

KİMYASAL MİKROBİYOLOJİ

Bakterilerin Kimyasal Yapısı

01. İnorganik Maddeler

Mikroorganizmaların yapısında bulunan inorganik maddelerin başında su gelir. Bakterilerin vegetatif formlarında, %70-90 arasında bulunan su, sporlarda ise %5-20 kadardır. Bakterinin geri kalan kısmı kuru maddeyi oluşturur. Bu kuru maddede, karbon, hidrojen, oksijen, nitrogen ve kül (P_2O_5 , Na_2O , MgO , CaO , SiO_2 , SO_2 , FeO) bulunur. Mineral elementlerin başında, Ca, P, K, Na, Mg, Mn, Fe, Co ve iz halinde Cu, Al, Zn, Mo vardır.

02. Organik Maddeler

Organik kısım bakteri kuru ağırlığının %40-90'ını oluşturur. Organik bileşiklerin bazıları makromolekül (protein, polisakkarid, lipid, nukleik asit, vs.) ve diğer kısmı da mikromolekül (aminoasitler, monosakkaridler, organik asitler, koenzimler, v.s) halinde bulunur. Başlıca organik komponentler

02.01. Proteinler

Proteinler, birbirlerine peptid bağları ile birleşmiş amino asit monomerlerinden oluşmuş yüksek molekül ağırlığına sahip organik polimerlerdir. Her protein molekülü, 20 tür amino asitin polipeptid zincirinde özel dizilişine sahiptir ve bu durum proteinlerin fonksiyonlarının spesifitesini meydana getirir. Proteinlerin molekül ağırlıkları on bin ile yüzbin arasında değişir. Proteinlerin, bakterinin gelişmesinde önemleri çok fazladır. Bu proteinlerin bir kısmı saf ve kristal halde elde edilebilmiştir. Bakteri proteinlerinde, genellikle, L-amino asitler daha fazla bulunur. D-amino asitlere, hücre duvarında, kapsülde (*B. anthracis*'in) ve bakteriler tarafından sentezlenen antibiyotiklerin bileşiminde rastlanır. Bakteri proteinlerinde, bütün amino asitler vardır. Proteinlerin büyük bir kısmı, ya lipidlerle (lipoprotein) veya karbonhidratlarla (glikoprotein) birleşmiş haldedir. Bu konjuge proteinlere en fazla hücre duvarı ve sitoplasmik membranda rastlanır. Bakteri flagellasında bulunan ve özel yapıya sahip olan protein (flagellin), salmonellalarda türleri birbirinden ayırmada kullanılır. Fimbria proteini (pilin) de aynı şekilde türlere özgü bir karakter gösterir. Bakteri proteinleri, aynı diğer proteinler gibi, fiziksel (ısı, ışık, UV-ışınları, vs.) ve kimyasal (asit, alkali, dezenfektanlar, vs. maddelere) karşı duyarlıdırlar. *B. stearothermophilus*'un sentezlediği alfa-amilase, 85 °C' de 20 saat kalmakla aktivitesinin ancak %29'unu kaybeder.

02.02. Karbonhidratlar

Karbonhidratlar, bakterilerde, çeşitli yerlere (kapsül, hücre duvarı, nukleik asitler) lokalize olmuşlardır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarında %15-20 oranında bulunan karbonhidratlar, Gram pozitiflerinkinde %35-60 arasındadır. Bazı bakterilerin içinde, enerji

ve karbon kaynağı deposu ödevini gören nişasta veya glikojen granülleri glukoz polimerlerinden oluşmaktadır. Bakteri polisakkaridleri, ya tek tür monosakkaridden oluşmuş homopolisakkarid ya da ayrı tür monosakkarid monomerlerinden meydana gelmiş heteropolisakkarid veya kompleks polisakkarid (lipopolisakkarid, glikoprotein, glikolipid, vs) halindedirler.

a) Homopolisakkaridler: *Acetobacter* 'lerde glukoz, leuconostok ve streptokok türlerinde dekstran, *A. levantium* 'da levan, *M. mycoides* 'de galaktan, *B. polymyxa* 'da mannan, bu tür polisakkaridlere örnek verilebilir. Enterobakterilerdeki Vi-antijeni, D-galaktoz-aminuronik asit yapısındadır.

b) Heteropolisakkaridler: A-grubu streptokoklardaki hyaluronik asit, bu tarz bir özellik gösterdiği gibi, bu grup mikroorganizmalardaki substans-c'de L-rhamnoz ve N-asetil glukozamin karakterindedir. *S. pneumoniae* tip-III'ün kapsülünde cellobiuronic asit'in tekrarlanan üniteleri vardır. Gram pozitif mikroorganizmalarda yüzeye yakın olarak bulunan, teikoik asit bir gliserol fosfat veya ribitol fosfat bileşiğidir. *L. casei* ve *S. faecalis* 'de gliserol teikoik asit bulunmasına karşın, *B. subtilis* 'de ribitol teikoik asit vardır.

c) Kompleks polisakkaridler: Gram pozitif ve az olarak da Gram negatif mikropların hücre duvarının bileşiminde bulunan peptidoglikanın yapısında, N-asetil muramik asit, N-asetil glukoz amin ve tetrapeptid bulunur. Muramik asite hücre duvarından başka, bakteri sporlarının korteksinde de rastlanır. *B. subtilis* 'den teikuronik asit (glikronik asit polimeri + N-asetil galaktoz amin) izole edilmiştir.

Gram negatif bakterilerin hücre duvarında protein, lipid ve karbonhidrat fazlaca bulunur. Hücre duvarından elde edilen lipopolisakkarid, endotoksik bir özelliğe sahiptir. Bu lipopolisakkaridin, polisakkarid porsiyonu, O-antijenini oluşturur. *Chromobacterium violaceum* 'un lipopolisakkaridinde fukose amin ve viose amin; *S. typhosa* 'da tyvelose; *S. abortus equi* 'de abequose; *S. paratyphi-A* 'da paratose; *E. coli* 'de de colitose ve *Y. pseudotuberculosis* 'de ascarylose bulunur.

02.03. Lipidler

Mikroorganizmalarda lipidlere genellikle bileşikler halinde rastlanır (lipoprotein, lipopolisakkarid). Gram negatif mikroorganizmaların hücre duvarında ve sitoplasmik membranında lipid bileşikleri fazla bulunur. En fazla rastlanan lipidler arasında, *E. coli* 'de cylopropane asit, palmitic asit, cis-vaccenic asit; *E. coli* 'nin endotoksininde beta-hydroxy myristic asit; *P. aeruginosa* 'da beta-hydroxy asit; *Agrobacter tumefaciens* 'de cis-vaccenic asit; *S. marcescens* 'de palmitic asit ve 9, 10-methylen hexadecanvic asit; mikoplasmalarda çift sayılı ve doymamış yağ asitleri, kolesterol ve az oranda caprilic asit ve capric asit bulunur.

Gram pozitif mikroplarda da lipidlere, değişik ve aynı Gram negatiflerinkine benzer yapıda rastlanmıştır. *L. arabinosus* 'da cis-vaccenic asit ve lactobacillic asit fazla bulunur. Bu son asit, streptokoklarda yoktur. Laktobasillerde palmitoleic asit ve cis-vaccenic asit esas olarak bulunur. *B. subtilis* 'de branşlı zincire sahip yağ asitleri vardır. *M. tuberculosis* 'de tuberculostearic asit, phthioic asit, mycocerosic asit, phthiocerol ve mycolic asit; *C. diphthriae* 'de kısa zincirli mycolic asit (corynemycolic asit); diğer asido-rezistens mikroplarda çeşitli yağ asitlerine, rastlanmıştır.

02.04. Nukleik asitler

Bakterilerdeki nukleik asitler, RNA (ribonukleik asit) ve DNA (deoksiribonukleik asit) karakterindedir. DNA, genellikle, sabit bir durum göstermesine karşın, RNA üreme durumuna göre değişmektedir. Bakteri kuru ağırlığının %2-5'ini oluşturan nukleik asitlerin moleköl ağırlıkları milyonun üstündedir. Bakteride başlıca 3 tür RNA vardır. Bunlarda, ribosomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) ve mesenger RNA (mRNA)'dır.

Bakterilerdeki DNA, sarmal ve çift iplikçikli iki adet polinukleotid'den oluşmuştur. Yapısında, pürin veya pirimidin bazlarından biri + pentoz şekeri (2-D-oxy D-riboz) + fosforik asit (H₃PO₄) bulunur. RNA'da ise pentoz şekeri sadece D-riboz olur.

03. Diğer Maddeler

Serbest kükürt (beğgiatoa ve bazı spirillerde), pigment maddeleri (pigmentli bakterilerde), vitaminler (azotobakter ve maya hücrelerinde), çeşitli enzimler (bütün mikroorganizmalarda), antibiyotikler (streptomyces türü mantarlarda, bazı bakteri ve basillerde, diğer bazı mantarlarda) rastlanmıştır.

Bakterilerde Enzimler

01. Genel Bilgiler

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, organik ve katalitik kimyasal bileşiklerdir. Bunlar, hücre içindeki biyokimyasal reaksiyonları hızlandırır ve reaksiyona giren maddelerle (substrat) geçici kimyasal birleşmeler yaparlar. Bunların yardımı olmadan reaksiyonlar çok yavaş cereyan eder. Enzimlerin iştirak ettiği reaksiyonların hızı, enzimsiz olanlardan, 10⁸-10¹⁰ defa daha fazladır. Mikroorganizmaların enzimleri hücre içinde sentezlenirler. Bunların bir kısmı, asimilasyon ve dissimilasyon olayları için, hücre içinde alıkonulurlar (endoenzimler, intrasellüler enzimler). Diğer bir kısmı ise, dış ortama salgılanarak, büyük molekülü maddelerin (protein, polisakkarid, lipid, vs.) hidrolizasyonunda görev yaparlar (ekzoenzimler, ekstrasellüler enzimler). Reaksiyonların başında substratlarla geçici bileşikler oluşturan enzimler, reaksiyon bittikten sonra onlardan ayrılarak yeni

reaksiyonları katalize etmek için eski formlarına dönerler. Kaybolmadıkları için çok az miktarı (bir kaç molekül) bile kısa bir süre içinde çok sayıdaki biyokimyasal reaksiyonları katalize edebilir. Örn; 2 ml konsantre trypsin, 37 °C' de ve pH 7.5' de, 2.5-3 kg. sığır etinin hidrolizasyonu için yeterlidir. Saf enzimlerde bu oran genellikle 10-5 ile 10-6 arasındadır.

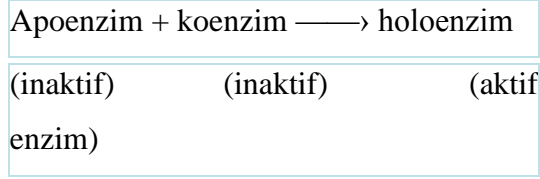
Enzimlerin sentezinde ve yapısında oluşan çok az değişmeler bile, enzimin aktivitesine olumsuz yönde etkilediğinden, bunların katalize ettiği biyokimyasal reaksiyonların bozulmasına veya yön değiştirmesine neden olur. Bu değişiklikler sonu, gelişme ve üreme durabilir ve bakteriler ölebilirler. Her enzim substrat üzerinde, ancak bir kademeli reaksiyonu katalize edebilir. Bu nedenle, metabolizma olayları sırasında, bir seri enzim reaksiyonları devreye girer ve birbiri ardı sıra devam ederler. Enzimler spesifiktir ve substrata özeldirler. Örn, proteinlere etkileyenler karbonhidrat ve lipidlere tesir etmezler; L-amino asitleri hidrolize edenler, D-amino asitlere etkilemezler; L-arginin'e tesir eden (arginase), D-arginin için etkisizdir. Bu tarz etkileme, enzim molekülü ile substrat molekülü arasındaki özel kimyasal ilişkiden ileri gelmektedir.

Hücrelerde enzim reaksiyonları genellikle geriye dönüşebilir (reversible) ve ortamda yeterince yeni ürünler birikince veya substrat tam hidrolize olunca, reaksiyon yavaşlar ve durur. Ancak, bakterilerde hücre içinde sentezlenen enzimlerin bir kısmı dışarı salgılandığından, böyle enzimlerin sentezlenmesi genellikle duraklamaz.

Enzimler protein yapısında ve kolloidal karakterde olduklarından, fiziksel (ısı, pH, UV-ışınları, osmotik basınç, vs.) ve kimyasal (asit, alkali, metabolitler, mineraller, vs.) faktörlerden etkilenirler. Etanol ve amonyum sulfatla presipite olan ve membranlardan diyalize olmayan enzimler, 10000 ile milyon arasında değişen yüksek bir molekül ağırlığına sahiptirler. En küçük enzimde 100 kadar amino asit bulunmaktadır (ribonuklease 125 amino asit ve MA 14000). Enzim spesifitesini oluşturan nedenlerin başında, bunların yapıları gelmektedir. Enzimlerin yapısı, polipeptid zincirindeki aminoasitlerin sayısı ve dizilişi (primer yapı), peptid zincirinin helikal durumu (sekonder yapı) ve peptidlerin kendi üzerine katlanma tarzları (tersiyer yapı) olmak üzere, başlıca 3 ayrı özellik gösterir. Enzimlerin yapısı ve enzim reaksiyonları genetik kontrol altındadır.

Enzimler birbirlerinden az-çok farklı 2 kısımdan oluşurlar. 1-Apoenzim: Protein karakterinde, kolloidal, ısıya dayanıksız, diyalize olmayan ve inaktif bir kısım (polipeptid zinciri veya zincirleri) 2- Koenzim (prostetik grup): Protein karakterinde olmayan, ısıya dayanıklı (termoistabil), düşük moleküllü ve inaktif organik bir kısım. Bu iki inaktif kısım birleşince aktif enzim (holoenzim) meydana gelir (konjuge enzim). Bu nedenle de, enzimler, düşük

molekül ağırlığına sahip organik bir moleküle (koenzim) bağlanmış proteinler (apoenzim) olarak ta tanımlanabilirler.



Koenzimler, apoenzimlerle bazen sıkı bazen de zayıf bağlarla bağlanmışlardır. Koenzimlerin, enzim aktivitesinde önemleri çok fazladır. Enzimlerin etkin bölümünü oluşturan koenzimlerin yapısında vitaminler de (tiamin, riboflavin, niasin, pantotenik asit, folik asit, pridoksin) bulunur. Örn. tiamin (Vit. B1), kokarboksilase koenziminin yapısına giren bir komponenttir. Pantotenik asit, koenzim A (Co-A)'nın; Vit. B1, flavin adenin dinukleotid (FAD)'nin; pridoksal da dekarboksilase ve transaminase'ların bir bölümüdür. Koenzimlerin en önemli görevlerinden biri de, substrattan 2 elektronlu hidrojen çekirdeğini alarak onu okside etmesidir.

02. Bakteri Enzimlerinin Karakterleri

Bakteri enzimleri başlıca iki genel bölüm altında incelenebilirler. Bunlar da:

1) Ekstrasellüler enzimler (ekzoenzimler): Bu enzimler hücre içinde sentezlendikten sonra dışarı salınarak buradaki gıda moleküllerinin ayrışmalarını ve hücre duvarından geçebilecek düzeye inmelerini katalize ederler. Bu tarz aktivite gösteren enzimler (hidrolitik enzimler) arasında, başlıca, proteinase'ler (peptidase, jelatinase, kollajenase, kazeinase, fibrinolizin, vs), karbohidrase'ler (sellülase, amilase, maltase, laktase, sukrase, hıyaluridase, vs) ve lipase'ler, nuklease ve diğerleri bulunmaktadır. Bakteriye toksik substansların bir kısmı da enzim özelliği taşırlar.

2) İntrasellüler enzimler: Bu tür enzimler de hücre içinde sentezlenmelerine karşın, dışarı çıkmayarak burada dissimilasyon ve asimilasyon reaksiyonlarında etkinlik gösterirler. Endoenzim olarak ta tanımlanan bu özellikteki enzimler arasında, başlıca permease'ler (sitoplasmik membranda bulunurlar ve aktif transportta etkinlikleri vardır, beta galaktosidase gibi), hidrolase'ler (hücre içinde hidrolitik reaksiyonlarda görev yaparlar), oksidoredüktase'ler (hücre içinde oksidasyon redüksiyon olaylarında elektron transferini katalize ederler), transferase'ler (karbonhidrat metabolizmasında ve yüksek enerjili fosfat bağlarının kurulmasında fonksiyonları vardır), DNA polimerase (DNA'nın replikasyonunda), RNA polimerase (DNA iplikçiklerinin birinden mRNA'nın meydana gelmesini katalize eder), nuklease (DNA ve RNA'ların ayrışmasında), restriksiyon endonuklease (DNA üzerinde belli baz aralıklarından kesmeler yapar), DNA ligase (DNA'daki kopmaları tamirde ve

birleştirmede fonksiyonu vardır), peptidil transferase (iki aminoasit arasında peptid bağlarının kurulmasını katalize eder) ve bunlardan ayrı olarak, sayıları 100'leri geçen diğer fonksiyonel enzimler bulunmaktadır.

Yukarıda bildirilen, görev yerlerine ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılan enzimlerin bazıları devamlı kullanıldıkları ve hücre dışına salındıkları için kesintisiz olarak sentezlenirler. Bunlar aynı zamanda hücrenin bulunduğu ortamla bir ilişkisi yoktur. Devamlı salgıladıkları için hücrenin bir parçası olarak kabul edilen bu enzimlere yapısal enzimler adı verilir. Ekzoenzim ve endoenzimlerin büyük bir kısmı böyle bir özelliğe sahiptir. Bazı enzimler de devamlı sentezlenmeyip ortamda, bunun sentezini indükleyecek bir substratın bulunması gerekmektedir. İndüklenebilen enzimler olarak tanımlanan bu enzimler, ortamdan substrat kaldırılırsa veya tükenirse, bunların sentezleri de durur. Örneğin, bileşiminde laktoz bulunan besi yerinde *E. coli* üretilirse, bunu parçalayan beta-galaktosidase enzimini sentezlenir. Laktoz ayrışıp bitince bu enzimin sentezi de sona erer.

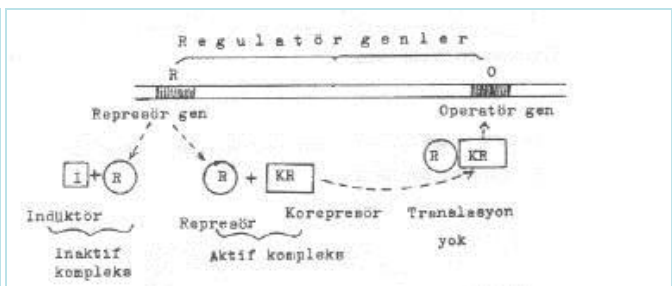
Bakteriyel enzimlerin bazıları, lipopolisakkarid membranda (reseptör görevi yapan proteinler, fosfolipase A ve lizofosfolipase, vs), periplasmik aralıkta (transmembran transportta ve kemotaksiste görev alan, elektrolit bağlayan enzimler, fosfatase ve esterase,vs) ve sitoplasmik membranda (hücre duvarının sentezinde fonksiyonel enzimler, proton translokasyonu, ATPase ve bazı elektron-transfer proteinleri permease'ler vs.) lokalize olmuşlar.

08. Enzim Sentezinin Regülasyonu

Mikroorganizmalarda enzim sentezinin kontrolü başlıca iki mekanizma tarafından regüle edilir. Bunlardan biri indüksiyon (enzim sentezinin uyarılması) ve diğeri de represyondur (enzim sentezinin baskılanması). Her ne kadar bu iki aktivite birbirine ters gibi görünürlerse de, genellikle, canlıların yaşamında her ikisinin rolü ve etkinliği oldukça önemlidir.

İndüksiyon da, ortamda özel indüktörlerin bulunduğu durumlarda enzimlerin sentezi veya salgılanması işlevi meydana gelmektedir. Özellikle, indüklenebilen enzimler (beta-galaktosidase, beta galaktoside permease, vs.) buna iyi örnek oluştururlar.

Represyonda regülör bir protein olan represörün korepresörle birleşerek oluşturduğu aktif kompleksin DNA'da bulunan operatör gen bölgesine bağlanması ve böylece genin fonksiyonu



önlenecek mRNA sentezinin baskılanması sonucu enzim sentezi de gerçekleşemez.

Represyon başlıca 2 tarzda meydana gelebilmektedir.

1) Son ürün inhibisyonu (Feedback represyonu): Birçok bakteri (Örn. *E. coli*) ürettiği ortamda metabolik aktivite sonucu bazı son ürünlerin oluşması (amino asitler gibi), enzimin aktivitesi üzerine olumsuz yönde etkileyerek, enzim sentezini durdurabilir. Eğer, son ürünler azalır ve minimal düzeye inerlerse etkinlikleri de kaybolur ve bu zaman enzim sentezi tekrar başlar (derepresyon). Örn., *E. coli*, minimal besi yerinde (arginin olmayan) üretilirse arginin biyosentezi normal olarak yürütülür. Eğer, besiyerine arginin 20 µg/ml olacak tarzda katılırsa enzim (Ornithin Carbomoyl Transferase) sentezi deprese olur. Böyle besi yerinden çıkarılan *E. coli*'ler yıkandıktan sonra (argininden kurtarılsa) minimal ortama ekilirlerse tekrar arginin biyosentezi gerçekleşebilir ve ortamda enzim konsantrasyonu artmaya başlar.

Glutamat → Ornitin → Citruline «⇌» Arginin (son ürün)

2) Katabolik represyon: Eğer, *E. coli*'ler, içinde hem glikoz ve hem de laktoz (veya, glikoz+sorbitol; glikoz+asetat) bulunan bir besiyerine ekilirse, önce glikoz kullanılır ve laktoz ayrıştırılmaz. İki substrat aynı anda katabolize edilemez ve genellikle, tercihen glikoz metabolize edilir: Eğer ortamda glikoz ayrışır ve biterse bu defa ikinci substrat kullanılmaya başlar. Burada, ikinci substratı ayrıştıracak olan enzim ilk aşamada inhibe edilerek sentezi önlenir. Bu tarz inhibisyon "katabolik represyon" olarak tanımlanır.

Bakteri Metabolizması

01. Genel Bilgiler

Mikroorganizmaların yaşamaları, büyüme, gelişme ve üremeleri için beslenmeleri ve bu nedenle de buldukları ortamlardan gerekli besin maddelerini almaları şarttır. Bakterilerin gıda maddelerinden yararlanabilmesi, bunların, hücre duvarından ve sitoplasmik membrandan geçebilmesine bağlıdır. Dış ortamda veya çevrede bulunan ve hücreye yararlı maddelerin molekülleri, genellikle, büyük olduğundan hücre duvarından geçemezler. Bunların aktif transportla geçebilecek bir düzeye indirilmeleri gereklidir. Bu görevi, bakteriler tarafından sentezlenen ve dışarı verilen hidrolizan enzimler (ekzoenzim) yerine getirirler.

Mikroorganizmaların dışındaki ortamda ekzoenzimler yardımı ile hücre membranlarından geçebilecek boyutlara indirilen gıda maddeleri (protein, karbonhidrat, lipid, v.s.), içeri

girdikten sonra da, sitoplazma içinde, ayrışmasına devam edebilir ve en küçük yapı taşlarına dek ayrışabilirler. Lüzumlu olduğu durumlarda da fazla ayrışmadan üniteler halinde hücre içinde ve özel depolarda tekrar kullanılmak üzere muhafaza edilebilirler. Sitoplasmada devam eden ayrışma olaylarını, içerde kalan ve dışarı bırakılmayan, endoenzimler katalize ederler (disimilasyon-katabolizma). Mikroplar, sonradan bu yapı taşlarından veya daha büyük moleküllerden, kendilerine lüzumlu olan maddeleri (protein, polisakkarid, lipid, enzim vs.) sentezler (asimilasyon-anabolizma). Bu iki ve çok önemli olan ve birbirini izleyen biyokimyasal olay, bakterilerde metabolizmayı oluşturur. Metabolik olaylar, birçok enzimlerin katalitik etkisiyle basamak basamak ve ardışık olarak yönetilir. Enzimlerde oluşabilecek en küçük değişimler, bu çok önemli ve seri biyokimyasal olayların bozulmasına veya yön değiştirmesine neden olurlar.

Üremekte olan hücrelerde metabolizma olayları devamlıdır ve birbirleriyle ilişkilidir. Anabolizma ile hücre tazelenir, tükenmiş olan ve lüzumlu bileşikler sentezlenir. Katabolizma da ise, sentez için gerekli enerji ve yapı taşları hazırlanır. Gıda azlığı, kuruma, sporlanma, minimal ısının altında bulunma, kimyasal mikrobistatiklerin etkisi, vs. diğer nedenlerle metabolizma azalacağı gibi donma olaylarında da tamamen durabilir.

Katabolizma olaylarında gıda maddelerin ayrışması sonu önemli miktarda enerji açığa çıkar (ekzergonik reaksiyonlar) ve bu enerji, yüksek enerji bağları halinde, ADP (adenosin difosfat) ve ATP (Adenosin trifosfat) tarafından alınarak kendi fosfat bağları arasında muhafaza edilir. Sentez olayları için gerekli olan enerji bu bağlardan sağlanarak yürütülür (endergonik reaksiyonlar).

Mikroorganizmalarda metabolizma başlıca üç temel grupta incelenir. Bunlar da;

- 1) Karbonhidrat metabolizması,
- 2) Lipid metabolizması,
- 3) Protein ve amino asit metabolizması.

02. Karbonhidrat Metabolizması

Karbonhidratlar, karbon (C), hidrojen (H) ve oksijenden (O) oluşmuş organik bileşiklerdir. Bu komponentler, kendi aralarında $(CH_2O)_n$ oranında bir araya gelmişlerdir. Karbonhidratlar heterotrofik mikroorganizmalar için enerji kaynağı ve karbonları da organik bileşiklerini sentezlerken yapı taşları olarak görev yaparlar. Karbonhidratlar yapılarında bulunan (karbon atomları sayısına göre) kısımlara ayrılırlar. Mono ve disakkaridler (şekerler) suda kolayca erir, kristalize ve diyalize olabilirler. Buna karşılık polisakkaridler, suda erimezler ve diyalize de olmazlar.

02.01. Karbonhidratların Sentezi

Polisakkaridlerin sentezi, monosakkaridlerden başlar. Dışardan hücreye giren veya hücre içinde bulunan monosakkaridler arasında glikozid bağının kurulması suretiyle polisakkaridler sentezlenirler. Bu sentez olayı bakterilerde başlıca iki tarzda yürütülür:

1- Fosforilasyon: Fosforilase enzimleri tarafından katalize edilen bu reaksiyonda monosakkarid üniteleri arasında glikozid bağı kurularak polisakkaridler sentezlenirler.

2- Transglikozilasyon: Bu reaksiyonda, glikozid bağının bir üniteden diğerine aktarılması ile, yeni bağlar kurulur ve polisakkaridler oluşturulur.

Hücre duvarı mukopeptidlerin sentezi: Gram pozitif ile Gram negatif bakterilerin hücre duvarları arasında farklar bulunmaktadır. Birincilerde çok az lipid bulunmasına karşın, Gram negatiflerde lipid miktarı daha fazladır. Fakat, her ikisinde de ortak olan bir çatı peptidoglikan (peptid zincirleri tarafından kovalent çapraz bağlarla birleştirilmiş olan paralel polisakkarid zincirleri) bulunur. Ancak, buna bağlanan ek komponentler arasında ayrılıklar vardır. Bakteri hücre duvarlarının sentezi başlıca 3 aşamada gerçekleşir.

1- Birinci dönemde, hücre içinde DP'ye bağlı olarak N-asetil muramil penta peptid sentezi (UDP -N- asetil muramil penta peptid) yapılır. Bu önemli madde, UDP (üridin difosfat) derivatifi halinde kendi prekürsorleri olan N-asetil glukozamin, fosfoenolpirüvat ve 5 amino asit ünitesinden sentezlenir. Birinci periyodun sonuna doğru, tekrarlanan şeker ünitelerinin tripeptid yan zincirlerine dipeptid D-alanil D-alanin bağlanır.

2- İkinci dönemde, biyokimyasal reaksiyonlar sitoplasmik membranda cereyan ederler. Birinci periyodda sentezi tamamlanan UDP -N-asetil muramil pentapeptid enzimatik olarak, UDP'den ayrılarak, membranda bulunan ve buna bağlı bir lipid intermedieri olan undekaprenil fosfata transfer edilir. Sonra bu bileşiğe, UDP-N-asetil glukoz amin ilave edilerek, peptidoglikan omurgasını tekrarlanan disakkaridleri oluşturulur. Bundan sonra da, bu disakkaridler peptid zinciri ile çapraz bağlanır. Bu zincirin uzunluğu ve amino asit kompozisyonu bakteriler arasında değişiktir. *S. aureus* 'da, bu zincir pentaglisindir.

3- Üçüncü dönemde, transpeptidasyon reaksiyonu ile paralel peptidoglikan zincirleri arasında çapraz bağlantı kurulur ve çapraz bağlayan zincirin terminal glisin molekülü, bitişik peptidoglikan zincirinde bulunan N-asetil muramil penta peptid molekülünün penta peptid yan zincirinin ucundan D-alanini çıkarır ve böylece, birbirlerine çapraz bağlanmış disakkarid üniteleri peptidoglikan sentezlenmiş olur. Bu dönem sitoplasmik membran dışında cereyan eder.

Bazı Gram pozitif mikroorganizmalarda bu sağlam peptidoglikan çatı, teikoik asit tabakası ile kaplıdır. Buna karşılık, Gram negatif mikroorganizmaların bazılarında (*E. coli*) peptidoglikan, çatı kompleksi polimerik lipopolisakkaridle (LPS) örtülüdür.

Hücre duvarı polisakkaridlerinin sentezi: Gram negatif mikroorganizmalara antijenik özellik kazandıran tip spesifik polisakkaridlerin sentezi de, aynı mukopeptidlerin sentezlerine benzer.

Kapsül polimerlerinin sentezi: Desktran ve levanlar, disakkaridler (sakkaroz) kullanılarak sentezlenirler. Bu da ortamda sakkaroz ünitelerinin varlığına bağlıdır. Bakterilerde bulunan hyaluronik asit sentezi de benzer yollarla yapılır.

Hücre içi depo polisakkaridlerinin sentezi: Bazı hücreler içinde enerji ve karbon kaynağı olarak polisakkaridler (nişasta, glikojen) biriktirilir. Bunlar, gıda maddesi olarak, dış ortamdaki besin maddelerinin azaldığı durumlarda kullanılır.

03. Lipid Metabolizması

Lipidler, çeşitli bileşikler halinde, mikropların hücre duvarında (özellikle, Gram negatiflerde), sitoplasmik membranda ve gıda deposu olarak ta hücre içinde bulunurlar. Mikobakterilerde de hücre duvarında balmumu halinde ve çok fazla miktarda lipidlere rastlanılır. Lipidler genellikle, yağlar (yağ asitlerinin gliserin esterleri), balmumu (yağ asitlerinin monoalkol esterleri) ve kompleks lipidler (fosfolipid, lipopolisakkarid, lipoprotein, v.s.) halindedirler.

Lipidler, karbon (C) ve hidrojenden (H)oluşmuş organik bileşiklerdir. Yapılarında, ayrıca, fosfor (P), nitrogen (N) ve sülfür (S) bulunabilir.

03.01. Lipidlerin Ayrışması

Mikroorganizmalarda bulunan hidrolitik enzimlerden, lipaselar yağları esas komponentlerine ayırır. Lipidler, hidrolize olunca, yağ asitleri ve gliserin meydana gelir.

03.02. Lipidlerin Sentezi

Mikroplarda lipidlerin sentezi, üredikleri ortamdaki karbon bileşiklerinin karakterine bağlıdır. Asetat, laktat ve glukoz içeren ortamlarda, *Mycobacterium phlei* ürediği zaman, kafi derecede lipid sentez ederek asido-rezistans hale gelmesine karşın, karbon kaynağı ihtiva etmeyen aynı besi yerinde, asido-rezistans karakter oluşmamaktadır.

Gliserin, genellikle, glukozla oranla lipid oluşturmada daha aktiftir. *B. subtilis*, glukoz ve maya ekstratı ihtiva eden ortamlarda, 6-branşlı zincir ile iki-düz zincirli yağ asitlerini sentez eder. Eğer besi yerine kısa zincirli yağ asitleri (propionik asit, butirik asit, v.s.) katılırsa uzun zincirli yağ asitleri sentezinde artma meydana gelir. Mikobakterilerde ve mayalarda, sature olmamış yağ asitlerinin sentezi, terminal elektron alıcısı olarak, moleküler oksijene bağlıdır.

Uzun zincirli yağ asitlerinin monomerik prekürsörleri Acetyl-CoA ile malonyl-CoA'dır. Malonyl-CoA, CO₂ ve acetyl-CoA'dan biotin gerektiren reaksiyon sonucu meydana gelir. Yağ asitlerinin sentezi, genellikle, malonyl-CoA'dan başlar.

Yağ asitlerinin sentezi, prekürsörlerden başlayarak bir seri reaksiyonlar sonunda gerçekleştirilir. Sentez için gerekli enerji ATP'den sağlanır. Önce acetyl-CoA, asetilasyona maruz kalarak malonyl-CoA meydana gelir. Bunu izleyen seri reaksiyonlardan sonra palmitik asit sentezlenebilir.

Birçok bakteriler de, asetatları poli-beta hidroksibutirik asite çevirerek hücre içinde muhafaza ederler. Bazı mikroorganizmalar (mikobakteri, korinebakteri, nokardia) lipidleri, 30-90 karbon atomlu yağ asitleri halinde depolarlar.

Gram negatif bakterilerde bulunan lipopolisakkaridler ve Gram pozitif bakterilerdeki ribitol veya gliserol teikoik asit sentezleri yüzey makromolekül olması ve bu mikroorganizmaların antijenik özelliklerini tayin etmesi bakımından önem taşımaktadırlar. Enterobakterilerde lipid, merkez polisakkaride ve bu da tip spesifik olan ve O-antijenik özelliğini oluşturan polisakkaridlere bağlanmıştır. Teikoik asit, ribitol veya gliserol ihtiva eden polimerdir. Teikoik asitlerin ekserisi, birbirine fosfodiester köprülerde bağlanmış polyolların tekrarlanan ünitelerinin oluşturduğu bir omurgadır. Genellikle, glukoz veya N-acetylglucose aminden meydana gelen şekerler, polyollere glikozid bağlarla birleşmişlerdir. D-alaninde aynı şekilde, polyollara ester bağları ile birleşmiştir. Polimer, ya hücre duvarına (ribitol veya gliserol polimerleri halinde) veya sitoplasmik membrana (gliserol polimerleri olarak) bağlanmıştır.

04. Protein Ve Amino Asit Metabolizması

Proteinler, kompleks organik bileşikler olup hücrelerin esas yapılarını oluştururlar. Proteinlerin bileşiminde, genellikle, karbon (C) %50, oksijen (O) %25 nitrogen (N) %16 ve hidrojen (H) %7 bulunur. Bazı proteinler de %1 kadar sülfür (S) ihtiva ederler. Bir kısmında da ayrıca, fosfor, demir, çinko ve bakır da bulunabilir. Hücrelerde, yapı ve görevleri bakımından çok çeşitli proteinler vardır. Proteinler yüksek moleküllü (5000-bir milyon) olduklarında kolloidal solüsyonlar meydana getirirler ve diyalize olmazlar. Fiziksel (ısı, UV-ışınları, X-ışınları, v.s.) ve kimyasal faktörler (asit, alkali, deterjan, ağır metaller ve bunların tuzları, vs.) proteinler üzerine olumsuz etki yaparlar. Proteolitik enzimlerle veya asit hidrolizasyonla, kendilerini oluşturan amino asitlere ayrışırlar. Proteinler, 20 tür amino asitin değişik sıralarda yan yana gelerek oluşturdukları polipeptidlerden meydana gelmiş polimerlerdir. Amino asitler birbirlerine kovalent olarak peptid bağları ile birleşmiştir. Bu peptid bağ, bir amino asitin karboksil ucundan suyun çıkması ile, diğer amino asitin a-amino

grubu arasında kurulur. Polipeptid zincirinde yüzlerce amino asit vardır. Bazı proteinlerde bir ve diğerinde de birden fazla polipeptid zinciri bulunabilir. Her polipeptid zincirinin belli bir molekül ağırlığı, kimyasal yapısı, amino asitlerin sırası ve 3 boyutlu şekli vardır.

Proteinler yapılarına göre başlıca iki kısma ayrılabilirler. 1- Basit proteinler: Bu tür proteinlerden hidrolizasyon sonunda sadece amino asitler meydana gelir, diğer organik veya inorganik ürünler oluşmazlar. 2- Konjuge proteinler: Bunların hidrolizasyonu sonunda yalnız amino asitler değil, aynı zamanda organik ve inorganik komponentler de teşekkül eder. Proteinlerin amino asit olmayan kısmına prostetik grup adı verilir. Bu grubun kimyasal yapısına göre konjuge proteinler sınıflandırılabilirler (nukleoprotein, lipoprotein, fosfoprotein, flavoprotein, glikoprotein, v.s.).

Proteinlerin yapısı başlıca 4 karakter göstermektedir. Primer yapı: Polipeptid zincirindeki amino asitlerin türleri, sırası ve aralarındaki kovalent bağlanma, proteinin primer yapısını oluşturur. Sekonder yapı: Polipeptid zincirinin uzun eksen boyunca uzanması veya heliks oluşturmasıdır. Bu tür yapıya fibroz proteinlerde rastlanır. Tersiyer yapı: Polipeptid zincirlerinin kendi üzerine 3 boyutlu bükülerek sert ve sıkıca katlanmış yapı oluşturması durumudur. Kuaternar yapı: İki'den fazla polipeptid ihtiva eden proteinlerde, bu polipeptid zincirlerinin birbirleriyle birleşmeleri tarzıdır.

Proteinler, 60-70°C. ısıda veya maksimal pH limitlerinde, peptid zinciri omurgası dağılmadan, kendi özel katlanması açılabilir (denatürasyon). Bu durum proteinin biyolojik aktivitesinin kaybolmasına yol açar. Bazı hallerde de denatüre olan protein tekrar ilk katlanmış orijinal durumuna dönebilir (renatürasyon).

Hücrelerde bulunan serbest amino asitler ya proteinlerin ayrışmasından, ya da hazır olarak dışardan sağlanırlar. Hücre sitoplasmasında aminoasitleri muhafaza eden ve depolayan "amino asit deposu" veya "havuzu" vardır. Polipeptid sentezi için gerekli amino asitler buradan temin edilirler. Amino asitler organik asitlerden türetilirler ve bu asitlerde hidrojen, alfa pozisyonunda olup bunun yerini amin (NH₂) almıştır.

04.01. Proteinlerin Ayrışması

Proteinler, amino asitlerin yan yana gelerek birbirleriyle birleşmesinden oluştuğu için, bunlar arasındaki bağın çözülmesi, proteinlerin hidrolizasyonuna neden olur. Bu ayrışma işini, hidrolizan enzimler (proteinase) veya genellikle, asitler peptid bağına su ilave ederek yaparlar. Proteinase ve peptidaseler genellikle ekstrasellüler enzimler olup hücre dışındaki büyük moleküle sahip proteinleri hidrolize ederek küçük ünitelere (amino asitlere) ayrıştırırlar. Amino asitler hücre duvarından ve sitoplasmik membrandan içeri girebilirler. Bunlar hücre

içinde ya amino asit deposunda muhafaza edilir veya daha ileri aşamalara kadar hidrolize edilirler.

04.02. Amino Asitlerin Hidrolizasyonu

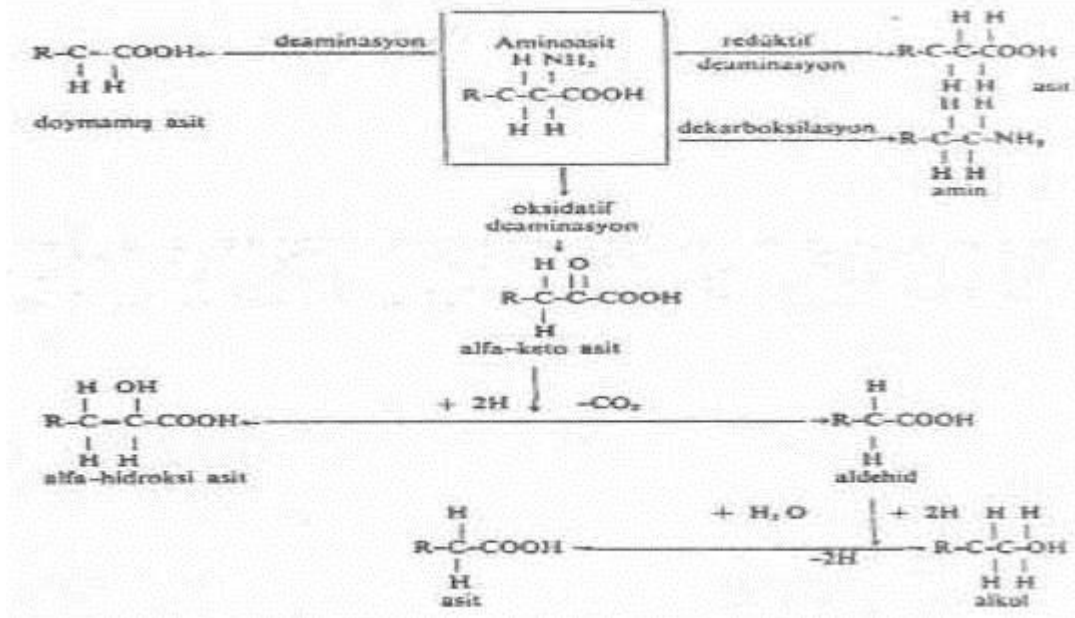
Mikroorganizmalar aminoasitleri başlıca 3 şekilde hidrolize ederler:

1- Deaminasyon: Bu tür amino asit hidrolizasyonu, bunlardan amin (NH₂) grubunun çıkması sonu meydana gelir. *E. coli* 'ler, glutamik asiti, oksidatif deaminasyonla, amonyak ve keto asite çevirir veya redüktif deaminasyonla NH₂ çıkarılarak, amino asit ayrıştırılır.

2- Dekarboksilasyon: Amino asitler, bunlardan karboksil (COOH) grubunun çıkarılması sonu ayrışır. Bu olayı karboksilase enzimleri katalize ederler ve reaksiyonun sonunda karbondioksit ve amin meydana gelir.

E. coli 'ler bu tarzda da amino asitleri ayrıştırabilir. Mikroorganizmalar özellikle asit karakterli ortamlarda üretildikleri zaman, amino asitler dekarboksilasyonla ayrışarak amin ve karbondioksit meydana gelir. Aminin oluşumu besi yerinin pH'sının yükselmesine neden teşkil eder. Deaminasyon daha ziyade alkali ortamlarda görülür.

3- Transaminasyon: Bu reaksiyonda, alfa-amino asitlerdeki amin grubu, alfa keto asite transfer edilir. Olay, transaminazlar tarafından katalize edilir. *E. coli* 'de transaminasyonla amino asit ayrıştırılmasına rastlanmıştır.



04.03. Amino Asitlerin Sentezi

Amino asitlerin sentezi, organik asitlerden orijini alırlar. Örn. bütün alifatik amino asitler sadece 4 ara maddeden (pirüvat, 3-fosfogliserat, okzalasetat, alfa-ketoglutamat) sentezlenebilirler.

04.04. Peptidlerin Sentezi

Amino asitler oluştuktan sonra bunlar arasında peptid bağları kurulmak suretiyle peptidler ve bunlar da birleşerek polipeptidleri meydana getirirler.

05. Nukleik Asitlerin Metabolizması

05.01. Nukleik Asitlerin Sentezi

Pürin nukleotidler: Bakteriler tarafından pürin nukleotidlerin sentezi birkaç yoldan sağlanır.

Pürin nukleotidlerin genel sentez mekanizması inosinik asit oluşumundan başlar. Bu asit sonradan adenin ve guanin ribonukleotidlere çevrilir. Pürin ribonukleotidler de redükte olarak deoksiribonukleotidleri meydana getirirler.

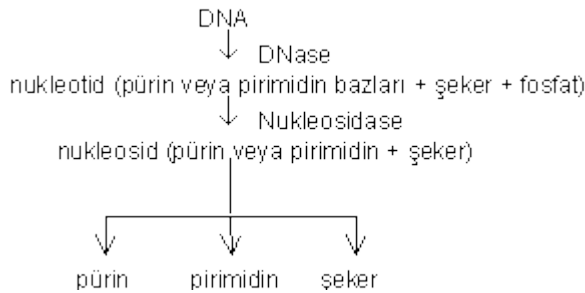
Bundan sonra pürin ribonukleotidler ve deoksiribonukleotidler fosforilasyon reaksiyonuna tabi tutulurlar.

Bu tarz pürin nukleotidlerin oluşturulması yanı sıra ikinci bir sentezleme yolu daha bulunmaktadır. Bu yolda, hücre içi depolarda bulunan serbest bazlar ve nukleotidlerden yararlanılır. Bunlar, kendilerine tekabül eden nukleotidlere çevrilirler.

Pirimidin nukleotidler: Pirimidin nukleotidlerin sentezi, genellikle uridin-5-fosfattan orijin alır. Bu önemli madde, bakteriler tarafından sitidin ve timidin nukleotidlere çevrilir. Bunlar redükte olarak, deoksiribonukleotidler oluşturulur. Böylece pürin ve primidin ribonukleotidler meydana getirilir. Sonra, protein sentezinde bildirilen mekanizma ile DNA'nın biyosentezi gerçekleştirilir.

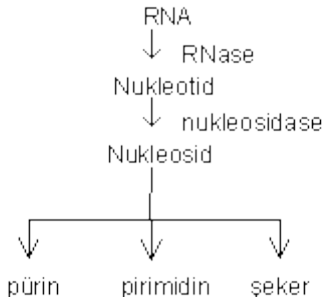
05.02. Nukleik Asitlerin Ayrışması

Deoksiribonukleik asitin ayrışması: DNA'nın ayrışması DNase aracılığı ile yapılır.



Oluşan ürünler de daha ileri devrelere kadar ayrışarak organik asitler, üre, karbondioksit ve diğer son ürünler meydana gelir.

Ribonukleik asitin ayrışması: RNA'nın ayrışması da RNase tarafından yönetilir. Ayrışma DNA'ninkine benzer bir tarz gösterir.



Bu maddeler de son ürünlere kadar ayrışır.

06. Enerji Metabolizması

Mikroorganizmalarda, enerji oluşturan oksidatif nitelikteki biyokimyasal olaylara biyolojik oksidasyon (biyooksidasyon) adı verilir. Oksidasyon, bir substratın oksijenle (O₂) birleşmesi veya substrattan, hidrojen (H⁺) ve elektronun (e⁻) çıkması olayıdır. Bir madde okside olurken diğeri redükte olur. Bu nedenle de biyooksidasyon bir oksidasyon-redüksiyon reaksiyonudur. Biyooksidasyon birbirini izler ve birlikte oluşurlar. Bir maddeden, hidrojen ve elektronun çıkması için, bir hidrojen alıcısına gereksinim duyulur. Hidrojen veren substrat okside olur ve alıcı da, hidrojen ve elektronla birleşerek, redükte olur. Bu sebeple de elektron veren redüksiyon yapan, ve elektron alan da oksidasyon yapan ajandır.

Biyooksidasyon başlıca iki tarzda oluşmaktadır:

1- Aerobik oksidasyon: İnorganik ve organik substratların, okside olarak moleküler oksijenle (O₂) birleşmesi bir aerobik biyooksidasyon olayıdır. Bu reaksiyon oksidase enzimleri aracılığı ile yürütülür. Aerobik oksidasyonda, tam bir oksidasyon meydana gelirse, açığa çıkan enerji çok fazla olur. Bu tarz biyooksidasyon, kemolitotrofik mikroplarda, toprak bakterilerinde, aerobik ve bazı fakültatif mikroorganizmalarda da görülebilir.

Bazı oksidasyon olaylarında da oksijen kullanılmasına karşın, tam bir oksidasyon meydana gelmeyebilir. Reaksiyon sonu oluşan ara ürünlerin atomları arasında bağlı olarak kalan enerjinin ancak bir kısmı açığa çıkar. Geri kalan kısmı ise bağlı kalır.

2- Anaerobik oksidasyon: Bu tür biyooksidasyon, fakültatif ve anaerobik mikroorganizmalar tarafından meydana getirilir. Anaerobik oksidasyonda, aerobikin aksine, hidrojen alıcısı olarak, oksijenin dışında, bir substrat kullanılır. Bu amaç için, inorganik (N, SO₄, S, C, KNO₃, NaNO₃, CO₂, CO vs) ve organik maddelerden yararlanılır (fermentasyon veya glikolizis).

Fermentasyon, anaerobik koşullarda, biyooksidasyon olaylarında, organik substratların hidrojen alıcısı olarak kullanılmasıdır. Anaerobik mikroorganizmalar hidrojen alıcısı olarak, oksijenden başka maddeler (inorganik veya organik) kullanırlar. Fakültatiflerde ise enzimler, hem aerobik ve hem de anaerobik koşullarda oksidasyon yapabilecek yetenektedirler.

Aerobik, fakültatif ve anaerobik mikroorganizmalar oksidasyon durumunu gösterir toplu tablo

Glikolizis (fermentasyon) olayına örnek olarak, genellikle, glukozun ayrışması gösterilir. Bu önemli karbonhidrat, aerobik ve anaerobik ayrıştığına göre, oluşan ürünler de değişik olur. Bu nedenle de fermentasyon ürünleri, substrat ve organizmaya bağlıdır.

Mikroorganizmalarda enerjinin çok önemli görevleri vardır. Biyokimyasal olaylar ancak enerji yardımı ile gerçekleştirilebilir. Bu enerji, ya ışıktan ya da kimyasal maddelerin (inorganik veya organik substratlar) biyooksidasyonundan sağlanır. Enerjiye en fazla sentez olaylarında gereksinme duyulur. Diğer fonksiyonlar da (hareket, hücre bölünmesi, aktif transport, bioluminesens, vs.) yine enerji yardımıyla oluşturulurlar. Biyooksidasyon reaksiyonları sonu açığa çıkan enerji, elektrostatik kuvvetle, ADP (adenozin difosfat) ve ATP'nin (adenozin trifosfat) fosfat bağları arasında muhafaza edilir.

Bakterilerde oluşan enerji ısı şekline dönüştürülemez. Aerobik oksidasyondan elde edilen enerji anaerobik oksidasyondan çok daha fazladır. Örn. glukozun aerobik oksidasyonunda 688 Kcal. ve 38 mol ATP elde edilmesine karşın anaerobik oksidasyonda sadece 54 Kcal. ve 2 mol ATP meydana gelir.

Enerji zengin bağlar: Substratların biyooksidasyonundan açığa çıkan enerji, özel ve hidrolize olabilir enerji zengin bağlar tarafından tutulurlar. Bu bağlar ADP ve ATP'nin fosfat atomları arasında saklı kalır ve bu bağlar hidrolize olunca enerji serbest kalır. ADP'de bir ve ATP'de ise iki adet böyle bağ bulunur. ATP hidrolize olunca AMP veya ADP haline dönüşür. Bunların tekrar, ATP haline gelebilmesi için bir seri reaksiyonlara (oksidatif fosforilasyon, substrat fosforilasyonu ve fotofosforilasyon) gereksinme duyulur. Bu reaksiyonlar ATP oluşturan çok önemli biyokimyasal olaylardır.

1- Oksidatif fosforilasyon: Substrattan, hidrojen ve elektron çıkarılarak, moleküler oksijene kadar aktarılmasında, birçok ara maddelerden (flavoprotein, sitokrom, NAD, NADH₂) geçirilir. Elektron aktarımı, bu işlemler sırasında, ADP'nin fosforilasyonu ile birlikte gerçekleştirilir.

2- Substrat fosforilasyonu: Bu tür fosforilasyon, Embden-Meyerhof biyokimyasal yolunda enerji zengin bağların meydana gelmesi ile ilişkilidir ve genellikle, ADP ve ATP üretilir. Örn. 3-fosfogliseraldehid, Pi bulunan ortamlarda, NAD tarafından oksitlenerek, 1,3-difosfoglisarik asit meydana gelir ve yeni fosfat grubu da ADP'ye aktarılır.

Hücrelerde, ADP ve ATP'den ayrı olarak, enerji içeren substanslar da bulunur. Bunlar arasında, sitozin trifosfat (CTP), guanozin trifosfat (GTP) ve uridin trifosfat (UTP) sayılabilir. Ancak, bunlar da enerjilerini ATP'den temin ederler ve çeşitli reaksiyonlara kanalize ederler.

06.01. Elektron Transportu

Substrat moleküllerinden, dehidrogenasyon yolu ile çıkarılan hidrojen ve elektron, diğer hidrojen alıcılarına özel taşıyıcı sistemlerin (elektron transport sistemleri) katalize ettiği reaksiyonlar aracılığı ile aktarılır. En iyi elektron taşıyıcı koenzimler arasında, NAD, NADP, riboflavinofosfat, FAD, çeşitli porfirinler bulunur. Substrattan, önce, NAD ile alınan hidrojen ve elektron, FAD'ye aktarılır. Buradan sitokrom oksidazlara geçerek havanın serbest oksijeni ile birleştirilir. Reaksiyonun sonunda H₂O₂ veya H₂O meydana gelir. Substrattan ilk hidrojeni alan dehidrogenase ve en son alan da oksijendir.

NAD (nikotinamid adenin dinukleotid): Dehidrogenasyon, reaksiyonu birçok hücrede genellikle, NAD veya NADP tarafından başlatılır. Bu koenzimler, önceleri, DPN (difosfo piridin nukleotid) ve TPN (trifosfo piridin nukleotid) olarak tanınırlardı. Bunlar, birçok apoenzimle birleşerek, esas aktif enzimin , özel substrat için, spesifitesini artırır. NAD'nin esas kısmını nikotin amid grubu oluşturur. Bu grubun piridin halkası, substrattan, hidrojen ve elektron alarak, NADH₂ haline redükte olur. Bu da sonradan, ikinci hidrojen alıcıya (FAD) hidrojeni vererek NAD ilk durumuna reokside olur.

FAD (flavin adenin dinukleotid): Sarı renkli ve bir koenzim olan FAD'nin bileşiminde vitamin -B2 (riboflavin) bulunur. FAD hidrojen alınca FADH₂'ye redükte olur. Bu sonradan hidrojen vererek FAD haline reokside olur. Hidrojen, FADH₂'den sitokrom sisteminin demir içeren pigmentine (sitokrom-b) aktarılır.

Sitokrom sistemi: Bu gruba ait sarı renkli pigmentler (a, a₃, b,c, ve diğerleri) aerobik ve fakültatif mikroorganizmalarda bulunur. Sitokrom pigmentlerinde demir vardır.

Bioluminesens: Floresens mikroorganizmalar tarafından ışık oluşturulması olayına bioluminesens adı verilir. Olay, biyooksidasyon reaksiyonlarında oluşan enerjinin ışık enerjisi haline dönüştürülmesidir. Pseudomonas ve vibrio türlerinde böyle ışık verebilen mikroplara rastlanır. Meydana gelen ışık mavi-yeşil olup dalga boyu 490 nm civarındadır. Işınımın bakteri ve mantarlarda devamlıdır. Mantarların ışığının dalga boyu 530 nm olup sarı-yeşildir. Bioluminesens olayında, serbest bulunan FMN (flavin mono nukleotid), NADH₂ tarafından redükte edilerek enzime (luciferase) birleşmesi sağlanır. Oluşan kompleks oksijenle okside olarak ışık vermeğe başlar. Işık fotonlarının çıkması ile, luciferase enzimini tekrar eski formuna dönüştürür.

07. Metabolizma Regülasyonu

07.01. Genel Bilgiler

Mikroorganizmaların yaşamaları ve üremeleri için beslenmeleri gereklidir. Mikroplar, çevrelerindeki gıdaları, kendileri tarafından sentezlenen ve çeşitli etkilere sahip

olan enzimleri yardımı ile yaralanabilecek duruma getirirler. Bu nedenle,enzimlerin aktivitesi mikroorganizmaların hayatları için zorunludur. Ancak, bunların da zamanında ve yeterince sentezlenmeleri ve koordine bir şekilde görev yapmaları önemlidir. Bu işlem bir regülasyon veya kontrollerle gerçekleştirilir. Enzim sistemlerinin sentezlenmeleri yönünden kontrolleri canlıların en önemli bir özelliğini oluşturmakla ve değişen çevre koşullarına çok yakından bağımlı bulunmaktadır.

Enzimlerin sentezlenme hızı ve miktarı ortamdaki gıda maddelerinin miktarı ve çeşidi ile ilişkilidir. Çok gereksinme duyulan enzimler yeterince ve devamlı olarak sentezlenirler ve bu devamlılık özel mekanizmalar tarafından kontrol edilirler. Bir bakteri hücresindeki bütün proteinleri sentezlemek için sayıları 600/800 'e kadar değişebilen enzime ihtiyaç vardır. En fazla gereksinim duyulan enzimler arasında proteinleri, karbonhidratları ve nukleotidlerin ayrıştırılmasında görev alanlarla, hücre duvarı, sitoplasmik membran ve ribosomların sentezlerinde vazife gören enzimlerdir. *E. coli* hücresinde,20 tane amino asit sentezinde lüzumlu olan bütün enzimler bulunur. Eğer ortama amino asitler katılırsa,bakteri hücresi,bu amino asitleri sentez için, kendisi özel enzim yapma işine girişmez. Bu durum,amino asitlerin sentezlenme işinde görev alacak enzimlerin imalinde bir gerileme veya duraklama meydana getirir.

E. coli biyokimyasal olayları incelemede kullanılan çok uygun bir mikroorganizma olup, dubleks karakterindeki kromozomunda 3000'den fazla proteini şifreleyebilecek kodlara sahiptir. Proteinlerin sentezi DNA üzerinde yerleşmiş olan gen veya genler tarafından yönetilir. Normal koşullar altında, yaşam için gerekli olan enzimlerin sentezlerini yöneten genler görev yaparlar. Diğerleri ise, genellikle inaktif durumda bulunurlar. Bunlar hayat için her zaman lüzumlu olmayabilirler. Gerçekten de, kromozom üzerindeki bütün genler aktif olsaydı veya aynı anda görev yapmış olsalardı, hücre lüzumsuz ve çok sayıda enzim ve proteinlerle dolmuş olurdu. Besi yerlerindeki gıdaların ve çevresel koşulların değişmesi ile bazı genler aktive edilir, diğer bir kısmı da baskı altında tutulur. Hücre bu şekilde, kendini, değişen çevre koşullarına uydurur ve yaşamını sürdürür. Örn; *E. coli* gliserinli besi yerinde üretilirse, hücrede, bu substratın ayrışmasını katalize eden enzimlerde bir artma meydana gelir. Buna karşılık, diğer bir kısım enzimler ise minimal düzeyde tutulurlar. Aynı şekilde, *E. coli* karbon ve enerji kaynağı olarak laktozlu bir ortamda üretilirse, bu substratın ayrışmasında görev alan beta-galaktosidase enzimin (indüklenebilen enzim) sentezinde 1000 misli artma olur. Ortama katılan gliserin ve laktoz bir indüktör olup kendilerinin ayrışmasında görev alan enzimlerin sentezlerini uyarırlar. Ancak, bütün indüktörler her zaman substrat olmayabilirler:

07.02. Enzim indüksiyonu

Mikroorganizmaların büyük bir kısmı enerji ve karbon kaynağı olarak birçok organik maddelerden yararlanırlar. Bunlardan faydalanılabilmesi ve enzim sentezi otomasyonunu çalıştırabilmesi için ortamdaki bir sinyal bekler ve bunu da indüktörler sağlarlar. Örn, *E. coli* besi yerleri içinde bulunsun veya bulunmasın, her zaman glukozu ayrıştıracak enzimleri sentezlemesine karşın, laktoz için böyle hazırlıklı değildir. Laktozu hemen metabolize edemez veya ayrıştıramaz. Aradan belli bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Laktozlu bir ortamda üreyen bir bakteri (*E. coli*), buradan alınıp tekrar laktozlu bir ortama konursa, latent dönem oluşmaz ve bakteri laktozu hemen ayrıştırmaya başlar (aradan zaman geçmemiş ise). Glukoz ve laktozlu ortamlarda ayrı ayrı üretilmiş *E. coli* hücrelerindeki enzim miktarları yönünden yapılan incelemelerde, laktozlu besi yerinde üretilmişlerde daha fazla enzimin sentezlendiği saptanmıştır. Bu enzimler arasında, beta-galaktosidase (laktozun, glukoz ve galaktoza ayrışmasını katalize eden enzim) ve galaktosid permease (laktozun hücre duvarından içeri girmesine yardımcı olan taşıyıcı enzim) önemli miktarlara ulaşmaktadır. Bundan sonra, *E. coli* 'nin laktoz metabolizması ile ilgili diğer bir enzim gelmektedir (transasetilase). Beta-galaktosidase ile birlikte bu enzimlerin düzeyinde de bir artma olur. Beta-galaktosidase sentezi durursa diğerlerinin üretimleri de sona erer. Bu nedenle, bu üç enzim birbirleri ile çok yakın ilişkili olup, bunların sentezlerini idare eden genler DNA üzerinde birbirine bitişik olarak sıralanmışlardır. Bu üçlü gruba (üniteye) laktoz operon (lac-operon) adı verilir.

Bu enzimlerin sentezini, yapıcı laktoza benzeyen suni indüktörler (thiomethylgalactosid ve isopropylthiogalactosid) kullanılarak da uyarmak mümkündür.

07.03. Lak-Operon Ve Regulator Genleri

Operon, kromozom üzerinde birbiriyle çok sıkı ilişkide bulunan gen topluluğunu (üniteyi) ifade eder. Bu genler birbirleriyle koordine (aktivasyon ve inaktivasyon) bir şekilde yönetilirler. En iyi bilinen veya incelenen operon, laktoz operondur. Bu genler grubu, laktoz metabolizmasını idare ve kontrol eder.

07.04. İ- Geni (Regulatör Gen) Ve Represör

Bakteri DNA'sında genlerin çalışmasını düzenleyen ve kontrol eden genler vardır. *E. coli* de, laktoz metabolizması veya diğer bir deyimle beta-galaktosidase için, lak-operonda bir regulatör gen (i-geni) bulunur. Bu gen, her biri 40.000 dalton olan 4 alt ünitelerden oluşmuş bir protein represörü (lak-represör) şifreler. Bir tetramer olan represör, DNA üzerindeki operatör bölgeye özel olarak ve kuvvetlice bağlanır. Represörler, proteinin sentezini baskılar veya engeller. Represörler de, DNA tarafından şifrelenmiştir. Represörlerin her zaman önleyici karakteri olmayabilir. Bunların da aktif ve inaktif olduğu durumlar vardır. Bu durumlar,

indüktör ve korepresör (son ürünler, metabolitler) molekülleriyle ilişkilidirler. İnaktif represöre, bir korepresörün bağlanması bunu aktif hale getirir. Örn. amino asit bulunmayan bir besi yerinde üretilen *E. coli* kültürüne sonradan bu maddeler katılırsa, amino asit biyosentezi ile ilişkili enzim yapımını denetleyen aktif represör sayısında artma oluşur. Böylece, özel mRNA yapımı önlenmiş olur. Represörler birden fazla protein sentezini de denetleyebilirler. Örn. *E. coli* de, beta-galaktosidase represörü, bunun dışında iki enzimi (galaktosid permease ve transasetilase) daha denetler.

07.05. Promotor (P)

Promotor bir DNA segmentidir. Bu segmente, sütüktürel genlerinin transkripsiyonunda görev yapan ve bu olayı başlatan RNA polimerase bağlanır. Şemada da, operatöre bitişik olarak solda gösterilmiştir. Promotor, bir kilit regülâtör elementidir. Çünkü, operonun mRNA sentez derecesini kontrol eder.

07.06. Operatör (O)

Bir DNA segmenti olan operatöre, represör bağlanır. Operatör, kendi kontrolü altında bulunan sütüktürel genlerle çok sıkı bir ilişkisi vardır ve bunların yanı başında bulunur. Buna karşın regülâtör gen (i-geni) ayrı bir yerde lokalize olmuştur. Şemada operatör gen, sütüktürel genlerin (z, y, a) solunda gösterilmiştir. Bu duruma göre, promotora bağlanan RNA polimerase, sütüktürel genleri transkripte etmeden önce ilk defa operatöre uğrar. Eğer, operatör represöre bağlanmış ise, RNA polimerase, sütüktürel genleri transkripte edemez. Böylece, lak-operon; represör, promotor ve operatör üçlüsü tarafından kontrol altında tutulmuş olur.

07.07. Katabolik Represyon

Katabolik aktivitede görev alan birçok enzimler bazı represyonlara maruz kalabilirler. Bir bakteri, çabuk metabolize olabilen bir karbon ve enerji kaynağı içinde üretilirse hücrede artan bir ATP birikmesi meydana gelir ve enzimlerin represyonuna yol açar. Enzimlerin baskılanması, enerji kaynaklarının daha yavaş metabolize olmasına neden olur. *E. coli*, laktoz ve glukozlu ortamda üretilirse ilk önce glukoz metabolize olur ve bu nedenle de beta-galaktosidase sentezi azalır. Glukoz varken, laktoz, indüktör olarak pek iş göremez. Bakteri enzimleri tarafından kolayca metabolize olan diğer substanslar da aynı tarzda etkiler ve indüklenen enzimler üzerine baskılayıcı etki yaparlar. Bu baskılamayı kaldırmak için ortama 3,5-cyclic AMP'nin ilâvesi gereklidir. Bu madde birçok bakteri hücresinde bulunur ve katabolik enzimlerin sentezi için aktivatör olarak görev yapar. Glukozun çok çabuk ayrışması hücrede ATP'nin fazla birikmesine ve cAMP'nin azalmasına yol açar. Bu da katabolik

represör olarak çalışır. Örn. *P. putida*, glukozlu ortamda suksinat içinde olduğundan, daha yavaş ürer. Suksinat glukozdan daha etkili represördür.

07.08. Son Ürün İnhibisyonu (Feedback inhibisyon)

Reaksiyonları katalize eden ilk enzimlerin, metabolik yollarda oluşan son ürünler tarafından baskılanması ve sentez olayının durması, enzim regulasyon mekanizmasının diğer önemli bir türüdür. Buna enzim sentezinin represyonu da denebilir. Örn. *E. coli* 'de, triptofan sentetase enzimi, triptofan ve bazı analogları tarafından inhibe edilerek aktivitesine son verilir. Histidin ve leusin sentezleri de aynı mekanizma ile regule edilirler. Ortamdaki son ürünler, herhangi bir şekilde, diğer biyosentetik reaksiyonlarda kullanılmazsa, hücre içi miktarı azalır ve sentez olayları durur. Eğer sarf edilirse, sentez yine başlar. Bu baskılama genetik bir karakter taşımaz. Mutasyonlarla değiştirilebilir ve baskılama işlemi kaldırılabilir.

Son ürün inhibisyonu, birçok şekilde meydana gelebilir. Lisin ve metionin sentezi ile aspartik asitten treoninin sentezi buna örnek olarak verilebilir. Bu biyokimyasal yolda, ilk enzimatik reaksiyon, aspartokinase tarafından katalize edilir. Bu enzim, bildirilen 3 son üründen (lisin, metionin ve treonin) biri tarafından inhibe edilerek sentez durdurulur. Bazı mikroorganizmalarda, bu işi 2 son ürün birlikte yapabilir (multivalent inhibisyon). İndüktöre maruz kalan hücrelerde sentez edilen enzimin maksimal bir düzeye ulaşabilmesi ve aynı şekilde represyonun da tam etkileyebilmesi için birkaç neslin geçmesi gereklidir.

07.09. Allosterik Proteinler

Birçok enzimler, substrat olmayan bileşikler tarafından inhibe edilirler. Bunların yapıları, substrata sterik bir benzerlik (isosterik) gösterirler. Buna malonik asit ve suksinik arasındaki kompetatif inhibisyon, örnek olarak verilebilir. Ancak, bazı düşük moleküllü bileşikler de, enzimle sterik benzerliği olmamasına (allosterik) rağmen allosterik enzimlerini inhibe veya aktive edebilirler. Buna *E. coli* 'de ki aspartat transkarbamilase örnek olarak gösterilebilir. Bu enzim, pirimidin biyosentez sırasının ilk enzimi olup bunun için substrat, karbamil fosfat ve aspartattır. Fakat, enzim, allosterik olarak sitidin trifosfat tarafından inhibe edilir. Bu sitidin trifosfat, spesifik biyosentetik sıranın son ürünüdür.

Yukarıdakine benzer bir örnek de glutamik dehidrogenase allosterik proteinidir. Bunun aktivitesi küçük moleküller veya steroidler tarafından inhibe edilir. Böylece enzim aktivitesi kontrol altına alınır.

07.10. Enerji Kontrolü

Hücre içinde enzim sentezinin regulasyonunda enerji kontrolünün önemi fazladır. Gıda maddelerinin ayrışmasından meydana çıkan enerji, enerjice zengin fosfat bağları arasında muhafaza edilirler. Böyle bağlara sahip olan ADP ve ATP, kendilerinde bulunan bu enerjiyi

sentez olaylarında kullanır ve reaksiyonların seri halinde devamını sağlar. Eğer, biyosentez olayları için gerekli ve yeterince enerji temin edilemezse, hücreler kendilerine lüzumlu maddeleri yapamazlar. Bu maddeler arasında enzimler de vardır. ATP'de biriken enerji, kendisinin olduğu hızda, hemen sarf edilemez ve bağlar arasında kalır. ADP'deki rezerve bitince daha fazla enerji bağı oluşumu önlenir ve ATP'deki enerji sarf edilinceye kadar, enerji sağlanması da inhibe edilir.

07.11.Nukleik Asit Sentezlerinin Regülasyonu

Bakterilerde nukleik asit (DNA ve RNA) moleküllerinin sentezlerinde özel kontrol mekanizmaları görev yapmaktadır.

DNA sentez regülasyonu: Bakterilerde, DNA'nın replikasyonu sırasında iki iplikçiğin birbirinden tam olarak ayrılması türlere göre az çok değişiklik gösterir. Her ne kadar aynı tür içinde de bazı ufak ayrımlar olmasına karşın, replikasyon, genellikle, sabit bir karakter taşır. Örn. bir bakteride tüm DNA molekülünün baştan sona kadar ayrılabilmesi için 40 dakika geçtiği kabul edilirse, bu sürenin 40 dakikadan az olduğu durumlarda DNA sentezi hızlanmıştır. Ancak bu kısalan süre, DNA polimerazın polimerizasyon aktivitesi hızından daha az olamaz. Böyle durumlarda da birinci replikasyon çatalının dışında ve bunun ayrımı bitmeden, uçlarda ikinci ve üçüncü çatal oluşabilir. Bu durum bölünme süresini kısaltır. Eğer 3 çatal oluşursa, bölünme süresi 20 dakikaya inebilir. DNA'nın replikasyonu 40 dakikadan fazla uzarsa, DNA sentezi de yavaşlar ve tek bir replikasyon çatalı meydana gelir.

RNA sentez regülasyonu: Mikroorganizmalarda bulunan DNA miktarı genellikle sabit bir durum arz etmesine karşın, ribosomal RNA (rRNA), üreme ortamının bileşimine göre azalabilir veya çoğalabilir. Az gıda içeren ortamlarda, bazı durumlarda, RNA sentezi çok azalır veya durabilir. Böyle hallerde hücre içindeki protein sentezlerinde de bir yavaşlama göze çarpar. Ribosomal RNA'ların gereği kadar sentez edilememesi bunları, ribosomların mRNA üzerinde yeterince toplanamamasına yol açar. Bu da sentez mekanizmasına olumsuz yönde etkiler. Bazı koşullarda da serbest olarak bulunan ribosomlar, RNA sentezini kodlayan genler üzerinde baskılayıcı görev yaparak, rRNA sentezini regule edebilmektedirler.

Mantarların Morfolojik Özellikleri

01. Giriş

Mantarlar, çok çeşitli olmaları nedeniyle, makroskopik ve mikroskopik morfolojik karakterleri yönünden oldukça geniş bir varyasyon gösterirler. Bu durumları, her ne kadar, genetik özelliklerine bağlı ise de yaşlanma (kültürlerin eskiliği), beslenme ve çevresel koşulların etkisi ile de yakından ilişkilidir. Hatta aynı koloni içinde, yaşlanmaya bağlı olarak

koloninin ortası ile çevresi arasında makrokonidiumların, şekli, büyüklüğü ile hifaların morfolojileri yönünden fark bulunmaktadır. Bu nedenle, özellikle patojenik mantarların birbirlerinden ayrılmasında, sadece bir iki karakter yanı sıra diğer özelliklerini de dikkate almakta büyük yararlar bulunmaktadır.

Mantarların büyük çoğunluğu (*Ascomycetes*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes*, vs) filamentöz bir koloni morfolojisine (küfler) sahip olmalarına karşın, bazıları da mukoid bir üreme gösterir (mayalar). Böyle karakterde olanlar arasında *Candida*, *Saccharomyces*, vs. cinslerine ait olan türler örnek olarak verilebilir.

Flamentöz mantarların (küflerin) morfolojileri başlıca iki yönden incelenmektedir. Bunlar da:

- 1) Mikroskopik morfolojik özellikleri
- 2) Makroskopik morfolojik özellikleri

02. Flamentöz Mantarların Mikroskopik Morfolojileri

Mantarların karakterize edilmesinde, bunların mikroskopik özelliklerinin büyük bir önemi vardır. Bu nedenle, bir mantarı oluşturan elementlerin mikroskopik olarak teker teker incelenmeleri gereklidir.

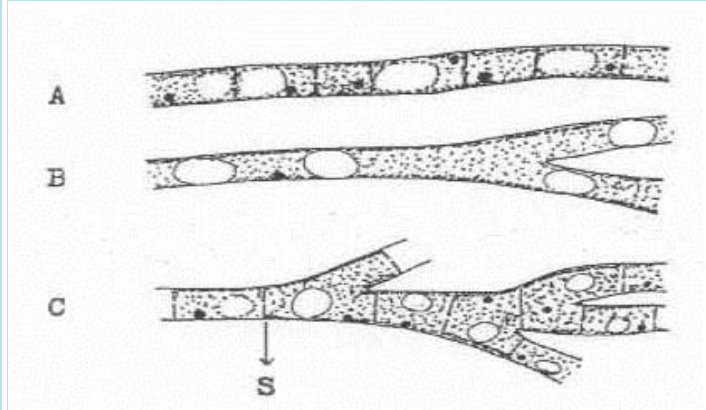
Hifa (hypha) : Mantar kolonileri, hifa adı verilen, genellikle, ince, uzun ve saydam mikroskopik filamentlerden oluşmuşlardır. Uzunlukları türlere göre değişmek üzere 1-3 cm (veya daha uzun) ve çapları da 5-10 mikrometre arasında bulunmaktadır. Bazıları branşsız ve ince bir borucuk tarzında bir görünüme sahip olmasına karşın, bir kısım hifalar da, genetik karakterleri gereği, branşlaşma gösterirler. Hifalardan meydana gelen ağ benzeri oluşumlara miselyum (mycelium) adı verilir. Miselyumlar mantarın vejetatif gövdesini teşkil ederler.

Aynı koloni içinde bulunan hifalardan bazıları beslenmeyi sağlamak için, üzerinde yaşadığı substratların içine doğru uzanırlar. Genelde, beslenmeyi sağladıkları için bunlara vejetatif hifa adı da verilmektedir. Diğer bir bölümü de dışarıda kalır (aerial hifa). Bu son türdeki hifalar arasında bazıları çoğalmada görev alır ve buna uygun olarak da kendilerinde özel organizasyonlar oluşur (reproduktif hifa, fertil hifa).

Flament özellik taşıyan mantarlardan (*Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, vs.) alt divizyonlarına ait türlerde hifalar septumsuz olup kesintisiz düz bir borucuk halindedir ve özel septumlarla bölünmediği için kompartımanlara (hücrelere) ayrılmamıştır (septumsuz hifa, sönositik hifa). Buna karşın, *Ascomycotina*, *Deuteromycotina*, vs. alt divizyonu içindeki sınıflara ait mantar türlerinde hifalar belli aralıklarla özel septumlar aracılığı ile bölünmüşlerdir (septumlu hifa). Ancak, bu bölünme tam olmayıp, bölmeleri ayıran septumların ortalarında veya ortalarına yakın yerlerinde bulunan özel deliklerle, hücreler,

birbirleriyle ilişki içindedirler. Bu nedenle bazı araştırmacılar hücre terimi yerine kompartıman kelimesini kullanmanın daha uygun olacağını belirtmektedirler .

Hifa türleri yandaki şekilde gösterilmektedir.

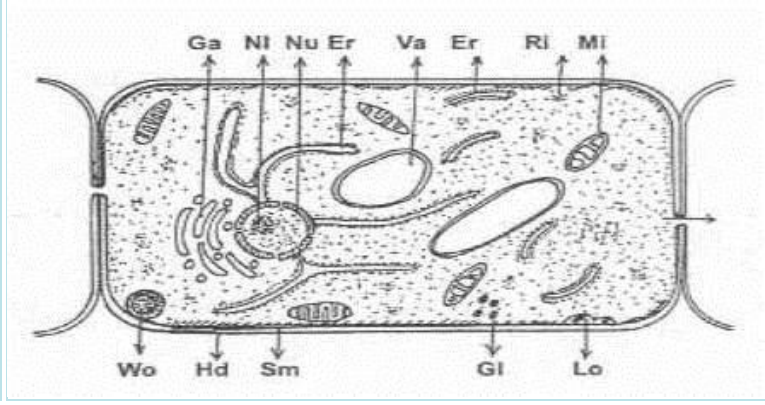


Kültür koşulları altında, özellikle, patojenik mantar kolonilerinde, hifaların mikroskopik ve makroskopik morfolojilerinde bazı farklılaşmalar göze çarpmaktadır. Böyle modifikasyonlar daha ziyade aerial ve fertil hifalarda gözlemlenmektedir. Bir kısım hifalarda da spiral, raket, noduler, şamdan, tarak, gibi özel formlara rastlanabilmektedir.

Hifalarda tesadüf edilen formasyon değişiklikleri, hiç bir zaman teşhis için kriter olarak düşünülmemelidir. Bunlar her ne kadar genetik karakterlerle ilgili iseler de besi yerinin kimyasal yapısı, çevresel koşullar, kültürün yaşı, vs. ile de yakından bağlantılıdır. Hifalarda septumların bulunuşu veya bulunmayışı sınıfların ayırımında bir ip ucu verirse de her zaman güvenilir bir kriter değildirler. Şöyle ki, Ascomycetes sınıfındaki mantarlar genelde septumlu iseler de bazen genç koloni hifalarında, septum oluşumu geç meydana geldiğinden, septumsuz gibi görülebilirler. Ayrıca, septumsuz olan Zygomycetes ve Oomycetes sınıfı mantarları içinde bazı türlerde pseudohifalara da rastlanabilir. Böyle karakterize edilen görünüme mayalarda da tesadüf edilmektedir. Bazı hallerde de, iki hifanın birbirine değdiği yerde anastomoz meydana gelmekte burada hücre duvarları eriyerek iki hücre birleşebilmektedir.

Hücre duvarı: Hücre duvarı ancak septumlu hifalarda söz konusudur. Sönotitik hifalar tek hücre veya tek bir borucuk şeklinde bir yapıya sahip olduklarından, bunlar için, hifanın cidar yapısı hücre duvarı olarak ele alınacaktır.

Yandaki şekilde tipik bir mantar hücresi gösterilmektedir.



Hücre duvarı, mantar hücrelerinin (kompartmanlarının) büyüklüğünü ve şeklini tayin edebilecek derecede kuvvetli bir yapıya sahiptir. Hücre duvarının giderildiği hallerde protoplastlar meydana gelir. Hücre duvarı, hücreleri çevresel koşulların olumsuz etkisinden koruduğu gibi, antijenik bir özelliğe ve bazı enzimleri içermeleri nedeniyle de fizyolojik bir aktiviteye sahiptir.

Mantar hücrelerinde, hücre duvarı, genellikle, çok katlı (multilaminer) ve fibriler bir özellik gösterir. Bu durum hücre duvarının sağlamlığını arttırmaktadır. Yapısında, polisakkaridler (yaklaşık % 80) daha fazla olmak üzere protein (% 5-15) ve lipid'ler (% 3-10) bulunmaktadır. Bunların miktarları, mantar türlerine, besi yerinin birleşimine ve çevresel koşulların durumuna göre az çok değişmektedir. Polisakkaridler arasında, glukan, galaktoz, kitin, kitozan, mannan ve selüloz en fazla bulunanlarıdır. Bu komponentler bazen birlikte de olabilmektedirler. Örn, Basidiomycetes ve Chytridiomycetesler de kitin + glukan; Zygomyceteslerde kitin + kitozan; Ascomyceteslerde kitin + glukan; Mayalarda mannan + glukan, gibi.

Hücre duvarının fibriler özelliğini kitin veya selüloz verir. Bunlar, N-asetilglukozamin ve glikoz polimerlerinin 1-4 beta tarzında birleşmesinden meydana gelmiş düz zincirlerdir. Glukanların (glikoz polimerleri) branşlı olmaları ve hücre duvarının diğer komponentleri ile çapraz bağlar kurabilme yetenekleri hücre duvarının kuvvetini ve sağlamlığını arttırmaktadır. Mayalardaki mannanlar (mannoz polimerleri) hücre duvarının esas komponentini oluşturmaktadır.

Hücre duvarının kimyasal yapısında, yukarıda bildirilen 3 temel substansın yanı sıra, melanin derivatları, inorganik elementler, fosfatlar, aminopolisakkaridler de vardır.

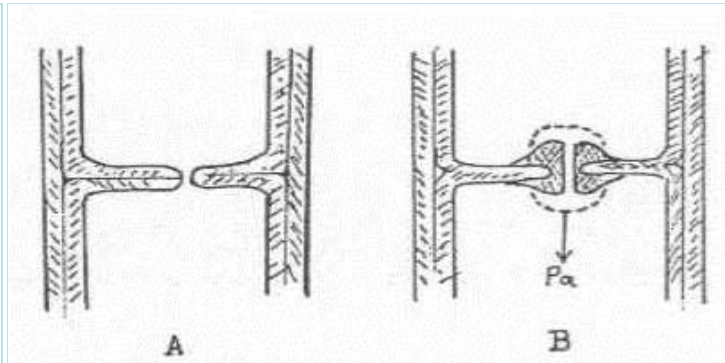
Mantarlarda hücre duvarının katman sayıları türler arasında farklar göstermektedir. Örn. *N. crassa* 'da dıştan içe doğru 4 tabaka bulunmaktadır (amorf glukan dış tabaka, glikoprotein, protein ve protein içine yerleşmiş kitin mikrofibril ağ tabakaları). Bu nedenlerle hücre duvarı

veya hifaların cidarları oldukça kalındır. Bu durum 150-200 nm arasında bir varyasyon göstermektedir.

Hifa, çok büyük bir üreme kapasitesine sahip olan apekse doğru giderek incelik ve çapı azalır (50-70nm), yapısı da basitleşerek bazı mantar türlerinde sadece iç ve dış tabakalar kalır.

Septum: Septum formasyonuna, Oomycetes ve Zygomycetes sınıfı mantarları hariç olmak üzere, diğer filamentöz mantarlarda rastlanmaktadır. Yapılan elektron mikroskopik incelemelerde birkaç tür septumun varlığı belirlenmiştir. Bunlar arasında başlıca 2 tipe fazlaca tesadüf edilmektedir. 1-Basit septum : Bu tür septum, daha ziyade Ascomycetes ve Deuteromycetes sınıfına ait mantar türlerinde bulunmaktadır. Böyle septumun ortasında veya ortasına yakın yerde bir tek delik (por) (0.005-0.5 mikrometre çapında) yer almaktadır. Bu deliği gerektiğinde kapatan ve bir hücrede bir veya birden fazla sayıda Woronin cisimciği bulunmaktadır. 2- Dolipor septum : Bu tür septuma Basidiomycetes sınıfına ait mantarlarda ve gelişmenin bazı aşamalarında rastlanılmaktadır. Bunda, septumun ortasında çok dar bir delik (100-200nm) vardır ve etrafı amorf ve kabarık bir kenarla (yaka) ile çevrilidir. Bunu da dışardan çok ince ve delikli bir membran sarar (parentosom). Dolipor septum, sitoplasmayı, bir kompartımandan diğerine geçirmesine karşın, çekirdeği geçirmez.

Yandaki şekilde septum yapısı gösterilmektedir.



Septum formasyonu genetik bir karakter olup hücre duvarının iç kısmından orijin alır ve içeri doğru uzanarak karşı cidara kadar devam eder. Yapısı, hücre duvarının yapısı ile aynı kimyasal özelliği gösterir. Septumun var veya yok oluşu, mantar türlerini ayırmada tek başına bir kriter oluşturamaz.

Sitoplasmik membran (plasmalemma) : Elektron mikroskopla yapılan ince kesitlerin muayenelerinde, hücre duvarının altında 3 tabakadan yapılmış ve ünit membran özelliği gösteren bir sitoplasmik membran bulunur. Permeabilite özelliği gösterdiğinden absorpsiyon ve sekresyonda büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Yapısında, fosfolipid, protein ve steroller (ergosterol) bulunur. Proteinlerin çoğunu, substansların geçişlerinde önemli fonksiyonlara sahip olan permease enzimleri oluşturmaktadır. Steroller, amfipatik bir karaktere sahip olup

hem polar (suda eriyebilir) ve hem de nonpolar (yağda eriyebilir) bölgelere sahiptirler. Bunlar, fosfolipid çift katmanı içine girmiş bir durumdadırlar.

Lomasom: Bazı mantar türlerinde, hücre duvarı ile sitoplasmik membran arasında yerleşmiş ve lomasom olarak adlandırılan bazı organizasyonlara tesadüf edilmektedir. Bunların buldukları yerlerde, sitoplasmik membran içe doğru çöküntüler meydana getirmektedir. Fonksiyonları tam olarak aydınlatılmamışsa da, bu oluşumların salgısal aktivitede ve sitoplasmanın sentezinde bazı önemli görevler üstlendikleri açıklanmaktadır. Özellikle, aktif gelişmekte ve büyümekte olan hifaların apeks hücrelerinde, vesiküllerin lomasomlarla birleştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Endoplasmik retikulum: Mantar hücrelerinde, etrafı iki katlı ünit membranla çevrili ve üzerlerinde ribosomların yerleştiği strüktürler bulunmaktadır. Protein sentezinde ve metabolizma için gerekli substansların taşınmasında büyük etkinliği olan endoplasmik retikulumların (ER) yapıları daha ziyade lipoprotein bir karakter arz etmektedir. Bu retikulumların bir ucunun da çekirdekte olması, bu aktiviteleri ile uygunluk göstermektedir. Yaklaşık 8 nm kalınlıkta olan endoplasmik retikulumların bazılarının lâmeller veya vesiküler bir yapısal özellik taşıdıkları da belirtilmiştir.

Vakuol: Olgun mantar hücrelerinde daha fazla olmak üzere çok sayıda vakuollere rastlanılmaktadır. Etrafları ünit membranla çevrili olan vakuollerin içlerinde pigment, kristal ve amorf karakterlerde bazı maddelerin bulunduğu ve hücre duvarına yakın olarak yerleştikleri bildirilmiştir. Hücrelerin dejenerasyonları sırasında sayılarında artmalar da meydana gelmektedir.

Vesikül: Büyümekte olan hifalarda, özellikle, apeksteki hücreler vesikül bakımından oldukça zengindirler. Bunların Golgi aparatından orijin aldıkları bildirilmektedir. Vesiküllerin içinde, hücre duvarının sentezinde ve aynı zamanda, lizisinde etkinlikleri olan enzimler, inorganik elementler, polisakkaridler, lipidler ve diğer gerekli substanslar bulunur ve bunları büyümekte olan hücre duvarı bölgesine taşırlar. Vesiküllerin etrafı bir ünit membranla çevrilidir. Bazıları küçük elektron dens, diğer bir kısmı da büyük ve elektron transperent bir özelliğe sahiptir.

Çekirdek ve çekirdekçik: Mantar hücrelerinde, nukleuslar genellikle, küçüktürler (2-3 mikrometre). Bu nedenle de normal ışık mikroskopları ile güçlkle fark edilirler. Çekirdeğin etrafında çift katlı ve delikli bir membran (nükleer membran) bulunur. Giemsa ile boyanan preparatlarda çekirdek kolayca görülebilir. Her hücrede bir tane çekirdek olmasına karşın, çok genç ve çok çabuk üreyen hifalarda bazen birden fazla nukleusa rastlanabilir. Septumsuz hifalarda, her hücrede birden fazla çekirdeğin varlığı kabul edilmektedir. Çekirdek içinde bulunan kromozom, deoksiribonukleik asit (DNA) yapısında olup birden fazla sayıdadır.

Mitokondrium: Yapısında protein ve DNA bulunan mitokondriumların bölünerek ve/veya tomurcuklanma ile çoğaldıkları bildirilmektedir. Hücrelerin birer enerji merkezleri (veya santralleri) fonksiyonlarını üstlenen bu oluşumlardan bir hücrede çok sayıda (yaklaşık 100 kadar) bulunabilmekte ve özellikle, üremekte olan hifalarda daha aktif ve fazla sayıda olabildiği belirtilmektedir. Boyutları (0.4 - 0.8x 1-2 mikrometre) mantar türleri arasında da değişimler göstermektedir. Mitokondriumların Krebs siklusunda ve oksidatif fosforilasyonda da önemli aktiviteleri olduğu gibi, respirasyonda fonksiyonu olan enzimlerce de zengindirler.

Zoosporlarda, genellikle, bir tane mitokondrium bulunmaktadır.

Ribosom: Elektron mikroskopla ancak görülebilen ribosomlar (25-80 nm), bir hücrede binlerce sayıda bulunabilmekte ve protein sentez merkezleri olarak önemli fonksiyonlar üstlenmektedirler. Yapısında RNA (% 50-70) ve protein (%35-50) bulunan ribosomlara, hücre sitoplasmasında serbest olarak veya birkaç tanesi bir arada (poliribosom) rastlanabildiği gibi, endoplasmik retikulumlarda ve mitokondriumlarda da bulunurlar. Ökaryotik bir özellik gösteren mantar ribosomlarının sedimentasyon konstantları 80 S (Svedberg ünitesi) dir (40 S + 60 S).

Golgi aparatı: Bir hücrede, genellikle, bir tane olarak bulunan ve çekirdeğe yakın olarak yerleşen Golgi aparatı, mantar türlerine göre yapı ve şekillerinde farklar görülmektedir. Vesikül, granül veya kesecikli bir strükture sahip olan Golgi aparatı, sentez olaylarında fonksiyonlara sahiptir.

Sitoplasmik granüller: Mantar hücrelerinde yukarıda açıklanan yapısal oluşumların yanı sıra lipid granülleri, kristaller, pigmentler, mikrotubuluslar, glikojen granülleri de bulunur.

Lisosom ve kitosom: Mantar hücreleri de endomembran sistem arasında yer alan lisosomların içlerinde hidrolitik enzimler vardır. Bunların yanı sıra, son yıllarda saptanan kitosom ise kitin, mikrofibrillerinin sentezinde etkinlikleri olan chitin synthase enzimine sahiptirler.

03. Mayaların Mikroskopik Morfolojileri

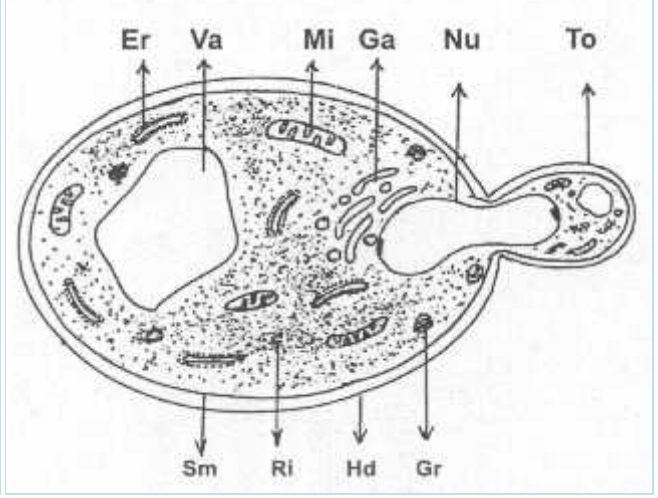
Maya hücreleri, yuvarlak, oval ve silindirik biçiminde bir görünümde olup tek hücrelidirler. Boyutları, türlere ve kültür koşullarına göre değişmek üzere, 2-10 x 3-16 mikrometre arasında değişmektedir. Bazı koşullarda, çok sayıda hücre yan yana gelerek uzun zincirler (pseudohifa) oluşturabilirler. Boyutları, genellikle bakterilerden daha büyüktürler. Hücre duvarı, maya hücrelerine şekil verir ve oldukça sert bir kimyasal yapıdadır. Bileşiminde glikoz ve mannoz polimerleri (mannan) ile birlikte az oranda lipid, protein ve kitin bulunmaktadır. Hücre duvarında, kalınlıkları değişik olan 3 tabakanın varlığı belirtilmektedir.

Sitoplasmik membran, ünit membran karakteri taşır ve permeabilitesi oldukça fazladır. Ayrıca, sitoplasmik membran enzimlerce de oldukça zengindir.

Maya hücrelerinde, etrafında delikli bir membrana (nükleer membran) sahip ve çapı 1 mikrometre civarında bulunan bir çekirdek bulunur.

Hücre içinde, üremenin aktif olduğu dönemde sayıları az olan ve üremenin sonuna doğru artan sayıda granül ve globullere rastlanılmaktadır. İçlerinde transperent bir sıvı bulunan büyükçe vakuoller, boyutları 0.25 x0.5 mikrometre kadar olan mitokondriümlar ve çok sayıda ribosomlar da yer almaktadır.

Bir mayanın yapısı yandaki şekilde gösterilmektedir.



04. Mantarların Makroskopik Morfolojileri

04.01. Koloni Morfolojileri

Patojenik mantarlar katı ortamlarda üretildikleri zaman başlıca 5 türde koloni oluşturmaktadırlar. Bu varyasyonlar, mantarların genetik karakterleri ile yakından ilgili iseler de besi yerinin kimyasal yapısına, kültürlerin eskiliğine, çevresel koşulların durumuna da bağımlı bulunmaktadır. Örn. difazik mantarların koloni morfolojileri ortamın ısısı ile yakından ilişkilidir. Şöyle ki, *C. immitis*, vücut ısısında (37°C) üretildiği zaman maya benzeri koloniler oluşturmaya karşın, oda ısısında (22-25°C) genellikle miselyal bir koloni meydana getirirler. *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, vs. de aynı karakterlere sahiptirler.

Başlıca koloni tipleri ve kısa özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

1) Miselyal koloniler: Kutan mikozislere neden olan dermatofitler (Epidermophyton, Microsporum, Trichopyton cinslerine ait türler)ve sistemik infeksiyona neden olan bazı mantarların (*B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, vs.) oda ısısında üretilmiş koloni formları ile saprofitik özellikte olan birçok mantarın kolonileri miselyal bir görünüme sahiptirler. Bu miselyumlar, genellikle, aerial ve reproduktif hifalardan meydana gelmektedir. Miselyal koloniler, genellikle, oval, yuvarlak bazen de düzensiz bir şekil gösterebilirler (çentikli, loblu, asteroid, poligonal, vs.) . Bu tür koloniler çeşitli renklere de sahip olabilirler.

Bazı kolonilerin üzerinde birden fazla sayıda katlanmalar ve kıvrımlar gözlenebildiği gibi, yayvan, kabarık ve pamuk gibi tüylü olanlarına da fazlaca rastlanabilir.

2) Maya benzeri koloniler: Saccharomyces sınıfına ait türler (*S. cerevisiae*, *S. fragilis*, *S. carlsbergensis*, vs.) kolonileri ile sistemik infeksiyon oluşturan dimorfik mantarların 37°C deki kolonileri genellikle maya benzeri bir özellik gösterirler. Koloniler yumuşak, mukoid kıvamda kabarık ve nemli bir görünüşte olup oval veya yuvarlak kenarlara sahiptirler.

C. albicans kolonileri de, genellikle, maya benzeri bir görünümde dirler.

3) Membranöz koloniler: Dermatofit mantarların bazıları (*T. schoenleini*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*, vs.) üremelerinin bazı aşamalarında kolonileri ince deri veya membranöz bir özelliğe sahiptirler. Böyle olsalar da yine bazılarında az miktarda aerial hifalara rastlanmaktadır.

4) Granüler koloniler: Eğer kolonilerde fazla miktarda sporulasyon meydana gelmişse, aerial hifalarda azalmalara buna karşın çok fazla miktarlarda sporlara rastlanabilir. Koloni, sporun özelliğine göre, ince veya kaba bir granülasyon gösterir. Ancak, bu tür kolonilerin de başlangıçta genellikle, flamentöz olduklarını unutmamak gerekir. Dermatofitlerden, *E. floccosum*, *M. gypseum*, *M. van breuseghenii*, *T. megninii*, vs. böyle bir koloni formasyonu gösterirler.

5) Pleomorfik koloniler: Mantarların laboratuvarlarda, besi yerlerinde uzun süre pasajları yapıldığında, bazen, kolonilerin orta veya kenarlarında beyaz, steril ve kadife görünümünde hifaların oluştuğu gözlenir. Bu durum renkli kolonilerde daha belirgin olarak fark edilebilir. Pleomorfizm, aerial hifalar arsında reproduktif hifaların teşekkül etmemesi ile karakterizedir. Bu tarz dejenerasyonlar, mantarlarda, genellikle, mutasyonlar sonucu oluşurlar. Böyle kolonilerden yapılan pasajlar, genellikle, steril kalır ve herhangi bir üremeye rastlanamaz. Renkli bir kolonide, böyle, pleomorfik dejenerasyona maruz kalmış bölgeleri tanımak, renklerinin beyaz olması nedeniyle, oldukça kolaydır. Dermatofitlerde, bu tür dejenerasyonlara sıkça tesadüf edildiğinden, pasajlarda buna dikkat edilmelidir.

Pleomorfik dejenerasyonların ekserisi genetik düzeyde olmasına karşın, çevresel koşulların, besi yerinin kimyasal yapısının ve diğer nedenlerin etkisi altında da bazı varyasyonlar meydana gelebilmektedir. Besi yeri bileşiminin yanı sıra, pH, redoks potansiyel, düşük ozmotik basınca bağlı olarak, aslında flamentöz olan *M. ramannianus* nitrojensiz ortamlarda maya benzeri koloniler oluşturmaktadır. Mantarların üremeleri sırasında besi yerinde oluşan bazı değişmelerle ilgili olarak mantarların morfolojilerinde de varyasyonlar meydana gelmektedir. Septum formasyonunda gecikmeler, durmalar veya hücrelerin sporangiuma dönüşmeleri, renk değişiklikleri, hücre büyüklüğü, hücre duvar kalınlığı, aerial hifa sayısında

azalmalar, vs. değişmelere rastlanabilir. Kültür koşullarında fiziksel ve kimyasal değişmeler ne kadar yavaş olursa, mantarlarda meydana gelen gelişmeler de o kadar yavaş olur. Daha fazla olan köklü değişmelerde primer metabolizmadan sekonder metabolizmaya bir kayış gözlenebilir. Bu son durumda sekonder metabolit sentezi artar. Bu olgu da vejetatif fazın durmasına buna karşı reproduksiyon faza geçmek için bir sinyalin verilmesine neden olur. Bazı mantarlarda dairesel zonların meydana gelişi de üreme aşamalarını gösterebilir.

Mantarların Beslenmesi, Fizyolojisi Ve Metabolizması

01.Giriş

Mantarların kendilerine özgü bir beslenme tarzları bulunmaktadır. Enerji kaynağı için organik bileşiklere ve biyosentez için de karbonlu kaynaklara gereksinim duyarlar. Mantarlar, genel olarak, heterotrofik organizmalar olarak kabul edilirler.

Basit organik moleküller (monosakkaridler, amino asitler, organik asitler, vs.) hücre membranlarından kolayca içeri girebilirler. Buna karşın, makromoleküller ise (disakkaridler, polisakkaridler, polipeptid ve proteinler, vs.) dışarıda enzimatik olarak ayrıştırıldıktan ve membrandan geçebilecek bir düzeye indikten sonra içeri girebilirler. Bazı mantarlar da (Myxomycestes) gıdalarını fagositozis veya endositozis ile alabilirler.

Mantarlar gıdalarının bir kısmını kendileri sentez edebilirler. Ancak, büyük bir bölümünü de dışardan sağlarlar. Dışarıda bulunan makromoleküllerin veya polimerlerin membrandan girebilmesi ekstrasellüler enzimlerin aktiviteleri ile mümkündür. Bu hidrolitik enzimler, hücre içinde sentezlendikten sonra, bir kısmı (yeteri kadar) hücre içinde kalır ve diğer bir kısmı da dışarıya bırakılırlar. Bu enzimler polimerleri monomer haline getirirler. Bu monomerler de aktif ve/veya pasif transportla hücre içine girerler. Hücre içine ulaşan bu maddeler burada daha küçük birimlerine ve yapı taşlarına kadar ayrıştırıldıkları gibi bir kısmı da olduğu gibi sentez olaylarında kullanılırlar. Ekstrasellüler enzimlerin dışarı çıkmasında ve hücre duvarına kadar taşınmalarında vesiküllerin büyük rolleri olduğu bildirilmektedir. Vesikller, sitoplasmik membrana kadar gelerek içindeki enzimleri buraya bırakır ve buradan da enzimler dışarı çıkarlar. Enzimlerin ve hücre içindeki metabolitlerin dışı çıkmasında ve dışardan içeri monomerlerin girişinde suyun rolü büyüktür. Enzimlerin bir kısmı, aynen bakterilerde olduğu gibi, yapısal ve bir bölümü de indkylenebilen bir karaktere sahiptir.

Mantarlar karbon ve enerji kaynaklarını bir çok substratlardan temin edebilirler. Doğada serbest olarak yaşayan mantarların bir çoğu enerji için bitkisel orijinli kaynaklardan yararlanırlar. Mantarların büyük bir ekseriyeti de glikoz, sakkaroz, nişasta, maltozu ayrıştırabilir ve bunlardan yararlanabilir. Bazıları da yağ asitlerini, organik asitleri ve gliserolu

da enerji kaynağı olarak ve ayrıca, heksos ve pentoz şekerlerinin derivatlarını da (uronik asit ve şeker alkollerini) kullanabilirler. Bunların hücre membranlarından geçişinde permease enzimlerinin rolü fazladır.

02. Mantarların Fizyolojisi

Mantarların hücre duvarlarında kitin ve selüloz karakterinde substansların bulunması, bunların devamlı değişen ve çok değişik olan çevre koşullarına uymalarında büyük yardımcı olurlar. Örn. mantarlar, bakterilerin dayanamayacakları kadar yüksek konsantrasyondaki şeker(%50) solüsyonuna direnç gösterirler. Çünkü, yüksek ozmotik basınca karşı, bakteriler kadar duyarlı değildir ve bunu hücre duvarının yapısındaki maddeler sağlarlar. Bu nedenle, reçel ve jöleler mantarlar tarafından kolayca kontamine edilebilirler. Ancak, bazı mantar türlerinin de %15 şeker yoğunluğunda üremelerinde sınırlanma oluşmaktadır.

Mantarlar genellikle düşük pH derecelerinde bile kolayca üreyebilir ve böyle ortamlara adapte olabilirler. Bu sebeple, mantarların minimal ve maksimal pH-limitleri 2-11 arasında değişebilir. Asit karakterdeki meyveler veya suları (özellikle, domates, portakal, limon, greyfurt, mandalina, vs.) buz dolabı ısısında olsalar bile mantarların üremeleri için iyi bir ortam oluştururlar. Hatta, bazı türler, 1 N asetik asit ve 2 N sülfürik asite dirençlidirler. Bunlara karşın, mantarların türlerine göre değişmek üzere, optimal pH'ları, üreme ve çeşitli metabolit sentezi ile paralellik göstermeyebilir. Buna, diğer çevresel koşulların ve üreme ortamının yapısının da büyük etkisi bulunmaktadır. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan mantarlar (patojenik mantarlar), üredikleri bölgelere ait pH limitleri, genellikle, kendileri için optimal bulunmaktadır.

Rutubet, mantarların üremelerinde çok önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır. Yüksek orandaki rutubet, genellikle, üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Rutubet azaldıkça, mantarların çoğalmaları da sınırlanmaya başlar. Mantarların rutubete olan gereksinimleri, türler arasında değişiklik gösterir. Bazı mantar türleri relatif rutubeti %10-15 arasında bulunan ortamlarda veya suyu çok azalmış olan kuru danelerde üreme yeteneğine sahiptirler. Patojenik mantarların, özellikle, dermatofitlerin insan veya hayvan vücutlarında yerleşebilmesi ve hatta hastalık oluşturabilmesi için rutubet yine önemli bir faktördür. Eğer deri, su ile ıslanmış ise, mantarların yerleşmesi ve üremesi daha kolay olmaktadır.

Mantarların üreme ısısı limitleri oldukça geniştir ve türler arasında farklar gösterir. Bu sınırlar, 0° ile 60°C arasında değişebilmektedir. Hifalar maksimal ısı limitinin dışında kolayca ölmelerine karşılık, sporları yüksek ısıya ve değişik çevre koşullarına çok fazla dayanıklılık gösterirler. Buz dolabı ısısında üreyebilen ve gıdaların bozulmasına neden olan mantarlara her zaman rastlamak mümkündür. Termofilik olanlar ise 60°C nin üstünde

gelişebilirler. Ancak optimal ısı, üreme için en uygun olanıdır. Patojenik mantarlar için optimal ısı, üzerinde veya içinde üredikleri canlının ısı derecesi olarak kabul edilmektedir. Ancak, deride lokalize olan mantarlar dış ortamla da temasta bulduklarından optimal ısı, çevrenin ısı ile bir yakınlık göstermektedir. Bu nedenle, dermatofitler için optimal üreme ısı 20-25° C'ler arasındadır. Mantarlar, aynı bakterilerde olduğu gibi, üreme ısı derecelerine göre başlıca 3 kısma ayrılırlar. Soğuk sevenler (psikrofilikler), genellikle 0° ile 15°C'ler; Ilık sevenler (mesofilikler), 15° ile 40°C'ler arasında ve sıcak sevenler (termofilikler) ise 40°C'den yukarıda üreyebilme kabiliyetine sahiptirler. Çok fazla soğuk, mantarların muhafazasında kullanılmaktadır. Sıfırın altında 195°C'de mantarlar uzun süre canlı kalabilirler.

Mantarlar, genellikle, aerobik karakter taşırlar ve oksijenin bulunduğu ortamlarda gelişirler ve ürerler. Bu nedenle, havada bulunduğu miktar (veya oran) kadar oksijen, üreme için gereklidir. Patojenik mantarlardan, *Actinomyces* bazı türleri hariç olmak üzere, diğerleri aerobik koşullarda ürerler. Oksijenin azlığı veya mikroaerofilik koşullar üremeyi ve gelişmeyi sınırlar.

Mantarların üremeleri için ışık, gereksinme duyulan önemli bir faktör değildir. Işık olmadan da kolayca gelişebilirler. Patojenik mantarlar da direkt ışık olmadan üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Direkt güneş ışınları, üremeyi ve gelişmeyi sınırlar. Ultravioleto ışınları fungistatik bir etkiye sahip olmasına karşın iyonizan ışınlar öldürebilirler (fungisid).

Mantarların klorofilleri olmadığı için fotosentez yapamazlar. Bu nedenle gıda gereksinimlerini (beslenme) dışardan karşılamak zorundadırlar. Bazı mantarlar basit yapıdaki ortamlarda (minimal ortam) gelişebildikleri halde, diğerlerinin ise üremeleri ve gelişmeleri için inorganik (C, H, O, K, P, N, S, Fe, Mn, Mo, Cu, Zn, Ca, vs.) maddelere ve özel üretim faktörlerine (tiyamin, biotin, Vit. B6, pantotenik asit, inositol, riboflavin, vs.) ihtiyaçları vardır. Mantarların karbon kaynaklarını, daha ziyade karbonhidratlar, alkol, organik asitler ve proteinler oluşturmaktadır. Nitrogen kaynağı için amonyum tuzları, sitratlar, proteinler, pepton, peptid, amino asit, üre, vs. den yararlanırlar. Bazı türler de amonyak ve nitratı bu amaç için kullanırlar. Mantarların bazıları kendilerine lüzumlu olan vitamin veya diğer gerekli maddeleri sentez edebilme kabiliyetine sahiptirler. Patojenik mantarlardan bir kısmı için tiyamin, inositol veya biotin üremeyi artırıcı veya üretim faktörü olarak önemlidir. Örn. *T. equinum* üremesi için nikotinik asit, *T. megnii* için de L-histidine gereksinim duyulur. Tiyamin, *T. tonsurans*'ın üremesini artırır. Patojenik mantarları üretmek ve izole etmek için, laboratuvarlarda, bileşiminde çeşitli inorganik ve organik maddeler bulunan besi yerleri

kullanılmaktadır. Bunlar arasında en fazla Sabouraud dekstroz agar, Brain-heart infusion kanlı agar, Czapek agar, Patates dekstroz agar, vs. sayılabilir.

Mantarların bazıları kuvvetli enzimler sentezleyerek bunların aracılığı ile çevredeki gıda maddelerini ayrıştırır ve bunlardan yararlanırlar. Bu enzimler, daha ziyade protease, karbonhidrase, nuklease ve lipase karakterindedirler. Bazı mantarlar da birden fazla enzim sentez edebilmektedirler. Örn. *Aspergillus niger* (amilase, sellobiase, katalase, lipase, protease, maltase, vs.) ve *A.oryzae* (amidase, amilase, katalase, lipase, protease, maltase, vs.) ve *P. camamberti* (amidase, laktase, lipase, maltase, protease, nuklease, vs.) gibi.

Mantarlar toprak fertilitésinin sağlanmasında, peynirlerin olgunlaşmasında ve bazı önemli endüstri ürünleri elde edilmesinde çok büyük yararlar sağlarlar. Organik asitler (asetik, formik, fumarik, gallik, glukonik, laktik, malonik, sitrik, oksalik asitler ve diğerleri), alkoller (alkol, gliserol, eritritol, mannitol, vs.), enzimler (amidase, amilase, invertase, lipase, protease, maltase, vs.), pigmentler (aleomodinin, auratin, beta karoten, aspergillin, vs.), polisakkaridler (glikojen, reguloz, nişasta, vs.), steroller (kolesterol, ergosterol, fungisterol, fitosterol, vs.), antifungal maddeler (griseofulvin, mikostatin, nistatin, vs.), antibiyotikler (penisilin, eritromisin, sikloserin, sefalosporin, kanamisin, streptomisin, vs.) ve diğer bir çok önemli maddeler (vitaminler, proteinler, ergot alkaloidleri, lipidler, toksin ve diğer toksik substanslar) bu ürünlerin arasında yer alırlar.

Mantarlar insan ve hayvanlarda, gerek kutan ve subkutan ve gerekse sistemik infeksiyonlar oluşturması bakımından da medikal önemleri fazladır. Bu hastalıkların bazıları da zoonotik bir karaktere sahiptir.

Mantarlar insan gıdası olarak da kullanıldıklarından, beslenmede özel bir yerleri vardır. Bu amaçla, zehirsiz türde mantarlar üretilmekte ve yemek olarak kullanılmaktadırlar. Mayalardan ekmek yapımına ve içkilerin fermentasyonunda (bira, şarap, viski, vs.) da büyük yararlar elde edildiği gibi bazı peynirlerin (Roquefort, Camemberti, Gorgonzola, Stilton, vs.) olgunlaşmasında da önemli görevler yaparlar. Ayrıca, maya hücrelerinin sentezlediği vitaminler (tiamin, riboflavin, nikotinik asit, pentotenik asit, biotin, pridoksin, vs) de insan ve hayvanlarda kullanılan medikal önemleri olan maddeler arasındadır.

Mantarların sentezledikleri ve sekonder metabolitlerden olan toksinler (mikotoksinler) insan ve hayvan sağlığı için büyük tehlike göstermektedirler. Bunlar arasında *A. flavus* 'un ve diğer mantarların sentezledikleri Aflatoksin karaciğerde kanser oluşturacak nitelikte etkiye sahiptir. Ayrıca, Rubratoksin, Okratoksin, Fusariotoksin ve diğer toksik substanslar da çeşitli mantarlar tarafından oluşturulurlar.

Mantarlar, meyve, sebze, ağaç gövdeleri, depolardaki çeşitli dane ve diğer gıdalarda da üzerinde veya içinde üreyerek bozulmalarına, değerinin ve kalitesinin düşmesine neden olurlar.

Virusların Genel Karakterleri

01. Giriş

Viruslar, protein veya kompleks bir yapıdan (glikolipoprotein) oluşan bir muhafaza içine paketlenmiş DNA veya RNA'lardan sadece birine sahip çok küçük infeksiyöz ajanlardır. Latince zehir anlamına gelen virus(lar) bu basit ve çok küçük yapıları ile cansız ortamlarda üreyebilecek yetenekte değildirler. Çünkü, taşıdıkları genetik bilgiler ve buna bağlı olarak gen sayısı kendilerinin bağımsız replikasyonlarını sağlayacak yeterlilik taşımamaktadır. Bu nedenle de canlı hücrelerin ekspresyon mekanizmalarına ve makromoleküllerine gereksinim duyarlar. Diğer bir ifade ile viruslar, bağımsız çoğalmalarını sağlayacak mekanizmalardan ve moleküllerden yoksundurlar. Bunları ancak, infekte ettikleri hücrelerde buldukları için, hücrelere bağımlıdırlar ve birer hücre paraziti olarak kabul edilirler. Bu noksanlıkları nedeniyle de, viruslar, bakteriler gibi tam bir hücre olarak değil "bazı genetik informasyonlara sahip infeksiyöz ajanlar" olarak tanımlanmaktadır.

Viruslar, infekte ettikleri hücrelerde kendi replikasyonlarını sağlayacak makromolekülleri her zaman hazır bulamazlar. Bulunanlar da replikasyonları için uygun veya yeterli olmayabilir. Böyle dezavantajları gidermek için, bazı viruslarda, replikasyonları için önemli fonksiyonu olan bazı enzimlerin kodlarını taşırlar. Ayrıca, viral genom hücreye (sitoplasma) girdikten sonra, hücrenin bütün mekanizmalarına hakim olmakta ve sadece kendilerinin replikasyonu için programlama ve yönlendirme yapmaktadır. Böylece, viral replikasyon güvence altına alınmaktadır. Litik infeksiyonlarda infekte hücreler, kendileri için değil, sadece virus için bütün olanaklarını (ekspresyon mekanizmaları, makromolekülleri, vs.) seferber eder. Hücrelerde metabolizma, replikasyon ve sentez olguları tamamıyla durur ve sonunda hücreler ölürler.

Bakteriler ise, viruslardan çok daha fazla büyüktürler. Genomlarında ve sitoplazmalarında kendi bağımsız replikasyonlarını sağlayabilecek genlere, genetik bilgilere, ekspresyon mekanizmalarına, enerji ve makromolekül oluşturabilecek bütün olanaklara sahiptirler. Bu nedenle de, bakteriler, canlı veya cansız bütün ortamlarda kolayca üreyebilmektedirler. Bakteri olarak kabul edilen, klamidia ve riketsiyalar canlı hücrelerde üremelerine karşın kendilerinde bağımsız replikasyonlarını yapabilecek tüm mekanizmalar bulunmaktadır.

Bazı bakteriler de (mikoplasma, riketsiya ve klamidia) boyutları yönünden viruslara yaklaşır bir konumdadır. Diğer bir ifade ile, bakteriler ile viruslar arasında ölçülere sahiptirler.

Bunlardan, mikoplasmalar hariç tutulursa, riketsiya ve klamidialar sadece canlı ortamlarda üreyebilmektedirler. Bu özelliğinin dışında, bu iki cinse ait etkenler ile mikoplasmalar tam bir bakteri karakteri gösterirler. Bu nedenlerle de, bakteriler arasında klasifiye edilmektedirler. Bakteriler ile virusların bazı özellikleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Viruslardan, çiçek grubuna ait olanlar hariç tutulursa, diğerleri normal ışık mikroskopu ile görülmezler. Ancak, bazılarının hücrelerde meydana getirdiği intrasellüler veya intranükleer inklüzyon cisimleri kolayca gözlenebilir. Virusların morfolojilerini izlemede elektron mikroskoplardan yararlanılır.

	Bakteri	Riketsiya	Mikoplazma	Klamidia	Virus
>300 nm çap	+	+	+	+	-
Çaresiz ortamda üreme	+	-	+	-	-
Bölünerek çoğalma	+	+	+	+	-
DNA+ RNA	+	+	+	+	DNA veya RNA
İnfeksiyöz nükleikasit	-	-	-	-	+
Ribozom	+	+	+	+	-
Metabolizma	+	+	+	+	-
Antibiyotiklere duyarlılık	+	+	+	+	-
Işık mikroskopu ile görülme	+	+	+	+	- Çiçek virüsleri hariç
Filtreleri geçebilme	-	-	-	-	+

Fenner ve ark.1993

Virusların aksine, bakterilerde, DNA, RNA ve ribozomların hepsi bulunur. Viruslar antibiyotiklerden etkilenmedikleri halde bakteriler değişik tarzda olmak üzere duyarlılık gösterirler. Bakteriler ortadan bölünerek çoğalırlar ve filtrelerden geçemezler.

Hayvan viruslarının etrafında bulunan kapsid veya zarf oluşumuna bazı bitki viruslarında rastlanamamıştır (viroid: tek iplikçik, sirküler RNA).

Virusların bakterilere oranla 10-20 kat daha küçük olmaları, bir çok yönlerinin eksik kalmasına yol açmaktadır. Hem viral genom çok küçük olmakta ve hem de içinde bulunan gen sayısı ve buna bağlı olarak genetik informasyonlar bakterilere oranla daha az olmaktadır. Virusların boyutları da 20-300 nm arasında değişmektedir. En küçük virus parvoviruslar (20 nm) ve en büyükleri ise çiçek virusları (300 nm). Çiçek virusları bu ölçüleri ile ışık mikroskopunda kolayca görülmektedirler.

02. Virusların Klasifikasyonu Ve İsimlendirilmesi

Doğada bulunan bütün organizmaların (hayvan, bitki, mantar, alg, parazit, bakteri, protozoon, vs.) kendine özgü bir veya birkaç virusla infekte olabileceği görüşü eskiden beri bilinmektedir. Bunlar arasında insan, hayvan ve bitkilerde hastalıklara yol açan değişik karakterde ve çeşitli özellikte viruslar saptanmış ve her geçen 5-10 yıl içinde de yeni viruslar ortaya çıkmaktadır.

Virusların ilk saptanması, bakterilerden sonra olmuştur. Bu gecikmede, virusların boylarının bakterilerden çok küçük olmaları nedeniyle normal ışık mikroskoplarıyla görülememesi, cansız sıvı ve katı besi yerlerinde ürememesi ve filtreleri geçmesi esas nedeni oluşturmuştur. Bugün, virusların varlığını ortaya koyabilecek, izole ve tanımlayabilecek, üretebilecek bir çok teknik geliştirilmiştir. Elektron mikroskoplar da virusları görüntüleme ve morfolojilerini belirlemede çok yararlı olmaktadır.

Viruslar hastalık oluşturduğu canlılara göre sınıflandırıldığı gibi (insan, hayvan, bitki, insekt, virusları, vs.) meydana getirdiği bozuklukların lokalizasyonuna göre de bir klasifikasyona tabi tutulmuştur. Şöyle ki, afinitesi (tropizm) olduğu doku ve organlara göre: enterotropik viruslar, neurotropik viruslar, dermatropik viruslar, pneumotropik viruslar, vs.

Ayrıca, viruslar enzimatik, immunolojik, bazı kimyasal maddelere duyarlılık, replikasyon stratejileri, vs. özellikleri de dikkate alınarak sınıflandırmalar yapılmıştır.

03. Başlıca Virus Grupları

Başlıca virus familyaları (alfabetik sıraya göre dizilmişlerdir).

DNA Virusları

Familya-1 : Adenoviridae

Cins -1 : Mastadenovirus (memelilerin)

Cins -2 : Aviadenovirus (kanatlıların)

Familya-2 : Circoviridae

Familya-3 : Hepadnaviridae

Familya-4 : Herpesviridae

Alt familya-1 : Alphaherpesvirinae

Cins -1 : Simplexvirus

Cins -2 : Varicellavirus

Alt familya-2 : Betaherpesvirinae

Cins -1 : Cytomegalovirus

Cins -2 : Muromegalovirus

Alt familya-3 : Gammaherpesvirinae

Cins -1 : Lymphocryptovirus
 Cins -2 : Rhadinovirus
 Cins -3 : Thetaly phocryptovirus
 Familya-5 : İridoviridae
 Familya-6 : Papovaviridae
 Cins -1 : Papillomavirus
 Cins -2 : Polyomavirus
 Familya-7 : Parvoviridae
 Cins -1 : Parvovirus
 Cins -2 : Dependovirus
 Cins -3 : Densovirus
 Familya-8 : Poxviridae
 Cins -1 : Orthopoxvirus
 Cins -2 : Leporipoxvirus
 Cins -3 : Avipoxvirus
 Cins -4 : Capripoxvirus
 Cins -5 : Suipoxvirus
 Cins -6 : Parapoxvirus
 Cins -7 : Molluscipoxvirus
 Cins -8 : Yatapoxvirus
 RNA Virusları
 Familya-1 : Arenaviridae
 Familya-2 : Birnaviridae
 Familya-3 : Bunyaviridae
 Cins -1 : Bunyavirus
 Cins -2 : Phlebovirus
 Cins -3 : Nairovirus
 Cins -4 : Hantavirus
 Familya-4 : Caliciviridae
 Familya-5 : Coronaviridae
 Familya-6 : Filoviridae
 Familya-7 : Flaviviridae
 Cins -1 : Flavivirus
 Cins -2 : Pestivirus

Familya-8 : Orthomyxoviridae
 Cins -1 : Influenza
 Familya-9 : Paramyxoviridae
 Alt familia -1 : Paramyxovirinae
 Cins -1 : Paramyxovirus
 Cins -2 : Morbillivirus
 Cins -3 : Rubellavirus
 Alt familia -2 : Pneumovirinae
 Cins -1 : Pneumovirus
 Familya-10 : Picornaviridae
 Cins -1 : Enterovirus
 Cins -2 : Cardiovirus
 Cins -3 : Rhinovirus
 Cins -4 : Aphthovirus
 Familya-11 : Reoviridae
 Cins -1 : Orthoreovirus
 Cins -2 : Orbivirus
 Cins -3 : Cypovirus
 Cins -4 : Rotavirus
 Cins -5 : Fijivirus
 Familya-12 : Retroviridae
 Alt familia -1 : Oncovirinae
 Cins -1 : Oncovirus (C)
 Cins -2 : Oncovirus (B)
 Cins -3 : Oncovirus (B)
 Alt familia -2 : Lentivirinae
 Alt familia -3 : Supunavirinae
 Familya-13 : Rhabdoviridae
 Cins -1 : Vesiculovirus
 Cins -2 : Lyssavirus
 Familya-14 : Togaviridae
 Cins -1 : Alphavirus
 Cins -2 : Rubivirus
 Cins -3 : Pestivirus

Cins -4	: Arterivirus
Familya-15	: Toroviridae (tam sınıflandırılmadı)
Familya-16	: Astroviridae (tam sınıflandırılmadı)

Virusların Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri

01. Virusların Morfolojik Özellikleri

İnsan ve hayvanlarda infeksiyon ve/veya hastalık oluşturan viruslar (genel bir terim olarak, hayvan virusları) morfolojik özellikleri yönünden fazla çeşitlilik göstermemekle beraber, elektron mikroskopik muayenelerde olgun viruslarda bazı farklı formlar gözlemlenmiştir.

Normal ışık mikroskopları ile görülebilen (1000 x veya 1500 x büyütme) Poxviridae familyası virusları hariç tutulursa, diğer virusların morfolojik karakterleri (olgun virus partiküllerinin genel görünümü ve yapıları) hakkında ayrıntılı bilgiler ve görüntüler, ancak, elektron mikroskopların keşfinden ve viroloji alanında kullanılmaya başlamasından sonra elde edilebilmiştir. Negatif boyama, X- ışınları difraksiyon, krioelektron mikroskopi, elektron mikroskop (TEM, SEM) ve diğer tekniklerin uygulanması, virusların daha net, ayrıntılı ve açık görüntülenmesine çok büyük katkısı olmuştur.

Yapılan çalışmalarla virusların başlıca 4 morfolojik form gösterdikleri belirlenmiştir.

1) Yuvarlak (sferik) formlar: İkosahedral simetriye sahip bazı DNA (Adenoviridae, Herpesviridae, Papovaviridae, Iridoviridae, Hepadnaviridae) ve RNA virus familyaları (Birnaviridae, Caliciviridae, Picornaviridae, Reoviridae ve diğer bazı familyalar) ile helikal simetriye sahip olanlar (Arenaviridae, Bunyaviridae, Coronaviridae, Orthomyxoviridae, vs) bu grup içinde yer almaktadırlar.

2) Flamentöz formlar: Filoviridae virusları (Ebola ve Marburg virusları) flamentöz morfolojik bir özellik gösterirler.

3) Mermi benzeri formlar: Rhabdoviridae virusları (kuduz virusu) mermi benzeri formlara sahiptirler.

4) Briket (tuğla) benzeri formlar: Poxviridae virusları (variola, vaccinia, Cowpox, Orf, BPS, *Molluscum contagiosum*, vs) bu gruba dahildirler.

Her ne kadar hayvan virusları başlıca 4 temel form gösteriyorlarsa da sferik olanlar daha fazla familya ile temsil edilmekte ve diğer 3 grup ise birer familyada bulunmaktadır.

Hayvan virusları, elektron mikroskopla saptanabilen başlıca 3 temel yapısal karakter göstermektedirler.

1) Kapsomerler ve kapsid

2) Zarf

3) Nukleik asitler (viral genom, DNA ve RNA)

01.01. Kapsomerler ve Kapsid

Hayvan viruslarının genetik materyallerinin (DNA ve RNA) etraflarında belli sayıda ve birbirleri ile non kovalent bağlarla birleşmiş protein alt üniteleri (kapsomerler) bulunmaktadır. Kapsomerler, ikosahedral simetriye sahip viruslarda, belli bir düzen içinde yan yana gelerek birleşir ve böylece genomun etrafında proteinden bir muhafaza oluşturur ki buna kapsid adı verilir. Helikal simetrideli viruslarda ise, kapsomerler, viral nukleik asitin üzerinde yan yana gelmiş ve genoma bağlanmış durumdadırlar.

Viruslar, kapsid simetrisine göre başlıca iki kısma ayrılmaktadırlar. Ancak, bu iki temel gruba uymayan poxvirusları 3. bir bölüm içinde toplanmış ve böylece hayvan virusları 3 kısımda incelenmektedirler.

- 1) İkosahedral (kübik) simetri
- 2) Helikal (sarmal) simetri
- 3) Kompleks yapı

1)İkosahedral (kübik) simetri: Kapsomerlerin yan yana gelerek oluşturdukları düzenli formlar arasında kübik simetrisinin özel bir önemi bulunmaktadır. İkosahedral simetri gösteren bir kapsid (isometrik kapsid), 12 köşe, 20 eşkenar üçgen yüzey ve 30 kenardan oluşmaktadır. Kapsidin köşelerinde yer alan her bir kapsomer 5 tane komşu kapsomerle (pentamer, penton), kenar ile yüzeylerde bulunan her bir kapsomerde 6 tane komşu kapsomerle (hekzamer, hekzon) çevrilmiştir. Bunlar bazı viruslarda aynı ve bir kısımlarında ise farklı yapıda polipeptidlerden oluşmaktadır. Adenoviruslarında da köşelerden çıkan, kısa ve uçları şişkince (tokmak benzeri) uzantılar (fiber) bulunmaktadır. Protein karakterinde olan fiberler, virusun hücrelere tutunmasında görev alırlar.

Kübik simetrideli viruslarda nukleik asitler, kapsidin orta kısmında lokalize olmuştur. Genom ile kapsidin oluşturduğu birliğe, genellikle, nukleokapsid adı verilmektedir.

Bazı DNA ve RNA viruslarının morfolojik özellikleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

DNA Virusları (familyalar)	Çap (nm)	Zarf	Simetri	Kapsomer	Etere duyarlılık
Adenoviridae	70-90	-	İkosahedral	252	Duyarsız
Hepadnaviridae	42	+	İkosahedral	?	Duyarlı
Herpesviridae	150	+	İkosahedral	162	Duyarlı
İridoviridae	125-300	+	İkosahedral	1892	Duyarlı
Papovaviridae	45-55	-	İkosahedral	72	Duyarsız
Parvoviridae	18-26	-	İkosahedral	32	Duyarsız

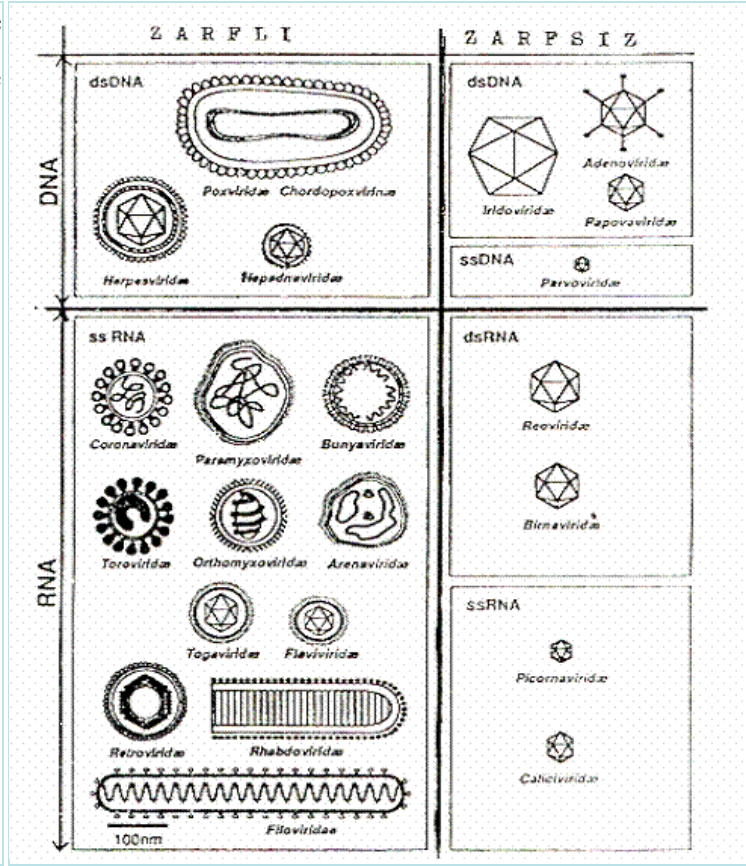
Poxviridae	230x400	+	Kompleks yapı	?	Duyarlı ve bazı türler duyarsız
------------	---------	---	---------------	---	---------------------------------

RNA Virusları (familyalar)

Arenaviridae	110-130	+	Helikal	?	Duyarlı
Birnaviridae	60	-	İkosahedral	92	Duyarsız
Bunyaviridae	90-120	+	Helikal	?	Duyarlı
Caliciviridae	35-40	-	İkosahedral	32	Duyarsız
Coronaviridae	75-160	+	Helikal	?	Duyarlı
Filoviridae	790-970x80	+	Helikal	?	Duyarlı
Flaviviridae	40-50	+	İkosahedral	?	Duyarlı
Orthomyxoviridae	80-120	+	Helikal	?	Duyarlı
Paramyxoviridae	150-300	+	Helikal	?	Duyarlı
Picornaviridae	25-30	-	İkosahedral	32	Duyarsız
Reoviridae	60-80	-	İkosahedral	32,92	Duyarsız
Retroviridae	80-100	+	Helikal	?	Duyarlı
Rhabdoviridae	75x180	+	Helikal	?	Duyarlı
Togaviridae	50-70	+	İkosahedral	60	Duyarlı

İkosahedral simetrik virüslere, hem DNA ve hem de RNA virüs familyalarının bazılarında rastlanmaktadır. DNA virüslerinden herpes ve hepadnavirüsleri, ile RNA virüslerinden togavirüs ve flavivirüslerinin etrafında (kapsidin dışında) diğer bir muhafaza daha bulur(zarf).

Bazı virusların morfolojik ve genom özellikleri yandaki şekilde gösterilmektedir.

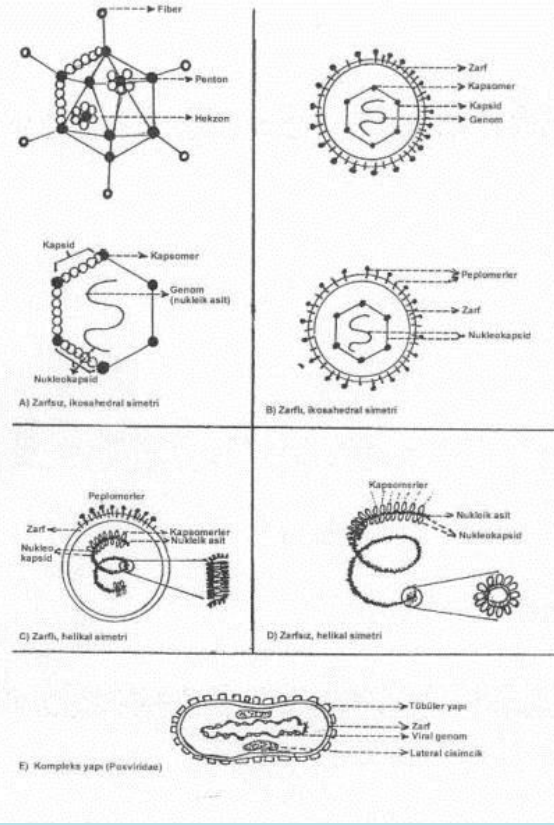


2) Helikal (sarmal) simetri: Helikal simetrik virüslere RNA virüs ailyelerinde rastlanmaktadır. DNA virüslerinde bu form bulunmamaktadır.

Sarmal simetrik virüslere spiral formda bulunan genetik materyalin üzerinde, bir tür polipeptitten oluşan, oval veya yuvarlak şekilli kapsomerler yan yana gelerek genomla birleşmişlerdir. Böylece, nükleik asit (RNA) kapsomerlerle birlikte helikal (spiral) bir form alır (helikal simetri).

3) Kompleks yapı formu: Yukarıda açıklanan temel iki kapsid simetrisine uymayan Poxviridae ailyesi virüslere kompleks yapı formu grubu içinde incelenmektedirler. Böyle yapıya sahip virüslerinin yüzeylerinde tübüler elementler bulunur. Çiçek virüslerinde, DNA karakterindeki viral genom ortada ve bikonkav bir lokalizasyon gösterir. Ayrıca, orta kısımlarda da lateral cisimcikler yer almışlardır (orthopoxvirüslere). Parapoxvirüslerinin yüzeylerinde çapraz yapılar bulunur. Poxvirüslerinin etraflarında lipitten zengin zarf vardır.

Virusların başlıca yapısal formları yandaki şekilde gösterilmektedir.



01.02. Zarf

Bazı DNA (herpesvirusları, hepadnaviruslar, poxvirusları) ve RNA virusları (arenavirusları, bunyavirusları ve diğerleri) nükleokapsidlerinin etraflarında, viruslar hücrelerden tomurcuklanarak olgunlaştıkları sırada hücreye ait membranlara sarılarak dışarı salınırlar. Bu nedenle de zarfın yapısı, hücre membranlarının (sitoplasmik membran, nükleer membran, endoplasmik retikulum) kimyasal yapısı ile çok büyük benzerlik gösterir. İki katmanlı (bilayer) olan zarf, hücreler tarafından kodlanmasına karşın, zarfta bulunan peplomerler (glikoprotein yapısında, spike) ise viruslar tarafından spesifiye edilirler. Tomurcuklanarak hücrelerden çıkan zarflı viruslar hücrelere zarar vermezler ve hücreler normal yaşamlarını sürdürürler. Diğer bir ifade ile, hücrelerde morfolojik değişiklikler (sitopatik etkiler, CPE) yapmazlar. Ayrıca, böyle viruslar, persistent infeksiyonlara yol açabilirler. Buna karşın hücre içinde olgunlaşan bazı viruslar da hücrelerde parçalanma (sitolizis) yaparak dışarı çıkarlar.

Viruslarda kapsid ve zarfın çok önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda belirtilmiştir,

a) Kapsidler ve zarflar, virusları, hem hücre içi (nükleazlardan) ve vücut içi antiviral maddelerden ve hem de vücut dışı fiziksel, kimyasal ve diğer virüsidal faktörlerin zararlı etkilerinden de korurlar,

- b) Kapsidler ve zarflar (peplomerler), protein ve glikoprotein yapısında olduklarından ve virus grupları arasında farklı kimyasal özellik taşıdıklarından, vücutta spesifik bağışıklığı uyarak özgül antikor sentezini sağlarlar,
- c) Kapsidler ve zarflar, hücre yüzeylerindeki spesifik reseptörlere bağlanmada önemli rol oynarlar ve virusların infeksiyon oluşturmasının veya hücrelere girişinin de ilk basamağını sağlarlar,
- d) Kapsidler ve zarflar, virusların güvenli olarak sitoplasmik membranı geçmesini ve hücre içine (sitoplasmaya) ulaşmasına yardımcı olurlar,
- e) Kapsidler ve zarflar, virusların morfolojik özelliklerini belirlemede de fonksiyoneldirler,
- f) Kapsidler ve zarflar (peplomerler), vücutta oluşan spesifik antikorların tanınmasında ve bunlara bağlanmada ve antikor-antijen interaksiyonlarında önemli görevlere sahiptirler.
- g) Bazı poxvirusları hariç tutulursa, zarfın bütünlüğü infektivite için gereklidir.

Zarflı viruslarda, glikoprotein yapısında olan peplomerlerin yanı sıra Transport kanal proteinlerinin varlığı da bildirilmektedir. Bunlar, membranın (zarfın) permeabilitesinde değişiklikler yapmakta, virionun internal ortamını modifiye etmekte ve virionun olgunlaşmasına katkıda bulunmaktadır.

01.03. Viral Nükleik Asitler (viral genom, DNA ve RNA)

Virusların genetik yapılarını oluşturan nükleik asitler (viral genom), deoksiribonükleik asit(DNA) veya ribonükleik asit (RNA)lerden sadece birinden oluşur. Diğer bir ifade ile, virionda ya DNA veya RNA'lardan sadece biri vardır ikisi birden bulunmamaktadır. Bunlara karşın, bakterilerin genetik materyallerini hem DNA ve hem de RNA oluşturur. Ancak bunlardan mRNA'da genetik bilgiler bulunur. Diğer RNA'lar (tRNA ve rRNA) nongenomiktirler.

02. Virusların Kimyasal Yapıları

Olgun bir virus partikülü, her ne kadar bir bakteri kadar zengin ve çeşitli kimyasal bileşenlere sahip değilse de duyarlı organizmaya girdiklerinde değişik derecede (virusa ve konakçıya bağlı olarak) immunolojik bir yanıt oluşturabilecek moleküllere ve kompleks yapılara sahip bulunmaktadır. Bu nedenle de, viruslar, immunolojik özellikleri bakımından, bakterilerden hiç de gerilerde değildir ve hatta daha da önde oldukları söylenebilir.

Virusların kimyasal yapılarını oluşturan başlıca bileşenler hakkında aşağıda kısa ve öz bilgiler verilmektedir.

02.01. Viral Proteinler

Virusların yapılarında bulunan proteinler (viral proteinler) başlıca iki karakter taşımaktadırlar.

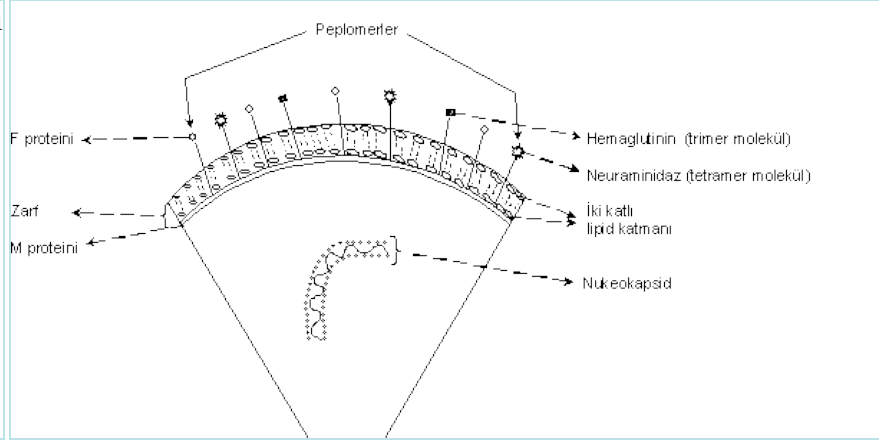
1) Yapısal (strüktürel) proteinler: Bu tür proteinler virionun bir çok bölgesinde lokalize olmuşlardır. Bunlardan, kapsid proteinleri, bazı DNA ve RNA viruslarında kapsidi oluşturan protein alt ünitelerinin (kapsomerler) yapısında bulunurlar ve çok iyi immunojenik aktiviteye sahiptirler. Kapsid proteinleri, bir virionun yüzeyinde, değişik karakterlerde ve lokalizasyonlarda olabilirler (VP1, VP2, VP3.....,gp,.....). Helikal simetrik viruslarda ise, genomla birleşik olan kapsomerler, nukleokapsidi oluştururlar. Burada da kapsomerlerin yapısı yine proteinden meydana geldiğinden antijenik bir özellik taşır.

Yapısal proteinlerin bazıları da virusun bağlanma proteinlerini (ligand) oluştururlar.

Zarflı viruslarda zarfın yapısında bulunan proteinler (zarf proteinleri) virus tarafından kodlanan peplomerlerde lokalize olmuşlardır. Peplomerlerde virus tarafından kodlanan peplomerlerde lokalize olmuşlardır. Peplomerlerde (spike), başlıca hemagglutinin, neuraminidase ve F-proteinleri bulunmakta ve bunlar, hücre yüzeylerinde yerleşik olan spesifik reseptörlerle bağlanabilen ligandları oluştururlar. Protein ve glikoprotein özelliği taşıyan bu moleküller de çok iyi antijenik karaktere sahiptirler. Hemagglutininler (trimer molekül) genellikle, hem alyuvarlara bağlanarak hemagglutinasyon fenomenine neden olurlar ve hem de hücrelere bağlanmada etkin ligandları oluştururlar. Neuraminidase (tetramer molekül) ise, hücre yüzeylerinde lokalize olan reseptörlerin yapısındaki oligosakkaridlerdeki sialik asidi hidrolize ederek bunun aktivitesine mani olur ve virusun bağlantısını çözümler serbest kalmasını sağlar (elüzyon). Bu nedenle neuraminidaz "reseptör parçalayan enzim" olarak tanınmaktadır (parapoxvirusları, orthopoxviruslar ve diğerleri). Virusların hücre içlerine girmesinde bu olgunun önemi fazladır. F-proteini (füzyon proteini), bu moleküller, hücrelerin bir araya gelmesini sağladığı gibi, hücre membranları ile de interaksiyona girerek zarfın membranla bütünleşmesinde de önemli rol oynar ve nukleokapsidin sitoplasmaya girişini kolaylaştırır. Zarflı olmasına karşın, Coronaviridae ve Herpesviridae viruslarındaki peplomerlerin etkinliği, Orthomyxoviridae ve Paramyxoviridae virusları kadar değildir ve oldukça zayıftır.

Bazı zarflı viruslarda da (rhabdoviruslar, reoviruslar, orthomyxoviruslar, vs) yapısal bir karakter taşıyan ve zarfın iç yüzünde lokalize olan nonglikozile matriks proteinleri (M-proteinleri) bulunmaktadır. Viruslara şekil vermede rollere sahip olan M-proteinlerine Arenaviridae, Bunyaviridae ve Coronaviridae familyası virusların da rastlanmamıştır.

Zarfin yapısı yandaki şekilde gösterilmektedir.



2) Yapısal olmayan (non strüktürel) proteinler: Bu proteinler, genellikle, viruslar tarafından kodlanmakta olup enzim karakteri göstermektedirler. Bunlar, virusların hücre içinde replikasyonları ve transkripsiyon regülasyonunda görev almaktadırlar (transkriptaz, revers transkriptaz, erken gen proteinleri ve diğerleri). Poxviridae familyası virusları kodladığı proteinleri bakımından oldukça zengindirler. Retroviruslar da revers transkriptaz enziminin kodlarına sahiptirler.

02.02. Lipidler

Bazı DNA (Herpesviridae, Hepadnaviridae, Iridoviridae) ve RNA virus familyalarında (Arenaviridae, Bunyaviridae ve diğerleri) nükleokapsidlerin dışında yer alan ve hücre orijinli olan zarflar genellikle lipidlerden zengindirler. Çünkü, zarflar, viruslar, hücre membranlarından (sitoplasmik membran, nükleer membran, endoplasmik retikulum) çıkarırken (olgunlaşma sırasında) alırlar. Bu nedenle de zarfın kimyasal yapısı ile hücrelerinki arasında çok yakın bir benzerlik bulunmaktadır ve bunlar hücre tarafından kodlanırlar. Zarflarda bulunan lipidler, viruslara göre değişmek üzere, hücre kuru ağırlığının %20-35'i kadar olabilmektedirler. Herpes viruslarının zarfları, hücrelerin nükleer membranları, orthomyxovirus ve paramyxovirusların zarf lipidleri de sitoplasmik membranların kimyasal yapıları ile özdeşler. Lipidlerin yapısında fosfolipid, kolesterol, nötral yağlar, trigliseridler, glikolipidler, vs. bulunmaktadır.

02.03. Karbonhidratlar

Karbonhidratlar, virusların değişik bölgelerinde lokalize olmuşlardır. Virusların genetik materyallerinde (DNA ve RNA) pentoz şekerleri bulunmaktadır. DNA viruslarında 2-deoxy D-ribose olan şeker, RNA viruslarında D-ribose molekülü halindedir. Bu durumları ile de, genoma ad verirler (DNA ve RNA gibi).

Karbonhidratlar, genomun yapısındaki bazlar ile fosfat molekülleri arasında bağ kurarlar. Şöyle ki, pirimidin bazlarında, şekerin 1 no'lu karbon atomu ile bazın 3 no'lu nitrojeni ve pürin bazlarında da şekerin 1 no'lu karbon atomu ile, bazın 9 no'lu nitrojeni arasında beta

glikozid bağları ile ve diğer taraftan da pentoz şekerleri 3. ve 5 no'lu karbon atomları ile fosfat moleküllerine fosfodiester bağları ile birleşerek kompleksler oluştururlar.

Zarfların yüzeyinde bulunan peplomerlerin yapısında da şeker molekülleri bulunduğundan bunlar, glikoprotein yapısı taşırlar ve iyi bir antijeniteye de sahiptirler. Buna karşın, matriks proteininde (M-proteini) şeker molekülü bulunmamaktadır (nonglikozile).

02.04. Fosfatlar

Fosfat molekülü (H_3PO_4), viral nukleik asitlerin 3. önemli yapısal komponentini oluşturur. Ayrıca, Poxviridae familyası viruslarında fosforilize olmuş bazı proteinlere (fosfoprotein) veya lipidlere (fosfolipid) rastlanılmaktadır.

02.05. Nukleik Asitler (viral genom)

Viruslar, genetik materyal olarak DNA (deoksiribonukleik asit) veya RNA (ribonukleik asit)'lerden sadece birini taşırlar. Bütün viral genomlarda her genin sadece bir kopyası olmasına karşın, retroviruslarında iki molekül tek iplikçik RNA bulunmaktadır (2, ss RNA, diploid).

Bakterilerin Genetik Karakterleri

01. Genetik Materyallerin Yapısı

Nukleik asitler, prokaryotik ve ökaryotiklerin, virus, plasmid, faj, transpozon, IS-elementlerinin temel makromolekülünü oluşturduğundan, ayrıca bütün yaşamsal fonksiyonları ve kalıtsal özellikleri de yönettiğinden çok önemli rollere sahiptirler. Bu bölümde daha ziyade prokaryotiklerin (bakteri), virus, plasmid ve faj genomlarının moleküler yapıları ve işlevleri hakkında genel mikrobiyolojiye dayalı, özlü ve temel bilgiler verilecektir.

Nukleik asitler, ilk defa, İsviçreli bir fizyolog olan Friedrich Mischer tarafından 1869 yılında bildirilmiştir. İrin içindeki beyaz kan hücrelerinde proteinlerden ayrı olarak asit karakterde bazı maddelerin de varlığını ortaya koyan araştırmacı, bunlara nuklein adını vermiştir. Çalışmalarını sonraları salmon balıklarının spermatozoidlerinin çekirdekleri üzerinde yoğunlaştıran F. Mischer, bu araştırmalarını 1874 yılında yayımlamıştır. Benzer konularda incelemelerini sürdüren diğer bir bilim adamı da, Richard Altman (1889), asit karakterleri nedeniyle, nukleinleri nukleik asit olarak yeniden isimlendirmiştir. Alman kimyacı, Robert Feulgen, nukleik asitleri, kendi adı ile anılan spesifik bir boyama yöntemi (Feulgen) ile boyamayı başarmıştır (1920). Aynı tarihte, Rockefeller Enstitüsü'nde, Phoebus Levine, nukleik asitlerin yapısında pentoz şekerinin bulunduğunu açıklamıştır. Oswald Avery (1930), nukleik asitlerin (DNA) genetik bir madde olduğunu bildirmiştir.

Watson ve Crick (1953), DNA'nın çift iplikcikli ve sarmal bir yapıya (double-helix) sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu tarihten sonra, gerek prokaryotik ve gerekse ökaryotik DNA üzerinde çok yoğun çalışmalar yapılmaya başlanmış ve halen de aynı hızda devam etmektedir. Bu araştırmalar sayesinde DNA'nın fonksiyonları hakkında çok ayrıntılı ve değerli bilgiler elde edilmiştir. Ayrıca, genetik materyal olarak, RNA ve mRNA üzerinde de benzer tarzda incelemeler yapılmıştır.

Hücrelerdeki bütün biyolojik olayları (fizyolojik, biyokimyasal, genetik vs.) yöneten, genetik bilgiler taşıyarak bunların nesillere aktarılmasında önemli fonksiyonları bulunan nukleik asitler (DNA ve RNA), hücrelerde bir merkezi jeneratör görevine sahip bulunmaktadır. Bu makromolekül, başlıca iki yapısal özellik taşımaktadır.

1) Deoksiribonukleik asit (DNA)

2) Ribonukleik asit (RNA)

02. Prokaryotik Deoksiribonukleik Asit (DNA)

Bakterilerde DNA, hücre kuru ağırlığının yaklaşık %2-3 kadarını oluşturmakta ve mikroorganizma türüne göre değişmek üzere de 0.01 pg (1 pg= 10⁻¹² g) ağırlığında olabilmektedir. Mikoplazmalarda DNA'nın molekül ağırlığı (MA) 4x10⁸ dalton, hemofiluslarda MA: 8x10⁸ dalton, *B. subtilis* 'de 3.9x10⁹ ve *E. coli* 'de 2.6x10⁹ kadardır (1 dalton= 1.67x10⁻²⁴ g). DNA'nın uzunluğu, *E. coli* 'de yaklaşık 1.1-1.5 mm kadar olup 4x10⁶ nukleotid çiftinden (baz çifti) oluşmaktadır. Bu uzunluk *E. coli* 'nin yaklaşık 500 katı kadardır.

Nukleotid birimlerinden (monomer) oluşan ve bir polimer olan DNA'nın yapısında 3 temel komponent bulunmaktadır. Bunlar da;

1) Pirimidin ve pürin bazları,

2) Pentoz şekeri (2-deoksi-D-riboz)

3) Fosfat molekülü (fosforik asit, H₃PO₄)

02.01. Pirimidin Bazları

DNA'nın yapısında yer alan pirimidin bazları, 4 karbon ve 2 nitrojen atomundan oluşmuş tek halkalı (6 köşeli) bir temel yapı özelliği gösterirler. Bu çatının serbest uçlarına bazı atom veya atom grupları bağlanarak pirimidinler meydana gelmişlerdir. Nukleik asitlerde başlıca iki tür pirimidin bazı bulunmaktadır. Bunlar da, Sitozin (C: 4 amino-2-oksipirimidin) ve Timin (T: (2,4-dioksi 5-metil pirimidin)).

02.02. Pürin Bazları

Bir pirimidin derivatı olarak kabul edilen pürin bazlarında, biri primidin (6 atomlu) ve diğeri de buna birleşmiş 5 atomlu imidazol halkasından (3 karbon + 2 nitrojen atomu) (meydana

gelmiş) iki halka bulunur. DNA'da iki tür pürin bazı bulunmaktadır. Bunlardan biri, Adenin (A: 6-amino pürin) ve diğeri de Guanin (G: 2 amino; 6 oksipürin)'dir.

Pirimidin ve pürin bazları hidrofobik bir karaktere ve planer bir yapıya sahiptirler. Bazı mikroorganizmalarda (fajlarda) nukleik asitlerin yapısında, yukarıda belirtilen temel bazların yanı sıra minor bazlar olarak adlandırılan, 5-metil sitozin (5'-MC) ve 5'-hidroksi metil urasil (5'-HMU) bulunmaktadır.

02.03. Pentoz Şekeri

DNA'nın yapısındaki ikinci önemli komponenti, 5 karbonlu bir pentoz olan D-riboz ($C_5H_{10}O_5$) oluşturur. Ancak, bu şekerin 2. pozisyonunda bulunan karbon atomuna bağlı bir oksijeni bulunmamaktadır ($C_5H_{10}O_4$). Bu nedenle de şeker, 2-deoksi-D-riboz ve nukleik asit de, buna bağlı olarak, deoksiribonukleik asit olarak, adlandırılmaktadır.

02.04. Fosfat Grubu

Nukleik asitlerin (DNA ve RNA) yapısında bulunan 3. komponent de fosfat molekülüdür (H_3PO_4). Fosfat, hem DNA'da ve hem de RNA'da aynı yapıdadır.

02.05. Nukleosidler

Nukleosidler: Pirimidin (T,C) veya pürin bazlarından (A,G) birisi ile pentoz şekeri (2-deoksi-D-riboz) birleşerek nukleosidleri meydana getirirler. Her iki molekül arasındaki bağlanma, pentoz şekerinin 1. pozisyonunda bulunan karbon atomunun, pirimidinlerin 3'-pozisyonundaki N-atomu ile ya da pürinlerin 9'-pozisyonundaki N-atomu ile beta glikozid bağları yardımı ile gerçekleştirilir.

02.06. Nukleotidler

Nukleosidler de fosfat molekülleri ile birleşerek nukleotidleri oluştururlar (deoksiribonukleotid). Bu birleşme, pentoz şekerinin 5'-pozisyonundaki karbon atomu ile fosfat molekülünün oksijeni arasında kurulan ester bağı ile sağlanır. Nukleotidler de yapısındaki bazların türlerine göre pirimidin nukleotidler (timin deoksiribonukleotid ve sitozin deoksiribonukleotid) ve pürin nukleotidler (adenin deoksiribonukleotid ve guanin deoksiribonukleotid) olarak iki kısma ayrılırlar.

02.07. Polinukleotidler

Yan yana bulunan nukleotidler (monomer), birbirleri ile fosfodiester bağları ile birleşerek polinukleotid zincirlerini (polimer) oluştururlar.

Fosfat grubu, bitişik nukleotidin pentoz şekerinin 5' pozisyonundaki karbon atomu ile diğer komşu şekerin 3'-pozisyonundaki karbon atomu arasında fosfodiester (O-P-O) bağı kurar.

Bir bakteri genomunda bu tarzda büyüyen, birbirine karşılıklı hidrojen bağları ile birleşmiş iki adet polinukleotid iplikçığı vardır. Bu iki iplikçikten, birinin 5'-P ucu serbestse, bunun

karşısında bulunan diğer iplikçiğin 3'-OH ucu serbesttir. Bu durum, her iki iplikçiğin diğer uçları için de benzeridir. Böylece iki iplikçik bir polariteye sahip olur ve iplikçikler birbirine anti-paralel bir durum gösterirler. Buna göre, iplikçiklerden birinin büyüme yönü 5'→3' ise, diğerinin büyüme yönü tersine 3'←5' olmaktadır.

Bir bakteride genetik kodlar ve özellikleri şöyledir.

1) Kodonlar tripletlerdir: Genetik bilgileri saklayan kodlar, 3 bazın birleşmesinden meydana gelmişlerdir.

2) Kodonlar değişkendir: Her amino asit için bir veya birden fazla triplet bulunmaktadır. Örn., fenilalanin için UUU ve UUC, serin için UCU ve UCC, vs. birden fazla kodon bulunur. Bu örnekleri daha da çoğaltmak mümkündür.

3) Kodonlar birbirlerine çakışmazlar: Bir triplette bulunan bazlar, aynı anda, başka bir amino asitin kodunu olamaz. Diğer bir ifade ile aynı harflerle oluşan bir kodon, ancak bir amino asitin şifresini teşkil eder. Ayrıca, yan yana bulunan bazlardan biri, bir önceki veya sonraki amino asitin kodununun bir harfini (bazını) oluşturamaz. Bu nedenle, kodonlar birbirlerinden tam bağımsızdırlar.

4) Kodonlar arasında boşluk yoktur: Prokaryotik mikroorganizmalarda (bakterilerde) kodonlar DNA veya mRNA üzerinde yan yana aralıksız olarak devam ederler. İki triplet arasında herhangi bir baz(lar) veya sekans bulunmaz ve bu nedenle arada intron (kodlamayan sekans) yoktur. Bu durum, genler için de geçerlidir. Buna karşın, viruslarda ve ökaryotiklerde, birbirleriyle ilişkili genler olsa bile, bazen aralarında 2000 veya daha fazla bazlık kodlamayan sekanslar (intron) bulunmaktadır. Ancak, DNA'dan mRNA sentezlenirken bu intronlar primer mRNA'ya aktarılmasına karşın, olgun mRNA'nın meydana gelmesinde intronlar çıkarılır ve sadece kodlayan genler (eksonlar) yan yana getirilerek birleştirilir ve böylece translasyon için sadece olgun mRNA kullanılır.

5) Kodonlar universaldir: Bir triplet, bakteride hangi amino asitin şifresi ise, ökaryotiklerde ve diğer organizmalara ait DNA'lar da aynı amino asitin kodudur. Bu durum da, canlıların genetik materyallerinin amino asit şifrelemesi yönünden birbirlerinin benzeri olduğunu göstermektedir. Ayrıca, baz türlerinin de hemen hemen aynı olduğunu anlamak mümkündür.

Bakterilerde DNA, iki adet polinukleotid iplikçiğinin sarmal bir tarzda karşılıklı birleşmesinden oluşmuş ve sirküler bir yapı karakteri gösterir (double heliks, çift sarmal). Aynı zamanda, bu polinukleotid iplikçiğinin iki ucu da kapalıdır (sirküler) ve tek bir molekül halindedir. Uzunluğu, bakterilerin türlerine göre değişmek üzere, bakteri boyunun 400-500 katı kadardır (1.1-1.5 mm). Ancak, *B. burgdorferi*'de lineer bir kromozomun olduğu bildirilmiştir.

02.08. Diğer Bazı Yapısal Özellikleri

Nukleik asitlerin, proteinlerde de belirlendiği gibi, bazı yapısal özellikleri bulunmaktadır.

1) Nukleik asitlerin primer yapıları: Nukleik asitlerin komponentlerinin birbirlerine bağlanma özellikleri

2) Nukleik asitlerin sekonder yapıları: Bu yapı içinde, nukleik asitlerin sarmal yapıları, her sarmala isabet eden baz sayıları, karşılıklı bazlar arası hidrojen bağları, DNA'nın yapısı (A, B, Z DNA formları), vs bulunmaktadır.

3) Nukleik asitlerin tersiyer yapıları: Bu kavram içinde DNA'nın sirküler, lineer ve süpersarmal formları yer almaktadır.

02.9. Denatürasyon ve Renatürasyon

Bakterilerden saf olarak elde edilen DNA süspansiyonu 100°C 'ye kadar yavaş yavaş ısıtılırsa (veya kimyasal yöntemlerle) bazlar arasındaki karşılıklı hidrojen bağlarında çözümler meydana gelerek iki iplikçik birbirlerinden ayrılabilir (denatürasyon). Eğer bu süspansiyon, yavaş yavaş soğutulursa bu defa da karşılıklı hidrojen bağları tekrar kurulur ve molekül eski formunu alır (renatürasyon). DNA'nın bu özelliğinden yararlanılarak suni veya melez (hibrid) DNA molekülleri oluşturmak (hibridizasyon) ve bunları çeşitli araştırmalarda, mikroorganizmaları sınıflamada, gen transferlerinde veya diğer genetik manipulasyonlarda kullanmak olanak dahiline girmiştir. Hibridizasyon denemelerinde çok yararlanan böyle çalışmalarda, hibrid moleküller oluşturmak ve sonra da bunları işaretli problemlerle saptamak mümkündür.

02.10. Süpersarmal (Süperheliks) DNA Formasyonu

Prokaryotiklerin (bakteriler) DNA'ları başlıca 2 topolojik formda bulunmaktadır.

a) Sirküler dubleks DNA formu: Bakteriler, bazı fajlar (PM2, vs.), iplikçikli sarmal sirküler bir karaktere sahiptir.

b) Süpersarmal (süperheliks) DNA formu: Fajlarda, plasmid ve virüslarda daha fazla rastlanılan bu form, dubleks sarmal DNA'nın serbest ortamda kendi eksenini etrafında 360° ve birkaç kez dönmesinden kaynaklanmaktadır.

02.11. DNA'nın Büyüklüğü

Bakterilerdeki DNA'nın uzunluğu oldukça değişiktir. DNA'nın yaklaşık ağırlığı 0.01 pg kadardır. (1 pico gram = 10⁻¹² g). *E. coli* 'de 4x10⁶ nukleotid çifti bulunur ve moleküler ağırlığı da 2x10⁹ daltondur. *E. coli* 'de DNA'nın uzunluğu 1.1-1.5 mm olup bakteri boyunun 400-500 katıdır. Diğer bakterilerde ise bu ölçüler değişik bir durum gösterir.

03.Prokaryotik Ribonukleik Asit (RNA)

Mikroorganizmalarda, DNA'dan ayrı olarak hücre içinde çok önemli fonksiyonlara sahip olan diğer bir makromolekül de ribonukleik asit (RNA)'dır. Kompozisyonu bakımından DNA'ya çok benzerlik göstermesine karşın fonksiyonel olarak farklı bir aktiviteye sahiptir. Bazı araştırmacılar RNA'yı tam bir genetik materyal olarak kabul etmemekte, biri genetik RNA (genellikle, mRNA ve RNA virüsleri) ve diğeri de nongenetik RNA (diğer RNA'lar) olmak üzere iki ayrı molekül olarak düşünmektedirler.

03.01. Pirimidin ve Pürin Bazları

RNA'nın yapısında pirimidin bazlarından Sitozin (C) ve Urasil (U: 2,4-dioksipirimidin) bulunur. Urasil, DNA'daki timinin yerini alır. Diğer bir ifade ile RNA'da timin yoktur. Urasil, yapı bakımından timine çok benzer.

03.02.Pentoz Şekeri

RNA'nın bileşiminde bulunan pentoz şekeri D-riboz ($C_5H_{10}O_5$) yapısındadır.

03.03.Fosfat Molekülü

RNA molekülünde DNA'daki gibi aynı H_3PO_4 molekülü vardır.

03.04. Nukleosidler ve Nukleotidler

Nukleosidler pirimidin bazları (sitozin, urasil) ve pürin bazlarından (adenin, guanin) biri ile pentoz şekerinin (D-riboz) birleşmesinden meydana gelmiştir. Bazların şekerle birleşmesi aynen DNA'da olduğu gibidir.

Nukleosidler, pirimidin nukleosid ve pürin nukleosid olarak iki grupta toplanabilirler.

Nukleotidler, nukleosidlerle fosfat molekülünün birleşmesinden oluşmuşlardır (pirimidin nukleotidler ve pürin nukleotidler).

03.05. Polinukleotid

Nukleotidlerin fosfodiester bağlarıyla birleşmesinden polinukleotidler meydana gelirler.

DNA'nın aksine, RNA tek iplikçik halindedir. Bu nedenle de DNA'ya oranla daha zayıftır ve kolay tahrip olur. Ancak, molekül bazı bölgelerde kendi üzerine katlanarak sağlam yapı oluşturur. Bu birleşme adenin ile urasil ve guanin ile sitozin arasında gerçekleştirilir.

03.06. RNA Türleri

Bakterilerde hücre içindeki fonksiyonları, molekül ağırlıkları, sedimentasyon konstantları, birbirinden farklı 4 tür RNA bulunmaktadır. Bunlar da;

- 1) Mesenger RNA (mRNA) (genetik)
- 2) Transfer RNA (tRNA)
- 3) Ribosomal RNA (rRNA, nongenetik)
- 4) Primer RNA (pRNA, nongenetik)

03.07.Mesenger RNA (mRNA)

DNA iplikçiklerinin birinden, RNA polimeraz enziminin (DNA'ya bağımlı transkriptaz) katalitik etkisi ile, genetik bilgiler mRNA'ya aktarılır (transkripsiyon). Yeni oluşan mRNA, kendisinin sentezine kalıplık yapan DNA iplikçığıne anti paralel bir durum gösterir (M.A. 500.000'in üzerindedir.)

03.08. Transfer RNA (tRNA)

Protein sentezinde önemli fonksiyona sahip olan, ribosom üzerinde sıraya giren kodonların amino asitlerine, amino acyl sentetase ile aktive olduktan sonra, bağlanarak onları ribosomlardaki kodonuna taşıyan ve sıraya koyan küçük bir moleküldür (75-85 nukleotid). Her amino asite özel bir veya birden fazla tRNA vardır.

03.09. Ribosom ve Ribosomal RNA (rRNA)

Üremekte olan hücreler de sayıları yaklaşık 15000-30000 kadar bulunan ribosomların amino asitlerin birbirleriyle birleşmesinde ve protein haline dönüşmesinde rolü çok büyüktür. mRNA, 30S alt ünitenin oluşuna yerleşir ve 50 S'lik ribosomla birleştikten sonra oluşan 70 S ribosom, mRNA üzerinde kayar ve her kayışta bir kodonu sıraya koyarak ilerler.

03.10. Primer RNA (pRNA)

DNA'nın replikasyonu sırasında parental iplikçığın 5'®3' yönünde olanına yeni iplikçik sentezlenirken bunun sentez yönü tersine 3'®5' olacağından, DNA polimeraz enzimi ters olan bu yönde sentezi kesintili olarak sürdürür. Önce, primaz (RNA polimerase) enzimi tarafından 50-100 nukleotidden oluşan primer RNA'lar sentezlenir. Bunlar basamak olarak kullanılarak kısa DNA sekansları (Okazaki segmentleri) oluşturulur. DNA pol.I enzimi yardımı ile araları doldurulur ve DNA ligaz ile de birleştirilir. pRNA'ların görevi bittikten sonra DNA polimerase tarafından dijeste edilerek çıkarılırlar. Bu RNA, bakterideki dnaG geni tarafından kodlanır.

04.Prokaryotik DNA ile RNA Arasındaki Başlıca Farklar

- 1) DNA genellikle çift iplikcikli. RNA ise tek iplikcikli.
- 2) DNA'da pentoz şekeri 2-deoxy D-riboz ($C_5H_{10}O_4$) tarzındadır. Yani, pentoz şekerinin 2 pozisyonundaki karbon atomuna bağlı sadece (H) molekülü bulunur, oksijen yoktur. Buna karşın RNA D-riboz karakteri taşır ($C_5H_{10}O_5$).
- 3) DNA'da Timin vardır. Bunun yerine RNA'da Uracil bulunur.
- 4) Fosfat molekülü her iki nukleik asitte de aynı yapıdadır (H_3PO_4).
- 5) DNA molekülü, genellikle çift iplikcikli olması nedeniyle, RNA'dan daha sağlam yapısal bir bütünlük gösterir. Ancak, tek iplikçik olan RNA'da kendi üzerine kıvrımlar yaparak çift iplikcikli kısa formlar meydana getirmekte ve yapısını sağlamlaştırmaktadır.

- 6) RNA molekülü, alkalilerle 2-3-cyclic diesterlere ayrışabilmektedir.
- 7) RNA'da guanin ve sitozin miktarları eşit değildir.
- 8) RNA-RNA dupleks, RNA-DNA dupleksinden daha sağlamdır.
- 9) RNA'daki baz sıraları, kendinin transkripsiyonunda görev alan DNA'daki baz sıralarına komplementerdir.
- 10) Dupleks DNA süperheliks form oluşturabilir.

05.Nukleik Asitlerin İn Vivo ve İn Vitro Fonksiyonları

05.01. İn Vivo Fonksiyonları

Nukleik asitlerin (DNA veya RNA) hücrelerde çok önemli vital fonksiyonları bulunmaktadır. Genetik materyallerin, canlılarda kalıtsal karakterleri taşıması ve nesillere transferi gibi görevleri yanı sıra, hücrelerdeki bütün fizyolojik, biyokimyasal, metabolik, morfolojik, antijenik, v.s. özelliklerin belirlenmesinde de önemli görevlere sahiptirler. Bunlardan ayrı olarak da, genetik materyaller, enerji taşımaları, enzimlerin kofaktörleri olmaları, kimyasal mesenger oluşturmaları, nukleik asitlerin sentetik analoglarının kanser sağaltımında ve viral infeksiyonlarında önleme amacı ile kullanılması gibi etkinlikleri de bulunmaktadır.

Bu son aktiviteleri hakkında aşağıda kısa ve özlü bilgiler verilmektedir.

- 1) Nukleotidler kimyasal enerji bağları taşırlar: Nukleik asitlerin yapısında fosfat moleküllerinin bulunması nedeniyle yüksek enerjiye sahip makromoleküllerdir. Bu enerji, hücrelerde, birçok biyokimyasal olgularda ve özellikle, biyosentezde fazlaca kullanılırlar.
- 2) Nukleotidler birçok enziminin de kofaktörleridir: Hücre içinde çok önemli ve hayati rollere sahip olan enzimlere ait kofaktörlerin yapısında da nukleotidler bulunur. Böylece enzimlerin aktivasyonunda ve fonksiyonel bir duruma gelmelerinde nukleotidlerin önemi oldukça fazladır. Örn, koenzim A (3' -fosfoadenin difosfat (PADP); nikotinamid adenindinukleotid (NAD); flavin adenindinukleotid (FAD) bunlar arasındadır.
- 3) Bazı nukleotidler hücrelerde sinyal iletişimde sekonder mesenger görevi yaparlar: Hücrelerde, nukleotidlerin diğer önemli fonksiyonları arasında bazı sinyalleri transferde sekonder mesenjer görevi yapmaları da bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi, cyclic adenosine monophosphattır (cAMP). Buna karşın guanosine monophosphatın (GMP) etkinliği daha zayıftır. cAMP, adenilate siklase enziminin katalitik aktivasyonu sonu ATP'den elde edilir.
- 4) Sentetik nukleotid analogları klinik hekimlikte fazlaca kullanılma alanı bulmuşlardır: Pürin ve pirimidinlerin sentetik analogları onkolojide ve viral infeksiyonların sağaltımında, son yıllarda fazlaca yararlanılan kimyasallar arasında yer almaktadırlar. Bu bileşikler, ya nukleik

asit sentezinde önemli fonksiyonları olan enzimlerin inhibisyonunu sağlayarak veya nukleik asitlerin yapısına girerek, etkilerini gösterirler.

5) Nukleotidler oksidatif fosforilasyon reaksiyonunda adaptör olarak (ATP) görev yaparlar.

6) DNA ve RNA'nın yapısını oluşturan nukleotidlerin, genetik bilgileri taşıdıkları ve transfer ettikleri için de önemlileri çok fazladır.

05.02. İn Vitro Fonksiyonları

Nukleik asitlerin in vitro birçok önemli çalışmalarda da rolleri bulunmaktadır. Bunlar kısaca şöyle sıralanabilirler.

- 1) Hibridizasyon denemelerinde (türlerin sınıflandırılmalarında, genlerle ilgili çalışmalar da, vs)
- 2) Rekombinant DNA teknolojisinde
- 3) Hastalıkların teşhisinde
- 4) Genlerin haritalarının yapılmasında
- 5) Diğer biyoteknolojik çalışmalarda

Genler ve Fonksiyonları

01. Genlerin Yapısı

Genler, hücrelerin ve dolayısıyla da canlıların kalıtsal karakterlerinin, yaşamları için gerekli olan proteinlerin, enzimlerin, diğer makro- ve mikromoleküllerin kodlarını taşıyan, kromozom üzerinde lokalize olmuş, değişik uzunlukta (kodladığı proteinin büyüklüğüne göre) DNA sekanslarıdır. Genler, aynı zamanda, canlılardaki bütün, genetik, biyokimyasal, fizyolojik, vs. olayların denetimini, doğru yönde ilerlemesini de kontrol ederler. Bir kromozom üzerinde, prokaryotiklerde 2000-3000 ve ökaryotiklerde de 50.000-100 bin arası gen bulunmaktadır.

Genlerin kromozom üzerindeki sırası ve sayısı organizmalara göre belli bir düzen ve sıra içindedir. Bu uyum türler için sabittir ve değişmez. Ancak, cinsler veya familyalar arasında farklar gösterebilir. Bu düzenli sıralanış, bir tespah tanesine veya bir müzik kasetinde magnetik tape de bulunan ve ardışık yerleşmiş müzik parçalarına benzetilebilir.

Genlerin büyüklüğü de (baz sayısı) kodladığı proteinin büyüklüğüne göre değişebilir. Bu ölçü, 1500-2000'den 10000 bp'e kadar değişebilir.

Genler, nukleik asit sekanslarından oluşmakta ve belli özel peptidlerin bilgilerini kodlar halde taşımaktadırlar. Genleri oluşturan baz sıraları ve sayıları da türler için de sabittir ve bu türlerin korunmasında çok önemli rollere sahiptir. Ancak, her amino asit'in spesifik bir veya birden fazla kodonla (triplet) belirlenmesi, bunların da 3'er tane nukleotid bazından oluşması,

çok sayıda replikasyonların meydana gelmesi, polimerizasyon sırasında enzimlerin duyarlılıklarının azalması nedeniyle yanlış bazların sıraya girmesi veya mutasyonları indükleyici faktörlerin ortamda bulunması, vs. nedenler nadir de olsa (10⁻⁷-10⁻⁹ oranında) baz sıraları arasında bazı değişikliklerin oluşmasına yol açmakta ve mutasyonların gelişmesine neden olmaktadır. Böyle varyasyonların sonunda da parent hücrelerden farklı genotip ve fenotipte yeni nesiller (mutant) meydana gelmektedir. Bazı mutasyonların hafif veya belli-belirsiz olmasına karşın bir kısmı da öldürücü nitelik taşıyabilir.

Prokaryotiklerde nukleik asitteki baz sıraları ile kodlanan proteindeki amino asit sıraları arasında bir düzen ve uyum vardır ve kesintisizdirler (kolineer). Bakterilerde ve bakteriyel viruslarda, genler kesintisiz olarak birbiri arkasına sıralanmalarına karşın, ökaryotiklerde ve bazı viruslarda, genler içi ve genler arasında hiç kodlama yapmayan (noncoding) sekanslar bulunmaktadır. Bunlara genel olarak intron (intervening sequence) adı verilmektedir. Buna karşın kodlayan sekanslar da, ekson olarak tanımlanmaktadır. Böyle kodlamayan sekanslar hem genleri bölmekte ve hem de iki gen arasını açmaktadırlar. Örn., alfa kollagen geninin 50'ye yakın bölüme ayrıldığı belirtilmektedir. İntronların uzunlukları da değişik olmasına karşın 2-3 kb uzunluğa kadar olabildiği açıklanmıştır. Hatta, bazıları eksonlardan da daha uzun olduğu bildirilmiştir. Ökaryotiklerde, DNA üzerindeki böyle durumlar genlerin uzunluğu ile kodlanan proteinin uzunluğu arasında bir farkın meydana gelmesine de neden olmaktadır. Ancak, transkripsiyon sırasında pre mRNA da eksonlarla birlikte intronlar da bulunmasına karşın, bunun prosesi sonu sentezlenen olgun mRNA'da sadece eksonlar bulunur ve intronlar çıkarılır. Çekirdek içinde meydana gelen bu olgudan sonra, olgun mRNA çekirdek etrafındaki deliklerden geçerek sitoplazmaya girer ve burada ribosomlara yerleşerek translasyona tabi tutulur.

01.01. Promoter (P)

DNA'ya bağımlı RNA polimerase enziminin bağlandığı bölgedir. Buna ait yeterli bilgi sayfa 149'de verilmiştir. Ökaryotiklerde bu bölgede 3 önemli lokalizasyon bulunmaktadır. -90, -80 ve -30 bölgeleri en fazla korunan yerler arasındadır. Prokaryotiklerle aynı fonksiyona sahiptir (-35 ve -10 bölgeleri).

01.02. Operatör sekans (O)

Bu bölgede represör ve aktivatörler etkinlik gösterir. Promoterin hemen sağında bulunur.

01.03. Lider sekans (L)

mRNA'da transkripsiyonun başlama noktasından sola doğru (5' -terminusa doğru, upstream) yerleşmiş sekanslardır. Bu kısım ribosomlarda translasyona tabi tutulmaz. Uzunluğu prokaryotik ve ökaryotiklere göre, yaklaşık 20-100 baz kadar olan lider sekans, mesajın

ribosomlara iyice bağlanmasında etkin role sahiptir. Prokaryotik ve ökaryotiklerde aynı fonksiyondadır.

01.04. Shine Dalgarno sekansı (SD)

AUG kodonundan sola (5'-ucuna) doğru -7 bölgesinde bulunan polipürin karakterinde (AGGA GG) sekanslardır. Bu bölge, 16S rRNA'nın 5' -terminusu ile komplementerdir. Ribosomun mRNA'ya bağlanmasını sağlar. Prokaryotiklerde vardır ve mRNA'ya aktarılır.

01.05. Enhanser

Ökaryotiklerde bulunan bu sekansın transkripsiyonu stimule etme aktivitesi bulunmaktadır.

01.06. AUG Kodonu

mRNA üzerinde, transkripsiyon için başlama sinyali veren ve formilize olmuş methioninin kodonudur. Buradan sağa doğru (3' -terminusa, down stream) polimerizasyon devam eder. AUG'nin transkripte edilen DNA sekansı (3' → 5') üzerindeki tripleti TAC'dir. mRNA'ya aktarılır.

01.07. Kodlayan Sekanslar (Ekson)

TAC kodonundan itibaren sağa doğru polimeraz enziminin mRNA'yı sentezlediği ve genetik bilgilerin anlamlı DNA'dan mRNA'ya aktarıldığı bölgedir.

01.08. Kodlamayan Sekanslar (İntron)

Bu sekanslar genler içinde ve genler arasında bulunabilir ve genlerin aralarını açarlar. Bunlar ökaryotiklerde ve bazı viruslar da vardır.

01.09. Terminatör (T)

DNA üzerinde, RNA polimeraz enziminin transkripsiyonu durdurma sinyalini veren sekanstır. DNA'da bulunan terminasyon kodonları, ATC, ATT ve ACT olup, bunların mRNA daki tripleri ise UAG (amber), UAA (ochre) ve UGA, (opal) dir ve protein sentezini durdururlar. Bunlara aynı zamanda nonsense kodonlar da denir. mRNA'ya aktarılır.

Genlerin izolasyonları, çıkarılması, transferleri, klonlanması, ekspresyonları ve diğer aktiviteleri hakkında ilgili bahislerde yeterli bilgiler verilmektedir.

02. Psödogenler (Yalancı Genler)

Psödogenler (yalancı genler), fonksiyonel genlerle ilişkisi olan, fakat bir aktif protein haline transle edilemeyen genler olarak tanımlanmaktadırlar. Bazı araştırmacılar da, böyle genleri, fonksiyonel olan genlerin etkinliği olmayan kopyası olarak kabul etmektedirler. Psödogenler genellikle y sembolü ile ifade edilirler.

Psödogenler, fonksiyonel genlerin genel yapısına benzer sekanslara (intron ve ekson) sahiptirler. Replikasyonun çeşitli aşamalarında meydana gelen spontan veya indükleyici etkenlerin etkisi ile oluşan mutasyonlar sonu inaktif hale gelmişlerdir. Örn., transkripsiyonun

başlamasını veren sinyal bazlarında bozukluklar mRNA sentezini ve dolayısıyla da translasyonu olumsuz yönde etkiler ve bu önemli fonksiyonlar ortadan kalkarlar.

Psödogenlere bir çok protein genlerinde rastlanılmıştır. Örn., globin, immunglobulin ve histokompatibilite antijenleri genleri, vs.de böyle inaktif genlere sahiptirler. Bunun tipik örneği tavşanların psödogeni ($\beta 2$) olup, bu gen ekson ve intronlardan oluşmakta ve bu da yapısal olarak fonksiyonel aktif globin genine ($\beta 1$) çok benzemektedir.

RNA transkriptine (mRNA) benzeyen inaktif genomik sekanslara işlenmiş psödogen (processed pseudogene) adı verilmektedir.

İnaktif genler, yine çeşitli mutasyonlarla aktivite kazanabilirler.

03. Gen Ekspresyonunun Artırılması

Hücrelerde gen sayısının ve gen ekspresyonunun artırılması için değişik metotlar kullanılmaktadır. Bunlardan önemli olanlarından bazıları aşağıda bildirilmiştir.

03.01. Gen Sayısının Artırılması

a) İstenilen bir ürünün veya proteinin sentezini kodlayan gen (hedef gen) kromozomdan uygun bir restriksiyon enzimi kullanılmak suretiyle kesilerek çıkarılır ve pürifiye edilir. Bu gen, hücre içinde çok fazla üreyebilen veya kopyası fazla olabilen bir plasmidin DNA'sı ile birleştirilir. Bu amaçla daha ziyade küçük suni plasmidler tercih edilirler. Çünkü, küçük plasmidlerin hücre içindeki kopya sayıları genellikle fazla olabilir. Bu rekombine plasmid alıcı bir hücreye transfer edilerek, genleri taşıyan plasmidlerin fazlaca üremesi sağlanır. Sonra bunlardan gen çıkarılır.

b) Plasmid ile birleştirilen hedef gen, uygun bir alıcı bakteriye transfer edildikten sonra, bu konak bakteri, içinde 150 mg/ml Chloramphenicol bulunan besi yerine transfer edilir. Böyle bir ortamda mikroorganizma içinde plasmidin çok sayıda kopyası (bakteri başına 1000'den fazla) oluşur ve böylece gen sayısı da artmış olur. Ancak bu mikroorganizmada ekspresyon meydana gelmez. Çünkü antibiyotik protein sentezini inhibe eder buna karşın plasmidin sayıca artmasına mani olmaz.

c) Hedef genin baz sıraları iyice biliniyorsa, bu takdirde, laboratuvarında sentetizerler yardımı ile sentetik gen hazırlanabilir ve başarı ile kullanılabilirler.

d) Hedef gen taşıyan DNA (veya mRNA), in situ PCR yöntemi ile çoğaltılır ve bundan gen çıkarılarak kullanılır.

03.02. Gen Ekspresyonunun Artırılması

Genin amplifikasyonu, her zaman, aynı genin ekspresyonu ile paralel gitmeyebilir. Gen ekspresyonunun istenilen düzeye çıkarılması için bazı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar da özetle şöyledir.

a) Hücrelerde DNA'nın transkripsiyonunda önemli fonksiyonu olan RNA polimeraz enzimi promoter bölgesine bağlanarak, buradan itibaren 3' -ucuna doğru (downstream) transkripsiyonu gerçekleştirilir. Ancak, bu tarzdaki ekspresyon her zaman aynı kuvvette olmaz. Diğer bir ifade ile, eğer bir gen, bir hücrede yüksek düzeyde eksprese edilebiliyorsa (fazla ürün sentezi oluşuyorsa) kuvvetli promotere sahip olduğu düşünülür. Bu nedenle promoterin kuvvetli olması veya özel bir tarzda modifiye edilerek kuvvetlendirilmesi gereklidir.

b) Hücrelerde genin ekspresyonu da kontrol altına alınabilir ve regule edilebilir. Örn., *E. coli* 'de, aminoasitleri kodlayan genler, eğer bu aminoasitler hücrede çok fazla miktarda bulunuyorsa represe edilerek, yeniden aminoasit sentezi durdurulur (feedback inhibisyon). Bu fenomenin mekanizması kısaca şöyledir: Hücre içinde bulunan ve inaktif bir karakterde olan represör proteinlere gen ürününün bağlanması represör moleküllerini aktive ederek, promoter bölgesine bağlanmasına yol açar. Bu durumda RNA polimeraz enzimi promotere bağlanmadığından genin ekspresyonu da gerçekleşemez.

Feedback inhibisyonun ters mekanizmasını oluşturarak genin ekspresyonunu artırılabilir. Şöyle ki, eğer represör proteinlerin aktive olması önlenirse ve böylece de promotere bağlanması inhibe edilir ve bakteriler fazlaca gen ürünü eksprese edebilirler. Bunu sağlamak için de, promoter bölgesinde bulunan operatör sekanslarda bazı modifikasyonlar yaparak veya represör proteinleri kodlayan genlerde mutasyonlar meydana getirerek bu proteinlerin promotere bağlanması önlenebilir ve böylece genin ekspresyonu devam eder, kapanmaz.

Araştırmacılar, son yıllarda, genlerin fonksiyonları için gerekli olan promoter ve terminatör sekansları değiştirebilmekte ve yeni ortama adapte olabilecek ve iyi bir etkinlik gösterebilecek tarzda modifiye edilebilmekte ve düzenleyebilmektedirler. Yeni ortamda fonksiyonel olamayan bir gene ait promoter ve terminatör sekansları çıkararak, bunları transfer edilecek gende kullanmak suretiyle, bu yeni gene işlerlik kazandırmak olanak dahilindedir. Örn., tavuk yumurta albumin geni, yaprak protein genine ait kontrol sekanslara (promoter-terminatör) bağlandıktan sonra bir bitki hücresine (Örn., yonca) transfer edilirse, oluşturulan transgenik bitki (yonca) yapraklarında yumurta akı biriktirebilir. Bu durum meraların besleyici kapasitesini artırmada etkili olabilir. Böylece, bir bitki (transgenik bitki), solar enerjiden yararlanarak fotosentetik mekanizma ile tavuk yumurta akı proteinini üretebilir hale gelebilir.

Genlerde kontrol mekanizmasını sağlayan sekanslar (promoter ve terminatör) arasında da önemli farklar bulunmaktadır. Bazıları ne kadar protein sentezleneceğini, bir kısmı da genlerde hangi sinyallerin ve ne kadar respons göstereceğini ve kimileri de organizmanın neresinde fonksiyonel olacağını tayin ederler. Promoterler, sentezlenen proteinin miktarına

göre zayıf, normal, kuvvetli (veya super promoter) olmak üzere gruplara ayrılmaktadırlar. Biyoteknolojik yöntemlerle, bilim adamları, zayıf veya normal promoterleri kuvvetli ile değiştirebilmekte ve genin etkinliğini artırabilmektedir. Bir türde etkin olan promoter, eğer geni ile birlikte başka bir organizmaya transfer edilirse bu yeni ortamda zayıf bir fonksiyon gösterebilir. Çünkü, yeni organizmanın replikasyon ve ekspresyon mekanizmaları bu yeni promoteri tam algılayamaz veya kabul edemez. Bu nedenle, promoterleri, yeni ortamın iyi tanıyabileceği başka bir promoterle değiştirilmesi gereklidir.

Memeli genlerinin, bakterilerde ekspresyonunda en fazla güçlük çekilen nokta, genlerin içinde ve genlerin aralarında bulunan ve bunları bölen ve herhangi bir kodlama yapmayan intronlardır. Bakterilerin ekspresyon mekanizmalarında intronları tanıyarak bunları çıkaracak mekanizmalar bulunmamaktadır. Onun için, intronlar önceden çıkarılarak sadece eksonlardan oluşan olgun mRNA hazırlamak ve bundan yararlanmak gerekecektir. Bakteriler aynı zamanda, bir amino asit için olan birden fazla tripletleri değerlendirmede ökaryotikler kadar organize olmadıkları gibi glikolizasyon reaksiyonlarına da sahip değildirler. Bu nedenle, memeli genleri taşıyan DNA sekanslarını ve kodonları, bakterilerin kolayca tanıyabileceği ve algılayabileceği bir tarzda değiştirmekte yarar vardır.

Bakteriler tarafından kabul edilen ve eksprese edilen genler, burada uzun süre kalabilmeli, en yüksek düzeyde eksprese edilebilmeli, gen aktivitesi kontrol edilebilmeli, sentezlenen gen ürünleri bakteri içinde ayrışmamalı ve kontamine olmamalıdır.

04. Genlerin İnaktivasyonu

Genetik manipulasyonlar arasında, sadece yeni genler transfer ederek değişik ve istenen karakterlere sahip organizmalar veya hücreler elde etmek değil, aynı zamanda, istenmeyen genlerin aktivitesini azaltmak veya inaktive ederek fonksiyonuna tamamıyla mani olmak gibi çalışmalar da bulunmaktadır. Genlerin kısmi veya tam inaktivasyonu üzerinde birçok değerli çalışmalar yapılmıştır. Bunlara ait ve önemli olan bazı teknikler aşağıda bildirilmiştir.

- 1) Mutasyonlarla inaktivasyon
- 2) Transpozonlarla inaktivasyon
- 3) Bakteriyofajlarla inaktivasyon
- 4) Antisens RNA ile inaktivasyon
- 5) Ribozimlerle inaktivasyon
- 6) Rekombinant DNA teknolojisi ile inaktivasyon
- 7) Feedback mekanizma ile inaktivasyon

04.01. Mutasyonlarla İnaktivasyon

Kromozomlar üzerinde ardışık olarak sıralanmış olan fonksiyonel genler (ancak, ökaryotiklerde genlerin bazıları intronlarla bölünmüştür), çeşitli iç ve dış nedenlerin (fiziksel, kimyasal, biyolojik, metabolik, fizyolojik mutajenik maddeler, vs.) etkisi altında gelişen mutasyonlara bağlı olarak, bazı değişikliklere (bazların girmesi, çıkması, karşılıklı bağlantıların değişmesi, vs.) maruz kalmaktadırlar.

04.02. Transpozonlarla İnaktivasyon

Transpozonlar (Tn: kromozom veya plasmidlerin üzerinde bulunan ve yer değiştirebilen genetik elementler), yer değiştirirken önemli bir gene girebilmekte ve genin bütünlüğünü bozarak inaktivasyonuna neden olmaktadır. Ancak, kromozom üzerinde bu yer değiştirme işlemi genellikle kontrol altında tutulamadığından veya güvenilemediğinden, istenmeyen genlerin inaktivasyonunda pek kullanılmamaktadırlar.

04.03. Bakteriyofajlarla İnaktivasyon

Bazı fajlar, bakterilerde belli bir genin yanına yerleşmekte veya içine girebilmektedirler. Örn; *E. coli* 'ye ait olan Lambda fajı, genellikle, bu bakterinin galaktoz ile laktoz genleri arasına integre olur. Faj, profaj halinde burada kalır ve nesillere böylece aktarılır.

04.04. Antisens Oligonukleotidlerle Hedef Genlerin İnaktivasyonu

Son birkaç yıl içinde, antisens oligonukleotid (oligomerler) kullanılarak, istenmeyen (hedef) genlerin inaktivasyonlarını, malignant hücrelerin ve virusların in vivo ve/veya hücre içinde üremelerinin inhibisyonlarını sağlamak, çok fazla üzerinde çalışılan bir konu haline gelmiş bulunmaktadır. Henüz gelişme aşamasında olan, in vitro hücreler üzerindeki araştırmalardan tam olarak kurtarılıp in vivo denemelere geçilemeyen bu teknolojinin ilerde başarılı olacağına inanılmaktadır.

04.05. Ribozimlerle İnaktivasyon

Son yıllara kadar hücrelerde biyolojik olayların katabolize edilmesini sadece proteinlerin (enzimler) yaptığı düşünülürdü. Diğer bir ifade ile, enzimlerin protein karakterinde olmaları kabul edilirdi. Ancak, son zamanlarda, bazı RNA moleküllerinin de enzim gibi aktiviteye sahip olduğu ve reaksiyonları hızlandırabilecekleri ortaya konulmuştur. Böyle etkinliğe sahip RNA moleküllerine Ribozim (ribozyme, ribonukleik asit enzim) adı verilmekte, ve bir çok canlı organizmada bulunabilecekleri de belirtilmiştir. Ribozimlerin çoğu RNA moleküllerini ayırtmakta ve özellikle, pre mRNA'dan intronların çıkarılma prosesinde etkinliği olduğu bildirilmektedir.

mRNA üzerinde hidrolizan etkiye sahip olan ribozim genleri DNA'dan çıkarılarak buna kuvvetli bir promoter ile terminatör sekansları ilave edildikten sonra hücrelere etkin bir tarzda

transfer etmek gereklidir. Genin hücre içinde ekspresyonu sonu sentezlenen ribozimler istenmeyen sekans üzerinde bir çok kesmeler yaparak genin bütünlüğünü bozar ve translasyonuna mani olur. Ribozim geni, sentetik olarak istenmeyen herhangi bir hedef sekansa yönelik hazırlanabilir ve kullanılabilir. Sentezlenen ribozim molekülleri hedef sekans üzerine bağlandıktan sonra ilmekler oluşturur ve mRNA'nın kesimi de bu ilmeklerin bulunduğu yerde meydana gelir. Bu bölgede, ribozim, mRNA'daki hedef sekanslara komplementerdir. Bu bölgenin dışında etkili olamazlar.

04.06. Rekombinant DNA Teknolojisi ile İnaktivasyon

Rekombinant DNA teknolojisi, biyoteknolojik yöntemlerin en önemlilerinden biridir. Hatta esasını oluşturur. Bu tekniği uygularken, özellikle, genlerin klonlanmasını yaparken, bir organizmadan çıkarılan hedef gen, alıcı veya konak bir prokaryotik veya ökaryotiğe transfer etmeden önce uygun vektörlerden birinde klonlanır. Ancak, bu klonlama sırasında, genellikle, seleksiyonda önemli fonksiyonu olan genlerin biri inaktive edilir. Bu genin içine hedef gen sekansları yerleştirilerek genin inaktivasyonu sağlanır. Bu inaktivite edilen gen, genellikle, antibiyotiklere dirençlilik sağlayan sekanslara sahiptir. Genin inaktivasyonu, antibiyotiğe organizmayı duyarlı hale getirir ve bu iyi bir seleksiyon ortamı sağlamış olur.

04.07. Feedback Mekanizma İle İnaktivasyon

Bir hücre içinde, veya organizmada gen ürününün fazla olduğu durumlarda, bu ürünlerin tersine bir mekanizma ile genin ekspresyonunu geçici bir süre için azaltması veya durdurması olayıdır. Buna en iyi örnek olarak, kanda fazla miktarda antikorun bulunduğu durumlarda uyarım için homolog antijen tekrar verildiğinde yeni bir stimülasyonun meydana gelmemesi ve antikor titresinde bir artmanın oluşmaması gösterilebilir. Hücre içinde aminoasitlerin fazla olduğu durumlarda da aynı fenomen gözlenebilir.

05. Genlerin İzolasyonu

Rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla genleri izole etmek, üzerinde çalışmalar ve özellikle, genetik manipulasyonlar yapmak olanak dahiline girmiştir. Genlerin kromozom üzerindeki sayıları, organizmaların türlerine göre (prokaryotik-ökaryotik) genellikle, 1000 ile 100.000 arasında değişmektedir. Doğaldır ki bu kadar gen çokluğu arasında istenilen karakterleri taşıyan geni(ler) bulmak, izole ederek üzerinde gerekli çalışmaları yapmak oldukça zordur. Bu nedenle gen kütüphanesi (gene library) oluşturmak ve genleri burada toplayarak, gerektiğinde buradan faydalanmak daha kolaylık ve güven sağladığı gibi zamandan da tasarruf ettirir.

Bu amaca ulaşmak için genomik DNA'lardan yararlanılır. Saf olarak elde edilen genomik DNA, genlerin büyüklüğünü dikkate alarak uygun bir veya iki restriksiyon enzimi ile

kesilir. Plasmid de virusa (vaccinia) ve faja (lambda) transfer edilerek buradan alıcı bir hücreye (prokaryotik veya ökaryotik) transfekte edilir. Prokaryotiklerden, genellikle, *E. coli* ve *B. subtilis*, ökaryotiklerden de maya (protoplastı) fazlaca kullanılmaktadır. Alıcı hücrelerde klonlanan genlerle oluşturulan kütüphaneler gerektiğinde özel işaretli proplar yardımıyla istenilen genler yönünden taranırlar.

06. Mikrosatelitler (Minisatelitler)

Genellikle ökaryotik kormozomlarda bulunan, rast gele tekrarlanan (ve genetik bilgi taşımayan) küçük DNA sekanslarıdır (<100 bp). Kolaylıkla amplifiye edilebilir ve klonlanabilirler. Bu mikrosatelitler insan hekimliğinde babalık testlerinde, kalıtsal hastalıkların teşhisinde ve genetik haritaların yapılmasında kullanılabilirler. Mikrosatelitler çiftlik hayvanlarında, verim, büyüme hızı, vs. parametrelerin saptanmasında da yardımcı olabilmektedir.

07. DNA'da Tekrarlar ve Sekonder Yapılar

Bazı DNA moleküllerinde iki kopya halinde identik, birbirine düz (doğru) veya ters oriyantasyonda kısa sekanslar bulunmaktadır. Bunlardan birincilerine direkt tekrarlar (direct repeat) ve ikincilere de ters tekrarlar (inverted repeat) adı verilmektedir. Bir DNA segmentinde veya molekülünde orta eksene göre tersine tekrarlar palindromik sekanslar olarak da adlandırılmaktadır. Buna, aşağıda örnek verilmiştir. Tersine tekrarlar orta eksene göre çapraz durumdadırlar.

Nukleik Asitlerin Biyolojik Fonksiyonları

01. Genel Giriş

Nukleik asitlerin hücre içindeki en önemli görevlerinden birisi de, kuşkusuz, DNA'nın replikasyonu ve bu sayede genetik bilgilerin nesillere aktarılması ile genlerin ekspresyonu (transkripsiyon ve translasyon)'dur.

02. DNA Replikasyonu

Hücreler, tek kromozomlu (prokaryotik) veya çok kromozomlu (ökaryotik) olsunlar, DNA'lar genetik bilgileri taşıdıklarından, her hücre bölünmesinde, bunların da çok az hata ile replike olması ve yeni sentezlenen DNA'nın kardeş hücrelere eşit olarak aktarılması gereklidir. Replikasyon tamamlanıncaya kadar da hücrelerin bölünmemesi lazımdır. Aksi halde, bazı hücreler genetik materyallerden yoksun kalır ve çekirdeksiz hücreler oluşur (anukleer hücreler). Diğer bir önemli nokta da, kromozomun (DNA), dış ve içten kaynaklanan zararlı etkilerden korunması ve DNA'da meydana gelecek bozuklukların da hemen tamir edilerek

nesillere aktarılmasının önlenmesidir. Böyle olumsuz durumları gidermek için hücreler yeterli düzeltme ve enzimatik mekanizmalara da sahiptirler.

Genetik materyallerin her ne kadar iyi korunmuş olmasına karşın, DNA'nın çok sayıda replikasyonu ve çok değişik nedenler bazı mutasyonların meydana gelmesine yol açmakta ve buna bağlı olarak da değişik karakterde yeni nesiller (mutant) ortaya çıkmaktadır.

DNA'nın hücre içinde kısa bir sürede ve minimal bir hata ile nasıl replike olduğuna dair bazı görüşler ileri sürülmüştür. Bunlardan 1) Konservatif (parental iplikçikler birbirlerinden ayrılmadan kopyalarının çıkması) ve Dispersif (parental DNA'da kopmalar meydana gelerek aralarına yeni sentezlenen DNA segmentlerinin girmesi) olan teoriler terk edilerek yerini, Watson-Crick tarafından ileri sürülen ve araştırmacılar tarafından da (Meselson ve Stahl deneyi, *E. coli* 'de) ispatlanan Semi konservatif modele bırakılmıştır. Buna göre, sarmal ve dupleks DNA açılmakta ve her iplikçiğin (parental iplikçik) karşısında enzimler tarafından bir yenisini sentezlenmekte ve parental iplikçikler yeni sentezlenen iplikçikler için bir kalıp görevi yapmaktadırlar. Bu modelde, her bir çift iplikçikli DNA'da bir parental ve bir de yeni sentezlenen iplikçik bulunmaktadır.

Prokaryotiklerde (bakterilerde) ispatlanan bu semi konservatif replikasyon modelinin, ökaryotikler, virus ve fajlar için de geçerli olduğu belirlenmiştir. Bu durum, semi konservatif replikasyon tarzının genel (üniversal) bir karakter taşıdığını da ortaya koymaktadır.

03. Prokaryotiklerde Replikasyon

E. coli 'ler üzerinde çok fazla deneme yapıldığı için, bu mikroorganizma, replikasyon için de bir model oluşturmuştur.

E. coli genomu, sirküler, sarmal ve dupleks bir DNA karakteri taşıyan ve yaklaşık 4.5×10^6 baz çiftine (bp, base pair) sahip tek bir makro moleküldür (1.1-1.4 mm uzunlukta). Tüm genomun replikasyonu için 20-50 gen'in fonksiyonel olduğu belirtilmektedir. *E. coli* uygun koşullar altında 15-20 dk. bir generasyon meydana getirmektedir. Genom replikasyonu *E. coli* 'de tek bir orijinden (oriC) başlayarak bidireksiyonal (iki yöne doğru) olarak devam eder.

E. coli 'de replikasyon orijini, konjugasyonla belirlenen dakika durumuna göre, 86. dk'dan iki yöne doğru devam ederek 32. dakikada son bulur (terminus). Bu süre, optimal koşullarda, bakterinin 15-20 dakikada bir bölünmesi süresinden daha kısadır.

E. coli 'de, kromozomun replikasyon orijini 86. dk. bölgesi olmasına karşın, diğer bakterilerde hem orijin ve hem de terminus daha değişik yerlerde olabilmektedir. Bu noktalar, bakteri türlerine özeldir. *E. coli* 'de bile uygun olmayan koşullarda bölünme süresi, optimal limitleri geçebilir.

Replikasyonun, kromozomu küçük olan bazı mikroorganizmalarda, tek yönlü (unidireksiyonal) olduğu da belirtilmiştir. Bu durumda, replikasyon, orijinden sadece bir yöne doğru devam eder ve tekrar başlangıç yerinde son bulur.

04.Ökaryotiklerde Replikasyon

Ökaryotiklere ait replikasyon mekanizmasının incelenmesinde maya hücrelerinden fazlaca yararlanılmıştır.

Ökaryotiklerde de prokaryotiklerde bulunan benzer enzim ve proteinler fonksiyoneldir (DNA pol., DNA ligase, topoisomerase, SSBP, DNA'yı açıcı proteinler, vs.). Ancak, bazıları yapısal farklılıklar gösterirler. Ökaryotiklerde 4 tür DNA polimerase enzimi (a, b, d, e,) vardır, ayrıca bir de gama (g) enzimi (mitokondrial) belirlenmiştir. DNA sentezi sırasında polimerase enzimi fazlalaşmakta ve DNA sentezi hücrenin S-fazında meydana gelmektedir. Pol. b ve g enzimleri daha ziyade hücrenin istirahat halinde iken bulunurlar. Pol. d, ayrıca, mitokondrial DNA'nın replikasyonunda etkilidir.

05. Diğer Replikasyon Modelleri

05.01. Mitokondrial DNA (mt DNA) Replikasyonu

Memeli hücrelerinin mitokondrisi yaklaşık 5 µm uzunlukta (MA: 10x10⁶, 15 000 bp) olup sirküler, süper sarmal bir DNA yapı özelliği gösterir. mtDNA'nın replikasyonunda, DNA pol, d enziminin aktif rolü vardır.

Fare L-hücreleri mitokondrisi üzerinde yapılan çalışmalarda, mtDNA'nın sentezine her iki iplikçikte de diğer mekanizmaların aksine, kesintisiz olarak devam ettiği ortaya konulmuştur. Ancak, replikasyonda bazı farklı yanlar da bulunmaktadır. Şöyle ki, biri ağır (H) ve diğeri de hafif (L) iplikçiklerde iki replikasyon orijini (OH ve OL) yer almaktadır. DNA'da, önce, H-iplikçiğindeki orijinden (OH) başlayarak bir D-ilmeği meydana gelir veilmek genişleyerek unidireksiyonal olarak sentez devam eder. H-sentezi, 2/3 uzunluğa erişince, bu defa L-iplikçiğindeki OL bölgesinde sentez başlar ve H-ye ters olarak bu da unidireksiyonal olarak ve kesintisiz devam eder. Sonra iki sirküler DNA birbirinden ayrılır, sentez tamamlanır ve DNA iplikçiğinde 100'e yakın super sarmal meydana gelir.

05.02. Rolling Circle Replication

Bu tür replikasyon modeline bazı fajlarda ve F-faktörünü kromozomlarında taşıyan Hfr-hücrelerde rastlanmaktadır.

05.03. Plasmidlerde Replikasyon

Bakterilerde sitoplazmada serbest olarak bulunan plasmidler replikasyon orijinine sahip olduklarından, bakteri genomuna bağlı olmaksızın, bakteri hücresi içinde otonom olarak kendi replikasyonunu yönetebilirler. Replikasyon tarzları, bakteri kromozomuna benzerdir. Ancak,

plasmidler bakterinin kromozomu ile birleşince (episom), aynen profajlar gibi, DNA'nın bir parçası gibi olurlar, onunla birlikte replike olurlar ve kardeş hücrelere transfer edilirler.

05.04. Replikasyon İnhibitörleri

DNA replikasyonu, sentez sırasında, çeşitli aşamalarda bazı kimyasal maddeler tarafından inhibe edilirler. Bu inhibitörler çok değişik karakter gösterdikleri gibi etkinlikleri de oldukça farklıdır. Bazıları nukleotid prekürsör sentezini inhibe eder, bir kısmı nukleotid analogu olarak DNA'ya inkorpore olur ve bazıları da DNA'ya bağlanarak aktivitesine mani olur. Enzimlere, özellikle, DNA polimerase ve replikasyonda fonksiyonu olan diğer enzimlere bağlanarak görevini aksatan ve bozan maddeler de vardır.

Transkripsiyon (mRNA Sentezi)

01.Genel Giriş

Protein sentezinde başlıca 3 tür RNA'nın etkinliği vardır. Bunlar da mRNA (mesenger RNA), tRNA (transfer RNA) ve rRNA (ribosomal RNA)'dır. Bunların dışında, DNA'nın replikasyonunda geçici olarak görev yapan ve primase enziminin katalitik etkisi ile sentezlenen 15-20 nukleotid'den oluşan primer RNA (pRNA) da bulunmaktadır.

Mesenger RNA (mRNA), DNA iplikçiliklerinin birinden (3' → 5) yönünde olanından, kalıp DNA, sens DNA), RNA polimerase enziminin (transkriptase) katalitik etkisiyle sentezlenen (transkripsiyon) ve amino asit veya polipeptid sentezi için gerekli bilgileri kodlar halinde taşıyan, tek iplikçikli bir nukleotid sekansıdır.

DNA'nın bir iplikçiğinde bulunan genetik bilgilerin şifreler (kodlar), halinde tek iplikçik RNA'ya transferine transkripsiyon ve bu bilgileri taşıyan RNA'ya da mesenger RNA adı verilir.

Prokaryotik mRNA çok dayanıksızdır ve translasyon başladıktan hemen sonra 5' -ucundan metabolize olmaya başlar. Ortalama ömrü 1-3 dk. kadardır. Ökaryotik mRNA ise saatlerce dayanır.

Prokaryotik mRNA, birden fazla genin (proteinin) kodlarına sahiptir (polisistronik mRNA veya poligenik mRNA). Buna karşın ökaryotiklerin mRNA'sı monosistronik (monogenik) bir özellik taşır.

Transfer RNA (tRNA), protein sentezinde, sentetase enzimi tarafından aktive edilen amino asitlere bağlanarak bunları, ribosomlar üzerinde sıraya giren kodon'larına taşıyan adaptör bir moleküldür. Yaklaşık 75-95 nukleotidden oluşur ve fonksiyonuna göre 5 kollu bir sekonder yapıya sahiptir. Bakteri hücresinde yaklaşık 50 farklı tRNA bulunur. Her amino asit için bir veya birden fazla tRNA vardır ve spesifik sentetase enziminin katalitik etkisiyle, her amino

asit, kendine ait tRNA'nın 3' -CCA ucuna bağlanır. Bu enzim kendine ait hem amino asiti ve hem de tRNA'yı tanır. Transfer RNA üç boyutlu (primer, sekonder, tersiyer) bir yapıya ve 5 kola (D-kolu, antikodon kolu, ekstrakol, T y C kolu Akseptör kol,) sahiptir.

Ribosomal RNA (r RNA), ribosomun yapısal ve fonksiyonel bir komponentidir. Prokaryotiklerde 70 S ribosom 2 alt üiteden oluşur. Bunlardan biri 50 S alt ünite (23 S rRNA, 5S rRNA ve proteinler) ve 30 S alt ünite (16S rRNA ve proteinler) dir.

Prokaryotiklerde (bakterilerde) transkripsiyon başlıca 3 aşamada gerçekleşmektedir.

1) Başlama

2) Zincir uzaması

3) Bitiş

02. Başlama

Mesenger RNA'nın sentezinin başlangıcında, RNA polimerase enzimi, DNA'nın 5' -ucuna doğru, primidinlerden zengin ve promotor olarak adlandırılan bölgesine bağlanır. Bu bağlanma 77-80 bazlık bir bölgeyi (-55 ile +20 bazları arası) kapsar. Böylece, aynı zamanda, yaklaşık 60 bazlık bölge RNase'ların etkisinden de korunmuş olur (Burada (-) olarak ifade edilen bölge, mRNA'da başlangıç kodonunu (AUG) oluşturan sıfır noktasından (başlama noktası) 5' -ucuna doğru (sola doğru, upstream), (+) ise 3' -ucuna doğru (sağa doğru, downstream) olan bölgeleri ifade eder). Bu -55 bölgesine kadar olan bölge içinde çok korunmuş olan ve merkezleri -10 ile -35'e isabet eden, her biri yaklaşık 6 bazdan oluşan iki bölge bulunmaktadır. Bunlardan birincisine Pribnow box adı da verilmekte, burası -6 ile -13 bölgeleri arasında yer almakta ve TATAAT bazlarından oluşmaktadır. İkinci bölge ise -30. ile -37. bazlar arasında bulunmakta ve T T G A C A bazlarından meydana gelmiştir. Bu kısımlara başlama bölgeleri (start bölgeleri) adı da verilmektedir. Bu bölgelerden -10,

03. Zincir Uzaması

Polimeraz enzimi tarafından, promotor bölgesinde -9 ile +2 bazları arasında (yaklaşık 10-11 baz uzunlukta) bir açıklık meydana getirildikten hemen sonra da (2-10 saniye içinde) mRNA sentezi de başlar. Açılma ile birlikte RNA pol. enzimi, DNA üzerinde, 5' ® 3' yönünde ilerlemeye başlarken, açık olan kısmı da, DNA'nın 3' ® 5' yönündeki iplikçiğin üzerinde de aynı yönde mRNA sentezlemeye devam eder.

Açılan DNA bölgesinin hemen arkasından da ilmek kısmında kapanma meydana gelir. Açılma veya açıklık aynen, enzimle birlikte ilerler. Böylece, DNA'nın dejenerasyonu önlenmiş olur.

Yeni sentezlenen mRNA ancak geçici olarak (kısa bir süre için) üç bazla, DNA'ya bağlanmıştır (DNAxRNA hibrid dupleks molekül). Başlangıçta, önce 8-9 bazlık kısa bir

sekans sentezlenerek hemen çıkarılırlar. Çıkan bu kısımlarla, RNA pol.un doğru yere bağlandığı ve sentezin doğru yönde olduğu güven altına alınır. Bundan sonra sentez 5' ® 3' yönünde aynen ve hızla devam eder. Sentez sırasında nukleotid trifosfatlar, mRNA'nın 3' -OH ucuna ilave edilerek tek iplikçik RNA'nın 5' ® 3' yönünde uzamasını sağlar. Ancak, DNA'da bulunan timin yerine, RNA'da urasil bulunur.

04. Terminasyon (Bitiş)

RNA polimerase, mRNA sentezini başlattıktan sonra zincir uzaması terminatör sekansa gelinceye kadar devam eder ve durur. Artık, enzim, zincire herhangi bir nukleotid ilave etmez. Sonra, zincir serbest kalır ve DNA'dan ayrılır. İlmekteki DNA x RNA dubleks hibrid bağları kopar. DNA'daki açıklık kapanır ve eski kapalı formuna döner.

Başlıca 2 tür terminasyon mekanizması bildirilmiştir.

1) Terminatör faktöre (rho faktörü) bağımsız sonlanma: Bu tür terminasyon da, RNA pol. enzimi (merkez enzimi) terminatör bölgeye ulaştığında sentez durur. Terminatör bölge iki yapısal karakter gösterir.

2) Terminatör faktöre (rho) bağımlı sonlanma: Bu tarz terminasyonda rho faktörü (M.A.: 46.000, heksamer) RNA üzerinde özel bir yere sıkıca bağlanarak ribonukleotid trifosfatları, nukleotid difosfat halinde hidrolize eder.

Ribosomlar; Ribosomal RNA'lar (rRNA) ve Transfer RNA (tRNA)

01. Ribosomlar ve Ribosomal RNA'lar (rRNA)

Ribosomlar, hücre içinde amino asitler arasında peptid bağlarının kurulmasını sağlayan, mRNA'ya bağlandıktan sonra bunun üzerinde hareket ederek protein sentezini gerçekleştiren kompakt, identik, irregüler bir morfolojik profile sahip olan partiküler strüktürlerdir. Yaklaşık, 15-20 nm büyüklükte olan ribosomlar, aktif üremekte olan *E. coli* 'ler de sayısı 15000-20000 arasında değişebilir. Hücre içinde serbest olarak bulunabilecekleri gibi, sentez sırasında mRNA üzerinde de tesbih gibi diziler halinde de (poliribosom) bir araya gelebilirler. Prokaryotiklerde ribosom'lar 70S (S: Svedberg ünitesi, sedimentasyon konstantı) karakterindedirler (ökaryotiklerde ise 80S'lik ribosom vardır). Birbirinin benzeri şekil ve yapıda olan ribosomların %60-65'ini ribosomal RNA (rRNA) ve %35-40'ında özel proteinler oluşturur ve MA:2.6x10⁶ daltondur.

Translasyon (Protein Biyosentezi)

01.Genel Giriş

Proteinler, hücrelerin informasyonel makromolekülleri olup kromozomda bulunan nukleotid (baz) sıraları tarafından spesifikite edilirler. Her protein bir veya birden fazla polipeptid zincirinden oluşmuştur. Her bir peptid zinciri de, aminoasitlerden meydana gelmiş lineer polimerler halindedirler. Proteinlerin amino asit sıraları, mRNA'daki baz sıraları tarafından tayin edilir. Genellikle, bir genin bir proteini kodladığı kabul edilir.

Mesenger RNA'daki kodlar, ribosomlar üzerinde deşifre edilerek, amino asit sıraları (polipeptid ve proteinler) haline dönüştürülürler

Protein sentezi bilinen en kompleks biyokimyasal olaylardan biri olup 100 den fazla farklı protein ve 30 türden fazla tRNA'nın fonksiyonu ile gerçekleştirilir.

Protein sentezindeki sellüler mekanizmaları kolay izleyebilmek ve anlamak için, bunları aşamalar halinde incelemek daha yararlı olacaktır.

Protein sentezi, başlıca 4 basamak içinde toplanabilir;

- 1) Aktivasyon
- 2) Başlama
- 3) Zincir uzaması
- 4) Bitiş (terminasyon)

02. Aktivasyon

Hücre içinde, sitosolda bulunan amino asitler, mRNA üzerindeki spesifik kodonlarına taşınmadan önce, kendine ait spesifik tRNA ile interaksiyona girmesi ve bağlanması gereklidir. Her amino asitin kendine uygun bir veya birden fazla tRNA'sı bulunmaktadır. Amino asitleri mRNA'ya taşımada tRNA'lar adaptör molekül görevi yaparlar. Amino asitlerin, kendilerine uyan tRNA'lara bağlanmasında amino acyl synthetase enzimi önemli fonksiyona sahiptir ve amino asitleri aktive ederek, tRNA'ya bağlanmasını sağlar. Aktive olan amino asitler, kendilerindeki karboksil grubu ile tRNA'nın serbest 3'-CCA (adenilik asit) terminusuna (akseptör kol) ester bağlarıyla birleşir. Reaksiyon iki aşamada tamamlanır.

03. Başlama

Protein sentezini başlatmada özel tek bir tRNA görev yapar ki o da formilize olmuş metionini taşıyan fmet tRNA'dır. Bu transfer RNA, aynı zamanda, kendi antikodon bölgesindeki bazlar (UAC) yardımıyla, mRNA üzerinde sırada bulunan ve metioninin kodonu olan AUG'yi tanıyarak kovalent olarak bağlanır. Bakterilerde, bazen AUG yerine, nadiren GUG kodonu da kullanılabilir.

04. Zincir Uzaması

Başlatma kompleksi oluştuktan sonra ikinci amino asitin kodonla birleşmesi, zincir uzamasının ilk adımını da oluşturur. Bu periyot başlıca 3 kısımdan meydana gelir.

a) Kodon tanıma: Bu aşamada, yukarıda belirtildiği gibi mRNA üzerinde sıraya giren ve üç bazdan oluşan kodonla bu kodonun temsil ettiği amino asitle birleşen tRNA'nın antikodon bölgesi arasında, bunların komplementer olması nedeniyle, karşılıklı bağlar kurulur.

b) Translokasyon: 70 S'lik ribosomda P- ve E-bölgeleri boşaldıktan sonra, A-bölgesinin de boşalması ve buraya 3. amino asiti bağlayan tRNA'nın gelmesi gerekir. Bunun için, A-bölgesinin serbest kalması lazımdır. İşte bu önemli olay, 70 S'lik ribosomun mRNA üzerinde bir kodon boyu kayması (5' ® 3' yönde) ile gerçekleşir. 70 S'lik ribosom, mRNA üzerinde sadece bir kodon boyu kaydığında, A bölgesi, mRNA üzerindeki bitişik, yeni bir amino asitin kodonuna gelmiş olur (veya böylece, A bölgesine yeni bir kodon gelmiş olur). Böyle bir hareket olurken, P bölgesindeki AUG kodonuna bağlı olan ve amino asit taşımayan tRNA dışarı itilerek serbest kalır ve AUG kodonundan ayrılır. Serbest kalan tRNA önce 50 S alt ünite üzerindeki E bölgesine gelir ve buradan da diğer bir amino asitle bağlanmak için tekrar sitosola döner. Bu kodona ait amino asitleri, amino acyl sentetase aktive ederek kendine ait tRNA ile bağlar. Bundan sonra, EF-Tu ve GTP ile bağlanan amino acyl tRNA kompleksi, kodonla birleşir.

c) Transpeptidasyon: Transpeptidasyon, peptidil bölgesindeki tRNA'ya bağlı amino asitler ile A-bölgesindeki, yeni gelen, tRNA'daki amino asitin karboksil ve amino terminal uçları arasında peptid bağı kurulması olayıdır. Bu reaksiyonu peptidil transferase enzimi katalize eder. Bu reaksiyon sonunda, P-bölgesindeki amino asitler, A-bölgesindeki yeni gelen amino asitle birleşirler.

Böylece zincir uzaması devam eder. Her translokasyonda sıraya bir amino asit katılmış olur.

05. Bitiş (terminasyon)

Protein sentezini sonlandırmada mRNA üzerinde 3 kodon etkili olur ve bunlara terminasyon kodonları (stop kodon) adı verilir (UAG: amber; UAA: ochre ve UGA:opal). Bazen terminasyon tripletlerini ifade etmede nonsense kodonlar terimi de kullanılmaktadır.

Bakteriler, en fazla UAA tripletini terminasyon kodonu olarak kullanırlar. Diğer terminasyon kodonlarından daha az yararlanılır.

07. Translasyon İnhibitörleri

Messenger RNA molekülünün translasyonunda bir veya birkaç basamağı inhibe ederek proteinin biyosentezine mani olan birçok substans bulunmaktadır.

Bakterilerde Varyasyonlar

01.Giriş

Mikroorganizmaları tanıma etmede, bunların kültürel, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve antijenik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bu karakterler, genellikle, sabit olmasına rağmen, bazı koşullar altında değişmekte ve orijinal mikroorganizmalardan bir veya birkaç yönden ayrı özellikte, yeni türler (varyantlar) meydana gelmektedir. Örn, Salmonellalar, genellikle laktoz negatiflerdir. Fakat, kültürlerde 10-6-10-10 oranında meydana gelen değişik örneklerin laktozu fermente ettiğine rastlanabilir. Kapsüllü mikroplar, devamlı pasajları yapılırsa, bu kapsül oluşturma özelliklerini kaybederler. Aynı tarzda, pigmentasyon kabiliyeti de pasajla azalır. Yeni izole edilen (S) karakterindeki mikroplar pasajla R-şekline dönüşebilir ve hastalık yapma kabiliyetlerini kaybedebilirler. Mikroorganizmalarda oluşan bu tür değişikliklere varyasyon adı verilmektedir.

Varyasyonların bir kısmı çevresel koşulların (ısı, ışık, pH, rutubet, osmotik basınç, oksijen azlığı, yüzey gerilimi, antimikrobiyel maddeler, metabolit intermedierler, v.s.) etkisi altında meydana gelirler. Uygun olmayan ve olumsuz yönde etkileyen bu koşullar düzelirse veya düzeltilirse, bakteriler eski formlarına ve karakterlerine dönerler. Genetik düzeyde olmayan ve gelecek kuşaklara aktarılmayan bu tür varyasyonlara modifikasyon (veya fenotipik varyasyon) adı verilir. Modifikasyonlar daha ziyade, kültürel morfolojik ve fizyolojik karakterlerde belirirler.

Bazı değişimler de, bakteri DNA'sını oluşturan polinukleotid iplikçiklerinde bulunan ve genetik kodları taşıyan nitrojen bazlarının sıralarında meydana gelir. Bu tür değişimler, genetik düzeyde olduğundan nesillere aktarılır ve devam ederler. Böyle değişimlere de mutasyon (veya genotipik varyasyon) denilir. Mutasyonlar, kendilerini daha çok biyokimyasal, patojenik ve antijenik özelliklerde belli ederler. Böyle değişimler sonucu oluşan ve parental hücrelerden farklı karakter gösteren yeni nesillere mutant adı verilir.

02. Fenotipik Varyasyonlar (Modifikasyonlar)

Fenotipik varyasyonlar, genellikle, optimal çevresel koşulların değişmesi sonucu kültürlerde spontan olarak oluşabildiği gibi, normal şartlar altında da meydana gelmektedirler. Besi yerlerinin sınırlı olması nedeni ile kısa bir süre içinde üreyen mikroorganizmalar gıda maddelerini tükettiği gibi ortamda metabolizma artıkları ve toksik intermedierlerin birikmesine, oksijenin sarf edilmesine, osmotik basınç ve yüzey geriliminin değişmesine, kültürlerin eskimesine ve pH'ın düşmesi gibi olumsuz yönde etkileyen koşulların meydana gelmesine neden olurlar. Bu değişen şartlar mikroorganizmalarda 10-6-10-10 oranında

modifikasyonlara yol açarlar. Bakterilerde görülen fenotipik varyasyonlar, çeşitli karakterlere etkiler ve orijinalinden farklı nitelikte varyantları meydana getirirler.

Modifikasyonlar, etkilediği başlıca karakterlere göre, şöyle klasifiye edilebilirler.

- 1- Morfolojik varyasyonlar,
- 2- Kültür varyasyonları,
- 3- Fizyolojik ve biyokimyasal varyasyonlar.

02.01. Morfolojik Varyasyonlar

1- Koloni varyasyonları: Eskimiş sıvı kültürlerden, durma veya ölme döneminde olanlarından, katı besi yerlerine ekim yapılırsa başlıca 2 tür koloni karakterine rastlanılır. Bunlardan biri yuvarlak, düzgün, pürüzsüz, parlak ve konveks (S-tipi), diğerleri ise düzensiz, pürüzlü ve mat (R-tipi) kolonilerdir. Bunların dışında ara koloni tipleri (intermedier koloniler ve mukoid-M) koloniler de oluşabilirler.

2- Kapsül varyasyonları: Bazı mikroorganizmalarda (*B. anthracis*, streptokok, *P. multocida*, *D. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *C. welchii*, v.s.), hücre duvarının dışında ve bundan ayrı olarak bakteriyi çevreleyen, kalınlıkları ve yapıları türlere göre değişen kapsül formasyonuna rastlanır. Kapsül oluşumu, genellikle, vücut içinde meydana gelmesine karşın, bazı özel koşullar (serumlu, sütlü, karbondioksitli, v.s.) altında vücut dışında da teşekkül edebilmektedir. Kapsül, mikropların antijenik kabiliyetini oluşturduğu gibi virulensi artırıcı özelliğe de sahiptir.

3- Flagella varyasyonları: Mikroorganizmalarda flagella oluşumundaki değişmelere sıkça rastlanılmakta ve flagellalı mikroplardan flagellasız varyantlar meydana gelmektedir. Örn, *P. vulgaris* ve *E. coli* 'de bu tür varyasyonlara fazla tesadüf edilebilir. *Salmonellalar*, içinde %0.1 oranında fenol bulunan ortamlarda üretilirse, flagella sentezi geriler ve flagellasız örnekler meydana gelebilir.

4- Fimbria varyasyonları: Flagellalı veya flagellasız mikroorganizmalarda görülebilen, kısa ve düz fimbrialar (pilus) bu mikropların anaerobik koşullarda, katı besi yerlerinde veya çalkalama kültürlerinin yapılması hallerinde, sentezleri durur ve fimbriasız türler meydana gelir.

5- Spor varyasyonları: Bazı mikroorganizmaların (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. tetani*, *C. welchii*, *C. botulinum*, v.s) in vitro veya in vivo spor oluşturma kabiliyetleri vardır. Sporulasyon her ne kadar bir genetik karakter ise de, oluşumunda çevresel koşulların etkisi de çok büyüktür. Örn, *B. anthracis* vücut içinde spor vermez, in vitro koşullarda sporulasyona rastlanır. Buna karşın, klostridum sınıfı mikroorganizmalar, anaerobik koşullarda hem vücut

içinde ve hem de vücut dışında spor verebilirler. Besi yerlerinde gıdaların azalması sporulasyonu hızlandırır.

6- Şekil varyasyonları: Taze kültürlerdeki veya üreme dönemindeki mikroorganizmalar morfolojik yönden bir örneklilik gösterdikleri gibi, diğer fizyolojik ve biyokimyasal karakterler bakımından da az çok homojen bir durumdadırlar. Kültürlerin eskimesi, bileşiminin değişmesi ve diğer optimal çevresel faktörlerin normallerinden ayrılması sonu, böyle ortamda bulunan mikroorganizmaların şekillerinde bozukluklar (involusyon formları) meydana gelir. Bu formlar kendini, şekillerinin yuvarlak, oval, granüllü, yıldız, halka, filamentli, branşlı, v.s. olmasıyla belli ederler.

02.02. Kültür Varyasyonları

Mikroorganizmaların sıvı ve katı besi yerlerinde üreme özellikleri ortam karakterinin optimalden ayrılması sonu değişebilir. Örn, *B. subtilis*, sıvı ortamda genellikle üstte pelikül oluşturarak ürer. Bu ortamın yüzey gerilimi düşürülürse, bu sefer homojen bir tarzda üreme gösterir. *S. aureus*, sıvı besi yerinde homojen ürer, ortamın yüzey gerilimi artırılırsa, üstte üremeye başlar. Mikropların üreme tarzı üzerine besi yerinin bileşimi ve çevresel koşulların etkisi büyüktür.

02.03. Fizyolojik ve Biyokimyasal Varyasyonlar

1- Boyanma özelliğinde varyasyonlar: Taze kültürlerdeki mikroorganizmalar boyanma özelliklerinde bir örneklilik (homojenite) göstermesine karşın, eski kültürlerde bu karakterlerinde sapmalar görülmektedir. Örn, *Klostridium* sınıfı mikroorganizmalar taze kültürlerde kuvvetli Gram pozitif olmasına karşın, eski kültürlerde ise Gram negatifliğe doğru bir eğilim vardır.

2- Pigment varyasyonları: Pigment oluşturan mikroplar, laboratuarda uzun süre pasajları yapılırsa veya uygun olmayan koşullarda üretilirse, pigmentasyonun zayıfladığı ve kaybolduğu görülür: Örn, *S. marcescens* en iyi aerobik koşullarda ve oda ısısında tipik kırmızı pigment oluşturur. Aynı mikroorganizma 37°C 'de ve anaerobik şartlarda pigment oluşturmaz. *S. aureus* da sütlü ortamda iyi pigment yapar ve pasajlar bu özelliği azaltır.

3- Granül oluşumunda varyasyonlar: Bazı mikroorganizmalarda besi yerinin bileşimine göre içlerinde lipid, karbonhidrat (nişasta), fosfat granüllerine rastlanır. Bunların azlığı veya çokluğu, besi yerlerindeki lipid, karbonhidrat ve fosfat bileşiklerine bağlıdır.

4. Enzimatik varyasyonlar: Mikroplar, ortamdaki çeşitli türdeki gıda maddelerinden yararlanabilmesi için, bunlara etkileyen değişik özellikteki enzimleri sentez ederler. Bunların bir kısmı devamlı olarak sentezlenirler (yapısal enzimler) ve bu sentezlenme durumu besi yerinin bileşimi ile fazla ilgili değildirler.

5. Diğer değişmeler: Mikroorganizmaların fizyolojik karakterlerinde (toksin, toksik substanslar, enzimler, vb. sentezi), diğer özelliklerinde olduğu gibi, aynı şekilde, varyasyonlar meydana gelebilir. Bunların bir kısmı mutasyonlar sonunda da oluşabilirler.

6. Attenüasyon: Mikroorganizmalar, normal koşulların dışında üretildikleri zaman oluşan değişikliklerden yararlanılarak aşilar meydana getirilmektedir. Örn, *B. anthracis* 42-43°C 'de devamlı pasajı yapılırsa, yalnız kapsül formasyonunu kaybetmez, aynı zamanda, duyarlı hayvanlar için hastalık oluşturma kabiliyetinde de zayıflama görülür (Pasteur'ün aşısı). Aynı şekilde, sığır tüberküloz mikropları, gliserinli safralı patatesli besi yerinde yıllarca pasajı yapıldıktan sonra, insanlar için çok önemli olan ve korunmada büyük yararlar sağlayan tüberküloz aşısı (BCG) haline getirilmiştir.

03. Genotipik Varyasyonlar (Mutasyonlar)

03.01. Genel Bilgiler

Mutasyonlar, genellikle polinukleotid iplikçiklerinin (DNA) yapısını oluşturan nukleotidlerdeki bazların, bakteri türüne veya cinsine özgü olan, dizilişlerindeki değişiklikler veya bu bazlarda meydana gelen kimyasal bozukluklar, kopmalar, zedelenmeler, v.s. sonu oluşurlar. Aynı tür içinde bulunan mikroorganizmaların DNA'larında, nitrojen bazları belli ve sabit bir sıra içinde bulunurlar ve böyle fertlerin DNA'ları birbirinin homologudurlar. Bu nedenle, aynı tür içinde bulunan mikroorganizmaların çeşitli karakterleri (morfolojik, fizyolojik, kültürel, biyokimyasal, antijenik vs) birbirine benzerler.

Baz dizilişlerine etkileyen bir faktör veya bazlardaki kimyasal bağlantıların karakterlerindeki değişmeler (tautomerik değişmeler) kendini transkripsiyon ve translasyonda belli ederler. Bunun sonucu olarak da mutasyonlar ve değişik karakterlerde yeni nesiller (mutantlar) meydana gelirler.

03.02. Mutasyonların Başlıca Nedenleri

Mutasyonların meydana gelmesine neden olan başlıca faktörler şöyle sıralanabilirler:

1- Polinukleotid iplikçiklerindeki normal baz sıraları arasına bir baz çiftinin çıkması (delasyon) veya baz sıraları arasına bir baz çiftinin girmesi (insersiyon) (nokta mutasyonları).

2- Bir baz çiftinin yerini diğer baz çiftinin alması (transisyonel ve transversiyonal mutasyonlar).

3. Aynı polinukleotid iplikçiği üzerinde yan yana bulunan pirimidin bazları arasında özel bağların kurulması (dimerizasyon).

4. Bazlarla şekerler ve şekerlerle fosfatlar arasındaki bağlantıların kopması.

Baz çiftinin çıkması ve girmesi durumu: Bu tarz mutasyonlarda DNA'daki normal baz sıraları arasından bir baz çifti çıkabilir veya baz sıralarına yeni bir baz çifti girebilir.

04. Mutajenik Maddeler (Mutajenler)

Bakterilerde mutasyon oluşturan etkenler, genellikle, fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterdedirler. Bunlar da,

04.01. Fiziksel Mutajenler

Isı: Eğer bakteriler 100°C 'ye kadar yavaş yavaş ısıtılırsa iplikçikler arasındaki karşılıklı hidrojen bağları çözülür ve iki iplikçik birbirinden ayrılır (denatürasyon). Isı yavaş yavaş azaltılırsa iki iplikçik hemen birleşir. Bu olay, hibridizasyonda işe yarar. Bilinen baz sıralarına sahip test DNA'sı ile bilinmeyen DNA (veya RNA) iplikçığının homologluk durumu araştırılır. Bu durum bakterinin klasifikasyonunda yararlı olur.

Ultraviole ışınları: Ultraviole ışınlarına maruz bırakılan bakteriler, primidinler (timin veya sitozin), pürinlerden daha fazla UV ışınlarını absorbe eder ve kendilerinde birçok fotokimyasal değişimler meydana gelir. Bunun sonucu, atomlar arası enerjinin artmasına ve timin dimerlerinin oluşmasına sebep olur. Bu bozukluk iki baz arası 0,34 nm'lik uzaklığı 0.28 nm'e indirerek DNA'da çarpıklıklar meydana getirir. Dimerlerin bulunduğu yerlerde transkripsiyonda atlamalar veya boşluklar oluşur ve bu bölge atlanarak devam edilir.

İks (x) ışınları: Dalga boyu UV-ışınlarından çok daha kısa olan X-ışınlarının bazların atomlarında oluşturduğu yüksek enerji, UV-ışınlarından 4 kat daha fazladır. Bazlar tarafından çok çabuk absorbe edilen bu ışınlar yüksek enerjilerinden dolayı, DNA iplikçiklerinden nukleotidlerin çıkmasına ve mutasyonlara sebep olmaktadır. Bu mutasyonlar genellikle ölümlü son bulur. İyonizan ışınlar, bakterilerde bazı kimyasal değişiklikler meydana getirirler. Bunun başında iyonizasyon gelmektedir. İyonizasyon sonu atomların orbital elektronlarında dışarı fırlamalar oluşur. Serbest kalan elektronlar, hücredeki bazı radikaller veya moleküller tarafından alınarak, yeni bileşikler teşekkül eder. Bunların çoğu bakteriye zarar verir niteliktedir.

Ultrasonik vibrasyonlar: Ses ötesi vibrasyonlar da bakteriler üzerine olumsuz yönde etkiler ve bazı genetik değişimler meydana getirebilirler.

04.02. Kimyasal Mutajenler

Kimyasal mutajenik maddelerin etkisi altında oluşan mutasyonlar kolayca tamir edilebilirler. Mutajenik maddeler, genellikle, transisyonel ve transversiyonel mutasyonlara yol açarlar: Bazıları da bazların çıkmasına ve DNA'da kopmalara sebep olurlar. Başlıca mutajenik maddeler:

Nitröz asiti (HNO₂):

Bazlar üzerine direkt etki yapan nitroz asiti, bazlardan oksidatif deaminasyon ile amin grubunu (NH₂) çıkarır ve bunun yerine keto (= O) grubunu koyar. Sitozinin de aminasyonu sonu urasil (U), ve adeninin deaminasyonunda da hipoksantin meydana gelir. Bu olaylar sonunda oluşan urasil adeninle ve hipoksantinde sitozinle bağ kurar.

Hidroksil amin (NH₂OH): Bu mutajen daha ziyade pirimidinler (sitozin) üzerine etkiler ve olay sonu oluşan yeni bileşikler, tautomerik değişmelere maruz kalır ve transisyonel mutasyonlar oluşur.

Alkılan maddeler: Birçok kimyasal maddeler, nukleotidler arasında alkil gruplar (CH₃-, CH₂-) sokarak transisyonel mutasyonlar yaparlar. Bu tür alkılan maddeler arasında sülfür, nitrojen mustard, dimetil sulfonate (DMS), dietil sulfonate (DES), etil metane sulfonate (EMS), metil metane sulfonate (MMS), nitrosoguanidine (NG), v.s. sayılabilir.

Baz analogları: Baz analogları parental DNA'ya etkilemezler. Bunlar replikasyon sırasında, yeni iplikçik sentezlenirken, sıraya girecek bazların yerine geçerler (veya bunların yerlerini alırlar) ve böylece transisyonel mutasyonlara yol açarlar. Baz analogları arasında en fazla üzerinde çalışılan timinin analogu 5- Bromouracil (5-BU) ve adeninin analogu 2-Amino pürin (2-AP)'dir.

Akridinler: Akridin boyaları arasında en iyi bilineni proflavindir. Proflavin tarafından oluşturulan mutasyonlar, baz analogları, nitroz asiti ve hidroksilamin tarafından geri çevrilemez. Ancak, mutasyon olan gende spontan mutasyonlar veya tekrar akridin boyaları ile oluşturulan ikinci bir mutasyon ile düzeltilebilir.

Diğer mutajenler: Metilkolantren, MnCl₂, arsenik, krom, urethane, creosol, katran, organik peroksidase, asitler, alkaliler. İndirekt etkileyen mutajenler: İlaçlar, hormonlar, fazla oksijen, pH değişimleri, diğer çevresel faktörler.

Biyolojik Mutajenler: Bakterilerde bulunan bazı ekstra kromozomal genetik elementler (plasmid, faj, transpozon, Mu fajı, İs-elementleri) mutasyonlara yol açabilirler.

Bunlar hakkında ileriki bahislerde gerekli bilgiler verilmektedir.

05. Bazı Önemli Mutasyon Türleri

05.01. Spontan (Doğal) Mutasyonlar

Bakteriyel populasyon, dışarıdan herhangi bir indükleyici madde katılmadan veya müdahale edilmeden, mutasyonlara maruz kalabilir. Buna spontan mutasyon adı verilmektedir. Oluşan mutantlara da spontan mutantlar denilir. Bakteri DNA'ları çoğalma sırasında çok fazla replikasyona tabi tutulmaktadır. Doğaldır ki, çok sayıda ve sınırsız replikasyonlar ve DNA'nın diğer fonksiyonları sırasında, nukleotidlerin asamblesinde ve polimerizasyonunda bazı hatalar meydana gelmektedir. Bu hatalara, bir bazdaki elektronların tautomerik transpozisyonu

oldukça fazla neden olmaktadır. Örn; timin normal olarak keto durumunda bulunur ve adeninle karşılıklı iki hidrojen bağı kurar. Eğer, timin, DNA'nın replikasyonu sırasında, enol forma değişirse, bu zaman guaninle birleşir. Bu durumda, yeni DNA'da AT yerine GC bazları girmiş olur.

05.02. Silent Mutasyon

Moleküler düzeyde, DNA'da bazlarda meydana gelen her türlü değişiklik mutasyon olarak kabul edilirse de, böyle mutasyonlar her zaman fenotipik olarak eksprese edilmezler. Bazı tripletlerin 3. bazında meydana gelen değişmeler fenotipe etkilemez. Bakteride hiç bir aksaklık meydana getirmez.

05.03. Geri Mutasyon ve Reversiyon

Mutantlar, kendi DNA'larında oluşan bazı mutasyonlar sonu tekrar orijinal (parental) veya doğal formlarını kazanabilirler (geri mutasyon). Bu olguda, değişen amino asit tripleti, geri mutasyonla tekrar orijinal amino asiti kodlayan triplet haline gelebilir.

05.04. Yapay (Suni) Mutasyonlar

Eğer hücreler mutajenik ajanlarla (kimyasal, fiziksel, biyolojik, vs.). muamele edilirse, mutantlar meydana gelebilir. Bu tarzda başlıca 4 tür mutant oluşabilmektedir.

- 1- Bir baz çiftinin diğeri ile yer değiştirmesi, örn., AT yerine GC 'nin girmesi gibi,
- 2- Bir baz çiftinin girmesi veya çıkması,
- 3- Büyük bir DNA segmentinin (bir veya birkaç genlik) kaybolması veya kromozom üzerinde başka bölgeye transferi (transpozisyonlar).
- 4- Biyoteknolojik yöntemlerle mutasyonlar oluşturulabilir ve mutant suşlar elde edilebilir.

05.05. Mutasyonun Sonuçları

Mutasyonların mikroorganizmalar üzerinde ne denli etkilediği başlıca iki faktör tarafından belirlenir. Bunlardan biri, gen ürünlerinin ne kadar değiştiği ve diğeri de gen ürünlerinin hücre içi ne derece de önemli olduğudur.

Gen ürünlerindeki değişiklikler: Bütün mutasyonlar, genetik kodları ve bunlara bağlı olarak da genetik bilgileri (informasyonları) değiştirir. Ancak, bunların gen ürünleri üzerindeki etkileri farklıdır. Bazıları hücre fenotipinde çok az veya hiç bir değişiklik yapmaz. Örn; bir kodonda meydana gelen değişiklik sonu oluşan gen ürünü, normal kodonla aynı olabilir. Bir amino asit bir kaç kodonla temsil edildiği için, böyle bir mutasyonun hiç bir zararlı etkisi yoktur. Bazen de değişiklik sonu oluşan farklı amino asitin gen ürününün fonksiyonuna bir zarar vermez. Farklı bir amino asitin şifresini oluşturan mutasyonlara genellikle, "missense mutasyon" adı verilir.

Esansiyal gen ürünleri: Bazı gen ürünleri hücrenin yaşamı için çok önemlidir. Bunların olmamasının hücrede oluşturduğu bozukluklar, gen ürünün fonksiyonlarına bağlıdır.

06. Mutant Türleri

Gerek spontan mutasyonlar (bilinen mutajenlerin olmadığı durumlarda, uygun olmayan çevresel koşulların altında kendiliğinden oluşan ve daha ziyade girme, çıkma, transisyon ve transversiyon tarzında görülen mutasyonlar) ve gerekse fiziksel veya kimyasal mutajenlerin etkisi altında oluşan mutasyonlar sonu, birçok karakterlerde değişmeler meydana gelebilir. Böyle mutasyonlar sonu oluşan başlıca mutant türleri şöyledir.

06.01. Rezistans Mutantlar

Mutasyonlar sonu çeşitli ilaç, dezenfektan, antibiyotik, kemoterapötik, inhibitörler, ultraviyole ışınları, fajlar, v.s. etkenlere karşı dirençlilik gösteren mutantlar oluşabilir.

06.02. Nutrisyonel Mutantlar

Özel üretme faktörlerine gereksinim göstermeyen orijinal parental (prototrof) hücrelerden, mutasyonlar sonu bir veya birkaç üretme faktörüne gereksinim duyan mutata (okzotrof) hücreler meydana gelebilir. Prototrof hücreler basit ortamlarda (minimal ortam) gelişebildikleri halde okzotroflar gelişemezler. Bunların besi yerlerine üretme faktörleri (amino asit, vitamin, nukleik asit, v.s.) katılır (kompleks ortam).

06.03. Fermentasyon Mutantlar

Orijinlerinde karbonhidratlardan bazılarını fermente etmeyen (veya eden) suşlardan oluşan mutantların bu karbonhidratlara etkilediği (veya etkilemediği) görülebilir. Örn; salmonella, proteus veya shigella arasında laktozu fermente eden, *E. coli* arasında da laktozu fermente etmeyen mutantlar ortaya çıkabilir.

06.04. Pigmentasyon Mutantları

Bazı mutasyonlar, pigment oluşturan mikroorganizmalarda bu kabiliyetin kaybolmasına yol açar. *S. marcescens* veya *S. aureus* 'dan uzun pasajlar veya mutasyonlar sonunda pigment oluşturmeyen mutantlar elde edilmiştir.

06.05. İndüksiyon Mutantları

Bu tür mutantlar, mutajenik maddelerin etkisiyle meydana gelirler.

06.06. Antijenik Mutantlar

Bakterilerde bulunan kapsül, flagella, hücre duvarı ve piluslar antijenik karakterlere sahiptirler. Bunların biyosentezini idare eden genlerde oluşan mutasyonlar, bu faktörlerin meydana gelmesine ve fonksiyonlarına etkiler ve değişikliğe uğratarak antijenik bozukluklara yol açarlar. Flagellalı bakteriler flagellasız, ve kapsüllü de kapsülsüz hale gelebilirler. Somatik (O) antijenlerinde de önemli değişmeler görülür.

06.07. Mutasyon Oranı

Kültürlerde oluşan spontan mutasyonlar az çok sabit bir durum gösterebilir. Mutasyon oranı her generasyonda, her bir hücreye isabet eden mutasyon miktarı ile ölçülür. Mutasyonlar genellikle, replikasyon sırasında ve yeni sentezlenen iplikçiklerde meydana gelirler. Parental DNA'da mutasyon çok azdır.

07. Mutasyonların Tamiri

Spontan olarak veya mutajenik maddelerin etkisiyle oluşan mutasyonlar, bakterilerde özel mekanizmalar tarafından tamir edilebilir ve düzeltilebilir. Ancak, bu işlem, oluşan bozukluğun büyüklüğüne ve önemine göre değişebilir. Nokta mutasyonları genellikle ve kolayca giderilebilirse de, bir genin kaybolması ve kromozomda oluşan kopmalar kolayca tamir edilemez ve ölümle son bulurlar.

07.01. Kontrol Okuma ile Düzeltme

DNA'nın sentezi (replikasyon) sırasında yanlış nukleotidlerin sıraya girmesi hücre tarafından hemen fark edilerek, ileri sentez çok kısa bir süre için durdurulur. DNA polimerase I ve III'ün geriye doğru kontrol okuma mekanizması ile hatanın yeri bulunarak yanlış nukleotid 3-OH ucundan hidrolize edilerek çıkarılır ve yerine doğru nukleotidler konarak bozukluk giderilir.

07.02. Represör Mutasyonlar

Eğer DNA'da baz çiftleri arasına bir bazın girmesi (veya çıkması) ile oluşan mutasyon, aynı genin içinde (intragenik) veya gen dışında (ekstragenik) meydana gelen ve diğer bir baz çiftinin çıkması (veya girmesi) şeklinde oluşan ikinci bir mutasyonla, giderilebilir (supresör mutasyon). İkinci mutasyon, birinciye ne kadar yakınsa, düzeltme işlemi hem kolay ve hem de imkân dahilinde olur. Aynı genlerde oluşan ikinci mutasyon, birinci ile arasında çok mesafe olacağından ve bu arayı yanlış sıralı aminoasitler dolduracağından, tamiri olanaksızdır ve bakterinin ölümüne sebep olur.

07.03. Dimerizasyonun Giderilmesi

Ultraviyole ışınlarının DNA'da bulunan primidinler tarafından absorbe olması ve enerji ile yüklenmesi sonu oluşan dimerizasyon (polinukleotid iplikçiğinde yan yana bulunan pirimidinlerin birbirleriyle birleşmesi) primidinlerin karşı iplikçikteki pürinlerle bağlanmasını önler ve DNA'yı çarpıtır. Bu durum replikasyona ve bunun sonucu olarak ta transkripsiyona ve translasyona etkileyerek mutasyonlara yol açar. Dimerizasyon başlıca 3 tarzda giderilir:

1- Fotoreaktivasyon: Eğer bakteriler, UV-ışınlanmasından sonra, hemen görülebilen ışınlarla tutulursa, UV-ışınlarının letal etkisi giderilir. Bu olayda UV-ışınlanması sırasında oluşan timin

dimerleri (T-T), gün ışığında aktive olan ve iş görebilen özel enzimler (fotoreaktif enzimler) tarafından hidrolize edilerek aralarındaki bağlantı koparılır. Böylece timinlerin, normal ve karşı iplikçikteki pürinlerle bağ kurması temin edilir.

2- Karanlıkta reaktivasyon: Bu tarz tamirat, ışıқта tamirattan farklıdır. Bu mekanizma ışıқта çalışmaz ve başlıca 4 enzim (endonuklease, ekzonuklease, polimerase, ligase) sıra ile iş görerek düzeltme görevini yaparlar.

3) Endonukleotik insizyonla tamir: Hücrelerde (prokaryotik ve ökaryotik) bulunan bazı endonukleazlar de DNA'daki lezyonları tanıyarak bunlardaki fosfodiester bağlarını kaparak çıkarılmasını katalize ederler.

4) Rekombinasyonla tamir: DNA'da meydana gelen bozuklukların giderilmesinde rekombinasyonla tamir mekanizması da görev yapmaktadır. *E. coli* 'de UV-ışınlarının oluşturduğu dimerlerin tamirinde bu sistemin de iş gördüğü açıklanmıştır. Replikasyonda atlanan dimer bölgesi, karşı parental DNA segmenti tarafından rekombinasyonla tamir mekanizması ile kapatılır sonra DNA'daki timin dimerleri de eksizyonla çıkarılır. Bunların yerleri de DNA polimerase ve DNA ligase tarafından düzeltilir.

5) Bypass ile tamir: Bu mekanizma, lezyonu tam olarak ortadan kaldıramaz ve lezyon atlanarak replikasyona devam edilir. Eğer, bozukluk fazla ise hücreler ölebilir. Eğer sıraya giren yeni baz tamirata düzeltirse, bozukluk ta fazla ileri gitmeden ortadan kaldırılmış olur.

6) N-glikosidase ile tamir: Bu mekanizmada, DNA'da bulunan anormal bazlar (urasil, hipoksantin, 3-metiladenin, v.s.) N-glikosidase enziminin katalitik etkisiyle N-glikosidik bağları koparılarak çıkarılır. Bir çok türde N-glikosidase enzimi belirlenmiştir.

7) Dealkilasyonla tamir: Bazı mikroorganizmalarda, mitojenik veya karsinojenik etkiye sahip olan bazı maddelerin (alkilan maddeler vs) etkisiyle kimyasal olarak modifiye olan (alkillenen) bazları tanıyarak bunları dealkile etmek (veya çıkartmak) suretiyle hatayı düzelten enzim sistemlerinin varlığı saptanmıştır.

Yer Değiştirebilen Genetik Elementler

01. Giriş

Yer değiştirebilen genetik elementlere (Transposable genetik elementler) prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda fazlaca rastlanmaktadır. Bakteri, mantar, maya, mısır, drosofila, vs. bunlardan sadece birkaçıdır. Bu elementler, bir kromozomdan diğerine, aynı kromozom üzerinde bir bölgeden başka bir yere, kromozom ile plasmid veya iki plasmid arasında yer değiştirebilen, kendinin transferini sağlayabilen küçük, lineer ve çift iplikçikli DNA sekanslarıdır. Plasmidlerde rastlanan transposable elementler, aynen kromozomda olduğu

gibi, bir plasmid üzerinde pozisyonunu değiştirebilir veya iki plasmidi birbirine birleştirebilir. Transposon ile hedef bölge sekansları arasında (girdiği yeni bölge) homolog yanların bulunmasına gereksinim yoktur.

Transposable elementler (mobil elementler) ilk defa, 1940 yılında Barbara McClintock tarafından mısır bitkisi genetiği üzerinde yaptığı çalışmalar sırasında saptanmıştır. Sonradan, bakteri, maya, diğer bazı ökaryotiklerde de varlığı bildirilmiştir.

Bakterilerin yeni karakterler kazanmasında ve yeni mutasyonların oluşmasında etkinlikleri fazla olan transposable elementler başlıca 3 grup altında toplanmaktadır.

- 1) İnsersiyon sekansları (İS-elementleri)
- 2) Transposonlar (Tn)
- 3) Mu fajı (mutator faj, mutasyon oluşturan faj)

02. İnsersiyon Sekansları (İS-Elementleri)

Transposonlardan daha basit bir yapı karakteri gösteren İnsersiyon sekansları (İS-elementleri) yaklaşık 750-1500 bp uzunluktadırlar. Elementlerin türlerine göre değişmek üzere, iki ucunda 10-40 bp kadar olan ve tersine tekrarlanan sekanslar (inverted repeat, IR) bulunmaktadır. Bunları dış taraftan çevreleyen, yeni girdiği alıcıya ait hedef bölgede ve aynı oriyantasyonda, 5-12 bp uzunlukta direkt tekrarlanan (direct repeat, DR) nukleotid sekansları yer almaktadır.

03. Transposonlar (Tn)

Transposonlar, İS-elementlerine oranla, daha büyük ve komplike bir özellik gösterirler. Yapılarında, transposase geninden ayrı olarak özel marker genleri (antibiyotiklere, kemoterapötiklere, metallere dirençlilik, vs) taşırlar. Transposonların yapısı, temel karakterleri bakımından, İS-elementlerine benzerlik gösterir. Transposonlar iki ucunda tersine tekrar (IR), bunları dıştan çevreleyen direkt tekrar (DR) ve ortada da transposase geni ayrıca başka diğer özel marker genleri de bulunmaktadır.

03.01. Replikatif Transpozisyon

Replikatif transpozisyon, DNA üzerinde bulunan transposonda bir çoğalmanın (dublikasyon) meydana gelmesi ve orijinal kopyanın parental DNA'da kalarak, yeni sentezlenen kopyanın başka bir hedef bölgeye transfer edilmesi tarzında gerçekleşen bir yer değiştirme olgusudur. Bu tür transpozisyonunda transposase enzimi yanı sıra resolvase enzimi de yardımcı olur. Bu son enzim, yeni kopyanın hedef bölgeye girmesinde (rekombinasyonda) etkinlik gösterir. Transpozisyon için, konak hücre kromozomu ile hedef bölge arasında homolog sekanslara gerek yoktur.

03.02. Nonreplikatif (Direkt) Transpozisyon

Transposon, bulunduğu yerden çıkararak, yeni hedef bölgeye direkt olarak geçebilir ve bu bölge içine girebilir. Bunun için, önceki bulunduğu DNA'da transposonun iki ucunda kesimler meydana gelerek, Tn buradan ayrılır, bunun karşısına gelen yeni hedef bölge sekansları arasında benzer tarzda oluşan kesimler sonu aralanan DNA içine girer. Bu tür transpozisyona Tn 5 ve Tn 10 da rastlanmaktadır. Direkt transpozisyonda transposase enzimi etkilidir. Verici DNA'dan çıkan Transposonun geride kalan açıklığı hemen kapatılır. Eğer hücre bunu kapatmazsa, ölümler meydana gelebilir.

03.03. Konservatif Transpozisyon

Bu tür transpozisyon lambda fajında olduğu gibi gerçekleştirilir. Karşılıklı gelen sekanslar arasında çapraz rekombinasyonla integrasyon meydana gelir.

Bazı transposonlar sadece bir tür ve bir kısmı da birden fazla mekanizmayı kullandıkları saptanmıştır.

4. Mu Fajı (Mutator Faj)

E. coli'ye ait olan bu faj, aynı bir transposon gibi bakterinin kromozomu üzerinde yer değiştirebilir ve çeşitli yerlere girebilir. Böyle durumlar mutasyonlara yol açmaktadır. Bu faja aynı zamanda "dev transposon" adı da verilmektedir.

05. İntegronlar

Son yıllarda, klinik materyallerden izole edilen, *Enterobacteriaceae* familyasına ve pseudomonaslara ait mikroorganizmalarda, bir çok rezistenslik genleri taşıyan ve İntegron olarak tanımlanan yeni hareketli elementlerin (mobile element) varlığı bildirilmiştir.

Mantar Plasmidleri, Mantar Virusları Ve Parazitizm

Mantar Plasmidleri

01. Giriş

Yapılan çalışmalarda mayalarda (*S.cerevisiae*) DNA karakterinde (3.9 x 10⁶ dalton) ve 2 mikrometre uzunluğunda sirküler ve çift iplikçikli plasmidlere rastlanılmıştır. Yaklaşık 6 polipeptid zincirini kodlayabilecek bir kapasitede (6318 bp) olan plasmidin bir hücrede 25-100 kopyasının bulunabildiği ve maya hücresi kromozomunun %3'ü kadar olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu plasmidin oligomycine karşı dirençlilik geni taşıdığı da açıklanmıştır. Maya plasmidinin, diğer ökaryotik ve prokaryotik hücrelere ait olan plasmidlere bazı benzerlikleri de bulunmaktadır. Maya hücresi DNA'sı her replike olduğunda plasmid DNA'sı da replike olmaktadır.

02. Mantar Virusları (Mikoviruslar)

Elektron mikroskopla yapılan incelemelerde, Penicillium cinsine ait bazı türler içinde çapları 25-50 nm kadar olan izometrik çift iplikçikli RNA viruslarına rastlanıldığı açıklanmıştır. Mikoviruslar, nadiren mantar hücrelerinde erimeler meydana getirirler. Mikovirusların mantarlarda toksin sentezini önlediği ve mantarları apatojenik hale getirdiği bildirilmiştir.

03. Parazitizm ve Parazitik Mantarlar

Mantarlar gıdalarını temin etmede çok geniş bir konakçı spektrumuna sahiptirler. Canlı (insan, hayvan, bitki, protozoa, vs.) ve cansız (daneler, yemler, besinler, vs.) ortamlar, uygun çevresel koşullar (ısı, rutubet, vs.) altında, mantarların üremeleri ve gelişmeleri için oldukça elverişlidir. Mantarlar üzerinde üredikleri substratlardan gıdalarını temin ederken bazı bozukluklara neden oldukları gibi salgıladıkları toksinlerle (mikotoksinler) ve toksik maddelerle de oldukça etkili olmaktadır.

Virusların Üremesi (Viral Replikasyon)

01. Genel Bilgiler

Virusların hücre içindeki multiplikasyon tarzlarını incelemeye bakteriyofajların modelliğinden fazlaca yararlanılmıştır. Fajların bu özelliklerini saptamada kullanılan teknikler, hayvan viruslarına da adapte edilerek bunların canlı sistemlerde (hücre, embriyolu yumurtalar, deneme hayvanları) replikasyon aşamaları (virusların hücrelere bağlanılışından olgunlaşmış çıkıncaya kadar geçirdiği evreler) ayrıntılı olarak belirlenmiştir. Ancak, yine de tam olarak saptanamayan ve kesin olarak ortaya konamayan bazı noktalar hala bulunmaktadır. Elektron mikroskopların da virusların bu karakterlerini incelemeye çok büyük faydaları olmuştur.

Virusların duyarlı hücrelerde replikasyon aşamaları, genellikle, 7 kısımda incelenmektedir. Her ne kadar, basamakların tümü direkt olarak ve gerçek anlamda nukleik asit sentezi ile bağlantılı değilse de, bu basamakların birlikte öğrenilmesinin konunun bütünlüğünün korunmasına ve daha kolay kavranılmasına yardımcı olacaktır. Bu aşamalar da,

- 1) Hücre membranına bağlanma (adsorbsiyon)
- 2) Hücreye giriş (penetrasyon, endositozis, internalizasyon)
- 3) Kapsidin ve/veya zarfın çıkarılması
- 4) Viral ekspresyon
 - a) Transkripsiyon
 - b) Translasyon
- 5) Nukleik asit sentezi (genom replikasyonu)

6) Viral komponentlerinin sentezi ve montajı (asamble)

7) Virusların olgunlaşması ve hücrelerden çıkışları

02. Hücre Membranına Bağlanma (Adsorbsiyon)

Virusların hücrelere girebilmesi ve bunun sonucunda da infeksiyon (litik veya nonlitik) oluşturabilmesi için, önce duyarlı hücrelere bağlanmaları gerekir. Zarfsız viruslarda kapsidin spesifik protein yapısı veya zarflı viruslarda, zarfın yüzeyinde bulunan protein ve glikoprotein karakterindeki özel moleküllerin (ligand, viral bağlanma proteinleri), duyarlı hücrelerin yüzeylerinde bulunan ve değişik kimyasal (protein, glikoprotein, oligosakkarid, lipoprotein, vs) yapıya sahip spesifik reseptörlere sıkıca bağlanması giriş için ilk ve önemli sinyali verir. Glikoproteinler, karbonhidratlardan daha fazla bağlanma etkinliğine sahiptirler ve daha fazla spesifiktirler. Aksi halde virionun ve hücre yüzeyinin negatif yüklü olmaları bağlanmayı (ligand-reseptör afinitesi) zorlaştırır. Bu nedenle virion ile hücre arasında kuvvetli bir kimyasal ilişkinin bulunması gereklidir. Ancak, şunu da hatırdan çıkarmamak gerekir ki, konakçının genetik duyarlılığı yanı sıra, kanlarında spesifik nötralizan antikorların da bulunmaması çok önemlidir. Ayrıca, konakçının immun yetmezlik hastalığına sahip olması veya immunsupresif ilaç kullanması infeksiyonu kolaylaştırır.

03. Hücreye Giriş (Penetrasyon, Endositozis, İnternalizasyon)

Elektron mikroskopik ve diğer, in vivo ve in vitro çalışmalar, virusların hücrelere girişlerinde oldukça ayrıntılı bilgiler vermiştir. Virusların hücrelerdeki spesifik reseptörlere sıkıca bağlanması ve bu fenomenin irreversible olması, hücreye giriş için ilk adımı oluşturmasına karşın, bu kuvvetli ilişkinin devam etmemesi, virusun serbest kalmasını önlememesi ve girişe engel olmaması yönlerinden de önemlidir. Virus, hücre yüzeyine adsorbe olduktan sonra peplomerlerdeki glikoproteinlerde bazı konformasyonel değişiklikler meydana gelir ve bunlar virusun girmesine yardımcı olur. Zarflı viruslardaki F-proteinin, sitoplasmik membranla birleşmesi (füzyon) nukleokapsidin sitoplasmaya geçişini çok kolaylaştırır. Zarfta bulunan neuraminidase enzimi (sialidase), reseptör proteinlerdeki sialik asiti hidrolize ederek virusun serbest kalmasına (elüsyon) ve içeri girişine yardımcı olur. Endositozis (viropeksiz) olayı da, hücrelere girişte yardımcı olan bir fenomendir. Reseptörler, viruslarla bağlanmaları yanı sıra, virusun içeri girmesine ve iç kısma sinyal vermede de görev yaparlar. Bu sinyaller, virus sitoplasmaya geçmeden önce, hücre içinde virus için bir hazırlık yapılmasını da uyarır.

Viruslar zarfsız ve zarflı olduklarına göre başlıca 3 genel mekanizma ile sitoplasmik membranı geçerek sitosola ulaşırlar.

03.01. Zarfsız Viruslar

Adenoviruslar, reoviruslar ve diğer zarfsız viruslar da nukleokapsidlerinde meydana gelen bazı değişiklikler aracılığı ile sitoplasmik membranı kolayca geçebilir (kapsid ile birlikte) sitoplasmaya ulaşır ve burada kapsidleri enzimatik olarak ayrıştırılarak nukleik asitler serbest kalırlar.

03.02. Zarflı Viruslar

Zarflı viruslar da başlıca iki tarzda sitoplasmik membranı aşarak hücre içine girerler.

1) Plasma membranı ile füzyon: Yüzeyinde F-proteini bulunan viruslarda, bu protein hücre membranı ile kolayca birleşir ve nukleokapsid serbest kalarak sitoplasmaya ulaşır. Bu olguda, zarf hücre membranı ile birlikte dışarıda kalır içeri girmez (paramyxovirusları ve diğerleri)

2) Endositozis (viropeksiz): Endositozis, normal hücreler tarafından uygulanan, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmış olan partiküllerin internalizasyon yöntemidir. Viruslar hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunduktan sonra, virüsü tümenden saran plasma membranı ile çevrilir ve böylece içeri alınır. Bu olguda, virionun etrafında zarftan ayrı olarak sitoplasmik membrandan da bir katman bulunur. Virionun etrafındaki dış muhafaza çıkarıldıktan sonra endosomla birleşirler (asidik lizozomal vesiküller). Burada, asidifikasyonun etkisi ile zarftan da sıyrılarak nukleokapsid sitosola geçer. Togaviruslar, orthomyxoviruslar, rhabdoviruslar ve diğer helikal simetrikli viruslarda bu tarz girişe rastlanmaktadır.

04. Kapsidin veya Zarfın Çıkarılması

Viral genom sitoplasmaya girdikten sonra hücre içindeki çeşitli enzimlere (DNase, RNase, protease, vs) çok duyarlı olduğundan, hemen transkripsiyonun ve diğer işlemlerin (translasyon, replikasyon) başlaması ve bitirilmesi gerekmektedir.

Virusların yapısal karakterlerine göre başlıca dört tür mekanizma ile kapsid ve/veya zarflardan kurtulma gerçekleştirilmektedir. Bunlar da,

1) Zarfsız viruslarda (picornavirusları gibi), virion hücre membranına bağlandıktan sonra, kapsidde konformasyonel değişiklikler meydana gelerek kapsid proteinlerinden VP2 ve VP4'lerde serbest kalma ve kayıplar meydana gelir. Bu durum, kapsidin proteazlara daha duyarlı hale gelmesine neden olur. Plasma membranında oluşan zayıf noktalardan nukleokapsid sitoplasmaya ulaşır ve burada kapsidten ayrılan genom (nukleik asit) fonksiyonu olan bölgeye gider.

2) Herpesviruslarında nukleokapsid sitoplasmaya girdikten sonra nükleer membranla birleşir ve DNA nükleer membrandaki deliklerden içeri girerek replikasyon bölgesine ulaşır.

3) Poxviruslarında, nukleik asitin etrafındaki zarflardan ayrılma, sitoplasmadaki endosomlar (veya vakuoller) içinde gerçekleşir ve DNA serbest kalarak sitoplasmaya geçer ve replikasyonun bütün aşamaları sitoplasmada tamamlanır.

4) Zarflarında F-(füzyon) Proteini bulunan viruslarda (paramyxoviruslar, vs) bu spesifik protein hücre membranı ile birleşerek membranda kalır ve nukleokapsid serbest kalarak sitoplasmaya geçer ve buradan replikasyon bölgesine gelir. Diğer zarflı viruslar (orthomyxovirus, togavirus, vs) ise endositozis (viropeksis) ile içeri girer, endosomlar içinde toplanır ve burada zarflarından ayrılan genom serbest kalarak sitoplasmaya geçer.

Helikal nukleokapside sahip viruslarda transkripsiyon, viral RNA henüz zarftan tam ayrılmadan önce başlar. İkosahedral zarfsız reoviruslarında ise, sadece bazı kapsid proteinleri çıkartılır ve serbest kalan viral genom bütün fonksiyonları sürdürür. Hatta, viral genom kapsidten tam ayrılmadığı zaman bile transkripsiyon başlayabilir.

05. Viral Ekspresyon

Viral genomun ekspresyonu başlıca iki önemli aşamada gerçekleşmektedir. Bunlarda, 1) Nukleik asitlerin transkripsiyonu ve 2) Translasyonudur. Ancak, henüz bütün virus familyalarının veya virusların viral ekspresyonlarının ayrıntılı aşamaları tam belirlenmiş değildir.

05.01. Transkripsiyon

Virusların ekspresyonlarının ilk ve önemli aşamasını mRNA (mesenger RNA) sentezi oluşturur (transkripsiyon). Viral genom tarafından spesifiye edilen mRNA'lar, aynı zamanda, sellüler ribosomlarda viral proteinlerin sentezini de (translasyon) programlar. Viral nukleik asitler, virusların strüktürel proteinleri yanı sıra, nukleik asit replikasyonu, gen ekspresyonu, virusun asamblesi, olgunlaşması ve hücrelerden çıkışları için gerekli olan özel ve çok spesyalize olmuş proteinlerin ve enzimlerin sentezlerini de yönetir. Diğer bir ifade ile viruslar, duyarlı hücrelerin sitoplasmalarına girdikten ve etraflarındaki muhafazalardan (kapsid veya zarf) kurtarıldıktan sonra, konakçı hücrenin bütün olanaklarını, kendi üretimi için programlar ve kendi lehine çevirirler. İnfeksiyonun başlangıcında ve infekte hücrelerde, viral mRNA'nın meydana gelmesi, hücre yönetiminin virus tarafından ele geçirildiğini de ifade eder.

05.02. DNA Viruslarında Transkripsiyon

Bazı DNA viruslarında, mRNA, hücreye ait, DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin (transkriptaz) katalitik etkisi ile sentezlenir (transkripsiyon). Poxviridae viruslarında ise viral transkriptaz enzimi kullanılır. Ancak, viral DNA'nın transkripsiyonu, nukleik asitte bulunan bütün genlerin aynı anda ve devamlı olarak ekspresyonunu sağlayacak tarzda proplanmış değildir. Şöyle ki, genomik DNA'da bulunan bazı genler erken ve bir kısmı da geç transkripte

edilirler. DNA virusları, RNA viruslarının aksine, sellüler ayrıştırma mekanizmaları kullanarak, sentezlenen polisistronik RNA'ları monosistronik mRNA molekülleri haline dönüştürebilme kapasitesine sahiptirler.

05.03. RNA Viruslarında Transkripsiyon

RNA Viruslarında transkripsiyon, DNA viruslarından daha komplikedir. Ökaryotik hücreler viral genomik RNA'dan, mRNA sentezi için, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimine sahip olmadıkları için, transkripsiyon da viral genomik RNA'ları kalıp olarak kullanamazlar. Bu nedenle de, RNA virusları (ssRNA ve dsRNA), kendi genomlarında, replikasyonları için gerekli olan enzimlerin kodlarını taşırlar (RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi).

Retroviruslar hariç tutulursa, diğer RNA virusların transkripsiyonları hücre sitoplazmasında gerçekleştirilir.

05.04. Translasyon

Genel anlamı ile translasyon, mRNA'da şifreler halinde bulunan genetik bilgilerin (informasyonların) sitoplasmada ribosomlar üzerinde deşifre edilerek (çözülerek) proteinler haline dönüştürülmesi fenomenidir. Gen ekspresyonunun en önemli bir kısmını oluşturan translasyon komplike bir karakter taşır.

05.05. Erken Proteinler

DNA viruslarında, mRNA'dan erken sentezlenen proteinler arasında, çeşitli aktiviteye sahip enzimler, viral genomun ekspresyonunu regule eden proteinler, sellüler protein sentezini ve sellüler nukleik asit sentezini suprese eden proteinler yer almaktadır.

05.06. Geç Proteinler

Geç viral proteinler, genellikle, hücre infeksiyonun ileri dönemlerinde ve viral replikasyondan sonra, mRNA'ların translasyonlarından elde edilirler. Geç proteinlerin çoğu, yapısal bir karakter taşırlar ve özellikle, regülatör fonksiyona sahip olanları, fazlaca sentezlenirler. Bunlar, erken viral genlerin veya hücre genlerin transkripsiyon ve translasyonlarını regule ederler.

06. Nukleik Asitlerin Replikasyonları (Genom Replikasyonu)

Virusların genom replikasyonları, genel hatları ile, bakterilerinkine benzerse de, viral genomun, DNA veya RNA olması, çift veya tek iplikçikli, segmentli-segmentsiz, lineer-sirküler bir özellik taşıması nedeniyle bazı farklılıklar taşımaktadırlar. Bu durum viruslar arasında değişik stratejilerin meydana gelmesine ve uygulanmasına yol açmıştır.

06.01. DNA Viruslarında Replikasyon

DNA virus familyalarının her birinde ayrı bir replikasyon mekanizması uygulanmaktadır. DNA virusları replikasyonları için gerekli olan proteinleri, enzimleri ve diğer

makromolekülleri, replikasyon başlamadan önce hücre içinde hazır olarak ve yeterince bulmaları gereklidir. Bu proteinler viral ve/veya hücre orijinlidirler. Hücrelerce sağlananlar, ancak hücrelerin belli zamanlarında (S fazı, DNA sentez fazı) gerçekleşmektedir. Bu nedenle de, virusların replikasyon sırasında hücrelerin S fazına bağlılıkları önemlidir. Ancak, bu durum viruslar arasında da değişiklik gösterir. Şöyle ki, küçük viruslardan olan parvovirusları, infekte ettikleri hücrelerin DNA'ları replike olurken, viral DNA'da aynı anda replike olmaya başlar. Bu yüzden, hücrelerin S-fazı bu viruslar için önem taşır. Buna karşın, büyük virusların sellüler fonksiyona ve proteinlerine bağımlılığı daha azdır. Çiçek virusları sitoplasmada replike olduklarından, hücrelerin S-fazına olan gereksinimleri daha sınırlıdır.

06.02. RNA Viruslarında Replikasyon

RNA viruslarının replikasyonlarını tam olarak tanımlamak oldukça güçtür. Viral genomun mRNA (pozitif polariteli RNA veya negatif polariteli RNA) olması, tek iplikcikli çift iplikcikli, segmentli-segmentsiz olmaları bunların replikasyonlarına etkilemekte ve değişik stratejiler kullanmalarına yol açmaktadır. RNA viruslarının replikasyonu, infekte ettiği hücrelerde bulunmayan veya sentezlenmeyen, bu nedenle de viral genom tarafından kodlanan RNA polimeraz enzimi (RNA'ya bağımlı RNA polimeraz, replikaz) tarafından katalize edilerek gerçekleştirilir. Enzim aynı zamanda, viral ekspresyonda da görev yapar (transkriptaz). RNA polimerazın bir özelliği de, primer olmaksızın sentezi başlatabilmesi ve devam ettirmesidir. Ancak, picornaviruslarında genomun 5' -terminal ucuna bağlanmış viral protein (Vgp) yeni iplikçik sentezinde primer oluşturur. RNA hücre içinde çok çabuk ayrıştırıldığı için, RNA polimeraz enzimi, virus zarflarından ayrılır ayrılmaz, hemen viral RNA'nın sentezine başlar. Bu enzim viral RNA'yı kalıp olarak kullanarak buna komplementer RNA sentezler ve bu da viral RNA'nın oluşturulması için kalıp fonksiyonu yapar.

07. Viral Komponentlerin Sentezleri Ve Birleştirilmesi (Asamble)

Hücre içinde virus komponentlerin sentezinden sonra, bunların tam bir olgun veya infeksiyöz virusu oluşturacak tarzda, bir sıra ve düzen içinde bir araya getirilmesi kısa zamanda tamamlanır. Asamblede rol alan ve enerji sağlayan bazı spesifik proteinler bulunmaktadır.

Viral kapsidler boş olarak hücrenin çeşitli yerlerinde sentezlenirler ve bu aşamadan sonra viral genom kapsid içine paketlenirler.

Genetik materyallerin kapsid içine girmesinde özel proteinler fonksiyoneldir.

08. Virusların Olgunlaşması (Maturasyon)

İkosahedral viruslarda, viral genomun önceden hazırlanmış olan boş kapsidin içine girmesi ile olgunlaşma tamamlanmasına karşın, zarflı viruslarda olgunlaşma daha değişik bir tarzda gerçekleştirilir. Özellikle, helikal simetriye sahip olan zarflı viruslar hücre membranlarından

çıkarken tomurcuklanma sırasında membranlardan aldıkları lipid katmandan oluşan bir zarfla kaplanarak olgunlaşırlar.

Herpes virusları hücre çekirdeğinde enkapside olduktan sonra, çekirdekten tomurcuklanma ile çıkarılarken nükleer membrandan da bir kısım olarak sitoplasmaya transfer olur. Virus partikülleri hemen Golgi aparatına gelir. Burada glikoproteinler proses edildikten sonra ekzositozis ile veya hücrelerin lize olması ile de dışarı çıkabilirler.

09. Virusların Hücrelerden Çıkışları (Serbest Kalma)

Hücrede çeşitli tarzlarda olgunlaşan ve enfeksiyöz bir karakter taşıyan zarfsız veya zarflı viruslar (virion) başlıca 3 mekanizma ile dışarı çıkmaktadırlar.

09.01. Hücrelerin Ölmesi (Sitolizis)

İkosahedral simetriye sahip bazı viruslar da üreme hem çabuktur ve hem de hücrelerde ölümler meydana gelir (litik etki, sitolitik etki). Hücrelerin parçalanması ile serbest kalan viruslar hücrelerden dışarı çıkarak başka sağlam hücreleri infekte ederler. Picornaviruslarında, virionun oluşumundan hemen sonra hücrelerde parçalanma meydana gelir. Nukleusda olgunlaşan bazı viruslarda, bir süre çekirdek içinde kalabilir ve çekirdek parçalanınca ekstrasellüler ortama çıkarlar. Herpesvirusları ise hem hücrelerin parçalanması ve/veya ekzositozisle dışarı salınabilirler.

09.02. Tomurcuklanma

Bazı helikal simetrikli viruslarda (paramyxoviruslar orthomyxoviruslar, rhabdoviruslar, arenaviruslar,) hücrelerden tomurcuklanma ile dışarı çıkarlar. Böyle hücreler, genellikle, hücrelerde parçalanma (CPE) oluşturmazlar, hücreler normal yaşamlarına devam ederler ve persistent enfeksiyonlara da yol açabilirler.

09.03. Ekzositozis

Bazı zarflı viruslar (coronavirüsleri, bunyaviruslar, flaviviruslar) ile herpes viruslarında sitoplasmadan çıkış ekzositozis ile olmaktadır. Sitoplasmada serbest halde bulunan viruslar, bazı özel vesiküllere bağlanarak hücre membranına ulaşırlar ve membrandan dışarı ekzositozis ile çıkarlar.

Viruslarda Mutasyonlar ve Rekombinasyonlar

01. Mutasyonlar

01.01. Genel Bilgiler

Viruslar, diğer mikroorganizmalardan daha fazla genetik varyasyonlara açıktırlar ve maruz kalırlar. Bu değişiklikler, genellikle, genetik yapıda oluşan ve fenotipe de etkileyen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadırlar. Viruslar uygun (permissif) canlı sistemlerde

(deneme hayvanları, embriyolu yumurtalar, hücre kültürleri) üreyerek kısa bir süre içinde milyonlarca hatta milyarlarca yeni nesil oluşturabilmektedirler. Gayet doğaldır ki, DNA veya RNA'nın bu kadar fazla replikasyonları sırasında, genetik düzeyde kendiliğinden (doğal veya spontan olarak) bazı değişimler meydana gelmektedir. Bazen de, virusların üretildikleri ortama ilave edilen bir kısım mutajenik maddeler, mutasyonlara yol açarak, böyle değişikliklerin oranını daha da artırmaktadır. Spontan mutasyonların oranı, normal koşullar altında, genellikle, çok sınırlı (10⁻⁶ - 10⁻⁸ arası) olmasına karşın, mutajenik maddelerin katılımı ile bu oran çok yükselmektedir (10⁻³ - 10⁻⁴).

Nukleik asitlerin yapılarını oluşturan bazların sırasında ve türlerinde bir çok tarzda değişiklikler görülebilmektedir. Bunların arasında başlıca,

1) Nukleik asitlerin normal baz sıraları arasından bir baz çiftinin çıkması (delesyon) veya baz sıraları arasına bir baz çiftinin girmesi (insersiyon) sonucunda mutasyonlar ortaya çıkabilirler (çift iplikçikli genoma sahip viruslarda).

2) Baz sıraları arasına bir bazın girmesi veya baz sıralarından bir bazın çıkması sonucunda mutasyonlar görülebilir (tek veya çift iplikçikli genomlarda).

3) Bir baz çiftinin yerini yine aynı türden diğer bir baz çiftinin (transisyonel mutasyonlar) veya farklı türden bir baz çiftinin alması (transversiyonel mutasyonlar) mutasyonlara yol açabilir (çift iplikçikli genoma sahip viruslarda) (nokta mutasyonları).

4) Aynı iplikçik üzerinde yan yana bulunan bazlar arasında kovalent bağlar kurularak ortaya çıkan birleşmeler (genellikle, timin dimerleri arasında oluşan dimerizasyon gibi) mutasyonlara neden olabilmektedir (tek veya çift iplikçikli genomlarda).

5) Tek veya çift iplikçikli genomlarda, değişik tarzlarda (baz-şeker bağlarının kopması, bazlar arası karşılıklı hidrojen bağlarının parçalanması, çapraz bağların kurulması, şeker-fosfat molekülleri arasındaki bağların kopması, ve diğer nedenler) mutasyonlar (hafif veya önemli) ortaya çıkabilmektedir.

01.02. Başlıca Mutant Türleri

Genlerin baz sıralarında veya tripletlerde, çeşitli nedenlerle (spontan, fiziksel, kimyasal ve diğer türden) meydana gelen genotipik değişimler (mutasyonlar), virusun orijinal (doğal) suşlarından farklı özellik taşıyan mutantların ortaya çıkmasına yol açar. Bunlar arasında en önemli olan mutantlar aşağıda belirtilmiştir.

1) Özel koşullara bağlı letal mutantlar: Bazı şartlara bağımlı olarak ortaya çıkan bu tür mutantlar, nonpermissif (uygun olmayan) koşullarda infeksiyöz bir karakter taşımazlar. Ancak bazı özel uygun şartlarda (permissif koşullar) infeksiyöz projeniler (nesiller) meydana getirmektedirler. Bu karaktere sahip mutantlar da başlıca iki kategoride incelenmektedirler.

a) Isıya duyarlı (temperatür sensitif, Ts) mutantlar: Hayvan virusları arasında çok sık rastlanılan bu tür mutantlar, düşük ısıda üremelerine karşın yüksek ısıda üreyememektedirler. Böyle mutantların kodladıkları proteinler veya polipeptidler ancak düşük ısıda (30-31°C) aktivite göstermekte, buna karşın daha yüksek ısılarda (37-38°C) etkinlikleri olmamakta ve inaktif duruma gelmektedirler. Çünkü, yüksek ısı proteinlerin quarterner yapısını bozmakta ve böylece aktivitesine olumsuz etkilemektedir. Viral genomda oluşan nokta mutasyonlar, hücre içinde oluşturulan polipeptidlerde normal sırasında olmayan amino asitlerin yer alması ve bunların da farklı karaktere (düşük ısıda aktivasyon göstermesi gibi) sahip olmasına yol açmaktadır.

b) Konağa bağımlı mutantlar: Böyle özellikteki mutantlar ancak bir tür hücrede üreyebilir ve bunlarda plaklar oluşturabilirler. Buna karşın bazıları da diğer bir türü tercih ederler. Poxviruslarında rastlanan p-mutantları ve adenoviruslarda saptanan kb-mutantları böyle özellik taşırlar.

2) Defektif mutantlar: Viral replikasyonları için önemli olan bir veya bir kaç fonksiyonel geni bulunmayan viruslar, genellikle, bu tanımla belirtilmektedirler. Böyle virusların duyarlı hücrelerde üreyebilmeleri için, normal yardımcı (helper) viruslarının sağladığı ve fakat, defektiflerin gen noksanlığı nedeniyle kendilerinin kodlayamadığı proteinlere gereksinimleri vardır. Diğer bir ifade ile defektif viruslar, yalnız olarak, permisif hücrelerde üreyemezler ve olgunlaşamazlar. Kendilerinde olmayan ve fakat, normal viruslarca kodlanan gen ürünü proteinlere bağımlıdır. Böyle durumlara delesyon mutantlarında fazlaca rastlanılmaktadır. Örn, defektif bir karakter gösteren parvovirusların üreyebilmeleri için, hücrelerde normal (helper) adenoviruslarının da bulunması gereklidir.

Bazı durumlarda virusların üremeleri, hücrel orijinli proteinlerin azlığından (yetersizliğinden), aktivite noksanlığından veya yokluğundan da kaynaklanabilir.

Laboratuvarlarda fazla pasajı yapılan viruslarda defektif viral partikül sayısında artmalar gözlemlenmektedir. Bunlar, ayrıca, homolog virusların da üremelerini önleyebilmektedirler. Böyle mutantların, çoğu zaman infeksiyöz yetenekleri de bulunmamaktadır. Ayrıca her hücre pasajında, infeksiyöz titrede azalmalar da saptanır. Normal homolog virusların üremelerini inhibe eden böyle mutant viruslara "defektif interfere edici viruslar" adı verilmektedir. Bu tür mutant virus partiküllerine RNA virusları arasında fazlaca rastlanılmakta ve bunlar, aynı zamanda, persistent infeksiyonların ortaya çıkmasında ve devamında da etkili olabileceği açıklanmaktadır.

Eğer virusların üretilmeleri için kullanılacak inokulumlar yüksek sulandırmalardan hazırlanırsa (10⁻⁵ veya 10⁻⁶ gibi) defektif virus sayısında ve hücrelerde birikmelerinde azalmalar meydana gelir.

Defektif virusların kapsidleri normal görünümde olmasına karşın genomlarında bir veya birkaç gen noktasıdır. Halbuki, pseudoviruslarda ise, kapsid normal olmasına karşın, virionda, viral genom yanı sıra konakçı hücre DNA'sından da küçük bir segment bulunmaktadır. Bu nedenle de her ikisi de infeksiyöz yeteneğe sahip değildirler. Ancak, pseudoviruslarda, genomun hepsi hücre orijinli değildir.

Defektif viruslara, influenza virusları, adenovirusları, papova virusları ve diğer viruslar arasında rastlanılmaktadır.

3) Sıcak mutantlar: Bu tür mutant viruslar, doğal (orijinal) virusların ürettiği ısı limitlerinin daha üstündeki derecelerde (40-41°C) çoğalmaktadırlar. Böyle mutantlar, vücut ısıları (ateşi) yükselmiş hastalarda kolayca üreyebilmekte ve infeksiyonlara yol açabilmektedirler.

4) Plak mutantları: Aynı virus türlerinde, spontan veya çeşitli faktörlerle oluşturulan mutasyonlar sonunda, plak formasyonlarında da bazı morfolojik değişiklikler de meydana gelmektedir. Böyle mutantlar genellikle delesyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadırlar. Aynı tür içinde heterolog plakların görülmesi antijenik ve patojenik karakterlerindeki değişimlerden kaynaklanmaktadır. Plak pürifikasyonları ile saf virus partikülleri elde edilebilir.

5) İlaçlara dirençli mutantlar: Bazı ilaçlara direnç gösteren mutantlara viruslar arasında tesadüf edilmektedir. Örn, poliovirus mutantının guanidine ve bazı herpes virus mutantları da fosfoasetik asite direnç gösterdikleri belirtilmiştir. Bunlara karşın, polioviruslarında ve vaccinia viruslarında guanidine bağımlı suşların varlığı açıklanmıştır.

Viruslar arasında bazı fiziksel ve kimyasal maddelere (formol, vs) dirençli nesillerin meydana geldiği de bildirilmiştir.

02. Rekombinasyonlar

02.01. Genel Bilgiler

İn vivo veya in vitro (hücre kültürlerinde) üreyen virusların arasında veya viruslarla içinde üredikleri hücre DNA'sı arasında oluşan genetik interaksiyonlar sonunda karşılıklı genetik materyal değişimi (intramoleküler genetik değişim), genellikle, rekombinasyon olarak tanımlanmaktadır. Bu olgu sonunda da yeni genetik karakterlerde hibrid virus suşları oluşmaktadır. Bu suşlar, doğal viruslardan bazı yönleri ile farklı oldukları gibi kendisini oluşturan her iki virusa ait genetik materyallere de sahiptirler.

1) İntramoleküler rekombinasyonlar: Bir hücre, genetik olarak birbirine yakın iki virusla koinfekte edildiğinde (örn, HSV-1 ve HSV-2 virusları gibi) viral nükleik asitlerinin sentezleri sırasında karşılıklı gen alış-verişi meydana gelmekte ve oluşan yeni hibrid suşlar, hem tip-1 ve hem de tip-2 HSV'larına ait genetik materyallere sahip olmaktadır (intertipik rekombinant viruslar). Diğer DNA viruslarında da (SV-40 ile adenoviruslar) benzer rekombinasyonlar ortaya çıkmaktadır.

2) Genetik reassortment: Bu olgu daha ziyade segmentli viruslar arasında görülmektedir. Aynı hücre, genetik olarak birbirine çok yakın iki virus tarafından koinfekte edildiğinde bu iki virusa ait bazı segmentler arasında karşılıklı değişimler (segment değişimi) olmaktadır. Bu fenomen sonunda da hibrid virus partikülleri meydana gelir.

3) Genetik reaktivasyon: Bir hücre, farklı genlerinde defekt bulunan ve birbirine genetik çok yakın (akraba) iki inaktif virus tarafından infekte edildiğinde, hücre içinde infeksiyöz virus partiküllerinin oluşmasına multiplisite reaktivasyonu adı verilir. Böyle olgular UV-ışınları ile inaktive edilen viruslarda daha iyi gözlenmektedirler. Kimyasal maddeler de benzer tarzda etkili olabilmektedir.

4) Eğer bir hücre biri aktif ve diğeri de inaktif birbirine genetik yakın olan iki virus tarafından infekte edilirse, aralarında, hücre içinde gen alışverişi olabilmektedir (kros reaktivasyon, Marker rescue). Bu olguda, inaktif virusun genom porsiyonu, aktif virusunun genomuna rekombine olmaktadır. Böylece ortaya çıkan yeni projeniler, genomlarında inaktif virusa ait özel markerleri taşırlar.

02.02. Viral Gen Ürünleri Arasında İnteraksiyonlar

Viruslar arasında genetik olmayan bu tarz interaksiyonlar bir kaç şekilde ortaya çıkmaktadır.

1) Komplementasyon: Her biri yalnız olarak hücrelerde üremeyen iki mutant virus aynı hücreyi infekte ettiklerinde birinin replikasyonu için gerekli olan proteinin diğeri kodlayarak her ikisi birlikte aynı hücrede üreyebilirler.

2) Fenotipik karışım: Bir hücrenin miks infeksiyonu sonu, bir virusa ait genetik materyalin tümü, diğeri virusa ait kapsid veya zarfın içine girebilir (transkapsidasyon). Bazen de, bir virusun kapsid veya zarf materyalleri, diğeri virusa ait kapsid veya zarf proteinleri arasında bulunabilirler (fenotipik karışım). Bu son durumda, viral genom etrafında her iki virusa ait proteinden meydana gelen kapsid yer alır.

3) Poliploidi ve heteroploidi (genotipik karışım): Virusların hücrelerde replikasyonları sırasında bazen aynı zarf veya kapsid içinde birden fazla aynı virusun genetik materyali (poliploidi) veya bir kapsid veya zarf içinde değişik viruslara ait genetik materyaller

bulunabilirler (heteroploidi). Bu tarzdaki olgulara, daha ziyade, hücrelerden tomurcuklanma ile çıkan viruslarda (paramyxoviruslar ve diğerleri) görülmektedir.

Gen Klonlaması (Moleküler Klonlama)

01. Genel Bilgiler

Rekombinant DNA teknolojisinin başlıca uygulama yöntemleri arasında gen klonlamasının önemi ve yeri çok fazladır. Hatta, esasını oluşturur. Gen klonlaması, basit olarak, bir genin identik kopyalarının elde edilmesi veya bir bireyden orijin alan identik projeni gruplarının oluşturulması olarak tanımlanabilir. Bir tek bakterinin uygun katı besi yerinde üreyerek milyonlarca identik nesil oluşturması ve gözle görülebilecek koloni meydana getirmesi de buna örnek verilebilir. Ancak bu tanım, bugün biyoteknolojide, aşağıdaki tarzda uygulamaya konulmaktadır. Önemli bir ürünün (veya proteinin) sentezini kodlayan genin ait olduğu hücre (prokaryotik veya ökaryotik) genomundan (veya kromozomundan) özel yöntemlerle (genellikle, restriksiyon endonukleaz enzimleri ile) kesilerek çıkarılması, bunun bir taşıyıcı (vektör) DNA'sı ile birleştirilerek alıcı bir hücreye (prokaryotik veya ökaryotik) transfer edilmesi, bu alıcı hücrede genin ekspresyonunun sağlanmasıdır. Yukarıda kısaca tarif edilen klonlamanın olumlu sonuç verebilmesi, konu üzerinde çalışanların bilgi, becerisi ve kullanılan yöntemlere bağlıdır. Birçok aşamalardan oluşan teknoloji, bu basamakların uyumlu işbirliği ile gerçekleştirilir.

Gen klonlamasında önemli olan aşamalar kısaca şöyledir (genel prensipler).

- 1) Gen taşıyan DNA'nın (veya RNA) saf olarak elde edilmesi,
- 2) Genin yerinin belirlenmesi,
- 3) Genin çıkarılması,
- 4) Taşıyıcı (vektör) DNA'nın elde edilmesi,
- 5) Gen DNA'sının vektör DNA'sı ile birleştirilmesi,
- 6) Oluşan rekombinant vektör DNA'nın alıcı hücreye aktarılması,
- 7) Seleksiyon,
- 8) Gen ürününün kontrol edilmesi.

02. Gen taşıyan DNA (veya RNA)'nın Elde Edilmesi

Klonlamanın ilk ve önemli aşamasını oluşturan bu kısımda, istenilen ürünün iyi tarzda sentezini kodlayan geni içeren prokaryotik (veya ökaryotik) hücre genomunun (DNA veya RNA) saf ve bol olarak elde edilmesi yer almaktadır. Ayrıca, gen bankalarından da yararlanılabilir.

03. Genin Yerinin Belirlenmesi

Her ne kadar genin yerinin belirlenmesi mümkünse de, klonlamada genellikle, istenilen geni taşıyan DNA'nın (veya kısa segmentlerinin) saf bir süspansiyonunun hazırlanması, amacı gerçekleştirmede yeterli olabilmektedir.

04. Genin Çıkarılması

DNA'larında istenen geni taşıyan bakteriler üretildikten ve DNA'ları çıkarıldıktan sonra saflaştırılır ve bir süspansiyon elde edilir. Bu DNA süspansiyonu bir (veya gerekirse iki) restriksiyon endonukleaz ile muamele edilerek DNA'lar değişik boylarda olmak üzere çok sayıda segmente bölünür. Doğaldır ki bu kadar çok sayıda segment (genomik DNA fragmenti) arasında istenilen (hedef) geni taşıyan sayısız sekans bulunacaktır. Elde edilen DNA fragmentleri, ayrı ayrı uygun vektörle bağlandıktan sonra klonlanır. Agar üzerinde oluşan koloniler, istenilen gen (hedef gen) yönünden teker teker incelenirler.

05. Vektör DNA'nın Elde Edilmesi

Yukarıda açıklandığı tarzda hazırlanan genomik DNA segmentleri ile vektör DNA'sı birleşecek duruma getirilir. Diğer bir ifade ile her iki DNA uçlarında karşılıklı birleşmeye elverişli yapışkan uçlar sağlanır. Eğer genomik DNA'da Hind III kullanılmışsa, vektör DNA'da da aynı RE, yani Hind III, kullanılmalıdır.

06. Gen DNA'sının Vektör DNA'sı ile Birleştirilmesi

Yukarıda belirtildiği tarzda ve saf olarak hazırlanan genomik DNA segmentleri ile vektör DNA (eğer plasmid ise) 37°C - 40°C'de birlikte 3-5 dakika inkubasyona bırakılır. Böylece, karşılıklı yapışkan uçların birleşmesi sağlanır. Yapışkan uçları birbirine bağlamada, ortama, DNA ligaz enzimi de ilave edilir ve birleşme sağlanırlar. DNA ligaz enzimi bu işlevini, DNA'nın bir ucundaki 5'-P ile diğer DNA'nın 3'OH ucu arasında fosfodiester bağları kurarak gerçekleştirir.

07. Rekombinant Plasmid DNA'sının Alıcı Hücreye Aktarılması

Vektör olarak plasmidlerin (pBR322, pUC, vs.) kullanıldığı durumlarda alıcı hücre olarak ta bu plasmidlerin ait olduğu uygun konakçı *E. coli* (veya eğer plasmid bir basile ait ise, alıcı hücre de, uygun bir basil olmalıdır. Örn., pUB110 plasmidi *B. subtilis* 'e aittir), seçilerek kullanılır.

Vektör ve genomik DNA segmentleri birleşmesinden oluşan konjugat, yeteri miktarda konakçı *E. coli* ile birlikte bulundurulduktan sonra, içinde uygun bir sıvı besi yeri ve Ca²⁺ iyonları bulunan erlenmayere transfer edilirler. *E. coli* 60-90 dakika kadar 37°C'de üretilir. Ortama katılan CaCl₂ *E. coli* 'nin yüzeyini, sirküler plasmid DNA'sı için geçirgen hale getirir ve rekombinant plasmid kolayca bakteriye transfekte olur (transfeksiyon).

08. İstenilen Geni Taşıyan *E. coli* 'lerin Seçimi (Seleksiyon)

İstenilen geni taşıyan plasmidli *E. coli* kolonilerini diğerlerinden ayırmak, gen aktarma tekniğinin en önemli bir aşamasını oluşturur. Bunu sağlamak için,

- 1) Koloni seleksiyonu: Sıvı ortamda üretilen Saf *E. coli* kültüründen içinde amp ve tet içeren yarı katı besi yerlerine ayrı ayrı ekilir ve üretilirler.
- 2) Koloni hibridizasyonu: Tetrasiklinli ortamda üremeyip te ampisilinli besi yerinde üreyen kolonilerden saf kültür yapıldıktan sonra, kültürden bir agarın yüzeyinde düzgün ve uygun aralıklarla nokta tarzında ekimleri yapılır. Uygun bir ısı ve süre inkubasyona bırakıldıktan sonra, kolonilerin iyi gelişmesi sağlanır.
- 3) Dot blot hibridizasyonu: Bakterilerde plasmidin aranmasında, işaretli proplar kullanılarak dot blot hibridizasyon yönteminden yararlanılabilir.
- 4) İstenilen geni taşıyan plasmidin saptanmasında plasmid DNA profil testi kullanılabilir.
- 5) İmmunolojik yöntemle saptama: Bakteriye yeni aktarılan genin ekspresyonu sonucu sentezlenen gen ürünü protein (antijen) immunolojik yöntemlerle ortaya konulabilir.

09.Gen Ürününün Kontrolü

Bakteri içinde, veya aynı zamanda dışa salgılandığı durumlarda filtratlardan, gen ürünü saptandığı hallerde aktivite, saflık, zararsızlık, yan etkileri vs., etkinliklerinin dikkatlice incelenmesi gerekmektedir. Bakteri içinde veya filtratlarda bulunan gen ürünleri, bakterilere ait endo- ve ekzo proteinlerle, toksin veya toksik substanslarla, enzimlerle, metabolitlerle, vs. yabancı ve zararlı maddelerle kontamine olabilirler. Bu nedenle gen ürününün bunlardan ayrılması ve saf olarak elde edilmesi (pürifikasyon) gereklidir. Bunun ilk aşamasını klonlamada kullanılan mikroorganizmaların iyi seçilmesi oluşturur. Ayrıca, bakteri içinde bulunan endoenzimler ve dışa salgılanan ekzoenzimler (hidrolitik enzimler) sentezlenen gen ürünü proteinini hidrolize ederek ayrıştırabilir ve etkinliğini bozabilirler. Bazen de gen ürünü, bakteri için toksik olabilir.

Klonlamada Kullanılan Başlıca Vektörler

01. Genel Bilgiler

Mikroorganizmalar arasında gen klonlamasında bir çok aracı molekülden (vektör) yararlanılmaktadır. Bunların amaca yönelik ve bilinçli olarak seçilmesi ve kullanılması gereklidir. Özellikle, restriksiyon haritalarının, baz sıralarının, gen fonksiyonlarının, hücre içi replikasyon mekanizmalarının, spesifik markerlerinin, vs. diğer özelliklerinin çok iyi bilinmesi ve tanınması klonlamanın başarısı için ilk adımı oluşturmaktadır.

Gen klonlamasında başlıca 4 temel vektörden yararlanılmaktadır. Bunlar da,

- 1) Plasmid vektörler,
- 2) Faj vektörler,
- 3) Viral vektörler,
- 4) Bakteriyel vektörler.

02. Plasmid Vektörler

Bazı prokaryotik (bakteriler) ve ökaryotik organizmalarda (maya, filamentöz mantar, mavi algler, vs.), hücrenin büyük kromozomundan ayrı olarak sitoplazma içinde ya serbest olarak (plasmid) veya hücre kromozomu ile birleşmiş halde (episom), DNA karakterinde ekstrakromozomal genetik elementler bulunmaktadır. Doğal olarak bulunabilen bu tür plasmidlere, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. botulinum*, vs. sıkça rastlanılmakta ve bunların bazıları da virulensle çok ilişkili bulunmaktadırlar. Mayalardan, *S. cerevisiae* 'de de böyle plasmidlere (2 µ DNA plasmidi) tesadüf edilmiştir. Doğal olarak bulunan bu plasmidlerden gen aktarımında pek fazla yararlanılamamakta, bunların yerine in vitro koşullarda ve amaca göre hazırlanan suni plasmidler tercih edilmektedirler.

02.01. Normal Plasmid Vektörler

Bu tür plasmid vektörlerde sadece rezistenslik veya diğer genler (ampr, tetr, lac+, vs.) ile replikasyon orijinleri vardır. Basit bir restriksiyon haritasına sahiptirler. Yabancı gen DNA segmenti, rezistenslik genlerinden biri içine aktarılarak inaktive edilir ve diğer gen, koloni seleksiyonu için, sağlam olarak bırakılır.

02.02. Ekspresyon ve Ekskresyon Vektörler

Yabancı gen DNA'sının alıcı hücrede (Örn., *E. coli* 'de) etkin bir tarzda ekspresyonunu sağlamak için bakterinin replikasyon mekanizması tarafından kolayca tanınabilen ve alıcı bakteriye ait kuvvetli bir prokaryotik promotorlardan (DNA'nın üzerinde bulunan ve RNA polimeraz enziminin bağlandığı ve transkripsiyonun başladığı bölge) biri yabancı gen DNA'sının 5'- ucuna bağlanarak plasmide eklenir ve böyle hazırlanan vektör plasmid, alıcı hücre tarafından kolayca algılanarak ekspresyon şansı, normal plasmid vektörlere oranla, çok artmış bir duruma getirilir. En fazla kullanılan promotorlar arasında, tryptophan promotoru, beta galactosidase vs. sayılabilir. Bu tarzda oluşturulan plasmidlere ekspresyon plasmidleri adı verilir.

02.03. Mekik (shuttle) Plasmid Vektörler

Yukarıdaki tarzda dizaynı yapılarak kullanılan plasmid vektörler (normal veya ekspresyon vektörleri) sadece bir tür alıcı hücrede veya konakçıda replike olabilir ve taşıdıkları gen eksprese edilebilir. Bunun dışındaki hücrelerde (ökaryotiklerde) replike olamazlar. Çünkü, bu

son alıcı hücelere ait RO'ya ve promotora sahip değildirler. Eğer, prokaryotik promotor taşıyan ekspresyon vektörlerine, ökaryotiklere ait bir promotor da ilave edilirse, bu tarzda hazırlanan vektör hem prokaryotik ve hem de ökaryotik mikroorganizmalarda replike olabilir.

02.04. Plasmid Tabanlı Ökaryotik Vektörler

Bu tür vektörler, genellikle, ökaryotik hücelere (memeli, kanatlı hücreleri) yabancı genlerin aktarılması ve ekspresyonu için geliştirilmiş vektörlerdir. Bu nedenle de, yabancı gene birleştirilmiş olan plasmide, kuvvetli viral promotor ve regülatör (terminasyon) sekanslar da ilave edilerek COS hücelere transfekte edilirler. Eğer istenirse, önce, yabancı gen taşıyan plasmid bir bakteriye aktarılarak genin fazlaca üretimi sağlanabilir. Ökaryotik hücreye transfekte edilen vektördeki genin ekspresyonu sağlanır.

03. Faj Vektörler

Gen transferlerinde, aracı diğer bir molekül olarak, çeşitli faj DNA'larından da yararlanılmıştır. Bakteriyofajlar, genel anlamda, bakterilerde üreyen ve lizis oluşturan bakteri viruslarıdır. Bir çok bakterinin kendilerine özgü fajları vardır ve bunlar, bakterilerin identifikasyonlarına ve teşhislerine de büyük katkıda bulunurlar.

03.01. Lambda Fajı

Gen transferi amacı ile lambda fajı (çift iplikcikli, lineer, yaklaşık 50 kbp uzunlukta, 31 x 10⁶ dalton molekül ağırlığında) başarı ile denenmiştir. Faj DNA'sının her iki ucunda (5'-uçlarında) 12 bazlık ve birbirinin komplementeri olan nukleotidler lokalize olmuşlardır (yapışkan uçlar, cohesive ends, cos).

03.02. M13 Fajı

Tek iplikcikli filamentöz fajlardan olan *E. coli* M13 fajı, lambda fajı kadar olmasa bile, yabancı genlerin aktarılmasında denenmiştir. M13 fajı, *E. coli*'nin seks pilusuna yapışır ve yaklaşık 6.8 kb uzunluktadır. M13 fajı bakteri içine girince, kendine ait olan tek iplikcik DNA, bakterinin replikasyon mekanizması tarafından buna ikinci bir cDNA sentezlenerek, çift iplikcikli hale dönüştürülür. Böylece sirküler ve çift iplikcikli replikatif formlar (RF) meydana gelir. Bu RF'ler rolling circle tarzında bir replikasyon gösterirler. M13 fajının bir *E. coli* içinde yaklaşık 100-200 kopyası bulunabilir. Belli bir üreme döneminden sonra, tek iplikcikli faj DNA'sı oluşmaya başlar ve bunlar faj başlığı içine girerler.

03.03. Kosmid (cosmid) Vektörler

Kosmid vektörler, bir bakteriye ait ve replikasyon orijin bölgesine sahip plasmidle, buna birleştirilmiş lambda fajı yapışkan ucundan (cos, cohesive ends) oluşturulmuşlardır. Bazı kosmidlerde tek bir cos bulunmasına karşın, iki bölge veya mekik kosmidler meydana getirmek de olanak dahilindedir.

04. Viral Vektörler

Viral vektörler, daha ziyade, prokaryotik ve/veya ökaryotik genlerin hücrelere (memeli, kanatlı, vs.) aktarılması ve genlerin ekspresyonları için, çok uygundur. Ökaryotik hücrelerde üredikleri için de böyle vektörlere, ökaryotik viral vektörler adı da verilmektedir. Viral infeksiyonlara karşı etkin aşıların hazırlanmasında da son yıllarda, viral vektörler oldukça önem kazanmıştır.

DNA Baz Sıralarının Saptanması

01. Genel Bilgiler

Prokaryotik organizmaların (bakteri), faj, virus ve plasmidlerin DNA'larında bulunan nukleotid sekanslarının belirlenmesinde başlıca iki klasik yöntem önderlik etmiştir. Bunlardan biri, Frederick Sanger (1975) tarafından geliştirilen ve dideoksinukleotid olarak adlandırılan tekniktir (enzimik metod). Bu metotla, Sanger, küçük DNA fajlarından olan øX174 fajının 5386 baz çiftinden (bp) oluşan genomunun nukleotid sıralarını saptamıştır (sequencing).

Baz sıralarını saptamada diğer bir metod da A.M.Maxam ve W.Gilbert'e (1977) aittir (kimyasal metod). Bu araştırmacılar da SV40 virusunun baz sekanslarını belirlemişlerdir (5226 bp). Greg Sutcliffe (1979), Gilbert'in laboratuvarında aynı tekniği uygulayarak pBR322 plasmidinin baz sıralarını tespit etmiştir (4362 bp).

Artık, bu gün, DNA baz sıralarının saptanması, geliştirilen yeni aletler yardımıyla otomatik olarak kolay, doğru ve kısa bir süre için de (bir günde binlerce baz) yapılabilmektedir (automatic DNA sequencing).

Aşağıdaki bu iki temel yöntemin genel prensipleri hakkında çok kısa bilgi verilmektedir. Ancak, bu iki metotta da sonraları yapılan bazı değişikliklerle yenilikler kazandırılmıştır. Pratikte en fazla enzimik yöntem kullanılmamaktadır.

02. Maxam-Gilbert Yöntemi (Kimyasal Metod)

Aşağıda, kısa bir DNA segmentinin baz sıralarının saptanması örnek olarak verilecektir.

- 1) Baz sıraları saptanması istenen DNA, spesifik restriksiyon endonukleaz (Örn., EcoRI) ile kesilerek değişik boylarda çift iplikçikli DNA fragmentleri elde edilir.
- 2) Bu DNA segmentleri, 3'-uçlarından radyoaktif bir madde olan ³²P ile işaretlenirler.
- 3) Radyoaktif fosforla işaretli olan bu çift iplikçikler çeşitli yöntemlerle (ısı, NaOH, vs.) denatüre edilerek tek iplikçikli hale getirilirler.
- 4) Bu denatüre süspansiyon, 4 eşit kısma ayrılarak tüplere taksim edilirler.
- 5) Tüplerin her birine, çok kontrollü miktar ve süre de spesifik bazları parçalayan bazı kimyasal maddeler (dimetil sulfat, hidrazin, formik asit, piperidin, vs.) katılarak etkilemeleri

sağlanır. Bu maddeler, bir DNA segmentinde sadece bir tür baza etkileyecek tarzda ayarlanmışlardır.

03. Sanger Yöntemi (Enzimik Metod)

Sanger metodunun esasını spesifik zincir terminatörleri olan 4 tür 2,-3-dideoksinukleotidlerin (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) çok kontrollü miktarlarda ve sürelerde kullanılması oluşturmaktadır. Bu maddelerin yapılarında bulunan, deoksiribozlarda 2. ve 3. pozisyonlardaki OH moleküllerindeki oksijenlerin olmaması, sadece H'nin bulunması, sentez sırasında, bu maddelerin sıraya girmesi durumunda, polimerizasyonu durdurmaktadır. Çünkü, bunlar yandaki moleküllerle fosfodiester bağları kuramamaktadırlar.

Nukleik Asitlerin İn Vitro Amplifikasyon Yöntemleri

01.Giriş

Nukleik asitlerin (DNA veya RNA) in vitro amplifikasyonları (sayısal çoğaltılması), patojenlerin ve dolayısıyla da infeksiyonların, tümörlerin, genetik hastalıkların teşhisinde ve adli tıpta, en fazla kullanılan yöntemlerin arasında yer almaktadır.

Amplifikasyon yöntemlerinde, çeşitli organ, doku ve sıvılardan izole edilen genetik materyaller veya sekanslar enzimatik olarak çoğaltılır. Sayısı artırılan genetik ürünler (amplikon), ya homolog işaretli problemler kullanılarak hibridizasyonla, veya elektroforezis ve boyamadan sonra direkt görüntülenerek ortaya konulurlar.

Amplifikasyon teknikleri, katı ortamlarda bakterilerin çoğalarak görülür hale gelmesi (koloni oluşturması) ile özdeşleştirilebildiği gibi, patojenlerin (veya antijenlerin) vücuda girdikten sonra oluşan spesifik antikorların ortaya konmasıyla da benzerlik gösterir. Şöyle ki, vücutta, çok az miktarda antikor bulunabilir bunlar bazı özel immunolojik testlerle (ELİSA, İFA, RİA, vs.) belirlenebilirler, aynen vücutta çok az sayıda genetik materyallerin amplifikasyon yöntemleriyle saptanabilmesi gibi. Ayrıca, vücutta hiç bir hastalık oluşturmadan veya antikor sentezini uyarmadan bulunabilen fakat başka bireyler için patojenik olabilen mikroorganizmaları, latent, gizli, kronik infeksiyonları, portör, rezervuar ve nesli tükenmiş hayvanları saptamada amplifikasyon teknikleri daha güvenilir ve çabuk sonuçlar vermekte ve epidemiyolojik çalışmalara büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Ancak, genetik materyallerin, vücutta immun responsun meydana gelmesinden veya tedaviden sonra ne kadar süre sonraya kadar kalabildiği ve teşhis için işe yarayabileceği henüz tam belirlenmiş değildir. Ancak, şunu da belirtmek gerekir ki, donmuş fosillerden elde edilebilen genetik materyaller amplifikasyonda kullanılabilmekte ve genetik materyaller uzun yıllar bozulmadan kalabilmektedirler.

Amplifikasyon yöntemlerinin çabuk, güvenli, sensitif ve spesifik olmaları, kandaki antikorlardan, materyallerin eskiliğinden, etkenlerin vücutta çok az sayıda veya inaktif olmalarından etkilenmemeleri nedeniyle, izolasyonları, üretilmeleri veya identifikasyonları çok zor olan bakteriyel ve viral ajanların belirlenmesinde büyük yararlar sağlamaktadır. Bu teknikler, ayrıca, zamandan ve personelden büyük tasarruf sağlamasına, personel hatalarını ve laboratuvar infeksiyonlarını minimal düzeye indirmesine karşın, halâ, pahalı, deneyimli ve bilgili personele, gelişmiş malzemeye, saf kimyasal maddelere, işaretli problara, enzimlere, spesifik primerlere vs. gereksinim vardır. Aynı zamanda, vücutta, herhangi bir infeksiyon oluşturmeyen mikroorganizmalar (apatojenik, kontaminantlar, vs.) kros reaktif olarak tespit edilebilmekte, sonuca ve yorumlamaya ters yende etkilemektedirler. Laboratuvarlarda aseptik ve/veya steril koşullara uyulmadığı durumlarda kontaminasyonlar (amplifiye olmuş DNA sekansları ile) fazla olmakta ve fazla kullanılan pipet, solüsyon, reagent, kimyasal vs. de bulaşmalar görülmektedir. Bunlar da, işaretli problar, veya primerler aracılığı ile amplifiye olmaktadır. Bunların yanı sıra, serolojik, kültürel, klinik, biyopsi ve otopsi bulguları negatif olan bir olguda sadece amplifikasyon yöntemleriyle alınan pozitif reaksiyonun değerlendirilmesi veya yorumlanması da oldukça zordur.

Şunu da unutmamak gerekir ki, amplifikasyon yöntemleri, hiç bir zaman direkt teşhis metotları değildir. Bunlar tanıya büyük yardımı ve desteği olan çok duyarlı, sensitif, çabuk ve güvenilir testlerdir. Bu üstünlüklerine karşın, amplifikasyon prosedürlerinin, belirtilen bazı dezavantajlarından dolayı, bazı araştırmacılar, diğer kolay ucuz ve duyarlı klasik laboratuvar teknikleri denendikten sonra, şüpheli veya sonuç alınamayan olgularda, kullanılmasının yerinde olacağını bildirmektedirler.

Amplifikasyon yöntemlerini 3 grupta incelemek yerinde olur.

- 1) DNA'nın amplifikasyonu
- 2) Transkripsiyonla amplifikasyon
- 3) Prob moleküllerinin amplifikasyonu

02. DNA Amplifikasyon Teknikleri

Bu teknik, klinik materyallerde bulunan veya izole edilen etkenlere ait DNA'ların veya bazı spesifik sekansların in vitro olarak enzimatik amplifikasyonlarını amaçlar. Pratikte de, bu DNA amplifikasyon yöntemi, diğerlerine oranla daha fazla uygulama alanı bulmuştur. RNA karakterindeki genomik materyaller de önce, revers transkriptaz (RT) ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilerek amplifikasyonu yapılır.

DNA amplifikasyonunun en yaygın ve önemlisini Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) oluşturmaktadır. Bu nedenle teknik hakkında aşağıda gerekli bilgiler verilmektedir.

03. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR)(Polymerase Chain Reaction, PCR)

Son yıllarda, özellikle, 1980'li yılların başından itibaren, genetik materyaller üzerindeki çalışmalar, nukleik asit karakterizasyonunda, moleküler klonlamada, sekans analizlerinde, rekombinant teknolojisinde ve klinik uygulamalarında nukleik asit tabanlı problemlerden yararlanma olanakları giderek artmıştır. Ayrıca, prokaryotik ve ökaryotiklerin genomlarındaki modifikasyonlar, restriksiyon analizleri ve sistemleri üzerinde de son zamanlarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Saiki ve ark. (1985) tarafından, mevcut yöntemlerin duyarlılıklarının artırılmasından ziyade, DNA veya RNA baz sıralarının sayısal olarak artırılması (amplifikasyon) teknolojisine dayanan ve dolayısıyla de mevcut yöntemlerle analiz edilebilmelerini sağlayan, Polimeraz zincir reaksiyonunu (PZR) geliştirmişlerdir.

03.01. PZR'nin Çalışma Prensipleri

Bir çok disiplinde olduğu gibi, insan ve veteriner hekimlikte de çok büyük yararlar sağlayan PZR'nin çalışma prensibi, oldukça basittir. Özet olarak, izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa zincirli oligonukleotid primerler yardımı ile, enzimatik olarak sayısal çoğaltılması (amplifikasyon) olarak tanımlanabilir. Bu hedef genetik materyal çok az sayıda ve hatta, bir çok veya sayısız diğer veya ilgisiz DNA'lar arasında olsa bile çoğaltılabilir ve homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve kolayca da identifiye edilebilir. Bu ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra, PZR başlıca 3 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar da,

1) Hedef DNA'nın denatürasyonu: Bütün gerekli materyaller çok küçük miktarlarda mikrofuj (Ependorf, vs.) tüplerine konduktan sonra özel bir aletin (Thermal cycler) gözlerine yerleştirilir. Alet otomatik olarak ısıyı 95°C'ye yükselterek bu ısıda hedef DNA'ların denatürasyonu (nukleik asitin iki iplikçığının birbirlerinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi) sağlanır. Bu işlem için, materyalin türüne göre değişmek üzere 3-5 dakika kadar bir süre yeterli olmaktadır.

2) Primerlerin bağlanması: Ayarlanmış olan süre sona erdikten sonra, alet ısıyı, 50-52°C'ye indirerek ortamda bulunan iki tür primerin, her birinin komplementeri olduğu tek iplikçik hedef DNA üzerindeki spesifik sekanslara bağlanması gerçekleştirilir. Şöyle ki, primerlerden biri kendine ait 5'-terminusu ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de, ikinci tek iplikçik DNA'nın, antiparalel olan diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5' → 3') bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması da yaklaşık yine 3-5 dakika kadar devam eder.

3) Polimerizasyon: Bu bağlanma süresi bitince aletin ısısı hemen 70- 72°C'ye çıkararak, tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi, 5' → 3' yönünde olmak üzere,

ortamdaki nukleotidleri kullanarak, primerlerin 3'-terminusuna nukleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Polimerizasyon reaksiyonunda, hedef DNA'nın tek iplikçik sekansları kalıp ödevi görür. Bu süre de yaklaşık 3-5 dakika sürmektedir.

03.02. Polimeraz Enzimleri

Orijinal PZR teknolojisinde, ilk önceleri, *E.coli* 'den izole edilen DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. Bu enzim termolabil olduğundan ısının 95°C'ye çıkarılması halinde, enzim inaktive olmaktadır. Bu dezavantajı gidermek için, her periyotta yeniden enzim katılması zorluğu, ısıya dayanıklı enzimin bulunması gereğini ortaya koymuştur. İlk termostabil DNA polimeraz, *Thermus aquaticus*'dan izole ve pürifiye edilmiştir (110 kD, Taq polimeraz). Bu mikroorganizma Yellow Stone Ulusal Parktaki sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir. Taq polimerazın 95°C'deki yarı ömrü yaklaşık 40 dakikadır. Bunun, 61 kD'luk Stoffel fragmentinin daha yüksek ısıya dayanıklı olduğu açıklanmış ve G + C'lerden zengin bazlara sahip hedef DNA'ların amplifikasyonunda daha etkili olduğu belirtilmiştir. Bu fragment aynı zamanda geniş bir Mg iyon konsantrasyonunda (2-10 mM) aktivite gösterebilmektedir. Böyle bir durum, aynı reaksiyon tüpünde, 2 veya daha fazla farklı (veya değişik) hedef DNA sekanslarını da aynı reaksiyon ortamında amplifikasyonuna olanak sağlamaktadır (multipleks PZR).

03.03. Hedef DNA Kaynakları

PZR için her türlü kaynaktan temin edilen DNA (veya RNA) kullanılabilir. Kan, serum, vücut sıvıları, dokular, organlar, fikse edilmiş dokular, vs. çok fazla yararlanılan materyaller arasındadır. PZR'nin çok duyarlı olması, çok az miktarlardaki örnekler gereksinim duymaktadır. Örn., tek bir saçtan elde edilen hücre(ler)den sağlanan genomik DNA yeterli olabilmektedir. Ayrıca, örneklerden elde edilen DNA'ların da pürifiye edilmelerine gereksinim yoktur. Bu nedenle de hedef örneklerin hazırlanmasında deterjanlar (Nonidet P40, Tween 20 ve/veya Triton X100, vs.) veya Chelating ajanlar hücre membranlarının parçalanmasında kullanılabilirler. Proteinaz K'den de sellüler proteinlerin ayrıştırılmasında yararlanılabilmektedir.

03.04. Primerlerin Seleksiyonu

Sentetik olarak kolayca hazırlanabilen tek iplikçikli spesifik DNA segmentleri olan primerler, kullanılma amaçlarına göre, 15-40 oligonukleotidden oluşmuşlardır. Bunlar, hedef DNA üzerinde kendine komplementer olan baz sıralarını bularak onlara bağlanır ve buradan (3'-OH terminus) DNA sentezinin ilerlemesine basamak teşkil ederler. Primerlerin yapısında, % 50-60 kadar G + C bazların bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına

yardımcı olur. Ayrıca, böyle birleşmeler, yüksek ısıda oluşturulan amplifikasyonda nonspesifik bağlanmaları da azaltır.

03.05. Amplifiye Edilmiş Ürünlerin Saptanması

PZR'dan sonra amplifiye edilmiş ürünlerin ortaya konulması önemli ve yapılması gereken bir işlemdir. Bu amaçla başlıca 4 tür uygulama kullanılmaktadır.

1) Ethidium bromidle bantların boyanması: Reaksiyon tüplerinde bulunan amplifikasyon ürünleri, buradan direkt olarak agarose jel elektroforezise (veya PAGE) tatbik edilir. Bu ortamda, ürünler molekül ağırlıklarına göre bir separasyona tabi tutulurlar. Bu işlem sonunda, jel, Ethidium bromide solusyonuna daldırılarak, oluşan bantlar görülür hale getirilirler. Meydana gelen bantlar, bilinen kontrol bantlarla karşılaştırılarak bir değerlendirme yapılır. Çok basit ve aynı zamanda kolay olmasına karşın bu tekniğin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan biri, boyama tekniğinin sekans spesitesi zayıftır. Çünkü, istenmeyen veya ilgisi olmayan DNA'lar da amplifiye olabileceğinden bunlar bant analizleri ile belirlenememektedirler. Her ne kadar, kontrol setler kullanılsa bile yine de böyle sorunlar ortaya çıkmaktadır.

2) Southern blot analizi: Amplifiye olmuş ürünler, aynen yukarıdaki teknikte olduğu gibi, agarose jel elektroforezis (veya PAGE) tabi tutularak molekül ağırlıklarına göre bir separasyona tabi tutulurlar. Bu aşamadan sonra, agarose jelden katı ortama (nitroselüloz filtre veya naylona) transfer edilirler (elektro transfer). Bu katı ortam üzerinde denatüre ve fikre edildikten sonra, işaretli (32P, biotin, vs.) spesifik problemlerle hibridizasyona tabi tutulur ve sonuçlar otoradyografi veya biotin kullanılmış ise renk indeksine göre değerlendirilirler. Film üzerinde siyah lekelerin (bantlar) bulunması hedef DNA'nın amplifiye olduğunu ortaya koyar. Southern blotting tekniğinin sensitivitesi ve spesifitesi daha yüksektir. Ancak, bu teknoloji de zaman alıcı ve fazla iş gerektirir.

3) Solüsyon hibridizasyon tekniği: Daha az olarak başvurulan bu teknikte, amplifiye edilmiş DNA ürünleri, işaretli problemler uygun NaCl yoğunluğuna sahip bir hibridizasyon solüsyonu içinde bir araya getirilirler. Karışım 95°C'de denatüre edilerek, DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılırlar. Solüsyon, 50-60°C'ye kadar ılıklaştırılarak spesifik problemlerin sekanslara bağlanması sağlanır. Bu karışım, poliakrilamid jel elektroforezis (PAGE) tabi tutularak separe edilir. Jel içerisinde DNA x DNA hibrid molekülleri büyük olduğundan ve yavaş harekete sahip olacaklarından, başlangıçta yer alırken, küçük moleküller (birleşmemiş problemler, tek iplikçik DNA, vs.) daha hızlı hareket ederek karşı uçta lokalize olurlar. Bundan sonraki işlemler aynen Southern blottingde olduğu gibi yürütülür ve değerlendirilir.

4) Diğer teknikler: Amplifiye ürünleri (amplikon) belirlemeye, diğerlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmaya yönelik, bazı teknikler de geliştirilmiş ve denenmiştir.

a) Spesifik problemlerle hibridize olmuş DNA moleküllerinde, polimeraz enziminin 5'®3' yönündeki ekzonukleaz aktivitesi, hibridize olmuş problemleri ayrıştırarak 5'-uçlarında izotop bulunan prob DNA'sının boyutlarında küçülmeler oluşturur ve bunlar da otoradiografi ile ortaya konurlar.

b) Hibridizasyon proteksiyon testi de aynı amaç için denenmiştir. Bunda, ayrıca, dijital okuma sistemleri de bulunmakta ve süre çok kısalmaktadır.

Amplifiye ürünleri saptamada, son yıllarda, nonizotopik problemlerin kullanılması yönünde bir eğilim bulunmaktadır. Biotin veya digoxigeninle işaretlenmiş problemleri hazırlamak daha kolay ve daha uzun süre de kullanma olanağı sağlamaktadır.

03.06. PZR'da Oluşan Hatalar

PZR'in çok yaygın kullanılmasına karşın, reaksiyon sırasında oluşan bazı hatalar negatif veya pozitif yanlış değerlendirmelere neden olabilmektedir. Bunların minimal düzeye indirilmesi araştırmacıların ve laboratuvarlarda çalışan teknik elemanın esas görevleri arasında olmalıdır. Ancak, bunların bir kısmı temiz çalışmaktan kaynaklanmakta, diğer bir bölümü de çalışanların bilgisi dışında oluşmaktadır. Bu hataların neler olabileceğini iyi bilen teknik kadro, böyle olumsuz durumları en az düzeye indirebilir.

Laboratuvarlarda kullanılan bir çok bileşikler PZR'da amplifikasyonu önlemekte veya olumsuz yönde gelişmesine yol açmaktadır. Bunlar arasında deterjanlar, chelating ajanlar (EDTA), proteinazlar, kanser kemoterapötik ajanları, RNA ve EDTA düzeyinin yüksek olması, Heparin, Urasil, fenol kalıntısının bulunması, PZR'nin duyarlılığına olumsuz etkileyen faktörlerin belli başlıları arasındadır. Bunlar, reaksiyon sırasında, DNA veya RNA ile bağlanabilir veya bazlar arasına girerek sonuca olumsuz yönde etkileyebilirler.

Her ne kadar PZR'da ısıya dayanıklı enzimler kullanılmakta ise de, bunların etkinliklerinin, yüksek ısıdaki yarı ömürlerinin çok iyi saptanması ve ondan sonra kullanılmaları şarttır. PZR'in dışında ki, 3SR, TAS vs gibi metotlarda genellikle, termolabil enzimlerden yararlanıldığından bunları kullanmadan önce gözden geçirilmesinde büyük yarar bulunmaktadır.

PZR'da en fazla görülen hataların başında non spesifik DNA'ların (non target DNA'lar) amplifiye olması ve sonuca etkilemesidir. Böyle amplifiye olmuş moleküllerin laboratuvarlarda birikmesi, örnek materyallere, pipetlere, solüsyonlara, kimyasallara, pipet uçlarına, vs. bulaşması istenmeyen olguların meydana gelmesine neden olur. Kontaminasyon problemini minimal düzeye indirebilmek ve bu düzeyde tutabilmek için fiziksel, kimyasal ve

enzimatik kontrollere ve özel önlemlere gereksinim vardır. Şöyle ki, reagentler bir defa kullanılmalı, teknisyenler kontamine olmamış eldivenler takmalı, PZR ve diğer işlemler için (amplifikasyon, örneklerin hazırlanması, amplifiye ürünlerin saptanması, elektroforezis, vs.) ayrı ayrı odaların bulunması, odalar arası çeşitli materyallerin ve solüsyon nakillerinin çok sınırlandırılması veya hiç yapılmaması, gibi önlemler, nonspesifik amplifikasyonları çok azaltır.

Hedef olmayan DNA'ların ampfikasyonunda, iyi seçilmemiş bazlara sahip problemlerin hazırlanmasının ve kullanılmasının da rolü büyük olmaktadır.

Son yıllarda amplifiye edilen ürünlerin sterilizasyonuna yönelik bazı teknikler geliştirilmiş ve başarı ile kullanıldığı açıklanmıştır. Bunlar arasında, dUTP (deoksi urasil trifosfat) ve UDG (urasil DNA glikosilaz) gibi kodlarla belirtilen yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan ayrı olarak da, bazı araştırmacılar negatif kontrol kullanmayı tavsiye etmektedirler. Şöyle ki, reaksiyon sonunda negatif kontrol, pozitif çıkarsa, bütün test ekarte edilir.

03.07. PZR'ın Başlıca Kullanım Alanları

PZR'ın hekimlikte bir çok kullanım alanı bulunmakta ve kontrollü çalışmalarda güvenilir, çabuk, spesifik ve sensitif olması nedeniyle de tercih edilmektedir.

1) Mikrobiyolojik çalışmalarda PZR: Rutin klinik muayenelerde hastalık ajanlarının izolasyon ve identifikasyonları oldukça zaman almakta ve bazen de herhangi bir etken ayrılamamaktadır. Serolojik yoklamalar da, şüpheli veya negatif sonuçlar verdiği gibi yanlış negatif ve pozitif reaksiyonlar da elde edilebilmektedir. Bunun gibi olgularda PZR büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Her ne kadar PZR direkt teşhis yöntemi olmamakla beraber, amplifikasyondan sonra işaretli problemlerin kullanılması veya elektroforezden sonra oluşan kanıtların boyanarak (ethidium bromidle) görüntülenmesi, tanıyı kolay hale getirmektedir. PZR'n başlıca kullanıldığı durumlar aşağıda kısaca belirtilmiştir.

- a) Kültürü yapılması, izolasyonu ve identifikasyonu çok zor veya yapılamayan mikroorganizmaların teşhisinde,
- b) Toksin oluşturan ajanların, saptanması güç olan toksinlerin ortaya konulmasında,
- c) Antimikrobial ilaçlara karşı dirençli olan bakterilerin belirlenmesinde,
- d) Mikroorganizmalar içinde alt tiplerin saptanmasında,
- e) Gıdalarda, sularda ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısında,
- f) Diğer mikrobiyolojik araştırmalarda (moleküler immunoloji ve epidemiyoloji, parazitoloji, bakteriyoloji, viroloji, vs.) PZR'dan büyük yararlar sağlanmaktadır.

2) Adli tıp: DNA fingerprintleri cinayetlerin aydınlatılmasında büyük yardımlar sağlamaktadır. Babalık tayini ve HLA (histokompatibilite antijenleri) testleri PZR ile çok

kolaylaşmış bulunmaktadır. Cinayet olgularında çok az bir kan, çok az saç veya sperma test için yeterli olabilmektedir. Böyle olgularda, PZR güvenilir ve çabuk sonuçlar vermektedir.

3) Genetik bozuklukların belirlenmesinde: Canlılarda genetik karakter gösteren bozuklukların belirlenmesinde de aynı etkinlikte kullanılmaktadır.

04. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) Modifikasyonları

Yukarıda açıklanan ve çok yararlanılan konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonunun bir çok modifikasyonları yapılmıştır. Bunlardan önemli bazılarının çok kısa olarak çalışma mekanizmaları aşağıda bildirilmiştir.

- 1) İners (tersine dönmüş) polimeraz zincir reaksiyonu
- 2) Asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu
- 3) Homopolimerli polimeraz zincir reaksiyonu
- 4) İn situ polimeraz zincir reaksiyonu
- 5) Hot start polimeraz zincir reaksiyonu
- 6) Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu
- 7) Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
- 8) Nested polimeraz zincir reaksiyonu
- 9) RNA'nın amplifikasyonu

04.01. İners (tersine dönmüş) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu teknik, bilinen sekanslara bitişik olarak bulunan ve fakat bilinmeyen bazlara sahip olan DNA segmentlerini amplifiye etmede kullanılır. Bilinmeyen sekanslar, tersine çevrilerek içe alındığı için bu adla tanımlanmaktadır.

- 1) Bilinen sekansın iki ucunda bulunan ve baz sıraları bilinmeyen segmentler belli bir uzaklıktan restriksiyon endonukleaz ile kesilir ve iki tarafta yapışkan uçlar meydana getirilir.
- 2) Bu kesim sonucunda molekül lineer bir forma gelir.
- 3) İki yapışkan uç birleştirilerek molekül sirküler şekle dönüştürülür.
- 4) Ortada bulunan ve bilinen sekanslara sahip olan DNA segmenti, ortasından başka bir restriksiyon endonukleaz ile bölünerek molekül tekrar lineer bir forma getirilir. Bu molekülün iki ucunda bilinen sekanslar bulunmaktadır.
- 5) Bu iki uçta bulunan bilinen sekanslara komplementer olan iki ayrı primer hazırlanarak reaksiyon ortamına katılır. Ayrıca, Taq polimeraz ve polimerizasyon için gerekli olan 4 tür dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) de ilave edilir.
- 6) Geri kalan işlem konvansiyonel PZR'daki prosedüre uyularak devam ettirilir. Böylece, bilinmeyen sekanslara cDNA sentezlenmiş ve bunların baz sıraları da belirlenmiş olur.

04.02. Asimetrik Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hedef DNA'nın sadece bir iplikçiğinin amplifikasyonuna yönelik ve farklı oranda (1:50) primerler kullanılarak yapılan bir polimeraz zincir reaksiyonudur. Asimetrik PZR iki aşamada gerçekleştirilir. Reaksiyonda az sayıda olan primerler kullanıldıktan sonra, çok sayıda olan diğer primerler tek iplikçik DNA zincirinin sentezini başlatır ve çoğaltır.

04.03. Homopolimerli Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu reaksiyon, primer bağlanma bölgesi olarak yalnız bir sekansın bilindiği durumlarda uygulanmaktadır. Bu bilinen bölgeye primerler bağlanırlar. Bu yöntemde, mRNA molekülü revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA) haline dönüştürülür. Elde edilen tek iplik DNA molekülünün 3'-terminusuna poli G'ler bağlanır. Bu uçlara bağlanabilmesi için 5'-terminusunda poli C'ler bulunan primerler hazırlanır ve reaksiyona iştirak ettirilerek tek iplikçik cDNA'ya ikinci bir DNA sentezlenir. Sonra bu iki DNA ayrılarak her birine spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilirler.

04.04. İn Situ Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu tekniğin esasını, morfolojik olarak sağlam hücre ve dokuların DNA'sının amplifikasyonu oluşturur. Bu yöntem, daha ziyade, parafinlenmiş veya arşiv dokuları için geliştirilmiştir. Bir lâm üzerinde tespit edilmiş ve morfolojik olarak sağlam hücre veya doku örnekleri hedef DNA (veya mRNA) kaynağı olarak kullanılır. Lâm üzerine, proteaz solüsyonu ilave edilerek dokulardaki proteinler giderilir ve %0.5 Nonidet P40'la da permeabilitesi artırılır. Sonra üzerine amplifikasyonda gerekli olan komponentler (primerler, 4 tür dNTP, MgCl₂, ve diğer solüsyonlar) konur ve üzerine bir lâmel kapatıldıktan sonra kenarları yapışkan bir madde (veya tırnak cilası) ile sabitleştirilir. Bu aşamadan sonra, lâm alüminyum bir kaba konarak Thermal cyclere yerleştirilir. Ortama 60°C'de Taq polimeraz ve mineral yağ ilave edilerek lâmel hemen kaldırılır. Sonraki işlemler, konvansiyonel PZR da olduğu gibidir.

Amplifiye olmuş ürünlerin spesifik olup olmadıklarını saptamada nonradioaktif maddelerle (biotin, digoxigenin, vs.) işaretli problardan yararlanır.

04.05. Hot Start Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Konvansiyonel PZR yöntemlerinde kullanılan komponentler (hedef DNA, primerler, Taq polimeraz, MgCl₂, dNTP, bufferler, vs.) oda ısısında ve birlikte tüplere konarak aynı anda reaksiyona sokulurlar. Ancak, bu tarzdaki uygulamada, primerler, reaksiyon başlamadan önce oda sıcaklığında Taq polimerazın etkisi altında, hedef DNA dışındaki bazı nonspesifik sekansları da amplifiye etmekte ve böylece yanlış pozitif reaksiyonlara yol açmaktadır. Bazı durumlarda da primer oligomerizasyonu, primer kaybı, nonspesifik amplifikasyonlar, vs. meydana gelebilmektedir. Bu olumsuz durumlara mâni olmak için geliştirilen Hot Start

PZR'da reaksiyona giren maddelerin bir kısmı (primerler, dNTP, MgCl₂, buffer) oda sıcaklığında tüplere konulmakta, sonra bunların üzerine buharlaşma ile madde kaybını önlemek için mineral yağ (manuel sistemde) veya balmumu tableti (otomatik sistemde) eklenmektedir. Geri kalan komponentler (Taq polimeraz, hedef DNA, buffer) de optimal ısı olan 60-80°C arasında reaksiyon tüpüne katılırlar. Bundan sonraki aşamalar konvansiyonel sistemdeki gibidir.

04.06. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu teknik, aynı amplifikasyon reaksiyonunda, farklı hedef DNA sekanslarına yönelik hazırlanan spesifik multiple primer çiftlerinin kullanılması ile gerçekleştirilir. Değişik hedef sekanslarının koamplifikasyonu bir çok amaç için kullanılma olanağı bulunmaktadır. Şöyle ki,

- a) DNA sekanslarının büyük bir bölümü, bunlarda bulunması muhtemel alterasyonlar yönünden incelenebilirler.

- b) Hedef DNA'nın farklı segmentleri araştırılabilir,

- c) Sekansların amplifiye olabilirliğinin internal kontrolleri yapılabilir

- d) Bir numunede bulunan değişik ajanlara ait DNA'lar aynı tüpte aynı anda amplifiye edilebilirler.

Bu test, *S. aureus* ve *C. difficile* 'de denenmiştir.

04.07. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Konvansiyonel PZR, genellikle, kalitatif bir karakter taşır. Diğer bir ifade ile amplifikasyon var veya yok sorusuna cevap verebilmektedir. Halbuki, son yıllarda geliştirilen yeni PZR teknikleri ile amplifiye olan hedef DNA'nın miktarı hakkında da bir bilgi verebilecek düzeye ulaşılmıştır. Bu yöntem, reaksiyona başlangıçta konulan hedef DNA miktarı ile, PZR sonunda saptanan ürünün düzeyi arasındaki lineer korelasyonun bulunup-bulunmadığını ortaya koymaktadır.

04.08. Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İki aşamalı olan bu testte, birinci periyotta, amplifikasyon tek primer çifti ile 15-30 kez tekrarlanır. Oluşan ve sayısal olarak artan ürünler, yeni bir reaksiyon tüpüne transfer edilerek burada, internal sekanslara spesifik sekonder primer çiftleri kullanılarak ikinci bir amplifikasyona tabi tutulur. Bu ikinci defa da 15-30 kez tekrarlanır ve oluşan ürünler jel elektroforezle ortaya konulurlar.

Bu yöntemin avantajları yanı sıra dezavantajları da (özellikle, transfer sırasında meydana gelen kontaminasyonlar, vs.) bulunmaktadır. Bu nedenle iki tüp yerine, tek tüp kullanmak suretiyle kontaminasyon riski minimal düzeye indirilmiştir. Bu tek tüp sisteminde, özellikle, iki tür reaksiyon ısısı kullanılmaktadır (düşük ve yüksek ısı).

Rekombinant Faj Antikor Tekniği (RFAT)

01. Genel Bilgiler

Gerek prokaryotik ve gerekse ökaryotik organizmalara ait değişik proteinleri kodlayan genler, çeşitli vektörler (faj, plasmid, cosmid, fajmid, virus, bakteri, vs.) yardımıyla, mikroorganizmalarda (genellikle, bakterilerde, basillerde, vs.) ve/veya ökaryotik hücrelerde başarı ile klonlanmış ve genlerin ekspresyonu sağlanmışır. Kuşkusuz, bunlar arasında, ökaryotiklere ait immunglobulin genleri de bulunmaktadır. Ancak, bugüne kadar, tam ve fonksiyonel bir İg geni klonlanamamış sadece, ağır zincirin Fc-porsiyonu veya sadece ağır veya hafif zincirlerin bir bölümü klonlanabilmiştir. Çünkü, tam bir immunglobulin geni, tek bir DNA sekansı halinde bulunmayıp ayrı ayrı genlerin reorganizasyonu sonucu oluşabilmektedir. Dolayısıyla de bu genlerin hepsini bir arada elde etmek mümkün olamamaktadır.

02. Rekombinant Faj Antikor Tekniğinin Avantajları

- 1) Rekombinant faj antikorların (RFA) üretimi daha kolaydır. Buna karşın MKA' ın (monoklonal antikorlar) üretimi zaman alıcı ve yorucudur. Spesifik antikor genleri kolaylıkla dalak hücrelerinden elde edilebilir. Bu durum zamandan ve emekten büyük tasarruf sağlar.
- 2) RFA 'lar daha çabuk ve ekonomik olarak üretilebilirler. Çok fazla miktarda faj antikorları, bakteri kültürlerinden bir gecelik inkubasyon sonunda, elde edilebilirler.
- 3) RFA 'larının üretimleri için, deneme hayvanlarına veya çok fazla miktarda hücre kültürlerine gereksinim yoktur. Halbuki, MKA 'ları fazla üretmek için hayvanlardan asites elde edilmesine veya hibridomaların büyük şişelerde hücre kültürlerinin yapılmasına ihtiyaç vardır.
- 4) RFA teknolojisi daha güvenilir ve stabil genetik kaynaklar sağlar. Halbuki, hibridomalarda bazen antikor sentezi azalabilir veya durabilir. Kimi hibridomlar da, çekirdek kaybederek genetik olarak güvensizlik oluşturabilirler.
- 5) Faj antikor genleri üzerinde her türlü genetik manipulasyonlar (sekans analizleri, mutasyonlar, vs.) yapmak olanak dahilindedir.

03. Rekombinant Faj Antikor Tekniğinin Aşamaları

- 1) Antikor sentezleyen hibridomalar veya immunize edilmiş farelerin dalaklarından sağlanan B-hücreleri (veya plazma hücreleri) içinden, immunglobulin molekülünün ağır ve hafif zincirlerine ait mRNA'lar ayrı ayrı izole edilerek pürifikasyona tabi tutulurlar. Antikor kolanlanmasının ilk adımını ve başarısını bu pürifikasyon sağlar. Ayrıca, hibridomaların veya B-hücrelerinin ve antikor sentezleme durumları, klonlamadan önce, iyice kontrolden geçirilmelidir. Pürifikasyon için afinite kromatografi tekniğinden yararlanılabilir.

- 2) Saf olarak elde edilen ağır ve hafif zincirlere ait mRNA' lardan revers transkriptaz enzimi yardımı ile tek iplikçik cDNA 'lar (komplementer DNA) sentezlenirler.
- 3) Her iki cDNA üzerindeki VH ve VL genleri için ayrı ayrı primerler hazırlanarak PCR tekniği ile amplifiye edilirler (30 kez çoğaltılır).
- 4) Amplifiye edilen VH ve VL zincir fragmentleri ayrı ayrı, agarose jel elektroforezise tabi tutularak pürifiye edilirler. Böylece, primerler ve diğer eksternal amplifiye ürünlerden kurtarılmış olurlar. Oluşan bantlar Ethidium bromide ile boyanarak görünür hale getirilir. Amplifiye edilen bantlar, agarose jelden kesilerek çıkarılır ve pürifiye edilirler .
- 5) VH ve VL gen sekansları, DNA linkerleri kullanılarak birleştirilir ve böylece tek iplikçik DNA fragmenti elde edilir. Linker, VH gen sekansının 3'-ucu ile VL gen sekansının 5'-ucu arasını birleştirir.
- 6) Elde edilen bu son molekül (VH + linker + VL), tekrar PCR tekniği ile, oligonukleotid primerler kullanılarak, amplifiye edilir (30 kez). Bundan sonra VH'in 5'-ucunda SfiI için ve LV'nin de serbest ucunda (3') NotI restriksiyon enzimleri için kesim yerleri (spesifik linker) ilave edilir.
- 7) Ortamdaki bağlanmamış, artan linkerleri, dNTP ve Taq polimeraz, vs. gidermek için tekrar bir pürifikasyona tabi tutulur (Spin kolum pürifikasyon).
- 8) Uçlara ilave edilen spesifik linkerler, ayrı ayrı SfiI ve NotI restriksiyon enzimlerin ilavesi ile kesilerek yapışkan uçlar meydana getirilir.
- 9) Antikor tek iplikçik DNA fragmenti (ScFv), fajmid vektör (pCANTAB5) ile birleştirilir. Ancak, bu vektör de önceden SfiI ve NotI'le kesilerek iki tane komplementer yapışkan uç meydana getirilir ve böylece ScFv ile bileşmesi kolaylaştırılır. İki yapışkan ucun birleşmesinde DNA ligazdan yararlanılır.
- 10) Hazırlanmış olan ScFv DNA sekansı ile fajmid kimerik molekülü, kompetent *E.coli* TG1 suşuna transfer edilir ve *E. coli* TG1 suşu, içinde CaCl₂ glikoz ve ampisilin bulunan ortamda 30°C'de inkube edilir (transfer için elektroporasyon tekniği de kullanılabilir). Bu ortamda sadece pCANTAB5 taşıyan *E.coli* TG1'ler ürer. Çünkü, fajmid de ampisilin dirençlilik geni bulunmaktadır.
- 11) Fajmid taşıyan *E.coli* TG1 kolonileri M13K07 helper fajı ile infekte edilir. Bakteriye transfer edilen rekombinant molekül (ScFv-DNA sekansı + pCANTAB5 fajmid) hücre içinde, sentez edilmeye başlar. Bu sırada faj replikasyonu da başlar, tam faj molekülleri oluşarak bakteri hücresinden dışarı çıkarlar. Dışarı çıkan ve içinde ScFv-gen sekansı taşıyan faj partiküllerinin yüzeyindeki g3p proteinine bağlı olarak bir veya birkaç antikor eksprese edilir.

12) Bakteriden dışarı çıkan fajların ucunda antikor molekülünün varlığı, immunolojik yöntemlerle (ELISA, vs) kontrol edilir. Bağlanamayan faj veya antikorlar, sistem yıkanarak, giderilir.

13) Ucunda antikor molekülü taşıyan fajla, *E. coli* TG1 tekrar infekte edilir ve katı ortama ekilir. Koloniler alınarak saf olarak üretilir ve fazla miktarda antikor taşıyan faj partikülleri elde edilir. Fajmid de tek iplikçik M13'e ve çift iplikçikli plasmide ait replikasyon orijini bulunur.