

BİYOKİMYA - I

DERS NOTLARI

Prof. Dr. Halil KORKMAZ
Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ
Doç. Dr. Tevfik ÖZEN
Yrd. Doç. Dr. Aytaç GÜDER

SAMSUN -2015

ÖNSÖZ	1
GİRİŞ	2
1.BÖLÜM: YAŞAMIN MOLEKÜLER ANLAMI	4
1.1. BİYOMOLEKÜLLER.....	10
1.1.1. Canlılardaki elementler ve özellikleri (Biyoelementler).....	10
1.1.2. Canlılar İçin Suyun Önemi.....	12
1.1.3. Canlılardaki Moleküller	14
2.BÖLÜM: HÜCRE	18
2.1. Bütün hücrelerin bazı ortak yapısal özellikleri vardır	18
2.2. PROKARYOTİK HÜCRE YAPISI	20
2.3. ÖKARYOTİK HÜCRE YAPISI.....	22
2.3.1. Ökaryot Hücrenin Kısımları ve Organelleri.....	24
2.3.1.1. Hücre membranı:	24
2.3.1.1.1. Biyolojik Membranın Akışkan–Mozaik Modeli.....	27
2.3.1.1.2. Akışkan Mozaik Modelin Özellikleri.....	29
2.3.1.1.3. Plazma Membranı Taşıyıcılar ve Reseptörler İçerir	29
2.3.1.1.4. Endositoz ve Egzositoz Plazma Membranındaki Trafik Yürütür.....	30
2.3.1.2. Sitoplazma	31
2.3.1.2.1. Endoplazmik retikulum (ER).....	32
2.3.1.2.2. Ribozomlar	33
2.3.1.2.3. Mitokondriler	34
2.3.1.2.4. Golgi organeli (Golgi cisimciği).....	36
2.3.1.2.5. Lizozomlar.....	36
2.3.1.2.6. Peroksizomlar (Mikro cisimleri).....	37
2.3.1.2.7. Sentirol	38
2.3.1.3. Çekirdek (nükleus).....	38
2.4. VİRÜS.....	39
2.5. FOTOSENTETİK HÜCRELER	41
2.5.1. Hücre duvarı (çeperi)	41
2.5.2. Kloroplastlar	42
2.5.3. Vakuoller.....	43
3. BÖLÜM: PROTEİNLER	44
3.1. AMİNOASİTLER	47
3.1.1.Nötral Aminoasitler	51
3.1.2.Bazik Aminoasitler	53
3.1.3.Asidik Aminoasitler.....	54
3.1.4.Sonradan oluşmak suretiyle proteinlerde bulunan aminoasitler.....	54
3.2. AMİNOASİTLERİN ASİT–BAZ ÖZELLİKLERİ	57
3.2.1.Aminoasitlerin Titrasyon Eğrileri Karakteristiktir	58
3.2.2.Aminoasitlerin Işık Absorpsiyonu.....	61
3.2.3.Aminoasitlerin Tanınması.....	61
3.3. AMİNOASİTLERİN ANALİZİ.....	62
3.3.1. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi İle Ayırma.....	62
3.3.2. İyon Değişim Kromatografisi:.....	66

3.3.3. Yüksek Gerilim Elektroforezi İle Ayrırma:.....	68
3.4. AMİNOASİTLERİN KİMYASAL REAKSİYONLARI.....	68
3.4.1. Aminoasitlerin α -Karboksil Gruplarının Reaksiyonları.....	68
3.4.2. Aminoasitlerin α -Amino Gruplarının Reaksiyonları.....	70
3.4.3. Aminoasitlerin Yan Zincirlerinin Reaksiyonları.....	75
3.5. PEPTİD BAĞI VE ÖZELLİKLERİ.....	76
3.6. PROTEİN YAPISININ DÜZEYLERİ.....	77
3.6.1. Primer (birincil) Yapı.....	77
3.6.2. Sekonder (ikincil) Yapı.....	83
3.6.2.1. α -Sarmalı.....	83
3.6.2.2. β -Kırmalı Yapı.....	85
3.6.2.3. Kollagen sarmalı.....	87
3.6.3. Tersiyer (üçüncül) Yapı.....	88
3.6.4. Kuaterner Yapı.....	90
3.7. PROTEİNLERİN SINIFLANDIRILMASI.....	91
3.7.1. Fibröz Proteinler.....	92
3.7.2. Globuler Proteinler.....	92
3.8. PROTEİNLERİN DENATÜRASYONU.....	94
3.9. PROTEİNLERİN ASİT-BAZ ÖZELLİKLERİ.....	95
3.10. PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI.....	97
3.11. PROTEİNLERİN MOLEKÜL AĞIRLIĞI TAYİNİ.....	110
4.BÖLÜM: ENZİMLER.....	115
4.1. ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI.....	115
4.2. ENZİM KOFAKTÖRLERİ.....	120
4.3. ENZİM KİNETİĞİ.....	121
4.3.1. Kataliz Olayı.....	121
4.3.1.1. K_m ve V_{maks} Değerlerinin Önemi.....	127
4.3.1.2. V_{maks} ve K_m Değerlerinin Grafikle Tayini:.....	128
4.3.1.3. Enzim Katalizinin Mekanizması.....	130
4.4. ENZİM AKTİVİTESİ VE MİKTARININ TAYİNİ.....	130
4.4.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler.....	132
4.5. ENZİM İNHİBİSYONU.....	134
4.6. ENZİMLERİN SPESİFİKLİĞİ (ÖZGÜLLÜĞÜ).....	138
4.7. ENZİMLERİN AKTİF BÖLGELERİ.....	139
4.8. MULTİENZİMLER.....	140
4.9. ENZİMATİK REAKSİYONLARIN KONTROLÜ VE DÜZENLENMESİ.....	141
4.10. ENZİM AKTİVİTESİNİN BAŞKA KONTROL MEKANİZMALARI.....	144
5.BÖLÜM: KARBOHİDRATLAR.....	146
5.1. MONOSAKKARİTLER.....	148
5.1.1. Monosakkaritlerde Stereoizomerlik.....	150
5.1.2. Monosakkaritlerin Anomerik Şekilleri.....	152
5.1.3. Monosakkaritlerin Asit ve Bazlarla Etkileşmesi.....	156
5.1.4. Monosakkaritlerin Önemli Türevleri.....	158
5.2. DİSAKKARİTLER.....	164

5.3. POLİSAKKARİTLER.....	166
5.3.1. Depo Polisakkaritler.....	167
5.3.2. Yapısal Polisakkaritler	169
5.4. GLİKOPROTEİNLER.....	170
5.5. GLİKOLİPİDLER	171
6.BÖLÜM: LİPİDLER.....	173
6.1. YAĞ ASİTLERİ.....	173
6.2. NÖTRAL YAĞLAR.....	176
6.3. FOSFOLİPİDLER.....	179
6.4. GLİKOLİPİDLER	180
6.5. MUMLAR.....	181
6.6. STEROİDLER VE TERPENLER.....	182
7.BÖLÜM: NÜKLEOTİDLER ve NÜKLEİK ASİTLER	187
7.1. Nükleik Asitlerin Yapısal Üniteleri ve Makromolekül Yapısı.....	192
7.1.1. Şekerler	193
7.1.2.Pürin ve Primidin Bazları.....	193
7.1.3. Nükleosidler	195
7.1.4. Nükleotidler.....	196
7.2. POLİNÜKLEOTİDLER–NÜKLEİK ASİTLER	199
7.2.1. Nükleik Asitlerin Yapısı	200
7.2.2. Watson-Crick DNA Modeli	202
7.3. NÜKLEİK ASİT KİMYASI	208
7.3.1. DNA Moleküllerinin Sulu Çözeltilerdeki Özellikleri.....	208
7.3.2. Değişik Türlerdeki Nükleik Asitler Melez Yapılar Oluşturabilir.....	211
7.3.3. Nükleik Asit ve Nükleotidler Enzimatik Olmayan Değişime Uğrar	212
7.4. RİBONÜKLEİK ASİT (RNA).....	215
7.4.1. Elçi RNA (mRNA)	216
7.4.2. Taşıyıcı RNA (tRNA)	217
7.4.3. Ribozomal RNA (rRNA)	218
7.5. DNA' NIN REPLİKASYONU (KENDİNİ EŞLEMESİ)	219
7.5.1. DNA Molekülünün Replikasyon Mekanizması	222
7.5.1.1. DNA Replikasyonunda Rol Oynayan Enzimler	223
7.5.1.2. Replikasyon İşleminin Aşamaları.....	228
7.5.1.2.1. DNA Çift Sarmalındaki Zincirlerin Birbirinden Ayrılması	228
7.5.1.2.2. RNA Primer Zincirin Oluşması	229
7.5.1.2.3. Yeni DNA Zincirinin Sentezi.....	230
7.5.1.2.4.Oluşan DNA Parçaları Arasındaki Boşlukların Doldurulması ve Parçaların Birleştirilmesi.....	232
7.5.2. Ters Transkripsiyon ve RNA Replikasyonu	233
7.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve DNA' nın çoğaltılması	234
7.6. GENETİK BİLGİNİN AKTARILMASI (TRANSKRİPSİYON)	237
7.6.1. Transkripsiyonun Aşamaları	238
7.6.1.1. RNA zincir Sentezinin Başlaması.....	239
7.6.1.2. Zincirin Uzaması.....	241

7.6.1.3. Zincirin Sonlanması.....	243
7.6.2. Transkripsiyonla Sentezlenen RNA Molekülleri	244
7.6.3. RNA Moleküllerinin Transkripsiyon Sonrası İşlenmesi.....	245
7.6.3.1. mRNA' nın İşlenmesi.....	245
7.6.3.2. rRNA'nın İşlenmesi.....	246
7.6.3.3. tRNA' nın İşlenmesi.....	247
7.6.4. Katalitik RNA Molekülleri.....	248
7.7. GENETİK BİLGİNİN ÇÖZÜLMESİ (TRANSLASYON).....	248
7.7.1. Genetik Bilginin Akışı	249
7.7.2. Genetik Kod(Genetik Şifre)	251
7.7.3. Protein Sentezi: Genetik Kodun İfade Edilmesi.....	256
7.7.4. Protein Sentezinin Aşamaları	258
7.7.4.1. Aminoasit-tRNA'larm Oluşumu.....	258
7.7.4.2. Polipeptit Zincir Sentezinin Başlaması	259
7.7.4.3. Polipeptit Zincir Sentezi ve Zincirin Uzaması	260
7.7.4.4. Polipeptit Zincir Sentezinin Sonlanması.....	262
7.7.5. Proteinlerin Translasyon Sonrası Türevlendirilmesi	264
7.7.6. Protein Katlanması.....	265
7.8. MUTASYON ÇEŞİTLERİ	267
KAYNAKLAR	268

ÖNSÖZ

Biyokimya, canlı organizmaların en küçük yapısal birimi olan hücrenin kimyasal yapısını ve hayatın devamı boyunca hücrede, moleküler düzeyde meydana gelen kimyasal olayları inceleyen bir bilim dalıdır. Biyokimya, biyolojik olayları kimyasal ilkeler çerçevesinde inceler ve analiz eder. Biyoloji ve kimya temel bilimlerinin bir çalışma alanı olan biyokimya, günümüzde başta tıp olmak üzere tarım, beslenme ve endüstride de uygulama alanı bulan bir bilim dalı haline gelmiştir. Netice olarak biyokimya bilimi, canlılığın meydana gelişindeki, canlılığın devamındaki ve nihayet yok oluşundaki kimyasal mekanizmaları inceleyen bir bilimdir.

Biyokimya–I notlarında, kimya öğrencileri için gerekli biyolojik açıklamalarla birlikte, biyoloji ve sağlık bilimleri eğitimi görenler için de gerekli kimyasal açıklamalar yapılmıştır. Bu notlar, hepsi ayrı olarak ele alınmış 7 bölümden oluşmaktadır ve her bölüm kendi konularıyla sınırlıdır. Biyokimya–I notlarında yaşamın moleküler anlamı, hücre yapısı ve başlıca biyomoleküllerin kimyasal yapıları ve özellikleri açıklanmaya çalışılmıştır. Bu yaklaşımın öğrencinin biyokimya bilgisinin temelini oluşturacağını düşünmekteyiz.

Biyokimyada, kimya öğrencilerine ayrı bir tat, çeşni sunmaya çalışacağız. Canlılığın yani yaşamın temelde, hücrede cereyan eden bir takım kimyasal olayların bir sonucu olduğunu anlayabilirsek amacımıza ulaşmış olacağız.

Bu notlar uzun, zorlu ve sabır dolu bir sürecin sonunda ellerinize ulaştı. Bu notlarımızı biyokimya ve ilgili disiplinlerde lisans ve lisansüstü öğrencilerinin kullanımına sunuyoruz.

Notlarımızın geliştirilmesi, eksikliklerinin ve kusurlarının giderilmesinde meslektaşlarımızın değerli eleştiri ve katkılarını bekliyoruz.

Bu notların yazılmasında büyük emeği olan Dr. Aytaç GÜDER'e katkılarından dolayı teşekkür etmeyi bir borç biliyoruz.

Öğrencilerimize ve meslektaşlarımıza yararlı olması dileklerimizle.

Prof. Dr. Halil KORKMAZ

GİRİŞ

Biyokimya nasıl bir bilim dalıdır? Kimyacılar niçin biyokimya ile ilgilenir? Bu sorulara cevap vermek istersek biyokimya bilim dalı için şunlar söylenebilir.

Klasik bir tanıma göre biyokimya; canlı organizmaların en küçük yapısal birimi olan **hücrenin** kimyasal yapısını ve hayatın devamı boyunca canlı organizmalarda meydana gelen kimyasal olayları inceleyen bir bilim dalıdır. Başka bir tanıma göre de biyokimya; biyolojik olayları kimyasal prensipler çerçevesinde ele alan, inceleyen ve analiz eden bir bilim dalıdır.

Biyokimya, binlerce farklı biyomolekülün canlıların olağanüstü özelliklerini oluşturmak için birbirleriyle nasıl etkileştiğini sorgulamaktadır.

Tıp ve sağlık bilimlerini de kapsamına alan biyoloji çok karmaşık problemler içermektedir. Biyokimya bilim dalı ise birtakım deneyler yaparak ve bir takım aletleri kullanarak bu sorunlara cevap aramaktadır. Biyoloji ve kimya temel bilimlerinin bir çalışma alanı olan biyokimya, günümüzde başta tıp olmak üzere tarım, beslenme ve endüstride de uygulama alanı bulan bir bilim dalı haline gelmiştir. Bu çok geniş kullanım alanında biyokimya; klinik kimya, fizyolojik kimya, zirai biyokimya, moleküler biyoloji, biyokimya mühendisliği, gıda enzimolojisi, gen mühendisliği vb. gibi alt dallara ayrılmıştır.

Bir biyokimyacının (biyokimyager) çalışma alanının ne olduğu, 1965 yılında Amerikan Biyolojik Kimya Cemiyeti tarafından belirlenmiştir. “**Biyokimyacı**, kimyasal, fiziksel ve biyolojik araç ve yöntemleri kullanarak canlı organizmanın yapısını ve hayatın devamı boyunca meydana gelen kimyasal değişimleri ortaya çıkarmak ve açıklamak için çalışan araştırmacıdır”.

Biyokimyaya olan ilgi, insanların yüzyıllar boyu devam eden insan hayatının sırrını çözmek arzusundan kaynaklanmaktadır. Fakat bugün modern ve pozitif bir bilim dalı olarak biyokimyanın amacı; hayatın sırrını çözmek değil, canlılarda görev alan kimyasal bileşikleri tanımak, bu bileşiklerin özelliklerini, birbiriyle olan etkileşimlerini ve bu etkileşimin sebeplerini araştırmaktır. Netice olarak biyokimya bilimi, canlının meydana gelişindeki, canlılığın devamındaki ve nihayet yok oluşundaki kimyasal mekanizmaları ele alan, inceleyen bir bilimdir. Canlı meydana geldikten sonra hayatın devamı boyunca; canlı organizmada meydana gelen olayların hepsine birden “**Metabolizma**” adı verilir. Biyokimya metabolizma bilimi olup, büyük oranda metabolizmaya ilgilidir.

Canlıları cansız varlıklardan farklı kılan özelliklerin ve canlıların yapılarında bulunan kimyasal bileşiklerin genel özelliklerinin ele alınması ve incelenmesi biyokimyanın nasıl bir bilim dalı olduğu hakkında bilgi verir.

Biyokimya terimi ilk defa 1903 yılında Alman kimyacı Carl Neuberg tarafından kullanılmıştır. Biyokimya alanında yapılan çalışmaların başlangıcı bu tarihten önceki yıllara rastlamaktadır. Biyokimya daha eski bilim dalları olan organik kimya, fizyoloji, biyoloji ve tıbbın gelişmesi ile günden güne daha fazla değer kazanmıştır.

1. BÖLÜM: YAŞAMIN MOLEKÜLER ANLAMI

Canlı organizmalar cansız moleküllerden oluşur. Canlı organizmalar, canlılık sona erdikten sonra cansız birtakım maddeler yığına dönüşür. Biyomoleküller olarak adlandırılan canlı yapıdaki bu moleküller, birbirinden ayrılıp incelendiği zaman cansız maddelerin bağlı buldukları bütün kimyasal ve fiziksel yasalara uydukları görülür. Üstelik canlı organizmalar gelişigüzel bir araya getirilmiş herhangi bir molekül topluluğunca sergilenmeyen olağanüstü niteliklere sahiptir. Bu bölümde, önce canlı organizmaları diğer madde topluluklarından (cansız varlıklardan) ayıran özelliklere değineceğiz ve sonra tüm canlı organizmaları karakterize eden bir seri ilkeyi belirleyeceğiz. Bu ilkeler, organizmaların ve onların hücrelerinin düzenlenmesini belirlemektedir.

Canlı organizmaları cansızlardan farklı kılan nedir? Cansız varlıklardaki moleküllerle karşılaştığımızda canlıların birtakım ayırt edici özellikleri vardır. Canlı bir organizmayı cansız çevresinden ayıran bu olağanüstü özellikleri inceleyelim:

1) Canlı varlıklar, en küçük canlı olan bakteriden (tek hücreli canlı), en yüksek yapılı canlıya kadar, son derece karmaşık ve teşkilatlı bir yapıya sahiptirler. Canlıların iç yapıları çok çeşitli kompleks molekülleri içerir. Yeryüzünde yaklaşık 1 milyon 200 bin tür canlının yaşadığı kabul edilmektedir. Ancak canlıların çevreleri basit cansız maddelerden (toprak, su, hava vb.) ibarettir.

2) Organizmanın her bir bileşeni kendine özgü bir işleve sahiptir. Canlı varlıkların yapısında bulunan her organ, doku, hücre ve hatta molekülün bir varoluş amacı ve görevi vardır. Bu sadece yaprak ve dallar veya kalp ve akciğer gibi makroskopik yapılar için değil, çekirdek veya kloroplast gibi mikroskopik yapılar içinde doğrudur. Ama dağın yamacındaki bir kaya parçasının orada niye durduğu bizi pek ilgilendirmez.

3) Canlı organizmaların çevrelerinden enerji alabilme, bu enerjiyi değiştirebilme ve kullanabilme yetenekleri vardır. Bu enerji güneş enerjisi ve besinler şeklinde olabilir. Canlılar çevreleriyle dengede değildirler, sürekli bir madde ve enerji alış verişinde bulunurlar. Canlılar her enerjiyi kullanamaz. Canlılar serbest enerjiyi kullanır. **Serbest enerji**, sabit sıcaklık ve basınçta iş yapabilen enerjidir. **Canlı organizmalar** çevreden enerji ve madde alarak çoğalma, büyüme ve yaşamak için tüm bilgileri içeren karmaşık yapılar olarak tanımlanır. Cansız maddeler enerjiyi amaçları doğrultusunda kullanamazlar. Bir taş enerji alırsa ısınır, entropisi artar ve dağılır.

4) Canlı varlıkların en olağanüstü yönleri üremeleri ve kendini oluşturma yeteneğidir (Şekil 1.1). Bu özellik canlılığın anahtarıdır ve böylece canlılar neslini devam ettirirler. Bir cansız maddeler yığımından milyonlarca yıl geçse de böyle bir olay beklenemez.

“Bin bahar geçse de taş yeşermez” (Hz. Mevlana).



Şekil 1.1. Biyolojik üreme mükemmele yakın bir duyarlılıkla gerçekleşir.

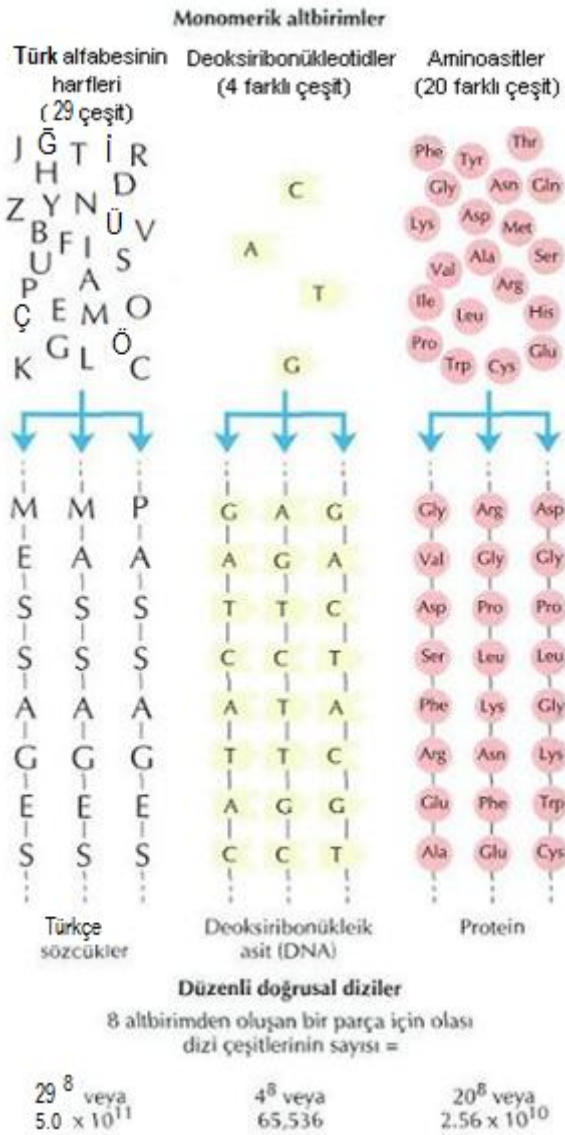
Canlıda herhangi bir madde belli oranda olmalıdır, az ya da çok olursa hastalık hali oluşur. Canlının kimyasal bileşenleri arasındaki ilişki dinamiktir, bir bileşendeki değişmeler, bir diğerinde tamamlayıcı değişmelere neden olur. Moleküllerin toplamı bir program yürütür, son ürün programın kopyalanması ve moleküler topluluğunun ölümsüzlüğü yani kısaca yaşamıdır.

Canlılar son derece çeşitlidir. Görünüş ve işlevde, kuşlar ve hayvanlar, ağaçlar, otlar ve mikroskopik organizmalar çok farklıdır. Ancak biyokimyasal araştırmalar, tüm canlıların hücresel ve kimyasal düzeylerde önemli ölçüde birbirlerine benzer olduklarını göstermektedir. Biyokimya tüm organizmalarda ortak olan yapıları, mekanizmaları ve kimyasal süreçleri moleküler anlamda tanımlar ve bütünüyle yaşamın moleküler anlamı diyebileceğimiz yaşamın tüm değişik formlarının yaşamla bağdaşan düzenleyici ilkelerini açıklar.

Canlılarda biyomoleküller olağanüstü çeşitlilik ve komplekslik arz eder. En küçük hücreler olan bakterilerde bile binlerce çeşit molekül bulunmaktadır. Mesela üzerinde en çok araştırma yapılan *E. coli* bakterisi yaklaşık 5000 çeşit organik bileşiğe sahiptir. Bu organik bileşiklerin 3000 kadarı protein, 1000 kadarı nükleik asit (1 tane DNA, diğerleri RNA) ve 1000 kadarı da diğer organik bileşiklerdir. *E. coli* proteinleri insan vücudundaki proteinlere ve insan vücudundaki proteinler de birbirine benzemezler.

Yeryüzünde bulunan 1 milyon 200 bin kadar organizmada 10^{10} - 10^{12} farklı protein ve 10^{10} farklı nükleik asit bulunduğu kabul edilmektedir. Organik kimyacıların sentezledikleri 1 milyona yakın organik bileşikle karşılaştırırsak, canlılardaki molekül çeşidinin çok büyük olduğu anlaşılır. Canlı organizmadaki biyomoleküllerin, bu derece çeşitli olmasına karşın protein ve nükleik asitler çok basit ve belli sayıda yapıtaşlarından oluşmaktadır.

Canlılardaki bütün proteinler 20 çeşit amino asidin, nükleik asitler ise 8 çeşit mononükleotidin değişik sayı ve sırada dizilmesiyle sentezlenmektedir. ($20! = 2 \times 10^{18}$ çeşit değişik şekli vardır). Aynen alfabemizdeki 29 harfin kullanılmasıyla sonsuz sayıda kelime, cümle ve ciltler dolusu kitapların yazılması gibi amino asitler proteinleri; mononükleotitler ise nükleik asitleri oluşturmak üzere monomerik altbirimler sonsuz sayıda farklı sıralanmalar meydana getirmek üzere birbirleriyle kovalent bağlarla bağlanabilir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Doğrusal sıralınımdaki monomerik altbirimler sonsuz sayıda karmaşık ileti için hece olabilmektedir. Olası sayıdaki farklı sıralanmalar, farklı sayıdaki altbirim çeşidine (N) ve doğrusal sıralanım uzunluğuna (L) bağlıdır. $S = N^L$ ortalama büyüklükteki bir protein için ($L \approx 400$), $S = 20^{400}$ bir astronomik sayıdır.

Canlılarda bulunan biyomoleküllerin bu derece çeşitli olmaları hiçbir zaman israf değildir. Çünkü canlılık hali için, milyonlarca görevin yerine getirilmesi gerekmektedir. Hücrede her bir molekül maksimum verimle çalışır, bazen de birden fazla görev yapar. Özetle canlıdaki her bileşik, en ekonomik şekilde kullanılmaktadır.

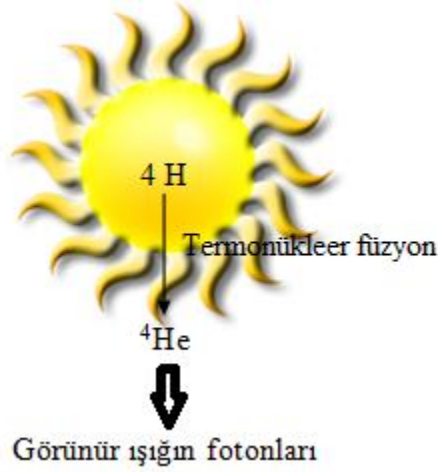
Eğer canlı varlıklar cansız moleküllerden oluşmuşsa; nasıl oluyor da cansız moleküllerden bu kadar farklı olabiliyorlar? Bir canlı organizma nasıl oluyor da cansız kısımlarının toplamından daha fazla nitelik taşıyabiliyor? Canlı organizmaları cansızlardan farklı kılan nedir? Felsefeyle uğraşanlar bu soruları canlıların **vital** güce sahip olması ile açıklamışlardır. Bu soruya kesin bir cevap vermek mümkün değildir. Ancak canlıyı oluşturan molekülleri inceleyerek bir takım açıklamalar getirilebilir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler şunlardır:

- 1) Biyomoleküllerin çoğunluğu karbon bileşikleridir.
- 2) Tüm canlı organizmalarda makromolekülleri oluşturan ana maddeler aynıdır.

Aminoasitler	————→	Proteinler
Monosakkaritler	————→	Polisakkaritler
(Glikoz, pentoz şekerler)		(Glikojen, nişasta)
Yağ asitleri	————→	Lipidler
Bazlar + H ₃ PO ₄ + Riboz	————→	Nükleik asitler (DNA ve RNA)

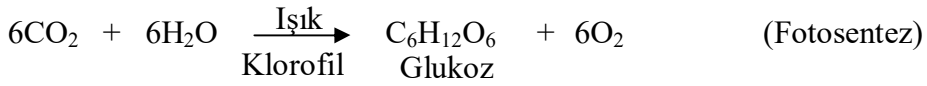
3) Her canlı türünün kendine has bir yapısı vardır. Bu yapıyı nükleik asitler belirler. Kalıtım molekülü bir türe ait kalıtsal bilgiyi taşıyan molekül DNA'dır. Bu bilgi DNA üzerindeki bazlar tarafından kodlanmıştır. RNA'lar DNA'daki kalıtsal bilginin protein sentezinde kullanılmasına yardımcı olurlar. Döllenmiş bir yumurtadan (zigot) birtakım mitoz bölünmeler sonucunda, yaklaşık 100 trilyon hücreden oluşan insan meydana gelmektedir.

4) Canlı varlıkların büyümeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri için enerjiye ihtiyaçları vardır. Canlılar bu enerjiyi çevrelerinden alırlar. Canlı varlıklar sadece serbest enerji kullanabilirler. Canlı varlıklar serbest enerjiyi kullandıktan sonra çevreye ısı olarak verirler. CO₂, H₂O ve O₂ sürekli olarak bir devir oluşturur, güneş enerjisi itici güçtür. Yaklaşık tüm canlı organizmalar enerjilerini ya doğrudan ya da dolaylı yolla güneşte termonükleer füzyon reaksiyonlarında oluşan güneş ışığının ışıma enerjisinden türetirler (Şekil 1.3).

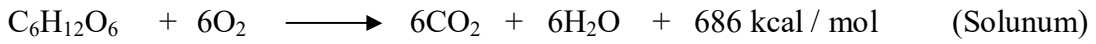


Şekil 1.3. Güneş ışığı tüm biyolojik enerjinin asıl kaynağıdır. Güneşteki termonükleer reaksiyonlar hidrojen den helyumu meydana getirir ve elektromanyetik enerji salınır. Işık şeklinde yeryüzüne ulaşan bu enerji, bitkiler, bazı algler ve bakteriler tarafından kimyasal enerjiye çevrilir.

Ototroflar (fotosentetik hücreler) güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürür (Fotosentez).



Heterotroflar (hayvansal organizmalar) kimyasal enerjiyi kullanırlar.



Hücre içindeki sentez tepkimeleri, tıpkı üretim yapan bir fabrika gibi sürekli enerji harcamaktadır. Canlılar serbest enerjiyi ATP olarak kullanırlar. ATP evrensel enerji molekülüdür ve bu enerjinin kaynağı da temelde güneş enerjisidir.

5) Canlı organizmalarda **enzim** adı verilen biyolojik katalizörler vardır. Enzimler çeşitli reaksiyonlarda katalizör rolü oynayan maddelerdir. Canlı organizmadaki bütün kimyasal reaksiyonlar enzim adı verilen protein yapısındaki bileşikler tarafından katalizlenmektedirler. Hücrede cereyan eden her reaksiyon bir enzim tarafından katalizlenir. Enzimlerin kataliz gücü çok yüksektir. Kimya laboratuvarlarında günlerce ve haftalarca sürebilen bir sentez, ardarda cereyan eden enzimatik reaksiyonlarla saniyenin binde biri kadar kısa bir sürede gerçekleştirilir.

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar % 100 verimle gerçekleşir. Mesela *E. coli* bakteri hücrelerini düşünelim. Bu bakteri hücresi yapısındaki kompleks organik bileşikler; su, amonyum (NH_4^+), glukoz gibi üç basit molekülden sentezlenmektedir. Bu bir kimyacı için hayal bile edemeyeceği bir durumdur. *E. coli* hücrelerini sonsuz küçük bir kap kabul edersek,

5000 çeşit organik bileşik; su, amonyum, glukoz ve bazı mineraller gibi basit maddelerin bulunduğu ortamda 37°C’de 20–30 dakika içinde bir arada sentezlenmektedir. Böylece bakterinin boyu iki katına çıkmakta ve bakteri bölünerek kendisinin aynısını meydana getirmektedir.

Görüldüğü gibi biyokimyanın ilgilendiği alan son derece harikulade özelliklerle doludur. Bu özelliklerin ortaya çıkarılması, ancak çok hassas ayırma, teşhis ve tayin metotlarının (spektroskopik ve kromatografik metotlar) gerçekleştirilmesinden sonra olmuştur.

Bugün bir ortaokul öğrencisinin bile tanıdığı DNA’nın genetik bilgiyi taşıdığını ve kalıtım molekülü olduğunu 1940’larda en ünlü bilim adamları bile bilmiyorlardı. DNA’nın çift sarmal yapısı ancak 1953 yılında belirlenebilmiştir (Şekil 1.4).

Küçük bir protein olan insülin hormonunun aminoasit sıralanışı 1953 yılında belirlenebilmiştir. İnsülin eksikliğinde şeker hastalığı meydana çıkmaktadır. Bir proteinin aminoasit sıralanışı ile DNA üzerindeki bazların sıralanışı arasındaki ilişki 1960 lı yıllarda anlaşılabilmiştir. DNA → RNA → Protein

Özetle diyebiliriz ki biyokimyanın temelini oluşturan konular son 60 yıl içerisinde açıklanabilmiştir. Bugün biyokimya araştırma alanları içerisinde en aktif olanlardır. Özellikle kanser araştırmaları için, projelere büyük kaynaklar ayrılması moleküler biyolojide olağanüstü gelişmelere yol açmıştır. Artık biyokimyacılar biyoloji ve tıpın en derin konularına el atmışlardır. Örnek olarak; tek bir hücreden farklı doku hücreleri nasıl oluşabiliyor? Hücrelerin büyümesi nasıl kontrol edilmektedir? Hafızanın mekanizması nedir? Kanserın mekanizması nedir? Şizofreni nasıl oluşmaktadır? Ayrıca günümüzde birçok biyoteknolojik ürün tıbbi teşhis ve tedavide kullanılmaktadır.



Şekil 1.4. DNA’ nın tamamlayıcı yapısı. İki zincirin birbirine tamamlayıcı olması, genetik bilginin nesilden nesile aktarılması için önemli olan doğru eşleşmeyi sağlamaktadır. Genetik bilgi, DNA’nın dört çeşit alt biriminin doğrusal diziliminde şifrelidir.

1.1. BİYOMOLEKÜLLER

Biyokimya, biyolojik olayları kimyasal prensipler çerçevesinde incelemektedir. Biyokimya, tüm organizmalarda ortak olan yapıları, mekanizmaları ve kimyasal süreçleri moleküler anlamda tanımlar ve bütünüyle yaşamın moleküler anlamı diyebileceğimiz yaşamın tüm değişik formlarının, yaşamla ilgili düzenleyici ilkelerini açıklar. Biyokimya, kimyasal terimlerdeki biyolojik şekil ve işlevleri açıklamayı amaçlar. Biyolojik olgunun anlaşılması için en yararlı yaklaşımlardan biri, canlı bir organizmadan protein gibi tek bir bileşiğin saflaştırılması ve onun kimyasal yapısı veya katalitik aktivitesinin karakterize edilmesi olmuştur. Canlı yapısını oluşturan ve her birinin özel işlevi olan moleküller topluluğuna **biyomolekül** denir. Biyomoleküllerin ve onların canlı hücrelerdeki etkileşimlerini incelemeye başlarken, doğal olarak bazı temel sorular akla gelir. Canlı hücrelerde hangi tip moleküller vardır ve oranları nedir? Bu moleküllerin yapıları nedir ve bu yapılar nasıl kararlı hale gelmektedir? Ayrıştıklarındaki etkinlikleri ve kimyasal özellikleri nedir? Birbirleriyle nasıl etkileşirler? İlk canlı hücrenin biyomolekülleri nasıl ve nereden kaynaklanmıştır?

Bu bölümde, önce canlıların hangi elementlerden oluştuğu, bu elementlerin seçiliş sebepleri, kimyasal özellikleri ve biyolojik moleküllerin özelliklerini oluşturan bazı kimyasal ilkeleri inceleyeceğiz.

1.1.1. Canlılardaki elementler ve özellikleri (Biyoelementler)

Canlıların yapılarında bulunan elementlerin çeşit ve miktarları litosferdekinden oldukça farklıdır. Litosferde (yer kabuğu) mevcut olan 92 elementten 27 tanesi canlıların bileşeni olup, bu elementlerden 16 tanesi her çeşit canlıda bulunmaktadır. Bu elementlerin canlılardaki dağılımı da litosferdeki ile aynı değildir. Canlılarda en bol olarak bulunan ilk dört element karbon, hidrojen, oksijen ve azottur. Bu dört element, birçok hücre kütlelerinin yaklaşık % 99'unu teşkil etmektedir. Litosferde en bol bulunan ilk dört element ise; oksijen, silisyum, alüminyum ve demirdir. Biyosferde; kalsiyum, fosfor, sodyum, mangan, potasyum, klor ve kükürt genellikle % 0,05–1 arasında değişen oranlarda bulunur. Diğer bazı elementler çok daha az miktarlarda mevcuttur (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Yerkabuğunda ve insan vücudunda en bol bulunan elementler ve toplam atom sayısı yüzdeleri

Yer kabuğu		İnsan vücudu	
(% Element = % Atom)		(% Element = % Atom)	
O	47,0	H	63,0
Si	28,0	O	25,5
Al	7,9	C	9,5
Fe	4,5	N	1,4
Ca	3,5	Ca	0,31
Na	2,5	P	0,22
K	2,5	Cl	0,08
Mg	2,2	K	0,06
Ti	0,46	S	0,05
H	0,22	Na	0,03
C	0,19	Mg	0,01

Hücre yaş ağırlığının yaklaşık; %50 – 60'ı karbon, %8 – 10'u azot, %25 – 30'u oksijen ve %3 – 4'ü hidrojenenden meydana gelmiştir. Buna karşılık yerkabuğunun %1'den daha azı karbon, hidrojen ve azottan meydana gelmiştir.

Tablo 1.2. Biyomoleküllerin yapısında bulunan elementler. İlk 16 element her canlıda bulunmaktadır.

Eser miktarda bulunan elementler		Bol miktarda bulunan iyonlar		Organik yapıda bulunan temel elementler	
Demir	Fe*	Sodyum	Na ⁺	Karbon	C
Bakır	Cu*	Potasyum	K ⁺	Hidrojen	H
Nikel	Ni	Magnezyum	Mg ⁺²	Oksijen	O
Krom	Cr	Kalsiyum	Ca ⁺²	Azot	N
Çinko	Zn*	Klorür	Cl ⁻	Fosfor	P
Flor	F*			Kükürt	S
Mangan	Mn*				
Selenyum	Se*				
Kobalt	Co*				
Silisyum	Si				
İyot	I*				
Molibden	Mo*				
Kalay	Sn				
Bor	B				
Vanadyum	V				
Arsenik	As				

* İnsan vücudunda bulunan eser elementler.

Acaba karbon, hidrojen, oksijen ve azot canlı yapıları için neden en uygun elementlerdir?

Bu dört elementin en önemli özelliği kovalent bağ yapabilmeleridir. Bu elementler güçlü kovalent bağ yapabilen atom ağırlığı küçük ve elektronegatifliği yüksek elementlerdir. Kovalent bağ yapma yeteneği ve bu bağın sağlamlığı bağ yapan elementlerin atom ağırlığıyla ters orantılıdır. Oksijen, azot ve karbon birden fazla elektron çiftini ortaklaşa kullanabildikleri için sırasıyla iki, üç ve dört bağ meydana getirebilir ve birçok çeşit kimyasal bileşik oluşturabilirler.

Karbon atomlarının birbiriyle oldukça kararlı kovalent karbon–karbon bağı meydana getirmesi de diğer önemli bir noktadır. Hatta bir karbon atomu dört ayrı karbon atomu ile de bağlanabilmektedir. Bunun sonucu olarak çok sayıda farklı organik bileşiğin karbon iskeleti ortaya çıkar. Ayrıca karbon; hidrojen, oksijen ve azot ile de kararlı kovalent bağlar yaparak birçok fonksiyonel grubun oluşmasını sağlar.

Organik bileşiklerin üç boyutlu uzayda sonsuz çeşitte (konformasyonda) olmasını sağlayan diğer önemli bir özellik de karbon atomunun sp^3 hibritleşmesi yaparak, bağların düzgün dört yüzünün köşelerine yönelmiş olmasıdır. Karbondan başka hiçbir element, bu kadar çok çeşitte kararlı bileşik oluşturamaz.

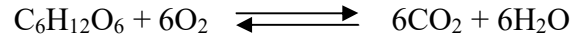
Canlıların yapısında bulunan organik bileşiklerde karbon oldukça indirgenmiş haldedir. Yerkabuğunda ise karbon yükseltgenmiş karbonat bileşikleri şeklinde bulunmaktadır. Atmosferde bol miktarda oksijen olduğundan karbon ve hidrojen kolayca CO_2 ve H_2O 'ya yükseltgenir. Canlılarda biyomoleküllerin CO_2 ve H_2O 'dan biosentezi için, serbest enerji ve indirgen güce ihtiyaç vardır.

1.1.2. Canlılar İçin Suyun Önemi

Canlılar su ve otuz küçük öncül molekülden oluşmuşlardır. Su canlılar için çok önemlidir. İnsan vücudunun yaklaşık 2/3'ü sudur. Suyun bazı önemli kimyasal özellikleri vardır. Suyun kimyasal özelliklerinin başında molekülün polarlığı ve hidrojen bağı yapma yeteneği gelmektedir (Şekil 1.5). Biyolojik sistemler için çok yararlı kimyasal özellikler içeren su, iyonik bileşikler ve polar bileşikler için iyi bir çözücüdür. Hücrelerde kimyasal reaksiyonların meydana gelebilmesi için maddelerin çözülmüş olması gerekir. Tüm metabolik olaylar sulu çözültide cereyan eder. Canlı organizmalarda besin öğelerinin sindirimi, emilimi, taşınması, metabolizması, atık zararlı maddelerin atılması, eklemlerin kayganlığı ve vücut ısısının denetimi su ile olmaktadır.

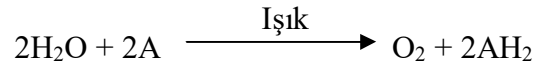
Su sadece canlı hücrenin kimyasal reaksiyonlarının oluştuğu bir çözücü değildir; bu reaksiyonlara sıklıkla doğrudan katılımcıdır. Hidroliz reaksiyonları; proteinlerin, karbohidratların ve nükleik asitlerin enzimatik olarak depolimerizasyonundan sorumludur.

Glukoz gibi katı yakıtların oksidasyonlarının son ürünü su ve karbondioksittir. Bütün reaksiyon şöyle özetlenebilir.



Katı yiyeceklerden ve depo yakıtlardan oluşan bu ‘‘metabolik su’’ susuz ortamlarda yaşayan bazı hayvanlar (çöl fareleri, kangurular ve develer) için uzun süre su içmeden yaşama kaynağı olarak kullanılır.

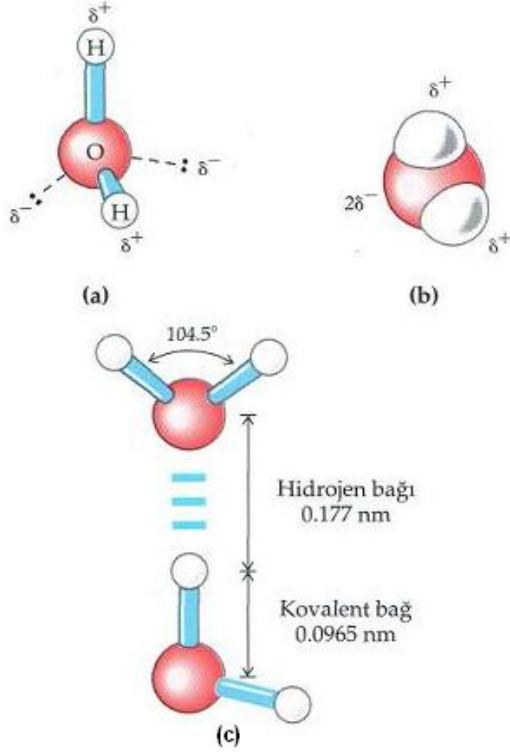
Yeşil bitkiler ve algler fotosentez yoluyla suyu parçalamak için güneş enerjisini kullanır.



Bu reaksiyonda A elektron alan bir türdür, fotosentetik organizmanın tipine göre değişir.

Suyun ısı kapasitesi yüksektir ve sıcaklıkla çok az değişir. Çünkü suyun katı ve sıvı durumlarında komşu su molekülleri hidrojen bağı ile birlikte bir arada tutulmaktadır (Şekil 1.5.c). Isı enerjisi bu bağların kırılmasıyla kaybolmaktadır. Bu bakımdan su, ani ısı değişimlerine karşı hücreleri korur ve vücutta meydana gelebilecek sıcaklık değişimleri dengelenir. Su sıvı halden gaz haline geçerken büyük miktarda ısı absorplar. Böylece sıcak havalarda, aktif çalışma durumunda ve mekanik hareket halinde organizma suyu buharlaştırarak fazla olan vücut ısısını dışarı atabilmektedir. Örneğin; 80 kg ağırlığındaki bir basketbolcu bir maçta 2 kg suyu ter olarak dışarı atabilir. Suyun vücut sıcaklığında (37°C) buharlaşma ısısı 574 kcal / kg’ dır. 574 kcal / kg x 2 kg = 1148 kcal olarak bulunur.

Bu kadar ısı ter olarak dışarı atılmamış olsaydı, bu basketbolcunun vücut sıcaklığı 14°C artacaktı. Suyun karakteristik ısı iletkenliği, ısının vücut dokularına eşit ölçüde dağılmasını sağlar. Vücuttaki suyun %15’inin kaybedilmesi hayatın sona ermesine neden olur. Vücut ağırlığı 70 kg olan yetişkin bir kişinin günlük su ihtiyacı 2,5 litredir.

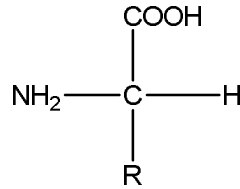


Şekil 1.5. Su molekülünün yapısı. H_2O molekülünün dipolar yapısı (a) top ve çubuk, (b) boşluk dolduran modeller şeklinde gösterilmiştir. (a)' da kesikli çizgiler bağ yapmayan orbitalleri gösterir. Oksijen atomunun dış yörüngesindeki elektron çiftleri arasında tetrahedrale yakın bir düzenlenme vardır; iki hidrojen atomu kısmi pozitif yük (δ^+) ve oksijen atomu kısmi negatif yük ($2\delta^-$) taşır. İki su molekülü (c)' de bir hidrojen bağıyla birleşir; hidrojen bağı üstteki molekülün oksijeniyle alttaki molekülün hidrojeni arasında oluşmuştur. Hidrojen bağları kovalent O-H bağlarından daha uzun ve daha zayıf bağlardır.

1.1.3. Canlılardaki Moleküller

Canlı organizmaları oluşturan biyolojik makromoleküller temelde otuz küçük öncül molekülden oluşmuştur. Bu otuz küçük öncül moleküller dört grupta toplanabilir.

1) 20 çeşit L- α -amino asit tüm proteinlerin yapı taşıdır;



2) Beş aromatik baz; iki tanesi pürin (adenin, guanin), üç tanesi pirimidin (sitozin, timin, urasil) bazları olup, riboz fosfat veya deoksiriboz fosfata bağlanarak **nükleotidleri** oluştururlar. Nükleotidler de DNA ve RNA'nın yapı taşlarıdır.

3) D-Glukoz şekeri, bitkilerde fotosentezin başlıca ürünüdür. D-Glukoz metabolizmada önemli bir ara ana maddedir. D-Riboz şekeri ise, nükleotidlerde şeker fosfatların öncülüdür.

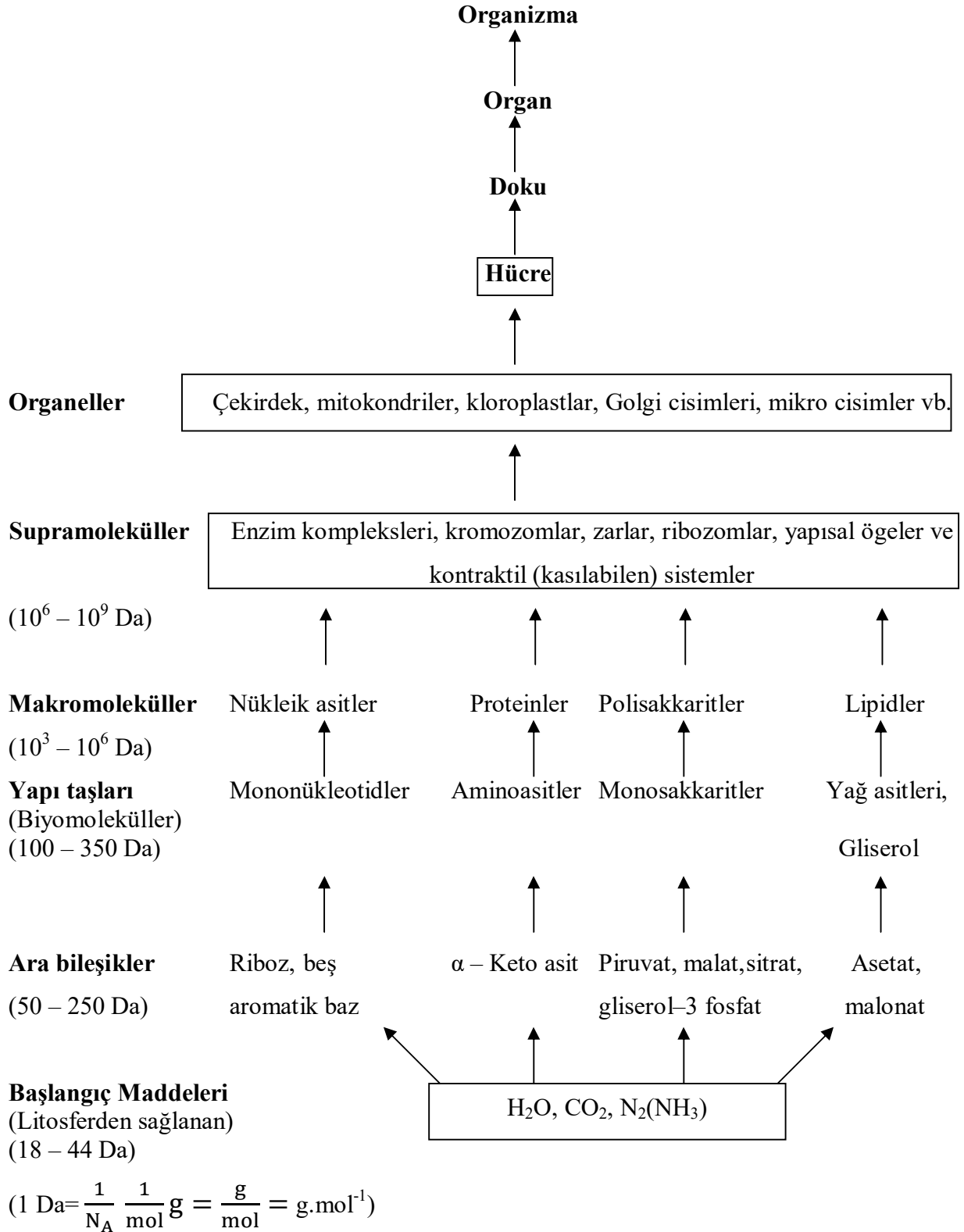
4) Palmitat ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COO}^-$), gliserol ve bir amin olan kolin molekülü, biyolojik membranları oluşturan fosfolipidlerinin yapı taşlarıdır.

Bu otuz küçük öncül molekül, biyoelementler gibi canlıların çevrelerinde hazır bulunmaları ve uyumlulukları nedenleriyle seçilmiştir. 3 milyar yıl önce yaşam başlamadan

ilkel dünyanın indirgen atmosferinde ve sıcak denizlerde bu otuz küçük öncül molekülün çok fazla miktarda bulunduğu sanılmaktadır.

Birçok küçük öncül molekül birbirine bağlanarak daha büyük yapılar olan makromolekülleri oluşturur. Bu makromoleküller proteinler, karbohidratlar, lipidler ve nükleik asitlerdir. Bunlar da birbirleriyle özgün biçimlerde birleşerek daha büyük yapıları oluştururlar.

Bütün organik biyomoleküller çevreden sağlanan H_2O , CO_2 , N_2 (NH_3) gibi basit başlangıç maddelerinden sentezlenir. Bu başlangıç maddeleri canlılar tarafından birtakım ara bileşikler yardımıyla molekül ağırlıkları 100–300 Dalton (1 Dalton (Da) = $1,67 \times 10^{-24}$ g) arasında değişen ve makromoleküllerin yapıtaşları olan biyomoleküllere dönüştürülür. Bu yapı taşı biyomoleküller kovalent bağlarla birleşerek hücrenin makromoleküllerini oluştururlar. Makromoleküllerin molekül ağırlıkları oldukça yüksektir. Örneğin; amino asitler proteinleri, mononükleotitler nükleik asitleri, monosakkaritler polisakkaritleri ve yağ asitleri de lipidleri oluştururlar. Molekül ağırlıkları 750–1000 Dalton arasında değişen lipidler, aslında makromolekül değildirlir ancak makromolekül olarak kabul edilirler. Bundan sonraki daha yüksek seviyede düzenlenme makromoleküllerin oluşturdukları supramoleküllerdir. Supramoleküller büyük moleküllü komplekslerdir. Lipoproteinler, lipid ve proteinlerin; ribozomlar ise nükleik asit ve proteinlerin kovalent olmayan bağlarla meydana getirdikleri supramoleküllerdir. Kovalent olmayan bağlar, Van der Waals ve hidrojen bağlarıdır. Bu bağlar nispeten zayıf bağlardır. Ancak makromoleküllerin üç boyutlu yapılarının uygunluğu nedeniyle, bu etkileşimlerden çok sayıda meydana geldiği için supramoleküller oldukça sağlam yapılıdır. Hücre yapısını oluşturan en yüksek seviyede moleküler düzenlenme, supramoleküllerin kovalent olmayan bağlarla bir araya gelmesi sonucu oluşan **organellerdir**. Bazı makromoleküllerin ve organellerin bir membran içerisinde toplanarak, organize olması sonucu **HÜCRE** oluşur. Biyolojik yapıda aşama düzeni Şekil 1.5’de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Başlangıç maddelerinden hücreye kadar biyomoleküllerin oluşum sırası

Escherichia coli bakteri hücresinde bulunan makromoleküllerin ve diğer bileşiklerin yüzdeleri ve çeşitleri Tablo 1.3’de verilmiştir.

Tablo 1.3. *Escherichia coli* (*E. coli*) hücresinin moleküler bileşimi

Biyomoleküller ve iyonlar	Hücrenin toplam ağırlığının yüzdesi	Farklı molekül tiplerinin yaklaşık sayısı
Su	70	1
Protein	15	3000
Nükleik asitler		
DNA	1	1
RNA	6	>1000
Polisakkaritler	3	5
Lipidler	2	20
Yapı taşları ve ara bileşikler	2	500
Anorganik iyonlar	1	200

Hücrelerde en bol bulunan molekül çeşidi proteindir. *E. coli* bakteri hücresinde 3 bin ve insan vücudunda yaklaşık 100 bin çeşit protein bulunduğu kabul edilmektedir. Diğer bütün hücrelerde; iskelet, kıl, nişasta ve yağ depoları dışında bu dört makramolekül hemen hemen aynı oranları korur.

2. BÖLÜM: HÜCRE

Hücreler tüm canlıların yapısal ve fonksiyonel birimleridir. Bütün biyokimyasal reaksiyonlar hücre içerisinde ya da hücrenin organellerinde meydana gelmektedir. Biyokimya öğrenmek isteyenlerin hücreyi, hücrenin bütün organellerini yapı ve fonksiyonları bakımından bilmesi gerekir. Hücre içinde meydana gelen bütün biyokimyasal reaksiyonların fiziksel ve kimyasal koşulları, hücrenin yaşam koşullarıyla aynıdır. Kimyasal reaksiyonların pek çoğu tüp, beher, balon veya daha büyük kaplar içerisinde yüksek sıcaklık, yüksek basınç, kuvvetli reaktifler, organik çözücüler ve çeşitli enerji türleri kullanılarak başarılmaktadır. Buna karşılık biyokimyasal reaksiyonlar çok küçük miktarlarda hücre içerisinde ve hatta hücrenin bir organelinin belli bir bölgesinde meydana gelmektedir. Hücreler yüksek sıcaklık ve basınca, kuvvetli reaktiflere, kuvvetli asitlere dayanıklı değildirler hemen ölürlür. Bu bölümde bir bütün olarak hücreyi ve hücrenin bütün organellerini yapı ve fonksiyonları bakımından ve biyokimyasal aktivitesi yönünden inceleyeceğiz.

2.1. Bütün hücrelerin bazı ortak yapısal özellikleri vardır

Canlıların en küçük yapısal ve fonksiyonel birimi hücredir. En küçük canlı organizmalar bir tek hücreden meydana gelmiştir. Buna karşın yetişkin insan vücudunun yaklaşık 10^{14} (100 trilyon) hücreden meydana geldiği kabul edilmektedir. Çok hücreli organizmalarda değişik büyüklükte, değişik şekillerde ve değişik fonksiyonlar gören binlerce çeşit hücre bulunmaktadır. İnsan vücudu, sirke sineği ve begonya çiçeği binlerce çeşit hücreden meydana gelmiştir. Bu hücrelerin bir kısmı belli bir ödevi görmek için özelleşerek dokuları ve organları meydana getirmektedir. Bir organizmanın hücre tipleri genellikle birbirine benzemektedir.

Her hücrenin etrafında gayet ince bir membran ve bu membranın içerisinde ise bir sitoplazma ve nükleus (çekirdek) bulunmaktadır. Hücrenin etrafında bulunan ve seçici geçirgen özellik gösteren bu membrana **plazma membranı** veya **sitoplazmik membran** adı verilmektedir. Bu membran hücrenin ihtiyacı olan besin ve madensel tuzların veya mineral maddelerin hücre içerisine girmesine; atık zararlı maddelerin ise hücre dışına atılmasına yardımcı olmaktadır. Genellikle bütün hücre membranları iki tabaka lipid ve bu ikili lipid tabaka içerisine çeşitli şekillerde yerleşmiş olan proteinlerden oluşmaktadır. Membran yapısındaki proteinlerin bir kısmı enzim, bir kısmı reseptör (algılayıcı) olarak görev yaparken, bir kısmı da transport (taşıma) görevi yapmaktadır.

Plazma membranı ile çevrili sitoplazma, sulu bir çözelti olan sitosol ve çeşitli çözünmüş parçacıklardan oluşur. Hücre sitoplazmasında çözünmüş olarak pek çok enzim

bulunmakta ve hücrenin yaşamını sağlayan tüm metabolik olaylar bu enzimler tarafından katalizlenmektedir. Sitosolde özelleşmiş metabolik işlevleri olan ve bir membranla çevrilmiş çeşitli organeller bulunmaktadır. Hücre içinde bulunan sitoplazmada yer alan 18–22 nm çapında **ribozom** adı verilen organeller protein sentez merkezi olarak görev yapmaktadırlar. Ribozomlar, yapı bakımından supramolekül; işlev bakımından organeldirler. Bütün hücrelerin nükleus (çekirdek) veya nüklear cisimcik (nükleoit) adı verilen kısımlarında kendini eşleyen ve bu bölgede depo edilen kalıtsal bilgiyi taşıyan **deoksiribonükleik asitleri (DNA'ları)** bulunmaktadır. Bir türe ilişkin genetik bilgi bu DNA'larda kodlanmaktadır.

Hücrelerin bir başka ortak özelliği genellikle boyutlarının çok küçük olmasıdır. Pek çok hücre çıplak gözle görülemez yani mikroskobiktir. Hayvan ve bitki hücreleri 5–100 µm çapında iken, birçok bakteri hücresi 1–2 µm uzunluktadır. Hücre kimyasal enerji kullanarak yapısal kısımlarında görev yapacak ve biyolojik aktivitesi olan makromoleküllerini sentezlemektedir. Hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonlar, hücrenin bir bölmesinde mikroskobik hacimlerde meydana gelmektedir. Mesela *E. coli* bakteri hücresinin yaklaşık hacmi 2×10^{-12} mL' dir. Biyokimyasal yönden, hücresel faaliyetleri daha iyi anlayabilmemiz için önce biyomoleküllerin ve hücrelerin büyüklüğünü bilmemiz gerekmektedir. Bazı biyomoleküllerin ve çeşitli hücrelerin yaklaşık boy ve ağırlıkları Tablo 2.1'de verilmiştir:

Tablo 2.1. Bazı biyomoleküllerin ve çeşitli hücrelerin boy ve ağırlıkları

Yapı	Uzunlama boyut (nm)	Ağırlık (Dalton)
Alanin (bir amino asit)	0,5	89
Glukoz (şeker)	0,7	180
Fosfolipid	3,5	750
Miyoglobin (küçük bir protein)	3,6	16.900
Hemoglobin (orta büyüklükte protein)	6,8	65.000
Miyozin (büyük bir protein)	160	470.000
Ribozom (<i>E. coli</i>)	18	2.800.000
Tütün mozaik virüsü	300	40.000.000
Mitokondri (karaciğer)	1500	1×10^{-12} g
<i>E. coli</i> hücresi	2000	2×10^{-12} g
Kloroplast (ıspanak yaprağı)	8000	1.3×10^{-10} g
Karaciğer hücresi	20000	2×10^{-9} g

Pek çok bakteri hücresi yaklaşık 2 µm, yüksek organizasyonlu hayvan hücresi ise 20–30 µm boyundadır. Hücrelerin küçük olması bir bakıma avantajdır çünkü difüzyon hızlı olur

ve metabolizma kolay düzenlenir. Hücre boyutunun küçük olması, hücre yüzeyini artırmakta ve kısa zamanda çok sayıda besin moleküllerinin hücre içine girişini kolaylaştırmaktadır.

Hücreler **prokaryot** ve **ökaryot** olmak üzere başlıca iki sınıfa ayrılır. Prokaryotlar en basit ve en küçük hücrelerdir. Biyolojik olarak ilk ortaya çıkan canlılar prokaryotik hücrelerdir ve 3 milyar yıl önce ortaya çıktıkları kabul edilmektedir. Yerkürenin yaklaşık 4,8 milyar yıl önce meydana geldiği kabul edilmektedir.

Prokaryotik kelimesi nükleustan önce anlamına gelmekte ve **prokaryotik hücre**, iyi teşekkül etmiş bir membranla çevrili çekirdeği (nükleusu) olmayan hücre demektir. Prokaryotik hücrelerde genetik materyal (DNA) sitoplazma içinde gayri muntazam nüklear cisimcik (nükleoit) şeklinde lokalize olup; etrafında ayrıca bir membran bulunmaz (Şekil 2.1).

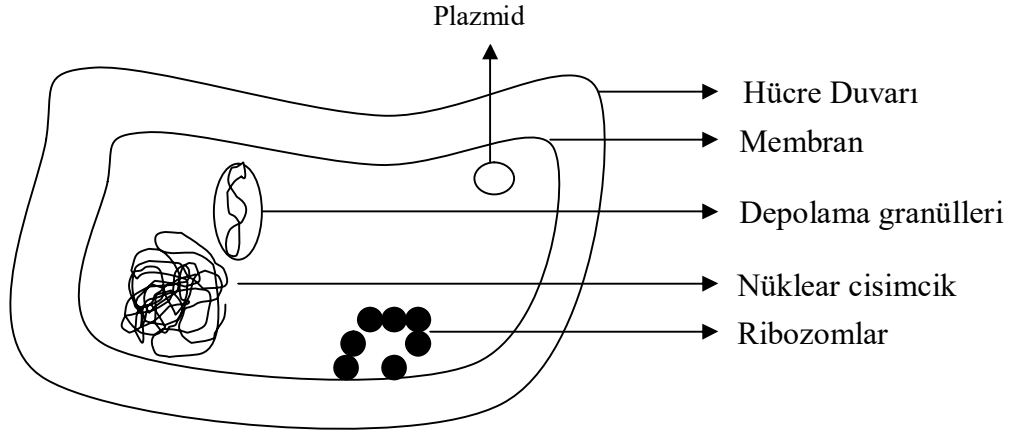
Ökaryotik hücrelerin prokaryotlardan 1 milyar yıl sonra ortaya çıktığı söylenmektedir. İnsan'ın (homo sapiens) ortaya çıkmasının ise 2 milyon yıl önce olduğu kabul edilmektedir.

Ökaryotik kelimesi iyi teşekkül etmiş nükleus anlamına gelmektedir. **Ökaryotik hücre** ise nükleusu etrafında bir membran bulunan iyi teşekkül etmiş hücre demektir.

2.2. PROKARYOTİK HÜCRE YAPISI

Prokaryotlar en basit ve en küçük hücrelerdir. Bir hücreli organizmaların çeşitli familyaları vardır ve bunlara genellikle **bakteri** adı verilir. Prokaryotlar, mavi–yeşil algleri (yeni isimlendirme sisteminde siyanobakteri) de içine alan 3.000 bakteri türünü kapsamaktadır. Mavi–yeşil algler yüksek bitkiler gibi fotosentez yapmaktadırlar. Atmosferdeki oksijenin yarısından fazlasını siyanobakteriler üretir. Bakterilerin pek çoğu fotosentez yapamayan, besinleri yıkarak yaşamlarını sürdüren **çürükçül (saprofit) bakterilerdir**. Canlıların 3/4' ü mikroskopik canlılar olup; bunların pek çoğunu bakteriler oluşturmaktadır. Prokaryotların mitokondri, endoplazmik retikulum gibi organelleri yoktur, sadece ribozomları vardır. Ribozomlar, protein sentezini sağlarken nüklear cisimcikler genetik maddenin depolanmasını ve nesilden nesile aktarılmasını düzenlemektedirler. Prokaryot hücrelerin çekirdek bölgesinde sıkı bir yumak şeklinde nükleotit tek bir çembersel (dairesel) DNA çift sarmalı molekülden ibaret bir **kromozomu** vardır (Şekil 2.1). Nükleotitteki DNA ya ek olarak birçok bakterinin bir ya da daha fazla **plazmid** adı verilen daha küçük çembersel DNA bölümleri içerir. Laboratuvarında, bu DNA bölümleri bakteri için gerekli olmadığından, deneysel uygulamalara yatkın ve moleküler genetikçiler için son derece yararlıdır. Pek çok bakteri sitoplazmasında nişasta ve yağ granüllerine rastlanmaktadır. Aynı zamanda sitoplazmanın sıvı kısmında pek çok enzim, makromoleküllerin sentezinde kullanılacak öncüller ve bazı mineraller bulunmaktadır.

Bakterilerde dıştaki hücre duvarı koruyuculuk ödevi görür. Hücre membranı besin maddelerinin hücre içine ve atıkların hücre dışına atılmasını sağladığı gibi kimyasal enerji sentezini de başarmaktadır. Prokaryotların pek çoğunda membranın sitoplazmaya bakan yüzünde elektron taşıyıcı proteinler bulunmaktadır. Bu proteinler oksidasyon (yükseltgenme) enerjisini ATP enerjisine çevirmektedir.



Şekil 2.1. Prokaryotik hücre yapısı

Bazı bakteriler hastalık etkenlidirler ancak bakterilerin çoğu faydalıdır. Bakteriler; toprak, hava, su ve canlı dokularında yaşarlar, biyolojik olarak hayatın devam etmesi için çok önemlidirler.

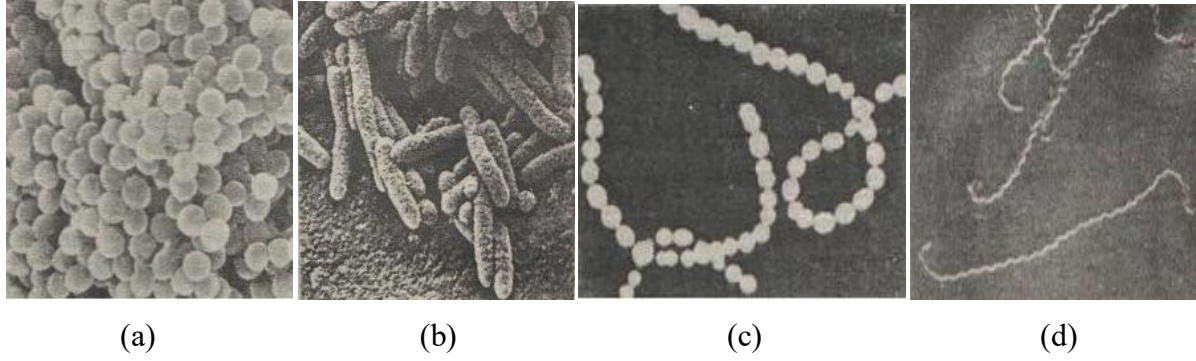
Prokaryotik canlılar yeryüzünde madde ve enerjinin değişiminde çok önemli rol oynarlar. Deniz ve göl sularında yaşayan fotosentetik bakteriler, güneş enerjisini absorbe (yakalayıp) ederek karbonhidratları ve diğer hücre materyalleri sentez etmektedirler. Fotosentetik bakterilerin, ürettikleri maddeler daha sonra diğer canlıların besini olarak kullanılmaktadır.

Bazı bakteriler atmosferdeki azotu tespit eder, azotlu organik bileşikler sentez ederler. Böylece prokaryotlar yeryüzündeki besin zincirinin çoğu kez başlangıcını teşkil etmektedirler. Prokaryotlar (saprofit bakteriler) aynı zamanda iyi bir tüketici olup; ölü hayvan ve bitkileri parçalayarak, onların tekrar toprağa, suya, havaya dönüşümlerini sağlamaktadırlar. Böylece karbon, azot ve oksijen biyolojik çevrimde tekrar tekrar kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde saf bakteri kültürlerinin biyoteknolojik olarak; antibiyotik, aşı ve bazı tıbbi enzimleri üretmesi sağlanır.

Prokaryotik organizmalar değişen çevre koşullarına daha iyi adapte olmakta, daha hızlı bölünerek çoğalmaktadırlar. Prokaryotik hücreler boyları iki katına çıkıncaya kadar büyürler, daha sonra ikiye bölünürken genetik materyal olan DNA molekülü kendini eşler. Birbirinin aynı olan iki kopyadan biri oğul hücrede, diğeri ana hücrede olmak üzere

paylaştırılır. Bir *E. coli* hücresi su, amonyum, glukoz ve bazı minerallerin bulunduğu ortamda 37 °C’ de 20–30 dakikada çoğalmaktadır.

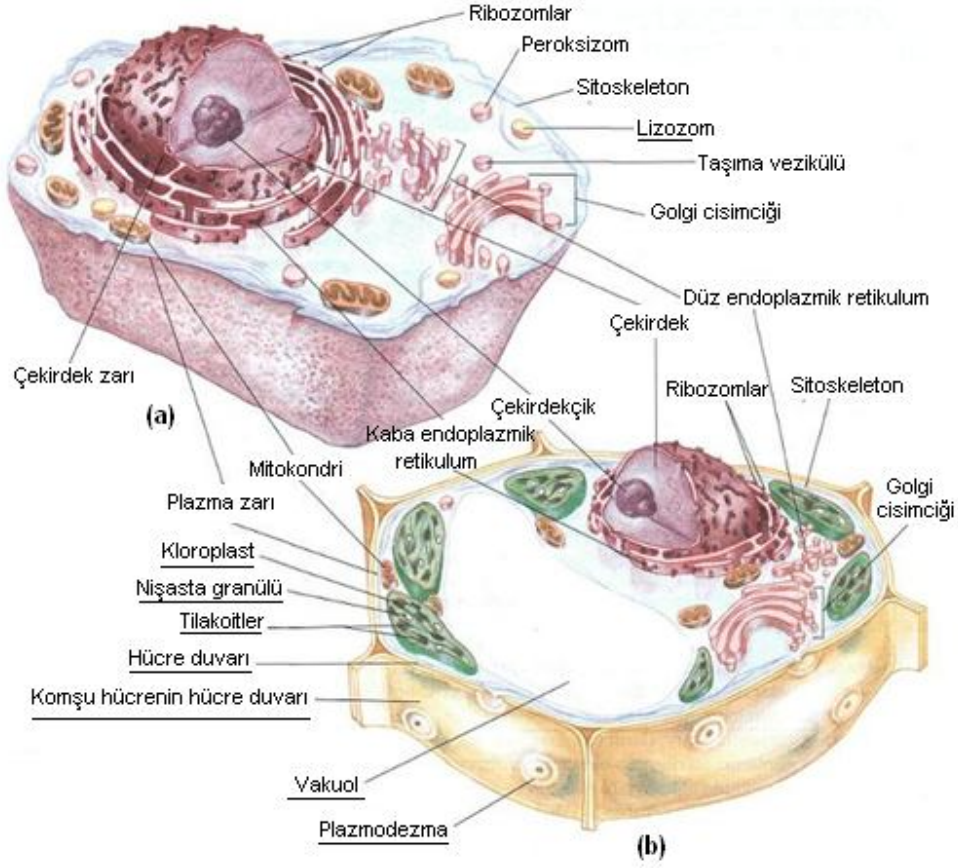
Bakteriler; şekillerine, boyanmalarına (duvar yapılarına) ve besinlerine göre sınıflara ayrılırlar. Bazı bakteriler şekillerine göre isimlendirilmekte ve sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.2). Küre şeklinde olanlara **kok**, çubuk şeklinde olanlara **basil**, burgu şeklinde olanlara ise **spiralla** denir.



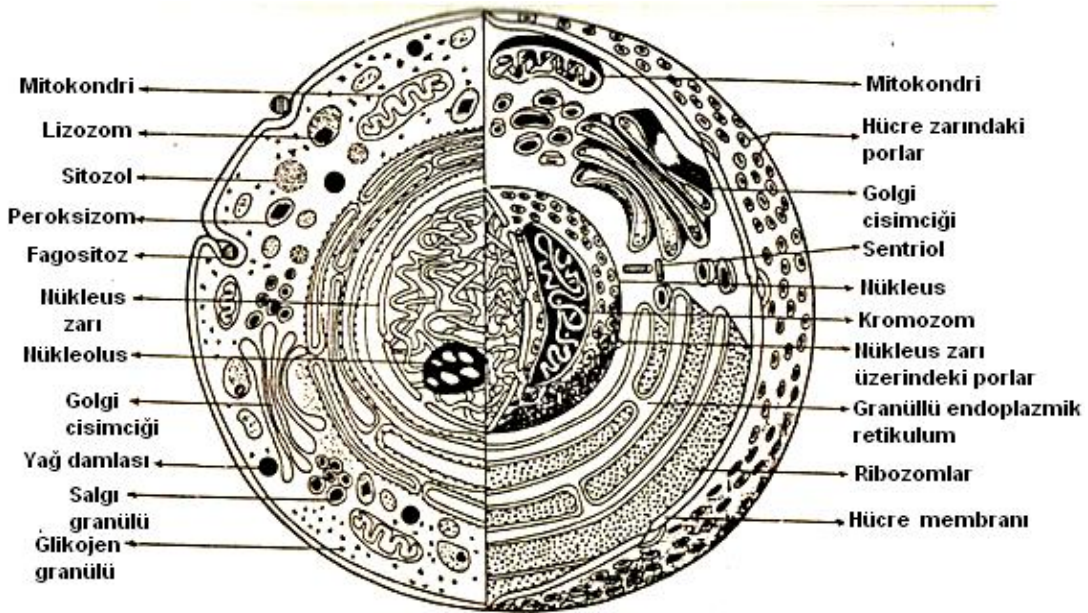
Şekil 2.2. Bazı prokaryotlar şekillerine göre isimlendirilmekte ve sınıflandırılmaktadır. Küre şeklinde olanlara kok, çubuk şeklinde olanlara basil, helezon şeklinde olanlara da spiralla adı verilmektedir. **(a)** *Staphylococci* (ağız, burun ve boğaz, insan cildi) **(b)** *E. coli* (bağırsak) **(c)** *Streptococci* (boğaz) **(d)** *Syphylis* (sifiliz yani frengi hastalığı bir bakteri çeşidinin neden olduğu, cinsel yolla bulaşan kronik bir enfeksiyondur).

2.3. ÖKARYOTİK HÜCRE YAPISI

Ökaryotik hücreler daha büyük, daha kompleks ve daha fazla çeşitlilik gösteren hücrelerdir. Tipik ökaryotik hücreler, prokaryotik hücrelerden çok daha büyüktür ve genelde çapları 5-100 µm arasında değişir. Örneğin karaciğerin başlıca hücresi olan hepatositlerin boyları yaklaşık 20-30 µm’dir. Ökaryotik hücrelerin en karakteristik özelliği iki katlı bir membranla çevrilmiş ve gayet iyi teşekkül etmiş bir nükleusa (çekirdek) sahip olmalarıdır. Ökaryotik hücrelerin oldukça kompleks bir içyapıları vardır. Ökaryotik hücrelerin prokaryotlardan diğer önemli bir farkı da mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği gibi bir membranla çevrili birkaç organelle sahip olmalarıdır. Bu organellerin her birinin hücre içinde farklı bir görevi bulunmaktadır (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4).



Şekil 2.3. Başlıca iki tip ökaryotik hücrenin şematik görünümü. (a) Bir hayvan hücresi (b) bir bitki hücresi örnekleridir. Bitki hücreleri genellikle 10-100 µm çaplarıyla, tipik olarak 5-30 µm arasında olan hayvan hücrelerinden büyüktür. Altı çizili yapılar, hayvan ya da bitki hücrelerine özgüdür.



Şekil 2.4. Bir hayvan hücresinin elektron mikroskobu düzeyindeki şematik şekli.

Ökaryotik hücrelerde bölünme daha karmaşık bir olay olan **mitozis** ile gerçekleşmektedir. Ökaryotik hücreler mitoz adı verilen 4 evreli (profaz, metafaz, anafaz ve telofaz) bir mekanizma ile çoğalırlar. **Mitoz**; bir ana hücreden onunla ve birbiriyle aynı sayıda kromozom taşıyan iki yavru hücre meydana gelmesidir. Mitoz öncelikle bir çekirdek bölünmesi ve onu takip eden sitoplazma bölünmesi şeklinde olur. Çok hücreli organizmada, erkek ve dişi eşey (cinsiyet) hücrelerinin birleşmesi ile (döllenme) meydana gelen **zigot** adı verilen tek hücreden, bir dizi mitoz bölünmelerle çok hücreli bir canlı meydana gelmektedir. Örneğin insanda, döllenmiş yumurtanın çok sayıda mitoz bölünme geçirmesiyle yaklaşık 100 trilyon hücreden oluşan yetişkin birey gelişir.

Yüksek organizasyonlu hayvanların, bitkilerin ve fungusların hücreleri ökaryotiktir. Bunun yanında pek çok tek hücreli organizmada ökaryotik hücreden meydana gelmiştir. Örneğin protozoa türleri, diatomalar, euglenoidler, mayalar ve bazı mantarlar bir hücreli ökaryotik organizmalardır. Ökaryotik hücreler, prokaryotlardan daha fazla özelleşmeye ve farklılaşmaya elverişlidirler. Böylece yaklaşık 3000 prokaryotik organizma türü varken milyonlarca ökaryotik hücre türü bulunmaktadır.

2.3.1. Ökaryot Hücrenin Kısımları ve Organelleri

Hücre başlıca üç kısımdan meydana gelmiştir:

- 1) Hücre membranı
- 2) Sitoplazma
- 3) Çekirdek (nükleus)

Ayrıca bu her bir kısım kendi arasında alt yapı şekilleri göstermektedir.

2.3.1.1. Hücre membranı:

Hücre membranı değişik düzeydeki organizmalara göre üç değişik yapıda bulunmaktadır.

- a) Hücre kılıfı (kapsülü)
- b) Hücre duvarı (çeperi)
- c) Hücre membranı

a) **Hücre kılıfı (kapsülü):** Bazı bakterilerde (örneğin bacillus anthracis–şarbon hastalığının etkeni) hücre duvarı dışında bir hücre kapsülü bulunmaktadır. Bu kapsül kaygan ve yapışkan bir polisakkarit olup; glukuronik asit ve glukoz ünitelerinin polimerleşmesi ile meydana gelmiştir. Hücre kapsülü oldukça sert ve dayanıklıdır. Bu kapsül bakteriyi zararlı etkenlerden korur ve hastalık yapma etkisini artırır.

b) Hücre duvarı (çeperi): Hücre duvarı (çeperi) hem bitkilerde hem de bakterilerde bulunmaktadır.

Bitki hücreleri etrafında bulunan hücre duvarı birbirini kesen polisakkarit liflerden oluşmuştur. Selülozdan meydana gelmiş olan bu lifler (iplikçikler) aynı çaptaki çelik telden daha dayanıklıdır. **Selüloz**, D-glukoz birimlerinin $\beta(1-4)$ glukozit bağı ile polimerleşmesi sonucu meydana gelmiştir. Selüloz yanında diğer polisakkarit ve glikoproteinden meydana gelmiş olan hücre duvarı bitkiye desteklik yapmakta ve yüzlerce kilo ağırlığı taşımaktadır.

Bakteri hücre duvarı bir glukoproteindir. Bakteri hücre duvarı polisakkaritlerin kısa peptit zincirleriyle çapraz bağlanması sonucu oluşan sağlam bir yapıdır. Böylece düz zincir polisakkaritten oluşurken; çapraz bağlanmalar da tetrapeptit ve pentapeptitler tarafından sağlanmakta ve bakteri duvarı meydana gelmektedir. Duvar yapısına göre 2 tip bakteri ayırt edilmektedir.

1) Gram pozitif bakteriler

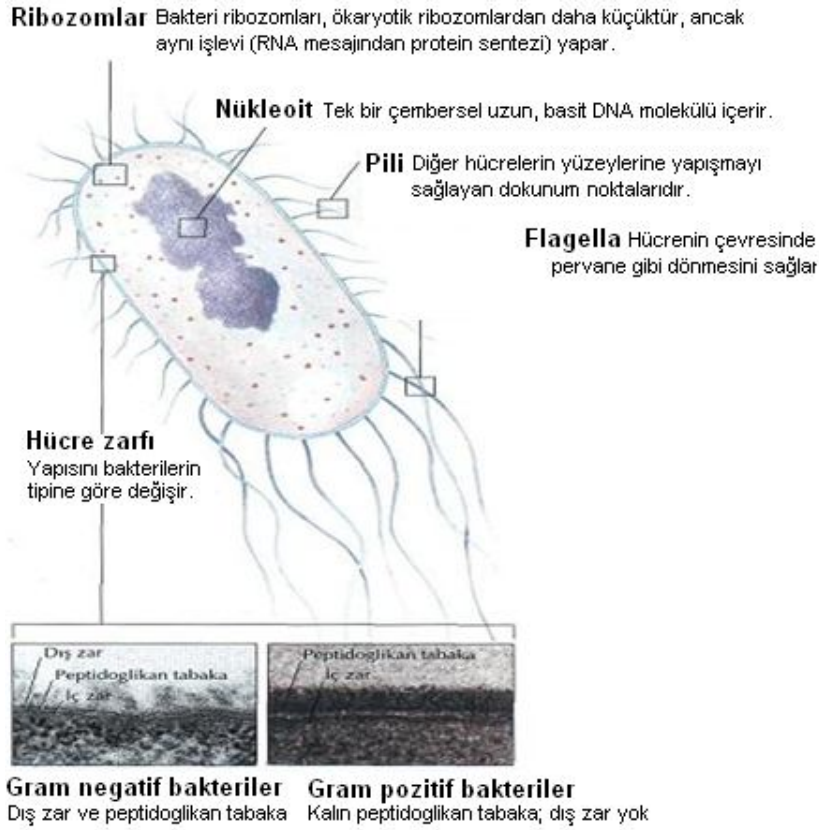
2) Gram negatif bakteriler

Bakteriler, önce kristal viyole ile daha sonrada iyot ile boyanacak ve boyanın fazlası alkol ile alınacak olursa iki tip bakteri görülmektedir (Şekil 2.5). Bunlardan, koyu mor-mavi boyananlar **gram pozitif bakteriler**; soluk mor-pembe boyananlar ise **gram negatif bakterilerdir**.

Gram pozitif bakterilerde; polisakkarit, protein ve teikoik asitten oluşmuş ve az miktarda lipid içeren kalın bir hücre duvarı bulunmaktadır. *Streptococcus albus* gram pozitif bir bakteridir.

Gram negatif bakterilerde ise, ince bir hücre duvarı ve bol miktarda lipopolisakkarit bulunmaktadır. *E. coli* hücresi gram negatif bir bakteridir.

Bakteriler, bu sağlam duvar sayesinde hipotonik çözeltiler içerisinde bile şişmeden ve patlamadan yaşamlarını sürdürebilmektedirler. O halde bitki ve bakteri hücre duvarları hücreye bir şekil vermekte ve bir direnç sağlamaktadır.

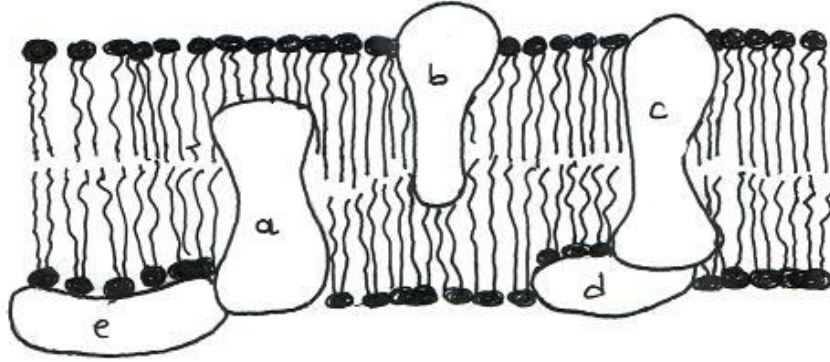


Şekil 2.5. Bakteri hücrelerinin ortak yapısal özellikleri. Hücre membranı yapısındaki farklılaşmalar nedeniyle, bazı bakteriler (gram-pozitif bakteriler) gram boyasını tutarken, diğer bakteriler (gram-negatif) tutmaz. *E. coli* gram-negatiftir.

c) Hücre membranı: Hücre membranı bütün hücrelerde sitoplazmanın etrafında bulunan bir membrandır. Bu membran hücreye şekil verir, hücrenin sınırlarını belirler ve seçici geçirgen bir bariyer görevi yapar. Hücreye ulaşan bütün kimyasal ve elektriksel bilgiler hücreye bu membran tarafından aktarılır. Örneğin; hormonlar (metabolik düzenleyiciler) ancak hücre membranındaki reseptörlere tutunarak aktivitelerini gösterirler. Birçok ilaç, hücre yüzeyine temas ederek etkisini gösterir. Enzimlerin pek çoğunun aktivitesi membranda gerçekleşir. Hücre yüzeyinde bulunan glikoproteinler hücreye antijenik özellik kazandırdığı gibi virüsler için de reseptörlük görevi yapmaktadırlar. Mesela kan hücresi olan alyuvarların (eritrositlerin) membran yapısında bulunan mukopolisakkaritler, **antijenik** (antikor oluşturan) özellik göstererek kan gruplarının tayin edilmesini sağlarlar. Hücre membranı, besin maddesi ve bazı tuzların hücre içine girişini ve artık maddelerin de hücre dışına atılmasını düzenlemektedir.

Hücre membranı ortalama olarak 75-100Å kalınlığındadır ve 8Å kalınlığındaki porlarla (gözenekler) kesiklik gösterir. Hücre membranının ana yapısı protein ve lipitten meydana gelmiş olup; yer yer proteinlere bağlı olarak karbonhidratlara da rastlanmaktadır (glukoprotein). Membran yapısında yaklaşık %40-50 lipid ve %50-60 oranında protein bulunmaktadır. Hücre membranı, iki lipid tabaka ve yer yer bu iki lipid tabakanın dışına

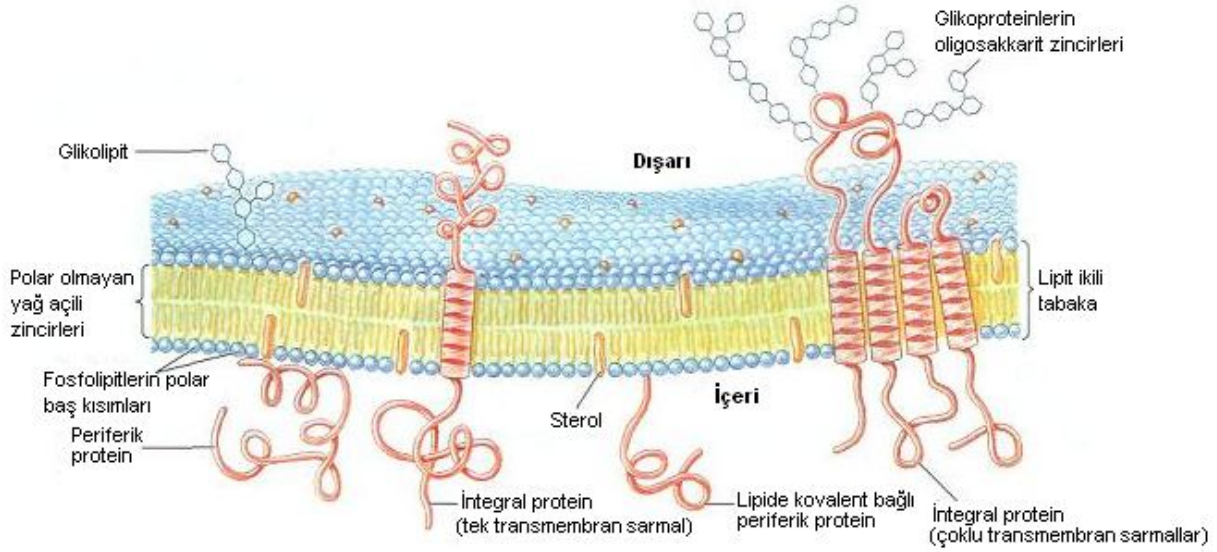
tutunmuş veya içine gömülmüş proteinlerden meydana gelmiştir (Şekil 2.6). Hücre membranında bulunan lipidlerin polar baş kısımları, membranın iki dış yüzüne dönük; polar olmayan ve genellikle 16–18 karbonlu hidrokarbon zincirleri ise membranın içine dönüktür. Membran yapısında yer alan lipidlerin çoğunluğunu fosfolipidler oluşturmaktadır. Hücre membranının dış ve iç yüzüne tutunmuş proteinlere **periferal proteinler**, iki lipid tabaka içerisine gömülmüş veya bir taraftan diğer tarafa membranı delip geçen proteinlere ise **integral proteinler** denir. Membran tarafından yürütülen dinamik fonksiyonlardan bu membran proteinleri sorumludur.



Şekil 2.6. Biyolojik membranların akışkan-mozaik modeli. a, b, c integral protein; d, e periferel proteinlerdir.

2.3.1.1.1. Biyolojik Membranın Akışkan–Mozaik Modeli

Son yıllarda yapılan çalışmalar biyolojik membranların, statik ve rijid bir yapıda olmadığını ortaya koymuştur. Membran lipid ve proteinlerinin membran düzleminde hızla difüze oldukları göstermiştir. Membran lipid ve proteinlerinin bu difüzyon özelliklerinden yola çıkarak S. Jonathan Singer ve Garth Nicolson 1972 yılında biyolojik membran yapısı için akışkan mozaik modelini önermişlerdir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Membran yapısı için akışkan-mozaik modeli. Membranların iç kısmında bulunan yağ açil zincirleri, sıvı, hidrofobik bir bölge oluşturur. İntegral proteinler polar olmayan aminoasit yan zincirleri ve hidrofobik etkileşimlerle tutunarak lipid denizinde yüzerler. Hem proteinler hem de lipidler ikili tabaka düzleminde serbest bir şekilde yana doğru hareket eder fakat ikili tabakanın bir yüzünden diğerine geçiş kısıtlanmıştır. Plazma membranının bazı protein ve lipidlerine tutunmuş olan karbohidrat kısımları, membranın hücre dışı yüzüne çıkmıştır.

Bu modele göre membranların ana yapısı ve bütünlüğünü oluşturan yapısı iki tabaka polar lipitten meydana gelmektedir. Polar lipid tabakalarının polar olan baş kısımları, membranın iki dış yüzüne dönük, 16-18 karbonlu doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oluşan hidrofobik yan zincirleri membranın içine dönük olup hücrenin normal sıcaklığında akıcıdır. Önerilen bu modelde integral membran proteinleri iki lipid tabaka içine gömülmüş veya bir taraftan diğer tarafa membranı delip geçmiştir. İntegral membran proteinlerinin yüzeyinde hidrofobik yan zincirli aminoasitler yer almakta ve bu iki lipid tabakanın ortasındaki hidrofobik bölge ile bütünlük oluşturmaktadır. Periferik membran proteinleri yüzeylerinde, hidrofilik yan zincirleri olan aminoasitler bulunmakta, lipidlerin polar baş kısımları tarafından elektrostatik olarak çekilmekte ve bir arada tutulmaktadır. Enzimleri ve taşıma sistemlerini de içeren integral membran proteinleri hidrofobik lipid tabakasının içerisinde üç boyutlu yapı (konformasyon) kazanmakta ve aktivite göstermektedir. Membran protein ve lipidleri arasında bir kovalent bağ söz konusu değildir. Bu modeli destekleyen birçok deneysel bilgi mevcuttur. Kimyasal ve elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar bu modeli desteklemektedir.

2.3.1.1.2. Akışkan Mozaik Modelin Özellikleri

Membranların çoğunda glikolipidler ve fosfolipidler ikili tabaka bulunur. Bu ikili lipid tabakanın iki görevi vardır.

a) Proteinler için çözücüdür, **b)** Geçirgenlik engelidir.

Membran lipidlerinin az bir kısmı membran proteinleri ile etkileşir ve bu durum membran proteinlerinin aktiviteleri için gereklidir.

Membran proteinleri membran düzleminde yana doğru (lateral) difüze olabilirler fakat membranın bir yüzünden diğerine dönemezler.

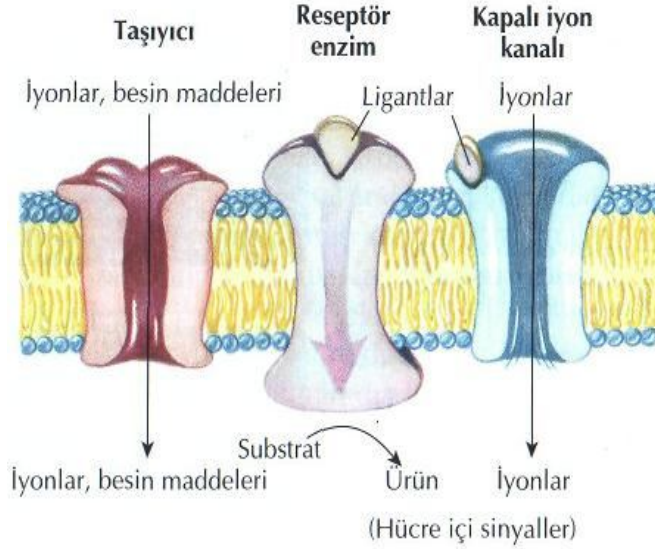
Glikoprotein ve glikolipidlerin şeker birimleri (karbohidrat) her zaman membranların dış yüzeyinde yer alır. Hücre yüzeylerindeki karbohidratlar hücrelerin birbirini tanınmasında önemli rol oynarlar. İntegral ve periferel proteinlerin membrandaki yerleşimleri, hem de glikoprotein ve glikolipidlerin şeker birimlerinin membranın dışına bakmaları, bütün membranların iç ve dış yüzeylerinin asimetric olduğunu göstermektedir. Son yapılan çalışmalar periferel proteinlerin yalnızca membranın sitoplazmaya bakan yüzüne yapışmış olduğunu göstermektedir.

Singer ve Nicolson tarafından önerilen Akışkan mozaik model, membranın pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini açıklamaktadır. Bu nedenle lipid ve proteinden meydana gelmiş membranın akla en yakın yapısı önerildiği için de pek çok kimse tarafından kabul görmüştür.

2.3.1.1.3. Plazma Membranı Taşıyıcılar ve Reseptörler İçerir

Hücrenin dış yüzeyi diğer hücrelerle, hücre dışı sıvı ve bu sıvı içinde çözülmüş maddeler, yine bu sıvıdaki besin molekülleri, hormonlar, nörotransmitterler ve antijenlerle temastadır. Tüm hücrelerin plazma membranlarında, yapıları protein olan, membranda yerleşik birçok **taşıyıcı** bulunmakta; besinler bunların aracılığıyla hücre içine taşınırken çeşitli ürünler de dışarı atılmaktadır. Hücreler, hücre dışı sinyal moleküllerinin (reseptör ligantları) bağlanmaları için dış yüzeyde yerleşik membran proteinlerine (**sinyal reseptörleri**) sahiptir. Bir dış ligant, membrandaki özgül reseptörüne bağlandığında; reseptör protein, ligant molekülünün taşıdığı sinyali hücre içine aktarır (Şekil 2.8). Örneğin, bazı dış yüzey reseptörleri, reseptör işgal edildiğinde açılan **iyon kanallarıyla** ilişkilidir; özgül iyonların girişine izin verir, diğerleri membranın iç yüzeyindeki enzimleri aktiveleştirir ya da inhibe eder. **Sinyal aktarım** tarzı ne olursa olsun, yüzey reseptörleri tipik olarak, sinyal yükseltgeçleri gibi davranır. Reseptörüne bağlanan bir sinyal molekülü, açılmış bir kanaldan binlerce iyonun akışına neden olabilir.

Bazı yüzey reseptörleri, düşük molekül ağırlıklı olan ligantları tanırken, diğerleri makromolekülleri tanımaktadır. Örneğin, asetilkolinin reseptörüne bağlanması, kas kasılması için sinyallerin iletimini belirleyen bir dizi hücresel olayı başlatır. Lipidleri taşıyan kan molekülleri olan lipoproteinler, hücre içine lipid girişini sağlayan özgül hücre yüzey reseptörlerince tanınır. Antijenler (immün sistem tarafından yabancı olarak kabul edilen proteinler, virüsler ya da bakteriler) özgül reseptörlerine bağlanarak antikorların üretimini başlatır. Bu bakımdan bir hücrenin yüzeyi, dış sinyal almak, yükseltmek ve cevap vermek gibi çok özgül "moleküler antenlerin" farklı çeşitlerini kapsayan karmaşık bir mozaik görünümündedir.



Şekil 2.8. Plazma membranındaki proteinler, taşıyıcılar, sinyal reseptörleri ve iyon kanalları şeklinde görev yapar. Taşıyıcılar maddeleri hücre içine ya da dışına taşır. Bazı taşıyıcılar, iyonlar ve bileşikler konsantrasyon gradientine karşı pompalamak için enerji kullanır. Hücre dışı sinyaller reseptörlerce yükseltilir. Bir ligant molekülünün yüzey reseptörüne bağlanması pek çok sayıda hücre içi elçi molekülünün ortaya çıkmasına ya da açılan bir kanaldan birçok iyonun akmasına neden olur.

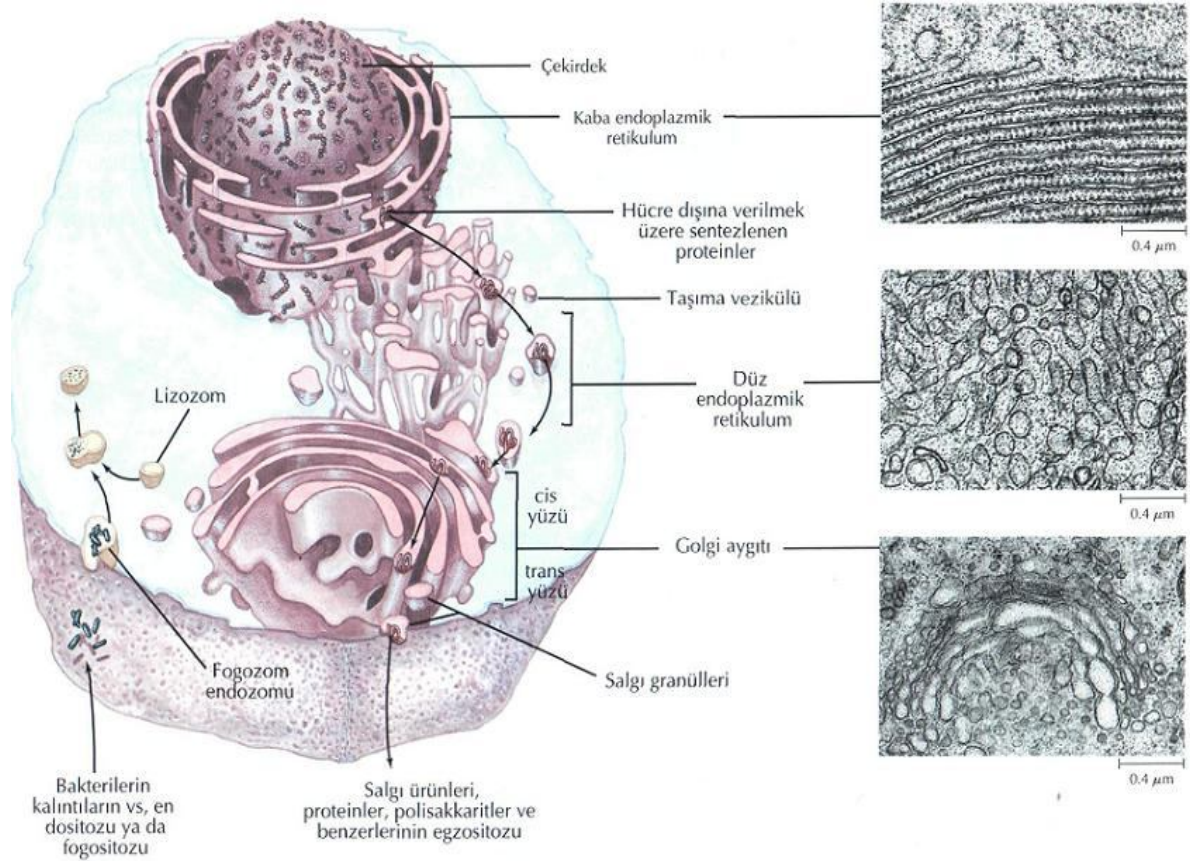
2.3.1.1.4. Endositoz ve Egzositoz Plazma Membranındaki Trafik Yürütür

Maddeler hücre içine ve dışına yalnızca hücre membranının içerisinden geçerek taşınmazlar. Hücre membranı ile birlikte hareket ederek de taşınırlar. Proteinler, virüsler ve diğer mikroorganizmalar gibi daha büyük tanecikler de bazı koşullarda hücre içerisine girerler ve çıkarlar. Bu durumda plazma membranından geçiş, hücre membranı ile birlikte olmaktadır.

Endositoz, hücrenin çevresindeki ortamın bileşiklerinin sitoplazmanın iç kısımlarına taşınma mekanizmasıdır. Bu süreçte plazma membranının bir bölgesi içeri doğru çöküntü yapar, hücre dışı sıvının küçük bir hacmi bu çöküntü içinde kalırken çevresi membranla çevrilir ve sonraki aşamada ise membranların birleşmesiyle hücre içine alım gerçekleşir. Ortaya çıkan küçük vezikül (endozom) hücrenin içine doğru hareket eder, içindekini membranların kaynaşmasıyla tek membranla çevrili bir diğer organelle (örneğin, lizozom) verir (Şekil 2.9). Böylece endozom, plazma membranının bir hücre içi uzantısı şeklinde görev yapar; hücre dışı ortamın bileşenleriyle, sitoplazmanın difüzyon yoluyla ulaşamayan iç kesimleri arasında etkin yaklaşmayı sağlar. **Fagositoz** özel bir endositoz olup; hücre içine taşınan madde, bir hücre parçası hatta daha küçük bir diğer hücre gibi taneciklerdir. Fagositoz

büyük ölçüde nötrofiller, monositler ve makrofajlar (monositlerden türeyen doku hücreleri) tarafından başarılır.

Endositozun tersi **egzositoz**dur. Sitoplazma içindeki bir vezikül plazma membranına doğru hareket eder ve onunla kaynaşır. Sonra içindekileri membranın dışına bırakır. Hücre dışına salgılanmak üzere yola çıkan birçok protein, salgı granülleri adı verilen veziküllerde paketlenir ve sonra egzositoz ile hücre dışına atılır.



Şekil 2.9. Endomembran sistemi. Bu sistem; çekirdek membranı, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve çeşitli tipte küçük vezikülleri kapsar. Sitosolden farklı bir bölümü (lümen) çevreler. Lümenin içeriği, bir endomembran sistemden diğerine, bir bileşenden kopan küçük taşıma vezikülleriyle birleşerek hareket eder. Endomembran sistemi dinamiktir; yeni sentezlenmiş proteinler kaba endoplazmik retikulumun lümenine ve dolayısıyla düz endoplazmik retikulumun lümenine ve sonra taşıma vezikülleri aracılığıyla golgi aygıtına hareket eder. Golgi aygıtının cis- yüzü çekirdeğe bakar, trans- yüzü ise plazma membranına yakındır.

2.3.1.2. Sitoplazma

Sitoplazma içinde pek çok organel ve yapı yer almış bulunmaktadır. Bu organel ve yapıları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz.

Endoplazmik retikulum (ER)

Ribozomlar
Mitokondriler
Golgi organeli (Golgi cisimciği)
Lizozomlar
Peroksizomlar (Mikro cisim)
Sentriol

Plazma membranı ile çevrili sitoplazma, sulu bir çözelti olan sitosol ve çeşitli çözünmüş parçacıklardan oluşur. Sitoplazma basit seyreltik sulu bir çözelti değildir. Sitoplazma karmaşık içerikli jele benzer çok yoğun bir sıvıdır. Sitoplazmada çeşitli makromoleküller ve binlerce küçük organik molekül bulunmaktadır. **Metabolitler** adı verilen bu küçük moleküllerden aminoasitler ve mononükleotidler gibi bazıları hücrelerde yapı taşı olarak görev yapmaktadırlar. Sitoplazmanın sitosolünde pek çok metabolik olay meydana gelmektedir. Örneğın glikoliz metabolik yolu sitoplazmanın sitosolünde gerçekleşir. Glikolizde glukoz molekülü 10 enzimatik reaksiyon basamağında pirüvata dönüşmektedir

Sitoplazmada çözünmüş olarak; pek çok enzim ve koenzimler, RNA ve enerji transferinde rol oynayan ATP ve ADP de bulunmaktadır. Sitosolde aynı zamanda K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cl^- , HCO_3^- gibi bazı önemli inorganik iyonlarda bulunmaktadır. Bazı ökaryotik hücre sitoplazmalarında özellikle karaciğer ve kas hücrelerinde bulunan glikojen granülleri, enerji deposu olarak görev yaparlar. Bazı ökaryotlarda yağ damlalarına da rastlanmaktadır.

2.3.1.2.1. Endoplazmik retikulum (ER)

Endoplazmik retikulum proteinlerin ve lipidlerin sentezini düzenler. Hemen hemen bütün ökaryotik hücrelerde, membrandan başlayarak çekirdeğe doğru yerleşmiş girintili çıkıntılı (labirentli) membran kanallarıdır. ER içerisinde etrafı bir membranla çevrili keseciklere (veziküllere) **sisterna** adı verilmektedir. Sisternalar çoğu zaman hücre içine giren maddelerin kanallar boyunca taşınmasını sağlamaktadır. Bazı hücrelerde de hücre materyalin depolanma bölgesi olarak görev yapmaktadır. İnsülin hormonu salgılayan pankreatik hücreler gibi protein salgılamak için özelleşmiş hücrelerde ER özellikle dikkat çekicidir (Şekil 2.9).

Kaba (granüllü) ER üzerinde ribozomlar bulunmaktadır. Hücre dışına verilecek proteinlerin sentezini yapan ribozomlar, ER dış yüzeyine bağlanır ve sentezlenen salgı proteinleri E.R. sisternaları içine gönderilir (Şekil 2.9). Lizozomlar içine sevk edilecek sindirim enzimleri ve plazma membranının yapısına girecek olan proteinler de ER üzerindeki ribozomlarda sentezlenir. Sitosol içinde kullanılacak ve işlev görececek proteinler ise, ER bağlantılı olmayan (serbest) sitoplazmik ribozomlarda sentezlenir.

Hücrenin diğer kesimlerinde ribozom taşımayan **düz endoplazmik retikulum** bulunur. Fiziksel olarak granüllü (kaba) ER nin devamı olan düz ER'ler, lipidlerin, bazı ilaç ve toksik bileşiklerin metabolizmalarını da içine alan diğer önemli süreçlerin gerçekleştiği yerlerdir. Bazı dokularda; örneğin iskelet kasında, düz ER Ca^{+2} iyonlarının depolanması ve hızlı salınması için özelleşmiştir. Ca^{+2} salınımı, kas kasılması gibi birçok hücrel olayın tetikleyicisidir.

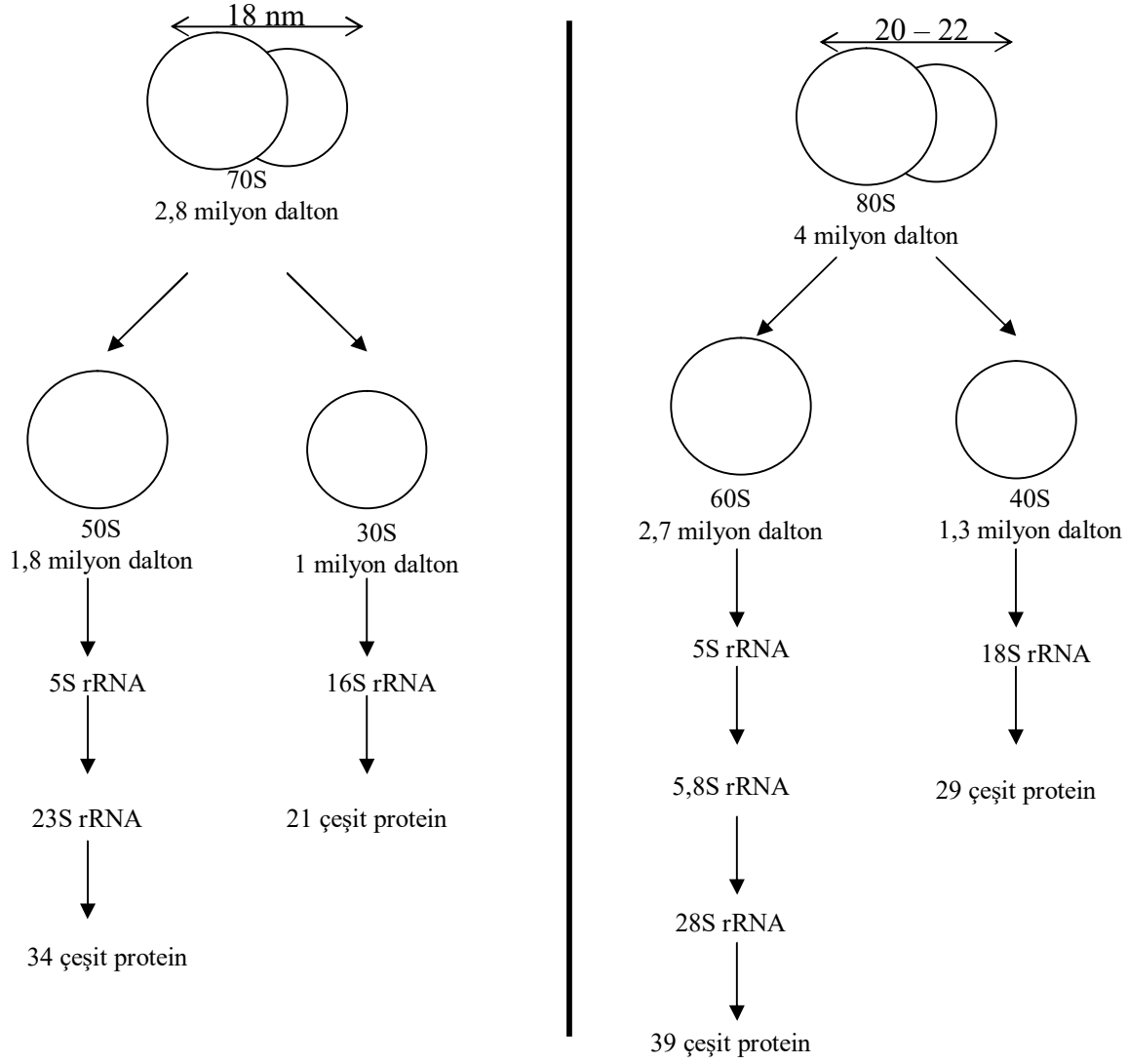
2.3.1.2.2. Ribozomlar

Ribozomlar hücrede protein sentezinin yapıldığı merkezlerdir. Ribozomlar yapı bakımından supramolekül fakat işlev bakımından organeldir. Ribozomlar, protein ve ribozomal RNA'dan meydana gelmiş bir yapı olup iki alt ünitesi bulunmaktadır. Prokaryotik hücrelerde ribozomun % 65'i ribozomal RNA'dan, % 35'i proteinden meydana gelmiştir. *E. coli* hücrelerinde yaklaşık 15 bin ribozom bulunmaktadır.

Proteinlerin sedimentasyon hızı 1–20S iken; nükleik asitlerin 4–100S' dir. 1×10^{-13} saniyelik sedimentasyon hızı 1S (Swedberg ünitesi; S) dir.

E. coli hücrelerinde bütün bir ribozomun uzunluğuna boyu 18 nm ve 2.8 milyon dalton molekül ağırlığında olup **sedimentasyon** (çökelme) hızı 70S'dir. Ribozomunun büyük alt ünitelerinin sedimentasyon hızı 50S ve molekül ağırlığı 1.8 milyon daltondur. Küçük alt ünitelerinin sedimentasyon hızı 30S ve molekül ağırlığı 1 milyon daltondur (Şekil 2.10).

Ökaryotik hücrelerde ribozomların uzunluğuna boyları 22 nm, sedimentasyon hızları 80S ve molekül ağırlıkları 4 milyon Dalton'dur. Türden türe farklılık göstermekle birlikte genellikle büyük alt ünite 60S, molekül ağırlığı 2.7 milyon dalton ve küçük alt ünite ise 40S, molekül ağırlığı 1.3 milyon Dalton' dur.



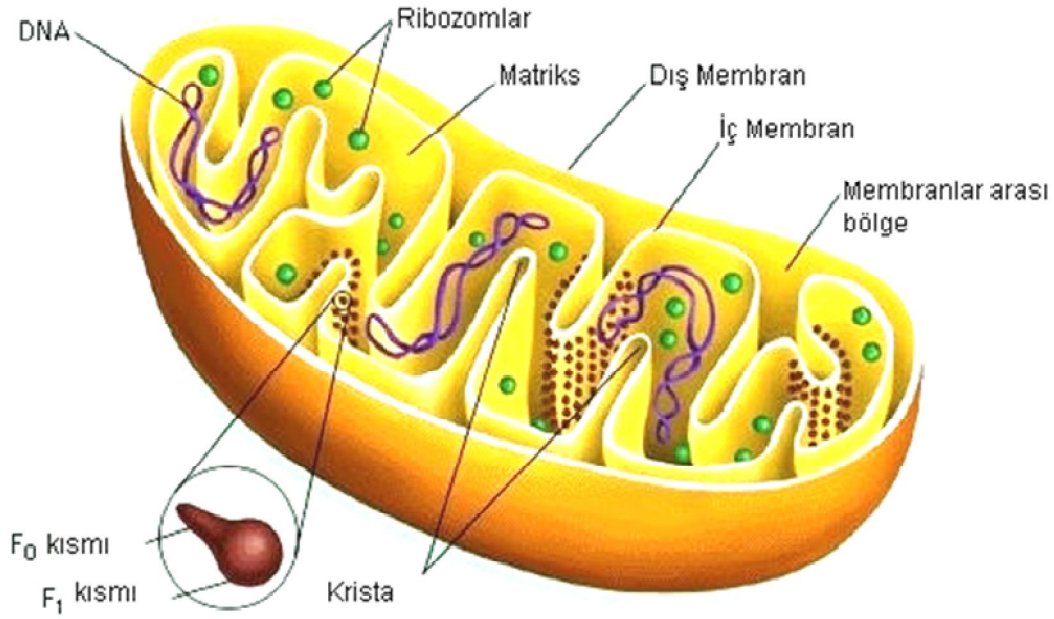
Prokaryotik Ribozom Organeli

Ökaryotik Ribozom Organeli

Şekil 2.10. Prokaryotik ve ökaryotik hücre ribozomlarının alt ünite yapıları, ribozomal RNA çeşitleri ve protein sayısı

2.3.1.2.3. Mitokondriler

Mitokondriler, aerobik ökaryot hücrelerin enerji santralleridir. Mitokondriler hücrede bulunan ikinci büyük organeldirler. Mitokondriler, bütün bitkisel ve hayvansal hücrelerde bulunmaktadır. Mitokondrilerin boyları, şekilleri, sayıları ve hücrede bulunduğu bölgeler türden türe, hücreden hücreye farklılık göstermektedir. Genellikle uzun bir kavunu andırmaktadırlar ve çapları 0.5–1 µm, uzunlukları ise 1–10 µm kadardır (Şekil 2.11). Örneğin ökaryotik hücrelerden sperma hücresi ve maya hücresi yalnızca birkaç büyük mitokondriye sahipken, kalp kası hücresinde binlerce mitokondri bulunmaktadır.



Şekil 2.11. Mitokondrinin yapısı

Her mitokondride başlıca iki membran bulunmaktadır (Şekil 2.11). Dış membran düzdür ve mitokondriyi tamamen sarmıştır. Dış membran, fosfolipid ve kolesterolce zengin iki tabaka lipit ve aynı orandaki proteinden meydana gelmiştir. Dış membran yapısındaki proteinlerin bazıları enzim aktivitesi göstermektedir. Örneğin; Yağ asidi zinciri uzama sistemi enzimleri dış membranda yer almaktadır.

İç membran mitokondri içine doğru bir takım çıkıntı ve kıvrımlar yapmıştır. Bunlara **krista** adı verilmektedir. Elektron taşıma sistemi (ETS) ve oksidatif fosforilasyon olayını başaran enzimler, iç membran ve krista üzerinde bulunmaktadır. Dış ve iç membranlar arası bölgede de bazı enzimler bulunmaktadır.

Mitokondrinin içi viskoz ve yarı koloidal bir sıvı ile doludur ve **matriks** adını almaktadır. Matriks de DNA, RNA ve enzimler bulunmaktadır. Mitokondri matriksinde TCA çevrimi (trikarboksilli asit çevrimi) ve yağ asitlerinin oksidasyonu enzimleri yer almış bulunmaktadır. Her mitokondrinin kendi DNA, RNA ve ribozomları vardır. Mitokondri ve kloroplast ribozomları genel yapı ve büyüklük bakımından, RNA dizileri yönünden ökaryot hücrelerin ribozomlarından çok bakterilerinkine benzemektedir. Eğer bu ribozomlar gerçekten erken dönem bakterilerin torunları ise, serbest yaşayan bakteri atalarında bulunan genlerin bir kısmı konakçı ökaryot hücrenin çekirdek DNA'sına transfer edilmiş olmalıdır.

Mitokondri enzimleri oksijenli solunumla organik bileşiklerin CO₂ ve H₂O'ya yükseltgenmelerini katalizler. Bu enzimlerin bazıları mitokondri iç membranında bazıları da matriksde bulunmaktadır. Mitokondrilerdeki oksidasyonla salınan enerji, hücrelerin başlıca

enerji taşıyan molekülü olan ATP' nin sentezinde kullanılır. Aerobik hücrelerde mitokondriler, ATP'nin başlıca üretim yeridir. ATP hücrenin diğer kısımlarına geçerek hücrel iş için gerekli serbest enerjiyi sağlar. Hücreler ATP enerjisini; mekanik iş, biyosentez ve taşıma işi vb. olaylarında kullanılır.

Ökaryotik hücrelerdeki genetik bilginin tamamı kromozomal DNA tarafından taşınmaktadır. Mitokondri DNA'sı tarafından kodlanan ve yine bu bölgede sentezlenen proteinler, mitokondri proteinlerinin %5'ini teşkil eder. Mitokondri DNA'sı mitokondri iç membranına özgü bazı proteinleri şifreler. Mitokondriler, lizozomlar ve golgi organelinin aksine daha önce var olan mitokondrilerin bölünmesiyle meydana gelir.

2.3.1.2.4. Golgi organeli (Golgi cisimciği)

Bu organel, tanımlayıcısının adından dolayı golgi organeli denilmektedir. Golgi organeli proteinleri işler ve ayırır. Tüm ökaryot hücrelerinin yassı yığınlar şeklinde dizili, keseler (veziküllerden) sisteminden oluşan golgi organelleri vardır. Golgi organeli, endoplazmik retikulumun devamı gibi görülmekte ve endoplazmik retikuluma meydana geldiği kabul edilmektedir. Kaba (granüllü) endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlarda sentezlenen proteinler, ER sisternasının lümenine (iç kesimine) geçer. Yeni sentezlenen bu proteinleri içeren küçük veziküller ER' den koparak golgi organelinin cis yüzüyle kaynaşır. Proteinler golgi organelinin içinden geçip trans yüzüne ulaşırken organelin içindeki enzimler, protein moleküllerinin değişikliğe uğramalarına neden olur. Proteinler golgi organelinde depo edilip paketlenmekte ve üç boyutlu yapılarını burada kazanmaktadırlar. Proteinler üç boyutlu yapılarını kazanmadan biyolojik aktivite gösteremezler. Sentezlenen proteinler olgun salgı granülleri haline geldikten sonra etrafı tek katlı bir membranla çevrili taşıma vezikülü içinde golgi organelinin trans yüzünden ayrılan proteine gideceği yerin adresi verilir. Bazı proteinler taşıma vezikülleri içinde kalır ve sonundan egzozitozla hücreden ayrılır. Diğer bazı proteinler ise lizozom gibi hücre içi organellere ya da hücre büyümesi sırasında plazma membranının yapısına katılır. Golgi organeli özellikle salgı yapan hücrelerde (pankreatik hücreler) çok sayıda bulunmaktadır.

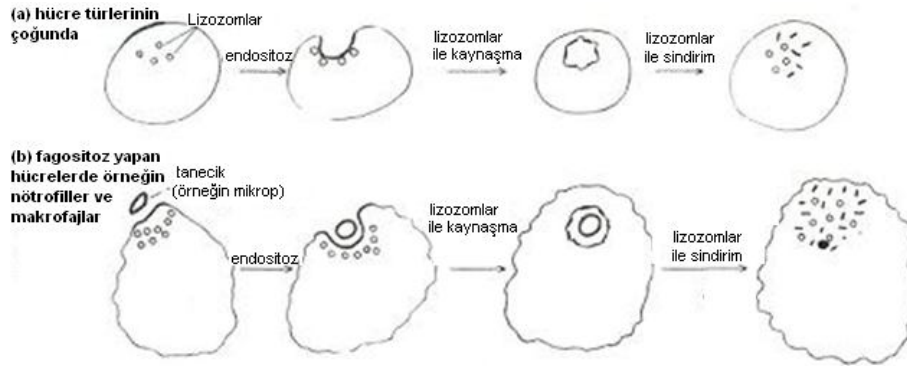
2.3.1.2.5. Lizozomlar

Lizozomlar hücrenin sindirim merkezleridir. Sitoplazmada etrafı bir membranla çevrili ve çapları 0,4-0,9 µm arasında değişen kesecikler (veziküller) bulunmaktadır. Hidrolitik ve yıkıcı enzimleri içeren bu keseciklere **lizozom** adı verilir. Lizozomların, Golgi organelinden meydana geldiği kabul edilmektedir. Lizozom bütün hayvansal hücrelerde özellikle karaciğer, böbrek ve akyuvar (lökosit) lerde bulunur, sadece alyuvarlarda (eritrosit) bulunmaz.

Lizozomların içinde bulunan; **proteazlar, nükleazlar, glikozidazlar, lipazlar, fosfolipazlar** ve **fosfatazlar** gibi enzimler sırasıyla proteinlerin, nükleik asitlerin, polisakkaritlerin, lipidlerin, fosfolipidlerin ve fosfatların hidrolizini katalizlemektedirler. Bu enzimler hücrede bulunmasına ihtiyaç duyulmayan maddeleri hidrolizleyerek daha küçük molekülleri oluşturur ve tekrar sitoplazmaya aktarırlar. Kısaca lizozomlar hücrenin sindirim merkezleridir.

İnsanlarda rastlanan genetik bir hastalık (Tay–Sachs hastalığı) lizozomların fonksiyon bozukluğundan ileri gelmektedir. Bu hastalığı taşıyan kimselerde lipid hidroliz eden enzimlerde (lipaz, fosfolipaz) bir bozukluk vardır. Bu bozukluk sonucu olarak, beyin ve diğer dokularda lipid birikimi olmaktadır ve bunun sonucu zeka geriliği ortaya çıkmaktadır.

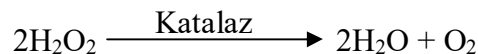
Akyuvarların (lökositlerin) görevi enfeksiyon ile savaşmak ve enfeksiyonu önlemektir. Bütün akyuvarlar kemik iliğinden sentezlenir. Nötrofiller, monositler ve makrofajların ana görevleri fagositozla ilgilidir (Nötrofiller: Nötür boyalara afinite gösteren hücre veya dokular, Monositler: Akyuvarların en büyüğü (12-25 μm çaplı), çekirdeği tekdir. Normal kanda lökositlerin %4-10 u arasında bulunur). Bu hücrelerde, içlerine aldıkları maddeleri düşük molekül ağırlığındaki bileşiklere parçalayan lizozomlar bulunur. Hastalık yapan (patojen) bakteriler veya virüsler fagositozla hücre içine alındığında lizozomlarda hidrolitik ve yıkıcı enzimler tarafından parçalanırlar (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Lizozomlar ile sindirim. (a) Hücre bileşenlerinin örneğin, hücre membranının sindirimi, (b) Hücre dışı maddelerin örneğin, mikrobun sindirimi; aynı zamanda hücre membranının bir bölümünün de sindirildiğine dikkat edilmelidir.

2.3.1.2.6. Peroksizomlar (Mikro cisimleri)

Hemen hemen bütün hücrelerde, oksidatif fonksiyon gören ve bir membranla çevrili, çapları 0,3–1,5 μm arasında değişen veziküllere **peroksizom** denir. H_2O_2 'i yıkan enzimi içerdiği için peroksizom adını almıştır. Peroksizomlar içinde bulunan proteinlerinin %40'ını H_2O_2 'in parçalanmasını katalizleyen **katalaz** enzimini oluşturmaktadır.



Mitokondri iç membranında, elektron taşıma sisteminde (ETS), elektronların O₂'e aktarılması her zaman tam olmaz ve oksijenin kısmi indirgenmiş ürünleri olan süperoksit radikali (O₂⁻) ve H₂O₂ oluşur.

Hücre içindeki yükseltgenme reaksiyonları moleküler oksijenin H₂O₂'ye dönüşmesini sağlar. H₂O₂, hücrenin bütün makromoleküllerini yükseltgeyerek biyolojik aktivitelerini yok (inaktive) eder. Katalaz enzimi, makromolekülleri H₂O₂'in yıkıcı etkisinden korur. Peroksizomlar görevlerini yapamazsa; oksijen radikalleri ve H₂O₂, hücreye zarar verirler. Böylece hücrenin yaşlanmasına ve kanser oluşumuna neden olurlar.

Gliksizomlar, bazı bitki hücrelerinde bulunan özelleşmiş peroksizomlardır. Gliksizomlar, tohum çimlenmesi sırasında yağları, karbohidratlara çeviren bazı bitkilerde gliksilat çevrimi metabolik yolunun enzimlerini bol miktarda içerir. Lizozomlar, peroksizomlar ve gliksizomlar mikro yapılar olarak bilinir.

2.3.1.2.7. Sentirol

Hayvan ve bazı ilkel bitki hücreleri nükleusu yanında veya nükleusa bitişik koyu boyanan **sentirol** adı verilen iki küçük organelle sahiptirler. Sentioller hücre bölünmesi sırasında kutuplara çekilerek iğ ipliklerinin tutunmasını sağlamaktadırlar. İğ iplikleri diğer uçları ile de kromozomlara yapışarak kutuplara doğru çekilmesini sağlamaktadırlar.

2.3.1.3. Çekirdek (nükleus)

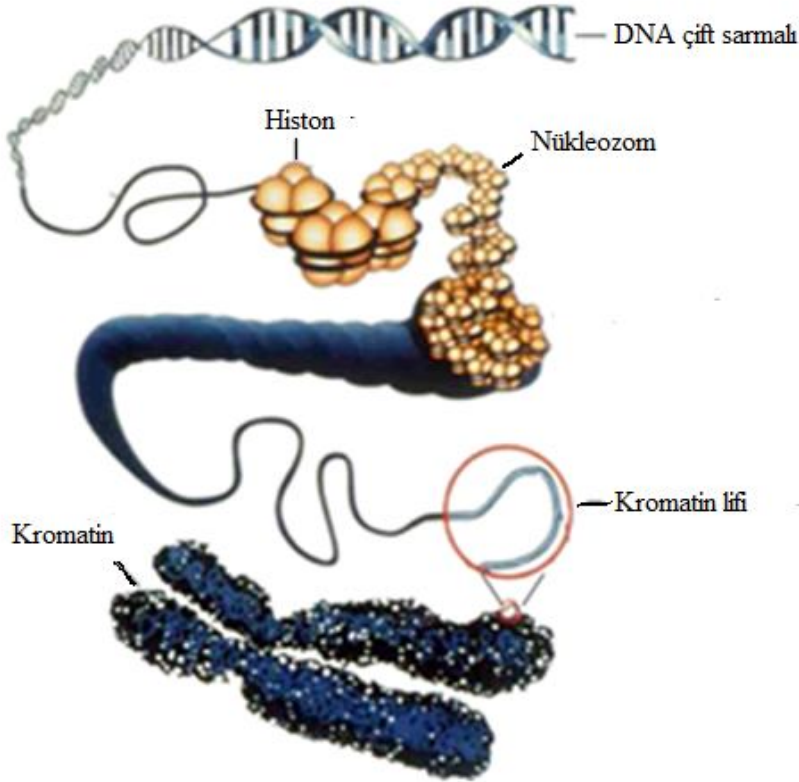
Ökaryotik hücrelerdeki çekirdeklerin hemen hemen hepsi DNA içermektedir. Ökaryotik hücrelerdeki genetik bilginin tamamı çekirdekteki **kromozomal DNA** tarafından taşınmaktadır. Gerek hayvan gerekse bitki hücrelerinin nükleusu, bir ara bölge içeren iki tabaka membranla sarılmıştır. Bu membranlar üzerinde porlar vardır. Bu porların çapı yaklaşık olarak 90 nm olup; bu porlardan çekirdeğe madde geçişi olmaktadır. Nükleus sitoplazmasına **nükleoplazma** adı verilmektedir. Nükleoplazma genellikle protein bakımından oldukça zengindir ve bu proteinlerin çoğunu enzimler teşkil etmektedir.

Nükleus içinde çok miktarda RNA içeren ve daha koyu boyanan **nükleolus (çekirdekçik)** yer almaktadır. Çekirdek içinde özel bir bölge olan çekirdekçikte, ribozomal RNA'yı şifreleyen genlerin kopyalarını içeren DNA bulunur. Hücrenin çok sayıda ribozoma ihtiyacı olduğunda, bu genler sürekli olarak RNA'ya yazdırılır. Çekirdekçik içinde oluşan ribozomal RNA, sitoplazmaya geçer. Kısaca çekirdekçik aynı zamanda ribozom sentezinin başladığı yerdir.

Nükleusun geri kalan kısmını kromatin oluşturmaktadır. Çekirdeğin ana yapısını DNA, RNA ve proteinler oluşturur. Kromatin birbirine sıkıca bağlı DNA ve proteinden

oluşur. **Kromatin**, kromozomları oluşturan DNA iplikleri ve bunları saran bazik histon proteinlerinden meydana gelmiş kompleks bir sistemdir. Kromatin kütesinin yarısını DNA, diğer yarısını ise histonlar oluşturur.

Hücre istirahat halindeyken kromatin, nükleoplazma içine rasgele dağılmıştır. Fakat hücre bölünmesinden hemen önce; kromatin kalınlaşıp, granülleşerek görünür hale gelmekte ve **kromozom** adını almaktadır (Şekil 2.13). Ökaryotik canlıların her türü belli sayıda kromozom taşımaktadır. Örneğin insan somatik (vücut) hücrelerinde 23 çift yani 46 kromozom bulunmaktadır. Hücre bölünmesinden önce, bütün DNA molekülleri kendini eşleyerek benzerlerini sentezlediklerinden DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. **Mitoz** adı verilen dört evreli olayla hücre bölünmektedir. Hücre bölünmesi sırasında hücrenin taşıdığı genetik bilginin bir kopyası, oğul hücreye aktarılmaktadır. Hücre bölündükten sonra kromatin nükleoplazma içerisinde tekrar rasgele dağılmaktadır.



Şekil 2.13. Kromozomlar mikroskobik şekilde mitoz sırasında görülür. Burada bir insan diploit hücresinde (somatik) 46 kromozomdan birinin elektron mikrografi görülmektedir.

2.4. VIRÜS

Virüsler, canlı hücreleri enfekte edebilen mikroskopik taneciklerdir. Virüs, insanlarda hastalık oluşturan faktörlerin başında gelir. İnsanlarda teşhis edilemeyen hastalıkların yaklaşık %60'ı virüsler tarafından oluşturulmaktadır. Çiçek, grip, hepatit B gibi virüs hastalıkları

milyonlarca insanın ölümüne sebep olmaktadır. Doğal bağışıklık, virüslere karşı güçlü bir koruma sağlamaktadır.

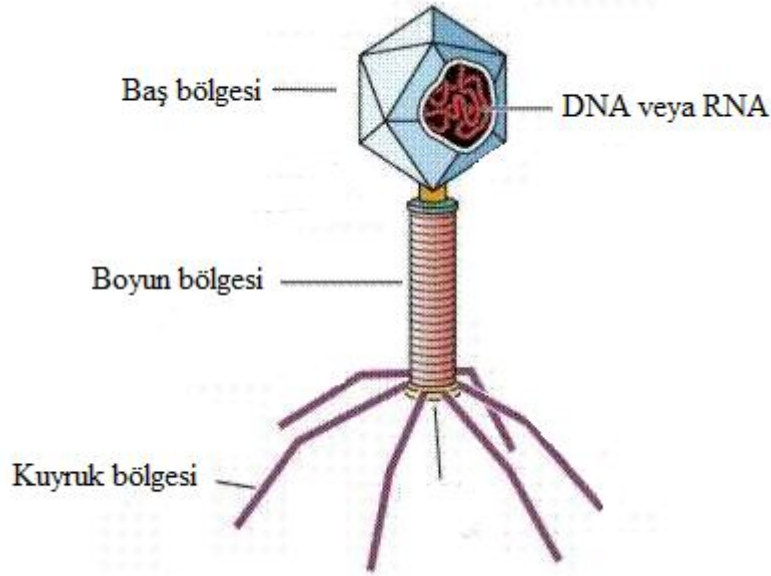
Virüsler, bakterilerden daha küçük parçacıklardır. Mikroorganizmaların en basit ve en küçük olanlarıdır. Virüsler, diğer hücrelerin taşıdığı özelliklerin birçoğuna sahip değildir (Şekil 2.14). Örneğin ribozomları yoktur, protein sentez edemezler. Mitokondrileri yoktur, enerji üretemezler. Virüsler yalnız başına yaşayamayan ancak bir konak hücreyi enfekte ederek yaşayabilen ve çoğalan hücre içi parazitlerdir. Virüslerin nükleik asitleri (DNA ya da RNA) protein yapısında olan bir kılıf tarafından korunmaktadır. Virüslerin tümü protein ve lipoproteine bağlı nükleik asit içerirler.

Virüsler başlıca iki şekilde bulunmaktadır. Konak hücrelerin dışındaki virüsler, **virion** adı verilen kristalleşebilen, belli bir şekle, boya ve kapsama sahip olan cansız basit yapılardır. Virüsün kendisi veya nükleik asit bileşeni, kendisi için spesifik konak hücre içine girecek olursa hücre içi parazit haline gelmektedir. Virüsün nükleik asiti, yapısı bozulmamış viryonu yeniden meydana getirecek genetik bilgiyi taşımaktadır. Virüs konak hücrenin enzimlerinin ve ribozomlarının rollerini değiştirerek hücreyi oğul virüsler sentez etmeye zorlamaktadır. Böylece bir tek virüsün konakçı hücreyi enfekte etmesinden sonra, yüzlerce oğul virüs meydana gelmektedir. Ökaryotlar (hayvan, mantar ve bitki) ve prokaryotlar (bakteriler) virüsler tarafından enfekte edilebilirler. Bakteri enfekte eden virüsler **bakteriyofaj** veya kısaca **faj** diye adlandırılır.

Virüs ve konak arasında iki durum söz konusudur. Bazı hallerde, oğul virüslerin sentezi tamamlandıktan sonra hücre parçalanarak ölür ve yeni virüsler ortama salınır. Bazen de, yeni sentezlenen oğul virüslerin nükleik asitleri hücre içinde kalıp, hücrenin görünüşünü, fonksiyonlarını ve hatta yaşamını etkiler. Viral hastalıkları önlemenin en iyi yolu, bağışıklık geliştirmeye yarayan aşıdır.

Virüsler tarafından enfekte olan hücreler, bir veya daha fazla bir grup protein sentezlerler. Bu grup proteinlere **interferonlar** denmektedir. Virüsün çift zincir nükleik asidi (DNA), konak hücrede interferon gen ekspresyonuna (ifade edilmesine) neden olmaktadır. İnterferon mRNA'sı, ribozomlara taşınarak interferon proteini üretilmektedir. İnterferonlar, etkilerini antiviral proteinler olarak gösterirler. Hemen hemen virüslerin her grubu, interferon oluşmasına neden olabilir. İnsan interferon genleri, *E. coli* hücrelerine klonlanmış ve büyük miktarlarda interferon üretilebilmiştir. Klonlama, iki eş kopya yapmak demektir. DNA klonlama, bir kromozomdan özgül bir gen veya DNA parçasının ayrılarak küçük bir DNA molekülüne bağlanması ve sonra bu değişen DNA'nın binlerce kez kopyalanmasıdır. Sonuç özel bir gen veya DNA parçasının sayısının seçici olarak artırılmasıdır. İki veya daha fazla

kaynaktan sağlanan kovalent bağlı parçaları içeren bileşik DNA parçaları **rekombinant DNA**’ lar olarak adlandırılır.



Şekil 2.14. Virüs yapısı

2.5. FOTOSENTETİK HÜCRELER

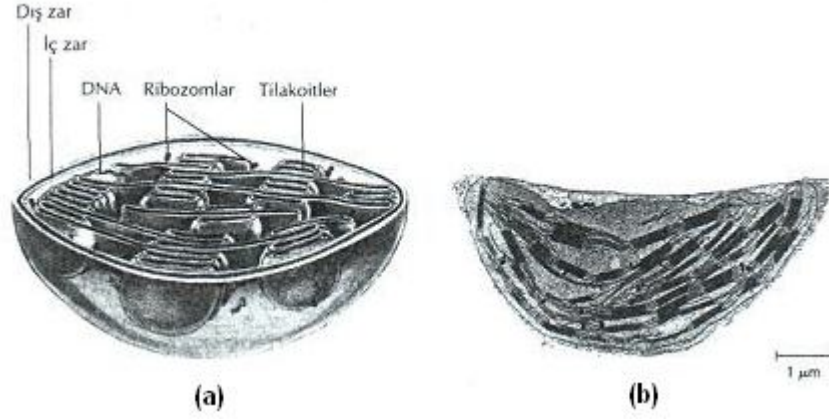
Yüksek bitkilerin yeşil yaprak hücreleri fotosentez yönünden oldukça aktiftirler. Bu hücreler hayvan hücrelerinde bulunan nükleus, mitokondri, golgi cisimleri, E.R. ve ribozomlar gibi ökaryotik yapı ve organellere sahip oldukları gibi, farklı olarak da üç başka önemli yapıya da sahiptirler. Bunlar; **1)** kalın ve sağlam hücre duvarı (çeperi), **2)** kloroplastlar ve **3)** büyük vakuollerdir. Yeşil yaprak hücrelerinin kloroplastları klorofilce zengin olup, CO₂ ve H₂O’dan glukoz sentezlenip nişasta halinde depolanmaktadır. Fotosentetik hücreler, karanlıkta glukozu atmosferik oksijeni kullanarak CO₂ ve H₂O’ya oksitler.

2.5.1. Hücre duvarı (çeperi)

Hücre duvarı polisakkarit ve protein karışımıyla örtülmüş selüloz liflerinden ibarettir. Selüloz lifleri, hemiselüloz, pektin ve glikoproteinlerden meydana gelmiş bir matris çimento maddesi içersine gömülmüştür. Selüloz yanında, diğer polisakkaritler ve glikoproteinlerden meydana gelmiş hücre duvarı, kalın ancak gözeneklidir. Su ve küçük moleküllerin kolayca geçişlerine izin verir, ancak suyun birikmesi nedeniyle hücrenin şişmesine duvarın katılığıyla karşı konulmaktadır. Böylece hücre duvarı, membranı mekanik ve osmotik basınçlardan korur ve hücrenin şeklini belirler. Bitki hücre membranı kalınlık, yapı ve özellikleri bakımından hayvan hücrelerindeki gibi benzer. Ancak bitki hücre membranının, lipid bileşenleri ve aktif taşıma sistemleri oldukça farklıdır.

2.5.2. Kloroplastlar

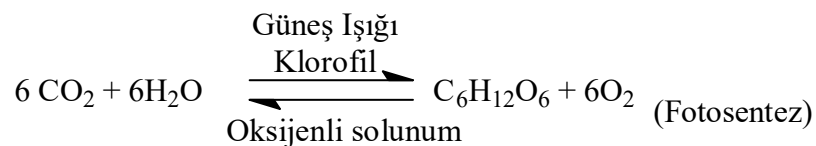
Yüksek bitkilerin yeşil yaprak hücreleri sitoplazması, iki kat membranla çevrili özelleşmiş organeller olan **plastidleri** içerir. Plastidlerin en dikkat çekenini, karakteristik şekilde bitkilerin ve alglerin fotosentez yapan hücrelerinde bulunan **kloroplast**dır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Kloroplastın yapısı. (a) Tilakoitler, ışık yakalayan (absorbe eden) klorofil pigmentini içeren yassılaştırmış veziküllerdir (b) Bir kloroplastın elektron mikro fotoğrafı.

Kloroplastlar klorofil pigmentini çok içerdikleri için fotosentetik hücreler genelde yeşil renklidirler. Kloroplastlar mitokondrilerden daha büyüktür, bir hücrede birbirinden farklı şekillerde ve çok sayıda bulunabilirler. Kloroplastların iç membranları, disk şeklinde birbiri üzerine istiflenmiş yassı veziküller teşkil eder (Şekil 2.15). **Tilakoid** adı verilen bu veziküllerin membranları, klorofil ve fotosentetik elektron taşıyıcı proteinlere sahiptir. Görünür spektrum (ışık) enerjisinin çoğunu yakalayan klorofil ve diğer pigment molekülleri kloroplastlarda veziküllerin oluşturduğu iç zar yığınları olarak bilinen tilakoidlerde yerleşmişlerdir.

Mitokondriler gibi kloroplastlarında DNA, RNA ve ribozomları vardır. Kloroplastlar da mitokondrilere benzer şekilde bitkilerinin enerji santralidir. Ancak mitokondriler besin maddeleri gibi yükseltgenebilen bileşiklerin kimyasal enerjisini kullanırken, kloroplastlar güneş enerjisinden yararlanır. Kloroplastlardaki klorofil ışık enerjisini soğurur ve ATP sentezlemek için kullanır. Fotosentetik hücrelerin kloroplastları, CO₂ ve H₂O'dan fotosentezle **glukoz** sentezleyip sükröz ve nişasta gibi karbohidratları depolamakta ve yan ürün olarak da O₂ oluşturmaktadır.



Fotosentez yapan bitki hücreleri sadece gün ışığında ATP sentezlerken, karanlıkta fotosentezle oluşturulan karbohidratlar mitokondrileri tarafından yükseltgenir ve ATP sentezlenir.

2.5.3. Vakuoller

Bitki hücrelerinin lizozomları yoktur. Ancak bitki hücrelerinin içerdikleri vakuoller, benzer yıkım işlerini ve hayvan hücrelerinde bulunmayan diğer işlevleri gerçekleştirirler. Vakuoller, yarı geçirgen iki tabaka bir membran ile çevrilidir. Genç hücreler çeşitli küçük vakuoller içerir. Hücre yaşlandıkça vakuoller kaynaşarak tek bir merkezi vakuole dönüşür. Bir bitki hücrelerinin vakuolü yüksek derişimde Ca^{+2} ve çeşitli depo bileşiklerini ve atık ürünleri içerir. Vakuollerin içinde çözülmüş halde şekerler, organik asitler, tuzlar, O_2 , CO_2 ve pigmentler bulunmaktadır. Vakuoller, bazı bitki hücrelerinde çiçek ve meyvelerin koyu mor ve kırmızı rengini veren antosiyaninleri de bol miktarda içerir. Vakuoller hücrenin hayatı boyunca yavaş yavaş biriken ve yoğunlaşan artık ve çözünen maddelerin ayırt edilmesi görevini üstlenir. Vakuol, hücrenel bileşenleri depolamak ve yıkmak gibi görevlerine ek olarak bitki hücrelerine destek de sağlar.

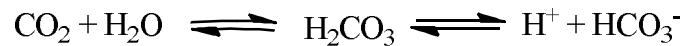
3. BÖLÜM: PROTEİNLER

19. yüzyıl ortalarında G. Mulder, hayvan ve bitki dokuları için ortak bir yapısal madde ekstrakte etmeyi başardı. Bu maddenin bütün canlılar için en önemli yapısal ve fonksiyonel bir madde olduğunu, onsuz hayatın mümkün olamayacağını belirtti. Yunancada ilk ve önemli olan anlamına gelen proteios sözcüğünden bu maddeye protein adını verdi.

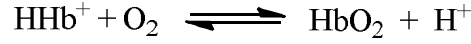
Proteinler bütün canlıların en önemli ve hücrelerin de en bol bulunan organik bileşiklerdir. Hücre kuru ağırlığının yaklaşık % 50'sini proteinler teşkil etmektedir. Proteinler biyolojik olaylarda önemli görevleri olan maddeler olup; fonksiyon ve biyolojik aktivitesi ne olursa olsun 20 çeşit aminoasitten meydana gelmişlerdir. Proteinlerin bir kısmı enzim, bir kısmı hormon, bir kısmı antikor, diğer bir kısmı da yapısal fonksiyon görmek üzere özelleşmişlerdir. Proteinler aminoasit sıralanışı bakımından farklıdırlar. Proteinlerin aminoasit dizilişinin belirlediği yapıya **primer yapı** denir.

Proteinlerin primer yapısı genetik bilgiyi taşıyan çekirdekdeki kromozomal DNA molekülleri tarafından denetlenmektedir. Hücre nükleusunda kromozomal DNA'larda binlerce gen bulunmakta ve bu genlerin ürünü olarak binlerce çeşit protein sentezlenmektedir. Her bir proteinin belli bir fonksiyonu vardır. Şimdi proteinlerin önemli biyolojik fonksiyonlarını inceleyelim:

1) Enzimatik katalizleme: Biyolojik sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların hemen hemen hepsi bir enzim tarafından katalizlenir. Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Genellikle her enzimin protein olan bir kısmı vardır. Bugüne kadar karakterize edilen 2000 kadar enzimin hepsi de protein yapısındadır. Enzimler çok basit kimyasal reaksiyonları katalizledikleri gibi DNA'nın kendini eşlemesi gibi çok karmaşık reaksiyonlarda da kataliz görevi yapmaktadırlar. Enzimler %100 verimle çalışırlar. Enzimler olağanüstü katalitik güce sahiptirler. Mitokondride organik yakıtların yükseltgenmesi ile meydana gelen CO₂ bikarbonat oluşturmak üzere hidratlaştırılır. Karbondioksitin su ile hidratlaşması reaksiyonunu, özellikle eritrositlerde bol bulunan karbonik anhidraz enzimi katalizler. Karbonik anhidraz enzimi bir saniyede 10⁵ tane CO₂ molekülünü hidratlaştırmakta ve reaksiyonun hızını 10⁷ kat artırmaktadır.



Oksijenin hemoglobin tarafından bağlanması büyük ölçüde pH ve CO₂ derişiminden etkilenir (Bohr etkisi). Böylece CO₂ ve bikarbonat arasındaki dönüşümün oksijenin bağlanması ve kana salınmasında büyük önemi vardır.



HHb^+ , hemoglobinin protonlanmış şeklini gösterir. Oksijen derişimi akciğerde yüksek olduğundan hemoglobin O_2 'i bağlar ve protonları serbest bırakır. Oksijen derişimi periferik (çevre) dokularda düşük olduğunda, proton bağlar ve O_2 'i serbest bırakır.

2) Taşıma ve depolama: Birçok küçük molekül ve iyonlar spesifik proteinler tarafından taşınmaktadır. Mesela O_2 molekülü kanda **hemoglobin** tarafından taşınırken, kaslarda **miyoglobin** tarafından depolanır. Demir kan dolaşımında **transferrin** proteini tarafından taşınırken, karaciğerde **ferritin** adı verilen bir başka proteinle kompleks oluşturarak depolanır. **Lipoproteinler** karaciğerden aldıkları proteinleri dokulara taşır. **Serum albümin** yağ asitleri taşıyıcısıdır. Bitki tohumları besin proteinleri depolar. Buğdayda gliyadin, mısırdaki zein, yumurtada ovalbumin, sütte kazein proteinlerin depolanma şeklidir.

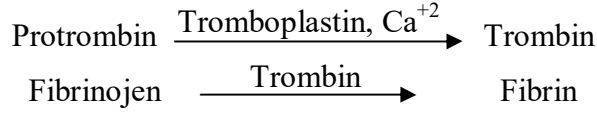
3) Mekanik hareket: Proteinler kasların en başta gelen bileşenleridir. Kas kasılması iki çeşit lif yapısındaki proteinin (miyozin ve aktin) kayma hareketiyle ortaya çıkmaktadır. İskelet kası hücrelerinin kontraktil (kasılabilen) sisteminde, ATP' nin kimyasal enerjisi miyozin fibrillerinin aktin filamentleri boyunca kaymasına neden olur. Mitoz olayında kromozomların hareketi de birtakım proteinler tarafından sağlanır.

4) Mekanik destek: Deri, kemik, tendon ve kıkırdak dokularının gerilmeye dayanıklılığı **fibröz** (çubuğumsu, lifli) bir bağ dokusu proteini olan **kollagen** tarafından sağlanmaktadır. Yapısal proteinler genellikle fibröz proteinler olup organizmaya desteklik yapmakta ve dayanıklılık sağlamaktadır. Yine saç, kıl, yün, tırnak vb. gibi destek ve koruyucu yapılar **α -keratin** grubu proteinlerdir.

5) Koruma: Antikorlar kan dolaşımında bulunan proteinlerdir ve topluca immunoglobulinler olarak adlandırılırlar. Antikorlar (γ -globulinler) vücuttaki virüs, bakteri ve diğer organizma hücreleri gibi yabancı maddeleri tanıyan ve onları bağlayıp çöktürerek kan dolaşımından uzaklaşmalarını sağlayan çok spesifik proteinlerdir. Aşılar antijendir, antikor oluştururlar. Aşılar enfeksiyon etkenine karşı kişiyi bağışık (korunmuş) duruma getirirler. Antijenin (mikrop) vücuda girmesiyle akyuvarların (lökositlerin) **lenfositlerinden** antikor adı verilen spesifik proteinler kan dolaşımına salınır. Bağışıklık sisteminin ana görevi vücutta enfeksiyonlara karşı korumaktır. Antikorlar, hücreye ait olanla olmayanları (yabancı proteinleri) birbirinden ayırt etmekte önemli rol oynarlar.

Ayrıca kanama sırasında pıhtılaşmayı sağlayan faktörlerin tamamına yakını protein yapısında olan maddelerdir. Normal şekilde damar içinde dolaşan kan pıhtılaşmaz. Kan

pıhtılaşması aslında vücudun bir korunma mekanizmasıdır. Kan pıhtılaşması on kadar faktörün görev yaptığı kompleks bir olaydır ve basit olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir.



Vücuttaki en küçük hücreler (2–3 μm) olan **trombosit**lerin başlıca görevi kan pıhtılaşmasını başlatmaktır. Pıhtılaşma, trombositlerden bazı etkenlerin saliverilmesi sonucu kan plazmasındaki bir dizi enzimin etkinleşmesi ile başlar ve **fibrin** pıhtısının oluşumu ile sonuçlanır. Kanın gerektiği zaman pıhtılaşmaması (kalıtsal ve besinsel nedenlere bağlı olarak) **hemofili** gibi hastalıklara yol açar. Aşırı pıhtılaşma ise kalp ve beyinde **tromboz**lara yol açabilir.

Fibrinojen kan plazması çözümlü proteindir. Kan serumunda albümin ve globülin proteinleri; kan plazmasında ise albümin, globülin ve fibrinojen proteinleri çözümlü halde bulunurlar.

6) Sinir uyarılarının üretimi ve iletimi: Spesifik uyarılara karşı sinir hücrelerinin cevabı reseptör proteinler aracılığıyla olmaktadır. Mesela **rodopsin** proteini, retinal çubuk hücrelerinin **fotoreseptör** (ışık algılayıcı) proteindir. Sinir hücrelerinde uyarıları iletme görevi reseptör proteinler tarafından sağlanmaktadır.

7) Hormonlar: Bazı proteinler hücrede fizyolojik aktiviteleri düzenlerler. Metabolizma olaylarının koordineli biçimde yürütmesini sağlayan hormonların büyük bir bölümü protein yapısındadır. Hormonlar, iç salgı bezleri olan **endokrin sistem** tarafından salgılanır. Bir protein olan insülin hormonu, pankreas bezinden salgılanır ve kan şeker seviyesini düzenler. Hormonlar, hedef hücrelerde membran yapısındaki reseptör proteinlere bağlanarak aktivite gösterirler.

8) Büyüme ve farklılaşmanın kontrolü: Hücre çekirdeğindeki genetik bilginin kontrolü ve sırasıyla ifadesi gerekir. Herhangi bir anda hücre genetik bilgisinin belli bir kısmı ifade edilir. Canlılarda farklı doku ve organların bulunması, farklı işlevlerin ortaya çıkması hücre çekirdeğinde aynı olan genetik bilginin bazı bölümlerinin baskılanmasıyla olur. Kromozomal DNA'nın baskılanan gen bölgesindeki genetik bilgi ifade edilemez. Farklı hücrelerde farklı gen bölgeleri baskılandığı için farklı protein ve dolayısıyla farklı hücre oluşur. Bakterilerde **represör (baskılayıcı) proteinlerin**, kromozomal DNA'nın spesifik bölgelerinin ifade edilmeden kalmasını sağlayan kontrol molekülleri olduğu gösterilmiştir.

Clostridium botulinum bakterisinin salgıladığı protein yapısında bir toksin (**Botox**); sindirim sisteminin yanı sıra sinir sistemini de etkiler ve solunum yetersizliğinden ölüme sebep olur.

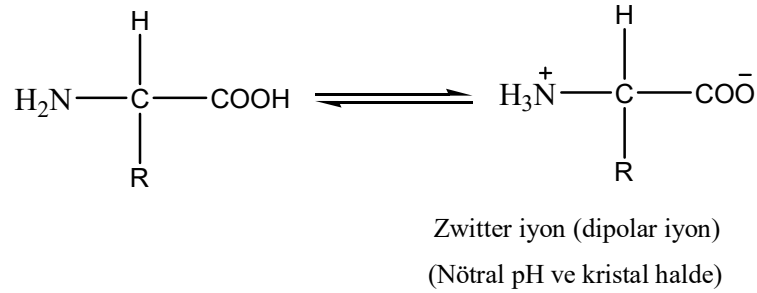
Proteinler molekül ağırlıkları 5.000–10.000 Dalton'dan birkaç milyon Dalton'a değişen makromoleküllerdir. İnsan insülin hormonu 5.500, ribonükleaz enzimi 13700, tripsin enzimi 23.800, fibrinojen 450.000 ve virüsler ise birkaç milyon dalton ağırlığındadır.

Proteinler % 50 karbon, % 7 hidrojen, % 23 oksijen, % 16 azot ve % 0–3 kükürt içermektedir. Bunların yanı sıra fosfor, demir, iyot, bakır, çinko, mangan vb. elementlerde birtakım spesifik proteinlerde bulunmaktadır.

3.1. AMİNOASİTLER

Proteinlerin yapısında 20 standart aminoasit ve bazı aminoasitlerin türevleri bulunur. Proteinlerde bulunan 20 standart aminoasidin hepsi de α -aminoasittir. Basit proteinler asit, baz ve enzimler tarafından hidroliz edildikleri zaman; yapı taşları olan α -aminoasitlere ve onların bazı türevlerine parçalanırlar. α -aminoasitler; α -karbon atomuna bir $-\text{NH}_2$, bir $-\text{COOH}$, bir $-\text{H}$ ve bir $-\text{R}$ yan grubunun bağlanmasıyla ortaya çıkan bileşiklerdir. Aminoasitler $-\text{R}$ grubunun yapı ve özellikleri bakımından birbirlerinden farklı olurlar.

α -aminoasitlerin iyonlaşmamış halinin, nötral pH'da ve kristal halde genel formüllerini aşağıdaki gibi yazabiliriz.



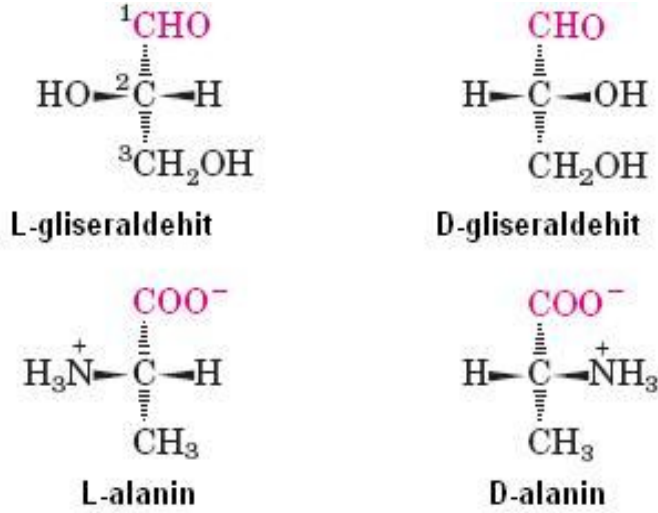
R grubunun hidrojen olması dışında α -karbon atomu asimetric olduğundan aminoasitler optikçe aktiftirler. Aminoasitler polarimetrede bir düzlemde titreşen polarize ışığı, sağa veya sola saptırırlar. Polarize ışığı saat ibresi yönünde saptıran bileşiklere **dekstrorotator izomer** adı verilir ve (+) işareti ile gösterilir. Polarize ışığı sola saptıran bileşiklere ise **levorotator izomer** denir ve (-) işareti ile gösterilir.

Bir stereoizomer maddenin optik aktivitesi (optikçe aktiflik) kantitatif bakımdan **spesifik rotasyon** olarak ifade edilmektedir. Saf bir stereoizomer maddenin belirli bir konsantrasyondaki çevirme derecesi polarimetrede ölçülerek optik aktivitesi tayin edilir. Optik aktivite aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$[\alpha]_D^{20^{\circ}C} = \frac{\text{Gözlenen çevirme derecesi} \times 100}{\text{Tüp boyu (dm)} \times \text{Konsantrasyon (g/100 mL)}}$$

α -karbon atomunun bağları tetrahedral düzende olduğundan dört farklı grubun ayna görüntüsü kendisi ile çakışmayan iki farklı uzaysal düzende bulunurlar. Asimetrik karbon atomunun dört bağlantısının mutlak şekli için özel bir bilimsel sınıflandırma geliştirilmiştir. Aminoasitler ve basit şekerlerin mutlak şekli için E. Fischer tarafından önerilen ve üç karbonlu bir şeker olan **gliseraldehitin** örnek alındığı D-, L- sistemiyle tanımlanmıştır (Şekil 3.1). Tüm kiral bileşikler için stereoizomerler, L – gliseraldehit ile konfigürasyon benzerliği olanlar L- ve D – gliseraldehit ile benzerliği olan stereoizomerler de D- olarak isimlendirilir.

Alaninin L- ve D- olmak üzere iki stereoizomerinin ayna görüntüsü çakışmaz. Bu bileşiklerden biri diğerinin optik izomeri veya stereoizomeridir.



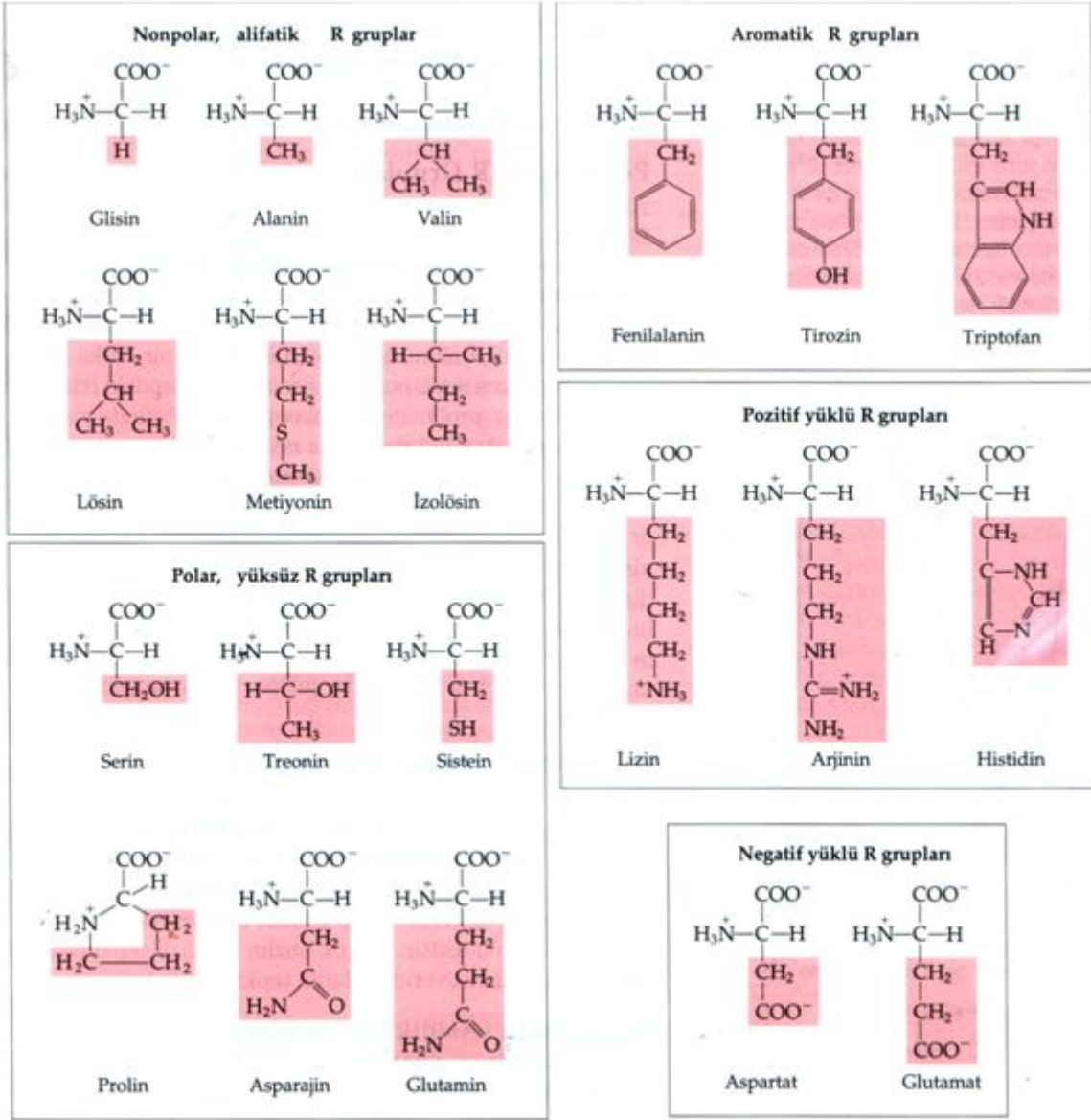
Şekil 3.1. Alaninin stereoizomerlerinin L- ve D- gliseraldehitin mutlak konfigürasyonu ile stereik ilişkisi. Perspektif formüllerde kiral atom merkezdir, karbonlar dikey sıralanmıştır. ► veya ◄ tek kama şeklindeki bağlar, kağıt düzleminin dışına doğru, kesikli çizgi halindeki bağlar bunun arkasında yer almıştır.

Fischer sistemi ile L- ve D- yalnızca kiral karbona bağlı dört grubun mutlak şeklini belirtir. L- ve D- nin optik aktivite yani sağa ve sola çevirme ile hiçbir ilgisi yoktur. L- stereoizomeri aminoasitlerde α -amino grubu solda, D- stereoizomeri aminoasitlerde ise sağdadır. Protein yapısında bulunan aminoasit kalıntıları L- stereoizomerleridir. Ancak L- aminoasitlerin hepsi levorotator (-) değildir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Bazı L- izomeri aminoasitlerin çevirme açıları

Aminoasit	Çevirme açısı
Alanin	+ 1,8
Fenilalanin	- 34,5
Lizin	+ 13,5
Histidin	- 38,5
Serin	- 7,5

Proteinler; şekil, büyüklük, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal aktivite yönünden birbirinden farklı –R grupları bulunduran 20 standart aminoasit içerir (Şekil 3.2). Bu aminoasitlerin hepsi de L- izomeri aminoasitleridir.

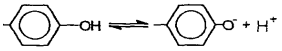
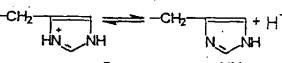
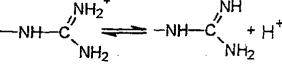


Şekil 3.2. Proteinlerdeki 20 standart aminoasit

Bakteriden insana kadar bütün türlerin proteinleri 20 standart aminoasitten meydana gelmektedir. Bu proteinlerin alfabeti, yeryüzünde hayatın başlangıcından beri geçerliliğinin sürdürmektedir. Proteinlerin birbirinden son derece farklı yapıları ve fonksiyonları, aynen 29 harften ciltler dolusu kitabın yazılması gibi, 20 standart aminoasitin değişik sayı ve sırada dizilişiyle ortaya çıkmaktadır.

Aminoasitler, yan zincirin yani –R grubunun yapı ve özelliklerine göre sınıflandırılmaktadırlar (Şekil 3.2 ve Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Standart aminoasitlerin özellikleri ve sınıflandırılması

Amino asitler	Kısaltılmış adlar ve simgeler	M_r (g/mol)	pK_a değerleri			pH_1	Proteindeki miktarı (%) ¹	Yan Zincirin iyonlaşması
			pK_1 (-COOH)	pK_2 (-NH ₃ ⁺)	pK_R (R grubu)			
Nonpolar alifatik R grupları								
Glisin ^{3,5}	Gly (G)	75	2,34	9,60		5,97	7,2	
Alanin ^{3,5}	Ala (A)	89	2,34	9,69		6,01	7,8	
Valin ^{2,5}	Val (V)	117	2,32	9,62		5,97	6,6	
Lösin ^{2,6}	Leu (L)	131	236	9,60		5,96	9,1	
İzolösin ^{2,7}	Ile (I)	131	2,36	9,63		6,02	5,3	
Metiyonin ^{2,5}	Met (M)	149	2,28	9,21		5,74	2,3	
Aromatik R grupları								
Fenil alanin ^{2,7}	Phe (F)	165	1,83	9,13		5,48	3,9	
Tirozin ^{3,7}	Tyr (Y)	181	2,20	9,11	10,07	5,65	3,2	
Triptofan ^{2,7}	Trp (W)	204	2,38	9,39		5,89	1,4	
Polar yüksüz R grupları								
Serin ^{3,5}	Ser (S)	105	2,21	9,15		5,68	6,8	
Prolin ^{3,5}	Pro (P)	115	1,99	10,96		6,48	5,2	
Treonin ^{2,5}	Thr (T)	119	2,11	9,62		5,87	5,9	
Sistein ^{3,5}	Cys (C)	121	1,96	10,28	8,18	5,07	1,9	$-SH \rightleftharpoons -S^- + H^+$
Aspargin ^{3,5}	Asn (N)	132	2,02	8,80		5,41	4,3	
Glutamin ^{3,5}	Gln (Q)	146	2,17	9,13		5,65	4,2	
Pozitif yüklü R grupları								
Lizin ^{2,6}	Lys (K)	146	2,18	8,95	10,53	9,74	5,9	$-NH_3^+ \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$
Histidin ^{2,4,5}	His (H)	155	1,82	9,17	6,00	7,59	2,3	
Arginin ^{4,5}	Arg (R)	174	2,17	9,04	12,48	10,76	5,1	
Negatif yüklü R grupları								
Aspartat ^{3,5}	Asp (D)	133	1,83	9,60	3,65	2,77	5,3	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$
Glutamat ^{3,5}	Glu (E)	147	2,19	9,67	3,25	3,22	6,3	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$

¹ 1150 proteindeki ortalama miktarı (bileşenine göre)² Besinsel olarak temel aminoasitler (vücuttaki sentezlerine göre)³ Besinsel olarak temel olmayan aminoasitler (vücuttaki sentezlerine göre)⁴ Besinsel olarak yarı temel aminoasitler (vücuttaki sentezlerine göre)⁵ Glukojenik olan aminoasitler (vücuttaki akibetlerine göre)⁶ Ketojenik olan aminoasitler (vücuttaki akibetlerine göre)⁷ Hem glukojenik ve hem de ketojenik olan aminoasitler (vücuttaki akibetlerine göre)

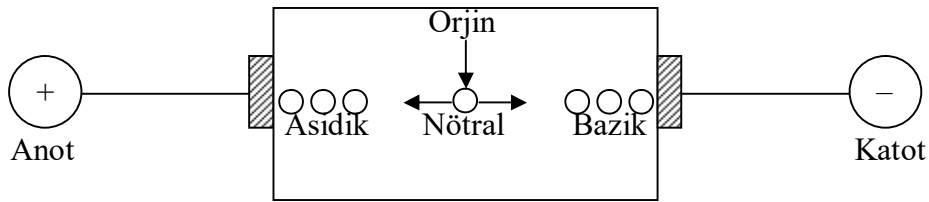
Proteinler; derişik kuvvetli asitler (HCl, H₂SO₄, vb.) ve bazlar (NaOH) ve enzimlerle (pepsin, tripsin, kimotripsin, vb.) hidroliz edilecek olursa 20 standart aminoasit ve onların bazı türevleri elde edilir.

Proteinlerin hidrolizi sonucu ele geçen aminoasit karışımı pH = 5.5 olan bir tampon çözelti içinde elektroforez işlemine tabi tutulacak olursa üç ana gruba ayrıldığı gözlenir (Şekil 3.3).

Birinci grupta pH = 5.5 olan tampon çözeltide net yükleri sıfır yani yüksüz olan aminoasitler bulunmaktadır. Bu grupta; bir amino ve bir karboksil grubu taşıyan **nötral aminoasitler** bulunur. Bu aminoasitler yüksüz oldukları için elektroforez işleminde elektriksel alanda göç edemezler.

İkinci grupta bulunan aminoasitler, katota (-) hareket eden net yükleri (+) olan birden fazla azot içeren (-NH₂ grubu şeklinde) **bazik aminoasitler** bulunur.

Üçüncü grupta anota (+) hareket eden birden fazla karboksil grubu (-COOH) bulunan ve net yükleri (-) olan **asidik aminoasitler** yer almaktadır. Bu şekilde sınıflandırma öğrenilmesi kolay olduğu için tercih edilir.

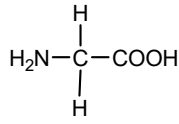


Şekil 3.3. Aminoasitlerin kağıt elektroforezi.

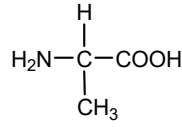
3.1.1. Nötral Aminoasitler

Nötral aminoasitler, bir amino grubuna karşılık bir karboksil grubu taşıyan aminoasitlerdir. Bu aminoasitler yan zincirlerinin (-R grubu) yapı ve özelliklerine göre alt sınıflara ayrılmaktadır.

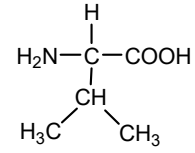
3.1.1.1. Düz Zincirli Aminoasitler: Düz zincirli aminoasitler hidrokarbon yapısında yan gruba (-R) sahip olan aminoasitlerdir. Bu aminoasitlerin en basit olanı -R' nin -H olduğu glisindir. Glisin H₂NCH₂COOH olduğundan α- karbonu asimetrik değildir. Alaninde R= -CH₃'dir. Hidrokarbon yapısında yan gruba sahip olan diğer aminoasitler ise, valin, lösin, izölösin ve prolindir. Prolin bir aminoasit değil bir iminoasittir. Prolinde, -R grubu, hem α-karbonuna hem de amino grubuna bağlanarak halkalı yapı oluşturmaktadır.



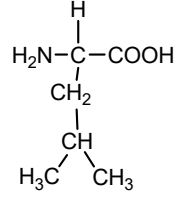
Glisin



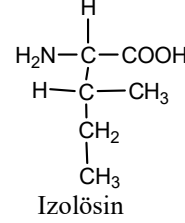
Alanin



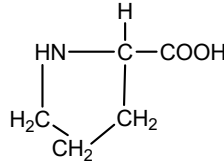
Valin



Lösin

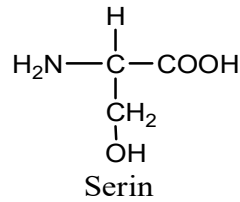


Izolösin

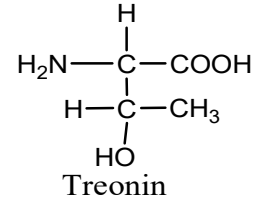


Prolin

3.1.1.2. Yan Zinciri Hidroksilli Aminoasitler: Yan zincirlerinde alifatik hidroksil grubu bulunan aminoasitlerdir. Bu aminoasitlerin yan gruplarındaki –OH gruplarının, protein yapısında bulunması proteinlerin biyolojik fonksiyonları açısından çok önemlidir. Hidroksil grubu polar olup, hidrojen bağı yapabilir. Bu grup aminoasitler; serin ve treonindir.

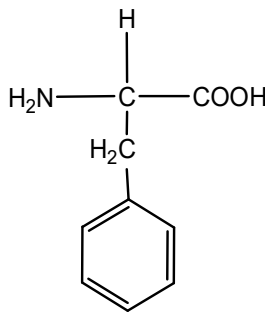


Serin

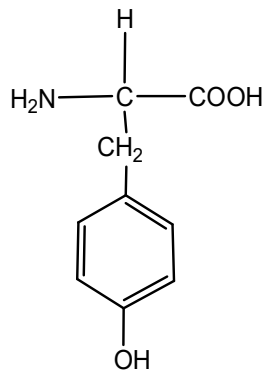


Treonin

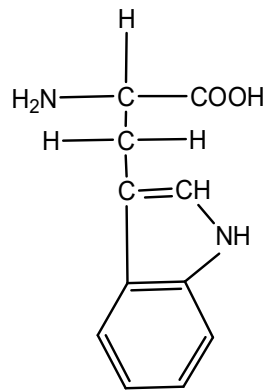
3.1.1.3. Yan Zinciri Aromatik Aminoasitler: Yan zincirinde aromatik grup bulunan aminoasitler; fenilalanin, tirozin ve triptofandır.



Fenilalanin

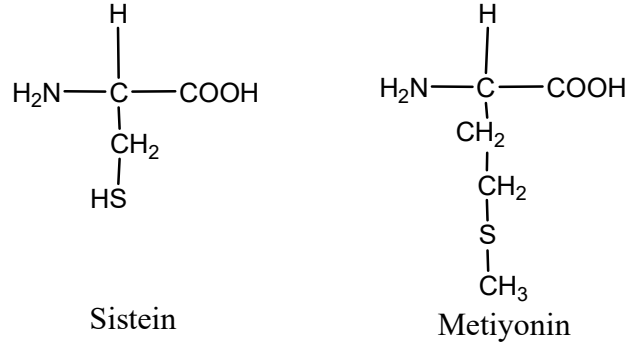


Tirozin



Triptofan

3.1.1.4. Yan Zincirinde Sülfür Grubu Bulunan Aminoasitler: Sistein ve metionin aminoasitleri bu grupta yer almaktadır. Sistein aminoasiti, proteinlerin üç boyutlu yapısında disülfid çapraz kovalent bağlarını oluşturmasıyla özel bir öneme sahiptir. Sülfidril grubu (–SH) aslında bir tiyol grubudur. Metioninin yapısında tiyoeter (R–S–R) grubu yer almaktadır. Metionin, protein sentezinde özellikle metilasyon reaksiyonlarında metil grubu vericisi olarak görev yapar.



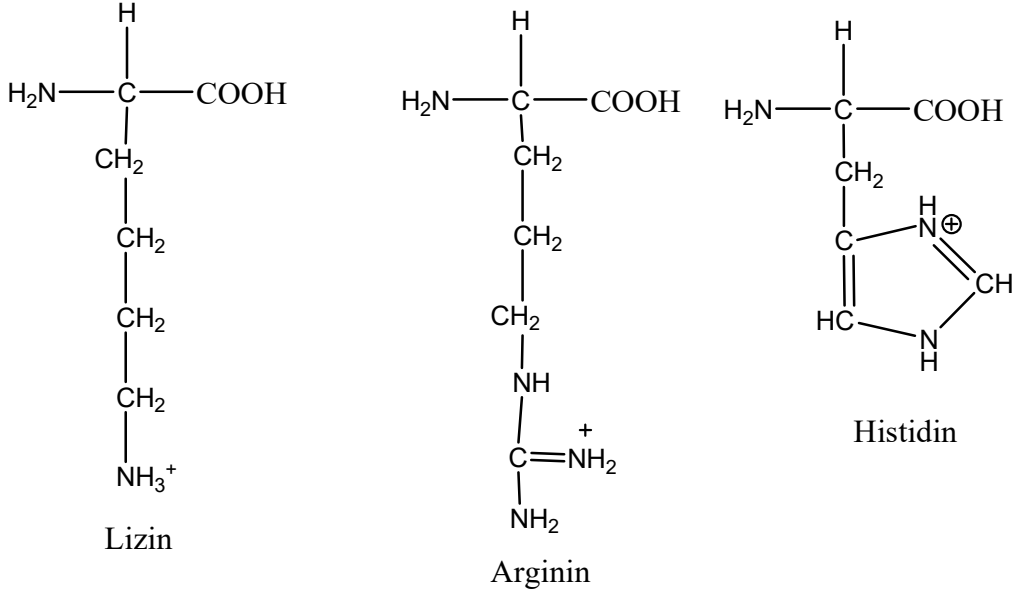
Buraya kadar söz ettiğimiz nötral aminoasitlerin yan zincirleri fizyolojik pH'da (pH=6–8) yüksüzdür. Bu aminoasitlerden yalnız tirozin ve sistein aminoasitlerinin yan zincirleri fizyolojik pH dışında iyonlaşabilir. Nötral aminoasitlerden polar yüksüz –R gruplarına sahip olan; serin, treonin ve tirozin dışındakiler apolar yani hidrofobik yan zincirlere sahiptirler. Sistein, –SH grubuyla; prolin ise farklı bir halka yapısından dolayı kısmen polardır. Polar aminoasitler su ile hidrojen bağı yaparlar ve polar olmayanlara göre suda daha iyi çözünürler.

Aminoasitlerde apolar R grubuna sahip olmak demek genellikle bu aminoasidin proteinlerin globüler (küresel) yapısında molekülün hidrofobik iç kısmında yer alması anlamına gelir. Aminoasitlerde apolarlık kavramı dipol momentinin sıfır ($\mu=0$) olması anlamında değildir.

3.1.2. Bazik Aminoasitler

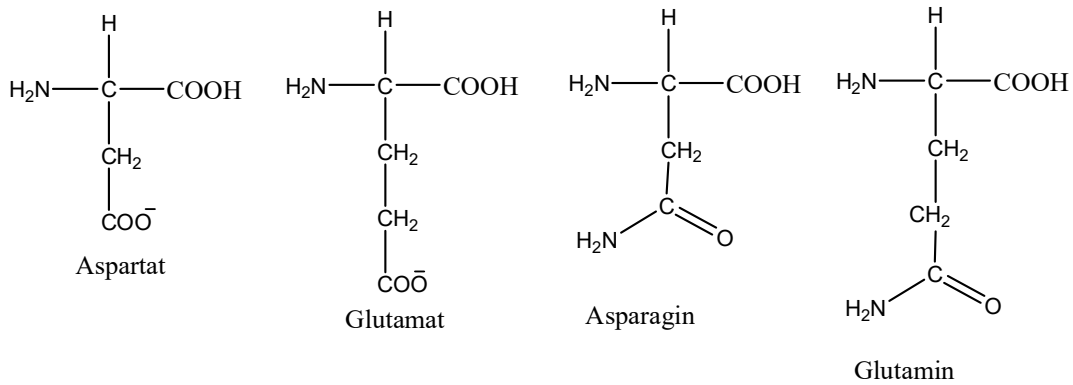
Fizyolojik pH'da pozitif yüklü yan gruplara sahip aminoasitlerdir. Bu aminoasitlerin yan zincirlerinde de en az bir amino grubu daha bulunmaktadır. Bu aminoasitler Lizin, arginin ve histidindir. Bu aminoasitlerden histidin aromatik özellikte imidazol halkasına sahip olduğundan fizyolojik pH'da çevresine göre bazen pozitif yüklüdür. Histidin dışında hiçbir aminoasidin fizyolojik pH'da tampon yapma kapasitesi yoktur. İmidazol halkasının pK'sı 6,0 olduğundan, fizyolojik pH sınırları içinde tampon yapma özelliğine sahiptir. Hemoglobin

yapısında önemli miktarda histidin bulunduğu için fizyolojik pH sınırlarında kuvvetli bir tampon oluşturur ve O₂ molekülünü taşır.



3.1.3. Asidik Aminoasitler

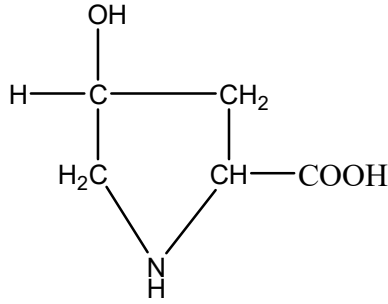
Yan zincirleri negatif yüklü R grubu bulunan yani asidik olan aminoasitler iki tanedir: Glutamik asit ve aspartik asit. Bir amino grubuna karşı iki karboksil grubu taşıyan aminoasitlerdir. Fizyolojik pH'da negatif yüklü olduklarından asit isimlerinden ziyade tuz yani anyon isimleriyle anılırlar. Aspartat ve glutamatın –R grubundaki karboksil üzerinden amidleşmesiyle oluşan asparagin ve glutamin olmak üzere iki tane amit türevi vardır. Bu aminoasitlerin yan zincirleri yüksüzdür ve NH₄⁺ kationunun taşınmasında rol alırlar.



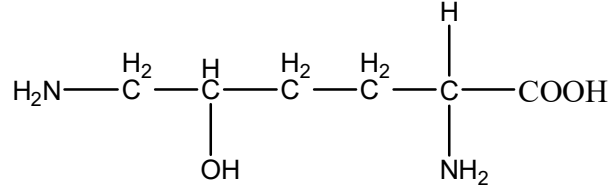
3.1.4. Sonradan oluşmak suretiyle proteinlerde bulunan aminoasitler

Protein yapısında yer alan 20 standart L-α-aminoaside ilave olarak bazı özelleşmiş proteinlerin hidrolizi sonucu farklı bir takım aminoasitlerde elde edilmiştir. Bunların hepsi de normal aminoasitlerin türevleridir.

Bu aminoasitlerden 4–hidroksiprolin, prolinin bir türevidir olup kollagen ve bazı bitki proteinlerinde bulunmaktadır. Lizin türevidir olan 5–hidroksilizin, deri ve kemiğe sağlamlığını kazandıran kollagen proteini yapısında bulunur.

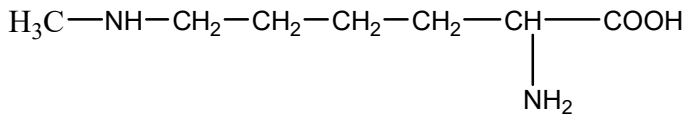


4 - Hidroksiprolin

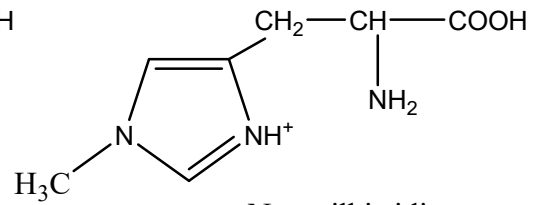


5 - Hidroksilizin

N–metil histidin ve N–metil lizin, bazı kas dokusu proteinlerinde bulunur.

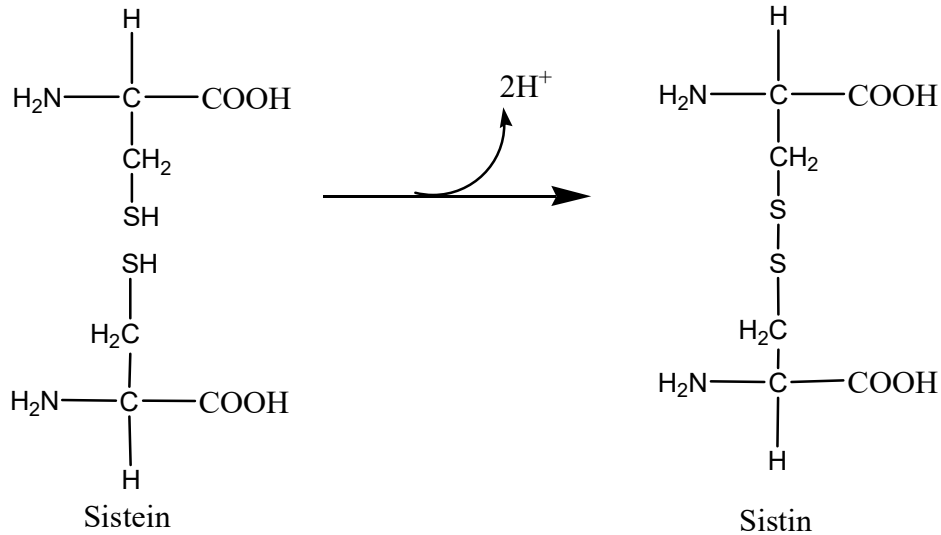


N-metillizin

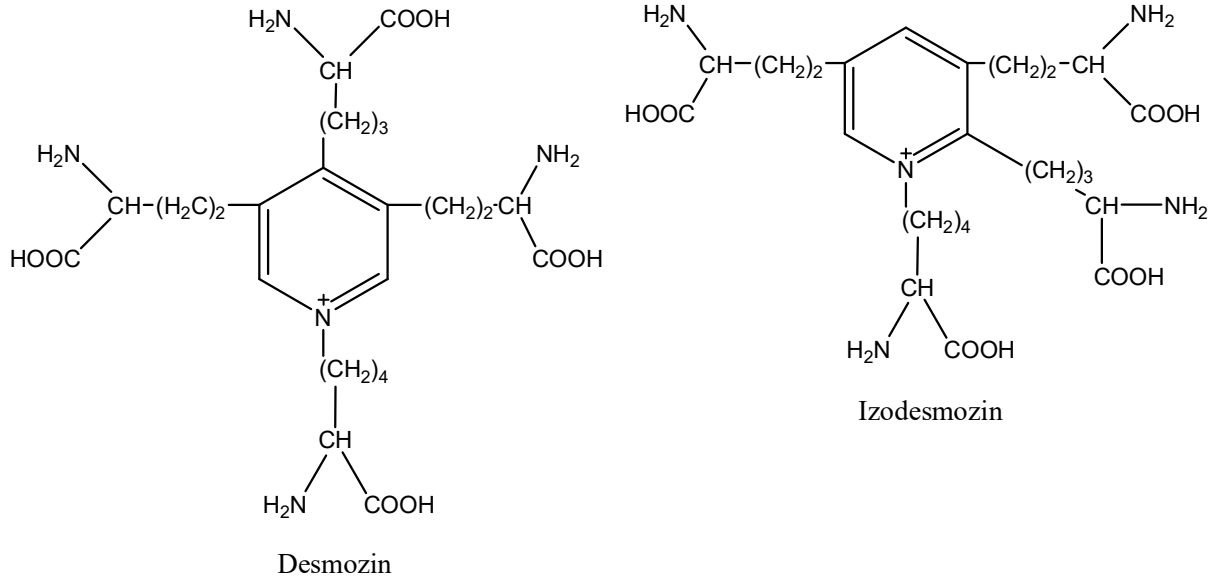


N-metilhistidin

Sistin bir sistein türevidir, başlıca saç, kıl, tırnak ve boynuz maddesi α–keratin grubu proteinlerde olmak üzere çoğu proteinlerde %1–2 oranında bulunmaktadır.

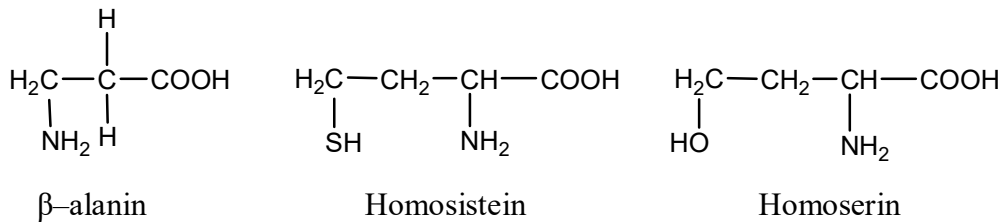


Dört lizin aminoasidinin bir araya gelerek oluşturduğu desmozin ve izodesmozin türev aminoasitleri de fibröz bir bağ dokusu proteini olan elastin yapısında bulunmaktadır.

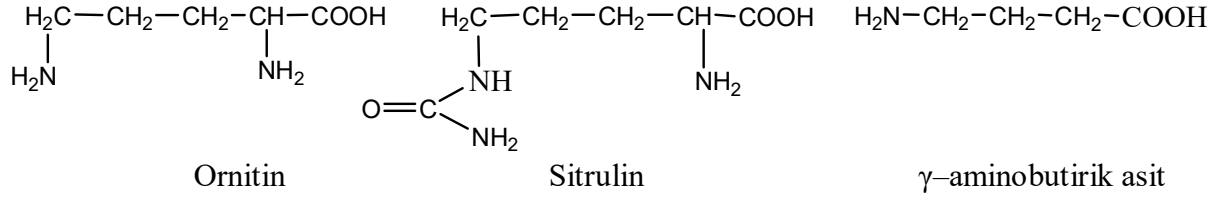


Bu türev aminoasitler, normal aminoasitlerin protein yapısına girdikten sonra değişikliğe uğraması sonucu oluşurlar.

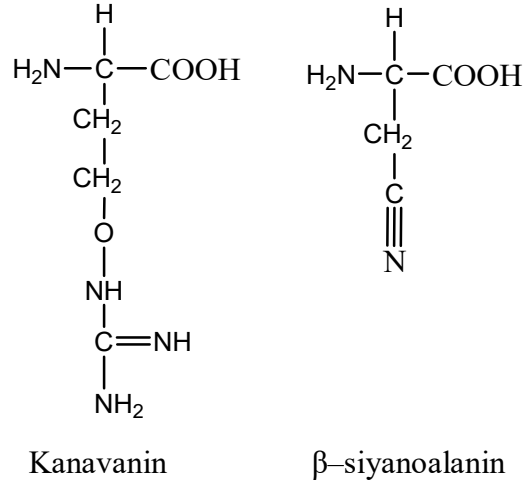
Protein yapısında yer almayan fakat doğal olarak bulunan bazı aminoasitler ya metabolizmanın önemli ara bileşikleri ya da önemli biyomoleküllerin öncül maddeleridir. Günümüzde farklı hücre ve dokularda serbest veya birleşmiş olarak 150'den fazla çeşitte aminoasit mevcut olduğu anlaşılmıştır. Gramisidin ve aktinomisin D antibiyotiklerinde ve çeşitli bakteri hücre duvarlarında D- izomer aminoasitler bulunmaktadır. D-glutamik asit bazı bakteri hücre çeperlerinde, D-alanin bazı böcek larvalarında ve D-serin toprak solucanı yapısında bulunmaktadır. Bu aminoasitlerin çoğu α -aminoasitlerdir. Ancak β -, γ - ve δ -aminoasitlerde bilinmektedir. β -alanin bir vitamin olan pantotenik asidin öncül maddesi olup koenzim A (CoA) yapısında yer almaktadır. Homosistein ve homoserin, aminoasit metabolizması ara bileşikleridir.



Ornitin ve sitrulin hem üre çevrimi ara bileşikleri hem de arginin aminoasidinin sentezinde öncül bileşiklerdir. γ -aminobutirik asit ise sinir uyarılarının iletiminde rol almaktadır.

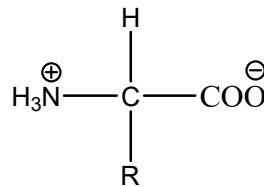


Mantarlar ve yüksek bitkiler, çoğunun fonksiyonu bilinmeyen çok sayıda aminoasit içermektedir. Bu aminoasitlerin bazıları bitkiler dışındaki canlılar için zehirlidir. Bunlara kanavanin ve β -siyanoalanin örnek olarak verilebilir. Bu grup aminoasitler proteinlerde bulunmayan fakat doğal olarak bulunan bazı aminoasitlerdir.



3.2. AMİNOASİTLERİN ASİT-BAZ ÖZELLİKLERİ

Aminoasitlerin asit-baz özelliklerinin bilinmesi proteinlerin özelliklerini anlamak ve incelemek için önemlidir. Aminoasitleri ayırabilmek, teşhis ve miktarını tayin edebilmek ve proteinlerin aminoasit bileşimlerini belirlemek için asit-baz özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Kristal halde aminoasitlerin normal erime noktaları 200 °C ve daha üstündedir. Aynen tuzlar gibi aminoasitlerin de erime noktaları yüksektir. Çünkü nötral pH ve kristal durumda aminoasitler zwitteriyon (dipolar iyon, iç tuz) yapısındadırlar.

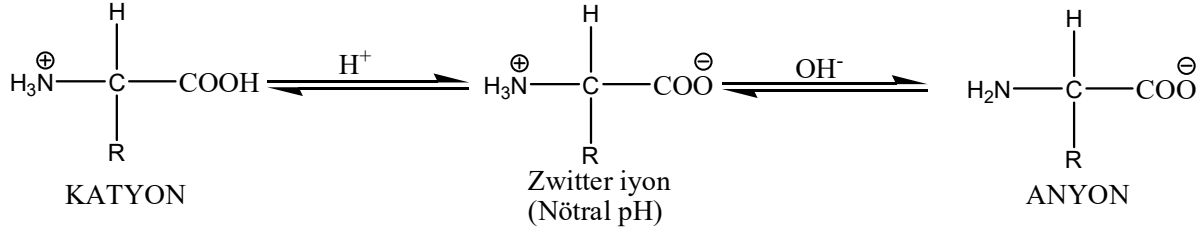


Zwitteriyon (dipolar iyon, iç tuz)

Aminoasitlerin sudaki çözünürlükleri tuzlar gibi oldukça yüksektir ve sulu çözeltilerinden nötral pH'da zwitteriyon şeklinde kristallendirilirler. Nötralliğe yakın

çözeltilerde zwitteriyon halinde bulunan aminoasitler düşük pH'larda katyon (+), yüksek pH'larda anyon (-) şeklinde bulunmaktadır.

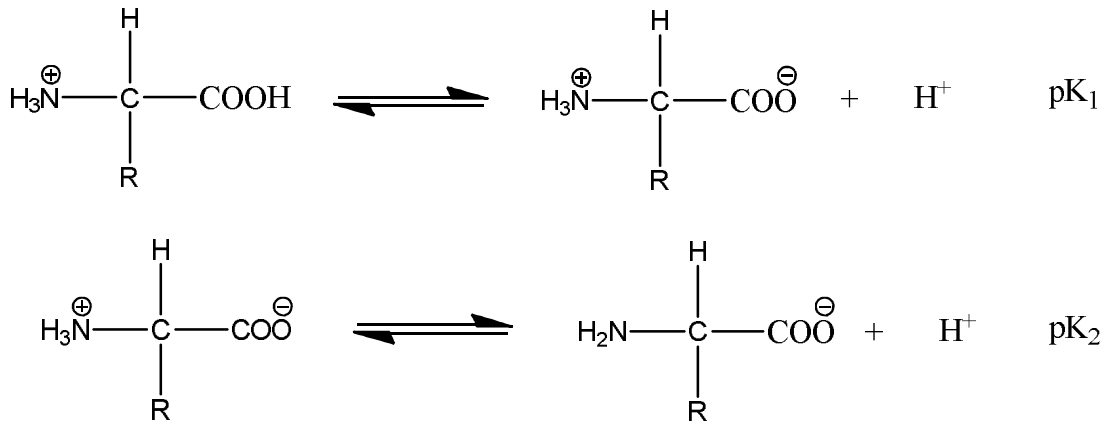
Aminoasitlerin pH' ya bağlı olarak iyonlaşma dengesi:



Aminoasitler $\text{pH} < 3$ olan ortamlarda, ortamdaki proton alarak katyonik halde bulunurken; $\text{pH} > 10$ olan ortamlarda ise ortama proton vererek anyonik formda bulunur. Aminoasitler asidik ortamda pozitif yüklü iyonlar, bazik ortamda negatif yüklü iyonlar oluştururlar yani amfoterik özellik gösterirler. Asitlere karşı baz, bazlara karşı asit özelliği gösteren bileşiklere **amfoterik bileşikler** adı verilir.

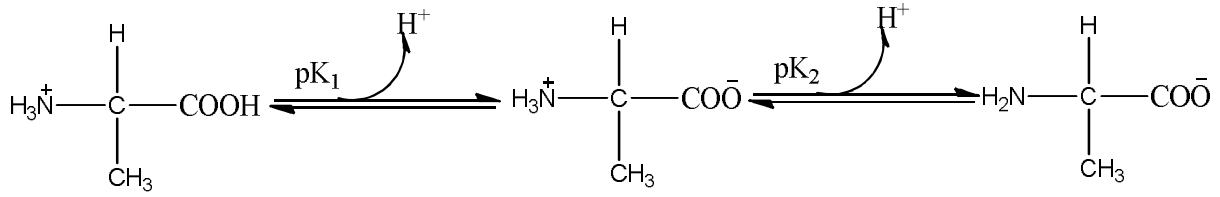
Bir aminoasit, -R grubu dikkate alınmaksızın, iki proton yüklenebilir. Bu nedenle genel olarak aminoasitler **dibazik asitler** (H_2A , H_2CO_3 ,...) gibi iki eşdeğer bazla titre edildiğinde bu protonları tamamen verebilirler.

Tamamen protonlanmış bir aminoasidin pH artışına bağlı olarak iyonlaşma dengesini aşağıdaki gibi gösterebiliriz.



3.2.1. Aminoasitlerin Titrasyon Eğrileri Karakteristiktir

Alaninin titrasyon eğrisi iki farklı grubun proton vermesiyle ilişkili olarak iki basamaklıdır (Şekil 3.4). Çok düşük pH'da alanin tamamen protonlanmış katyon formundadır.



0.1 M alaninin 25°C'da 0,1 M NaOH ile titrasyon eğrisinin birinci basamağının orta noktasında 0,5 eşdeğer OH⁻ ilave edildiği için proton verici ve proton alıcı türlerin (H₂A ve HA⁻) derişimleri eşittir. Herhangi bir titrasyonda, titre olmaya başlayan protonlanmış grubun pK_a değerinin pH'ya eşit olduğu yerde orta noktaya ulaşılır. Alanin için bu orta nokta da pK_a= 2,34'tür. Bu -COOH grubunun pK_a değeridir.

Henderson – Hasselbach eşitliğinde;

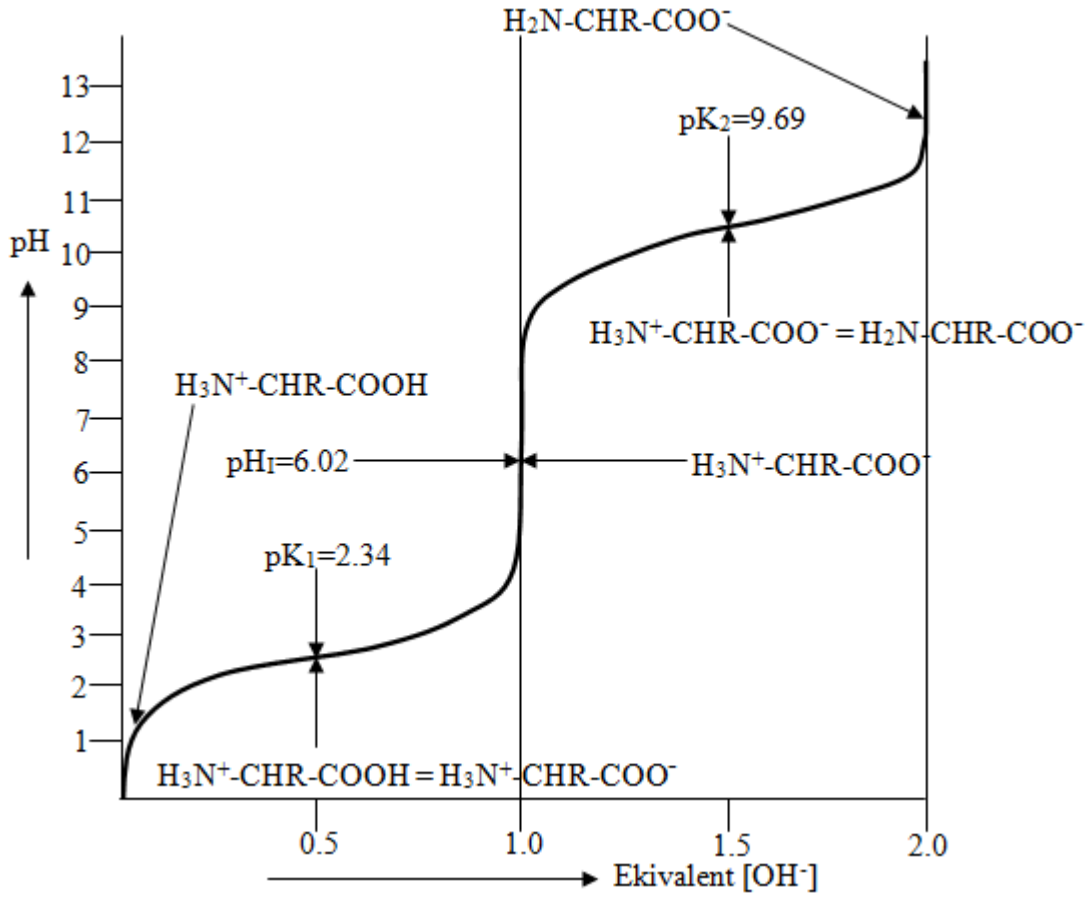
$$pH = pK_a + \log \frac{[HA^-]}{[H_2A]}$$

[H₂A] = [HA⁻] ise pH = pK_a olduğu görülür.

Diğer önemli nokta ise 1,0 eşdeğer alaninin titrasyonunda, 1,0 eşdeğer OH⁻ ilave edildiği zaman pH'nın 6,02'ye ulaştığı noktadır. Bu noktada -COOH grubu tamamen protonlarını vermiştir, alaninin tamamı zwitteriyon halindedir ve molekül üzerindeki toplam yük sıfırdır. Bu pH'da alanin doğru akım uygulanan bir elektrik alanda anoda ya da katoda hareket edemez. Bu noktadaki pH değerine **izoelektrik pH** denir ve pI ile gösterilir. Her aminoasitin kendine özgü bir izoelektrik pH' sı vardır. -R grubu iyonlaşmayan aminoasitler için izoelektrik pH (pI) = (pK₁ + pK₂) / 2 eşitliği ile verilir.

pK₁ ve pK₂ değerleri biliniyorsa herhangi bir pH'da çözültideki amino asitlerin iyonik türlerinin oranı bulunabilir. İzoelektrik noktada tamamen zwitteriyon (dipolar iyon) hali mevcuttur.

Titrasyonun ikinci basamağı, -NH₃⁺ grubunun proton kaybetmesine karşılıktır. 1,5 eşdeğer OH⁻ ilave edildiği zaman yani ikinci basamağın orta noktasında pH=pK₂= 9,69'dur ve -NH₃⁺ grubunun pK_a değerine eşittir. Bu noktada [H₃N⁺CHRCOO⁻] = [H₂NCHRCOO⁻] denge durumundadır. Titrasyon pH ≈ 12,0'da tamamlanır ve bu noktada alanin tamamen anyon (H₂NCHRCOO⁻) halindedir. -COOH için 2,34 ve -NH₃⁺ için 9,69 iki iyonlaşabilir grubun pK_a değerleridir.



Şekil 3.4 . Alaninin titrasyon eğrisi (R = -CH₃)

R grubu iyonlaşmayan aminoasitlerin titrasyon eğrisi alaninin titrasyon eğrisi gibidir. R yan grubu iyonlaşabilen aminoasitlerin (lizin, histidin, glutamik asit gibi) titrasyon eğrileri daha karmaşıktır. Çünkü bu aminoasitlerin -R yan grubunda bulunan iyonlaşabilir grup da titrasyona iştirak eder. Bu tip aminoasitlerin izoelektrik pH' larının bulunmasında aminoasidin zwitteriyon halini veren pK değerlerinin aritmetik ortalaması alınır. Örnek olarak lizin ve glutamik asidin izoelektrik pH'sını hesaplayalım. Lizinin önce -COOH grubu (pK₁ = 2,18) sonra -NH₃⁺ grubu (pK₂ = 8,95) ve en son olarak da -R grubu (pK_R = 10,53) iyonlaşacaktır. Lizinin zwitteriyon hali pK₂ ve pK_R arasında olduğundan pH_I = (8,95+10,53) / 2 = 9,74 bulunacaktır. Glutamik asit için pK₁ = 2,19 pK₂ = 9,67 ve pK_R = 4,25' dir. Glutamik asidin zwitteriyon hali, pK₁ ve pK_R arasında olduğundan izoelektrik pH; pH_I = (2,19 + 4,25) / 2 = 3,22 olarak hesaplanacaktır.

Aminoasitlerin asit-baz özelliklerini aşağıda belirtildiği şekilde özetleyebiliriz:

1) Aminoasitler, izoelektrik pH' larının üzerindeki pH' larda negatif yüklenirler (anyon) ve anota; altında ise pozitif yüklenirler (katyon) ve katota göç ederler.

2) Alanin gibi –R grubu iyonlaşmayan aminoasitlerin titrasyon eğrisi alaninin titrasyon eğrisine benzer. pK_1 değerleri 2,0 – 3,0; pK_2 değerleri ise 9,0-10,0 arasındadır.

3) Alifatik mono karboksilik asitlerin pK_a değeri 4-5 arasında olduğundan, α -aminoasitler, alifatik mono karboksilli asitlerden 100-1000 kat daha kuvvetli asitlerdir. Örneğin alaninin pK_1 değeri 2,34 iken; asetik asidin pK_a değeri 4,76'dır.

4) Aminoasitlerin α -amino grubunun bazlığıının, alifatik primer aminlerden fazla farklı olmadığı (daha zayıf) görülür.

5) Bir amino asitin izoelektrik pH değeri; pK_1 , pK_2 ve varsa pK_R değerlerinin uygun aritmetik ortalamasıdır.

6) pK_1 (1,3 – 3,3) ve pK_2 (8,6-10,6) değerlerinde titrasyon eğrisinin yatay gittiği bölgede, aminoasitlerin tampon kapasitesi vardır. Histidin ($pK_R = 6,0$) hariç aminoasitlerin fizyolojik pH' da (pH = 6,0-8,0) tampon kapasitesi yoktur. Hemoglobin bol miktarda histidin içerdiğinden fizyolojik pH sınırlarında güçlü tampon kapasitesi vardır. Aksi takdirde temiz arter kanının pH' sı 7,35'den daha asidik olur ve hemoglobin oksijen (O_2) taşıyamaz.

3.2.2. Aminoasitlerin Işık Absorpsiyonu

Aminoasitlerin hiçbirisi görünür bölgede ışık absorpsiyonu yapamazlar. Ancak aromatik benzen halkası içeren aminoasitler (fenilalanin, triptofan, tirozin) UV bölgede önemli miktarda absorpsiyon yaparlar. Çoğu proteinler yaklaşık sabit oranda tirozin aminoasidi içerdiğinden 280 nm'deki ışık absorpsiyonunun spektrofotometrik ölçümü sonucu, bir çözeltildeki protein miktarı kolay ve hassas bir şekilde tayin edilebilir. Diğer aminoasitler 220 nm'den daha düşük dalga boyunda absorpsiyon verirler.

3.2.3. Aminoasitlerin Tanınması

Bazı aminoasitler spesifik renk reaksiyonlarıyla tanınırlar (Tablo 3.3). Bu teknik kromatografi ve kağıt elektroforezinde aminoasitlerin lokalize olduğu bölgeleri görünür hale getirmede kullanılır. Belirli bir proteinin yapısında bazı aminoasitlerin bulunup bulunmadığı bu renk absorpsiyonları ile anlaşılır.

Tablo 3.3 . Bazı aminoasitlerin tanınmalarında kullanılan renk reaksiyonları

Testin Adı	Ayıraçlar	Renk	Aminoasit
Ksantoprotein	Kons. HNO_3	Sarı	Tirozin–Triptofan
Millon	$HNO_3 + Hg(NO_3)_2$	Kırmızı	Tirozin
Hopkins – Cole	Gliksilik asit + H_2SO_4	Kırmızı	Triptofan
Sakaguchi	α -naftol + $NaClO$	Kırmızı	Arginin
Nitroprusside	sey. NH_3 çözeltisinde ve sodyum nitroprusside	Kırmızı	Sistein

3.3. AMİNOASİTLERİN ANALİZİ

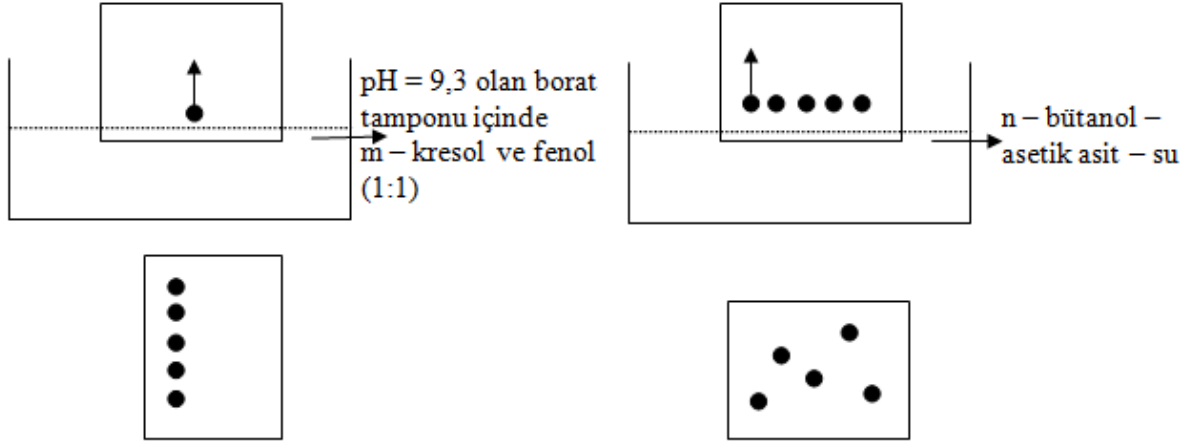
Protein yapısında bulunan aminoasitler, kuvvetli asitlerle ve enzimlerle hidroliz sonucu serbest hale getirilir. Aminoasitleri analiz etmek için çeşitli teknik ve yöntemler kullanılmaktadır. Aminoasitler şu yöntemlerle analiz edilebilir:

3.3.1. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi İle Ayırma

Dağılma kromatografisi işlemleri sabit fazın veya destek malzemesinin türüne göre kağıt kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi, gaz kromatografisi ve yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) şeklinde uygulanır. Dağılma kromatografisi türlerinin ayrılma ilkesi aynıdır. Bu ilke; ayrılacak olan maddenin genellikle higroskopik su olan sabit faz ile bir organik çözücü olan hareketli faz arasında, belirli ve farklı dağılım katsayılarına sahip olmaları ve hareketli fazın hareketiyle çok sayıda bileşenlere ayrılmanın meydana gelmesidir.

a. Kağıt Kromatografisi: Kağıt kromatografisinde Whatman No: 1 veya No: 3 gibi özel hazırlanmış süzgeç kağıtları kullanılır. Selüloz lifler üzerinde bulunan higroskopik su sabit fazı oluşturur. Ayrılacak karışımdan bir damla kağıtın kenarından 1 cm yukarı kadar damlatılır, kağıtın kenarı uygun bir organik çözücü veya çözücü karışımına daldırılır ve ayırma olduktan sonra kurutulur. Çözücü kapiler etkisiyle ilerlerken aminoasitleri de çözüp sürükler. Aminoasitlerin su ile çözücü arasındaki dağılımları farklı olduğundan; her biri farklı sürüklenir ve bir süre sonra ayrılmalar meydana gelir. Bu metotla aminoasitleri birbirinden ayırmak için, n-bütanol-asetik asit-su (4:1:5) karışımı uygulanır.

Kağıt kromatografisi; iki boyutlu (yönlü) olarak da uygulanabilir (Şekil 3.5). Bu durumda lekeler bir doğru üzerinde değil de, bir düzlem üzerinde yer alacaklarından daha iyi bir ayırma olur (Şekil 3.6). Burada birinci yürütme için pH'ı 9.3 olan borat tamponunda m-krezol ve fenol (1:1) çözeltisi kullanılır. Yürütme tamamlandıktan sonra kağıt kurutulur ve 90° çevrilir. İkinci yürütme için çözücü olarak n-bütanol-asetik asit-su (4:1:5) karışımı kullanılır. Bu işlemler tamamlandıktan sonra kağıt kurutulur. Aminoasitler renksiz olduğu için ve NH₃'lı ninhidrin çözeltisi püskürtülerek, 80°C'de ısıtılıp aminoasit lekeleri renklendirilir.



Şekil 3.5. İki boyutlu kağıt kromatografisi

Hidroksiprolin ve prolin (sarı) hariç bütün aminoasitler ninhidrin ve NH_3 çözeltisi ile mavi-mor renk verirler.

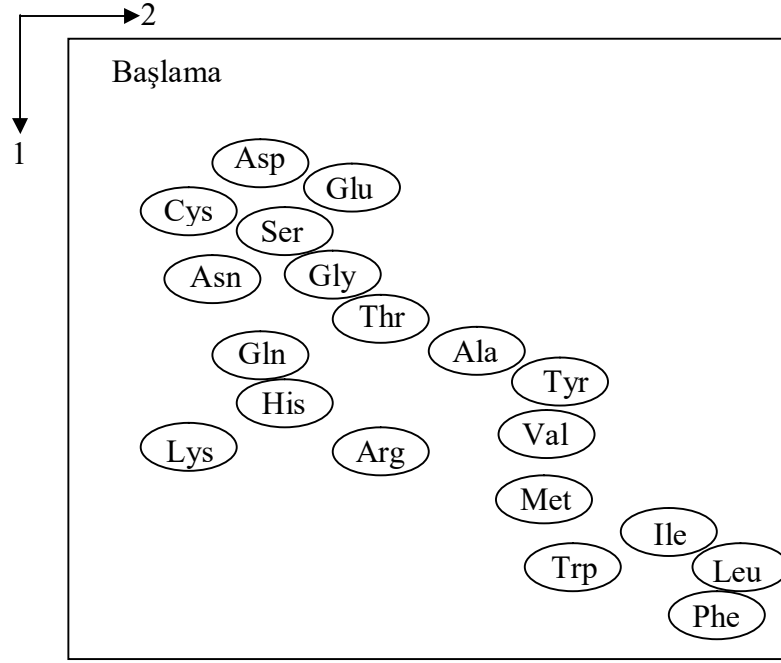
Moleküllerin dağılma kromatografisindeki hareketleri bir R_f değeri ile karakterize edilir. R_f değerlerinden ve renklerinden aminoasitler tanınır.

$$R_f = \frac{\text{Orjinden itibaren bileşiğin aldığı yol}}{\text{Orjinden itibaren çözücünün aldığı yol}}$$

Her leke kesilip alınarak, hangi aminoaside ait olduğu belirlenir ve bir spektrofotometrede lekelerin renk koyulukları incelenip yüzdeleri hesaplanabilir.

$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l C$ Lambert-Beer eşitliğinden standart çalışma grafiği (absorbansa karşı konsantrasyon) çizilerek, konsantrasyon tayin edilir.

Genellikle bu işlem uzun, zaman alıcı ve zahmetli olduğu için aminoasitler R_f değerlerinden tanınır. Her çözücü sisteminde hazırlanmış referans kartları bulunmaktadır. Her leke analiz edildikten sonra karttaki R_f değerleriyle karşılaştırılır. Böylece her lekenin hangi aminoasite ait olduğu belirlenir.

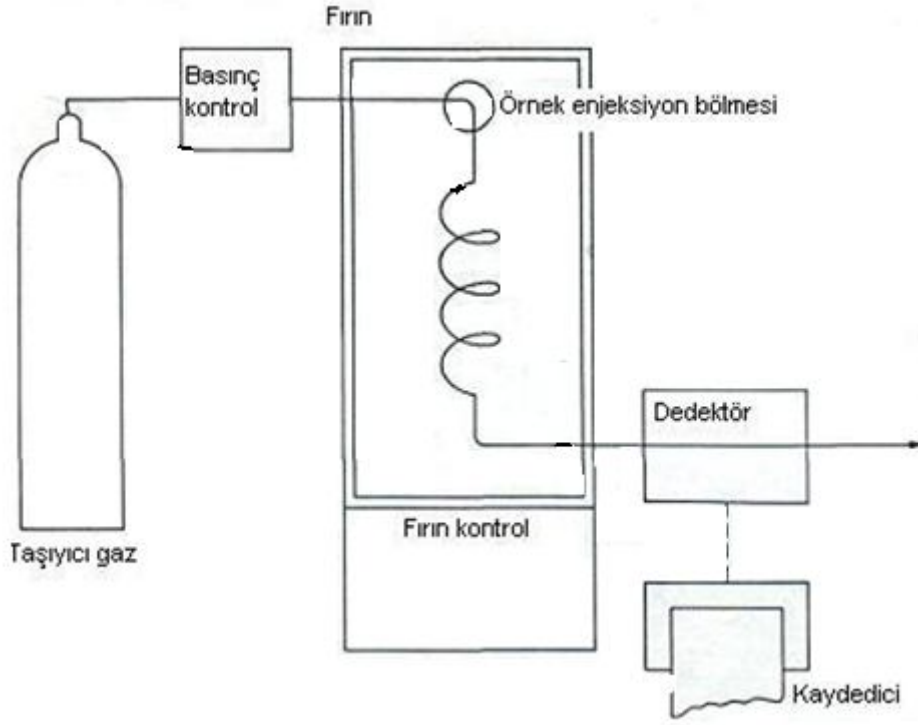


Şekil 3.6. Aminoasitlerin iki boyutlu kağıt kromatografisi ile ayrılması. **1.** Yürütme: m-krezol – fenol (1:1) pH=9,3 borat tamponu. **2.** Yürütme: n-bütanol-asetik asit-su (4:1:5)

b. İnce Tabaka Kromatografisi: İnce tabaka kromatografisinde sabit faz destek olarak; cam, alüminyum veya plastik bir plaka üzerine ince bir tabaka şeklinde kaplanmış olan silika jel, alümina veya poliakrilamid gibi maddeler kullanılır. İlkesi ve uygulaması kağıt kromatografisi gibidir. Ancak burada daha net ayrımlar elde edilebilir.

c. Kolon Kromatografisi: Kolon kromatografisinde bir cam veya plastik boru içerisine silika jel, alümina, nişasta, poliakrilamid vb. gibi madde tozları doldurularak, üzerine ayrılacak karışım uygulanır ve uygun bir çözücü ile elüe edilir.

d. Gaz Kromatografisi: Aminoasitler uçucu olmayan bileşiklerdir. Gaz kromatografisinde ancak uçucu olan bileşikler analiz edilebilmektedir. Aminoasitlerin önce uçucu türevleri hazırlanır. Bu amaçla trimetilsilyl kullanılır. Uçucu türev, gaz kromatografisi (GC) aletinin çok ince ve iyi paketlenmiş uzun kolonlarından geçirilir. Kolondan geçerken, karışımdaki aminoasitler birbirinden ayrılır ve tek tek kolonun sonundan çıkar. Kolondan çıkan her aminoasit dedektörden [Termal Kondüktivite (TCD), Elektron Yakalama (ECD) veya Alevde İyonlaşma dedektörlerinden (FID) biri kullanılır] geçer ve geçerken de kayıtedici aminoasitleri kaydeder (Şekil 3.7). Böylece karışım halindeki aminoasitlerin önce uçucu türevleri hazırlanıp, daha sonra kolondan geçirilecek olursa; bu aminoasitler birbirinden ayrılır ve karışımda hangi aminoasitin ne miktarda bulunduğu tayin edilir.



Şekil 3.7. Gaz kromatografisinin temel bileşenleri

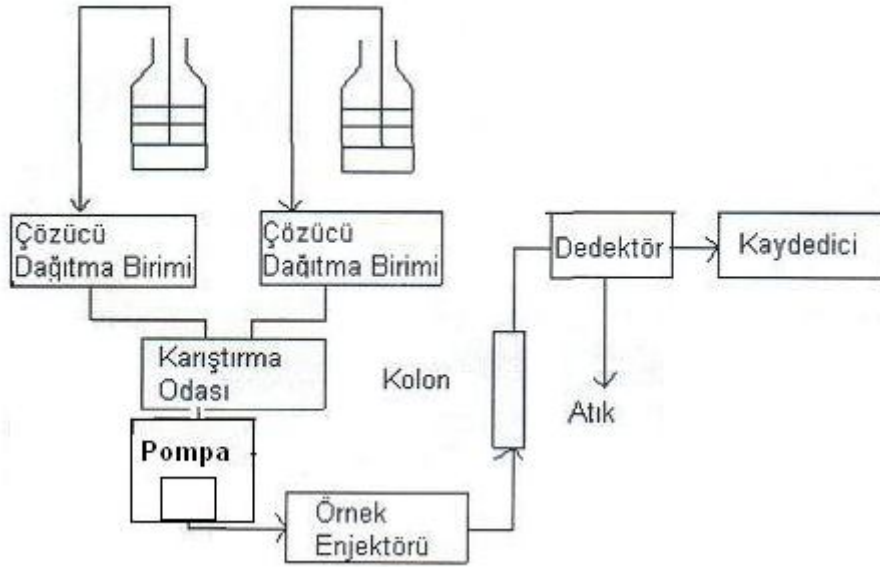
e. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC): Ayırma teknikleri içerisinde HPLC en yaygın olarak kullanılanlardanandır. Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan HPLC yönteminde, sabit faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesi sonucu, hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulanması gerekir. Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, en yaygın biçimde uygulanan kromatografi türüdür (Şekil 3.8).

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmokoloji, bitki kimyası vb. alanlarında ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir yöntemdir. Özellikle, diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikler ve yüksek polarlıktaki bileşikler, herhangi bir türevlendirme olmaksızın HPLC ile ayrılabilir ve analiz edilebilir.

HPLC' nin sıvı kromatografisinin diğer türlerinden üstünlükleri şunlardır:

- HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
- Böyle kolonlarda gerçekleştirilen ayırma, çok daha çeşitlidir.

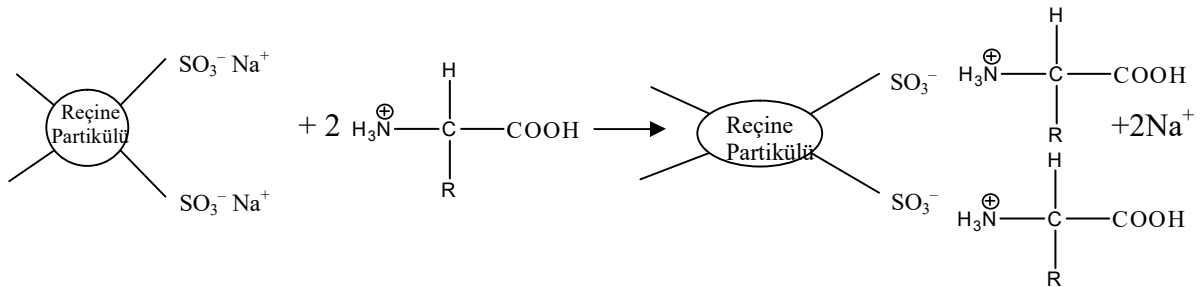
- Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- Nicel analiz amaçları için de kullanılabilir.
- Analiz süresi kısadır.
- Duyarlık çok yüksektir, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak 10 µg'lık bir örnek bile tayin edilebilir.



Şekil 3.8. HPLC cihazının temel bileşenleri

3.3.2. İyon Değişim Kromatografisi:

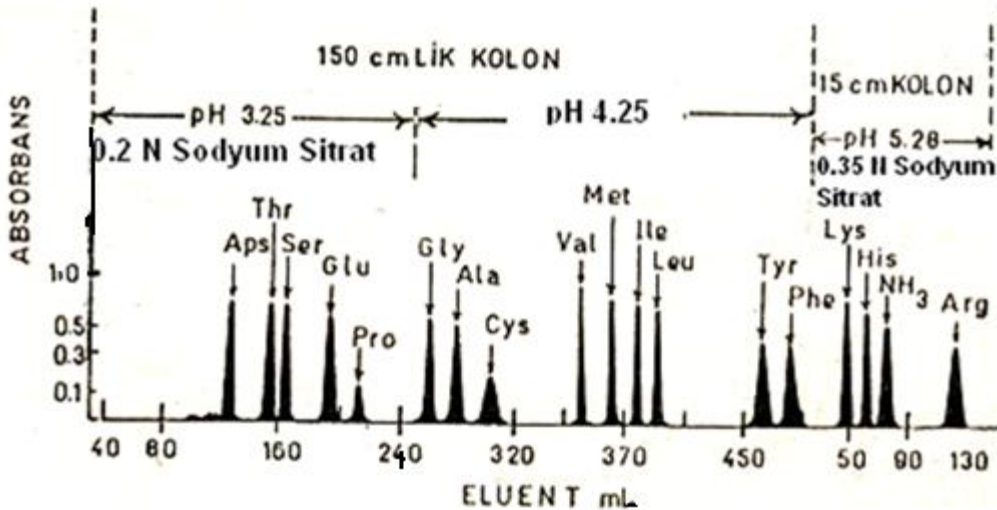
İyon değiştirici reçineler polistiren, poliakrilamid gibi sentetik reçine moleküllerinde karboksil grubu (zayıf asit), sülfonik asit (kuvvetli asit) veya kuaterner amonyum katyonu gibi bazik bir grup bulunan maddelerdir. Asit grubu ($-\text{SO}_3\text{H}^+$) bulunan reçine, NaOH ile muamele edildiği zaman anyon haline ($-\text{SO}_3\text{Na}^+$) geçerek katyonları bağlayabilirler.



Ortamın pH'sına göre aminoasitlerin reçine anyonuna bağlanma kuvvetleri farklıdır. İşte bu özellikten yararlanarak aminoasitler birbirlerinden ayrılabilirler.

Uygulamada sülfonize ve % 8 (divinil benzen) çapraz bağlı kation değiştirici reçine (ticari adı Dowex 50x8) ile oldukça iyi sonuçlar alınmaktadır. Analizde biri kısa (15 cm) diğeri uzun (150 cm) olan iki kolon kullanılır. Katyon değiştirici reçine tozu pH = 3,0 olan tampon çözelti ile karıştırılarak kolonlara doldurulur, süzildükten sonra pH = 3,0 olan tampon çözeltide çözünmüş olan aminoasitler karışımı üstten kolona verilir. Kısa kolon pH = 5,28 olan tampon çözeltisi ile elüe edilir. Sırasıyla lizin, histidin ve arginin aminoasitleri kolondan alınır. 0,35 N sodyum sitrat tamponu kısa kolonda elüsyon çözeltisi olarak kullanılır.

Uzun kolon önce pH = 3,25 olan tampon çözeltisi ile elüe edilir. Sırasıyla aspartik asit, treonin, serin, glutamik asit ve prolin gelir. Elüatlar küçük fraksiyonlar halinde alınır ve analize tabi tutulur. Sonra pH = 4,25 olan tampon çözeltisi ile elüsyona devam edilir; sırasıyla glisin, alanin, sistein, valin, metionin, izolösin, lösin, tirozin ve fenilalanin ayrılır. Elüsyon çözeltisi için 0,2 N sitrat tamponu kullanılır. Fraksiyonlardan alınan numuneler ninhidrin ile ısıtılarak renklendirilir ve spektrofotometrede $\lambda = 570$ nm'de absorpsiyonu ölçülür. Bu yöntem kolonlar 1/3 oranında kısaltılarak otomatik hale getirilmiştir. Otomatik analiz cihazında (otoanalizör) elüatlar 55°C'de sürekli olarak ninhidrin ile renklendirilir ve bir spektrofotometre hücrelerinden geçerken 570 nm'de sürekli olarak grafiğe alınır (Şekil 3.9). Grafiklerin alıkonma zamanlarından aminoasitlerin türleri; pik alanlarından da aminoasitlerin yüzdeleri hesaplanır. Ya da elektronik bir düzenele sayısal olarak gösterilir veya yazılır. Bir aminoasit otoanalizörü ile proteinlerdeki aminoasit yüzdeleri birkaç saat içinde doğru bir şekilde tayin edilebilir.



Şekil 3.9. Aminoasitlerin otomatik tayinlerinin yapılmasında kullanılan aminoasit analizörü ile elde edilen kromatografik profil.

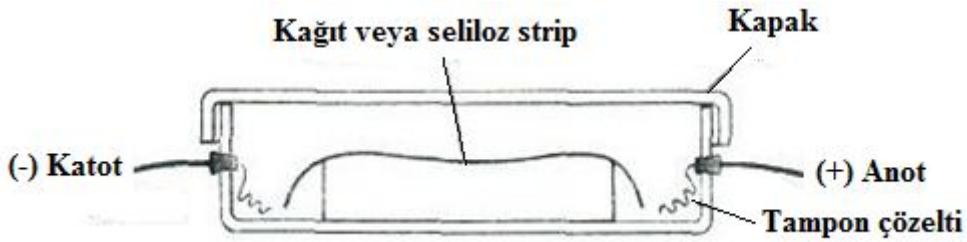
3.3.3. Yüksek Gerilim Elektroforezi İle Ayırma:

Belli bir pH'da aminoasitlerin yük farklılıklarına göre elektriksel alanda göç etmeleri esasına dayanır. Uygun bir tampon çözelti ile ıslatılmış süzgeç kağıtının ortasına yine aynı tamponda çözülmüş aminoasitler karışımı numunesi damlatılır. Kağıdın karşılıklı kenarlarında bulunan elektrotlara birkaç bin voltluk DC elektrik alanı uygulanır (Şekil 3.10). Tampon çözelti için pH'nın 6.4 olduğunu varsayalım. Bu pH'da aspartik asit ve glutamik asit negatif (-) yüklüdürler, anoda (+) göçerler. Lizin, arginin ve histidin gibi bazik aminoasitler pozitif (+) yüklüdürler, katoda (-) göçerler. Göçme hızı molekül ağırlığına da bağlıdır, küçük moleküller daha hızlı, büyük moleküller daha yavaş göç ederler.

Bunların dışındaki aminoasitlerin (nötral aminoasitler) izoelektrik pH değerleri 6,4'e yakın olduğundan yük durumlarına göre kimi anoda kimileri katoda daha yavaş göçerler. Birkaç saat sonra ayrılma olur. Ancak aminoasitler renksiz olduğu için görülemezler. Kağıt kurutulduktan sonra üzerine ninhidrin çözeltisi püskürtülüp ısıtılarak aminoasit lekeleri görünür hale getirilir. Bu yöntemde değişik tampon çözeltileri kullanılarak aminoasitlerin en uygun şekilde ayrılması sağlanabilir.

$$\text{Elektriksel hareketlilik} = \frac{v(\text{göç hız})}{E(\text{volt})}$$

Bu yöntem küçük moleküllü peptidlerin ve nükleik asitlerin ayrılmasında da kullanılabilir.



Şekil 3.10. Kağıt veya selüloz strip elektroforezi.

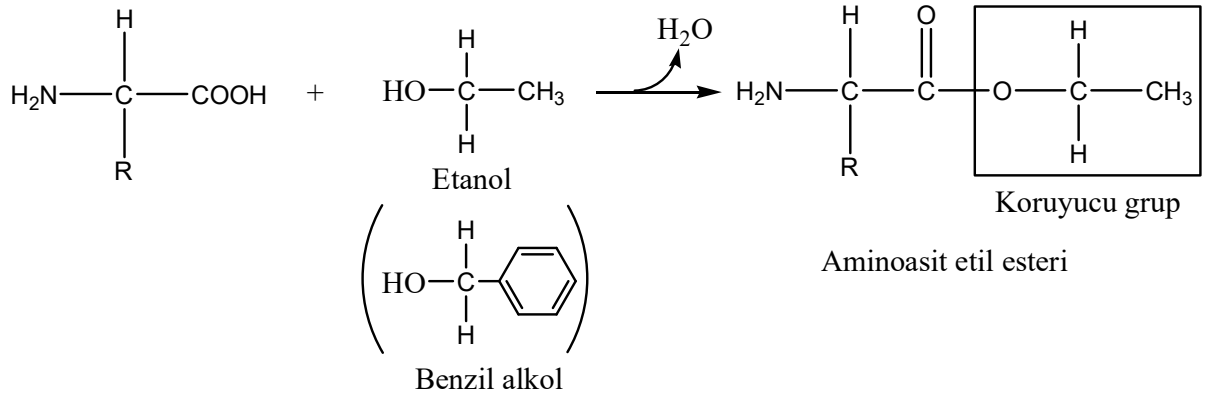
3.4. AMİNOASİTLERİN KİMYASAL REAKSİYONLARI

Aminoasitler, karakteristik kimyasal reaksiyonlarını α -karboksil, α -amino ve yan zincirlerindeki fonksiyonel gruplarıyla vermektedir.

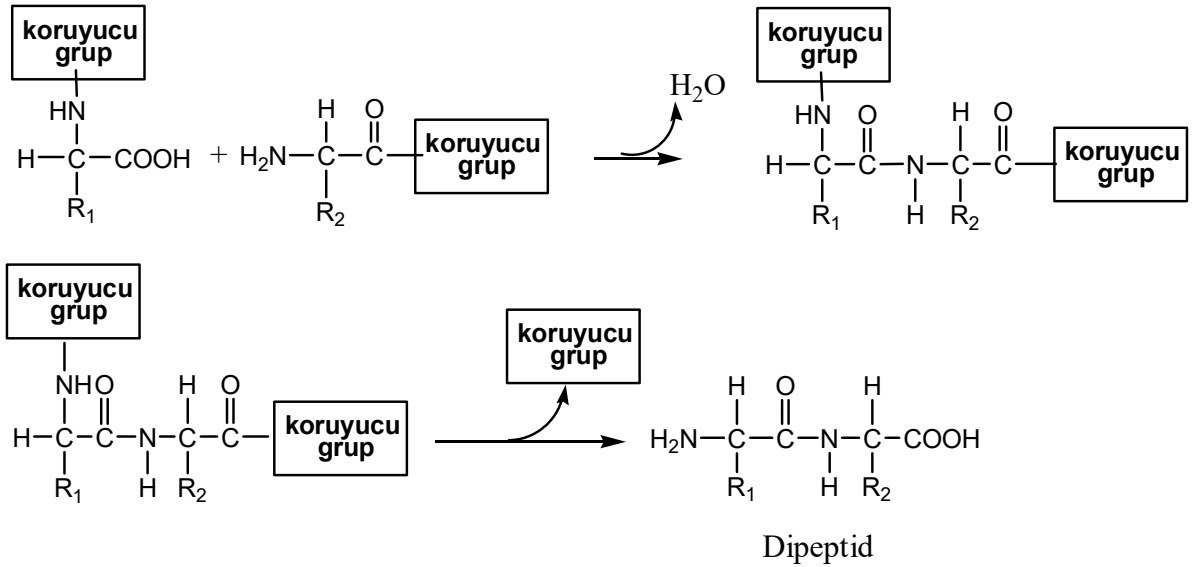
3.4.1. Aminoasitlerin α -Karboksil Gruplarının Reaksiyonları

1. Aminoasitlerin α -karboksil grupları amidleri, esterleri ve asit halojenürleri vermek üzere organik reaksiyonlara girerler. Etanol ve benzil alkol ile aminoasitlerin

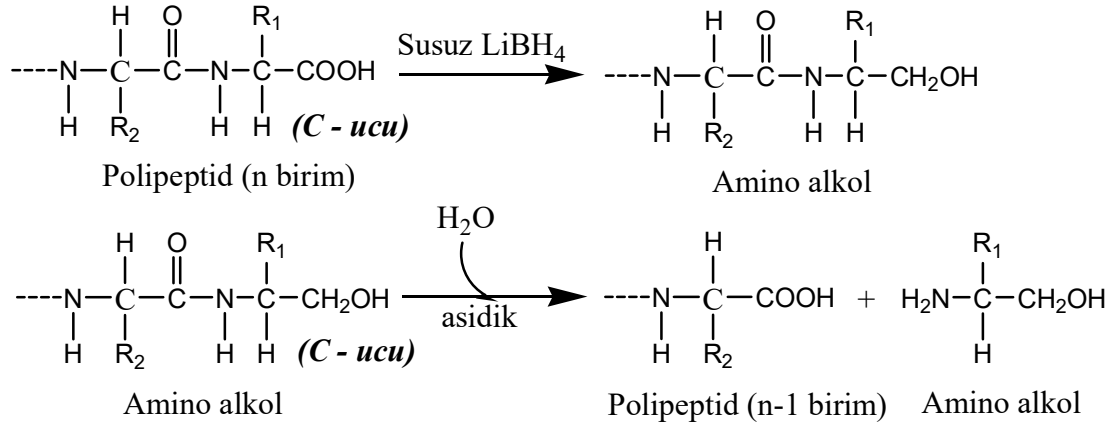
esterleşmesi peptidlerin kimyasal sentezinde karboksil grubunun geçici olarak korunması için kullanılır.



2. α -karboksil grubu korunmuş bir aminoasit ile α -amino grubu korunmuş diğer bir aminoasit arasından bir mol suyun çıkmasıyla peptid bağı oluşur. Birinci aminoasidin α -amino, ikincisinin α -karboksil grubu korunmuş olmasaydı iki farklı dipeptid oluşur.

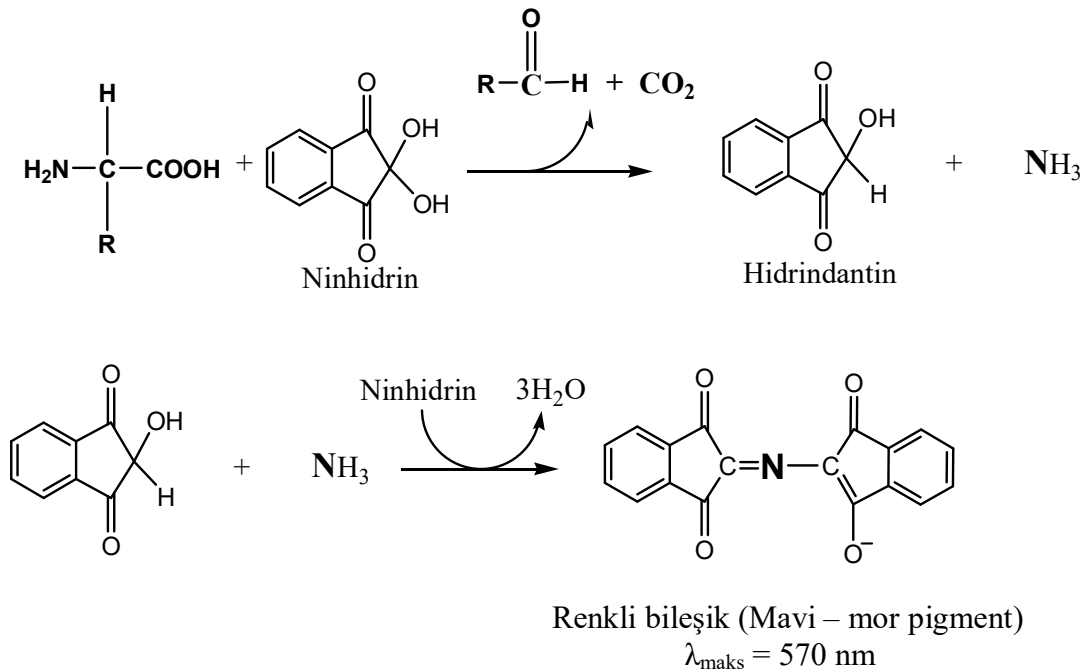


3. Aminoasitlerin karboksil grubunun diğer önemli bir reaksiyonu da polipeptidlerin C- ucu aminoasitlerinin tayininde kullanılmaktadır. Susuz ortamda bir polipeptid LiBH_4 ile etkileştirilirse C- ucu aminoasidinin α - amino alkolü meydana gelir. Daha sonra bütün polipeptid hidroliz edilerek α - amino alkol kromatografik yöntemle kolayca tayin edilir.

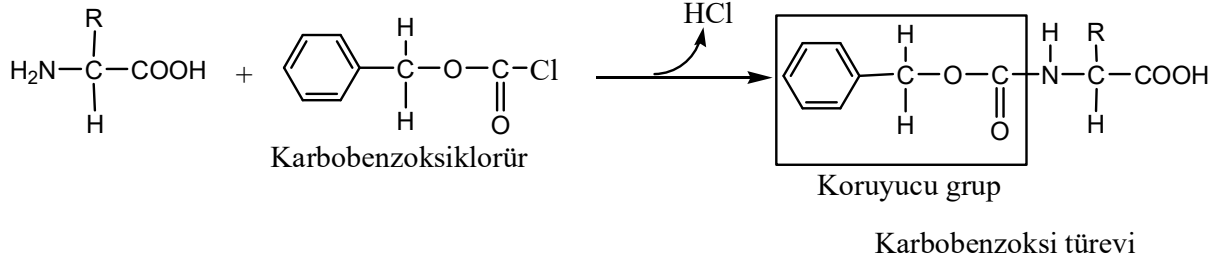


3.4.2. Aminoasitlerin α -Amino Gruplarının Reaksiyonları

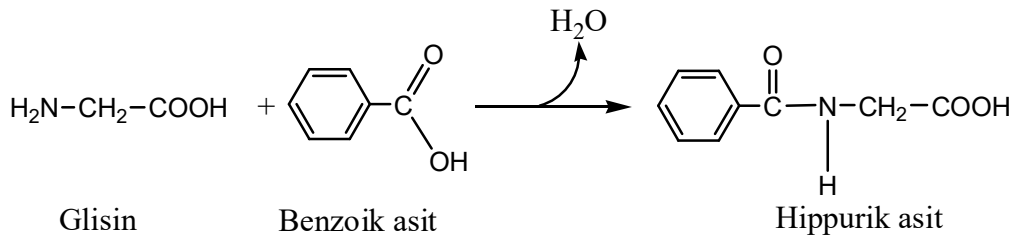
1. α -Amino grubunun en karakteristik ve en çok kullanılan reaksiyonu, aminoasitler ve proteinlerin α -amino grubunun tanınmasında kullanılan ninhidrin ile vermiş oldukları reaksiyonlardır. Bu reaksiyonla aminoasitler çok az miktarlarda bile kantitatif olarak tayin edilebilir. α -aminoasitler iki eşdeğeri ninhidrin ile ısıtılacak olursa mavi-mor renkli kompleks oluşturur ve bunun kolorimetrik ölçülmesi ile aminoasitlerin miktarı belirlenir (Beer Yasası, $A = \epsilon lC$). Bu reaksiyon serbest amino grubu bulunan bütün aminoasitler ve peptidler tarafından verilir. Prolin ve hidroksprolin sarı renkli kompleks verir.



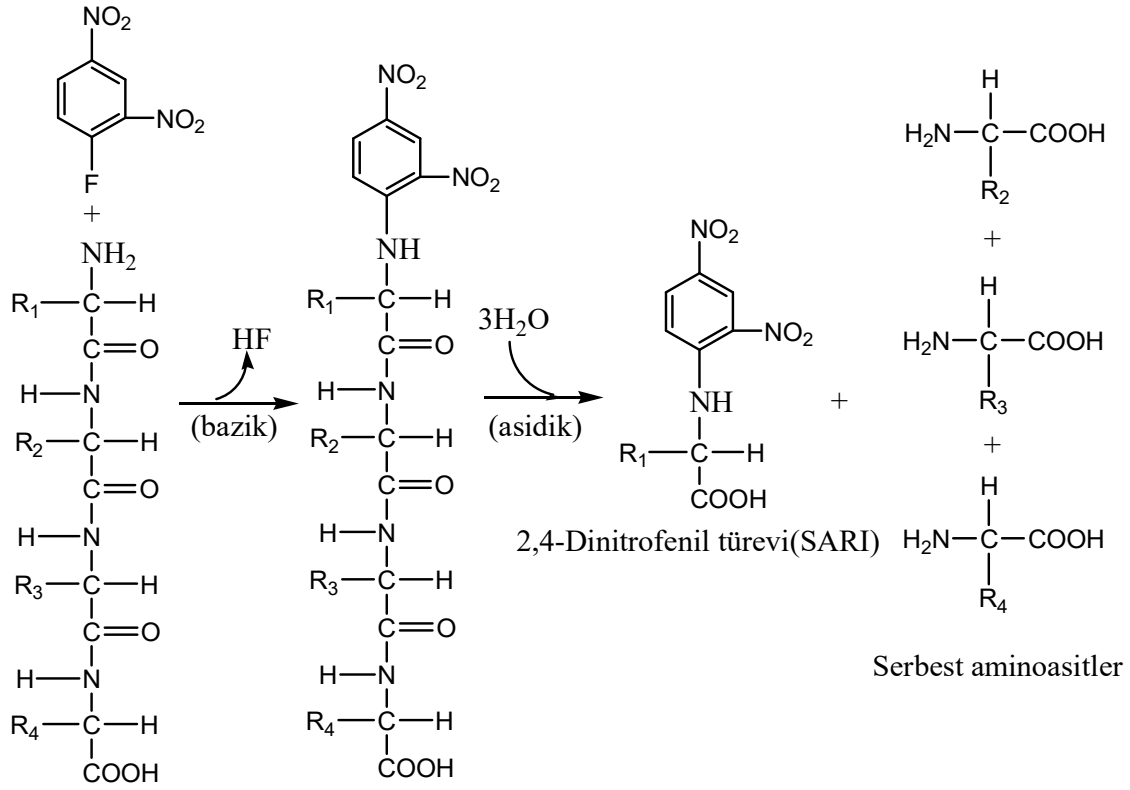
2. Aminoasitlerin α -amino grupları, asit klorürleri veya anhidritleri ile açillendirilebilirler. Bu işlem peptid sentezinde α -amino grubunun geçici olarak korunmasında kullanılır.



3. *In vivo* koşullarda glisin benzoik asit ile benzoile edilerek hippurik aside dönüştürülür. Bu reaksiyon **detoksifikasyon** mekanizması bakımından önemlidir. Hippurik asit idrar yolu ile vücuttan atılır. Benzoik asit ve türevleri hücre için toksiktir. Benzoik asit TCA çevrimi ve solunum zincirinin bazı enzimlerini inhibe eder ve hücre membranını da parçalar. Benzoatlar daha çok mayalar ve mantarlara karşı etkilidir. Benzoatların gıdalardaki konsantrasyonu %0,05–0,1 arasında olmalıdır. Benzoatlar doğal olarak gıdalarda bulunduğu gibi birçok ambalajlanmış besinlerde de katkı maddesi olarak kullanılır.

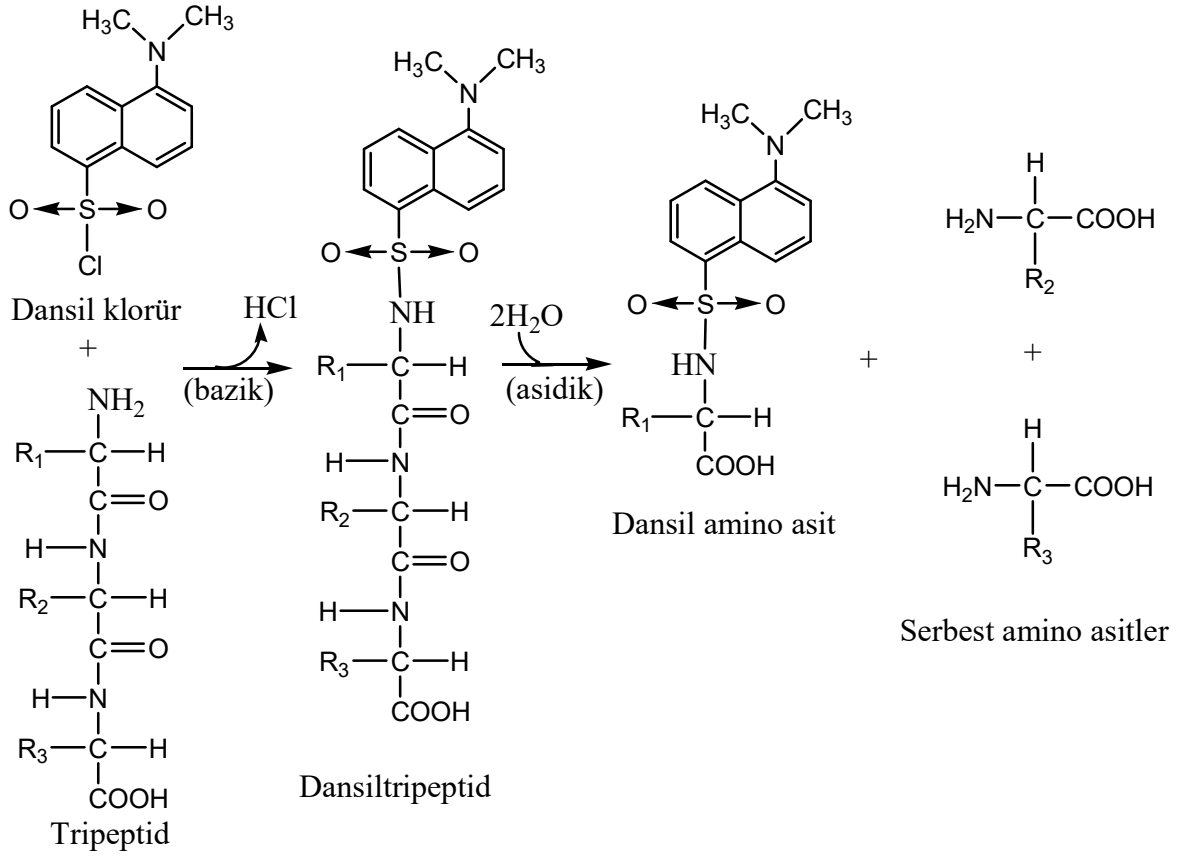


4. α -Amino grubunun bir başka önemli reaksiyonu da 2,4-dinitroflorobenzen (2,4-DNFB) ile olan reaksiyonudur. Zayıf bazik çözeltilerde aminoasitlerin sarı renkli 2,4-dinitrofenil türevleri oluşur (Şekil 3.11). Bu metod, F. Sanger tarafından polipeptid zincirlerinin N- ucunda bulunan aminoasitlerin teşhisinde kullanılmıştır. Oluşan sarı renkli türev kromatografik olarak ayırt edilir.



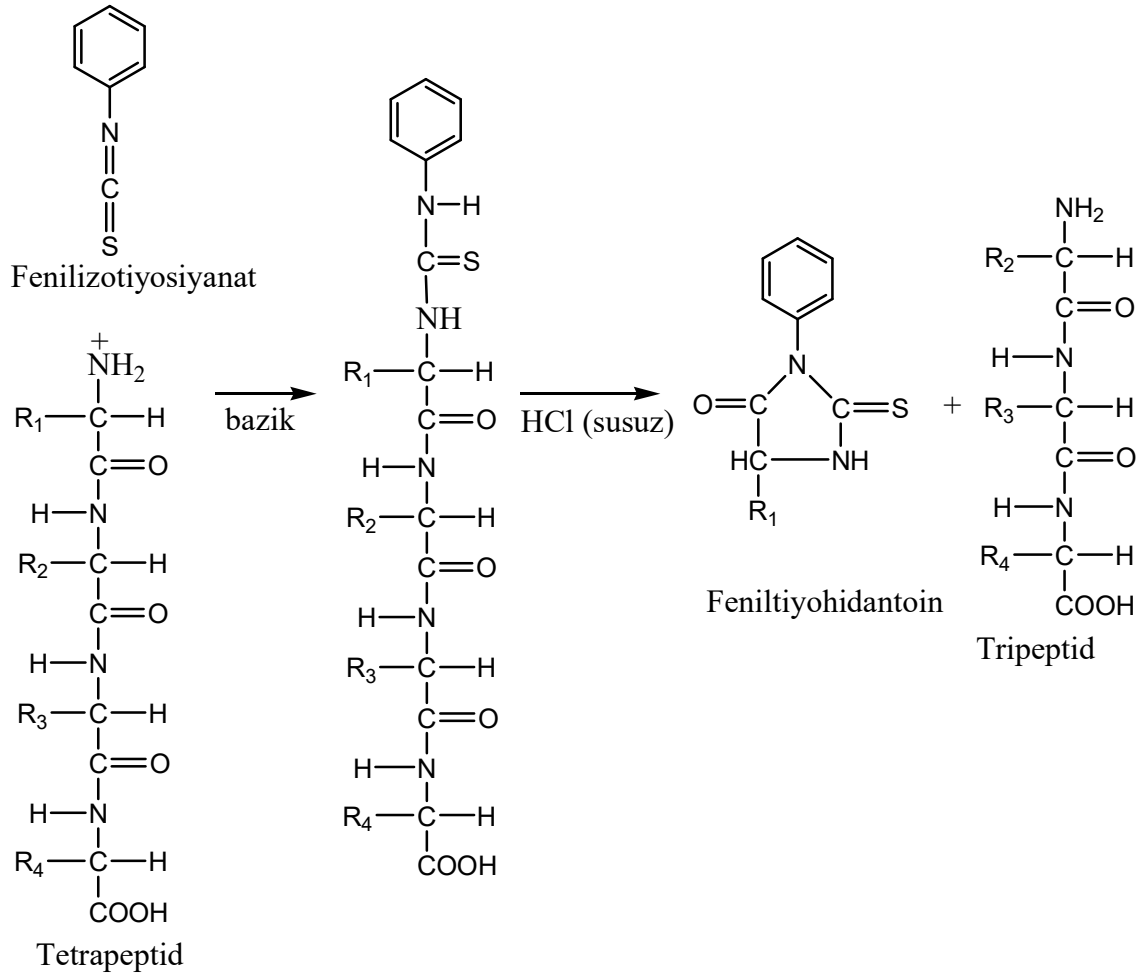
Şekil 3.11 . Sanger reaksiyonuna göre bir tetrapeptidin N- ucu aminoasidinin teşhisi

5. Son yıllarda α -amino grubunun dansil klorür bileşiği ile işaretlenmesi yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 3.12.). Dansil grubu floresans özellikte olduğundan dansil aminoasit türevleri florometrik yöntemle çok düşük miktarda bile (50 pikomol) belirlenebilmektedir.



Şekil 3.12. Dansil türevi olarak bir tripeptidin N- ucu aminoasidinin teşhisi

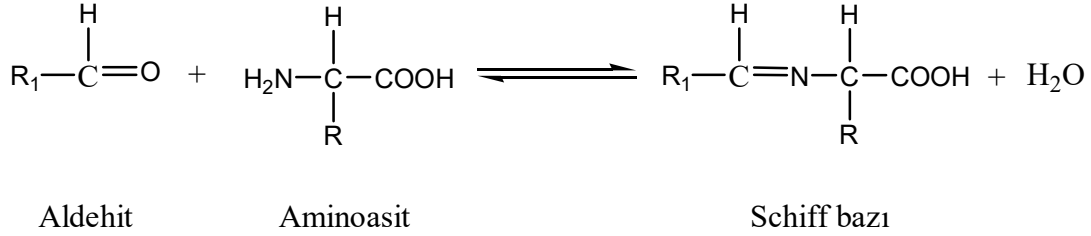
6. Polipeptid zincirlerinin aminoasit sıralanışının belirlenmesinde yararlanılan ve amino grubu üzerinde gerçekleştirilen en önemli ve çok kullanılan bir başka reaksiyon Edman reaksiyonudur. Susuz asidik ortamda fenilizotiyosiyanat bir peptidin serbest amino grubuyla fenilhidantion türevine dönüşür ve zincirin diğer kısmı bozulmamış olarak kalır (Şekil 3.13). Bu türev gaz kromatografisi ile kolayca ayrılabilir ve teşhis edilebilir.



Şekil 3.13. Edman reaksiyonu ile N- ucu aminoasidinin teşhisi

Fenilzotiyosiyanat ile polipeptidlerin N- ucundan başlayarak aminoasit sırasını tayin etmek mümkündür. Her bir reaksiyon turunda bir aminoasit türevi serbest hale getirilerek gaz kromatografisi ile tayin edilir. N- ucundaki 1. aminoasitten sonra sırasıyla 2. 3. ve diğer aminoasitler tayin edilir. Polipeptidin uzunluğu arttıkça aminoasit dizisinin belirlenmesinin doğruluğu azalır. Bu yöntemde önce polipeptid zinciri daha küçük peptid zincirlerine ayrılır ve her bir peptid zincirinin aminoasit sırası Edman reaksiyonu ile belirlenir. Böylece bir polipeptid zincirinin aminoasit sırası belirlenmiş olur.

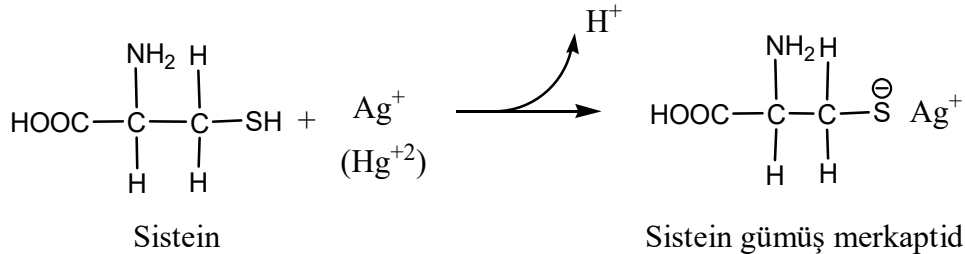
7. Aminoasitlerin α - amino grupları aldehitlerle Schiff bazı adı verilen az kararlı bileşikler oluşturur. Schiff bazları; substratları α -aminoasitler olan enzimlerin reaksiyon mekanizmalarında ara bileşiklerdir.



3.4.3. Aminoasitlerin Yan Zincirlerinin Reaksiyonları

Aminoasitler, yan zincirlerindeki $-\text{SH}$ ve $-\text{OH}$ gibi fonksiyonel gruplarla da reaksiyon verirler. Bu reaksiyonların bazıları kalitatif teşhiste kullanılabilir. Ancak daha hassas olan kromatografik yöntemler bu amaçla daha çok kullanılır. Sistein aminoasidinin $-\text{SH}$ grubu reaksiyona girmeye oldukça yatkındır. Alkali çözeltilerde bir seri kompleks reaksiyonlar sonucunda kükürt kaybolur.

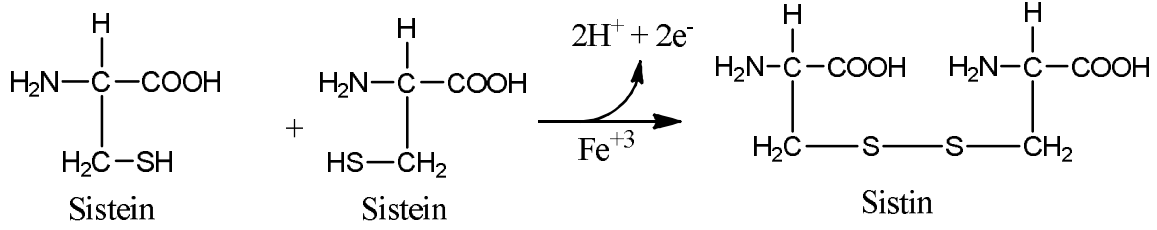
1. Sistein eser miktarda da olsa ağır metal katyonları ile merkaptanları oluşturur.



Sistein birçok enzimin katalitik bölgesinin (aktif merkez) çok önemli bir bileşendir. Bu tip enzimler Ag^+ , Hg^{+2} ve Pb^{+2} gibi ağır metal katyonları ile $-\text{SH}$ üzerinden reaksiyon vererek merkaptanları oluşturur ve enzim aktivitesini kaybeder.

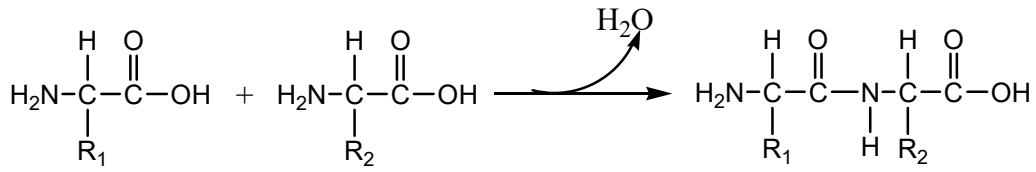
2. Demir tuzlarının varlığında iki sistein molekülü $-\text{SH}$ grupları üzerinden yükseltgenerek disülfid çapraz kovalent bağlarını ($-\text{S}-\text{S}-$) oluşturur ve oluşan bileşiğe **sistin** adı verilir. Protein zincirinin farklı yerlerindeki sistein aminoasidi birimleri $-\text{SH}$ grupları üzerinden yükseltgenerek disülfid kovalent bağı oluşturarak, zincir içinde çapraz kovalent bağları meydana getirir. Böylece disülfid kovalent bağları proteinlerin üç boyutlu yapılarına

katkıda bulunurlar. Disülfid kovalent bağı, iki polipeptidin bir arada tutulması ya da bir polipeptidin iki noktasının birbirine bağlanmasında rol oynamaktadır.



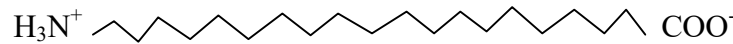
3.5. PEPTİD BAĞI VE ÖZELLİKLERİ

Proteinler aminoasitlerin birbirlerine bağlanması sonucu oluşur. Bir aminoasidin α - karboksil grubu ile diğer bir aminoasidin α - amino grubu arasından 1 mol H_2O 'nun açığa çıkmasıyla oluşan kovalent bağa **peptid bağı** denir. Peptid bağı bir çeşit amid bağıdır.



İki aminoasidin birleşmesiyle **dipeptid**, üç aminoasidin birleşmesiyle **tripeptid**, çok sayıda aminoasidin birleşmesiyle **polipeptid** zinciri ve bu zincirin üç boyutlu yapı kazanmasıyla **protein** oluşur. Genellikle, 10 dan daha az amino asitten oluşan zincire oligopeptit adını alır. Proteinler ise genellikle 50 ya da daha fazla amino asit içeren peptid zincirinden oluşur.

Bir polipeptid zincirinin serbest halde bir $-\text{COOH}$ ve bir de $-\text{NH}_2$ ucu vardır. Nötral ortamda iyonlaştıkları düşünülür ise bir polipeptid zinciri aşağıdaki şekilde gösterilebilir.



Polipeptid zincirinin aminoasit bileşenlerinin okunmasına N- ucundan başlanır ve her bir aminoasidin isminin sonuna **-il** eki getirilir ve C- ucundaki aminoasit aynen okunur.

Örneğin;

(N-ucu) H_3N^+ -(Ala-Glu-Gly-Lys)- COO^- (C-ucu) tetra peptidi; alanil-glutamil-glisil-lizin şeklinde isimlendirilir.

3.6. PROTEİN YAPISININ DÜZEYLERİ

Proteinler biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için gerekli olan üç boyutlu yapılarını (konformasyonlarını) açıklayacağımız periyodik motifleri de içeren dört basamakta kazanırlar. Proteinlerin yapısı denince; **1)** Polipeptid zincirinde yer alan aminoasitlerin dizilişi (primer yapı), **2)** Aminoasitlerin –R grupları dikkate alınmaksızın polipeptid zincirinin uzaydaki konumu (sekonder yapı), **3)** Protein molekülünde –R grubundakiler de dahil tüm atomların uzaydaki konumu (tersiyer yapı) anlaşılmalıdır. **4)** Biyolojik işlev gören protein, birden fazla polipeptid zincirinden (alt birim) oluşuyorsa, bunların birbirine karşı konumları (kuaterner yapı) da bilinmelidir.

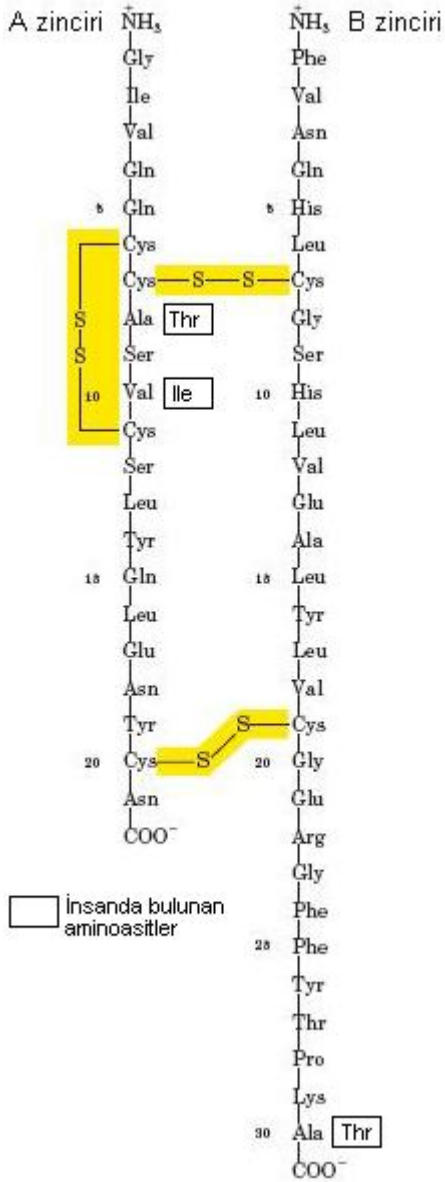
Birer biyomakromolekül olarak tanımlanabilen proteinlerin çok çeşitli konformasyonları alması mümkündür. Ancak biyolojik bir görevi yerine getirebilmeleri doğal konformasyonlarını sağlamaları ile mümkün olur. Bu yapılar oldukça düzenli ve kompleks olduklarından anlaşılabilmeleri için dört farklı yapı düzeyi dikkate alınır; birincil yapı, ikincil yapı, üçüncül yapı ve dördüncül yapı.

3.6.1. Primer (birincil) Yapı

Primer yapı protein molekülünde yer alan aminoasitlerin diziliş sırasındır ve proteinin omurgasını oluşturur. Disülfid çapraz kovalent bağları var ise bu yapıya katkıda bulunur. Bu yapı DNA'daki nükleotid dizilişi tarafından şifrelenir. Protein molekülündeki aminoasit sıralanışını kromozomal DNA'daki genler belirler. Kalıtım molekülü DNA'daki nükleotidlerin sırası RNA'daki nükleotidlerin tamamlayıcı sırasını belirler. Proteinler temelde aynı mekanizma ile aminoasitlerin peptid bağıyla birleşmesiyle sentezlenir. Primer yapı proteinin üç boyutlu aktif konformasyonundan birinci derece sorumludur. Birincil yapı bir proteinin ya da peptidin polipeptid zincirini oluşturan aminoasitlerin amino ucundan karboksil ucuna doğru sırasındır. Bu yapı polipeptid zincirindeki bütün disülfür köprüleri dahil bütün kovalent bağları kapsar. Meselâ, bir peptid hormon olan insülin birbirine disülfür bağlarıyla bağlı iki polipeptid zincirinden oluşur.

1953 yılında gerçekleştirilen iki önemli buluş biyokimya tarihinde büyük öneme sahiptir. Bu tarihte J. Watson ve F. Crick DNA'nın çift sarmal yapısını tanımlamıştır. Aynı yıl F. Sanger insülin hormonunun polipeptid zincirinin DNA'daki nükleotid dizisini ortaya koymuş ve proteinlerdeki aminoasit dizisi arasında bir ilişki olduğu anlaşılmıştır. Bu buluşlardan ancak 10 yıl sonra proteinlerin aminoasit dizilişinde DNA nükleotidlerinin rolü gösterilmiştir.

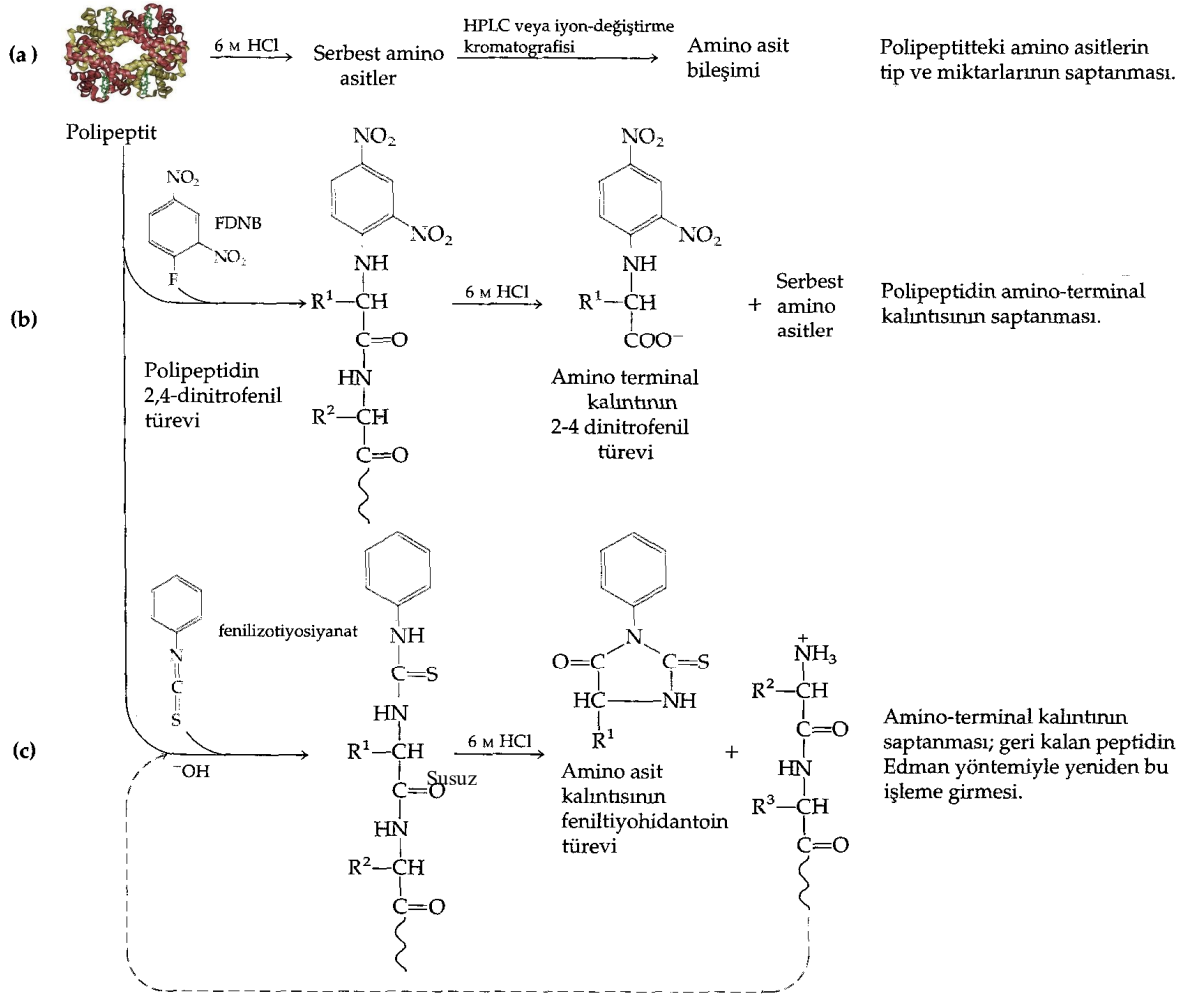
Çeşitli türlerden binlerce farklı proteinin aminoasit dizisi ilk kez F. Sanger tarafından geliştirilen yöntemle belirlenmiştir. 1953 yılında F. Sanger protein yapısında bir hormon olan insülin'in aminoasit sıralanışını belirleyerek ilk defa bir proteinin aminoasit dizilişini göstermiştir (Şekil 3.14). Bu çalışması ile 1956'da ilk Nobel kimya ödülünü kazanmıştır. (DNA baz dizilişini tayin etmek için geliştirdiği yöntemle 1977 yılında ikinci Nobel ödülünü kazanmıştır). İnsülin hormonu iki zincirden oluşmuştur.



Şekil 3.14. Sığır insülininin aminoasit dizisi. İki polipeptid zinciri disülfid çapraz bağlarıyla birbirine bağlıdır. A zinciri domuz, köpek, tavşan ve balina insülininde aynıdır. İnek, domuz, köpek, at ve keçide B zincirleri aynıdır. Sığır insülin hormonunun aminoasit dizilişinde 3 tane disülfid çapraz kovalent bağ vardır. Bu çalışma biyokimyada dönüm noktası olmuştur. Her bir proteinin kendine özgü bir aminoasit sırası vardır.

Bir proteinin primer yapısını belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılır. Proteinlerdeki uzun polipeptidlerin aminoasit sıralamasının doğru şekilde yapılabilmesi için polipeptid küçük parçalara ayrılmalıdır. Bu işlemin birkaç basamağı vardır. Bu yöntemlerden birinde, ilk olarak protein kimyasal ve enzimatik yöntemlerle hidroliz edilip aminoasit içeriğini belirler. Eğer disülfid bağları varsa kırılmalıdır. Sonra Sanger'in yöntemiyle N- ucu aminoasidi teşhis

edilir ve daha sonra da Edman yöntemiyle polipeptidin tüm aminoasit sırası belirlenir. Bir polipeptidin aminoasit sırasının belirlenmesindeki basamaklar Şekil 3.15’de gösterilmiştir.



Şekil 3.15. Bir polipeptidin dizilenmesindeki basamaklar. **(a)** Aminoasit bileşiminin saptanması ve amino terminal kalıntının tanımlanması. **(b)** sıklıkla bir polipeptid dizilimindeki ilk basamaklardır. Burada Sanger'ın yöntemiyle amino terminal kalıntının tanımlanması gösterilmiştir. Edman yıkım yöntemi **(c)** bir peptidin düz dizilimini açığa çıkarır. Daha kısa peptidler için bu yöntem tek başına tüm dizilim için etkilidir ve **(a)** ve **(b)** basamakları sıklıkla atlanır. Sonraki yöntemler daha büyük polipeptidler için uygundur. Bu büyük polipeptidler sıklıkla dizi tayini için daha küçük peptidlere ayrılırlar.

Bir proteinin aminoasit sıralanışının bilinmesi dört yönden önemlidir.

a. Proteinin aminoasit sırasının bilinmesi, biyolojik aktivitesinin moleküler temelinin açıklanmasında önemli bir aşamadır.

b. Birçok proteinin aminoasit sırasının ve üç boyutlu yapısının bilinmesi gerekir. Çünkü bu bilgilerden yararlanılarak, polipeptid zincirlerin karakteristik üç boyutlu yapıya katlanmasını yöneten kurallar açıklanabilir.

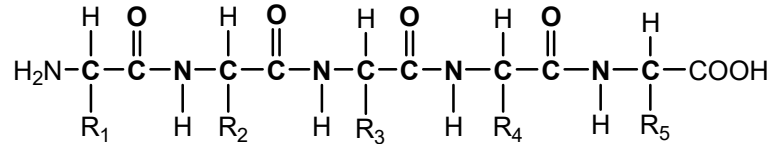
c. Aminoasit sıralanışındaki değişmeler, anormal işlevler ve hastalıklar ortaya çıkmasına neden olur. Örneğın orak hücreli anemi gibi öldürücü bir hastalık, tek bir proteinde tek bir aminoasitteki değişiklikten oluşmaktadır. Orak hücreli hemoglobin (Hemoglobin S) normal hemoglobinden (Hemoglobin A) sadece bir aminoasit bakımından farklıdır. Hemoglobinin iki β-zincirindeki 6 nolu aminoasit kalıntısı glutamat yerine hasta hemoglobinde valin geçer.

Hemoglobin A: Val – His – Leu – Thr – Pro – **GLU** – Glu – Lys –

Hemoglobin S: Val – His – Leu – Thr – Pro – **VAL** – Glu – Lys –

d. Biyolojik sistemlerdeki moleküler değişimler aminoasit sıralanışlarından izlenebilirler. Akıaba olmayan proteinlerin (türlerin) aminoasit sıralanışı birbirinden oldukça farklıdır. Ortak ataya sahip proteinlerin aminoasit sıralanışında benzerlik olabilir.

Polipeptid zinciri düzenli şekilde tekrarlanan atomlardan oluşan bir omurgaya sahiptir. α-karbonu, karboksil karbonu ve α-amino azotu atomlarından oluşan bu omurga her uzunluktaki protein zincirinde aynıdır. Yan gruplar bu omurganın çevresinde yer alır. Bir protein zinciri üzerinde aminoasitler arasında peptid ve disülfid bağlarından başka kovalent bağ yoktur.



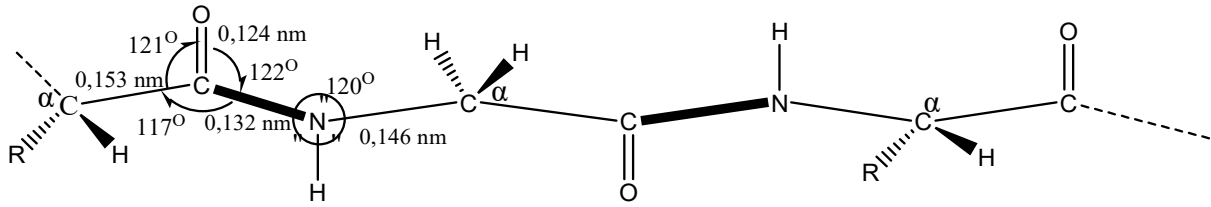
Proteinlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi, belirli bir üç boyutlu yapıya sahip olmalarıdır. Gevşek veya gelişigüzel katlanmış bir polipeptid zinciri biyolojik aktivite gösteremez. Proteinin belli bir biyolojik fonksiyonu görebilmesi için fizyolojik şartlarda üç boyutlu yapıya (konformasyona) sahip olması gerekir. Bir proteinin konformasyonundan aminoasitlerinin sıralanışı (**primer yapı**) birinci dereceden sorumludur.

Birincil yapıda aminoasitlerin sırası oldukça önemlidir. Aynı sayıda ve türde aminoasitten çok çeşitli kombinasyonlarda peptid birincil yapıları oluşturulabilir. Peptid zincirinde bulunan aminoasitlerin sırasının değişmesi onun bir üç boyutlu yapı almak üzere katlanmasını ve böylece görevini etkiler.

Bir proteinin birincil yapısı onun kendine özel üç boyutlu yapı almasında ve dolayısıyla biyolojik fonksiyonun ortaya çıkmasında oldukça etkilidir. Dolayısıyla polipeptid

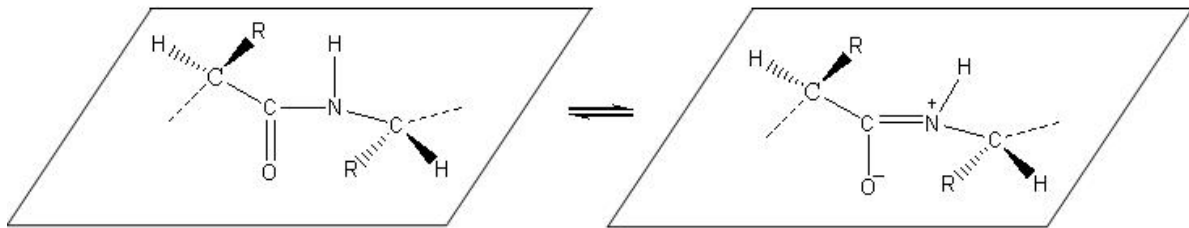
zincirinde herhangi bir aminoasidin modifiye olması, zincirden çıkması veya zincire bir amino asit katılması hem proteinin yapısını ve hem de özelliklerini doğrudan etkileyecektir. Bu açıdan proteinlerin birincil yapılarının bilinmesi oldukça önemli bir araştırma konusudur.

1930'ların sonlarında Linus Pauling ve Robert Corey aminoasitler ve peptidlerin yapılarını tam olarak ortaya koyabilmek için X-ışını kristalografisi (X-ışını kırınımı) çalışmalarına başlamışlardır. Amaçları peptid zincirlerinde bağ uzunluğu ve bağ açıları hakkında bir takım bilgiler elde etmek; bu bilgileri protein konformasyonunu yorumlamakta kullanmaktı. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen iki önemli bilgidен birisi peptid bağının dönmeyen (rijid) düzlemsel yapıya sahip olması; diğeri de karbonil oksijeni ile amino azotuna bağlı hidrojenin trans konfigürasyonda bulunmasıdır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Peptid bağını oluşturan atomlar

Karbonil karbonuyla, azot atomu arasındaki peptid bağının dönme serbestliği yoktur. Çünkü karbonil grubundaki rezonans kararlılığı nedeniyle bu bağ %40 çift bağ özelliği taşır (Şekil 3.17). Peptid bağının hem karbonil karbonu hem de amino azotu sp^2 hibritleşmesi yaptığından peptid grubu düzlemseldir.

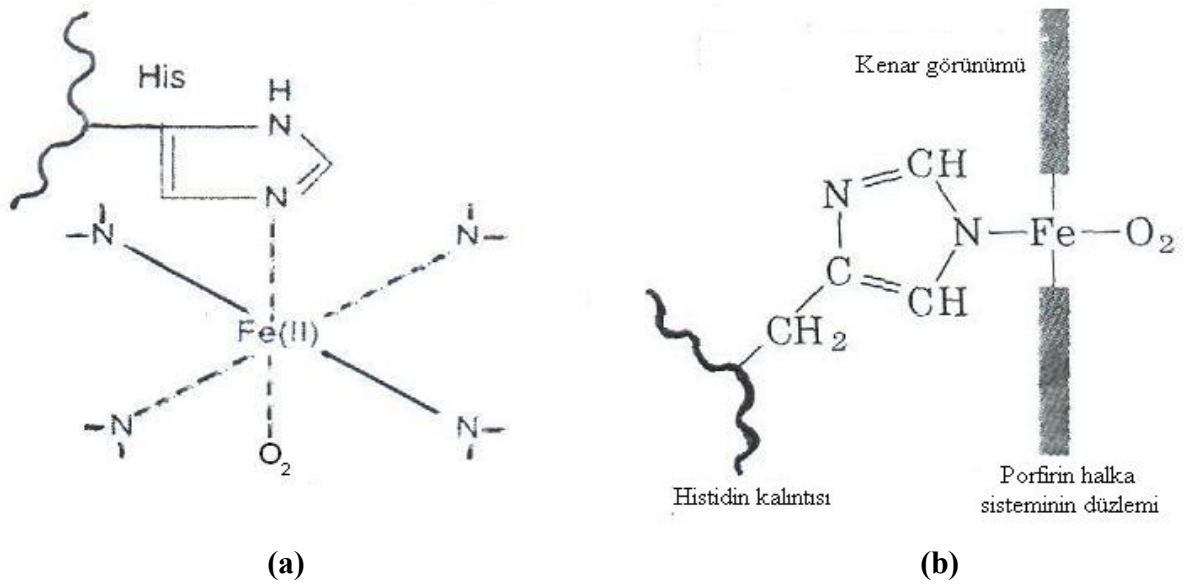


Şekil 3.17. Peptid bağının rezonans yapısı

Model peptidler üzerinde X-ışını kırınımı analizi yöntemiyle ölçülen peptid bağı uzunluğu 0,132 nm'dir. C-N tek bağı 0,146 nm, C=N çift bağı 0,127 nm'dir. Peptid bağı, ne tek bağ kadar uzun, ne de çift bağ kadar kısadır. α-karbonu, karbonil karbonu; α-karbonu ve amino azotu atomları arasındaki bağlar tek bağıdır. Dönmeyen (rijid) bir yapıya sahip peptid

düzleminin her iki tarafındaki bağlar etrafında dönme serbestliği vardır. Bu dönmeler peptid bağlarının farklı konformasyonlar oluşturmasına müsade eder.

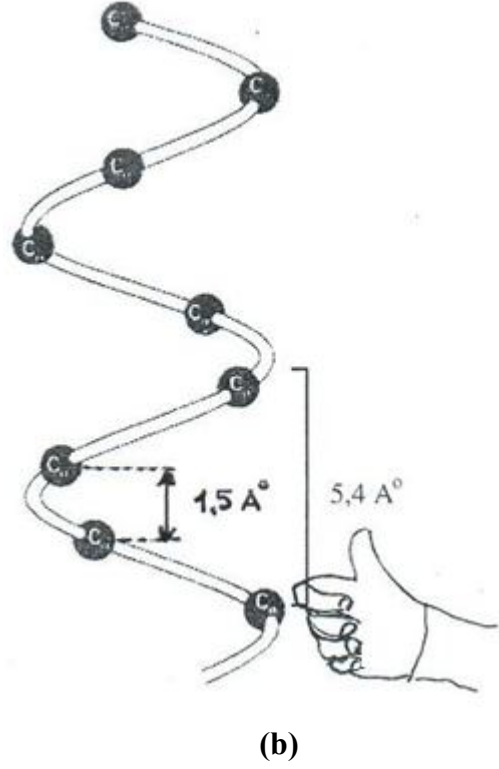
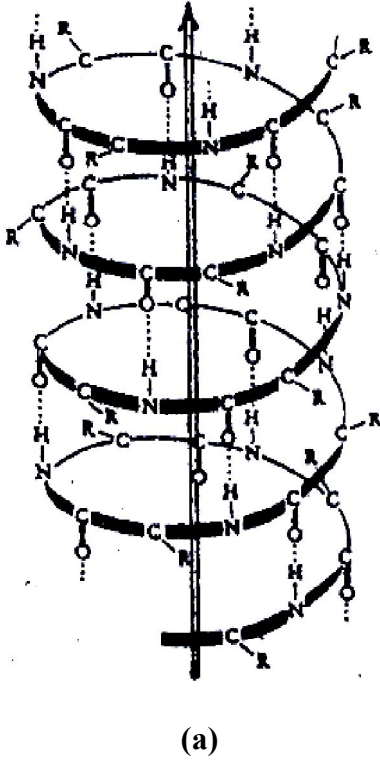
Yalnızca aminoasitlerin birleşmesiyle meydana gelen protein molekülü her zaman biyolojik aktivite gösteremeyebilir. Protein, biyolojik fonksiyonunu yerine getirebilmek için bazen aminoasit yapısında olmayan; metal iyonları, karbonhidratlar, lipidler, koenzimler, porfirin halkaları vb... kimyasal birimlerle birleşir. Bazen de birden fazla polipeptid zinciri bir araya gelerek belirli bir biyolojik fonksiyonu yerine getirebilir. Mesela kanda O₂ taşıyan hemoglobin, dört polipeptid zincirinden (alt birimden) ibarettir. Hemoglobin dört alt birimin yanı sıra her alt birimde porfirin halkası ve Fe²⁺ iyonundan ibaret “**Hem**” grubundan da dört adet içerir (Şekil 3.18). Proteinin biyolojik fonksiyon görebilmesi için proteinlere bağlı bu tip gruplara **prostetik grup** adı verilir.



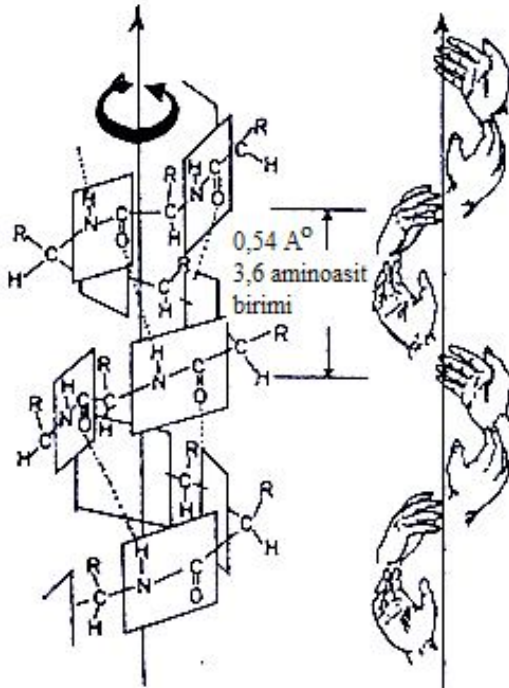
Şekil 3.18. (a) Hem kalıntısının çevresindeki oksihemoglobin yapısının şematik gösterimi (b) Hem grubunun yandan görünüşü. Bu görüntü Fe²⁺'nin porfirin halka sistemine dik olan iki koordinasyon bağını göstermektedir. Bu iki bağdan biri histidin kalıntısıyla doldurulmuştur. Diğer, oksijen için bağlanma bölgesidir. Kalan dört koordinasyon bağı düzlemseldir ve düz porfirin halka sistemine bağlanmıştır.

Yüzlerce aminoasidin oluşturduğu protein molekülünün, sulu çözeltide uzunca tek bir zincir halinde kalması mümkün değildir. Aminoasitlerin yan grupları ve polipeptid omurgası üzerindeki polar bölgeler arasında bir takım etkileşmeler olacağı muhakkaktır.

Acaba grupların karşılıklı etkileşmeleri sonucu gevşek ve gelişigüzel bir katlanma mı veya düzenli ve tekrarlanan bir yapı mı ortaya çıkmaktadır? L. Pauling ve R. Corey birçok polipeptid üç boyutlu yapısının moleküler modellerini yaparak incelediler. 1951 yılında bu



Şekil 3.19. (a) Proteinlerin yapısını oluşturan polipeptid zincirlerindeki sekonder yapı tiplerinden birisi de α -sarmal yapısıdır (b) Sağ el yönündeki bir α -sarmal modeli.



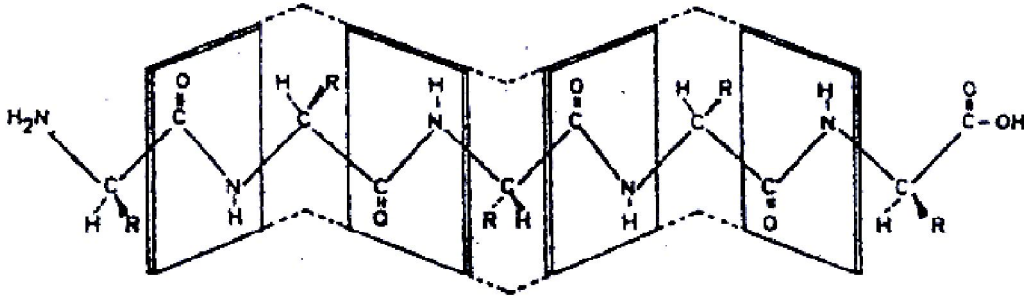
Şekil 3.20. Proteinlerde peptid düzlemi dikkate alındığı zaman sekonder yapı şekli olan α -sarmal yapısının moleküler modeli.

Üç boyutlu yapısı bilinen proteinlerde α -sarmal içeriği oldukça farklıdır. Hemoglobin ve miyoglobinde; α -sarmal proteine hakim motif iken (1000Å 'dan daha uzun) bir sindirim enzimi olan kimotripsinde yok denecek kadar kısadır (40Å 'dan daha kısadır).

Bazen iki veya daha fazla sayıda α -sarmalı bir kablo gibi birbiri üzerine sarılabilir. Bunların hepsinde N- ucu bir tarafta C- ucu diğer taraftadır. Bu şekildeki proteinlere saç α -keratini, derideki epidermini, kastaki miyozini, kan pıhtısında fibrini örnek olarak verebiliriz.

3.6.2.2. β -Kırmalı Yapı

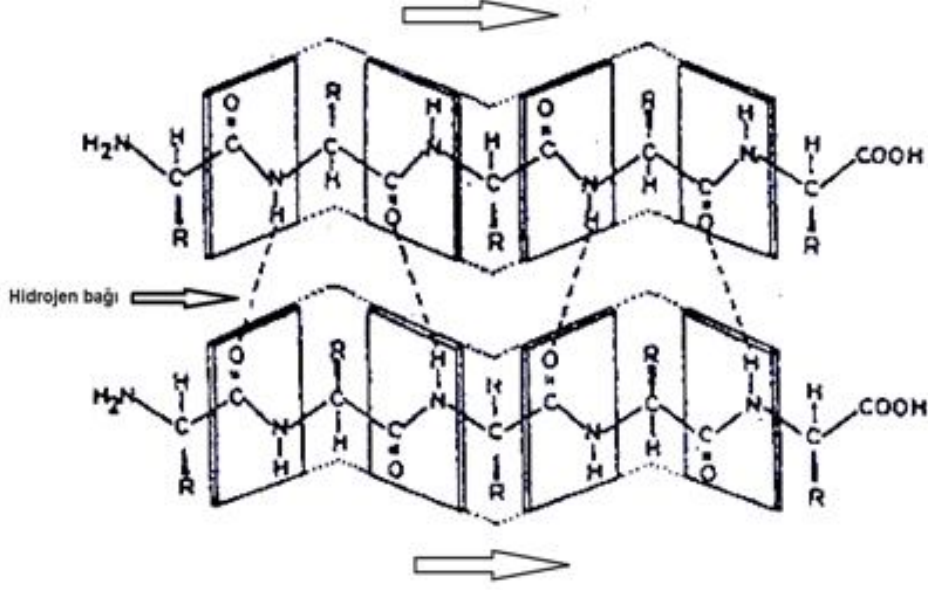
β -Kırmalı tabaka yapı, α -sarmalların çubuğumsu yapısının aksine tabaka halindedir. β -Kırmalı tabakada polipeptid zincirleri α -sarmalda olduğu gibi sıkı sarılmış halde değil, tamamen uzanmış yapıdadır (Şekil 3.21). Birbirine komşu aminoasitler arasında eksensel mesafe $3,5\text{\AA}$ 'dur (α -sarmalda $1,50\text{\AA}$ idi). β -Kırmalı tabaka yapı gösteren proteinlerde peptid bağı düzlemleri birbiri ardı sıra bir sağ bir sol düzenlenimi içinde bulunurlar. R grupları periyodik olarak düzlemin bir alt, bir üst konumunda yer almaktadır. α -Sarmal yapıda proteinlerin çubuk şeklinde olmasına karşılık β -kırmalı tabaka düzeninde proteinler tabakalar halindedir.



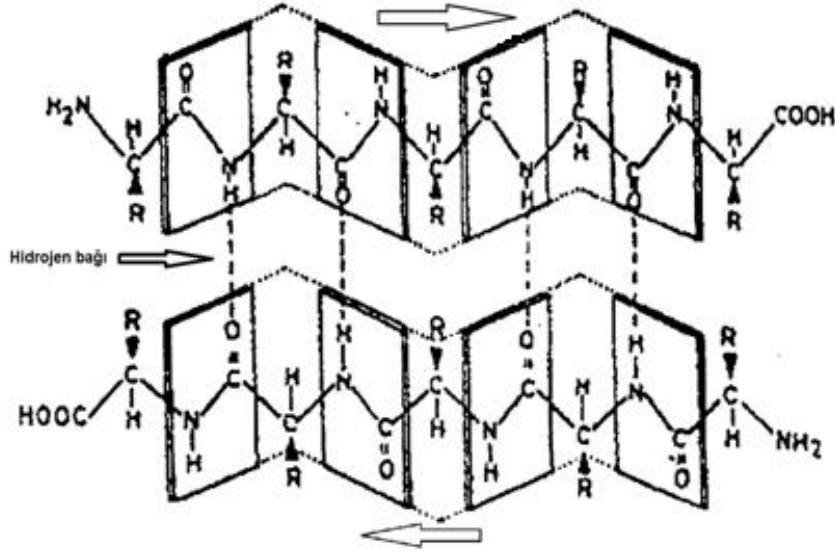
Şekil 3.21. Proteinlerin sekonder yapı şekillerinden birisi de β -tabakalı yapıdır.

α -Sarmaldan bir diğer farkı da, β -kırmalı tabakanın farklı polipeptid zincirlerindeki karbonil ve amino grupları arasındaki hidrojen bağlarıyla stabilize edilmesidir.

Bir β -kırmalı tabakada bitişik zincirlerin C- uçları bir yönlü, N- uçları diğer yönlü (paralel) veya birinin C- ucu diğerinin N- ucu ile aynı yönlü (antiparalel) olabilir (Şekil 3.22 ve Şekil 3.23). Antiparalel yapıdaki hidrojen bağları nispeten doğrusal olduğundan daha kısa ve kararlıdır. Mesela ipek fibroin proteini (doğal ipek) tamamen antiparalel β -kırmalı tabakaların yığılmasıyla oluşur.



Şekil 3.22. Paralel polipeptid zincirlerinin meydana getirdiği β -kırmalı tabaka yapı proteinlerde rastlanan sekonder yapı şekillerinden birisidir.



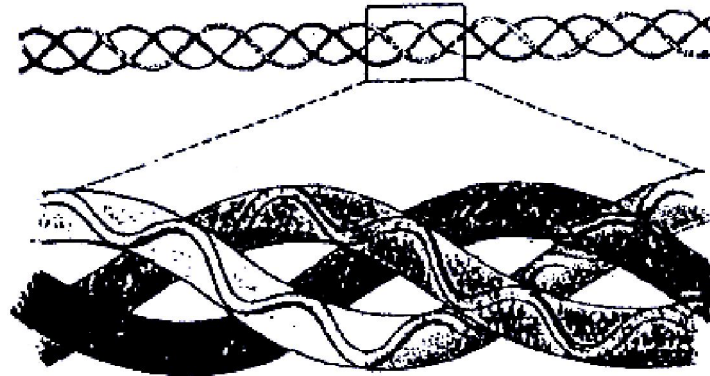
Şekil 3.23. Antiparalel polipeptid zincirlerinin meydana getirdiği β -kırmalı tabaka yapı proteinlerde rastlanan sekonder yapı şekillerinden birisidir.

Bir proteinin yapısında bulunan iki veya daha fazla sayıdaki β -tabaka, birbirine yakın konumda tabakalanarak bir araya geldiklerinde birbirine değen yüzeylerinde bulunan aminoasitlerin R grupları nispeten küçük olmak zorundadır. İpek fibroini ve örümcek ağı fibroini gibi β -keratinlerin, en küçük R gruplarına sahip iki aminoasit olan Gly ve Ala içerikleri çok yüksektir. Gerçekten ipek fibroininde Gly ve Ala, aminoasit dizisinin büyük kısmında birbirini izlemektedir.

Özellikle 2–5 paralel ve antiparalel β - zincirlerini içeren yapısal birimlere proteinlerde çok rastlanır. β -keratin yapısında (tırnak ve boynuz proteini) birbirine paralel peptid zincirleri, yandan hidrojen bağlarıyla çapraz bağlanmıştır.

3.6.2.3. Kollagen sarmalı

Üçüncü tip periyodik motif kollagen sarmalıdır. Bu yapı deri, kemik ve eklemlerin başlıca proteini olan kollagenin yüksek gerilme gücünü sağlar. Kollagen ipliksi (lifli, çubuğumsu) bir proteindir ve insan vücudunun yaklaşık %6'sını oluşturur. Derinin %45'ini, kemiğin %18'ini eklemlerin yaklaşık %50'sini kollagen oluşturur. Kollagenin aminoasit dizilişi genellikle Gly–X–Pro– veya Gly–X–Pro–OH... şeklindedir. Glisin bütün aminoasitlerin üçte biri kadardır. Prolin de diğer aminoasitlere oranla oldukça yüksek oranda bulunur. Bunların yanında hidroksiprolin ve hidroksilizin de bulunması kollagen proteinin bir karakteristiğidir. Arada bulunan X herhangi bir aminoasit olabilir. Kollageni oluşturan aminoasitler sarmal bozucu olduğundan α -sarmalı oluşturmazlar. Kollagen sarmalı yapıda üç polipeptid zinciri birbiri üzerine sarılmıştır. Kollagen sarmalın her bir zincirinin sarmal motifi, α -sarmaldan tamamen farklıdır. Bu yapıyı stabilize eden hidrojen bağları, zincirlerin birisi üzerinde bulunan glisin aminoasitlerinin amino gruplarıyla; bir diğer zincir üzerindeki aminoasitlerin karbonil grupları arasında oluşur. Bu tip yapıya sahip tropokollagende, sarmalın uzunluğu 3000Å ve çapı 15Å 'u bulur. Kollagen sarmalın kararlılığı, prolin ve hidroksiprolin artıklarının kilitleme özelliğine ve hidroksi prolinin üzerindeki –OH grubunun hidrojen bağı yapabilmesinden kaynaklanmaktadır. Kollagen üçlü sarmalında üç polipeptid zincirin sıkıca sarılması, kollagene eşit boyutta bir çelik telden daha fazla gerilme kuvveti sağlar (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. Tropokollagen molekülü üçlü sarmal yapısından meydana gelmiştir (Tropokollagen molekülünden alınan kesit)

Birçok protein sıkı ve globuler (küresel) şekillere sahiptir. Çünkü polipeptid zincirlerinin yönleri sık sık değişmekte ve sulu çözeltide saç tokası gibi dönüşler yapmaktadır. Sulu çözeltide protein zinciri aniden yön değiştirir ve birtakım kıvrılmalar yapar.

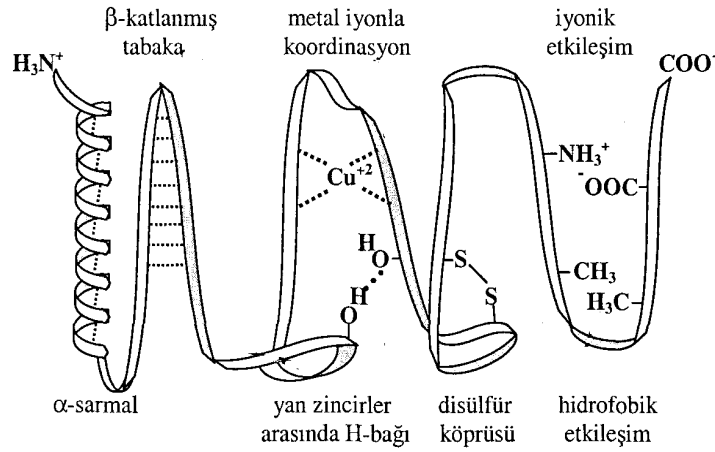
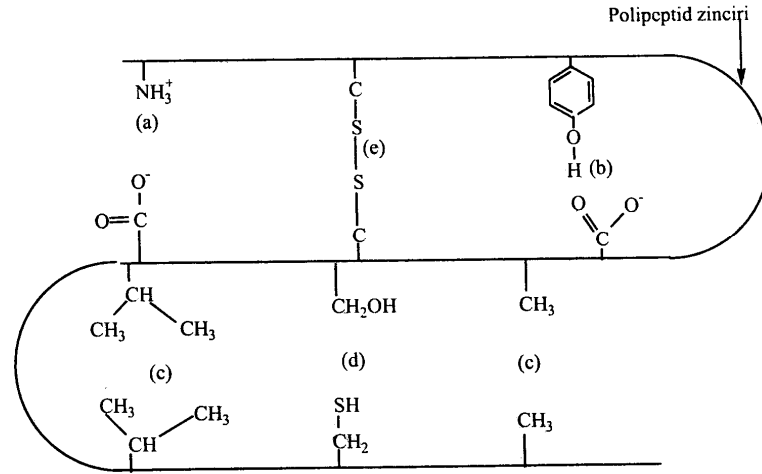
3.6.3. Tersiyer (üçüncül) Yapı:

Tersiyer yapı bir proteinde bulunan bütün atomların üç boyutlu düzenini içerir. Bu yapı düzeyi aminoasitlerin yan zincirlerdeki atomlar ve prostetik grup olarak adlandırılan kovalent bağlı yapılarda bulunan atomlar arasındaki etkileşimleri de içerir. Polipeptid zincirinde farklı bölgelerde bulunan aminoasit birimlerinin yan zincirlerindeki gruplar arasındaki etkileşimlerle ve çeşitli sekonder yapıların katlanması sonucu ortaya çıkan üç boyutlu yapıdır. Bu şekilde katlanmalarla birbirinden uzakta olan aminoasitler bir araya gelirler. Böylece proteinin hem kararlı bir yapı kazanmasını ve hem de biyolojik fonksiyonunu tam olarak yerine getirebilmesi için gerekli olan bölgelerin oluşumunu sağlarlar.

Küresel proteinlerde aminoasit yan zincirleri polarlıklarına göre protein yapısının yüzey kısımlarında veya iç bölgelerinde yer alırlar; *Val, Leu, ile, Phe* ve *Met* gibi polar olmayan aminoasit birimleri daima sulu ortamla temas olmayacak şekilde bir proteinin iç kısmında yer alırlar. Bu şekilde dağılıma sebep olan etkileşimler hidrofobik etkileşimlerdir. *Asp, Glu, Lys, Arg* ve *His* gibi yük taşıyan ve polar aminoasit birimleri daima sulu ortam ile temas halinde olacak şekilde bir proteinin yüzey kısımlarında yerleşeceklerdir. Genellikle bu yüklü gruplar enzimlerin kataliz olaylarında rol oynarlar veya metal iyonlarının bağlanabileceği önemli bölgeleri oluştururlar. Yüksüz polar aminoasit birimleri olan *Asn, Gln, Ser, Thr, Trp* ve *Tyr* ise genellikle proteinlerin yüzeylerinde çok nadiren de iç kısımlarında ve diğer aminoasit birimleri ile hidrojen bağı yapmış durumda bulunurlar. Proteinin iç kısımlarında H-bağı yapmakla H-bağı salıcı yan zincirin polarlığı nötralize edilmiş olur. Ayrıca bu kovalent olmayan etkileşimler yanında sistein birimlerinin sülfhidril gruplarının oksidasyonu ile farklı bölgelerdeki sistemler arasında kovalent disülfür köprüleri de oluşabilir. Bu bağlar polipeptid zincirinin katlanıp belirli bir konformasyonda kalmasını sağlar (Şekil 3.25).

Primer yapıda farklı bölgelerde bulunan aminoasitler bütün bu etkileşimlerle ve kararlı kuvvetlerle biraraya getirilir. Böylece protein polipeptid zincirin katlanmasıyla üç boyutlu bir yapı kazanır. Ancak bu yapı farklı ortamlarda farklı konformasyonlar şeklinde ortaya çıkabilir. Bütün bu yan zincirlerin polarlığından ve sekonder yapıların bir organizasyonundan kaynaklanan konformasyonel düzenlenmelerin bir sonucu olarak oluşan tersiyer yapının

ortaya çıkmasını sağlayan etkileşimler ile genel olarak bir proteinin yapısında etkili olan bağlar ve etkileşimler, peptid bağı hariç Şekil 3.25’ de şematik olarak gösterilmiştir.



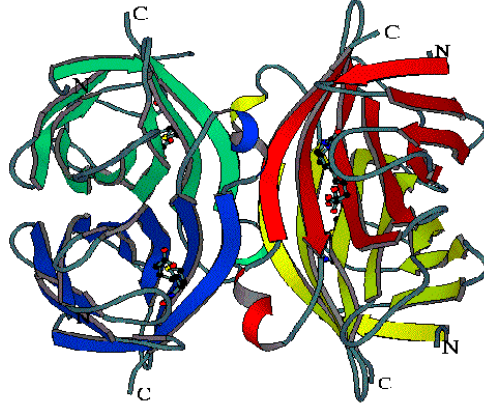
Şekil 3.25. Proteinlerdeki molekül içi etkileşimler ve bağlar; **a)** İyonik etkileşim, **b)** Hidrojen bağı (–OH ile –COO[–] arasında), **c)** Apolar grupların hidrofobik etkileşimi ile bir araya gelişi ve aralarında Van der Waals çekimlerinin oluşması, **d)** Dipol–dipol etkileşimi, **e)** Disülfid bağı, **f)** Metal iyonla koordinasyon.

Lineer dizilişte birbirinden uzak noktalarındaki aminoasit kalıntıları arasındaki sterik etkileşimlerle ortaya çıkan yapıdır. Bir protein zinciri içindeki kararlı katlanmalar sonucu lineer dizilişte birbirinden uzak noktalarındaki aminoasit kalıntıları bir araya gelir ve enzim proteininin aktif bölgesini de oluşturur. Doğal durumda her proteinin karakteristik bir üç boyutlu yapısı vardır. Ribozükleaz enzimi primer yapısında 124 aminoasit ve 4 disülfid bağına sahiptir (Şekil 3.26). Doğal proteinler sekonder yapı özellikleriyle yetinmeyip bir takım daha kıvrılmalar ve bükülmeler yaparak kendilerine özgü tersiyer yapıları kazanırlar. Bu yapıda belli bir düzenlilik ve periyodik motif göze çarpmaz. Disülfid çapraz kovalent bağları bu yapıyı daha kararlı hale getirir.

3.6.4. Kuaterner Yapı:

Belirli proteinler birden fazla polipeptid zincirine sahiptirler ki bu polipeptid zincirlerin her birine *altbirim* (subunite) adı verilir. Altbirimlerin bir araya gelerek belirli bir geometride düzenlenmesine *kuaterner yapı* denir. Dolayısıyla kuaterner yapı birden fazla polipeptid zinciri içeren proteinlerin bir özelliğidir. Çok altbirimli bir protein, birbirine benzeyen veya benzemeyen polipeptid zincirleri içerebilir ve polipeptid zincirleri birbirleriyle kovalent olmayan etkileşimlerle etkileşirler. Bu etkileşimlerin varlığından dolayı kuaterner yapı bir proteinin herhangi bir bölgesindeki yapısal bir değişim farklı bir bölgenin özelliğinde de önemli bir değişimle sonuçlanabilir. Böylece bu enzimlerin aktivitelerinin regülasyonunda yapısal bir temel sağlanmış olur. Bu özelliği gösteren proteinler *allosterik* olarak tanımlanırlar. Ancak kuaterner yapı bütünü bütün proteinlerin allosterizm göstermesi gibi bir zorunluluk yoktur.

Kuaterner yapıya birden fazla polipeptid zincirine sahip oligomerik proteinlerde rastlanır. Bazı proteinler tersiyer yapıyı kazandıktan sonra iki veya daha fazlası bir araya gelerek daha ileri bir organizasyona gidebilir. Bazı proteinler iki veya daha fazla polipeptid zincirinin bir araya gelmesiyle biyolojik aktivite gösterirler. Polipeptid alt birimleri, sekonder ve tersiyer yapıları meydana getiren sterik etkileşmelerle oluşan bağlarla bir arada tutulur. İnsülin hormonunda iki, hemoglobinde 2α - ve 2β - olmak üzere dört polipeptid zinciri bulunur.



Bir enzimin etkinliği veya proteinin biyolojik fonksiyonu polipeptid zincirin uzunluğu ile değil, herbiri birer aktif bölge taşıyan benzer altbirimlerin sayısını artırmakla artar. Genellikle, molekül ağırlığı yaklaşık 100 kDa dan daha büyük olan bir çok protein kuaterner yapıdan oluşur. Hemoglobinin $\alpha_2\beta_2$ ile ifade edilen 4 altbirimden oluşan kuaterner yapı bir proteindir. Benzer altbirimleri içeren proteinler oligomer olarak ve birbirine benzeyen altbirimler ise protomer olarak adlandırılırlar. Hemoglobinin iki $\alpha\beta$ şeklindeki iki protomerin oligomeri olduğundan bir dimer olarak tanımlanır.

Dördüncül yapıyı oluşturan polipeptid zincirleri çok çeşitli etkileşimlerle de bir arada tutulurlar ve bunlar tersiyer yapıda gözlenen etkileşimler olan elektrostatik etkileşimler, H-bağı etkileşimleri, van der Waals kuvvetleri, polipeptid zincirleri içerisindeki disülfid bağları ve hidrofobik etkileşimlerdir. Tüm bu etkileşimler kuaterner yapının oluşumunda oldukça etkilidirler ve bu çok altbirimli yapıyı kararlı kılacak enerjiyi sağlarlar. Birçok oligomerik proteinde protomerler simetrik olarak düzenlenir.

Proteinlerin işlevi aminoasit dizilişine bağlıdır. *E. coli* bakterisi 3 binden fazla farklı protein, insan ise 50–100 bin arası protein sentezlemektedir. Proteinin her bir tipi özgün bir aminoasit dizisine sahiptir. Aminoasit dizisi, proteinin üç boyutlu yapısı ve dolayısıyla işlevini tanımlamada temel rol oynamaktadır. Aminoasit dizisi ve biyolojik işlev arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya yarayan birçok deneysel ipucu mevcuttur. Birincisi, daha öncede işaret edildiği gibi farklı işlevleri olan proteinler, daima farklı aminoasit dizileri içerir. İkincisi, insanlarda hatalı proteinlerin yapımından dolayı binlerce genetik hastalık ortaya çıkmaktadır. Son olarak farklı türlerdeki işlevsel olarak benzer proteinler karşılaştırıldığında, bu proteinler benzer aminoasit dizisi içerir. Homolog proteinler genellikle farklı türlerde aynı işlevi görürler. Örneğin, mitokondriyal bir protein olan sitokrom c, ökaryotik hücrelerde biyolojik oksidasyon sırasında elektron transferi yapar. Sitokrom c ve diğer homolog proteinlerin incelenmesi sonucunda önemli bir karara varılmıştır: Herhangi iki türdeki homolog proteinlerin farklı aminoasit kalıntılarının sayısı, bu türler arasındaki biyolojik farklılıkla doğru orantılıdır. Örneğin, at ve maya hücresi gibi çok farklı iki türdeki sitokrom c protein molekülünün 48 aminoasit kalıntısı farklı iken, ördek ve tavuk gibi birbirine yakın iki türdeki sitokrom c proteininde yalnızca 2 aminoasit kalıntısı farklı bulunmaktadır. Gerçekte, tavuk ve hindi türleri aynı aminoasit dizisine sahiptir. Bu durum inek ve koyunda da izlenir.

Her bir proteinin aminoasit dizisi tamamen sabit veya değişmez midir? Hayır, biraz esneklik olasıdır. Proteinler çoğunlukla, aminoasit dizilerinde biyolojik işlevler için temel olacak önemli bölgeler içerirler. Bu bölgelerin dışında aminoasit dizisi, işlevleri etkilemeden değişebilir. Dizideki önemli bölgeler proteinden proteine değişir ve bu dizi üç boyutlu yapıyı etkiler, dolayısıyla yapı da işlevi etkiler.

3.7. PROTEİNLERİN SINIFLANDIRILMASI

Proteinler konformasyonlarına ve kimyasal bileşimlerine göre iki sınıfta incelenir.

Konformasyonlarına göre proteinler fibröz (lifimsi, çubuğumsu) ve globuler (küresel) yapıda olmak üzere ikiye ayrılır.

3.7.1. Fibröz Proteinler

Fibröz proteinlerin tümü suda ve seyreltik tuz çözeltilerinde çözünmeyen sağlam yapılu moleküllerdir. Bu özellik proteinin hem iç kısmında hem de yüzeyinde bulunan hidrofobik aminoasit kalıntılarından ileri gelmektedir. Fibröz proteinlerin polipeptid zinciri tek bir eksen boyu paralel düzenlenmiş ve uzun lifler (α -sarmalı) veya tabakalar (β -kırmalı tabaka) oluşturmuşlardır. Fibröz proteinler buldukları yapıya güç ve/veya esneklik kazandırır. Daha çok vücutta sağlam yapıyı gerektiren ve koruyuculuk görevi yapan yerlerde bulunur. Mesela deride epidermin, kemik kollajeni, tırnak, boynuz ve saç keratini ve bağ dokusu elastini bu proteinlerdendir. Fibröz proteinler yüksek hayvan ve bitki organizmalarının bağ dokularının temel yapısal elemanlarıdır.

3.7.2. Globuler Proteinler

Bir polipeptid zincirinin farklı bölümleri veya birçok polipeptid zincirinin birbiri üzerine katlanıp sıkı bir yumak halini almasıyla ortaya çıkan yapıdır. Katlanma aynı zamanda proteinlerin geniş kapsamlı işlevlerini yerine getirebilmeleri için yapısal çeşitliliği sağlar. Bu tip proteinlerin çoğu sulu çözeltilerde çözünür ve kolayca difüze olurlar. Globuler proteinlerin hücrede çok önemli dinamik görevleri vardır. Bilinen enzimlerin çoğu, antikorlar, bazı hormonlar, serum albumin ve hemoglobin gibi taşıma görevi yapan proteinler globuler yapıda proteinlerdir.

Bazı proteinler ise hem fibröz hem de globuler özelliğe sahiptirler. Bu tip proteinler fibröz proteinler gibi uzun çubuğumsu şekillere sahip iken, aynen globuler proteinler gibi tuz çözeltilerinde çözünürler. Bu tür proteinlere önemli bir yapısal protein olan kas miyozini ve kan pıhtılaşmasında fibrinin ön maddesi olan fibrinojen örnek olarak verilebilir. Fibrinojen kan plazmasının çözünür proteindir.

Kimyasal bileşimlerine göre proteinler, **1- Basit proteinler** ve **2- Bileşik proteinler** olmak üzere iki ana grupta incelenebilir.

1) Basit Proteinler: Yapılarında yalnız α -aminoasitleri bulduran proteinlerdir. Hidroliz edildiklerinde serbest α -aminoasitler ve onların bazı türevleri oluşur. Basit proteinler aşağıdaki alt gruplara ayrılır.

a. Albüminler: Suda çözünen ve ısıtıldıklarında pıhtılaşan proteinlerdir. Albüminler doymuş tuz çözeltisi, özellikle doymuş $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisi ile çöktürülürler. Serum albümin, yumurta akı ovalbümini, süt laktalbümini örnek olarak verilebilir.

b. Globulinler: Seyreltik nötral tuz çözeltilerinde çözünen ve suda çözünmeyen proteinlerdir. Globulinler ısıtılınca pıhtılaşır. %50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisi ile çöktürülürler. Örnek olarak serum globulin, ovoglobulin ve bitki tohumu globulinleri verilebilir.

c. Glutelinler: Bitkisel proteinlerdir. Seyreltik asit ve baz çözeltilerinde çözünürler. Su ve alkol gibi nötral çözücülerde çözünmezler ve ısıtılınca pıhtılaşır. Örnek olarak buğday gluteni, pirinç orizenini verilebilir.

d. Prolaminler: Bitkisel proteinlerdir. Suda ve nötral çözücülerde çözünmezler. % 70' lik alkolde çözünürler, mutlak alkolde çözünmezler. Buğday gliadini, mısır zeini örnek olarak verilebilir.

e. Histonlar: Suda ve seyreltik asit çözeltilerinde çözünürler ve ısıyla pıhtılaşmazlar. Arginin ve lizin gibi bazik aminoasitler yapılarında bolca bulunur. Vücut hücrelerinin çekirdeğinde nükleik asitlerle kompleks yapan proteinlerdir. Hayvansal kaynaklı proteindir. Hemoglobinin globin proteini bu grupta yer alır.

f. Protaminler: En basit proteinlerdir. Seyreltik NH_3 çözeltisinde ve suda çözünen bazik polipeptidlerdir. Isıyla pıhtılaşmazlar. Bazik aminoasitler yapılarında bol miktarda (% 87 arginin) bulunur ve diğer proteinleri çöktürürler.

g. Skleroproteinler (Albuminoidler): Bütün nötral çözücülerde, seyreltik asit ve baz çözeltilerinde çözünmezler. Vücutta bağ ve destek dokusu proteinleridir. Kollagen, α -keratin ve elastin bu grup proteinlerdir. İnsan sindirim sisteminde aminoasitlere hidrolizlenemediğinden besin değerleri yoktur. Kollagenin hidroliziyle hazırlanan jelatin besinlerde koyulaştırıcı olarak kullanılır.

2) Bileşik Proteinler: Biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için protein yapısında olmayan gruplara bağlı proteinlerdir. Protein yapısında olmayan, proteine bağlı böyle gruplara **prostetik grup** adı verilir. Bileşik proteinler aşağıdaki gruplara ayrılır.

a. Nükleoproteinler: Bir veya daha fazla protein molekülünün nükleik asitlerle yapmış olduğu komplekslerdir. Hücre çekirdeği nükleohistonları (**kromozomlar**) ve virüsler örnek olarak verilebilir.

b. Glikoproteinler: Prostetik grup olarak karbohidratları içeren proteinlerdir. Proteinlerin karbohidratlara bağlanarak oluşturduğu komplekslerdir. Tükürük salgısı ve mukus salgısı münleri, immünoglobulinler, yumurta ovomukoidi ve serum elektroforezi sonucu oluşan α_1 - ve α_2 - fraksiyonları örnek olarak verilebilir.

c. Fosfoproteinler: Çoğunlukla serin aminoasidi kalıntısı üzerinden fosfat grubu bağlı proteinlerdir. En bilinen örneği süt kazeinidir. Yumurta sarısı proteinlerinden vitellin ve glikojen sentetaz da bu grupta bulunur.

d. Kromoproteinler: Prostetik grup olarak renkli bir kısım (kromofor grup) grup içeren proteinlerdir. Hemoglobin, flavoproteinler ve sitokromlar örnek olarak verilebilir.

e. Lipoproteinler: Proteinlerin nötral yağlar, fosfolipidler ve kolesterol ile yapmış oldukları komplekslerdir. Serum lipoproteinleri (şilomikronlar, VLDL, LDL, HDL) ve yumurta sarısı proteinleri örnek olarak verilebilir.

f. Metaloproteinler: Metal iyonlarına koordinasyon bağları ile bağlı proteinlerdir. Zn^{+2} –karbonik anhidraz, Fe^{+2} –transferin, Cu^{+2} –seruplazmin bu grup proteinlerdir.

3.8. PROTEİNLERİN DENATÜRASYONU

Bir polipeptidin doğal konformasyonuna ulaşması için sentez sırasında ve sonrasında katlanması gerekir. Protein yapıları, belirli hücresel şartlar altında işlev görmek üzere değişim geçirir. Hücredeki ortam şartlarından, farklı şartlarda protein yapısında küçük veya büyük oranda değişim oluşturur. Biyolojik fonksiyon kaybının oluşmasına neden olan üç boyutlu yapının bozulmasına **denatürasyon** denir. Proteinlerin birçoğu biyolojik aktivitelerini belirli kimyasal ortamlarda, sınırlı pH ve sıcaklıkta sürdürebilmektedirler. Çok asidik ve bazik ortamlarda, yüksek sıcaklıkta ve bazı kimyasal maddelerin bulunduğu ortamlarda proteinlerin üç boyutlu yapılarında yani biyolojik aktivite gösteren yapılarında değişimler olur. Örneğin denatüre olan protein bir enzim ise katalik aktivite gösteremez. Denatüre olan proteinin çözünürlüğü azalır ve hatta çökelme olur. Denatürasyonun iki önemli sonucu; biyolojik aktivitenin kaybı ve çözünürlüğün önemli oranda azalmasıdır.

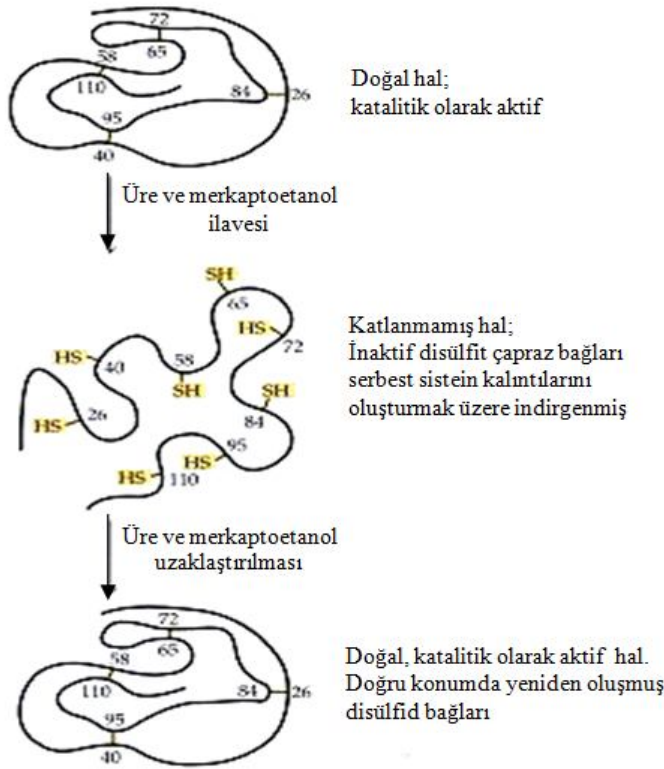
Birçok protein 50–60°C' nin üzerinde ve 10–15°C'nin altındaki sıcaklıklarda denatürasyona uğrar. Yumurta akının ısıtılmasıyla (70°C' da 5 dakika) beyaz renkli bir pelte oluşumu **dönüşümsüz denatürasyon**dur. Yani denatürasyona neden olan etkenler ortadan kaldırılrsa bile protein tekrar doğal üç boyutlu yapısına katlanamaz. Birçok protein pH = 4'ün altında ve 10'un üstünde denatüre olur.

Denatürasyonda, proteinin yapısındaki kovalent bağlar (primer yapı) etkilenmez, değişme bir yere kadar sekonder yapıda, büyük ölçüde de tersiyer yapıda ve var ise kuaterner yapıda meydana gelir.

Bazı proteinler denatürasyondan sonra bu olaya neden olan şartların ortadan kaldırılması ile tekrar doğal üç boyutlu yapılarına kavuşabilir ve biyolojik aktivitelerini yeniden kazanırlar. Bu tip denatürasyonlar dönüşümlü değişimlerdir ve **renatürasyon** adını alır.

Denatürasyona neden olan etkenler; ısıtma, asit–baz ilavesi dışında UV ve IR–ışınlar, kuvvetli çalkalama, derişik üre çözeltisi, β –merkaptöetanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), sodyumdodesilsülfat (SDS), aseton ve alkol gibi çözücülerdir.

Proteinlerin denatürasyonu üzerinde yapılan çalışmalar protein moleküllerinin üç boyutlu yapıları ve aminoasit dizilişleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. C. Anfinsen (1964) primer yapısında 124 aminoasit ve 4 disülfid çapraz kovalent bağı bulunan ribonükleaz enzimini 8 M üre ve β –merkaptöetanol içeren bir çözeltide denatüre etmiştir. Üre katlanmış proteini açarken, β –merkaptöetanol ise disülfid çapraz kovalent bağlarını –SH gruplarına indirger. Daha sonra diyaliz ile üre ve β –merkaptöetanolü uzaklaştırıp hava ile oksitlenmesini sağlamış, ribonükleazın yeniden üç boyutlu yapısına katlanıp katalitik aktivitesini kazandığını gözlemiştir (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. Katlanmış, denatüre haldeki ribonükleazın renatürasyonu. Ribonükleazı denatüre etmek için üre, disülfid bağlarını indirgemek için merkaptöetanol kullanılır. Disülfid bağlarının parçalanmasıyla sekiz Cys kalıntısı serbestleşti. Renatürasyon, doğru disülfid bağlarının yeniden oluşumunu gerektirir.

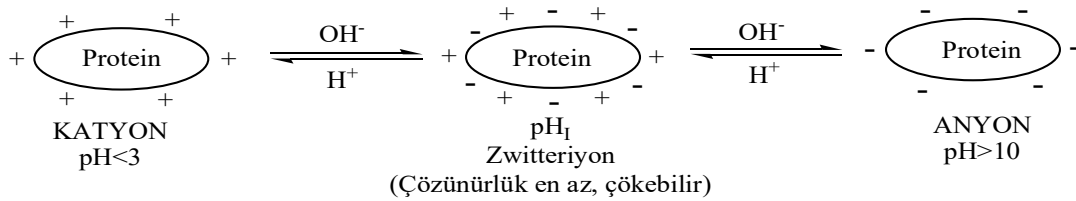
3.9. PROTEİNLERİN ASİT–BAZ ÖZELLİKLERİ

Bir proteinin asit–baz özelliklerini büyük ölçüde aminoasitlerinin iyonlaşabilir –R grupları tayin eder. Proteinin üç boyutlu yapısında iyonlaşabilir R grupları çevrelerindeki diğer –R gruplarından çok etkilenir. Bir polipeptid zincirinin N– ucu amino ve C– ucu karboksil gruplarının asit – baz özelliklerine katkısı yok denecek kadar azdır.

Ribonükleaz enzimi sırası bilinen 124 aminoasit içeren ve sıkıca katlanmış bir proteindir. Bu enzim proteini; C- ucu karboksil grubundan ve N- ucu amino grubundan başka 34 tane daha iyonlaşabilen R grubu içermektedir. Titrasyon işleminde harcanan eşdeğer OH^- lar verilen pH aralığında iyonlaşabilen grupların sayısına karşılık gelmektedir. X-ışını denemeleriyle doğrulandığı gibi globuler proteinlerde iyonlaşabilen R gruplarının tamamına yakını dış yüzeye, hidrofobik veya apolar grupların çoğunun ise içeriye yönelmiş olduğunu göstermektedir. Bazı globuler proteinler ise doğrudan titre edilemeyen iyonlaşabilir gruplara da sahiptir, bunlar tersiyer yapıda saklanmış veya doğrudan hidrojen bağı yapmış olabilirler. Mesela miyoglobindeki 11 histidinden ancak 5'i denatürasyon sonucu titre edilebilmektedir.

Birçok proteinlerle yapılan benzer titrasyon çalışmaları proteinlerin toplam tampon kapasitesinin çok azını fizyolojik pH'da ($\text{pH} = 6-8$) gösterdiklerini ortaya koymuştur. Fizyolojik pH sınırlarına en yakın pK_R değerine histidinin -R grubundaki imidazol halkası sahiptir. Bu nedenle % 8 histidin içeren hemoglobin eritrositlerde (alyuvar) önemli bir hücre içi tampon görevi yapmaktadır.

Proteinler de aynen aminoasitler gibi kendilerine özgü bir izoelektrik pH'ya sahiptirler. İzoelektrik pH'da protein molekülü üzerindeki toplam yük sıfır olduğundan DC elektrik alanında göç edemez. Yüksek oranda bazik aminoasitler içeren proteinlerin izoelektrik pH'ları yediden büyük, asidik aminoasitleri içeren proteinlerin izoelektrik pH'ları yediden küçüktür (Tablo 3.4). Globuler proteinlerin birçoğunun izoelektrik pH'ları 4,15- 6,15 arasında değişir. Proteinlerin yapılarında asidik veya bazik grupların olması yapıya **amfoterik (amfolit)** özellik kazandırır (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. Proteinlerin pH'ya bağlı iyonlaşma dengesi.

Tablo 3.4. Bazı proteinlerin izoelektrik pH değerleri

Protein	pH _i
Pepsin	1,0
Yumurta Albumini	4,6
Kazein	4,8
Serum Albumini	4,9
Üreaz	5,0
β – laktoglobulin	5,2
İnsülin	5,35
Fibrinojen	6,5
Hemoglobin	6,8
Kimotripsin	9,5
Ribonükleaz	9,6
Lizozom	11,0

İzoelektrik pH'nın üstünde protein negatif yüklü olup elektriksel alanda anoda (+) doğru göç eder. İzoelektrik pH'nın altında ise pozitif yüklü olarak çözünür ve katoda (-) göç eder. Proteinlerin titrasyon eğrileri ve izoelektrik pH'ları nötral tuzların varlığında önemli ölçüde değişir. Çünkü bu şartlarda polipeptid zincirindeki aminoasit kalıntılarının -R gruplarının iyonlaşması etkilenir. Proteinler aynı zamanda Ca⁺², Mg⁺², Cl⁻ ve PO₄⁻³ iyonlarını bağlayabilir. Bundan dolayı proteinlerde gözlenen izoelektrik pH değerleri çözüldükleri ortamın tabiatına (bileşimine, özelliğine) bağlıdır. Çünkü bir proteinin izoelektrik pH'sı bulunduğu ortamdaki etkilenir.

3.10. PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI

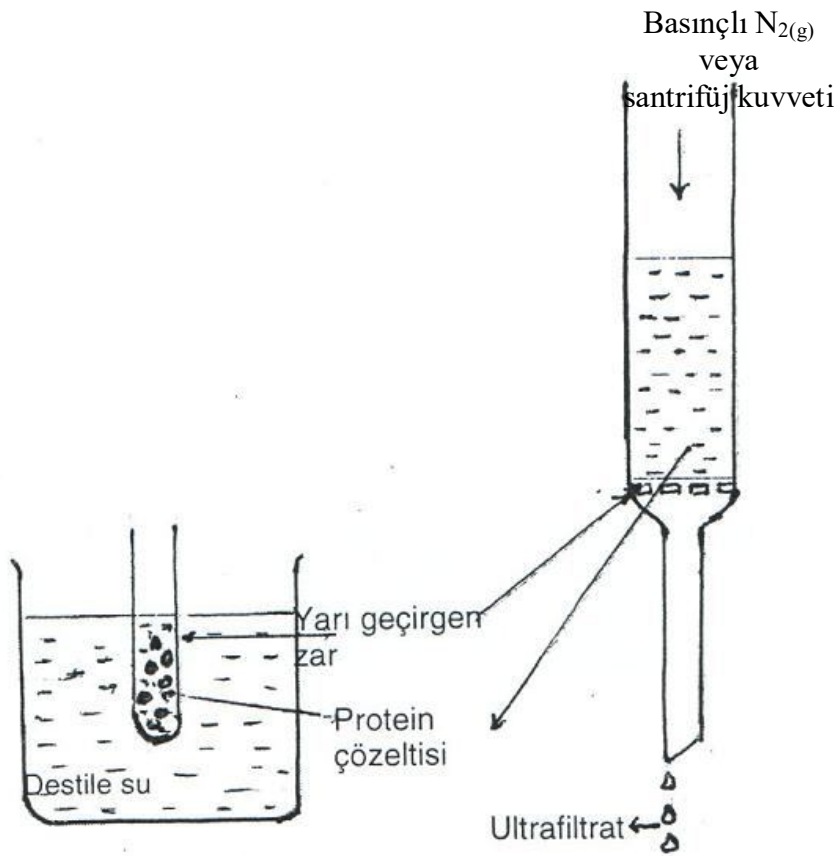
Her türlü organizma kendine has proteinlere sahip olduğu gibi, her hücre tipi de binlerce çeşit protein içermektedir. Ayrıca proteinler biyolojik aktivitelerini belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu nedenle bir proteini saf şekilde bir hücre veya dokudan izole etmek güç bir iştir. Bu güçlükler rağmen birçok protein saf olarak izole edilebilmiştir. Örneğin; binlerce enzimin 200'den fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Enzim aktivitesi göstermeyen yüzlerce protein de saf olarak izole edilmiştir. Proteinlerin izolasyon işlemleri çok dikkat ve gayret gerektirir. Globuler proteinler çözelti içindeki davranışlarından (özelliklerinden) yararlanılarak saflaştırılabilirler. Bu özellikler şunlardır: **1.** Molekül büyüklüğü **2.** Çözünürlük **3.** Elektriksel yük **4.** Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıklar ve **5.** Diğer moleküllere karşı biyolojik afinite.

1) Molekül Büyüklüğü Esasına Göre Proteinlerin Ayrılması: Proteinlerin en dikkat çekici özelliği molekül büyüklükleridir. Bu özelliğinden dolayı bir protein molekülünü

diğer proteinlerden ve küçük moleküllerden ayırmak mümkündür. Bu esasa dayalı protein ayırma metotları şunlardır.

a. Diyaliz ve Ultrafiltrasyon: Düşük molekül ağırlıklı maddeler bir protein çözeltisinden basit diyaliz yoluyla uzaklaştırılabilirler. Bunun için yarı geçirgen membran kullanılır, protein molekülleri tutulur, küçük moleküller ve su membrandan geçer (Şekil 3.28).

Ultrafiltrasyon, basınç veya santrifügasyon kuvvetiyle su ve küçük çözünen moleküllerin bir membrandan geçmeye zorlanması ve proteinlerden ayrılmasıdır. Selofan ve diğer sentetik materyallerden yarı geçirgen membran süzme aracı olarak kullanılabilir.

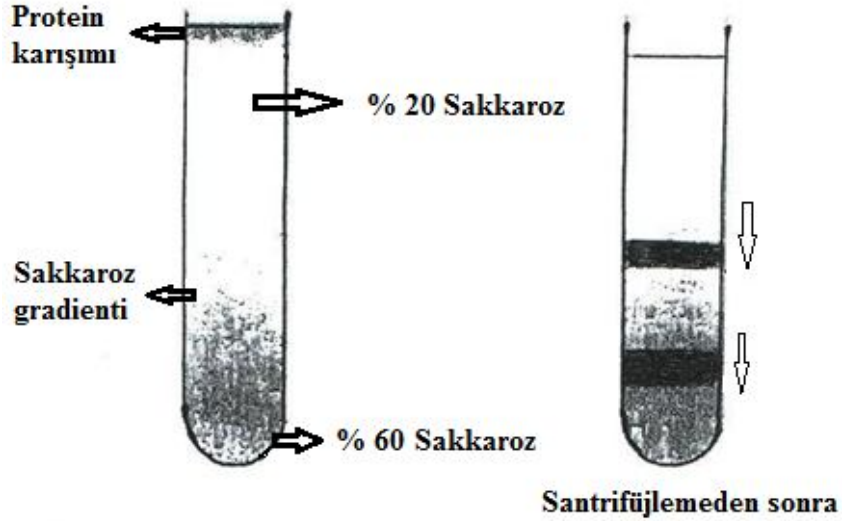


Şekil 3.28. Diyaliz ve Ultrafiltrasyon

b. Yoğunluk Gradienti Santrifügasyonu: Çözünmüş proteinler kuvvetli bir santrifügasyon alanında çökme eğilimi gösterdiklerinden protein karışımları santrifüjleme metotları ile ayrılabilirler. Bu metotla aynı zamanda diğer makromoleküller, virüsler ve hatta organeller de ayrılabilirler. Bu metotla ayırma da bir santrifüj tüpü içerisinde bir çeşit bileşik kap yardımıyla sakkarozun sürekli bir yoğunluk gradienti hazırlanır. Ortamın yoğunluğu

tüpün aşağısından yukarı doğru azalır. Proteinler karışımı çözeltisi tüpün üstünden tatbik edilir ve daha sonra tüp santrifüjlenir (Şekil 3.29).

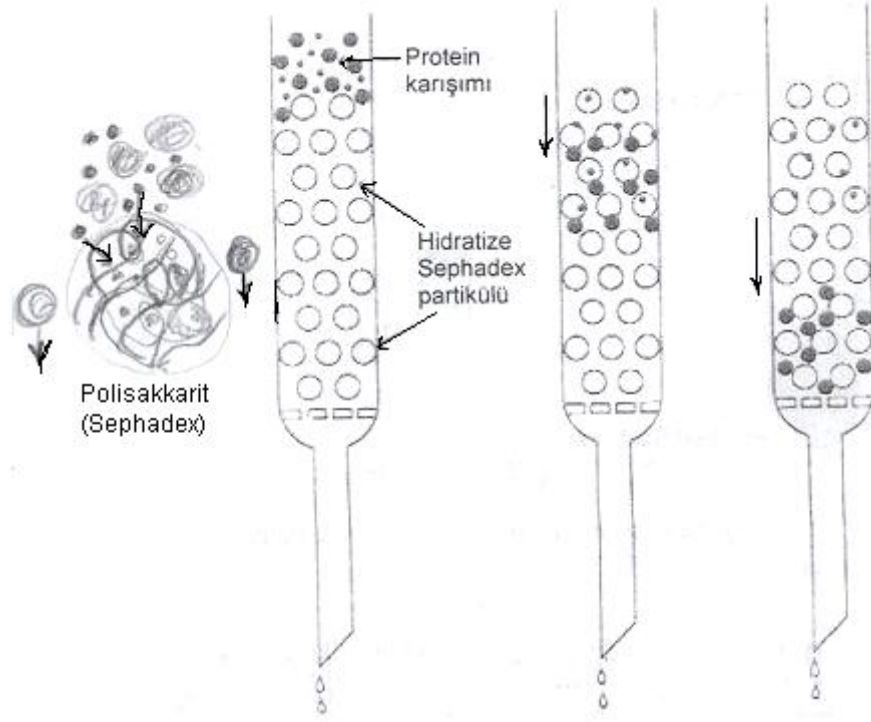
Santrifüjleme sırasında protein molekülleri büyüklüklerine, şekillerine ve konsantrasyonlarına göre ayrılırlar. Değişik bantlar meydana gelir. Bantların durumu ya optik olarak değerlendirilir veya tüpün dibi delinerek bantlar fraksiyonlar halinde alınır ve analiz edilir. Bir başka yol da tüp (polietilen) içeriğinin dondurularak, bantların ince diskler halinde kesilip analiz edilmesidir.



Şekil 3.29. Sakkaroz yoğunluk gradienti santrifügasyonu ile proteinlerin ayrılması

c. Jel Filtrasyon Kromatografisi: Diyaliz ve ultrafiltrasyon ile küçük moleküllerden ayrılan protein karışımlarına uygulanır. Molekül büyüklüğüne göre proteinleri ayırmada kullanılan en uygun ve en etkili metottur (Şekil 3.30). Bu metot da bir kolona kuvvetli hidratize olmuş polimerik bir materyal konulur. Bu materyal Sephadex ve Sepharose gibi bir polisakkarit veya poliakrilamid gibi bir biyojel türevi olabilir. Jel partikülleri değişik büyüklükte porlara sahip olacak şekilde hazırlanabilir.

Polimer materyal iyice yıkanır ve bir tamponla dengelenir. Daha sonra aynı tampon içinde çözülmüş olan proteinler karışımı çözeltisi kolona üstten verilir. Büyük moleküller jel partiküllerinin porlarına (gözeneklerine) giremezler ve hızlıca akıp giderler. Küçük molekül proteinler ise gözeneklere girer ve akışları engellenir. Böylece önce büyük molekül proteinler, daha sonra da küçük molekül büyüklüğüne göre proteinler elüe edilir. Elüatlar küçük fraksiyonlar halinde toplanarak analiz edilir.



Şekil 3.30. Sephadex kolonda iki farklı büyüklükteki proteinin ayrılması.

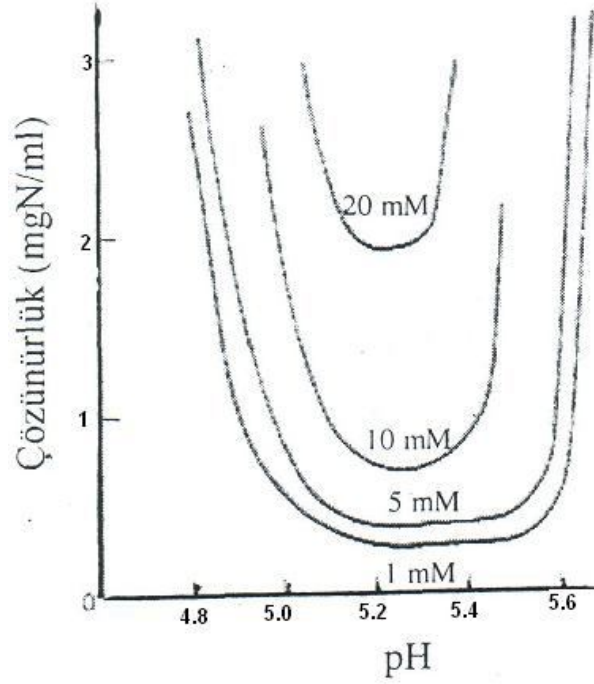
Jel filtrasyon kromatografisi, diğer makromoleküller, virüsler, ribozomlar, hücre çekirdekleri ve hatta bakteriler gibi çok daha büyük yapıların ayrılmasında da kullanılabilir. Ancak bu durumda uygun porlu jellerin seçilmesi gerekir.

Ayrırma gücü büyük olan bu basit metot, proteinlerin molekül ağırlığının tayininde de kullanılır.

2) Çözünürlüklerindeki Farklılık Esasına Göre Proteinlerin Ayrılması:

Proteinlerin çözünürlüğü başlıca pH, iyonik şiddet, çözücünün dielektrik özelliği ve sıcaklığa bağlıdır. Bu özelliklerden proteinleri ayırmada yararlanır. Proteinler, yük ve protein-çözücü (su) etkileşimi ile kararlı çözeltiler oluştururlar. Proteinler bu iki etkiden birisi kaldırılırsa bazen ikisi de kaldırılırsa her zaman çökelirler. Bu esaslara dayalı proteinlerin ayrılması metotları şunlardır:

a. İzoelektrik Çökeltme: Çoğu globuler proteinlerin çözünürlüğü sistemin pH'ından etkilenir. β -laktoglobulinin (süt serumu proteini) çözünürlüğü NaCl konsantrasyonuna bağlı olmaksızın pH = 5.2–5.3 arasında minimum bir değere sahiptir (Şekil 3.31). Bu kritik pH değerinin her iki tarafında çözünürlük önemli ölçüde artar. Bu pH, β -laktoglobulinin izoelektrik pH'sıdır. İzoelektrik pH'da çözünürlük en azdır.



Şekil 3.31. 25 °C' da β-laktoglobulinin çözünürlüğüne tuz konsantrasyonu ve pH değerinin etkisi.

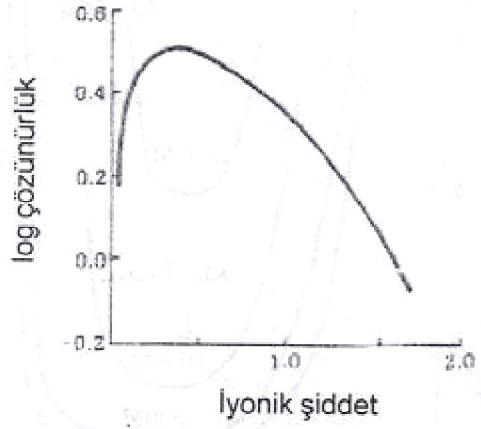
Değişik proteinlerin iyonlaşabilen R grupları farklı olduğundan izoelektrik pH'ları da farklıdır. Bu farklılıktan yararlanılarak proteinler birbirinden izoelektrik çökelme ile ayrılabilirler. Eğer bir protein karışımının pH değeri karışımda bulunan proteinlerden birisinin izoelektrik pH'sına gelirse bu protein az veya fazla miktarda çöker. Bu pH'nın altında ve üzerindeki izoelektrik pH'lı proteinler çözeltide kalır. Bu şekilde devam edilirse sırasıyla karışımdaki hangi proteinin izoelektrik pH'sına gelirse o protein çöker.

İzoelektrik çökelme ile çöktürülen proteinler doğallıklarını ve biyolojik aktivitelerini korurlar. Daha sonra pH'sı uygun bir ortamda proteinler çözeltiliye alınırlar. Her protein için izoelektrik pH çözeltideki iyonlara göre kolayca değişir.

Eğer bir protein çözeltisi H^+ ve OH^- iyonu dışındaki küçük iyonları uzaklaştırmak için saf suya karşı diyaliz edilirse izoelektrik pH izoionik pH'da gerçekleşir ve izoelektrik pH, izoionik pH'ya eşit olur. **İzoionik pH**; bir protein çözeltisinin sonsuz seyrelme durumunda su iyonlarından başka iyonun bulunmadığı pH olup sabit bir değerdir.

b. Nötral Tuzlarla Çöktürme: Nötral tuzlar proteinlerin çözünürlüğünü etkiler (Şekil 3.31). Nötral tuzlar düşük konsantrasyonlarda protein moleküllerinin çözünürlüğünü artırır. Bu olaya **salting-in** adı verilir. $MgCl_2$ ve $(NH_4)_2SO_4$ gibi iki değerlikli iyon içeren tuzlar; $NaCl$, NH_4Cl ve KCl gibi tek değerlikli iyon içerenlerden daha etkilidir. Nötral tuzların

bu özelliği iyonik şiddetlerine bağlıdır (Şekil 3.32). İyonik şiddet $I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$ eşitliği ile verilir.



Şekil 3.32. CO-Hemoglobinin izoelektrik pH'da çözünürlüğüne K₂SO₄ nötral tuzunun etkisi.

Yüksek tuz konsantrasyonlarında proteinlerin çözünürlüğü azalır ve hatta çökelirler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonlarında bir protein çözültiden hemen hemen kantitatif olarak çöktürülebilir. Bu olaya **salting-out** adı verilir. Salting-out etkisinin fizikokimyasal prensibi karmaşıktır. Yüksek tuz konsantrasyonlarında katyon ve anyonun hidrasyonu, suyu protein moleküllerinden uzaklaştırır. Yani protein-çözücü (su) etkileşmesi bozulur ve çözünürlük çökme derecesinde azalır. Su molekülleri tuzun katyon ve anyonunu hidratlaştırır ve çözünürlük azalır, bununla birlikte diğer faktörlerde etkilidir.

Her bir protein farklı iyonik şiddette çökeceğinden bu yolla proteinler birbirinden ayrılabilir. Tuz konsantrasyonunun artmasıyla (salting-out etkisi) çöktürülen proteinler üç boyutlu yapılarını ve biyolojik aktivitelerini korurlar. Nötral tuzlarla çöktürmede suda iyi çözünen ve iyonik şiddeti yüksek olan (NH₄)₂SO₄ yaygın olarak kullanılır.

c. Çözücülerle Fraksiyonlama: Suda çözünebilen nötral organik çözücülerin özellikle etanol ve asetonun ilavesi çoğu globuler proteinlerin çözünürlüğünü çökme derecesine kadar azaltabilir. Sabit pH ve iyonik şiddette proteinlerin çözünürlüğü, ortamın dielektrik sabitinin bir fonksiyonudur. Etanolün dielektrik sabiti (D=24) sudan (D=80) küçüktür. Bu nedenle aşağıdaki eşitliğe göre, proteinin sulu çözeltisine etanol ilavesi ile zıt yüklerin çekimi artar; protein moleküllerin çözünürlüğü çökme derecesinde azalır ve kümelenerek çökelirler.

$$F = \frac{e_1 \cdot e_2}{D \cdot r^2}$$

(F: moleküller arası çekim kuvveti, e: yük, D: Dielektrik sabiti, r: moleküller arası uzaklık)

Organik çözücüler protein-su etkileşimini azaltır ve proteinleri çökeltir. Çökeltme izoelektrik pH'da daha kolay olur. Protein karışımlarındaki bir protein; değişik soğuk etanol-su; aseton-su karışımlarındaki farklı çözünürlüğü esasına göre ayrılabilir. Proteinler yüksek sıcaklıklarda denatüre olduğu için düşük sıcaklıklarda çöktürülürler.

d. Sıcaklık Etkisi: Globuler proteinlerin çözünürlüğünü sıcaklık da etkiler. Globuler proteinlerin çözünürlükleri 0–40°C arasında artar. 50–60°C'ın üzerinde proteinlerin çoğu denatüre olur ve çözünürlük azalır. Proteinlerin ayrılması daha çok düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir.

3) Elektriksel Yük Esasına Göre Proteinlerin Ayrılması: Proteinlerin elektriksel yüklerine göre ayrılması, karakteristik asit-baz özelliklerine dayanmaktadır. Proteinlerin aminoasit bileşimi ve dizilişi farklı olduğundan her proteinin kendine özgü bir asit-baz davranışı ve izoelektrik pH'sı vardır. Proteinler izoelektrik pH'larının üstündeki çözeltilerde anyon; altındakiler de ise kation olacak şekilde çözünürler. Proteinlerin karakteristik asit-baz özelliklerine dayalı iki ayırma metodu geliştirilmiştir: **a.** Elektroforez, **b.** İyon değişim kromatografisi

a. Elektroforez: Elektroforez genel olarak bileşiklerin belirli bir pH'da yük farklılıklarına göre, DC elektrik alanında ayrılmaları ilkesine dayanır. Bu yöntem genel olarak büyük miktarlardaki proteinleri saflaştırmak için kullanılmaz, daha basit ve uygun alternatifler mevcuttur ve elektroforetik metotlar proteinlerin yapı ve işlevlerini olumsuz etkiler. Fakat elektroforez özellikle faydalı ve avantajlı bir yöntemdir. Bu yöntemin avantajı proteinlerin hem ayrıştırılması hem de görüntülenebilmesidir, araştırmacı farklı protein sayısını ve özgün bir proteinin saflık derecesini tahmin edebilir. Ayrıca elektroforez, proteinlerin izoelektrik pH ve yaklaşık molekül ağırlıkları gibi çok önemli özelliklerini de tanımlamaya yarar.

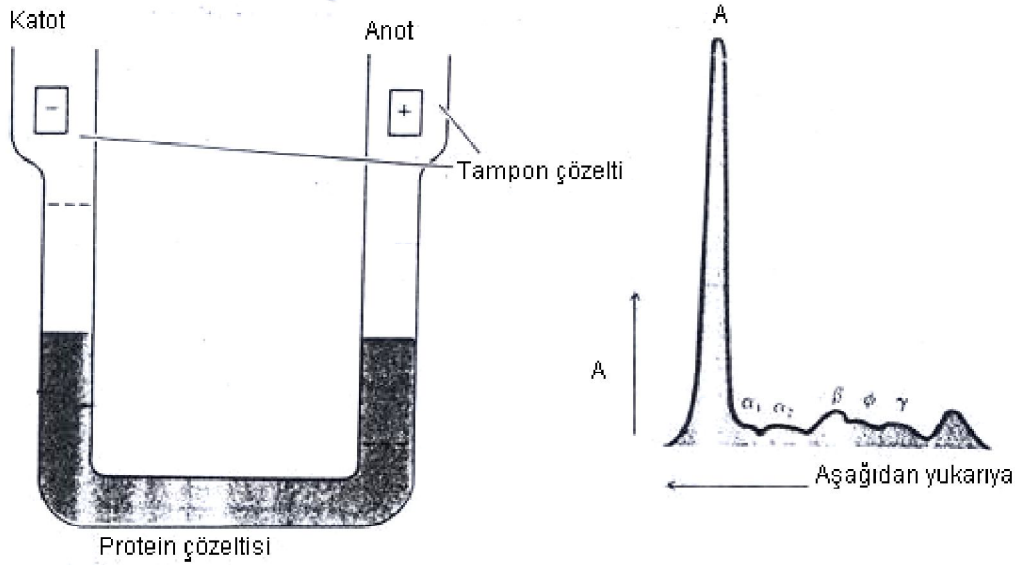
Sistemin pH'sı tekniğin uygulandığı tampon çözelti ve elektrik alanı da bir DC güç kaynağından sağlanır. Elektroforezde makromolekülleri hareket ettiren güç, elektriksel potansiyel (E) dir. Yüklü bir parçacığın elektriksel alanda göçü, elektriksel hareketlilik eşitliğiyle verilir:

$$\mu = \frac{v}{E}$$

(v: göç hızı, E: elektriksel potansiyel)

Proteinler bir DC elektrik alanında Na⁺, Cl⁻ gibi küçük iyonlardan daha yavaş hareket ederler, çünkü proteinlerin yük yoğunlukları (e/m) çok daha küçüktür.

i) Serbest Elektroferez: İlk olarak geliştirilen elektroferez serbest elektroferezdür. A. Tiselius (1937) tarafından geliştirilmiş olan bu elektroferezde, proteinler karışımı uygun bir tamponda çözülerek U şeklinde bir boru içerisine yerleştirilir (Şekil 3.33). Protein çözeltisinin üzeri saf tamponla doldurulur. Elektriksel alan uygulandığında proteinler yük yoğunluklarına göre hareket ederler ve bantlar oluştururlar. Daha sonra proteinlerin konumu ve miktarı bantların kırılma indislerinin ölçülmesi ile belirlenir. Uzun yıllar serbest elektroferez kan plazma proteinlerinin kantitatif tayininde kullanılmıştır. Kan plazma proteinlerinin, izoelektrik pH'ları 4,5–7,0 arasında değişir. pH = 8,6 tampon çözeltide kan plazma proteinleri anyon şeklinde çözünecek ve anoda göç edeceklerdir. Proteinlerin şekil, büyüklük ve yükleri farklı olduklarından aynı hızla göç edemezler, yük yoğunluklarına göre sıralanırlar.



Şekil 3.33. Serbest elektroferez aletinin şematik gösterimi (Solda) ve insan kan plazma proteinlerinin elektroferez çıktısı (pH=8.6) (Şağda) A=Serum albümin, Φ=Fibrinojen, α_1 -, α_2 -, β - ve γ -değişik globulinler.

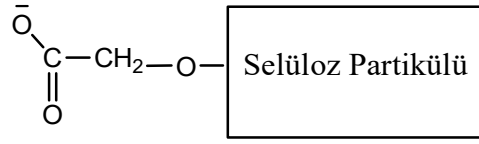
ii) Bölge Elektroferezi: Serbest elektroferez değişik şekillerde uygulanan bölge elektroferezi ile değiştirilmiştir. Bu elektroferez metodu çok daha basittir ve çok az numune gerekir. Bölge elektroferezinde, protein çözeltisi hidratize ve gözenekli bir materyalden hazırlanmış sabit bir matris üzerine tatbik edilir. Taşıyıcı olarak filtre kağıdı ve selüloz asetat şeritler kullanılabilir, bunlar proteinler ile reaksiyona girmeyen veya geri kazanılabilen inert materyallerdir. Protein karışımındaki bileşenler bölgelere ayrılıncaya kadar elektroferez devam ettirilir. Proteinlerin konumu ve konsantrasyonları uygun bir renk reaktifi ile tayin edilir. Konsantrasyonla orantılı olan renk şiddeti bir **dansitometre** ile ölçülür. Bu elektroferezin ayırma gücü çok daha yüksektir, kan plazma proteinlerinin kantitatif tayininde kullanılır.

Bölge elektroforezinde taşıyıcı materyal; jel filtrasyon kromatografisindeki gibi proteinleri molekül büyüklüklerine göre engelleyebilir ise ayırma gücü daha büyük olur. Bu çeşit elektroforezle proteinler bir karışımdan elektrik yükleri ve molekül büyüklükleri esasına göre ayrılabilirler. Patates nişastası ve poliakrilamid jel bu amaçla çok kullanılır. Basit bölge elektroforezinde kan plazma proteinleri için 5–6 bileşen, bu metotla yaklaşık 15 bileşen gözlenir.

iii) Disk Elektroforezi: Bir başka çeşit elektroforez olan disk elektroforezinde iki farklı gözenekli jel ve iki farklı pH'lı tampon çözelti kullanılır. Proteinler kaba gözenekli jelden küçük gözenekli jele doğru hareket ederlerken, bu sırada pH da değişir. Sonuçta her protein çok ince keskin bir bant oluşturur.

Elektroforez ile ayırma metotları içerisinde en saflaştırıcı ve en verimli olanı izoelektrik odaklama ile ayırmadır. İzoelektrik odaklama, bir proteinin izoelektrik noktasının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir (Şekil 3.34). Düşük molekül ağırlıklı organik asitler ve bazların (amfolitler) karışımının jel boyunca elektriksel alanda dağılımları farklı pH değerlerini (pH gradienti) oluşturur. Protein karışımı jele uygulanınca her protein kendi izoelektrik pH değerine eşit pH'ya gelinceye kadar göç eder. Bu şekilde farklı izoelektrik pH'lı proteinler jel boyunca farklı dağılır. Ayırma gücü çok yüksek olan bu metot ile kan plazma proteinleri 40–50 fraksiyona ayrılabilir.

Karboksimetil selüloz (CM–selüloz) nötral pH’da negatif yüklü gruplar içerir ve bir katyon değiştiricidir.



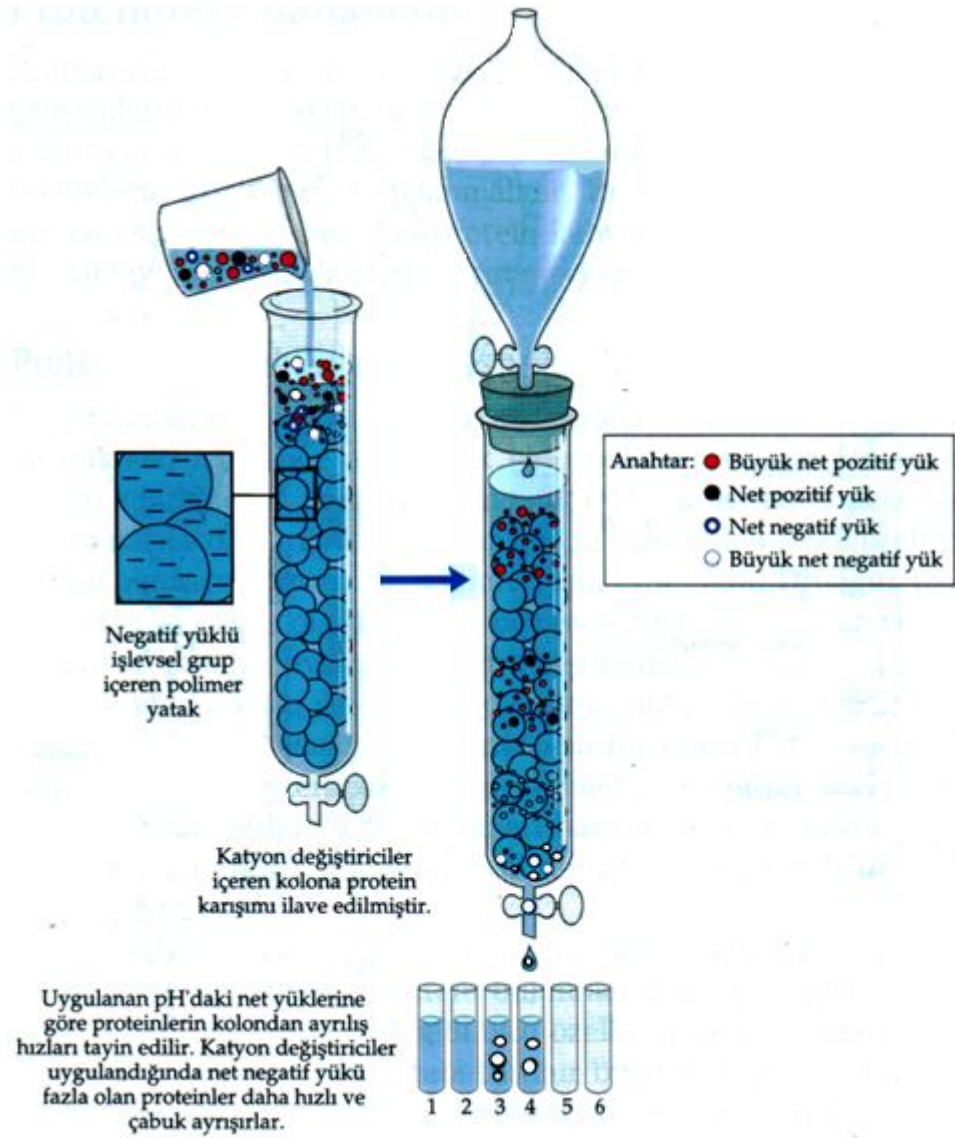
CM - Selüloz

Bu kromatografide bir kolona doldurulan iyon değiştirici, tampon çözelti ile dengelenir. Protein karışımı çözeltisi kolona yüklendikten sonra protein molekülleri zıt yüklü gruplarla elektrostatik olarak etkileşir ve alı konur.

DEAE–selüloz kolonda uygun pH’da anyon (–) halinde çözünmüş proteinler tutulur. Diğer bileşenler kolondan geçer gider. Daha sonra diğer bileşenlerden ayrılan protein molekülleri küçük fraksiyonlar şeklinde kolondan alınır.

Protein karışımının, DEAE–selüloz kolonda ayrılması işleminde, her bir proteinin sırasıyla elüsyonunda azalan pH’lı tamponların bir serisi veya artan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bunların kolondan geğerilmesi anyonik proteinlerin bağlanmasını zayıflatır. pH’nın düşmesiyle birlikte iyon değiştiriciye tutunan proteinlerin negatif yüklü bölgeleri nötral hale gelir ve kolondan çıkar. İyonik şiddetin artmasıyla tuzun pozitif yüklü iyonları proteinin negatif yüklü bölgelerine bağlanırlar. Tuzun negatif yüklü iyonları ise iyon değiştiriciye bağlanmak için proteinlerle yarışırırlar. Böylece proteinler daha zayıf bir kuvvetle DEAE–selüloza bağlanırlar ve hatta koparırlar. Elüatlar küçük fraksiyonlar şeklinde toplanır ve analiz ediliriirlar.

Katyon şeklinde (+) çözünmüş proteinler ise, katyon değiştirici CM – selüloz kolondan ayrırırlar. CM - selüloz kolonda uygun pH’da katyon halinde tutulur. Diğer bileşenler kolondan geçer gider (şekil 3.35).



Şekil 3.35. İyon değiştirme kromatografisi. Kolon matrisi, yüklü bağlı gruplar içeren sentetik bir polimerdir. Bağlı anyonik gruplar kasyon değiştiriciler, bağlı kationik gruplar anyon değiştiriciler olarak adlandırılır. Şekilde kasyon değiştiricili (CM–selüloz) iyon değiştirme kromatografisi gösterilmektedir. Kolonda bulunan yüklü gruplarda her bir proteinin afinitesi, molekülün iyonlaşma durumunu belirleyen pH ve çözelti içinde birbiriyle yarış halinde bulunan serbest tuz iyonlarının derişimleriyle belirlenir. Ayrılma kademeli olarak değişen pH ve/veya mobil fazın tuz derişimiyle pH veya tuz gradyanı oluşturmak üzere optimize edilir.

İyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ile kombine edilirse ayırma gücü çok daha artar. DEAE–Sephadex, iyon değiştirici olarak kullanılırsa proteinleri yük ve molekül büyüklüklerine göre ayırmak mümkündür.

4) Seçimli Adsorpsiyon Esasına Göre Proteinlerin Ayrılması: Proteinler mangal kömürü gibi apolar veya alüminyum oksit gibi polar materyallere molekül büyüklüklerine

göre adsorbe olabilirler. Apolar adsorpsiyonlarda hidrofobik etkileşimler sonucu oluşan van der Waals çekim kuvveti ve polar adsorpsiyonlarda iyonik etkileşimler ve hidrojen bağları etkilidir. Proteinleri adsorpsiyon esasına göre ayırmada en çok kullanılan adsorban madde kristal kalsiyum fosfatın bir şekli olan Ca^{+2} – hidroksiapatit ($Ca_5(OH)(PO_4)_3$) tir.

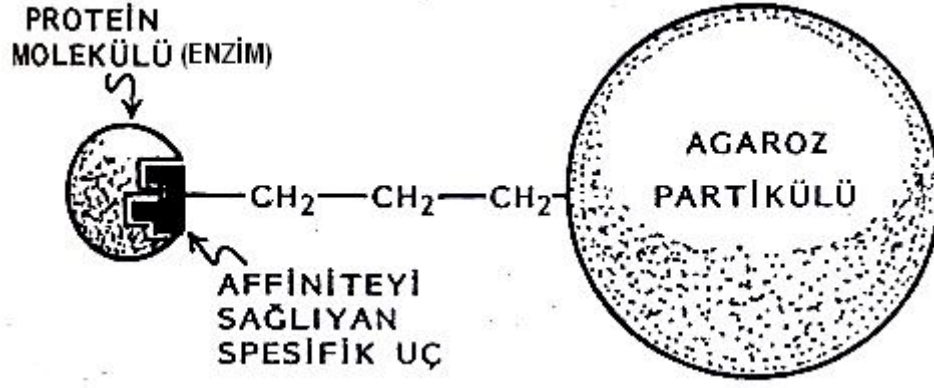
Protein molekülündeki negatif yüklü gruplar adsorban bileşiğin Ca^{+2} iyonlarına bağlanır. Proteinler fosfat tamponuyla kolondan elüe edilir.

5) Diğer Moleküllere Biyolojik Afinite Esasına Göre Proteinlerin Ayrılması (Afinite Kromatografisi): Bazı proteinler afinite kromatografisi ile çok kere bir basamakta çok kompleks bir karışımdan ayrılabilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş (tutuklanmış) bir liganda spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Agaroz, Biyogel gibi materyaller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler

Saflaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, nükleik asit polimeraz
Hormon	Reseptör protein
Vitamin	Taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, Lektin

Çok kompleks bir karışımda bulunan bazı proteinler (enzim proteinleri) afinite kromatografisi ile bir tek basamakta oldukça saf halde ayrılabilirler. Afinite kromatografisi için polisakkarit olan agaroz taneciklerine kimyasal bir reaksiyon ile enzimin koenzimi bağlanır. Üzerine koenzim bağlanmış olan agaroz tanecikleri kolon dolgu maddesi olarak kullanılır. Protein karışımı, koenzimin immobilize edildiği agaroz tanecikleri doldurulmuş kolona tatbik edildiği zaman sadece ayrılacak olan enzim proteini, koenzimin serbest ucuna spesifik olarak bağlanır (Şekil 3.36). Diğer proteinler bağlanmazlar, kolondan geçip giderler.



Şekil 3.36. Koenzimin immobilize edildiği agaroz taneciklerine enzim proteininin spesifik olarak bağlanması.

Sonra serbest koenzim içeren çözelti kolona verilir. Bu defa enzim proteini rekabetten dolayı çözelti ile gelen serbest koenzime bağlanır ve kolondan çıkar. Böylece enzim proteini diğer yüzlerce proteinden afinite kromatografisi ile bir tek basamakta saf bir şekilde elde edilir.

3.11. PROTEİNLERİN MOLEKÜL AĞIRLIĞI TAYİNİ

Bir protein saflaştırılıp alındıktan sonra bazı özellikleri belirlenir. Proteinin toplam molekül ağırlığı, polipeptid zincir sayısı, polipeptid zincirlerinin molekül ağırlığı, amino asit bileşimi ve dizilişi analizleri yapılır. Proteinlerin ve alt birimlerinin molekül ağırlığı tayini metotlarının prensibini kısaca açıklayalım.

1) Proteinin Kimyasal Bileşiminden Molekül Ağırlığı Bulunması: Bir proteinin herhangi bir elementten bir atom içerdiği varsayılarak minimum molekül ağırlığı bulunur. Bu metot herhangi bir metal atomu içeren proteinler için kullanılır. Örneğin miyogloblin (kasta O₂ depo eden protein) % 0.335 demir atomu içerir. Buna göre miyogloblinin minimum molekül ağırlığı;

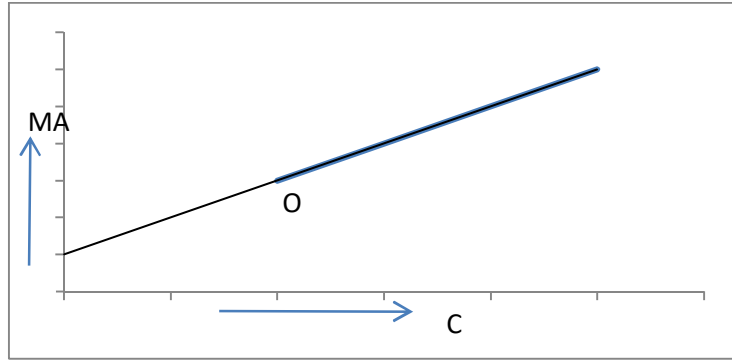
$$\frac{Fe'in\ Atom\ Ağ.}{Yüzde\ Demir\ Miktarı} \times 100 = \frac{56}{0,335} \times 100 = 16.700 \text{ dalton olarak hesaplanır.}$$

Gerçek molekül ağırlığı molekül başına içerilen demir atomu sayısı (n) ile çarpılarak bulunur. Miyogloblin için n=1 olduğundan miyogloblinin molekül ağırlığı 16.700 x 1 = 16.700 Dalton'dur. Hemoglobinde, miyogloblin gibi aynı oranda (% 0,335) demir içerir. Hemogloblin molekül başına 4 demir atomu içermektedir. Bu nedenle hemogloblinin molekül ağırlığı 16.700 x 4 = 66.800 dalton olarak bulunur.

2) Osmotik Basınç Ölçümüyle Molekül Ağırlığı Tayini:

Molekül ağırlığı ile osmotik basınç arasında $M_A = \frac{C}{\pi} RT$ eşitliği ile gösterilen bir ilişki vardır. Bu eşitlikte M_A molekül ağırlığı, C g/L olarak konsantrasyon, π ölçülen osmotik basınç, R gaz sabiti ve T mutlak sıcaklıktır.

Değişik protein konsantrasyonlarında osmotik basınç (π) ölçülür. Bir çözeltinin osmotik basıncı, çözünen maddenin gaz halinde aynı sıcaklık ve konsantrasyonda yapacağı basınca eşittir (van't Hoff kuralı). Yukarıdaki eşitliğe göre hesaplanan molekül ağırlığı yaklaşık bir değerdir. Gerçek molekül ağırlığının bulunabilmesi için hesaplanan M_A değerlerinin konsantrasyona karşı grafiği çizilir (Şekil 3.37). Osmotik basınç ideal çözeltilerin bir özelliği olduğundan ve ideallığe çok düşük konsantrasyonlarda erişilebildiğinden grafikteki doğru C=0 değerine ekstrapolasyon ile uzatılarak gerçeğe çok yakın M_A değeri bulunur.



Şekil 3.37. Osmotik basınç ölçümüyle molekül ağırlığı tayini.

3) Sedimentasyon Metodu ile Molekül Ağırlığı Tayini: 1925'de T. Svedberg tarafından geliştirilmiş olan ultrasantrifüj yöntemi ile molekül ağırlığı tayinidir. Ultrasantrifüjle protein molekülleri yerçekiminin 100 - 250 bin katı bir kuvvetle itilir. Proteinlerin hareket hızı; şekillerine, büyüklüklerine bağlı olduğu kadar çözündükleri ortamın yani çözeltinin yoğunluk ve viskozitesine de bağlıdır.

$$M_A = \frac{RTS}{D(1 - v d)}$$

Eşitlikte D difüzyon katsayısı, v proteinin kısmi spesifik hacmi, d çözeltinin yoğunluğu, S proteinin sedimentasyon katsayısıdır. D katsayısı saf çözücüdeki difüzyonla, v' de 1 g katı proteinin çözücü hacminde meydana getirdiği değişikliklerle bulunurken, S sedimentasyon katsayısı ultrasantrifüjde proteinin hareket hızından elde edilir.

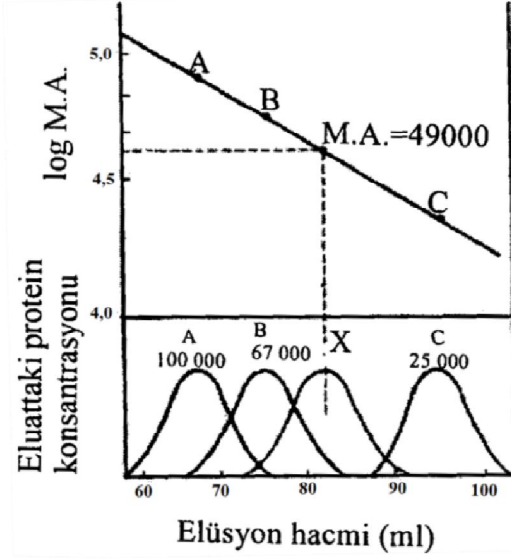
Ultrasantrifüjde aynı şekil ve aynı ağırlıktaki protein molekülleri aynı hızda hareket ederler ve belli bir bant oluştururlar. Bu bantların refraktif indekslerinde (kırılma indislerinde) meydana gelen değişme gözlenir ve sedimentasyon katsayısı

$$S = dx/dt \cdot 1/\omega^2 x \quad \text{eşitliğinden hesaplanır.}$$

Burada x dönüş merkezinden uzaklığı, ω saniyede radyan cinsinden açısal hızı, dx/dt oranı da bantların hareket hızını göstermektedir. Proteinler için S değeri, 1×10^{-13} – 200×10^{-13} saniye arasındadır. 1 Svedberg birimi 10^{-13} saniyelik katsayıya eşit olduğundan, proteinler için S değeri, 1–200 S arasında değişir.

4) Jel Filtrasyon Kromatografisi Yöntemi İle Molekül Ağırlığı Tayini: Son yıllarda proteinlerin molekül ağırlığı tayininde en çok kullanılan ve çok basit aletlerle gerçekleştirilen bir metottur. Bu metot özellikle globuler proteinlerin molekül ağırlığı tayininde başarıyla kullanılmaktadır. Bu metotta, proteinler jel filtrasyon kromatografisi işlemine tabi tutulurlar. Globuler proteinlerin kolondan geldiğini gösteren 280 nm'deki absorbansa karşılık gelen elüsyon tampon hacmi ile proteinlerin molekül ağırlığı arasında orantılı bir ilişki vardır. Elüsyon tampon hacmi (V_e), örnek proteinin kolona verilip kolondan alınımına kadar toplanan sıvı hacmi olarak tanımlanır.

Önce kolondan molekül ağırlığı bilinen saf globuler proteinler aktarılarak bir standart grafik çizilir. Bu grafik 280 nm'de maksimum absorbansın elde edildiği tüplerdeki elüsyon tampon hacmine karşı molekül ağırlığının logaritmasının çizilmesiyle hazırlanır. Daha sonra molekül ağırlığı bilinmeyen protein kolondan akıtılarak kaçınıcı tüplerde geldiği bulunur ve elüsyon tampon hacmi belirlenir. $\log M_A$ –elüsyon tampon hacmi (V_e) grafiğinden bilinmeyen proteinin molekül ağırlığı tayin edilir (Şekil 3.38.). Bu yöntem çözünür proteinler için uygulanır ve bilinen proteinler için uygun jeller kullanılır. Bu metodun en avantajlı yönü molekül ağırlığı tayin edilecek proteinin saf halde olmasının gerekmemesidir.

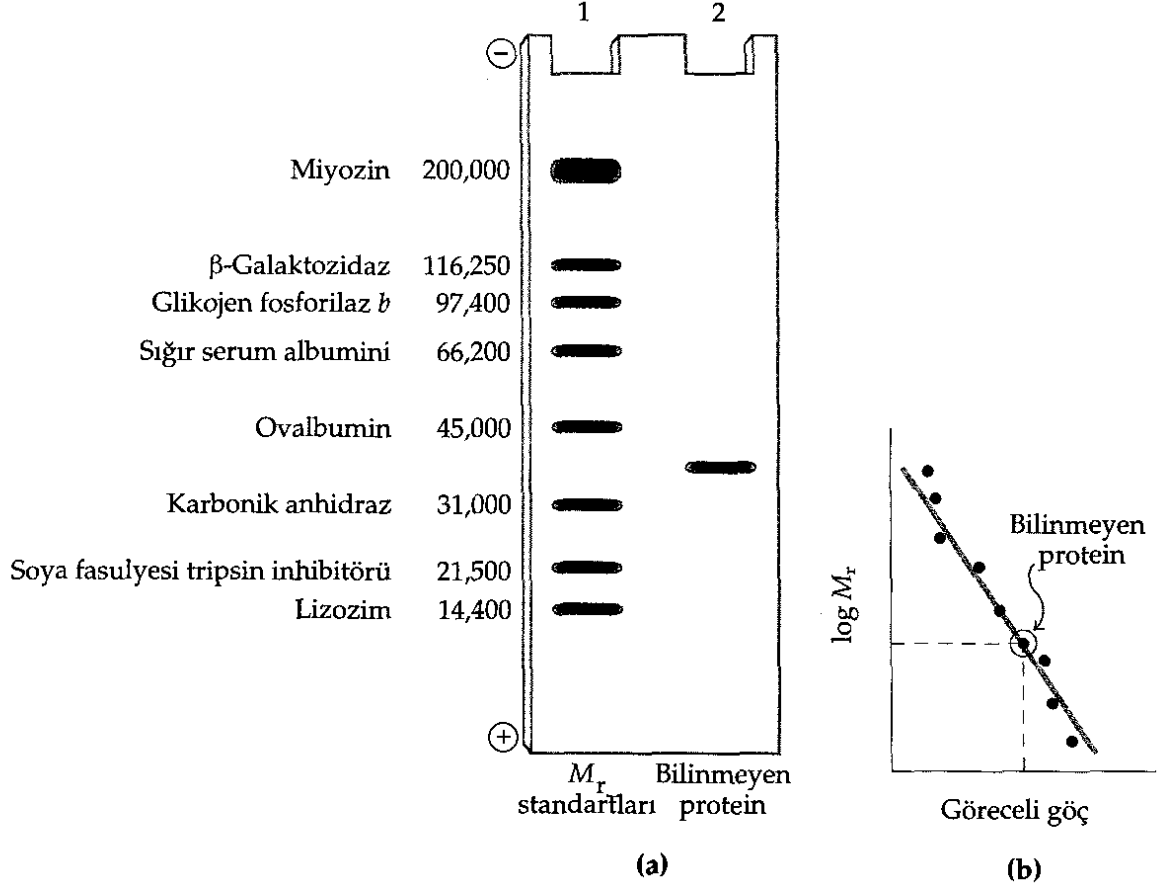


Şekil 3.38. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini.

5) Sodyum dodesil sülfat (SDS) Elektrofrez: Bu metotta proteinler normal elektroforez işlemine tabi tutulur. Bu metotta farklı olarak elektroforez tamponuna % 1 SDS eklenir. SDS bir deterjan olup formülü, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$ şeklindedir. SDS çoğu proteine iki aminoasit kalıntısına bir SDS olacak şekilde bağlanır.

Molekül ağırlığı tayin edilecek protein ve molekül ağırlığı bilinen standart proteinler % 1 SDS içeren tampon çözeltide çözülür. Molekül ağırlığı bilinen standart proteinler ve molekül ağırlığı bilinmeyen protein, poliakrilamid jelinin (Biogel) bulunduğu kolona üstten verilir. Daha sonra DC elektrik alanı uygulanır. Proteinlerin hareket hızı normal elektroforezde olduğu gibi yük ve kütleleri (e/m) yerine yalnız kütlelerine bağlıdır. Çünkü proteine yapışmış SDS üzerindeki negatif yük proteinin yükünden kat kat fazla olduğundan net negatif yükü artırır. Proteinin kendi yükü maskelenir ve her proteinin e/m oranı benzer olur. Böylece SDS varlığında elektroforezde proteinler tamamen kütle (molekül ağırlığı) esasına göre ayrılır, küçük polipeptidler daha hızlı göç ederler.

Elektroforez sonrasında proteinler jele bağlanmayan fakat proteine bağlanan Coomassie Blue boyası ile görüntülenir. Molekül ağırlığı bilinen proteinlere göre (standart protein) başlangıç noktasından itibaren aldıkları yol karşılaştırılarak bilinmeyen proteinin molekül ağırlığı bulunur (Şekil 3.39). Eğer protein iki veya daha fazla alt birim içeriyorsa bu alt birimler genellikle SDS ile ayrılacaktır ve her alt birim için ayrı bir bant gözlenecektir. Örneğin hemoglobin dört alt birime ayrılır ve dört bant oluşturur. Aslında SDS proteinlerin üç boyutlu yapılarını da değiştirmektedir. Alt birimlerin toplam külesinden proteinin molekül ağırlığı bulunur.



Şekil 3.39. Bir proteinin molekül ağırlığının tahmini. Bir proteinin SDS poliakrilamid jel üzerindeki elektroforetik hareketliliği bu proteinin molekül ağırlığıyla ilişkilidir. **(a)** Molekül ağırlıkları bilinen standart protein elektroforezi (Şerit 1). Bu standart proteinler bilinmeyen proteinlerin (Şerit 2) molekül ağırlıklarını tahmin etmede kullanılır (Solda). **(b)** Bilinen proteinlerin $\log M_A$ ' larının elektroforez sırasındaki göçe karşı grafiği doğrusaldır. Böylece bilinmeyen proteinin göreceli molekül ağırlığını grafikten okumamız mümkündür (Sağda).

4. BÖLÜM: ENZİMLER

Enzimler canlı organizmadaki kimyasal reaksiyonları hiçbir yan ürün vermeksizin hızlandıran ve %100 ürün verimiyle oluşmasını sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA molekülleri (ribozimler) hariç bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş kısmı enzimlerdir. Enzimler olağanüstü katalitik aktiviteye sahip moleküllerdir. Bir dakikada 36 milyon molekülü değişikliğe uğratabilmektedirler.

Canlıları oluşturan moleküller (biyomoleküller) kinetik yönden oldukça kararlılırlar, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki bütün kimyasal olaylar enzimler tarafından katalizlenir. Enzimler protein yapısında olduğundan ve kromozomal DNA tarafından şifrelendiğinden bir hücredeki bütün olaylar DNA seviyesinde düzenlenmekte ve kontrol edilmektedir. Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentezlenmektedir.

Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmaktadır. Enzim üzerindeki ilk çalışmayı S. S. Berzelius (1835) gerçekleştirmiş diastazın nişastayı in vivo koşullarda H₂SO₄'ten daha yüksek verimle katalizlediğini göstermiştir. Diastaz amilaz enzimleri karışımıdır. L. Pasteur (1860) fermentasyon olayının enzimlerle yürütüldüğünü deneylerle göstermiş ve enzimler için **ferment** terimini kullanmaya başlamıştır. Fakat Pasteur enzimlerin yalnız canlı hücre içinde kataliz görevini yapabildiklerini zannetmiştir.

Enzimoloji de en önemli gelişme 1926 yılında J. B. Sumner' in üreaz enzimini "Jack bean" bitkisinden elde edip kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasıdır.

Bugün için 2000 kadar enzim tanımlanmış, saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir.

4.1. ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI

Enzimler, önceleri etkileşerek ürüne dönüştürdükleri **substrat** adı verilen bileşiklerin isimlerinin sonuna, **-az** eki getirilerek isimlendirilmiştir. Mesela, üreyi CO₂ ve NH₃'e parçalayan enzime üreaz, arginini ornitin ve üreye parçalayan enzime arginaz, fosfat esterlerinin hidrolizlenmesini sağlayan enzimlere de fosfataz denilmiştir. Bu isimler en azından substratlar hakkında bilgi verirlerken, bu konuda hiçbir bilgi ifade etmeyen bazı enzim adları da biyokimyacılar tarafından kullanılmıştır. Mesela pepsin, tripsin ve katalaz gibi. Zamanla birçok enzimin daha ortaya çıkarılması sonucu, sistematik bir isimlendirmeye

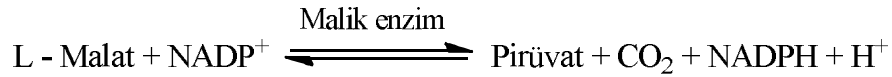
ihtiyaç duyuldu. Bunun üzerine enzimler, uluslar arası enzim komisyonu tarafından, katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir sınıflandırmaya tabi tutuldu. Fakat bugün birçok biyokimyacı tarafından enzimlerin geleneksel isimler hala kullanılmakta, sistematik isimleri de genellikle parantez içinde verilmektedir.

Sistematik isimlendirmenin başlıca özellikleri şunlardır:

a. Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 gruba bölünmüştür. Her bir grupta kendi içinde 4 ile 13 arasında alt gruba ayrılmıştır. Sözü edilen 6 grup bir takım örnekleriyle aşağıda verilecektir.

b. Enzim adı iki kısımda verilir. İsmi ilk bölümü substrat veya substratlarıdır. İkincisi ise katalizlenen reaksiyonun tipinin sonuna –az eki getirilmiş hali, yani grup veya alt grup adıdır. Substratlar aralarına iki nokta konularak yazılırlar.

c. Reaksiyonun tabiatını açıklayacak ifadeler gerekiyorsa, parantez içinde ismin sonuna yazılabilir. Mesela,

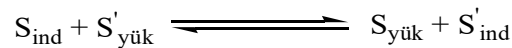


reaksiyonunun bir dekarboksilasyon reaksiyonu olduğunu belirtmek için enzim adı; L–malat: NADP⁺ oksidoredüktaz (dekarboksile eden) şeklinde yazılır.

d. Her enzime sistematik bir kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C. (Enzyme Code) harflerinden sonra art arda gelen dört rakamdan ibarettir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir. Mesela E.C. 2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin transferaz enzimi olduğunu; 7, bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1, fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamı da bu enzimin alkol grubuna transferi sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir. Sözü edilen enzim hekzokinaz geleneksel adıyla bilinen; ATP: D–heksoz 6–fosfotransferaz enzimidir.

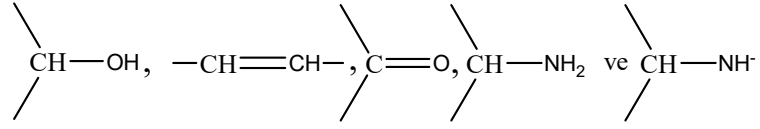
Enzimlerin ayrıldıkları 6 ana grup, bazı örnekleriyle şunlardır:

1) Oksidoredüktazlar: 2 substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Substratlara S ve S' denilirse, olay



genel reaksiyonu gösterilebilir.

Bu büyük ve önemli grup, önceden dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar, peroksidazlar vs. gibi geleneksel isimlerle anılan ve



gruplarının indirgenme ve yükseltgenmelerini katalizleyen enzimleri kapsar.

Örnek:



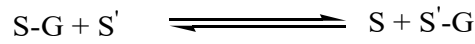
Geleneksel adı: Alkol dehidrogenaz

Sistemik adı: Alkol: NAD⁺ oksidoredüktaz

E.C.1.1.1.1.

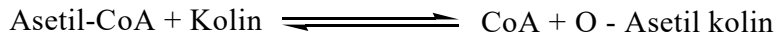
- 1.1. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-OH} \\ \diagdown \end{array}$ grubuna etki eder
- 1.2. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=O} \\ \diagdown \end{array}$ grubuna etki eder
- 1.3. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=CH-} \\ \diagdown \end{array}$ grubuna etki eder
- 1.4. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-NH}_2 \\ \diagdown \end{array}$ grubuna etki eder
- 1.5. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-NH-} \\ \diagdown \end{array}$ grubuna etki eder

2) Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Taşınan gruba G denilirse,



genel reaksiyonu yazılabilir. Fosforil grubu transferini sağlayan ‘‘kinaz’’ enzimleri bu gruptadır.

Örnek:



Geleneksel adı: Kolin açıl transferaz

Sistemik adı: Asetil-CoA: kolin O-asetil transferaz

E.C.2.3.1.6

- 2.1. Bir C grubu transfer eder
- 2.2. Aldehit ve keton grubu transfer eder
- 2.3. Açıl grubu transfer eder
- 2.4. Glikozil grubu transfer eder
- 2.5. Metilden başka alkil grupları transfer eder
- 2.6. Azotlu grupları transfer eder
- 2.7. Fosfat içeren grupları transfer eder
- 2.8. Sülfür içeren grupları transfer eder

3) Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C–halojenür veya P–N bağlarının bir H₂O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bütün proteolitik enzimler ve lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz ve nükleaz vs. gibi anılan enzimler de bu gruba dahildir.

Örnek:



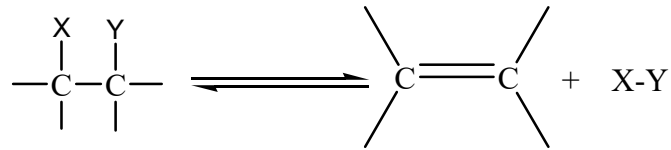
Geleneksel adı: Asetil kolin esteraz

Sistemik adı: Asetil kolin Asetil–hidrolaz

E.C.3.1.1.8.

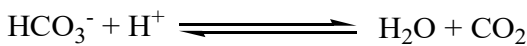
- 3.1. Esterler
- 3.2. Glikozil bileşikleri
- 3.3. Eter bağına
- 3.4. Peptid bağına
- 3.5. Diğer C-N bağlarına

4) Liyazlar: Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp; çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Genel anlamda reaksiyonları,



şeklinde gösterilebilir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu gruptandır.

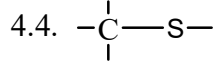
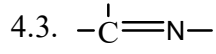
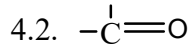
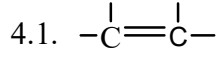
Örnek:



Geleneksel adı: Karbonik anhidraz

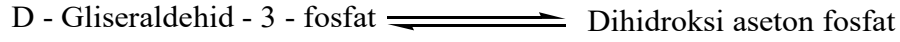
Sistemik adı: Karbonat hidroliyaz

E.C.4.2.1.1.



5) İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirlerine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu gruptandır.

Örnek:



Geleneksel adı: Trioz fosfat izomeraz

Sistematik adı: D-Gliseraldehit-3-fosfat Ketolizomeraz

E.C.5.3.1.1.

5.1. Rasemazlar ve izomerazlar

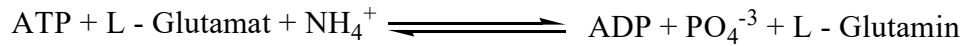
5.2. Cis-trans izomerazlar

5.3. İntramoleküler oksidoredüktazlar

5.4. İntramoleküler transferazlar

6) Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Örnek:



Geleneksel adı: Glutamin sentetaz

Sistematik adı: L-Glutamat: NH_4^+ ligaz (ADP)

E.C.6.3.1.2.

6.1. C-O bağı oluşmasını sağlayanlar

6.2. C-S bağı oluşmasını sağlayanlar

6.3. C-N bağı oluşmasını sağlayanlar

6.4. C-C bağı oluşmasını sağlayanlar

4.2. ENZİM KOFAKTÖRLERİ

Bazı enzimler katalitik görevlerini yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan **kofaktör** adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar (Tablo 4.1). Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi **koenzim** adı verilen ısıya dayanıklı kompleks bir organik bileşik de olabilir. Katalitik olarak aktif enzim–kofaktör kompleksine **holoenzim** adı verilir. Kofaktörsüz proteine **apoprotein**; enzime ise **apoenzim** denir. Apoenzim katalitik olarak aktif değildir. Bu kofaktörler çok defa enzim–kofaktör kompleksinden diyalizle uzaklaştırılabilir. Bazı enzim–kofaktör kompleksleri kovalent olarak bağlandığından diyalizle uzaklaştırılmayacak kadar sıklıdır. Böyle kofaktörlere **prostetik grup** denir.

Tablo 4.1. Kofaktör olarak metal iyonu içeren bazı enzimler

Enzimin metal içeriği	Örnek
Zn ⁺² içeren	Alkol dehidrogenaz, Karbonik anhidraz, Karboksipeptidaz
Fe ⁺² ve Fe ⁺³ içeren	Sitokromlar, Peroksidaz, Katalaz, Ferredoksin
Mg ⁺² içeren	Fosfohidrolazlar, Fosfotransferazlar
Cu ⁺² ve Cu ⁺ içeren	Tirozinaz, Sitokrom oksidaz
Mn ⁺² içeren	Arginaz, Fosfotransferazlar
K ⁺ içeren	Piruvat fosfokinaz (Mg ⁺² de gerekir)
Na ⁺ içeren	Plazma membran ATP-azı (Mg ⁺² ve K ⁺ iyonları da gerekir)

Koenzimler, genellikle elektronların ve atomların veya fonksiyonel grupların transferini gerçekleştirirler. Koenzimlerin birçoğu B grubu vitaminlerin türevleridir (Tablo 4.2). Bu vitaminler hayvansal organizmalar tarafından sentezlenemediklerinden diyetle alınmalıdır.

Tablo 4.2. Grup transferi gerçekleştiren koenzimler

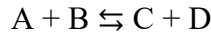
Koenzim	Taşımlanan birim
NAD ⁺	Hidrojen atomları (elektronlar)
NADP ⁺	Hidrojen atomları (elektronlar)
FMN	Hidrojen atomları (elektronlar)
FAD	Hidrojen atomları (elektronlar)
Koenzim Q (CoQ)	Hidrojen atomları (elektronlar)
TPP (Tiamin pirofosfat)	Aldehitler
Koenzim A (CoA)	Açıl grupları
Lipoamid	Hidrojen atomu ve açıl grubu
Biyositin	CO ₂
Piridoksal fosfat	Amino grupları
Tetrahidrofolat koenzimleri	Metil, metilen, formil veya formimino grupları

4.3. ENZİM KİNETİĞİ

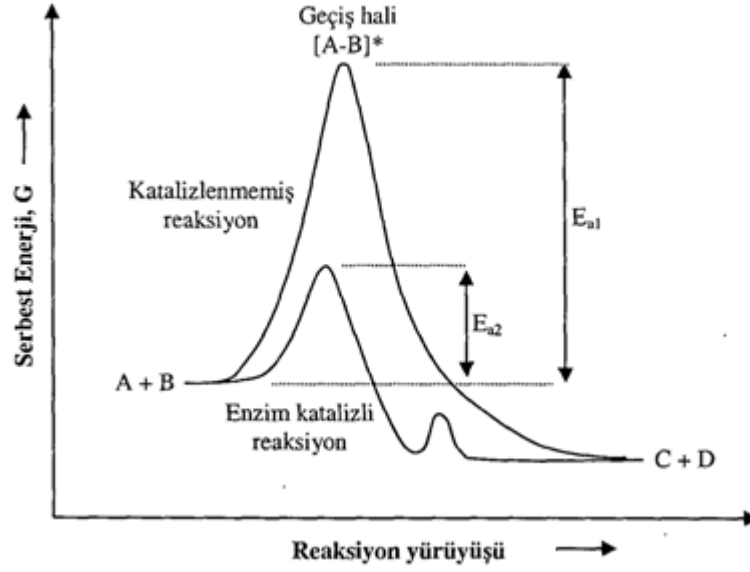
Enzim kinetiği enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarının incelendiği bir konudur. Kimyasal kinetiğin temel ilkeleri enzim kinetiğinde de geçerlidir. Ancak kimyasal kinetik kimyasal reaksiyonların hızlarının yanı sıra mekanizmalarını da inceler. Fakat enzim kinetiğinde daha çok biyokimyasal reaksiyonların hızları ve hıza etki eden faktörler kantitatif olarak ele alınacaktır.

4.3.1. Kataliz Olayı

$A \rightarrow \ddot{U}$ reaksiyonunu ele alalım. A moleküllerinden yüksek enerjili olanlar yani aktifleşmiş olanlar hemen gerekli bağ oluşumu veya parçalanması ile ürüne (Ü) dönüştürülür. Kısacası, reaksiyona giren maddelerin ürüne dönüşmesi için bir enerji engelini aşmaları gerekmektedir (Şekil 4.1.). Bu enerji engeline **aktifleşme enerjisi** (E_a) denir ve belli bir sıcaklıkta 1 mol reaktantın aktifleşmiş kompleks oluşturması için gerekli enerji miktarı olarak tanımlanır. Enzimler, kimyasal reaksiyonların normalden en az milyon defa daha hızlı gerçekleşmesini sağlar. Katalizlenmemiş bir reaksiyonun dengeye varması yavaş olmasına karşın, enzimler varlığında denge birkaç saniyede sağlanır.



A ve B moleküllerinin yukarıda tanımlandığı şekilde reaksiyon verip C ve D ürünlerini oluşturabilmesi için kimyasal bağı kırabilecek ya da yapabilecek kadar yeterli kinetik enerjiyle birbirlerine çarpışmaları gerekir. Dolayısıyla geçiş halinin oluşumunu sağlayacak kadar bir aktivasyon enerjisine (E_{a1}) sahip olmalıdır (Şekil 4.1). Geçiş hali $[A-B]^*$ yüksek enerjili bir ara üründür ve A ile B reaktantlarının ürünlere (C ve D) dönüşebilmeleri için bu enerjiye ihtiyaçları vardır ve geçiş hali oluşur oluşmaz ürün meydana gelmeye başlar. Eğer reaktant moleküllerin çoğu yeterli kinetik enerjiye sahip olmazsa, çok azı geçiş halinin enerjisine varacak ve dolayısıyla çok az ürün oluşacaktır. Ancak çevreden yeterli enerji sağlanırsa geçiş haline daha kolayca varılıp daha fazla ürün oluşması mümkündür.



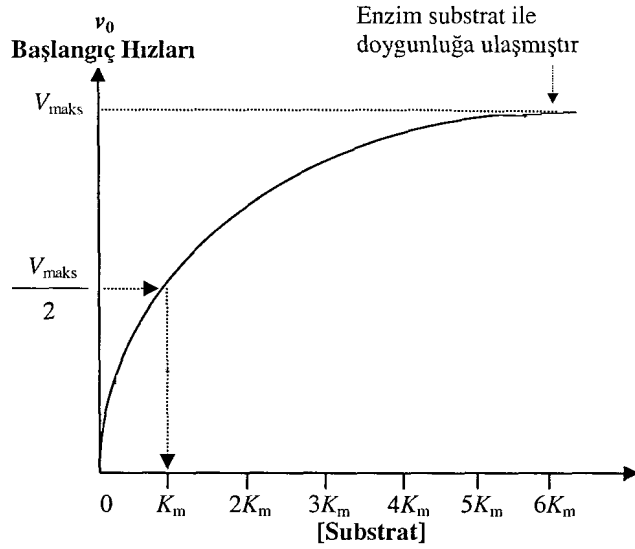
Şekil 4.1. Bir reaksiyonun katalizlenmiş ve katalizlenmemiş halleri için enerji diyagramı

Enzim katalizli bir reaksiyonda, A ve B reaktantları enzimin aktif bölgesine bağlanıp ve C ile D ürünlerini oluşturmak üzere etkileşeceklerdir. Ancak enzim varlığında geçiş halinin enerjisi enzimsiz olana göre daha düşüktür (Şekil 4.1). Bunun sebebi, enzimin aktif bölgesinde A ve B substratları daha düşük enerjili yeni bir ara ürün veya ara ürünler oluşturur. Böylece enzimler aktif bölgede substratlar ile etkileşmek üzere sakladıkları gruplar yardımıyla, aktivasyon enerjisini oldukça düşürerek reaksiyonun her hangi bir yönde daha hızlı ilerleyebilmesini sağlayabilir. Bununla birlikte, enzimler dengenin yönüne asla etki etmezler. Yani enzimler, enzimsiz reaksiyonlara göre daha düşük enerjili bir aktivasyon enerjisine sahip alternatif bir yolla substratları ürünlere yüksek hızlarda dönüştürme yeteneklerine sahiptir.

Reaksiyon hızı geçiş kompleksi konsantrasyonu ile orantılıdır. Sıcaklık artışı geçiş kompleksi konsantrasyonunu artıracağından reaksiyon hızlanacaktır. Katalizör dengeye çabuk ulaşılmasını, ürünün çabuk oluşmasını sağlar. Katalizörlerin reaksiyon hızları üzerindeki etkileri aktifleşme enerjisini azaltmak şeklindedir. Katalizörler reaktantlarla daha düşük enerjili bir geçiş kompleksi oluşturarak birim zamanda daha çok ürün oluşumunu sağlarlar.

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonların kinetiği:

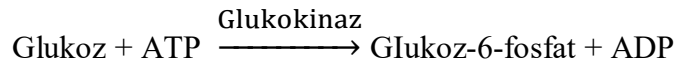
Kimyasal kinetiğin genel ilkelerinin enzimatik reaksiyonlara da uygulandığı belirtilmişti. Bununla birlikte enzimatik reaksiyonlarda bazı farklı özellikler vardır. Bunların en önemlisi enzimlerin substratlarına **doyma** olayıdır. Bir enzimatik reaksiyonun hızının substrat konsantrasyonu ile değişimini grafikte gösterebiliriz (Şekil 4.2).



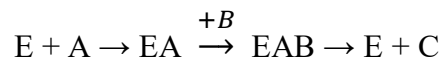
Şekil 4.2. Enzimatik olarak katalizlenen bir reaksiyonun hızına substrat konsantrasyonunun etkisi

Düşük substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artar, yani reaksiyon substrata göre birinci mertebededir. Substrat konsantrasyonu artırıldığı zaman, reaksiyon hızı artışında bir azalma gözlenir ve bu bölümde reaksiyon sıfıncı ve birinci mertebeler arasında karışık bir mertebede olur. Substrat konsantrasyonu daha da artırılırsa hız sabitleşir ve substrat konsantrasyonuyla değişmez. Bu bölümde reaksiyon sıfıncı mertebededir ve bütün enzim molekülleri substratla birleşmiş yani doymuş haldedir. Bütün enzimler substrata doyma özelliğini gösterirler. Ancak her enzimin substratına doyma konsantrasyonu farklıdır.

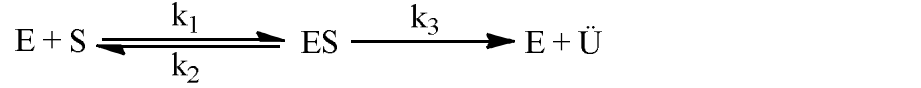
Enzimler genellikle kataliz olayı oluşmadan önce iki ya da daha fazla farklı substratı aktif bölgede bağlayarak etkileşmelerini sağlarlar. Mesela, heksokinaz (veya glikokinaz), glukozun fosforillenmesini sağlayan bir enzimdir ve bu işlemde glukozun yanında fosforillenmeyi sağlayacak adenozin trifosfat (ATP) gibi ikinci bir substrata gereksinim duyar.



İki veya daha fazla substrat aktif bölgeye bağlandığı durumlarda, aktif bölgeye bağlanma sırası oldukça önem arzeder. Bu bağlanmalar çeşitli şekillerde olabilir. Mesela, düzenli bağlanmada ikinci bir substrat bağlanmadan önce birinci substratın bağlanması gerekir. İkinci substratın bağlanmasını takiben ürün oluşur.



Enzimlerin kinetiğini daha iyi anlayabilmek için minimum gereksinim olan tek bir substratlı, tek bir ara ürünlü (ES) basit bir enzimatik reaksiyon dikkate alınabilir.



Bu eşitlikte enzim ve ürün arasında olabilecek reaksiyon ihtimali ihmal edilebilecek kadar az olsun. Bu eşitliğe göre, substrat konsantrasyonu enzimi ES haline dönüştürecek kadar fazla olduğunda, eşitliğin ikinci kısmı gerçekleşir ve bütün reaksiyon hızı substrat konsantrasyonundaki artmaya karşı duyarsız olur. Dolayısıyla reaksiyon hızı ya da ürünün oluşma hızı enzim-substrat kompleksinin konsantrasyonuna bağlı olur.

$$Hız = V = \frac{d[\ddot{U}]}{dt} = k_3 [ES] \quad (2)$$

[ES] nin toplam üretim hızı, bu kompleksin oluşumuna katkıda bulunan reaksiyon hızları ile bu kompleksin yok olmasını sağlayan reaksiyon hızları arasındaki fark olacaktır.

$$\frac{d[\ddot{U}]}{dt} = \underbrace{k_1[E][S]}_{\text{ES nin oluşum hızı}} - \underbrace{(k_2[ES] + k_3[ES])}_{\text{ES nin parçalanma hızı}}$$

Burada k_1 , k_2 ve k_3 ilgili reaksiyonların ne kadar hızlı ilerleyeceğini gösteren hız sabitleridir.

Michaelis-Menten (1913) ile Briggs-Haldane (1925), enzimlerin etki mekanizmalarını açıklayabilmek için yaptıkları çalışmalar sonucunda iki varsayımda bulunmuşlardır ve bir "Enzim Etki Mekanizması Teorisi" önermişlerdir. Bu teoriye göre enzim bir enzim-substrat (ES) kompleksi oluşturmak üzere substrat ile bağlanabilir ve daha sonra ES kompleksi serbest enzim ve ürüne ayrılır.

a) [ES] kompleksi kolayca serbest enzim ve üründen oluşturulamaz.

$$V = k_3 [ES] \quad (3)$$

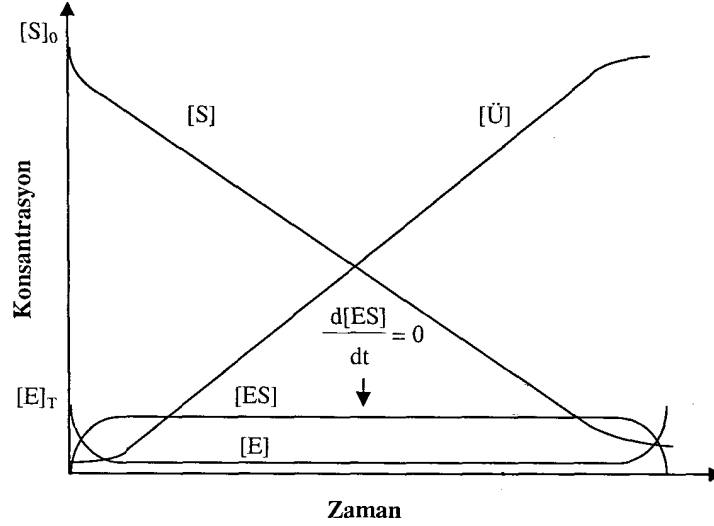
b) [ES] kompleksinin oluşum hızı (k_1), bu kompleksin parçalanma hızına (k_2 ve k_3) eşittir ve [ES], substrat tamamen tükeninceye kadar sabit kalır. Dolayısıyla ES nin oluşum hızı "sürekli bir hale" varmış olur (Şekil 4.3).

Sürekli hal durumunda, ES kompleksinin konsantrasyonu sabit kalacaktır ve dolayısıyla aşağıdaki (2) ve (3) eşitlikleri yardımıyla aşağıdaki eşitlik elde edilebilir.

$$d[ES]/dt = -d[ES]/dt = 0$$

$$k_1 [E][S] = k_2 [ES] + k_3 [ES] \quad (4)$$

Bütün bu reaksiyonlar için verilmiş olan kinetik eşitliklerin, deneysel olarak ölçülebilecek terimler halinde düzenlenmesi mümkündür.



Şekil 4.3. Michaelis-Menten enzim kinetiğine uyan tipik bir enzim için sürekli halin oluşması

Toplam enzim konsantrasyonu, serbest enzim ile ES kompleksinin konsantrasyonlarına eşittir.

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (5)$$

Dolayısıyla (4) ve (5) eşitlikleri birleştirilip yeniden düzenlenebilir.

$$\begin{aligned} k_1 ([E]_T - [ES]) [S] &= k_2 [ES] + k_3 [ES] \\ [ES] (k_2 + k_3 + k_1 [S]) &= k_1 [E]_T [S] \end{aligned} \quad (6)$$

Eşitliğin her iki yanını k_1 'e bölünüp bu ifade $[ES]$ 'na göre çözülebilir.

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{\left(\frac{k_2 + k_3}{k_1}\right) + [S]} \quad (7)$$

Bu ifadedeki hız sabitleri oranını K_M terimi ile ifade edilir ki bu Michaelis sabiti olarak bilinir.

Böylece eşitlik yazılırsa, aşağıdaki ifade elde edilir.

$$[ES] = \frac{[E]_T \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Bu eşitlik, (3) numaralı ifadede yerine yazılıp yeniden düzenlenirse reaksiyonun başlangıç hızı için bir ifade elde edilir.

$$\text{Hız} = V = \frac{k_3[E]_T [S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

Bir reaksiyonun maksimum hızı (V_{maks}) enzimin substrat ile doydugu yani tamamen ES halinde olduğu zaman yüksek substrat konsantrasyonlarında meydana gelir ki bu durumda K_M , substrat konsantrasyonuna göre ihmal edilebilecek bir değere sahip olduğundan (10) eşitliği elde edilir.

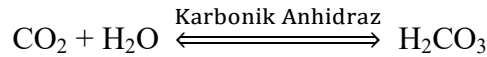
$$V_{\text{maks}} = k_3 [E]_T \quad (10)$$

Elde edilen (10) eşitliği (9) eşitliğine yerleştirilirse enzim kinetiği temel eşitliği elde edilir ki bu *Michaelis-Menten eşitliği* olarak bilinir (11 eşitliği).

$$V = \frac{V_{\text{maks}} [S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

Michaelis sabiti şeklinde tanımlanan K_m substratın enzime bağlanma gücünü veya ilgisini ifade edebilen bir sabittir. Diğer bir sabit olan k_3 ise ürünün katalitik üretiminin doğrudan bir ölçüsüdür ve herhangi bir enzim molekülünün bir substrat molekülünü ürüne dönüştürebilmesi için gereken zamanı ifade eder dolayısıyla birimi s^{-1} dir. Bu sebeple bazen *dönüşüm sayısı (turnover sayısı)* olarak da tanımlanan k_3 ne kadar büyük ise enzim yüzeyindeki katalitik olaylar o kadar çabuk oluşur.

Enzim aktivitesi yanında oldukça yaygın olarak kullanılan bir terim de dönüşüm sayısıdır. *Dönüşüm sayısı* (k_3), her bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısını gösteren bir terimdir ve bir enzimin ne kadar hızlı çalışabileceğini ya da substratı ne kadar çabuk ürüne dönüştürebileceğini gösterir. Meselâ, karbonik anhidraz enzimi karbonik asidi oluşturmak üzere saniyede yaklaşık 1.000.000 substrat molekülünün dönüşümünü sağlayabilmektedir.



- Düşük substrat konsantrasyonlarında; $K_M \gg [S]$ olduğundan K_M ' nin yanında $[S]$ ihmal edilir ve $V = \frac{V_{\text{maks}}}{K_M} [S]$ doğru denklemi elde edilir. Bu denklem $V \rightarrow [S]$ eğrisinin hızın substrat konsantrasyonuyla orantılı olduğu başlangıç kısmını göstermektedir.

- $[S] \gg K_M$ olduğuyüksek substrat konsantrasyonunda; K_M ihmal edilir ve $V = V_{\text{maks}}$ olur. Bu durumda bütün enzim substrat ile doymuş ve artan $[S]$ ile sabit bir maksimum hıza ulaşmıştır.

• $V = V_{maks}/2$ olduğu özel durumda; değerleri Michaelis–Menten eşitliğinde yerine koyarsak,

$$\frac{V_{maks}}{2} = \frac{V_{maks}[S]}{K_M + [S]}$$

eşitliğinden $[S] = K_M$ elde edilir. Bu bağıntıdan K_M sabitinin tanımını çıkarabiliriz. K_M ; maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonudur şeklinde tanımlanır ve birimi de mol/L'dir.

Michaelis–Menten eşitliği enzimatik reaksiyonların kantitatif incelenmesinde bütün enzimler için temel bir ifadedir. Fakat birçok enzim bu eşitliğin türetildiği ideal şartlara uymayabilir.

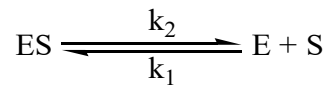
4.3.1.1. K_M ve V_{maks} Değerlerinin Önemi

Enzimlerin K_M değerleri birbirinden çok farklılık gösterir. Birçok enzim için bu değer 10^{-1} – 10^{-6} M arasındadır. K_M değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. K_M , substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddet ile değişebilir. Birden fazla substratı olan enzimlerin her substrat için ayrı bir K_M değeri vardır.

K_M değerinin iki anlamı vardır. Birincisi K_M , enzimin aktif bölgesinin yarısının doyduğu substrat konsantrasyonudur. İkincisi K_M değerinin, katalizleme mekanizması basamaklarının hız sabitleriyle ilişkisi olmasıdır.



denkleminde $k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$ eşit olduğu için; $K_M = (k_2 + k_3) / k_1$ eşitliğinden $k_2 \gg k_3$ olduğu zaman $K_M = k_2 / k_1$ olur.



ES kompleksinin, enzim ve substrata ayrışması denkleminde göre, ES kompleksinin ayrışma sabiti,

$$K_{ES} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

şeklinde ifade edilir. Böylece $K_M = K_{ES}$ olmaktadır. Yani $k_2 \gg k_3$ olduğu zaman K_M , ES kompleksinin ayrışma sabitine eşittir. Bu durumda K_M , ES kompleksinin bir sağlamlık ölçüsüdür. Sonuç olarak K_M enzimin substratına olan ilgisini ifade eder ve K_M enzimin

substratına olan ilgisiyle ters orantılıdır. Yüksek K_M zayıf bağlanmayı, düşük bir K_M kuvvetli bağlanmayı ifade eder.

Enzimlerin V_{maks} değerleri de birbirinden çok farklıdır. V_{maks} değerleri, substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle de değişir. V_{maks} , enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesi olup; enzim–substrat kompleksinin (ES), enzim ve ürünlere dönüşümünün ölçüsünü verir. Çünkü $V_{maks} = k_3[E]_T$ ile verilen maksimum hız, enzimin substratına doyması durumunda erişilir. Doygunluğun çok üstündeki substrat konsantrasyonlarında enzimatik reaksiyonun hızı, enzim miktarıyla doğru orantılıdır. Yani enzim miktarı iki katına çıkarıldığı zaman, hız da iki katına çıkar.

4.3.1.2. V_{maks} ve K_M Değerlerinin Grafikle Tayini:

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında en faydalı bilgiler Michaelis–Menten eşitliğinde yer alan, enzimin substratına ilgisiyi ifade eden K_M ve enzimin katalitik aktivitesini gösteren V_{maks} değerlerinden elde edilir. Bu iki değer deneysel olarak bulunur. Değişik substrat konsantrasyonlarında hızlar tayin edilir. Bulunan değerler Michaelis–Menten eşitliğindeki yerine konularak veya bu eşitliğe uygun $V \rightarrow [S]$ eğrisi çizilerek V_{maks} ve K_M değerleri belirlenir. Ancak bu deneylerden elde edilen hız (V) değerleri her zaman doğru olmayabilir. Dolayısıyla bu eğriden ekstrapolasyonla doğru V_{maks} ve K_M değerleri elde edilemez. Aynı zamanda her enzimin doymun olduğu substrat konsantrasyonu hazırlanamayabilir. Bu nedenle $V \rightarrow [S]$ grafiğinde eğrinin her noktası deneysel yoldan belirlenemez. Bunun sonucu olarak da V_{maks} ve K_M değerleri doğru olarak tayin edilemez.

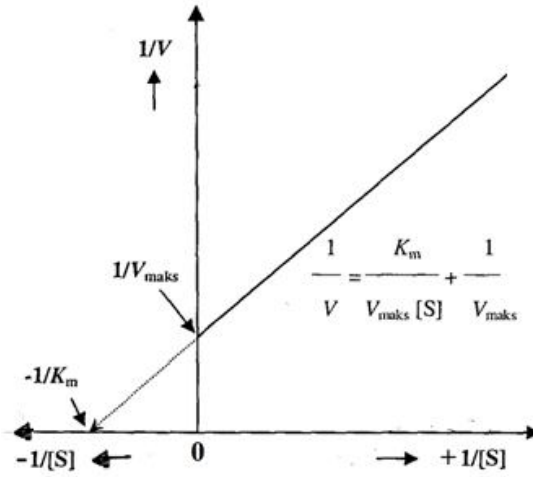
Michaelis–Menten eşitliğini bir doğru denklemine dönüştürmek gerekir. Bunu, eşitliğin her iki tarafını ters çevirerek gerçekleştirebiliriz.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{maks}[S]} \quad \text{eşitliğinden}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad \text{eşitliği elde edilir. Bu eşitlik } y = mx + n \text{ doğru denklemine}$$

benzemektedir.

$$\frac{1}{V} \rightarrow \frac{1}{[S]} \text{ grafiği çizilir. Bu çizime } \mathbf{Lineweaver} - \mathbf{Burk} \text{ grafiği adı verilir (Şekil 4.4).}$$

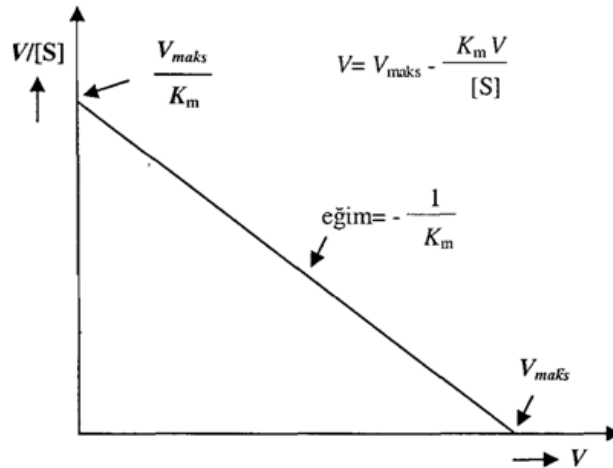


Şekil 4.4. Lineweaver-Burk grafiği.

Doğru yatay eksenini kesecek şekilde uzatıldığında kesme noktası $-1/K_M$ 'yi verir. Görüldüğü gibi bu grafikten faydalanarak V_{maks} ve K_M değerleri bulunabilir. Deneylerde ortaya çıkan yanlış sonuçlar da doğru üzerinde büyük sapmalar halinde kolayca fark edilir. Bu çizim şekli çok sık kullanılırsa da çok hassas değildir. Çünkü grafik üzerinde düşük substrat konsantrasyonları ve onlara karşılık gelen hız değerleri daha çok yer almaktadır. Genellikle düşük substrat konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlar daha az sağlıklıdır.

Eadie-Hofstee Eğrisi, Michaelis-Menten eşitliğinin farklı bir şekilde düzenlenmesi ile (Lineweaver-Burk denkleminin her iki tarafının $V_{maks} \cdot V$ ile çarpılması ve gerekli düzenlemelerin yapılmasıyla) elde edilir ve bir doğru verir (Şekil 4.5). Hız değerleri x-eksenine ve $V/[S]$ değerleri de y-eksenine yazılarak elde edilen doğrunun eğimi $-1/K_M$ değerini, böylece K_M , y-eksenini kestiği nokta V_{maks} / K_M ve x-eksenini kestiği nokta da V_{maks} değerini verir.

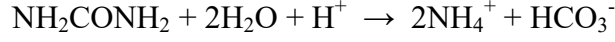
$$\frac{V}{S} = -\frac{V}{K_M} + \frac{V_{max}}{K_M} \quad (\text{Eadie-Hofstee denklemi})$$



Şekil 4.5. Eadie-Hofstee Eğrisi

4.3.1.3. Enzim Katalizinin Mekanizması

Enzimler kimyasal dengeye ulaşımı hızlandırır. Çünkü enzimlerin katalitik gücü çok yüksektir. Üreaz enzimi, ürenin aşağıdaki reaksiyona göre katalizini hidrolizler;



pH=8,0 ve 20°C'da bu reaksiyonun hız sabiti, enzimsiz $3 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ iken enzimatik olarak $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Böylece ürenin parçalanması reaksiyonunun üreaz enzimi ile 10^{14} kat hızlandığı görülmektedir. Enzimler reaksiyonları 10^8 – 10^{20} kat arasında hızlandırabilirler. Enzimlerin olağanüstü katalitik gücünün nedenlerini şu şekilde sıralayabiliriz:

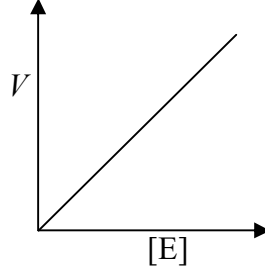
- Enzim, substrat molekülünü bağlayarak, parçalanacak bağın aktif merkeze çok yakın olmasını ve ara ürün oluşumunu sağlar.
- Bazı enzimler, substratla dayanıksız kovalent bağlı ara ürünler oluştururlar. Böylece reaksiyonu kolaylaştırırlar.
- Proton verici veya proton alıcı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla bir enzim genel bir asit veya baz reaksiyonunu hızlandırır.
- Enzim, substrat molekülündeki parçalanacak bağın gerilmesini ve deformasyonunu sağlayarak bağın parçalanmasını kolaylaştırır.

4.4. ENZİM AKTİVİTESİ VE MİKTARININ TAYİNİ

Bir çözelti veya doku ekstraktı içindeki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden bulunur. Enzimlerin miktarı çok küçük olduğundan doğrudan tayin etmek mümkün değildir. Bu iş için enzim hakkında şu bilgiler gerekmektedir.

- Katalizlenen reaksiyon denkleminin net eşitliği,
- Enzimin kofaktör veya metal iyonu ihtiyacının olup olmadığı,
- Substrat veya varsa kofaktör için K_M değerleri,
- Enzimin optimum pH'sı,
- Enzimin kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı,
- Substratın harcanma veya ürünün oluşum hızının tayin edilebildiği basit bir analitik yöntem.

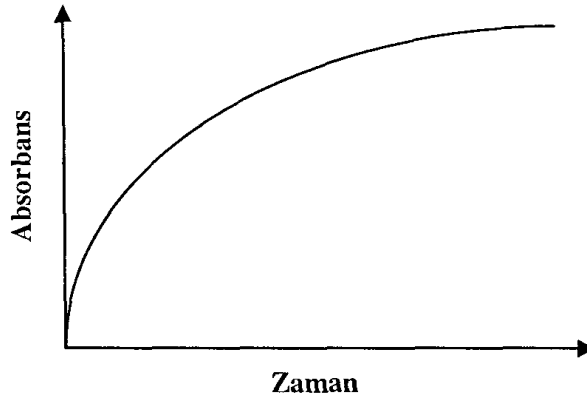
Enzim aktivitesi tayin edilirken, optimum pH, sıcaklık ve doyumluğun üzerindeki substrat konsantrasyonları seçilir. Böylece sıfırıncı mertebeden bir reaksiyon oluşur. Kofaktörlü enzimlerde metal iyonu ve koenzim konsantrasyonları da doyumluğun üzerinde alınır. Bu durumda enzimatik reaksiyonun hızı enzim miktarı ile doğru orantılı olur ve doğrudan çözeltideki enzimin miktarını verir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Enzimatik reaksiyonun hızına enzim miktarının etkisi

Ürünün oluşum hızının ölçülmesi genellikle substratın harcanma hızına göre daha hassas sonuçlar verir. Çünkü substrat konsantrasyonu oldukça yüksektir ve harcanan miktarda çok küçüktür. Reaksiyon ürünleri özel kimyasal veya spektroskopik metotlarla ölçülür. Ancak spektroskopik metotlar daha avantajlıdır. Çünkü enzimatik reaksiyon devam ederken ölçüm yapabilmek ve sonuçları grafik üzerine kaydetmek mümkündür.

Bir enzimin katalitik aktivitesi, substratın tükenme hızı veya ürünün oluşma hızının ölçülmesiyle tayin edilebilen bir özelliktir. Eğer oluşan ürün renkli ise ve spektrumun görünür bölgesindeki bir ışığı absorbe ediyorsa, ürünün oluşma hızını ölçmek daha uygun olur. Bu amaçla enzim ve substrat karıştırılıp, spektrofotometreye yerleştirilir ve karışımın absorbansındaki değişiklikler belirli bir dalga boyunda ölçülür. Reaksiyon sırasında daha fazla ürün oluştuğça, daha çok renk üretilecek ve karışımın absorbansı artar. Absorbanstaki artış belirli bir süre boyunca sabit kalır ancak substrat zamanla tükendiğinden reaksiyon ve dolayısıyla absorbanstaki artış yavaşlar (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Enzim aktivitesinin zamanla değişimi

Bir çözelti içindeki enzim aktivitesi, *enzim ünitesi (birimi)* cinsinden verilir. 25°C sıcaklıkta ve optimal şartlarda bir mikromol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne

dönüştüren, enzim miktarına 1 *enzim ünitesi* (1 EU; *Enzyme Unit* = 1U) olarak ifade edilmesi genelde kabul edilmiştir.

Ancak Uluslararası sistemde zaman saniye ve madde miktarı mol olduğundan enzim aktivite birimi *katal*dır. 1 *katal* enzim, belirli şartlar altında 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Ayrıca enzim deneylerinde özgül aktivite terimi de kullanılır, *özgül aktivite* ise miligram protein başına gözlenen enzim aktivitesidir. Bu terim daha çok izole edilen enzimin saflığını kontrol etmek için kullanılır.

4.4.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler

Enzim aktivitesine etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz.

1) Substrat konsantrasyonu, 2) Enzim miktarı, 3) pH, 4) Sıcaklık, 5) İyonik şiddet (NaCl, NH₄SO₄ gibi), 6) Var ise kofaktör konsantrasyonu (NADH, NADPH, FADH₂, FMN, TPP, Biyositin gibi), 7) İnhibitör ve Aktivatör konsantrasyonları

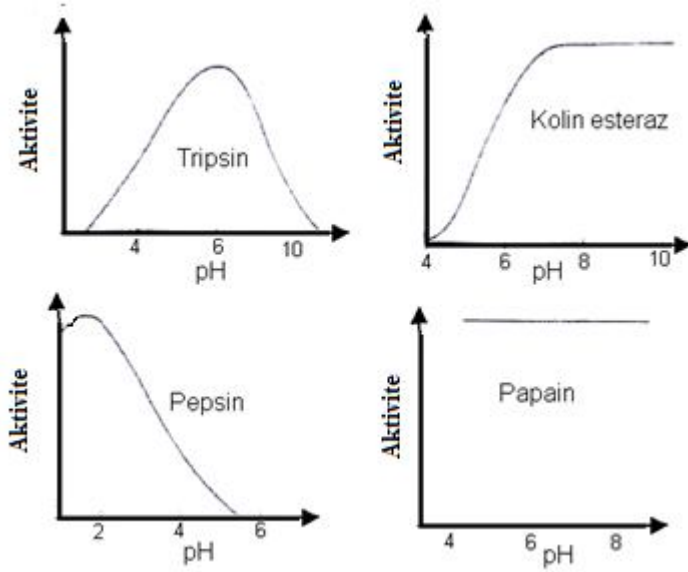
Bunlardan substrat konsantrasyonunun enzimatik reaksiyonun hızına olan etkisi Michaelis–Menten bağıntısında, enzim ve kofaktör miktarlarının etkileri ise bu eşitlikle ilgili bölümde açıklanmıştır. İnhibitörlerin enzimler üzerindeki etkisi öneminden dolayı ayrıntılı olarak verilecektir. pH ve sıcaklık etkilerini incelemeye önce protein yapısında olan enzimlerin üzerinde yüklü grupların bulunduğunu hatırlayalım. Ortamda mevcut olan iyonlar bu gruplarla etkileşerek enzimin katalitik gücüne etki edebilir. Bundan dolayı enzim aktivitesinin maksimum olduğu bir optimum iyonik şiddet söz konusudur. Şimdi sırayla enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörleri inceleyelim.

pH Etkisi: Her enzim için aktivitenin maksimum olduğu bir pH değeri vardır (Tablo4.3).

Tablo 4.3. Bazı enzimlerin optimum pH'sı

Enzim ve substrat	Optimum pH
<i>Pepsin</i>	
Yumurta albümini	1,5
Hemoglobin	2,2
<i>Pirüvat karboksilaz</i>	
Pirüvat	4,8
<i>Katalaz</i>	7,6
H ₂ O ₂	
<i>Tripsin</i>	7,7
Benzoilargininamid	7,0
Benzoilarginin etil ester	
<i>Alkalen fosfataz</i>	9,5
Gliserol– 3–fosfat	
<i>Arginaz</i>	9,7
Arginin	

Bu optimum pH değerlerinin üstünde ve altında enzim aktivitesi düşer. Bununla birlikte her enzimin pH–aktivite eğrisi farklıdır, yani enzimin kendine özgüdür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Bazı enzimlerin pH–aktivite eğrileri

Bir enzimin pH–aktivite ilişkisine etki eden faktörler şunlardır.

- 1) Substratı bağlamada görev alan ve enzimin aktif bölgesinde bulunan iyonlaşabilen grupların pK değerleri,
- 2) Enzime bağlanmada etkili olan substrat gruplarının pK'sı,
- 3) Enzim üzerindeki katalitik grupların pK'sı,
- 4) Enzimin biyolojik olarak aktif konformasyonunu belirleyen grupların pK'sı.

pH–enzim aktivitesi eğrileri her bir pH için substrata doyurulmuş enzim çözeltileri ile yapılan deneyler sonucu tayin edilir. Çünkü birçok enzimin K_M değeri pH ile değişir. Her enzimin kendine özgü pH–enzim aktivite ilişkisi vardır.

Elektriksel yönden yüksüz veya üzerindeki yüklerin kataliz olayında hiçbir rolünün olmadığı substratlara sahip enzimlerin, pH–aktivite ilişkisi papainde olduğu gibi basittir, yani aktivite pH' dan etkilenmez.

Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi pH ile aynı değildir. Enzimlerin kendilerine özgü bir optimum pH'sı şeklindeki pH–aktivite eğrilerinin bazen artan bazen de azalan bölümünde yer alır. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde pH–aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir. Bu özelliğe dayanarak enzimatik reaksiyonlar kontrol edilebilir. pH'nın karmaşık hücre içi kontrol ağında çok önemli bir yeri vardır.

Sıcaklık Etkisi: Bütün kimyasal reaksiyonların hızı sıcaklıkla artar. Enzimatik reaksiyonlarda bu genel kurala uyar. Ancak 50–60°C'nin üstündeki sıcaklıklarda enzim

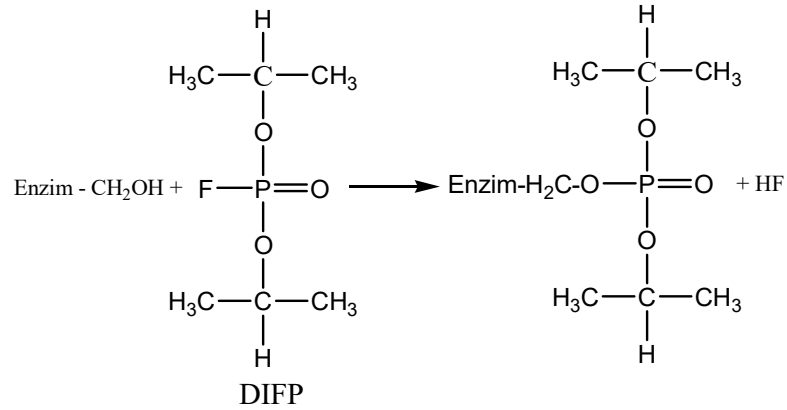
aktivitesi düşer. Çünkü yüksek sıcaklıkta enzimin aktif konformasyonu bozulur, enzim proteini denatüre olur. Sıcaklık bir *in vivo* aktivite düzenleme aracı değildir. Hücre içinde sıcaklık değiştirilerek enzimatik reaksiyon denetlenmez. Çünkü canlılar, sıcaklığın nispeten sabit olduğu izotermal sistemlerdir.

4.5. ENZİM İNHİBİSYONU

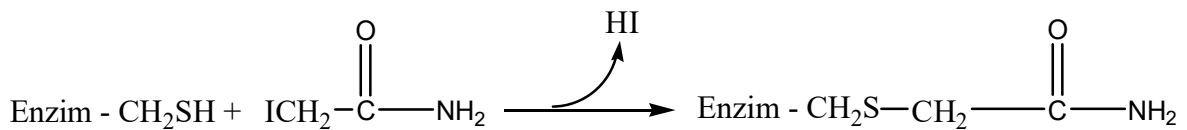
Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin, bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına *inhibisyon* adı verilir. Bu olaya neden olan bileşiklere *inhibitör* adı verilir. İnhibitörler genellikle küçük moleküllü bileşikler veya iyonlardır. Enzim aktivitesinin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde enzimatik reaksiyon hızının başlı başına bir kontrol mekanizmasıdır. Enzimler inhibe edilerek hücredeki olaylar kontrol edilebilir. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler bu yolla etkilerini gösterirler.

Enzimatik inhibisyon **1) Dönüşümsüz inhibisyon**, **2) Dönüşümlü inhibisyon** olmak üzere ikiye ayrılır.

1. Dönüşümsüz İnhibisyon: Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin, sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilfluorofosfat (DIFP), enzimin aktif bölgesinde yer alan serin aminoasidi ile reaksiyona girerek, inaktif DIFP–Enzim kompleksi oluşturur.

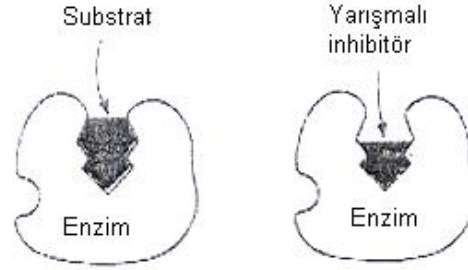


İyodoasetamid gibi alkilleyici bileşiklerde enzimleri dönüşümsüz olarak inhibe ederler. Etkilerini sistein ve diğer yan zincirler üzerinde gösterirler.



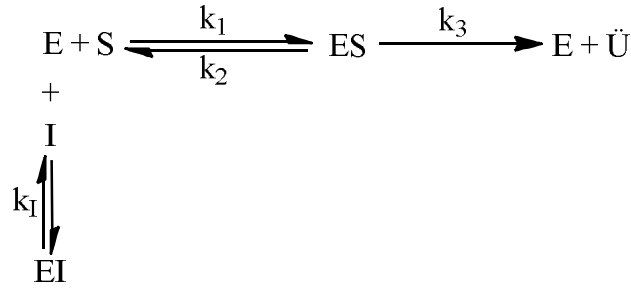
2. Dönüşümlü İnhibisyon: Dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi bir denge şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç farklı şekilde incelenir. **a) Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, b) Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon, c) Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon.**

a. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon: Dönüşümlü inhibisyonun en basit olanıdır. Yarışmalı inhibitör yapı bakımından substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır (Şekil 4.9).

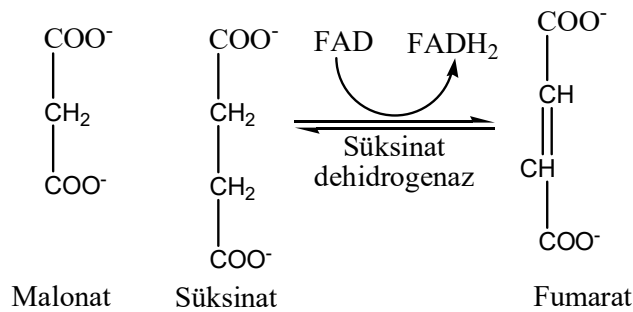


Şekil 4.9. Enzim-substrat kompleksi (Solda), yarışmalı bir inhibitörün substrat yerine bağlanması (Sağda).

Böylece inhibitör substratın enzime bağlanmasını engeller. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırabilir. Yani enzimin V_{maks} değeri değişmez çünkü hem enzim-substrat hem de enzim-inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğundan substrat konsantrasyonunun artırılması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır.



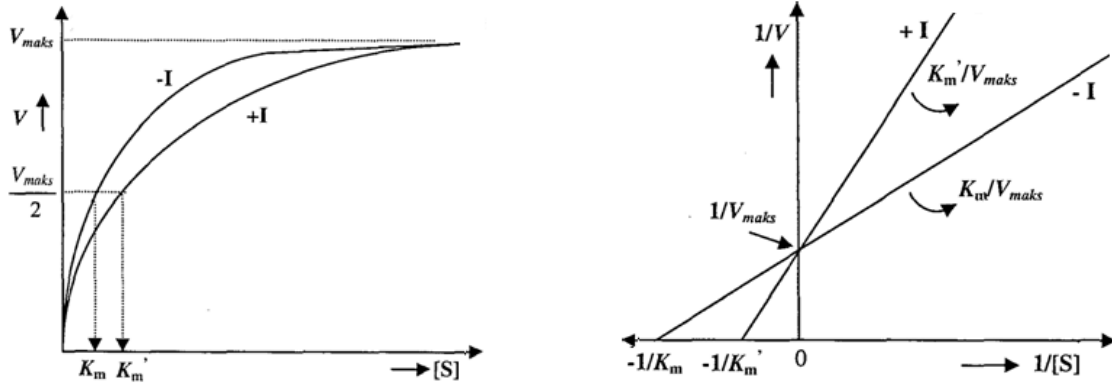
Yarışmalı inhibitör kataliz hızını, ES kompleksi oranını düşürerek azaltır yani enzimin K_m değeri artar. Bu tip inhibisyona; malonatın süksinat dehidrogenaz enzimi üzerindeki etkisi klasik bir örnek olarak verilmektedir.



Malonat yapı olarak süksinata benzediğinden enzimin aktif bölgesine bağlanır.

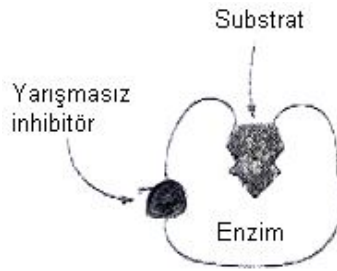
Farklı substrat ve inhibitör konsantrasyonlarında yapılan enzimli reaksiyon hızlarının ölçümlerinden, $V = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]}$ eşitliğine göre V - $[S]$ Michealis-Menten ve

$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$ eşitliğine göre $1/V$ - $1/[S]$ Lineweaver-Burk grafiği çizilir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafiği; V_{maks} aynı kalırken K_M artar.

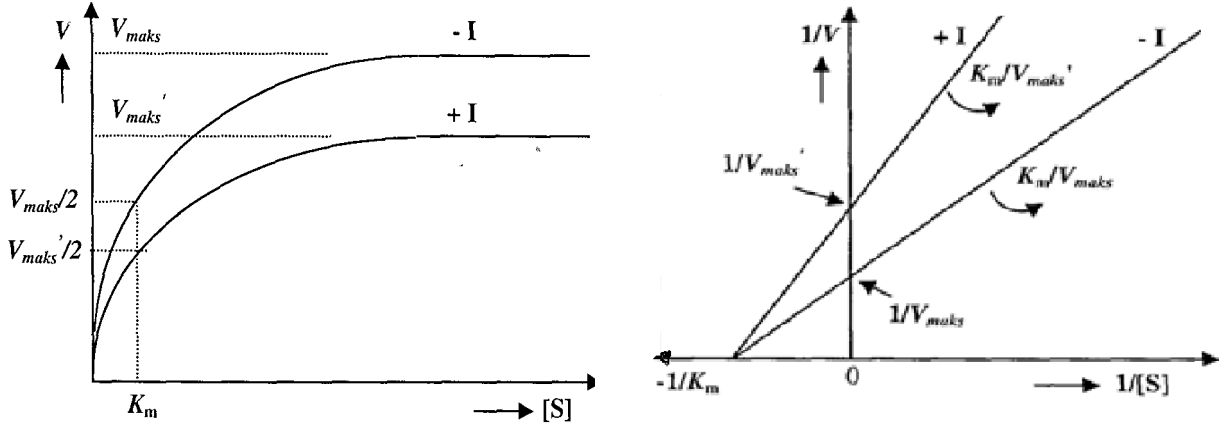
b. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon: İnhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum; bağlanmanın aynı bölgeye olmadığını, inhibitörün aktif bölge dışında bir yere bağlandığını gösterir (Şekil 4.11). İnhibitör aktif bölgeye bağlanmadığından, substrat ile inhibitör arasında bir yarışma söz konusu değildir.



Şekil 4.11. Yarışmasız bir inhibitörün substrattan farklı bir bölgeye bağlanması

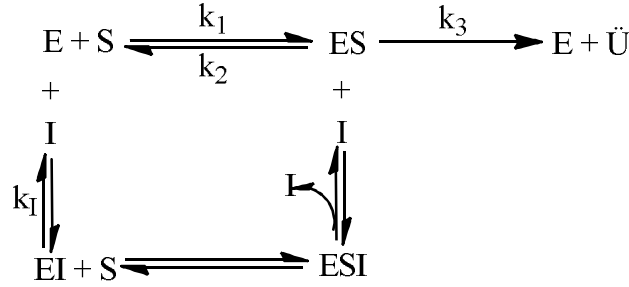
Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılamaz. $V = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]}$ eşitliğine göre V - $[S]$ ve $\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$ eşitliğine göre çizilen $1/V$ - $1/[S]$

grafiğinden enzimin V_{maks} değeri azalırken K_M 'nin sabit kaldığı görülür (Şekil 4.12).

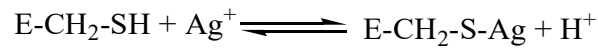


Şekil 4.12. Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Michealis-Menten ve Lineweaver–Burk eğrisi; V_{maks} azalırken K_M aynı kalır.

Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlandığı için iki çeşit inaktif kompleks oluşur (EI ve ESI).

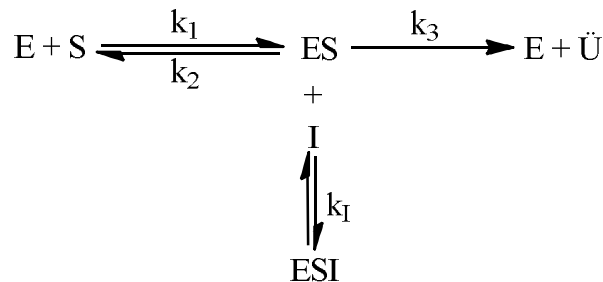


Yarışmasız inhibisyona örnek olarak enzimlerin aktiviteleri için gerekli olan sisteinlerin –SH gruplarına bazı ağır metal katyonlarına merkaptanları oluşturacak şekilde dönüşümlü olarak bağlanmalarını örnek olarak verebiliriz.



Burada –SH grubu aktif bölgede bulunabildiği gibi, enzimin üç boyutlu yapısının oluşumunda etkili olan, bir bölgede de yer alabilir.

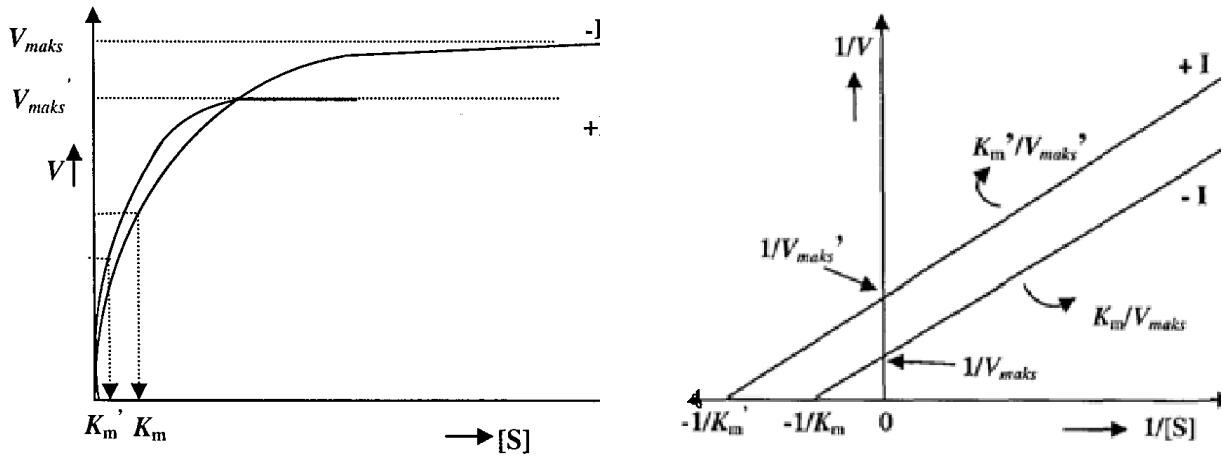
c. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyonda, inhibitör serbest enzime değil sadece enzim substrat kompleksine bağlanabilir.



Buna göre inhibitörlü reaksiyonun denge sabiti,

$$K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \text{ şeklinde ifade edilir.}$$

Bu bağıntı unkompetitif inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun artmasıyla inhibisyonun artabileceğini göstermektedir (Şekil 4.13). Buna göre inhibitör varlığından ortamdaki sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_M azalır. Aynı zamanda ortamda ESI kompleksi sürekli var olduğundan V_{maks} ' da düşer. Yarı yarışmalı inhibisyon bir substratlı reaksiyonlarda nadiren görülür ancak birden fazla substratlı reaksiyonlar da yaygındır.

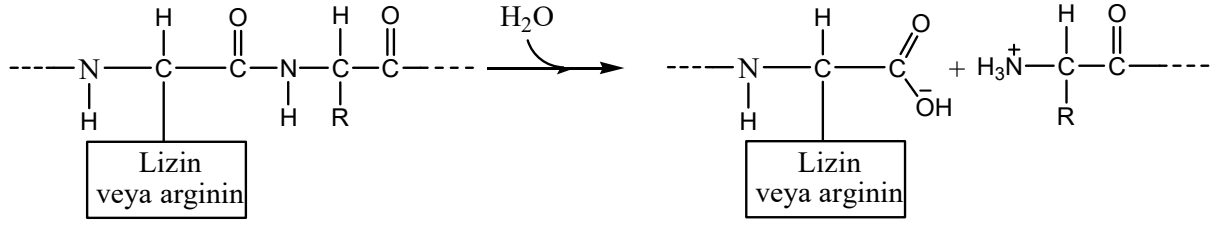


Şekil 4.13. Unkompetitif bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatic bir reaksiyon hızının Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrisi; V_{maks} ve K_M aynı oranda azalır. $[I]$ artsa bile doğruların eğimi aynıdır.

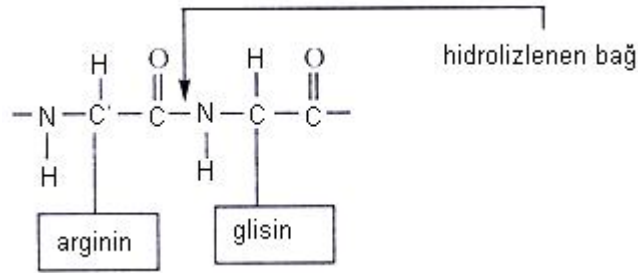
Birden fazla polipeptid zincirinden meydana gelen allosterik enzimlerde, **allosterik inhibisyon** adı verilen bir başka çeşit inhibisyon olayı gözlenir. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör, enzimin aktif merkezinden başka bir yere bağlanır ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzim aktivitesini etkiler.

4.6. ENZİMLERİN SPESİFİKLİĞİ (ÖZGÜLLÜĞÜ)

Enzimler hem katalizledikleri reaksiyona hem de ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktirler. Enzimler genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizlerler. Örneğin; midede ve ince bağırsakta, proteinlerin peptid bağlarını seçimli olarak hidrolizleyen proteolitik enzimleri ele alalım. Proteolitik enzimler, sindirim sisteminde proteinleri hidroliz eden enzimlerdir. Proteolitik bir enzim olan tripsin; lizin veya arginin kalıntılarının karboksil ucundaki peptid bağlarının hidrolizini katalizler.



Bazı enzimlerin spesifikliği daha yüksektir. Örneğin; kanın pıhtılaşmasında görev yapan trombinin substrat spesifikliği tripsine göre daha yüksektir. Bu enzimin parçaladığı peptid bağının karboksil bileşeni arginine, amino bileşeni de glisine ait olmalıdır.



Birçok enzim stereospesifik özellik taşır. Mesela laktat dehidrojenaz yalnız L–laktat, glutamat dehidrojenaz yalnız L–glutamat, D–aminoasit oksidaz enzimi de D–aminoasitleri üzerinde etkilidir.

4.7. ENZİMLERİN AKTİF BÖLGELERİ

Bir enzimin aktif bölgesi, substratları (varsa kofaktörleri) bağlayan ve bağ yapımı ile yıkımında görev yapan aminoasit kalıntılarını içerir. Bunlara *katalitik grup* adı da verilir. Enzimlerin yapı, spesifiklik ve kataliz özellikleri farklı farklı olmasına rağmen, aktif bölgelerinin ortak özelliklerini şöyle sıralayabiliriz.

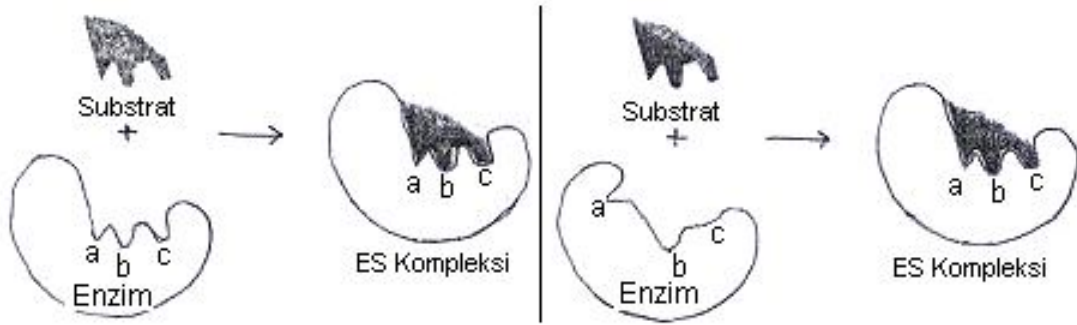
1) Aktif bölge enzimin toplam hacmine oranla küçük bir hacim işgal eder. Enzim proteinindeki aminoasitlerinin birçoğu substrata temas etmez.

2) Aktif bölge bir nokta, çizgi hatta yüzey değildir. Üç boyutlu bir yapıdır. Birbirinden çok uzakta bulunan aminoasitler bir takım katlanma ve bükülmelerle birbirine yakın konuma gelir ve katalitik grupta görev alabilir.

3) Substratlar enzime nispeten zayıf bağlarla bağlanır. Çünkü enzim–substrat kompleksinin ürüne dönüşmesi gerekir. Bağ enerjileri –3 kcal/mol ile –12 kcal/mol arasındadır. Halbuki bir kovalent bağın kuvveti –50 kcal/mol ile –110 kcal/mol arasındadır. Buradan da görüldüğu gibi kovalent bağın yaklaşık onda biri kadar güce sahip bir bağlanma olur.

4) Aktif bölgeler bir yarı ve girinti (çukur) içinde yer alırlar. Substrat molekülleri suyun giremediği girinti bölgelere bağlanır. Bu girinti içinde bağlama ve kataliz için gerekli polar gruplar da vardır. Yapısı incelenen bütün enzimlerde substrat, suyun giremediği girintilere bağlanmıştır.

5) Spesifik bir bağlanma, atomların aktif bölgede belirli tarzda düzenlenmeleri sonucu mümkün olur. Substrat aktif bölgeye tam oturacak şekilde olmalıdır. Spesifik bağlanma ancak bu şekilde gerçekleşir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Substrat-enzim etkileşimleri: Anahtar-kilit modeli; enzim aktif bölgesi substrata kendiliğinden komplementerdir (Solda), Etkileşme sonucu uygunluk modeli; enzim substratın bağlanmasıyla şekil değiştirir ve substrata komplementer hale gelir (Sağda).

Enzim ile substrat arasındaki bu **anahtar-kilit modeli** kataliz olayının stereospesifikliğini çok iyi açıklamaktadır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar bazı enzimlerin aktif bölgelerinin rijid bir yapıda olmadığı gösterilmiştir. Bu tip enzimlerde, aktif bölgenin şekli substratın bağlanmasıyla değişikliğe uğramakta ve substrata uygun hale gelmektedir. Bu çeşit bağlanma modeline **etkileşme sonucu uygunluk modeli** adı verilir.

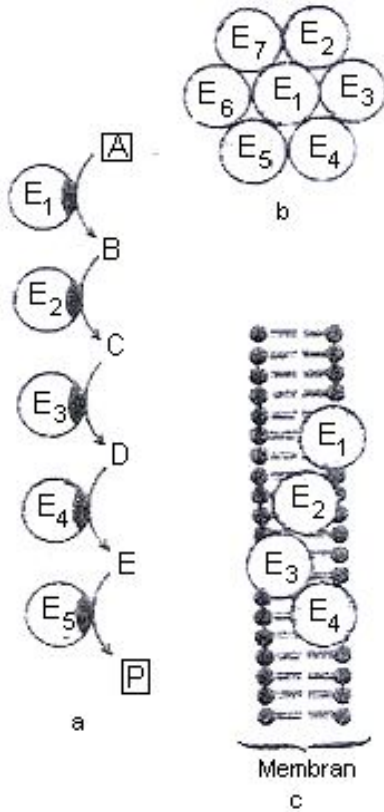
4.8. MULTİENZİMLER

Sağlam bir hücrede enzimler bir arada çalışırlar ve seri halde birçok reaksiyonu katalizlerler. Birinci enzimin katalizlediği reaksiyonun ürünü, sonraki basamağın substratı olur. Dolayısıyla substrat bir seri enzimli reaksiyon sonucu ürüne dönüştürülür. İşte bu tip enzimlerin oluşturdukları enzim topluluklarına **multienzim sistemi** adı verilir. Multienzim sistemlerinde üç tip moleküler organizasyon bulunur.

1) En basit tipte multienzim sistemlerinde enzimler sitoplazma gibi bir sıvı içerisinde çözülmüş ve birbirlerinden ayrı olarak bulunurlar. Küçük substrat molekülleri bir enzimden diğerine hızla difüzyonla giderler ve ürün oluşur. Örnek olarak glikoliz yolu enzimleri verilebilir. Glikoliz yolunda, glukoz 10 basamak enzimli reaksiyonu sonucu 2 mol piruvata dönüşür (Şekil 4.15.a).

2) İkinci tip multienzim sistemlerinde; enzimler son derece organize olmuş ve birbiriyle fiziksel olarak birleşmiş enzim kompleksleri halinde fonksiyonlarını beraberce yerine getirirler (Şekil 4.15.b). Kompleksten ayrılan enzimler aktivitelerini kaybederler. Substrat, kompleksten hiç ayrılmadan birçok basamak enzimatik reaksiyondan sonra ürüne dönüşür. Böyle bir multienzim sistemi biyolojik yönden çok avantajlıdır. Bu tip multienzim organizasyonuna örnek olarak, maya hücrelerinde yağ asitlerinin sentezini katalizleyen yağ asidi sentetaz enzim kompleksini verebiliriz. Bu enzim kompleksi birbirine sıkıca bağlanmış yedi çeşit enzim molekülünden oluşur.

3) Üçüncü tip multienzim sistemlerinde enzimler, membranlar veya ribozomlar gibi yapılar üzerinde dizilmiş haldedir (Şekil 4.15.c). Örnek olarak, solunum zinciri ve protein sentezi enzimleri verilebilir. Solunum zincirinde enzimler mitokondri iç membranında sıralanırken protein sentezinde ribozomlar üzerinde yapışmış durumdadır. Multienzim sistemlerinin kinetiği, tek bir enzimin kinetiğinden çok daha karmaşıktır.



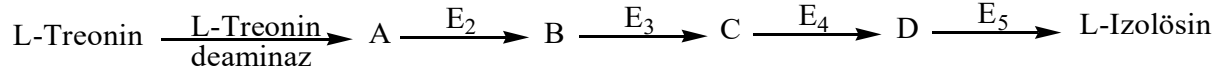
Şekil 4.15. Multienzim sistemleri: **a)** Çözünmüş ve birbirinden ayrı enzimleri olan sistemde, substrat ve ara bileşikler difüzyonla enzimleri bulur; **b)** Enzim komplekslerinde substrat enzimlerden ayrılmadan ürüne dönüşür; **c)** Membrana bağlı bir enzim sistemi.

4.9. ENZİMATİK REAKSİYONLARIN KONTROLÜ VE DÜZENLENMESİ

Multienzim sistemleri belirli bir metabolik yolun reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Hücrelerde bir metabolik yolun ürünlerine her zaman aynı seviyede ihtiyaç duyulmaz. Metabolik yolların hızı hücre ihtiyacına göre ayarlanamazsa hastalık hali ortaya

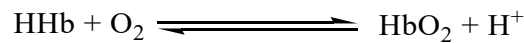
çıkır. Bu düzenleme de enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Bunun için, enzimatik reaksiyonların kontrol ve düzenlenmesi metabolizmanın düzenlenmesi anlamına gelmektedir.

Birçok multienzim sistemi, metabolik yolların hızını kendi kendilerine düzenleme yeteneğine sahiptirler. Bu metabolik yolların çoğunda seri reaksiyonların son ürünü, belirli bir konsantrasyona eriştiğinde metabolik yolun ilk basamağında görev yapan enzimi inhibe eder. Örnek verecek olursak; amino asit metabolizmasında, L-Treonin amino asidinden beş basamaklı bir enzimatik reaksiyonla L-İzolösin oluşur.



L-İzolösin belli bir konsantrasyona ulaşıncaya metabolik yolun ilk basamağını katalizleyen enzimi inhibe eder. Bu tür son ürünün inhibisyonuna, **feed-back (geri beslemeli) inhibisyon** adı verilir. Metabolik yolun hızını belirleyen enzim bu yolun düzenleyici enzimidir. Düzenleyici enzimler multienzim sistemlerinin çoğunda reaksiyon serisinin ilk enzimidir. Metabolik yolun ürünleri birden fazla ise, dallanma noktalarını oluşturan enzimlerle de kontrol sağlanabilir. Düzenleyici enzimlerin ortak özellikleri şunlardır:

1) Düzenleyici enzimlerin çoğu allosteriktir. **Allosteriklik**; genel anlamda bir proteinin biyolojik aktivitesinin, bazı moleküllerin o proteine bağlanmasıyla üç boyutlu yapısında değişiklik oluşturulması sonucu değişebilmesidir. Mesela kanda oksijen taşıyan hemoglobinin oksijene olan afinitesi, proteine CO₂, H⁺ ve 2,3 – bisfosfogliserat (2,3–BPG) bağlanmasıyla değişmektedir.

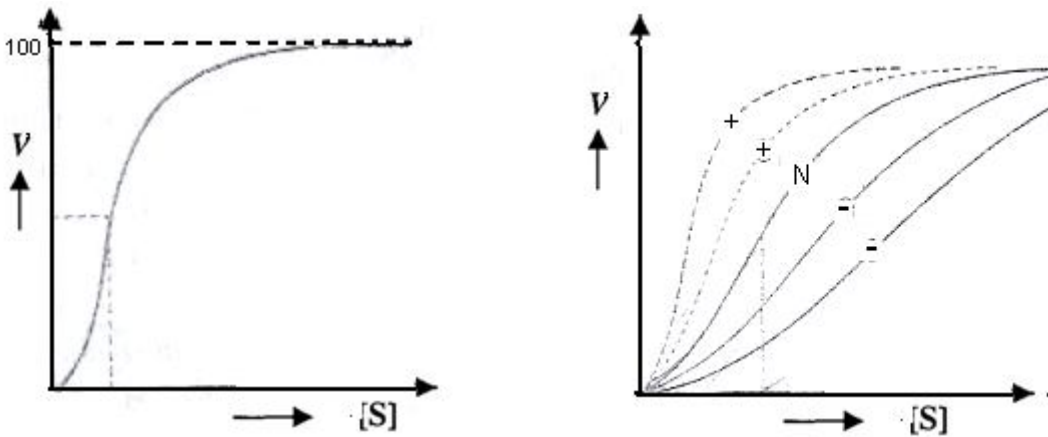


Hemoglobinin oksijen bağlama dengesi pH ile değişmektedir. Bu etkiye **Bohr etkisi** denilmektedir. Allosterik enzimlere bağlanarak allosterik enzimlerin aktivitelerini etkileyen moleküllere **modülatör** adı verilir. Modülatörler substratın bağlandığı aktif bölgeye değil de farklı bir yere yapışır. Eğer modülatörün etkisi; enzim aktivitesini artırıcı yani pozitif yönde ise **aktivatör**; aktiviteyi azaltıcı yönde ise **inhibitör** adını alır.

Feed-back inhibisyonu bir çeşit allosterik inhibisyonudur. L-Treonin deaminaz allosterik bir enzimdir. Allosterik enzimler birden fazla modülatör bileşik tarafından etkilenebilir. Allosterik enzimlerin kinetik özellikleri Michaelis–Menten eşitliği ve eğrisinden sapmalar gösterir.

- **Allosterik Enzimlerin Kinetiği:** Homotropik allosterik enzimlerde substrat, aynı zamanda konsantrasyonuna göre katalitik aktiviteyi artırıcı rol de oynar. Heterotropik enzimlerde ise enzim, substrattan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. L-Treonin deaminazın son ürün L-İzolösin tarafından inhibisyonu buna bir örnektir.

Allosterik enzimlerde v -[S] eğrilerinin şekilleri, homotropik veya heterotropik olmalarına bağlıdır (Şekil 4.16). Bilindiği gibi Michaelis-Menten ifadesinin v -[S] eğrisi hiperboliktir. Homotropik düzenleyici enzimlerin v -[S] eğrileri ise sigmoid yapıdadır. Eğrinin sigmoid hali; ilk bağlanan substratın, ikincisinin bağlanmasını kolaylaştırdığını ve bu şekilde aktiviteyi artırdığını gösterir.



Şekil 4.16. Homotropik allosterik enzimler için v -[S] eğrileri; Sigmoid eğri, bir substratın bağlanması ikincisini kolaylaştırır (Solda); Heterotropik allosterik enzimler için v -[S] eğrileri; Pozitif veya negatif modülatör, enzimin substrata afinitesini (K_M) değiştirir ve V_{maks} aynı kalır (Sağda). Modülatörler aktivasyon ve inhibisyon etkilerini K_M veya V_{maks} 'u değiştirerek gösterirler.

2) Düzenleyici enzimlerin en önemli ortak özelliklerinden birisi de katalizledikleri reaksiyonların hücre içi şartlarında dönüşümsüz olmasıdır. Düzenleyici enzimin katalizlediği reaksiyon gerçekleşikten sonra, metabolik yol tamamlanmış demektir. Çünkü daha ileri bir denetleme noktası yoktur.

3) Düzenleyici enzimler diğer enzimlere göre daha büyük ve daha kompleks olup saflaştırılması daha zordur. Genellikle hepsi birden fazla alt birim içerirler yani oligomerdirlir. Düzenleyici enzimler birden fazla polipeptid zinciri ile birlikte enzim fonksiyonunu yerine getirirler.

4) Bir metabolik yolda düzenleyici olmayan enzimler genelde uzun ömürlüdürler ve hücre içi konsantrasyonları nispeten sabittir. Dolayısıyla metabolik yolun kontrolünde etkili değildirler. Düzenleyici enzimlerin ise hücre içi ömürleri çok kısadır ve sentezleri DNA seviyesinde düzenlenir. Hormonlar veya hücre içi şartların oluşturduğu sinyaller bu

enzimlerin sentezini baskılayabilir veya uyarabilir. Bütün metabolik yolların kontrolünün düzenleyici enzimler aracılığıyla gerçekleştirildiği anlaşılmaktadır. Düzenleyici enzimlerin hücre içi konsantrasyonlarındaki inişler ve çıkışlarla bazen de allosterik etkileşmelerle, aktivitelevlerinin değışmesi sonucu metabolik yolun hızı düzenlenmektedir.

4.10. ENZİM AKTİVİTESİNİN BAŞKA KONTROL MEKANİZMALARI

Enzimatik reaksiyonlar başka düzenleyici mekanizmalar tarafından da etkilenirler. Bunların başlıcalarını zimojen aktifleşmesi, kovalent modifikasyon ve hormonlar olarak sayabiliriz.

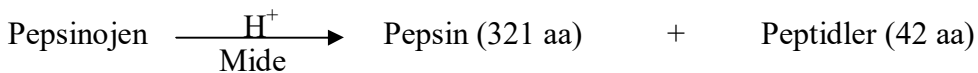
Zimojen Aktifleşmesi: Zimojen aktifleşmesi ile düzenlenme şekli ekstraselüler (hücre dışında; yani midede, ince bağırsak vb.) ortamda olmaktadır. Biyolojik sistemlerde bazı proteinler, inaktif öncül bileşikler şeklinde sentezlenir ve daha sonra görev yapacakları yerde bir veya birkaç peptid bağının hidroliziyle aktif hale geçerler. Enzimin inaktif ön bileşik haline **zimojen** veya **proenzim** adı verilir. Zimojenlerin, proteolitik enzimlerle aktifleştirilmesi olayına **zimojen aktifleşmesi** adı verilir. Proteinlerin (zimojenlerin) spesifik proteolitik enzimlerle aktifleşmesine biyolojik sistemlerde sık rastlanır. Mide ve pankreasın birçok proteolitik enzimi (proteazlar) bu yolla düzenlenir (Tablo 4.4). Bazı örnekler şunlardır.

1) Besinlerle aldığımız proteinleri hidrolizleyen sindirim enzimleri mide ve pankreasta zimojenler halinde sentezlenirler.

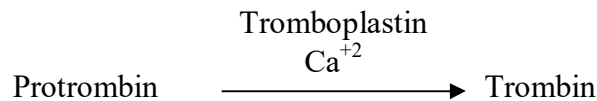
Tablo 4.4. Mide ve pankreas zimojenleri

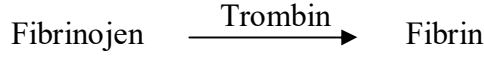
Sentez Yeri	Zimojen	Aktif Enzim
Mide	Pepsinojen	Pepsin
Pankreas	Tripsinojen	Tripsin
Pankreas	Kimotripsinojen	Kimotripsin
Pankreas	Prokarboksipeptidaz	Karboksipeptidaz

Pepsinojenin midenin asidik ortamında hidrolizi sonucu aktif pepsin enzimi oluşur.



2) Kan pıhtılaşması ondan fazla proteinin görev aldığı bir olaydır. Pıhtılaşma faktörü proteinlerin birçoğu inaktif halden aktif hale zimojen aktifleşmesi ile geçmektedir. Mesela protrobin trombine dönüşerek aktivite kazanmaktadır.



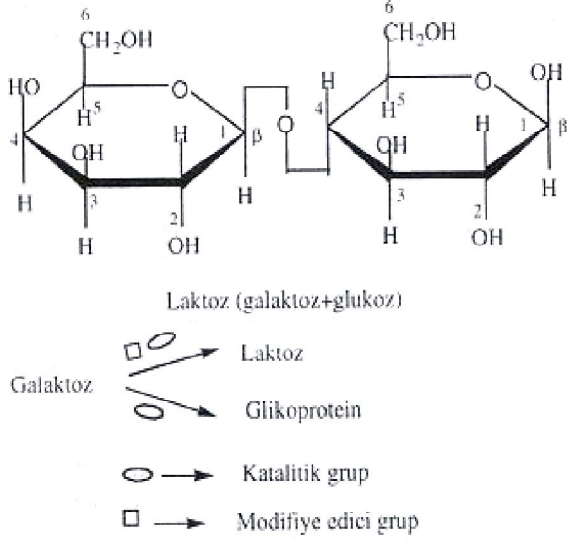


Böylece fibrinojen, bir takım peptid bağlarının hidrolizi sonucu fibrine dönüşmekte ve pıhtılaşma olmaktadır.

3) Bazı protein yapısındaki hormonlar da aktif olmayan ön bileşikler halinde sentezlenmektedir. Mesela insülin, bir peptid bağının proteolitik yolla uzaklaştırıldığı proinsülininden yapılmaktadır.

Kovalent Modifikasyon: Biyolojik sistemlerde enzimatik aktiviteyi kontrol eden bir diğer mekanizma da küçük bir grubun enzime kovalent olarak bağlanması, yani enzimin kovalent modifikasyonudur. Glikojenin sentez ve yıkımında görev yapan iki enzimin aktivitesi, bir fosforil grubunun bu enzim proteinlerinin bir serin kalıntısına bağlanmasıyla düzenlenir. Her iki enzimde fosforillenir ve bu durumda enzimlerden biri aktifleşirken diğeri inaktif hale geçer. Bu modifikasyon fosforil grubunun hidrolizlenmesiyle tersine çevrilebilir. Bu grupların enzimlere kovalent bağlanması başka enzimler tarafından katalizlenir.

Hormonlar: Bazı enzimlerin spesifikliği fizyolojik kontrol altındadır. Örneğin; süt bezlerinde süt şekeri laktozun sentezini katalizleyen laktoz sentetaz enziminin yapısında, bir katalitik grup, bir de modifiye edici grup bulunur (Şekil 4.17). Katalitik grup tek başına laktoz sentezleyemez. Katalitik grubun görevi kovalent bağlanmış karbohidrat zinciri içeren bir proteine galaktozun bağlanmasını katalizlemektir. Modifiye edici grup ise, katalitik bölgenin özelliklerini değiştirerek enzimi, galaktoza glukoz bağlayarak laktoz sentezleyecek şekle dönüştürür. Modifiye edici grubun seviyesi hormonal kontrol altındadır. Gebelik esnasında süt bezlerinde katalitik grup sentezlenirken, az miktarda modifiye edici grup sentezlenir. Doğumla birlikte hormonal seviyelerde çok büyük değişimler olur ve çok miktarda modifiye edici grup sentezlenir. Bu da katalitik grupla birleşerek büyük miktarda laktoz sentezleyen aktif laktoz sentetaz kompleksini meydana getirir.



Şekil 4.17. Bir glukoz ve bir galaktoz biriminden ibaret olan laktoz, bir katalitik bir de modifiye edici grup ihtiva eden laktoz sentetaz enzimi tarafından sentezlenir. Yalnız katalitik grup olduğu zaman enzim başka bir reaksiyonu katalizler.

İZOENZİMLER (İZOZİMLER)

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ve farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim adı verilir. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı; substrat, kofaktör ve inhibitörlere afiniteleri değişik olabilir.

İzoenzimleri en çok incelenen enzim, laktat dehidrogenaz (LDH)' dir. Elektroforetik çalışmalar bu enzimin beş tane izoenzimi olduğunu göstermiştir. Her biri dört polipeptid birimi ihtiva eder. İki çeşit polipeptid birimi vardır: Birisi H ile gösterilen ve kalp LDH' ında rastlanan birim, diğeri ise M sembolüne sahip iskelet kası LDH' ında görülen birimdir. H ve M polipeptid zincirlerinin amino asit bileşimleri ve amino asit dizilişleri birbirinden oldukça farklıdır. Genetik araştırmalar bu alt birimlerin iki farklı gen vasıtasıyla şifrelendiğini göstermiştir. İki birimden 5 çeşit 4 alt birimli izoenzim oluşabilir: HHHH, HHHM, HHMM, HMMM, MMMM. Hayvanların farklı dokularında bu enzimlerin beşine de rastlanmıştır. Her iki zincirin biyosentezi ve bu izoenzimlerin belirli bir hücredeki bağlı miktarları genetik kontrol altındadır. LDH izoenzimleri kalp ve karaciğer hastalıklarının teşhisinde önemlidir. Kan serumunda LDH izoenzim miktarı klinik teşhiste kullanılır. Örnek olarak HHHH ve HHHM izoenzimleri karaciğer hastalıklarında artar.

İzoenzimlere bir diğer örnek karbonik anhidraz (CA) verilebilir. CA' nın birçok canlı türünde CO₂' nin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen çok sayıda izoenzimi mevcuttur. Bugüne kadar memeli hayvanlar için; eritrositlerde (CA-I ve CA-II), iskelet kasında (CA-III), insan böbreğinde (CA-IV), belirli dokuların mitokondrilerinde (CA-V), tükürük bezlerinde (CA-VI) ve sitozolde (CA-VII)

karbonik anhidraz izoenzimleri belirlenmiştir. Genelde tek polipeptid yapıya sahip olan bu izoenzimlerin yanında bitkilerde oligomerik yapıda CA izoenzimlerine rastlanmıştır.

Bugün, birçok enzimin izoenzimleri bilinmektedir. Bunların çoğu farklı polipeptid zincirlerinin değişik kombinasyonundan ibarettir. Birçok allosterik enzimlerin de, allosterik modölatörlerine karşı farklı duyarlılıkta iki veya daha fazla izoenzimleri bulunmuştur.

5. BÖLÜM: KARBOHİDRATLAR

Karbohidratlar, canlı organizmaların besin maddelerinin en önemlisi olan kimyasal bileşiklerdir. **Karbohidrat** terimi karbon, hidrojen ve oksijen içeren bir grup bileşiği belirtmektedir. Oksijen ve hidrojen oranı sudaki gibidir. Karbohidrat sözcüğünde buradan gelmektedir. Yapı ve işlev bakımından önemli görevleri vardır. Şekerler veya sakkaritler olarak da bilinen bu bileşikler $C_m(H_2O)_n$ genel formülü ile gösterilen karbonun hidratlaşmış şekli ve bunların türevleridir. Fakat aynı oranlamaya sahip olan ancak karbon hidrat olmayan maddelerde vardır. Örneğin asetik asit ve formaldehit gibi.

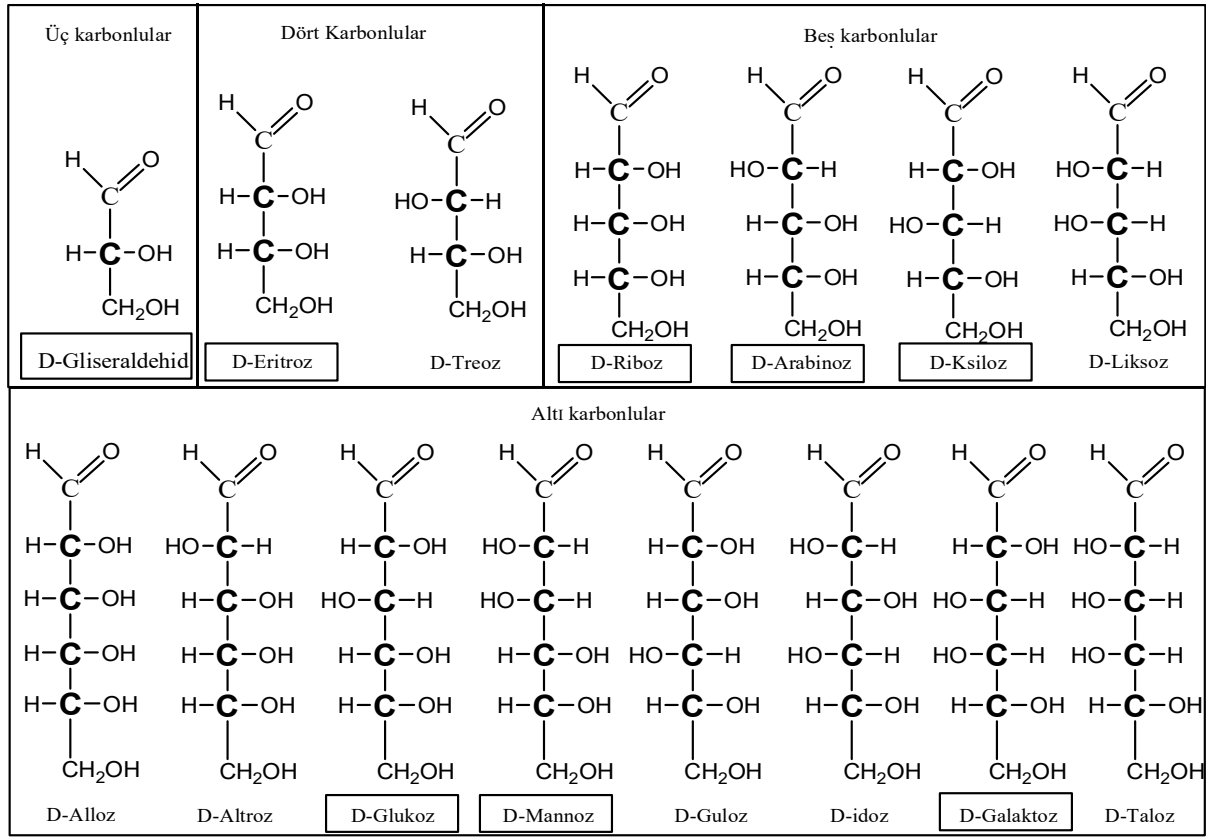
Polihidroksialdehit ve polihidroksiketon yapısındaki moleküllerin en küçük birimlerine **monosakkarit** denir. Tabiatta en bol bulunan monosakkarit, bir şeker olan D-glukozdur. Diğer bütün şeker molekülleri D-glukozdan türemişlerdir ve canlı organizmadaki polisakkaritler D-glukoz polimerleridir.

İki ile on monosakkarit biriminin glikozid bağları ile oluşturdukları bileşiklere **oligosakkaritler** adı verilir. **Polisakkaritler**, monosakkaritlerin oluşturduğu lineer ve dallanmış uzun zincirli karbohidratlardır. Biyosferde en bol bulunan organik bileşikler karbohidratlardır. Birer polisakkarit olan nişasta ve selüloz bitkilerin depo polisakkaritleri ve yapı taşlarıdır. Polisakkaritler aynı zamanda bakteri ve bitki hücre duvarlarının önemli bileşenleridir. Karbohidratlar başlıca dört bölümde incelenirler: **1) Monosakkaritler, 2) Disakkaritler, 3) Polisakkaritler ve 4) Karbohidrat türevleri.**

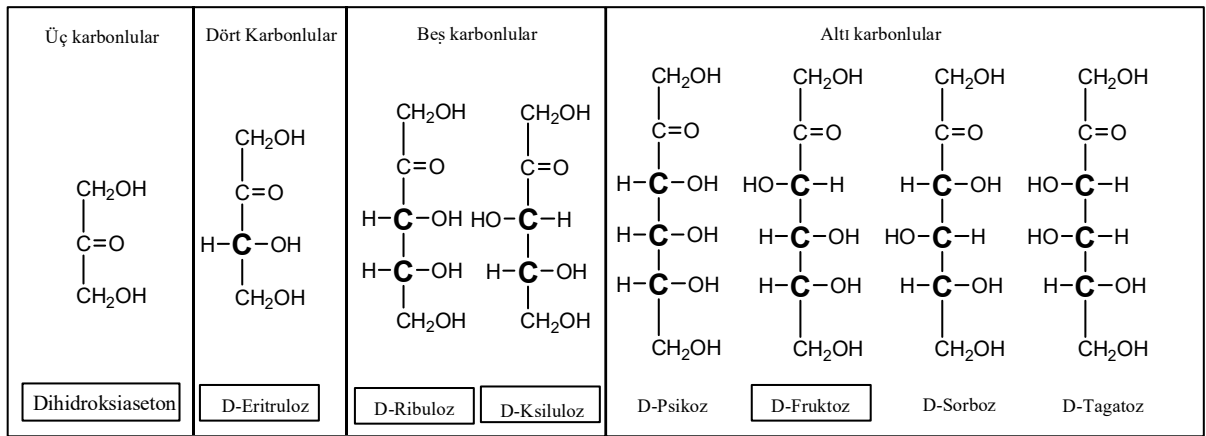
5.1. MONOSAKKARİTLER

Monosakkaritler, kendisinden daha küçük yapılara ayrılmayan polihidroksi aldehit ve keton yapısında olan karbohidratlardır. $(CH_2O)_n$ genel formülü ile gösterilirler ve $n = 3$ veya daha büyük olur. Eğer karbonil grubu, zincirin başında ve sonunda ise monosakkarit **aldoz**; başka bir yerinde ise **ketoz** adını alır (Şekil 5.1). Karbon zincirinin uzunluğuna göre triozlar, tetrozlar, pentozlar, heksozlar, ...vb. şekilde isimlendirilirler.

En basit monosakkaritler, bir **aldotrioz** olan gliseraldehid ve bir **ketotrioz** olan dihidroksiasetonur. Her iki sınıf monosakkaritler içinde tabiatta en bol bulunan monosakkaritler heksozlardır.



a)D-Aldozlar

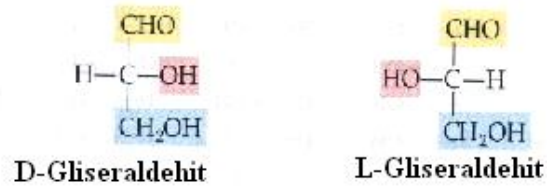
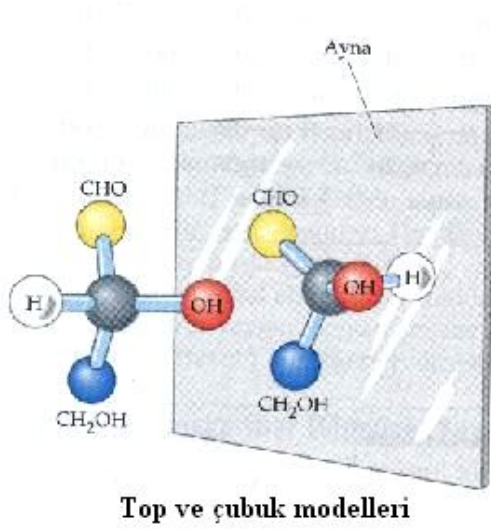


b)D-Ketozlar

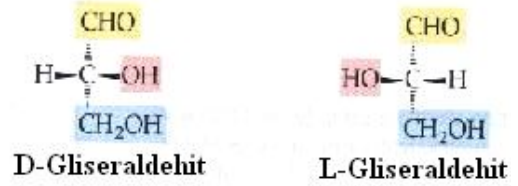
Şekil 5.1. Üç ile altı karbon atomuna sahip **a) D–Aldozlar** ve **b) D–Ketozlar** projeksiyon formülü olarak gösterilmiştir. Koyu renkli karbon atomları kiral merkezlerdir. Tüm bu D–izomerlerinde, karbonil karbonundan en uzak kiral karbonu D–gliseraldehitteki kiral karbonuyla aynı konfigürasyona sahiptir. Kutu içinde isimleri olan şekerler doğada en yaygın olanlarıdır.

5.1.1.Monosakkaritlerde Stereoizomerlik

Dihidroksi ζ eton dışında bütün monosakkaritler bir veya daha fazla asimetric karbon içerirler. En basit aldoz olan gliseraldehid bir asimetric karbon atomu içerir ve iki izomeri bulunmaktadır (Şekil 5.2.).



Fischer projeksiyon formülleri



Perspektif formülleri

Şekil 5.2. Gliseraldehidin iki izomerinin üç türlü gösterilmesi. Stereoizomerler birbirlerinin ayna görüntüleridir. Top ve çubuk modeli moleküllerin gerçek konfigürasyonunu gösterir. Gelenek olarak, Fischer formülünde yatay bağlar kağıt düzleminin dışından okuyucuya doğru, dikey bağlar kağıt düzleminin gerisinden okuyucudan uzağa gösterilir. Perspektif formüllerde katı kama biçimli bağların ucunun okuyucuya doğru, parçalı kama biçimli bağların ucunun dışarıya doğru olduğunu hatırlayınız.

Gliseraldehidin iki farklı izomerinden geçen polarize ışık, eşit büyüklükte fakat ters yönlere; **dekstrorotatory (+)** sağa, D-(+) Gliseraldehit $[\alpha]_D^{20} = +13.5^\circ$; **levorotatory (-)** sola, L-(-) Gliseraldehit $[\alpha]_D^{20} = -13.5^\circ$ çevirirler.

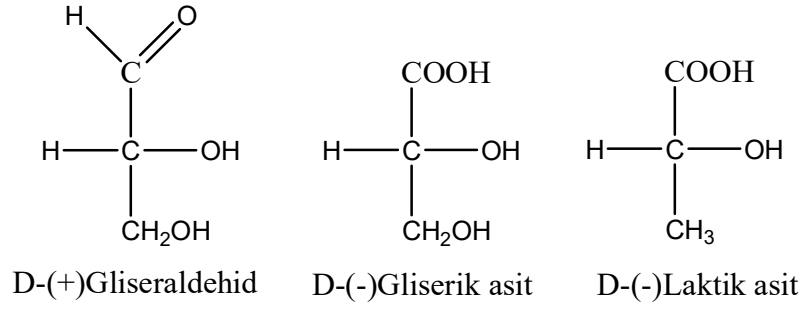
Optikçe aktiflik kantitatif olarak spesifik çevrilme α_D^T derecesi olarak ifade edilir.

$$[\alpha]_D^T = \frac{\text{Gözlenen çevirme} \times 100}{\text{Optik yol (dm)} \times \text{Konsantrasyon} \left(\frac{g}{100mL}\right)}$$

Bu eşitlikte T = 20 °C, D = 589.3 nm (sodyumun D-çizgisi) dir.

Şekerler, aminoasitler ve diğer optikçe aktif bileşiklerin atomlarının uzaydaki konfigürasyonları, gliseraldehid izomerlerine göre isimlendirilmektedir. Asimetrik karbon atomunun konfigürasyonu D- ve L- harfleriyle temsil edilir.

Işığı sağa çeviren gliseraldehide benzeyenler **D-izomeri**, ışığı sola çeviren gliseraldehide benzeyenler **L-izomeri** olarak gösterilir. Burada D- ve L- mutlak uzaysal konfigürasyonu gösterir; optik çevirmenin yönünü belirtmez. Çünkü D- serisinde olup da polarize ışığı sola çeviren bileşikler de vardır.

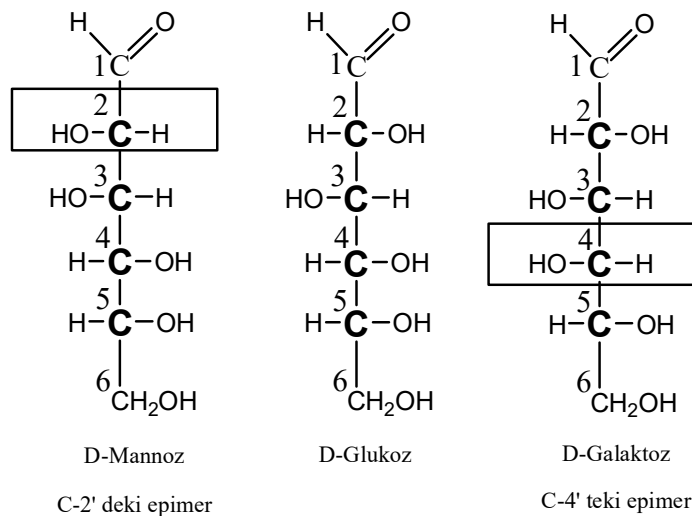


Monosakkaritlerde birden fazla asimetric karbon atomu bulunuyorsa, optik izomerlerin sayısı 2^n 'dir ve n asimetric karbon atomu sayısidir. Örneğın aldoheksozların (D-glukoz vb.) 4 tane asimetric karbonu olduğundan $2^4 = 16$ tane stereoizomeri vardır. Bunların yarısı D- yarısı da L- izomerlerdir.

Asimetric karbon atomu birden fazla olan monosakkaritlerde, fonksiyonel karbonil ($\overset{\text{H}}{\text{>C=O}}$) ve keton (>C=O) gruplarından en uzaktaki asimetric karbon atomu D-gliseraldehide benziyorsa, D-izomeri; L-gliseraldehide benziyorsa, L-izomeri olarak gösterilir.

Aldozların biyolojik yönden en önemlileri, D-gliseraldehid, D-riboz, D-glukoz, D-mannoz ve D-galaktozdur. Ketozların tabiatta en bol bulunanları ise dihidroksiaseton, D-ribuloz ve D-fruktozdur. L-izomeri şekerlere biyolojik sistemlerde nadiren rastlanır. En önemlileri L-ramnoz, L-fukoz ve L-sorbozdur.

Yalnız bir karbon atomu üzerinde konfigürasyonda farklılık gösteren iki monosakkarite **epimer** adı verilir. D-glukoz ile D-mannoz ve D-glukoz ile D-galaktoz epimer şekerlerdir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Epimerler. D-glukoz ve onun iki epimeri projeksiyon formülü olarak gösterilmiştir. Her bir epimer bir kiral merkezin konfigürasyonu bakımından (kutu içinde) D-glukozdan farklıdır.

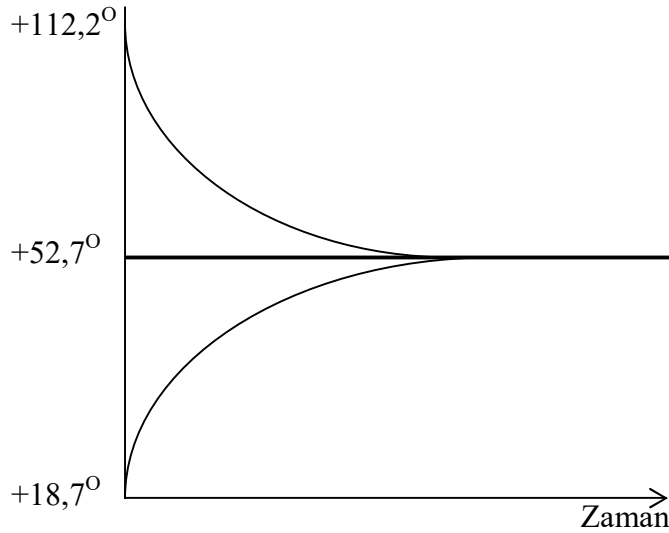
5.1.2. Monosakkaritlerin Anomerik Şekilleri

Monosakkaritlerin birçoğu sulu çözeltilerinde açık zincir yapılarındaki asimetric karbon sayısından bir fazla asimetric karbon atomuna sahipmiş gibi davranırlar. Örneğin; D-glukoz iki izomere sahiptir. Bu izomerler α -D-glukoz ($[\alpha]_D^{20} = +112.2^\circ$) ve β -D-glukoz ($[\alpha]_D^{20} = +18.7^\circ$) dur.

D-glukozun bu iki izomeri suda çözündükleri zaman her birinin optik çevrilmesi zamanla değişir ve son bir denge değerine ($[\alpha]_D^{20} = +52.7^\circ$) ulaşır. Bu değişmeye **mutarotasyon** denir. Bu karışımın yaklaşık üçte biri α -D-glukoz, üçte ikisi β -D-glukoz ve çok küçük miktar da doğrusal ve beş üyeli halka (glukofuranoz) formlarından ibarettir.

Sulu çözeltide α -D-glukoz ve β -D-glukoz'un mutarotasyonu, polarize ışığı çevirme açısının zamana göre değişmesiyle kendini gösterir (Şekil 5.4).

α -D-Glukoz	—————→	DENGE	←————	β -D-glukoz
+112,2°		+52,7°		+18,7°
% 36		% 1 (açık zincir)		% 63



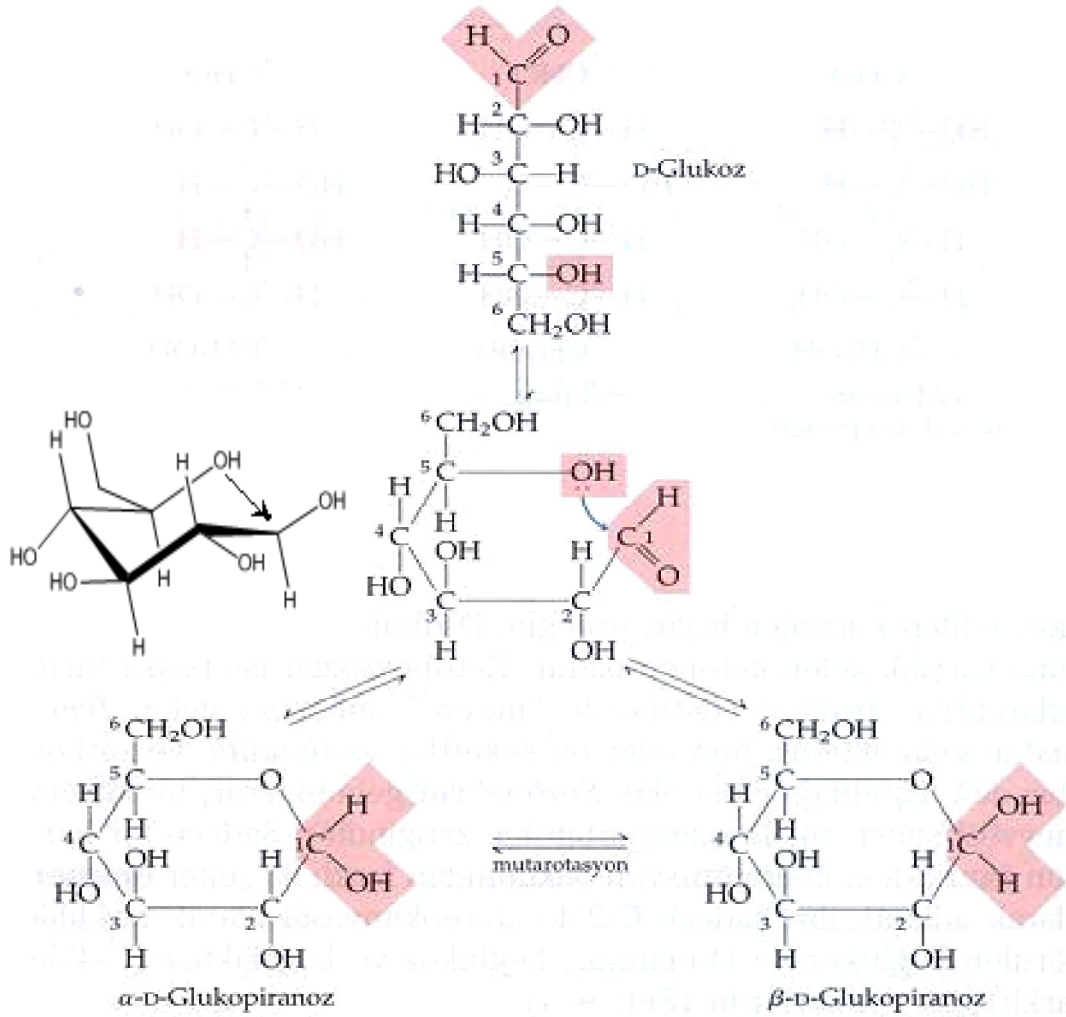
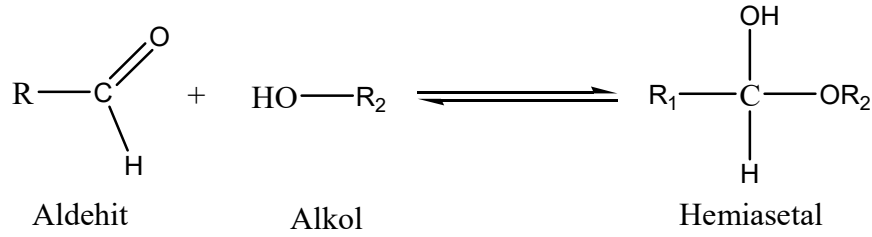
Şekil 5.4. α - ve β -D-glukozun çevirme açısının zamana göre değişimi.

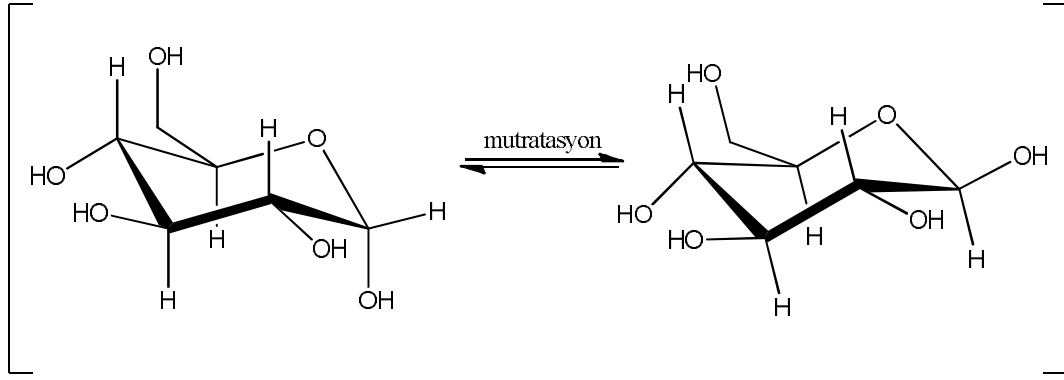
α - ve β -D-glukozun farklı özellikleri vardır (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. α - ve β -D-glukozun özellikleri.

Özellik	α -D-glukoz	β -D-glukoz
Spesifik çevirme $[\alpha]_D^{20}$	+112,2°	+18,7°
Erime noktası (°C)	146	150
Suda çözünürlük (g /100mL)	82,5	178

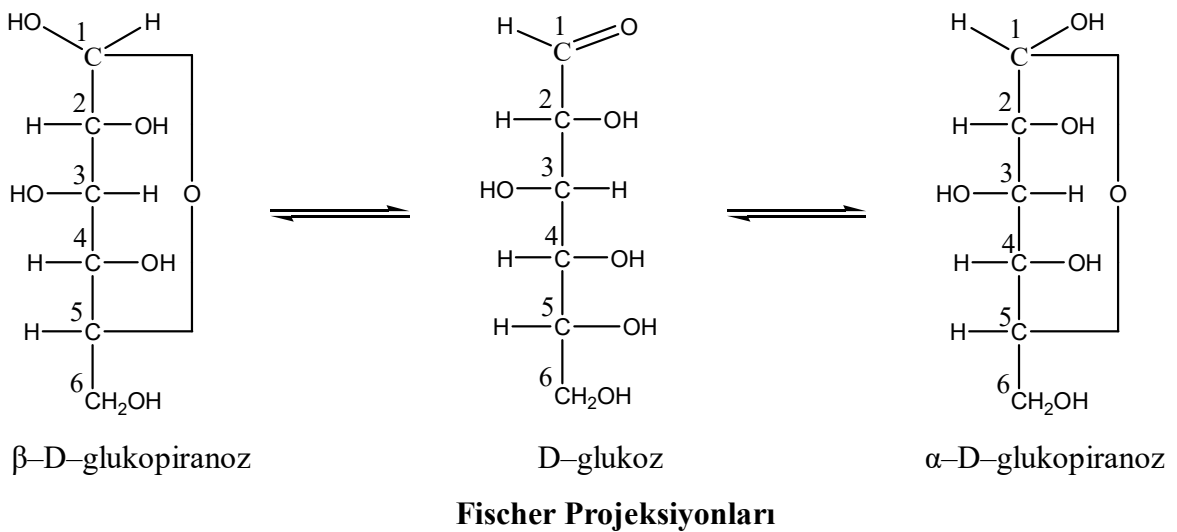
D-glukozun α -D- ve β -D-izomerleri açık zincir yapısında değildir. D-glukozun 5 nolu karbon atomu üzerindeki hidroksil grubu (-OH) ile 1 nolu karbon atomu üzerindeki aldehit grubu (>C=O) arasındaki reaksiyon sonucu **hemiasetal** oluşur (Şekil 5.5).

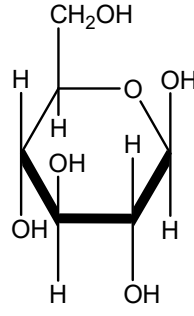




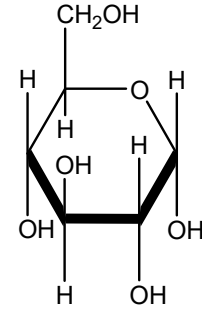
Şekil 5.5. D-glukozun iki anomerik formunun oluşumu. C-1' deki aldehit grubu ve C-5' deki hidroksil grubu arasındaki reaksiyon hemiasetal bir bağlanma oluşturur (sandalye konformasyonu), böylece α - ve β - anomerleri oluşur, bunlar sadece hemiasetal karbonu etrafında stereokimyasal farklılığa sahiptir. α - ve β - anomerleri arasındaki değişime mutarotasyon denir.

Görüldüğü gibi hemiasetal reaksiyonu sonucu 1 nolu karbon atomu asimetric hale gelmiştir. Bundan dolayı D-glukozun; α -D-glukoz ve β -D-glukoz olmak üzere iki izomeri meydana gelmiştir. Hemiasetal reaksiyonu ile halkalaşma sonucu asimetric olan 1 nolu karbon atomuna **anomerik karbon atomu** adı verilir (Şekil 5.5.). Hemiasetal karbonu yani anomerik karbon üzerindeki konfigürasyondan ortaya çıkan izomerik şekillere **anomer** denir. α -D-glukoz ve β -D-glukoz anomerdir. Sadece beş ve altı karbon atomu içeren monosakkaritler kararlı halka oluştururlar. Bunun sonucu olarak altı üyeli **piran halkası** meydana gelir. Onun için aldohexozlar **piranoz** adını alır (Şekil 5.6).





β -D-glukopiranoz



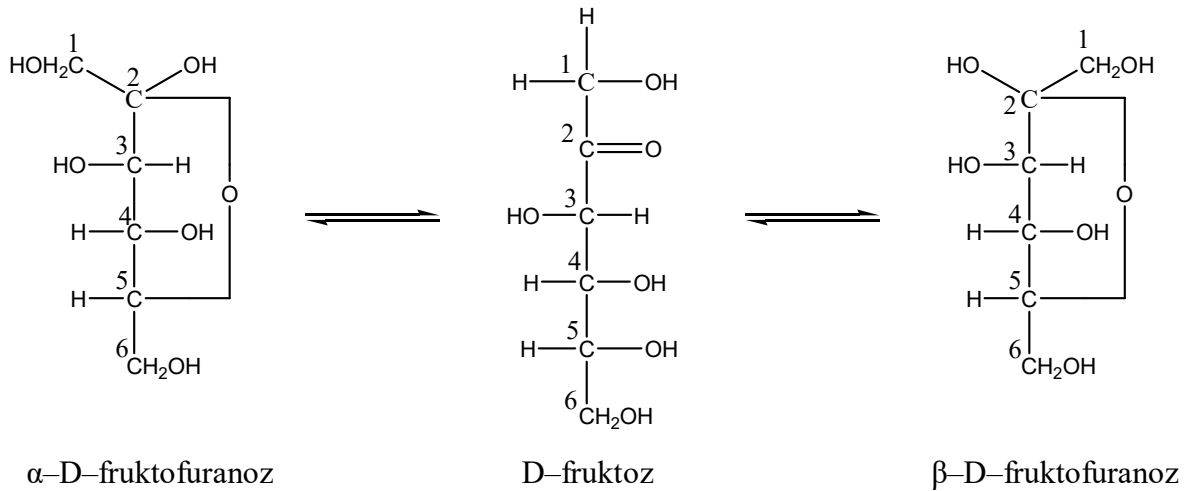
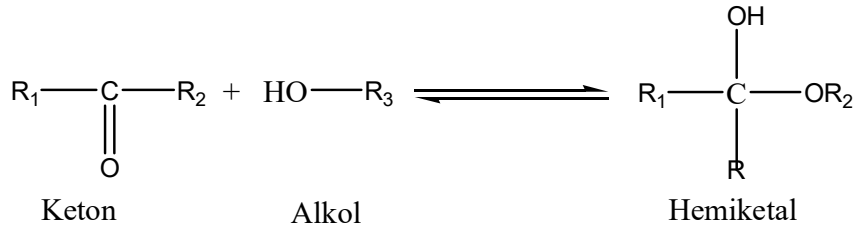
α -D-glukopiranoz

Haworth Projeksiyonları

Şekil 5.6. D-Glukozun Fischer ve Haworth projeksiyon formülleri

Haworth, karbohidrat yapılarını göstermek üzere bir sistem geliştirmiştir. Bu sisteme göre halka kağıt düzleminde dışarıya doğru dik olarak gelmekte, karbon atomlarına bağlı gruplar ise halka düzleminin üst ve altında yer almaktadır. Haworth formülleri halkaların gerçek uzaysal konfigürasyonunu aksettirmemektedir.

Ketoheksozlar da α - ve β - anomerik şekillere sahiptirler. Bu bileşiklerde 5 nolu karbon atomundaki hidroksil grubu (-OH) ile 2 nolu karbon üzerindeki karbonil grubuyla (>C=O) reaksiyona girerek **hemiketal** oluşturur. Hemiketal reaksiyonu ile halkalaşma sonucu asimetric olan 2 nolu karbon atomuna **anomerik karbon atomu** adı verilir. Bunun sonucu olarak beş üyeli **furan halkası** oluşur. Onun için ketoheksozlar **furanoz** adını alır (Şekil 5.7).

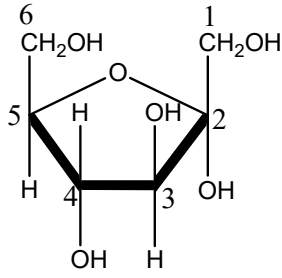


α -D-fruktofuranoz

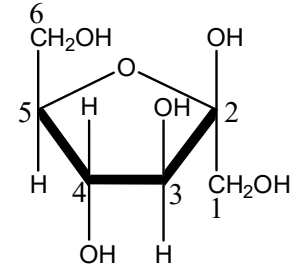
D-fruktoz

β -D-fruktofuranoz

Fischer Projeksiyonları



α -D-fruktofuranoz



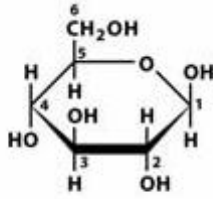
β -D-fruktofuranoz

Haworth Projeksiyonları

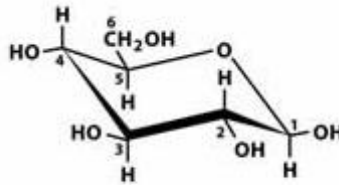
Şekil 5.7. D-Fruktozun Fischer ve Haworth projeksiyon formülleri

D- şeker serisinde α - ve β - izomerleri; **anomerik** karbon atomu üzerindeki hidroksil grubu (-OH), 5 nolu asimetrik karbon atomu üzerindeki hidroksil grubu (-OH) ile aynı yönde ise **α -izomeri**, farklı yönde ise **β -izomeri** denir. Bu durum Fischer ve Haworth projeksiyonlarında görülmektedir.

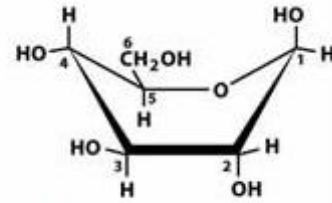
1890 da Sachse tarafından ilk defa ileri sürüldüğü gibi altı üyeli bir halkada, örneğin sikloheksanda bütün atomların bir düzlem üzerinde bulunmadığı ve halkanın bükülmesi sırasında halkanın sağlam bir yapı oluşturmak üzere iki ayrı düzlem işgal ettiklerini göstermiştir. Bu şekilde sikloheksanın sandalye ve kayık şekli olmak üzere başlıca iki konformasyonu oluşabilir. Termodinamik bakımdan en dayanıklı olan sandalye şeklidir. Heksozlar üzerinde yapı incelemeleri, piranoz halkasının da altıgen olmadığı, sikloheksandaki gibi sandalye ve kayık şekli olmak üzere iki konformasyonu bulunduğunu kanısını vermektedir.



Haworth projeksiyonu



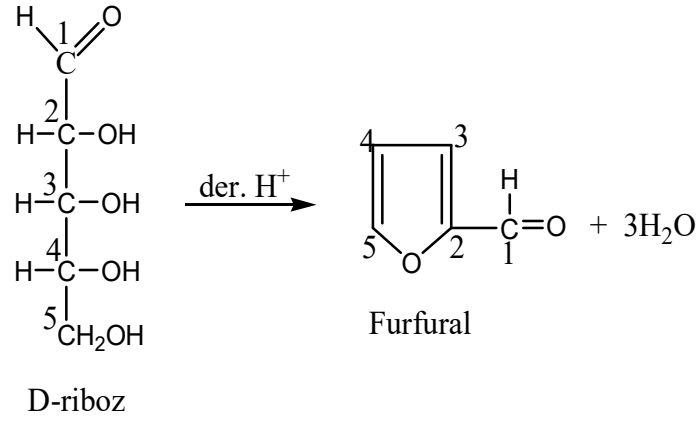
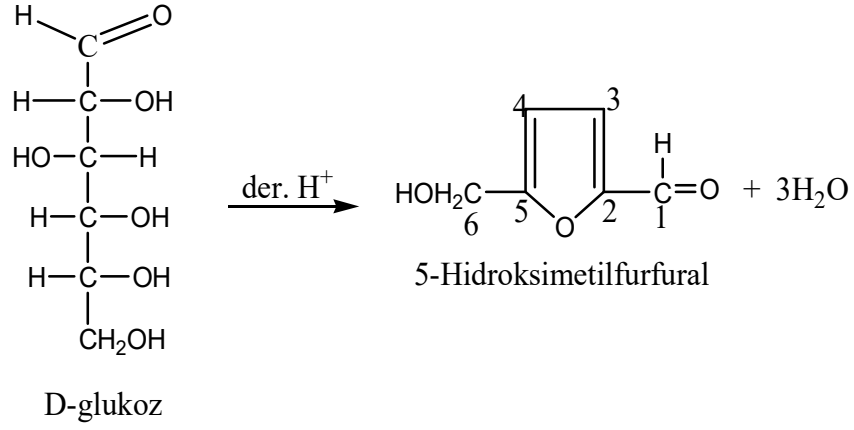
Sandalye konformasyonu



Kayık konformasyonu

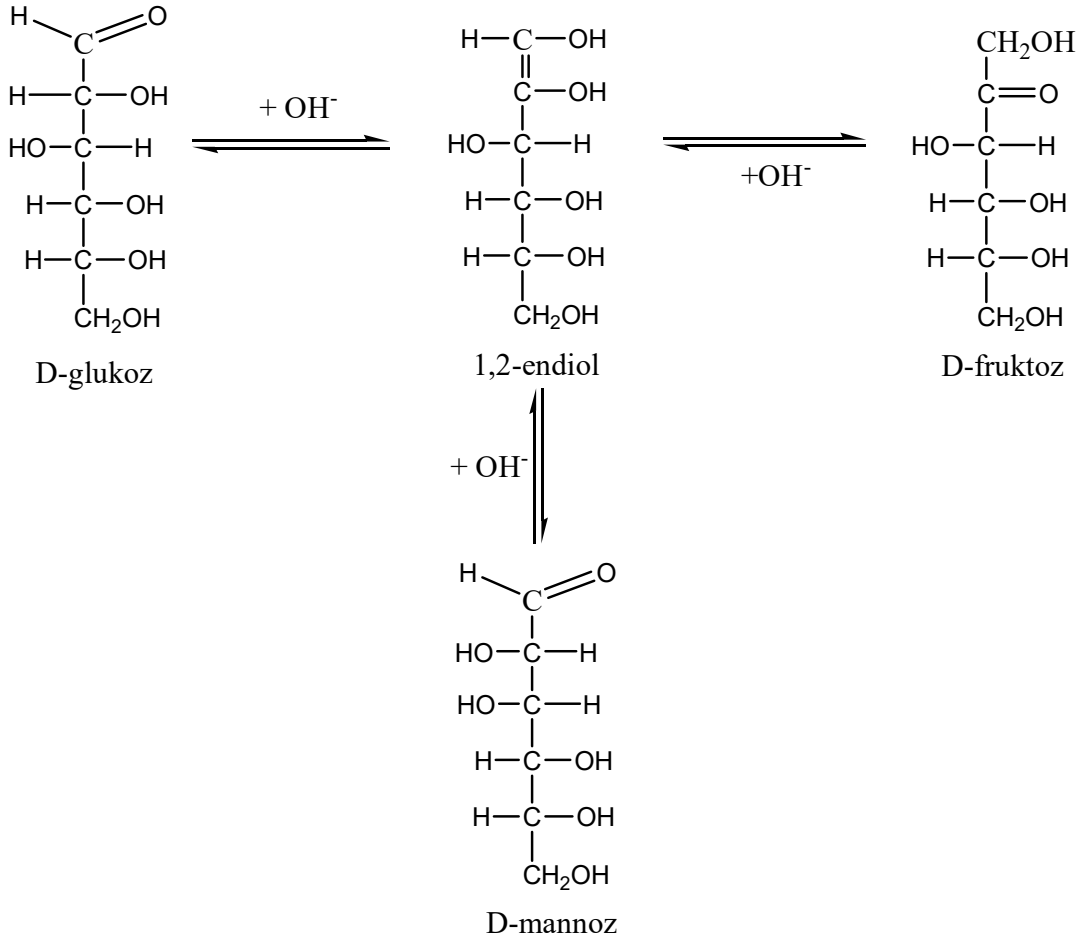
5.1.3. Monosakkaritlerin Asit ve Bazlarla Etkileşmesi

Monosakkaritler sıcak ve seyreltik HCl, HNO₃, H₂SO₄ gibi asit çözeltilerinde kararlıdır. Bunun için polisakkaritlerin asidik hidrolizinde monosakkaritler bozunmadan kalırlar. Derişik asit çözeltilerinde şekerler dehidratasyona uğrarlar ve furanın aldehit türevleri olan **furfuraler** oluşur.



Monosakkaritlerin derişik H_2SO_4 ile dehidratasyonu sonucu oluşan furfural, değme yüzeyinde α -naftol ile menekşe renkli kompleks verir (Molisch testi).

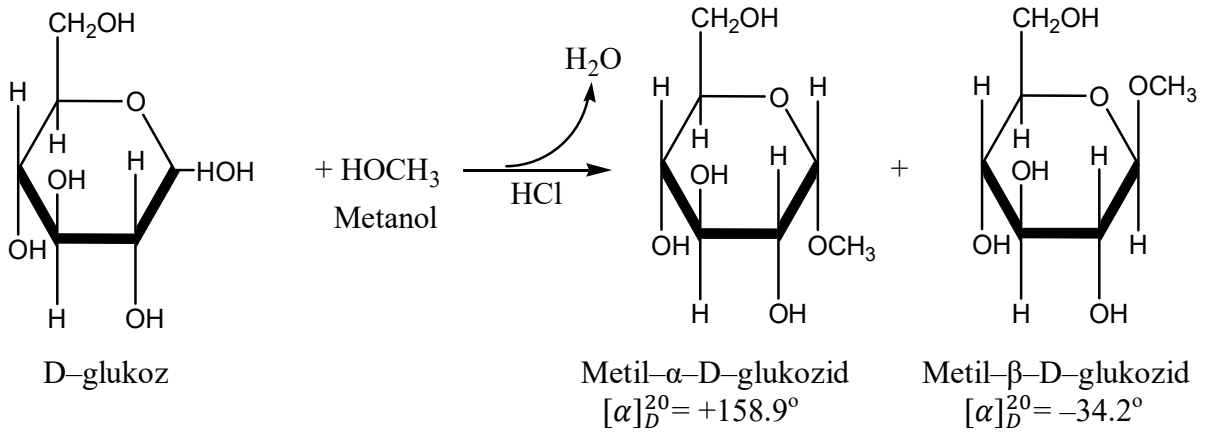
Seyreltik baz çözeltilerinde, monosakkaritlerin anomerik karbonu ve ona komşu karbon atomu çevresinde yeni bir düzenlenme olur, diğer karbon atomları üzerinde değişiklik olmaz. Örneğin; D-glukozun seyreltik bazik çözeltilisinde D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz denge karışımı oluşur.



Ketonlar indirgen değildir ancak fruktoz yukarıdaki denge nedeni ile indirgen bir şekerdir. Yüksek sıcaklıklarda ve derişik bazik çözeltilerde serbest monosakkaritler, parçalanırlar ve hatta polimerleşirler.

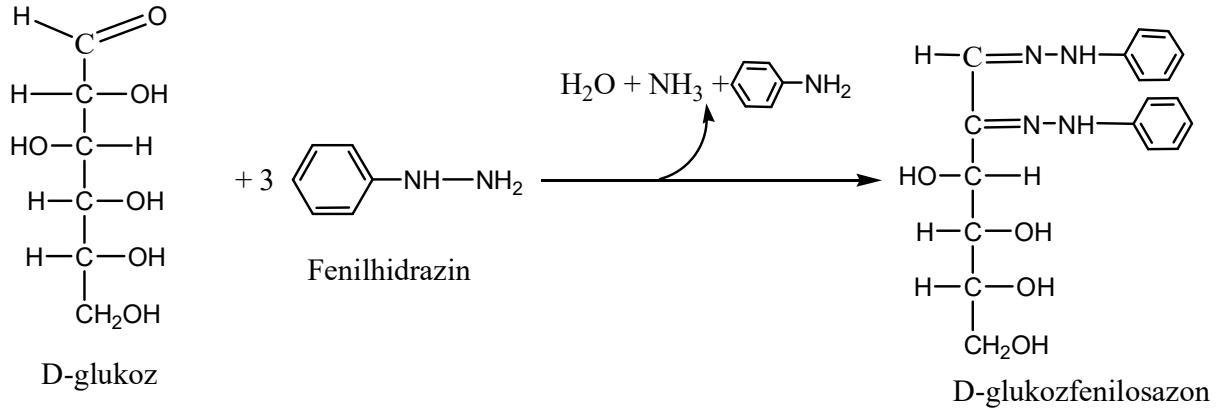
5.1.4. Monosakkaritlerin Önemli Türevleri

1) **Glikozid Bağı ve Glikozidler:** Mineral asitli ortamda (HCl vb.) aldoheksozlar alkollerle α - ve β -glikozidleri verirler.



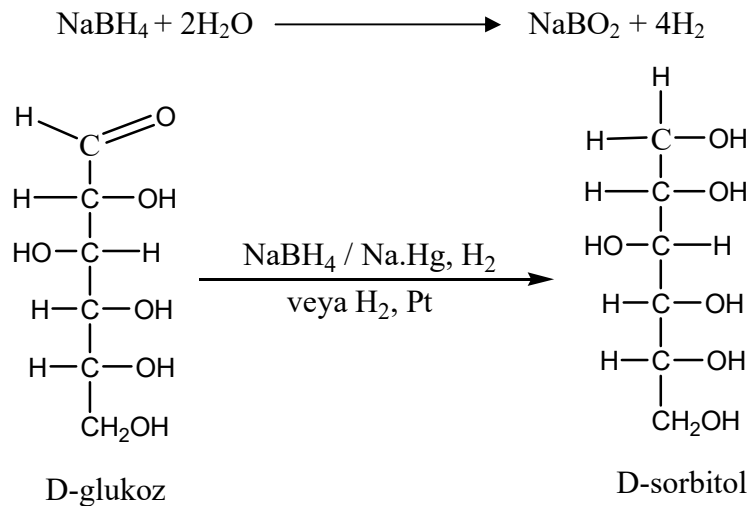
Glikozidler asimetrik karışık asetallerdir. Glikozid bağları, bir monosakkarit ile diğer bir monosakkarit arasında da oluşur. Bunun sonucu disakkaritler meydana gelir. Polisakkaritler de birçok monosakkarit birimlerinin glikozid bağlarıyla bağlamaları sonucu oluşurlar. Glikozid bağları kaynar asit çözeltileri ve spesifik enzimler tarafından hidrolizlenir.

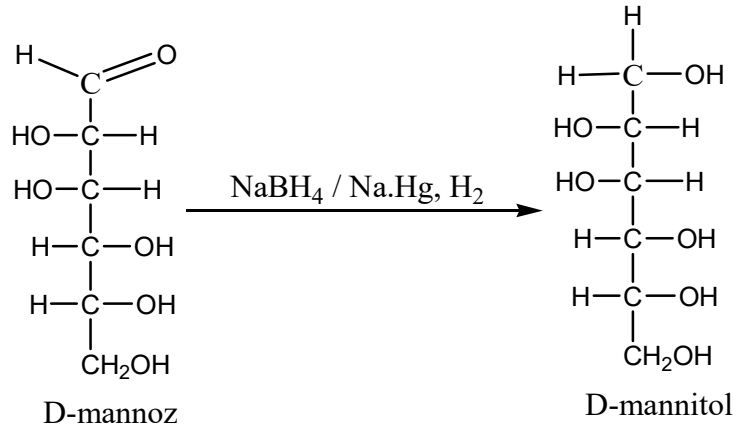
2) Fenilosazonlar: Monosakkaritler 100°C'da seyreltik asit çözeltisinde aşırı fenilhidrazin ile **fenilosazonları** verirler. **Osazonlar** kolayca kristallenirler.



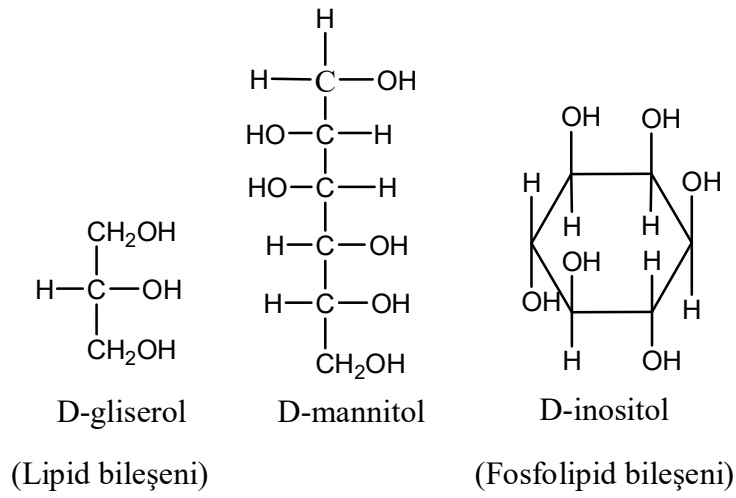
D-mannoz ve D-fruktoz da aynı osazonu (D-glukozfenilosazon) oluştururlar.

3) Şeker Alkolleri: Monosakkaritlerin karbonil gruplarının NaBH_4 ve metal katalizörler varlığında $\text{H}_{2(g)}$ ile indirgenmesi sonucu **şeker alkolleri** oluşur.



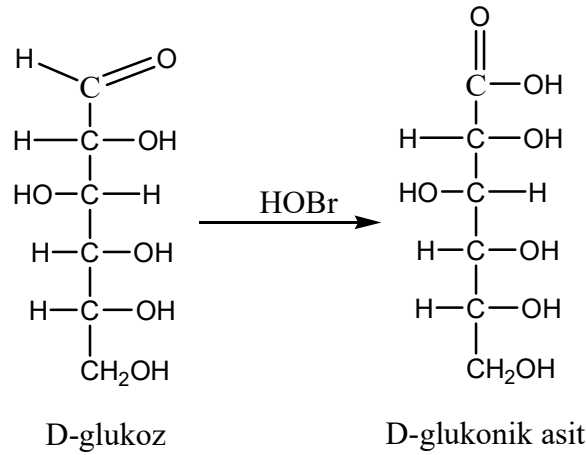


Şeker alkollerinden **gliserol**, **mannitol** ve **inositol** tabiatta en bol bulunanlardır.



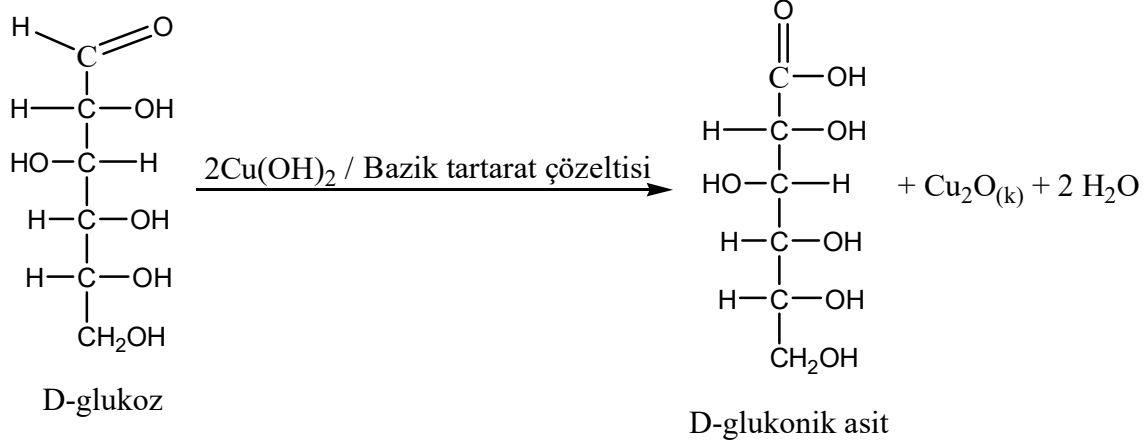
4) Şeker Asitleri: Aldozların yükseltgenmesi ile üç tür şeker asidi oluşur: a) Aldonik sit, b) Aldirik asit ve c) Üronik asit.

a. Aldonik asit: Aldoz şekerler indirgendirler. Zayıf yükseltgenlerle aldonik asitleri verirler.

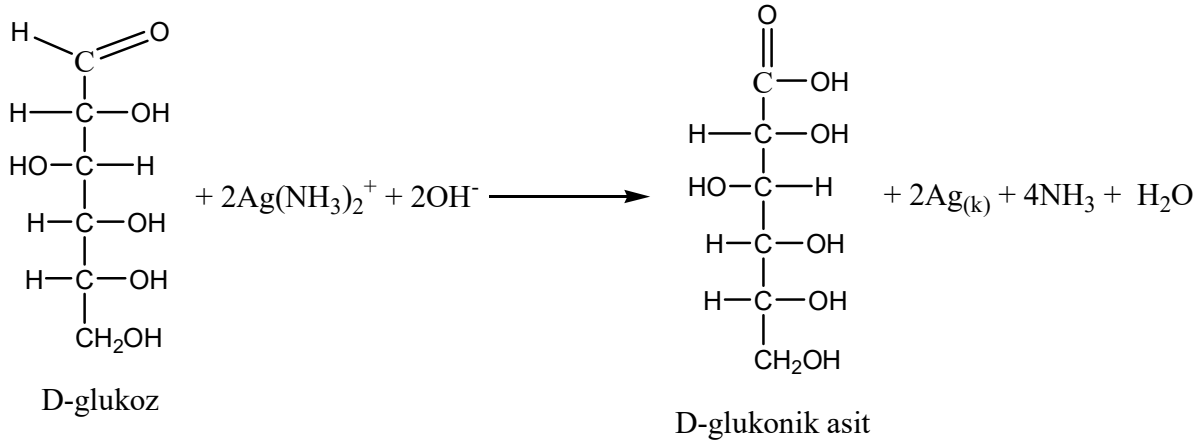


Monosakkaritlerin kalitatif ve kantitatif tayini bazik çözeltilerde Cu^{+2} ve Ag^+ iyonlarını indirgenme ilkesine dayanır.

Aldoz veya ketozların indirgen şekerleri Fehling çözeltisini (suda çözünen bazik kompleksi) indirgeyerek tuğla kırmızısı $\text{Cu}_2\text{O}_{(k)}$ oluşmasına neden olur.

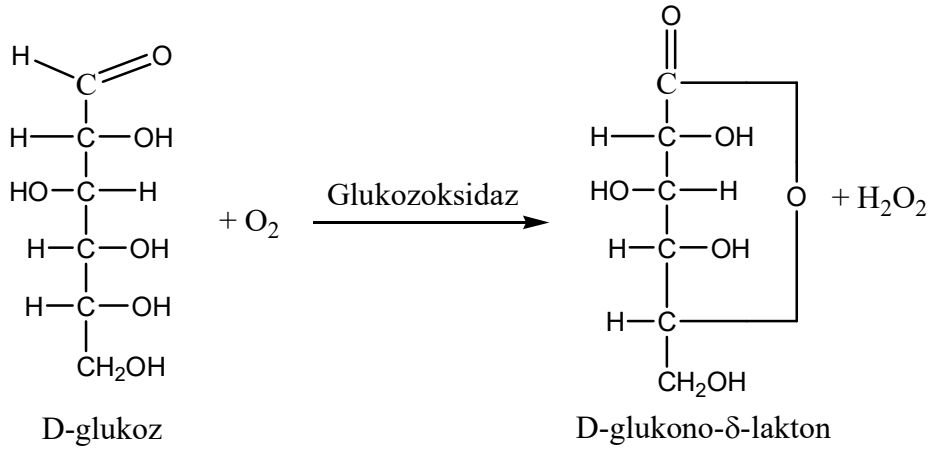


Glukoz ve diğer indirgen şekerler, amonyaklı gümüş nitrat çözeltisini (Tollens belirteci), sıcakta indirgenerek gümüş aynası (metalik Ag) oluşturur. Böylece diamin gümüş katyonu ile gümüş aynası olur.



Bu tayin metotlarının hepsi monosakkaritin karboksilik asite yükseltgenmesi ilkesine dayanır. Cu^{+2} ve Ag^+ iyonlarını indirgeyebilen glukozun karbonil grubu, karboksil grubuna yükseltgenir. Bu tür şekerlere **indirgen şeker** adı verilir. Bu özellik bir indirgen şekerin varlığını gösteren hem kalitatif hem de kantitatif bir test olan Fehling reaksiyonunun temelidir. Bu test uzun yıllar şeker hastalığının tanısında kan ve idrar glukoz düzeylerinin ölçülmesinde kullanılmıştır.

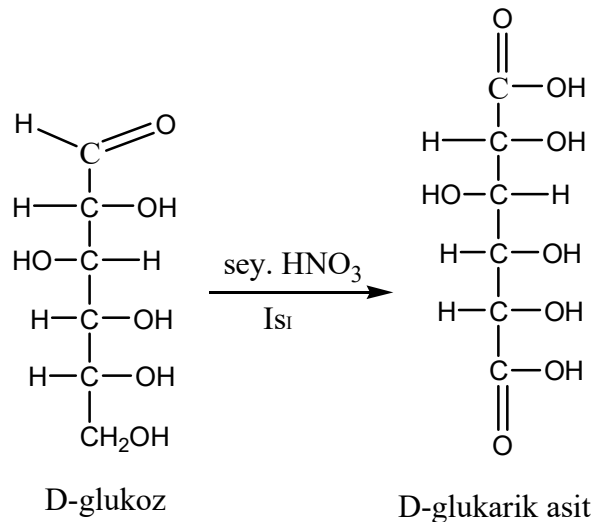
Günümüzde **glukozoksidaz** enzimi kullanılarak daha hassas kan glukoz ölçümleri yapılmaktadır.



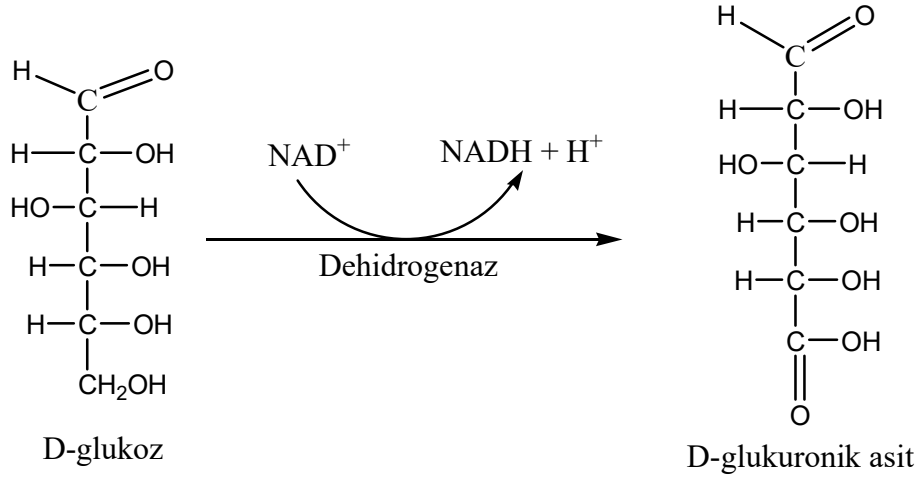
Açığa çıkan H_2O_2 miktarının ölçülmesiyle kan glukoz düzeyi belirlenir. **Peroksidaz** enzimi H_2O_2 'in bir renksiz bileşikle (**o-dianisidin** vb.) reaksiyonunu katalizleyerek renkli bir bileşik oluşturur ve bunun miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Glukozoksidaz enzimi, β -D-glukozun D-glukono- δ -laktona oksitlenmesini katalizlerken; α -anomerini etkilemez. Bu özelliğe karşın glukoz oksidaz ile katalizlenen bu reaksiyon klinik olarak kan glukoz düzeyini ölçmekte kullanılır. Çünkü mutarotasyonla α - ve β -izomerleri birbirlerine dönüşür. Glukozoksidaz glukoz için özgüldür. Galaktoz gibi Fehling ayıracağı ile reaksiyona giren indirgen şekerleri tanımaz.

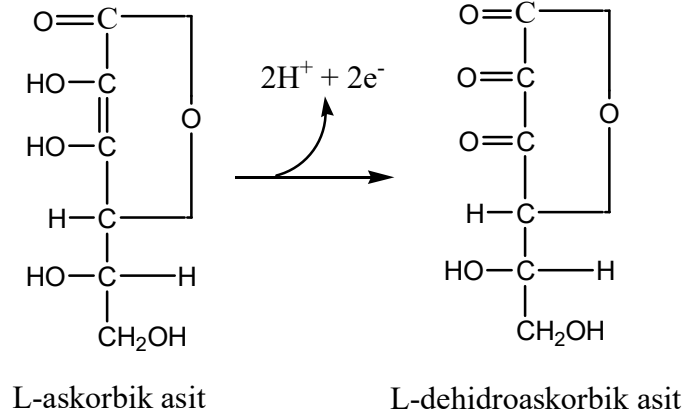
b. Aldirik asit: Kuvvetli yükseltgenlerle (HNO_3 vb.) aldoz şekerin hem karbonil grubu hem de uçtaki primer alkol grubu yükseltgenir ve aldirik asitler oluşur.



c. Uronik asit: Biyolojik yönden önemli olan üronik asitler de sadece primer alkol grubu yükseltgenmiştir. Bu ancak enzimatik olarak mümkündür.

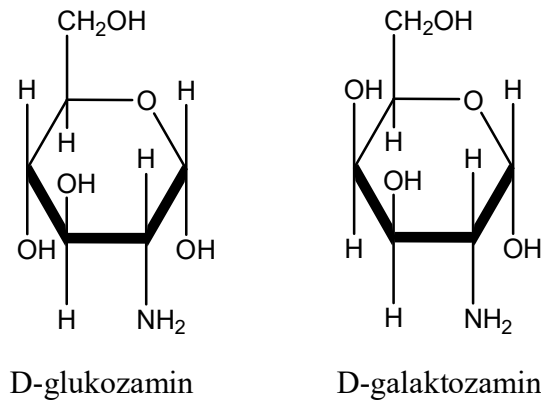


En önemli şeker asitlerinden birisi de, **L-askorbik asit** yani C vitaminidir. L-askorbik asit kolayca yükseltgenir.



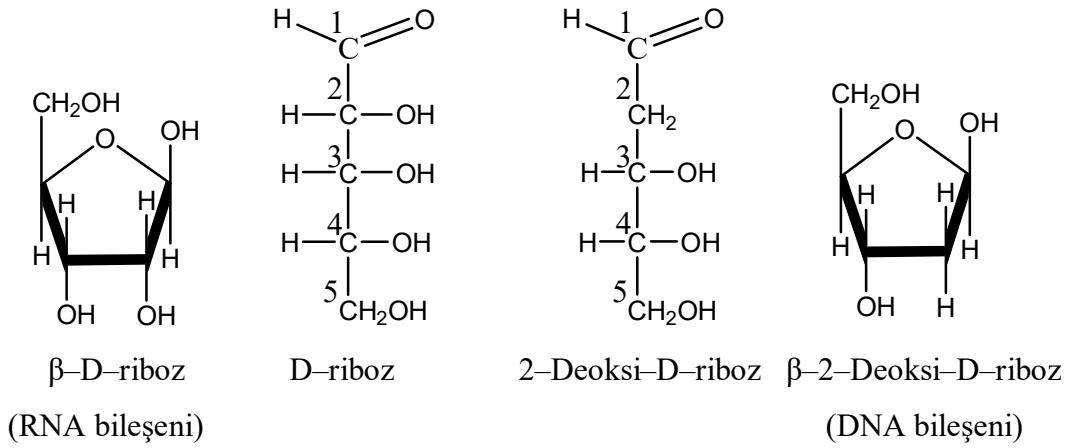
C vitamini güçlü bir antioksidanttır. C vitamini eksikliğinde diş etlerinde kanama ile ortaya çıkan skorbüt hastalığı ortaya çıkar. C vitamini turuncgillerde bol bulunur.

5) Amino Şekerler: D-glukozamin ve D-galaktozamin en yaygın olan amino şekerlerdir. Bu bileşiklerde monosakkaritin iki nolu karbondaki –OH grubu yerine –NH₂ grubu girmiştir. Glukoz ve galaktozun tek farkı 4 nolu karbondaki –OH' ların yerinin farklı olmasıdır.

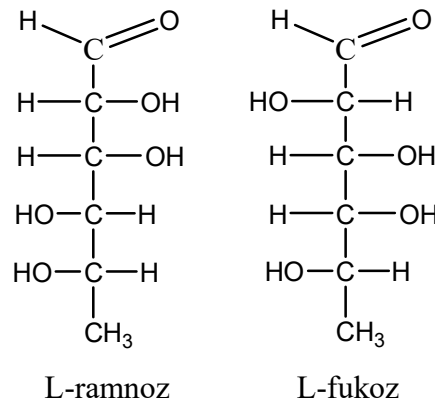


D-glukozamin omurgalı canlıların dokularında bulunan birçok polisakkaritin bileşenidir. Böcek ve kabuklu hayvanların yapısal polisakkariti olan kitinin önemli bileşenidir. **D-galaktozamin** ise kıkırdak dokusunun başlıca polisakkariti olan glikolipidlerin bileşenidir.

6) Deoksi Şekerler: Tabiatta en bol bulunan deoksi şeker, DNA' nın bileşeni olan 2-deoksi-D-ribozdur. D-riboz şeker RNA' nın yapısında, deoksiriboz şeker ise DNA' da bulunur. Hücrelerde yaygın olarak bulunur.



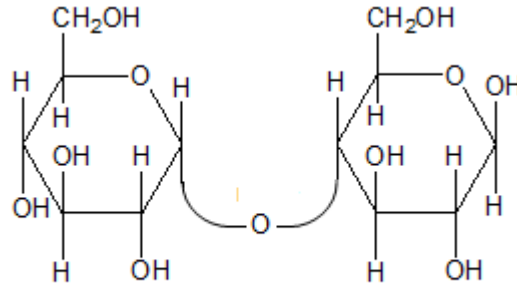
Canlılarda, genellikle şekerlerin D-izomerleri bulunmaktadır, çok nadiren L-izomerleri de vardır. Deoksi şekerler olan L-ramnoz ve L-fukoz, bazı bakteri hücre duvarlarının yapısında bulunmaktadır.



5.2. DİSAKKARİTLER

Disakkaritlerin en önemlileri **maltoz**, **laktoz** ve **sükroz (sakkaroz)** dur.

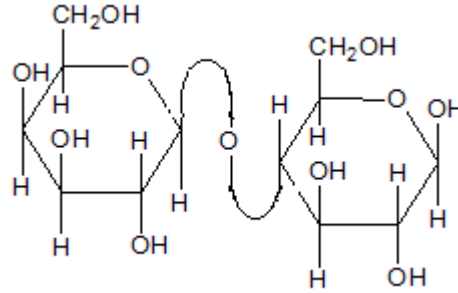
Maltoz, iki glukoz biriminin $\alpha(1\rightarrow4)$ **glikozid bağı** ile bağlanması sonucu oluşur. Buna **malt şekeri** de denir ve serbest halde pek az bulunur.



Maltoz (β - şekli)

Nişastanın **amilaz** enzimleriyle hidrolizi sonucu glukoz ve maltoz oluşur. Amilaz enzimi tükürük ve pankreas salgısında bulunur. Maltoz indirgen bir şekerdir çünkü ikinci glukoz biriminin anomerik karbonu serbesttir.

Laktoz, tabiatta yalnızca sütte bulunur. β -D-galaktoz ve β -D-glukoz birimlerinin **$\beta(1\rightarrow4)$ glikozid bağı**yla bağlanması sonucu oluşur.

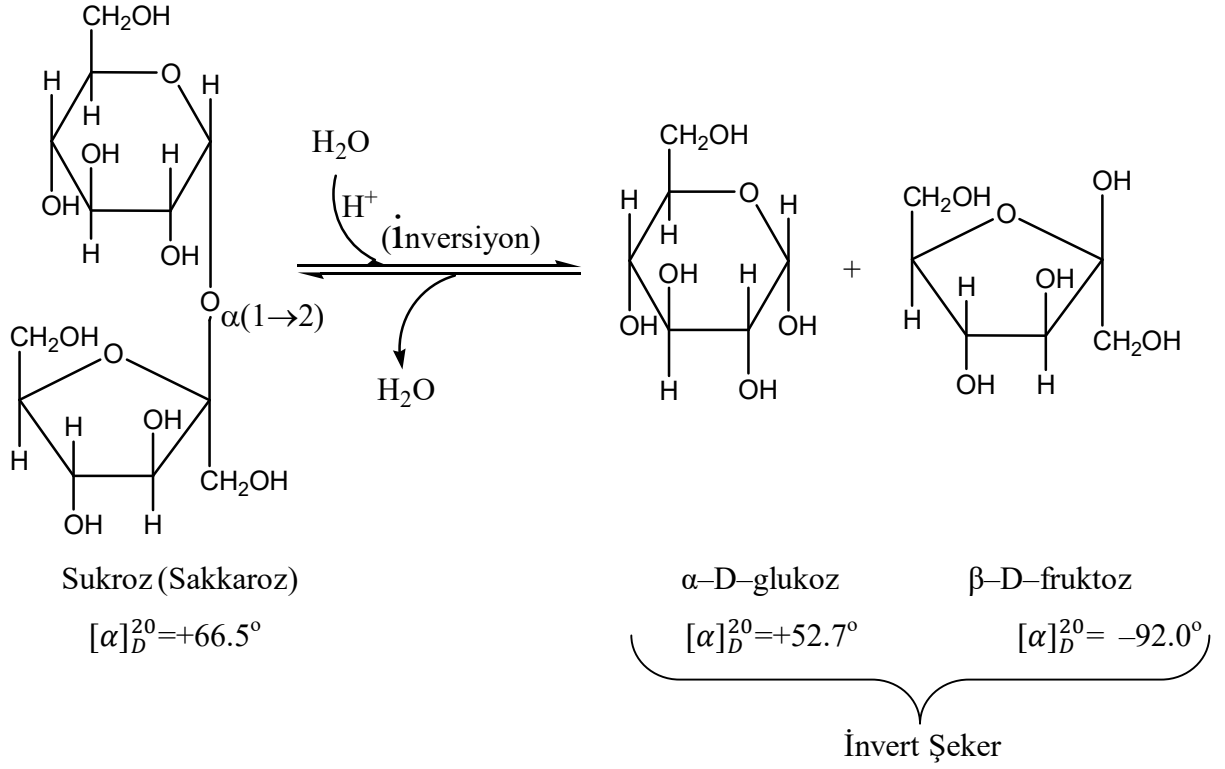


Laktoz (β - şekli)

İkinci glukoz biriminin anomerik karbonu serbest olduğu için indirgen bir şekerdir. Hem maltozda, hem laktozda β - şekli yaygındır.

Sükroz (sakkaroz), hergün kullandığımız şeker pancarından veya şeker kamışından elde edilen şekerdir. α -D-glukoz ve β -D-fruktoz birimlerinin **$\alpha(1\rightarrow2)$ glikozid bağı**yla bağlanması sonucu oluşur.

Sükroz, asidik ortamda hidroliz edilirse; kendini oluşturan α -D-glukoz ve β -D-fruktoza dönüşür (Şekil 5.8).



Şekil 5.8. Sükrozun hidrolizi ve invert şeker oluşumu (inversiyon).

Sükrozun ($[\alpha]_D^{20} = +66.5^\circ$) hidrolizi sonucu, D–glukoz ($[\alpha]_D^{20} = +52.7^\circ$) ve D–fruktozun $[\alpha]_D^{20} = -92^\circ$ meydana gelmesine **inversiyon** olayı denir. Çünkü hidroliz sonucu eşdeğer glukoz ve fruktozun oluşması optik çevirmeyi dekstrodan levoya değiştirir. Bu şeker karışımına da **invert şeker** adı verilir.

Sükroz, invertaz enzimi ile de hidrolizlebilir ve invert şeker karışımı oluşur. İinvert şeker sükrozdan daha tatlıdır. Çünkü hidroliz sonucu sükrozdan yaklaşık 1.7 kat daha tatlı olan fruktoz serbest hale geçmektedir. İinvert şeker şekerlemecilikte hem daha tatlı, hem de daha az kalorili olmasından dolayı sükroza tercih edilmektedir.

5.3. POLİSAKKARİTLER

Polisakkaritler birçok monosakkaritin veya monosakkarit türevlerinin glikozid bağıyla bağlanması sonucu oluşan büyük moleküllü bileşiklerdir. Polisakkaritler makromoleküller olup, asitler veya enzimlerle tamamen hidroliz olduklarında monosakkaritler veya türevlerini oluştururlar. Polisakkaritlerde en bol bulunan monosakkarit birimi D–glukozdur. D–fruktoz, D–mannoz, D– ve L–galaktoz, D–ksiloz ve D–arabinoz polisakkaritlerde bulunan diğer monosakkaritlerdir.

Doğal polisakkaritlerde bulunan monosakkarit türevlerinin başlıcaları da D–glukozamin, D–galaktozamin ve D–glukronikasit vb. gibi türevleridir.

Tek bir çeşit monosakkarit veya türevinin oluşturduğu polisakkaritlere **homopolisakkarit**; farklı monosakkarit veya türevlerinin oluşturduğu polisakkaritlere ise **heteropolisakkarit** denir.

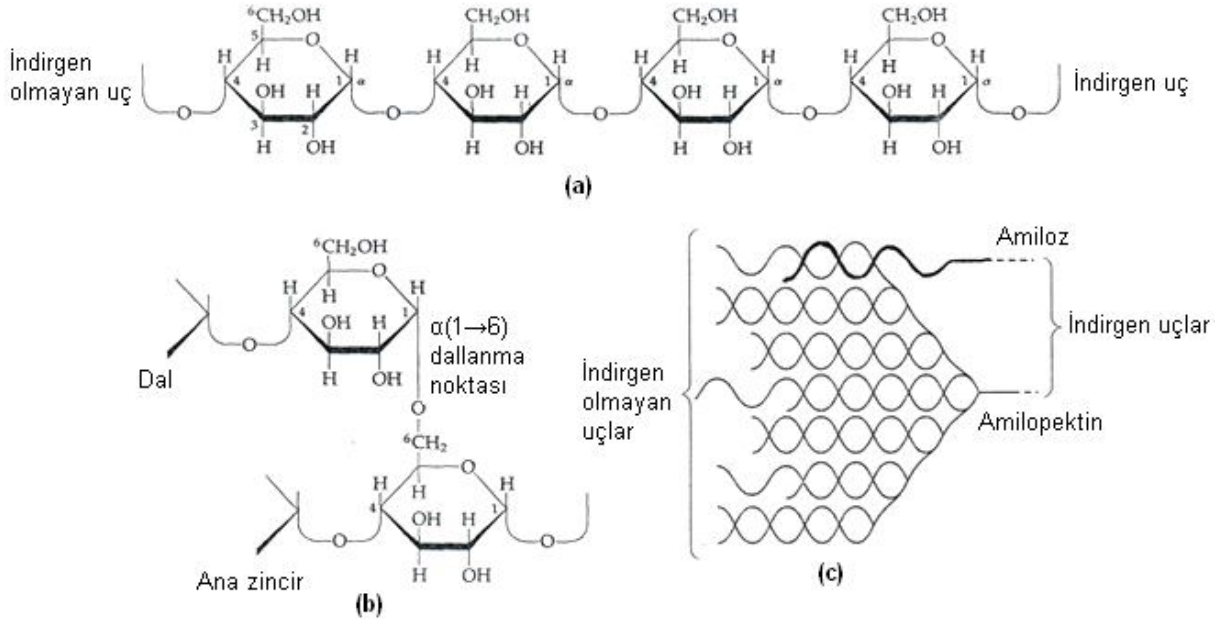
Başlıca homopolisakkaritler **nişasta, glikojen, selüloz, inulin** ve **kitin**'dir. Bunlardan inulin, fruktoz birimlerinden oluşur ve yer elmasında bulunur. Nişasta, bitkilerde depolanan ve suda koloidal olarak çözünen bir polisakkarittir. Kan grubu polisakkaritleri, **pektin** ve **alginiik asit** heteropolisakkaritlere örnektir.

Bitkisel organizmanın depo polisakkariti olan nişasta ve hayvansal organizmanın depo polisakkariti olan glikojen hücre sitoplazmasında granüller halinde bulunur. Yarı çapları 100–400 Å olan granüller çok sayıda polisakkarit moleküllerinin birleşmesi sonucu oluşur. Granüller polisakkaritlerin yıkım ve sentezinde görev yapan enzimler ve bazı proteinleri içerir.

5.3.1. Depo Polisakkaritler

Nişasta, bitkisel organizmanın depo polisakkaritidir. Nişasta tamamen D–glukoz birimlerinden oluşmuş olup iki tip glukoz polimeri içerir. Bunlar amiloz ve amilopektindir (Şekil 5.9).

1) **Amiloz**: D–glukoz birimlerinin $\alpha(1\rightarrow4)$ **glikozid bağları**yla bağlanmasıyla oluşan düz zincirli, hiçbir dallanmanın olmadığı büyük bir moleküldür. Molekül ağırlıkları birkaç binden 500 bine kadar değişir. Amiloz suda koloidal olarak çözünür ve iyotla mavi renk verir.



Şekil 5.9. Nişasta polisakaritleri, amiloz ve amilopektin. (a) Amilozun kısa bir parçası, $\alpha(1\rightarrow4)$ bağlarıyla bağlı D-glukozlardan oluşan doğrusal bir polimerdir. Tek bir zincir binlerce glukoz içerebilir. Amilopektin dallanma noktaları arasında aynı bağlarla bağlı şekerlerin uzamış zincirine sahiptir. (b) Amilopektinin $\alpha(1\rightarrow6)$ dallanma noktası. (c) Nişasta granüllerinde olduğuna inanıldığı şekildeki amiloz ve amilopektin kümelenmesi. Amilopektinin iplikleri birbiriyle veya amiloz iplikleriyle (koyu) ikili sarmal yapıyı oluşturur. Daha dıştaki dalların indirgen olmayan ucundaki glukozlar, enerji üretimi için nişastanın hücre içi mobilizasyonu sırasında, enzimatik olarak her seferinde bir tane olmak üzere koparılır. Glikojen benzer bir yapıya sahiptir, fakat daha fazla dallanmıştır ve yoğundur.

2) Amilopektin: Amilopektin son derece dallanmış haldedir. Dallanma noktası ortalama 24–30 glukoz birimi uzunluğundadır ve bitki türüne göre değişir. Düz zincirli yapı $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozid bağlarıyla oluşturulurken, dallanmalar $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozid bağlarıyla olur. Molekül ağırlığı bir milyona kadar çıkabilir. Amilopektin de suda koloidal olarak çözünür ve iyotla kırmızı–mor renk verir.

Amiloz, pankreas salgısı ve tükürkte bulunan **amilaz** enzimi tarafından hidrolizlenir. Parçalanma sonucu glukoz ve maltoz karışımı oluşur.

Amilopektinin, $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozid bağları dallanma noktasına kadar amilaz enzimiyle hidrolizlenir. Dallanma noktasındaki $\alpha(1\rightarrow6)$ bağları $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozidaz enzimi tarafından hidrolizlenir. Amilopektin, amilaz ve $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozidaz enzimlerinin birlikte etkisi sonucu glukoz ve maltoz moleküllerine kadar parçalanır.

3) Glikojen: Glikojen, hayvansal organizmanın depo polisakaritidir. Başlıca karaciğer ve kas hücrelerinde bol olarak bulunur. Glikojen yapı olarak amilopektine benzer. Düz zincirli yapı (zincir omurgası) $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozid bağlarıyla oluşturulurken; dallanma

noktasında $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozid bağları vardır. Ancak glikojende dallanma daha sıktır ve ortalama 8–10 glukoz biriminde ortaya çıkar. Glikojen de **amilaz** enzimi ve $\alpha(1\rightarrow6)$ **glikozidaz** enzimlerinin birlikte etkisi sonucu glukoz ve maltoza kadar parçalanır.

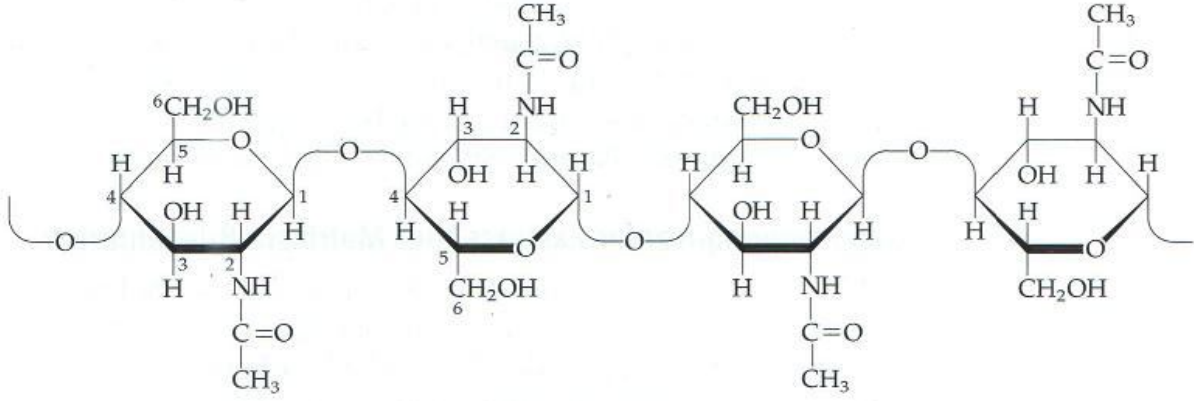
5.3.1. Yapısal Polisakkaritler

Selüloz ve kitin yapısal homopolisakkaritlerdir.

1) Selüloz: Selüloz, yapısal polisakkaritlerin en önemlisidir. Selüloz biyosferdeki toplam organik karbonun yarısından fazlasını oluşturur. Çünkü selüloz bütün bitkilerin en önemli yapısal elemanıdır. Selüloz bitki hücre çeperlerinin önemli bir bileşenidir. Odunun %50'si, pamuğun tamamı selülozdur. Selüloz D-glukoz birimlerinin $\beta(1\rightarrow4)$ glikozid bağlarıyla polimerleşmesi sonucu oluşan, tamamen düz zincirli ve büyük molekülü polisakkaritlerdir. Molekül ağırlıkları 50.000–2.500.000 arasında değişir. Bu da yaklaşık 300–15.000 glukoz birimine karşılık gelir.

Birçok hayvan, $\beta(1\rightarrow4)$ bağlarını hidrolizleyecek enzimleri olmadığı için selülozu besin maddesi olarak kullanamaz. Omurgalılarından sadece sığırlar ve diğer geviş getiren hayvanlar (koyun, keçi, deve vb.) selülozu besin olarak kullanırlar. Geviş getiren hayvanların midelerinde **selülaz** salgılayan bakteri ve diğer mikro canlılar bakımından zengin bir bölge (rumen) vardır. Odun-çürütme mantar ve bakterileri de selülaz enzimi salgılar. İnsan sindirim sistemindeki enzimler $\beta(1\rightarrow4)$ glikozid bağlarını hidrolizleyemez. Selüloz içeren lifli besinler, (meyveler, sebzeler, vb.) insan sindirim sisteminde suyu tutar ve bağırsaklara dolgunluk hissi verir.

2) Kitin: Kitin, $\beta(1\rightarrow4)$ bağlarıyla bağlanan N-asetilglukozaminlerin oluşturduğu doğrusal bir homopolisakkarittir (Şekil 5.10). Yapı bakımından selüloza benzerlik gösterir. Selülozdan farkı C-2'deki hidroksil grubu yerine asetillenmiş bir amino grubunun bulunmasıdır. Kitin, omurgalılar tarafından sindirilemez. Kitin, milyona yakın artropot türünün (böcekler, istakozlar ve yengeçler vb.) katı dış iskeletinin temel bileşenidir ve muhtemelen selülozdan sonra doğada en çok bulunan polisakkarittir.



Şekil 5.10. N-asetilglukozamin birimlerinin $\beta(1\rightarrow4)$ bağlandığı kısa bir kitin parçası.

3) İnülin: Yer elması, soğan ve sarımsakta bulunan inülin $\beta(1-2)$ glikozit bağlarıyla bağlı fruktoz birimleri içeren bir polisakkarittir.

4) Agar (Agar – Agar: Agaroz): Yosun türü deniz bitkilerinde bulunan bir galaktoz polimeridir. Galaktoz birimleri $\beta(1-4)$ bağlarıyla bağlıdır. %1 lik çözeltisi bile oldukça kıvamlıdır. Çok su tutar. Jel elektroforezinde, çeşitli kremlerin hazırlanmasında ve tıpta(mikrobiyolojide) besi yeri olarak kullanılır.

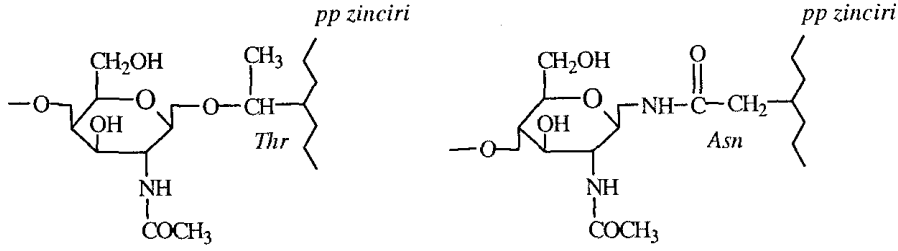
5) Dekstrin: Düz zincirler halindedir. Hepside, $\alpha(1-4)$ glikozit bağlarıyla bağlı glukoz birimleri içeren, düz zincirli bir polisakkarittir. Bazı bakterilerin şekerlere etkisi sonucu oluşurlar.

5.4. GLİKOPROTEİNLER

Peptid zincirlerinde kovalent bağlı karbohidrat grupları içeren glikoproteinler, biyolojik yönden çok önemlidir. Canlı organizmalarda çok yaygın olarak bulunan biyomoleküller olup özellikle membran yapılarında bulunurlar. Değişik glikoproteinlerde karbohidrat miktarları % 2–30 arasında değişir. Hemen hemen bütün glikoproteinlerin omurgalılarıdaki fonksiyonu ekstraselülerdir (hücre dışı) ve yapısal görev yaparlar. Glikoproteinlere, plazma membranı glikoproteinleri, kan glikoproteinleri, antikorlar, bağırsaklarda salgılanan değişik sindirim enzimleri ve bazı protein yapısındaki hormonlar örnek verilebilir. Glikoproteinlerde birçok monosakkarit ve türevleri bulunmaktadır. Glikoproteinler, plazma membranının dış yüzeyinde ekstraselüler matrikste ve kanda (kan glikoproteinleri, antikorlar) bulunurlar.

Karbohidrat içeriğine bağlı olarak enzim, taşıyıcı protein, reseptör, hormon ve yapısal proteinleri modifiye ederek çok çeşitli fonksiyonları yerine getirirler. Bu karbohidratlar proteinlere ve heksozamin grubu ile peptit zincirinde bulunabilen treonin ve serin gibi amino

asit yan zincirlerindeki hidroksil grupları ile kovalent bağlanarak (O-köprülü glikanlar) ya da heksoz amin grubu ile peptit zincirindeki bir asparagin yan zinciri azotu arasındaki kovalent bir bağlanma ile (N-köprülü glikanlar oluşturur (Şekil 5.11).



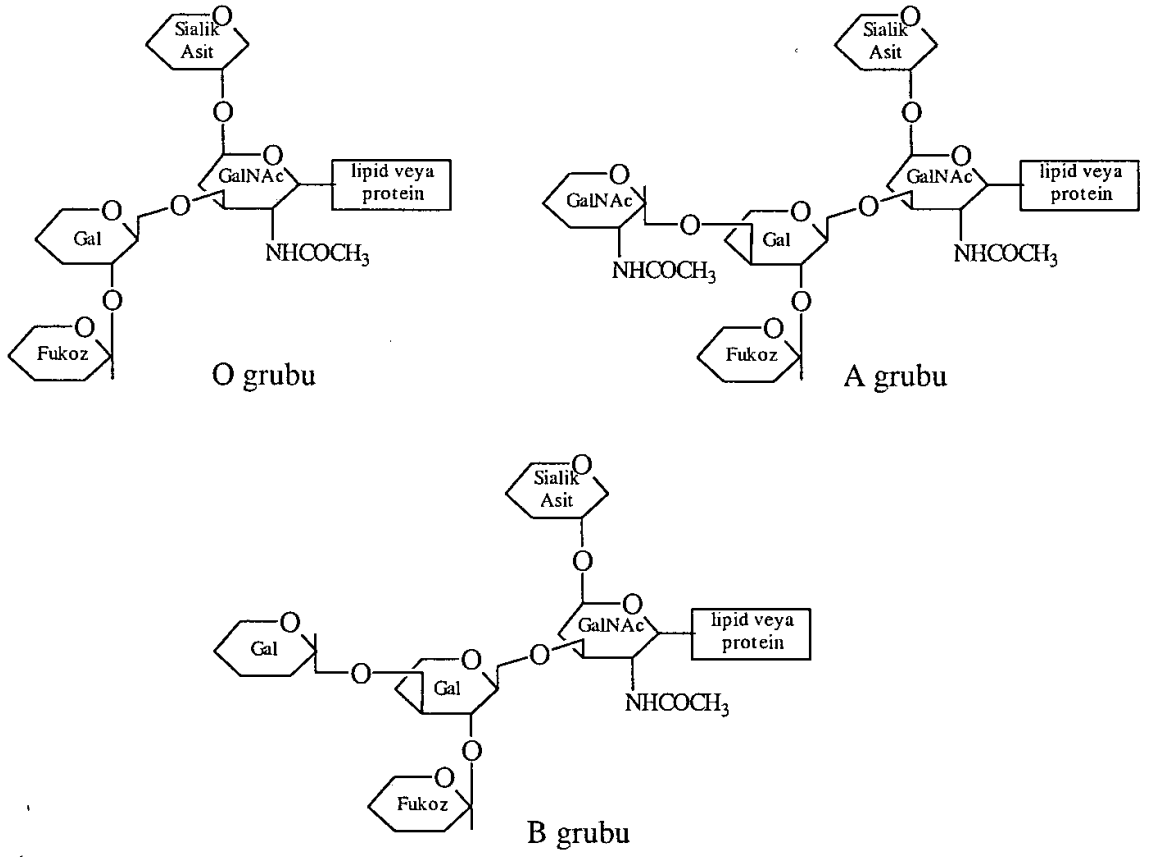
Şekil 5.11. Glikoprotein türevleri

5.5. GLİKOLİPIDLER

İnsan ve hayvan hücrelerinin plazma membranlarındaki dağılımları ile asimetric bir düzen sağlayan lipid molekülleri glikolipid olarak bilinir. Bu moleküller karbohidrat birimleri ile kovalent yapılar oluşturur. Membranlarda bu yapılar iki tabakalı yapının dış tabakasında yer alır ve içerdikleri karbohidrat zincirleri hücre dışına doğru yönelir. Bu yapılanmadan dolayı glikolipidlerin bileşenleri olan karbohidrat birimlerinin hücrelerin iletişimde ve diğer hücrelerle temasında rol oynadıkları tahmin edilmektedir. Bu lipid türevlerinin oluşturulması Golgi sisteminde gerçekleştirilir. Glikolipidler membranlarda yaklaşık olarak %10'dan daha az bir oranda yer alır ancak bu oran organizmadan organizmaya veya dokudan dokuya farklılık gösterebilir.

Glikolipidler içerdikleri karbohidrat birimlerinde yük taşıyabilmektedir. Ancak pek çok prokaryot ve ökaryottaki glikolipidlerin karbohidrat birimleri yüksüz olduğundan nötral karakter taşır. Yük taşıyan kompleks glikolipidlerden biri de gangliozitlerdir ve zayıf asidik gruplar içerdiklerinden bu moleküller eksi yük taşır.

İnsanlarda kan grubunun belirlenmesini sağlayan ve eritrosit membranlarında bulunan glikolipidler antijen olarak bilinir ve karbohidrat birimleri eritrosit membranlarının dış kısmında bulunur. Bu antijenlerden en basiti O antijendir ve diğer iki antijen bu maddenin türevleri olarak dikkate alınabilir (Şekil 5.12). Antijenlerin varlığına bağlı olarak antikorlarla muamele edildiğinde kandaki hücrelerin çökmesi sağlanır. Bu çökme reaksiyonları kan gruplarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır ve bu oligosakkaritler kan grubu antijenleri olarak bilinir. Ancak bu maddeler kan dışındaki birçok hücrede bulunur.



Şekil 5.12. Antijenler

6. BÖLÜM: LİPİDLER

Lipidler önemli bir biyomolekül grubunu oluşturur. Lipidler bitki ve hayvan hücrelerinde bulunan ve suda çözünmeyen; kloroform, eter ve benzen gibi apolar organik çözücülerde çözünen bileşiklerdir. Lipidler yapı ve fonksiyon bakımından çok büyük farklılıklar gösterirler. Lipidlerin başlıca fonksiyonlarını şunlardır:

1. Membranların yapı elemanlarıdır,
2. Metabolik yakıtın hücre içi depolama şeklidirler,
3. Metabolik yakıtın bir taşıma şeklidir,
4. Birçok bakterilerin, yüksek bitki yapraklarının, böcek kabuklarının, omurgalı derilerinin, hücre çeperleri için koruyucu bileşenlerdir. Ayrıca bazı lipidlerin, vitamin ve hormon olarak da biyolojik aktiviteleri vardır. Örneğin D vitamininin, ön maddesi kolesteroldür. Steroid hormonlar da, gonadlar ve adrenal korteksde kolesterolden sentezlenir.

Lipidler birkaç şekilde sınıflandırılır. Yaygın olan sınıflandırma şekli aşağıdaki gibidir.

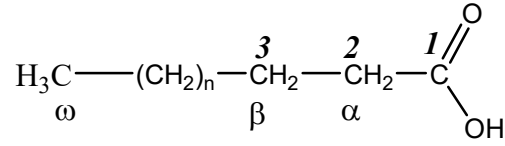
1. Yağ asitleri,
2. Nötral yağlar,
3. Fosfolipidler,
4. Glikolipidler,
5. Mumlar,
6. Steroidler ve terpenler

Şimdi bunları sırasıyla inceleyelim.

6.1. YAĞ ASİTLERİ

Yağ asitlerinin birçok hücre ve dokularda serbest haldeki konsantrasyonları çok düşüktür. Fakat yağ asitleri; nötral yağlar, fosfolipidler, glikolipidler, kolesterol esterleri ve bazı mumların yapı taşları olduklarından bazı özelliklerinin ayrıntılı olarak incelenmesi faydalı olacaktır. Çeşitli hücre ve dokulardan 100' den fazla çeşit yağ asidi izole edilmiştir. Yağ asitleri, $R-COOH$ formülüyle gösterilen alifatik monokarboksilik asitlerdir. Burada R grubu doymuş ya da bir veya daha fazla karbon-karbon çift bağı içeren doymamış uzun bir hidrokarbon zinciri olabilir. Yağ asitleri birbirlerinden zincir uzunluğu, çift bağların sayısı ve yeri bakımından ayrılırlar (Tabl 6.1). Yağ asitlerinin sistematik isimlendirilmeleri hidrokarbon zinciri isminin sonuna -oik ekinin getirilmesiyle yapılır. Mesela C_{18} doymuş yağ asidinin adı oktadekanoik asittir. Hidrokarbon zincirinde bir çift bağı içeren C_{18} yağ asidi oktadekanoik asit, iki çift bağı içeren oktadekadienoik, üç çift bağı içeren oktadekatrienoik asit şeklinde isimlendirilir. 18:0 sembolü doymuş bir C_{18} yağ asidini, 18:1 sembolü bir çift bağı içeren C_{18} yağ asidini, 18:2 sembolü iki çift bağı içeren C_{18} yağ asidini gösterir.

Yağ asitlerinin karbon atomları karboksil ucundan başlayarak numaralandırılır.



2 ve 3 nolu karbon atomları sırasıyla α ve β sembolleriyle, zincirin en ucundaki metil karbonu ise ω (omega) ile gösterilir. Çift bağın yeri Δ sembolünün üzerine yazılan rakamlarla belirtilir. Örneğin **cis**- Δ^9 , 9 ve 10 nolu karbon atomları arasında ki bir çift bağı; **cis,cis**- $\Delta^{9,12}$, 9 ve 10 nolu karbon atomları ile, 12 ve 13 nolu karbon atomları arasında çift bağ olduğunu ifade etmektedir. **Trans**- Δ^2 de, 2 ve 3 nolu karbon atomları arasında bir trans çift bağı olduğunu ifade eder. Yağ asitlerinin genel isimleri de vardır.

Yağ asitleri fizyolojik pH'da iyonlaşmış halde buldukları için, karboksilli asit isimleri yerine karboksilat isimleriyle yazılmaları daha uygundur. Mesela palmitik asit yerine palmitat vb.

Yüksek bitki ve hayvan lipidlerinin bileşiminde bulunan doğal yağ asitlerinin bazı genel özellikleri şunlardır:

Yüksek bitki ve hayvan lipidlerinde bulunan yağ asitlerinin hemen hemen hepsi çift sayıda karbon atomu içerir ve zincir uzunlukları 14–22 karbon arasında değişir. Bunların arasında 16–18 karbonlular en bol olanlarıdır.

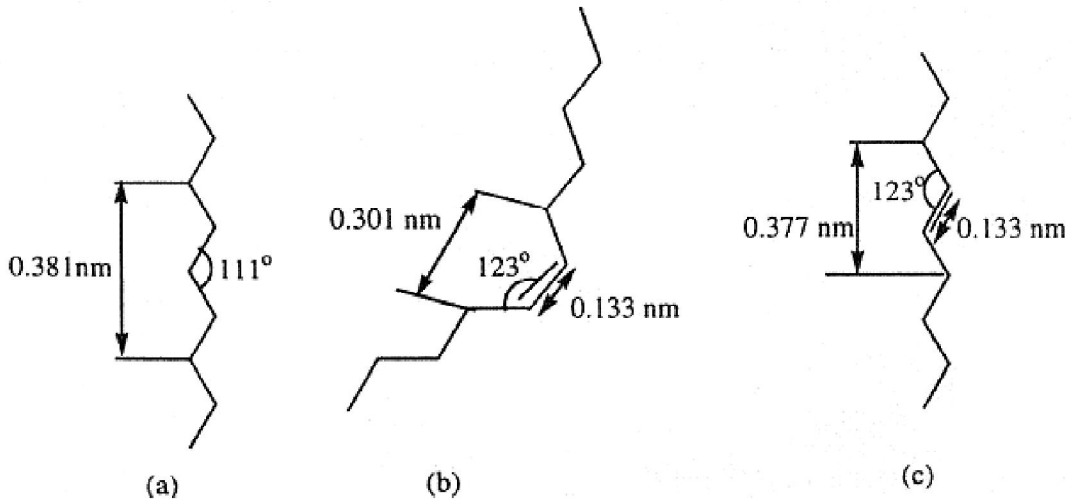
Yağ asitlerinin erime noktaları; çift bağ sayısı arttıkça azalır ve zincir uzadıkça da artar (Tablo 6.1).

Tablo 6.1. Bazı doğal yağ asitleri.

Karbo nNo	Genel ismi	Sistemantik ismi	Formülü	E. N. (°C)
12:0	Laurat	n - dodekanoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-COO}^-$	44.2
14:0	Miristat	n - tetradekanoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-COO}^-$	53.9
16:0	Palmitat	n - hegzadekanoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-COO}^-$	63.1
18:0	Stearat	n - oktadekanoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-COO}^-$	69.6
20:0	Araşidat	n - eikosanoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-COO}^-$	76.5
24:0	Lignoserat	n - tetrakosanoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{22}\text{-COO}^-$	86.0
16:1	Palmitoleat	cis- Δ^9 -hegzadekenoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_7\text{-COO}^-$	-0.5
18:1	Oleat	cis- Δ^9 -oktadekenoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_7\text{-COO}^-$	13.4
18:2	Linoleat	cis,cis- Δ^9 - Δ^{12} -oktadekadienoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-(CH=CH-CH}_2\text{)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-COO}^-$	-5
18:3	α -Linolenat	hepcis- Δ^9 - Δ^{12} - Δ^{15} -oktadekatrienoat	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-(CH=CH-CH}_2\text{)}_3\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-COO}^-$	-11
20:4	Araşidonat	Hepcis- Δ^5 - Δ^8 - Δ^{11} - Δ^{14} -eikosatetraenoat	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-(CH=CH-CH}_2\text{)}_4\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-COO}^-$	-49.5

Yüksek yapılı organizmalardaki doymamış yağ asitlerinin çoğunda 9 ve 10 nolu karbon atomları arasında bir çift bağ vardır. Birden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinde, çift bağlar genelde konjugasyon ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ şeklinde) göstermezler. Bunun yerine aralarına bir metilen grubu girer ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$). Doğal doymamış yağ asitlerinin çift bağlarındaki geometrik konfigürasyon cis- formundadır. Yüksek organizmalarda en bol bulunan doymamış yağ asitleri **oleat**, **linoleat**, **linolenat** ve **araşidonattır**.

Doymuş ve doymamış yağ asitleri yapısal konfigürasyon yönünden birbirlerinden önemli derecede farklılık gösterirler. Doymuş yağ asitlerinde hidrokarbon zinciri sonsuz sayıda konformasyona sahip olabilirler, çünkü her bir tek bağın tam dönme serbestliği vardır. Bunların en az enerjili ve en muhtemel konformasyonu şekilde gösterilen uzanmış halidir. Doymamış yağ asitlerinde de dönme serbestliği olmayan çift bağda, eğer cis- ise 30° 'lik bir bükülme vardır. Trans- şekli ise aynen doymuş yağ asitlerindeki benzer. Cis- şekilleri, trans- şekillerine göre daha az kararlıdır ve biri diğerine bazı katalizörlerle çevrilebilmektedir. Birden fazla çift bağ içeren yağ asitlerindeki cis- konfigürasyonu, bükülmelerden dolayı hidrokarbon zincirini kısaltır (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Doymuş ve doymamış yağ asitlerinin konfigürasyonu. (a) Doymuş, (b) Cis-çift bağ, (c) Trans-çift bağ.

Uzun zincirli yağ asitleri suda çözünmezler. Bunların sabun adı verilen Na^+ ve K^+ tuzları su içinde hidrofobik etkileşimlerle de stabilize edilen **miseller** oluştururlar.

Doymuş ve doymamış doğal yağ asitleri görünür ve yakın UV bölgede absorpsiyon göstermezler.

Doymamış yağ asitlerinin çift bağlarına, katılma reaksiyonları olabilir. Eğer doymamış yağ asitlerinin çift bağlarına H_2 katılırsa doymuş yağ asitleri oluşur. Cl_2 veya I_2 gibi halojenler de çift bağlara kolayca katılabilir. Bundan faydalanarak halojenlerle yapılan

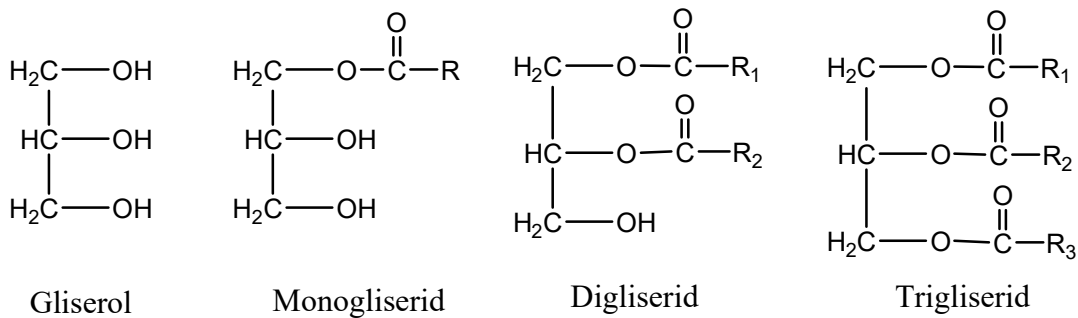
kantitatif titrasyonla, yağ asidi veya nötral yağ örneklerindeki çift bağ sayıları hakkında bilgi edinilebilir. Ayrıca doymamış yağ asitlerindeki çift bağlar, O₂ molekülü ve radikallerinin yükseltgeyici etkisi sonucu parçalanır.

Memeliler, doymuş yağ asitleri ile bir tek çift bağlı doymamış yağ asitleri sentezleyebilir. Çünkü bu canlılarda, yağ asidi zincirlerinin 9 nolu karbonundan daha sonraki karbon atomlarında çift bağ oluşturacak enzimler yoktur. Bunun sonucu olarak linoleat (18:2 cis- Δ^9, Δ^{12}) ve linolenat (18:3 cis- $\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$) yağ asitleri sentezlenemez. Bu iki yağ asidine **temel (esansiyel) yağ asitleri** adı verilir. Linoleat, **Omega-6 yağ asidi**; linolenat, **Omega-3 yağ asidi** olarak da bilinir. Esansiyel terimi bunların organizma tarafından sentezlenemediği ve diyetle alınması gerektiği anlamına gelmektedir. Diyetle alınan linolenat, birçok diğer doymamış yağ asitlerinin sentezlendiği ön madde görevini yapar. Memelilerdeki doymamış yağ asitleri palmitoleat, oleat, linoleat ve linolenattan türetilir.

Doymamış yağ asitlerinden olan 20 karbonlu 4 çift bağ içeren araşidonik asit (20:4 cis- $\Delta^{5,8,11,14}$) **eikosanoidler** adı verilen bileşiklerin türetildiği ön maddedir. Eikosanoidler üç sınıfa ayrılır: **Prostaglandinler** (hücre içi haberciler, cAMP sentezini düzenleyerek etki gösterirler), **tromboksanlar** (trombositler tarafından üretilirler ve kan pıhtılaşmasının oluşmasında rol oynarlar) ve **lökotrienler** (güçlü biyolojik sinyallerdir, akciğer hava yollarında kasların kasılmasını indükler ve aşırı üretilmeleri astım krizine yol açar). Değişik eikosanoidler farklı hücre tiplerinde farklı sentetik yollarla üretilir.

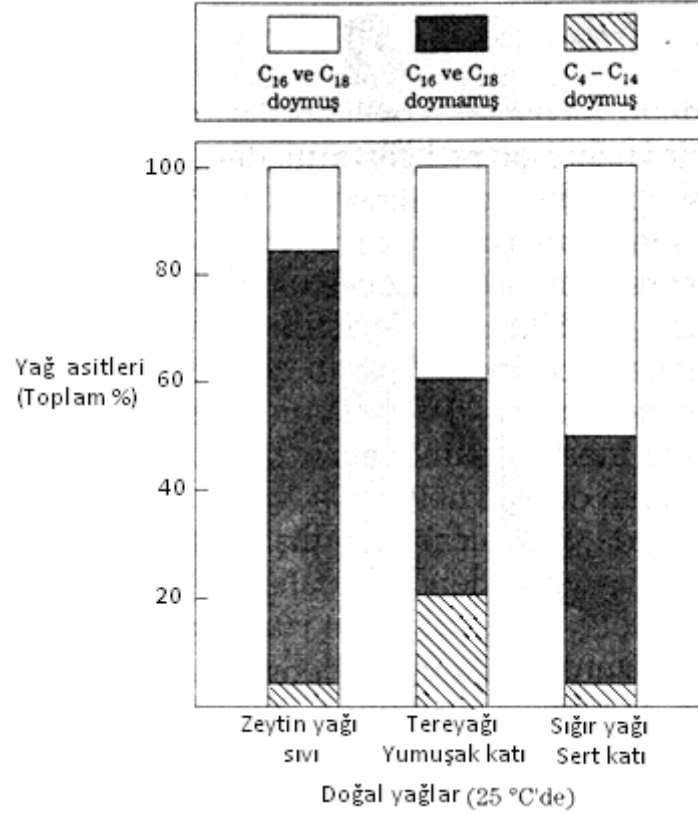
6.2. NÖTRAL YAĞLAR

Açılgliceroller veya gliseritler olarak da bilinen nötral yağlar, yağ asitlerinin gliserolle oluşturdukları esterlerdir. Nötral yağlar, hayvan ve bitki hücrelerindeki yağ depolarının başlıca bileşenleridir. Gliserolün üç hidroksil grubunun da yağ asitleriyle esterleşmesi sonucu oluşan bileşikler **triaçilgliserol** veya **trigliseritler** olarak bilinir.



Nötral yağların büyük kısmını trigliseritler oluşturur. Bunun yanı sıra monogliserid ve digliseritler de mevcuttur. Doğal katı ve sıvı yağlar çeşitli trigliseridlerin bir karışımıdır.

Trigliseridlerdeki yağ asitlerinin hepsi de aynı ($R_1 = R_2 = R_3$) ise **basit gliseritler**, eğer birbirinden farklı ($R_1 \neq R_2 \neq R_3$) ise bunlara da **karışık trigliseridler** adı verilir. Bitkisel yağlar, süt ürünleri ve hayvansal yağlar gibi nötral yağların çoğu, basit ve karışık trigliseridlerin kompleks karışımıdır. Bunlar zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi farklı çeşitli yağ asitlerini içerir (Şekil 6.2).



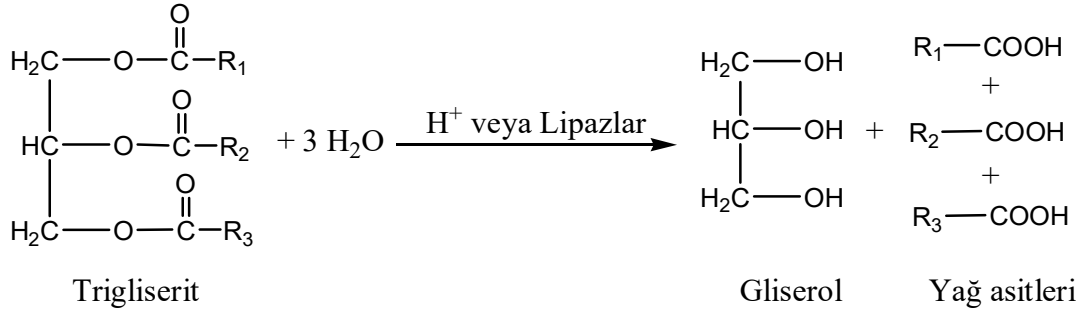
Şekil 6.2. Üç çeşit gıda yağının yağ asidi bileşimi. Zeytinyağı, tereyağı ve sığır yağı; yağ asitleri bileşimi farklı olan triaçilgliserol karışımları içerir. Bu yağların erime noktaları (ve dolayısıyla oda sıcaklığındaki halleri) yağ asidi içeriklerinin doğrudan yansımasıdır. Zeytinyağı 25°C’ de sıvı halde bulunmasını sağlayan, yüksek miktarda uzun zincirli (C₁₆ ve C₁₈) doymamış yağ asidi içerir. Tereyağındaki daha yüksek orandaki uzun zincirli (C₁₆ ve C₁₈) doymuş yağ asitleri, erime noktasını yükseltir. Böylece tereyağı oda sıcaklığında yumuşak bir katıdır. Uzun zincirli daha da çok doymuş yağ asidi içeren sığır yağı sert katıdır.

Nötral yağların erime noktaları, içerdikleri yağ asitlerinin karbon-karbon çift bağ sayısı ile azalırken; zincir uzunluğuna bağlı olarak artar. Mesela **tristearin** ve **tripalmitin** 20 °C’ de katı iken **triolein** ve **trilinolein** sıvıdır.

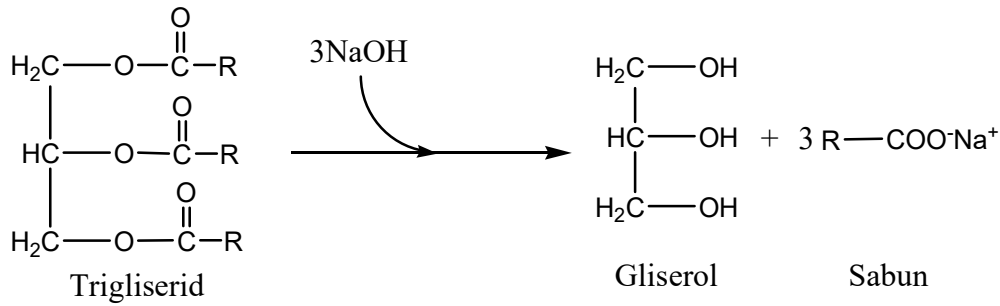
Bütün trigliseridler suda nispeten çözünmez ve miseller oluşturma eğilimleri de yoktur. Bununla beraber monogliseridler ve digliseridler polarlıkları ve serbest hidroksil

grupları yüzünden kolayca misel oluşturur. Nötral yağlar kloroform, eter, benzen ve sıcak etanolde çözünürler. Nötral yağlar sudan daha hafiftirler.

Gliseritler; asit veya bazlarla kaynatıldıkları zaman veya pankreas salgısında bulunan lipaz enzimleriyle hidrolizlenirler.



Gliseridlerin alkalilerle hidrolizine **sabunlaşma** adı verilir ve yağ asidi tuzları (sabun) ile gliserol karışımı oluşur.

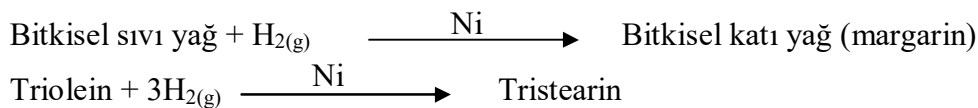


Eğer bir lipid molekülü yapısında bir yağ asidi bulunuyorsa, NaOH veya KOH ile hidroliz edildiği zaman bu yağ asitlerinin Na^+ ve K^+ tuzları, yani sabun oluşur.

Yapılarında yağ asidi bulunan lipidler sabunlaşabilen, bulunmayanlarda sabunlaşmayan lipidler şeklinde bir ayırımı tabi tutulabilirler.

Stereoidler ve **terpenler** sabunlaşmayan lipidlerdir. Kolesterolün yağ asitleriyle oluşturduğu esterler de nötral yağlardır. Çünkü hem apolar hemde iyonlaşmayan moleküllerdir.

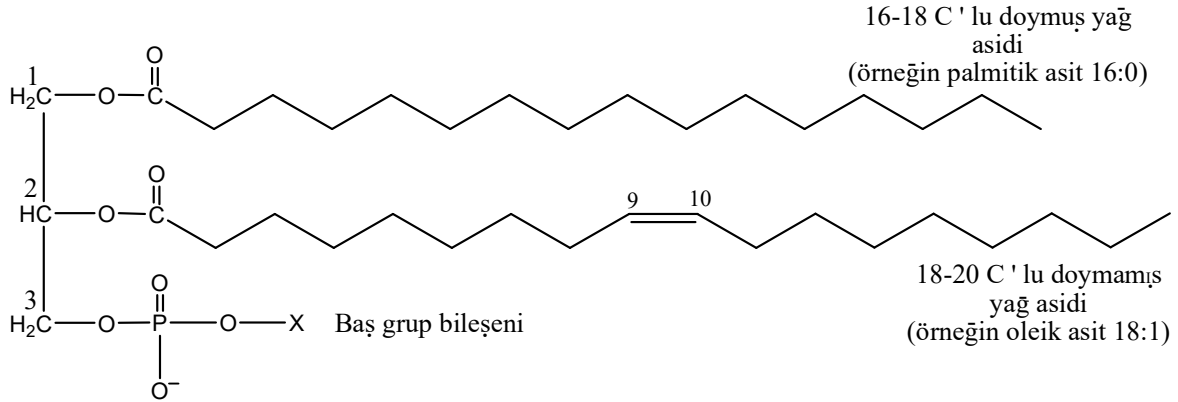
Sıvı yağlar, **katalitik hidrojenlenme** ile katı hale dönüştürülebilir. Bu işlem, uygulamada istenen kıvamda bir karışım elde edilinceye kadar sürdürülür. Karbon-karbon çift bağlarının bir kısmına $\text{H}_{2(g)}$ katılır, çift bağların tamamının doyurulmasına gerek yoktur.



6.3. FOSFOLİPİDLER

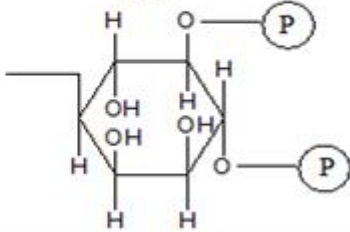
Fosfolipidler biyolojik membranların en önemli bileşenleridir. Gliserolden türetilen fosfolipidlere **fosfogliseritler** adı verilir. Bir fosfogliserit, bir gliserol omurgası ile iki yağ asidi ve fosforillenmiş bir alkolden oluşur (Şekil 6.3). Fosfogliseritlerde, gliserolün 1 ve 2 nolu karbon atomlarındaki hidroksil grubu iki yağ asidinin karboksil gruplarıyla, 3 nolu karbonun hidroksil grubu da fosforik asitle esterleşmiştir. Bu şekilde oluşan bileşiği **fosfatidik asit** denir ve en basit fosfogliserittir. Membran yapısında çok az miktarda fosfatidat bulunur. Bununla beraber fosfatidatlar, diğer fosfogliseritlerin biyosentezinde önemli ara bileşiklerdir. Fosfogliseritler, fosfatidatlardaki fosfat grubunun bazı alkollerin hidroksil grubuyla esterleşmesi sonucu oluşur. Bu alkollerin başlıcaları **etanolamin, kolin, serin, gliserol** ve **inositoldür** (Tablo 6.2).

Genel olarak, fosfolipidler C-1' de 16–18 karbonlu doymuş yağ asidi ve C-2'de 18–20 karbonlu doymamış yağ asidi içerir (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. Fosfogliserit (genel yapısı)

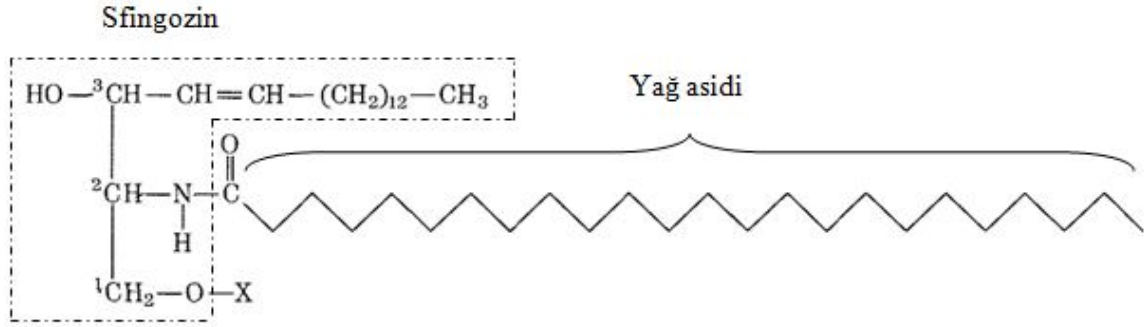
Tablo 6.2. Yaygın fosfolipidler.

Fosfolipidin adı	X' in adı	X' in formülü
Fosfatidik asit	Hidrojen	—H
Fosfatidiletanolamin	Etanolamin	—CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ ⁺
Fosfatidilkolin (Lesitin)	Kolin	—CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃
Fosfatidilserin	Serin	—CH ₂ —CH—NH ₃ ⁺ —OOC
Fosfatidilgliserol	Gliserol	—CH ₂ —CH—CH ₂ —OH HO
Fosfatidilinozitol 4,5 difosfat	miyo-Inozitol 4,5-difosfat	

Yaygın fosfolipidler, fosfodiester bağıyla baş-grup alkollerine bağlanmış diaçilgliserollerdir. Bir fosfomonoester olan fosfatidik asit ana bileşiktir. Her türev baş-grup alkolüne (—X) fosfatidil- ön eki getirilerek isimlendirilir. Fosfatidilkolinin diğer bir adı da lesitindir. Akciğer alveollerinde sürfaktan (yüzey aktif bileşik) fonksiyonunun en önemli bileşeni dipalmitoil lesitindir.

6.4. GLİKOLİPİDLER

Glikolipitler, sfingomiyelin gibi sfingozin alkolünden türemiştir. Glikolipitler, karbohidrat grubu içeren lipidlerdir (mono ve oligo sakkarit) (Şekil 6.4 ve Tablo 6.3). En basit glikolipitler, yalnız bir tek glukoz veya galaktoz molekülü ile bağlanmış bileşiklerdir ve bunlara **serabositler** adı verilir. Bu bileşiklerden, özellikle sinir hücre membranında daha çok rastlanan galaktoserebrositler glukoserebrositlerden daha yaygındır (Şekil 6.4 ve Tablo 6.3). Şeker bağlanmamış yalnız yağ asiti ile açillendirilmiş haline **seramid** denir. Şeker birimi yerine yedi tane monosakkarit biriminin (grubunun) yer aldığı glikolipitlere ise **gangliositler** denir.



Şekil 6.4. Sfingolipitin genel yapısı

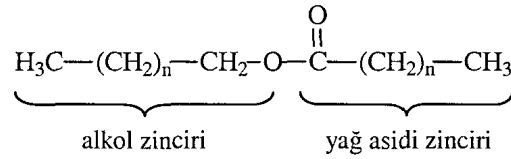
Tablo 6.3. Yaygın sfingolipitler

Sfingolipitin adı	X' in adı	X' in formülü
Seramit	Hidrojen	-H
Sfingomiyelin	Fosfokolin	$- \text{P} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}^- \end{array} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$
Nötral glikolipitler (Glikozilserebrozit)	Glukoz	
Laktozilseramit (Bir globozit)	Di-, tri- veya tetrasakkarit	
Gangliyozit	Kompleks Oligosakkarit Neu5Ac: Sialik ait (N- Asetilnöraminik asit) GalNAc: N-acetyl- galactosamine	

6.5. MUMLAR

Biyolojik mumlar, doymuş veya doymamış yağ asitleri (C_{14} – C_{36}) uzun zincirli (C_{16} – C_{30}) monoalkollerin esterlerinin bir karışımıdır. Erime noktaları 60 – 100°C arasında değişir. Mumlar aynı zamanda hidrofobik nitelikleri ve yüksek yoğunlukları ile ilgili olarak, doğada

çeşitli görevler üstlenmektedirler. Omurgalıların belli deri bezleri, deriyi ve kılları korumak, esnek, yağlı ve su geçirmez halde tutmak için mum salgılar. Mumlar genellikle deri, kürk ve tüylerin koruyucu örtüsünü teşkil ederlerken; yüksek bitkilerin yaprak ve meyvelerinin ve birçok böceğin kutiküllerininin (dış deri, epiderma) dış yüzeyini ince bir katman halinde kaplamaktadırlar. Bal mumu, ester mumlarına bir örnektir. Bal mumunun başlıca bileşenleri, uzun zincirli alkollerle palmitik asitin oluşturduğu ($C_{15}H_{31}-COOR$, $R=C_{26}-C_{34}$) esterlerdir. Ester mumları bazik ortamda sabunlaştırılabilir ve kendini oluşturan yağ alkolü ile yağ asidine ayrışır.

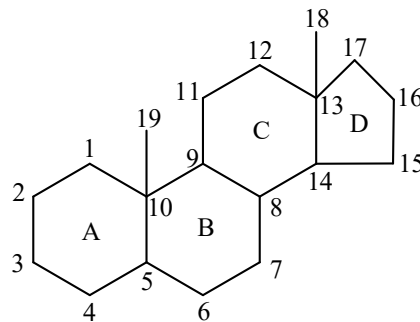


Biyolojik mumların, eczacılık, kozmetik ve diğer endüstride çok çeşitli kullanım alanları vardır. Linolein (koyun yününden), bal mumu ve ispermeçet yağından çıkarılan mumlar (balinalardan) losyon, merhem ve cila üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

6.6. STEROİDLER VE TERPENLER

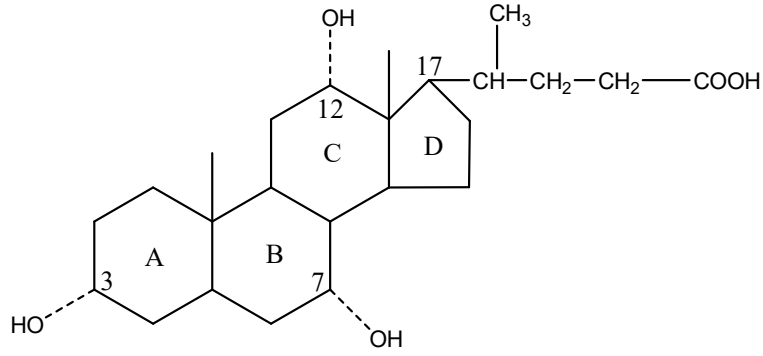
Hücrelerin sıcak alkali ortamda sabunlaşmayan lipidleri steroidler ve terpenlerdir. Bu bileşikler farklı olmalarına karşın hepsi de beş karbonlu izopren türevleridirler.

Steroidler, üç sikloheksan halkasının fenantren düzeninde kondenzasyonu sonucu oluşan **siklopentanoperhidrofenantren** türevidirler (Şekil 6.5). Doğal steroidler içinde en önemlileri; safra asitleri, cinsiyet hormonları, adrenal korteks hormonları ve sterollerdir.



Şekil 6.5. Siklopentanoperhidrofenantren halkası.

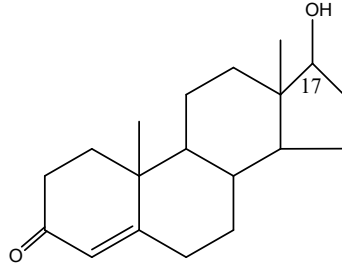
Safra asitleri içinde, insan safrasında en bol bulunanı **kolik asittir** (Şekil 6.6).



Şekil 6.6. Kolik asit.

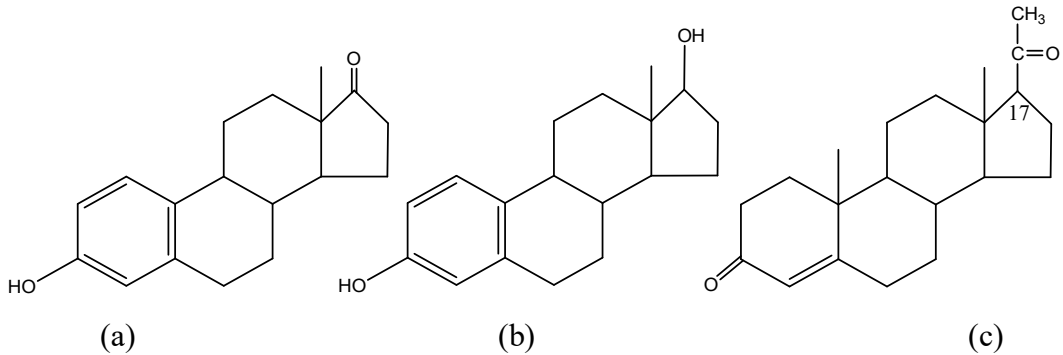
Safra asitleri suda kolayca çözünebildikleri gibi, diğer lipidleri emülsiyon haline getirerek ince bağırsaklarda sindirilmelerini kolaylaştırırlar.

Erkek ve dişi cinsiyet hormonlarının her ikisi de steroid yapısındadır. Bunlardan erkek cinsiyet hormonu olan **testosteron** testiste sentezlenir (Şekil 6.7).



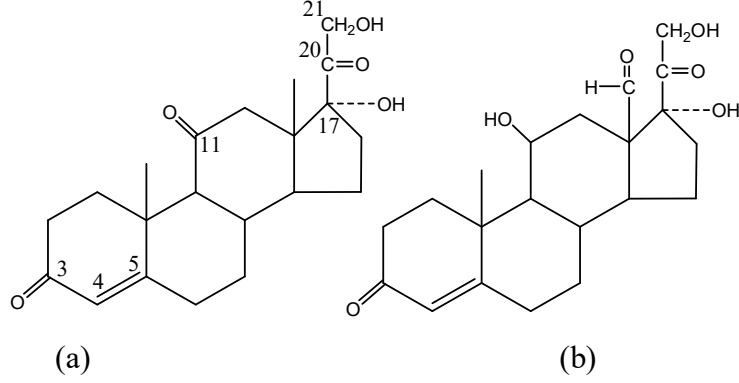
Şekil 6.7. Testosteron.

İki tip dişi cinsiyet hormonu vardır. **Östrojenler** ve **progesteron**. Üç çeşit östrojen hormonu tespit edilmiştir. Bunlar **östron**, **östradiol** ve **östrioldür** (Şekil 6.8). Bunların üçü de yumurtalıkta sentezlenir ve A halkaları fenolik özelliktedir. Progesteron ise uterus mukozasını gebeliğe hazırlayan ve gebelik oluştuğunda devamını sağlayan hormondur. Progesteronda 17. karbon pozisyonunda bir yan zincir bulunur.



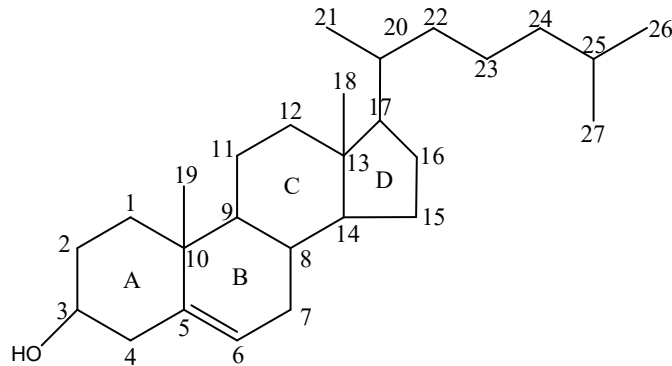
Şekil 6.8. Östrojen hormonları. (a) Östron, (b) östradiol ve (c) progesteron.

Adrenal korteksten hormon aktivitesine sahip birçok steroidler izole edilmiştir. Bunlar etkilerine göre iki sınıfa ayrılmışlardır. 1) Karbohidrat metabolizması üzerinde etkili olanlar (**Kortizon** ve **kortizol**), 2) Mineral metabolizması üzerinde etkili olanlar (**Aldosteron**) (Şekil 6.9).



Şekil 6.9. Adrenal korteks hormonları. (a) Kortizon, (b) aldosteron.

Buraya kadar saydığımız steroidler canlılarda çok az miktarda bulunurlar. Fakat steroidlerin bir grubu olan steroller canlılarda oldukça bol miktarda bulunmaktadır. **Sterollerde** 3 nolu karbondan bir alkolik hidroksil grubu ve 17 nolu karbondan ise 8 veya daha fazla sayıda karbondan oluşan dallanmış bir alifatik zincir vardır. Steroller ya serbest alkoller ya da C-3 hidroksil grubunun uzun zincirli yağ asitleriyle oluşturduğu esterler halinde bulunurlar. **Kolesterol** hayvan dokularında hem serbest hem de birleşik halde en bol bulunan steroldür (Şekil 6.10). Hayvan hücre membranlarında çok, mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarında ise az miktarlarda kolesterol mevcuttur. Yün yağında bulunan lanosterol ise, kolesterol biyosentezinde önemli bir ara bileşiktir. Bitki hücrelerinde kolesterol yoktur ve **fitosteroller** adı verilen bir grup sterollerini içerirler.



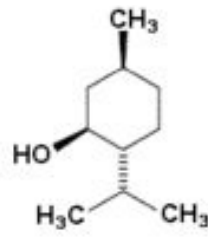
Şekil 6.10. Kolesterol yapısı

27 karbonlu kolesterolün özellikleri;

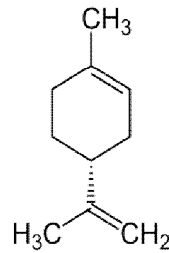
1. Hemen hemen düzlemsel ve oldukça katıdır.
2. Bileşik halkalar C-C bağlarının rotasyonuna izin vermez.
3. Dokularındaki en önemli sterol olan kolesterol, bir polar baş grupla ve açık halka yaklaşık 16 karbonlu yağ asidi kadar uzun bir apolar hidrokarbon gövdeyle çift yönlüdür.
4. Zar yapısında önemli görevleri vardır.
5. Zar yapısındaki görevlerine ek olarak belirli biyolojik aktiviteleri olan ürünler için öncül maddelerdir (örneğin steroid hormonları gen ifadenmesini düzenleyen etkin biyolojik sinyallerdir).
6. Bağırsakta deterjan görevi gören safra asitleri öğünlerdeki yağları emülsifiye ederek (küçük parçalara ayırarak) sindirici lipazların kolayca ulaşabilmelerini sağlayan polar kolesterol türevleridir.
7. Biyolojik zarlarda kolesterolün yapısal rolü steroid hormonlarla sinyal iletir.
8. Sentezlenebilir.
9. Lipoproteinlerin yapısını oluşturur.

Terpenler:

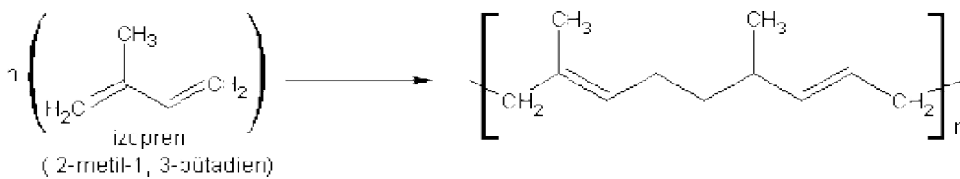
Terpenlerin temel bileşenleri izoprendir. Monoterpenler, iki izopren birimi içerirler (limonen, mentol) (Şekil 6.11). Altı izopren birimi taşıyan skualen ise hayvan organizmasında meydana gelen bir terpen olup, kolesterol biyosentezinde bir ara bileşik(ara ürün) olarak yer alır. Steroidlerle terpenlerin yakınlığı buradan ileri gelir. (Şekil 6.12)

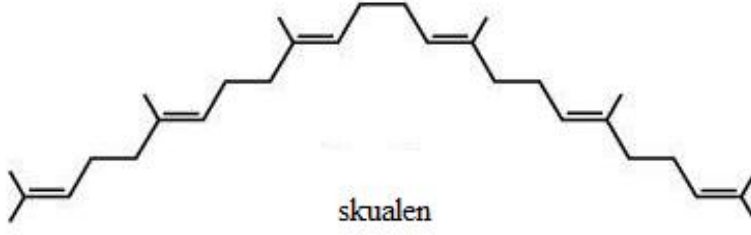


Mentol



Limonen





Şekil 6.12. Mentol, limonen, izopren ve skualen

Sekiz izopren birimi içeren terpenlere karoten denmektedir. A-vitamini bir karoten türevidir. Birçok doğal yağlara sarı renk veren β -karoten yapısında bileşiklerdir.

7. BÖLÜM: NÜKLEOTİDLER ve NÜKLEİK ASİTLER

Nükleotidlerin hücre metabolizmasında çok farklı, önemli görevleri vardır. Nükleotidler, nükleik asitlerin bir yapı taşı olmalarının yanı sıra, enerji taşıyıcılığı, enzim kofaktörlerinin bileşeni olmak ve kimyasal habercilik gibi işlevlere de sahiptirler. Nükleotidlerin görevlerinin şüphesizki en önemlisi genetik bilginin korunması ve taşınması görevini üstlenen **deoksiribonükleik asit (DNA)** ve **ribonükleik asit (RNA)** gibi zincir şeklindeki nükleik asitlerin yapı taşları olmalarıdır. Her proteinin ve sonucunda her biyomolekül ve hücre bileşeninin yapısı, hücrenin nükleik asitinin nükleotit dizisinde programlanmış olan bilginin ürünüdür. Genetik bilginin bir **gen**'den diğerine geçişi ve depo edilme yeteneği yaşam için önemlidir. Gen kalıtımın en küçük birimidir. Gen, bir proteinin sentezi için gerekli kalıtsal bilgiyi taşıyan DNA parçasıdır.

Kalıtsal özelliklerin sonraki kuşaklara bağımsız birimler şeklinde aktarıldığı fikri ilk defa 1865 yılında Gregor Mendel tarafından ileri sürülmüştür. Mendel zamanında gen kavramı gelişmediği için kalıtım faktörlerinden söz edilmiştir.

Hayatın sırrı, DNA yapısında yer alan dört **bazın (adenin, guanin, timin ve sitozin)** ve bu bazların **nükleotidlerinin (dAMP, dGMP, dTMP ve dCMP)** milyonlarca değişik dizilişinin belirli bir anlam ifade edişinde gizlidir.

DNA, polipeptid (protein) zincirinde yer alan 20 aminoasitin değişik dizilişini denetleyerek çok farklı fonksiyonlara sahip proteinlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bir tek kromozoma sahip olan *E. coli* hücrelerinin DNA'sı yaklaşık 4.600.000 baz çiftine sahiptir. Bu bazların yan yana yazılması ise 740 sayfa tutmaktadır. Ortalama olarak bir baz çifti 600 dalton kadardır. *E. coli* kromozomu (1 DNA= 1 kromozom) 4.6 milyon baz çiftinin doğrusal biçimdeki uzunluğu 1.7 mm yani *E. coli* hücre uzunluğunun (2 µm) 850 katıdır.

Ökaryotik hücreler, prokaryotik hücrelere nazaran daha büyük ve pek çok DNA molekülüne sahiptirler. Ökaryotik hücrelerin DNA'ları proteinlerle birleşerek **kromatin iplikçiklerini** oluşturmuş ve iki katlı nükleus membranı ile sarılmıştır.

Bir insan hücresi 46 (23 çift) kromozoma sahiptir. Bu 46 kromozomun kapsamında bulunan DNA zincirlerinin bazıları yan yana yazılacak olursa 820.000 sayfa tutmaktadır. İnsan hücre DNA'sı 2.9×10^9 baz çiftine sahiptir. Bir insan hücrelerinin toplam DNA molekülü düz bir iplik haline getirilirse boyu 2 m' yi bulmaktadır. Bir insan vücudunda ortalama 100 trilyon (10^{14}) hücre bulunur. Bu kadar hücrenin toplam DNA molekülleri uç uca eklenecek olursa 200 milyar km bir uzunluk meydana gelecektir. Bu uzunluk dünyanın çevresi (40.000 km) ya

da dünya ile güneş arasındaki uzaklıkla ($1,5 \times 10^8$ km) karşılaştırılınca hücrelerimizdeki olağanüstü DNA paketlenmesi ortaya çıkmaktadır.

Şu halde bir tek hücrenin hafızasındaki **genetik bilgi**, mevcut bilgisayarlarla mukayese edilemeyecek derecede daha yüksek ve daha karmaşıktır. Bu kadar muazzam kapasiteye sahip genetik bilginin yerinde ve zamanında **transkripsiyon (yazımı)** ve **genlerin regülasyonu (düzenlenmesi)** için ayrıca programlanması gerekmektedir. Hücrenin bu kadar önemli molekülü olan DNA'nın genetik materyal olduğunun anlaşılması uzun yıllar almıştır.

Kalıtımın **kromozom**lara bağlı olarak taşındığına çok önceki yıllarda inanılmıştır. Göz ve saç rengi gibi özelliklerin ana babadan çocuklara geçtiği dikkatleri çekmiştir. Bununla beraber kalıtımı taşıyan molekülün kimyasal temeli 20. yüzyıla kadar anlaşılammıştır.

1860 yılında sperm ve yumurtanın kalıtımda rol oynadığı anlaşılmış ve 1868 yılında spermde bulunan kalıtım materyalin büyük kısmının çekirdekte olduğu görülmüş ve çekirdeğin kalıtımda önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Sperm ve yumurta hücrelerinde kromozom sayısının (gonadlarda mayoz bölünme ile) yarıya indiği (n kromozomlu haploid) gözlenmiştir.

1903 yılında kalıtımı sağlayan faktörlerin yani genlerin fiziksel birimler halinde kromozomlar üzerinde bulunması gerektiği bir hipotez olarak ileri sürülmüş ve genlerin kromozomlarda olduğu açıkça ortaya konmuştur. Bir tek kromozom binlerce gen taşıyabilir.

Ökaryotik hücrelerin genetik materyalinin kromozom adı verilen daha küçük birimlere dağıldığı gösterilmiştir. Her organizmadaki kromozom sayısı o canlıya has bir durumda ortaya çıkar (Tablo 7.1).

Tablo 7.1. Çeşitli türlerin normal kromozom sayıları.

Organizmalar	Kromozom Sayısı
Bakteri	1
Meyve sineği (Drosophila)	8
Kurbağa	26
Bal arısı (dişi)	32
Kedi	38
Fare	40
Rehesus maymunu	42
Tavşan	44
İnsan	46
Şempanze	48
Tavuk	78

Bir canlının biyolojik bakımdan daha gelişmiş bir grupta bulunması ile kromozom sayısı arasında herhangi bir ilişki yoktur.

Bir ökaryotik hücrenin her bir kromozomu, *E. coli* hücrelerinden 4–100 kat daha büyüktür ve bir tek çift sarmal DNA içermektedir. Örneğin, insandaki daha küçük kromozomlardan birinin DNA'sı *E. coli*'nininkinden neredeyse 15 kat daha uzundur ve yaklaşık 30 mm uzunluğa sahiptir. İnsanın 24 farklı tip (22 XX eş çift ve X, Y eşey kromozomları) kromozomundaki DNA moleküllerinin uzunluğu, 25 katın üzerinde bir değişim göstermektedir. Ökaryotlardaki her bir tip kromozom karakteristik bir gen grubu taşımaktadır. Örneğin insanda diploid kromozom sayısı olan $2n=46$ (23 çift) kromozomun 44 tanesi yani 22 çifti **otozom**lardır. Geri kalan bir çift **genozom** (eşey kromozomu) olarak kadınlarda iki tane X kromozomu (44 XX + XX yani ♀=22 çift XX+XX), erkeklerde ise bir X ve bir Y kromozomu (44 XX + XY yani ♂=22 çift XX+XY) bulunur.

DNA'nın genetik bilgiyi taşıyan molekül olduğuna ilişkin doğrudan kanıtlar 1944 yılında yapılan deneylerden elde edilmiştir. DNA molekülünde bulunan bir takım özellikler DNA'nın genetik materyal olduğunu desteklemektedir.

1. Bir organizmanın hücrelerindeki DNA miktarı inanılmayacak derecede sabittir. DNA miktarı beslenme, çevre koşulları ve metabolik olaylara göre azalıp çoğalmaz. Böyle bir özellik genetik bilgiyi taşıyan molekülde aranan önemli bir özelliktir. Çünkü bir canlının bütün hücreleri aynı genetik bilgiyi taşır. Ayrıca bir canlıda veya hücrede bulunan DNA miktarı, canlının yaptığı işlerin çokluğu ve karmaşıklığı ile orantılıdır. Örneğin bir bakteri hücresi 0,01 pg DNA, bir memeli hücresi ise 6 pg DNA (yani 600 kat) içermektedir. Bakteri hücre ağırlığının % 1'ini oluşturan tek bir DNA molekülü (1 kromozom) vardır.

2. Bir organizmanın diploid hücresinde her kromozom çift olarak ($2n$) bulunur. Diploid (bir çift eş kromozom içeren) ökaryot hücrelerde yaklaşık tüm DNA hücre çekirdeğindedir. **Histon** sınıfı bazik proteinlerle bağlı olarak kromozomlar arasında paylaşılmıştır (nükleozom).

Haploid hücrede ise kromozom sayısı yarıya (n) inmiştir. Sperm ve yumurta hücresinde (eşey hücreleri) mayoz bölünme ile n kromozomlu DNA iplikleri oluşur. n kromozom sperm ve n kromozom yumurtadan olmak üzere $2n$ kromozomlu bir döllenmiş yumurta (**zigot**) oluşur. O halde genetik materyal kromozomlarda taşınmakta, kromozom sayısı yarıya indiği zaman DNA miktarı da yarıya inmektedir.

Ökaryotik hücreler prokaryotlardan daha fazla DNA içerir. Meyve sineği (*Drosophila*)'nin hücreleri *E. coli* hücrelerinden yaklaşık 25 kat daha fazla DNA içerir. İnsan hücreleri ve diğer pek çok memeli hücresi *E. coli*'nin yaklaşık 600 katı kadar DNA'ya

sahiptir. Pek çok bitki ve amfibi hücreleri (hem karada hem de suda yaşayan) çok daha fazla DNA içermektedir. Ökaryotik hücreler bakteri hücrelerinden daha fazla DNA içermesine karşın, bir ökaryotik genomda daha büyük oranda kodlanmayan DNA bulunur. *E. coli* DNA' sının her milimetresinde 2500'ün üzerinde gen bulunurken, insan DNA' sının her milimetresinde yaklaşık 50 gen vardır. Bu kodlanmayan DNA' nın çoğu, ökaryotik kromozom yapısının düzenlenmesinde önemli rol oynayabilmektedir.

Amfibialar, örneğin kurbağa insana göre daha fazla DNA içerir (Tablo 7.2). Amfibialarda gen çeşidinden çok, bir genin birçok kopyası bulunmaktadır.

Tablo 7.2. Bazı organizma hücrelerinin ve virüslerin yaklaşık DNA miktarları.

Türler	Hücre veya virüs başına DNA miktarı (pg)	Nükleotit çifti sayısı (milyon)
Memeliler	6,0	5,5
Amfibialar	7,0	6,5
Sürüngenler	5,0	4,5
Kuşlar	2,0	2000
Balıklar	2,0	2000
Yüksek bitkiler	2,5	2,3
Funguslar	0,02–0,17	20
Bakteriler	0,002–0,06	2,0
T ₄ bakteriyofajı	0,00024	0,17

Hassas kromatografik yöntemlerle biyolojik bakımdan değişik düzeyde bulunan türlerin DNA'larının baz bileşimi incelenmiştir. DNA'nın yapısı hakkında en önemli bilgi 1950 yılında Erwin Chargaff ve arkadaşlarının çalışmaları ile elde edilmiştir.

Araştırmacılar dört nükleotid bazının, farklı organizmaların DNA yapısında değişik oranlarda bulunduğunu ve bazı baz miktarlarının birbiriyle yakın ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Tablo 7.3).

Tablo 7.3. Bazı organizmalarda % mol baz bileşimleri.

Organizmalar	% mol Baz Bileşimi				Baz Oranları		
	A	T	C	G	A/T	G/C	Pürin/Primidin
İnsan	30,9	29,4	19,8	19,9	1,05	1,00	1,04
Koyun	29,3	28,3	21,0	21,4	1,03	1,02	1,03
Tavuk	28,8	29,2	21,5	20,5	1,02	0,95	0,97
Buğday filizi	27,3	27,1	22,8	22,7	1,01	1,00	1,00
<i>E. coli</i>	27,7	23,6	25,7	26,0	1,04	1,01	1,03

Chargaff birçok değişik türden toplanan DNA'lardan aşağıdaki sonuçlara ulaşmıştır.

1. DNA'yı meydana getiren baz bileşimi genelde türden türe değişiklik gösterir.
2. Aynı türün değişik dokularından izole edilen DNA'lardaki baz bileşimi aynıdır.
3. Bir türün DNA'sındaki baz bileşimi organizmanın yaşı, beslenme durumu veya çevre değişikliği ile değişmez (devamlı aynıdır).

4. Tür dikkate alınmaksızın tüm hücre DNA'larında adenozin bazı sayısı, timidin bazı sayısına ($A=T$), guanozin bazı sayısı ise sitidin bazı sayısına ($G=C$) eşittir. Bu eşitliklerden **pürin bazlarının** sayısının **primidin bazlarının** sayısına eşit ($A+G = T+C$) olduğu anlaşılır. Bu nicel ilişkiler zaman zaman **Chargaff kuralları** olarak anılır ve birçok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır. Ayrıca bu kurallar DNA'nın üç boyutlu yapısının oluşturulmasında, genetik bilginin şifrelenmesinde ve nesilden nesile aktarılmasında da rol oynar.

Birbirine yakın türlerden elde edilen DNA'ların baz bileşimleri birbirine yakındır. Bu özelliklerden yararlanılarak canlılar sistematik olarak sınıflandırılabilir. Bu bilgilerin elde edilmesinden sonra DNA'nın kalıtsal bilgiyi taşıyan molekül olduğundan kimsenin şüphesi kalmamıştır. DNA'nın bilinen tek işlevi genetik bilginin depolanması ve aktarılmasıdır.

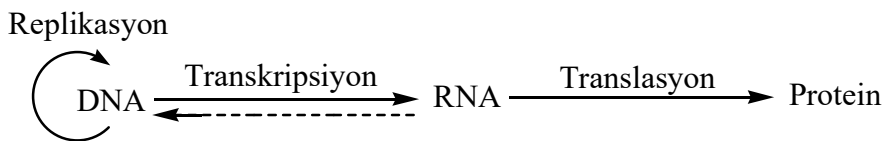
Bundan sonra dikkatler DNA'nın yapısının ortaya çıkarılmasına çevrilmiştir.

Kalıtsal bir bilgiyi taşıyan bir molekülün üç önemli özelliği bulunması gerekiyordu.

1. Bu molekül kendini doğru bir şekilde eşleyebilmeli ve uzun yıllar boyunca nesilden nesile aktarılan kalıtsal bilgi değişmeden kalmalıdır.
2. Biyolojik değişmeye fırsat vermek için bu molekül kendini eşlerken çok nadir de olsa mutasyona imkan vermelidir.
3. Kalıtsal bilgiyi taşıyan bir molekül hücrede sentezlenen bütün proteinlerin sentezini denetleyebilmelidir.

Daha sonraki yıllarda yapılan bütün çalışmalar, DNA molekülünün bu üç özelliği taşıdığını ve kalıtsal bilgiyi taşıyan molekül olduğunu ortaya koymuştur.

Santral (merkezi) dogma, genetik bilginin DNA'dan RNA'ya ve daha sonra proteine aktarıldığını belirtir (Şekil 7.1). Kavram 1958 yılında F. Crick tarafından önerilmiştir.



Şekil 7.1. Normal hücrede genetik bilginin akışı. Noktalı çizgi bazı tümör virüslerinin RNA'larının içerdiği bilgiden DNA sentezlediğini göstermektedir (1970). Çok az kanıtın bu görüşü desteklediği zamanlarda ortaya atılan bu ilke önemlidir.

Genetik bilginin saklanması ve aktarılmasında **santral (merkezi) dogma** üç süreçle belirlenir.

1. Kendini eşleme (replikasyon): DNA'nın eş yavru DNA molekülleri oluşturmak üzere kendini kopyalamasıdır. Bu olay sayesinde hücre bölünmesi sırasında yavru hücrelere pay edilecek olan kalıtsal maddenin miktarı ve özellikleri korunmuş olur. Kalıtsal maddenin nesilden nesile değişmeden geçmesinin temeli DNA moleküllerinin kendilerini eşleme yeteneğidir.

2. Yazım (transkripsiyon): DNA'daki genetik bilginin ribozomlara taşınmak üzere mRNA şeklinde yazılmasıdır.

3. Çevirme (translasyon): Protein biyosentezi sırasında özgül aminoasit sırasının belirlenmesinde, kalıp olarak bir RNA'nın kullanıldığı, ribozomlar üzerinde genetik bilginin okunma sürecidir.

Bir canlının genetik özellikleri, canlının DNA'sının belli bir bölümünde değişiklik yapılarak ya da bir canlıya başka bir canlı türüne ait bir gen aktararak değiştirilebiliyor. Herhangi bir canlıya aynı türden başka bir canlıdan alınan ve istenen bir özelliği taşıyan yeni bir gen aktarılabilir gibi farklı türlerden canlıların genleri de birbirine aktarılabilir.

Değişik kaynaklardan elde edilen DNA iplikçiklerinin birbiriyle eşleşerek melezleşmesi moleküler genetiğin temelini teşkil eder. Özgül genlerin tanınması ve saflaştırılmasında bu melezleşme teknikleri güvenilirdir. Bir cinayetten sonra tek bir saç telinden kişinin tanınması ve belirtileri ortaya çıkmadan onlarca yıl önce hastalıkların tahmini gerçekleşebilir.

7.1. NÜKLEİK ASİTLERİN YAPISAL ÜNİTELERİ VE MAKROMOLEKÜL YAPISI

Nükleik asitler kalıtsal bilgiyi taşımakla kalmayıp, bu bilgiyi protein sentezine de aktarmaktan sorumludurlar. Bir polipeptidin sentezinden sorumlu DNA parçasına *gen* adı verilmektedir. Temelde proteinler için asıl şifreyi DNA molekülleri taşımaktadır. DNA'nın protein sentezini denetleyebilmesi için diğer birkaç nükleik asit çeşidinin varlığı gereklidir.

Nükleik asitler iki gruba ayrılır.

1. Deoksiribonükleik asitler (DNA)
2. Ribonükleik asitler (RNA)

Her iki nükleik asit de nükleotidlerin polimerize olması ile meydana gelmektedir.

Makromoleküler yapıda şeker ve fosfat üniteleri fosfodiester bağı ile birbirine bağlanarak molekülün ana omurgasını oluşturmakta, bazlar ise iki omurgayı bir arada

tutmaktadır. Nükleik asitler birçok yapısal ünitenin bir düzen dahilinde bir araya gelmesi ile ortaya çıkmıştır.

Nükleik asitler hidrolizleri sonucunda, nükleotid birimlerine yıkılırlar ve hidroliz sürdürülecek olursa da alt birimlere yıkılırlar (Tablo 7.4).

Tablo 7.4. DNA ve RNA'nın yıkım ürünleri.

Bileşen	RNA	DNA
Asit	Fosforik asit	Fosforik asit
Şeker	β -D-riboz	β -D-2-deoksiriboz
Bazlar	Adenin (A)	Adenin (A)
	Guanin (G)	Guanin (G)
	Sitozin (C)	Sitozin (C)
	Urasil (U)	Timin (T)

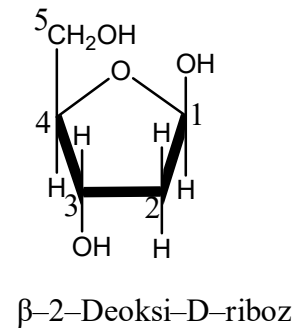
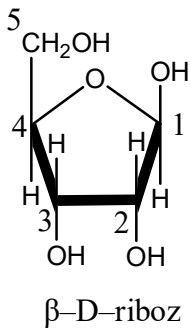
Nükleik asitlerin yapısını oluşturan üniteler şunlardır:

a) Şekerler b) Pürin ve Primidin bazları c) Nükleosidler d) Nükleotidler

Şimdi bu yapısal birimleri sırasıyla inceleyelim.

7.1.1. Şekerler

Şekerler, nükleik asitlerin ana omurgası boyunca yer alan ünitelerdir. RNA yapısında β -D-riboz şeker; DNA yapısında ise β -D-2-deoksiriboz şeker yer almaktadır.

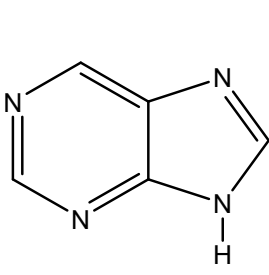


Nükleik asitlerin yapısında bulunan şekerler 3'-OH ve 5'-fosfat grupları ile reaksiyona girmektedir. Bazlar ise şekerlerin 1 nolu karbonuna bağlanmaktadır.

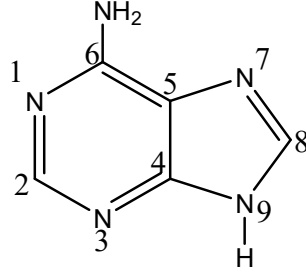
7.1.2. Pürin ve Primidin Bazları

Nükleik asitlerin yapısında bulunan bazlar başlıca iki gruba ayrılmaktadır. Her ikisi de aromatik karakterdedir.

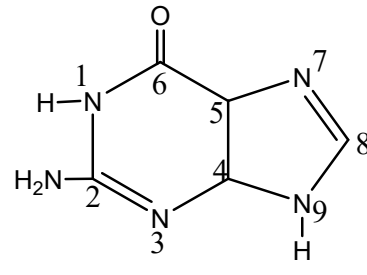
Pürinler



Pürin

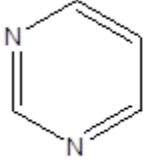


Adenin (A)

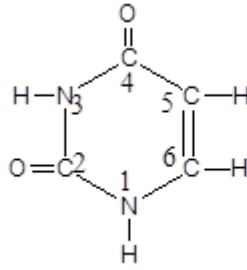


Guanin (G)

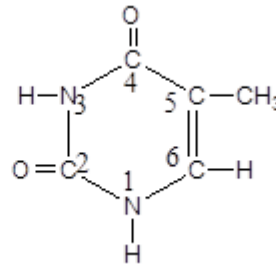
Primidinler



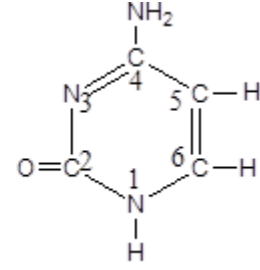
Primidin



Urasil (U)

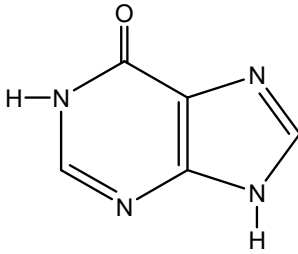


Timin (T)

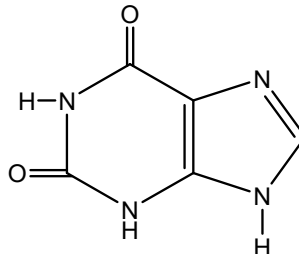


Sitozin (C)

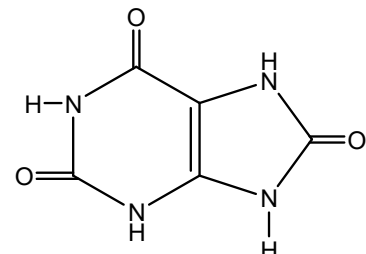
Primidinlerden timin ve sitozin DNA yapısında, urasil ve sitozin RNA yapısında yer almaktadır. Pürin ve primidin bazları serbest halde iken suda pek çözünmezler. Burada saydığımızın dışında çok sayıda pürin ve primidin türevleri vardır. Nadir bazlar olarak adlandırılan bu bazlardan pürin türevleri olan ksantin, hipoksantin, ürik asit nükleik asitlerin yapısında az da olsa yer alırlar.



Hipoksantin



Ksantin



Ürik asit

Nükleik asitlerin pürin ve primidin bazları 260–280 nm'de UV ışığı kuvvetle absorblarlar. Bundan faydalanılarak serbest bazların ve aynı zamanda nükleosit ve

nükleotidlerin kantitatif analizi yapılabilir. Kromatografik ve elektroforetik metotlarla pürin ve primidin bazları birbirinden kolayca ayrılabilirler.

7.1.3. Nükleosidler

Pürin ve primidin bazlarının bir β -D-riboz ve β -D-2-deoksiriboz şekerinin 1 nolu karbonuna bağlanması ile nükleositler meydana gelmektedir. β -D-riboz veya β -D-2-deoksiriboz şekerin 1 nolu karbonu, primidinlerin 1 nolu azotuna; pürinlerin ise 9 nolu azotuna bağlanmıştır. Bu N-glukozit bağı bütün doğal nükleositlerde β - şeklidir.

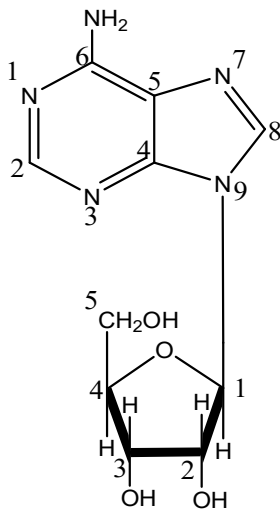
Nükleositler içerdikleri pentoz şekerin cinsine göre ikiye ayrılırlar.

1. Ribonükleositler
2. Deoksiribonükleositler

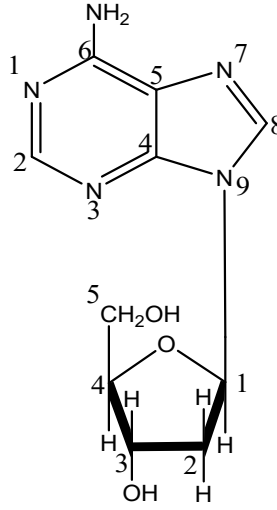
Nükleositler yapılarındaki baz ve şekere göre isimlendirilir (Tablo 7.5).

Tablo 7.5. Başlıca ribonükleositler ve deoksiribonükleositler.

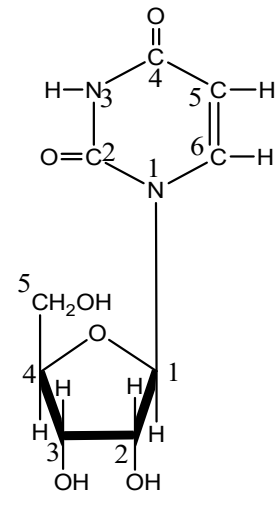
Baz	Ribonükleositler	Baz	Deoksiribonükleositler
Adenin (A)	Adenozin	Adenin (A)	Deoksiadenozin
Guanin (G)	Guanozin	Guanin (G)	Deoksiguanozin
Urasil (U)	Uridin	Timin (T)	Deoksitimidin
Sitozin (C)	Sitidin	Sitozin (C)	Deoksisitidin



Adenozin



Deoksiadenozin



Üridin

Nükleositler, serbest bazlara göre suda daha iyi çözünürler. Kromatografik metotlarla kolayca ayrılabilir ve teşhis edilebilirler.

7.1.4. Nükleotidler

Nükleotidler, nükleositlerin fosfat esterleridir. Pentoz şekerlerin en az bir hidroksil grubu esterleşmiştir. En çok rastlanan esterleşme 5 nolu karbon atomu üzerindedir. Böylece nükleosit–5'–fosfat veya 5'–nükleotid oluşur (Tablo 7.6 ve 7.7). Üstlü sayı (5') pentoz şekerdeki bir karbon atomunu belirtir. Üstsüz sayı ise pürin veya primidin bazlarının halka atomlarının birisine işaret eder. Pentoz şekerin türü ise nükleotid adına yeni bir takımın eklenmesi ile belirtilir. Örneğin; 5'–ribonükleotid veya 5'–deoksiribonükleotid gibi...

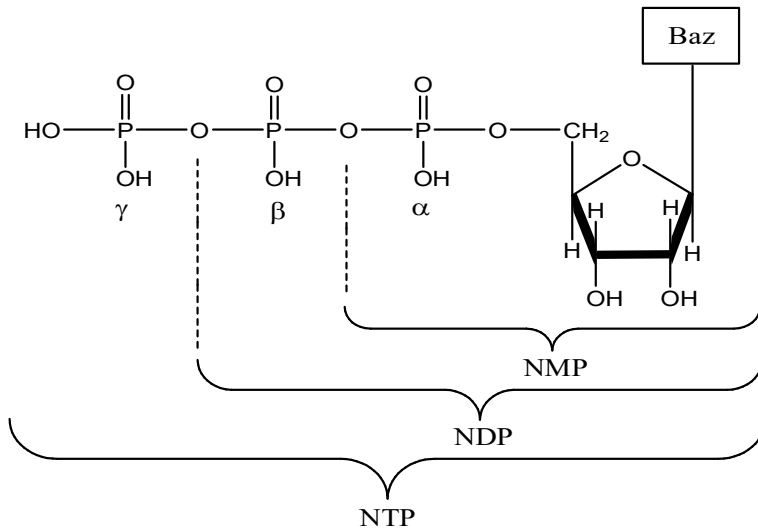
Adenozin 5'–hidroksil grubunun esterleşmesi ile adenozin 5'–fosfat veya kısaca **adenilat** oluşur. Bazen **adenilik asit** adı da verilen bu bileşiğin fizyolojik şartlarda fosfat grubunun iyonlaşması sebebiyle adenilat şeklinde isimlendirilmesi uygundur.

Adenilat; **AMP** şeklinde kısaltılmış olarak yazılır ve adenozin monofosfat şeklinde isimlendirilir.

Tablo 7.6. Nükleotid çeşitleri.

Baz	Ribonükleotid 5'-fosfatlar	Baz	Deoksiribonükleotid 5'-fosfatlar
Adenin	Adenilat: Adenozin monofosfat (AMP)	Adenin	Deoksiadenilat:Deoksiadenozin monofosfat (dAMP)
Guanin	Guanilat: Guanozin monofosfat (GMP)	Guanin	Deoksiguanilat:Deoksiguanozin monofosfat (dGMP)
Urasil	Üridilat: Üridin monofosfat (UMP)	Timin	Deoksitimidilat: Deoksitimidin monofosfat (dTMP)
Sitozin	Sitidilat: Sitidin monofosfat (CMP)	Sitozin	Deoksisitidilat: Deoksisitidin monofosfat (dCMP)

Ribonükleotidler ve deoksiribonükleotidler bir, iki veya üç fosfat grubuna sahip olabilirler (Şekil 7.2).

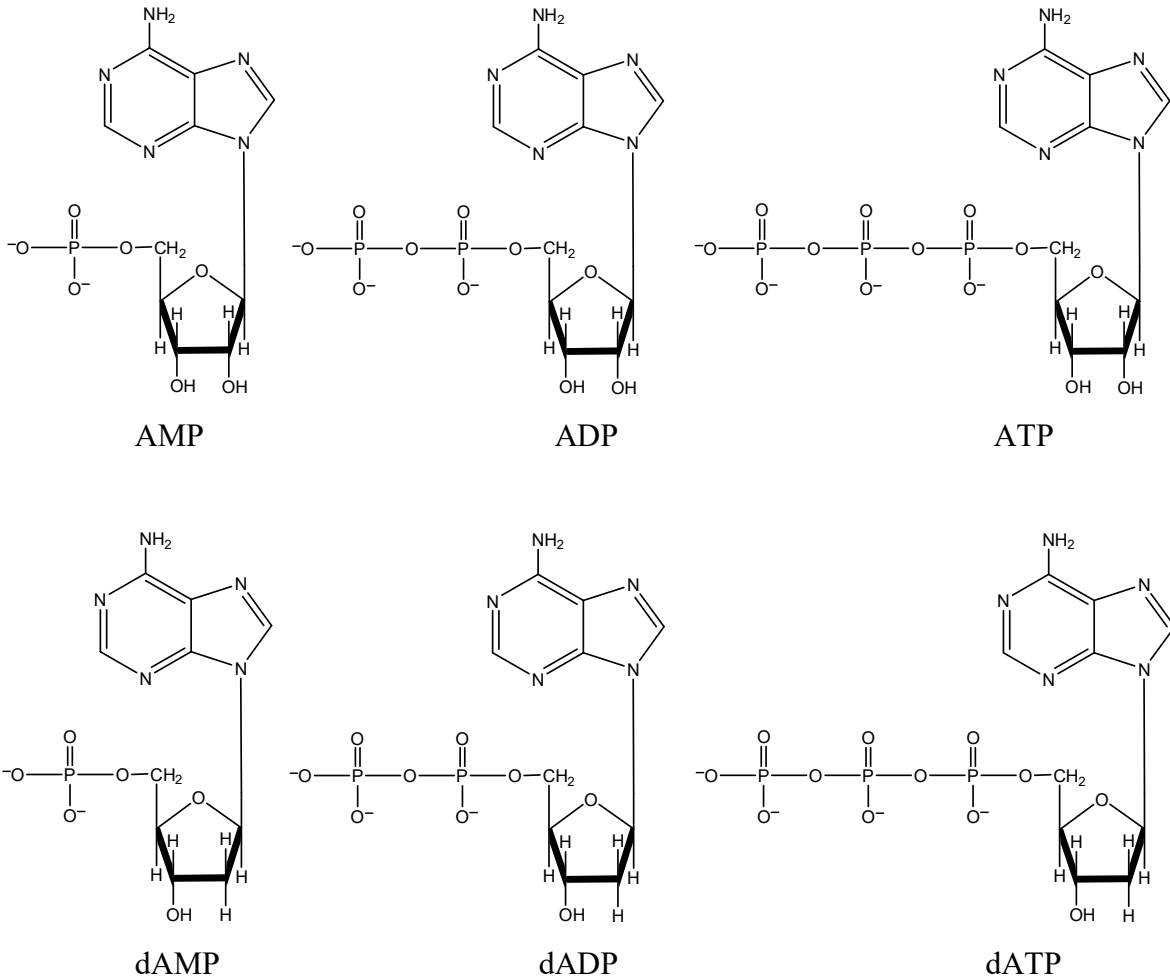


Şekil 7.2. Nükleosit fosfatların (Nükleotidlerin) yapıları ve kısaltılmış isimleri. Riboz şekerinin 2 nolu karbonunda bulunan –OH yerine –H olursa; deoksiribonükleotid 5'–mono–, 5'–di– ve 5'–tri–fosfatlar oluşur.

Tablo 7.7. Ribonükleotidler ve deoksiribonükleotidler

Ribonükleotidler			
Baz	5'-monofosfatlar	5'-difosfatlar	5'-trifosfatlar
Adenin (A)	AMP	ADP	ATP
Guanin (G)	GMP	GDP	GTP
Sitozin (C)	CMP	CDP	CTP
Urasil (U)	UMP	UDP	UTP

Deoksiribonükleotidler			
Baz	5'-monofosfatlar	5'-difosfatlar	5'-trifosfatlar
Adenin (A)	dAMP	dADP	dATP
Guanin (G)	dGMP	dGDP	dGTP
Sitozin (C)	dCMP	dCDP	dCTP
Timin (T)	dTMP	dTDP	dTTP



Nükleotid difosfatlar ve trifosfatlar (NDP' ler ve NTP'ler) kuvvetli asidik özellik gösterirler. 3 ve 4 proton verebilirler. Yapıdaki kondanse fosforik asidin ayrışabilen iki protonunun pK değerleri 1,0 ve 6,2'dir. Bu gruplar hücre içinde yüksek konsantrasyonda

bulunan Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonları ile kompleks oluştururlar. Sitoplazmada Mg^{+2} yüksek konsantrasyonda bulunduğundan NDP ve NTP' ler Mg^{+2} kompleksi halinde bulunurlar. NDP ve NTP'lerin yapısında bulunan β - ve γ - fosfat grupları spesifik enzimler yardımıyla kademeli bir şekilde hidrolizlenerek inorganik fosfat (P_i) halinde serbest hale geçirilir.

Nükleotidler tüm biyokimyasal süreçlerde katkıları olan bileşiklerdir. Nükleotid trifosfatların (NTP) hücre içinde önemli fonksiyonları vardır.

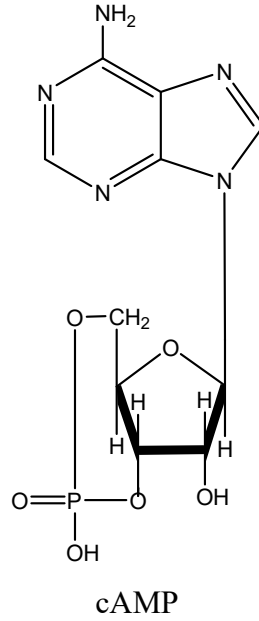
a) ATP kimyasal enerjinin merkezi taşıyıcısı ve değişik enzimatik reaksiyonlarda fosfat, pirofosfat grupları taşıyıcısı rolünü oynar. Nükleosid trifosfatların hidrolizi kimyasal enerji açığa çıkarır ve birçok biyokimyasal reaksiyonun yürümesini sağlar. ATP, ADP'ye dönüşür. Spesifik biosentez yollarında kimyasal enerji diğer NTP' ler özellikle GTP, UTP ve CTP tarafından da taşınmaktadır.

b) NTP ve NDP'lerin ikinci önemli fonksiyonları özel yapıtaş molekülünün enerjice zengin taşıyıcıları olmalarıdır. Nükleotid türevleri pek çok biosentezlerde aktive olmuş öncüllerdir. Örneğin glikojen biosentezinde UDP-glukoz, glukozun aktive olmuş öncülüdür.

c) NDP ve dNDP' ler RNA ve DNA sentezinde nükleotid birimlerinin enerjice zengin öncül bileşikleridir. NTP ve dNTP'ler bütün fonksiyonları sırasında β - ve γ - fosfat gruplarının enerjileri yeni kovalent bağların oluşmasında kullanılır.

d) Adenin nükleotidleri pek çok enzim kofaktörünün bileşenidir. Üç temel koenzim, NAD^+ , FAD ve CoA (koenzim A) bileşenleri adenin nükleotidleridir. Bu kofaktörler, adenozin içerikleri dışında birbirleriyle yapısal olarak bir yakınlığa sahip değildirler.

e) Bazı nükleotidler metabolik düzenleyicilerdir. Hücrelerin çevrelerine olan ilgisi hormon ve diğer dış kimyasal sinyallerle verilen başlama işaretiyle sağlanır. Bu hücre dışı kimyasal sinyallerin (birinci haberciler) hücre yüzeyindeki algılayıcılarla etkileşimi, hücre içinde ikinci habercilerin oluşumunu sağlar ve bunlar da hücre içi uyum değişikliklerini gerçekleştirir. Bu ikinci haberciler genellikle nükleotidlerdir. Birçok hormonun etki mekanizmasında anahtar role sahip iki nükleotid bilinmektedir. Bunlar siklik adenozin-3',5'-fosfat (cAMP) ve siklik guanozin-3',5'-fosfat (cGMP)'dir. cAMP glikojen sentez ve yıkımının uyumlu denetiminde görev alır. Bunların en yaygın olanlarından biri siklik AMP (cAMP) olup adenilat siklazın katalizlediği reaksiyon ile ATP'den oluşur. Adenilat siklaz plazma membranının iç yüzeyinde bulunmaktadır. Siklik AMP bitkiler dışında hemen her hücrede düzenleyici işleve sahiptir.



7.2. POLİNÜKLEOTİDLER–NÜKLEİK ASİTLER

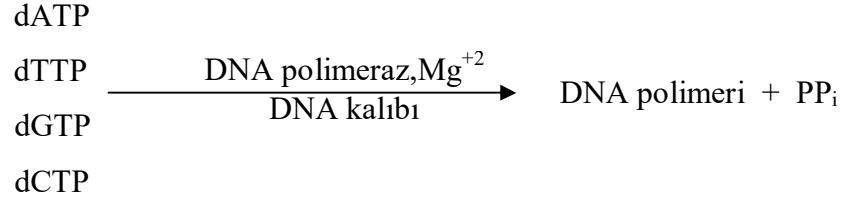
DNA'nın kalıtımı taşıyan molekül olduğunu RNA'ların ise DNA'nın taşıdığı genetik bilgiyi proteinlere aktarmada aracılık görevi yaptığını daha önce açıkladık. DNA ve RNA'nın yapı taşlarını basitten komplekse doğru inceledik.

DNA ve RNA molekülleri genel yapı bakımından birbirinin benzeridirler. Ancak DNA ve RNA'nın bir takım farklı özellikleri vardır. Bu farklı özellikleri şu şekilde sıralayabiliriz:

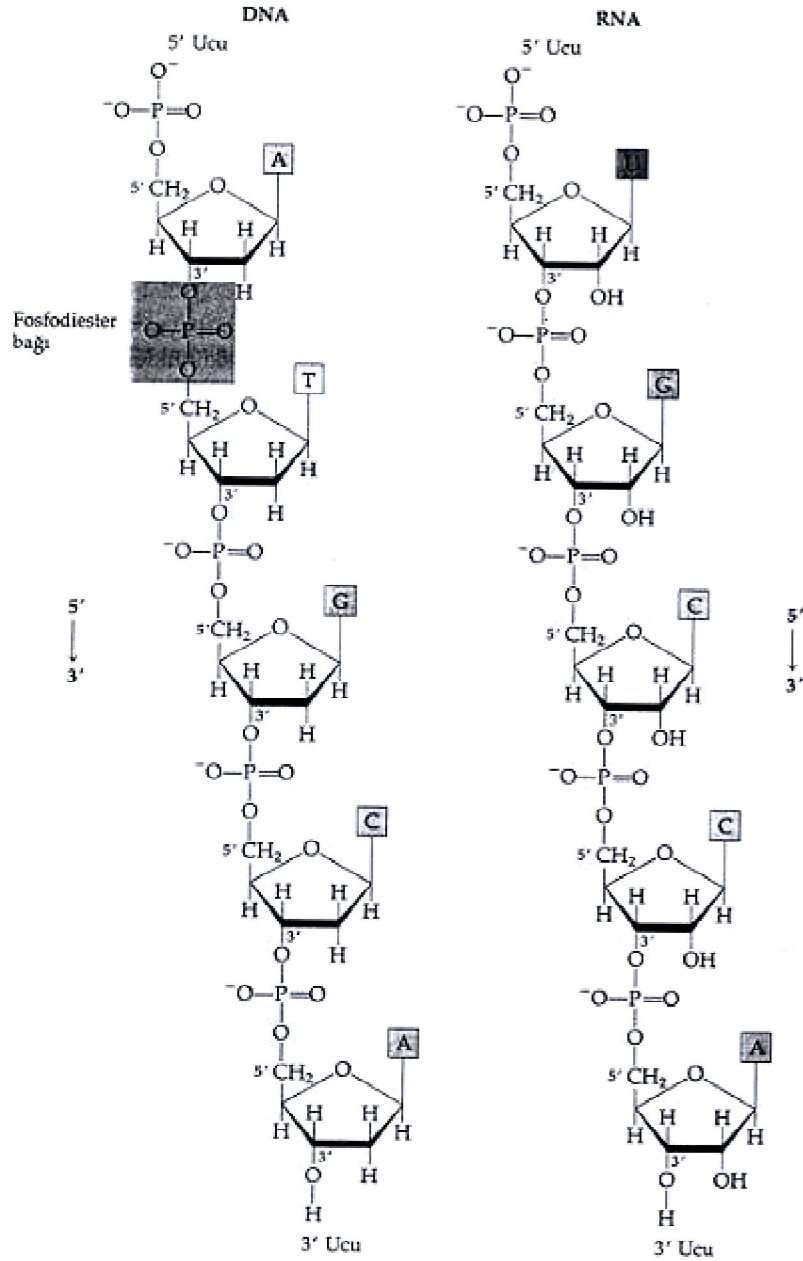
1. DNA yapısında β -D-2-deoksiriboz, RNA'nın yapısında β -D-riboz şekeri bulunur.
2. DNA'nın yapısında adenin, timin, sitozin ve guanin bazları bulunur. RNA da ise adenin, urasil, sitozin ve guanin bazları bulunur. DNA'daki timin yerine RNA'da urasil bazı girmektedir.
3. DNA hemen hemen her zaman çift sarmal yapıda bulunur. Sadece bazı virüslerde tek zincir (sarmal) yapıdadır. RNA'lar hemen hemen her zaman tek zincir halinde bulunur. Sadece tRNA'da kısmi çift sarmal yapı gözlenir.
4. DNA'nın bilinen tek işlevi kalıtsal bilgiyi taşıması ve aktarmasıdır. RNA'lar çoğu zaman yapısal görev yapmakta veya protein sentezinde genetik bilginin DNA'dan proteine aktarılmasında aracı rolü oynamakta (santral dogma), ancak nadiren bazı virüslerde kalıtsal bilgiyi taşıyan moleküldür.
5. DNA'larda adenin sayısı timine, guanin sayısı sitozine eşittir ($A=T \leftrightarrow T=A$ / $G=C \leftrightarrow C=G$). RNA'daki bazlar arasında böyle bir oran söz konusu değildir.

7.2.1. Nükleik Asitlerin Yapısı

Deoksiribonükleotidlerin polimerize olması ile DNA ve ribonükleotidlerin polimerize olması ile de RNA meydana gelmektedir.



Bir nükleotiddeki şekerin 5'-karbonuna bağlı fosfat grubunun hidroksili ile diğer nükleotiddeki şekerin 3'-hidroksil grubu arasında bir fosfodiester bağı oluşur. Böylece bir şeker ve fosfat grubunun ardarda devam etmesi ile nükleik asitlerin ana omurgası meydana gelmektedir. Bir şeker ve bir baz farklılığı dışında DNA ve RNA moleküllerinin pek çok özellikleri birbirine benzemektedir (Şekil 7.3).



Şekil 7.3. DNA ve RNA'nın kovalent yapıdaki omurgasında bulunan fosfodiester bağlantıları. Fosfodiester bağları birbirini izleyen nükleotid birimlerini birbirine bağlar (DNA molekülünde koyu renkli kutu içinde gösterilen). Her iki nükleik asidin de omurgasındaki alternatif pentoz ve fosfat grupları yüksek oranda polardır. Makromolekülün 5'-ucunda 5'-nükleotidi; 3'-ucunda da 3'-nükleotidi bulunmaktadır.

Nükleik asitlerin zincirlerinde 5'- ve 3'- uçları bulunur. Bu zincirlerin baz dizilişini verirken 5' → 3' yönü kullanılır.

DNA moleküllerinin nükleotid monomer sayıları ve dizilişleri canlı türüne göre farklılık gösterir. Bütün DNA çeşitlerinde bulunan adenin, guanin, timin ve sitozin bazlarının

yanında; bazı DNA molekülleri bu bazların metil türevlerini de ihtiva etmektedir. Bu metil türevleri DNA sentezledikten sonra oluşur.

DNA molekülleri, **komplementer (tamamlayıcı)** çift sarmal şeklinde düzenlenmiş iki zincir halindedir (Şekil 7.4. ve Şekil 7.6.). Prokaryotik hücreler bir tek çift sarmal DNA'dan oluşan bir kromozom taşırlar. Ökaryotik hücreler ise çok sayıda kromozoma sahiptir; bir kromozom bir DNA molekülüdür demektir.

Ökaryotik hücrelerde DNA moleküllerinin tamamına yakını hücre çekirdeğinde yer alır ve bazik özellikteki histon proteinleri ile kompleks yapmış haldedir.

7.2.2. Watson-Crick DNA Modeli

Rozalind Franklin ve Maurice Wilkins'in DNA örneklerinden elde ettikleri X-ışını kırınım fotoğrafları DNA'nın yapısının sarmal yapı olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca Erwin Chargaff ve arkadaşlarının 1950'lerde ortaya koyduğu bir gerçek olan DNA'daki adeninin timine ve guaninin sitozine eşit olduğu da biliniyordu. Fakat DNA'nın bütün özelliklerini içeren bir model ortaya atılmış değildi.

Nihayet 1953 yılında James Watson ve Francis Crick, X-ışını görüntülerini ve karakteristik bazı çifti özelliklerini dikkate alarak DNA'nın üç boyutlu yapısına ait bir model önerdiler. Bu DNA'nın aynı zamanda sekonder yapısıdır (Şekil 7.4).

Çift sarmaldan meydana gelen DNA'nın bir eksen etrafında sağ el çift sarmal meydana getirdiğini anladılar (Şekil 7.5). Bugün **B-DNA** olarak bilinen ve DNA çift sarmalın hücre içinde çoğunlukla sahip olduğu yapıya ait bu modelin önemli özelliklerini şöyle sıralayabiliriz.

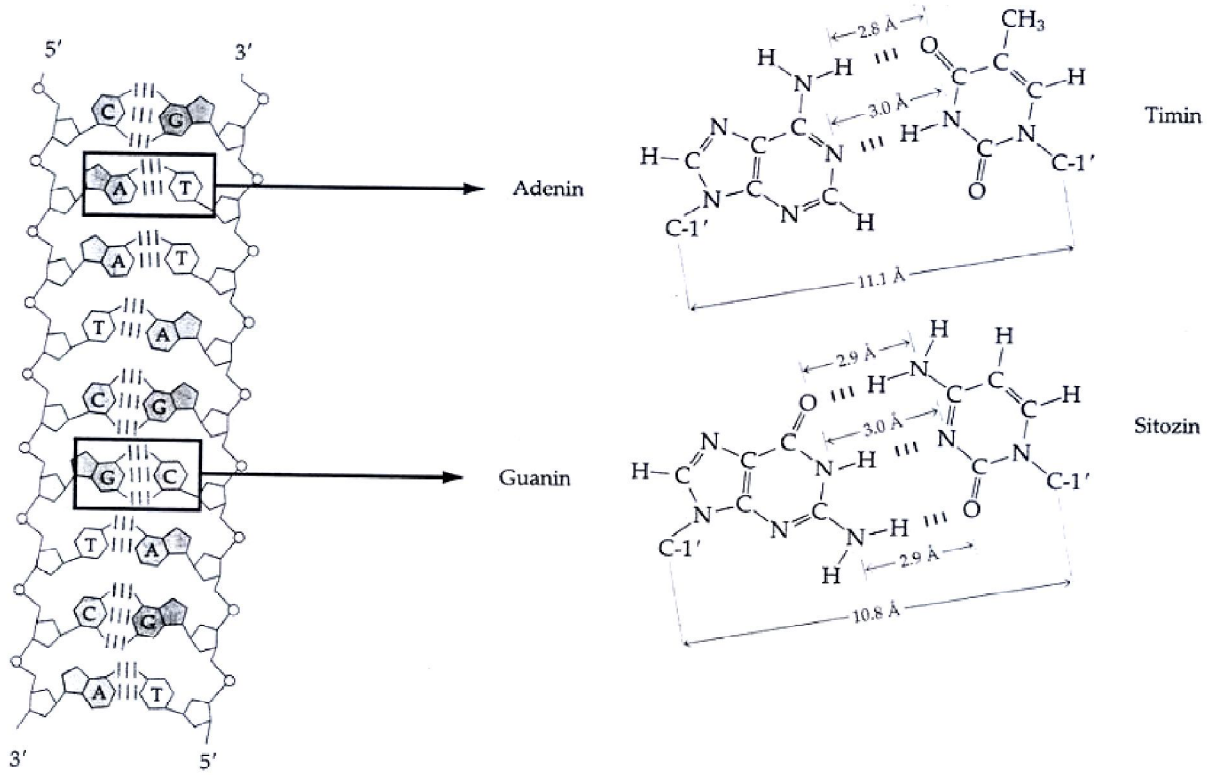
1. İki antiparalel polinükleotid zinciri ortak bir eksen etrafında sağ el yönünde çift sarmal meydana getirir. DNA'nın iki zinciri birbirlerinin tamamlayıcısı (komplementeri) ve antiparaleldir (Şekil 7.6). İki sarmalın birbiriyle ilişkisi, bazlar arasındaki hidrojen bağları ile olmaktadır.

2. Pürin ve pirimidin bazları sarmalın iç tarafında yer alırken, fosfat ve deoksiriboz birimleri dış tarafta kendilerini saran su moleküllerine dönüktür.

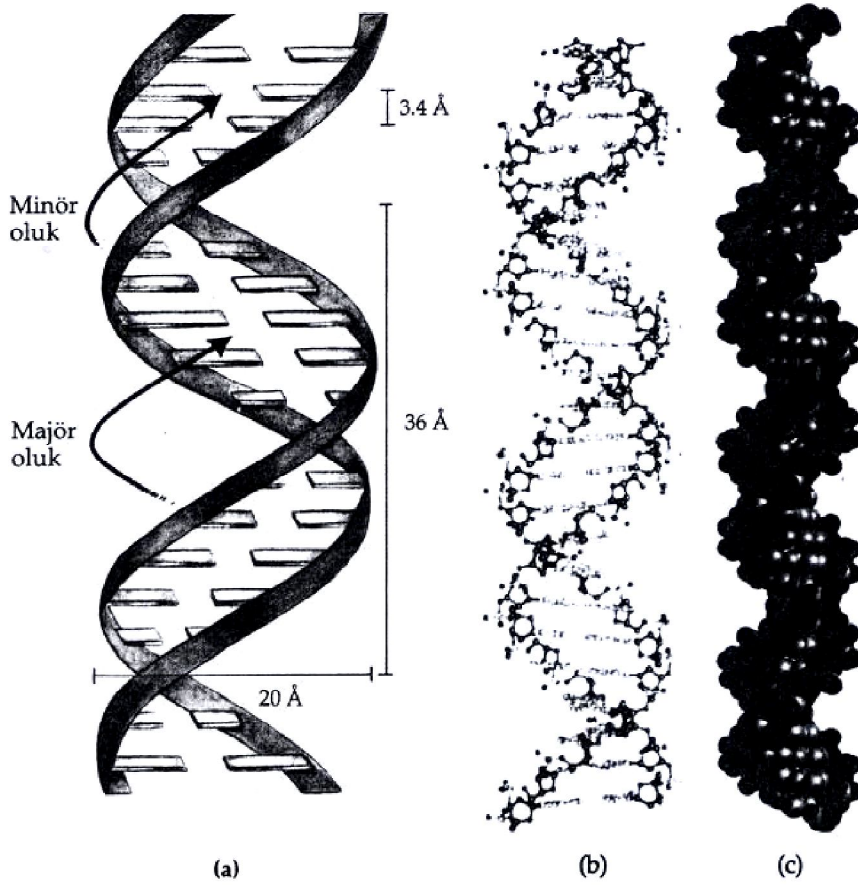
3. Sarmalın çapı 20 \AA 'dur. Komşu bazların sarmal eksenine boyunca aralarındaki mesafe 3.4 \AA olup; 36° 'lik bir dönme yapmışlardır. Böylece sarmal yapı 10 bazda bir tekrar edilirken tam bir dönüş 34 \AA 'dur. Sulu çözeltilerde bu yapı çok az farklılık gösterip, bir tam dönüş içinde 10.5 baz çifti bulunur (Şekil 7.5).

4. İki zincir baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Adenin daima timinle, guanin de sitozinle eşleşir. Ancak belirli baz çiftleri 20 \AA çapındaki sarmalın içine sığabilir. Karşı karşıya duran bazların biri pürin ise diğeri mutlaka pirimidin olmalıdır.

5. Bir polinükleotid zinciri boyunca bazların sıralanışı hiçbir şekilde sınırlanmamıştır. Bazların sıralanışı genetik bilgiyi taşır.



Şekil 7.4. Watson ve Crick tarafından önerilen baz çiftlerine ait hidrojen bağı. Hidrojen bağı yapıları diğer gösterimlerde olduğu gibi çizgilerle gösterilmiştir. DNA sarmalı için döner merdiven iyi bir örnektir. Döner merdivenin iki yanındaki trabzanları şeker ve fosfat grupları, basamakları da bazlar olarak düşünebiliriz. Bu döner merdiven her on basamakta bir devir (dönüm) yapmaktadır.

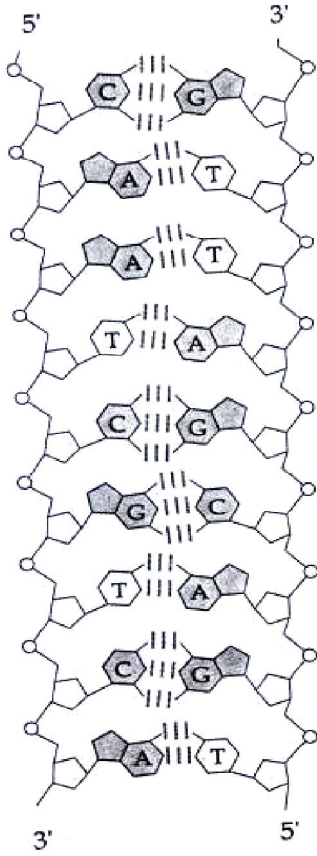


Şekil 7.5. DNA yapısı için Watson–Crick modeli. Watson ve Crick’in orjinal modellerinde, çift sarmalın tam bir dönüşü için 10 baz çifti veya 34 \AA (3.4 nm) önermişlerdir. İzleyen ölçümler bu sayıların tam bir dönüş için 10.5 veya 36 \AA (3.6 nm) olduğunu göstermiştir. **(a)** Çift sarmalın boyutlarının şematik gösterimi. **(b)** Omurgayı ve yığılmış bazları gösteren çubuk yapısı. **(c)** Boşluk doldurma modeli.

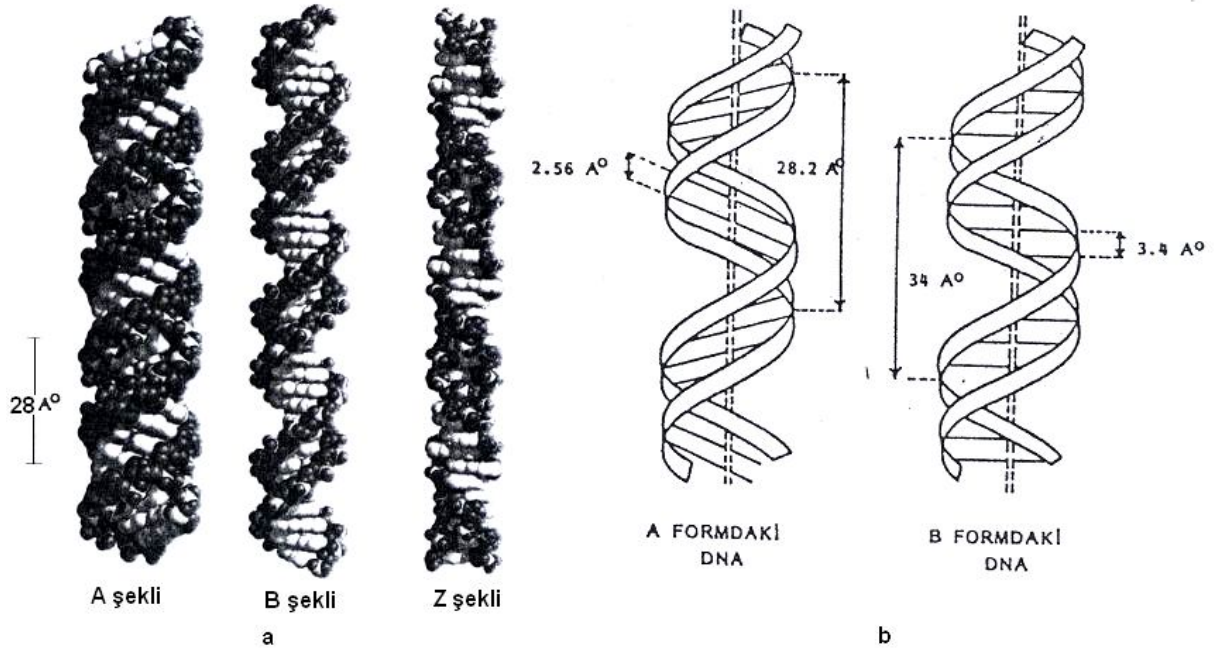
DNA çift sarmalın en önemli özelliği baz çiftlerinin spesifikliğidir. DNA çift sarmalı başlıca iki kuvvet bir arada tutmaktadır. Birincisi komplementer olan bazlar arasındaki hidrojen bağları, ikincisi ise sarmalın içinde kalan korunmuş bölge ile sarmalın dışında ve oldukça polar özellikteki kısım arasındaki hidrofobik etkileşimdir.

Çift sarmalın omurgasını teşkil eden kısımda bulunan fosfat grupları $\text{pH}=7,0$ ’ de negatif yüklüdür. Bu nedenle nötral pH ’ da DNA molekülü kuvvetli asidiktir.

Watson ve Crick’in önerdiği DNA yapısı B–DNA olarak tanımlanır. DNA molekülleri içinde B–DNA en kararlı yapı olup, DNA’ nın herhangi bir özelliğinin açıklanmasında referans oluşturur (Şekil 7.7).



Şekil 7.6. DNA çift sarmalın tamamlayıcı iplikçikleri. Çift sarmalın birbirini tümleyen antiparalel iplikçikleri Watson ve Crick' in önerdiği baz eşleşmesini gerçekleştirir. Baz eşleşmesi gerçekleşmiş antiparalel iplikçikler baz içeriği açısından birbirinden farklı bileşime sahiptir. Soldaki iplikçikte $A_3T_2G_1C_3$ bileşimi varken, sağdaki iplikçikte $A_2T_3G_3C_1$ bileşimi bulunur. Her bir iplikçik için sıralama $5' \rightarrow 3'$ yönünde incelendiğinde dizilim farklıdır. Çift sarmal yapıdaki $A=T$ ve $G=C$ kuralı dikkat çekicidir.



Şekil 7.7. (a) DNA' nın A, B ve Z şekillerinin karşılaştırılması. **(b)** A ve B formlarındaki DNA' ların yapıları arasındaki fark şematik olarak gösterilmektedir. DNA' ların çift sarmalı şeker ve fosfatın birbirine bağlanması ile meydana gelmektedir. İki sarmal arasındaki çizgiler ise baz çiftlerini ifade etmektedir.

DNA' nın değişik karakter gösteren A ve Z şekilleri kristal yapı içinde oldukça ayrıntılı açıklanmış olup, özellikleri Tablo 7.8' de özetlenmiştir. Değişik çözelti yapıları içinde A

formu nispeten az su içeren çözeltilerde oluşması desteklenen şeklidir. A–DNA sağ el dönüşlü çift sarmal olup, bir sarmal dönüşündeki baz çifti sayısı B–formundaki ~10 (10,5) yerine 11, genişliği ise daha fazladır. Baz çiftlerinin düzlemi sarmal eksenine göre 20° eğilmiştir. DNA’yı kristallendiren birçok ajanlar bu işlemi DNA’ yı dehidrate ederek (suyu uzaklaştırarak) yapar ve sonuçta birçok kısa DNA molekülü A–formunda kristallenir.

Z–şekilli DNA (Z–DNA) B–yapısı (B–DNA)’ ndan daha çok ayrılıklar gösterir, en belirgin farklılık sol el dönüşümlü sarmal olmasıdır. Bir sarmal dönüşünde 12 baz çifti bulunur ve yapı daha ince, uzamış ve zig–zag bir görünüme kavuşmuştur. Belli nükleotid dizileri sol el dönüşümlü Z–sarmal yapısı içine diğerlerinden daha çok girer. En göze çarpan örnek pürin ve primidinin birbirini birer atlayarak izleyen dizilimidir ve özellikle de C ve G veya 5–metil C ve G kalıntıları değişir. Örneğin ...GCGCGC... bazlarını içeren yapay çift sarmal DNA sol el sarmal yapı göstermektedir, buna Z–DNA denir. Daha sonra sentezlenen dört bazı içeren DNA’nın düşük tuz konsantrasyonunda B–DNA olduğu görülmüştür. Z–DNA yüksek tuz konsantrasyonunda formunu korur.

Tablo 7.8. DNA’nın A, B ve Z şekillerinin karşılaştırılması

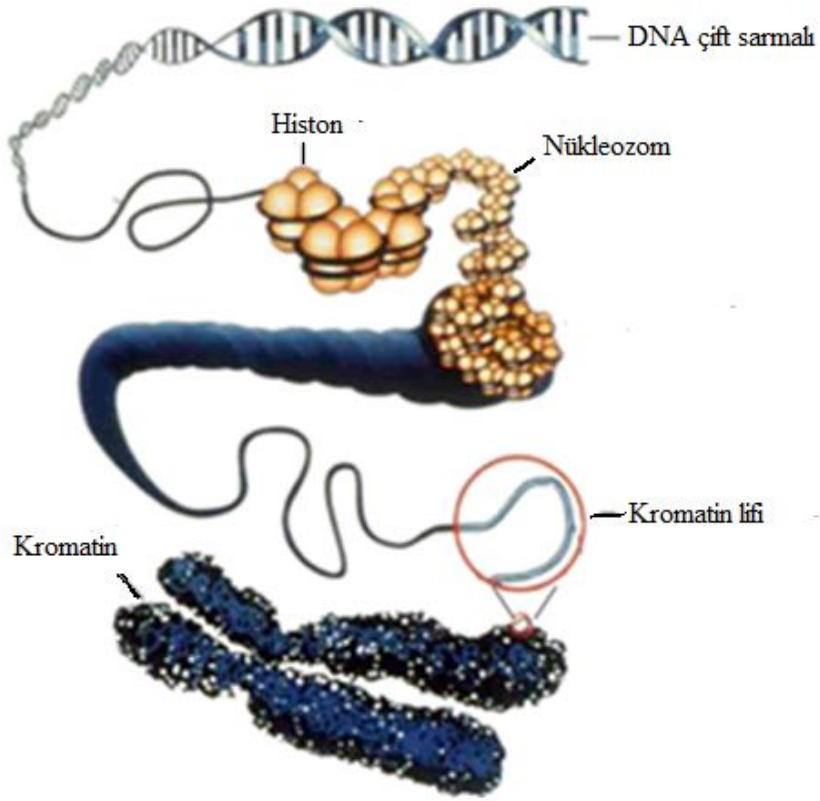
DNA’ nın özellikleri	DNA		
	A şekli	B şekli	Z şekli
Sarmal yapısı	Sağ el	Sağ el	Sol el
Çap	~ 26 Å	~ 20 Å	~ 18 Å
Her bir sarmal için baz sayısı	11	~10 (10,5)	12
Her bir baz çifti için sarmalın yükselişi	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
Sarmalın eksenine göre baz açısı	20°	6°	7°

A–DNA’nın hücre içinde bulunuşu kesinlik kazanmış değilken, kısa Z–DNA’ lara hem prokaryotik hem de ökaryotik hücreler içinde rastlanabilir. Z–DNA’lar henüz tam olarak tanımlanmamış olsa da, gen rekombinasyonunda ve ifadenmesinde önemli görevler yüklenebilir.

Bir ökaryotik canlının bütün hücrelerindeki DNA’lar aynıdır ve hücre nükleusunda yer alır. DNA’lar histon adı verilen bazik proteinlerle kompleks yapmış ve farklı sayıda kromozomlar arasında bölünmüş halde bulunurlar. Ayrıca mitokondrilerde ve bitki kloroplastlarında da bakterilerdekine benzer DNA molekülleri bulunur.

İster prokaryotlarda ister ökaryotlarda olsun, bütün DNA moleküllerinin en önemli ortak özellikleri çok büyük olmalarıdır.

Ökaryotik hücreler, türden türe farklılık gösteren sayıda, birçok kromozom ihtiva eder ve her bir kromozom da bir tane çok büyük DNA molekülünden ibarettir. Tek bir memeli hücresindeki DNA'ların toplam uzunluğu 2 m' den fazla olup, baz çiftlerinin sayısı E.coli'nin yaklaşık 1000 katıdır. Bu boyuttaki bir molekülün mikroskobik boyutlardaki hücrenin içine yerleşmesi ileri seviyede bir düzenli sıkıştırma ve katlanmanın sonucudur. Ökaryotik DNA yapılanmasının temel birimleri nükleozomlardır. Nükleozomlar, kromozomdaki DNA molekülünün histon adı verilen bazik proteinlerle oluşturduğu komplekslerdir (Şekil 7.8). Ökaryotik DNA, histonların dışında transkripsiyon ve replikasyon enzimleri, transkripsiyon faktörleri ve hormon reseptörleri gibi fonksiyonel proteinlerle de birleşmiş halde olabilir.



Şekil 7.8. Kromozomlar mikroskobik şekilde mitoz sırasında görülür. Burada bir insan diploit hücresinde (somatik) 46 kromozomdan birinin elektron mikrografı görülmektedir. Her mitotik kromozom, her biri sıkıca sarılı kromatin liflerinden oluşan iki kromatitten meydana gelir. Her kromatin iplikçığı ise, DNA molekülünün histon proteinlerinin çevresini sarak bir dizi nükleozomların meydana getirildiği bir paketlenmenin sonucudur.

Bölünmeyen ökaryotik hücrelerde kromatin denilen kromozom materyali, şekilsiz ve çekirdeğin her tarafına rastgele dağılmış olarak gözlenir. Hücreler bölünmeye hazırlanırken, kromatin yoğunlaşır ve türe özgü sayıda iyice belirginleşmiş kromozomlara dönüşür.

Kromatin, çok az miktarda RNA ile birlikte, yaklaşık eşit ağırlıkta protein ve DNA içeren ipliklerden oluşur. Kromatindeki DNA, histon denilen proteinlerle çok sıkı bağlanarak nükleozom denilen yapısal birimlere paketlenmiş ve dizilmiştir (Şekil 7.8). Kromatinde, bazıları özgül genleri düzenleyen, histon olmayan pek çok proteinde bulunur. Ökaryotik kromozom DNA'sı nükleozomların oluşumuyla başlayarak en sonunda, ışık mikroskobunda görülen yoğunlaşmış kromozomu oluşturmak için daha ileri düzenlenmiş yapılara paketlenir.

7.3. NÜKLEİK ASİT KİMYASI

Nükleik asitlerin işlevini anlamak için bunların yapıları kadar kimyasal özelliklerini de bilmeliyiz. DNA'nın genetik bilgiyi depolama ve taşıma görevi kısmen kalıtsal kararlılığına bağlıdır. DNA'nın kimyasal değişimi enzimlerin yokluğunda oldukça yavaştır.

7.3.1. DNA Moleküllerinin Sulu Çözeltilerdeki Özellikleri

DNA moleküllerinin sulu çözeltileri, kendilerine has bir takım özellikler göstermektedir.

1. Asit-Baz Özellikleri: Komşu nükleotidler arasındaki fosfodiester bağı fosfat gruplarının pKa değerleri oldukça küçüktür. Bu nedenle DNA, pH=4,0'ün üzerinde tamamen iyonlaşmış çok protonlu bir asittir. Bu fosfat grupları, sarmalın çevresinde tamamen suya yönelmiş halde olup; Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi katyonlara kuvvetlice bağlanabilmektedirler.

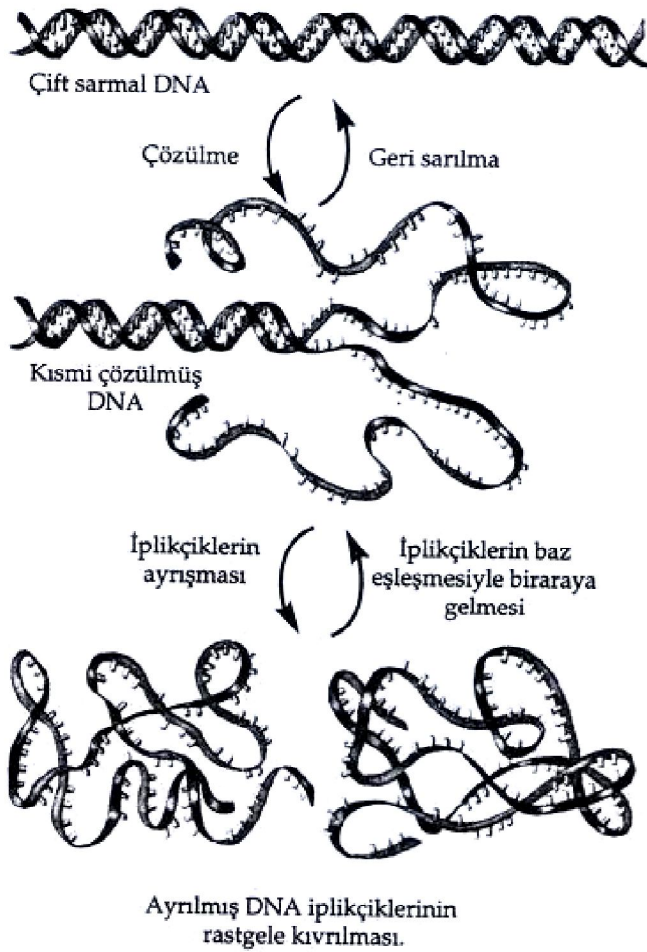
Ökaryotik hücrelerin kromatinlerinde bulunan ve bazik proteinler (pozitif yüklü) olan histonlar da DNA molekülleriyle kuvvetlice bağlanırlar. Bu proteinlerin yapısındaki R gruplarından, pH=7.0'nin üzerinde pozitif yüklü olan arginin ve lizin kalıntıları düzenli olarak sıralanmışlardır. Bunlar DNA çifti sarmalı çevresinde, yine periyodik bir yerleşime sahip olan, negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşirler.

Bazların hidrojen bağı yapabilme kapasiteleri pH'ya bağlı olduğundan, DNA çifti sarmalındaki baz çiftlerinin kararlılıkları da pH ile değişir. Baz çiftlerinin kararlılıkları pH=4,0–11,0 arasında maksimumdur.

Hücre içi herhangi bir değişim olmadan kalıtsal bilginin uzun süreli saklanması ne kadar önemli ise, DNA yapısının reaksiyonlarla yavaş da olsa değişmesi fizyolojik olarak o kadar önemlidir. Karsinogenez ve yaşlanma belkide bu dönüşümsüz ve yavaş olayların birikimiyle bağlantılıdır. Diğer yıkıcı olmayan değişimler ise DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda iplikçiklerin ayrışması sırasında oluşabilir.

Fizyolojik olayların ışığı altında nükleik asit kimyasını anlamamız; moleküler biyoloji, tıp ve adli tıp alanında bize güçlü teknolojik donanım sağlayacaktır.

2. **Çift Sarmal DNA' nın Denatürasyonu:** Dikkatli bir şekilde saflaştırılmış DNA çözeltisi pH=7,0 ve oda sıcaklığında (25°C) oldukça yoğun bir haldedir. Bu çözeltiliye uygulanan pH değerleri 4'ün altına ve 11'in üstüne çekilecek veya sıcaklık 80°C' nin üzerine çıkarılacak olursa; **DNA denatürasyonu (çözülme)** ya da **çift sarmalın erimesi (iplikçiklerin birbirinden ayrılması)** meydana gelecektir. Bu davranışı küresel (globüler) proteinlerde de gözlenmektedir. Eşleşmiş baz çiftleri ve baz yığılmalarının oluşumundaki hidrojen bağlarının bozulması; çift sarmalın bozulmasına, tek iplikçik oluşturmasına, iplikçiklerin birbirinden tüm DNA uzunluğu boyunca ya da bir kısmında ayrılmasına neden olacaktır. Bütün bu oluşumlar sırasında ise DNA'nın kovalent bağları kırılmaz (Şekil 7.9).



Şekil 7.9. DNA'nın dönüşümlü olarak çözülmesi (denatürasyon) ve tekrar birleşmesi (renatürasyon).

İki zinciri birbirine bağlı tutan bir düzine ya da daha fazla baz kalıntısı bulunduğu durumda oluşan renatürasyon tek kademeli ve hızlı bir olaydır. Sıcaklık ve pH'nın birçok organizmanın yaşama sınırlarına getirilmesiyle birbirinden ayrılmış iki iplikçik kendiliğinden eski haline gelir ve sarılır. İki iplikçiğin birbirinden tamamen ayrılması durumunda birleşme iki basamakta gerçekleşir. Birincisi, yavaş bir kademe olup, iki iplikçik birbiriyle rastgele

çarpışarak; komplementer kısa bir çift sarmal parçacığı oluşturur. İkinci basamakta ise; geriye kalan eşleşmemiş iki iplikçik, hızlıca bir araya gelir ve bir fermuar gibi çift sarmalı oluşturur.

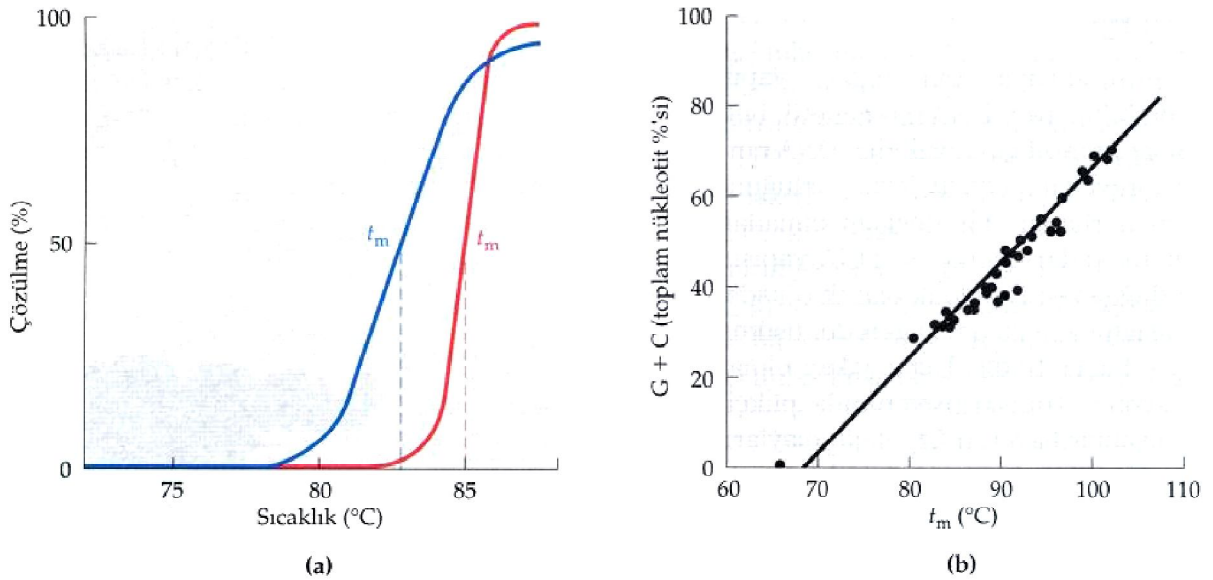
DNA'nın denatürasyonu sonucu fiziksel özelliklerinde bir takım değişiklikler meydana gelir.

1. Viskozite azalır,
2. 260 nm'deki absorpsiyon artar
3. Optik çevirme daha negatif olur.

DNA denatürasyonunun derecesini belirlemede en basit yol, hiperkromik etki adı verilen 260 nm'deki absorpsiyon artışının spektrofotometrik yoldan takip edilmesidir.

Çift sarmal nükleik asit yapısı içinde yığılmış bazlar arasındaki yakın etkileşim UV ışığın absorpsiyonunu, aynı derişimde serbest nükleotid içeren çözeltiliye göre azaltır. Absorpsiyon iki komplementer nükleik asit iplikçığının bir araya gelmesiyle daha da azalır. Bu etkiye **hipokromik etki** denir. Çift sarmal nükleik asidin çözülmesi ise tersi etkiyi doğurmakta ve absorpsiyonu artırmakta olup **hiperkromik etki** olarak adlandırılmaktadır. Sonuç olarak çift sarmal DNA'nın çözülmüş formu olan tek iplikçik hali ve dönüşümü UV ışığın absorpsiyonu izlenerek bulunur.

Viral veya bakteriyel DNA molekülleri çözeltili içinde yavaşça ısıtıldıkları zaman çözülürler (Şekil 7.10). Değişik DNA moleküllerinin kendine özgü bir **çözülme veya erime noktası (t_m)** vardır.



Şekil 7.10. DNA'nın ısıyla çözülmesi. (a) İki farklı DNA örneğine ait çözülme veya erime eğrisi. % 0' dan % 100' e geçişin tam ortası erime noktasıdır (t_m). Bu nokta DNA'nın baz bileşiminin pH'sına, iyonik şiddetine, büyüklüğüne ve içeriğine bağlıdır. (b) DNA yapısındaki G=C içeriği ve t_m arasındaki ilişki.

DNA molekülünün yapısı içinde bulunan G≡C baz çiftinin miktarının artmasıyla erime noktası artacaktır. Bunun nedeni G≡C baz çiftinde bulunan üç hidrojen bağının bağ enerjisi, A=T baz çiftinin bağ enerjisinden büyük olmasıdır. DNA' nın sabit pH ve iyonik şiddet koşullarında, erime noktasının belirlenmesiyle DNA baz bileşimi bulunabilir.

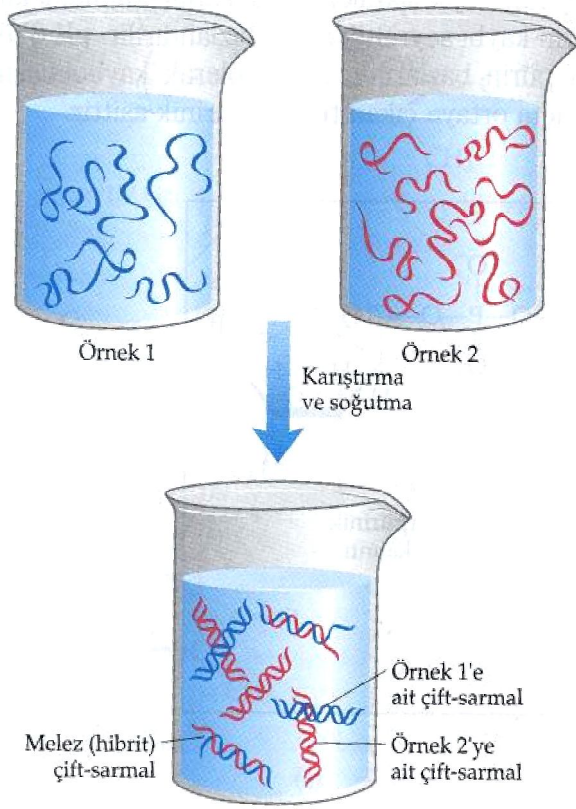
7.3.2. Değişik Türlerdeki Nükleik Asitler Melez Yapılar Oluşturabilir

DNA iplikçiklerinin bir diğer iplikçikle komplementer bir şekilde eşleşmesi, iki değişik türdeki veya aynı türün genomu üzerindeki benzer dizilimlerin belirlenmesinde kullanılır.

Eğer insan ve fare hücresinden saflaştırılan DNA çift sarmalları, ısıtılarak iplikçikleri tamamen ayrıldıktan sonra karıştırılır ve 65°C' de birkaç saat bekletilirse, birçok DNA iplikçığının birbiriyle birleştiği görülür. Birçok insan DNA iplikçığı, komplementeri olduğu insan DNA' larıyla birleşerek insan çift sarmal DNA' sını; aynı şekilde fare DNA iplikçığı komplementer DNA' sıyla birleşerek fare çift sarmal DNA' sını oluşturacaktır. Ayrıca bazı insan DNA iplikçikleri, fare DNA iplikçikleriyle baz çifti oluşturabilecekleri bölgelerde birleşerek melez–çift sarmal oluşturacaktır (Şekil 7.11).

Değişik organizmalarda bazı RNA ve proteinler aynı yapı ve işleve sahiptir. Birçok durumda bu proteinleri şifreleyen DNA ve RNA' lar da aynı dizilime sahiptir. İki tür birbirine biyolojik akrabalık nedeni ile yaklaştıkça, bunların DNA' ları da daha kolay melezleşir. Örneğin insan DNA' sını fare DNA' sıyla, maya DNA' sına nazaran çok daha fazla melez yapı oluşturur.

Değişik kaynaklardan elde edilen DNA iplikçiklerinin birbiriyle eşleşerek melezleşmesi, moleküler genetik pratiğinde kullanılan tekniklerin temelini oluşturur. Komplementer DNA' lar değişik türlerden olduğu gibi, aynı türden de olabilir veya laboratuvarında kimyasal olarak sentezlenebilir. Özgül genlerin ve RNA' ların tanınması ve saflaştırılmasında bu melezleşme teknikleri güvenilir olup; uygulamaya geçilmesi sonucu, bir cinayet sonrası tek bir saç telinden kişinin tanımlanması veya belirtileri ortaya çıkmadan onlarca yıl önce hastalıkların tahmini gerçekleşebilir.



Şekil 7.11. DNA melezleşmesi (hibritleşmesi). Birbiriyle mukayese edilecek olan DNA örneği ısıtılarak, iplikçikleri birbirinden tamamen çözülür. İki çözelti birbiriyle karıştırılıp yavaşça soğumaya bırakılırsa, her bir örneğe ait DNA iplikçığı kendine ait komplementer kalıpla birleşir ve normal çift sarmal yapıyı oluşturur. Eğer iki DNA arasında anlamlı bir dizilim benzerliği varsa sonuçta kısmi çift sarmal yapı veya melezleşme gerçekleşir. İki DNA arasındaki dizilim benzerliğinin artması meydana gelecek melez sayısını da artıracaktır. Melez oluşumu DNA'lardan birinin radyoaktif izotoplarla işaretlenmesi sonucu kolayca gözlenip, ölçülebilir.

7.3.3. Nükleik Asit ve Nükleotidler Enzimatik Olmayan Değişime Uğrar

Nükleotidlerde bulunan pürin ve pirimidinlerin kovalent yapıları kendiliğinden olan birçok değişikliğe uğrarlar. Bu reaksiyonların hızı çok yavaş olmakla birlikte, hücrenin genetik bilgi değişimine olan toleransının (hoşgörüsünün) az olması nedeniyle fizyolojik öneme sahiptir.

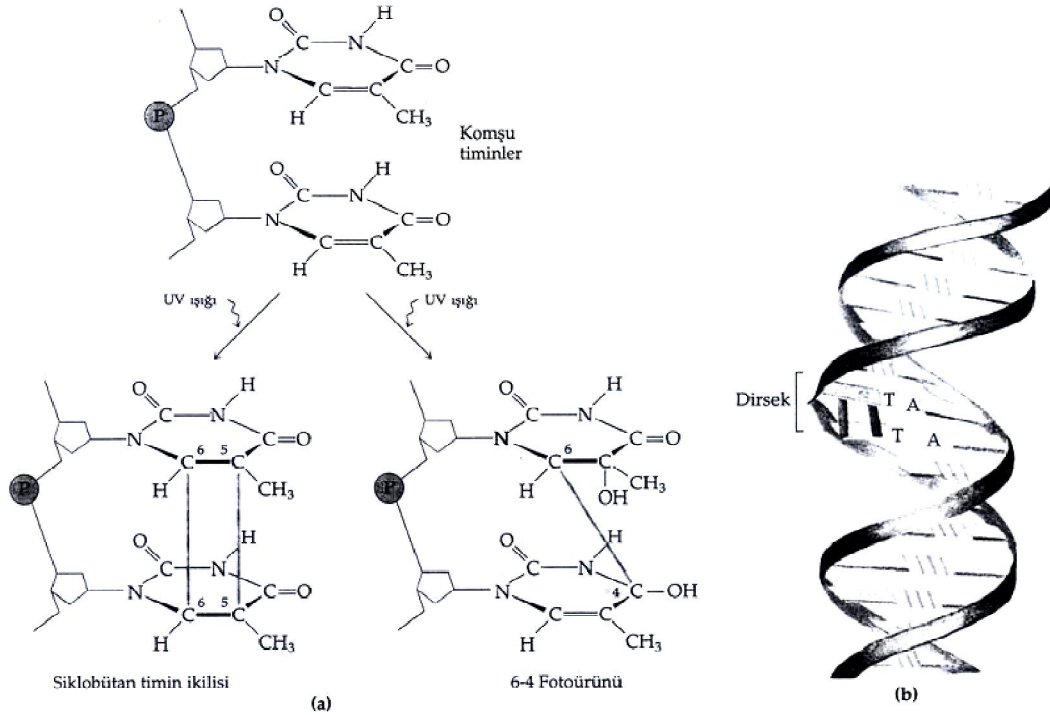
Genetik bilginin şifrelendiği DNA yapısında oluşan değişiklikler **mutasyon** olarak tanımlanır. Memelilerde mutasyonların birikimiyle karsinogenez ve yaşlanma arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir.

Bazı nükleotid bazları dış halka amino gruplarını kendiliğinden kaybeder (**deaminasyon**). Örneğin tipik hücre şartlarında bir günde DNA'daki her 107 sitidin artığı için bir sitozin urasile dönüşür. Adenin guanine deaminasyonu ise 100 kez daha yavaştır.

Diğer önemli bir reaksiyon da deoksiribonükleotidlerin baz ve pentoz şeker arasındaki N-β-glukozid bağlarının hidrolizidir.

Bir başka reaksiyon da ışıkla gerçekleşir. Hücre içinde nükleik asit üzerindeki komşu iki pirimidin bazı UV ışık yardımıyla kondanse olur ve siklobütan-pirimidin dimerlerini oluşturur. Aynı DNA üzerindeki komşu timidin kalıntıları da çoğunlukla bu değişime uğrar (Şekil 7.12). X-ışınları ve gama ışınları gibi iyonlaştırıcı ışınlar ise halka yapılarının

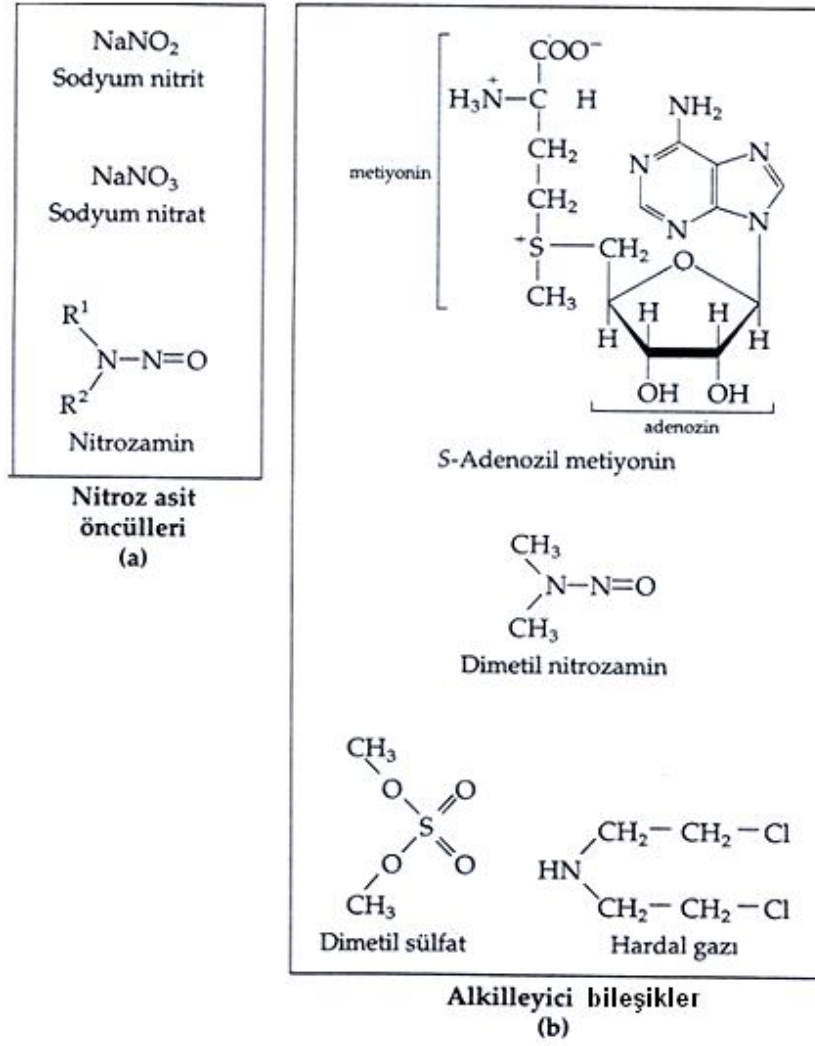
açılmasına ve nükleik asitlerin kovalent omurgasının kırılarak bazların parçalanmasına neden olur.



Şekil 7.12. UV ışığının etkisiyle primidin ikilisinin (dimerinin) oluşumu. **(a)** Solda gösterilen reaksiyonda komşu iki primidin kalıntısının C-5 ve C-6 karbonları arasında siklobütül halkasının oluşumu gözükmemektedir. Sağdaki alternatif reaksiyon 6-4 foto ürünü olup; bağ bir primidin C-6'sı ve komşu primidin C-4'ü arasında gerçekleşir. **(b)** Bir kıvrılma veya dirsek, siklobütan primidin ilişkisinin oluşumu sırasında DNA'da ortaya çıkar.

Gerçekte tüm yaşam şekilleri DNA üzerinde kimyasal değişikliğe neden olan yüksek enerjili ışığa maruz kalmaktadır. Yakın UV radyasyonu (200-400 nm), güneş ışığının önemli bir kısmını oluşturmaktadır; bakteri ve insan deri hücreleri DNA' sında, primidin dimerini oluşturur ve diğer kimyasal değişiklikleri yapar. Hepimiz kozmik ışınlar halinde sabit bir iyonlaştırıcı ışına maruz kalmaktayız. Bu ışın aynı zamanda radyum, plutonyum ve uranyum gibi radyoaktif elementlerden de yayılır.

Endüstriyel aktivite sonucu çevreye yayılan reaktif kimyasallar da DNA hasarına yol açmaktadır. Bu ürünler normal yaşam için tehlikeli olmayabilirken, hücrede tehlikeli olanlara metabolize olabilir. Bu bileşiklerin bilinen iki tanesi **1)** Deaminasyona neden olan nitröz asit, **2)** Alkilleyici bileşiklerdir (Şekil 7.13).

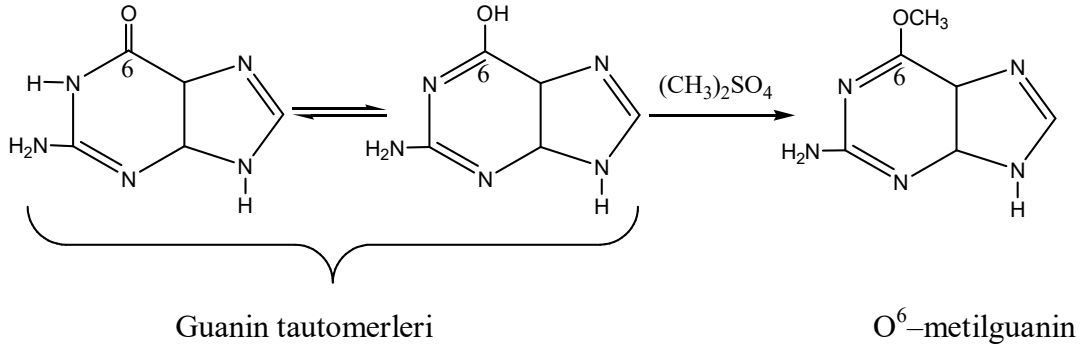


Şekil 7.13. DNA hasarına neden olan kimyasal bileşikler.

(a) Deaminasyon reaksiyonlarını uyarıcı nitroz asit öncülleri. (b) Alkilleyici bileşikler.

Bazların deaminasyonunda etkin bir hızlandırıcı olan nitroz asit, nitroz aminler, nitrit ve nitrat tuzları gibi öncül moleküllerden oluşur. C vitamini besinlerle aldığımız nitritin barsaklarımızda nitroz amine dönüşmesini engellemektedir. Bisüfit de benzer etkilere sahiptir. Her iki bileşik de işlenmiş yiyeceklerde zehirli bakterilerin ürememesi için koruyucu (antimikrobiyal) olarak kullanılır. Bu bileşikler çok az kullanıldıkları ve DNA hasarı üzerindeki etkisi minimum düzeyde olduğu için kanser riskini artırmazlar.

Alkilleyici moleküller veya bileşikler de DNA'nın özgül bazlarını değiştirir. Örneğin çok reaktif bir kimyasal olan dimetilsülfat; guanini metilleyerek, sitozinle baz çifti oluşturmayan O⁶-metilguanin oluşturur. Hücre içinde normal olarak bulunan S-adenosilmetiyonin gibi alkilleyici bileşikler de benzeri reaksiyonları sürdürür.



Oksidatif hasar, DNA’ da değişime neden olan mutajen kaynaklarının olasılıkla en önemlisidir. Hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, hidroksil ve süperoksit radikalleri aerobik metabolizma ya da radyasyon sonucu oluşur. Hücrenin bu reaktif türleri yok edecek savunma sistemleri mevcuttur. Bunlar arasında reaktif oksijen türlerini zararsız ürünlere dönüştüren katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimleri sayabiliriz. Hücre savunmasından kaçabilen bu oksidanlardan bir kısmı DNA hasarına yol açabilir. Bu reaksiyonlar, deoksiriboz ve bazların oksitlenmesinden zincir kırılmasına kadar kompleks tepkime gruplarını oluşturur.

Bunlar DNA hasarını gösteren iyi anlaşılmış reaksiyon örnekleridir. Yiyecekler, su ve hava içindeki karsinojenik bileşenler etkilerini DNA bazları üzerinde gösterir. DNA’ nın polimer olarak bütünlüğü RNA ve proteine göre daha fazladır. Bunun nedeni ise DNA’ nın biyokimyasal onarım sistemine sahip tek makromolekül olmasıdır. Sonuçta bu onarım DNA üzerindeki hasarı azaltır.

Hücrenel zorunluluk olan DNA’ daki bilginin doğruluğunun korunması, çeşitli DNA onarım sistemleriyle sağlanır. DNA bazen kendiliğinden bazen de çeşitli çevresel etkenler sonucunda zarar görebilmektedir.

7.4. RİBONÜKLEİK ASİT (RNA)

Hücrelerde üç tip RNA vardır: Elçi RNA (mRNA), taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA). Her RNA tipinin baz bileşimi ve molekül ağırlığı farklıdır (Tablo 7.9). RNA’ lar tek polinükleotid zincirden oluşur. Ribozomal RNA’ nın üç çeşidi, tRNA’ nın altmış çeşidi ve mRNA’ nın binlerce çeşidi vardır.

Tablo 7.9. Bir *E. coli* hücreesindeki RNA’ ların özellikleri (çeşitleri ve dağılımı)

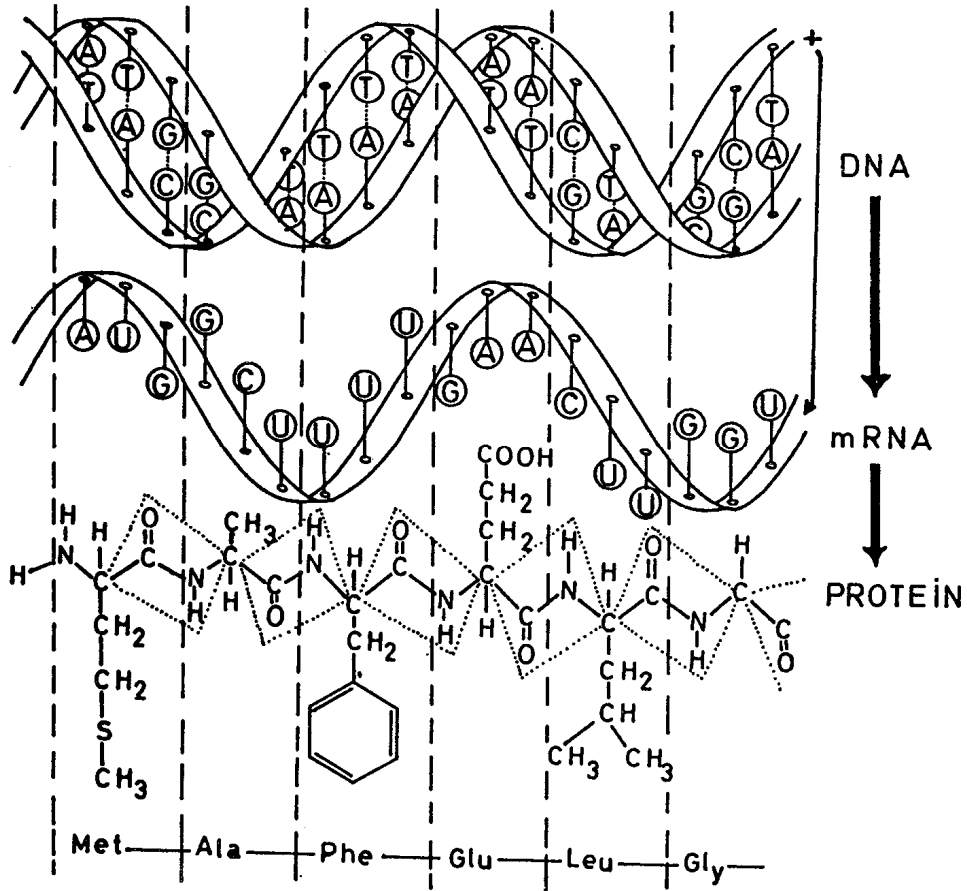
RNA	Sedimentasyon Katsayısı	Molekül Ağırlığı	Nükleotid Sayısı	Toplam RNA’ nın yüzdesi
mRNA	6S-25S	25.000-1.000.000	75-3.000	~2
tRNA	4S	23.000-30.000	75-90	16
rRNA	5S	~35.000	~100	} 82
	16S	~550.000	~1.500	
	23S	~1.100.000	~3.100	

Bakteri hücrelerinde RNA'ların tamamına yakını sitoplazmada bulunur. Ökaryotik hücrelerde değişik RNA'lar hücrenin farklı bölmelerinde farklı oranlarda bulunur. Bir karaciğer hücresinde RNA'ların % 11'i çekirdekte, % 5'i mitokondride, % 50'si ribozomlarda ve % 24'ü sitozolde bulunur.

7.4.1. Elçi RNA (mRNA)

mRNA hücrenin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında bulunur. Yazım süreci (transkripsiyon) sırasında çekirdekte kromozomal DNA'nın bir sarmalındaki bir bölge ile eşleşebilen (komplementer) tek zincirli moleküllerdir.

Yazım sürecinden sonra mRNA sitoplazmada ribozomlara tutunur. Protein sentezinde amino asitlerin sırasal dizilimi için kalıp olarak görev yapar. mRNA zinciri boyunca üçlü nükleotidler (kodon) doğrusal biçimde aminoasitlerin sırasını belirler. Hücrenin toplam RNA'sının çok azını oluşturmalarına karşın, mRNA molekülleri farklı molekül ağırlıkları ve baz sıraları ile pek çok türde görülürler. Hücre tarafından sentezlenen binlerce farklı proteinin her biri özgül bir mRNA ya da mRNA molekülünün bir bölümü tarafından kodlanır (Şekil 7.14).

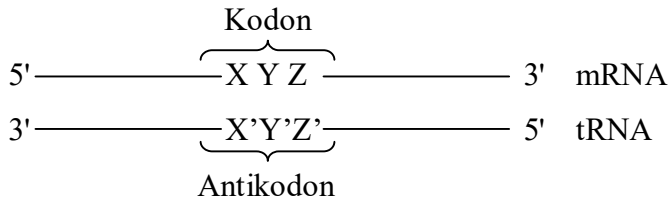


Şekil 7.14. Genetik bilgi DNA'dan mRNA'ya aktarılmakta; mRNA üzerinde bulunan üçlü kodonların her biri, bir aminoasiti belirlediğinden bu bilgi protein zinciri haline dönüştürülmektedir.

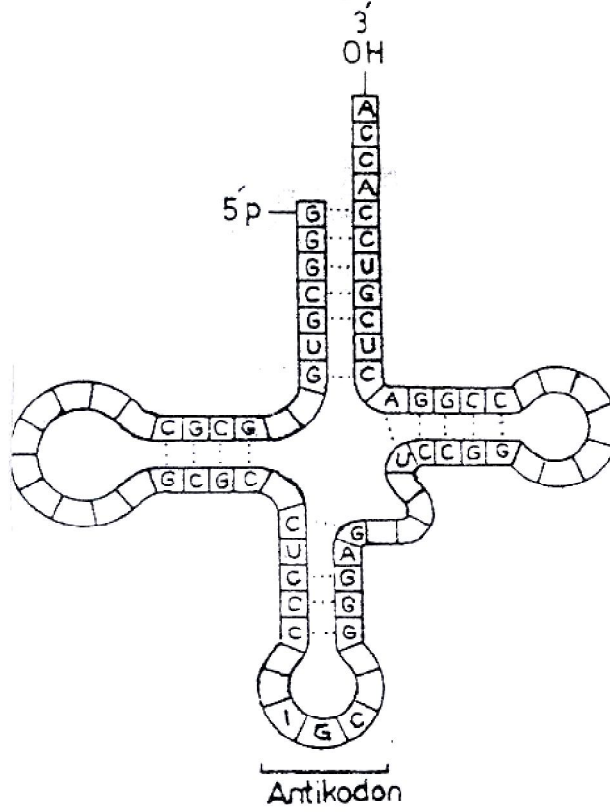
Kodon; genetik kodun en küçük birimi, üçerli baz dizileridir. Bunların 5'→3' yönündeki dizilişlerine denilmektedir. Genetik Kod; mRNA'lar üzerinden 5'→3' yönünde nükleotidlerin sıralanmasına denir. Genetik kod gerçekte DNA üzerindedir ancak denel olarak mRNA üzerinde daha kolay belirlenir.

7.4.2. Taşıyıcı RNA (tRNA)

Protein sentezi sırasında özgül aminoasitleri ribozomlara taşıyan oldukça küçük moleküllerdir. Protein yapısında yer alan her farklı aminoasit için en az bir tane tRNA bulunur. tRNA'ların altmış çeşidi bulunmaktadır. tRNA'lardaki nükleotidlerin en az yarısı çift sarmal oluşturmak üzere eşleşmişlerdir (Şekil 7.15). Molekülün alt kısmı üç bazdan oluşan antikodon ucudur ve mRNA üzerindeki kodon ile eşleşir ve aminoasitlerin mRNA üzerindeki şifreye göre doğru bir şekilde dizilmelerini temin etmektedirler.



tRNA'lar adaptörlük görevi yaparak 3'-uçları ile bağladıkları aminoasitleri ribozomlara tutulmuş mRNA üzerindeki kodonlara göre polipeptid zincirine dizerler (Şekil 7.16).

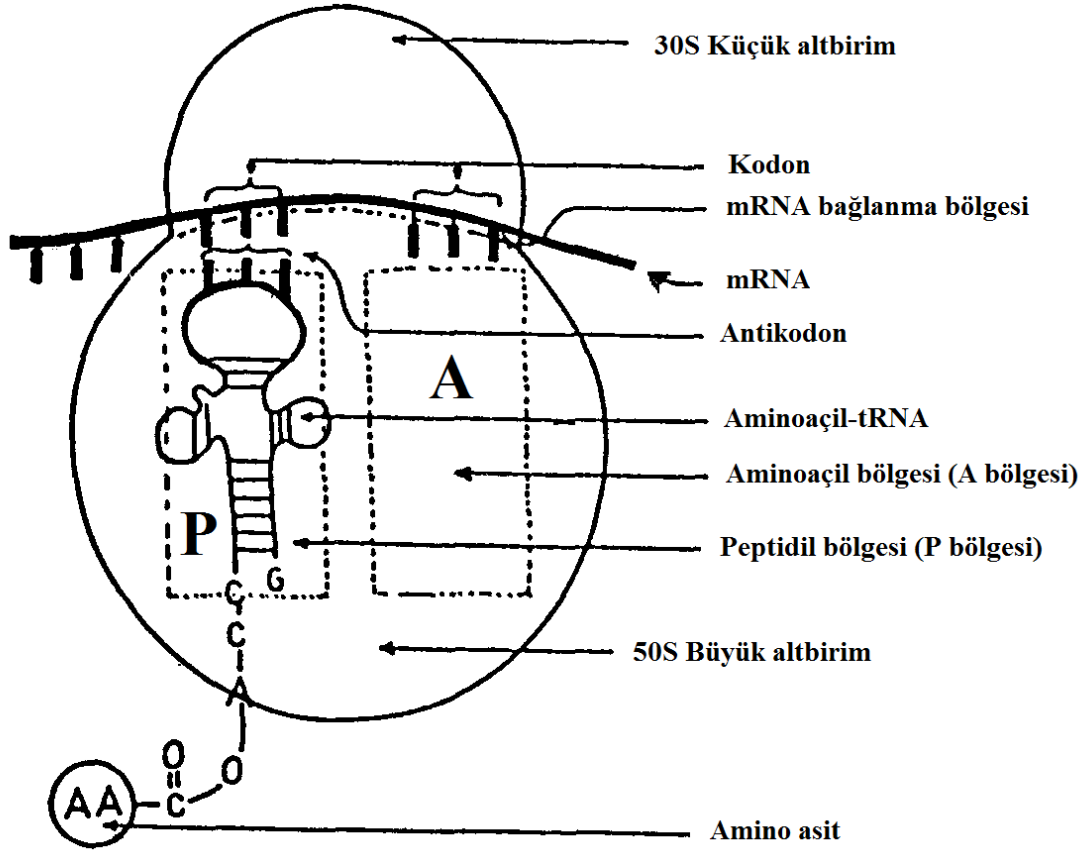


Şekil 7.15. Şematik bir tRNA gösterimi.

7.4.3. Ribozomal RNA (rRNA)

rRNA'lar ribozomların ana yapısal bileşenidir. Prokaryotik hücrelerde 3 çeşit ve ökaryotik hücrelerde 4 çeşit rRNA bulunur. Değişik tür canlıların ribozomları içerik ve boyut olarak farklıdır. Ribozomlar yaklaşık %40 protein ve %60 RNA'dan oluşurlar. Bakteri ribozomları 70S çökme sabitine sahiptir ve işlevleri farklı iki alt birimden oluşur. Büyük alt birimin çökme sabiti 50S ve küçük alt biriminki 30S' dir. Hayvan hücresinin sitoplazmik ribozomları 80S çökme sabitindedir ve alt birimleri 60S ve 40S olmak üzere ayırt edilir.

Ribozomlar üzerinde, protein sentezi sırasında aminoasidi taşıyan tRNA' ları ve onlara uygun mRNA kodonlarını tutan bir aminoasit yeri, bir de gittikçe büyüyen polipeptid zincirine kendi aminoasidini ekleyen ve sonra bu polipeptidi yüklenen tRNA'nın yer aldığı yeni bir yer yani polipeptid yeri vardır (Şekil 7.16).

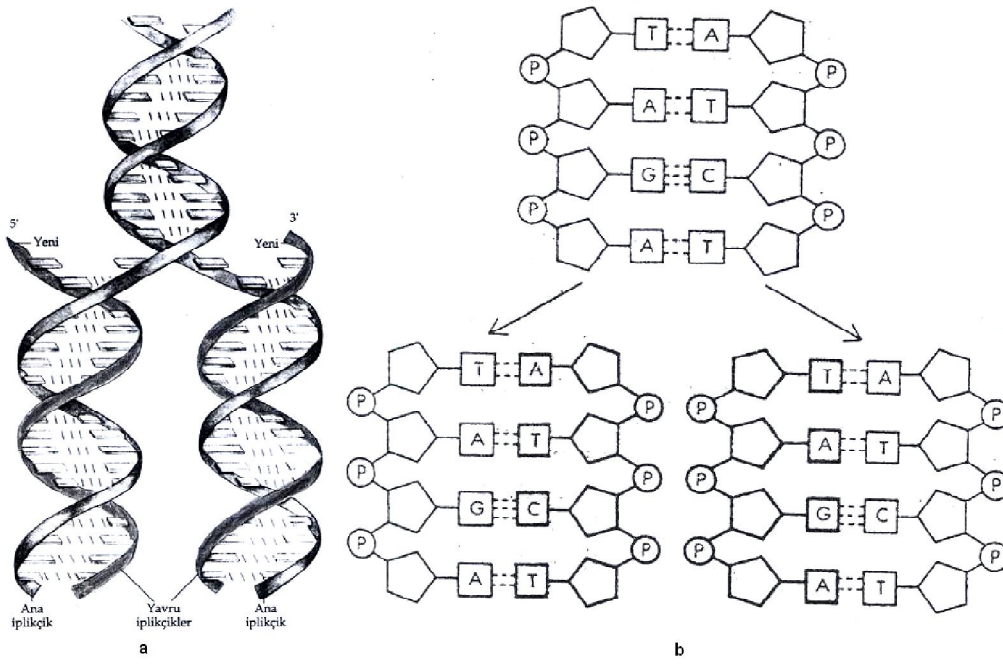


Şekil 7.16. Bir prokaryotik hücre ribozomunun şematik yapısı.

7.5. DNA' NIN REPLİKASYONU (KENDİNİ EŞLEMESİ)

DNA'nın kendini eşlemesi yarı tutucudur (semi konservatiftir). Yarı tutucu kendini eşleme hipotezi Watson ve Crick tarafından 1953 yılındaki DNA yapısına ilişkin makalelerin yayınlanmasından sonra önerildi.

Watson ve Crick hipotezlerinde çift sarmal yapıdaki DNA'nın her sarmalının oğul DNA sentezinde kendi komplementerini (tamamlayıcısını) sentezlemek için kalıplık ödevi yaptığını önermişlerdir. Yeni sentezlenen oğul DNA'nın çift sarmalından birisi, ata DNA'dan gelmektedir (Şekil 7.17). Bu ata DNA'nın komplementeri olan ikinci sarmal ise ata DNA'yı kalıp olarak kullanmakta ve yeniden sentezlenmektedir. Bu, yarı tutucu (semi konservatif) olarak kendini eşlemedir.



Şekil 7.17. (a) Watson ve Crick tarafından önerilen DNA replikasyonu. Önceden varolan ya da “ata” iplikçikler fermuar gibi ayrılır ve her biri tümleyici (yavru) iplikçığın biyosentezi için kalıp olarak kullanılır.

(b) Watson ve Crick DNA modeline göre DNA'nın replikasyonu. Koyu çizgili polinükleotid zincirleri yeni sentezlenen yavru sarmalları göstermektedir. Bu durumda DNA'nın replikasyonu yarı tutucudur.

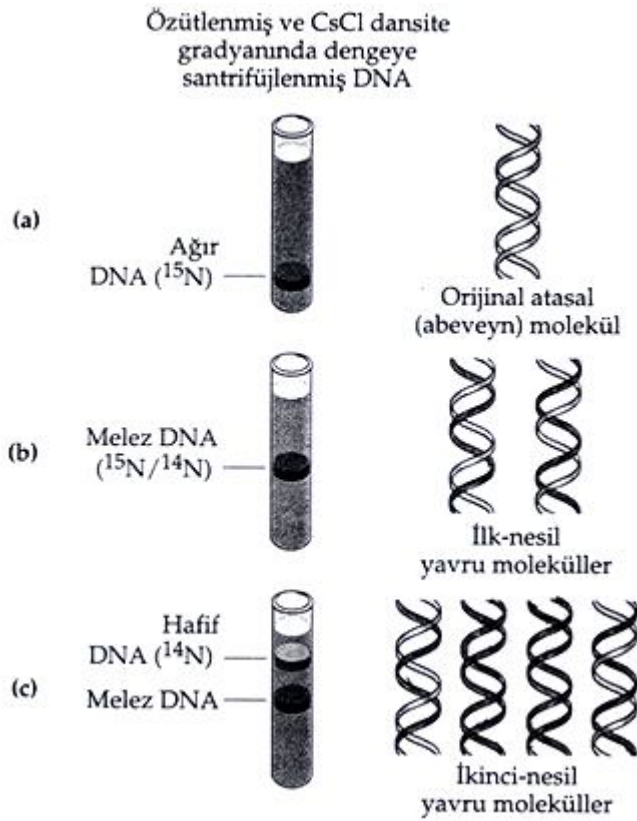
Bu hipotez M. Meselson ve F. Stahl tarafından 1957 yılında gayet zekice planlanmış bir deneyle ispatlanmıştır. Bu araştırmacılar *E.coli* hücrelerini ^{14}N **hafif izotop** yerine ^{15}N işaretli **ağır izotop** içeren tek azot kaynağı (NH_4Cl)’ nda birkaç nesil üretmişlerdir. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ortamında çoğalan *E.coli* hücrelerinin DNA’sının pürin ve pirimidin bazları ağır izotopla (^{15}N) işaretlenmiş olur. Bu hücrelerden izole edilen DNA’nın yoğunluğu hafif (^{14}N) DNA’ya göre yaklaşık %1 daha fazlaydı (Şekil 7.18.a). Bu küçük farklılığa karşın, ağır (^{15}N) DNA ve hafif (^{14}N) DNA karışımları sezyum klorür (CsCl) çözeltisinde yoğunluk gradienti santrifügasyonu yönteminde DNA bir dengeye ulaşarak ayrılmıştır. 1 mL suda 1,7 g CsCl çözünmesi ile hazırlanan çözeltinin yoğunluğu yaklaşık DNA’nın yoğunluğuna eşittir.

Daha sonra ^{15}N ’ li ortamda üretilmiş olan *E.coli* hücreleri, sadece ^{14}N izotopu içeren ($^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$) ortama aktarılarak hücre popülasyonu iki katına çıkıncaya kadar çoğaltılmışlardır.

Yeni nesilden ayrılan DNA’nın ataya ait ağır (^{15}N) DNA ile kontrol olarak kullanılan hafif (^{14}N) DNA arasındaki bölgede tek bant oluşturduğu görülmüştür. Bu melez DNA’lar yeni bir ^{14}N içeren hafif zincirle bir tane atasal ^{15}N içeren ağır zincirden oluşmaktaydı (Şekil 7.18.b).

Bütün DNA'lar bir ağır ve bir hafif zincirden melezlendiğine göre, yarı tutucu bir mekanizma ile kopyalandığı açıktır. Yarı tutucu kopyalama hipotezi, deneyin bir sonraki aşamasında da kanıtlanmıştır (Şekil 7.18.c).

Araştırmacılar E.coli bakterilerinin $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ içeren ortamda bir kuşak (nesil) daha çoğalmalarına müsaade etmişlerdir. İkinci nesil hücrelerden izole edilen DNA, yoğunluk gradientinde iki bant oluşturmuştur. Bantlardan birinin hafif (^{14}N) DNA, diğerinin ise melez ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) DNA'nın yoğunluğuna eşit olduğu bulunmuştur.



Şekil 7.18. Meselson–Stahl deneyi.

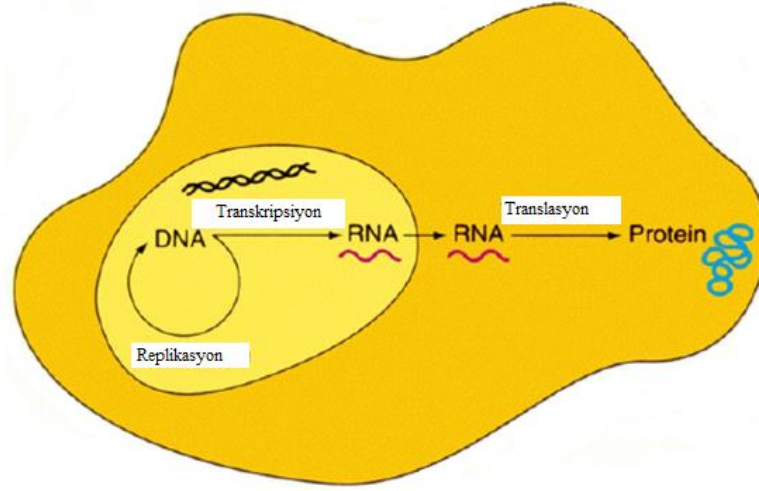
(a) Hücreler, sadece ağır azot içeren (^{15}N) bir ortamda birçok nesil üretildiler. Bu durumda tüm azotları ^{15}N 'li olan DNA'lar, sezyum yoğunluk gradyan santrifüjü sonrasında tek bir bant şeklinde görüldü. (b) Hafif azot (^{14}N) içeren bir ortama aktarılarak bir nesil üretildiklerinde ise; izole edilen hücresel DNA'ları yoğunluk gradyanda daha üstte bant verdi. (c) İkinci nesil üremesine bırakılmış hücresel DNA'lar yarı tutucu eşlemeyi doğrulayacak şekilde iki hibrit DNA ve iki hafif DNA (koyu) bant bölgeleri oluşturdu.

Bu deneyden sonra her hücre bölünmesi esnasında, DNA'nın bir sarmalının ata DNA'dan geldiği ve ikinci sarmalın ise yeni sentezlendiğini ve Watson–Crick modelinin doğruluğu kesinleşmiştir.

DNA'nın kendini eşlemesi bir başlama noktasından genellikle çift yönlü olarak başlar. Daha sonraki çalışmaların sonuçları, hem DNA'nın her iki zincirinin de birlikte eşlendiğini hem de bakteri kromozomunun çift yönlü olarak sentezlendiğini gösterdi.

Ökaryotik DNA sentezinde de prokaryotlarınkine benzer yol izlenir. En önemli farklılık ökaryotik DNA'nın replikasyonunun çok noktadan başlaması ve en az beş sınıf DNA polimerazın görev yapmasıdır. Ayrıca, ökaryotik DNA sentezi prokaryotlara göre 10 kat daha yavaştır.

Gerçekte genetik bilginin aktarılması, bir türden biyolojik molekülün diğer bir türe dönüştüğü işlemleri içerir. Biyomoleküllerarası bu bilgi akışı basit bir şekilde aşağıdaki gibi ifade edilebilir (Şekil 7.19).



Şekil 7.19. Genetik bilginin nükleik asitlerden proteinlere aktarılması (ekspresyon)

DNA molekülünün baz dizisinde saklı olan bilgi, *transkripsiyon* adı verilen işlemle mRNA moleküllerine dönüştürülür. mRNA kalıp olarak DNA baz dizisini kullanarak bazların oluşturduğu komplementer bir diziyi içerir ve mRNA' daki kodonlar (üçlü baz setleri) özel bir amino aside karşılık gelir. Dolayısıyla, üç bazlı mRNA dizileri proteindeki amino asitlerin sırasını belirler ki bir proteinin amino asit sırası da onun üç boyutlu yapısını tayin eder. Bir proteinin biyolojik fonksiyonu onun şekline ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Böylece, bir proteinin üç boyutlu şekli tamamen DNA molekülündeki nükleotid baz sırası ile belirlenir.

7.5.1. DNA Molekülünün Replikasyon Mekanizması

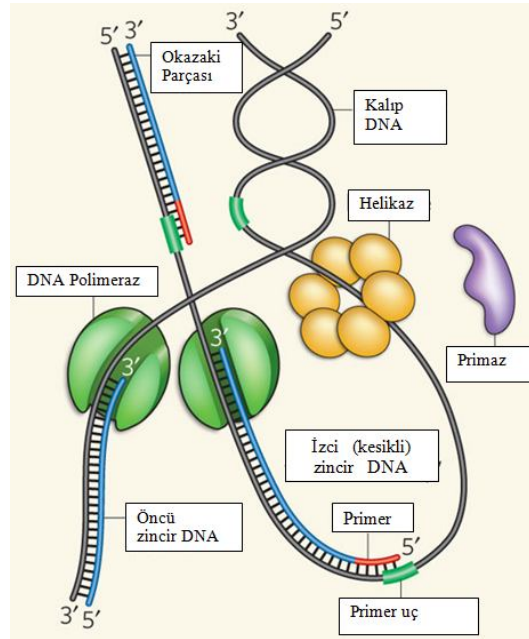
DNA'nın replikasyonu DNA molekülünün kendine özgü yapısına bağlıdır ve oldukça karmaşık işlemleri içerir. Replikasyon sırasında, DNA molekülünün çift sarmalı açılır ve böylece, her bir zincirdeki baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları koparak tamamlayıcı eşler birbirinden ayrılır. Bu sırada yeni nükleotidler yeni bir zincir oluşturmak üzere bu ana zincirler üzerinden birbirine katılır. Bu işlemde, ana zincir yeni zincirin baz sırasını belirlemek üzere bir kalıp gibi kullanılır ve yeni bir zincir oluşuncaya kadar polimerleşme devam eder. Böylece oluşan yeni çift sarmal molekülü biri ana zincirden gelen ve diğeri de yeni sentezlenmiş olan iki zinciri içermiş olur. Bu işlem *yarı korunmuş replikasyon* olarak tanımlanır. Yapılan çalışmalar, replikasyon sırasında hücrenin her 10^9 - 10^{10} bazda sadece bir

kopyalama hatası yaptığını göstermiştir ki bu hatalar da yine hücre içindeki çeşitli enzimler aracılığıyla tamir edilir.

Yarıkorunmuş replikasyon sırasında orjinal DNA molekülü iki antiparalel zincir halinde ayrılır ve bir zincir 5'→3' yönünde sentezleniyorken diğer zincir ise 3'→5' yönünde sentezlenir.

Ancak DNA polimeraz I ve III yeni bir DNA zincirini ancak 5'→3' yönünde sentezleyebilir. R. Okazaki yeni sentezlenen DNA'nın küçük parçacıklar (**Okazaki parçaları**) halinde sentezlendiğini ve bu parçaların tam bir DNA zinciri oluşturmak üzere DNA ligaz adlı bir enzim ile bir araya getirildiğini bulmuştur. Böylece yeni DNA zincirlerinin sentezlenmesi yönündeki sorular bir çözüme kavuşmuştur.

Replikasyonda antiparalel zincirler halinde ayrılan zincirlerin birisi (**öncü zincir**) 5'→3' yönünde sentezlenir. Okazaki parçaları da 5'→3' yönünde sentezlenir ve bu parçalar diğer zinciri (**izci zincir**) vermek üzere DNA ligaz ile birleştirilir. Bütün bu işlem oyalanan zincir (**izci zincir**) süreksiz olan parçalardan sentezlendiğinden **kesintili replikasyon** olarak tanımlanır ve bir arada yürüyen bu zincirler bir **replikasyon çatalı** oluşturur (Şekil 7.20).



Şekil 7.20. Replikasyon çatalının ve Okazaki parçalarının oluşumu.

7.5.1.1. DNA Replikasyonunda Rol Oynayan Enzimler

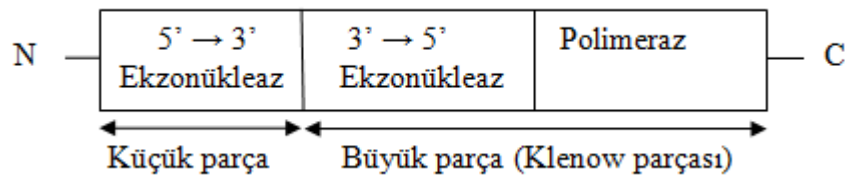
Replikasyon işlemleri sırasında en az 15 protein ve enzim görev yapar ki bu, tam ve doğru bir genetik kopyalanma işlemi için gereklidir (Tablo 7.10). Her bir protein bileşenin

kendine has görevi vardır. *E.coli*'nin replikasyonunda DnaB proteini (DNA çift sarmalını açmaya başlar), SSB (tek zincirli DNA' ları kararlı yapar) ve DNA giraz (süper bobinli yapıyı bozar) gibi proteinler de mevcuttur. Bu işlemlerde primaz RNA primerlerini sentezler, helikaz ise çift sarmalı çatal haline getirir. DNA polimeraz III, DNA sentezlerken, DNA polimeraz I, RNA primerlerini uzaklaştırır ve boşlukları doldurur. DNA ligaz da parçalarını birleştirerek tam bir DNA tek zinciri oluşturur.

Tablo 7.10. *E. coli*' de DNA replikasyonunda görev yapan proteinler

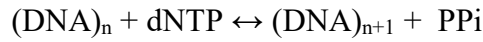
Replikasyon Proteinleri	Görevi
DNA giraz	DNA süper sarmalının yapısını çözer
SSB	Tek zinciri DNA ya bağlanır.
DnaA	Başlama faktörü
HU	Histon benzeri DNA bağlanma proteini
PriA	Replikasyonun başlamasını sağlar
PriB	Replikasyonun başlamasını sağlar
PriC	Replikasyonun başlamasını sağlar
DnaB	DNA yı açar (sarmal yapıyı ve çift zincirleri)
DnaC	Bir çaperon
DnaT	Dna nın salıverilmesini sağlar
Primaz	RNA primerinin sentezini sağlar
DNA polimeraz III	DNA polimerinin sentezini sağlar
DNA polimeraz I	RNA primerini keser ve boşluğu nükleotidlerle doldurur
DNA ligaz	Okazaki parçalarını birbirine bağlar
Tus	Sonlanmayı sağlar

Yeni DNA zincirlerinin sentezlenmesinde önemli rollerden biri DNA polimeraz I ile sağlanır. Replikasyon işlemlerinde rol oynayan DNA polimeraz I enziminin üç enzimatik etkinliği vardır (Sekil 7.21). Bu enzim 36 kDa moleküler ağırlığa ve 5'→3' ekzonükleaz aktivitesine sahip küçük bir kısım ile 67 kDa' lık ve **Klenow parçası** adı verilen daha büyük bir kısımdan oluşur ki bu parça hem polimeraz ve hem de 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir.

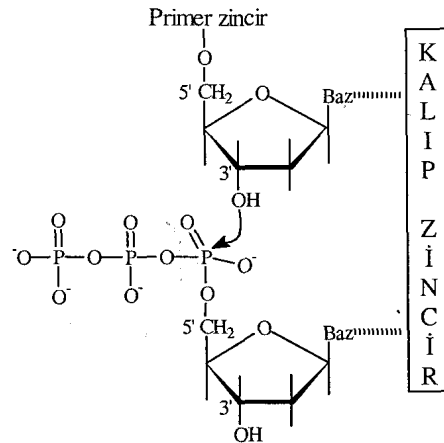


Şekil 7.21. DNA polimeraz I in peptid bileşenleri ve etkinlikleri.

Günümüze kadar en iyi anlaşılan ve en basit DNA polimeraz olan DNA polimeraz I tek başına DNA replikasyonunu gerçekleştirmemesine rağmen hem replikasyonda ve hem de DNA'nın onarımında kritik bir rol oynar. Bu enzim bir DNA zincirinin 3'-ucuna birer birer deoksiribonükleotidlerin ilavesini 5'→3' yönünde katalizler. Böyle bir polimerleşme işlemi gerçekleştirmek üzere DNA polimeraz I enzimi DNA çift sarmalının bir zincirine ihtiyaç duyar ki bu zincir yeni bazların ilavesi için bir kalıp görevi görür. Yeni DNA sentezi için ayrıca deoksiribonükleotit trifosfatlara (dNTP'ler veya dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), bir RNA primerine ve Mg⁺² iyonlarına ihtiyaç vardır. DNA polimeraz I enzimi mononükleotid birimlerinin yeni ve büyüyen DNA zincirinin serbest olan 3'-konumlarına basamaklı bir şekilde katılmasını katalizler ve bu sentez işlemi 5'→3' yönünde gerçekleşir. Bir sentez işlemi olduğundan enerji gerektiren bu katılma reaksiyonu için gerekli enerji deoksiribonükleotid trifosfatlardan pirofosfat (PPi) ayrılmasıyla açığa çıkan enerjiden sağlanır. DNA polimeraz I, DNA molekülünü yenilemek üzere dakikada yaklaşık 1000 nükleotidi birbirine ilave eder. Hücre içinde bulunan diğer DNA polimerazlar (DNA polimeraz II ve III) ise benzer mekanizmalarla diğer enzimatik fonksiyonları yerine getirir.

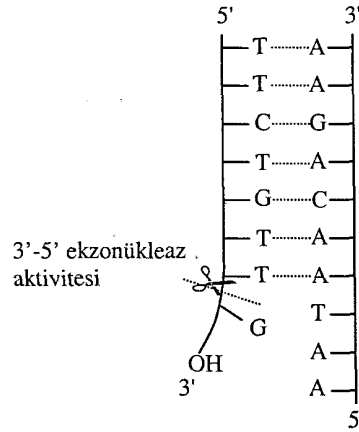


DNA polimeraz I, DNA sentezlemek için bütün deoksiribonükleotid 5'-trifosfatları (dNTP'ler veya dATP, dTTP, dGTP ve dCTP) ve Mg⁺² gerektirir. Başlangıçta, serbest bir 3'-hidroksil grubunu içeren bir primer zincir ve tek zincirli bir bölgeyi içeren bir DNA kalıbı da gereklidir. Polimeraz, dNTP'de bulunan en içteki fosfor atomuna primerin 3'-ucundaki hidroksil grubunun nükleofilik saldırımını katalizler (Şekil 7.22). Böylece bir fosfodiester bağı oluşurken bir pirofosfat ayrılır. Bu işlemlerde gerekli enerji pirofosfatın hidrolizinden karşılanır.



Şekil 7.22. DNA polimeraz I in Poimeraz aktivitesi

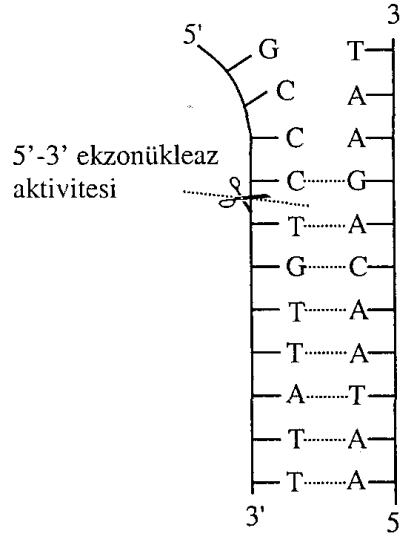
DNA polimeraz I ayrıca 3'→5' ekzonükleaz ve 5'→3' ekzonükleaz şeklinde iki etkinliği daha vardır. DNA zincirlerinin polimerasyonunu katalizlediği gibi DNA polimeraz I, 3'→5' ekzonükleaz etkinliği ile hidrolizini de katalizleyebilir. 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi zincirin 3'-ucundan başlanıp 5'-ucuna doğru nükleotidlerin basamaklı hidrolizini içerir (Şekil 7.23).



Şekil 7.23. DNA polimeraz I in 3' →5' ekzonükleaz aktivitesi

DNA polimeraz I' in 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi, çift sarmalın bir parçası olmayan ve 3'-ucunda serbest olarak bulunan bir nükleotide gereksinim duyar. Böylece uzaklaştırılacak bu nükleotid hem serbest bir 3'-hidroksil ucuna sahip olmalı ve hem de çift sarmalın bir parçası olmamalıdır. Deneyler, bu özelliğin primerin ucuna yanlış ilave edilen nükleotidlerin bulunmasını ve yerine doğru olan nükleotidin yerleştirilmesini sağladığını göstermiştir. Böyle bir aktivite DNA replikasyonunun doğruluğunu artırır. Böylece enzimin DNA zincirine ilave edilen yeni bazların doğruluğunu kontrol etme özelliği vardır.

DNA polimeraz I' in 5'→3' aktivitesi ise, DNA çift sarmalının bir parçası olan zincirdeki bir 3',5'-fosfodiester bağının hidrolizini katalizler (Şekil 7.24). Gerçekte bu enzim DNA üzerinde bulunan bir parçanın onarım işlemi gereğince uzaklaştırılmasını sağlar. Bu aktivite 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi olarak bilinir ve 3'→5' aktivitesinden birkaç farklılık gösterir ki bunlardan biri hidrolizlenen bağ, DNA' nın çift sarmallı bölgelerinde bulunur. Diğer, hidrolizlenme 5'-ucundaki fosfodiester bağında veya zincirin iç kısımlarında bulunan serbest bir hidroksil grubu içerebilen bir bağda meydana gelebilir. Ayrıca bu aktivite o anda gerçekleşen DNA sentezi ile artırılır. Diğer bir özelliği de, bu aktiviteyi sağlayan bölgenin enzim üzerindeki diğer iki aktif bölgeden (polimeraz ve 3'→5' ekzonükleaz) farklı bir bölgede olmasıdır. 5'→3' aktivitesinin bu özellikleri ile polimeraz enzimi, DNA replikasyonunda hatayı bulup onu düzeltten bir özellik gösterir.

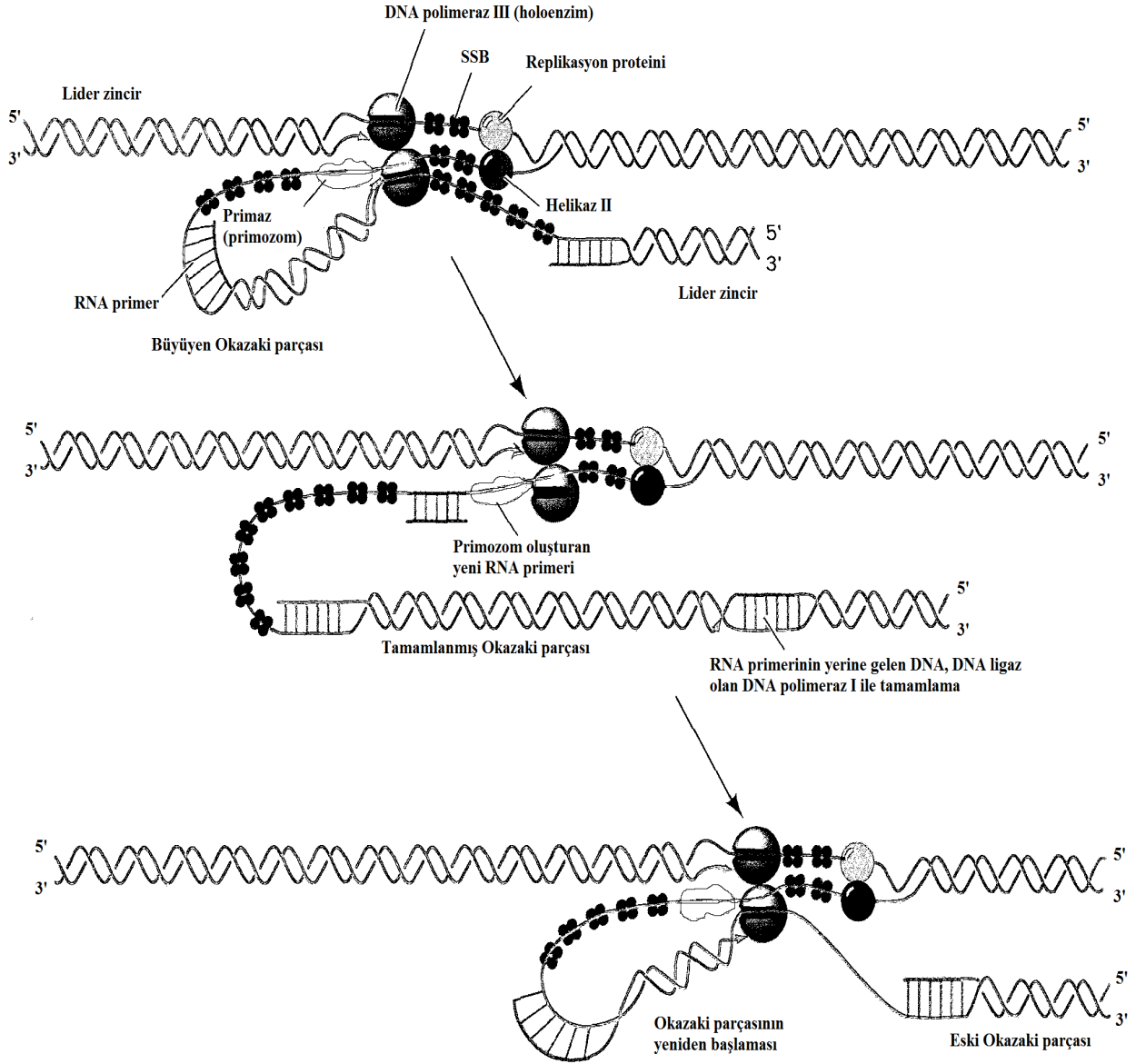


Şekil 7.24. DNA polimeraz I in 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi

E. coli' de DNA polimeraz I yanında DNA polimeraz II ve III adı verilen iki polimeraz daha bulunur. Yapılan *in vitro* çalışmalarda bu enzimlerin DNA polimeraz I gibi ortak bazı özellikleri olduğu bulunmuştur. Bunlar;

- 1) Bir kalıba bağlı olarak dNTP' den DNA'nın sentezini katalizler,
- 2) Bu işlemlerde serbest 3'-ucuna sahip bir primer gereklidir,
- 3) Sentez işlemi, 5'→3' yönünde gerçekleşir,
- 4) Bu enzimler 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir.

Replikasyon işlemlerinde rol oynayan enzimler çeşitli bileşenlerle beraber DNA sarmalının açılmasını, replikasyon boyunca kararlı kalmasını, replikasyon çatalının oluşturulmasını, her bir zincirin eşinin uygun bir hızda sentezlenmesini ve eğer gerçekleşirse hataların okunup düzeltilmesini sağlayacak şekilde mükemmel bir düzen içerisinde çalışır (Şekil 7.25).



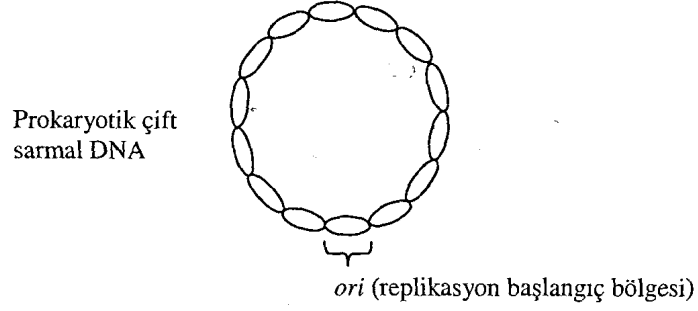
Şekil 7.25. DNA replikasyonunda rol oynayan bazı proteinler.

7.5.1.2. Replikasyon İşleminin Aşamaları

DNA'nın replikasyonu prokaryotlarda ve ökaryotlarda çok sayıda enzim gerektiren işlemleri içerir ve bu işlemler aşağıdaki basamaklar halinde özetlenebilir.

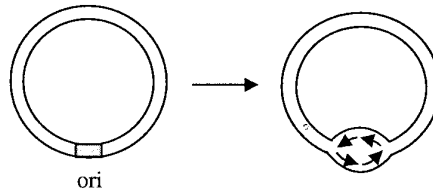
7.5.1.2.1. DNA Çift Sarmalındaki Zincirlerin Birbirinden Ayrılması

Ökaryotik ve prokaryotik bütün çift zincirli DNA moleküllerinde replikasyon işlemi *replikasyon orjini* olarak tanımlanan bir veya daha çok özel baz sıralarından başlar. Replikasyonun başlatıldığı bu baz dizileri *ori* olarak adlandırılır (Şekil 7.26). *Ori*'den başlayan replikasyon her iki yönde ilerleyerek zincir sonuna ulaşıncaya kadar gerçekleşir.



Şekil 7.26. Bir prokaryotik çift sarmal DNA ve replikasyon başlangıç bölgesi

Prokaryotlarda, *ori* yaklaşık 200-300 baz çiftinden oluşur. Türler içinde oldukça korunmuş olan bu diziler çeşitli sayıda tekrarlayan baz çiftlerini içerir. DNA molekülündeki baz çiftleri çift sarmalın iç kısmında olduklarından, sarmalın önce kendini oluşturan zincirlere ayrılması gerekir ve böylece yeni DNA zincirlerinin oluşturulabileceği bir kalıp oluşur. Zincirlerin birbirinden ayrılması işlemi, çok çeşitli replikasyon proteinlerini gerektirir. Önce replikasyon başlama bölgesine, **replizom** olarak adlandırılan ve DNA polimeraz ile beraber çeşitli replikasyon proteinlerinin oluşturduğu bir protein kompleksi bağlanır. Bu görevi yerine getirecek proteinlerden biri helikaz olarak bilinen bir replikasyon enzimidir. Sarmalın açılmasıyla birbirinden ayrılan zincirlerin kararlılığı da tek zincir bağlanma proteinlerince sağlanır ve bu proteinler bir yandan da replikasyon sırasında sarmalın tekrar oluşmasını engeller. *Ori* bölgesinden başlayan replikasyon işlemi, çemberimsi DNA'nın açılmasıyla iki replikasyon çatalı halinde ve iki yönde çatal karşılaşıncaya kadar devam eder (Şekil 7.27). Öncü zincir öncelikle DNA polimeraz III ile 5'→3' yönünde sentezlenir. Oyalanan zincir de aynı yönde sentezlenmesine rağmen bu sentez işlemi ise daha karmaşıktır.

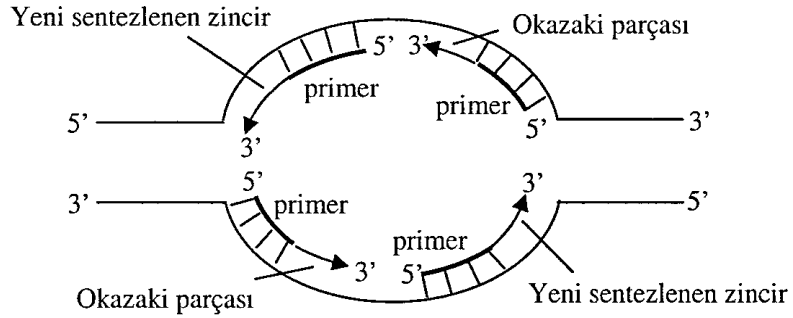


Şekil 7.27. Prokaryotlarda *ori*'den başlayan replikasyon işlemi, her iki yönde iki replikasyon çatalı halinde gerçekleşir.

7.5.1.2.2. RNA Primer Zincirin Oluşması

Çeşitli replikasyon enzimleri ve proteinleri ile replikasyon çatalı şeklinde açılan her iki DNA zinciri de DNA polimeraz için birer kalıp görevi görür. Ancak DNA polimeraz bir kalıp zinciri tanıyamaz ve polimerleşme işlemini sadece tek bir zinciri kullanarak başlatamaz. Bu enzim, bir DNA çift zincirine ihtiyaç duyar. Bunu sağlamak üzere yaklaşık 10-30 nükleotid

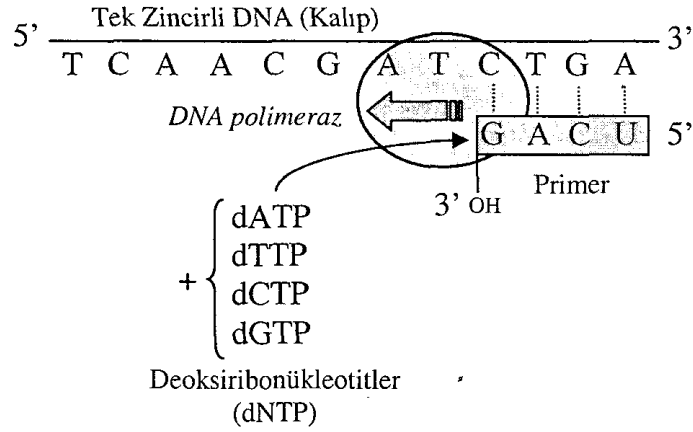
uzunluğunda kısa bir nükleotid zincirin sentezlenmesi ve zincirlerin 3'-ucuna eklenmesi gerekir. Böylece, her iki kalıp zincir üzerinde oluşacak kısa bir çift zincir DNA polimerazın bağlanması ve kalıp zincirlere nükleotidleri eklemesi için yeterli olur. Bu amaca uygun bir ribonükleotid dizisi sentezlenir. Üretilen bu kısa oligonükleotid zincir, DNA sentezi için bir **primer** olarak görev yapar ve bu RNA zincirin sentezi **primaz** adlı bir enzim (DNA-sentezi için bir RNA polimeraz) ile gerçekleştirilir. Bu zincir orjinal DNA zincirinin 3'- ucundaki baz sırasının tamamlayıcısıdır (komplementer) ve kalıp DNA'nın bu ucundaki bazlarla hidrojen bağı yaparak bu bölgede kısa bir çift zincir oluşturur. Böylece, bu primerlerin her iki kalıp zincire ayrı ayrı bağlanmasıyla üretilen çift zincirlere DNA polimeraz moleküllerinin bağlanması ve her bir kalıptan tamamlayıcısı olan yeni zincirin sentezlenmesi için gerekli şartlar sağlanmış olur (Şekil 7.28).



Şekil 7.28. İki yönlü ve iki çatallı replikasyon

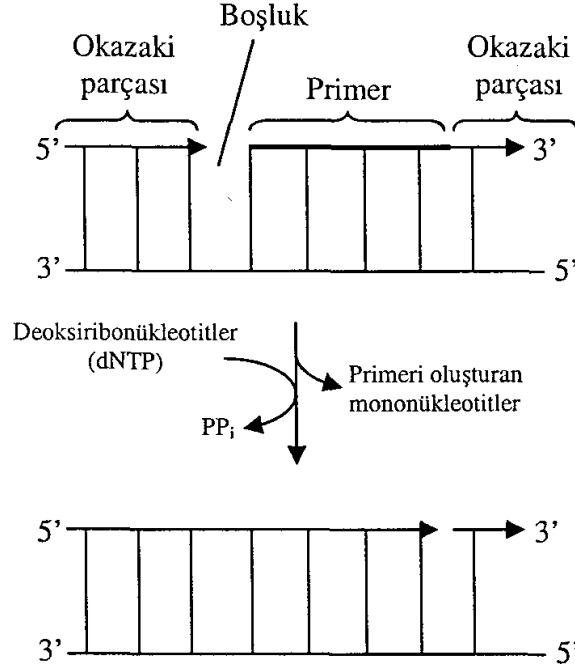
7.5.1.2.3. Yeni DNA Zincirinin Sentezi

DNA polimeraz, replikasyonu katalizleyebilmek için çift zincirli bir DNA'ya gerek duyar. DNA polimeraz bir kalıp DNA zinciri ile bu zincirin 3'-ucuna bağlanan primerin oluşturduğu çift zincire bağlanıp kalıp üzerinde 3'→5' yönünde ilerleyerek ortamdaki deoksiribonükleotidleri primer zincirin 3'-ucuna 5'→3' yönünde ilave eder ve kalıbın tamamlayıcısı yeni bir zinciri sentezler. Bu işlem, çift zincirin her iki yönünde de replikasyon çatallı oluşturularak gerçekleşir. Aşağıdaki modelde bir kalıp üzerinde replikasyonun başlaması gösterilmektedir (Şekil 7.29).



Şekil 7.29. Primaz tarafından sentezlenen primer RNA zinciri kalıp DNA ile kısa çift zincirli bir DNA oluşturur. Bağlı primerin serbest 3'-OH ucuna DNA polimeraz ile yeni nükleotidler ilave edilir ve polimeraz kalıp zinciri 3'→5' yönünde okumaya devam eder.

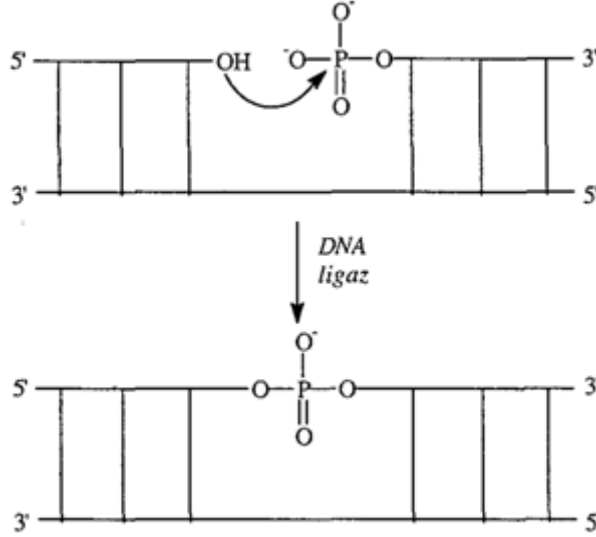
Primaz primeri sentezledikten sonra yeni bir primere ihtiyaç oluncaya kadar her iki kalıptan ayrılır. Ancak Okazaki parçalarının oluşturulabilmesi için izci zincire yeni primerlerin bağlanması gerekir ve izci zincir için 3'→5' yönündeki replikasyon da bu primerler üzerinden başlatılarak gerçekleştirilir. Polinükleotid sentezi ilerledikten ve ilk Okazaki parçası ikinci primere kadar sentezlendikten sonra DNA polimeraz sentezi durdurur ve izci zincir üzerinde kayarak ikinci primerin sonuna nükleotidleri katmaya ve ikinci Okazaki parçasını sentezlemeye başlar. Böylece, izci zincir üzerindeki 3'→5' yönündeki replikasyon da devam eder. Üretilen Okazaki parçaları birbirlerinden primerlerle ayrılır ve DNA polimeraz I bir yandan 5'→3' ekzonükleaz aktivitesini göstererek bu kısa zincirli primerleri nükleotidlerine parçalayarak kalıp zincirden uzaklaştırırken diğer yandan da primerin uzaklaşmasıyla ortaya çıkan boşlukları, polimeraz aktivitesini kullanarak, deoksiribonükleotidlerle doldurur (Şekil 7.30).



Şekil 7.30. DNA polimeraz I in primerleri kalıptan 5'→3' ekzonükleaz etkinliği ile uzaklaştırılması ve 5'→3' polimeraz etkinliği ile boşlukların doldurulması

7.5.1.2.4. Oluşan DNA Parçaları Arasındaki Boşlukların Doldurulması ve Parçaların Birleştirilmesi

RNA primer zincirlerinin uzaklaştırılması ile oluşturulan DNA parçalarına izci zincirin tamamlayıcısı (komplementeri) olacak şekilde DNA polimeraz I ile yeni nükleotidler ilave edilir. Ancak DNA polimeraz I ile uzatılan yeni zincir parçalardan bir önceki zincirin 3'-hidroksil ucu ile bir sonraki zincirin 5'-fosfat ucu arasında bir bağlanma olmadığından üretilen bu parçalar arasında boşluklar vardır. İzci zincirin tam bir tamamlayıcısının oluşturulabilmesindeki son adım zincir uçlarının birleştirilmesidir ve bu görev DNA ligaza aittir. Bu enzim, üretilen bu DNA parçalarından birinin 3'-hidroksil grubu ile diğer komşu DNA parçasının 5'-fosfat grubunun esterleşme reaksiyonunu katalizlemeden sorumludur. Böylece, bu zincir parçaları arasında bir fosfodiester bağı oluşturularak tam bir zincire ulaşılmış olur (Şekil 7.31.). Bu reaksiyon, endergonik olduğundan işlemin gerçekleşmesi için ATP hidrolizi gibi bir reaksiyon ile kenetlenmiştir. Bazı ligazlar ise nikotinamid dinükleotidlerinin mononükleotidlere dönüşmesi işlemi ile sağlanan enerjiyi kullanır.



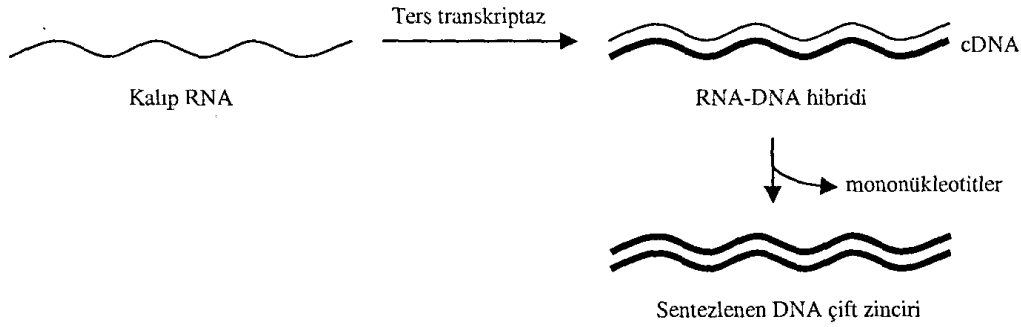
Şekil 7.31. DNA ligazın izci zincirleri birleştirme özelliği

Prokaryotik DNA replikasyon işlemleri çok sayıda protein ve enzim bileşeni içerdiğinden yukarıda anlatıldığından daha fazla ve farklı reaksiyonları ve aşamaları gerektirir. Bütün bu işlemler açısından karşılaştırıldığında ökaryotik ve prokaryotik replikasyon arasında oldukça yüksek düzeyde benzerlikler vardır. Ancak, ökaryotik sistemler daha karmaşık olduğundan replikasyon işlemleri arasında farklılıklar da mevcuttur.

7.5.2. Ters Transkripsiyon ve RNA Replikasyonu

DNA'nın replikasyonu işleminde bir DNA zinciri kalıp gibi rol oynar ve bir DNA polimerazın da etkisiyle bu kalıbın tamamlayıcısı olan yeni bir DNA zinciri sentezlenir. Eğer bir RNA dizisi kalıp ise bu durumda *ters transkriptaz* adı verilen bir enzime ihtiyaç vardır. Bu enzim varlığında kalıp RNA dizisine sahip yeni DNA zincirleri sentezlenebilir (Şekil 7.32). Diğer DNA ve RNA polimerazlarda olduğu gibi bu enzim de 5'→3' yönünde polimerleşmeyi katalizler. Bu işlemde de bir primer gerekir ve şartlar sağlandığı takdirde deoksiribonükleotidler primerin 3'-ucuna eklenerek tamamlayıcı bir DNA (cDNA) zinciri sentezlenir. Böylece, bir DNA-RNA hibridi oluşturulmuş olur. Bu hibritten RNA zinciri yine ters transkriptaz ile ayrıldıktan sonra geri kalan DNA zinciri ters transkriptaz tarafından bir kalıp olarak kullanılarak yeni bir zincir sentezi ve böylece çift DNA zinciri sentezi gerçekleştirilir. Ters transkriptaz yardımıyla böylece bir RNA dizisine karşılık gelen bir DNA sentezi bu yolla mümkün olur. *Retrovirüs* olarak adlandırılan bazı virüslerin genetik maddesi RNA olduğundan bu virüsler kalıp olarak RNA'ları kullanır ve ters transkriptaz ile kendi

DNA'larını sentezler. Genetik maddesi RNA olan ancak ters transkriptaz içermeyen virüsler de mevcuttur.



Şekil 7.32. Bir kalıp RNA zincirinden ters transkriptaz etkisiyle tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi.

7.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve DNA' nın Çoğaltılması

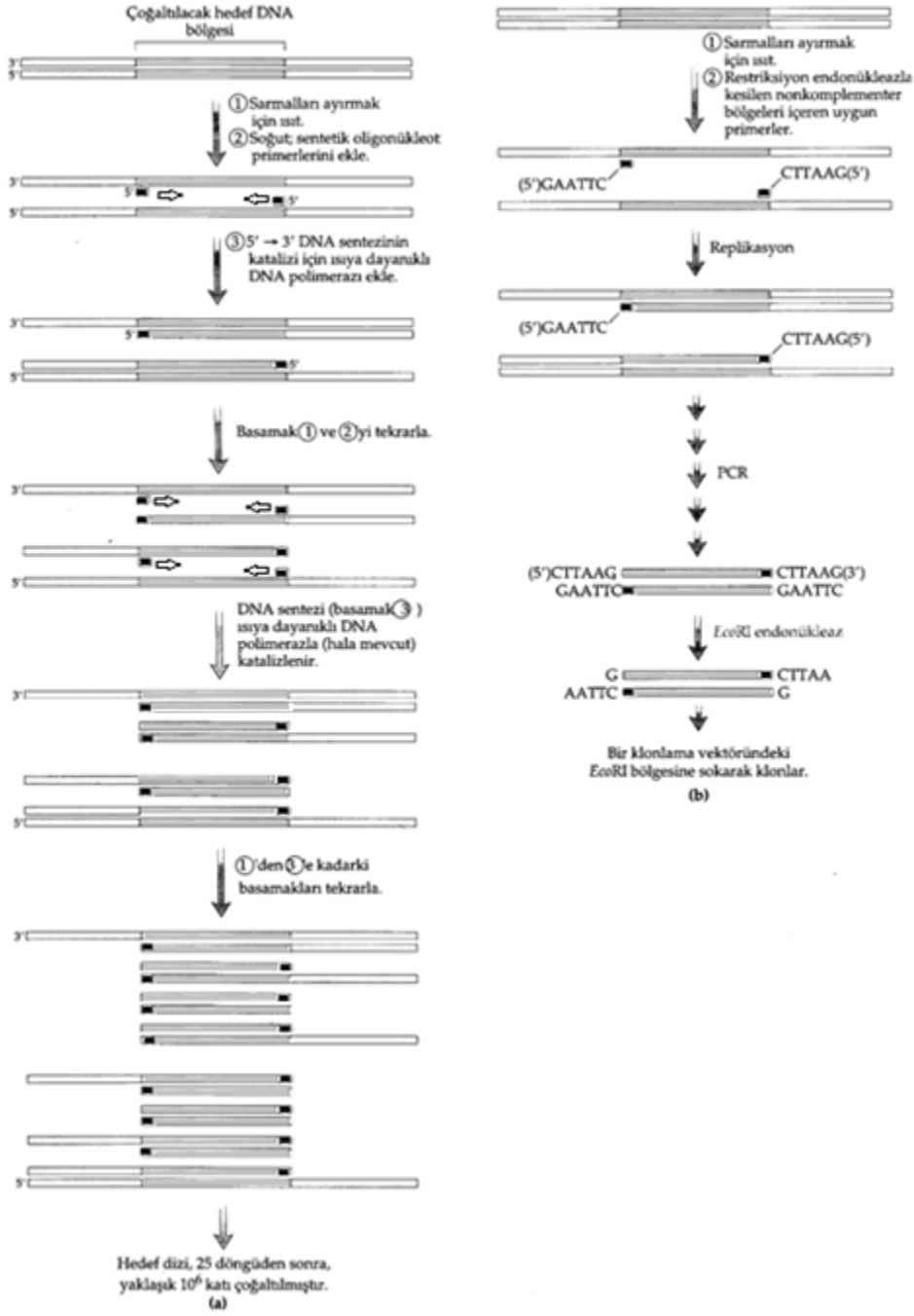
İnsan genom projesi ve her bir tip organizmanın genomlarının sırasının belirlenmesine ilişkin çalışmalar, çok özgün gen sırası bilgilerini açığa çıkarmaktadır. Oysa bir ya da daha fazla DNA kütüphanelerinin oluşturulması, “*bir genomun dizisinin*” belirlenmesinde çoğu kez bir ara basamaktır. Genomik dizinin belirlenmesi tamamlandığında bir genin kütüphanenin yardımı olmaksızın kolayca, klonlanabildiği görülecektir. Eğer kodlanacak bir DNA parçasının en azından bir kısmına ait dizi bilinirse, o DNA bölümünün çok sayıda kopyası, **polimeraz zincir tepkimesi (PCR)** kullanılarak çıkartılabilir. 1983 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilen PCR ile çoğaltılmış DNA doğrudan klonlanabilmekte ya da çeşitli analitik işlemlerde kullanılabilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu, özellikle çok düşük seviyelerdeki bir DNA parçasının (< 6 kb) miktarının artırılması amacıyla geliştirilmiş bir yöntem olup esas *in vitro* replikasyona yani hücre olmaksızın replikasyona dayanır. Ancak, hücrelerde gerçekleşen replikasyona göre hem az sayıda bileşeni ve hem de oldukça basit aşamaları gerektirir. Bu yöntem, arzu edilen seviyelerde DNA'yı çoğaltma imkânını sağlar. Dolayısıyla, özellikle genetik bozuklukların düzeltilmesinde, mikrobiyolojide ve adli tıpta çeşitli amaçlar için DNA'nın analiz edilebilecek ve kullanışlı bir düzeyde bulunması arzu edilir ki PCR bu açıdan oldukça kullanışlı ve verimli bir yöntemdir.

PCR kolay uygulanabilir özelliğe sahiptir. İki sistematik oligonükleotid sentezlenir, bunların her biri, çoğaltılacak bölümün uçlarının hemen yanındaki yerlerdeki hedef DNA'nın karşıt sarmaldaki sıralara komplementerdir. Oligonükleotidler replikasyonun primerleri olarak görev yapar; hibritleşmiş problemlerin 3' uçlarıyla birbirlerine karşı konuşlanmış ve istenen DNA parçası boyunca DNA sentezini başlatmak üzere yerleşmiştir (Şekil 7.33a).

Çoğaltılacak bölümü içeren izole DNA, önce hafif şekilde ısıtılarak denatüre edilir, sonra sentetik oligonükleotidlerin çok fazla bulunduğu ortamda soğutulur. Daha sonra dört tip deoksinükleosit trifosfat eklenir ve primerli DNA bölümü seçicilikle kopyalanır. Isıtma, soğutma ve replikasyondan oluşan bir döngü, birkaç saat içinde otomatik işleme 25-30 kez tekrarlanır, primerlerin takılı olduğu bu DNA bölgesinin kolayca analizi ve/veya klonlanabilmesi için çok sayıda kopyası çıkarılmış olur. PCR' da *taq I* polimeraz (90°C'de kaplıcalarda yaşayan bir bakteriden [*Thermus aquaticus*] elde edilmiştir) gibi ısıya dayanıklı polimerazlar kullanılır. Enzim her ısıtma basamağında aktif kaldığı için yenilenmesine gerek yoktur. PCR için kullanılan primerlerin titiz tasarımı örneğin endonükleaz kesim yerlerinin dahil edilmesi, çoğaltılmış DNA'nın sonraki klonlanmasını kolaylaştırmaktadır (Şekil 7.33b). Bu yöntemde, yukarıda üç aşama olarak verilen işlem aynı DNA üzerinde birinci aşamadan itibaren defalarca tekrar edilip DNA sentezi gerçekleştirilerek yüksek DNA seviyelerine ulaşılır. İşlemden gerçekleştirilen çevrim sayısı (**n**) arttıkça üretilecek DNA miktarı da üstel olarak (**2ⁿ**) artar. Dolayısıyla, her bir çevrimde mevcut DNA'nın iki katı kadar daha fazla DNA elde edilebilir.

PCR yöntemi hemen her örneğin saptanması ve çoğaltılması için yeterince hassastır. DNA yavaş şekilde yıkılmasına karşın 40,000 yaşından fazla örneklerden alınan DNA' lar PCR yardımıyla başarıyla klonlanmıştır. Bu teknik mumyalanmış insan kalıntılarından ve yünlü mamut gibi soyu tükenmiş hayvanlardan alınan DNA parçalarının klonlanması için kullanılmıştır. Böylece moleküler arkeoloji ve moleküler paleontoloji gibi yeni bilim dalları ortaya çıkmıştır. Defin yerlerinden sağlanan DNA; PCR yöntemi ile çoğaltılarak, eski insanların göç yolları izlenmektedir. Epidemiyologlar, İnsan patojenik virüslerinin biyolojik değişimini incelemek için insan kalıntılarından PCR' la çoğaltılan DNA örneklerini kullanabilirler. DNA klonlamadaki yararlarına ek olarak PCR' nin, adli tıpta da çok önemli yeni bir araç olduğu anlaşılmıştır.



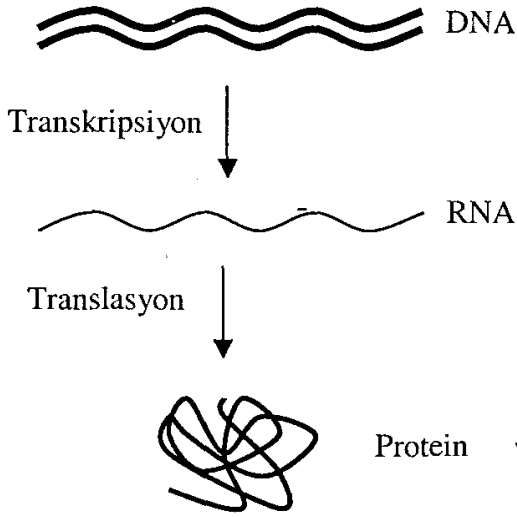
Şekil 7.33. DNA'nın PCR kullanılarak çoğaltılması, (a) işlem üç basamaklıdır. **1.)** Isıtmakla DNA sarmalları birbirinden ayrılır, sonra **2.)** Çoğaltılacak bölgeyi kuşatan çok miktardaki kısa sentetik DNA primerleriyle (siyah uç) bağlanır. Polimerleşmeden sonra **3.)** İşlem 25 ya da 30 döngü olmak üzere yinelenir. Isıya dayanıklı DNA polimeraz *TaqI* (kaplıcalarda üreyen bakterilerden, yani *Thermus aquaticus*, elde edilir) ısıtma basamaklarından etkilenmez, (b) PCR ile çoğaltılan DNA klonlanabilir. Primerler bir restriksiyon endonükleazın kesim yerleri olan uçlarda komplementer olmayan DNA içerir. Primerlerin bu kısımları hedef DNA'ya bağlanmamalarına karşın, PCR işlemi bunların çoğaltılacak DNA'ya girmelerini sağlar. Çoğaltılan parçaların bu yerlerden kesimi, çoğalmış DNA'nın bir klonlama vektörüne bağlanmasını kolaylaştırıcı yapışkan uçlar çıkarır.

Günümüzde oldukça yaygın olan PCR yöntemi otomatik termal çevrimcilerle gerçekleştirilir ve birkaç saatlik zaman dilimi içerisinde çok küçük miktarlardaki DNA parçalarından milyon kat kadar daha fazla DNA çoğaltılabilir. Bu yöntem mikrobiyolojide yaygın olarak mikroorganizmaların teşhisinde ve alt türlerin belirlenmesinde, adli tıpta özellikle babalık tayininde, kriminolojide suç delillerinden alınacak numunelerin DNA içeriklerinin artırılıp analiz edilmesi ve suçluların tespitinde, klinik çalışmalarda genetik bozuklukların belirlenmesinde ve daha pek çok alanda kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ayrıca, eğer özel primerler sağlanırsa klonlamada oldukça kullanışlıdır. Miktarı artırılacak nükleik asidin RNA olduğu inanıldığında ters transkriptazın (RT) kullanıldığı bir başka yöntem olan RT-PCR' dir ki bu yöntem PCR' nin bir başka uygulamasıdır. Bu yöntemde ise ters transkriptaz etkisiyle herhangi bir RNA molekülünden tamamlayıcı DNA (cDNA) üretilir. Bu cDNA molekülleri kalıp görevi yaparak PCR gerçekleştirilir ve böylece başlangıçtaki RNA dizisine sahip DNA yüksek miktarda üretilmiş olur.

7.6. GENETİK BİLGİNİN AKTARILMASI (TRANSKRİPSİYON)

Ribonükleik asitler birbirlerine 3',5'-fosfodiester bağı ile bağlı ribonükleotidlerin oluşturdukları tek zincirli polinükleotidlerdir. DNA zincirlerinde kullanılan mononükleotidlerdeki bazlar olan adenin, guanin ve sitozin bu polimerlerin de yapısında yer almasına rağmen timin yerine urasilin bulunduğu nükleotid kullanılır. Bu bazlardan oluşturulan RNA molekülleri de çift zincirli ikincil yapılar oluşturabilir. Ancak, bu yapılar genellikle zincir içerisinde tamamlayıcı (komplementer) bazların (A=U ve G=C) hidrojen bağları ile etkileşmesi sonucu oluşturulur ve *saç tokası* veya *raket* olarak tanımlanır.

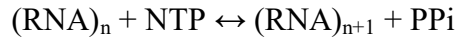
RNA moleküllerinin sentezi genetik şifrenin çözülmesinde oldukça önemli bir aşamadır. Bu işlemde DNA zincirlerinde saklı bulunan birincil bilgi transkripsiyon olarak adlandırılan işlemle RNA moleküllerine aktarılır (Şekil 7.34). Sentezlenen RNA zincirindeki baz dizisi üretildiği DNA zincirindeki birincil yapının baz bileşimini ve sırasını da yansıtır. Bu baz sırası da sentezlenecek proteinin aminoasit sırasını belirler.



Şekil 7.34. Genetik bilginin nükleik asitlerden proteinlere akışı ve bu işlemlerde RNA sentezinin yeri.

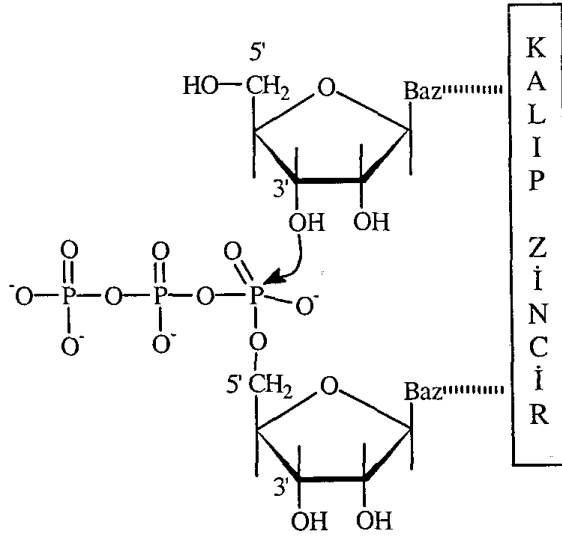
Hücrelerde RNA sentezi oldukça verimli bir şekilde ayarlanır. Genellikle hücrenin metabolik ihtiyaçlarına ve büyüme şartlarına bağlı olarak bu işlemler gerçekleşir. Bu da genellikle prokaryotlarda genlerin sadece %5 ökaryotlarda ise %1'den daha az bir kısmının okunması ile sonuçlanır.

DNA'nın transkripsiyonu olarak adlandırılan RNA sentezi işleminin bazı özellikleri vardır. Bu işlemlerde RNA sentezi işlemin başlamasını ve RNA zincirinin büyümesini katalizleyen **DNA-bağımlı bir RNA polimeraza** ihtiyaç vardır. Bu enzim, $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ gibi çeşitli alt birimlerden oluşur ve RNA sentezinin başlayabilmesi bu alt birimlerin tamamının varlığına bağlıdır. RNA polimeraz, kalıp olarak çift sarmallı DNA molekülünün tek zincirine, ribonükleotid trifosfatlara (ATP, GTP, UTP ve CTP) ve Mg^{2+} iyonuna ihtiyaç duyar. DNA replikasyonunda rol oynayan DNA polimerazdan farklı olarak RNA polimeraz bir primer gerektirmeden polinükleotidin sentezini katalizleyebilmektedir.



7.6.1. Transkripsiyonun Aşamaları

DNA sentezinde olduğu gibi RNA zincirinin sentezi 5'→3' yönünde gerçekleşir. Ribonükleotidlerin katılması sonucu oluşan pirofosfat molekülünün hidrolizi sonucu açığa çıkan enerji 3',5-fosfodiester bağlarının oluşumu için yeterlidir. Ribozomal RNA (rRNA), mesajcı RNA (mRNA) ve transfer RNA (tRNA) moleküllerinin sentezi bir DNA bağımlı RNA polimeraz tarafından benzer yollarla katalizlenir (Şekil 7.35).

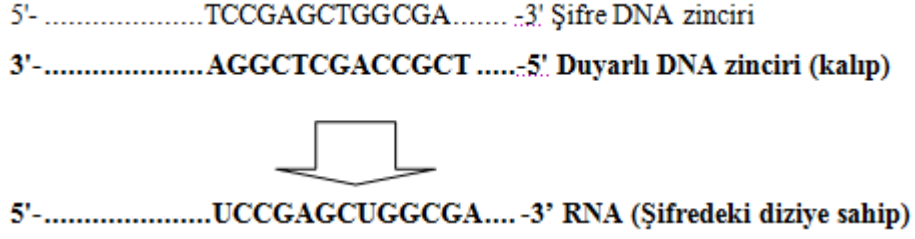


Şekil 7.35. RNA polimerazın polinükleotit sentezindeki görevi

RNA polimeraz çeşitli alt birimlerden ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$; beş tane) oluşan büyük bir enzimdir. Her bir alt birim kendilerine has görevleri ile beraber RNA sentezinin gerçekleştirilmesinde rol oynar. Bu alt birimlerden α , enzimin diğer alt birimlerinin bir arada bulunmasında görev yapar. β ve β' enzimin katalitik bölgesinin oluşumunda yer alır ve β alt birimi nükleosit fosfatların bağlanmasında yer alırken β' ise DNA bağlanmada görev yapar. Transkripsiyonun başlamasında ve DNA zinciri üzerindeki bazı korunmuş bölgelerin tanınmasında ise σ alt birimi görev yapar. Bu alt birim RNA polimeraz bağlandıktan ve polimerleşme işlemi başlar başlamaz enzimden ayrılır ve katalitik işlem devam eder.

7.6.1.1. RNA zincir Sentezinin Başlaması

RNA sentezinin başlayabilmesi için RNA polimerazın DNA çift sarmalındaki zincirlerden birini kalıp olarak tanıyıp üzerindeki bazı özgün ve korunmuş bölgelere bağlanması gerekir. İki DNA zincirinden sadece biri RNA sentezi için kalıp görevini görür ki bu zincir RNA'nın tamamlayıcısı olduğundan bazen **duyarlı (sense)** zincir olarak söylenir (Şekil 7.36). Genel olarak duyarlı zincir 3'→5' yönündeki zincirdir. Diğer DNA zinciri 5'→3' yönünde ilerlediğinden ve sentezlenen RNA transkripti ile aynı yönlülük gösterdiğinden bu zincir bazen yanlışlıkla duyarsız (**antisense**) zincir olarak tanımlanır. Üstte yer alan model zincir gerçekte genetik şifreyi içerir ve zincirdeki bilgiye sahip bir RNA'nın sentezlenmesi ancak bu üstteki zincirin tamamlayıcısı olan alttaki yani duyarlı zincirin RNA polimeraz tarafından okunması ile mümkündür.

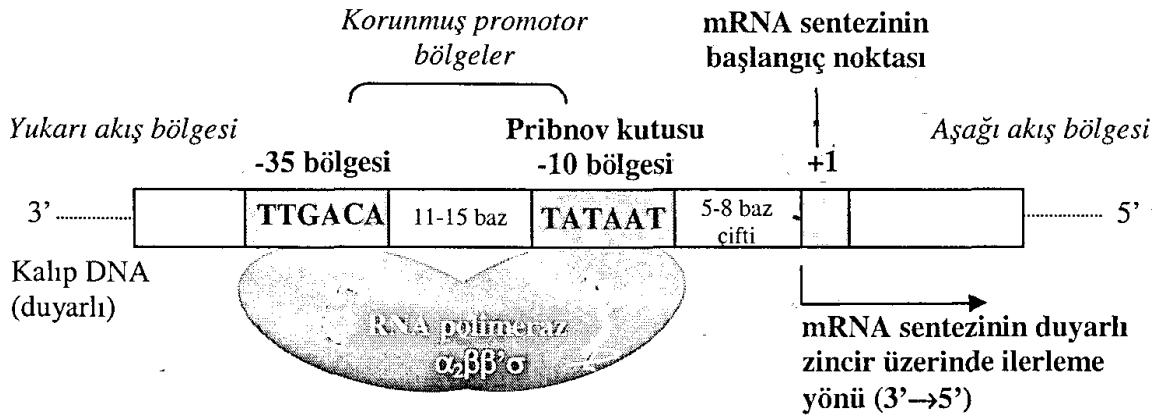


Şekil 7.36. Genetik şifrenin duyarlı zincir üzerinden RNA şeklinde aktarılması.

Yapılan çalışmalar sonucu, DNA kalıp zinciri yani duyarlı zincir üzerinde adenin ve timince zengin bazı bölgelere RNA polimeraz enziminin bağlandığı anlaşılmıştır ve bu bölgelere **promotor bölgeler** adı verilmiştir. Bu bağlanmanın sağlanması için mRNA sentezi işlemi katalizleyen RNA polimerazın bu kalıba bağlanabileceği promotor bölgelerin kalıp üzerinde bulunması zorunludur. Genellikle DNA zincirlerinden sadece biri promotor bölgelere sahiptir ve bu bölgeler korunmuş bölgelerdir. Sentezlenecek mRNA'yı kodlayan nükleotid zincirin gerisinde ve 3'-yönünde yer alır. RNA polimeraz enziminin alt birimlerinden biri olan sigma (σ) alt birimi bu promotor bölgeleri tanır ve RNA polimerazın bu bölgelere bağlanmasını sağlar. Promotor bölgelere RNA polimerazın bağlanmasına bağlı olarak başlama bölgesinde DNA çift zinciri kısmen açılır. RNA polimeraz kalıp DNA'yı 3'→5' yönünde okumaya ve takiben de RNA zincirini 5'→3' yönünde sentezlemeye başlar. Zincir üzerinde okunmanın başladığı ilk nükleotidin konumu +1 olarak numaralandırılır ve **transkripsiyon başlama Bölgesi** olarak adlandırılır. Duyarlı zincir üzerinde başlama nükleotidi genellikle C veya T şeklinde bir pirimidindir. Dolayısıyla RNA transkripti büyük bir ihtimalle G veya A şeklindeki bir purin ile başlar. Ayrıca, bu nükleotid RNA transkriptindeki ilk bazdır ve RNA polimerazın okuma yönüne bağlı olarak takip eden nükleotidler +2, +3 vs. şeklinde sıralanır. Duyarlı zincir üzerinde RNA polimerazın okumaya başladığı yönün aksi yöndeki nükleotidler ise eksi (-) işaret ile belirtilir ve transkripsiyon başlama noktasından bir önceki ve yukarı akış bölgesinde yer alan ilk nükleotid -1 olarak tanımlanır.

Prokaryotlarda, promotor bölgeler DNA zinciri üzerinde transkripsiyonun başlayacağı bölgeden 3'-ucuna doğru yaklaşık 40 baz çiftinin oluşturduğu baz dizisidir ve bu diziler transkripsiyona uğramaz. Çeşitli genler üzerinde yapılan çalışmalarla promotor bölgelerin korunmuş olduğu ve genellikle adenin ve timince zengin bölgeleri içeren baz dizilerine sahip oldukları gözlenmiştir. Bu korunmuş baz dizileri transkripsiyonun başlama noktasından (+1) daha yukarı akış bölgesinde (duyarlı DNA zincirinin 3'-ucuna doğru) bulunur ve prokaryotlarda bu dizilerden biri -10 konumunda olup **Pribnov kutusu** olarak tanımlanır.

Pribnov kutusundaki korunmuş baz dizisi “genellikle *TATAAT*” şeklindedir. Diğer korunmuş bölge ise transkripsiyonun başlangıcından yaklaşık -35 baz yukarı akış bölgesinde ortaya çıkar ki bu bölge de oldukça korunmuş olup genellikle *TTGACA* şeklinde bir baz dizisine sahiptir (Şekil 7.37). Prokaryotlarda -10 ve -35 bölgeleri etkin promotorlarda oldukça korunmuştur. Bu bölgelerdeki nükleotidlerdeki bir değişiklik, RNA polimerazın promotor bölgeye bağlanma etkinliğini, bağlanmanın kararlılığını ve dolayısıyla transkripsiyonun başlama etkinliğini azaltabilir ya da artırabilir.



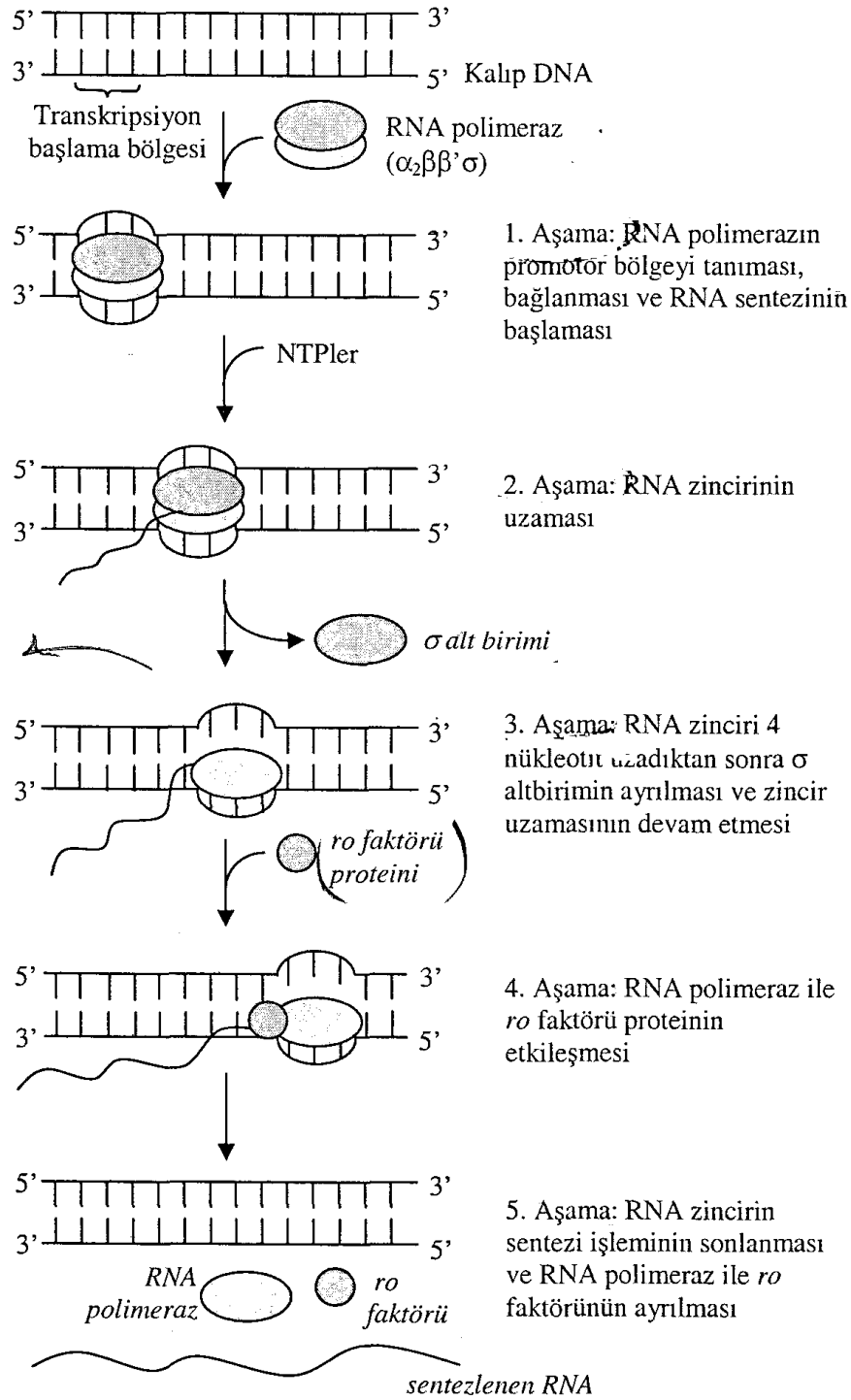
Şekil 7.37. Transkripsiyonda kalıp DNA üzerindeki korunmuş bölgeler.

RNA polimeraz promotor bölgelere bağlanıp başlama bölgesinde DNA çift zincirini kısmen açtıktan sonra bu sigma (σ) alt birimi enzimden ayrılır ve enzimin geri kalan kısmı ($\alpha_2\beta\beta'$) etkinliğini göstererek RNA sentezini +1 noktasından başlatır ve zincirin büyümesini sağlar. Transkripsiyon başlama noktasını genellikle C veya T gibi bir pirimidin bazı oluşturur. Böylece, RNA polimeraz tarafından katalizlenen işlemle 3',5'-fosfodiester köprüleri oluşturularak ribonükleotidlerin basamaklı katılması gerçekleşir. Bu işlemlerde DNA çift sarmalının sadece tek bir zinciri ve 3'→5' yönünde RNA polimeraz tarafından okunur. Dolayısıyla, yeni sentezlenen tamamlayıcı RNA zinciri 5'→3' yönünde sentezlenir. DNA zinciri sentezinden farklı olarak RNA zincir bir primer gerektirmez.

7.6.1.2. Zincirin Uzaması

Sigma alt biriminin ayrılması ile RNA polimeraz zincirin uzama reaksiyonlarını katalizler ve ribonükleotid birimlerinin basamaklı bir şekilde zincire ilavesi sonucu (yaklaşık dakikada 3000 baz) RNA zinciri büyür. RNA polimeraz DNA sarmalı üzerinde hareket ederken bu sırada sarmal açılır ve duyarlı zinciri okumaya devam eder. Duyarlı zincir

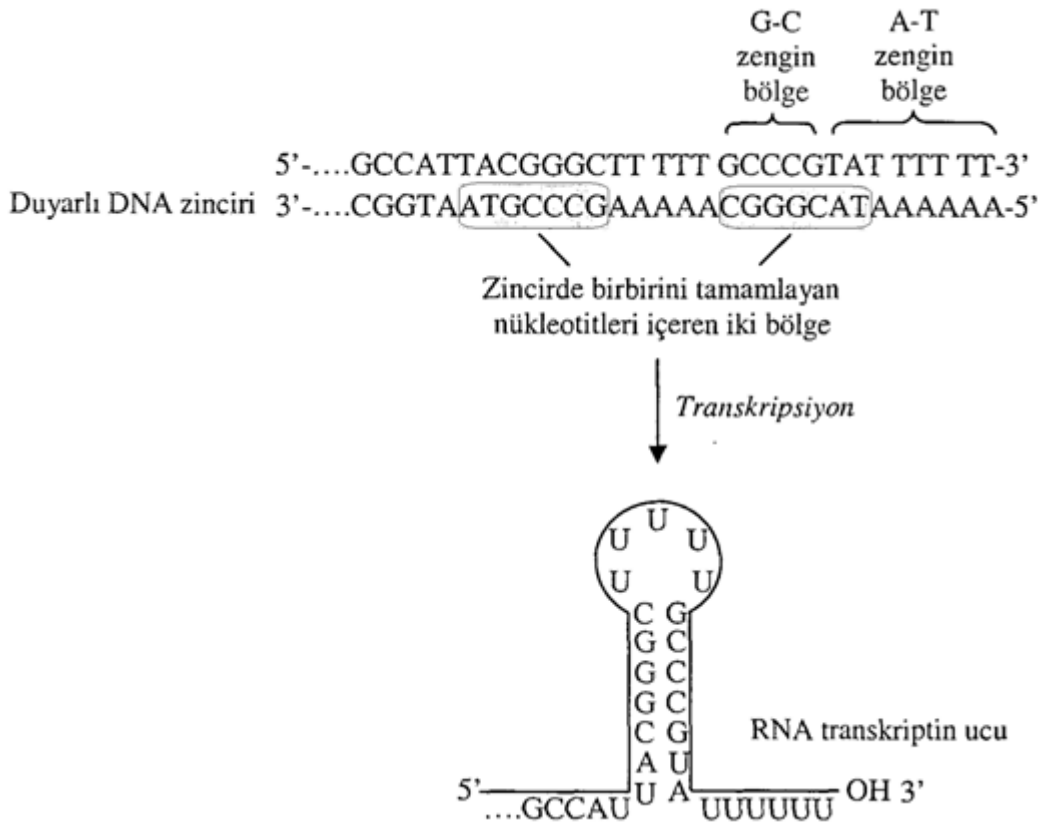
üzerinde okunan nükleotidler diğer zincirdeki nükleotidlerle tekrar etkileşerek sarmal oluşturur (Şekil 7.38). Bu sırada, açık sarmal üzerinde RNA polimeraz kalıp zinciri okudukça sentezlenen RNA zinciri kalıp zincir ile kısa çift zincirli bir RNA-DNA hibridi oluşturur. Zincir yeterince uzadıktan ve RNA polimeraz promotor bölgeden uzaklaştıktan sonra yeni bir RNA polimeraz promotor bölgeye bağlanarak yeni RNA sentezleri başlatılır. Böylece ihtiyaç duyulan RNA molekülleri yeteri kadar sentezlenir.



Şekil 7.38. RNA sentezindeki aşamalar

7.6.1.3. Zincirin Sonlanması

Bakterilerde duyarlı DNA kalıbı, transkripsiyonun başlaması için gerekli olan bir promotor bölge yanında bir de transkripsiyonun sonlandırılmasını sağlayacak bir *sonlandırma bölgesine* sahiptir. Bu bölge *guanin* ve *sitozin*lerin zengin olduğu bir bölgeyi takiben *adenin* ve *timin*ce zengin bir bölgeyi içerir. RNA polimeraz duyarlı DNA kalıbı üzerinde bu baz dizisini okuduktan sonra oluşan transkript üzerinde G-C bölgeleri arasında zincir içi hidrojen bağlarıyla tamamlayıcı bazlar eşleşerek RNA zincirinin sonunda raket şeklinde bir yapı oluşturur (Şekil 7.39). Bu yapı RNA polimerazın duyarlı DNA zincirini okuma işlemini durdurur ve böylece bu ikincil yapı RNA sentezinin sonlanmasına yol açar.



Şekil 7.39. Raket yapısı oluşumu ile transkripsiyonun sonlandırılması

Ayrıca transkriptin sonundaki urasil nükleotidleri ile duyarlı zincirin 5'- ucundaki adenin nükleotidleri arasındaki A-U etkileşimi, duyarlı zincirin 5'- ucundaki adenin nükleotidleri ile kalıp olmayan DNA zincirinin 3'-ucundaki timin nükleotidleri arasındaki A-T etkileşimlerinden daha zayıf olduğundan RNA-DNA hibridi şeklindeki RNA transkripti duyarlı zincirden kendiliğinden ayrılır.

Transkripsiyonun sonlandırılması bazı durumlarda, *ro faktörü* (ρ) adı verilen proteinlerle de gerçekleşir. Ancak bu proteinlere ökaryotik sistemlerde rastlanmamıştır. Bu işlemler prokaryotlarda hem nadiren gerçekleşir ve hem de oldukça karmaşıktır. Bir tür helikaz olan *ro faktörü* proteini transkripsiyonun son aşamasında oluşan DNA-RNA hibritinin birbirinden ayrılmasını katalizler. Bu protein, üretilen RNA zinciri üzerinde özellikle belirli bir ikincil yapısı olmayan ve sitozince zengin bölgelere bağlanır. RNA polimeraz sonlandırma bölgesine ulaştığında bu bölgede ilerlemeden kalır ve *ro* proteini yeni sentezlenen molekülüne bağlanıp RNA polimerazın DNA kalıbından uzaklaştırılması sağlanmış olur (Şekil 7.38).

7.6.2. Transkripsiyonla Sentezlenen RNA Molekülleri

DNA' daki baz sırasının RNA molekülleri haline aktarılması olan transkripsiyon işlemi ile ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) ve mesajcı RNA (mRNA) olmak üzere üç farklı RNA molekülünün sentezi gerçekleştirilir. Bu RNA molekülleri hem yapı ve hem de hücrelerdeki fonksiyonları açısından birbirlerinden farklılıklar gösterir (Tablo 7.11).

Tablo 7.11. Çeşitli RNA türleri ve özelliklerinin karşılaştırılması

RNA türü	Sentezi katalizleyen polimeraz	Büyüklüğü	Görevi	H-bağının bolluğu
rRNA	RNA polimeraz I	Değişiklik gösterir	Proteinlerle bir araya gelerek ribozomları oluşturur	Oldukça fazla
mRNA	RNA polimeraz II	Çeşitli	Proteinlerin aminoasit sırasını belirler	Çok az
tRNA	RNA polimeraz III	Küçük	Amino asitleri protein sentezinin olduğu yere taşır	Oldukça fazla

Prokaryotlarda tek bir DNA-bağımlı RNA polimerazla katalizlenen RNA sentezi ökaryotlarda ise üç farklı RNA molekülünün sentezi yine üç farklı polimerazın katalizlediği işlemlerle gerçekleştirilir. Ökaryotlarda bu enzimler nükleusta bulunur ve yüksek moleküler ağırlıklı olup çok sayıda alt birim içerir. Bu polimerazlar, kalıp DNA üzerindeki promotorlarla etkileşmeleri için *transkripsiyon faktörleri* (TF) adı verilen ilave protein bileşenlere ihtiyaç duyar. Her üç RNA polimeraz da *α -amanitin* adı verilen inhibitöre karşı davranışlarına göre birbirinden ayrılabilir. RNA polimeraz I bu inhibitöre dirençli iken diğer iki polimeraz duyarlılıkları farklıdır.

7.6.3. RNA Moleküllerinin Transkripsiyon Sonrası İşlenmesi

Prokaryotlarda ve ökaryotlarda farklı yollarla oluşturulan 3 tip RNA söz konusudur ki bunlar mRNA, rRNA ve tRNA' dır. Transkripsiyonla oluşturulan ve temel transkriptler olarak tanımlanan prokaryotik ve ökaryotik RNA molekülleri DNA kalıbından ve RNA polimeraz enziminden ayrıldıktan sonra bu RNA molekülleri oluşturulmak üzere genellikle bazı ilave enzimatik işlemlerle modifiye olur. Bu işlemlerde ya zincirlere uç zincir parçaları ilave edilir ya da bazı bazlar türevlendirilir. Prokaryotlara göre ökaryotik RNA daha çeşitli modifikasyon işlemlerine uğrar. Bu transkripsiyon sonrası modifikasyon işlemleri yeni sentezlenen RNA moleküllerinin biyolojik aktiviteleri açısından gereklidir ve çeşitli basamakları içerir.

a) RNA molekülünün büyük bir kısmını oluşturan ön kısmının uzaklaştırılması ki bu işlemlerle ayrılan RNA parçası daha sonra ribozomun (rRNA) oluşturulmasında kullanılır.

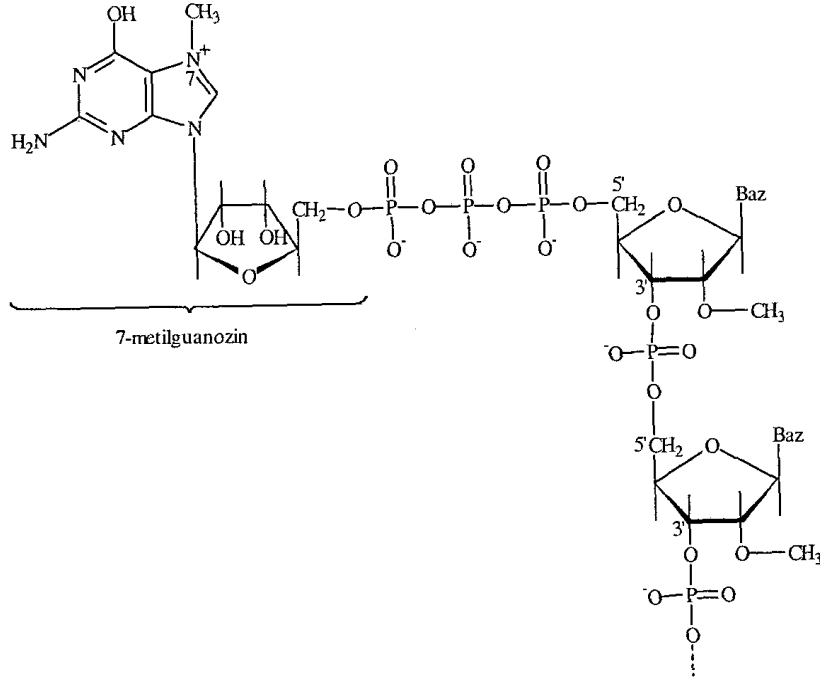
b) mRNA zincirinin 3'-ucuna poliadenozin birimlerinin ilave edilmesi. Poliadenozin (poli A) kuyruğu mRNA' nın nükleusdan sitoplazmaya ulaştırılmasında rol oynar.

c) RNA nükleotid bazlarının ve şeker birimlerinin enzimlerle modifikasyonu.

7.6.3.1. mRNA' nın İşlenmesi

Prokaryotlarda oluşturulan mRNA molekülleri daha ileri bir modifikasyona gidilmeksizin doğrudan proteinlerin sentezinde kullanılır. Bununla birlikte, ökaryotlarda mRNA şeklindeki genetik bilginin nükleusdan çıkarılıp sitozolde kullanılacakları hedef bölgelere gönderilebilmeleri için nükleusda bazı transkripsiyon sonrası işlemlerden geçer. Ökaryotik mRNA' larda gözlenen bir tür transkripsiyon sonrası işlem transkripsiyonla oluşturulan RNA zincirinin 3'-ucuna poliadenozin dizilerinin eklenmesidir. Bu işlemde poli A polimeraz, bir poliadenozin dizisini (poli A) oluşturulan mRNA' nın 3'-ucuna ilave eder. Bu 3'-poli A kuyruğu genellikle 50-200 adenozin nükleotidini içerir ve poli A bölgesi mRNA'nın nükleusdan sitoplazmaya taşınmasında rol oynar ve daha çok mRNA' yı nükleaz ve fosfatazların parçalayıcı etkisinden korumada önemli bir rolü olduğu bilinmektedir.

mRNA molekülünün 5'-ucunun da modifiye edildiği işlemler vardır. Böyle bir işlemle molekülün 5'-trifosfat kuyruğu 7-metilguanozin ile esterleştirilir ki bu modifikasyonla ökaryotik mRNA'nın 5'-ucunda oluşturulan kuyruk 5'-başlığı (5'-cap) olarak bilinir (Şekil 7.40).

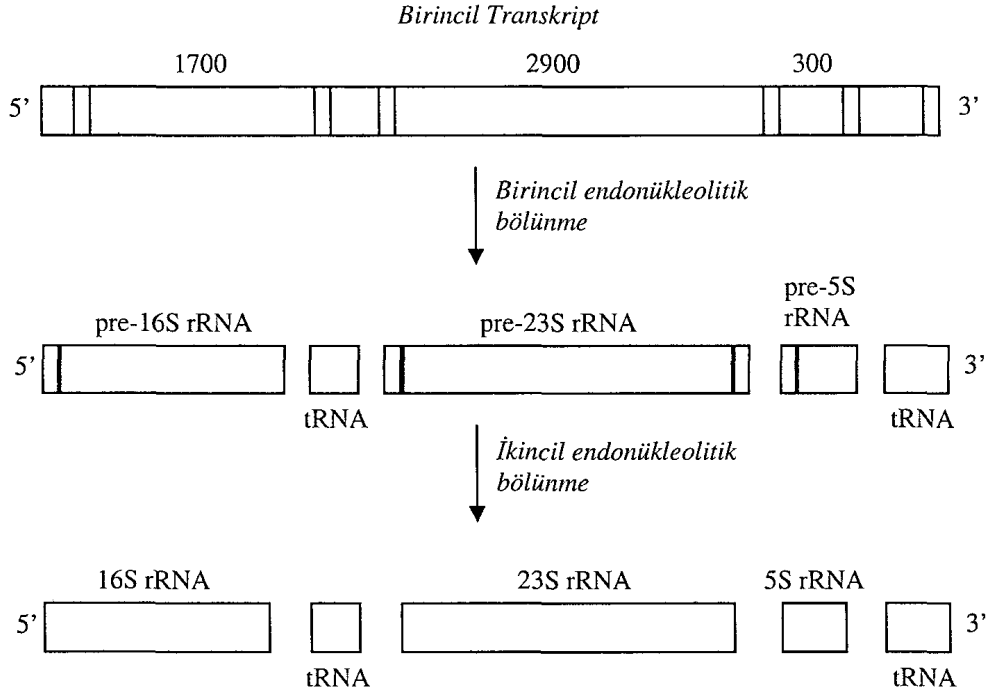


Şekil 7.40. Ökaryotik mRNA' nın 5'-ucundaki 5'- başlığı

7.6.3.2. rRNA'nın İşlenmesi

Ribozomal RNA (ökaryotik rRNA) ön RNA (pre-rRNA) molekülünün bölünmesi ile oluşur. Bu işlem RNaz III, RNaz P, RNaz E ve RNaz F etkisiyle gerçekleşir (Şekil 7.41). Bu endonükleolitik enzimler yardımıyla polisistronik yapıdaki birincil transkript olan 45S ön RNA molekülü 16S, 23S ve 5S'lik üç RNA molekülü ile iki tRNA molekülü şeklinde bölünmeye uğrar. (Polisistronik: Bir mRNA nın birkaç proteini kodlayan genetik bilgiye sahip olması. Monosistronik: Bir mRNA nın tek bir proteini kodlayan genetik bilgiye sahip olması).

İkincil endolitik bölünme gerçekleşmeden önce ribozomların oluşumunda rol oynayan bazı ribozomal proteinler bu öncül rRNA'larla birleşir. Ribozom oluşumu sırasında, 16S ve 23S rRNA' lardaki bazı özel nükleositler metillendirilir ve böylece RNA moleküllerinin hücre içi RNaz lar tarafından parçalanması önlenmiş olur. Ancak bu metillendirme işleminin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.

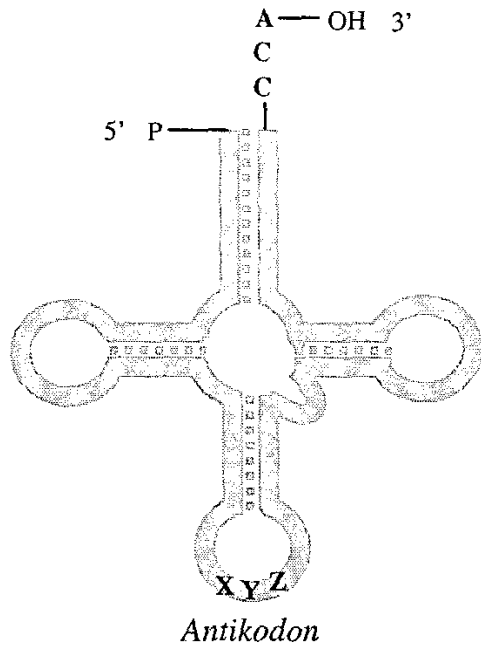


Şekil 7.41. Ribozomal RNA (rRNA) moleküllerinin transkripsiyon sonrası modifikasyonu

7.6.3.3. tRNA' nın İşlenmesi

Uzun polinükleotid zincirler şeklinde üretilen ön tRNA molekülleri çeşitli modifikasyon işlemlerinden sonra olgun tRNA'lar haline dönüştürülür. Bu işlemler zincir kısaltılması, uçlara dizilerin ilavesi ve bazların türevlendirilmesi şeklinde sıralanabilir. Metillendirme işlemi en genel türevlendirmelerden biridir.

tRNA molekülleri yaklaşık 80 nükleotidden oluşur ve *yonca yaprağı yapısı* olarak tanımlanan ikincil bir yapıya sahiptir. Bütün tRNA moleküllerindeki bazların çoğu modifiye olmuş ve her birinin T-ucunda CCA şeklinde bir dizi vardır ki aminoasitler taşınmak üzere bu dizinin ucuna bağlanır (Şekil 7.42). Çeşitli özel bölgeler yanında mRNA üzerindeki kodona karşılık gelecek şekilde bir aminoasidi taşıyan tRNA' yı belirleyen bir *antikodon*, bu yonca yaprağı yapısının aminoasit bağlanan ucunun tam karşısında olacak şekilde yer alır.



Şekil 7.42. tRNA' nın yapısı

7.6.4. Katalitik RNA Molekülleri

Son 20 yıla kadar biyokatalizörlerin sadece peptid yapısında olduğu tahmin ediliyordu ve aminoasitlerin birbirlerine peptid bağları ile bağlı olduğu bu polipeptidlerin canlılarda yegâne katalizörler olduğu bilinmekteydi. Ancak, son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarla bazı özel RNA moleküllerinin de katalitik özellik gösterdikleri ortaya konmuştur. **Ribozim** olarak adlandırılan bu katalitik RNA moleküllerinin bazı ester hidrolizi/esterleşme reaksiyonları ile kendi kendilerini kesebildikleri ve enzimatik özellikler gösterdikleri ortaya konmuştur. Protein yapısındaki enzimlerle karşılaştırıldığında daha az seviyelerde katalitik etkinlik göstermelerine rağmen bu RNA moleküllerinin etkinliklerinin içerdikleri RNA' ya ilave olarak bazı protein alt birimlerinin varlığı ile arttığı bilinmektedir. Bu katalitik RNA molekülleri bazı RNA substratları tanıyarak bir nükleaz gibi hidroliz etme yeteneğine sahiptir. Bu çalışmalar özellikle *Cech ve Altman ile arkadaşları* tarafından gerçekleştirilmiş ve bu iki bilim adamı bu katkılarından dolayı Nobel Ödülü almıştır.

7.7. GENETİK BİLGİNİN ÇÖZÜLMESİ (TRANSLASYON)

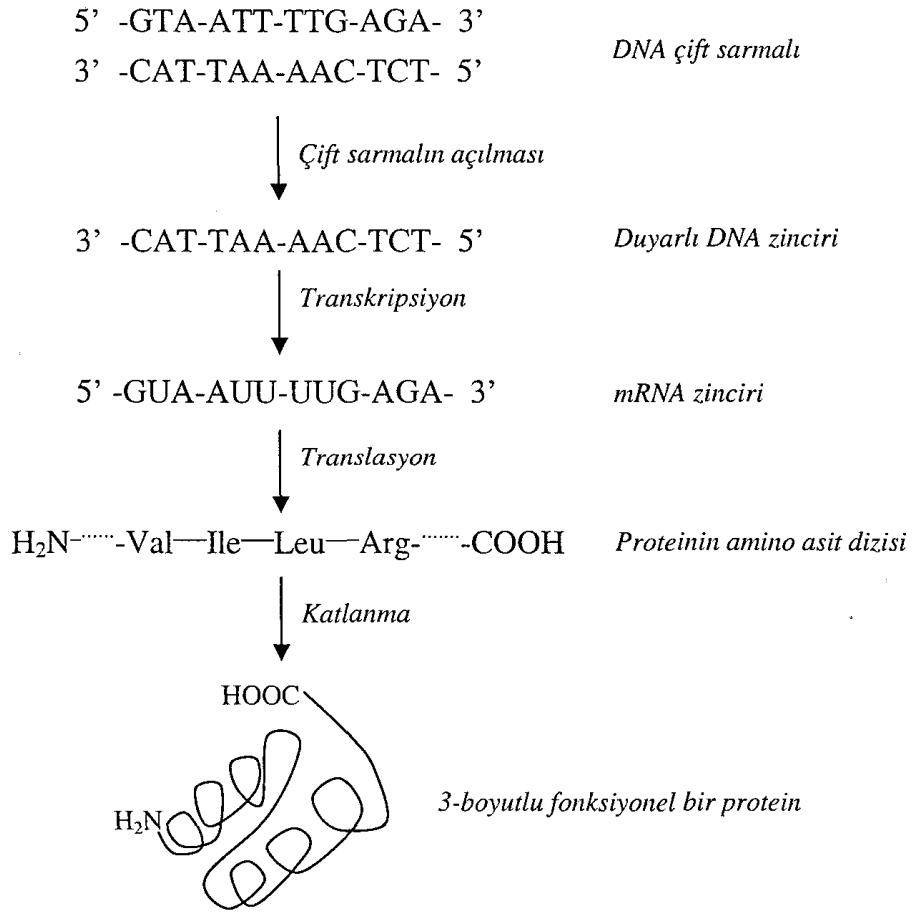
Tipik ökaryotlarda protein sentezi sitoplazmada gerçekleşir. Genetik bilgi akışı transkripsiyon ve translasyon ile DNA'dan proteinlere doğru gerçekleşir. Bu bilgi akışında orjinal DNA baz dizisine karşılık gelen tamamlayıcı (komplementer) bir baz dizisi içeren mRNA ara bir rol oynar. Bu RNA molekülleri nükleusda oluşturulduktan sonra sitoplazmaya taşınır. mRNA, sitoplazmada proteinlerin sentezinde önemli bir rol oynayan sitoplazmik organeller olan ribozomlara bağlanır ve genetik mesajın bir polipeptid zinciri oluşturmak

üzere ribozomlar tarafından okunması sağlanır. Bu işlemlerde, aminoasit moleküllerinin her biri özel bir tRNA molekülü ile kovalent bağlanarak aktifleştirilir ve peptid şeklindeki polimerleşme işlemine katılması sağlanır. Böylece, mRNA halindeki mesaj, tRNA' larla aktiflenmiş aminoasitlerin ve ribozomların bir bileşeni halinde rRNA' nın katkısıyla genlerden üretilen bütün RNA' ların katılımıyla protein şeklinde çözülmüş olur. Protein biyosentezi için bu bileşenler yanında diğer birçok protein faktöre ihtiyaç vardır. Bu bileşenler dayanışma halinde ve zayıf etkileşimlerle bir araya gelerek büyüyen peptid zinciri üzerinde doğru bir aminoasit sırasının oluşmasında görev yapar.

7.7.1. Genetik Bilginin Akışı

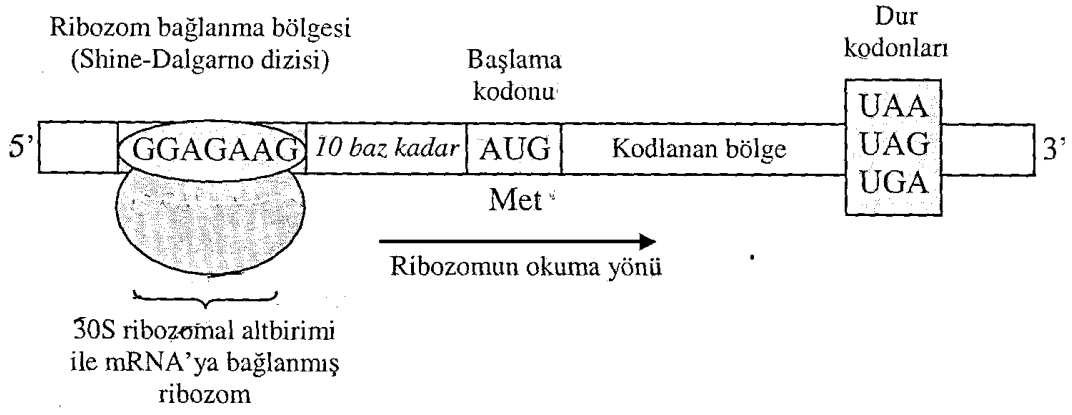
DNA molekülünde saklı bulunan kimyasal bilgi (genetik kod) bir mesajcı RNA (mRNA) molekülü halinde ve tamamlayıcı bir baz dizisi olarak ifade edilir ve bu baz dizisi bir protein ürünündeki aminoasit dizisini kodlar (Şekil 7.43). Translasyon veya protein biyosentezi olarak tanımlanan bu işlem diğer kimyasal polimerleşme işlemlerinde olduğu gibi bütün hücrelerde; başlama, çoğalma ve sonlanma olarak, tanımlanan üç aşamada gerçekleşir. Her aşamada gerçekleşen işlemde gerekli enerji GTP hidrolizi ile sağlanır ve bu işlemlere özgün ve çözümlenir birçok protein bu olaylara katılır.

mRNA'nın doğru bir şekilde okunabilmesi için sahip olduğu kodon dizisinin ribozom ile doğru bir şekilde bağlanması gerekir. Prokaryotlarda mRNA dizisinin tanınması ribozomun 30S ribozomal alt biriminin 16S rRNA bileşeni ile mRNA üzerindeki translasyon başlama dizileri arasındaki etkileşim ile sağlanır. 16S rRNA'nın 3'-ucunda yer alan pirimidince (C ve U) zengin bir bölge ile prokaryotik mRNA'nın 5'-ucundaki purince (A ve G) zengin ve tamamlayıcı bir bölge arasında baz etkileşmesi sonucu 30S ribozomal alt birim mRNA üzerindeki bir başlama kodunu ile doğru bir konumda etkileşime girer.



Şekil 7.43. DNA' dan proteine genetik bilginin akışı.

Ribozomun 30S ribozomal alt biriminin 16S rRNA bileşeni ile mRNA üzerinde etkileştiği pürince (A ve G) zengin bölge, **ribozom bağlanma bölgesi** olarak tanımlanır ve bazende bu dizinin varlığını keşfeden bilim adamlarının adıyla **Shine-Dalgarno dizisi** olarak adlandırılır (Şekil 7.44). **Shine-Dalgarno dizisini** tanıma ile ribozomal translasyon işlemi bu bölgeden yaklaşık 10 nükleotid kadar aşağı akış yönünde yer alan (AUG) şeklindeki özel ve korunmuş bir başlama kodonu ile başlamış olur. Böylece, mRNA zinciri 5'→3' yönünde ribozomlar tarafından okunarak polipeptid zinciri bu kodona karşılık gelen aminoasitten itibaren sentezlenmeye başlar. Başlama kodonuna karşılık gelen bu aminoasit özel bir metiyonindir. Takip eden kodonlara karşılık gelen 10 veya daha fazla aminoasit uzunluğuna erişildiğinde bu N-ucundaki özel metiyonin birimi uzaklaştırılır. Ribozom başlama kodonundan başlayarak mRNA üzerinde 5'→3' yönünde UAA, UAG veya UGA kodonlarından herhangi birine ulaşıncaya kadar mRNA'yı okumaya devam eder. Okunmayan bu üç kodon ribozomun "**dur kodonu**" olarak adlandırılır ve bu kodonlar sadece translasyon işleminin durmasını sağlar. Ayrıca, **Shine-Dalgarno dizisi** sadece ribozomun bağlanması için gereklidir ve bu dizi de okunmaz veya herhangi bir şifre içermez



Şekil 7.44. Bir mRNA transkripti üzerinde çeşitli bölgeler.

7.7.2. Genetik Kod (Genetik Şifre)

mRNA molekülleri sadece dört bazdan (adenin, guanin, sitozin ve urasil) oluşturulmasına rağmen proteinler 20 farklı aminoasitten oluşturulur. Eğer her bir baz bir aminoaside karşılık gelseydi bu taktirde bu bazlar sadece 4 aminoasidi kodlayacaklardı. Eğer iki baz bir çift (dublet) halinde bir aminoasidi kodlasalardı her biri için 4 ve dolayısıyla 4'ü için (4x4) 16 kombinasyon mümkün olacaktı ki bu durumda 16 aminoasit kodlanabilecekti. Bununla birlikte, her bir aminoasit için 3'lü baz kodları kullanıldığında ise yeterinden fazla (4x4x4=64) kombinasyon söz konusudur. Böylece, 20 aminoasidin herbirinin mRNA'daki **3 bazlı (triplet) nükleotit dizileri** ile kodlandığı sonucuna varılmıştır. Bu triplet ya da üçlü sıra bir *kodon* olarak adlandırılır ve 64 kodondan 61'i 20 aminoaside geri kalan 3'ü de (UAG, UAA ve UGA) özel bir genetik mesajın sonunu gösteren bir sinyal olan *dur* kodonuna karşılık gelir (Tablo 7.12). AUG hem polipeptit zinciri içindeki Met birimlerini kodlarken hem de başlangıç sinyalinin bir kısmını oluşturur. Ayrıca metiyoninde olduğu gibi triptofan için de tek bir kodon (UGG) mevcuttur.

Tablo 7.12. Standart genetik kod

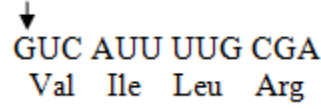
1.Pozisyon (5'-ucu)	2.Pozisyon				3.Pozisyon (3'-ucu)
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA <i>Stop</i>	UGA <i>Stop</i>	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG <i>Stop</i>	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

Genetik kodun en önemli özelliklerinden biri *dejenere* olmasıdır. Genetik şifrenin çarpıcı bir özelliği bir aminoasidin birden fazla kodonla temsil edilmesidir. Ala (4), Arg (6), Asn (2), Asp (2), Cys (2), Gln (2), Glu (2), Gly (4), His (2), Ile (3), Leu (6), Lys (2), Met (1), Phe (2), Pro (4), Ser (6), Thr (4), Trp (1), Tyr (2) ve Val (4) aminoasitleri bir veya birden fazla kodondan oluşur. Yukarıdaki tabloya bakıldığında Trp ve Met hariç diğer tüm aminoasitler için birden çok kodon olduğu anlaşılacaktır. Mesela, GAU ve GAC'nin her ikisi de Asp'ı kodlarken GGU, GGC, GGA ve GGG kodonlarının her biri Gly'i kodlayabilmektedir. Ser, Lys ve Arg'in her biri için ise 6 kodon mevcuttur. Ayrıca, her bir aminoasit için kodonlar 5'-ucundan itibaren dikkatlice incelendiğinde genellikle 1. ve 2. konumlar sabit kalmakta sadece 3. konumdaki baz değişmektedir. Mesela, Asp için yukarıda verilen kodonlara bakıldığında 3. konumda ya U ya da C içerdiği görülecektir. Dolayısıyla, protein sentezi sırasında Asp için GAU veya GAC'dan biri okunacaktır. Bu özelliğinden dolayı 3. konumdaki bazlara *oynak baz* adı verilir.

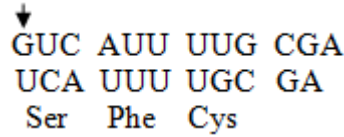
DNA çift sarmalındaki genetik bilgi, mRNA'lar üzerinde ribozomlar tarafından üçlü kodonlar okunurken bir kodondaki herhangi baz, bir önceki veya sonraki kodonda *ortaklaşmaz* veya *çakışmaz*. Yani kodondaki bazlar birer birer değilde bir kodonu oluşturan üç baz bir anda ve takip eden üç baz da bir anda okunarak işlem devam eder. Böylece her bir kodon sadece bir kez olmak üzere ve 5'→3' yönünde sırayla okunur.

Nükleik asit zincirlerinde üç nükleotitten oluşan dizinin özel bir aminoasidi kodladığı unutulmamalıdır. Dolayısıyla, bir DNA dizisine bir bazın katılması veya diziden

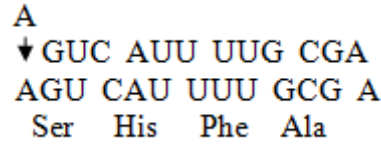
bazın çıkması bu tripletler halindeki gruplanmayı değiştirebilir ve farklı aminoasitlerin kodlanma durumu ortaya çıkabilir.



şeklinde kodlanan bir baz dizisinde 5'-ucundaki baz olan G' nin bir mutasyonla uzaklaştırıldığı bir durumda bu baz dizisi, üçlü kodonlar değişeceğinden orjinaldekilerden farklı aminoasitlerin bulunacağı bir polipeptid dizisi olarak okunur.

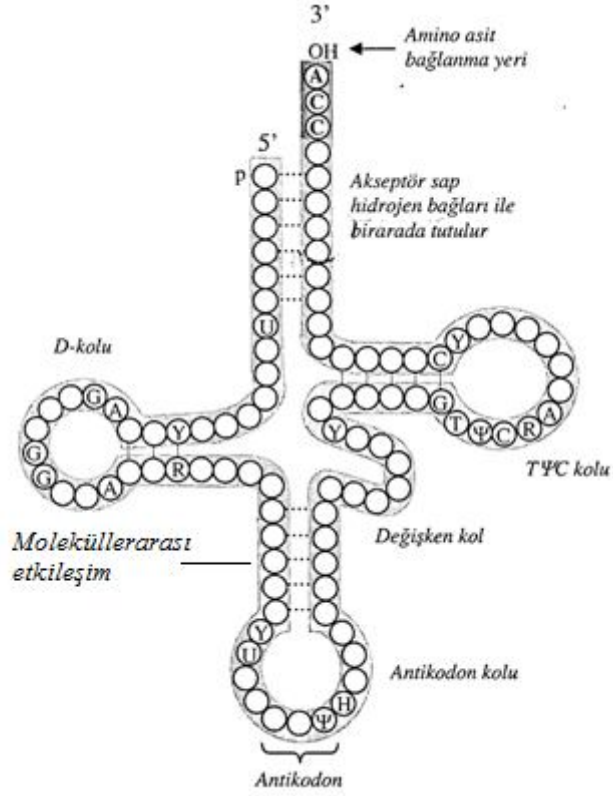


5'-ucuna yeni bir baz (A) eklendiği durumda da yine yeni bir kodon dizisi ve böylece yeni bir polipeptid dizisi ortaya çıkar.



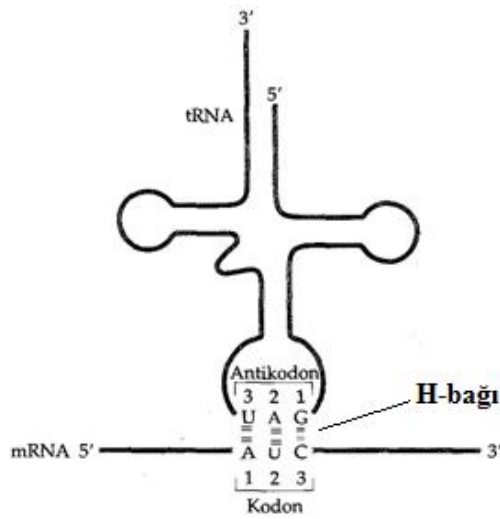
Protein sentezi sırasında genetik kodun okunabilmesi için her biri 20 aminoasitten birine özel olmak üzere en azından 20 farklı tRNA molekülü, aminoasitleri ribozomların da katkısıyla polipeptid sentezinin gerçekleştiği bir konuma getirir. Adaptör bir molekül olarak tanımlanan bu tRNA molekülleri aminoasitlerle bağlanmış bir şekilde mRNA üzerindeki belirli bir kodona bağlanır ve böylece polipeptid sentezinin gerçekleşmesi için gerekli şartlar sağlanmış olur.

tRNA moleküllerinin diğer belirgin özellikleri ise 3'-ucunda CCA baz dizisi ise sonlanmalarıdır ve aminoasit birimleri bu kodonun son bazı olan adenine kovalent bağlanır. **Antikodon** olarak tanımlanan ve tRNA' lar üzerinde bulunan bu özgün üç bazlı dizi, mRNA molekülü üzerindeki bir üçlü baz dizisine karşılıktır. Dolayısıyla, protein sentezi sırasında tRNA'lar üzerindeki antikodonlar, mRNA' lardaki kodon bölgesi ile hidrojen bağları yaparak etkileşir. tRNA'lar üzerindeki diğer kol ve halka yapıları tRNA molekülünün şeklini belirlemede önemlidir ancak bu halka yapılarında karşılıklı bazlar arasında bir bağlanma gerçekleşmez (Şekil 7.45).



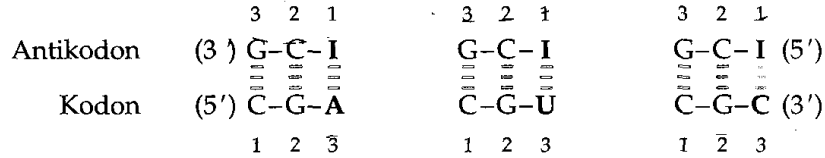
Şekil 7.45. Bir tRNA molekülünün yapı elemanları. I: İnosin, ψ : Psödoüridin

Transfer RNA'lar, mRNA'nın kodonlarıyla tRNA üzerindeki üç bazlık antikodon dizi sayesinde baz eşleşmesi yaparlar. mRNA'daki kodonun ilk bazı (5'→3' yönünde okunur) antikodonun üçüncü bazıyla eşleşir (Şekil 7.46).



Şekil 7.46. Kodon ve antikodon arasındaki baz eşleşmesindeki iki RNA'nın anti paralel etkileşimi.

tRNA'nın antikodonu Watson-Crick baz eşleşimiyle tek kodonu tanıyorsa, hücrelerde bir aminoasidin her bir kodonu için farklı tRNA bulunması gerekirdi. Bazı tRNA'lardaki antikodonlar, ender baz hipoksantin içeren inozinat (I ile gösterilir) nükleotidi bulundurur. İnozinat, üç farklı (U, C ve A) nükleotitle hidrojen bağı kurabilir. Bu baz eşleşimleri, Watson-Crick baz eşleşimleri G=C ve A=U arasındaki hidrojen bağlarından çok daha zayıftır. Mayada, bir tRNA^{Arg} (5')ICG antikodonuna sahiptir. Bu antikodon üç arginin kodonunu, (5')CGA, (5')CGU ve (5')CGC tanıyabilir.



Kodon-antikodon eşleşmelerinin incelenmesi, Crick'in çoğu kodonların üçüncü bazının antikodonun karşılık gelen bazıyla daha gevşek baz eşleşmesi kurduğu sonucuna varmasını sağladı. Bu kodonların üçüncü bazı (ve antikodonlarının ilk bazını) "**wobble**" olarak isimlendirdi. Crick **wobble hipotezi** adı verilen dört ilişki öne sürdü:

1. Bir mRNA kodonunun ilk iki bazı daima tRNA antikodonunun bazıyla güçlü Watson-Crick baz eşleşmesi yapar ve şifrenin özgünlüğünden büyük oranda sorumludur.

2. Antikodonun ilk bazı (5'→3' yönde okunduğunda, kodonun üçüncü bazıyla eşleşir) tRNA tarafından tanınan kodon sayısını belirler. Antikodonun ilk bazı C veya A ise, baz eşleşimi özgüldür ve tek kodon tanınır, ilk baz U veya G ise bağlanma daha az özgüldür ve iki farklı kodon okunabilir. İnozin (I) antikodonun ilk (wobble) nükleotidi olduğunda üç farklı kodon tanınabilir ki, bu bir tRNA için maksimum sayıdır (Tablo 7.13).

Tablo 7.13. Wobble bazı eşleşmesi

Antikodonun Wobble bazı	Wobble bazı (1)	Wobble bazı (2)
Tek kodonun tanınması		
Antikodon	→ (3') X-Y-C (5')	(3') X-Y-A (5')
	===	===
Kodon	→ (5') X-Y-G (3')	(5') X-Y-C (3')
İki kodon tanınması		
Antikodon	→ (3') X-Y-U (5')	(3') X-Y-G (5')
	===	===
Kodon	→ (5') X-Y-A (3')	(5') X-Y-C (3')
	G	U
Üç kodonun tanınması		
Antikodon	→ (3') X-Y-I (5')	
	===	
	A	
Kodon	→ (5') X-Y-U (3')	
	C	

3. Bir aminoasit farklı kodonlarca şifrelendiğinde ilk iki bazdan biri farklı olan kodonlar farklı tRNA'lara gereksinir.

4. Tüm 61 kodonu çevirmek üzere en az 32 tRNA gerekir.

Kodonun wobble (veya üçüncü) bazı özgülükte rol oynamakla birlikte sadece antikodonda karşısına gelen bazla çok zayıf eşleşme yaptığından tRNA'nın protein sentezi sırasında kodondan hızlı ayrılmasına izin verir. Eğer kodondaki bazların üçü de antikodondaki bazların üçüyle güçlü Watson-Crick eşleşimi yapıyorsa tRNA'lar çok yavaş ayrılacak ve bu da protein sentezinin hızını yavaşlatacaktı.

7.7.3. Protein Sentezi: Genetik Kodun İfade Edilmesi

Bir proteinin aminoasit sırasını mRNA molekülündeki kodonların dizilişi ve bu sırayı da DNA molekülünün orjinal baz dizisi belirler. Translasyon ile mRNA üzerindeki kodon dizisinin okunduktan sonra oluşan polipeptit zinciri belirli bir görevi yapacak şekilde bir protein oluşturmak üzere bir araya gelip katlanır. Bu işlemlerde polipeptit zincirinin oluşturulması ve protein biyosentezi için çeşitli bileşenlere ihtiyaç vardır.

Bunlar:

- i) İfade edilecek belirli bir genetik mesajı içeren bir mRNA zinciri,
- ii) Protein sentezleyen organel olan ribozom,
- iii) tRNA moleküllerine bağlı aminoasitler (aminoaçil-tRNA'lar)
- iv) Polipeptid zinciri sentezinin başlaması, uzaması ve sonlandırılması için gerekli olan çeşitli enzim ve proteinlerdir.

Bu bileşenlerin katıldığı protein sentezindeki işlemler bazı temel aşamaları içerir.

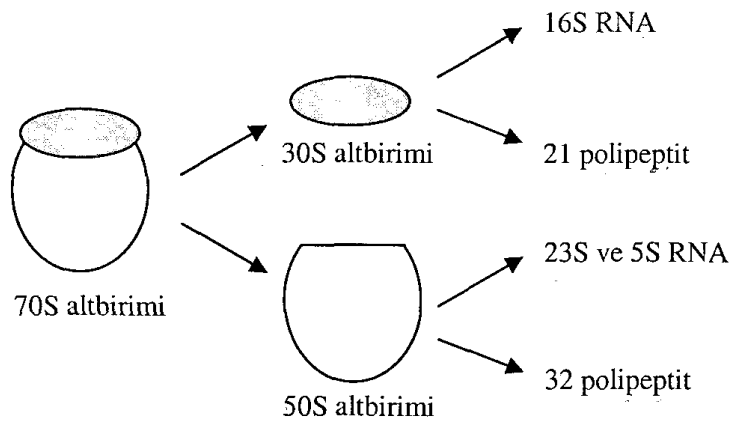
Bunlar:

- i) Aminoaçil tRNA moleküllerinin oluşturulması yani 20 aminoasitten herbirinin belirli tRNA molekülüne bağlanması,
- ii) Polipeptid zincir sentezinin başlaması yani mRNA/ribozom başlama kompleksinin oluşumu,
- iii) Polipeptid zincirinin büyümesi,
- iv) Protein sentezinin sonlanması,
- v) Aktif ve fonksiyonel bir proteini oluşturmak üzere polipeptid zincirinin translasyon sonrası modifikasyonu şeklinde sıralanabilir.

Protein sentezinde fiziksel olarak mRNA ribozom kompleksine bağlı olan polipeptid zincirine basamaklı bir şekilde aminoasitlerin ilavesi ile zincir istenen protein aminoasit

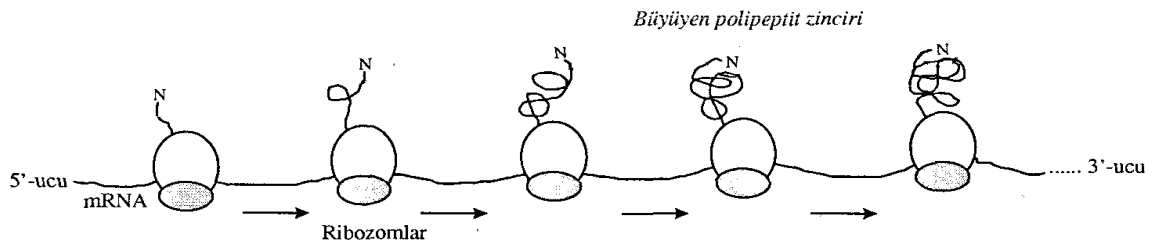
dizisini verene kadar büyür. Bu işlem sırasında mRNA 5'→3' yönünde okunur ve polipeptit ise amino ucundan karboksil ucuna doğru sentezlenir.

Protein sentezinin en önemli elemanlarından biri olan ribozomlar hem prokaryotların ve hem de ökaryotların stoplazmasında bulunur. Ökaryotlarda bazı ribozomlar endoplazmik retikulumun dış membranlarına bağlı bulunur. Prokaryotik ribozomlar sedimentasyon katsayıları 50S ve 30S olan iki temel alt birime sahiptir ve genellikle 50S alt birimi 23S rRNA, 5S rRNA ve 32 farklı polipeptitten oluşur. 30S altbirimi ise 16S rRNA ve 21 farklı polipeptit zincirinden oluşur. Ökaryotik ribozomlar (80S) prokaryotiklere göre biraz daha büyüktür ve biri 60S ve diğeri 40S olan iki alt birimden oluşur (Şekil 7.47).



Şekil 7.47. Prokaryotik ribozomun yapısı ve bileşenleri.

Prokaryotik protein sentezinin başlama aşaması sırasında mRNA'ya önce ribozomun küçük alt birimi daha sonra da büyük alt birimi bağlanır ve böylece 70S başlama kompleksini oluşturur. Bir polipeptid sentezi gerçekleşirken yeni ribozomlar aynı mRNA zincirine bağlanıp aynı anda bu proteinin birçok kopyası üretilebilir. Böylece, tek bir mRNA zinciri üzerinde her bir protein sentezini gerçekleştirebilen çok sayıda ribozomun bulunduğu bir yapı ortaya çıkar. Bu yapı **poliribozom** veya **polizom** olarak tanımlanır (Şekil 7.48).



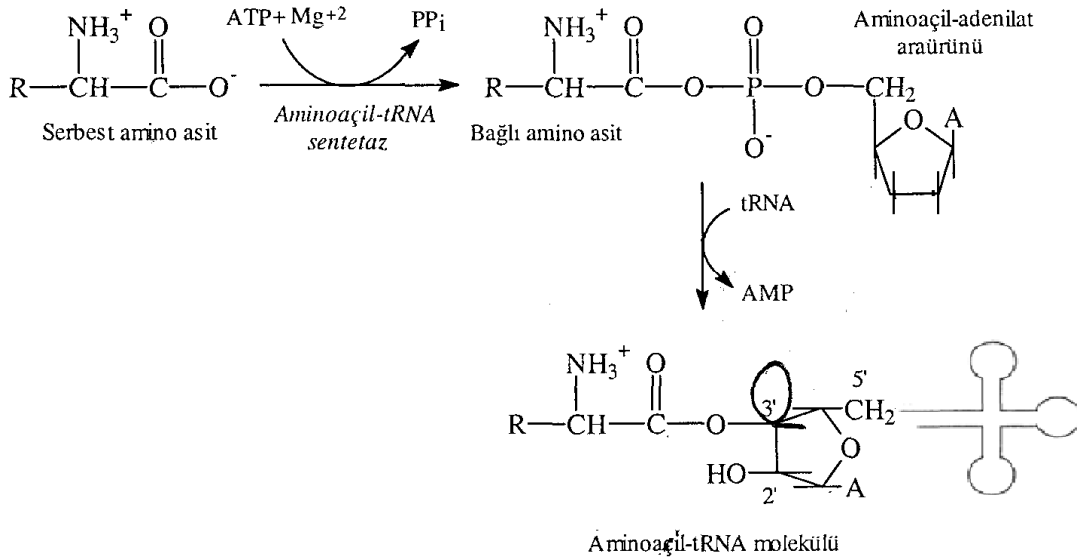
Şekil 7.48. Bir polizom

7.7.4. Protein Sentezinin Aşamaları

Protein sentezi, bir biyopolimerin sentezinde olduğu gibi başlama, zincir uzama ve sonlanma olarak adlandırılan işlemler yanında çeşitli ilave basamakları da içerir. Bunlar aminoaçil-tRNA'ların oluşumu veya aminoasitlerin etkinleştirilmesi, polipeptit zincir sentezinin başlaması, polipeptit zincir sentezi ve zincirin uzaması, polipeptit zincir sentezinin sonlanması ve proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonu şeklinde sıralanabilir.

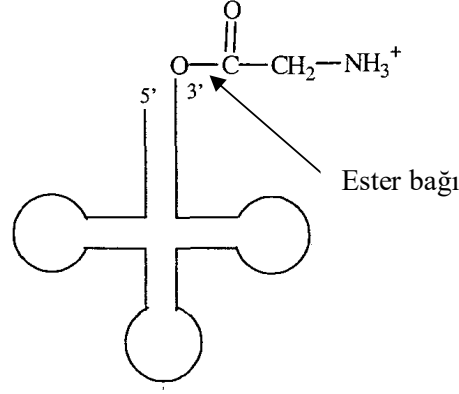
7.7.4.1. Aminoaçil-tRNA'ların Oluşumu

Bu basamak aminoasitlerin aktiflenmesi şeklinde de tanımlanır. Herhangi bir aminoasit, protein sentezinde kullanılmadan önce bir tRNA molekülüne bağlanmak durumundadır (Şekil 7.49). Bir aminoasidin belirli bir tRNA molekülünün 3'-ucu hidroksil grubu ile kondenzasyonunun gerçekleştiği böyle bir aktivasyon işlemi **aminoaçil-tRNA sentetaz** tarafından katalizlenir. Bir ATP molekülü ile Mg^{2+} iyonu da gerektiren bu reaksiyon bir aminoaçil-adenilat ara ürünü üzerinden gerçekleşir.



Şekil 7.49. Aminoasitlerin polipeptit sentezinde kullanılmak üzere aktiflendirilmesi.

Sentetaz, bağlı bulunan aminoasidi aminoaçil-tRNA oluşturmak üzere tRNA molekülünün 3'-OH grubuna transfer eder. Böylece aminoasit karboksil grubu üzerinden bir ester köprüsü ile 3'-OH grubuna bağlanır. Bir önceki basamakta oluşan pirofosfatın hidrolizi ile açığa çıkan enerji reaksiyonun tamamlanmasında kullanılır. Herbir aminoaside ve tRNA molekülüne özel bir tRNA'ya katılmasını sağlar. Böylece, aminoasit tRNA molekülleri oluşturur (Şekil 7.50).



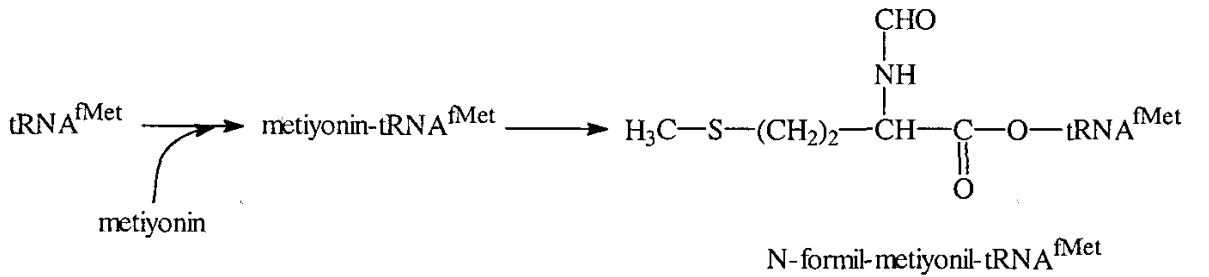
Şekil 7.50. Glisil-tRNA

7.7.4.2. Polipeptid Zincir Sentezinin Başlaması

Prokaryotlarda polipeptit sentezi ökaryotlardakinden farklılıklar gösterir. Böyle sistemlerde polipeptid sentezi için üretilen başlama kompleksi aşağıdaki bileşenleri içerir;

- i) Ribozomun 30S (küçük) alt birimi,
- ii) mRNA molekülü,
- iii) Başlangıç tRNA molekülü ($tRNA^{fMet}$) ve N-formil-metiyonin,
- iv) Başlama faktörü proteinleri (BF1, BF2, BF3).

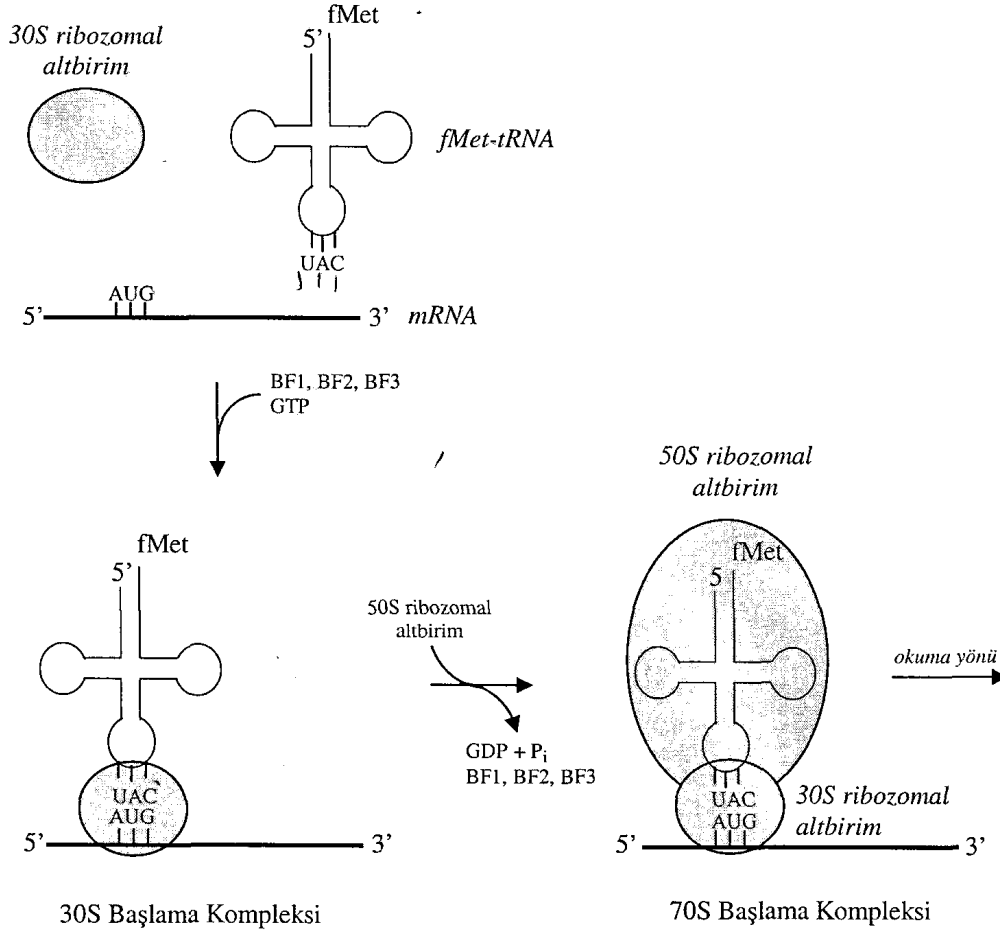
E. coli üzerinde yapılan çalışmalar başlangıç aminoasit biriminin formilmetiyonin (fMet) olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, translasyon başlamadan önce bu aminoasit birimini taşıyan özel bir tRNA ($tRNA^{fMet}$) molekülünün mRNA ile etkileşmesi gereklidir. Formil-metiyonil tRNA sentetazın etkisiyle başlangıç tRNA molekülü olan $tRNA^{fMet}$ ve N-formil metiyoninden formil-metiyonil-tRNA $tRNA^{fMet}$ oluşturulur (Şekil 7.51).



Şekil 7.51. N-formil metiyonil-tRNA^{fMet} oluşumu

Translasyonun başlaması karmaşık bir işlemdir. Bu işlemde, ribozomun 30S altbirimi, başlama faktörü proteinleri, $fMet-tRNA^{fMet}$ ve bir GTP molekülü ile beraber birleşerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks mRNA'nın 5'-ucuna yakın bir yere bağlanır ve fMet-

tRNA^{fMet} antikodonu (UAC) mRNA üzerinde metiyonine karşılık gelen AUG (başlama) kodonu ile hidrojen bağı yapar. Böylece, ribozomun 50S altbirimi bağlanarak 70S ribozom mRNA ye bağlı bir şekilde tamamlanmış olur. GTP molekülü GDP ve inorganik fosfata hidrolizlenerek başlama faktörleri kompleksten ayrılır. Böylece, 70S başlama kompleksi protein sentezini gerçekleştirmek üzere hazır duruma gelmiş olur (Şekil 7.52).



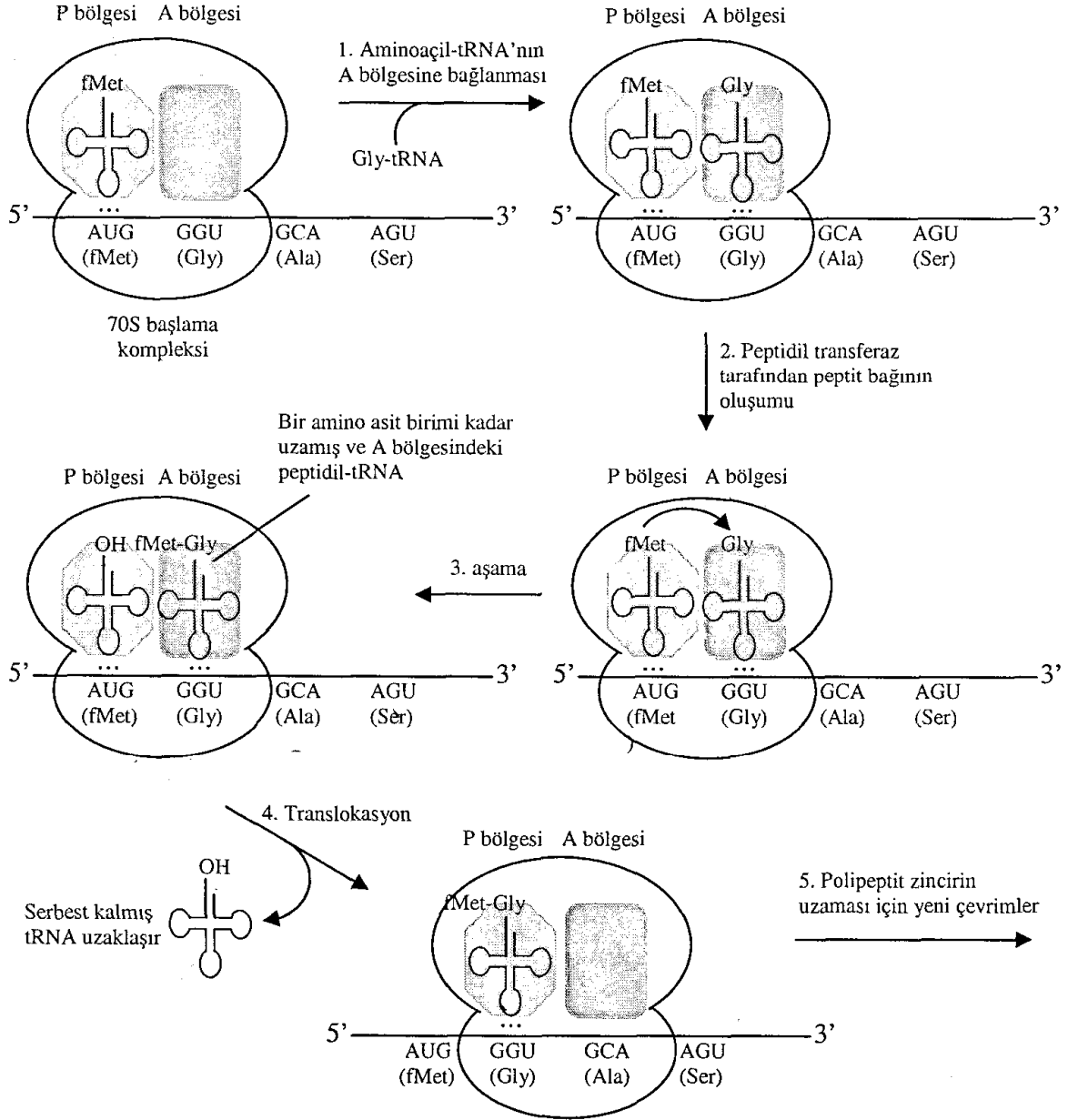
Şekil 7.52. 70S başlama kompleksinin oluşması.

7.7.4.3. Polipeptit Zincir Sentezi ve Zincirin Uzaması

Polipeptid zincir sentezi ve zincir uzaması ile ilgili olaylar çok sayıda aşamayı gerektirir ve birçok işlem ardışık olarak ve tekrarlanarak gerçekleşir (Şekil 7.53). Bu aşamada 3 temel olay vardır:

- i) Aminoasıl-tRNA ribozoma bağlanması ve kodonun tanınması,
- ii) Bir peptid bağı oluşması,
- iii) Translokasyon yani peptid zincirine bağlı tRNA'nın ve ribozomun hareketi ve böylece bir sonraki kodonun okunabilmesi.

Ribozomun büyük olan 50S altbirimi iki farklı tRNA bağlanma bölgesine sahiptir ve bu bölgeler, P (peptidil) ve A (aminoaçıl) bölgeleri olarak tanımlanır. Polipeptid zincirinin oluşumunun başlangıcında, fMet-tRNA bu altbirimin P bölgesine mRNA üzerindeki AUG kodonuna bağlıdır. Bir aminoaçıl-tRNA molekülü dolayısıyla A bölgesine bağlanır. Bu bağlanma işlemi için bir GTP molekülünün hidrolizi ve ayrıca çeşitli zincir uzama faktörü (UF-Tu ve UF-Ts) olarak tanımlanan proteinler gereklidir. İlave edilecek ilk aminoasidin Gly olduğu kabul edilirse, bir Gly-tRNA^{Gly} ribozomal 50S altbirimin A bölgesine bağlanıp mRNA üzerindeki alanini veren kodon (GGU) ile hidrojen bağı yapar. Bu sırada, 50S alt birimine bağlı bulunan peptidil transferaz adlı enzim fMet' in karboksil grubu ile Gly'in amino grubu arasında bir peptid bağı oluşumunu katalizler ve fMet-tRNA'daki fMet grubunun Gly' e transferini sağlar. Böylece, ribozomal 50S altbiriminin P bölgesi fMet için özgün olan bir tRNA molekülünü içeriyorken A bölgesi de bir dipeptidin bağlı olduğu bir tRNA molekülünü (fMet-Gly-tRNA) içerecektir. Bir sonraki aşama, fMet-Gly-tRNA'nın A bölgesinden P bölgesine hareketidir. Önce, aminoasit içermeyen tRNA^{fMet} P bölgesinden ayrılır ve 70S ribozom kompleksinden uzaklaşır. Böylece, fMet-Ala-tRNA dipeptidi P bölgesine bağlanıp A bölgesi yeni bir aminoaçıl-tRNA bağlanması için boşalmış olur ve uygun hale gelir. Bağlı dipeptidin A bölgesinden P bölgesine hareketi diğer bir zincir uzama faktörüne (UF-G, translokaz) ve GTP'nin hidrolizine gerek duyar. Bu translokasyon sırasında 70S ribozom üzerinde ve A bölgesi bir kodona karşılık gelinceye kadar hareket eder ve böylece uygun antikodona sahip yeni bir aminoaçıl-tRNA'nın kabul edilmesi sağlanır. Yeni kodon alanine karşılık gelen GCU ise böylece Ala-tRNA^{Ala} nın antikodonu bu GCU kodonuna 50S ribozomal altbirimin A bölgesinde bağlanır. Yukarıdaki zincir uzama işlemlerinin bir tekrarı ile önce yeni aminoaçıl-tRNA'nın bağlanması, peptidil transferaz ile ribozomal P bölgesinde bulunan fMet-Ala-tRNA^{Gly} dipeptidinin karboksil ucu ile Ala'nın amino ucu arasında bir peptid bağı oluşumu ve A bölgesindeki bağlı tripeptidin P bölgesine hareketi gerçekleşir. Böyle bir işlemle, mRNA molekülü ribozom tarafından sırayla her defasında bir kodon olmak üzere okunur. Polipeptid zinciri de her defasında bir aminoasit kadar uzadıkça üç boyutlu bir yapı almak üzere katlanmaya başlar.

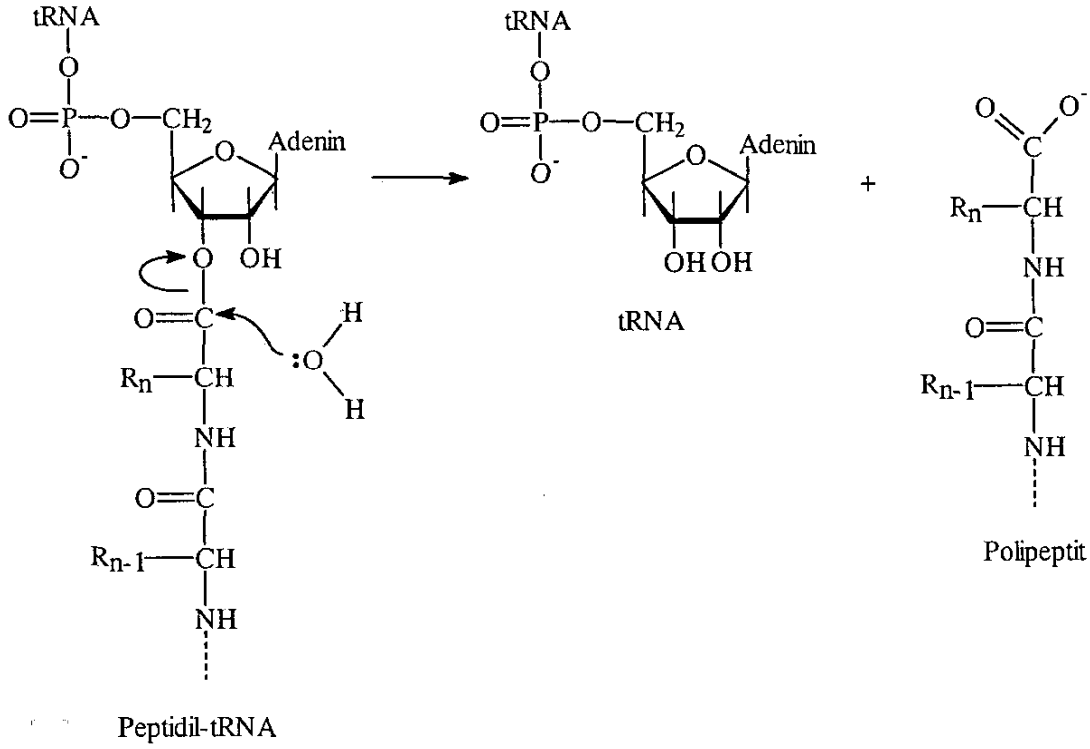


Şekil 7.53. Polipeptit zincir sentezi ve uzatılması işlemlerinde temel basamaklar.

7.7.4.4. Polipeptid Zincir Sentezinin Sonlanması

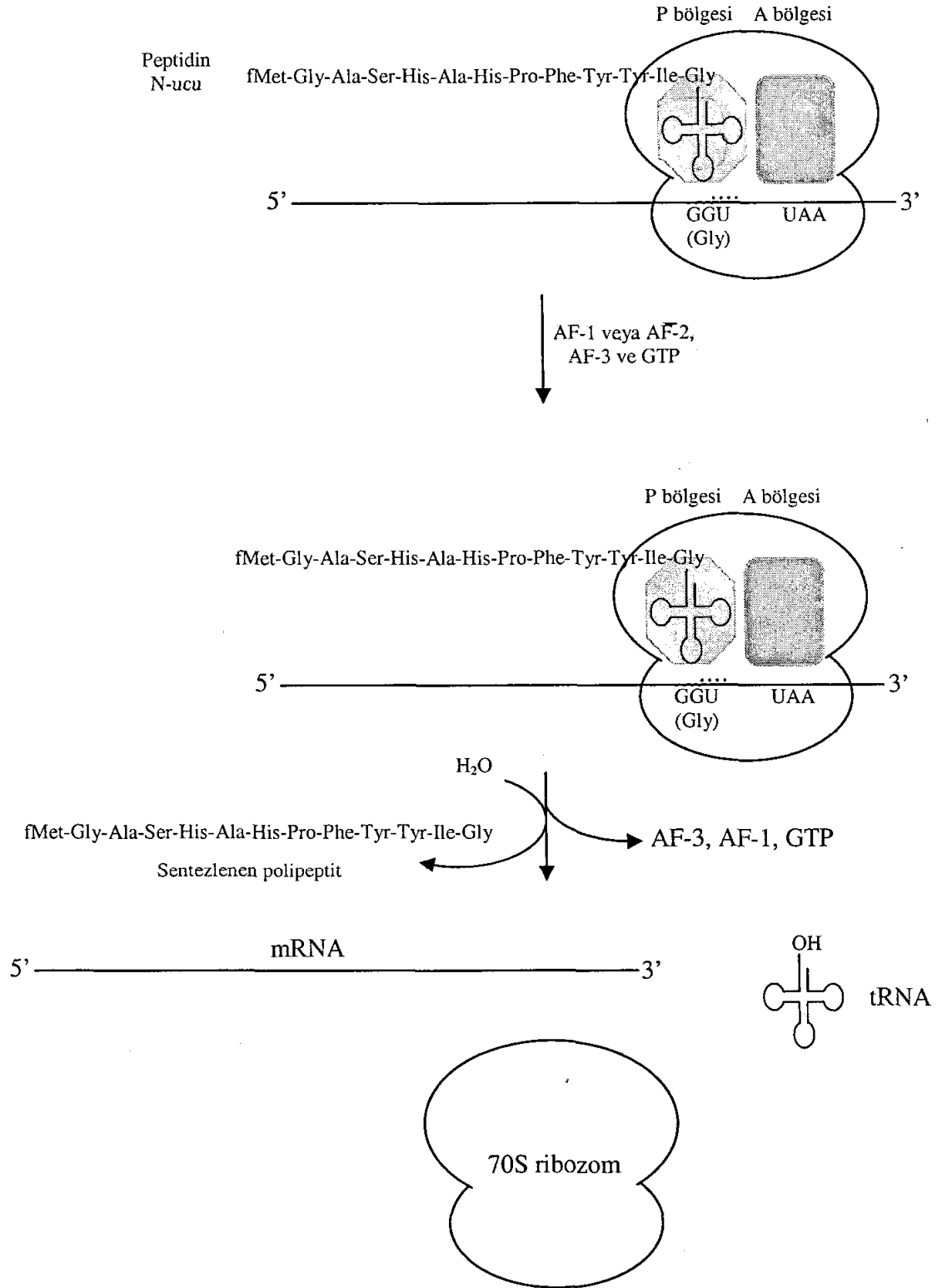
mRNA molekülleri üzerinde polipeptid zincir sentezinin sonlanma sinyali olarak rol oynayan üç dur kodonu (*UAA*, *UAG* ve *UGA*) vardır. Bu kodonlar genetik mesajın sonunu ve dolayısıyla polipeptid zincirin bittiğini bildirir. Ayrıca ayrılma faktörleri (AF-1, AF2 ve AF3) olarak tanımlanan proteinler ribozomun A bölgesine bağlanır ve dur kodonunu tanımlar. AF-1 faktörü *UAA* ve *UAG*'yi tanıırken AF-2 *UAA* ve *UGA*'yı tanıır. AF-3 ise bu faktörlerin ribozoma bağlanabilmesini indükler. Ayrılma faktörlerinin bağlanması ile ribozomal peptidil transferaz indüklenir, P bölgesine bağlı en son tRNA molekülünden polipeptid zincirin

hidrolizini katalizleyerek polipeptit zincirin ribozom/mRNA kompleksinden ayrılmasını sağlar (Şekil 7.54).



Şekil 7.54. Ribozomal peptidil transferaz ile peptidil-tRNA'nın hidrolizi.

Sonlanma işleminde, ayrılma faktörleri daha sonra ribozomdan ayrılır ve ribozomun kendisi de kendini oluşturan 30S ve 50S alt birimlerine ayrışır. Böylece, ribozom mRNA molekülünden ayrılarak sitoplazmaya difüzenir (Şekil 7.55). Bu şekilde ribozomal alt birimler protein sentezi için sürekli işleme girer. Etkin bir şekilde büyüyen bakterilerde ribozomların büyük bir çoğunluğu protein sentezi ile meşguldür. Polipeptit zinciri sentezlendikten sonra serbest alt birimlerine ayrışan 70S ribozomlar protein sentezinde etkin değildir. Bu, polipeptid sentezi için başlama faktörleri ile sadece 30S alt biriminin etkileşebilmesinden kaynaklanır. Prokaryotik polipeptit zincir sonlanması için çeşitli ayrılma faktörleri gerekli olmasına karşın ökaryotik sonlanmada sadece bir ayrılma faktörü yeterli olmaktadır. Bu proteinin ribozomal A bölgesine bağlanması GTP bağımlıdır ve bu iki molekül arasındaki etkileşimle oluşan kompleks, A bölgesi bir sonlanma kodonuna ulaşınca ancak bu bölgeye bağlanabilmektedir.



Şekil 7.55. Polipeptit zinciri sentezinin sonlanması.

7.7.5. Proteinlerin Translasyon Sonrası Türevlendirilmesi

Yeni sentezlenen polipeptid zincirin biyolojik bir aktivite gösterebilmesi için ilave enzimatik basamaklar (translasyon sonrası modifikasyon) gerekebilir. Zincir içinde ve

zincirler arası disülfür bağlarının oluşturulması, kovalent türevlendirme, prostetik grupların ilave edilmesi ve proteoliz gibi işlemler translasyon sonrası türevlendirme işlemlerindedir.

Polipeptidlerin proteolitik parçalanması en sık rastlanan türevlendirme işlemlerinden biridir. Öncelikle sentezlenen her polipeptid zincirin N-ucunda bulunan metiyonin veya N-formil metiyonin biriminin polipeptit zincirinden enzimatik olarak uzaklaştırılması bu türden bir proteolitik işlemdir. Bu tür işlemlere uğrayan proteinler **proprotein (önprotein)** olarak adlandırılır. Proinsülin böyle bir proteolitik işlemle insüline dönüştürülür.

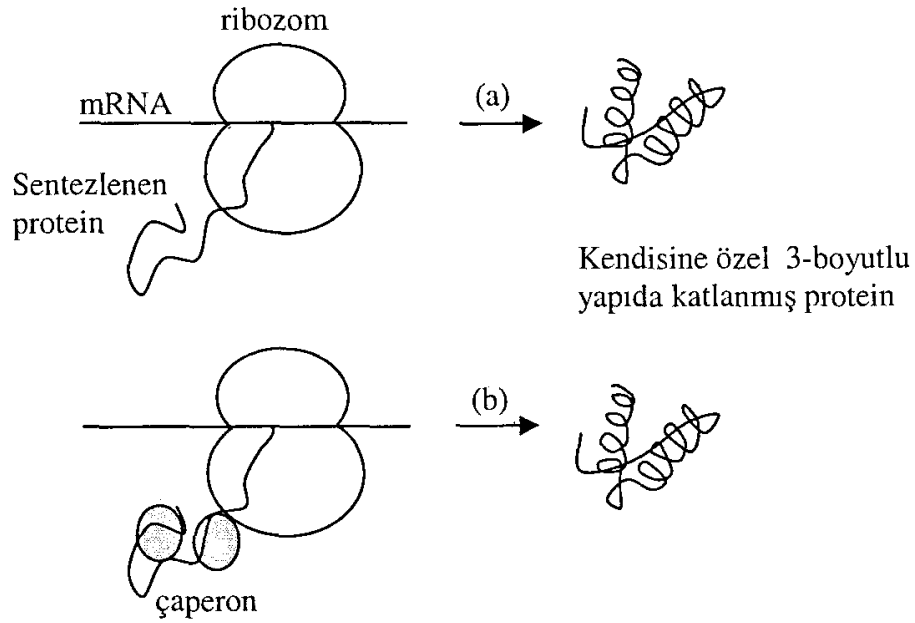
Bazı peptidlerin sentezlendikten sonra görev yapacakları bölgelere varması veya membranı sarmallarla geçecek şekilde membrana gömülü olabilmesi için peptid zincirinin N-ucuna birkaç hidrofobik aminoasit birimi katılır. Bu kısa peptid zinciri bağlı bulunduğu proteinin tanınması için adeta bir etiket veya sinyal gibi görev yapar ve bu özelliğinden dolayı **lider peptid veya sinyal peptid** olarak tanımlanır. Sinyal peptidlerle türevlendirilmiş proteinler ise **preprotein** olarak bilinir. Görevini tamamlayan bu peptid daha sonra ana peptid zincirinden çeşitli enzimlerin etkisiyle uzaklaştırılır.

Proteinler içerdikleri aminoasitlerin çeşitli türevlendirilebilen gruplardan dolayı hidrosillenme, metillenme, fosforillenme ve glikozillenme gibi çeşitli işlemlere uğrayabilir. Fosforillenme hem glikojen ve hem de lipid metabolizmasında görev yapan birçok enzim üzerinde gerçekleşen bir türevlendirme yoludur. Türevlendirme ile enzim faaliyetinin denetlenmesini sağlar.

7.7.6. Protein Katlanması

Sentezlenen her bir proteinin kendine özel üç boyutlu yapıyı almasını sağlayan bilgi, o proteinin birincil yapısını oluşturan aminoasit dizisinde mevcuttur. Proteinler, ribozomlar tarafından sentezlenirken bile katlanmaya başlar. Proteinlerin polipeptit zincirleri oluşturulduktan sonraki çok kısa bir zaman dilimi içinde ikincil yapıları oluşmaya başlar. Zincir sentezlenip uzadıkça önce birbirine yakın aminoasitler arasında hidrojen bağlarıyla sağlanan sarmal yapı ve takiben de zincirin farklı bölgelerindeki aminoasitlerin katılımıyla da katlanmış tabaka yapıları oluşur. Bu sırada, hidrofobik kısımlar su ile çevrilip iç kısımda bir hidrofobik çekirdek oluşturur. Aynı zamanda disülfür köprüleri, iyonik etkileşimler, peptit bağının izomerleşmesi gibi yüksek enerjili bağlar oluşur. Bu işlemlerde ortaya çıkan serbest enerji, bölgesel ancak yüksek enerjili ve kararsız protein yapılarının oluşmasına sebep olur. Bu kararsız bölge yapıları diğer moleküllerle kümelenerek daha kararlı hale gelebilir. Böylece, bir proteinin doğal yapısını alması engellenir.

Çeşitli *in vitro* çalışmalarla, proteinlerin katlanma işlemlerinde **çaperon** veya **çaperonin** adı verilen yardımcı proteinlerin katkıda buldukları belirlenmiştir. Çaperon ve çaperoninler ısı şok proteinleridir ve hsp60 (ısı şok proteini, 60 kDa), hsp70 ve hsp90 bunlardan en bilinen birkaçıdır. Bu proteinler, uygun olmayan etkileşimleri engelleyerek bir peptid zincirinin etkin bir protein oluşturmak üzere doğru bir şekilde katlanmasını sağlar. Çaperonlar genellikle hidrofobik yüzeyleri tanıyarak katlanmakta olan bir peptid zinciri ile diğer moleküllerin kümelenmesini engelleme yeteneğine sahiptir. Bu proteinler ribozomlara bağlı kalır ve proteinin peptid zincirinin tamamının sentezini beklemeden onun adım adım ve uygun bir şekilde katlanmasını sağlar (Şekil 7.56). Çaperonlar sadece protein katlanmasında rol oynamaz ve aynı zamanda yanlış katlanmış peptid zincirlerini de bozabilir. Ayrıca çaperonlar, proteinlere gidecekleri hücre bölgelerine ulaşmalarında eşlik eder veya yönlendirir. Ayrıca çaperonların, proteinlerle diğer biyomoleküllerin doğru bir konumda bir araya gelmesinde de etkili oldukları bilinmektedir.



Şekil 7.56. Bir proteinin kendisine özel üç boyutlu yapıyı almak üzere, **a)** Kendi kendine katlanması **b)** Çaperon bağımlı katlanması.

7.8. MUTASYON ÇEŞİTLERİ

Mutasyon, DNA baz dizilişinde meydana gelen kalıcı değişmelerdir. Başlıca üç çeşit mutasyon vardır:

1. Bir veya daha fazla sayıda baz çiftinin başka bazlarla yer değiştirmesi (**substitüsyon**),
2. Bir veya daha fazla baz çiftinin atlanması (**deletion**),
3. Bir veya daha fazla baz çiftinin DNA zinciri içine sokulması (**insertion**).

En sık rastlanan mutasyon çeşidi substitüsyondur. Eğer bir mutasyon DNA'nın önemsiz bir bölgesini etkilerse veya bir genin işlevinde ihmal edilebilir bir etkisi varsa **sessiz mutasyon** adını alır. Nadirde olsa, bazen mutasyonun biyolojik bir avantajı olabilir. Bununla birlikte mutasyonların çoğu zararlıdır.

Memelilerde mutasyonların birikmesi ile kanser arasında güçlü bir ilişki vardır. Tipik bir memeli hücresi genomu, 24 saatlik bir zaman dilimi içinde binlerce hata biriktirir. Bununla birlikte, DNA onarımının bir sonucu olarak, bu hataların binde birinden daha azı mutasyona neden olmaktadır. DNA oldukça kararlı bir moleküldür. Eğer tamir (onarım) sistemleri olmasaydı, pek çok seyrek fakat tahrip edici reaksiyonun birikmiş etkisiyle yaşam imkansız hale gelirdi.

KAYNAKLAR

1. Bingöl, G., (1983), Biyokimya, Hacettepe TAŞ Kitapçılık Ltd. Şti.
2. Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., (2007), Biyokimya (Lippicott's Illustrated Reviews Serisinden, Çeviri Editörü: Ulukaya, E.), İstanbul, Nobel Tıp Biyokimya, 3. Baskı, ISBN: 987-975-420-579-4.
3. Conn, E.E., Stumpf, P.K., (1976), Outlines of Biochemistry, Fourth Edition, John Willey and Sons, INC, New York, USA.
4. Gözükara, E.M., (1997), Biyokimya (Cilt 1 ve Cilt 2), İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, Üçüncü Baskı.
5. Güner, S., (2007), Biyokimya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Yayınları, Trabzon, No: 224.
6. Gürdöl, F., Ademoğlu, E., (2006), Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. ISBN: 975-420-462-4.
7. Keha E., Küfrevioğlu, İ., (2005), Biyokimya, İstanbul, Aktif Yayınevi, 2. Baskı, ISBN: 975-6755-20-02.
8. Montgomery, R., Conway, T.M., Spector, A.A., Chappell, D., (2000), Biyokimya (Olgu Sunumlu Yaklaşım, Çeviri Editörü: Altan, N.), Palme Yayıncılık, Altıncı Baskıdan Çeviri, ISBN: 975-7477-67-2.
9. Montgomery, R., Dryer, R.L., Conway, T.W., Spector, A.A., (1977), Biochemistry (A Case-orientted Approach), Second Edition, Saint Louis, The C. V. Mosby Company, ISBN 0-8016-3469-5.
10. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., Çeviri: Dikmen, n., Özgünen, T., (1998), Adana, Harper'in Biyokimyası, 24. Baskı, barış kitabevi, ISBN: 975-95-331-1-1.
11. Nelson, D.L., Cox, M.M., (2005), Lehninger Biyokimyannın İlkeleri (Çeviri Editörü: Kılıç, N.), Ankara, Palme Yayıncılık, Üçüncü Baskıdan Çeviri, ISBN:1-57259-931-6.
12. Tekman, Ş., Öner, N., (1981), Ankara, Genel Biykimya, İstanbul Üniversitesi yayınları No. 2810, Eczacılık Fakültesi No. 30, Üçüncü Baskı. İstanbul.
13. Tüzün, C., (1992), Biyokimya, Ankara, Palme Yayınları, İkinci Baskı, Tıp Serisi: 111.
14. Tüzün, C., (1993), Medikal Biyokimya, Palme Yayınları, Ankara, Tıp Serisi: 112, ISBN: 975-7477-05-2.
15. Voet, D., Voet, J.G., (1990). Biochemistry, Jhon Willey and Sons, Canada. ISBN: QP514.2.V64.