



BİYOFİZİK

DERS NOTLARI

İstanbul Tıp Fakóltesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Genişletilmiş İkinci Baskı

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. Giriş	1
2. Canlı sistemlerin molekül yapısı	4
2.1. Madde yapısı	4
2.1.1. Atom yapısı	4
Ana kuantum sayısı	5
Açısal kuantum sayısı	5
Magnet kuantum sayısı	5
Spin (dönme impulsu) sayısı	5
2.1.2. Kimyasal bağlar ve moleküllerin oluşumu	9
2.1.2.1. Kimyasal değerlilik	9
2.1.2.2. Kimyasal bağ çeşitleri	11
Kovalent bağlar	11
İyonik bağlar	12
Koordinasyon bağları	13
London-van der Waals (Dipol-Dipol) bağı	13
Hidrojen bağları	16
Hidrofobik etkileşimler	19
3. Radyoaktiflik ve ışın biyofiziği	22
3.1. Atom çekirdeği	22
3.2. Radyoaktifliğin bulunuşu	23
3.3. Çekirdek kuramı	25
3.4. Radyoaktif parçalanma ve ışınlar	28
3.5. Radyoizotopların özellikleri	34
3.5.1. Yarılanma süresi (Yarı ömür)	34
3.5.2. Radyoaktiflik	39
3.5.3. Radyoaktif ışınların madde ile etkileşimi (girginliği ve iyonlaştırıcı etkinliği)	40
3.6. Radyoaktif ışınların yol açtığı kimyasal değişiklikler	44
3.7. Soğurulan ışın enerjisi ile ilgili kavramlar	48

3.8. Radyoizotopların araştırmalarda kullanımı	51
3.9. Radyoizotopların belirtiminde kullanılan yöntem ve araçlar	58
3.10. Radyoaktif ışınların tanı ve sağaltımda kullanımı	67
3.11. Işın Biyofiziği	73
3.11.1. Soğurum (absorpsiyon) spektrometresi	80
3.11.2. Işıltı (floresans) spektrometresi	83
3.11.3. Sirküler dikroizm	83
3.11.4. Nükleer magnetik rezonans	87
4. Hücre yapıtaşları	91
4.1. Giriş	91
4.2. Su	95
4.2.1. Suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri	98
4.2.1.1. Suyun özgül ısısı	98
4.2.1.2. Suyun buharlaşma ısısı	99
4.2.1.3. Suyun erime ısısı	100
4.2.1.4. Suyun dielektrik dursayı	101
4.2.1.5. Suyun çözücü özelliği	101
4.2.1.6. Suyun iyonlaşması	103
4.3. Makromoleküller	111
4.3.1. Giriş	111
4.3.2. Proteinler	111
Enzimler (katalitik proteinler)	112
Immunproteinler	112
Protein hormonlar	112
Düzenleyici proteinler	112
Taşıyıcı proteinler	112
Kontraktil proteinler	112
4.3.2.1. Proteinlerin yapısal özellikleri	113

1. Apolar ya da hidrofobik R-grupları içeren amino asitler	113
2. Açık bir elektrik yükü taşımayan, ancak polar nitelikte R-grupları içeren amino asitler	117
3. R-grubu negatif elektrik yüklü (yani asidik) amino asitler	117
4. R-grubu pozitif elektrik yüklü (yani bazik gruplar) amino asitler	117
4.3.2.2. Amino asitlerin asit-baz özellikleri	117
4.3.2.3. Peptit bağı	120
4.3.2.4. Aktif proteinlerin ligantlarıyla etkileşimi	130
4.3.2.5. Denge diyalizi ve bağlanmanın sayısal belirtimi	137
4.3.3. Aktif protein örneğinde yapı-işlev ilişkileri	139
4.3.3.1. Miyoglobin ve hemoglobin-oksijen taşıyan proteinler	139
4.3.3.2. Miyoglobin ve hemoglobinin yapısal ve işlevsel özellikleri	139
4.3.4. Nükleik asitler	156
4.3.4.1. DNA molekülü	160
4.3.5. Karbonhidratlar(Polisakkaritler)	174
4.3.6. Lipitler	178
4.3.7. Makromolekül yapıtaşları ve ara moleküller	184
5. Biyoenerjetik	186
5.1. Giriş	186
5.2. Termodinamik kuralları	186
5.2.1. Termodinamiğin birinci kuralı	188
5.2.2. Termodinamiğin ikinci kuralı	190
5.3. Serbest enerji ve denge dursayısı	194
5.4. Canlılarda enerji akımı	196
5.5. ATP ve kimyasal enerji iletimi	199
5.6. Hücre metabolizmasında ATP-ADP sisteminin önemi	201
5.7. Enerji iletimi ve ortak ürünü ilkesi	202
5.8. ATP'nin hücre içinde oluşması	204
5.9. Glikolizin bilançosu	209

5.10. Glikolizin düzenlenmesi	210
5.11. Glikolizin ve solunumun enerjetiğinin karşılaştırılması	211
5.12. Hücre solunumu	213
5.12.1. Asetil-CoA'nin oluşması	213
5.12.2. Krebs döngüsü	214
5.12.3. Elektrontransportu ve solunum zinciri	215
5.12.4. Elektron iletiminin enerjetiği	217
5.12.5. Oksidatif fosforillenme	220
5.13. Glikozun oksitlenmesinin enerji bilançosu	221
5.14. Solunum hızının düzenlenmesi	221
5.15. Redoks potansiyeli ve ölçülmesi	221
5.16. Biyolojik işler	228
5.16.1. Kimyasal iş (biyosentez)	228
5.12.2. Aktif iletim (transport) ya da ozmotik işlem	228
5.17. Membran yapısı	228
5.18. Biyoenerjetik ilkeleri ve moleküllerin membrandan iletimi	237
5.18.1. Pasif iletim	238
5.18.1.1. Basit difüzlenme	239
5.18.1.2. Kolaylaştırılmış difüzlenme	240
5.18.2. Aktif iletim	241
5.19. Difüzlenme ve ozmoz	241
5.20. Biyoenerjetik açıdan moleküllerin membrandan iletimi	243
5.21. Gibbs-Donnan dengesi	246
5.22. Membran potansiyeli	250
5.23. Difüzlenme potansiyelleri	254
5.24. Membran dinlenim potansiyeli	254
5.25. Aksiyon potansiyeli	256
5.26. Mekanik iş	269
5.26.1. Miyozin filamentleri	272
5.26.2. Aktin filamentleri	274
5.26.3. Kas kasılmasının enerji kaynağı	279

6. Bilgi Kuramı	281
6.1. Canlılar ve entropi	281
6.2. Bilgi ve entropi	282
6.3. Bilgi kuramı	284
6.4. Bir mesajın ikili sistemde anlatımı	294
6.5. Kanal kapasitesi	297
6.6. Hücrenin bilgi içeriği	298
6.7. Kibernetik ilkeleri	299
7. Enzimler-Fiziksel ilkeler	310
7.1. Giriş	310
7.2. Tepkime hızları	312
7.3. Tepkime hızı ve aktifleşme enerjisi	315
7.4. Kataliz kavramı-enzimlerin etki mekanizması	318
7.5. Enzim kinetikleri	323
7.6. Enzim inhibisyonu	329
7.7. Enzim etkinliğinin düzenlenmesi	335
8. Moleküler Biyofizik	350
8.1. Giriş	350
8.2. Nükleik asitler;DNA ve RNA	353
8.3. Kalıtsal bilginin anlatımı(gen ekspresyonu)	354
8.4. Prokaryotik ve ökaryotik DNA'nın özellikleri	358
8.5. Eşleme(Replikasyon)	362
8.6. DNA'nın enzimatik oluşma mekanizması	363
8.7. DNA polimeraz çeşitleri	371
8.8. DNA sentezinin enerjisi	376
8.9. Komplementer bazlar arasındaki hidrojen köprülerinin DNA yapısının kahlımlılığında ve şifrenin doğru okunmasındaki önemi	379
8.10.DNA'nın transkripsiyonu (Kayıt aşaması)-RNA sentezi	381
8.11.Transkripsiyonun düzenlenmesi	384
8.12. RNA'nın işlenmesi ("splicing")	385
8.13. Kolineerlik ve kalıtsal şifre	386

8.14. Protein sentezi (Translasyon)	392
8.15. Protein sentezinin enerjietiği	401
8.16. Gen ekspresyonunun düzenlenmesi	404
8.17 RNA yazılımı (“editing”)	409
8.18 Ters Transkripsiyon	410
8.19. Prion hastalıkları	412
8.20 Mutasyonlar	415
8.21. Baskılama (Supresyon)	423
8.22. DNA onarım mekanizmaları	429
9. Gen Mühendisliğı	438
9.1. Restriksiyon nükleazları	438
9.2. Yüksek organizmalara özgü mRNA ’ların saflaştırılması ve radyo-aktif cDNA ’ların hazırlanması	441
9.3. Kalıtım Mühendisliğı	446
9.4. Gen mühendisliğinin uygulama alanları	451
9.5. Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (PCR)	455
9.6. DNA dizi analizi (Sanger Yöntemi)	455
9.7. Kalıtsal hastalıkların doğum öncesi (prenatal) tanısı	457
9.8. Doğum öncesi tani yöntemleri	463
9.9. İnsan Gen Tedavisi	473
10. Hücreden yüksek canlılara geğış	483
10.1. Çekirdekli(ökaryot) hücre ve genomu	483
10.2. Diploitlik ve eşemsel çoğalma	499
10.3. Embriyonik gelişme	501
11. Hücre farklılaşması açısından lenfosit modeli	528
11.1. Antikorlar-yapıları,sınıfları ve oluşum mekanizmaları	535
11.2. Antikor-antijen etkileşimi	544
11.3. Antikorların çeşitliliğini belirleyen molekölse mekanizmaları	550
11.4. T-lenfositleri	560
11.5. T-lenfositleri ve ana doku uyuşum kompleksi (“major histokompatibility complex (MHC)”)	562

11.6. Bağışık yanıtın oluşumunda hücresel moleküler mekanizmalar	567
11.7. Bağışık yanıtın düzenlenmesi	573
11.8. Anti-idiotipik sistem	575
11.9. Bağışık tolerans	576
11.10. Otoimmün hastalıklar (öze bağışıklıktan kaynaklanan hastalıklar)	577
12. Hücre çoğalması ve kanser problemi	581
12.1. Hücre kültürü sistemleri	581
12.2. Hücre siklusu	585
12.3. Hücre çoğalma faktörleri-sinyal iletim yolları	587
12.4. Fosfolipaz C, diasilgliserol, inositol trifosfat yolu	589
12.5. G-proteinleri-hücre uyarıcılarının aracısı düzenleyici proteinler	593
12.6. Adenilat siklaz-cAMP yolu	595
12.7. Reseptör-tirosin kinaz (RTK) sistemi	596
12.8. Hücre siklusu ve siklinler	601
12.9. G1 evresi-çoğalma faktörleri ile siklin/CDK etkileşimleri	603
12.10. P53 ve apoptoz	603
12.11. Mitoz-siklin/CDK düzenlenmesi	606
12.12. Hücre kültürlerinde kanser hücrelerinin davranışı	609
12.13. Hücre hibritlemesi ve uygulama alanları	610
12.14. Kanser problemi	613
12.14.1. Somatik mutasyonlar ve kanser	616
12.14.2. Viral karsinogenez	621
12.15. DNA tümör virüsleri	623
12.16. RNA tümör virüsleri	627
12.17. Onkogenler(ve proto-onkogenler)	633
12.18. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşmesi	635
12.19. Onkogenlerin şifrelediği proteinler-Kanser proteinleri	641
12.20. Süpresör genler	643
12.21. Sonuç	645
Kaynaklar (Genel)	648
Ek Okuma Kaynakları	650

İstanbul Tıp Fakóltesi Biyofizik Anabilim Dalı

Şekil ve Resimler için Kullanılan Kaynaklar	658
Bazı Fizik ve Matematik Sabitleri	663
Yaşam Bilimlerinde Son Altmış Yılda Molekül Düzeyde Yapılan	
Başlıca Buluşlar ve Bu Buluşların Yol Açtığı Gelişmeler	670
Kısaltmalar	695
Dizin	697

1. Giriş

Biyofizik fiziksel ilke ve yöntemlerin biyolojik sistemlere uygulandığı bir bilim dalıdır. Bu tanıma göre, daha ondokuzuncu yüzyılda biyolojik olaylara eğilirken klasik fiziğe yaptıkları büyük katkılarla ölümsüzleşen Fick, Poiseuille ve Helmholtz biyofiziğin kurucuları olarak gösterilebilir. Böyle bir genel tanıma uyan faaliyetler günümüzde daha çok **sistem biyofiziği** kapsamında yer almaktadır. Sistem biyofiziğini (ya da genel biyofiziği) biyolojik işlevleri ve ilişkileri betimleyen **klasik fizyoloji** ile bu tür işlev ve ilişkilerin teknolojik öyküsünü ve benzetimi (simülasyonu) ile uğraşan **biyomühendislikten** ayırmak gerekir. Diğer yandan, klasik nitelikli yaşam bilimleri arasında bile, araştırmaların molekülse düzeyeye kaymasına koşut olarak, gözlenen bütünleşme, biyofiziğin ayrı bir kolunun **moleküler biyofizik** adı altında gelişimine zemin hazırlamıştır.

İlk kez, Weaver tarafından 1938 yılında ayrı bir bilim dalı (ya da bir çok bilim dalının örtüştüğü bir bilimsel alan) olarak tanımlanan **moleküler biyoloji** canlıların temel birimi olan hücrenin gizemlerine moleküler düzeyde açıklık getirme görevini üstlenmiştir. Bu alanda son elli yılda gerçekleşen atılımlar yaşama ilişkin görüş ve anlayışları derinden etkilemiştir. Moleküler biyolojinin kazanımları geleneksel nitelikli yaşam bilimlerinde de yeni yapılanmalara ve anlayış değişikliklerine yol açmıştır. Moleküler biyofizik, moleküler genetiğin yanı sıra, moleküler biyolojinin farklılaşmasıyla ortaya çıkan ve onu geri besleyen iki önemli bilim dalından biridir. Moleküler biyoloji kapsamında yapılan önemli buluşların büyük bir bölümünün

biyofizikçilerden kaynaklanması ve moleküler biyoloji kavramının bilim dünyasında benimsenmesinde belirleyici olan araştırmacının gene de biyofizikçi olmaları iki dal arasındaki karşılıklı ilişkiye işaret etmektedir.

Moleküler biyofizik biyomolekülleri ve yaşamsal süreç ile işlevleri molekül düzeyinde ve fiziksel yöntemlerle inceleyen ve fizik dilinde yorumlayan bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Bu açıdan biyomoleküllerin yapısı ve kimyasal dönüşümlerine ilişkin bilgiler hareket noktasını oluşturmaktadır. Ancak, moleküler biyofizik, moleküler biyoloji (ve de biyokimyanın) olaylarını molekül düzeye indirgeyerek açıklama çabalarına kuantum mekaniği, termodinamik ve informatik yöntemleri ve kavramlar aracılığıyla ayrı bir boyut getirir. Bunun ötesinde, biyofizik canlılara ilişkin molekül düzeydeki bulum ve gözlemlerle, organizma düzeyindeki yapılanma ve davranışlar arasında şu anda henüz aydınlanmamış ilişki ve bağlantıları tanımlama ve açıklamaya, farklı düzeylerde kazanılmış bilgileri bütünleştirerek yorumlayabilme potansiyeline sahip başlıca bilim dalı olarak belirmektedir. Gelecek on yıllarda yaşam bilimleri arasında gittikçe öne çıkarak yaşamla ilgili sorulara en kesin yanıtları vermeye aday gözükmektedir.

Son yirmi yıldan beri İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi öğrencilerine yaklaşık 60 saatlik bir ders programı kapsamında Moleküler Biyofizik ağırlıklı olarak Biyofizik dersleri verilmektedir. Öğrencilere verilen derslerin notları 1994 yılında “Biyofizik Ders Notları” adı altında toplanmış, kısa sürede tükenen bu basımdan sonra, “Ders Notları” güncellenilip, genişletilerek ikinci basıma hazırlanmıştır.

“Ders Notları”nda, öğrencilere verilen derslerde olduğu gibi, biyolojik olaylara yapı, bilgi ve enerjetik gibi fiziksel kavramlar açısından yorum getirilmeye çalışılmaktadır. Ders programıyla uyumlu olarak, önce atom ve molekül yapısı ve kimyasal bağlara ilişkin bilgiler verilmiş, biyomoleküller ve hücre yapıtaşları yapısal ve işlevsel açıdan irdelenmiştir. Bu konuları sırasıyla **biyoenerjetik** ve onunla yakın bağlantılı konular olan **bilgi kuramı**, **kibernetik** ve **kinetik (enzim) bilim** izlemektedir. Genel nitelikli bu konulardan sonra kalıtsal bilgi, bu bilginin iletimi ve anlatımı(ekspresyonu) ayrıntılı olarak ele alınmaktadır. İkinci ana bölüm hücreden, **çok hücrelilere (yüksek canlılara) geçiş**, **embriyonal gelişme**, **hücre çoğalması** ve **farklılaşması** (somut bir örnek olarak lenfosit farklılaşması), hücre çoğalmasının yüksek canlılarda tabi olduğu düzenleme ve denetim mekanizmaları (ve denetimin ortadan kalkmasıyla gelişen **kanser**) konularını işleyerek son bulmaktadır.

“Ders Notları” yukarıda da belirtildiği gibi, yeniden derlenerek, önemli ölçüde geliştirilmiştir. Bu nedenle, ikinci baskı hazırlayanlarca “Ders Notları”nın standart bir ders kitabına dönüşme sürecinin önemli bir aşaması olarak görülmektedir. Hazırlayanlar bu sürece öğrencilerinin ve meslekdaşlarının yapacakları eleştiriler ve getirecekleri öneriler ile önemli katkılarda bulunacaklarına inanmakta, “Ders Notları”nın öğrenciler ve genç araştırmacılar için yararlı bir kaynak hizmetini göreceği umudunu taşımaktadır.

2. Canlı sistemlerin molekül yapısı

2.1. Madde yapısı

2.1.1. Atom yapısı

Atomlar, Bohr tarafından önerilen bir modele göre güneş sistemlerini andıran bir düzene sahiptir (Şekil 2-1). Bu modelde negatif elektrik yüklü elektronlar pozitif yüklü proton(lar)ın ve bunların yanı sıra elektrik yükü taşımayan nötron(lar)ın oluşturdukları çekirdeğin çevresindeki belirli yörüngelerde dolar. Elektron yörüngesinin çekirdeğe uzaklığının değişmediği ve bu uzaklığın yörüngede dolanan elektronun enerji düzeyini yansıttığı varsayılmıştır. Elektronun dolanabileceği en küçük çaplı yörünge (ya da bulunabileceği en düşük enerji düzeyi) $n = 1$ olarak gösterilir. Diğer yörüngeler $n = 1$ yörüngesinin tam katlarına karşılık gelir. Örneğin $n = 2$, $n = 3$, vb. Dışardan sisteme iletilen enerji sonucu bir elektron uyarılarak bir üst yörüngeye (bir üst enerji düzeyine) geçebilir. Uyarılmış elektron, başlangıç yörüngesine döndüğünde açığa çıkan enerji bir elektromagnetik dalga şeklinde yayınlanır. Bohr atom modeli buna göre elementlerin uyarana yanıt olarak verdiği ışık spektrumunu açıklayabilmektedir.

Şekil 2-1. Bohr Atom Modeli.

Bohr atom modeli, 1930'larda yerini Schrödinger ve Heisenberg' in geliştirdikleri, kuantum mekaniği kapsamındaki daha ayrıntılı bir modele

bırakmıştır. De Broglie'nin madde dalgaları kuramına dayanan bu modelde devinen elektron, elektromanyetik bir dalga olarak düşünülmüş, çekirdekten belirli uzaklıklarda bulunan elektron yörüngelerinin yerini ise elektronun çekirdeğin çevresinde bulunabilme olasılıkları gözönüne alınarak geliştirilen, üçboyutlu bir elektron bulutu almıştır. Bu bulutun özellikle yoğunlaştığı düzeyler Bohr modelinin $n = 1$, $n = 2$, $n = 3$ düzeylerine karşılık gelir (Şekil 2-2). Bu modelde, elektronun çekirdeğin çevresinde bulunduğu yer orbital (yörüngeç) terimiyle anlatılmıştır. Orbitallerdeki elektronların özellikleri kuantum sayıları ile belirlenmiştir.

Ana kuantum sayısı (n): Elektronun çekirdek çevresinde bulunma olasılığının en yüksek olduğu düzeyin çekirdekten olan uzaklığını gösterir. Bu, Bohr modelinin $n = 1$, $n = 2$, $n = 3$ yörüngelerinin (kabuklarının) karşılığı olup, elektronun enerji düzeyini yansıtır.

Açısal kuantum sayısı (l): Elektronun açısal momentini dolayısıyla sahip olduğu kinetik enerjiyi belirler. Elektronun enerjisi ile sınırlıdır.

Magnet kuantum sayısı (m): Çekirdek çevresinde dolanan yüklü bir parçacık olarak elektron, manyetik bir alan oluşturur. Magnet kuantum sayısı da bu alanın boyutlarını tanımlar.

Spin (dönme impulsu) kuantum sayısı (s): Yörüngecinde kendi eksenin- de dönerek dolanan elektronun çevresinde oluşan magnetik alanı anlatır. Elektron için buna göre yalnız iki dönüş yönü (spin kuantum sayısı) bulunur. Bunlar birbirine karşıt iki değer ($\pm 1/2$) ile gösterilir. Modele göre elektronların yörüngeçlerine dağılımı aşağıdaki kurallara bağlıdır:

- Bütün elektronlar erişebilecekleri en düşük enerji düzeyinde bulunur.

- Bir yörüngeçte, spin kuantum değeri ters olmak koşuluyla, yalnız iki elektron bulunur (Pauli Kuralı).
- Aynı enerji düzeyindeki bütün yörüngeçlere ilk olarak paralel spine sahip birer elektron dağılır (Hunt Kuralı).

Şekil 2-2. Kuanta kuramına göre atom modeli.

Bu kurallara örnek olarak periyodik sistemin ilk iki sırasındaki elementlerin atomlarının elektron dağılımı verilebilir. Bilindiğı gibi, periyodik sistemin ilk sırası iki elementten oluşur. Bu elementlerin

elektron kabukları ($n = 1$) Hidrojende bir, Helyumda ise ters spinli iki elektron içerir (Şekil 2-3).

Periyodik sistemin ikinci sırasında dış kabuk ($n = 2$) en çok 8 elektrondan oluşur. Dış kabukta bulunan elektronların dolandıkları yörüngeçler enerji düzeylerine göre iki sınıfa ayrılır:

- alçak enerji düzeyindeki **s** yörüngeci (bir adet), ve
- daha yüksek enerji düzeyindeki **p** yörüngeci (üç adet).

Elektronların bu yörüngeçlere dağılmaları yukarıdaki kurallara uygun olarak gerçekleşir. Önce alçak enerji düzeyindeki **s** yörüngeci iki ters spinli elektron ile dolar. Üst enerji düzeyindeki **p** yörüngeçlerine daha sonra sırasıyla paralel spinli birer elektron dağılır ve ters spinli birer elektronun da eklenmesiyle yörüngeçler dolar.

Şekil 2-3. Periyodik sistemde değerklik şeması.

2.1.2. Kimyasal bağlar ve moleküllerin oluşumu

2.1.2.1. Kimyasal değerlilik

İki ve daha çok sayıda atomun aralarında kurdukları kimyasal bağlar sonucu moleküller oluşur. Kimyasal bağ iki atomu (molekölü) birlikte tutan çekici güç olarak tanımlanabilir.

Moleküllerin oluşumunu sağlayan kovalent bağların kurulmasında özellikle dış kabuk elektronları belirleyici rol oynar. 1916 yılında Lewis tarafından ortaya atılan bir düşünceye göre, iki atom arasında kurulan kovalent bağ, He ya da Ne gibi soy (asal) gazlarda görülen, 2 ya da 8 elektron içerikli kararlı bir dış kabuk düzeni (konfigürasyonu) oluşturur. Ancak, Lewis'in bu düşüncesi kimyasal bağ gerçekleri ve elementlerin değerliliğini sınırlı olarak açıklayabilmektedir. Kuantum mekaniğinin öngördüğü modelde ise, kimyasal bağ, atomların dış kabuk yörüngeçlerindeki spin değerlerinin tamamlanma ilkesine dayanır. İki komşu atomun ters spin değerli elektrona sahip yörüngeçlerinin kesişmesi sonucu oluşan elektromagnetik çekim burada atomları birlikte tutan gücü oluşturur. Buna göre, kimyasal değerlilik bir elementin atomunun dış kabuğundaki tamamlanabilecek spin değerlerinin toplam sayısına eşittir. Bu düşünceden hareketle Şekil 2-3'de gösterilen elementlerin örneğinde kimyasal değerlilik (valenz) kavramı açıklanabilir:

İlk sıradaki Hidrojen atomunun tek değerliliği ve Helyum atomunun eylemsizliği (inertliği) yukarıda belirtilen ilkelerle kolayca anlaşılır.

Aynı nedenlerden periyodik sistemin birinci grubunun ikinci üyesi olan Li atomundan tek değerlilik beklenir (LiCl).

Buna karşılık, Be'un temsil ettiği ve değerliliğinin 2 olduğu bilinen ikinci grubunun elementlerinin eylemsiz olması beklenirdi. Fakat çok az enerji gerektiren bir uyarma sonucu s yörüngesindeki bir elektron bir p yörüngesine aktarıldığında beklenen 2 değerlilik ortaya çıkar (BeO).

Periyodik sistemin üçüncü grubunun üyelerinin üç değerliliği gene bir uyarma sonucu ortaya çıkmaktadır (B_2O_3). Ancak, bu grubun elementlerinin zaman zaman tek değerlilik de gösterdiği bilinmektedir (B_4C).

Karbonun temsilcisi olduğu grup genellikle bir uyarma sonucu oluşan dört değerliliği (örneğin: CO_2) ile tanınır. Ancak, özellikle grubun yüksek atom ağırlıklı üyelerinde iki değerlilik de görülür. İki değerlilik, CO örneğinden de bilindiği gibi, karbonda da gözlenir.

Azotun bulunduğu beşinci grupta, üç değerlilik ve, bir uyarma üzerine oluşan yeni bir dış kabuk ($n = 3$) sonucu, beş değerlilik olanaklıdır (NH_3 ve N_2O_5). Beş değerlilik için gerekli uyarma enerjisi oldukça yüksek olmakla birlikte bu, tepkime ile açığa çıkan enerji ile karşılanabilmektedir.

Oksijenin bulunduğu altıncı grupta, özellikle oksijen için geçerli iki değerliliğin yanı sıra, sülfür ve grubun daha alt sıralarındaki elementlerde (yine uyarma sonucu) dört ve altı değerlilik de bilinir (örneğin sülfürün oluşturduğu bileşikler: H_2S , SO_2 ve SO_3).

Yedinci grubun yani halojen elementlerin üyeleri ise, bir değerlilik ve ayrıca üç, beş, yedi değerlilik gösterirler (örneğin HCl , $HClO_2$, $HClO_3$ ve $HClO_4$).

Sekizinci grubun üyeleri eylemsizdir; tüm yörüngeçlerin dolu olmasından kaynaklanan kalımlı dış kabuk düzeni nedeniyle kimyasal bir tepkimeye girmezler.

2.1.2.2. Kimyasal bağ çeşitleri

Yukarıda anlatılan fiziksel ilkeler, elementlerin bağ kurmalarında geçerli kuralları belirler. Bağlar ise, atomdan moleküllerin ve moleküllerden ise canlı sistemlerin oluşmasında en belirleyici rolü oynar.

Kovalent bağlar: Yukarıda belirtildiği gibi, bu bağların oluşmasında atomların dış kabuklarındaki spin değerleri tamamlanmamış değerlik elektronları rol oynar. İki atomun birbirine yaklaşması ile iki yörüngecin kesişmesi olanak kazanır. Eğer elektron spinleri ters değerli ise, bu yörüngeçlerin kaynaşması ile meydana gelen elektromagnetik çekim, iki atomun bir arada tutulmasını ve dolayısıyla kovalent bağın oluşmasını sağlar (Şekil 2-4). Bu bağlarda değerlik elektronları atomlar arasında eşit oranda paylaşılır. Kovalent bağlar, iki atom arasında oluşan en güçlü bağlardır.

kovalent bağ polar kovalent bağ iyonik bağ

Şekil 2-4. Kovalent ve iyonik bağlarda elektronların dağılımındaki değişme.

İyonik bağlar: Kovalent bağların özel bir şeklini oluşturur. Kovalent bağı oluşturan atomlardan birinin elektronegatif nitelikte olması durumunda görülür. Bu tip bağlarda değerliliği belirleyen elektron çifti elektronegatif atoma kaydığı için asimetrik bir elektron paylaşımı ortaya çıkar. Örneğin, NaCl gibi bir tuz molekülünde böyle bir elektron çifti elektronegatif klor atomunun üzerinde bulunur. Bunun sonucu ortaya çıkan bağ elektronegatif klor iyonuyla, elektropozitif sodyum iyonunun arasındaki elektrostatik çekim olarak düşünülebilir. İyonik bağın kuvveti buna göre Coulomb yasasına tabidir:

$$F = k \frac{q_1 \cdot q_2}{r^2} \quad (2-1)$$

F= Vakum altında iyonik bağın kuvveti (Newton)

k= Elektrostatik çekim dursayısı (kcal . C⁻² . m)

q₁ ve q₂= Etkileşen yükler (C Coulomb)

r = Etkileşen yükler arası uzaklık (m)

Tuzun suda çözünmesi sonucu dipolar su molekülleriyle etkileşerek ayrılan bu iyonlar arasındaki elektrostatik çekim kristal yapıdakine kıyasla çok daha düşüktür. Suyun yükler arasındaki etkileşimi perdeleme etkisi dielektrik dursayısı (ε) ile ifade edilir. Bu işlevin denkleme (2-1) katılmasıyla Coulomb eşitliğinin çözümlerinde geçerli türevi elde edilir:

$$F = k \frac{q_1 \cdot q_2}{\epsilon r^2} \quad (2-2)$$

İyonik bağlar gibi salt yük esaslı etkileşimler, özel bir yönelim göstermez.

Koordinasyon bağları: Bu tip bağlarda elektron çifti, bağı kuran atomlar tarafından verilir. Elektron vericisi olarak davranan F, O, N, vb. atomların dış kabuklarındaki serbest elektron çiftleriyle, alıcı atomların

boş yörüngeçleri doldurulur. Koordinasyon bağlarının özgün örneklerini, metal atomlarının (özellikle geçiş metallerinin iyonlarının) oluşturduğu kompleks yapılarda görmek olanaklıdır. Örneğin, demirin iki değerlikli iyonu (Fe^{2+}) bu tür kompleks yapılar oluşturur (Şekil 2-5). Şekilde görüldüğü gibi H_2O zayıf bir ligant olarak Fe^{2+} 'nin elektron konfigürasyonunu etkilemez. CN^- ise sahip olduğu güçlü bir elektrik alanı nedeniyle Fe^{2+} elektronlarını 3d yörüngeçlerinde çift oluşturacak biçimde yeniden düzenlenmesine yol açar. Hemoglobin örneğinde görüleceği gibi metal iyonlarının oluşturduğu kompleksler önemli biyolojik işlevlere sahiptir.

London-van der Waals (ya da Dipol-Dipol) bağı: Yukarıda iyonik bağ çeşidinde değişik elektrik yüklü iki iyonu elektrostatik çekimin bir arada tutarak bir tuz molekülünü oluşturduğunu gördük. Buna benzer bir elektrostatik çekim, geçici olarak karşıt elektrik yüklerine bürünen iki molekül arasında da görülür. Bu tip bir etkileşim için iyonik bağlarda olduğu gibi Coulomb yasası geçerlidir:

$$U = k \frac{q_1 \cdot q_2}{\epsilon \cdot r^n} \quad (2-3)$$

U = Etkileşim kuvveti (kcal/m^{n-1})

r = Etkileşen yükler arası uzaklık (m).

(Etkileşime katılan grupların niteliklerine göre, n 1 ile 6 arasında bir değer taşıyabilir.)

Şekil 2-5. Demir iyonunun oluşturduğu kompleks yapı örnekleri.

London-van der Waals (ya da Dipol-Dipol) Bağı olarak adlandırılan bu bağı oluşabilmesi için, bu moleküllerin dipolar bir niteliğe yani bir bölgelerinde sınırlı bir elektropozitif (q_1) ve diğer bir bölgelerinde ise sınırlı bir elektronegatif (q_2) yüke sahip olmaları gerekir. Bu elektriksel kutuplaşma geçici nitelikli olup, komşu moleküller arasındaki etkileşimlerden doğar. Bu etkileşimlere katılan grupların niteliğine göre

etkileşimlerin türü, yönelimi, gücün uzaklıkla olan ters orantılı bağlantısının boyutu belirlenir (Şekil 2-6).

Şekil 2-6. İki yakın molekül ya da atom arasındaki kovalent olmayan etkileşim enerjisi.

Dipol-dipol etkileşimlerine dayanan van der Waals bağları, iyonik bağa oranla yakın uzaklıklarda (r^{-4} - r^{-6} değerleriyle orantılı olarak) çok etkili olabilmektedir. Dolayısıyla bu tip bağlar, özellikle hücre içinin yoğun ortamında, makromoleküllerin hücre altyapılarıyla etkileşmelerinde, örneğin ribozom üzerinde gerçekleşen protein biyosentezinde, DNA üzerinde RNA moleküllerinin oluşumunda ya da enzimatik kataliz sırasında büyük önem kazanır. Düzlemsel (aromatik)

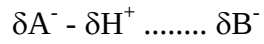
moleküllerin arasında oluşan ve etkileri r^{-6} ile orantılı olarak değişen dispersiyon güçleri ise bu moleküllerin üstüste tabakalandığı yapıları, örneğin DNA çift sarmal yapısını, kalımlı kılmada büyük rol oynar. Ancak, etkileşim gücü için önemli bir altsınır bulunmaktadır. Molekül ya da atomların etkileşimlerinin en kalımlı olduğu bir uzaklığın (r_0) ötesinde çekim gücü azalır. Dış elektron yörüngeçleri kesişmeye başlayacak ölçüde yakınlaştıklarında karşılıklı olarak bir itim gücü oluşur. Daha ileri bir yakınlaşmaya koşut olarak itim gücü r^{-12} ile orantılı artar. Bu tür etkileşimlerde erişilebilecek en küçük uzaklık, etkileşen molekül ya da atomların van der Waals yarı çaplarının (R) toplamına eşittir. (Şekil 2-6). Atom ve moleküllerin van der Waals yarı çapları 0,1-0,2 nm arasında değişir (Tablo 2-1).

Hidrojen bağları: Hidrojen bağı, dipol-dipol bağının özel bir şeklini oluşturur. Hidrojen atomu, kovalent olarak elektronegatif bir atoma (örneğin oksijen, sülfür ya da nitrojene) bağlandığında, ortaya çıkan A-H yapısının elektriksel olarak kalıcı biçimde kutuplaştığı görülür. Hidrojen atomu (H) sınırlı bir pozitif yük kazanarak, çevresini de kutuplaştırıcı biçimde etkiler. Eğer çevrede sınırlı bir elektronegatif yüke sahip bir atom (B) bulunuyorsa, o zaman H ve B arasında bir etkileşme olanak kazanır.

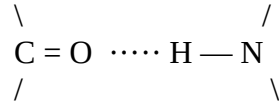
Atom ve Gruplar	R (nm)
H	0,12
O	0,14
N	0,15
C	0,17
S	0,18
P	0,19
– OH	0,14
– NH ₂	0,15
– CH ₂	0,20
– CH ₃	0,20
Aromatik halkalar	0,17

Tablo 2-1. Bazı atom ve atom gruplarının van der Waals yarı çapları.

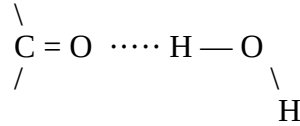
Bu etkileşim iyonik bağdakinin aksine özgün bir yönelim gösterir. Ortaya çıkan ve hidrojen bağı olarak tanınan bu bağı kalımlılığı B molekülünün taşıdığı elektronegatif yükle orantılıdır. Hidrojen bağı genellikle noktalı bir çizgiyle gösterilir:



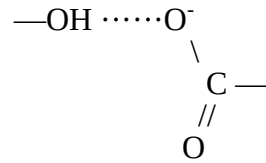
Şekil 2-7’de hidrojen bağlarının çeşitli örnekleri görülmektedir.



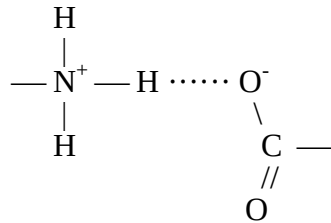
Bir karbonil grubu ile bir imino grubu arasında (iki peptit grubu arasında)



Bir karbonil grubu ile su molekülünün bir hidrojen atomu arasında



Bir hidroksil grubu ile yüklü bir karboksil grubu arasında



Yüklü amino ve karboksil grupları arasında

Şekil 2-7. Hidrojen bağlarına çeşitli örnekler.

Hidrojen bağlarının enerjisi ($3-7 \text{ kcal.mol}^{-1}$), van der Waals bağlarının ortalama enerjisine (1 kcal.mol^{-1}) oranla daha yüksektir.

Hidrojen bağlarını oluşturan atomların özgün biçimde birbirine yönelik olması, bu oldukça yüksek bağ enerjisinin bir nedenidir. Buna karşılık kovalent bağ enerjisine (genellikle 50-100 kcal.mol⁻¹) oranla hidrojen bağının oldukça zayıf olduğu görülür.

Hidrofobik etkileşimler: Metan (CH₄) gibi hidrokarbon molekülleri, bağ oluşumuna katılan elektronlarının eşit olarak hidrojen ve karbon atomları arasında paylaşılması nedeniyle, elektriksel bir kutuplaşma göstermez. Böyle moleküller, polar su molekülleriyle hidrojen bağları kuramadıklarından, su içinde çözünme yeteneğinden yoksundur. Su evresinden kaçıp aralarında kümelenme eğilimi gösterir (örneğin misellerin iç bölümünde) (Şekil 2-8). Böyle sudan kaçan (hidrofobik) gruplar arasındaki çekici güce **hidrofobik bağ** adı verilir. Hidrofobik bağların esasını apolar gruplar arasında da oluşabilen van der Waals güçleri oluşturur. Hidrofobik bağların gücü (3-4 kcal.mol⁻¹), van der Waals bağlarının yanısıra bu grupların, su evresinden polar su molekülleri tarafından dışlanmasıyla kaynaklanır.

Tüm değinilen kimyasal bağ çeşitleri, Tablo 2-2’de topluca, güçleri (oluşum enerjileri) açısından, karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Ayrıca, Şekil 2-9’da kovalent olmayan etkileşim özellikleri toplu olarak verilmiştir.

Kovalent bağların aksine, oluşumları düşük miktarda enerji salınımıyla gerçekleşen, kolayca yeniden kırılabilen ve dolayısıyla çok

Şekil 2-8. Misel oluşumu.

kısa ömürlü (10^{-12} s) olan iyonik bağlar, van der Waals ve hidrojen bağları ile hidrofobik ilişkiler zayıf bağlar olarak gösterilir. Bu bağlar, biyomoleküllerin suyun polar ortamında özgün üçboyutlu yapılarını kazanmalarında önemli rol oynar. Ayrıca, biyolojik tepkimelerin ön aşamaları, örneğin enzimlerin tepkimeye uğrattıkları substrat molekülleriyle etkileşimleri, bu tip zayıf bağlarla gerçekleşir. Böylece, biyoloji tepkimelerin özgünlüğünün yanısıra, yüksek hızı da güvenceye alınır.

Çeşitleri	Bağ gücü* (kcal.mol ⁻¹)
Kovalent Bağ	50-100
İyonik Bağ	5 (su ortamında) ≥ 100 (kristal yapıda)
van der Waals Bağı	1-2
Hidrojen Bağı	3-7
Hidrofobik İlişkiler	3-4

*) Oluşumları sırasında açığa çıkan enerji (oluşum enerjisi)

Tablo 2-2. Kimyasal bağların bağ güçleri.

Şekil 2-9. Kovalent olmayan etkileşim tipleri.

3. Radyoaktiflik ve ısı biyofiziği

3.1. Atom çekirdeği

Atom çekirdeğinin içinde iki çeşit ana parçacık bulunur: Artı yüklü olan protonlar ve yüksüz nötronlar. Protonlar, elektron kütlelerinin ($=1,672648 \times 10^{-31}$ kg) 1840 katına eşit bir kütleye ($=1.6724 \times 10^{-24}$ g) sahiptir. Nötronların kütlesi ise proton kütlelerinden biraz daha fazladır ($=1.6747 \times 10^{-24}$ g). Buna göre, atom kütlesi çok büyük oranda (neredeyse bütünüyle) çekirdekte toplanmıştır. Çekirdeğin kütlesi, içerdiği proton ve nötronların kütlelerinin toplamına eşittir. Proton ve nötronlar, **nükleon** olarak da adlandırılır. Bir atomun protonlarının sayısı, yörüngeçlerde bulunan elektronların sayısına eşit olup, aynı zamanda atom sayısını belirler. Nötronlarla protonların toplam sayısı ise atom kütle sayısını belirler. Geleneksel olarak atom sayısı (Z) bir elementin simgesinin sol alt, kütle sayısı (A) ise sol üst köşesine yazılır.



Proton ve nötronların sayıları her zaman eşit değildir. Ayrıca, bir elementin atomlarının kütle sayısı, çekirdeklerin içerdiği değişik sayıda nötron nedeniyle değişebilir. Proton sayıları (ya da atom sayıları) aynı, ancak kütle sayıları farklı atomlar **izotop** olarak adlandırılır. Örneğin, en basit element olan hidrojenin farklı nötron sayılarından kaynaklanan üç değişik çekirdek yapısı (izotopu) bulunur (Tablo 3-1).

İçerdiği farklı nötron sayısına bağlı olarak çekirdeğin enerji içeriği de değişir. Protonlara oranla daha az ya da fazla sayıda nötron içeren çekirdekler kalımsızdır. Kendiliklerinden parçalanarak başka çekirdek türlerine dönüşme olasılığı çok yüksektir. Parçalama sırasında ışın olarak salınan enerji nedeniyle bu tür izotoplar **radyoizotop**, kalımsız durumları ise **radyoaktiflik** olarak adlandırılır.

¹	
H Hidrojen :	1 proton, 0 nötron, kütle sayısı 1,
¹	
²	
H Döteryum :	1 proton, 1 nötron, kütle sayısı 2,
¹	
³	
H Trisyum :	1 proton, 2 nötron, kütle sayısı 3.
¹	

Tablo 3-1. Hidrojenin izotopları.

3.2. Radyoaktifliğin bulunuşu

Radyoaktifliğin bulunuşu 1896 yılında Fransız bilgini Henry Becquerel (1852-1908)'in, Röntgen'in birkaç ay öncesinde keşfettiği X-ışınları üzerinde yaptığı deneyler sırasında olmuştur. X-ışınları, camdan yapılmış elektronik lambalardan çıktıkları için, Becquerel, onların belki camın küçük miktarda gösterdiği **fosforesansla** ilgili

olabileceğini düşünmüştür (Şekil 3-1). Bazı maddelerin ışık soğurup yavaş yavaş yeniden yayınlama özelliklerine dayanan fosforesansın, o dönemde X-ışınları gibi anlaşılmayan bir olgu olması, Becquerel'in bu düşüncesinde etkili olmuştur.

Becquerel, fosforesans etkisi çok güçlü olan potasyum-uranyum sülfat ($KUSO_4$) kristallerini ışık geçirmeyen kağıda sarılı bir fotoğraf plağı üzerine yerleştirmiştir. Güneş ışığı etkisiyle kristallerden plağı karartabilen ışınların çıkıp çıkmadığını öğrenmeyi amaçlayan Becquerel, havanın bir iki gün kapalı kalması üzerine, laboratuvarının ışıklarının da yeterli olabileceği düşüncesiyle filmi banyo edince, kristalin şeklinde kararmış bir görüntü bulmuştur. Deney, tam karanlıkta yinelenildiğinde, aynı sonucu verince Becquerel, yeni bir ışın çeşidini bulmuş olduğunu anlamıştır.

Şekil 3-1. X ışınının oluşumu:

A) Röntgen'e göre,

B) Becquerel'in sınamak istediği varsayımına göre.

Sarılı filmin karartılmasının sıcaklıktan bağımsız ve uranyum miktarıyla doğru orantılı olduğu, kısa zamanda anlaşılmıştır. Ayrıca, 1898 yılında, yine Paris'te çalışan Polonyalı araştırmacı Marie Curie

(1867-1934), uranyum cevherinden daha güçlü ışın yayınlayan, radyum ve polonyum elementlerini kimyasal yöntemlerle saflaştırmıştır.

3.3. Çekirdek kuramı

İzotopların kalımlı, radyoizotopların ise kalımsız çekirdeklerinin proton ve nötron sayıları gözden geçirildiğinde, birkaç kural ortaya çıkar.

Periyodik cetveldeki atom kütle sayılarından proton (atom) sayıları çıkarıldığında, doğada bulunan, çoğu kalımlı izotopların nötron sayıları elde edilir.

Örnek olarak hafif elementlerden bazıları ele alındığında, kalımlı çekirdeklerde nötron sayılarının proton sayısına ya eşit ya da bir olduğu görülür (Tablo 3-2).

Örnek ağır elementlerden seçilirse, kalımlı izotoplardaki nötron sayılarının proton sayılarından çok daha fazla oldukları görülür (Tablo 3-3).

Çekirdek kalımlılığının incelenmesi için periyodik cetveldен daha elverişli bir gösterge olarak **nüklitler cetveli** kullanılır. **Nüklit**, eşit proton ve eşit nötron sayılarına sahip atomların (aynı tür izotopların) oluşturduğu kümedir. Nüklitler cetvelinde kalımlı elementlerde nötron sayısındaki değişiklikler atom sayılarının bir işlevi olarak gösterildiğinde,

Element	Atom ağırlığı	Proton sayısı	Hesaplanan Nötron sayısı
H	1.0	1	1
He	4.0	2	2
Li	6.9	3	3 ya da 4
Be	9.0	4	5
B	10.0	5	5 ya da 6
C	12.0	6	6
N	14.0	7	7
O	16.0	8	8
F	19.0	9	10
Ne	20.2	10	10 ya da 11

Tablo 3-2. Bazı hafif elementlerin proton ve nötron sayıları.

proton ve nötron sayıları tek ve birbirlerine eşit olan hafif nükleonların dışındaki kalımlı nükleonların genelde nükleon sayılarının çift olduğu görülür. Ayrıca, proton ya da nötron sayılarının belirli çift sayılara eşit olmaları, nüklide özel bir kalımlılık sağlar. Bu sihirli sayılar 2,8,50,82 ve 126'dır. Bunun ötesinde, kalımlı çekirdeklerde nötron sayıları proton sayılarının işlevi olarak gösterildiğinde, bu nükleonlar arasında özel oranların korunduğu bir eğri ortaya çıkar (Şekil 3-2). Bu eğriye göre, ağır elementlerin kalımlı izotoplarında nötron/proton oranları aşamalı olarak 1/1 oranının üzerindeki belirli kesir değerlerden geçer.

Element	Atom ağırlığı	Proton sayısı	Hesaplanan Nötron sayısı
Au	197.0	79	118
Hg	200.6	80	120 ya da 121
Tl	204.4	81	123 ya da 124
Pb	207.2	82	125 ya da 126
Bi	209.0	83	126

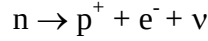
Tablo 3-3. Bazı ağır elementlerin proton ve nötron sayıları.

Şekil 3-2. Nüklitler cetveli.

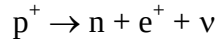
3.4. Radyoaktif parçalanma ve ışınlar

Kalımlılık eğrisinin değerlerinden sapan ve çok sayıda (ya da çok az sayıda) nötron içeren nüklitler, kalımsız ve radyoaktif nitelik gösterir.

Eğer çekirdekte çok sayıda nötron bulunursa, bir nötronun protona dönüşümü sonucu eksi bir yük (bir elektron) salınır:



Eğer çekirdekte çok az sayıda nötron bulunuyorsa, tersine, bir proton, artı yüklü bir pozitronun salınımıyla, bir nötrona dönüşür:



ν (antinötrino), ν (nötrino) bu tip tepkimelerde açığa çıkan çok küçük kütleli parçacıklardır. Atom çekirdeğinin böyle bir elektron ya da pozitronun salınımıyla geçirdiği dönüşüm **β -parçalanma**, açığa çıkan ışın da **β -ışını** olarak adlandırılır. Ayrıca çok büyük atomların parçalanması sırasında helyum çekirdekleri (iki proton ve iki nötron) **α -ışını** olarak açığa çıkar.

Çekirdek parçalanması sırasında açığa çıkabilecek üçüncü tip ışın, çok kısa dalga boylu, (10^{-4} - $10^{-2}\text{\AA}$), çok yüksek enerjili bir elektromanyetik dalga olan **γ -ışınıdır**.

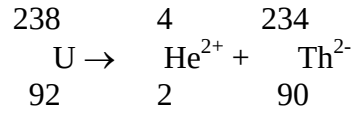
Yukarıdaki tanımlardan anlaşılacağı gibi, α ve β ışınları, γ -ışınlarından farklı olarak, elektrik yüklü parçacık akımlarıdır. α -ışınlarındaki yük artı iki ($2+$), β ışınlarındaki ise eksi ya da artı bir ($1\pm$) dir.

α ışınları (ya da helyum çekirdekleri) büyük kütleleriyle atom düzeyinde top mermisi etkisi gösterebilirler. α ışınlarının bu etkilerine dayalı olarak hafif elementlerin çekirdeklerinden proton ışınlarını açığa çıkarmaları ilk kez 1919 yılında gözlenmiştir. 1932 yılında α ışınlarının başka elementlerden ise nötron parçacıklarını kopartabildiği görülmüştür. Tablo 3-4’de doğal ve yapay nükleer ışınlar topluca gösterilmektedir. Radyoaktif parçalanma reaksiyonlarına örnekler ise Tablo 3-5’te verilmiştir.

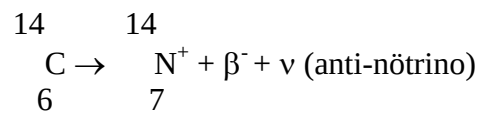
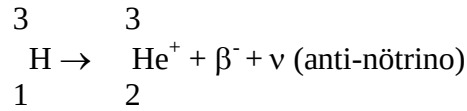
Niteliği	Türü	Simgesi	Bileşimi	Elektrik yükü	Kütlesi (g)
Doğal ışınlar	Alfa	α	Helyum iyonları ($2n+2p$)	+2	$7,2 \times 10^{-24}$
Doğal ışınlar	Beta	β	Elektronlar ya da pozitronlar	± 1	9×10^{-28}
Doğal ışınlar	Gama	γ	Elektromanyetik ışın (fotonlar)	0	0
Doğal ışınlar	Nötrino	ν	Nötrinolar	0	10^{-29}
Yapay ışınlar	Nötron	n	Nötronlar	0	$1,8 \times 10^{-24}$
Yapay ışınlar	Proton	p	Protonlar	+1	$1,8 \times 10^{-24}$
Yapay ışınlar	Döteron	d	Döteryum iyonları ($n+p$)	+1	$3,6 \times 10^{-24}$

Tablo 3-4. Nükleer ışınların özellikleri.

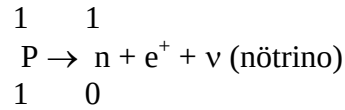
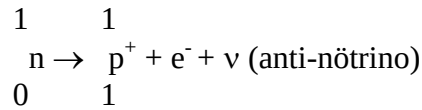
α -Parçalanma



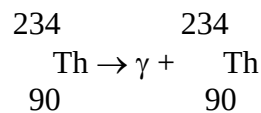
β Parçalanma



yukarıdaki üç örneğe esas olan reaksiyon:



γ Parçalanma



Tablo 3-5. Radyoaktif parçalanma reaksiyonlarına bazı örnekler.

Nötron ve proton yaklaşık eşit kütleyle sahip olduklarından, β ışınının salınmasıyla gerçekleşen bir parçalanma sonunda element kütlelerinde (ve kütle sayısında) önemli bir değişiklik ortaya çıkmaz. γ ışınının salınması sonucu ise kütle sayısı ve atom sayısında bir değişiklik ortaya çıkmadığı gibi elementin bir diğerine dönüşümü de sözkonusu değildir. Burada yalnızca çekirdek düzenindeki olası bir değişiklikten söz edilebilir. Çıkan ışınların enerjisi reaksiyondaki nüklitlerin enerji farkına eşittir.

Alfa ışınları, belirli bir izotoptan belirli bir iki enerji ile yayınlanır. Uranyum-238, Toryum-234 çekirdeğine dönüşürken, 4,18 MeV olan fazla enerjisinin tümünü % 78 olasılıkla, ya da fazla enerjisinin 4,13 MeV'luk bölümünü % 22 olasılıkla α ışınına verir (Şekil 3-3). α partikülü ikinci duruma göre daha yavaş fırlatılırsa, yeni oluşmuş ^{234}Th çekirdeği, en kararlı haline geçmek üzere ayrıca 0,05 MeV'luk bir γ ışını da yayınlar.

Şekil 3-3. Uranyum 238'den çıkan ışın.

Beta radyasyonuna gelince, bazen benzer bir durum sözkonusu olabilir. Şekil 3-4'de ^{131}I iyot'in oldukça kompleks radyasyon şeması gösterilmektedir. Zaten gama ışını yaymadan bile her beta yayınlayıcısının radyasyonu karışıktır. Beta yayınlayıcıları, elektronlardan başka antinötrinolar da çıkarırlar. Bu tanecikler, kütleleri küçük olduğu halde, parçalanan çekirdeğin fazla enerjisinden büyük bir miktar taşıyabilirler.

Yayınlanan enerjinin toplamı sabit, her parçalanan çekirdek için aynı olan bir miktardır. Ancak, çıkan beta elektronu ile antinötrino arasındaki enerji dağılımı şansa bağlıdır. Enerjinin tümü bazen yalnız biriyle, bazen de ikisi arasında paylaşılmış olarak çıkar.

Şekil 3-4. İyot-131'den çıkan ışın.

Beta ışınının enerjisi, böylece sıfırdan başlayıp $E_{\max}$ denen maksimum ışın enerjisine değin uzanır. Bu dağılım eğrisinin şekli basit olan her β^- yayınlayıcısı için aynıdır (Şekil 3-5). Uygulamada saptanan ortalama β ışını enerjisi (E_{av}) istatistik hesaplarda,

$$E_{av} \cong \frac{1}{3} E_{\max} \quad (3-1)$$

eşitliği ile gösterilebilir.

Gama ışınları görüldüğü gibi, alfa ya da beta ışınından geri kalmış enerjinin açığa çıkması sonucu oluşur. Enerjileri ve enerjilerine doğrudan doğruya bağlı olan dalga boyları, bu nedenle belirli bir izotop için belirli bir kaç değeri gösterir.

Şekil 3-5. Ortalama enerji değerinin saptanması.

3.5. Radyoizotopların özellikleri

3.5.1. Yarılanma süresi (Yarı ömür)

Parçalanma sıklığı kavramı, fizikte bir devrim olarak ortaya çıkmıştır. Kvant kuramına göre açıklanan parçalanma reaksiyonlarının eski fizik kuramlarına uymayan en açık özelliği, meydana gelip gelmeyeceklerinin belirsizliğidir. Radyoaktif bir atomun ne zaman parçalanacağını önceden kestirmek mümkün değildir. Parçalanma sonucu atomun hangi yolu izleyeceği de ayrıca belirsizdir. Fizikçiler, kesin bilgi yerine, yalnızca olasılıklardan sözdebilirler. Örneğin, trityum için bir yıl süresindeki parçalanma olasılığı % 7 olarak hesaplanır.

Olasılıktan söz edildiğine göre, bir tek atomu değil, bir popülasyonu gözlemek gerekir. Gözlenen popülasyondaki birey sayısı istatistiğin kurallarına göre yeterliyse, popülasyondaki olay yüzdesi bir tek bireyin olay olasılığı olarak yorumlanabilir (Şekil 3-6).

Bir radyoizotop örneğinin içerdiği atom çekirdeklerinin yarısının radyoaktif parçalanımı için geçen süre yarı ömür olarak tanımlanır. Bu süre radyoizotopa göre saniyenin kesiri ile binlerce yıl arasında değişebilir. Radyoaktif parçalanma sıklığına bağımlı olarak gerçekleşen bu dönüşüm, radyoaktif nüklidin atomlarının başlıca bir özelliğini oluşturur. Radyoaktif nüklidin herhangi bir atomu için bu parçalanmanın ne zaman olacağını kestirmek sözkonusu olmadığından (bu bir saniye içinde ya da bin yıl sonra cereyan edebilir) dönüşüm ya da parçalanma hızı radyoaktif atomlar için geçerli bir ortalama parçalanma olasılığı ya da katsayısı (λ) ile anlatılır: Belirli bir zaman kesiti içinde (t), λ değerine bağımlı olarak bir radyoaktif elementin başlangıçtaki atomlarının sayısındaki (N_0) azalma sonucu (N) sayıda atom kalacaktır:

$$\ln \frac{N}{N_0} = \ln N - \ln N_0 = -\lambda \cdot t, \quad (3-2)$$

ya da,

$$N = N_0 \cdot e^{-\lambda t} \quad (3-3)$$

Yarılma süresi ile başlangıçtaki atom sayısının yarı değere indiği süre tanımlandığında bu eşitlik,

Şekil 3-6. Bir tek radyoaktif atomun önceden ancak parçalanma olasılığı bilinebilir .

(A) Deney: İstatistik bakımından yeterli büyük bir popülasyon gözlenir.

(B) Yorum: Tek bir atomun parçalanma olasılığı.

$$N = \frac{N_0}{2} = N_0 \cdot e^{-\lambda t_{1/2}} \quad (3-4)$$

olacaktır. İki yanından N_0 'ların çıkarılması ve logaritmasının alınması ile eşitlik λ ile $t_{1/2}$ arasındaki bağıntıyı anlatan yalın bir şekle indirgenebilir:

$$\ln \frac{1}{2} = -\lambda \cdot t_{1/2} \quad (3-5)$$

$$\ln 2 = \lambda \cdot t_{1/2} \quad (3-6)$$

$$0,693 = \lambda \cdot t_{1/2} \quad (3-7)$$

$$\lambda = \frac{0,693}{t_{1/2}} \quad (3-8)$$

Yukarıdaki eşitliklere göre, radyoaktif bir örnek içinde bulunan radyoizotopun sayısı azaldıkça, aktifliği (bkz.aşağıda) orantılı olarak azalacaktır. Şekil 3-7'-de 1 mikromol karbon-14'ün azalış eğrisi, hem normal, hem de yarı-logaritmik- olarak gösterilmektedir. Eğrinin şekli, radyoizotopların aktifliğinin azalması açısından genel geçerliliğe sahiptir.

Şekil 3-7. Bir mikromol (6×10^{17}) Karbon-14 (^{14}C) atomunda ve aktifliğinde zamana baēlı azalma.

Bozunum eğrisi denen bu çeşit grafiēe deēişik fen bilim dallarını ilgilendiren birçok konuda ayrıca rastlanır.

Şekil 3-7’de işaretlenen $t_{1/2}$ karbon-14’ün yarılanma süresi yani ^{14}C atomlarının sayısının yarı yarıya inmesi için gerekli olan süredir. Parçalanma olasılığı (λ) ne kadar büyükse, $t_{1/2}$ o kadar kısa olur:

$$t_{1/2} = 0,693/\lambda \quad (3-9)$$

Karbon-14 (^{14}C) için $\lambda = 1,2 \times 10^{-4} \text{ yıl}^{-1}$ olduğuna göre,

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{1,2 \times 10^{-4}} \text{ yıl} = 5800 \text{ yıl.}$$

Fiziksel yarı ömrün yanında biyolojik yarı ömür de tanımlanır. **Biyolojik yarı ömür**, organizmaya verilen bir radyoaktif maddenin yarısının dışarı atılması için geçen süredir. Bu iki tanımın birleştirilmesi ile **etkin (efektif) yarı ömür** (t_{et}) tanımlanır.

$$t_{et} = \frac{t_F \cdot t_B}{t_F + t_B} \quad (3-10)$$

Burada t_F : fiziksel yarı ömür, t_B : biyolojik yarı ömür olarak tanımlanmaktadır.

3.5.2. Radyoaktiflik

Radyonüklitlerin tanımı için radyoaktiflik terimi, zaman kesitinde (dt) gerçekleşen parçalanma sayısı (dN), kullanılır.

$$A = \frac{dN}{dt} . \quad (3-11)$$

Radyoaktiflik birimi olarak kabul edilen Curie (Ci), 1 g Radyum'da bir saniyede parçalanan çekirdek sayısı olarak tanımlanır:

$$Ci = 3,7 \times 10^{10} s^{-1} \text{ (saniyede } 3,7 \times 10^{10} \text{ parçalanma).}$$

Günümüzde uluslararası kabul edilen birim sisteminde SI (Système International d'Unités) Curie (Ci) yerine Becquerel (Bq) kullanımı da yaygınlaşmaktadır.

$$1Ci = 3,7 \times 10^{10} Bq = 37 GBq$$

Radyoizotoplarla çalışmada radyoaktiflik oldukça sık olarak dakikada parçalanma ("desintegration per minute", kısaca "dpm") terimi ile anlatılır.

$$\begin{aligned} 1 Ci &= 3,7 \times 10^{10} \times 60 \text{ dak}^{-1} \\ &= 2,22 \times 10^{12} \text{ dak}^{-1} \\ &= 2,22 \times 10^{12} \text{ dpm} \end{aligned}$$

Özgün aktiflik (spesifik aktiflik) ile ise kütle birimi, örneğin mol, başına düşen radyoaktiflik (Ci) anlaşılır:

$$\text{Özgün aktiflik} = \frac{A}{m} \left(\frac{\text{Ci}}{\text{mol}} \right) \quad (3-12)$$

Özgün aktiflik değeri, bir radyoizotopun ya da bir radyoizotopla işaretli molekülün, uygulandığı denek içinde katıldığı oluşumlara, yıkımlara ya da iletisini etkileyen mekanizmaları sayısallaştırma olanağını verir.

3.5.3. Radyoaktif ışınların madde ile etkileşimi (girginliği ve iyonlaştırıcı etkinliği)

Radyoaktif ışınlar, karşılaştıkları moleküllerin elektronlarını yörüngeçlerinden fırlatacak enerjiye sahiptir. Elektronu fırlatılmış molekül, pozitif yüklü iyonla dönüşüğü için bu olaya **iyonlaşma**, onu oluşturan ışınlara da **iyonlayıcı ışınlar** denir. Radyoaktif ışınların enerji düzeyleri ve ayrıca nitelikleri (parçacık ya da elektromagnetik dalga niteliğinde olup olmamaları) onların maddeyle etkileşim biçimini, girginlik ve iyonlaştırıcı etkinliğini belirler.

Elektromagnetik dalga niteliğindeki γ -ışınları maddenin atomlarıyla etkileşiminde üç değişik yol izleyebilir. Düşük enerjili ($< 0,5 \text{ MeV}$) γ -ışınının tüm enerjisinin bir elektron tarafından emilmesi ve bunun sonucu uyarılan elektronun yörüngecinden fırlatılması **fotoelektrik** olaya yol açar. Daha yüksek ($0,5 \text{ MeV}$ - 10 MeV) enerjili γ -ışınlarının elektronlarla çarpışması elektronların yörüngeçlerinden

sökülerek fırlatılmasına ve enerjisinin bir bölümünü yitirmiş ışının da dalga boyu artarak yolundan sapmasına neden olur (“**Compton olayı**”). **Çift oluşum** olayında ise, atom çekirdeğine giren yüksek enerjili γ -ışınının emilimi, çekirdekten bir elektron ve bir pozitronunun saçılmasına yol açar. Elektron, çevrede β -ışınlarına özgü değişikliklere neden olur. Pozitronun bir elektronla çarpışması sonucu ise bu iki zıt yüklü partikül yok olur ve buna koşut olarak iki γ -ışını salınır (Şekil 3-8).

Bu olayların hiçbirisinin gerçekleşmemesi ve γ -ışınının enerjisini yitirmeden maddenin içinden geçip çıkması sözkonusu diğer bir olasılıktır.

Kütlesel ve artı yüklü α -ışınları atomların içinden geçerken doğrusal bir yol izler. Yolları üzerinde çarpıştıkları elektronları yörüngeçlerinden koparak iyonlaşmaya yol açan α -parçacıkları her çarpışma sonucu enerjilerinden bir bölümünü yitirir. Bir parçacığın iyonlaştırıcı etkinliği parçacığın yüküne, kütlesine ve başlangıçtaki enerjisine doğru ve hızına ters orantılıdır. Kütlelerine bağımlı olarak madde içinde alçak bir hızla geçen ve yollarından saptırılmayan α -parçacıklarının elektronlarla çarpışma (ve buna bağımlı olarak ta enerjilerini yitirerek, durma) olasılığı çok yüksektir. Buna göre, α -ışınları girginlikleri düşük, iyonlaştırıcı gücü yüksek radyoaktif ışınlar olarak tanımlanabilir.

β -parçacıklarının atomlarla etkileşimi sırasında da, α -ışınlarında olduğu gibi, madde içinde iyonlaşmalar meydana gelir. Enerjisini çarpışmalar sonucu gittikçe tüketen β -ışınları sonunda madde tarafından soğurulur. Bir elektronla aynı kütleye sahip olan β -parçacığının merkezi

Şekil 3-8. γ -ışınlarının madde ile etkileşimi.

bir çarpışma sonucu tüm kinetik enerjisini çarptığı elektrona aktarıp onu yörüngesinden koparabilir, ya da dokunduğı elektronu yörüngesinden çıkarmasının yanısıra yoluna, yönünü değıştirerek, devam edebilir. Bunun sonucu, β -parçacığının madde içindeki yolu, α -ışınlarının doğrusal yolunun tersine, sapmalar ve yön değıştirmeler ile

göze çarpar. α -parçacıklarında olduğu gibi, β -parçacıklarında da, enerji ve hızdaki azalmaya koşut olarak iyonlaştırıcı etkinlik artar.

Radyoaktif ışınların girginliği, ışınların kendi niteliklerinin yanısıra girdikleri maddenin yoğunluğuna da bağlıdır. Atomların ve atom elektronlarının yoğunluğunun yüksek olduğu bir maddede, ışınların girginliği (P) ya da erişebilecekleri uzaklık yoğunluğu düşük bir maddeden daha küçüktür. Örneğin ^{32}P -radyoizotopundan yayınlanan β -parçacıklarının su içindeki erişim uzaklığı E.U. $\text{H}_2\text{O} = 0,8 \text{ cm}$ iken, alüminyum içindeki erişim uzaklığı,

$$\text{E.U.}_{\text{Al}} = \text{E.U.}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \frac{P_{\text{H}_2\text{O}}}{P_{\text{Al}}} = 0,8 \cdot \frac{1}{2,7} \text{ cm} = 0,3 \text{ cm}$$

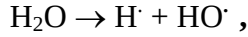
olur. Radyoaktif ışınların erişim uzaklığı radyoaktifliğin sayımı ve biyolojik madde içindeki yerleri ve miktarlarının saptanmasında geçerli kural ve yöntemleri belirleyen önemli bir faktördür.

Radyoaktifliğin belirtiminde radyoaktif ışınların iyonlaştırıcı etkisine dayanan Geiger-Müller tipi sayaçlar ya da, günümüzde kesinlik gerektiren çalışmalarda ön plana geçmiş olan parıltı (sintilasyon) sayaçları kullanılır.

3.6. Radyoaktif ışınların yol açtığı kimyasal değişiklikler

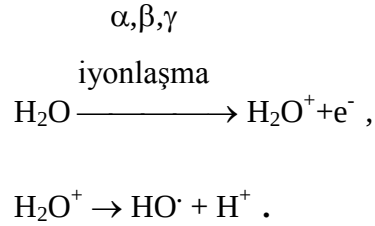
Radyoaktif ışınların hücre içinde yol açtıkları olaylar, fiziksel, (fiziko-)kimyasal ve biyolojik olmak üzere başlıca üç evreden geçer (Şekil 3-9). Fiziksel evrede ışın enerjisinin soğurulmasına koşut olarak, yukarıda anlatıldığı biçimde, iyonlaşmalar gerçekleşir. Bu evre 10^{-13} s gibi çok kısa bir süre içinde tamamlanır.

Fiziko-kimyasal evrede uyarılmış ya da iyonlaşmış moleküller birbirleriyle ve (ya da) çevrelerindeki moleküllerle tepkileşir. Yaklaşık 10^{-6} s süren bu ikinci evrenin sonunda iyonlaşmış moleküller yerlerini görelî olarak daha kalımlı, ancak çok reaktif olan ve serbest radikaller olarak adlandırılan moleküler birimlere bırakır. Gerek iyonlaşma ve gerekse radikal oluşumu öncelikle hücre kütlesinin yaklaşık yüzde 70'ine karşılık gelen su içinde gerçekleşir. Buna karşılık, hücrenin makromoleküllerinin ışıklardan doğrudan etkilenme olasılığı hücre kütlesindeki paylarıyla orantılı olarak daha düşüktür. Ancak, radyoaktif ışınların suyla etkileşimi sonucu oluşan iyonlar dolaylı olarak bu moleküllerin de etkilenmesine yol açabilir. Normalde ışın etkisiyle meydana gelen başlıca birincil parçalanma ürünleri,

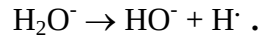
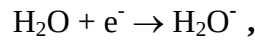


Şekil 3-9. Radyoaktif ışınların hücredeki etkilerinin aşamaları.

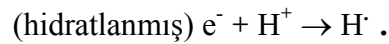
hidrojen ($H^\cdot$) ve hidroksil ($OH^\cdot$) radikalleridir. Hidroksil radikalleri genelde radyoaktif ışının bir elektronu açığa çıkarmasıyla iyonlaştırdığı su moleküllerinden türer:



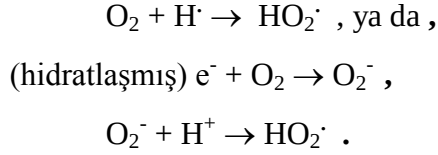
Açığa çıkan elektronun çevredeki su molekülleri ya da hidrojen iyonu ile birleşmesi ise hidrojen radikallerinin oluşumuna yol açar:



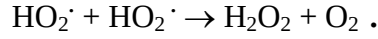
Açığa çıkan ve hidratlanmış elektron, bir hidrojen iyonu ile doğrudan birleşerek de hidrojen radikallerinin oluşumuna yol açabilir: _



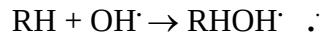
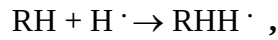
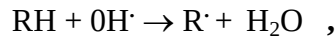
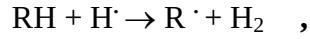
Hidrojen ve hidroksil radikalleri ile serbest hidratlanmış elektron çok reaktif yapılar olarak bir sonraki evrede (kimyasal evrede) çevreye difüzlenip, çözünmüş başka yapılarla tepkimeye girer. Bu reaksiyonlar soğurulmuş ışın enerjisinin çevreye dağılımında aracı olur. Bu süreçte yeni, ikincil radikaller oluşabilir ve makromoleküller (ve diğer biyomoleküller) ikincil radikaller üzerinden değişikliğe uğrayabilir. Oluşabilen ikincil radikallerden biri çözünmüş oksijenden türeyen hidroperoksit radikali ($\text{H}_2\text{O}_2^\cdot$)dir:



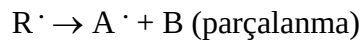
İki hidroperoksit radikalının birleşmesi ile görelî bir kalımlığa sahip, ancak oksitleyici etkisiyle biyolojik maddeye zarar verebilen hidrojen peroksit oluşur:

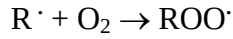


Radikallerin makromoleküllerle (örneğin protein ya da nükleik asit (= RH)lerle) tepkimeleri sonunda makromolekül radikallerinin oluşumu gerçekleşir:

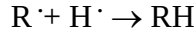
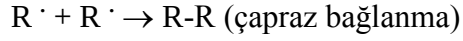
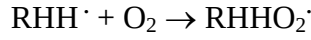


Makromolekül radikallerinin birbirleri ile ya da başka yapılarla tepkimeleri genelde bunların biyolojik işlevlerinin yitimiyle sonuçlanan yapısal değişikliklerle sonuçlanır.

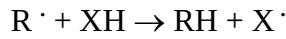




(oksitletme)



(eski duruma dönüş)



3.7. Soğurulan ışın enerjisi ile ilgili kavramlar

Madde içinden geçen ışının enerjisinin soğurulması yukarıda belirtildiği gibi iyonlaşmaya, ayrıca bunun ötesinde fotografik ve biyolojik etkilere ve ısı oluşumuna yol açabilir. Madde tarafından soğurulan enerji miktarı gram başına erg (erg/g) ile anlatılır. Soğurulan ışın enerjisine ilişkin olarak zamanla ışın dozu kavramı geliştirilmiştir. Günümüzde ışın dozunun tanımında genelde üç çeşit birim kullanılmaktadır. Bunlardan; **röntgen (R)** ışınlama dozunu, **rad** (“radiation absorbed dose”) soğurulan enerji dozunu ve **rem (rad x “relative biological effectiveness (RBE) = “roentgen equivalent man (rem)”**) canlı sistemler tarafından soğurulan ışın dozunun anlatımında kullanılır.

Röntgen (R), X- ya da γ -ışınlarının 0,001293 gram (= 1 cm³) havada 1 esu miktarında (artı ya da eksi simgeli) elektrik yükünün

oluşumuna yol açan miktarı olarak tanımlanır. Bu aynı zamanda gram hava başına 86,9 erg (sulu ortamda ise 98 erg) soğurulmuş enerjiye karşılık gelir.

Rad (D), havadaki X- ya da γ -ışınlarının miktarının anlatımına yarayan röntgen biriminin aksine, ışın çeşidinden bağımsız olarak, ısınlanan maddenin birim kütlesi başına soğurulan enerji miktarını ya da kısaca soğurulan dozu anlatır. Bir rad, bir gram madde başına soğurulan 100 erg'e karşılık gelir ($1 \text{ rad} = 100 \text{ erg/g}$).

Buna göre, sıvı ortamda, örneğin yaklaşık yüzde yetmiş oranında su içeren hücrede (ya da böyle hücrelerden oluşan “yumuşak” dokularda) 1 röntgen karşılığı ısınlama yaklaşık 1 rad karşılığı soğurulan ışın enerjisine eşit olmaktadır. Ancak, örneğin kemik dokusunda röntgen ile rad arasındaki bu oran röntgen ısınlının foton enerjisine bağlıdır. Tanı için kullanımda 1 röntgen doza maruz kalmak 4 rad soğurulmasına karşılık gelir. Bugün kullanılan yüksek enerjili radyoterapide gerek kemik, gerekse yumuşak dokuda (veya su içinde) röntgen ve rad arasındaki oran 1 olur. 1975'te Uluslararası Radyolojik Birimler Komisyonu (ICRU) MKS birim sistemine uyarak Gray (gy) birimini kabul etmiştir. 1 Gy, bir kg dokuda bir joule enerji absorplanmasına neden olan ışın olarak tanımlanır. Buna göre, $1 \text{ joule} = 10^7 \text{ erg}$ olduğundan, $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$ 'dır.

Ancak, belirtildiği gibi, rad yalnızca X- ya da γ -ışınlarının soğurulan enerjisi ile sınırlı bir doz birimi değildir, kapsamına α -parçacıkları, β -parçacıkları, nötron ya da protonların soğurulan enerjisini de alır.

Değişik çeşit ışınların yol açtığı biyolojik etkilerin farklı olması nedeniyle, bunların etkilerini karşılaştırılabilir bir ölçütte anlatabilmek amacıyla rem birimi kullanılmaktadır. Bir rem, bir rad X- ya da γ -ışınının karşılığı dozun biyolojik eşdeğeridir. RBE değişik ışınların etki ölçülerini karşılaştırmaya yönelik bir terim olup,

$$RBE = \frac{250 \text{ kV X-ışını dozunun yol açtığı belirli bir biyolojik etki}}{\text{Aynı biyolojik etkiye yol açmak için gerekli başka bir ışın dozu}}$$

olarak tanımlanır.

Işının soğurulmuş enerji dozunun hızının (rad) hesaplanmasında belirli bir alana (cm^2) birim zamanda düşen ışın miktarı (foton ya da parçacık sayısı (N)), ışınlama süresi (birim zaman (s)) ve ışının enerjisi (eV) ve ışın enerjisinin suda bir cm ışın yolu boyunca soğurulma oranından (AE, MeV/cm) hareket edilir (Tablo 3-6). (N)in hesaplanabilmesi için ayrıca ışın kaynağının aktifliği (Ci ya da Bq) ve hedefe uzaklığının bilinmesi gerekir. Bir elektron voltu (eV) 1 voltluk bir elektrik alanında bir elektronun kazandığı kinetik enerjiye karşılık gelir:

$$1 \text{ eV} = 1,6 \times 10^{-12} \text{ erg} ,$$

$$1 \text{ MeV} = 1,6 \times 10^{-6} \text{ erg} .$$

Soğurulan enerji dozu hızı,

$$= NAE \text{ MeV/cm}^3.s, \text{ ya da su içinde,}$$

$$\text{NAE} = \frac{\text{NAE}}{\rho} \text{ MeV/g.s (} \rho_{\text{su}}(\text{yoğunluk})= 1 \text{ g/cm}^3\text{);}$$

$$1 \text{ sa} = 3600 \text{ s ,}$$

$$1 \text{ rad} = 100 \text{ erg/g,}$$

$$\text{NAE} = 0,031 \text{ MeV/cm (Tablo 3-6)}$$

olduğuna göre, 1 fotonun (γ -ışını, 1 Mev) 1 saatte yol açacağı soğurulmuş enerji,

$$= \frac{0,031 \times 1,6 \times 10^{-6} \times 3600}{100} \text{ rad.sa}^{-1}$$

$$= 1,78 \times 10^{-6} \text{ rad.sa}^{-1} = 1,78 \times 10^{-6} \text{ rem.sa}^{-1}.$$

3.8. Radyoizotopların araştırmalarda kullanımı

Biyofiziksel ve biyokimyasal araştırmalarda kullanılan başlıca radyoizotoplar Tablo 3-7 'de verilmiştir. Çoğunluğu β -türü ve görelî olarak düşük enerjili ışın salan bu radyoizotoplar özellikle metabolik ve kalıtsal olayların molekül düzeyde araştırılmasında geniş uygulama bulur. Radyoaktif işaretleme biyolojik etkinliğini değıştirmedığından, radyoizotop işaretli bir molekül tıpkı normal, işaretsiz benzerlerinin

E(MeV)	AE(MeV/cm)
0,2	0,006
0,5	0,016
1,0	0,031
1,5	0,042
2,0	0,052
3,5	0,060

Tablo 3-6. γ -ışınlarının her cm ışın yolu boyunca soğurulan enerji oranları (AE).

geçtiği dönüşümleri izler. Öncül bir madde yapısındaki atomlardan biri radyoaktif olacak biçimde sentezlenebilir. Bu tür radyoaktif maddenin varlığında tutulan hücrelerde dönüşüm sonrası ortaya çıkan radyoaktif ürünler belirlenebilir. Böylece, bu dönüşümlere esas oluşturan reaksiyonlara ışık tutmak olasıdır.

Ayrıca, kullanılacak radyoizotop ve öncül maddeye bağlı olarak (makro)moleküller özgün biçimde işaretlenebilir.

Radyoaktif maddelerin kullanımında deneyin hücre düzeyinde ya da hücreden yoksun bir sistemde yapılmasına bağlı olarak farklı yollar izleme zorunluğu olabilir. Bunda özellikle fosforillenmiş (yükli) moleküllerin hücre zarından geçememeleri belirleyici olur. ^{32}P ile işaretli ATP (= ^{32}P -ATP) bu nedenle hücre deneylerinde kullanılamaz. Ancak, hücre zarından kolayca geçip, dönüşüm sonucu ATP molekülüne girebilen ($^{32}\text{PO}_4^{3-}$) hücre deneylerinde yaygın biçimde kullanılır.

Radyonüklit	Yarılama süresi	Işın türü	Işın enerjisi (MeV)	Suda erişme uzaklığı (cm)
H-3	12,1 yıl	β	0,018	8×10^{-4}
C-14	5568 yıl	β	0,155	3×10^{-2}
Na-24	15 saat	β (ve γ)	1,39	0,21
P-32	14,2 gün	β	1,71	0,80
S-35	87 gün	β	0,167	3×10^{-2}
Ca-45	164 gün	β	0,254	7×10^{-2}
Fe-59	45 gün	β (ve γ)	0,46(0,27)	0,18
I-131	8,1 gün	β (ve γ)	0,34(0,61)	0,25

Tablo 3-7. Biyofiziksel ve biyokimyasal araştırmalarda kullanılan bazı radyonüklitlerin özellikleri.

Hücre düzeyinde yapılan deneyler sonuçların görüntülenmesi ya da sayısallaştırılmasına yönelik olarak düzenlenebilir. Sonuçları görüntülemeyi hedefleyen deneylerde otoradyografi yöntemi kullanılır. Bu yöntemde işaretleme sonrası örnekler (doku kesitleri ya da elektroforez sonrası kurutulmuş gel örnekleri) sıkı temasta olacak şekilde fotoğraf filminin üstüne yerleştirilir ve karanlıkta (radyoaktiflik içeriğiyle ve kullanılan radyoizotopun enerjisiyle) uygun bir süre bekletilir. Banyo sonrası filmin üzerinde kararmış bölgeler radyoizotopun yerleştiği hücre (doku) kesimlerini ya da (elektroforez gellerinde) radyoaktif işaretlenmiş proteinleri (ya da nükleik asitleri) gösterir (Şekil 3-10).

Şekil 3-10. Radyoaktif (^{32}P) işaretlelenmiş E.coli hücre proteinlerinin 2 boyutlu PAGE elektroforez sonucu otoradyogramı.

Sayısallaştırmaya yönelik deneylerde ise radyoaktif olarak işaretlelen hücre kesimi (ya da makromolekül) bir saflaştırma işleminden sonra özel sayaçlarda (bkz.aşağıda) sayıma tabi tutulur. Bu tür deneylerin sonuçlarının yorumunda radyoaktif işaretleli maddenin hücre içerisinde benzeri soğuk, işaretlelenmemiş molekülle karışması sonucu özgün aktifliğinde meydana gelecek azalma gözönüne alınır. Hücreler ortama eklenen radyoaktif madde ile dengeye ulaşınca dek uzun bir süre tutulabileceği gibi (“**equilibrium labelling**”), kısa süreli bir işaretlemeye de tabi tutulabilir (“**pulse labelling**”). Kısa süreler için ortama eklenen öncül nitelikli radyoaktif maddelerin varlığında özellikle dönüşüm hızı (“**turnover-rate**”) yüksek olan molekülleri işaretleme olanaklıdır.

Radyoaktif maddenin tekrar ortamdan uzaklaştırılmasından sonra işaretli moleküllerin radyoaktiflik içeriğinin zaman içindeki azalmasını izleyerek onların dönüşüm/yıkım hızları da belirlenebilir (“**pulse chase**”) (Şekil 3-11).

Şekil 3-11. “Pulse chase” yöntemi.

Radyoizotoplarla işaretli maddeler hücreden yoksun sistemlerde (örneğin deney tüpünde) de çok yaygın biçimde kullanılır. ^{32}P -ATP ya da ^{35}S -dATP’nin kullanımı ile deney tüpünde protein ya da nükleik asitlerin enzimatik yollarla fosforillenmesini izlemek ya da onları radyoaktif işaretlemek olanaklıdır. Bu şekilde işaretlenen makromoleküller saflaştırılarak ikincil reaksiyonları izlemek için kullanılabilir (Şekil 3-12 ve Şekil 3-13).

Radyoaktif işaretli öncül moleküllerin kullanımı ile pek çok biyosentez olayı molekül düzeyde incelenebilir. Örneğin ^3H , ^{14}C ya da ^{35}S (metyonin) işaretli amino asitlerle protein sentezi, ^3H , ^{14}C ya da

Şekil 3-12. Southern emdirim (“blot”) yöntemi.

^{32}P işaretli nükleotitlerle nükleik asitlerin biyosentezi incelenir.
Günümüzde klinikte çok yaygın olarak kullanılan **RIA**

(“radioimmunoassay”/radyobağışıklık testi) de, ^{125}I işaretli maddelerin kullanımıyla, bu maddelerin örneklerdeki miktarları çok duyarlı biçimde (örneğin ng düzeyinde) belirlenebilmektedir.

Şekil 3-13. α - ^{35}S -dATP ile işaretleme sonrası DNA dizileme sonuçlarının otoradyografik değerlendirilmesi. 1 ve 2 numaralı bulgular aynı örnekten iki farklı uygulamayla elde edilmiştir.

3.9. Radyoizotopların belirtiminde kullanılan yöntem ve araçlar

Işınların film karartması özelliği, bugün de radyoizotopların tam yerini saptamak için uygulanan ve yukarıda örneklenen otoradyografi tekniğinde önemlidir. Çalışmalarda radyoizotop ışınlarının varlığını derhal belirten bir alet gerekebilir. Modern radyoizotop laboratuvarındaki genel kontrol işini, ışınların iyonlaştırıcı etkilerine dayanan **Geiger-Müller sayacı** görür. Radyoizotopların sayısal belirtimi için en uygun araç ise, γ -ışınlarını ışığa çeviren sintilasyon sayaçlarıdır.

Otoradyografi yönteminde ışık geçirmeyen kağıda sarılı fotoğraf filmi kontrol etmek istediğimiz örneğe doğrudan uygulanır. Uygun bir

poz süresi geçtikten sonra film banyo edilir. Örneğin radyoizotop içeren bölgesi karşısındaki film bölgesinin kararmış olduğu görünür.

Örnek olarak filmle temas ettirilmesi kolay yassı organlar olan yapraklara sahip bir bitki alalım. Fosfat iyonu bitki kökünden yapraklara geçebilir mi? Bu soruyu yanıtlamak için ^{32}P izotopu ile işaretlenmiş fosfatı bitkinin suyuna ekleriz. Sulandıktan birkaç saat sonra bitkinin bir yaprağını koparıp sarılı filmin üstüne koyarız. Yaprığın kenarları kıvrılmasın diye de üstüne ağır bir kitap bırakıp (Şekil 3-14), filmi birkaç gün sonra banyo edince yanıtımızı kesin olarak alırız. Filmde yaprağın tam bir görüntüsü

Şekil 3-14. Otoradyografi.

oluştuktan, ^{32}P 'yi içeren fosfat iyonlarının yaprağın her tarafına dağıldığını anlarız. Kontrol olarak ^{32}P vermediğimiz bir bitkinin yaprağı altında kalmış film ise beklediğimiz gibi saydam çıkar.

İkinci örnek olarak, mikroskopik bir kesitin otoradyografisini düşünelim. Yanıtını istediğimiz soru şu olsun: Kromozomlardaki DNA, mitoz sırasında mı, yoksa mitoz bölünmelerinin arasında mı çoğalır? Hücreleri sık mitoz yapan bir dokuya işaretli DNA yapıtaşları verirse sorumuzun yanıtını belki alabiliriz. İşaretli yapıtaşı olarak DNA'da bulunan, fakat RNA'da bulunmayan **timidini** seçeriz. Timidin, değişik kalıntıları radyoizotoplarla işaretlenmiş olarak sağlanabilir.

Mikroskopik otoradyografiye uygun olarak ışınları az enerji ile yayınlayan ^3H (trityum) izotopuyla işaretli timidini yeğlenir.

Kromozomlar, en yoğun hale geldikleri metafazda incelenmeye elverişli olur. Bu nedenle, radyoaktif ^3H -timidinden başka dokunun ortamına kolçisini de ekleriz (Şekil 3-15a). Bu maddenin iğ iplikçiklerinin oluşmasını önleyerek, mitozu tam metafaz aşamasında durdurma yeteneği vardır.

İşaretli timidin ile kolçisini koyduktan 12 saat sonra dokuyu işaretsiz ortamla yıkayıp lama koymaya hazırlarız (Şekil 3-15b). Aslında renksiz olan kromozomları görebilmek için preparatı standart histolojik teknikler kullanarak boyarız (Şekil 3-15c). Mutlak karanlık bir odada preparatın üstünü, piyasada “**stripping film**” olarak tanınan kıvrılabilen özel bir filmle kapatırız. Böylece elde edilen “**sandviç**”, bir hafta kadar sıkı kapalı bir kutu içinde bekletilir. Bu poz sürecinde radyoaktif çekirdeklerden çıkan ışınlar, filmde kararmış noktalar oluşturur.

Şekil 3-15. Kromozom DNA'sının otoradyografisi.

- a) Hücreleri yüksek mitotik etkinlik gösteren dokunun bulunduğu ortama kolçisin ve radyoaktif işaretli timin eklenir,
- b) 6 saat sonra radyoaktif ortam uzaklaştırılır, doku temiz ortamla yıkanır;
- c) Histolojik tekniklerle hazırlanmış doku lama konur, Preparat özgül bir kromozom boyasıyla boyanır;
- d) Örneğin üstüne film konur;
- e) Preparat, ışık geçirmeyen bir kutuya konur;
- f) Preparat, film banyolarından geçirilir;
- g) Preparat, mikroskop altında incelenir.

Preparat, film lamdan çıkarılmadan, karanlıkta normal fotoğraf banyolarından geçirilir (Şekil 3-15f). Bu banyolar, preparattaki boyanmış kromozomları etkilemez. Preparat mikroskop altında incelenirken (Şekil 3-15g) kromozomlar ya da üzerlerindeki kararmış noktalar odak ayarı değiştirilerek tam net hale getirilebilir. Derste gösterilen slaytlar orta bir ayarla çekildiğinden, hem kromozomlar, hem de kararmış noktalar görülebilmektedir.

Üzerinde kararmış noktalar görülen hücrelerin kromozomları, bu 12 saat süre içinde DNA'larını çoğaltmışlardır. Diyelim ki, incelediğimiz, mitozları metafazda durdurulmuş birkaç hücreden aşağı yukarı yarısı, böylece işaretli görünür. Diğer yarısında kromozomları görürüz, fakat üzerlerindeki film noktasızdır. Bu sonucu orantılı daire

grafığı ile gösterebiliriz (Şekil 3-16). Kolçisinin ortamda 12 saat bulunmasını dairenin mitozdan önceki 12 saatlik kısmını tarayarak gösteriniz. Deney başladığında, bulunan tüm hücreler, mitoz evresine gelip metafazda kalırlar. Bunlardan ancak yarısı işaretli çıktığına göre, bu kısmın ilk yarısını ayrıca soldan sağa tararız. Deney başladığında, tek taramalı aşamada bulunan hücreler işaretsiz kaldığına göre, kromozomlardaki DNA'nın mitozdan aşağı yukarı 6 saat önce çoğaldığını anlarız.

Bu yöntem, çocuk kliniklerinde, insan genetiği (sitogenetik) servislerine birçok kromozomal hastalığın tanısında kolaylık getirmiştir.

İyonlaşma olayına dayanan radyoaktiflik belirtim araçlarından **sis kameralarında** meydana gelen iyon, yoğunlaşma çekirdeği görevini yapar. İyon toplama araçlarında ise, bir gazda meydana gelen iyonlar, iki elektrodun deşarj olmasına sebep olur. Geiger-Müller sayaçları, bir çeşit iyon toplama aracıdır.

İyon toplama araçlarında gelen ışınların oluşturduğu pozitif iyonlar, silindir şeklindeki kabın negatif yüklü kenarına çekilir. Yörüngelerinden fırlatılmış elektronlar ise, tel şeklindeki anoda doğru devinir. Silindirik katodu ile tel anodu arasındaki potansiyel farkı, 100-500 V olursa **araca orantılı sayaç**, 1000-2000 V olursa **Geiger-Müller sayacı** denir.

Şekil 3-16. DNA çoğalması ve mitozun orantılı grafiği.
Başlangıçta taranmış kısımda bulunan her hücre,
deneyin 12 saat süresinde mitozu başlayıp
mikroskop altında kromozom topluluğu olarak
görülecektir. Onlardan ancak çift taranmış
kısımdakiler ayrıca işaretli olacaktır.

Alet orantılı sayaç olarak kullanıldığı takdirde, fırlatılan elektronlara birkaç 100 elektron voltluk kinetik enerji kazandırılır (bir elektron volt, bir elektronun bir voltluk potansiyel farkından geçmesiyle kazandığı enerji miktarıdır).

Devinen bir elektronun 34 eV'luk enerjisi bile, karşılaştığı bir atomu iyonlaştırmaya yetmediğine göre, **ikinci iyonlaşma** olayının

birkaç kez meydana gelmesi beklenecektir. Işının enerjisi de binlerce elektron volt düzeyinde olduğuna göre, ikinci iyonlaşma her ışıktan sonra ışının enerjisiyle orantılı olarak yüzlerce kez yinelenebilir. Devreden gelen akım ise, radyoaktif örnekten gelen ışın enerjisiyle orantılı olur (Şekil 3-17).

Bu tip alet Geiger-Müller sayacı olarak çalıştığında, tel ile kap arasındaki voltaj o kadar yüksektir ki, birinci iyonlaşmaya neden olan

ışın enerjisi artık önemsiz kalır. Enerjisi az olsun, fazla olsun, Geiger túbüne giren her ışın, devrede esasen aynı akımı meydana getirir (Şekil 3-17). Bu özellik bazı işler için bir sakınca sayılabilir, ancak yüksek voltajın kazandırdığı duyarlık yüksek olduğu için Geiger sayacı, kontrol ve kaba belirtim işleri için en yaygın kullanılan bir alettir. Portatif “kontrol metresi” halinde Geiger sayacı, radyoizotopların kullanıldığı her klinik ve laboratuvarında bulunur.

Üçüncü bir çeşit iyon toplama aracı olan **iyonlaşma kamerasında**, anot, çubuk şeklinde bulunur, uygulanan potansiyel farkı da 100 volt’tan az olur. Bu araçlar, en çok dolmakalem şeklinde yapıp, radyoaktif maddeler ya da X ışınlarıyla çalışanların ceplerinde bulunarak, radyasyonun bir ön ölçümünde kullanılır.

- Şekil 3-17. a) Geiger-Müller tüpleri ışınlar tarafından iyonlaşabilen bir gazla doludur.
- b) Bir γ ışını tüpe girdiğinde, iyonlaşmaya yol açar. 1000 V civarında pozitif potansiyelde tutulan merkez elektrod bütün gaz iyonlaşana kadar elektronları çeker.
- c) Bu sırada merkez elektrottaki voltaj düşmesi grafikteki gibi olur ve devreden akım geçer. Bu sırada daha ağır iyonlar dış duvara gider.
- d) 400 μ s sonra tüp içindeki gaz ilk durumuna (nötr) döner.

Geiger sayacının öbür düşük voltajlı akrabası olan orantılı sayacın yerini, son 30 yılda bundan sonraki kısımda tanıtılacak olan **sintilasyon sayaçları** almıştır.

Sintilasyon (parıltı) sayaçları, bugün izleme tekniğinde kesinlik isteyen her belirtim işi için kullanılır. Bu tip aletler sintilatör denen bileşiklerin iyonlayıcı ışığı emdikten sonra, onun enerjisinden bir kısmını yeniden ışık olarak yayınlama özelliklerine (fluoresans olayına) dayanır. Yayınlanan ışığın şiddeti de, orijinal ışının enerjisiyle orantılıdır. Işığı kaydederek “elektrik göz” görevini, esaslı foto-elektrik etkisi olan bir fotosel (fotohücre) görür (Şekil 3-18). Sintilasyon sayaçları, aslında ancak **fotoçoğaltıcı** diye adlandırılan daha duyarlı bir fotohücre tipi bulunduktan sonar yaygınlaşmaya başlamışlardır. Fotoçoğaltıcıların

Şekil 3-18. Fotoçoğaltıcı tübünün kesiti.

katotlarının bünyesinden yalancı **puls**lar (akım atışları) çıktığından dolayı, bu hücreler çift olarak kullanılır (Şekil 3-19). **Çift olay devresi**, ancak her iki fotoçoğaltıcıdan birden aldığı gerçek pulsları **puls yüksekliği inceleme devresine** geçirir. Bu inceleme devresi ise, aleti kullananın ayarlanmasına göre yükseklikleri belirli sınırlar arasında bulunan pulsları sayılmaya gönderir. Sayaç aletinin asıl sayıcı kısmı, bir **sayı ölçeği**dir. Bunun özel 10 pozisyonlu “**magnetron**” tüpleri, inceleme devresinden gelen pulsları sayar. Önceden ayarlanmış bir zaman süresi sonunda elde edilen sayı, elektronik beyinlerdekine benzer bir bölme devresinde zamana bölünür. Veri, zaman diliminde sayım cinsinden rakam ya da grafik olarak kaydedilir.

Şekil 3-19. Bir sintilasyon dedektör sistemi. PMT, fotoçoğaltıcı tüp.

Sintilatörler, tayin edilecek olan ışın cinsine göre, likit ya da katı halde seçilir. Likit sintilatör olarak toluenin diğer bazı organik bileşiklerle karması kullanılır. Bu likit karması doğrudan doğruya örnek tüpüne eklendiği için, ^3H ve ^{14}C gibi yayınladıkları beta ışınları çok zayıf olan izotoplar, **likit sintilasyon sayaçlarında** tayin edilebilir. Bu araç, biyokimya ve moleküler biyoloji araştırma laboratuvarlarında artık demirbaş haline gelmiştir.

Katı sintilatör olarak, talyum (atom numarası 81 olan element) ile bulaşmış sodyum iyodür kristalleri en çok kullanılır. Bu NaI (Tl) kristalleri U şeklinde yapılarak örnek tüpü doğrudan doğruya kristalin içine yerleştirilen kuyu tipi alet meydana gelir. Kullanılmaları likit sintilasyon sayaçlarından kolay olduğu halde, bunlar ancak γ enerjileri fazla β ışınları için kullanılabilirler.

3-10. Radyoaktif ışınların tanı ve sağaltımda kullanımı

Radyoaktif ışınların sağaltımda kullanımı iki şekilde yapılır. Cobalt-60'ın yayınladığı güçlü ışınlar tümör bulunan organa odaklanır. Bu bölge belli bir süre ışınlanarak kanserli hücrelerin öldürülmesi

sağlanır. Sağlıklı dokunun zarar görmemesi için vücudun diğler bölgeleri kurşun maskelerle korunur. Tümörün bütününün yok edilmesi için hesaplanan doz, bölünmüş dozlar halinde günlere yayılarak verilir. Örneğın bir tümörü yok etmek için hesaplanan doz 4000 rad ise, bu doz günde 400 rad olmak üzere 10 güne yayılarak uygulanır.

Radyoizotopların sağaltımında ikinci uygulama şekli belirli elementlerin kritik organlarda toplanması esasına dayanır. İyot ya da

Tablo 3-8. Tanıda kullanılan başlıca radyoizotoplar ve dozları.

teknezyumun radyoizotopları tiroit bezinde toplanır. Tablo 3-8'de görülecek dozlarda verilen bu radyoizotoplar, tutuklandıkları organ içindeki tümör dokusunu ışınlarak kanser hücrelerini öldürürler.

Tanıda radyoizotopların kullanımında aynı düşünceden yola çıkarak, bir radyoizotopun yayınladığı γ ışınları vücut yüzeyinden kaydedilerek, radyoizotopun hedef organ içindeki değişik yoğunluktaki toplanma bölgeleri yapılan kayıtlarla belirlenebilir.

Klinik çalışmalarında bu esasa dayalı olarak sintigrafi aleti kullanılır (Şekil 3-20 ve 3-21). Bunun yazıcısı ve sintilasyon kristali birlikte gezdirilebildiği için, meydana gelen grafik, hastanın vücudunun tam bir radyoaktiflik haritasıdır (Şekil 3-22). Sintigrafi, vücut yüzeyine yakın organlardaki tümörlerin yerlerini belirlemeye özellikle uygundur. Şekil 3-20'de görüldüğü gibi, radyoaktif işaretli bir izleme maddesi normal olarak dokuya bağlanırsa tümör, radyoaktifliği olmayan bir “soğuk bölge” olarak gözlenir. Eğer tümör bölgesinde, izleme maddesi öncelikli olarak toplanırsa “sıcak bölge” dikkati çeker.

Şekil 3-20 Çizgisel tarayıcı.

Sintilasyon dedektörü bir ampule mekanik bir bağlantı ile paralel çalışacak şekilde bağlanır. Dedektör hedef organ üzerinde paralel çizgiler üzerinde belirli hızlarla hareket ederken, lambada bir film kağıdı üzerinde aynı hareketleri yapar. Dedektörün üzerine düşen γ ışınlarının oluşturduğu elektrik pulsları film üzerinde lambanın şiddetine göre karartılmış noktalar şeklinde işlenerek hedef organın işaretli elementi (^{131}I gibi) yakalama yoğunlukları belirlenir. İşaretli elementi az yakalayan bölgeler az noktalı ve çok yakalayan noktalar daha karanlık olarak film üzerinde belirlenir. Açık renkli bölgeler “soğuk”, koyu renkli çok noktalı bölgeler “sıcak” olarak isimlendirilir. Bu bölgelerin tümör olma olasılığı değerlendirilir.

Şekil 3-21. Gama kamera ve elemanları.

NaI(Tl) kristalinin üstüne konumlandırılmış 20 adet fotoçoğaltıcı tüpler bir kurşun muhafaza içine konmuştur. Gama ışınının kristale gelmesi ile oluşan pırıltı kendine en yakın fotoçoğaltıcı tüpte çok büyük, uzaktakinde ise çok zayıf bir akım oluşturur. Oluşan bu akımların yeri x, y düzleminde sinyal işleyicide belirlenerek osiloskoba gönderilir ve bu kamera ile film üzerine kaydedilir.

Şekil 3-22 . Böbrek taramasında yer alan devreler.
Yukarıdaki üç devre genellikle tek bir
modüle monte edilir. Genellikle, aynı
zamanda farklı bir ünite de diğör böbreğin
işlevi ölçölür

3.11. Işın Biyofiziği

Radyoizotopların bozunumu sırasında salınan γ -ışınları, tıpkı X-ışınları, morötesi, görünür ve kızılaltı ışık, mikrodalgalar ve radyodalgaları gibi elektromagnetik dalgalardan oluşur. Elektromagnetik ışınlar dalga özelliklerinin yanı sıra tanecik özellikleri de gösterir. Bu bağlamda, ışının (boşlukta) yayılması, atomlar tarafından soğurulması ya da salınımı belirli enerji paketleri (=ışın enerjisi kvantları ya da fotonlar) üzerinden gerçekleşir.

Foton enerjisi, elektromagnetik ışının dalga sıklığı (frekans) ya da dalga sıklığının ters (resiprok) değeri olan dalga boyu (λ) tarafından belirlenir. Logaritmik ölçütte verilen sıralamada görülebileceği gibi, elektromagnetik spektrum dalga boyları 10^{-12} (10^{-11})cm (=kozmetik ışınlar ve γ -ışınları) ile 10^{-4} cm (=radyo dalgaları) arasında değişen çok farklı enerji içerikli ışınları kapsar (Şekil 3-23).

Günümüzde ışın enerjisinin ölçütü olarak dalga sıklığının yanı sıra, artan ölçüde, dalga sayısı (ν)da kullanım bulmaktadır. Dalga sayısı cm ile verilen dalga boyunun ters değerine karşılık gelir:

$$\nu = \frac{1}{\lambda} \cdot \text{cm}^{-1}. \quad (3-13)$$

Örneğin, 100 nm ($=10^{-7}\text{m} = 10^{-5}\text{cm}$) dalga boyundaki bir morötesi ışının dalga sayısı,

$$\nu_{100 \text{ nm}} = \frac{1}{10^{-5} \text{ cm}} = 10^5 \cdot \text{cm}^{-1}.$$

Şekil 3-23. Elektromagnetik spektrum.

Dalga sıklığı (ν) ise ışık hızı (c) ile dalga sayısı (ν)nın çarpımı ile elde edilir:

$$\nu = c \cdot \nu = c \cdot \frac{1}{\lambda} = 2,998 \times 10^{10} \text{ cm.s}^{-1} \cdot \nu (\text{cm}^{-1}) \quad (3-14)$$

Dalga sıklığı birimi, hertz, s^{-1} ile ifade edilir: 1 hertz = saniyede bir çevrim (siklüs) = 1 çevrim. s^{-1}). Yukarıdaki örneğin dalga sıklığı buna göre,

$$\nu = 2,998 \times 10^{10} \text{ cm.s}^{-1} \times 10^5 \text{ cm}^{-1} = 2,998 \times 10^{15} \text{ Hertz}$$

Dalga sıklığından hareketle, ışın enerjisi (ışın kvant ya da foton enerjisi) (E) hesaplanır:

$$E = h \cdot \nu. \quad (3-15)$$

(h = Planck ışın kvant dursayısı = $6,627 \times 10^{-34} \text{ J.s}$).

Gene aynı örneğe göre, 100 nm boyundaki ışının foton enerjisi:

$$\begin{aligned} E &= 6,627 \times 10^{-34} \text{ J.s} \times 2,998 \times 10^{15} \text{ s}^{-1} \\ &= 1,986 \times 10^{-18} \text{ J} \end{aligned}$$

Foton enerjisi, sıklıkla elektron volt (eV) olarak verilir:

$$1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$$

Buna göre,

$$E = 1,986 \times 10^{-18} \text{ J/1, 602} \times 10^{-19} \text{ J} = 12,4 \text{ eV}$$

Foton enerjisi genelde Einstein başına enerji (Einstein = 1 mol ışın kvantı (foton)) = $6,023 \times 10^{23}$ ışın kuvantı (N) olarak verilir:

$$E = N h \nu = N h c \nu$$

$$= 6,023 \times 10^{23} \text{ Einstein}^{-1} \times 6,627 \times 10^{-34} \text{ J.s.} \times 2,998 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$$

$$= 1,196 \times 10^6 \text{ J.Einstein}^{-1} = 1,196 \times 10^3 \text{ kJ.Einstein}^{-1}.$$

Tablo 3-9'da, ışının belirtilen özelliklerinin ölçümünde kullanılan birimleri topluca vermektedir.

Boşlukta ışık hızı	$c = 2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$
Ortamda ışık hızı	$c' = c/n$ n= kırma indisi
Dalga sayısı	$\nu = 1/\lambda$; $\nu (\text{cm}^{-1}) = 10^7/\lambda (\text{nm})$ $1 \text{ cm}^{-1} = 1 \text{ kayser}$
Frekans	$\nu = c/\lambda = c\nu$ $\nu (\text{hertz}) = 2,998 \times 10^{10} \nu (\text{cm}^{-1})$ boşlukta
Kuantum enerjisi	$E = h\nu = hc\nu$ $E (\text{joule}) = 1,986 \times 10^{-23} \nu (\text{cm}^{-1})$ $E (\text{eV}) = 1,240 \times 10^{-4} \nu (\text{cm}^{-1})$
Einstein enerjisi	$E = N h \nu = N h c \nu$ $= 6,023 \times 10^{23} h c \nu$ $E (\text{joule}) = 11,961 \nu (\text{cm}^{-1})$ $E (\text{kcal}) = 2,859 \times 10^{-3} \nu (\text{cm}^{-1})$

Tablo 3-9. Işığın bazı özellikleri.

Işın, foton enerjisini içinden geçtiği maddede çarpıştığı atomlara aktarır. Aktarılan foton enerjisinin miktarına göre elektron uyarılabilir ya da atomundan sökülebilir. Söküm için gerekli olan enerjinin ötesindeki enerji miktarı açığa çıkan elektronun kinetik enerjisine dönüşür:

$$E = eI + eK \quad (3-16)$$

(eI = söküm ya da iyonlaştırma enerjisi; eK = sökülen elektronun kinetik enerjisi). Fotoelektrik olay olarak tanımlanan bu olay, 3.5.3'te açıklandığı gibi, göreceli düşük enerjili radyoaktif ışınların iyonlaştırıcı etkilerinin esasını oluşturur. Tablo 3-10 bazı atomik gazların iyonlaşma enerjilerini göstermektedir. Enerji düzeyleri (>1 keV), radyoaktif ışınların (ve de X-ışınlarının) iyonlaştırıcı etkilerinin nedenini açık biçimde ortaya koymaktadır (Tablo 3-11).

Gazın Türü	İyonlaşma enerjisi (eV)
Xenon	12,1
Oksijen	13,6
Kripton	14,0
Azot	14,5
Argon	15,8
Neon	21,6
Helyum	24,6

Tablo 3-10. Bazı atomik gazların iyonlaşma enerjileri.

Foton türü	Dalga boyu sınırları (m)	Foton enerjileri
Gama ışını	$4,7 \times 10^{-13}$ (en kısa)	-0,300 MeV $2,6 \times 10^6$
X-ışını	$1,6 \times 10^{-11}$ - $6,6 \times 10^{-8}$	-3,000 keV $19-7,4 \times 10^4$
UV-ışını	$1,4 \times 10^{-8}$ - $3,8 \times 10^{-7}$	3,2 - 88 eV
Görünür bölge ışını	$3,8 \times 10^{-7}$ - $7,6 \times 10^{-7}$	-2,000 eV 6,6-3,2 eV

Tablo 3-11. Işınlardan foton enerjilerine göre iyonlaştırma özellikleri.

Işının etkilediği maddeye aktardığı enerji iyonlaştırma enerjisinin altında olabilir. Bu durumda ışın enerjisinin madde tarafından soğurulması söz konusu olabilir. Ancak, enerjinin soğurulması atomların enerji düzeyleri ile ışın dalga sıklığına (ışın enerjisine) bağlı olacaktır. Maddenin dalga mekaniğine dayalı özelliklerine bağlı olarak atomlar (ve elektronlar) basamaklı ya da kesikli enerji değerleri içerir. Atomlar, yalnızca bu belirli enerji düzeylerinde bulunabildiklerinden, ışının soğurulabilmesi basamaklar arasındaki enerji farklarına karşılık gelen dalga sıklıklarında olanaklı olabilir. Uyarılma sonucu elektron üst basamaklardan birisine geçebilir, ancak basamaklar dışındaki bir ara enerji düzeyine geçiş olanaklı değildir. Uyarılmaya koşut olarak, uyarıcı ve uygun dalga sıklığındaki ışın soğurulur. Özet olarak, ışını soğurmadan önceki enerji düzeyi (E_1), soğurma sonrası enerji düzeyi (E_2) olarak gösterildiğinde,

$$E_2 - E_1 = h\nu = h.c.\lambda^{-1} \quad (3-17)$$

Belirtilen enerji basamakları elektronun bulunabileceği farklı enerji durumlarına karşılık gelmektedir. Daha somut bir açıklama ile, bir molekülün enerji düzeyi atomlar (çekirdekler) arası uzaklığa (r) bağlı olarak değişir. İki atomlu basit bir sistem örnek alınacak olursa, enerjinin belirli bir çekirdekler arası uzaklıkta en düşük düzeyde olduğu görülür. Bu uzaklık aynı zamanda iki atom arasındaki etkileşimin ya da bağın en kalımlı olduğu noktaya karşılık gelir (Bölüm 2.1.2.2. ile karşılaştırınız). Bu taban enerji değeri molekülün elektron konfigürasyonu ve yörüngeç düzeni tarafından belirlenir ve molekülün elektronik durumu olarak tanımlanır. Uyarılma sonucu elektron bir üst kabuktaki yörüngeçe geçiş yapabilir (elektronik geçiş). Molekül elektronik enerji düzeyinin ötesinde titreşim (vibrasyon) ve daha küçük dönme (rotasyon) enerjisi ara değerlerine de sahiptir (Şekil 3-24). Elektronik enerji değeri gibi titreşim ve dönme enerji değerleri de kvantlaşmış durumdadır.

Şekil 3-24. Basit bir diatomik molekülde enerji düzeyleri. (Kalın çizgiler, elektronik enerji düzeyleri; ince düz çizgiler, titreşim enerji düzeyleri; ince kısa çizgiler, dönme enerji düzeyleri).

Dolayısıyla geçiş uyarma enerjisinin karşılığı olan dönme, titreşim ve/ya da elektronik geçişler biçiminde gerçekleşebilir (Şekil 3-25).

Şekil 3-25. Elektromagnetik spektruma göre bakır içerikli protein hemosiyaninin görünür ışık ve mor ötesi soğurum spektrumu.

3.11.1. Soğurum (absorpsiyon) spektrometresi

Moleküllerin ışığı soğurma özellikleri, soğurum (absorpsiyon) spektrometresinin esasını oluşturur. Yukarıda da belirtildiği gibi, moleküllerin yapıları (ve de içinde bulundukları ortamlara) göre soğurma özellikleri değişmektedir. Dolayısıyla soğurum spektrometresi moleküllerin yapıları ve çevrelerine ilişkin önemli bilgiler sağlar.

Görünür ışığın örneğinde olduğu gibi, farklı dalga boylarında, düzlemlerde ve evrelerde (fazlarda) yayılan ışınlar topluca ışın demetleri oluşturur. Özel işlemlerle (örneğin kristal yapılardan geçirilme sonucu) bu tür ışın demetlerinden tek dalga boylu (monokromatik) ışık türleri elde edilebilir (Şekil 3-26). Ayrıca aynı düzlemde yayılabilen (polarlanmış) ışın türleri, ışın kaynağının özelliklerine göre de aynı faz faktörlü (koherent) ışın türleri benzer tekniklerle elde edilebilmektedir. Soğurum spektrometresinde bu tür işlemlerden geçirilerek elde edilen ve fiziksel özellikleri tanımlanmış ışınlar kullanılır.

Bir maddenin çözeltisinin farklı dalga boylarındaki ışın soğurma özelliklerine göre soğurum (absorpsiyon) spektrumu belirlenir. Belirli bir dalga boyundaki ışığın içinden geçtiği çözeltide soğurulan miktarı maddenin çözeltideki derişimiyle orantılıdır. Bu özellik, sözkonusu maddenin çözeltideki içeriğinin belirlenmesini olanaklı kılar. Işık için bir çözeltideki geçirgenlik (transmitans (T)) ya da onun ters değeri olan soğurum (A) Bouguer-Lambeert-Beer yasasıyla ortaya konmuştur:

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon lc} \quad (3-18)$$

$$A = \frac{1}{T} = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon.c.l \quad (3-19)$$

Şekil 3-26. Tek dalga boylu ışık türlerinin eldesi ve spektroskopide kullanımı.

(I_0 , çözeltiliye giren ışığın şiddeti; I , çözeltiden çıkan ışığın şiddeti; ϵ = molar soğurum (ekstinksiyon) katsayısı ($\text{litre.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$); c = derişim (mol.litre^{-1}); l = ışığın çözeltide geçtiği yol (cm)). Eşitlik böylece bir maddenin bilinen ϵ ve çözeltisinin ölçülen A değerinden derişiminin hesaplanmasını sağlar.

Kızılaltı (infrared) spektrometresi Şekil 3-27'de görüldüğü gibi, titreşim enerji değerlerindeki geçişlere ilişkin bilgi verir. $-\text{C}=\text{O}$ ya da $-\text{N}-\text{H}$ gibi belirli grupların özgün dalga boylarında (1700 cm^{-1} ve 3400 cm^{-1}) gösterdiği titreşim enerji geçişleri nedeniyle bu teknik özellikle makromoleküllerin ikincil yapılarının incelenmesinde geniş kullanım bulur. Görünür ve mor ötesi ışık bölgelerinde elektronik geçişler izlenir. Metal iyonlar içeren bileşikler ve aromatik, heterosiklik ve çift bağlı sistemler bu yöntemle incelenir. Bu tür yapıları içeren makromoleküller (özellikle triptofan, tirozin, fenilalanin gibi amino asitler üzerinden proteinler, baz içerikleri üzerinden nükleik asitler) ile yürütülen

araştırmalarda görünür ve morötesi spektroskopisi (daha ilerideki bölümlerde de görüleceği gibi) önemli bir rol oynar.

3.11.2. ışıltı (floresans) spektrometresi

Soğurulan ışın tarafından uyarılan molekül kazanılan enerjiyi genelde ısı biçiminde çevreye aktarır. Ancak, bazı koşullarda, soğurulan enerji sonucu uyarılan bileşik fazla enerjiyi ışıltı (floresans) biçiminde salar. Soğurulan enerjinin bir bölümü gene de ısı enerjisi biçiminde yitirildiğinden, daha düşük enerji düzeyindeki ışıltı daha uzun dalga boylarında yansır (Şekil 3-28a). Elektron uyarımı sonucu bir üst

elektronik düzeye ve oradan da daha üst derecede bir titreşim düzeyine geçebilir. Titreşim enerjisi fazlasının sönme süresi ($\sim 10^{-12}$ s) elektronik enerji değerinin sönme süresinden ($\sim 10^{-9}$ s) çok daha kısa olduğundan yalnızca elektronik geri dönüşün ışıltıya dönmesi olanaklıdır. Titreşim enerjisinden yitirilen miktar ise bu durumda ışıltının daha düşük enerji değerini belirler (Şekil 3-28b).

3.11.3. Sirküler dikroizm

Absorpsiyon ve floresans spektroskopisi, biyomoleküllerin ikinci yapıları hakkında bilgi verme açısından yeterli değildir. Bu amaçla teknik olarak polarlanmış ışık kullanan sirküler dikroizm geliştirilmiştir. Işığın polarlaştırmak için çeşitli yollar vardır. En bilineni düzlem polarlaştırma yöntemidir. Işık elektromagnetik dalga olarak birbirine dik elektrik (E) ve magnetik (H) alan bileşenlerinden oluşmuştur (Şekil 3-29). Eğer ışık bir polarlayıcıdan geçerse E vektörü tek yöne yönelebilir. Bu şekilde E vektör düzlemi ile polarizasyon düzlemi belirlenmiş ışık, düzlem polarlanmış ışık olarak adlandırılır (Tek düzlemde polarlanma).

Şekil 3-27. Kızılaltı spektrumu. Biyolojik moleküllere özğü kızılaltı (infrared) soğurum bantları. Sol ölçekte grupların kendi başlarına, sağ ölçekte ise hidrojen bağı kurmuş durumlarında soğurdukları dalga boyları görölmektedir.

İki düzlem polarlanmış dalga bir çeyrek (ya da yarım) dalga boyunda farklı fazlarda ise üst üste gelebilirler (Şekil 3-30). Bunun sonucu E vektörü bir sarmal çizerek döner. İşte ışığın frekansına bağı

olarak elektrik alanın bu rotasyonu **sirküler polarlanma** olarak adlandırılır.

Şekil 3-28. a. Işıltı (floresans)nın oluşumu.
b. Tirosine özgü floresansta uyarım ve yayım (emisyon) spektrumu.

Oluşan bu sirküler polarlanmış ışıktaki elektrik alan ya saat yönünde ya da tersi yönde dönebilir. Birincisi sağ sirküler, ikincisi sol sirküler polarlanmış ışık olarak adlandırılır.

Birçok biyomolekül asimetrik yapıdadır. L- ve D-amino asitler, sağ ve sol protein sarmallar, sağ ve sol nükleik asitler çift sarmalları gibi. Bu moleküller ışığı soğurduklarında sağ ya da sol sirküler polarlanmış

Şekil 3-29. Düzlem polarlanmış ışık.

Işık oluşturlar. Sağ sirküler polarlanmış ışık sağ α sarmal ile, sol sirküler polarlanmış ışıktan farklı biçimde etkileşime girer ve soğurumdaki **sirküler dikroizm (CD)** olarak adlandırılan farklılığı doğurur. Soğurumdaki bu farklılık,

$$\Delta A = \frac{A_C - A_R}{A}, \quad (3-20)$$

eşitliği ile belirlenir. Eşitlikte A_C , sol sirküler polarlanmış ışığın soğurumuna, A_R , sağ sirküler polarlanmış ışığın soğurumuna, A , polarlanmamış ışığın soğurumuna karşılık gelmektedir.

Şekil 3-30. Sirküler polarlanmış ışık.

ΔA pozitif ya da negatif değerde olabilir. Bu nedenle sirküler dikroizm spektrumu (CD spektrum), normal absorpsiyon spektrumundan farklıdır. Sirküler dikroizm spektrumu bir polipeptit için değişik yapılar gösterebilir (Şekil 3-31).

3.11.4. Nükleer magnetik rezonans

Elektronların çevresinde oluşan magnetik moment gibi atomun çekirdeğindeki nükleonların da kendi çevrelerinde dönme (spin) hareketinden dolayı bir magnetik moment oluşur. Nötron ve protonların magnetik moment değerleri (nötron için $-9,66 \times 10^{-27}$ Joule/Tesla, proton için $1,41 \times 10^{-26}$ Joule/Tesla) spinlerinin de birbirinden farklı olmasından dolayı birbirinin etkisini ortadan kaldıracak şekildedir.

Şekil 3-31. Bir polipeptidin değişik konformasyonlarının CD spektrumları.

Ancak tek sayıda nükleonu olan atomların spinleri ek bir magnetik dipol oluşturur. Bu tip atomlar küçük bir mıknatıs olarak düşünülebilir. Canlı sistemler H-1, Na-23, P-31, C-13, O-17, Fe-57 gibi tek sayıda nükleon içeren atomlardan meydana gelmiştir. Bu atomların herbiri için bir magnetik moment değeri vardır. Dolayısıyla bu çekirdeklerin herbiri

bir mıknatıs olarak kabul edilebilir (Şekil 3-32). Bu çekirdeklerin spin eksenleri çeşitli doğrultularda bulunur. (Bu magnetik momentlerin bileşenleri sıfır kabul edilebilir). Böyle çekirdeklerin bulunduğu sistemlere dışardan güçlü bir magnetik alan uygulandığında çekirdeklerin spin eksenleri aynı doğrultuya gelirler. Ancak bu arada magnetik alan doğrultusunda topacın yalpalanarak dönmesi gibi presesyon hareketi yaparlar (Larmour frekansı ile titreşme).

Şekil 3-32. Bir magnetik alanda magnetik moment değerleri.

Bu protonlara aynı frekansta bir radyo frekans (RF) dalgası yeterli sürede gönderildiğinde çekirdekler bir enerji alır ve titreşimlerinin genlikleri artar. Dönme eksenleri 90 ya da 180 derece sapar ve aldıkları enerji ile tüm çekirdekler aynı ekseninde presesyon hareketi yaparlar (Şekil 3-33). Bu olay **magnetik rezonans**tır. Burada rezonans magnetik

sistemin doğal frekansı ile dış etkenin frekansının uyum içinde olduğunu ifade etmektedir. RF dalgası kesildiğinde önceki duruma dönmeye başlar ve çevreye elektromagnetik dalga yayarlar. Bu dalgalar alıcı bobinler ile ölçülerek oluşan değerler bilgisayarlarla değerlendirilir.

Şekil 3-33. a) RF dalgası ile +2 ekseninden 90°C sapmış protonlar. b) RF dalgası ile +2 ekseninden 180°C saptırılıp -2 ekseninde salınım yapan protonlar.

İşte, bir magnetik sistem üzerine uygulanan bir magnetik alanla, bu sistemin sıfırdan farklı magnetik momentinin etkileşiminden doğan fiziksel olayların incelenmesi nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopisi tekniğini oluşturur. Yukarıda belirtildiği gibi, magnetik alan içindeki bazı atom çekirdekleri belirli frekanstaki radyo dalgaları ile uyarılırsa, soğurdıkları enerjinin bir kısmını radyo sinyalleri şeklinde yayarlar. Doğal frekans, magnetik alan içindeki sistemin magnetik momentlerin frekansı olarak tanımlanır. Dış etkenin frekansı radyo frekansı ya da mikrodalga enerjisi olabilir. Elektromagnetik spektrumun radyo frekans enerji bölgesine düşen doğal frekanslı magnetik rezonansa **NMR**, mikrodalga enerji bölgesine düşen doğal frekanslı magnetik

rezonansa da **elektron spin rezonans (ESR)** ya da **elektron paramagnetik rezonans (EPR)** denir.

NMR görüntüleme yöntemi olarak da kullanılır. Bu amaç için durgun magnetik alana ek olarak bir alan gradyenti de gerekir. Böylece magnetik sistemin (örneğin) farklı kısımları farklı şiddette magnetik alan etkisinde kaldıkları için farklı rezonansa ulaşır. Sonuçta elde edilen NMR sinyalleri örnek içindeki farklı doğrultularda uygulanmasıyla, örneğin iki ve üç boyutlu görüntüleri elde edilir.

4. Hücre yapıtaşları

4.1. Giriş

Kimyasal bağların oluşumuyla ortaya çıkan moleküllerin önemli bir bölümü canlılara özgüdür. Biyomoleküller olarak adlandırılan bu tür moleküller, temel maddeler olarak, dünyadaki 109 doğal elementin 27'sini, bunlar arasında da, 16'sını yaygın olarak içerir (Tablo 4-1). Bu elementlerden biyomoleküllerde özellikle yüksek oranlarda bulunan karbon, hidrojen, nitrojen ve oksijen aynı zamanda canlı sistemlerin özgün yapı düzenlerini belirler. Birbirleriyle kolaylıkla reaksiyona girerek kalımlı, yeni bileşikler oluşturan bu elementlerden karbon, nitrojen ve oksijen arasında çift kovalent bağlar da kurulabilir.

Biyomoleküllerin oluşumunda $n=2$ kabuğunda doldurulması gerekli dört yörünge taşıyan karbon atomu, çok özel bir konuma sahiptir. Karbon atomları birleşerek polimerleşebilir ya da halkasal moleküller oluşturabilir. Canlı sistemlerin iskeletini oluşturan bu tür karbon bileşiklerinde, boş yörüngeçlerin kolonlarının hidrojen, nitrojen, oksijen ya da sülfür atomları tarafından doldurulmasıyla ortaya çok farklı çeşitte molekül çıkar. Böyle moleküllerin merkezinde yer alan karbon atomunun uzayda üçgen prizma şeklinde dağılım gösteren elektron konfigürasyonu, biyomoleküllerin karmaşık üçboyutlu yapı düzenlerinin oluşumunda belirleyici rol oynar.

Yüksek oranda hidrojen içeriği, biyomoleküllerin diğer önemli bir özelliğini oluşturur. Bu tür indirgenmiş, yüksek enerji içerikli moleküller, canlı sistemlerde CO_2 , H_2O ve N_2 gibi küçük yalın moleküllerden enerji kullanımı ile oluşur.

Organik elementler	Eser elementler
O	Mn
C	Fe
N	Co
H	Cu
P	Zn
S	B
Monoatomik iyonlar	Al
Na ⁺	V
K ⁺	Mo
Mg ²⁺	I
Ca ²⁺	Si
Cl ⁻	Sn
	Ni
	Cr
	F
	Se

Tablo 4-1. Biyoelementler.

Karbon atomlarından türeyen biyopolimerler, canlı sistemlerin (hücrenin) ana yapıtaşları olan büyük moleküllere (makromoleküllere) karşılık gelir. Molekül ağırlıkları 10^3 - 10^9 dalton arasında değişen makromoleküller canlıların özyapıları olup, hücrede, yukarıda belirtildiği gibi, çevreden alınan küçük moleküllerden bir biyosentez süreci sonunda oluşur (Tablo 4-2). Makromoleküller, lipitler, karbonhidratlar (polisakkaritler), nükleik asitler ve proteinler olmak üzere dört sınıf molekülü kapsar.

Makromoleküllerin hücrenin altyapılarının oluşumunda oynadıkları yapıtaşı rollerinin yanında kendilerine özgü görevleri vardır. Bu bağlamda, nükleik asitler, kalıtsal bilgiyi şifrelenmiş biçimde saklama ve iletme görevlerini üstlenmiştir. Proteinlerin özel bir sınıfını oluşturan enzimler, hücre metabolizmasını yürüten ve yönlendiren katalitik nitelikli moleküllerdir. Karbonhidratlarla lipitler ise, canlılar için gerekli enerjiyi saklamakla görevlidir. Makromoleküllere böyle bir işlevsel açıdan bakıldığında, nükleik asit ve özellikle proteinlere karbonhidrat ve lipitlere oranla daha aktif görevlerin düştüğü görülür. Bu işlevsel farklılık, nükleik asitler ve proteinlerin birden fazla çeşitte yapı taşından oluşması ve yapı taşlarının bu makromoleküllerde özgün biçimde dizilmiş olmasından kaynaklanır. Örneğin, nükleik asitler dört değişik çeşit nükleotidin, proteinler ise 20 farklı amino asidin özgün sıralara göre dizilmeleriyle oluşur. Farklı çeşit yapı taşlarının farklı dizilimleriyle oluşan bu tür moleküller, içerdikleri bilgi nedeniyle, informatif makromoleküller olarak tanımlanır. Karbonhidrat ve lipitlerin yapı taşlarının sıralanmasında bu tür bir özellik görülmez. Karbonhidratlar genelde tek tip bir yapıtaşının (örneğin glikozun) ardaşık ya da iki farklı

çeşit yapıtaşının dönüşümlü dizilimiyle oluşur. Lipitlerin ana ögesi yağ asitleri ise, yinelenen ve iki karbon atomlu birimlerden meydana gelir.

Makromoleküllerin iyonik bağlar, van der Waals bağları ya da hidrojen köprüleri gibi zayıf bağ çeşitleri aracılığıyla birleşmeleriyle

Ortamdan alınan maddeler	Ara maddeler	Makromolekül yapıtaşları	Makromoleküller	Supramoleküller	Organeller
Molekül ağırlık: 18-44 dalton	Molekül ağırlık: 50-250 dalton	Molekül ağırlık: 100-350 dalton	Molekül ağırlık: 10^3 - 10^9 dalton	Molekül ağırlık: 10^6 - 10^9 dalton	
C ₀ ₂	riboz, karbamil-fosfat	mononükleotidler	nükleik asitler (DNA, RNA)	enzim kompleksleri, ribozomlar, membran, kromatin	çekirdek mitokondri
H ₂ O	α -ketoasitler	amino asitler	proteinler		
N ₂	fosfopiruvat, kalat	basit şeker molekülle	polisakkaritler (karbonhidratlar)		
	asetat, malonat.	yağ asitleri	lipitler		

Tablo 4-2. Hücresin molekül altyapılarının hiyerarşik düzeni.

frekansta bir radyo frekans (RF) dalgası **supramoleküller** adı verilen ve molekül ağırlıkları 10^6 - 10^9 dalton arasında değişen hücre altyapıları çıkar. Protein ve lipidlerin birleşmesiyle oluşan membranlar, DNA ve protein etkileşimleriyle oluşan kromatin , RNA ve proteinlerden oluşan ribozomlar supramoleküllerin başlıca temsilcileri arasında sayılabilir. Supramoleküller arasındaki birleşmeler sonucu ise, en gelişmiş ve karmaşık hücre altyapıları olan (çekirdek, mitokondri ve lizozom gibi) organeller meydana gelir.

Makromoleküller hücre kütlesinin yaklaşık 1/3'ünü meydana getirir ve hücre kütlesindeki oranları açısından sudan sonra ikinci sırada yer alırlar. Günümüze değin bulunmuş 5000'in üstünde biyomolekülün yaklaşık yüzde doksanı makromoleküllere karşılık gelir, bunların arasında proteinler 3000'in üstünde değişik çeşit molekül ile en ön sırada yer alırlar (Tablo 4-3).

4.2. Su

Hücre yapıtaşları arasında su, hücre kütlesindeki payı bakımından en ön sırada bulunur ve hücre kütlesinin yaklaşık yüzde yetmişini oluşturur. Su, hücrenin hemen tüm metabolik olaylarının gerçekleştiği bir ortam olup, çeşitli tepkimelere doğrudan katılır ve yine bazı tepkimelerin ürünü olarak ortaya çıkar. Suyun hücre altyapıları ve hücre yapıtaşlarıyla etkileşmesi ise, bu moleküllerin doğal üçboyutlu yapılarını ve hücrenin molekül sel düzenini belirler. Fiziksel ve kimyasal özellikleri açısından suyun sıvılar arasında ayrıcalıklı bir yeri bulunur. Su, diğer sıvılara oranla daha yüksek bir özgül ısıya, daha yüksek bir

Molekül	Toplam hücre kütlesine oranı (%)	Ortalama molekül ağırlık (dalton)	Hücre-deki yaklaşık sayıları	Çeşit sayısı
H ₂ O	70	18	4×10^{10}	1
İnorganik iyonlar	1	40	$2,5 \times 10^8$	20
Karbonhidratlar ve öncüleri	3	150	2×10^8	200
Amino asitler ve öncüleri	0,4	120	3×10^7	100
Nükleotitler ve öncüleri	0,4	300	$1,2 \times 10^7$	200
Lipitler ve öncüleri	2	750	$2,5 \times 10^7$	200
Diğer küçük moleküller (hem, besin molekül-lerinin kırılma ürünleri, vb.)	0,2	150	$1,5 \times 10^7$	250
Proteinler	15	40,000	10^6	2000-3000
Nükleik asitler				
DNA	1	$2,5 \times 10^9$	4	1
RNA	6			
16S rRNA		500,000	3×10^4	1
23S rRNA		1,000,000	3×10^4	1
tRNA		25,000	4×10^5	60
mRNA		1,000,000	10^3	1000

Tablo 4-3. E.coli hücresinin yaklaşık kimyasal içeriği.

erime, kaynama ve buharlaşma ısılarına , daha yüksek bir yüzey gerilim enerjisine ve dielektrik dursayısına sahiptir. Bütün bu nitelikleri su moleküllerinin arasındaki kohezyon (türdeş yapışma) güçlerinin diğer sıvılara oranla daha yüksek olmasından kaynaklanır. Su moleküller arasında görülen güçlü ilginliğin nedenini bu moleküllerin dipolar yapısında aramak gerekir.

Oksijen atomunun dış elektron kabuğundaki iki değerlik (valenz) elektronu, hidrojen atomlarının elektronlarıyla kovalent bağlar kurarken, oksijenin diğer dış yörüngeçlerinde bulunan elektronlar çekirdeğe yaklaşarak su molekülünün oksijen bölümünü sınırlı elektronegatif duruma getirir. Buna koşut olarak, hidrojen atomları sınırlı elektropozitif yüke bürünür. Su molekülünü temsil eden bir modele bakıldığında, elektrostatik yükün bir üçgen prizmanın dört köşesine dağılmış olduğu görülür (Şekil 4-1). Hidrojen atomları üçgen prizmanın iki ucunda, oksijen yörüngeçleri tarafından oluşturulan iki elektronegatif yük merkezi de üçgen prizmanın diğer iki ucunda yer alır. Oksijen atomunun çekirdeği ise, üçgen prizmanın merkezinde bulunur. Su molekülünün elektrik yükünün bu dört yönlü dağılımı sonucu, her bir su molekülü etrafında dört komşu su molekülü gruplaşır. Elektrostatik kutuplaşma, su molekülleri arasındaki (dipol-dipol etkileşimine dayalı) hidrojen köprülerinin kurulmasına yol açar. Sıvı fazında su molekülleri arasında bu gruplaşma dinamik niteliklidir. Su molekülleri zaman zaman birleşip, yeniden ayrışır. Gruplaşma eğilimi, suyun donması durumunda üstünlük kazanır ve suyun kristal yapısı olan buz parçacıkları ortaya çıkar. Katı hale geçmesiyle suyun biyolojik sistemler için büyük önem taşıyan diğer ayrıcalıklı bir özelliği ortaya çıkar. Su, bütün sıvılar arasında katı (yani

buz) haline geçtiğinde yoğunluğu azalan tek sıvıdır. “Su yüzeyden donar” deyimiyle anlatılan bu mekanizma okyanuslardaki yaşamın, evrim sürecinde, başlıca güvencesini oluşturmuştur.

Şekil 4-1. Suyun molekül yapısı.

4.2.1. Suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri

4.2.1.1. Suyun özgül ısısı

Özgül ısı ile, maddenin ısı içeriğinin kütlesine ve sıcaklık değişikliğine olan oranı anlaşılır.

$$c \text{ (özgül ısı)} = \frac{Q}{m \cdot \Delta T} \quad (4-1)$$

$c_{su} = 10^3 \text{ cal.kg}^{-1} \cdot ^\circ\text{K}^{-1}$ (ya da $1 \text{ kcal.kg}^{-1} \cdot ^\circ\text{K}^{-1}$ olarak yazılabilir)

$Q = \text{ısı (cal)}$

$m = \text{kütle (g)}$

$T = \text{sıcaklık (}^\circ\text{K)}$

Suyun özgül ısısı bir gramda ve bir derece Kelvin başına bir kaloriye eşit olup, bu değer genelde diğer sıvıların özgül ısılarının yaklaşık iki katına karşılık gelir (Tablo 4-4). Buna göre su, biyolojik koşullara uygun bir ısı deposu (“termoregülatör”) niteliği göstermekte ve ısınıp dış sıcaklık değişikliklerine karşın koruyabilmektedir. Varlıkları dar bir sıcaklık aralığına göre ayarlanmış olan canlılar için bu özellik çok büyük bir önem taşır.

Sıvılar	Özgül Isı (c) kcal.kg ⁻¹ .°K ⁻¹
Su(14,5-15,5°C'ta)	1,0
Etilalkol(10-30°C'ta)	0,58
Etileter(10-30°C'ta)	0,52
Benzol	0,41
Petrol	0,57
Gliserin	0,24

Tablo 4-4. Bazı sıvıların özgül ısıları.

4.2.1.2. Suyun buharlaşma ısısı

Buharlaşma ısısı, bir sıvıyı buharlaştırmak için sıvı kütlesi başına gereken ısı miktarıdır.

$$q_v \text{ (buharlaşma ısısı)} = \frac{Q}{m} \quad (4-2)$$

-

Suya özgü buharlaşma ısısı 100°C'ta 539 cal/g'dır. Bir karşılaştırma suyun buharlaşma ısının da diğer sıvılarınkine oranla birkaç kat daha yüksek olduğunu gösterir (Tablo 4-5).

Sıvılar	cal.g ⁻¹
Su	539
Metanol	263
Etanol	204
N-propanol	164
Aseton	125
Benzin	94
Kloroform	59

Tablo 4-5. Bazı sıvıların buharlaşma ısıları.

Suyun yüksek özgün buharlaşma ısısı, kendisini kaynama noktasının yüksekliğinde (=100°C ya da 373°K) göstermektedir. Buharlaşma ısısı da bir sıvının moleküllerini birbirlerinden ayırmak için gerekli enerji miktarının ve dolayısıyla moleküller arası bağların gücünün bir ölçüsü olarak düşünülebilir.

4.2.1.3. Suyun erime ısısı

Suyun yüksek erime ısısı da biyolojik çevrenin kararlılığı için önem taşır. Ayrıca hücresel suyun çok miktarda erimiş tuz ve değişik

polar nitelikli madde içermesi nedeniyle donma olasılığı düşüktür.

Çözülmüş maddelerin derişimlerine bağılı olarak suyun donma noktası 0°C'in altına inebilir. Ancak, çevre sıcaklığı çok fazla alçaldığında, donma sırasında sudan serbestlenen ısı canlının vücut sıcaklığındaki düşüşü yavaşlatır. Çünkü, suyun donması ısı salan bir olay olup, 1 g su 0°C'ta donarken, 1°C'tan 0°C'a düşmesi için gerekenden 80 kat daha fazla ısı verir. Başka bir deyimle, 1 g buz 0°C'ta su yapmak için verilecek ısı 80 cal/g'dır.

4.2.1.4. Suyun dielektrik dursayısı

Suyun çözücü özelliğı, onun yüksek dielektrik dursayısından (ϵ) kaynaklanır. Suyun elektriksel geçirgenliğinin bir ölçüsü de olan dielektrik dursayısı ile birbirinden belirli bir uzaklıkta (r) bulunan iki karşıt yüklü partikül (q_1, q_2) arasındaki elektrostatik çekime (F) karşı koyan ortam gücü anlaşılır (bkz. eşitlik 2-2).

$$F = \frac{q_1 \cdot q_2}{\epsilon \cdot r^2} \quad (\epsilon_{\text{vakum}} = 1 \text{ iken, } \epsilon_{\text{su}} = 80) \quad (4-3)$$

Dielektrik dursayısı yüksek olan bir ortamda iki ters yükün aralarındaki çekme gücü zayıflar. Su içinde, vakum ya da havaya göre, bu çekim 1/80'e iner. Dolayısıyla, tuz su içine konduğunda, Na^+ ile Cl^- iyonlarına ayrışır. Çeşitli sıvıların dielektrik dursayıları Tablo 4-6'da verilmektedir.

4.2.1.5. Suyun çözücü özelliği

Dipolar niteliğiyle su, hücrede bulunan polar moleküllere ve tuzlara özgü en etkili bir çözücü olarak işlev görür. Dipolar su molekülleri,

	Kaynama noktası °C	Erime noktası °C	Özgöl ısı kcal/kg°K	Dielektrik sabiti (20°C)	Yüzey gerilim dyn/cm	yoğunluk g/ml
H ₂ O	100	0	1,000	78,55	69,56	1,000
H ₂ O ₂	152	- 0,89	0,578	86	71,7.	1,4649
Aseton	56,5	- 95	0,506	21,4	21,16	0,8186
Etil alkol	78,5	-114,6	0,581	25,7	20,60	0,7893
Karbon tetraklorür	76,0	- 22,8	0,198	2,24	24,33	1,5954
Benzen	80,0	5,51	0,406	2,28	26,26	0,879

Tablo 4-6. Bazı sıvıların fiziksel özellikleri.

tuzun ters elektrik yüklerine sahip ve dolayısıyla elektrostatik çekim ile birbirine bağlı bölümleri (iyonlar) arasına girerek bunları birbirlerinden ayırır. Suyun sınırlı elektronegatif oksijen atomu (artı yüklü) katyonlar üzerinde, suyun sınırlı elektropozitif hidrojen atomları ise (eksi yüklü) anyonlar üzerinde birer örtü meydana getirerek bu ayrışımı gerçekleştirirler (Şekil 4-2). **Hidratlaşma** adı verilen bu mekanizma hücre membranlarından iyonların transportunda da önemli bir rol oynar. Suda çözülmeyen bir biyolojik madde grubunu ise hidrokarbon molekülleri oluşturur. Ancak, bir hidrokarbon molekülünün tek bir hidrojen grubu yerini bir karboksil, hidroksil, amino ya da karbonil grubuna bıraktığında, bu polar grupla su molekülleri arasında kurulu hidrojen köprüleri, bu maddelerin de suda çözünmesine yol açar. Hidratlaşma, suyun yüksek dielektrik dursayısından (ϵ) kaynaklanır.

Şekil 4-2. Suyun hidratlaşma özelliği.

4.2.1.6. Suyun iyonlaşması

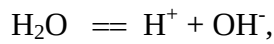
İyonlaşma suyun diğer bir özelliğini oluşturur. Çok seyrek olarak su molekülünün hidrojen atomlarından biri elektronunu kovalent bağlı olduğu oksijen atomuna bırakarak komşu bir su molekülüne geçer. Böyle bir olay sonucu bir H_3O^+ (hidronyum) ve bir OH^- (hidroksil) iyonu

oluşur. Hidratlaşma mekanizması tıpkı diğer iyonlar gibi bu iyonların da iyonlaşmamış H₂O molekülleri tarafından ayırık tutulmasını sağlar. Bir arı su içinde ve 25°C'ta bu iyonların herbirinin derişimi 10⁻⁷ M'dır. Sudaki hidronyum derişimi genellikle H⁺ yani proton derişimi olarak anlatılır. Genelde, sudaki protonların (1 M'a dek) derişimlerinin anlatımında derişimin negatif logaritması (pH) kullanılır:

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = -\log[\text{H}^+] \quad (4-4)$$

Buna göre, arı suyun normalde pH'sının 7,0'ye eşit olması gerekir. Kuramsal açıdan bu husus geçerli olmakla birlikte, laboratuvarında uzunca bir süre durmuş arı suyun pH'sının genellikle 5 civarında olduğu görülür. Bunun nedeni havadaki CO₂'in su içinde zamanla çözünerek H₂CO₃'e dönüşmesi ve pH değerini düşürmesidir. pH'nın negatif logaritmik niteliğinin ışığında CO₂'in çözünmesi sonucu suyun pH'sının 7'den 5'e düşmesi, sudaki proton derişiminin 100 kat arttığını anlatmaktadır. Arı suyun kendiliğinden ayrışmasıyla ortaya çıkan pH değeri, yani pH= 7, bu olayın ayrışım dursayısından (K) hareketle de hesaplanabilir.

Suyun ayrışımında,



denge sola kaymıştır.

Ayrışım denge dursayısı;

$$[\text{H}^+] [\text{OH}^-]$$

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \quad (4-5)$$

eşitliği ile saptanır. Bu eşitlik,

$$[H_2O] K = [H^+][OH^-], \quad (4-6)$$

olarak yazılabilir.

Suyun ayrışım denge dursayısı,

$$K = 1,8 \times 10^{-16} \text{ M ve}$$

$$1 \text{ litre sudaki } H_2O \text{ moleküllerinin derişimi} = [H_2O] = \frac{1000}{18} = 55,5 \text{ M,}$$

olduğuna göre,

$$K_{su} = [H_2O] K = \text{suyun iyonlaşma ürünü,}$$

$$K_{su} = 55,5 \times 1,8 \times 10^{-16} = [H^+][OH^-],$$

$$10^{-14} = [H^+][OH^-],$$

hesaplanır. Suyun iyonlaşması eşit derişimlerde H^+ ve OH^- iyonları vereceğine göre,

$$[H^+] = [OH^-].$$

Bu nedenle,

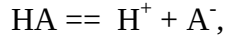
$$10^{-14} = [H^+]^2,$$

olarak yazılır ve

$$10^{-7} \text{M} = [\text{H}^+] \text{ ya da } \text{pH} = 7,$$

bulunur.

Suyun iyonlaşması konusu çerçevesinde, asit ve baz kavramlarının tanımlanması uygun olacaktır. Brönsted-Lowry tanımına göre, asit ile bir proton vericisi, baz ile ise bir proton alıcısı anlaşılır. Lewis tarafından önerilen ve daha geniş bir uygulama sahası bulan bir tanıma göre ise, asit ile bir elektron çifti alıcısı, baz ile de bir elektron çifti vericisi anlaşılır. Her iki tanıma göre de asit-baz reaksiyonu her zaman için bir asit-baz çiftinin varlığını gerektirir, örneğin CH_3COOH ve CH_3COO^- . Brönsted-Lowry kavramına göre asitlerin protonlarına ilginlikleri asitlik güçlerine ters orantılıdır. Asitlerin ayrışımı, yani protonlarını bir alıcıya aktarmaları da bir denge reaksiyonu olup,



(K) ile asidin ayrışım dursayısı anlatılır:

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} . \quad (4-7)$$

Asidin protonlarına ayrışma eğilimini yansıtan bu dursayının negatif logaritması (pH'da olduğu gibi) pK değeri olarak gösterilir. Bu eşitliğin yeniden düzenlenerek iki yanının logaritmasının alınması sonucu Henderson-Hasselbalch eşitliği elde edilir.

$$[H^+] = K \frac{[HA]}{[A^-]}, \quad (4-8)$$

$$-\log [H^+] = -\log K - \log \frac{[HA]}{[A^-]}, \quad (4-9)$$

$$pH = pK - \log \frac{[HA]}{[A^-]}, \quad (4-10)$$

$$pH = pK + \log \frac{[A^-] \text{ (= proton alıcı = baz(tuz))}}{[HA] \text{ (= proton verici = asit)}}. \quad (4-11)$$

Bu denkleme göre asit ve baz derişim oranlarının eşit olduğu, yani iyonlaşmış asidin derişiminin iyonlaşmamış asidin derişimine eşit olduğu

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 1 \text{ ya da } \log 1 = 0 \text{ durumunda, } pH = pK \text{ olmaktadır.}$$

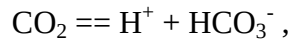
Buna göre, bir asidin pK değeri, asidin yarı yarıya iyonlaştığı pH değerine karşılık gelir. Henderson-Hasselbalch eşitliği belirli bir pH değerindeki baz/asit derişim oranından pK değerinin ve belirlenen

baz/asit derişim oranından ve asidin bilinen pK değerinden pH değerinin hesaplanmasını sağlar. Bu eşitlik zayıf asitler ve onların tuzları için geçerlidir. Zayıf bir asit bir baz ile titre edildiğinde, eklenen küçük miktar OH⁻ iyonlarının belirli bir pH bölgesinde pH değerlerini çok az etkilediği görülür. pH'nın çok az etkilendiği bu bölge asidin pK'sına karşılık gelir. Böyle bir asit ve onun tuzunu içeren eriyiğin, asit ve baz eklenmelerine karşın, pK değerine karşılık gelen bölgede pH değerini değiştirmeme özelliği tampon etkisi olarak tanımlanır.

En yüksek tampon etkisi pK değerine karşılık gelen pH bölgesinde, ya da Henderson-Hasselbalch eşitliğinin incelenmesiyle de anlaşılaçağı gibi, proton alıcısının (baz) ve proton vericisinin (asidin) molar derişimlerinin eşit olduğı koşullarda elde edilmektedir. Tampon sistemlerini oluşturan zayıf asit-baz (tuz) sistemlerinde, güçlü bir bazın eklenmesiyle, zayıf asidin ayrışmış protonları OH⁻ iyonlarıyla reaksiyon göstererek, pH'nın değişmesini önlemektedir. H⁺ iyonlarının eklenmesi durumunda ise, sistemdeki tuzun anyonları H⁺ ile reaksiyona geçerek zayıf bir asidin oluşmasına yol açmaktadır.

Organizmada pH'yı sabit tutmakla görevli çeşitli tampon sistemleri bilinmektedir. Bunların arasında başlıca hücre içi tampon sistemleri olarak, H₂PO₄⁻ - HPO₄²⁻ sistemi (pK= 7,2) ve H₂CO₃-HCO₃⁻ (pK= 3,8) sistemi sayılabilir. pH'nın belirli bir değerde (7,4'te) tutulması pH değişmelerine büyük duyarlık gösteren enzimlerin (ve diğer proteinlerin) işlerliği açısından yaşamsal bir önem taşır. Nitekim, patolojik durumlarda görülen pH kaymaları onarımı olanaksız bozukluklar meydana getirebilmektedir. İnsanda, akciğer ve böbrekler aracılığıyla gerçekleşen

düzenlenme mekanizmalarıyla yakın bağlantılı işleyişi açısından ($\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$) tampon sisteminin özgün bir konumu vardır. Bu sistemin pK değeri, görüldüğü gibi, asidik bir bölgede bulunmakta ve fizyolojik pH'da (pH 7,4) bu sistemin tampon etkisi olarak dışı gibi gözükmemektedir. Ancak, burada bikarbonat sisteminin tamponlar arasında özel bir yeri olduğu ve H_2CO_3 'ün suda çözünmüş CO_2 ile dengede olduğu gözönünde bulundurulmalıdır. Çözünmüş CO_2 derişimi, H_2CO_3 derişiminden yaklaşık 1000 kat daha yüksek olduğuna göre ayrışım reaksiyonu,



ve denge dursayısı,

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} , \quad (4-12)$$

şeklinde yazılabilir. Bikarbonat sisteminin bu ikinci pK değerinin karşılığı olan pH 6,1'dir. Bikarbonat sisteminin en güçlü tampon etkisini göstereceği, yani CO_2 'in HCO_3^- 'a eşit olacağı, pH bölgesi buna göre de nötral pH'nın altında kalmaktadır. pH 7,4'te Henderson-Hasselbalch eşitliğine göre,

$$7,4 = 6,1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]},$$

$$1,3 = \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]}.$$

Her iki tarafın antilogaritması alınırsa,

$$20 = \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]},$$

bikarbonat iyonlarının derişimi çözümlü CO_2 derişiminden 20 kat yüksek olacak demektir. $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ sisteminin, buna karşın, yeterince tampon etkisi gösterebilmesi akciğerlerdeki CO_2 varlığıyla açıklanabilir. Metabolik koşullarda ortaya çıkacak bir baz fazlalığı ilk anda H_2CO_3 ve çözümlü CO_2 miktarının tükenmesine yol açsa bile, çözümlü CO_2 derişimindeki azalma, akciğer CO_2 deposu sayesinde en kısa sürede düzeltilir. Böylece, $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oranının 20/1 olarak sabit kalabilmesi sağlanır. Ortaya çıkacak bir asit fazlalığında ise, H_2CO_3 ve çözümlü CO_2 miktarındaki artış CO_2 'in akciğerlerden solutulmasıyla dengelenir.

4.3. Makromoleküller

4.3.1. Giriş

Yukarıda açıklandığı gibi, makromoleküller hücre altyapılarının oluşmasında yapıtaş rolü oynar, bunun ötesinde özgün işlevler de üstlenirler. Bu bağlamda, nükleik asitler kalıtsal bilgiyi saklayıp, iletmekle görevlidir. Proteinlerin özel bir sınıfını oluşturan enzimler hücre metabolizmasını yürüten ve hücre yapıtaşlarını oluşturan katalitik nitelikte moleküllerdir. Karbonhidratlar ve lipitler ise organizma için gerekli enerjiyi saklama görevini üstlenmişlerdir. Makromoleküllere işlevsel açıdan bakıldığında hücre içinde özellikle nükleik asit ve proteinlere aktif bir rolün düştüğü, karbonhidrat ve lipidlerin ise enerjinin depolandığı görece pasif molekül niteliğini taşıdıkları görülür. Nükleik asit ve proteinler ile karbonhidrat ve lipitler arasındaki bu farklılıklar özelliklerinden kaynaklanır. Nükleik asit ve proteinler birden çok çeşitte yapıtaşından özgün bir bilgi taşıyan sırayla (şifreli olarak) dizilimleri sonucu oluşur. Buna karşın, karbonhidrat ve lipitler genellikle aynı yapıtaşının, ya da iki çeşit yapıtaşının dönüşümlü olarak, ardışık dizilmesiyle oluşur. Bu bölümde makromoleküller daha ayrıntılı olarak ele alınacak, bu moleküllerin yapı-işlev ilişkilerine ışık tutulmaya çalışılacaktır.

4.3.2. Proteinler

Geçen yüzyılın sonunda Berzelius tarafından belirlenmiş olan adlarının (πρωτος (=birinci)) da vurguladığı gibi, proteinler, makromoleküller (ve tüm hücre yapıtaşları) arasında çok öncelikli bir

konuma sahiptir. Proteinlerin bazıları (örneğin suda çözünme yeteneğinden yoksun kollagen, elastin ve keratin gibi proteinler) hücrenin oluşumunda salt bir yapıtaş olarak işlev görür (yapısal proteinler). Diğer bazı proteinler ise, özgün üçboyutlu yapıları sayesinde molekülleri tanıma, onlarla etkileşerek, hücredeki olaylara yön verme etkinliğine sahiptir. Bu ikinci sınıfa giren (etkin ya da aktif) proteinlerin ortak özelliği **ligant** adı verilen, kendilerine özgü maddeleri bağlama yetenekleridir. Bağladıkları ligandın özelliklerine, onu tabi tuttukları işleme ve liganda bağlanmaları sonunda meydana gelen tepkimelere göre, bu proteinler de çeşitli gruplara ayrılabilirler.

Enzimler (katalitik proteinler): Bu proteinler **substrat** adı verilen ligantlarını bağlayarak kimyasal bir değişime uğratır.

İmmunproteinler: Bu proteinler **antijen** adı verilen makromoleküler nitelikli ligant yapıları geri dönüşümsüz bir etkileşim ile bağlayarak sabitleştirirler.

Protein hormonlar: Etkilerini gösterdikleri hücrelerin membranlarındaki kendilerine özgü proteinlere (reseptörlere) geridönüşümlü olarak bağlanırlar.

Düzenleyici proteinler: Ligantlarına bağlanmaları geridönüşümlü olup, ligandın biyolojik etkinliğinin değişmesiyle sonuçlanır.

Taşıyıcı proteinler: Kendilerine özgü ligandı geridönüşümlü olarak bağlayıp, canlı sistemin bir bölümünden diğer bölümüne taşımakla görevlidirler.

Kontraktil proteinler: Liganda bağlanmaları mekanik işin gerçekleşmesiyle sonuçlanır.

4.3.2.1. Proteinlerin yapısal özellikleri

Proteinler, 20 çeşit amino asidin peptit bağları olarak adlandırılan kovalent bağlarla birleşmesi sonucu oluşur. Amino asitler bir metan molekülünün hidrojen atomlarının üçünün yerlerini sırasıyla bir karboksil grubu, bir amino grubu ve bir kalıntıya (R grubuna) bırakması sonucu oluşmuş olarak düşünülebilir.

Amino asitlerin merkezinde yer alan (α -)karbon atomu üzerindeki dört grubun asimetric dağılımı ayna görüntüsü izomerisine yol açar (Şekil 4-3). Sterik açıdan amino asitler D- ve L- tiplerine ayrılır. Proteinlerde yalnız L- tipi amino asitler bulunur.

Şekil 4-3. L-Amino asidin atomlarının uzaysal gösterimi.

Amino asitler arasındaki farklılığı R-grubunun değişen yapısı belirler. R-grubunun elektro-kimyasal özelliklerine göre amino asitleri dört sınıfa ayırmak olanaklıdır (Şekil 4-4).

1. Apolar ya da hidrofobik R-grupları içeren amino asitler:

Bu amino asitlerin R-grupları alifatik bir zincir ya da aromatik bir halkadan oluşur. Temsilcileri arasında alanin, valin, lösin, izolösin, prolin, fenilalanin ve triptofan bulunur.

Şekil 4-4a. Apolar R-gruplar içeren amino asitler.

Şekil 4-4b. Asidik ve bazık nitelikte R-grupları
içeren amino asitler.

Şekil 4-4c. Polar R-grupları içeren amino asitler.

2. Açık bir elektrik yükü taşımayan, ancak polar nitelikte R-grupları içeren amino asitler:

Bu amino asitlerin R-gruplarının içerdğđ hidroksil (-OH), sülfidril (-SH) ya da amit (CONH₂) grupları gibi polar gruplar H₂O ile hidrojen bağları kurabilirler. Böylece bu amino asitler ilk grup amino asitlerine oranla suda kolaylıkla çözölürler. Bu grubun temsilcileri arasında hidroksil grubu içeren serin, treonin ve tirosin, sülfhidril grubu içeren sistein ve amit grubu içeren asparagin ve glutamin bulunur.

3- R-grubu negatif elektrik yüklü (yani asidik) amino asitler:

Bu sınıfın temsilcileri olan aspartik asit ya da glutamik asit, ikinci bir karboksil grubu içermeleri nedeniyle nötral pH'da açık negatif yüke sahiptir.

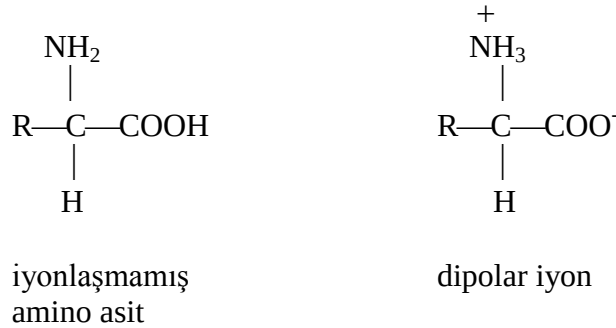
4- R-grubu pozitif elektrik yüklü (yani bazik gruplar) amino asitler:

Bu amino asit sınıfı ikinci bir amino grubu taşıyan lisini, guanidyum grubu içeren arginini ya da zayıf bazik nitelikte imidazol grubunu içeren histidini kapsar.

4.3.2.2. Amino asitlerin asit-baz özellikleri

Amino asitler nötral (pH 7,4) bir su eriyiğinde, gerek karboksil ve gerekse amino gruplarının iyonlaşmış olması nedeniyle dipolar bir iyon şeklinde bulunur (Şekil 4-5).

Amino asitlerin dipolar iyon özelliği, onların görece yüksek (~200°C) erime noktalarında yansır. Amino asit molekülleri arasındaki etkileşim (Na^+Cl^- örneğinde görüldüğü gibi) karşıt elektrik yüküne sahip gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimle kalımlılaşır.

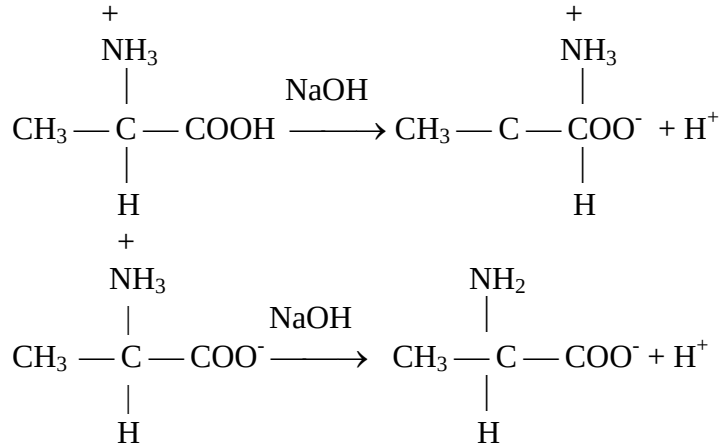


Şekil 4-5. İyonlaşmamış ya da dipolar iyon şeklindeki amino asitler.

Brönsted-Lowry'ye göre alanin gibi tek bir karboksil ve tek bir amino grubu taşıyan basit bir amino asit dibazik (yani iki pK değerine sahip) bir asit olarak tanımlanabilir. Zira alanin, karboksil ve amino gruplarının proton yüklü olduğu asidik bir ortamda ($\text{pH} \approx 1$) bazla, örneğin NaOH ile, titre edilebilen iki gruba (başka bir deyimle verebileceği iki protona) sahiptir:

Nitekim, alanin eriyiği, eklenen OH^- iyonlarının etkisiyle karboksil grubunun pK'sının karşılığı olan pH 2,3'te ve amino grubunun pK'sının karşılığı olan pH 9,7'de, tamponlama özelliği gösterir (Şekil 4-6).

Alaninin titrasyon eğrisinin simetrik iki kolunun birleştiği orta (dönüm) noktası ($\text{pH} = 6,0$), COO^- - ve NH_3^+ - gruplarının taşıdıkları artı ve eksi yüklerin eşit olduğu ve amino asidin net bir elektrik yükü taşımadığı izoelektrik pH'ya (ya da izoelektrik noktaya (pI)) karşılık gelir. Genellikle pI'nın pK değerlerinin ortalamasına eşit olduğu söylenebilir.



Şekil 4-6 . Alaninin NaOH ile titrasyonu.

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} . \quad (4-13)$$

Buna göre alaninin izoelektrik noktasını aritmetiksel olarak hesaplamak olanaklıdır.

$$pI_{\text{alanin}} = \frac{2,3 + 9,7}{2} = 6,0$$

R-grupları net bir elektrik yükü taşıyan amino asitlerde, bu gruplara özgü, üçüncü bir pK (pK_R) değeri bulunur. Asidik R-grupları

taşıyan amino asitler (glutamik asit ya da aspartik asit)de pK_R değeri pH 4,0 civarında bulunur. Bazik R-gruplarına sahip amino asitlerin pK_R değeri ise gruba göre pH 6,0 ile pH 12,0 arasında değişir (Tablo 4-7).

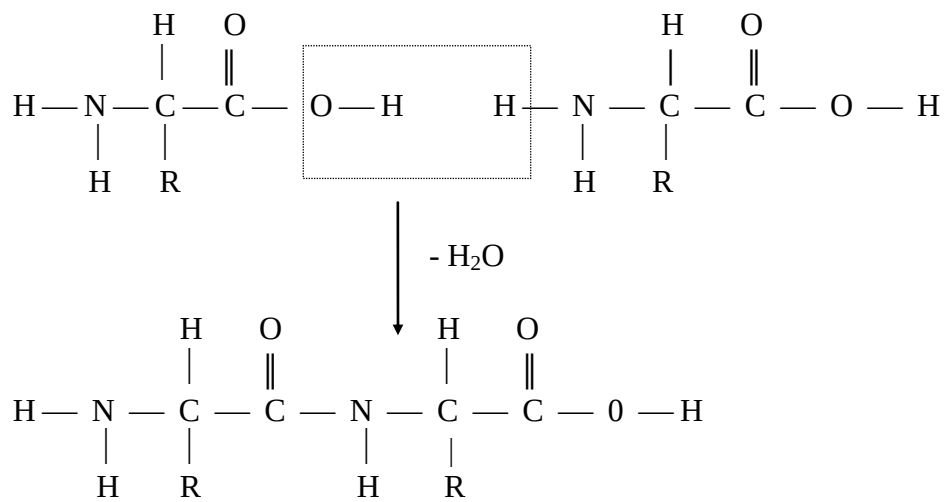
4.3.2.3. Peptit bağı

Belirtildiği gibi, proteinler amino asitlerin birbirleriyle peptit bağları adı verilen kovalent bağlarla birleşmeleri sonucu oluşurlar. Peptit bağı bir amino asidin karboksil grubu ile ikinci bir amino asidin amino grubu arasından bir H_2O molekülünün açığa çıkması sonunda meydana gelir.

Peptit bağı, çift kovalent bağ özelliklerini taşır (Şekil 4-7). Bu özellikler C-N bağının eksenini boyunca dönüş yeteneğini büyük ölçüde kısıtlar ve bağı oluşturan ögelerin bir düzlem üzerinde yer alması ile sonuçlanır (Şekil 4-8). Karbonil ($-C=O$) ve imino ($-N-H$) grupları bu düzlem üzerinde genelde paralel bir konumda bulunur.

Şekil 4-7. Peptit bağında elektron bulutu. Çift kovalent bağ niteliği veren π yörüngeçleri.

Şekil 4-8. Peptit bağlarının yapısı. Bağ uzaklıkları nm olarak verilmiştir.



Adı	α -Karboksil grubunun pK_a değeri	α -Amino grubunun pK_a değeri	İyonlaşmış yan zincirlerin pK_a değeri	Kalıntıların kütlesi (Dalton)	Proteindeki miktarı (mol %)
Alanin	2,3	9,7	-	71,08	9,0
Arginin	2,2	9,0	12,5	156,20	4,7
Asparagin	2,0	8,8	-	114,11	4,4
Aspartik asit	2,1	9,8	3,9	115,09	5,5
Sistein	1,8	10,8	8,3	103,14	2,8
Glutamin	2,2	9,1	-	128,14	3,9
Glutamik asit	2,2	9,7	4,2	129,12	6,2
Glisin	2,3	9,6	-	57,06	7,5
Histidin	1,8	9,2	6,0	137,15	2,1
İzolösin	2,4	9,7	-	113,17	4,6
Lösin	2,4	9,6	-	113,17	7,5
Lisin	2,2	9,0	10,0	128,18	7,0
Metionin	2,3	9,2	-	131,21	1,7
Fenilalanin	1,8	9,1	-	147,18	3,5
Prolin	2,0	10,6	-	97,12	4,6
Serin	2,2	9,2	-	87,08	7,1
Treonin	2,6	10,4	-	101,11	6,0
Triptofan	2,4	9,4	-	186,21	1,1
Tirosin	2,2	9,1	10,1	163,18	3,5
Valin	2,3	9,6	-	99,14	6,9

Tablo 4-7. Protein yapısında bulunan amino asitlerin özellikleri.

Böyle peptit bağları ile ardaşık sıralanmış bir amino asit dizisinin oluşturduğu polipeptit zincirinin bir ucunda serbest bir amino grubu ($-NH_2$) ve diğer ucunda serbest bir karboksil grubu ($-COOH$) bulunur. Serbest amino grubunun bulunduğu uca proteinin amino (N-terminal) ve serbest karboksil grubunun bulunduğu uca da karboksil (C-terminal) ucu adı verilir. Bir proteini meydana getiren böyle bir amino asit dizisine yani polipeptit zinciri, o proteinin **birincil (primer)** yapısı olarak gösterilir.. Her proteinin birincil yapısını oluşturan amino asitlerin çeşidi, sayısı ve sırası o proteine özgüdür. Bir polipeptit zincirindeki çeşitli gruplar aralarında, peptit bağından başka türde bağlar da kurarlar. Bu bağlar sonucu polipeptit zinciri kendi içine katlanarak özgün bir üçboyutlu yapı ya da başka bir deyimle konformasyon kazanır. **İkincil (sekonder)** yapı bir polipeptit zincirinin, komşu amino asitlerin aralarında kurdukları hidrojen köprüleri sonucu, kazandığı yapı düzenine karşılık gelir.

1930’larda Astbury Röntgen ışınları kırılma analizi yöntemiyle saç ve yünde bulunan (keratin gibi) proteinlerin yapılarının yinelenen; 5,0-5,5 Å uzunluğunda bir yapı düzenini içerdiğini saptamıştır. Bu bulgu Pauling ve Corey’in proteinlerin ikincil yapısını aydınlatan çalışmalarının zeminini hazırlamıştır^x.

İkincil yapının (ve başlıca bir örneği olan α -sarmal yapısının) oluşumunda belirleyici olan kurallar şöyle özetlenebilir (Şekil 4-9).

1- Yukarıda da belirtildiği gibi, peptit bağını oluşturan atomların karşılıklı dönüş (rotasyon) yeteneği yoktur. Bu atomlar bir düzlem üzerinde bulunur. Karbonil grubunun oksijen ve $-NH_4$ grubunun hidrojen atomu **trans** konumundadır.

2- Polipeptit zincirinde yalnız α -karbon atomu rotasyon yeteneğine sahiptir.

3- Polipeptit zincirindeki atomların birbirlerine yaklaşımları ancak van der Waals çaplarının izin verdiği ölçüde olanaklıdır.

4- X-ışınlarının kırılma analiziyle saptanan 5,0-5,5 Å'luk birim 3,6 amino asit içeren bir dönüşe karşılık gelir.

5- α -sarmal yapısı, her bir peptit bağının imino grubunun kendisinden dört önceki peptit bağının karbonil grubuyla oluşturduğu hidrojen bağlarıyla kalımlılık kazanır. Pauling-Corey modeline göre, polipeptit zincirlerinin kendiliklerinden α -sarmal yapısı oluşturmaları beklenir. Zira, bu yapı belirtilen koşulları yerine getirmekte, polipeptit zincirlerinin oluşturabileceği en kalımlı yapıya ve erişebilecekleri en düşük enerji düzeyine karşılık gelmektedir. Ancak, polipeptidi oluşturan amino asitlerin R-gruplarının niteliği ile polipeptidin bulunduğu eriyiğin pH'sı da α -sarmalın oluşmasını

^xRöntgen ışınları, kırılma analizi belirli bir dalga boyuna sahip X ya da Röntgen ışınlarının atomlarının çevrelerindeki elektron bulutları tarafından kırılma ya da dağılma ilkesine dayanır. En yoğun elektron bulutlarına sahip atomlar Röntgen ışınlarını en zayıf bir şekilde kırarlar. Bir kristalin tekrarlanan atom ya da molekül bireyleri Röntgen ışınları kırılma analizi yöntemi tarafından incelenebilir. Böyle çalışmalar yardımıyla moleküllerin üçboyutlu yapıları hakkında çok değerli bilgiler edinmek mümkün olur. NaCl gibi tuzların oluşturduğu kristallerdeki çalışmalara oranla , protein gibi makromoleküllerin Röntgen ışınlarını kırma şekillerini incelemek ve bulguları değerlendirerek bunların üçboyutlu yapıları hakkında sonuçlara varmak ancak kompleks matematiksel analizler sayesinde olur. Bilgisayarlar bu tür analizleri günümüzde büyük ölçüde kolaylaştırmıştır.

belirleyici etkenlerdir. Örneğin, küçük ve elektrik yükü taşımayan R-grupları içeren polialanin kendiliğinden pH 7,0'de α -sarmal yapı oluştururken, polilisin pH 7,0'de benzer bir yapı oluşturamadığı gözlenir. Polilisin örneğinde, pH 7,0'de R-gruplarının taşıdıkları pozitif yükler arasındaki itim, α -sarmal yapı oluşturan hidrojen köprülerinin kurulmasını engeller. Diğer yandan, pH 12'de R-grubunun elektrik yükünü yitirmesi sonucu, polilisin α -sarmal yapı oluşturabilir. Prolinde N- ve α -karbon atomlarının esneksiz bir halka içinde bulunmaları ve bunların arasındaki bağın dönüş olanağının bulunmaması ise, prolin içeren polipeptit bölümlerinde α -sarmal düzeninin bozulmasına neden olur.

α -sarmal yapısında yinelenen ana birim 18 amino asit içeren beş sarmal dönüşüne karşılık gelir. Buna göre, sarmalın her dönüşü 3,6 amino asit içerir. Bu yapıda iki amino asit arasında 0,15 nm'lik bir uzaklık (ya da yükseklik farkı ($P = \text{Pitch}$)) bulunduğundan, her dönüş sarmalda 0,54 nm'lik bir yükselme ile sonuçlanır. Yinelenen ana birim ile sarmal dönüşünün özdeş olmadığı, sarmal dönüşünün tam sayı amino asit (3,6) içermediği, ana birimin beş sarmal dönüşünden sonra oluştuğu, α -sarmal yapısının vurgulanması gerekli özellikleridir.

α -sarmal yapısında dönüş başına düşen 3,6 amino asit, her imino grubunun dört önceki karbonil grubu ile etkileşmesini olanaklı kılmaktadır. Dönüş üç ya da daha az sayıda (örneğin iki) amino asit içerdiğinde, α -sarmala özgü zincir içi hidrojen köprülerinin oluşumu olanak dışıdır. Bu koşullarda ($P = 0,32-0,34$ nm) β -yapısı (β -konfigürasyon) türü yapılar oluşur. Isı denatürlenmesi sonucu yün ve saç

proteinlerinde görülen ya da küresel, doğal üçboyutlu proteinlerin belirli bölümlerinde yer alan β -konfigürasyon yapısında paralel ya da antiparalel biçimde sıralanmış iki polipeptit zincirinin imino ve karbonil grupları arasındaki hidrojen köprüleri oluşur (Şekil 4-10).

Polipeptit zincirinde, yalnızca $N - C_\alpha$ ve $C_\alpha - \overset{\parallel}{C} -$ bağları dönüş yeteneğine sahiptir. Bu bağların dönüş açıları ϕ ve Ψ olarak tanımlanır. ϕ ve Ψ açı değerlerine göre polipeptit zincirinin konformasyonu belirlenir (Şekil 4-11).

Şekil 4-9. a) Paralel ve b) antiparalel β -konfigürasyonu

Şekil 4-10. a) α -sarmal ve b) β -konfögürasyon yapıları

Şekil 4-11. Peptit bağında ψ ve ϕ dönüş.

Üçüncül (tersiyer) yapı, polipeptit zincirlerinin uzak bölümlerindeki grupların birbirleriyle kurdukları (S-S, hidrojen, van der Waals ya da tuz bağları gibi) bağlar sonucu oluşan özgün, küresel yapı düzenidir. Bir proteinin birincil yapısı, o proteinin doğal üçboyutlu yapısının ya da konformasyonunun oluşması için gerekli bilgiyi de içerir. Polipeptidin içerdiği amino asit dizisinin erişebileceği en düşük enerji düzeni proteinin en kalımlı ve özgün üçboyutlu yapısını da belirler. İlk bakışta bir polipeptit zincirinin katlanma olasılıkları sınırsız gibi görülebilir. Ancak, katlanma olasılıklarını sınırlayan ve aynı zamanda katlanma sürecini kolaylaştıran önemli kurallar bulunmaktadır. Son yıllarda gösterildiği gibi, proteinlerin üçboyutlu yapıları “**domain**” adı verilen özgün bölümlerden oluşur. “Domain” bu bağlamda proteinin, kendi içinde katlanarak özgün bir üçboyutlu yapı kazanmış ve proteinin belirli bir (alt)işlevini üstlenmiş bölümüne karşılık gelir. Proteinin proteazlarla sınırlı biçimde kırılması sonucu açığa çıkan “domain” karşılığı parçaların bu işlevlerini sürdürebilmeleri, “domain”lerin protein yapısı içindeki özerk konumunu vurgular. “Domain” yapılarda gözlenen motiflerin sıklıkla çok farklı proteinlerde bulunması, protein oluşumunun “modüler” bir mekanizmayı izlediğini ortaya koymaktadır (Şekil 4-12). Buna göre, belirli modüllerin farklı kombinasyonlarla bir araya gelmesiyle çok farklı nitelikli proteinler oluşabilir.

Proteinlerin katlanma sürecini ve şeklini belirleyen diğer bir kural **hidrofobik** (polar olmayan ve suyu sevmeyen) grupların katlanmış yapı içinde, **hidrofilik** (polar ve suyu seven) grupların ise yapı yüzeyinde konumlanmasına dayanır. Ancak, bu kural suyun çözücü olarak bulunduğu ortam için geçerlidir. Normalde, yalın bir yapı düzenine sahip

bir polipeptit zincirinin kendi içinde katlanarak özğün bir yapıya dönüşmesi olasılığı düşük bir olaydır (“**negatif entropi**”). Ancak, kurulan zayıf bağlar sonucu açığa çıkan enerji ve hidrofobik grupların polar su fazından uzaklaşarak aralarında kurdukları van der Waals bağları (“**pozitif entropi**”) katlanma sürecini olanaklı kılar.

Şekil 4-12. Çeşitli “domain” türleri.

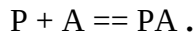
Dördüncül (kvarterner) yapı düzeni, birden çok polipeptit zincirinden meydana gelen proteinlerde (örneğin hemoglobin ya da

immunoglobulin) görülür. Böyle proteinler, **altbirim** adı verilen polipeptit zincirlerinin zayıf bağlarla ya da S-S köprüleriyle birleşmesi sonucu oluşurlar. Dördüncül yapının oluşumunda moleküllerin asimetrik yapıları ve altbirimlerin birbirlerini tümleyen (komplementer) yüzeyleri belirleyici olur. Bu etkileşimlere bağlı olarak çok yüzeyli (örneğin yirmi yüzeyli (ikosaedral)ye değin) yapı düzenleri ortaya çıkar (Şekil 4-13).

4.3.2.4. Aktif proteinlerin ligantlarıyla etkileşimi

Aktif proteinlerin ligantlarının bağlandığı yer, proteinlerin bağlama bölgesi ya da aktif bölgesi olarak gösterilir. Bir aktif proteinin bir ya da birden çok bağlama bölgesi olabilir. Bu bölgeler, işlev ve yapıları yönünden birbirlerinin benzeri olabilecekleri gibi, değişik özelliklere de sahip olabilirler. Birden çok sayıda aktif bölge taşıyan bir proteinin aktif bölgelerinden birine bağlanan bir ligant, o proteinin yapısını ve serbest bağlama bölgelerinin liganda olan ilgisini olumlu ya da olumsuz bir şekilde etkileyebilir. Çeşitli bağlama bölgeleri arasındaki karşılıklı etkileşim, bazı proteinlerin ya da enzimlerin etkinliklerinin düzenlenmesinde büyük bir rol oynar. Aktif proteinlerin bu şekilde düzenlenmesine **alosterik mekanizma** adı verilir (bkz.Bölüm 4.3.3.4 ve 7.7).

Tek bir bağlama bölgesi olan bir proteinin (P), tek bir ligandı (A) bağladığı yalın bir etkileşim aşağıdaki şekilde anlatılabilir.



Şekil 4-13. Proteinlerin dördüncül yapılarında simetri türleri.

Bu etkileşimin denge dursayısı (K),

$$K = \frac{[PA]}{[P] [A]}, \quad (4-14)$$

birleşim (asosiyasyon) denge dursayısı (K_a) olarak ta gösterilir. Birleşim dursayısı, ayrışım (disosiyasyon) denge dursayısının (K_d) resiprok değerine eşittir.

$$K = K_a = \frac{1}{K_d} \quad \text{ya da} \quad (4-15)$$

$$K_d = \frac{1}{K_a} \quad (4-16)$$

Bir ligandın (A) bağlanmasında, denge dursayısını hesaplamak için önce proteine (P) bağlanmış tüm ligant moleküllerinin sayısının (PA) tüm protein moleküllerinin sayısına olan oranını saptamak gerekir. Bu oran v simgesiyle gösterilir.

$$v = \frac{\text{tüm bağlanmış A moleküllerinin sayısı}}{\text{tüm P molekülleri}} = \frac{[PA]}{[P] + [PA]}, \quad (4-17)$$

eşitlik (4-14) yeniden düzenlendiğinde,

$$[P] = \frac{[PA]}{K [A]}, \quad (4-18)$$

ve eşitlik (4-17)'de P yerine yukarıdaki değer uygulandığında,

$$v = \frac{[PA]}{\frac{[PA]}{K[A]} + [PA]}, \quad (4-19)$$

$$v = \frac{1}{\frac{1}{K[A]} + 1} = \frac{K[A]}{1 + K[A]}, \quad (4-20)$$

$$v = \frac{1}{\frac{K_d}{[A]} + 1} \quad (4-21)$$

eşitliği elde edilir. (Şekil 4-14).

Şekil 4-14. Proteinin ligandı ile doyum eğrisi.

Görüldüğü gibi, bir protein molekülüne tek bir ligandın bağlandığı bir sistemde ligant derişiminin yüksek olduğu koşullarda v 'nün yaklaştığı değer 1 olmaktadır, yani protein molekülünün aktif bölgesi ligant ile doyurulmaktadır. Bu etkileşim v değerinin ligant (A) derişiminin bir işlevi olarak bir diyagramda gösterildiğinde, hiperbolik bir eğrinin ortaya çıktığı ve çok yüksek ligant derişimlerinde v 'nün değerinin 1'e yaklaştığı gözlenir. Bağlama yerlerinin yarısının doyurulduğu ligant derişimi, eşitlik (4-21)'in incelenmesiyle de anlaşılacağı gibi, denge ya da birleşim dursayısının resiprokuna, yani ayrışım dursayısına (K_d) eşittir. Bölüm 7-5'de irdelendiği gibi, K_d proteinin ligandına olan ilginliğine yansır ve ilginlikle ters orantılı bir ilişki gösterir.

Birden fazla bağlama bölgesi olan sistemlerde (4-21) eşitliği,

$$v = \frac{n K [A]}{1 + K [A]}, \quad (4-22)$$

şeklinde yazılır.

Proteinin ligandıyla olan etkileşimini tanımlayan hiperbolik eğriyi doğrusal şekillere dönüştürmek olanaklıdır. Böylece, sayısal değerlere ulaşmak kolaylaşır. (4-22) eşitliğinin her iki yanı ters çevrildiğinde,

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{nK} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{n}, \quad (4-23)$$

Klotz (Lineweaver-Burk) eşitliği elde edilir. $\frac{1}{v}$ 'nün $\frac{1}{[A]}$ 'ya karşı

çizimi yapıldığında, çıkan doğrunun

dikey eksenindeki kesim noktası $\frac{1}{n}$ ve eğimi $\frac{1}{nK}$ olur (Şekil 4-15a).

Benzer şekilde (4-23) eşitliğinin her iki tarafı (A) ile çarpıldığında Heins Scott ve Hildebrand Benessie eşitliği elde edilir:

Şekil 4-15. n tane benzer bağlama yeri içeren proteine ait ideal bağlanma eşitliğinin doğrusal dönüşümlerine özgü çizimler.(a): Klotz (Lineweaver Burk); (b): Heins Scott ve Hildebrand Benessie;(c): Scatchard (Eadie Hofstee) çizimleri .

$$\frac{[A]}{v} = \frac{1}{nK} + \frac{[A]}{n} . \quad (4-24)$$

$\frac{[A]}{v}$ 'ye karşı $[A]$ çiziminde $\frac{1}{n}$ 'lik bir eğimle dikey eksen ($\frac{1}{nK}$) da

kese doğru ortaya çıkar (Şekil 4-15b).

Bir başka dönüşüm ise (4-22) eşitliğindeki paydanın sola geçirilmesi ile (4-25) elde edilir. Bunun düzenlenmesi ile Scatchard eşitliği ve sonuç olarak ise,

düsey eksen $\frac{v}{[A]}$ ve yatay eksen v olan doğrusal çizimler

elde edilir (Şekil 4-15c):

$$v (1 + K[A]) = nK[A] , \quad (4-25)$$

$$v = nK[A] - vK[A] , \quad (4-26)$$

$$\frac{v}{[A]} = nK - Kv . \quad (4-27)$$

4.3.2.5. Denge diyalizi ve bağlanmanın sayısal belirtimi

Şekil 4-16'da görülen özel hücreler, denge diyaliz işlemi için kullanılır. Ortadan yalnız küçük moleküllere geçirgen bir diyaliz membranı ile ikiye ayrılmış hücrenin bir bölmesine tampon eriyiği içinde radyoaktif işaretli ligant konur. İkinci bölmede ise salt tampon eriyiği bulunur. Ligandın difüzlenererek denge oluşturması için (hücrenin her iki bölmesinde de ligant derişiminin eşit olması için) gerekli süre saptanır. Daha sonra hücrelerin ikinci bölümüne sabit miktarda protein (enzim), diğer bölümüne ise artan derişimlerde radyoaktif ligant konur. Denge oluşumu için saptanan süre sonunda her iki bölmeden alınan örneklerin radyoaktiflik içerikleri belirlenir. İki bölme arasındaki radyoaktiflik farkından enzime bağlı ve birinci bölmedeki radyoaktiflik değerinden de serbest (yani bağlanmamış) ligant miktarı saptanır. Bölüm 4.3.2.4'teki formüllerden biri kullanılarak deneysel olarak elde edilen bu değerlerden ayrışım dursayısı hesaplanır.

Şekil 4-16. a) Denge diyaliz hücresinin şematik gösterilişi.
b) Verilerin Klotz'a göre çizimi.

4.3.3. Aktif protein örneğinde yapı-işlev ilişkileri

4.3.3.1. Miyoglobin ve hemoglobin-oksijen taşıyan proteinler

Günümüzde canlıların büyük bir bölümü, yaşamak için oksijen içerikli bir havayı gereksinir. Yüksek canlıların tümünü kapsayan ve aerob olarak tanımlanan bu büyük canlı sınıfı, evrim sürecinin ileri aşamalarında (günümüzden yaklaşık 400 milyon yıl önce) yeryüzünde ortaya çıkmıştır. Yeryüzündeki ilk canlıların anaerob, ilkel atmosferin ise O_2 'den yoksun olduğu sanılmaktadır. Yeryüzünde başta yoğun miktarlarda bulunan, zengin enerji içerikli (indirgenmiş) organik molekülleri tüketerek çoğalan bu (**heterotrof**) canlılar zamanla bu maddelerin azalmasına yol açmıştır. Bunu kendi kendisini besleyebilen (**ototrof**) organizmaların evrimi izlemiştir. Bunların CO_2 , H_2O ve güneş enerjisinden kendi enerji kaynaklarını oluşturmalarına koşut olarak, atmosferin O_2 içeriği artmıştır. Aerob organizmalar ise, günümüz atmosferinde % 21 oranında bulunan oksijeni kullanarak besin maddelerinden gereksindikleri enerjiyi (ileride görüleceği gibi) en etkin biçimde kazanmalarını sağlayan güçlü oksitlenme mekanizmalarını geliştirmiştir. Yüksek canlılarda atmosferden alınan O_2 'nin kullanılacağı yere (yani doku ve hücrelere) taşınması dolaşım sistemi aracılığıyla gerçekleşmekte, O_2 'ni taşıyan molekül sistemini ise hemoglobin oluşturmaktadır.

4.3.3.2. Miyoglobin ve hemoglobinin yapısal ve işlevsel özellikleri

Etkili bir taşıyıcı sistem, taşınacak maddeyi yüksek derişimde bulunduğu yerde sıkı biçimde bağlar, düşük derişimdeki yerde ise salıverir. Hemoglobin, oksijenle etkileşimlerinde bu kuralı örnek biçimde yerine getiren bir proteindir. Alyuvarların içerdđi kılcal damarında yüklendiği O₂'i dokulara taşır. Kasta bulunan miyoglobin ise, önplanda O₂'i depolama görevini üstlenmiştir. O₂'le etkileşen bu iki proteinin işlevleri arasındaki farklılık (taşıma ve depolama) ile yapısal özellikleri arasındaki bağlantı aşağıda anlatılacaktır.

Gerek miyoglobin ve gerekse hemoglobin hem-içerikli proteinlerdir. Polipeptit kısmına ek olarak bu proteinlerin yapısında bulunan ve dolayısıyla prostetik (ek) grup olarak adlandırılan hem grubu düzlemsel bir protoporfirin halkasından ve bu halkanın orta konumunda bulunan bir Fe²⁺ -atomundan oluşur (Şekil 4-17). Protoporfirin metan köprüleriyle birleşmiş dört pirol grubundan meydana gelmiştir.

Şekil 4-17. Hem içinde bulunan demir atomunun yaptığı altı bağ.

bu düzlem içinde pirol gruplarının N-atomlarıyla dört koordinasyon bağı ile, ayrıca protoporfirin halkasının bir yanındaki imidazol Fe^{2+} grubunun N-atomuyla koordinasyon bağıyla birleşmiştir. Fe^{2+} , düzlemin diğer yanındaki O_2 molekülü ile altıncı koordinasyon kolu üzerinden etkileşir.

Miyoglobin, yaklaşık 18.000 dalton molekül ağırlıklı olup, 153 amino asit içerir, tek bir polipeptit zincirinden ve bir hem grubundan oluşmuştur. Polipeptit zincirinin uzayda katlanmasıyla ortaya çıkan üçboyutlu (üçüncül) yapısı küresel proteinlerin yukarıda açıklanan tüm özelliklerini gösterir (Şekil 4-18). Polar ve iyonlaşmış grupların suya yönelik konumuna karşılık polar olmayan amino asitler, miyoglobin molekülünün iç bölümünde toplanmıştır. Küresel yapının dış yüzeyindeki polar olmayan amino asitlerin çevrelediği bir hidrofobik oyuk içinde ise hem grubu yer alır. Hem grubunun Fe^{2+} -iyonunun beşinci koordinasyon kolu (yukarıda belirtildiği gibi) bu oyuk içinde bir histidinin imidazol grubu ile birleşmiştir. Miyoglobinin hidrofobik hem oyuğunun H_2O moleküllerinden yoksun olması Fe^{2+} 'i O_2 tarafından oksitlenmekten korur. Ayrıca histidinin, demirle (beşinci koordinasyon kolu üzerinden) birleşen, N-atomunun getirdiği elektronegatif yükte demir ile O_2 arasındaki bağı gevşek ve geridönüşümlü kalmasını sağlar. O_2 -yokluğunda altıncı (O_2 'ye özgü) koordinasyon kolu boş kalan Fe^{2+} 'in çapının genişliği ve ayrıca protoporfirinin pirol grupları arasındaki itim, Fe^{2+} 'unun protoporfirin düzleminden histidine doğru yaklaşık 1 Å ölçüsünde kaymasına neden olur. Ancak, altıncı koordinasyon kolu

Şekil 4-18. Miyogloblin yapısı.

üzerinden O_2 ile birleştiğinde, Fe^{2+} protoporfirin düzleminin merkezine yerleşir. Fe^{2+} 'unun O_2 bağlayıp bağlamama durumuna göre yaptığı bu 1 Å mesafelik kaymalar diğer yandan bağlı olduğu histidin grubunun ileri geri devinimlerine yol açar. Bu devinimler histidin üzerinden tüm protein molekülünün üçboyutlu yapısını etkiler. Bu yapısal değişiklikler ise, özellikle daha sonra görüleceği gibi, hemoglobinin O_2 ile etkileşiminde büyük önem taşır (Şekil 4-19).

O_2 'in miyoglobine (ve hemoglobine) bağlanması sonucu, bu proteinlerin soğurduğu ışığın dalga boyunda da değişiklikler meydana gelir. O_2 yokluğunda bu proteinler en etkin şekilde 550 nm dalga boyundaki ışığı soğurur. Buna karşın, O_2 -yükli miyoglobin ya da

Şekil 4-19. Hem düzleminde Fe^{2+} iyonun histidin grupları ve O_2 ile etkileşimleri.

hemoglobin 530 ve 570 nm'lerde iki absorpsiyon (soğurum) tepesi gösterir. Seçilen dalga boyuna göre, bu tepelerin yüksekliklerindeki değişikliklere göre proteinin O_2 -bağlama oranlarının belirlenmesine olanak sağlar (Şekil 4-20).

Bu tür bir spektroskopik ölçüm işlemiyle değişik O_2 -içerikli (yani sınırlı O_2 -basıncına $-PO_2$ 'ye sahip) gaz karışımlarında O_2 -bağlamış miyoglobin oranları (v) saptandığında, ortaya hiperbolik bir O_2 doyum (ya da O_2 -ayrışım) eğrisi çıkar. Yaklaşık 10 mmHg PO_2 'de miyoglobin molekülleri O_2 ile doyuma ulaşır. Böyle bir eğriden, daha önce de belirtildiği gibi, proteinin ligandına özgü ayrışım dursayısını (K_d 'yi) belirlemek olanaklıdır. Ayrışım dursayısı proteinin ligandıyla yarı doyumunu veren ligant derişimine karşılık geldiğine göre, gaz niteliğindeki ligantlar için K_d yerine, genelde, P_{50} yani yarı doyumunu sağlayan PO_2 değeri verilir. Miyoglobine bağlanmada O_2

Şekil 4-20. Görünür ışık bölgesinde oksijen yüklü ve oksijenden yoksun hemoglobinin (oksi- ve deoksihemoglobinin) soğurum spektrumları. Miyoglobin ve hemoglobinin soğurum spektrumları benzeşiktir.

için P_{50} 1 mmHg olarak bulunmuştur (Şekil 4-21). Atmosferik havada, akciğerin hava keseciklerinde ve kas kılcal damarlarında geçerli PO_2 değerlerinin ışığında (Tablo 4-8), miyoglobin niteliğinde bir proteinin O_2 'i kan yoluyla akciğerlerden dokuya taşınması söz konusu olmayacaktır. Zira, O_2 'e olan yüksek ilginliği nedeniyle, miyoglobin taşıdığı O_2 'i PO_2 1 mmHg'nın altına düşmedikçe çevreye vermesi olanaklı değildir. PO_2 değeri ise, kasta ancak fiziksel etkinlik sırasında 1 mmHg'nın altına düşebilir. Buna göre, miyoglobin görece yüksek ilginliği nedeniyle kasta O_2 'i tutuklayıp saklama görevi için uygun bir proteindir. Ancak, O_2 'i akciğerlerden dokulara taşımak için gerekli özellikleri taşımamaktadır. O_2 'i kanda fizyolojik açıdan anlamlı bir biçimde taşımak için gerekli koşulları ise hemoglobin yerine getirmektedir.

Şekil 4-21. Miyoglobinin O₂-doyum eğrisi.

	PO₂ (mmHg)
Atmosferik hava	160
Akciğer (alveoller)	105
Kas (kılcal damarları)	20

Tablo 4-8. Atmosferik hava ve değişik vücut bölmelerindeki PO₂ değerleri.

Hemoglobin 66,000 dalton molekül ağırlığında olup, her biri yaklaşık 16,500 dalton molekül ağırlıklı dört altbirimden oluşmuştur. Bu altbirimler iki ayrı tipte olup, bir hemoglobin molekülünde her tip altbirimden iki adet bulunur (Şekil 4-22). Altbirim içeriklerine ve yaşam sürecinde ortaya çıktıkları evreye göre değişik hemoglobin tipleri bulunur.

Şekil 4-22. Hemoglobin.

Erişkinlerde görülen tüm hemoglobin tipleri α -globin zincirli altbirim yapısına sahiptir. α -globin zincirinin 146 amino asit içermelerine karşın, erişkinlerde görülen hemoglobinlerin içerdiği ikinci tip globin, β , δ ya da γ zincirleri 141 amino asit içerir. Hemoglobinin altbirimlerinin üçboyutlu yapıları aralarında ve ayrıca miyoglobinin üçboyutlu yapısıyla büyük benzeşiklik gösterir. Birincil yapılarındaki farklılıklara karşın, üçboyutlu yapılarındaki benzerlik bu proteinlerin

hepsinin bir atagenin çoğalışımı ve değışiminden türemiş olduğunu sezindirmektedir.

Tıpkı miyoglobinde olduğu gibi, hemoglobinde de prostetik grubu O_2 bağlayan ve hidrofobik bir oyuga gömülü hem grubu oluşturur. Her altbirimde bir hem grubu dolayısıyla bir O_2 -bağlama bölgesi bulunur. Hemoglobin molekülünün dört O_2 - bağlama bölgesi molekülün yüzeyinde birbirlerinden erişebilecek en ayrık konumda bulunur. Altbirimlerin komşu altbirimlerle oluşturdukları çok sayıda hidrojen köprüsü hemoglobin molekülünün dördüncül yapısının kalımlılığını belirler. Hemoglobin molekülünün O_2 bağlaması sırasında altbirimler aralarındaki işbirliğini belirleyen özgün kaymalar meydana gelir. Altbirimlerin temas noktalarını oluşturan ve bu işbirliği için büyük önem taşıyan amino asitlerin evrim boyunca değışmemiş oldukları görülür. Ayrıca O_2 taşımayan hemoglobinin altbirimleri arasında tuz bağları bulunur.

Hemoglobin, miyoglobine oranla O_2 bağlamada gösterdiği çeşitli ayrıcalıklarla göze çarpar.

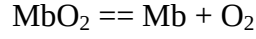
- 1- hemoglobinin O_2 -bağlama eğrisi sigmoit ya da S-biçimlidir,
- 2- hemoglobinin O_2 ile yarı doyumu için gerekli PO_2 (P_{50})= 26 mmHg,
- 3- hemoglobinin O_2 'e olan ilginliği ve buna bağımlı olarak O_2 -doyum eğrisinin dikliği H^+ - iyonlarının derişimine, CO_2 ya da 2,3-difosfogliserat (2,3-DPG) moleküllerinin hemoglobinle etkileşimine bağımlı olarak değışir.

S-biçimindeki O_2 - doyum eğrisi, hemoglobinin düşük PO_2 -değerlerinde O_2 'e olan ilginliğinin düşük olduğunu, artan PO_2 -

değerlerinde, başka bir deyimle O_2 bağlandıkça, ilginliğinin arttığını gösterir. Allosterik düzenleme mekanizmasına özgü bu davranış, hemoglobinin altbirimlerinin O_2 -bağlamada gerçekleştirdikleri işbirliğini (kooperatif etkileşimi) yansıtmaktadır. Bu özelliği sayesinde hemoglobin, akciğer alveollerinde % 98 ($v= 0,98$) oranında yüklediği O_2 'in yaklaşık % 65'ini periferik dokudaki kılcıl damarlara geldiğinde (O_2 ile doyum oranının burada % 36 ($v= 0,36$)ya düşmesine koşut olarak) bırakır. Normal hemoglobin A molekülünün O_2 'i akciğerden dokuya taşımada gösterdiği % 65'lik verime karşın, altbirimleri arasında allosterik bir işbirliği olmayan, ancak $P_{50}= 26$ mmHg olan bir hemoglobin tipinde bu verim % 36'yı, miyoglobinin özelliklerine sahip bir proteinde ise % 4'ü geçmez (Şekil 4-23).

Şekil 4-23. Hemoglobinin O_2 -doyum eğrisi.

Miyoglobin ile hemoglobinin O_2 ile etkileşimlerinde gösterdikleri farklı davranış Hill tarafından geliştirilen bazı denklemlerle matematiksel bir anlatım bulmuştur: Oksijenin miyoglobine (Mb) bağlanması protein ligant etkileşimlerine bir örnek oluşturur.



Etkileşimin ayrışım denge dursayısı (K_d)

$$K_d = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]} \quad (4-29)$$

ile tanımlanır.

Burada $[MbO_2]$, O_2 yüklü miyoglobinin, $[Mb]$, O_2 'den yoksun miyoglobinin ve bağlanmamış oksijenin (O_2) derişimlerini (litrede mol) anlatmaktadır.

Miyoglobinin O_2 ile doyum oranı (v) eşitlik 4-12'dekine benzer biçimde gösterilebilir.

$$v = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]} \quad (4-30)$$

(4-29) ve (4-30) sayılı eşitliklerin birleştirilmesiyle, doyum oranını tanımlayan eşitlik (4-31) elde edilir:

$$v = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d} \quad (4-31)$$

Derişim yerine sınırlı oksijen basıncı PO_2 kullandığında eşitlik (4-31),

$$v = \frac{PO_2}{PO_2 + P_{50}} \quad (4-32)$$

şeklinde yazılır.

Hiperbolik bir eğri veren eşitlik 4-32, oksijen ayrışımında v , PO_2 ve P_{50} bağlantılarını tanımlar.

Ancak, bu eşitlik hemoglobinin (işbirlikli (kooperatif) bir etkileşimin açılımı olan) sigmoidal oksijen ayrışım eğrisini tanımlamaktan uzaktır. Archibald Hill, kooperatiflik karşılığı üstel bir işlevi katarak yukarıdaki eşitliği hemoglobin gibi proteinler için geçerli etkileşimlere uyarlamıştır. (4-32)nin yeniden düzenlenmesiyle elde edilen eşitlik (4-33)te, n bu üstel işlevi (Hill katsayısını) simgeler. n ideal koşullarda etkileşime giren bağlanma bölgelerinin toplam sayısına karşılık gelir.

$$\frac{v}{1-v} = \frac{(PO_2)^n}{(P_{50})^n} \quad (4-33)$$

Eşitliğin iki yanının logaritması alındığında,

$$\log \frac{v}{1-v} = n \log PO_2 - n \log P_{50} \quad (4-34)$$

$\log (v/(1-v))$ değerlerinin, $n \log PO_2$ 'nin bir işlevi olarak verildiği bir diyagramda, ortaya çıkan doğrunun eğimi Hill katsayısını verir (Şekil 4-24). İşbirliğinin bulunmadığı durumlarda, örneğin miyoglobinin O_2 ile etkileşiminde $n= 1$. Hill katsayısı işbirliğine giren bağlanma bölgelerinin sayısı ile orantılı olarak artar. Ancak, uygulamada hesaplanan Hill katsayısı değerleri normalde, ideal koşullarda beklenen değerlerden, daha düşük bulunur. Hemoglobin oksijen etkileşimlerinde $n= 2,8$ 'dir.

1937 yılında F.Haurowitz'in O_2 'den yoksun ve O_2 -yükli hemoglobin örneklerinin oluşturdukları kristallerin değişik görüntüsünde de gözlediği gibi, O_2 'in bağlanması hemoglobinin üçboyutlu yapısında önemli değişikliklere yol açar. O_2 -bağlamamış hemoglobin, gergin bir yapı, O_2 -bağlı ve O_2 'ne yüksek ilginlik kazanmış hemoglobin gevşek bir yapı özelliği gösterir. Bu farklılıklar, altbirimler arasında bulunan tuz bağlarından kaynaklanır. Gergin yapı, O_2 -bağlama bölgelerinin (hem oyuklarının) üçboyutlu yapısını etkileyerek O_2 'in hem grubuyla etkileşimini zorlaştırır.

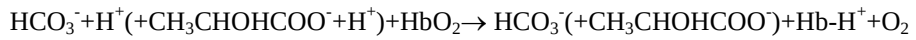
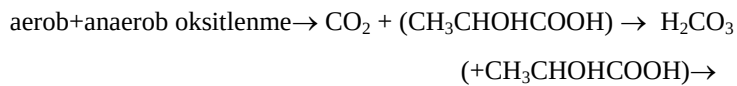
Şekil 4-24. O₂'nin hemoglobin ve miyoglobine bağlanmasının Hill denkleminde göre çizimi.

O₂ moleküllerinin bağlanmasına bağımlı olarak altbirimlerin üçboyutlu yapılarında meydana gelen değışiklikler ve bu altbirimlerle komşu altbirimleri arasındaki tuz bağlarının parçalanması gevşek, O₂-bağlamaya daha uygun konformasyonun ortaya çıkmasını sağlar (Şekil 4-25).

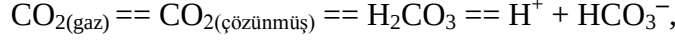
pH değıerindeki bir düşme sonucu hemoglobinin O₂'i daha zorlukla bağladığı görülür. Bohr etkisi olarak tanınan bu davranış O₂ ve H⁺-iyonlarının hemoglobine bağlanmak için girdikleri yarışı yansıtır. Bu mekanizma canlılarda O₂ ve CO₂'in taşınmasında önem taşır. Besin maddelerinin O₂'e bağımlı (aerob) oksitlenmesi sonucu oluşan CO₂, H₂CO₃'e dönüşerek dokuda pH'nın düşmesine yol açar. Ayrıca, aerob

Şekil 4-25. Hemoglobin altbirimlerinde oksijen bağlamaya koşut olacak kooperatif konformasyon (ilginlik) değişimi. Oksijen bağlanması altbirimler arasındaki tuz bağlarını (kavisli çizgiler) ortadan kaldırır.

oksitlenme için O_2 (örneğin fiziksel etkinlik sırasında) yetersiz kaldığında, besin maddelerinin bir bölümü oksijen yokluğunda (anaerob olarak) oksitlenir. Bunun sonucu dokuda (H_2CO_3 gibi pH'nın düşmesine neden olan) laktik asit oluşur. pH'nın düşmesi ise aerob oksitlenme için gereksinilen O_2 'nin dokuda hemoglobinden daha kolay ayrışmasını sağlar:

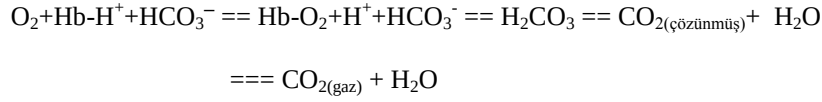


Hemoglobinin serbest H^+ -iyonlarını bu mekanizmayla kapabilmesi dokuda oluşan CO_2 'in HCO_3^- 'e dönüşmesini ve böylelikle CO_2 'in kandan akciğere iletilmesine olanak sağlar.



(Aksi durumda, reaksiyonlar dizisinde sağ yandaki serbest H^+ iyonlarının derişimlerindeki yükselme sonucu iletilebilecek HCO_3^- miktarının çok kısıtlı kalması gerekirdi).

Akciğerlerde ise, yüksek PO_2 değerlerinde O_2 'in hemoglobine bağlanmasıyla açığa çıkan H^+ -iyonları, dokudakinin tersine, CO_2 'in solunmasını olanaklı kılar:



Hemoglobinin O_2 ile etkileşimini belirleyen diğer önemli bir etmen, 2,3-difosfogliserat, kısaca 2,3-DPG'dir. Bu madde hücre içinde glikozun yıkımı (glikoliz) sırasında oluşan önemli bir araürün olan 1,3-difosfogliserattan bir yan reaksiyon sonucu oluşur.

Çözünmüş hemoglobinin O_2 'e olan ilginliğinin eritrosit içindeki hemoglobinkine oranla çok daha yüksek olduğu bulunmuş, eritrosit dışındaki hemoglobin için P_{50} 1 mmHg olarak saptanmıştır. Bu bulgunun altında yatan mekanizma 1967 yılında Reinhold Benesch ve Ruth Benesch'in 2,3-DPG'nin hemoglobine bağlanarak onun O_2 'e olan ilginliğinin azalmasına yol açtığını göstermesiyle açıklığa kavuşmuştur. 2,3-DPG'nin hemoglobine bağlanmasıyla P_{50} değeri bilinen 26 mmHg'a ulaşmaktadır (Şekil 4-26).

Şekil 4-26. 2,3-DPG'nin O_2 'nin hemoglobine bağlanmasına etkisi.

2,3-DPG yokluğunda hemoglobinin akciğerde yüklediği O_2 'i dokuya iletme yeteneğini büyük ölçüde yitirmesi, 2,3-DPG'nin fizyolojik önemini vurgular. Hemoglobin başına tek bir 2,3-DPG molekülü, hemoglobinin ortasındaki, dört altbirimin histidin gibi elektropozitif gruplarının çevrelediği, oyuğa bağlanır. Fetal hemoglobin (HbF) ise normal erişkin hemoglobini (HbA)ne oranla O_2 'e daha yüksek bir ilginlik gösterir. Fetal hemoglobinin γ -zincirlerinin, hemoglobin A'nın β -zincirinin aksine, 2,3-DPG ile etkileşen histidin gruplarının yerine serin grupları taşıması, 2,3-DPG bağlama bölgesinin elektropozitif niteliğini değiştirir. Fetal hemoglobinin elektronegatif 2,3-DPG molekülünü HbA kadar sıkı bağlayamaması, gözlenen yüksek O_2 ilginliğine yol açar. Diğer yandan, O_2 'e olan yüksek ilginliği, O_2 -derişiminin akciğerlere oranla çok daha düşük olduğu plasenta dokusunda, HbF'in HbA'dan O_2 'i devralmasını kolaylaştırır.

2,3-DPG'nin eritrosit içindeki derişimindeki değışmeler klinik uygulamada önem kazanabilir. Örneğin uzun süre durmuş kan konservelerinde 2,3-DPG derişiminin 4,5 mM'dan 0,5 mM'a kadar düşmesi, O₂ iletim işlevi büyük ölçüde bozulmuş bir kanın (dolayısıyla ameliyatlarda önemli sorun yaratabilecek bir durumun) ortaya çıkmasına neden olabilir.

4.3.4. Nükleik asitler

Nükleik asitler, informatif makromoleküllerin ikinci ana sınıfını oluşturur. Hücrede kalıtsal bilginin taşınma ve iletilmesi işlevini üstlenmiş olan bu moleküller, tıpkı proteinler gibi birden çok yapıtaşının özgün bir sırada ardaşık dizilmeleriyle oluşur.

Nükleik asitlerin temsilcileri DNA ve RNA molekülleri, dört çeşit **nükleotit** adı verilen yapıtaşından kurulur. Bir nükleotit molekülü ise bir ya da birden çok sayıda fosfat grubundan, beş karbon atomlu bir şeker (pentoz) molekülünden ve nitrojen içerikli heterosiklik (çok türel halkalı) bir bazdan oluşur (Şekil 4-27). DNA'da şeker bölümüne, ikinci karbon atomu üzerindeki hidroksil grubundan yoksun, deoksiriboz, RNA'daki şeker bölümüne ise bir riboz molekülü karşılık gelir. Nükleotitler, adenin ve guanin gibi purin, ya da sitozin ve timin gibi pirimidin bazlarını içerir. RNA molekülünde timinin yerini diğer bir pirimidin türü olan (ve halkanın 5.konumundaki -CH₃ grubundan yoksun) urasil almıştır.

Şeker molekülünün birinci karbon atomu ile bazların (pirimidinlerde üçüncü konumdaki, purinlerde ise dokuzuncu konumdaki) nitrojen atomu arasında kurulan (C-N) bağ(ı) sonucu **nükleositler** oluşur. Bir nükleosidin şeker molekülünün üçüncü ya da beşinci karbon atomunun taşıdığı hidroksil grubuna bir fosfat grubunun

ester bağı ile bağlanması sonucu ise nükleotitler meydana gelir. Fosfat grubuna, diğeryandan, anhidrit bağları ile bir ya da iki fosfat grubu daha bağlanabilir. Buna göre, nükleosit mono-, di- ya da trifosfattan söz edilir.

Nükleotitlerin fosfodiester bağları ile birleşmeleriyle polinükleotit zincirleri meydana gelir. İçerdikleri yapıtaşlarına göre polinükleotitler, **poliribonükleotitler (RNA zincirleri)** ya da **polideoksiribonükleotitler (DNA zincirleri)** olarak tanımlanır. Polinükleotitleri meydana getiren fosfodiester bağları, genelde bir nükleotidin şeker molekülünün 5'-OH grubu ile diğerybir nükleotidin şeker molekülünün 3'-OH grubu arasında oluşur (5'→3' fosfodiester bağları).

Nükleositler, açık kimyasal formül yerine, şematik olarak, bazın büyük baş harfi ve bu harften aşağıya dikey çekilmiş ve şeker molekülünü simgeleyen bir çizgiyle gösterilebilir.

Şekil 4-27. Nökleotitler.

Çizginin üst ucu şeker molekülünün 1., alt ucu ise 5.karbon atomunu temsil eder. Alt uçtan dikey çizgiyle bir dar açi oluşturacak biçimde çekilen ikinci bir çizgi ise, nökleotidin fosfat grubu ya da gruplarını gösterir. Aynı yaklaşımla polinökleotitleri de şematik olarak göstermek olanaklıdır (Şekil 4-28).

Şekil 4-28. Nükleotit ve polinükleotitlerin basitleştirilmiş gösteriliş biçimi.

Bir polinükleotit zincirinin değişken öğelerini, purin ve pirimidin bazları oluşturur. Şeker ve fosfat grupları ise zincirlerin yinelenen değişmez nitelikli yapıtaşlarıdır. Buna göre, bir polinükleotit zincirinin taşıdığı bilgi dört çeşit bazın dizilme sırasına göre belirlenir. $5' \rightarrow 3'$ fosfodiester bağları, polinükleotit zincirlerine farklı nitelikli iki uç (serbest bir $5'$ -fosfat ucu ve serbest bir $3'$ -OH ucu) kazandırır. Böylece polinükleotit zincirleri tıpkı polipeptit zincirleri gibi taşıdıkları değişik nitelikli uçları nedeniyle birincil yapılarında özgün bir yönelim gösterir:

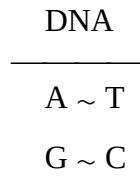
polinükleotit $5'-P$ ucu $\rightarrow 3'-OH$ ucu

polipeptit NH_2 ucu $\rightarrow -COOH$ ucu

İnformatif makromoleküllerin yapıtaşlarının dizilişindeki yönelim benzerliği ile kalıtsal bilginin iletilmesi arasında daha sonra da görüleceği gibi önemli bir bağıntı vardır.

4.3.4.1.. DNA molekülü

Kırkılı yıllarda yürütölen ve DNA'nın kalıtsal bilginin taşıyıcısı olduğunu gösteren deneyler üzerine yoğunlaşan çalışmalar, ellili yıllarda DNA molekülünün üçboyutlu yapısının aydınlanması ve kalıtsal bilginin saklanma ve iletilmesini belirleyen mekanizmaların açıklanmasıyla sonuçlanmıştır. Kırkılı yıllarda önce Chargaff, DNA'nın baz içeriğini inceleyerek adenin ile timin ve guanin ile sitozin miktarlarının yaklaşık eşit olduğunu göstermiştir:



Chargaff'ın çok sayıda değişik canlıdan elde edilen DNA örneklerinin baz içeriğini inceleyerek yaptığı bu gözlemi Wilkins'in DNA kristallerinde X-ışınları saçılma yöntemiyle yürüttüğü çalışmaları izlemiştir. Bu çalışmalar, DNA'nın yapısının dönüşümsel olarak kendisini yineleyen bir özellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, DNA molekülünün iki DNA zincirinden oluştuğu, bazların düzlemsel yapılarıyla molekülün iç bölümünde eksene dikey konumda tabakalandığını, şeker ve fosfat gruplarının ise molekülün dış bölümünde ve molekül boyunca dizili olduğu saptanmıştır.

Watson ve Crick'in, 1953 yılında bu bulguları değerlendirerek, önerdikleri DNA modeline göre ise, DNA'yı oluşturan ve ters yönelimli

(antiparalel) iki zincir ortak bir eksen etrafında kıvrılarak bir çift sarmal meydana getirir. Bu sarmalın her bir dönümü 34 Å uzunluğunda olup, 10 nükleotit çifti içerir. Her zinciri oluşturan nükleotitlerin deoksiriboz ve fosfat gibi hidrofilik grupları dışa yani su fazına dönük, hidrofobik nitelikte düzlemsel bazlar ise zincirler arasındaki iç boşluğa dönük konumdadır. Model ayrıca Chargaff'ın buluşundan hareketle her zincirdeki adeninin karşısında diğer zincirde bir timinin ve her guaninin karşısında da bir sitozin molekülünün yer aldığını, karşılıklı sıralanan bu purin-pirimidin çiftlerinin aralarında hidrojen köprüleri kurduklarını varsayar. Böyle hidrojen köprüleri aracılığıyla çiftler meydana getiren bazların birbirlerini tümleyici davranışı **komplementerlik** olarak adlandırılır. DNA dizilerinin tümleyici bazları arasındaki hidrojen köprüleri, üstüste tabakalanmış (**“stacked”**) bazları arasındaki dispersiyon güçleri (bkz. Bölüm 2.1.2.2), dışa yönelik polar nitelikli fosfat ve şeker gruplarının su evresiyle kurdukları hidrojen köprüleri, çift sarmal yapısının kalımlılığını belirler (Şekil 4-29).

Watson ve Crick modelindeki yapı, **DNA B** yapısı olarak ta tanınmaktadır. Sağ yönelimli bir çift sarmal olan B yapısında, şeker ve fosfat iskeletinin kıvrımlarının uzayda eşit aralıklı sıralanmaması, DNA zincirleri arasındaki oyukların eşitsizliğini belirler. Buna bağlı olarak, yapıda sırasıyla değişen küçük ve büyük oyuklardan söz edilir.

DNA zincirlerinin karşılıklı oluşturdıkları baz çiftleri ve bunların taşıdıkları nitrojen ve oksijen atomları büyük ve küçük oyukların tabanını, oluşturur (Şekil 4-30). Bazlara özgü ve hidrojen köprüleri kurma özelliğine sahip grupları içermeleri nedeniyle, DNA ile özgün

biçimde, baz dizilerini tanıyarak, etkileşen düzenleyici nitelikli proteinler öncelikle bu oyuklara bağlanır.

Baz çiftleri arasında kurulan hidrojen bağları, DNA çift sarmal yapısının kalımlılığını belirleyen en önemli bir etken olduğuna göre, içerdikleri hidrojen bağı sayısındaki farklılığa bağlı olarak $G \equiv C$ ve $A = T$ baz çiftlerinin kalımlılığa katkısı farklı olur. Buna göre, $G \equiv C$ içeriğiyle orantılı olarak DNA molekülünün denatürlendiği, yani tek ipliklerine ayrıştığı sıcaklık yüksek olacaktır (Şekil 4-31).

Günümüzde DNA B yapısının yanı sıra, **DNA A** ve **DNA Z** yapıları da bilinmektedir (Şekil 4-32). DNA'nın bu üç değişik yapısının özellikleri Tablo 4-9'da karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir.

Doğada DNA uçları serbest, düz ve açık ya da kovalent biçimde kapanmış (halkasal) biçimlerde bulunabilir (Şekil 4-33). akteri, virüs

Şekil 4-29. DNA çift sarmal yapısı. İskelet modeli.

Şekil 4-30. Baz çiftleri arasında oluşan hidrojen bağları ve baz çiftlerinin küçük ve büyük oyuklara yönelik konumu.

Şekil 4-31. DNA'nın denatürlenmesinin G+C içeriğine bağımlılığı.

ya da mitokondrilerde bulunan DNA, genelde halkasal niteliklidir. Bunun ötesinde, bu kapalı DNA moleküller çoğu zaman kendi üstüne sarılmış bir bobin (“**supercoiled**”) durumda bulunur. Genelde, sağ yönelimli olarak bulunan üstsarmal pozitif, sol yönelimli üstsarmal negatif olarak tanımlanır.

DNA'nın böyle bir üstsarmal yapısına dönüşmesi enerjetik nedenlere dayanır. Çift sarmal yapı aynı şekilde DNA'nın en kalımlı,

Şekil 4-32. A, B ve Z DNA

en gevşek ve en düşük enerji düzeyli yapısına karşılık gelir. Bu yapının düzenindeki bir değişiklik, örneğin sarmal yapının belirli bir birimindeki dönüm sayılarının azaltılması (sarmal yapının açılması) ya da çoğaltılması (sarmal yapının daha sıkışık duruma getirilmesi), sistemin enerjetik konumunu bozar ve yapıyı gerilimli bir duruma getirir. DNA'nın gerilimden arındırılması, üste sarılma ("supercoiling")

	A	B	Z
-Biçim	yayvan	orta kalınlıkta	ince uzun
-Baz çifti başına yükselme	2.3 Å	3.4 Å	3.8 Å
-Sarmal çapı	25.5 Å	23.7 Å	18.4 Å
-Sarmal dönüş yönü	sağ	sağ	sol
-Glikosidik bağ	anti	anti	anti C,T,syn G
-Sarmal dönüşü başına baz çifti	11	10.4	12
-Sarmal dönüşü yüksekliği	24.6 Å	33.2 Å	45.6 Å
-Baz çiftleri arası dönüş açısı	33°	36°	-60°
-Büyük oyuk	dar/derin	geniş/derin	düz
-Küçük oyuk	geniş/sığ	dar/derin	çok dar/çok derin

Tablo 4-9 A, B ve Z DNA yapılarının özellikleri.

yoluyla olanaklı olur. DNA'nın çift sarmalının bir dönümlük açılımı, genelde sağ yöndeki bir üstsarmal, DNA çift sarmalına bir dönümlük kıvrılmanın eklenmesi ise sol yöndeki bir üstsarmal ile dengelenir (Şekil 4-34).

Şekil 4-33. Üstsarmallı DNA ("supercoiled DNA").

Yukarıda belirtilmiş olduğu gibi, ısı yoluyla DNA çiftsarmal yapısını oluşturan DNA zincirlerini birbirlerinden ayıştırmak, yani DNA'yı denatürlemek mümkündür. Denatürlenme "kooperatif" bir olay olup, belirli bir sıcaklıkta hızla gerçekleşir (Şekil 4-35). DNA'nın erime sıcaklığı ("**temperature of melting**" ya da kısaca **T_m**) olarak gösterilen bu sıcaklıkta DNA yarı yarıya ipliklerine ayrışır. T_m, DNA'nın

Şekil 4-34. Üstsarmal oluşumu.

baz içeriğine bağımlı olup, G + C içeriğiyle orantılı olarak yükselir (bkz.Şekil 4-31).

DNA'nın denatürlenmesi, spektrofotometrik olarak aracılığıyla izlenebilir. DNA'yı oluşturan nükleotitler (somut olarak bunların içerdiği bazlar) 260 nm'de ışığı etkin biçimde soğurma yeteneğine sahiptir (Şekil 4-36). Buna bağlı olarak nükleik asitler de 260 nm'de

Şekil 4-35. DNA'nın denatürlenmesi.

Şekil 4-36. Denatürlenmenin DNA'nın soğurum özelliklerine etkisi.

yüksek bir soğurum (absorpsiyon A_{260}) değeri gösterir. Bu özellikleri nükleik asitlerin çözeltilerdeki varlığını ve miktarının belirtimi için çok yaygın biçimde kullanılır. Ancak, DNA çift sarmal yapısında üstüste

tabakalanmış baz çiftleri çözünmüş bazlara ya da çözeltideki serbest DNA zincirlerin içerdiği bazlara oranla ışığı 260 nm’de (yaklaşık % 34 oranında) daha az soğurur. “**Hipokromi**” olarak adlandırılan bu davranışı, DNA’nın ipliklerinin birleşmesinin bir göstergesi olarak kullanılır. Yüksek ısılarda ayrıışan DNA iplikleri, içinde bulundukları çözeltinin yeniden soğumasıyla (örneğin T_m değerinin birkaç derece altında) yeniden birleşerek çift sarmal yapıyı oluşturur. A_{260} değerindeki azalma ile izlenen bu yeniden birleşme reaksiyonunun hızı (ikincil derecede bir tepkime olarak (bkz.Bölüm 7.2)) ayrı zincirlerdeki birbirini tümleyici (komplementer) baz dizilerinin derişimine bağımlıdır. DNA derişimi (ipliklerin toplam nükleotit içeriği) sabit tutulduğunda, yeniden birleşme oranı yinelenen dizilerin bulunduğu bir DNA örneğinde, dizilerin tekil (yinelenmeyen) nitelikli olduğu bir DNA örneğinden daha yüksek olacaktır. Tekil nitelikli diziler olarak haploit kromozomda tek kopya olarak bulunan kalıtsal bilgi birimleri (örneğin klasik anlamıyla genler) tanımlanır.

Yukarıdaki düşüncelerden hareketle geliştirilen bir deney düzeneğinde yeniden birleşim hızı, **Cot** ($Cot = C_0$ (nükleotit derişimi (M) x t (zaman)) terimi ile anlatılır. Denatürlenmiş DNA derişiminin (C_0), t süreli bir yeni birleşme süreci sonunda denatürlenmiş olarak kalan DNA derişimine (C) oranını tanımlayan bir eşitlikte,

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kCot} \quad (4 - 35)$$

C/C_0 oranı, k (birleşim hız dursayısı ve **Cot** değerine bağlıdır. **Cot** ölçümleri, yaklaşık 400 baz çiftlik parçalara indirgenmiş bir DNA örneğinin bulunduğu bir tepkime ortamında gerçekleştirilir. T_m değerinin yaklaşık 30°C altında yürütülen bir yeniden birleşim deneyinde C/C_0 değerleri, **Cot** değerlerinin işlevi olarak gösterilir (Şekil 4-37). Ortaya çıkan eğrilerin biçimi ve konumu DNA örneklerinin baz içeriğine ışık tutması açısından önem taşır. İncelenen DNA'nın büyüklüğüne (sabit kalan DNA derişimde görelî olarak seyreden tümleyici dizilerin birbirlerini bulurak birleşmeleri için gereksindikleri sürenin (t) uzamasına) bağlı olarak birleşim için gerekli **Cot** değeri de büyüyecektir. Yinelenen dizilerden oluşan bir örnek ise (en basiti poli U + poli A) küçük bir **Cot** değerine sahip olacaktır. Başka bir deyimle, yinelenen yakın dizilerin birleşmesi, bir ölçüt olarak E.coli DNA'sına oranla yaklaşık 10^6 kat daha hızlı gerçekleşir. Diğer yandan, insan DNA'sının yinelenmeyen dizileri E.coli DNA'sına oranla 10^3 kat daha yavaş birleşecektir.

Ökaryot DNA'sı, yeni birleşim hızı açısından incelendiğinde, ortaya karmaşık üç öğeli (çok hızlı, hızlı ve yavaş bileşkenlerden oluşan) bir eğri çıkmıştır. Eğrinin analizi ökaryot DNA'sının % 10-15'inin çok kez yinelenen dizilere % 25-40'luk bölümünün ise tek kopyalı dizilere karşılık geldiğini göstermiştir (Şekil 4-38).

Şekil 4-37. DNA birleşim eğrisi. Şekil idealleştirilmiş koşullarda gerçekleşecek ikincil derecede bir tepkime sonucunu betimlemektedir.

Şekil 4-38. Farklı kaynaklı DNA örneklerinin Cot eğrileri. Sırasıyla poli U+poli A sentetipolinükleotitleri a) fare uydu ("mouse satellite") DNA kesimi; MS-2, faj DNA'sı; T4, faj DNA'sı; b) dana DNA'sı yinelenmeyen diziler kesimi.

4.3.5. **Karbonhidratlar (Polisakkaritler)**

Makromoleküllerin diğer bir ana grubudur. Polihidroksialdehit ya da keton niteliğindeki monosakkaritler, karbonhidratların yapıtaşlarını oluşturur. Monosakkaritler, $(CH_2O)_n$ kapalı formülüne sahiptir. Monosakkaritlerin içerdiği karbon atomları 2-8 arasında değişebilir. Buna bağlı olarak ta monosakkaritler diöz, triyoz, tetroz, pentoz ve heksoz adları altında sınıflandırılır. Monosakkaritler taşıdıkları hidroksil gruplarının simetrik olmayan dağılımlarına bağlı olarak gliseraldehidin örneğinde olduğu gibi ayna görüntüsü izomerisi gösterir (Şekil 4-39).

Şekil 4-39. Gliseraldehit örneğinde ayna görüntüsü izomerisi.

Bu simetrik olmayan dağılıma bağlı olarak monosakkaritler optik açıdan etkindir. Polarlaşmış ışığı sağa ya da sola çevirme özelliklerine göre monosakkaritler D- ve L-tiplerine ayrılır. Canlılarda ön planda D-tipi monosakkaritler bulunur. Monosakkaritler taşıdıkları çok sayıda

hidroksil grubu nedeniyle suda özellikle kolay çözünür, suyu sever (hidrofilik) bileşiklerdir. Suda aldehit ya da keto grubunun hidroksil gruplarının biriyle (örneğin pentozlarda 4.karbon atomu, heksozlarda ise 5.karbon atomu üzerindeki hidroksil grubuyla) tepkime sonucu oluşturduğu yarıasetal üzerinden halkasal (piranoz) yapılar oluşur (Şekil 4-40).Halkasal yapısı hidroksil grubunun düzlemden aşağı ya da yukarı bakmasına bağlı olarak halka yapısının α - ve β -izomerleri meydana gelir (Şekil 4-41).

Şekil 4-40. Şeker moleküllerinin yarıasetal oluşumu üzerinden halkasallaşması. Piranoz yapılarının oluşumu.

Monosakkaritler, hidroksil grupları üzerinden fosfat grubuyla ester bağları oluşturur. Monosakkaritlerin hücre metabolizmasına katılımı bu tür fosfat bileşikleri üzerinden gerçekleşir.

,

Şekil 4-41. Glikozun optik etkinliğe sahip α - ve β -stereo-izomerleri (Haworth izdüşüm formülleri).

İki monosakkaritin birleşmesiyle disakkaritler türer. Monosakkaritlerin birleşmesine yol açan bu bağlar **glikosit bağları** olarak ta adlandırılır. Glikosit bağları genellikle bir yarıasetal hidroksil grubu ile

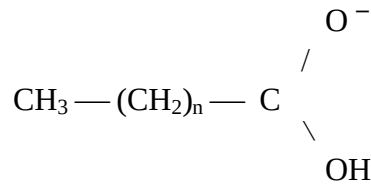
ikinci monosakkaritin 4. ya da 6. hidroksil grubu arasında oluşur (örneğin $\alpha(1\rightarrow4)$ glikosit bağı) (Şekil 4-42).

Şekil 4-42. Bazı disakkarit türleri.

Böyle glikosit bağlarıyla türeyen 2-10 monosakkarit içerikli bileşikler **oligosakkarit**, 10'un üzerinde monomer içeren bileşikler ise, **polisakkaritler** olarak tanımlanır. Özellikle heksozlardan türemiş polisakkaritler, canlılar için büyük önem taşır. Molekül ağırlıkları >milyon daltona ulaşabilen polisakkaritler, canlılarda yapıtaşı ve enerji depoları işlevlerini üstlenir. Örneğin β -glikosit bağlarıyla oluşmuş selüloz, canlılarda karşılaşılan en yaygın yapısal moleküldür ve bitkisel dokunun iskeletini oluşturur. Bitkilerde bulunan ikinci ana polisakkarit tipini temsil eden nişasta ise, α -glikoz moleküllerinin $\alpha(1\rightarrow4)$ ve $\alpha(1\rightarrow6)$ glikosit bağlarıyla birleşmesiyle türeyen dallanmış bir polisakkarittir. Hayvan hücrelerinde ise benzer bağlarla glikojen oluşur.

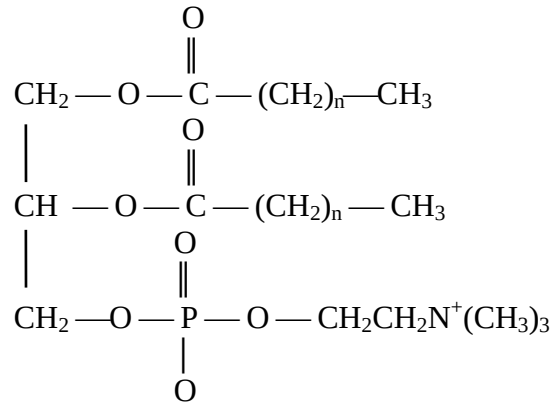
4.3.6. Lipitler

Makromoleküllerin dördüncü ana sınıfını lipitler oluşturur. Lipitler, apolar ve polar bölümlere sahip (yani amfipatik nitelikte) moleküllerdir. Bu özellikleriyle suda özel yönelim gösterir. Polar grupları su evresine yöneliktir. Polar olmayan gruplar ise su içinde özgün (misel ya da çift lipit tabakaları gibi) yapılar oluşturur. Lipitler, yağ asitleri, yağ asidi bileşikleri ve izopren türevleri olarak üç ana sınıfı kapsar. Yağ asitleri bir uçlarında karboksil grubu taşıyan değişik uzunlukta hidrokarbon zincirlerinden oluşur:



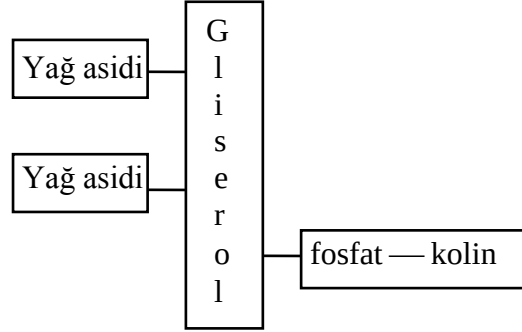
Doğada bulunan yağ asitlerinin içerdiği karbon atomları çift sayılı olup, sentezleri eklenen iki karbon atomlu birimler (asetik asit grupları) üzerinden gerçekleşir. Hidrokarbon zincirlerinin hidrojenle doyma derecesine göre doymuş ve doymamış yağ asitlerinden söz edilir. Doymamış yağ asitleri, bir ya da daha çok sayıda çift kovalent içerir. Hücre membranlarının yapıtaşı olarak fosfolipit, glikolipit gibi yağ asidi bileşikleri ve kolesterol gibi izopren türevlerine önemli görev düştüğü görülür.

Fosfolipitler, gliserol gibi ya da sifongosin gibi bir alkol içerir. Gliseroldan türeyen fosfolipitler, **fosfogliseritler** olarak tanımlanır. Gliserolun iki hidroksil grubu yağ asitleriyle, üçüncü hidroksil grubu ise bir fosfat grubuyla esterleşmiştir. Fosfat ayrıca kolin, serin, etanolamin, gliserol ya da inositol gibi ikinci bir alkol grubuyla da) esterleşebilir (Şekil 4-43):



Şekil 4-43. Fosfotidil kolin.

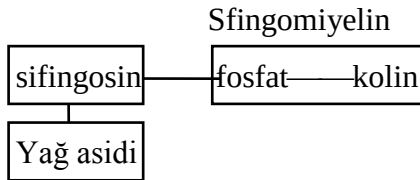
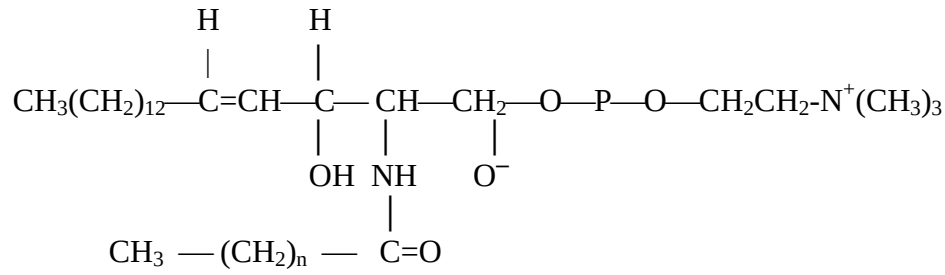
Fosfotidil kolinin örneğinde görölen amfipatik yapı düzeni, bu grubun diğeri temsilcileri için de geçerlidir. Bu ortak yapı şematik olarak Şekil 4-44'te gösterilmektedir..



Şekil 4-44. Fosfogliseritlerin ortak yapısı.

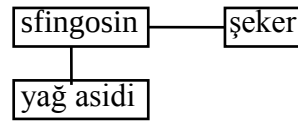
Sfingosinden türeyen fosfolipitlerin en yaygın temsilcisi, sfingomiyelindir. Karmaşık yapılı ve amino grubu içerikli sfingosin amino grubu üzerinden peptit bağı ile bir yağ asidi ile birleşmiştir.

Sfingosinin üç hidroksil grubu bir fosfat grubu, fosfat grubu ise ayrıca bir kolin ile esterleşmiştir (Şekil 4-45).



Şekil 4-45. Sfingomiyelin ve şematik gösterilişi.

Lipitlerin ikinci ana grubunu oluşturan glikolipitler de bir sfingosin ve onunla peptit bağıyla birleşmiş bir yağ asidinden türemiştir. Uç hidroksil grubu, bir şeker molekülü (mono ya da oligosakkarit) ile birleşiktir (Şekil 4-46).



Şekil 4-46. Glikolipitlerin ortak yapısı.

Buna göre, fosfolipit ve glikolipitlerin yapıları büyük benzerlik göstermektedir. Bu moleküller basitleştirilmiş ve amfipatik özellikleri

daha da vurgulanarak polar bir baş ile birlikte karşı yönde uzanan iki hidrokarbon kuyruktan oluşmuş yapılar olarak gösterilir (Şekil 4-47).

polar baş

hidrokarbon zincirleri
(hidrofobik özelliktedir)

Şekil 4-47. Fosfolipit ve glikolipitlerin ortak yapıları.

Fosfolipitler, yukarıda da belirtildiği gibi, suda amfipatik özelliklerine bağlı olarak misel ya da çift tabaka gibi yapılar oluşturur (Şekil 4-48).

misel

çift lipit tabakası

Şekil 4-48. Fosfolipitlerin oluşturduğu özgün yapı biçimleri.

Özellikle çift tabaka oluşması sonucu büyük boyutlara ulaşan düzlemsel yapılar meydana gelir. Ortamdaki şiddetli bir çalkantı sonucu

bu yapıların **lipozom** adı verilen küresel biçimler aldıkları görülür (Şekil 4-49).

Şekil 4-49. Lipozomun şematik şekli.

Lipozomları, çevresinden bir membranla ayrılmış hücrenin öncü bir modeli olarak düşünmek mümkündür. Gerçekten de, çift lipit yapraklı hücre membranlarının ana yapısını oluşturur. Kolesterol ise isoprenoit türevi lipitlerin alt grubu olan steroidlerin önemli bir temsilcisidir (Şekil 4-50). Yüksek canlıların hücre membranlarında bulunur. 2-OH grubu nedeniyle amfipatik niteliktedir.

Şekil 4-50. Kolesterol (açık formülü ve uzay dolduran modeli).

4.3.7. Makromolekül yapıtaşları ve ara moleküller

Hücre yapıtaşları arasında, su ve makromoleküllerin yanı sıra, makromolekül yapıtaşları ve ara moleküllerin bazı temsilcilerine kısa değinilmesinde yarar olacaktır. Bu moleküller ile daha ilerideki konuların kapsamında da karşılaşılacaktır. Bu bağlamda, nükleosit trifosfatlar ve,

özellikle, ATP nükleik asit yapıtaşları olarak üstlendikleri görevin ötesinde hücrenin enerji metabolizmasında ve enerji aktarımında yaşamsal bir işlevi yerine getirir. Aynı şekilde NAD, NADP, ve FAD hücrede elektron taşıyıcıları olarak pek çok metabolik süreçte rol oynar ve indirgenme-yükseltgenme (redoks) olaylarının gerçekleşmesini sağlar (Şekil 4-51).

Şekil 4-51. Elektron taşıyıcıları.

5. **Biyoenerjetik**

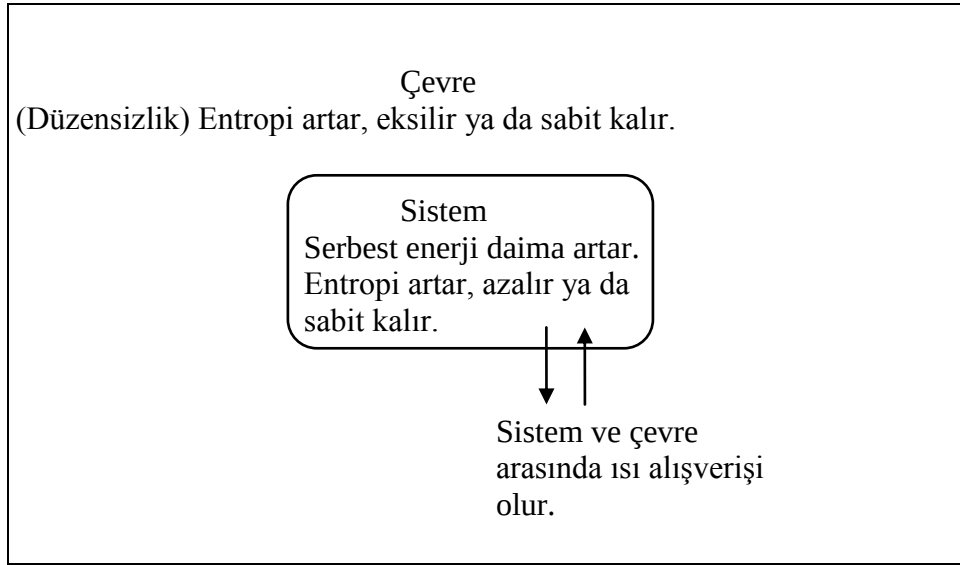
5.1. **Giriş**

Enerji, bir olayın gerçekleşebilirliğini ve yönünü belirleyen güç ya da, günlük gözlem ve deneyimlerin adım başında anımsattığı gibi, bir işi gerçekleştirme yeteneği olarak tanımlanır. Doğada kendiliğinden gerçekleşen bir olay ile bir iş arasında önemli bir fark bulunur. Örneğin, ele alınarak yükseğe kaldırılan bir taşın, bırakıldığında, yere düşmesi, kendiliğinden gerçekleşmesi beklenen bir olaydır. Bu olay enerji gerektirmediği gibi, bir iş olarak ta tanımlanamaz. Ayrıca düşme olayı, taşın yükseğe kaldırılması sırasında kazanılan gizil (potansiyel) enerjinin de yitimiyle sonuçlanır. Taşın yükseğe kaldırılması ise (enerji gerektiren) bir iş olarak tanımlanır. Bu iş sırasında madde daha üstün bir enerji düzeyine ve olasılığı daha düşük bir konuma getirilir.

Termodinamik, enerji ve madde arasındaki ilişkileri inceleyen fizik dalıdır. Termodinamik ilke ve yöntemlerin aracılığıyla biyolojik olayları inceleyen bilim dalına ise **Biyoenerjetik** adı verilir..

5.2. **Termodinamik kuralları**

Klasik termodinamik, maddenin basınç, hacim, ısı ve kimyasal bileşimi gibi fiziksel ve kimyasal özellikleriyle uğraşan bir bilim dalıdır. Zaman kavramı, ayrıca, bir olayın ya da kimyasal tepkimenin hangi mekanizma ya da hangi yoldan oluştuğu termodinamik kapsamına girmez. Termodinamik, bir kimyasal ya da fiziksel olay sırasında, belirli bir madde grubunu kapsayan bir **sistemde** meydana gelen enerji değişikliklerini ölçer. (Şekil 5-1). **Sistemin** dışındaki maddenin tümü bu bağlamda **çevre** olarak



Evren= Sistem+çevre
Evrenin toplam enerjisi sabit kalır.
Evrenin entropisi artar.

Şekil 5-1. Sistemin çevre ile olan etkileşiminde entropi ve serbest enerji değişikliği (Sabit basınç ve sıcaklıkta).

tanımlanır. Çevresiyle enerji ve madde alışverişinin olup olmamasına göre sistemler üç ana gruba ayrılır:

1. **yalıtılmış sistemde** hacim, kütle ve enerji değişmez, zira böyle bir sistem çevre ile ne enerji, ne de madde alışverişinde bulunur.
2. **kapalı sistemde** çevre ile yalnızca enerji alışverişi olanaklıdır.
3. **açık sistemde** ise, çevreyle gerek enerji ve gerekse madde alışverişi gerçekleşir. Canlılar termodinamik açıdan açık sistem kapsamına girer.

5.2.1. Termodinamiğin birinci kuralı

Bu kural evrende enerji miktarının değişmediğini, ancak enerjinin bir şekilden diğerine (örneğin ısı enerjisinden mekanik enerjiye ya da tersine) dönüşebileceğini söyler. Kinetik enerji formülüne,

$$E_{\text{kin}} = 1/2 mv^2, \quad (5-1)$$

göre, moleküllerin enerji düzeyi hızlarının karesine orantılıdır. Bir gaz karışımı (ya da bir sıvı ve hatta katı evre) içinde, moleküller değişik devinim durumlarında bulunabilir. Bunlar, aralarındaki etkileşmeler ve çarpışmalar sonucu, değişik yön ve hızlarda devinebilir, geçici olarak ta durabilir. Dolayısıyla, eşitlik 5-1'e göre, molekülleri değişik enerji düzeylerinde bulmak olanaklıdır.

Moleküllerin ortalama hız değeri (kinetik enerji düzeyi) sıcaklıkla orantılı olarak artarak bir eşik değere yaklaşır. Bu eşik değer bir olayın (tepkimenin) gerçekleşmesi için gerekli enerji düzeyi olup, **aktifleşme enerjisi** olarak adlandırılır (Şekil 5-2).

Şekil 5-2. Sıcaklığa bağlı olarak sistemin aktifleşme enerji düzeyinin belirlenmesi.

Sıcaklık artışıyla birlikte aktifleşme enerjisine ulaşan moleküllerin oranının artması tepkime olasılığının artmasına da neden olur. Böyle bir sisteme dışarıdan iletilen ısı, moleküllerin termik devinimini, dolayısıyla kinetik enerjiyi (=sistemin iç enerjisini) artırır:

$$\Delta E = \Delta Q, \quad (5-2)$$

ΔE = iç enerjide değişim;

ΔQ = sisteme iletilen ısı.

Ancak bu arada sisteme iletilen enerji işe de dönüştürülebilir:

(Şekil 5-3).

Şekil 5-3. Bir sistemde verilen enerjinin (ΔQ) işe (ΔI) dönüştürülmesi.

$$\Delta I = p\Delta V \quad (5-3)$$

ΔI = yapılan iş;

p = basınç;

ΔV = hacimde değişme

Bu durumda, sistemin **iç enerjisindeki** değişme sisteme iletilen enerji ile yapılan işin farkına eşit olur.

$$\Delta E = \Delta Q - p\Delta V \quad (5-4)$$

Buna göre, çevreden iletilen enerji (ΔQ) ölçüsünde sistemin iç enerjisinde artış olur (ΔE), ya da enerjinin bir bölümü mekanik enerjiye ($p\Delta V$), yani işe dönüştürülür. Ancak, sonuçta sistem ve çevresinin toplam enerjisinde birinci kuralın öngördüğü gibi bir değişme olmaz. Canlı sistemlerde olaylar değişmeyen sıcaklık ve hacimlerde gerçekleştiğinden, $p\Delta V$, ihmal edilebilir bir değerde kalır. Çevreden sağlanan enerji ise ATP'nin aracı olduğu özgün kimyasal tepkimelerde biyolojik işe dönüşür.

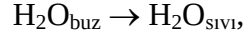
5.2.2. Termodinamiğin ikinci kuralı

Bu kural, bir olayın kendiliğinden gerçekleşebilirliğinin koşullarını tanımlar. Doğada kendiliğinden oluşan olaylar genelde enerji yitimiyle sonuçlanır. Bir gaz karışımını içeren bir kabın aynı büyüklükte içi boş bir ikinci kaba bağlanması bunun için örnek alınabilir. Birinci kaptaki gaz moleküllerinin bazıları taşıdıkları kinetik enerji sonucu ikinci kaba geçer ve bir süre sonra her iki kaptaki molekül sayısı eşitlenir. Gaz moleküllerinin (ve dolayısıyla sistemin) enerjisi bu dağılmayla orantılı olarak azalır (Şekil 5-4).

Bu tür gözlemlerden doğada kendiliğinden oluşan ve geriye dönüşümü olmayan olaylarda sistemin iç enerjisindeki azalmanın tek belirleyici olduğu sonucu çıkarılabilir. Ancak, doğadaki olayların hepsi için bu ilke geçerli değildir.

Şekil 5-4. Bir sistemde iç enerjide azalma.

Örneğin buzun erimesi,



O°C ve üzerindeki sıcaklıklarda sistemin iç enerjisinin artmasına karşın kendiliğinden gerçekleşir. Buna göre, bir olayın kendiliğinden gerçekleşebilirliğini yalnızca sistemin iç enerjisinin değişimiyle açıklamak olanaklı değildir. Gerçekleşebilirliği belirleyen başka bir etken daha bulunmaktadır. Ele alınan örnekte sistemin iç enerjisinin artmasının yanısıra düzenin azalması (ya da düzensizlikte artma) sözkonusudur. Zira, su moleküllerinin buzun kristal yapı düzenini bırakarak daha düşük düzeyli bir düzene, yani sıvı evresine geçmektedir. Maddenin düzensizlik durumu, istatistiksel açıdan moleküllerin rastlantısal dağılışı ya da oluşma olasılığının daha yüksek olduğu durum, **entropi (S)** olarak adlandırılır.

Kendiliğinden ve geridönüşümsüz biçimde gerçekleşen olaylarda sistem ve çevrede entropi artar:

$$\Delta S_{\text{sistem}} + \Delta S_{\text{çevre}} > 0 \quad (5-5)$$

Bu olgu, termodinamiğin ikinci ana kuralı olarak tanımlanır. Entropi değişikliği enerji boyutuna sahiptir:

$$S = \frac{Q}{T} \quad (\text{cal.mol}^{-1}\text{K}^{-1}) \quad (5-6)$$

Çevredeki entropi değişimi,

$$\Delta S_{\text{çevre}} = \frac{\text{çevre tarafından soğurulan enerji}}{T} , \quad (5-7)$$

olarak anlatılır. Çevredeki entropi değişimi, örneğin artışı, sistemin iç enerjisindeki azalmaya koşut olarak gerçekleşir:

$$\Delta S_{\text{çevre}} = - \frac{\Delta E_{\text{sistem}}}{T} . \quad (5-8)$$

Buna göre, geri dönüşümsüz olaylar, eşitlik 5-8'in 5-5'e yerleştirilmesi,

$$\Delta S_{\text{sistem}} - \frac{\Delta E_{\text{sistem}}}{T} > 0 , \quad (5-9)$$

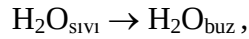
ve yeniden düzenleme ile,

$$\Delta E_{\text{sistem}} - T \Delta S_{\text{sistem}} < 0 , \quad (5-10)$$

bağlantısı ile anlatılır. Bu bağıntı olayların yönünün sistemin iç enerji ve entropi değişiminin ortak işlevi olarak belirlendiğini ortaya koymaktadır. Bu ortak işlev için **serbest enerji** (Gibbs enerjisi ya da kısaca G) ifadesi kullanılır:

$$\Delta E - T\Delta S = \Delta G < 0 \quad (5-11)$$

Serbest enerji, tepkimenin yönünü ya da gerçekleşebilirliğini belirleyen ve iş için değerlendirilebilen enerji şeklidir. Serbest enerji değişiminin sıfır olması denge durumunu, eksi değer taşıması olayın serbest enerjide azalmayla, yani kendiliğinden, gerçekleşeceğini, artı değer ise olayın oluşmasının sayısal değer ölçüsünde serbest enerji gereksinimi olduğunu gösterir. Serbest enerjinin simgesinin belirlenmesinde iç enerji ve entropi değişikliklerinin sayısal katkılarının önemi yeniden,



dönüşümü örneğinde görülebilir (Tablo 5-1). Bu dönüşüm sürecinde iç enerji üç farklı sıcaklıkta (-10°C , 0°C ve 10°C)da azalmakta, üstelik bu azalma 10°C 'ta diğer sıcaklıklara oranla daha da fazla olmaktadır. Ancak, dönüşüm iç enerjideki azalma miktarının negatif entropi yani düzendeki artış miktarını aşamaması sonucu gerçekleşmemektedir (pozitif ΔG). Serbest enerjide azalmayla yürüyen ters yöndeki dönüşüm ($su_{buz} \rightarrow su_{sıvı}$) ise bu sıcaklıkta kendiliğinden gerçekleşecektir ($\Delta G = -54 \text{ cal.mol}^{-1}$).

$^{\circ}\text{K}$	Sıcaklık $^{\circ}\text{C}$	ΔE (cal.mol $^{-1}$)	ΔS (cal.mol $^{-1}.$ $^{\circ}\text{K}^{-1}$)	ΔG (cal.mol $^{-1}$)
283	+10	-1529	-5,6	+54
273	0	-1436	-5,2	0
263	-10	-1343	-4,9	-51

Tablo 5-1. Buzun erimesine ilişkin termodinamik değerler.

5.3. Serbest enerji ve denge dursayısı

Bir tepkimede, örneğin A maddesinin B maddesine dönüşümünde, ilkönce A molekülleri B moleküllerine dönüşür ve bir süre sonra tepkime dengeye ulaşır. Denge durumunda A'dan B'ye dönüş, B'den A'ya dönüş eşit olduğundan net bir kimyasal değişim görülmez. Bu durum denge dursayısı ile anlatılır:



$$K = \frac{[B]}{[A]} \quad (5-12)$$

Denge durumunda B maddesinin derişiminin A maddesininkinden yüksek olması, ($K > 1$), B maddesinin tepkime ürünü olarak oluşmasının bekleneceğini gösterir. Buna karşın, B maddesinin derişiminin A maddesininkinden düşük olması, ($K < 1$), yeterince $A \rightarrow B$ dönüşümünün sözkonusu olmadığını anlatır. Tepkime sonucu $[A] = [B]$, denge durumunu ($K = 1$), A maddesinin yarı yarıya B maddesine dönüştüğünü gösterir. Buna göre, denge dursayısı tıpkı serbest enerji değişimi gibi tepkimenin gerçekleşebilirliğinin bir göstergesidir. Nitekim, bir tepkimenin serbest enerji değişimi (ΔG), ile denge dursayısı, (K), arasındaki ilişki bir eşitlik ile anlatılabilir:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \cdot \ln K, \quad (5-13)$$

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K, \quad (5-14)$$

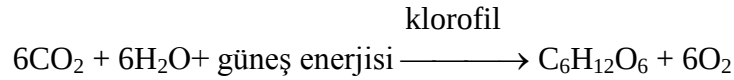
$$\Delta G^0 = -2,3 RT.\log K \quad (5-15)$$

Bu eşitlikte, R Gaz dursayısı ($1.987 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{derece}^{-1}$), T mutlak sıcaklık (= Kelvin), $\ln K$ denge dursayısının doğal logaritması, ΔG^0 ise standart koşullarda, yani bütün tepkenlerin derişiminin 1 M olduğu durumdaki, serbest enerji değişiminin değeridir. Buna göre, beklenildiği gibi, denge dursayısı (K) > 1 olduğunda, standart serbest enerji değişimi

eksi değer taşır, $K < 1$ olduğunda, artı değer kazanır, $K = 1$ olduğunda ise $\Delta G^0 = 0$ olur.

5.4. Canlılarda enerji akımı

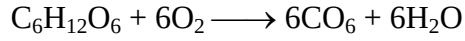
Canlılar, varlıklarını besin maddeleri şeklinde alınan kimyasal enerjiyle sürdürür. Enerji gereksinimlerini karşılamada izledikleri yola göre canlıları **özbeslenimli (ototrof)** ve **dışbeslenimli (heterotrof)** olarak iki ana sınıfa ayrılır. Özbeslenimli (ototrof) canlılar, güneş enerjisini -klorofil varlığında gerçekleşen- fotosentez sürecinde değerlendirerek CO_2 ve H_2O 'dan glikoz gibi yalın, ancak yüksek enerji içerikli şeker molekülleri oluşturur.



$$\Delta G = +686 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

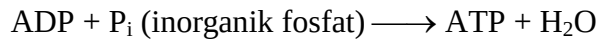
Buna göre, fotosentez sürecinde oluşan 1 mol glikoz başına 686 kcal güneş enerjisi tüketilir. Başkalarından beslenen (heterotrof) canlılar ise, enerji gereksinimlerini karşılayacak maddeleri güneş enerjisi gibi bir

dış enerji kaynağını değerlendirerek oluşturmak yeteneğinden yoksundur. Besin maddelerinin hücrede yıkımları (biyolojik oksitlenme ya da hücresel solunum) sonucu bu maddelerin içerdikleri enerjinin yeniden açığa çıktığı görülür:



$$\Delta G = -686 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

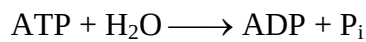
Biyolojik oksitlenmeyle açığa çıkan enerji, canlıların değerlendirebileceği başlıca enerji biçimini oluşturan ATP moleküllerinin sentezi için kullanılır:



$$\Delta G = +7,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Görüldüğü gibi bir glikoz molekülünün yıkımı ile açığa çıkan enerji çok sayıda ATP molekülünün oluşumu için yeterli olabilmektedir. Bununla birlikte biyolojik oksitlenmenin sağladığı enerjinin ancak belirli bir oranı ATP moleküllerine dönüşür. Enerjinin geri kalan kısmı ısı olarak yitirilir.

ATP'nin hücre içinde ADP ve P_i 'a dönüşümü sürecinde serbest kalan enerji ise,



$$\Delta G = -7,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

yaşam için gerekli işlerin gerçekleştirilmesinde kullanılır.

- Canlıların ATP hidrolizine bağımlı olarak gerçekleştirdikleri işler,
- biyosentez -küçük moleküllerden büyük, karmaşık düzenli, hücreye özgü moleküllerin (örneğin makromoleküllerin) oluşumu (bkz. Bölüm 8),
 - etkin (aktif) ileti -moleküllerin hücre membranında bir derişim gradyentine karşı taşınması (bkz. Bölüm 5-18),
 - mekanik iş -kontraktıl hücre öğelerinin kasılması (bkz. Bölüm 5-26),
- olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır.

Buna göre Şekil 5-5’de görüldüğü gibi biyolojik enerji akımı başlıca üç aşama geçirmektedir.

1. Güneş enerjisinin ototrof organizmalarda fotosentezle organik maddelerde saklanması,
2. Bu organik maddelerin solunum yoluyla yıkımı sonucu enerjinin yeniden açığa çıkarılarak ATP moleküllerinin oluşumunda kullanımı,
3. ATP’nin içerdığı enerjinin çeşitli biyolojik işlerin gerçekleştirilmesi için değerlendirilmesi.

Şekil 5-5. Biyolojik enerji akımının aşamaları.

5.5. ATP ve kimyasal enerji iletimi

Biyolojik bir tepkimenin serbest enerjide artışla gerçekleştiği, yani biyolojik bir işin yürütülmesinin gerektiği durumlarda, gerekli enerji yukarıda belirtildiği gibi, ATP yoluyla sağlanır. ATP'nin ADP ve inorganik fosfata hidrolizi sonucu açığa çıkan enerji ($\Delta G = -7,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$) ve hidroliz denge dursayısı $K (= [\text{ADP}] / [\text{ATP}]) > 10^5$, bu tepkimenin büyük ölçüde sağa kaymış olduğunu gösterir. Bunun nedeni, ATP, ADP ve P_i moleküllerinin yapısal özelliklerinden kaynaklanır (Şekil 5-6).

Şekil 5-6. ATP'nin kimyasal yapısı.

ATP'nin üç fosfat grubu ardaşık olarak anhidrit bağlarıyla sıralanmış olup, en içteki α -konumlu fosfat grubu riboza bir ester bağı

ile bağlanmıştır. Hücrede suyun nötral, ancak polar ortamında ATP molekülünün üç fosfat grubu protonların ayrışmasıyla dört eksi yük taşır. ATP'nin bu elektronegatif niteliği ve elektronegatif fosfat grupları arasındaki itim, ATP hidrolizinin enerjettiğini belirler. ATP'nin parçalanması sonucu oluşan ürünler, ADP^{3-} ve $H_2PO_4^-$ iyonları da, elektronegatif yükleri nedeniyle yeniden bir birleşme ve tepkimeyi geri çevirme eğilimi göstermezler. Buna karşın, alkol-fosforik asit esterlerinin hidrolitik parçalanmaları sonucu oluşan ürünlerde böyle bir elektrostatik itim -alkollerin açık bir elektrik yükü taşımamaları nedeniyle- görülmez. ATP hidrolizinin serbest enerjisinin yüksek negatif değerinin diğer bir nedeni ise tepkime ürünlerinin (ADP ve fosfatın) elektron bulutlarının olanaklı olan en düşük enerji düzeyinde düzenlenmeleridir. ATP'nin yanı sıra, bazı başka fosfat bileşiklerinin hidrolizi de serbest enerjide büyük ölçüde azalmaya yol açar. Böyle bileşiklere yüksek enerjili fosfat bileşikleri ve fosfat gruplarının bu bileşiklerde oluşturduğu bağlara da **yüksek enerjili fosfat bağları** adı verilir. Burada anlatılmak istenen kovalent bağın kendisi değildir. Daha önce de görüldüğü gibi, kovalent bir bağın kırılması $80-100 \text{ kcal.mol}^{-1}$ gibi büyük bir enerji miktarı gerektirir. Bu deyim ile tepkimeye giren fosfat türevinin hidrolizi sonucu kimyasal işgücündeki değişim anlatılmaktadır. Bu tür tepkimeler fosfat gruplarının aktarımıyla gerçekleştiğinden, serbest enerji değişimi fosfat gruplarının vericisi ve alıcısı moleküllerin doğasına bağlıdır. ATP hidrolizine ilişkin $\Delta G = -7,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ifadesiyle, üçüncü (γ -konumlu) fosfat grubunun alıcı H_2O molekülüne aktarımı sırasında serbest enerjide meydana gelen

değişme değeri anlatılmaktadır. Standart koşullar altında çeşitli fosfat bileşiklerinin hidroliziyle açığa çıkan standart serbest enerji miktarları Tablo 5-2’de görülmektedir:

	ΔG^0 kcal.mol ⁻¹	Fosfat gruplarının transfer yönü
Fosfoenol piruvat	- 14,8	
1,3-difosfogliserat	- 11,8	
Kreatinfosfat	- 10,3	
ATP	- 7,3	
Glikoz-1-fosfat	- 5,0	
Fruktoz-6-fosfat	- 3,8	
Gliserin-3-fosfat	- 2,2	

Tablo 5-2. Çeşitli fosfat bileşiklerinin hidroliziyle açığa çıkan standart serbest enerji miktarları.

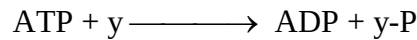
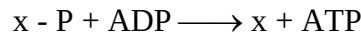
Görüldüğü gibi ATP, hidrolizinde meydana gelen serbest enerji değişimi açısından, daha çok ölçeğin ortasında bir yer almaktadır. Fosfoenol piruvat, 1,3-difosfogliserat ve kreatinfosfat gibi bileşiklerin fosfat aktarım potansiyeli ATP’ninkinden daha yüksek glikoz-1-fosfat, fruktoz-6-fosfat ve gliserin-3-fosfatınki ise daha düşüktür.

5.6. Hücre metabolizmasında ATP-ADP sisteminin önemi

ATP'nin hücre enerjeliğindeki öneminin bir nedenini fosfat bileşiklerinin termodinamik ölçeğindeki konumu oluşturmaktadır. ADP-ATP sistemi yüksek ve düşük fosfat aktarım potansiyeline sahip fosfat bileşikleri arasında bir köprü işlevi görmekte, fosfat gruplarının yüksek enerjili bileşiklerden glikoz ve gliserin gibi moleküllere aktarılmasında aracı rolü oynamaktadır. ATP ya da ADP'nin hücrede fosfat gruplarının iletimi ile sonuçlanan tepkimelerin vazgeçilmez bir ögesi olması, ATP-ADP sisteminin hücre içindeki öneminin diğer bir nedenini oluşturur. Hücrede bir grup enzimler yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin fosfat gruplarını ADP'ye aktarırken, diğer bir grup enzimler de ATP'nin üç fosfat grubunu çeşitli düşük enerjili fosfat grup alıcılarına aktarır. Hücre içinde ATP-ADP sisteminin yokluğunda fosfat gruplarını iletebilecek enzimler ise bilinmemektedir. Anlatılan özellikleri ATP'yi fosfat gruplarının ve dolayısıyla enerji akımının hücre içindeki kilit bileşiği olarak belirler.

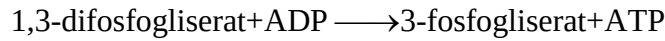
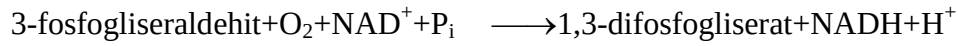
5.7. Enerji iletimi ve ortak ürünü ilkesi

ATP'nin enerjiyi iletme yeteneği, onun enerji sağlayan ve enerji gereksinen ardaşık sıralanmış iki tepkimede ortak ürün ve substrat olarak rol oynaması ilkesine dayanır:



Ortak ürün ilkesi bu yolla enerji gereksinen bir biyosentez olayının, enerji salan bir tepkimeyle bağlaşıp niteliğe dönüşerek, gerçekleşmesini sağlar. Bir besin maddesinin oksitlenmesiyle açığa çıkan enerjinin yüksek enerjili bir fosfat bileşiğinde saklanıp, ikinci aşamada fosfat grubuyla

birlikte ADP molekülüne aktarıldığı bilinmektedir. Bir aldehidin oksitlenme sonucu karbonik aside dönüşmesi serbest enerjinin büyük ölçüde azalmasıyla sonuçlanan bir olaydır. Normalde, bir deney tübünde böyle bir tepkime ısının açığa çıkmasıyla sonuçlanır. Ancak, hücre içinde bu enerji, oksitlenme ürününün bir fosfat türevinde, saklanır. Örneğin 3-fosfogliseraldehidin 3-fosfogliserata dönüştüğü tepkimede açığa çıkan enerji 1,3-difosfogliseratın oluşumunda değerlendirilir. ATP'ye oranla daha yüksek bir serbest enerji düzeyine (fosfat grubu aktarma gücüne) sahip olan 1,3-difosfogliserat molekülünün ($\Delta G^0 = -11,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$) karboksil grubuna anhidrit bağıyla bağlı fosfat grubu ikinci aşamada ADP'ye aktarılır. Böylelikle oksitlenme enerjisi ATP'nin kazanımında değerlendirilmiş olur:

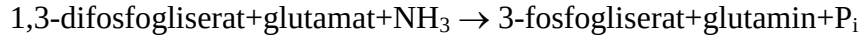


ATP şeklinde kazanılan enerji hücrede bir biyosentez olayında değerlendirilebilir: Örneğin glutamik asidin glutamine dönüşmesi enerji gerektirir ($\Delta G^0 = +3,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Bu tepkimenin hücre içinde gerçek-

leşmesi sürecinde, ilk aşamada, ATP'nin ve fosfat grubunun aktarılmasıyla glutamat aktifleşmiş bir ara moleküle, γ -glutamilfosfata dönüşür. İkinci aşamada fosfat grubunun amonyak ile yer değiştirmesiyle de glutamin oluşur:



Bu reaksiyonların toplu bilançosu ($\Delta G^0 = -8,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$), glutamin sentezinin ortak ürün ilkesi sonucu serbest enerjide azalmayla gerçekleşen bir tepkimeye dönüştüğünü ortaya koymaktadır:

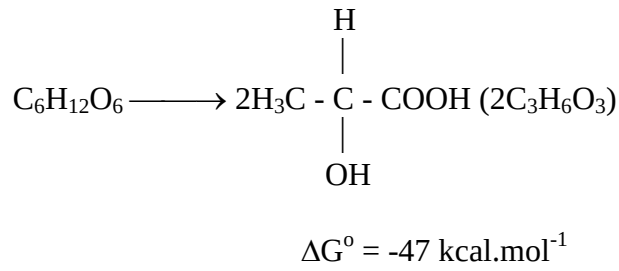


$$\Delta G^0 = -8,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

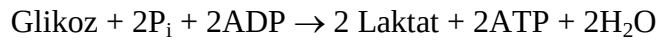
5.8. ATP'nin hücre içinde oluşması

ATP hücrede besin maddelerinin oksitlenmesi sonucu oluşur. Oksitlenme a) oksijenin varlığında (**aerobik** biçimde), b) oksijenin yokluğunda (**anaerobik** biçimde) gerçekleşebilir. Yüksek canlılar genellikle besin maddelerinin enerjiye dönüşmesinde her iki oksitlenme mekanizmasından da yararlanır. Ortam koşullarına göre enerjilerini aerobik ya da anaerobik biçimde oluşturma yeteneğine sahip canlılara **fakültatif aerob** ya da **anaerob canlılar** adı verilir. Biyolojik evrimin başında yalnız basit anaerob canlıların bulunduğu sanılmaktadır. Fotosentez sonucu oksijenin atmosferdeki oranı evrim boyunca arttıkça, oksijeni besin maddelerinin oksitlenmesi için kullanan (aerob) canlılarda yeryüzünde ortaya çıkmıştır. Pek çoğu fakültatif aerob olan bu canlıların

metabolizmasında anaerob mekanizma enerjinin glikozdan elde edilmesinde hazırlayıcı aşama rolü oynar. Anaerob koşullarda her glikoz molekülü 2 laktat molekülüne parçalanır. Oksijenin varlığında ise, hücre içinde glikoz, laktat yerine, CO₂ ve H₂O moleküllerine dönüşür. Anaerobik koşullarda glikozun laktat moleküllerine dönüşmesi **glikoliz (fermentasyon)** adı altında tanınır.

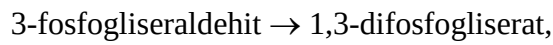


Glikoliz sonucu açığa çıkan enerjiyle iki ATP molekülü oluşur:



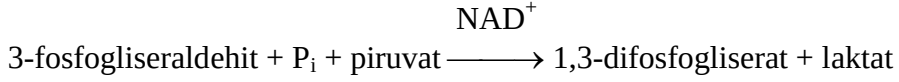
$$\Delta G^0 = -32,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Buna göre, glikoliz sırasında açığa çıkan enerjinin ($\Delta G^0 = -47 \text{ kcal.mol}^{-1}$) yalnızca % 31'i ATP oluşmasında ($\Delta G^0 = +14,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$) kullanılmaktadır. Glikoliz herbiri özel bir enzim tarafından katalizlenen 11 aşamadan oluşur (Şekil 5-7). Yukarıda ortak ürün mekanizmasına ilişkin olarak değinilen,



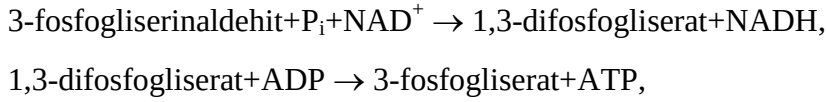
dönüşümü glikoliz sırasında karşılaşılan tek oksitlenme olayıdır. Oksitlenmeyle aldehit molekülünden iki hidrojen atomu ve bunların karşılığı iki elektron ayrılarak, glikolizin sondan ikinci ürünü olan piruvat molekülüne aktarılır. Bunun sonucu piruvat laktat molekülüne dönüşür:

Şekil 5-7. Glikoliz (Emden-Meyerhof yolu).



Bu iki tepkime arasındaki köprü işlevini ise -bir elektron taşıyıcısı ve (hidrojen aktarıcı) dehidrogenaz enzimlerinin bir koenzimi olarak bilinen NAD^+ molekülü üstlenmiştir (bkz.Bölüm 4.3.6). NAD^+ 3-fosfogliseraldehitten ayrılan 2 hidrojen atomunu (bir H^+ ya da $\text{H}:$ olarak gösterilebilecek hibrit iyonunu) alarak NADH molekülüne dönüşür ve ikinci bir aşamada ise laktat dehidrogenaz bu iki elektronu ya da hidrojen atomunu piruvat molekülüne aktarır.

Hücre açısından glikolizdeki en önemli bir aşama hiç kuşkusuz ATP'nin oluşumudur. ATP oluşması ile sonuçlanan tepkime dizilerinden biri,



gösterilmiştir. Bu tepkime dizisi kimyasal enerjinin enzimatik oksitlenme sonucu ATP molekülünde saklanabildiğini gösteren ilk örnektir.

Bu örnekte geçerli ilkeye göre,

- ilk aşamada, oksitlenme sonucu, yüksek enerjili bir fosfat türevi,
- ikinci aşamada da, fosfat grubunun ve dolayısıyla kimyasal enerjinin, ADP molekülüne aktarılmasıyla ATP molekülü oluşur.

1,3-difosfogliserat bu iki tepkimenin ortak ürünüdür. Hidrolizine koştur olarak serbest enerjide meydana gelen azalma, tıpkı ATP molekülünün örneğinde de görüldüğü gibi, bu molekülün yapısından ve

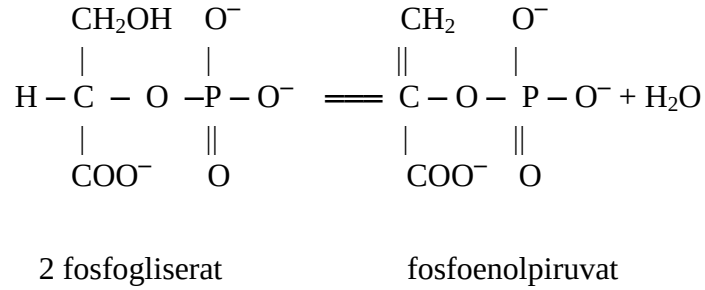
elektronegatif niteliğinden kaynaklanır. 1,3-difosfoglisarat iki fosfat grubu, dolayısıyla 4 elektronegatif yük taşır. Ayrıca, molekülün karboksil ve fosfat grupları arasındaki anhidrit bağı olağanüstü bir elektron yoğunluğu içerir. Elektronlar arasındaki itim, bu bağı kalımlılığını bozar ve hidrolize yönelik eğilimini belirler. Diğer yandan, elektronegatif nitelikleri hidroliz sonucu oluşan tepkime ürünleri (3-fosfoglisarat ve ATP)nin yeniden birleşerek tepkimeyi geri döndürmelerine olanak tanımaz. Sonuçta, hidroliz enerjisi ATP sentezinde değerlendirilir:

$$\text{1,3-difosfoglisaratın hidrolizi: } \Delta G^0 = -11,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

$$\text{ATP sentezi: } \Delta G^0 = + 7,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

$$\text{Bilanço: } \Delta G^0 = - 4,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Glikolizde ATP oluşmasını sağlayan ikinci tepkime ise fosfoenolpiruvatın piruvata dönüşmesiyle sonuçlanır. Fosfoenolpiruvat molekülünde elektronegatif fosfat ve karboksil grupları aynı karbon atomuna bağlıdır.

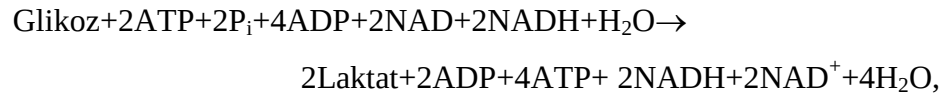


Ayrıca komşu 3. karbon atomuyla oluşturduğu çift kovalent bağ nedeniyle elektronlar 2. karbon atomu çevresinde yoğunlaşmıştır. Bu özellikler hidrolizle açığa çıkan büyük enerji miktarının başlıca nedenini oluşturur. ($\Delta G^0 = -14,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Fosfoenolpiruvat molekülünden hidroliz-lenen fosfat grubu bağlaşık bir tepkimeyle ATP molekülüne aktarılır:

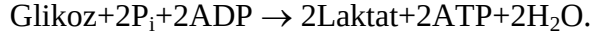


5.9. Glikolizin bilançosu

Glikoliz, bir glikoz molekülü ile başlar ve önce iki ATP molekülünün tüketimini gerektirir. Bir ATP molekülü (heksokinazın katalitik etkisi altında) glikozun glikoz-6-fosfata, ikinci ATP molekülü ise (fosfofruktokinaz enziminin katalitik etkisiyle) fruktoz-6-fosfatın fruktoz-1,6-difosfata çevrilmesinde kullanılır. Başta ATP tüketilmesi bir ölçüde glikolizin tetiklenmesini sağlar. Glikolizin başlangıcında kullanılan bu iki ATP molekülüne karşın, iki 1,3-difosfoglisarat, iki de fosfoenolpiruvat molekülünün hidrolizi sonucu toplam 4 ATP molekülü elde edilir. Buna göre, hücrenin net kazancı iki ATP molekülüdür. Glikolizin bilançosunu ise aşağıdaki şekilde yazmak olanaklıdır:



ya da

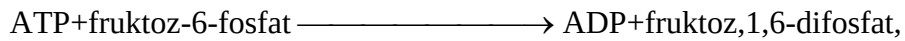


Glikolizin başlangıç maddesi olan glikoz ile son ürünleri olan piruvat ve laktat dışında tüm araürünleri fosforillenmiş bileşiklerdir. Glikoz ve laktatın hücre membranından geçmesine hiçbir engel bulunmaz. Glikoz kolaylıkla dış ortamdan alınabilir ve yine kolaylıkla dış ortama verilebilir. Buna karşın fosforillenmiş araürünler ve aynı şekilde ATP ve ADP, hücre membranından geçemez. Böylece, enerji dönüşümü için önem taşıyan bu maddelerin hücre içinde tutuklanabilmeleri güvenceye alınır.

5.10. Glikolizin düzenlenmesi

Glikolizi oluşturan aşamaların çoğunda serbest enerjide yalnızca küçük oranlarda azalmalar meydana gelir. Dolayısıyla, bu aşamalar geridönüşümlü niteliktedir. Ancak, heksokinaz, fosfofruktokinaz ve piruvatkinaz tarafından katalizlenen üç tepkime geridönüşümsüzdür. Yukarıda belirtildiği gibi, heksokinaz ve fosfofruktokinaz enzimlerinin katalizlediği aşamalarda tüketilen ATP molekülleri glikolizi geridönüşümsüz kılmaktadır. Glikolizin hızı yani ATP oluşum hızı ayrıca fosfofruktokinaz enzimi üzerinden gerçekleşen bir allosterik düzenleme mekanizmasıyla ayarlanır. Bu tür bir düzenleme glikoliz gibi ardaşık sıralanmış enzimatik aşamalardan oluşan tepkime dizilerinin genellikle başında bulunur (bkz.Bölüm 7.7). Fosfofruktokinazın katalizlediği tepkimede,

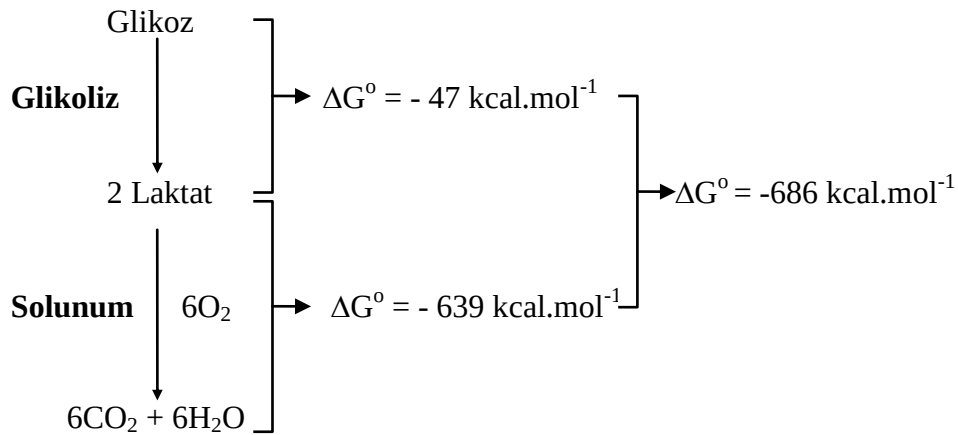
fosfofruktokinaz



dönüşüm hızı ATP (ve ADP) derişimlerine bağılı olarak değışir. Tepkimenin substrat ve ürünleri arasında bulunan bu maddeler, ayrıca allosterik bir etki de gösterir. Tepkimenin hızı yükselen ADP derişimlerinde artar, yükselen ATP derişimlerinde ise yavaşlar. Glikolizin son ürünü olan ATP bir “**feed-back**” (başa besleme) mekanizmasıyla kendi oluşumunu baskılar.

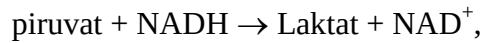
5.11. Glikolizin ve solunumun enerjetiğinin karşılaştırılması

Glikozun içediğı enerjinin ($\Delta G^0 = -686 \text{ kcal.mol}^{-1}$) yalnızca % 7’si ($\Delta G^0 = -47 \text{ kcal.mol}^{-1}$) (oksijenden yoksun olarak) değıerlendirilebil-mektedir. Enerjinin geriye kalan ve piruvat molekülünde saklı kısmı ise oksijene bağımlı solunum sürecinde değıerlendirilir.

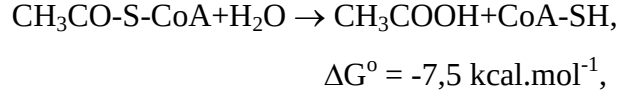


Buna göre, aerobik oksitlenme glikolize oranla çok daha etkindir. Anaerobik sistemde enerjinin ancak küçük bir oranı değerlendirilebildiğinden, anaerob organizmaların, aerob organizmaların gerçekleştirdiği işe eşdeğer iş yapabilmeleri için, çok (yaklaşık 20 kat) daha fazla besin maddesini tüketmeleri gerekir.

Bu husus, **Pasteur etkisi** olarak tanımlanan bir düzenleme mekanizmasının da esasını oluşturur: aerobik hücrenin, bir (mikro)organizmanın oksijenden yoksun bir ortamda tutulmasına koşut olarak glikolizin hızının ve laktat oluşumunun arttığı gözlenir. Glikolizin hızının oksijen yokluğunda artışı yukarıda anlatılan fosfofruktokinaz enzimi üzerinden etkin allosterik mekanizma ile açıklanabilmektedir. Oksijen yokluğunda ATP gereksinimini çok daha düşük verimli glikoliz ile karşılama zorunluğunda kalan hücre enerji açığını glikoliz hızını artırarak kapatma yoluna gider. Diğer yandan, tıpkı enzimler gibi enzimlerin koenzimleri de hücre içinde yalnızca çok sınırlı miktarlarda bulunur. Bu husus dehidrogenazların koenzimini oluşturan NAD^+ -NADH sistemi için de geçerlidir. Aerobik organizmada mitokondri enzim sistemlerinin 1,3-difosfoglisaratın oluşumu sırasında meydana gelen NADH'nın tümü mitokondri içine “**mekik sistemi**” aracılığıyla iletilir. Mitokondri sisteminin,



dönüşümünü katalizleyen laktat dehidrogenaza oranla oksijen varlığında NADH'a daha yüksek bir ilgi göstermesi burada belirleyicidir.



asetil grubunun aktifleşmiş ve çeşitli alıcılara aktarılmaya uygun durumunu gösterir. Nitekim, Asetil-CoA'nın içerdiği asetil grubu, Krebs döngüsünün gerçek substratını oluşturur ve enzimatik bir transfer sonucu sözkonusu döngüye sokulur. Glikoz molekülünün parçalanmasında olduğu gibi, yağların ve amino asitlerin parçalanmaları da önce Asetil-CoA'nın oluşmasıyla sonuçlanır. Yukarıda da belirtildiği gibi, tüm besin maddelerinin oksitlenme ürünlerinin Krebs döngüsüne girişleri Asetil-CoA yoluyla olmaktadır.

5.12.2. Krebs döngüsü

Krebs döngüsü ardaşık sıralı sekiz enzimatik aşamadan oluşur. Döngü bir önceki dönüşümün son ürünü olan oksalasetat ile asetil-CoA molekülünden asetil grubunun birleşerek bir sitrat molekülüne dönüşmesiyle başlar:



Döngünün sonucu asetik asidi oluşturan iki karbon atomu iki CO₂ molekülüne çevrilir ve dört tepkimede ikişer hidrojen atomu (ya da onların karşılığı olan ikişer (elektron) açığa çıkar. Piruvatın asetil-CoA'ya dönüşmesinde ortaya çıkan iki hidrojen atomu da eklendiğinde her piruvat molekülünün Krebs döngüsü kapsamında oksitlenmesi sonucu topluca 2x5 elektron çifti ortaya çıkmaktadır (Şekil 5-8).

5.12.3. Elektron transportu ve solunum zinciri

Krebs döngüsü sırasında üç aşamada dehidrogenazların etkisiyle elektron çiftleri serbest kalarak NAD^+ molekülüne aktarılır. Dördüncü bir oksitlenme reaksiyonu sonucu ise, suksinattan bir elektron çifti bu tepkimeyi katalizleyen enzimin yapısındaki FAD molekülüne aktarılır. NADH moleküllerinin ve indirgenmiş FAD (FAD_{red}) molekülünün elektronları bundan sonra bir enzim dizisine -solunum zincirine- aktarılır. Solunum zinciri çeşitli besin maddelerinden açığa çıkan tüm elektronların oksijene aktarılmak üzere izledikleri yoldur. Aerob hücrede, oksijen en sonuncu elektron alıcısını temsil eder. Elektronların içerdikleri yüksek enerjinin değerlendirilmesiyle besin maddelerinin oksitlenmesinden en büyük kazanç solunum zincirinde sağlanır. Solunum zincirinde NADH ve indirgenmiş FAD'ın elektronları ilk olarak ortak bir elektron alıcısı olan coenzim Q'ya ve daha sonra sitokromlardan oluşan bir diziye aktarılır. Elektron ileten enzimler olarak tanımlanan sitokromlar prostetik grup olarak (miyogloblin ya da hemoglobinde olduğu gibi) hem grubunu taşır. Sitokromların hem grubundaki demir iki ya da üç değerlikli olabilir. Sitokrom molekülünün üç değerlikli demiri bir elektron almakla indirgenerek iki değerlikli demire dönüşür. Böyle bir sitokrom molekülü, ikinci bir aşamada, elektronu bir sonraki oksitlenmiş (üç değerlikli demir taşıyan) sitokrom molekülüne aktararak onu indirger. Solunum zincirinin en sonuncu ögesi olan sitokrom a'nın elektronunu oksijen molekülüne vermesiyle H_2O molekülü oluşur. Sitokromlar NAD^+ ve flavoproteinlerin (FAD içeren elektron

Şekil 5-8. Solunum yolu.

taşıyıcısı proteinler) aksine tek bir elektron taşıyabilirler. Solunum yolunun NADH'dan oksijene kadar olan reaksiyon dizisi Şekil 5-9'da gösterilmiştir.

Şekil 5-9. Solunum sürecinde elektronların NADH'dan O_2 'e aktarımına dek izledikleri aşamalar.

5.12.4. Elektron iletiminin enerjietiği

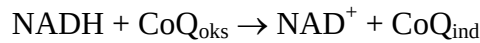
Elektronların bir bileşikden diğetine aktarılmaları oksitlenme-indirgenme olaylarının esasını oluşturur. Asit-baz tepkimelerindeki H^+ -iletimine benzer biçimde, oksitlenme-indirgenme olaylarında da elektronların iletiminden söz edilir. Asit-baz çiftleri gibi, elektron verici ve alıcıları da birlikte oksitlenme-indirgenme (redoks) çiftleri oluşturur. Her elektron vericisinin belirli bir elektron verme gücü ya da eğilimi, her elektron alıcısının da elektronlara yönelik bir ilginliğı vardır. Bir elektron vericisinin elektron verme gücü elektromotif güç ya da potansiyel (ya da redoks potansiyeli (E^0)) olarak gösterilir. Elektronların (bir elektron vericisinden elektron alıcısına) iletimi enerji salan bir olaydır. Bu süreçte serbest enerjideki değişme redoks potansiyeliyle doğrudan orantılıdır:

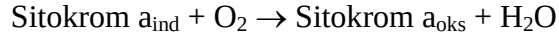
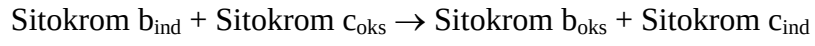
$$\Delta G^0 = -n.F.\Delta E^0 \quad (5-16)$$

Eşitlikte, n = aktarılan elektron sayısı, F = Faraday dursayısı ($23400 \text{ cal.volt}^{-1}$), E^0 = elektron taşıyıcıları arasındaki redoks potansiyel farkı, karşılığı olarak yazılıdır.

Elektron vericilerini redoks potansiyeli değerlerine göre termodinamik bir ölçütte sıralamak olanaklıdır (Şekil 5-10). Bu ölçüte göre, elektron iletisi, daha yüksek (ya da daha negatif) redoks potansiyeli değerine sahip bileşikden daha düşük redoks potansiyeli değerine sahip bileşiğe doğru olacaktır.

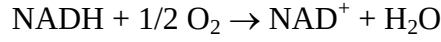
Bu taşıyıcıların redoks potansiyelleri karşılaştırıldığında bir elektron çiftinin aktarılması sırasında serbest enerjide üç aşamada önemli azalmalar beklenecektir.





Diğer yandan, bir elektron çiftinin solunum zincirinin en yüksek redoks potansiyeline sahip bileşiği olan NADH'dan oksijene dek izlediği yol sonucu toplamda büyük bir enerji miktarı açığa çıkmaktadır:

Şekil 5-10. Solunum yolunda görev yapan elektron vericilerinin redoks potansiyel değerleri.

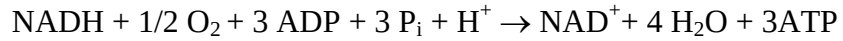


$$\Delta G^0 = -52 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Bir glikoz molekülünün tümünün oksitlenmesi sonucu 12 elektron çifti solunum zinciri yoluyla oksijen aktarıldığına göre, elektron iletim mekanizması 624 kcal.mol⁻¹ karşılığı enerji miktarını ortaya çıkarır. Buna göre, glikoz molekülünün içerdiği enerjinin büyük oranda elektron iletimi sürecinde açığa çıkmaktadır.

5.12.5. Oksidatif fosforillenme

Mitokondrilerle yapılan çalışmalar, elektron iletiminin maksimum hızı için inorganik fosfat ve ADP'nin gerekli olduğunu ve elektron iletimine koşut olarak ATP'nin oluştuğunu ortaya koymuştur. Her elektron çiftinin solunum zinciri üzerindeki iletimi üç ATP molekülünün oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Solunum zincirinde elektron iletimine bağlı olarak gerçekleşen bu fosforillenme (=ATP sentezi) **oksidatif fosforillenme** adı altında tanınır. Buna göre bir elektron çiftinin mitokondri içindeki iletiminin bilançosu şu şekilde belirtilebilir:



Her mol ATP'nin oluşması 7,3 kcal gerektirdiğine göre, NADH'nın oksitlenmesi ile açığa çıkan enerjinin (-52 kcal.mol⁻¹) % 42'si ATP şeklinde kazanılmaktadır. Solunum zincirinin, yukarıda belirtildiği gibi, üç aşamasında serbest enerji miktarında büyük azalmalar meydana gelmektedir. Böylelikle, NADH'dan bu aşamalarda açığa çıkarılan enerji birer ATP molekülünün oluşumu için (7,3 kcal'lik enerji paketleri

şeklinde) değerlendirilmektedir. Oksidatif fosforillenme kimyasal-ozmotik bir esasa dayanır. Kısaca elektron iletisi sırasında açığa çıkan enerji önce mitokondri membranında bir proton gradyentinin oluşturulması için kullanılır. Bu gradyent boyunca sitoplazmadan mitokondri içine akan protonların sağladığı enerji (=proton motif gücü) ise ATP moleküllerinin oluşturulmasında değerlendirilir.

5.13. Glikozun oksitlenmesinin enerji bilançosu

Glikoliz sırasında 2 ATP molekülünün yanı sıra, oluşan 2 NADH molekülünün solunum zincirindeki oksitlenmesi sonucu her NADH başına yalnızca ikişer ATP molekülü oluşur. Sitoplazmada oluşan bu NADH moleküllerinin mitokondrideki solunum zincirine ulaşmaları sürecinde tüketilen enerji ATP oluşum veriminin düşmesine neden olur. İki piruvat molekülünün iki Asetil-CoA molekülüne çevrilmesi iki NADH molekülü üzerinden altı ATP molekülünün oluşmasına yol açar. Krebs döngüsü sırasında iki asetik asidin oksitlenmesi ve sekiz elektron çiftinin solunum zinciri üzerinden oksijene aktarılmasına koşut olarak ise 24 ATP molekülü oluşur. Buna göre, bir glikoz molekülünün tümüyle oksitlenmesi sonucu 36 ATP molekülü ($26 \times 7,3 \text{ kcal} = 262,8 \text{ kcal}$) ya da glikoz molekülünün içerdiği enerjinin % 38'i hücrenin kullanılabileceği bir kimyasal enerji şekline dönüşür.

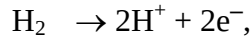
5.14. Solunum hızının düzenlenmesi

Glikolizde olduğu gibi Krebs döngüsünde de reaksiyon dizisinin hızını düzenleyen allosterik bir enzimin varlığı görülür. İzositrat molekülünü α -ketoglutarata çeviren izositratdehidrogenazın etkinliği

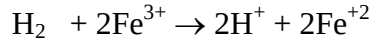
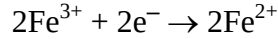
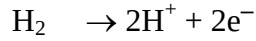
tıpkı fosfofruktokinaz enziminde görüldüğü gibi yükselen ADP varlığında artar, yükselen ATP derişiminde ise azalır.

5.15. Redoks potansiyeli ve ölçülmesi

Bir maddenin O_2 ile birleşmesi, ya da hidrojen (elektron) yitirmesi **oksitletme (yükseltgenme)** bunun tersi ise **indirgenme (redüklenme)** olarak tanımlanır. O_2 , oksitleyici bir madde olarak hücre solunumu ile H_2O 'ye indirgenir. Çok zayıf bir oksitleyici olan H^+ ise çok güçlü bir indirgeyici olan H_2 'ne dönüşebilir. O_2-H_2O ve H^+-H_2 iki önemli biyolojik redoks çifti oluşturmaktadır. Moleküler hidrojenin (H_2) oksitletmesi,



ile açığa çıkan elektronlar oksitleyici bir madde tarafından alınır. Örneğin, Demir(3) tuzu kullanıldığında böyle bir redoks reaksiyonu,



şeklinde yazılır.

Genelde, bir maddenin oksitletmiş (X) ya da indirgenmiş (X^-) biçimleri, (X) ve (X^-) çifti, **redoks çifti** olarak tanımlanır. Hücre içinde metabolik önemi olan birçok redoks çifti (sistemi) vardır (Tablo 5-3). Redoks sistemlerinde redoks potansiyeli olarak tanımlanan, elektron vericisinin elektron verme gücü ile alıcısının elektron ilginliğinden kaynaklanan elektromotor potansiyelin (E) ölçülmesi gerekir.

Böylece,

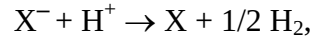
$$\Delta G = -nF\Delta E,$$

(Bkz. 5-16) formülüne göre bir redoks sisteminde elektron iletisine koşut olarak gerçekleşen serbest enerji değişimi (ΔG) hesaplanır. (Redoks potansiyeli negatif (-0,421 V) olan H_2-H^+ çiftinde H_2 iyi bir indirgeyici, redoks potansiyeli pozitif (0,385 V) olan $Fe^{+2}-Fe^{+3}$ çiftinde ise Fe^{+2} zayıf bir indirgeyici olarak tanımlanır). Bir çiftin redoks potansiyelinin, örnek hücresi ile standart referans hücresi arasında meydana gelen elektromotor gücün, ölçülmesi için Şekil 5-11'de görülen devre kullanılabilir. Örnek hücre 1 M oksitleyici (X) ve 1 M indirgeyici (X^-) eriyiği içine daldırılmış bir elektrottan, standart referans hücre ise, 1 atmosferlik H_2 gazı ile dengelenmiş 1 M H^+ eriyiği içine daldırılmış bir elektrottan oluşur.

Yarı-Reaksiyon	E° (V)
$1/2 O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O$	0,815
$SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons SO_3^{2-} + H_2O$	0,48
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NO_2^- + H_2O$	0,42
Sitokrom $a_3(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ sitokrom $a_3(Fe^{2+})$	0,385
$O_2(g) + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O_2$	0,295
Sitokrom $a(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ sitokrom $a(Fe^{2+})$	0,29
Sitokrom $c(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ sitokrom $c(Fe^{2+})$	0,254
Sitokrom $c_1(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ sitokrom $c_1(Fe^{2+})$	0,22
Sitokrom $b(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ sitokrom $b(Fe^{2+})$ (mitokondride)	0,077
Ubiquin + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ ubiquinol	0,045
Fumarat + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ suksinat	0,031
$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons FADH_2$ (flavoproteinde)	~0,
Oksalasetat + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ malat	-0,166
Piruvat + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ laktat	-0,185
Asetaldehit + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ etanol	-0,197
$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons FADH_2$ (serbest koenzim)	-0,219
$S + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2S$	-0,23
Lipoik asit + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ dihidrolipoik asit	-0,29
$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADH$	-0,315
$NADP^+ + H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADPH$	-0,320
Sistin + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 2 sistein	-0,340
Asetoasetat + $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ β -hidroksibutirat	-0,346
$H^+ + e^- \rightleftharpoons 1/2 H_2$	-0,421
Asetat + $3H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ asetaldehit + H_2O	-0,581

Tablo 5-3. Hücrede bulunan bazı redoks sistemleri ve ölçülen standart redoks potansiyeli (E°) değerleri.

İki hücre agar köprüsü ile, elektrotlar ise bir voltmetre ile bağlandığında, oluşan devrede elektronlar bir hücreden diğerine akarlar.



denklemine göre, elektronların akışı örnek hücreden standart referans hücreye yönelik olup, örnek elektrodu standart referans elektroduna göre negatiftir. Hücrelerdeki reaksiyonlar

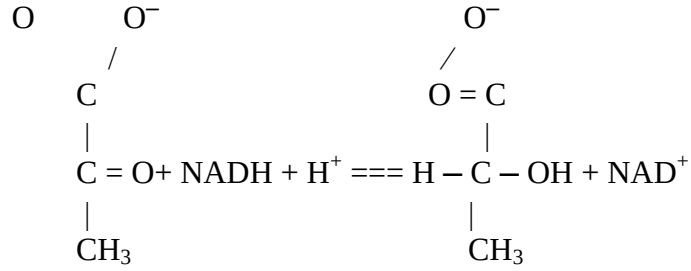
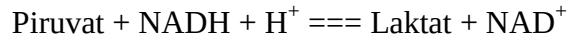
,



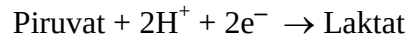
Örnek maddenin elektronlara ilginliğinin H_2 'den daha az yani redoks potansiyelinin negatif olduğunu ortaya koymaktadır. Redoks potansiyelinin pozitif olması ise, örnek maddenin elektronlara ilginliğinin H_2 'den fazla olduğunu gösterir. Örneğin güçlü bir indirgeyici olan NADH, negatif redoks potansiyeline, güçlü bir oksitleyici olan O_2 ise pozitif redoks potansiyeline sahiptir.

Şekil 5-11. Bir redoks çiftinin redoks potansiyelini ölçmek için kullanılan devre.

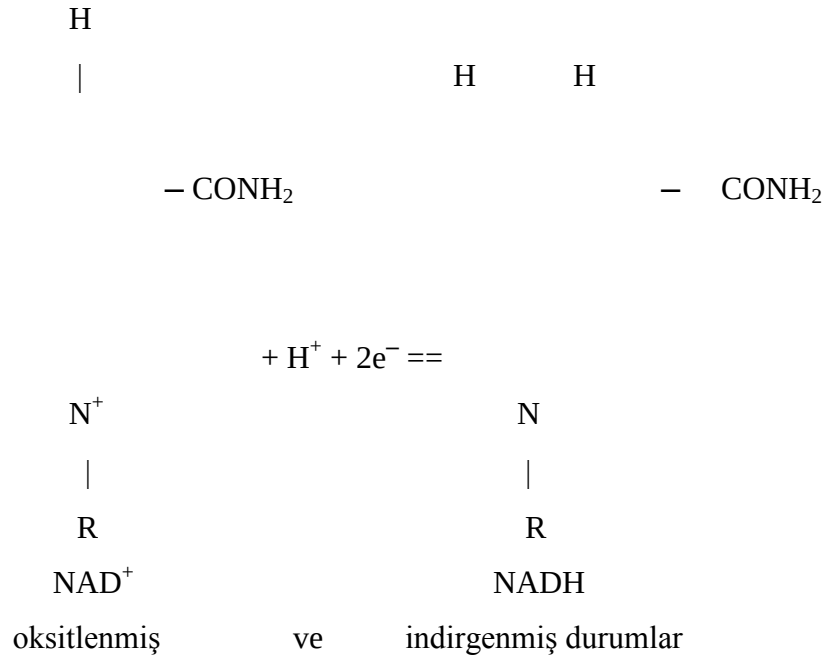
Tablo 5-3’de verilen hücrede bulunan biyolojik açıdan önemli olan bir redoks çifti aşağıda gösterilmektedir.



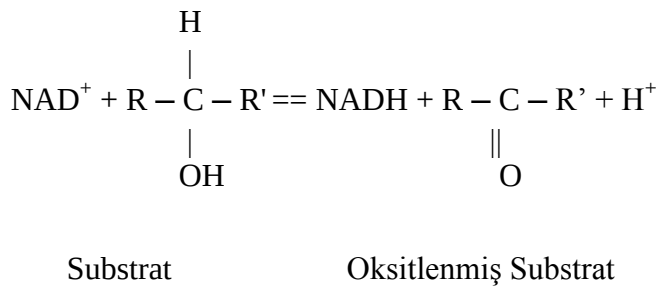
Bu reaksiyonu katalizleyen laktat dehidrogenaz NADH’yı, NAD⁺ ye oksitlerken, piruvatu indirgeyerek laktata çevirir. İndirgenme NADH’nın transfer potansiyeli yüksek olan bir çift elektronunun piruvata aktarımı ile gerçekleşir.



Bölüm 4.3.6.da belirtildiği gibi, NAD^+ hücrede elektron alıcısı olarak görev yapar.

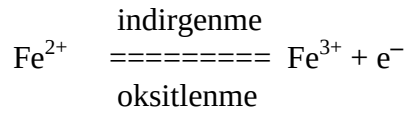
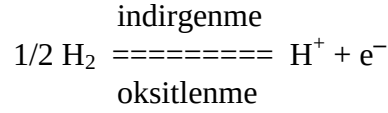


Substratın oksitlenmesine koştur olarak, NAD^+ yi bir hidrojen iyonu (H^+) ile iki elektron (2e^-) (hidrit iyonu) aktarılır.



Bu hidrojen aktarımı reaksiyonunda bir hidrojen atomu substrattan NAD^+ ye diğeri ise sıvı içine verilir. Substratın yitirdiği iki elektron ise NAD^+ halkasına girer.

Yukarıda da belirtildiği gibi bazı elementler kolaylıkla elektron vererek eriyik içinde iyonlar oluşturabilirler.



İndirgeyici

Oksitleyici

5.16. Biyolojik işler

Besin maddelerinin oksitlenmesi sonucu ortaya çıkan enerji hücrede ATP moleküllerinin oluşması için değerlendirilmektedir. Hücre elde ettiği bu enerjiyi başlıca üç tür biyolojik işin -kimyasal iş, aktif iletim, mekanik iş (bkz: 5-24)- yürütülmesinde kullanır.

5.16.1. Kimyasal iş (biyosentez)

Kimyasal iş, hücrelerde tüm yaşam boyunca sürdürülür. Bu süreçte, canlılar, küçük yapıtaşlarından kendilerine özgü makromolekülleri, örneğin nükleik asit ve proteinleri, oluştur, yenilerler. Büyük, karmaşık ve düzenli bu moleküllerin basit yapıtaşlarından oluşması enerji gerektirir (negatif entropi) (bkz: 8. bölüm).

5.16.2. Aktif iletim (transport) ya da ozmotik işlem

Hücre içinde reaksiyonlar belirli, sabit bir ortamda gerçekleşir. Hücre, yaşamı için gerekli maddeleri, örneğin glikozu, tuzları, dış ortamdan alır ve iç ortamında yoğunlaştırır. Bu nedenle, bu maddelerin hücre içindeki derişimleri genelde dış ortama oranla daha yüksektir. Hücre tarafından derişim gradyentine karşı yürütülen ve enerji gerektiren bu etkinliklere **aktif iletim (transport)** adı verilir. Sinir ve kas hücrelerindeki impuls oluşması ve iletimi de yine böyle enerji gerektiren iletim sistemleri aracılığıyla olur.

Aktif iletimin nasıl gerçekleştiğini anlamak için membran yapısını tanımak gerekir.

5.17. Membran yapısı

Yüksek canlıların hücrelerindeki kimyasal aktifleşme hücre membranının meydana getirdiği yapılara bağlıdır.

Membranların esas yapıtaşı lipitlerdir. Bölüm 4.3.5’de anlatıldığı gibi, lipitler sulu ortamda birbirleriyle etkileşerek kapalı, ancak esnek bir yapı oluştururlar. Bu lipit yapı içinde gömülü olarak protein molekülleri de bulunur. Bu proteinlerin farklılığı membranların özelliklerini ve membranların özgün işlevlerini belirler. Membranların esas işlevi, iç ve dış ortamı birbirinden ayırmaktır. Bu doğrultuda, hücre membranı, hücre içinde meydana gelen kimyasal reaksiyonları dış ortamdan yalıtır. Plazma membranı olarak da adlandırılan bu membranın yanısıra hücre içinde organelleri çevreleyen **mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi, plastit, kloroplast** ve **lizozom** membranları bulunur. Besin maddelerinin hücreye girme ya da atık maddelerin hücreden çıkarılma sürecinde plazma membranının lipit yapısının oluşturduğu engelin aşılması zorunludur. Bu engel membranda gömülü olarak bulunan küresel yapılı proteinler tarafından kolaylaştırılır. Bu proteinler, besinlerin ya da atık maddelerin membrandan iletimini katalizler. Diğer yandan, yüksek canlıların hücreleri makromolekül nitelikli maddeleri hücre içine **endositoz** olarak adlandırılan bir işlem ile alırlar. Endositoz sürecinde, plazma membranında bulunan ve kuyruklarıyla membrana tutunmuş olan bazı özel (reseptör) proteinler hücre içine alınacak makromoleküllere bağlanarak membranda çukurlar oluştururlar. Bu çukurların içe doğru kapanmasıyla, hücre içine sarkan tomurcuklar, tomurcukların membrandan ayrılmasıyla da hücre içi sıvısında membranla çevrili kabarcıklar oluşur. Ters yönlü bir süreçte ise hücre

içindeki kabarcıklar plazma membranı ile kaynaşarak içeriklerini hücre dışına bırakırlar. Bu şekilde hücre içi ile dışı arasında dolaşım sağlanır (Şekil 5-12).

Şekil 5-12. Hücre membrandan makromoleklerin taşınımı.

Membranların esas yapısı, 1925'deki **Gortel** ve **Grendel** tarafından öne sürölen modelde de öngöröldüğü gibi, çift lipit katmanından oluşmuştur. Lipit moleküllerinin ana özellikleri Bölüm

4.3.5'te ele alınmıştır. Değişik lipid molekülleri içerdikleri hidrofilik ve hidrofobik uçlardan kaynaklanan ortak bir amfipatik özelliğe sahiptir (Şekil 5-13).

Şekil 5-13. Membran lipidlerinin amfipatik özelliği.

Lipitler sulu bir ortama konduklarında kendiliklerinden çift kat oluşturacak şekilde tabakalanır. Çift tabakanın hidrofilik baş grupları suya yönelik biçimde dizilir. Yağsı hidrofobik kuyruklar ise sudan dönük olarak çift tabakanın iç bölümünde yer alırlar. Bu yerleşim şekli, bu moleküllerin su içinde ulaşabilecekleri en düşük serbest enerji düzeyine karşılık gelir. 1965 yılında **Alec Bangham** ve arkadaşları su içinde çift tabakaların kapalı küresel kabarcıklar oluşturduğunu göstermiştir. Böylece su, kabarcığın içinde ve dışında olmak üzere iki bölmeye ayrılır. Küresel yapı, çift tabakanın ucunda kalan lipid moleküllerinin hidrofobik bölümlerinin sudan gizlenmelerini sağlayan, enerjetik olarak en uygun düzen şeklidir (Şekil 5-14).

Şekil 5-14. Çift katlı lipit yapının üçboyutlu gösterimi.

Lipitlerin, bu özelliği hücre membran sistemlerinin oluşumunda belirleyici olmaktadır. Biyolojik membranlarda çift tabakanın iki genel özelliği önem kazanır:

1- Çift tabaka, iç bölümünün hidrofobik (apolar) niteliğinden dolayı, **amino asit, şeker, protein, nükleik asit** gibi birçok polar molekül türüne ve iyonlara karşı geçirgen değildir (Engel özelliği).

2- Doğal (fosfo)lipitlerden oluşan çift tabaka sıvı özelliği taşır ve bu özelliği nedeniyle ikiboyutlu gelişi güzel bir devingenlik gösterir.

(Fosfo)lipitler, bulundukları tabakada serbestçe yana doğru difüzlenir (düzlemsel difüzlenme). Bu nedenle, aynı tabakada bulunan iki komşu (fosfo)lipit her mikrosaniye karşılıklı yer değiştirebilir. Ancak, (fosfo)lipit molekülleri iki tabaka arasında hemen hemen hiçbir zaman

yer değiştiremezler. Bu çok nadir olan bir olaydır. Bu açıklamalar her tabakanın ikiboyutlu sıvı özelliğini ortaya koyar. Fosfolipitlerin çift tabakanın her iki yanındaki dağılımı doğada belirli kurallara bağlıdır. Örneğin, kırmızı kan hücrelerinin plazma membranının dış tabakasında **fosfotidilkolin**, sitoplazmaya bakan tabakada ise **fosfotidil etonolamin** ve **fosfotidilinositol** bulunur.

Bir membranın matriksini lipidlerin oluşturmalarına karşın, özgün işlevleri proteinler tarafından üstlenilmiştir.

Membran proteinleri, membrandaki konumlarına göre iki genel sınıfa ayrılır.

1- Amino asit sırası oldukça düzenli çubuk şeklinde **α -sarmal** (yapıda olan) **proteinler**.

2- Membranın hidrofobik bölgesi içinde gömülü **küresel proteinler** (Şekil 5-15).

Şekil 5-15. Membran yapısı.

α -Sarmal yapıdaki membran proteinlerinin tipik bir örneğini **glikoforin** oluşturur. Glikoforin kırmızı kan hücre membranlarında bulunan bir glikoproteindir. İşlevinin yeterince tanımlanmamış olmasına karşın yapısı oldukça iyi bilinmektedir. Molekülün büyük bir bölümü hücrenin dış tarafında konumlanmış olup, glikosillenmiş amino asitler içerir.

1971 yılında (Mark Bretscher tarafından) glikoforinin hücre membranını boydan boya geçtiği gösterilmiştir. Daha sonra amino asit dizisi belirlenmiş ve membran içinde bulunan bölümünün 26 hidrofobik amino asitten oluştuğu bulunmuştur. Bu hidrofobik dizi α -sarmal yapı biçiminde çift tabakayı bir yandan diğer yana geçebilecek uzunluktadır. Kısa hidrofilik kuyruk ise çift tabakadaki proteini sabitleştirmek üzere sitoplazmada bulunur.

Bugün hidrofobik α -sarmal bölümü ya da bölümleriyle hücre membranını enlemesine geçen ve hidrofilik bir kuyruk ile de sitoplazmaya sarkan birçok membran proteini bilinmektedir. Bunlar arasında reseptör olarak işlev üstlenmiş ya da bağışık sistem hücrelerinin yabancı yapılar ile ya da aralarındaki iletişime aracılık eden (faredeki H2 ya da insandaki HLA transplantasyon antijenleri gibi) proteinler sayılabilir. Reseptör proteinlerin membranları enlemesine geçen α -sarmal yapıya bir ya da daha çok sayıda bölgesi bulunabilir. Membran konumlu reseptör proteinlerinin bir grubu membranı bu şekilde içe ve dışa doğru yedi kez enlemesine geçen özelliğiyle bilinir (Şekil 5-16). Bu grubun temsilcileri olan reseptörler gelen haberi hücre içindeki hedef moleküle (efektöre) iletmede **G protein** adı verilen aracı

Şekil 5-16. Membranı yedi kez enlemesine geçen reseptör.

proteinlere gereksinim duyar. Yedi geçişli motifle evrimin farklı evrelerinden türlerde ve farklı işlevli reseptör proteinlerinde karşılaşılr. (Bakteri rodopsini, mayada çiftleşmeyle ilintili reseptörler ve insanda β -adrenerjik, muskarinik asetilkolin ve çeşitli nöropeptit reseptörleri bu kapsama girer).

Yedi geçişli motifle ilintili bir yapıyla kanal ve transport proteinlerinde de karşılaşılr (Şekil 5-17). Bu proteinlerde, membran içi konumlu α -sarmal yapılarının bir araya gelmeleriyle, kanallar oluşur.

Şekil 5-17. Membranı çok kez geçişli protein motifi.
Glikoz iletim proteininin örneğinde membran
kanal ve iletim proteinlerin genel yapı düzeni.

α -sarmal yapıların kanala bakan yüzlerinde yer alan polar kalıntılı amino asitler bu kanalların hidrofilik niteliğini belirler (Şekil 5-18).

Şekil 5-18. α -sarmal yapılarının membranda kanal oluşturması.

Küresel yapılı ikinci tür proteinler ise lipit çift tabakasına işlevleri için gerekli olan dayanıklılığı sağlar. Genelde membran içi konumlu bu proteinlerin varlığını elektronmikroskopunda donuk yontu (“freeze etching”) tekniğiyle görüntülemek olanaklıdır (Şekil 5-19).

5.18. Biyoenerjetik ilkeleri ve moleküllerin membrandan iletisi

Hücre membranlarından partiküllerin geçişi, diğer bir ifadeyle hücre membran (zar) geçirgenliği, membranın ve partikülün çeşidine, membranın içi ve dışındaki değişmelere bağlıdır.

Şekil 5-19. Membran içi proteinlerin elektron-mikroskopunda donuk yontu (“freeze etching”) tekniğıyle görünlmesi.

Bir partikül mekanizmaları farklı birkaç değışik yoldan membranı geçebilir. Enerjetik açıdan bu geçiş (iletim) iki farklı biçimde gerçekleşebilir:

- 1- Pasif iletim,
- 2- Aktif iletim.

5.18.1. Pasif iletim

Enerji tüketmeksizin derişim ve elektriksel potansiyel gradyentleri boyunca gerçekleşen iletimdir İki şekli bulunur:

- a) Basit difüzenme,
- b) Kolaylaştırılmış difüzenme.

5.18.1.1. Basit difüzenme

Başka bir molekül aracılığı olmadan, moleküllerin (taneciklerin) membrandan kendi kinetik enerjileri ile geçişidir. Membranların lipit çift tabakasından doğrudan ya da protein kanallarından geçişler bu kapsam içine girer. Lipit çift tabakada çözülebilen oksijen, azot, karbondioksit gibi gazlarla, alkol, eter gibi maddeler lipit tabakadan doğrudan difüzenir.

Su molekülleri de, lipit çift tabakada çözünemedikleri halde, bu tabakadan hidrofilik geçitler üzerinden kolaylıkla geçebilmektedirler. Bu geçitlerden genelde hızları büyük, molekül ağırlıkları küçük moleküller geçebilir.

Yüklü tanecikler ise, ancak proteinlerin meydana getirdiği kanallardan geçerler. Seçici geçirgenliğe sahip olan bu kanallar geçirgenliklerini belirleyen mekanizmalara göre,

- voltaj kapılı kanallar,
- ligant kapılı kanallar,
- mekanik kapılı kanallar,

şeklinde sınıflanır.

Sinir ve kas hücrelerinde Na-K kanal kapıları voltaj kapılı kanallara, sinaptik iletimde rol alan ve **transmitter** adı verilen moleküllerin denetimde çalışan kanallar ligant kapılı kanallara, duyuşal sinir uçlarında gerilim, basınç gibi mekanik uyarıların etkisiyle açılan kanallar mekanik kapılı kanallara örnek oluşturur.

5.18.1.2. Kolaylaştırılmış difüzenme

Membranı doğrudan geçemeyen moleküller (tanecikler) özel taşıyıcı proteinlere bağlanarak membranı geçebilirler. Glikoz ve amino asitlerin çoğunun dokudaki taşınması **kolaylaştırılmış difüzenme** ile olur.

Basit difüzenme ile kolaylaştırılmış difüzenme arasındaki önemli farkı difüzenme akışı belirler. **Difüzenme akışı**, birim kesitten birim zamanda geçen mol sayısı olarak tanımlananır. Difüzenme akış hızı basit difüzenmede derişim farkı ile doğru orantılı iken, kolaylaştırılmış difüzenmede belirli bir derişim farkının üstünde sabit bir (maksimum) değerde kalır (Şekil 5-20).

Şekil 5-20. Basit difüzenme ile kolaylaştırılmış difüzenmede difüzenme akışı ile derişim arasındaki ilişki.

5.18.2. Aktif iletim

Hücre membranında bazı moleköl ve iyonlar enerji (ATP) tüketilerek derişim ya da potansiyel gradyentine karşı taşınırlar. Bu süreçte işlev gören taşıyıcı proteinler ATPaz etkinliği gösterir.

Hücre membranlarında Na^+ , K^+ , Ca^{++} , H^+ , Cl^- , Γ iyonları aktif iletim ile taşınır.

5.19. Difüzlenme ve ozmoz

Bir membran tarafından ayrılan iki bölmede membranı geçebilen bir maddenin farklı derişimli çözeltileri bulunduğunda yüksek derişimli bölmeden düşük derişimli bölmeye doğru bir **difüzlenme** gözlenir (Şekil 5-21).

Şekil 5-21. Moleküllerin membrandan difüzlenmesi.

Farklı iki çözeltiliyi ayıran yarı geçirgen bir membrandan su ya da başka çözücü moleküllerin geçmesi ise, difüzlenmenin **ozmoz** adı verilen özel bir durumunu oluşturur.

Şekil 5-22'deki gibi bir borunun sol bölmesinde membranı hiç geçemeyen (glikoz) ya da zor geçen (NaCl) bir maddenin çözeltisi varsa, su molekülleri daha yoğun oldukları sağ bölmeden sol bölmeye geçer. Böylece, sol bölmede yükselen sıvı düzeyi ile birlikte hidrostatik

Şekil 5-22. Ozmoz ve ozmotik basınç oluşumu.

basınç oluşur ve bir denge kurulur. Daha fazla su geçişini engelleyen bu basınca **ozmotik basınç** denir.

$$\text{Ozmotik basınç} = \rho \times h \times g \quad (5-17)$$

$g : 9,8 \text{ m/s}^2$,

ρ : çözelti yoğunluğu,

h : yükseklik farkı,

Molar derişimi c olan seyreltik bir çözeltinin ozmotik basıncı ise,

$$\text{Ozmotik basınç} = n \times c \times R \times T \quad (5-18)$$

R : genel gaz dursayısı ($8,31451 \text{ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$),

T : mutlak sıcaklık ($^{\circ}\text{K}$),

n : çözünen bir maddenin çözeltide verdiği molekül sayısı

c birimi mol/m^3 ise ozmotik basınç birimi Paskal olur.

Moleküllerin yalnızca sayılarının önemli olduğu, cinslerinin önemli olmadığı olaylara **ozmotik olaylar** denir.

Bir çözeltide iyonlaşmadan çözünen bir maddenin 1 mol miktarına **1 ozmol** denir.

Bir molekülü n sayıda taneciğe ayrıştırarak çözünen bir maddenin 1 mol miktarı ise **n ozmol** kadardır.

Bir çözeltinin 1 litresi içinde çözünmüş maddenin ozmol cinsinden miktarına **ozmolar derişim** ya da **ozmolarite** denir.

5.20. Biyoenerjetik açıdan moleküllerin membrandan iletimi

Suda çözünmüş bir maddenin moleküllerinin dağılımı daha önce gaz karışımlarının örneğinde görülen termodinamik kurallara bağlıdır. Bölüm 5.19’de belirtildiği gibi, bir kabın geçirgen bir membran ile ayrılmış iki bölmesinden birine maddenin yüksek derişimli, ikinci bölmesine ise daha düşük derişimli çözeltisi konulduğunda çözünmüş maddenin moleküllerinin ikinci bölmeye geçmeye başladıkları gözlenir. Bu ikinci termodinamik kuralla uyumlu bir olaydır, zira, maddenin moleküllerinin iki bölmeye eşit sayıda dağılımı entropide artış ve iç enerjide azalma ile gerçekleşecek ve

$$\Delta G = \Delta E - T \Delta S,$$

eşitliğine göre serbest enerjide azalmayla sonuçlanacaktır (Şekil 5-23)

Şekil 5-23. Pasif iletimin oluşumu.

Maddenin iki bölme arasındaki derişim farkını ortadan kaldıracak ve iki bölmedeki derişimler arasında bir eşitlik oluşturacak biçimde geçirgen membrandan difüzlenmesi **pasif iletim** olarak tanımlanır. Bu olayın kendiliğinden oluşması beklenir ve enerji gerektirmediği gibi serbest enerji de bir azalmayla gerçekleşir. Buna karşın, bölmeler arasında bir derişim farkının oluşumuna yol açacak biçimdeki bir iletim, entropide azalma, iç enerjide ve de serbest enerjide artış ile olanaklı olabilecektir (Şekil 5-24).

Şekil 5-24. Aktif iletimin oluşumu.

Serbest enerji gerektiren böyle bir iletim **aktif iletim** olarak tanımlanır. ΔG ile K (denge dursayısı) ya da ΔG ile ΔE^0 (redokspotansiyeli) arasındaki bağlantıları anlatan eşitliklere benzer bir eşitlikle, aktif ve pasif ileti türleri ile ΔG arasındaki bağlantıyla anlatılabilir:

$$\Delta G = 2,3 RT \log \frac{[C_2]}{[C_1]} \quad (5-19)$$

C_1 = maddenin 1.bölmedeki derişimi,

C_2 = maddenin 2.bölmedeki derişimi.

Bu eşitliğe göre, tıpkı yukarıdaki örneklerde olduğu gibi, $C_1 > C_2$ olduğunda ΔG negatif (=pasif iletim), $C_1 < C_2$ olduğunda ise, ΔG pozitif değer (=aktif iletim) kazanacaktır.

Örneğin $C_1 = 0,1 \text{ M}$, $C_2 = 0,01 \text{ M}$, deney sıcaklığı 27°C (300°K) olduğunda,

$$\begin{aligned} \Delta G &= 2,3 (1,98 \text{ cal.mol}^{-1} \cdot ^\circ\text{K}^{-1}) (300^\circ\text{K}) \log \frac{0,01 \text{ M}}{0,1 \text{ M}} \\ &= -1080 \text{ cal.mol}^{-1}, \end{aligned}$$

olacak, C_1 ve C_2 değerleri yer değiştirdiğinde, ΔG 'nin sayısal değeri değişmeyecek, yalnızca pozitif nitelikte olacaktır.

5.21. **Gibbs-Donnan dengesi**

Düşünüleceği gibi, canlı sistemlerde, örneğin hücre membranında, gerçekleşen iletim olayları yukarıdaki örneklerde görüldüğü ölçüde basit değildir. Hücre membranının seçici geçirgenliği ve hücre içinde bu membrandan geçemeyen fosfat bileşikleri ve proteinler gibi anyonların bulunması nedeniyle, madde ve iyonlar hücre içinde ve hücreler arası (interstisyel) sıvıda değişik derişimlerde bulunur. Membrandan geçemeyen anyonların hücre içinde bulunması **Gibbs-Donnan dengesi** adı altında tanınan bir durumun oluşumuna yol açar. Yukarıdaki örnekteki kabın bir gözüne bir protein çözeltisi (membran geçemeyen $\text{protein}^- + \text{Na}^+$) diğer gözüne ise NaCl çözeltisi konulduğunda (Şekil 5-25), ilk aşamada Cl^- (ve yük dağılımını dengelemek için de Na^+) iyonları daha yüksek derişimde bulundukları 1.bölmeden 2.bölmeye difüzlenir. Cl^- iyonlarının aksine, anyonik proteinin membrandan geçememesi burada oluşan dengenin daha değişik nitelikte olmasına neden olur. Gibbs tarafından termodi-

Şekil 5-25. Gibbs-Donnan dengesinin oluşumu.

namik düşüncelere dayanılarak ileri sürülen, daha sonra Donnan tarafından varlığı deneysel olarak kanıtlanan bu tip dengede bölmelerin birinde bulunan, difüzlenebilen iyonların derişimlerinin çarpımının, diğer bölmedeki aynı nitelikteki iyonların derişimlerinin çarpımına eşit olması gerekir:

$$[Na^+]_1 \cdot [Cl^-]_1 = [Na^+]_2 \cdot [Cl^-]_2 . \quad (5-20)$$

Gibbs-Donnan dengesinin termodinamik açıklanması ise şu şekilde yapılabilir: Na^+ iyonlarının difüzlenmesindeki serbest enerji değişimi,

$$\Delta G_{Na^+} = 2,3 R T \log \frac{[Na^+]_2}{[Na^+]_1} , \quad (5-21)$$

Cl^- -iyonlarının difüzlenmesindeki serbest enerji değişimi,

$$\Delta G_{Cl^-} = 2,3 R T \log \frac{[Cl^-]_2}{[Cl^-]_1} \quad (5-22)$$

Her iki iyonun birbiriyle bağlantılı difüzlenmesindeki serbest enerji değişimi ise,

$$\Delta G_{Na^+} + \Delta G_{Cl^-} = 2,3 RT \log \frac{[Na^+]_2}{[Na^+]_1} + 2,3 RT \log \frac{[Cl^-]_2}{[Cl^-]_1}, \quad (5-23)$$

olarak gösterilebilir. Denge durumunda ise serbest enerji değişimi sıfır olacağına göre,

$$\Delta G_{Na^+} + \Delta G_{Cl^-} = 0$$

$$0 = 2,3 R T \log \frac{[Na^+]_2}{[Na^+]_1} + 2,3 R T \log \frac{[Cl^-]_2}{[Cl^-]_1} \quad (5-24)$$

olacaktır. Bu eşitliğin yeniden düzenlenmesiyle,

$$2,3 RT \log \frac{[Na^+]_2}{[Na^+]_1} = -2,3 RT \log \frac{[Cl^-]_2}{[Cl^-]_1}, \quad (5-25)$$

$$= 2,3 RT \log \frac{[Cl^-]_1}{[Cl^-]_2},$$

$$\text{ya da } \frac{[\text{Na}^+]_2}{[\text{Na}^+]_1} = \frac{[\text{Cl}^-]_1}{[\text{Cl}^-]_2}, \quad (5-26)$$

$$[\text{Na}^+]_2 \cdot [\text{Cl}^-]_2 = [\text{Na}^+]_1 \cdot [\text{Cl}^-]_1 \quad (5-27)$$

eşitliği elde edilir.

Difüzlenemeyen proteinlerin varlığı nedeniyle, $[\text{Na}^+]_2 > [\text{Na}^+]_1$ ve de $[\text{Cl}^-]_1 > [\text{Cl}^-]_2$ olacaktır. İyonların bu şekilde eşitsiz dağılımı karşılığı olarak bir denge durumu görüldüğüne göre, yukarıdaki örneklerin tersine, Gibbs-Donnan dengesinde iki bölme arasında gerek Na^+ ve gerekse Cl^- gradyentlerinin oluşumu pasif olarak, bir enerji gerektirmeden gerçekleşecektir.

$[\text{Na}^+]_2 > [\text{Na}^+]_1$ ve $[\text{Cl}^-]_1 > [\text{Cl}^-]_2$, sonucu oluşan gradyentler boyunca,

$$\Delta G = 2,3 RT \log \frac{[\text{Na}^+]_1}{[\text{Na}^+]_2} \text{ ve}$$

$$\Delta G = 2,3 RT \log \frac{[\text{Cl}^-]_2}{[\text{Cl}^-]_1},$$

eşitsizliklerine göre Na^+ 'un 2.bölmeden 1.bölmeye, Cl^- 'un ise 1.bölmeden 2.bölmeye geçmesi beklenir (Şekil 5-26).

Şekil 5-26. Gibbs-Donnan dengesi sonucu Na ve Cl iyonlarının dağılımı.

Gibbs-Donnan dengesinden çıkarılması gereken bazı sonuçlara burada değinmek gerekir:

-Denge durumunda, proteinin bulunduğu 2.bölmenin ozmotik basıncının 1.bölmedekinden yüksek olması beklenir. Örneğin, hücrenin hipotonik bir ortamda şişmesi gibi sıvı yüzeyi 2.bölmede yükselecektir. Suyun 1.bölmeden 2.bölmeye geçmesi 1.bölmedeki iyon derişimlerini yükselteceğine göre, Cl⁻ (ve ona bağımlı olarak Na⁺) yeniden 2.bölmeye difüzlenecektir.

Oluşacak

böyle bir kısır döngü sonucu, kuramsal olarak, 1.bölmenin tüm öğelerinin 2.bölmeye geçmesi (ya da, hücre örneğinde, hücrenin şişerek çatlaması) söz konusu olacaktır.

5.22. **Membran potansiyeli**

Yukarıdaki durumda Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarından çok az miktarların diğer bölmeye geçmeleriyle bir membran potansiyeli oluşacaktır. Bu potansiyel iyonların difüzlmesini sağlayan derişim gradyentine ters yönlü olacak ve diğer bölmeye geçen iyonun geri difüzlmesinde (çekilmesinde) etkin olacaktır. Membran potansiyelinin ulaştığı değer sonucu iki yönde difüzlünen iyonların miktarı eşit olduğunda (bölmelerin

iyon derişimlerinde net bir değişim gözlenmediğinde) bir **denge potansiyeli** oluşacaktır (Şekil 5-27).

Şekil 5-27. Derişim ve potansiyel gradyentlerinin oluşumu.

Denge potansiyelinin değeri,

$$E = 2,3 \frac{RT}{nF} \log \frac{C_1}{C_2} , \quad (5-28)$$

(Nernst) eşitliği ile saptanır. Eşitlikle, C_1 ve C_2 , 1. ve 2.bölmelerdeki iyon derişimlerine; R , gaz dursayısına ($1,97 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{°K}^{-1}$); T , mutlak sıcaklığa (°K); F , Faraday dursayısına ($2,3 \times 10^4 \text{ cal.v}^{-1}.\text{mol}^{-1}$); n , iyon

değerliğine ve E, volt olarak denge potansiyeline (1. bölme potansiyeli eksi 2. bölme potansiyeli) karşılık gelir.

Gibbs-Donnan dengesinde geçerli olan hususların iyonların hücre içi ve hücre dışı sıvılardaki dağılımında oynadığı olası rolü belirlemek için,

- bu iyonların (başlıca K^+ , Na^+ ve Cl^- -iyonlarının) hücre içindeki ve hücre dışındaki (interstisyel sıvıdaki) derişimlerini saptamak,

- bu derişim değerlerini Nernst eşitliğine uygulayarak her iyon için denge potansiyelini hesaplamak,

- iyonların içinde bulunan bu denge potansiyeli değerlerini ölçülen gerçek membran potansiyeliyle karşılaştırmak gerekir.

Tablo 5-4'ün incelenmesi ve hücre içi ve dışı iyon derişimlerinin Nernst eşitliğine,

$$E = 2,3 \frac{RT}{nF} \log \frac{\text{katyon dış}}{\text{katyon iç}}$$
$$(ya da E = 2,3 \frac{RT}{nF} \log \frac{\text{anyon iç}}{\text{anyon dış}})$$

uyarlanmasıyla, Cl^- -iyonlarının hücre membranından difüzlenmesinin Gibbs-Donnan dengesine uygun olarak gerçekleştiği ve membran potansiyeliyle uyduğu görülür. K^+ -için hesaplanan denge

potansiyeli ise membran potansiyeline yakın, ancak, daha negatif bir değer taşımaktadır. (Hücre içine difüzlenen az miktarda Na^+ -iyonu, membran potansiyelinin, K^+ -denge potansiyelinden beklenenden, daha negatif olmasına neden olur. Bunun sonucu, K^+ -iyonları derişim gradyentine bağılı olarak az da olsa dışarı difüzlenme eğilimindedir). Na^+

	Denge potansiyeli (mV)	Hücre içi derişimi (mEq/l)	Hücre dışı derişimi (mEq/l)
K^+	-97	155	4
Na^+	+60	12	145
Cl^-	-90	4	120

Tablo 5-4. Kas hücresinde K^+ , Na^+ , Cl^- iyonlarının denge potansiyel değerleri.

için bulunan derişim değerlerinden hesaplanan denge potansiyeli ise, hücre içine yönelik derişim ve potansiyel gradyentlerine karşın, bu iyonun hücre dışı sıvıda yoğunlaşmış olduğunu ortaya koyar. Başka bir deyimle, yukarıdaki tanımlamalara göre, Na^+ iyonunun aktif iletimle hücre dışına çıkarılmış olması gerekmektedir (Şekil 5-28).

Şekil 5-28. Elektrokimyasal ve derişim gradyentleri.

5.23. Difüzlenme potansiyelleri

Membran potansiyeli, yukarıda Gibbs-Donnan dengesinde görülen mekanizmayla oluşabileceği gibi, iyonların değişik difüzlenme hızlarından da kaynaklanabilir. Sıvı ortamda böyle bir difüzlenme potansiyeli geçici nitelikte olmakla birlikte, hücre membranının seçici geçirgenliği, difüzlenme hızlarındaki farkları artırarak, potansiyel farklarını kalımlaştırabilir. Nitekim, K^+ hücre membranında Na^+ a oranla yaklaşık 100 kat daha hızlı difüzlenir.

Hücre membran potansiyelinin oluşumunda rol oynayan üçüncü ve çok önemli bir etmen Na^+-K^+ a bağımlı ATPaz sistemidir. Na^+ -iyonları bir derişim gradyentine karşı bu enzime bağılı olarak hücre içinden dışına, K^+ -iyonları ise hücre dışından içine etkin biçimde pompalanır. Membran potansiyelinin oluşumuna yol açan, “elektrogenik” nitelikteki bu pompanın hücre dışına pompaladığı yaklaşık 3 Na^+ -iyonuna karşılık, hücre içine 2 K^+ -iyonu alınır.

5.24. Membran dinlenim potansiyeli

Hücrelerin membranlarının iç ve dış yanları arasında bir dinlenim potansiyeli bulunur. Genellikle iç yanı negatif olan potansiyelin değeri hücre ve tür tipine göre -60 mV (örneğin mürekkep balığı aksonu) ile -100 mV (örneğin memelilerin kas hücresi) arasında değişir. Membran

potansiyelinin oluşumunda yukarıda anlatılanlara göre ön planda difüzenen K^+ , Cl^- ve çok az bir oranda da Na^+ -iyonları tarafından belirlenir. İyonların membran potansiyelinin oluşumundaki katkıları onların membranın iyon “kapılarından” geçiş hızlarıyla orantılıdır (difüzenme potansiyelleri). Bu iyonların iç ve dış derişimlerinin ve onların difüzenme (ya da membrandan geçiş) hızlarının (g) göz önüne alınmasıyla geliştirilmiş Goldmann eşitliği, bu parametrelerle membran potansiyelinin oluşumu arasındaki bağlantıyı anlatır:

$$E_{\text{membran}} = \frac{RT}{F} 2,3 \log \frac{g_K \cdot [K^+]_d + g_{Na} \cdot [Na^+]_d + g_{Cl} \cdot [Cl^-]_i}{g_K \cdot [K^+]_i + g_{Na} \cdot [Na^+]_i + g_{Cl} \cdot [Cl^-]_d} \quad (5-29)$$

Normalde, hücrelerin membranlarında (örneğin 10 μm çapında bir hücrenin membranında) potansiyel oluşumu çok az sayıda ($\sim 10^7$) iyon fazlalığının membranın bir yanında toplanmasıyla mümkün olabilir. Membran potansiyelinin oluşumu için hücre içi ya da hücre dışı sıvıların iyon derişimlerinde bir değişiklik söz konusu değildir. Yukarıda belirtildiği gibi membran potansiyeli K^+ -denge potansiyelinden daha düşük negatifliğe sahiptir. Ayrıca, Na^+ -iyonları da onları hücre içine çeken derişim ve elektrokimyasal potansiyel gradyentlerine karşın hücre dışı sıvıda yoğunlaşmıştır. Normalde, pasif ileti sonucu K^+ -iyonlarının dışa ve Na^+ -iyonlarının da (çok daha düşük bir hızla bile olsa) hücre içine geçmeleri ve bunun sonunda membran potansiyelinin ortadan kalkması gerekir. Ancak, hücre aktif iletiyle (Na^+-K^+ 'a bağımlı ATPaz - Na^+-K^+ -pompası- aracılığıyla ve ATP tüketerek) mevcut potansiyeli korur.

Nitekim, pompanın etkinliğini baskılayan ouabain (“strophantin”) gibi maddelerin etkisi ya da hücrenin enerji gereksiniminin karşılanamaması sonucu membran potansiyeli ortadan kalkar.

5.25. Aksiyon Potansiyeli

Dinlenim membran (zar) potansiyeli, yukarıda belirtildiği gibi, her hücre için belirli bir değerdedir. Sinir ve kas hücreleri gibi uyarılabilir hücrelerde bu değer -60 mV ile -95 mV arasında değişir. Sinir ya da kas hücreleri uygun bir uyarı ile uyarıldıklarında bu membran dinlenim potansiyeli değerinde geçici bir değişim olur ve bu değişiklik membran boyunca yayılabilir. Organlar arasındaki iletişim işte bu potansiyel değişiklikleri aracılığı ile sağlanır.

Canlıların iç ve dış ortamlarındaki her türlü değişiklik özelleşmiş reseptör hücreleri yardımıyla elektriksel sinyallere dönüştürülür. Bu sinyaller sinirler yoluyla beyine iletilir. Burada algılanıp yorumlanan hatta saklanabilen bu bilgilere yanıt olarak yine elektriksel sinyaller oluşturulur. Bu oluşan potansiyel değişiklikleri yine sinir hücreleri yardımıyla uygulayıcı (kas, salgı bezi gibi) organlara gönderilir.

Sinir sistemi yaklaşık 10^{12} adet sinir hücresi (nöron) ile bunun 10-50 katı kadar glial hücreden oluşur. Bilgi iletilişinde bunlardan yalnız nöronlar rol oynar. Nöronlar, birçok farklı şekil ve büyüklükte olabilir. Ancak genel olarak bir nöron, hücre çekirdeği (nükleus), uzantı (dendrit) ve sinif lifi (akson)ndan oluşur (Şekil 5-29).

Şekil 5-29. Miyelinli sinir hücresinin yapısı.

İki nöron arasındaki bilgi alışverişi **sinaps** adı verilen yapılarda olur. Bir nöron, uzantıları ya da gövdesindeki sinaptik bağlantıları ile diğer nörondan aldığı bilgiyi, akson boyunca potansiyel değişiklikleri şeklinde sinir son ucuna kadar iletir. Bu uçtan da bilgi sinaptik yol ile diğer hücrelere aktarılır.

Sinir ve kas hücre zarlarının dinlenme durumu, ortasında iyi bir yalıtkan bulunan kutuplaşmış bir **kondansatörü** andırır. Uygun bir uyarı ile bu kondansatör boşalabilir, hatta çok kısa bir süre için ters kutuplanabilir (depolarizasyon). Zarın belirli bölgesinde 1 ms kadar süren bu potansiyel değişikliğinden sonra, membran bu bölgede dinlenme durumuna dönerken potansiyel değişikliği membran boyunca yayılmasına devam eder. Lif boyunca iletilen uyarının temel birimi olan bu potansiyel değişikliğine **aksiyon potansiyeli** denir. Bu potansiyel değişiklikleri elektriksel ölçü ve gözlem araçları ile gözlenebilir ve kaydedilebilir (Şekil 5-30). Aksiyon potansiyelinin pozitif potansiyellere doğru değişim süreci **ters kutuplanma (depolarizasyon)**, yeniden dinlenme potansiyeline dönüş **geri kutuplanma (repolarizasyon)**, dinlenimden daha negatif potansiyele doğru gidiş ise **üst kutuplanma (hiperpolarizasyon)** olarak adlandırılır.

Hücreler, ısı, kimyasal, mekanik ve elektriksel olarak çok değişik yollarla uyarılabilirler. Laboratuvarlarda bu yapay uyaranlardan elektriksel uyaranlar tercih edilir. Çünkü, özel elektronik devrelerde (stimülatör) elde edilen bu elektriksel uyaranları, uygulama süresi, şiddeti, frekansı bakımından kolaylıkla ayarlamak, değiştirmek ve yinelemek olanaklıdır.

Şekil 5-30. Aksiyon potansiyeli.

Ayrıca, mikroelettrot tekniği ile ağız kalınlığı çok inceltilmiş cam elektrotlar kullanılarak hücre membranına zarar vermeden içeri girip membranı uyarmak ve aksiyon potansiyelini gözlemek olanaklıdır.

Fizyolojik olarak,

- 1) Hormonlar (asetil kolin reseptörleri),
- 2) Isı (deride sıcaklık reseptörleri),
- 3) Mekanik (Paccini cisimlerinde, işitme tüy hücreleri),
- 4) Kimyasal faktörler (dilde tat reseptörleri),
- 5) Elektromagnetik ışınlar (retinada kon ve çomaklar),

gibi uyarılar ve reseptörleri aksiyon potansiyelinin oluşmasına neden olurlar.

Uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin yayılma hızı, dinlenim membran potansiyeli, aksiyon potansiyelinin tepe değeri ve süresi hücre türüne göre değişir (Tablo 5-5). Ancak, hücrede bir kez aksiyon potansiyeli ortaya çıkınca, büyüklüğünün ve zamanla değişim biçimi uyarının cinsi ve büyüklüğüne bağlı değildir.

Bir sinir uyarısı, sönmeden ve biçimi bozulmadan bir akson boyunca sabit hızla iletilir. Yani, bir sinir lifi ya iletim durumundadır, ya da değildir.

Yayılma hızı	1 - 100 m/s
Dinlenim membran potansiyeli	(-60) - (-95) mV
Tepe değeri	(+20) - (+50) mV
Süre	0,5 ms - 0,5 s

Tablo 5-5. Aksiyon potansiyelinin özellikleri.

İletimde ise, aksiyon potansiyeli bu lif için karakteristik, sabit bir şekilde ortaya çıkar. Bu özellikler **hep ya da hiç davranışı** olarak adlandırılır.

Yalıtılmış tek hücrelerde yapılan deneylerde uyaran şiddeti **eşik uyaran** adı verilen bir değere ulaşmadıkça aksiyon potansiyeli oluşmaz. Uyarıların aksiyon potansiyelini yaratabilmeleri ancak belirli bir şiddet ve sürede uygulanmalarıyla olasıdır. Uyarının etkili olabilen minimum şiddetine **eşikdeğer** denir. Eşikdeğerden daha az şiddetli olan uyarılar **eşikaltı** uyarılar, daha şiddetli olanlar **eşiküstü** olarak tanımlanır. Eşikdeğer, membran potansiyelini aksiyon potansiyelini doğuracak bir değere kadar ters kutuplayan (depolarizleyen) uyaran şiddetidir. Laboratuvar ve klinikte uygulanan eşikdeğerler sabit değildir. Hücreden hücreye değiştiği gibi, birbirini izleyen uyarılar ya da metabolik ve hormonal etkilerle aynı hücrede değişimler gösterir. Elektriksel uyaran kullanıldığında, akım uygulama süresi Δt küçültülünce, eşik akım şiddeti ($I_{\text{eşik}}$) yükselmektedir. Buna göre bir aksonu elektriksel olarak uyarmak için minimum bir elektrik yükü gerektiği ($\Delta Q = I_{\text{eşik}} \cdot \Delta t$) anlaşılmaktadır. Dikdörtgen şekilli akım uyarıları ile çalışırken eşik akım şiddetinin, uygulama süresine göre, değişimi hiperbolik bir eğridir (Şekil 5-31).

Şiddet-süre eğrisi olarak adlandırılan bu eğri, deneysel olarak

$$I_{\text{eşik}} = \frac{a}{\Delta t} + b \quad (5-30)$$

bağıntısına uyar.

Eğri, bir minimum akım şiddetinin altında, uygulama süreleri ne kadar uzun olursa olsun, uyarı oluşturulamayacağını ortaya

koymaktadır. Bu akım şiddeti **reobaz** olarak adlandırılır. Eşik akım şiddetinin $\Delta t \rightarrow \infty$ için aldığı sınır değeri, reobaz akım şiddetinin karşılığıdır:

$$\lim_{\Delta t \rightarrow \infty} I_{\text{eşik}} \cong b$$

Şekil 5-31. Eşik akım şiddetinin uygulama süresine bağlılığı, şiddet-süre eğrisi.

Bağıntıya göre, Δt 'nin çok küçük olması durumunda b terimi önemsiz kalır ve

$$\lim_{\Delta t \rightarrow \infty} I_{\text{eşik}} \cong \frac{a}{\Delta t} \quad a = I_{\text{eşik}} \cdot \Delta t \quad (5-31)$$

yazılır.

Reobazın 2 katı değerinde ($2b$) bir akımın uyarı oluşturabilmesi için uygulanması gerekli minimum süreye **kronaksi** denir. Bu kavram uyarılabilirliğin bir ölçüsü sayılır.

Bir aksona eşikaltı düzeyde bir elektrik uyarı uygulandığında, aksiyon potansiyeli gelişmez. Ancak, uygulama noktası civarında membran potansiyeli az da olsa değişir. **Yöresel yanıt** adı verilen bu potansiyel değişikliği aksiyon potansiyeli gibi yayılmaz. Yöresel olarak

ortaya çıkar ve söner. Yöresel yanıtın değeri uyaran şiddeti arttıkça artar (Şekil 5-32).

Şekil 5-32. Uyarılabilir hücrenin, süresi sabit, şiddeti artan uyaranlara karşı verdiği yanıtlar.

1. Yöresel geçici bir potansiyel
2. Daha yüksek yöresel geçici bir potansiyel
- 3, 4. Aksiyon potansiyeli

Eşikaltı bir uyarının neden olduğu ters kutuplanma (depolarizasyon) henüz tam sönmeden bir hücreye ikinci bir eşikaltı uyaran daha uygulandığında, ikinci uyarının oluşturacağı yöresel ters kutuplanma birinciden arta kalana eklenebilir ve toplamaları eşik potansiyele ulaşarak bir aksiyon potansiyelini tetikleyebilir. **Toplama (“Summation”)** olarak adlandırılan bu olayla sinir sisteminde iki farklı şekilde karşılaşmaktadır (Şekil 5-33).

Şekil 5-33. Ardışık eşikaltı uyaranların etkisi.

A: Eşik altı bir uyaran etkisinde yöresel yanıt

B: Eşik altı iki uyaranın peşpeşe uygulanmasında zamansal toplama ile aksiyon potansiyeli oluşur.

Bir sinir hücresi yukarıdaki gibi çok kısa zaman aralığı içinde ardışık iki eşikaltı uyaran etkisinde kalarak yöresel olarak ters kutuplanabilir. Bu olaya **zamansal toplama** (“**temporal summation**”) denir. Bu olaya daha çok çevresel sinir sisteminde rastlanır. Diğer taraftan bir nöron aynı anda farklı bölgelerinde eşikaltı uyaranlar etkisinde kalabilir. Bu tür iki ya da daha çok odaktan kaynaklanan eşikaltı yanıtlar bir diğer noktada toplanarak eşik değere ulaşabilirler. **Uzaysal toplama** (“**spatial summation**”) olarak adlandırılan bu türden toplama işlemi merkezi sinir sisteminin integrasyon işlemleri için önem taşır.

Uyarılabilir bir hücre için kritik potansiyel ya da eşik potansiyel (E_{kritik}) uyaranın, şiddeti, süresi ve artma temposu ile birlikte zarın geçmişine de bağlıdır. Kare puls biçimli bir uyaran için eşik en düşüktür. Şiddeti zamanla doğrusal olarak artan uyaranlar için, eşik potansiyel, uyaran artma hızı ile ters orantılıdır (Şekil 5-34). Uyaranın artma hızı bir minimum değer altına düşerse, uyaranın son değeri ne olursa olsun aksiyon potansiyeli oluşamaz. Uyarılabilir bir hücre ya da dokuda şiddeti

yavaş yavaş artan bir uyaran karşısında eşiğin yükselmesi **uyum** (“**accomodation**”) olarak adlandırılır.

Şekil 5-34. Şiddeti yavaş olarak artan bir uyaran karşısında, kritik depolarizasyon potansiyelinin ve aksiyon potansiyeli genliğinin değişimi. Kritik depolarizasyon değerleri okla işaretlidir.

Uyarılabilir bir lifin belirli bir bölgesinde aksiyon potansiyeli oluşurken, ikinci bir uyaran şiddeti ne olursa olsun, bu bölgede aynı anda başka bir aksiyon potansiyeli oluşturamaz. Aksiyon potansiyeli

süresinden biraz uzun olan, lifin hiç uyarılamadığı bu döneme **mutlak refrakter dönem** denir. Bunu izleyen biraz daha uzun süreli ve **bağlı refrakter dönem** olarak adlandırılan bir dönemde ise ikinci bir uyarın aksiyon potansiyeli oluşturabilir. Ancak eşik değeri normal dinlenme durumuna göre yükselmiştir (Şekil 5-35).

Şekil 5-35. Eşik üstü bir uyarının yol açtığı uyarı sonrasında geçen süreye bağlı olarak ikinci uyarın için eşik şiddetindeki değişim.
x₁ - Mutlak refrakter dönem
x₂ - Bağlı refrakter dönem

Bir akson aynı anda iki ayrı yerinden uyarılabilir. Zıt yönlerde birbirine doğru yaklaşan aksiyon potansiyelleri aynı bölgeye ulaşınca, bir diğeri refraakter dönemine rastlayacağından, yok olur. Mutlak refrakter dönem bir yönde ilerleyen aksiyon potansiyelinin kendiliğinden geri dönmesini engeller. Mutlak refrakter dönem bir aksonun ardışık aksiyon potansiyelinin oluşturma frekansını da sınırlar.

Aksiyon potansiyeli oluşumunu iyon akımlarıyla açıklayacak olursak, 3 dönemde incelenebilir (Şekil 5-36):

1. Dinlenme dönemi,
2. Ters kutuplanma (depolarizasyon) dönemi,
3. Geri kutuplanma (repolarizasyon) dönemi

Şekil 5-36. Çift fazlı aksiyon potansiyelinin oluşumu.

Hücre içinin negatif, hücre dışının pozitif olduğu dinlenim durumu (1.Dönem), bir uyarı ile membranın Na^+ iyonlarına karşı geçirgenliğinin birdenbire artması sonucu, bozulur. Na^+ iyonlarının hızla hücre içine akması, dış ile iç arasında potansiyel farkını önce kaldırır, sonra iç yüzde dış yüze göre pozitif yük toplanır. Dinlenim potansiyeli ortadan kalkar ve ters yönde bir potansiyel oluşur (2.Dönem). Bu oluşumdan hemen sonra zarın tekrar Na^+ iyonlarına karşı geçirgenliği azalır ve hemen hemen durur. Lif içindeki pozitif ters potansiyel ortadan kalkar, normal dinlenim potansiyeli geri gelir (geri kutuplanma) (3.Dönem). Bu dönemleri ayrıntılı irdelemek için Na^+ yanında K^+ sızma kanallarını (difüzlenme), $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pompasını (aktif ileti) ve voltaj kapılı $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ kanallarını birlikte düşünmek gerekir.

Bir uyarı ile membran dinlenim potansiyeli -90 mV 'dan 0 'a doğru yükseldiğinde, -70 ile -50 mV arasında Na^+ iyonlarının geçiş

kapısı (aktifleşme kapısı) yapısal değişikliğe uğrayarak açılır (Şekil 5-37). Bu aktif sürede Na^+ geçirgenliği 500-5000 kat kadar artar ve Na^+ iyonları hücre içine doğru hızla akar. Voltaj yükselmesi sonucu, aktifleşme kapısının açılmasından bir süre sonra kanalı inaktifleştiren ikinci bir kapı (inaktifleşme kapısı) kapanır. Bu kapanma aktifleşme kapısının açılmasını izleyen saniyenin onbinde biri kadar bir süre sonra meydana gelir. Kapının kapanması ile membran dinlenim potansiyeline dönüş (geri kutuplanma) gerçekleşir.

Na^+ kanalının çok önemli bir özelliğini inaktifleşme kapısının membran potansiyelinin dinlenim durumuna yakın bir değere dönüşünceye kadar yeniden açılmaması oluşturur. Böylece, Na^+ kanalları sinir lifi geri kutuplanmadan yeniden açılmaz.

K^+ kanalları dinlenim durumunda kapalıdır. Bu nedenle, K^+ iyonları hücre dışına çıkamaz. Membran dinlenim potansiyeli -90 mV ile 0 mV arası bir değere yükselince kapının yavaşça açılmasıyla K^+ iyonları

Şekil 5-37. Aktifleşme ve inaktifleşme kapıları.

dışarı difüzenir. K^+ iyonlarının yavaşça dışarı difüzenmeleri Na^+ kanallarının kapanmasına rastlar. Böylece, Na^+ iyonlarının hücreye girişinin azalmasına koşut olarak, K^+ iyonlarının dışarı çıkışı geri kutuplanmayı hızlandırır ve dinlenim durumu gerçekleşir.

5.26. Mekanik İş

Kas kasılması, kimyasal enerjinin mekanik enerjiye çevrildiği bir biyolojik iş türüdür. Kasılma süreci vücudumuzun yaklaşık % 40'lık bölümünü oluşturan iskelet kası ile, % 5-10'luk bölümünü oluşturan düz kaslar ve kalp kasında benzer biçimde gerçekleşir. Kas kasılmasını anlayabilmek için kas dokusunun, örneğin iskelet kasının, yapısını tanımak gerekir. İskelet kasları, çapları 10-80 mikron arasında değişen kas liflerinin bir araya gelip kas demetlerini oluşturmalarıyla meydana gelir. Kas lifinin hücre membranı **sarkolemma** olarak adlandırılır. Bunun yapısı daha önce gördüğümüz plazma membranı ile, polisakkarit bileşiminde ince bir tabakadan oluşmuştur. Bu tabakanın en dışında ise **kollagen** iplikçikler bulunur. Kas liflerinin uçlarında sarkolemmanın bu yüzey tabakası bir tendon lifiyle kaynaşır. Tendon lifleri de demet halinde toplanarak kemiklere tutunur (Şekil 5-38).

Kas liflerinin her biri birkaç yüzden, birkaç bine kadar değişen sayıda miyofibrili kapsar. Miyofibrillerin herbiri ise, yaklaşık 1500

miyozin ile bunun iki katı kadar (~3000) **aktin** filamenti içerir. Aktin ve miyozin filamentleri kas kasılmasının ana işlevsel birimleridir.

Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda miyozin kalın filamentler, aktin ise ince filamentler olarak görülür. Bu filamentler birbirleri içine girdikleri için koyu ve açık şeritler halinde gözlenir. Aktin filamentlerini içeren kısım **I bandı** adını alır. Bunun nedeni, bu kısmın polarlanmış ışığa karşı izotrop olmasıdır. Miyozin filamentleriyle birlikte onların arasına giren aktin filamentlerinin de uçlarını içeren karanlık, anizotrop şeritlere ise **A bandı** denir.

Aktin filamentleri **Z çizgisi** adı verilen bir yapıya ve bu yapı üzerinden birbirlerine bağlanmışlardır. Z çizgisi bir kas lifçığı içinde (miyofibril) aktin filamentlerini birbirine bağladığı gibi, bir lifçikten diğerine devam ederek bir kas lifi içinde yan yana gelmiş bütün lifçikleri de birbirine bağlar. Z çizgileri iskelet ve kalp kaslarına çizgili bir görünüm kazandırır (Şekil 5-39).

Şekil 5-38. Kas dokusunun altyapıları.

Bu yapı ile bir kas lifinde aktin ve miyozin filamentleri yan yana gelmiş olur. İki komşu Z çizgisi arasında kalan bölüm **sarkomer** olarak adlandırılır. Kas dinlenim durumunda sarkomerin boyu yaklaşık 2 mikrondur. Bu uzunlukta iken aktin filamentleri her iki yandan gelerek miyozin filamentlerini örtmüş durumdadır. Bir kas lifi çekilip gerildiğinde, dinlenim durumundaki boyundan daha uzun hale gelir. Böylece her sarkomerde aktin filamentlerinin uçları birbirinden uzaklaşmış olur. Bu durumda A bandının tam orta yerinde açık bir çizgi meydana gelir. Bu **H bandı** olarak adlandırılır. Bu band normal görev yapan bir kasta çok seyrek görülür. Normal sarkomerin kasılma sürecindeki uzunluğunun kontraksiyonu 2-1,6 mikron arasında olması bunun nedenini oluşturur. Bu sınırlar içinde aktin filamentleri birbirlerini bile kısmen örtecek bir konuma gelirler.

Şekil 5-39. Çizgili kasın elektronmikroskop görüntüsü.

Miyofibriller kas lifi içinde ve **sarkoplazma** adı verilen bir matrikste asılı durumda bulunurlar. Sarkoplazma sıvısı içinde yüksek derişimlerde K^+ , Mg^{2+} , fosfat iyonları ve proteinler, ayrıca çok sayıda mitokondri bulunur. Bunlar miyofibriller arasında ve onlara paralel konumda yerleşmişlerdir. Mitokondrilerin çokluğu miyofibrillerin yüksek ATP gereksinimlerini yansıtır. Kas lifleri içinde **sarkoplazmik retikulum** adı verilen gelişmiş bir endoplazmik ağ sistemi bulunur. Bu yapı, kas kasılmasının düzenlenmesinde kalsiyum iyonlarının serbest bırakılmasıyla bağlantılı işlevi nedeniyle özel önem taşır.

Kas kasılmasının, **kayan filamentler** mekanizması ile gerçekleştiği bugün kabul edilmektedir. Bu mekanizmanın öngördüğü gibi, kasılma sürecinde filament boyları sabit kalır, ancak komşu iki Z çizgisinin arası daralır (Şekil 5-40). Kasılma sırasında A bandının uzunluğu sabit kalmakta, ancak I bandı kısalarak gözden kaybolur. Bu gözlemlere göre, ince filamentlerin kalın filamentler boyunca A bandının ortasına doğru kaymaları, I bantlarının dolayısıyla kas liflerinin kısalmalarına neden olmaktadır.

5.26.1. **Miyozin filamenti**

Miyozin, miyofibrillerin elektronmikroskopunda görülen kalın filamentlerine karşılık gelir. Miyozin uzun, polar bir protein olup, yaklaşık 480.000 dalton molekül ağırlıklıdır. Birbiri etrafında sarmal yapısı ile dolanmış altı polipeptit zinciri miyozini oluşturur. Bu altı zincirden ikisi büyük (200.000 dalton), diğer dördü küçük (20.000 dalton) molekül ağırlıklıdır (Şekil 5-41).

İki ağır zincir birbirine sarılarak bir çift sarmal yapar. Bu zincirlerden herbirinin bir ucu içine katlanarak **miyozin başı** adı verilen küresel yapıyı oluşturur. Böylece, miyozin molekülü **kuyruk** adı verilen uzun çift sarmal bir yapı ile bunun ucunda yan yana bulunan iki baştan

Şekil 5-40. Kas kasılmasının kayan filamentler mekanizmasına göre şematik gösterimi.

oluşur. Çift sarmal ile baş arasında esnek bölüme **menteşe** adı verilir. Miyozinin başlarının her biri ikişer hafif zincir taşır ve Ca^{2+} iyonları varlığında ATPaz etkinliğini gösterir.

Miyozin filamenti yaklaşık 200 miyozin molekülünden oluşur. Moleküllerin kuyruk kısımları toplanarak filamentin gövdesini oluşturur. Moleküllerin menteşe bölümlerindeki bükülme ise başları gövdeden dışarı yönelik bir konuma getirir. Miyozin moleküllerinin orta bir noktadan başlayarak, iki ters yönde faz farklı dizilmeleri filamentlerin iki yönlü simetrik yapısını belirler (Şekil 5-42).

Şekil 5-41. Miyozin filamentinin yapısı.

Miyozin filamentinin tüm uzunluğu 1-6 mikron arasında değişir. Bu filamentin tam orta bölümünde 0,2 mikronluk bir uzunlukta çapraz köprü başlarının bulunmadığı dikkat çeker. Menteşeli kollar miyozin

filamentinin uçlarına doğru uzanırlar. Bu nedenle merkezde miyozin molekülünün yalnız kuyruk kısımları bulunur. Baş kısımları bulunmaz.

5.26.2. **Aktin filamenti**

Aktin filamenti; aktin, tropomiyozin ve troponin adlı üç ayrı bileşenden oluşmuş bir komplekstir. Aktin filamenti sarmallaşmış iki **F-aktin** molekülünden oluşmuştur. Fibriler nitelikteki

Şekil 5-42. Miyozin molekülünün yapısı.

F-aktin molekülleri ise 42.000 dalton ağırlığındaki **G-aktin** moleküllerinin ATP varlığında polimerleşmesi sonucu oluşur (Şekil 5-43).

Tropomiyozin, aktin filamentlerine gevşek bağlanan diğer bir moleküldür. 70.000 dalton molekül ağırlıklığında, 40 nm uzunluğunda bir proteindir. Dinlenim durumunda F-aktine bağlanıp, aktinin aktif bölgelerini

Şekil 5-43. Aktin filamentinin yapısı.

kapatarak, aktin ile miyozin arasındaki kasılmaya yol açacak bir etkileşimi ortadan kaldırdığı düşünülmektedir.

Troponin, tropomiyozin boyunca yer almış molekül ağırlıkları 79.000 dalton olan üç altbirimden oluşmuştur. Bu küresel yapılı altbirimler Troponin I, T, C olarak adlandırılır.

Troponin I, aktine; Troponin T, tropomiyozine ve Troponin C, Ca^{2+} iyonlarına yakın ilgi gösterir. Bu kompleksin tropomiyozini aktine bağladığı düşünülmektedir.

Saf aktin filamenti, troponin-tropomiyozin kompleksi bulunmadığı zaman, Mg^{2+} ve ATP varlığında güçlü biçimde miyozine bağlanır. Troponin-tropomiyozin kompleksinin varlığında bu

bağlanmanın olmaması, gevşek durumdaki kasta bu kompleksin aktin-miyozin etkileşimini engellediğini düşündürmektedir. Ancak, kasılımdan önce troponin-tropomiyozin kompleksinin etkisi Ca^{2+} iyonlarının varlığında ortadan kalkar. Ayrıntıları bilinmemekle birlikte, Ca^{2+} iyonlarının troponin C ile birleşmesi aktin filamentindeki miyozin bağlanma bölgelerinin açığa çıkmasını sağlar. Böylece, kasılmaya yol açacak aktin-miyozin etkileşimi gerçekleşir. Özetle, kas kasılması mekanizmasını aşağıdaki gibi sıralanabilir (Şekil 5-44).

1- Miyozin molekülünün baş bölümü ATP ile birleşir. Miyozin başının içerdiği ATPaz etkinliği ile ATP hidrolizlenir. Oluşan ADP ve Pi

taşıyan baş gergin, enerji içerikli bir konformasyonda ve aktin filamentine dikey konuma gelir.

2- Ca^{2+} iyonlarının varlığında troponin-tropomiyozin kompleksinin inhibitör etkisi ortadan kalkar. Aktin filamenti üzerindeki bağlanma bölgeleri açılır ve miyozin başları bu bölgelere bağlanır.

3- Bağlanmayı başın A bandı yönünde ve çırpma şeklindeki eğilme hareketi izler. Aktin ve miyozin filamentinin karşılıklı kaymasına yol açan bu hareket (**mekanik iş**) için gerekli enerji bir önceki aşamadaki ATP hidrolizi ile sağlanır. Açığa çıkan enerji ise başın bağlanma öncesi gergin konformasyonunda korunmaktadır.

4- Başın eğilmesiyle serbestlenen ADP ve Pi , başa yeni bir ATP molekülünün bağlanmasına olanak sağlar. ATP'nin bağlanmasıyla ayrılan miyozin başı yeni bir döngüyü başlatır (Şekil 5-45).

ATP kas kasılması sırasında, buna göre, başlıca üç görev üstlenmiştir:

1-Aktif ve miyozin filamentleri arasında etkileşimin sonlandırılması,

2-Hidrolizi sonucu aktin ve miyozin filamentlerinin karşılıklı kayması, dolayısıyla kasılma için gerekli enerjinin sağlanması,

Şekil 5-44. Kas kasılmasının mekanizması.

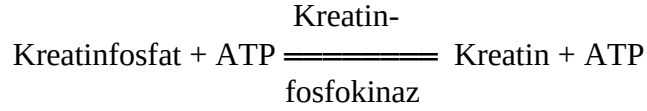
3-Uyarı üzerine açılan kanallar üzerinden sarkoplazmaya serbestlenen Ca^{2+} iyonlarının Ca^{2+} a bağlı bir ATPaz enzimi aracılığıyla yeniden sarkoplazmik retikuluma pompalanması ile kasılma sürecinin sonlandırılması.

Şekil 5-45. Kas kasılmasında oluşan kompleksler.

5.26.3. Kas kasılmasının enerji kaynağı

Kas kasılması çok fazla enerji gerektiren bir biyolojik olaydır. Bu enerji, normalde solunum yoluyla sağlanmakla birlikte kas anaerob koşullar altında da kasılabilmektedir. Kas anaerob koşullar altında gerekli enerjiyi glikoliz yoluyla sağlamaktadır. Nitekim, yeterli oksijenin sağlanamadığı ağır iş sürecinde, kas kısa bir süre için anaerobik koşullarda da çalışabilmektedir. Ancak, daha önce de görüldüğü gibi, solunuma oranla enerji kazanımında çok daha az verimli olan glikoliz glikojen depolarının hızla azalmasına ve ayrıca laktat oluşmasına yol

açar. Kas, gerek solunum ve gerekse glikolizin durdurulduğu koşullar altında da, kasılma etkinliği gösterebilir Böyle bir durumda, enerjinin **kreatinfosfat** adı verilen bir maddeden elde edildiği görölür. Kreatinin fosforillenmiş bir türevi olan kreatinfosfatın hidrolizi ile açığa çıkan enerji ($\Delta G = -10,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$) kasta, ADP'nin ATP'ye çevrilmesinde kullanılır:



Kreatinfosfat deposu yeterli olduğu sürece, solunumun ve glikolizin inhibisyonuna karşın kasın ATP içeriğinde bir azalma görölmez. Buna göre, kas dokusunda ATP'nin gereksinilen miktarda sağlanabilmesini güvenceye alan üç mekanizma bulunmaktadır.

- 1- Solunum,
- 2- Glikoliz,
- 3- Kreatinfosfat.

6. Bilgi Kuramı ve Kibernetik

6.1. Canlılar ve entropi

Canlı, açık sistem niteliğiyle çevreden (fotosentezle kazanılan ya da hazır alınan glikozla) sağladığı enerjiyi özgün yapıların sentezinde ve içortamının korunmasında kullanır. Canlıya özgü düzenin oluşturularak korunması entropide azalma (negatif entropi) anlamına gelir. Bu azalma canlı sistemle sınırlı olup, çevredeki entropi artışı pahasına sürer. Canlının yaşamının noktalanmasıyla entropiye karşı sürdürülen savaşım da son bulur.

Canlıların görünürde durağan (sabit) içortamları gerçekte devingen niteliklidir. Açık sistemin gereği içortamdaki maddeler sürekli bir dönüşüm ve çevreyle değişim içindedir. Sürekli işleyen değişim ve onunla bağlantılı bir dönüşüm sürecine karşın, hücre içindeki maddelerin derişimleri genelde değişmez (Şekil 6-1). Görünürdeki bu denge durumu

Şekil 6-1. Akardenge (homeostaz)

devingen denge ya da **akardenge (homeostaz)** olarak adlandırılır. Enerji akımı ve dönüşümü sırasında hücre ATP/ADP derişimlerinin sabit kalması akar dengenin tipik bir örneğini oluşturur. Akardengede entropi artışı en düşük düzeyde kalır. Bu açıdan, akardenge, entropiye karşı savaş veren canlılar için en uygun bir durumdur.

6.2. Bilgi ve entropi

Canlının entropiye karşı olan savaşımını mümkün kılan ve aşağıda ana hatlarıyla irdelenecek etmen bilgidir. Bilgi ile entropi arasındaki ilişki geçen yüzyılda fizikçi J.Maxwell ile başlayan ve yüzyılımızın ortalarına dek süren bir düşünce ve tartışma sürecinin sonunda aydınlanmıştır.

Daha önce verilmiş bir örneğe göre (bkz.Bölüm 5.18), biri gazla dolu, diğeri boş iki kabın birleştirilmesiyle, dolu kaptaki gaz moleküllerinin bir kısmının boş olana geçmesi beklenecektir. Bir süre sonra ise, her iki kaptaki gaz derişimlerinin (basınçlarının) eşitlenmesiyle sistem dengeye ulaşır. Denge, olasılığı en yüksek olan ve entropide artışla gerçekleşen duruma karşılık gelir.

Dolu kapta iki değişik çeşit gazın bulunduğu durumda da bu gazların eşit oranlarda iki kaba entropideki artışa koşut olarak dağılması beklenir. Diğer yandan, bu gazların birbirlerinden ayrışarak ayrı kaplarda toplanmaları olasılığı çok düşük olan ve kendiliğinden gerçekleşmesi hiç beklenmeyecek bir durumdur. Ancak, entropide azalmaya yol açacak böyle bir olayın gerçekleşmesi enerji gerektirmeyecektir. Kuramsal olarak, farklı gaz moleküllerini ayırdedebilen bir varlığın -bir “Şeytan”ın- katkısı ile bu mümkün olabilmelidir (Şekil 6-2). İşte, Maxwell, genel kanıya ters düşen böyle bir olasılığı ortaya atarak irdlemiştir. Bu

düşünceye göre, **Maxwell Şeytanı**’nın gaz moleküllerini tanıyıp, sınıflandırabilmesi yeterli olacak ve iş gerektirmeyecektir.

Şekil 6-2. Maxwell Şeytanı (Demonu).

Maxwell, Şeytanının yetkinliğini belirleyen özelliği gerektiğince tanımlayamamıştır. 1929 yılında, Maxwell Şeytanı’nın işlevi için özel bir bilgiye sahip olması gerektiğine işaret eden, Szilard konuya yeni bir boyut getirmiştir. Şeytanın bilgisinin gaz moleküllerinin ayrılması sırasında entropide görülen azalmaya enerjetik açıdan eşit olması gerekir: yani entropi ile bilgi arasında ters orantılı bir ilişki bulunmaktadır.

Maxwell Şeytanı’nı anımsatan bir etken cansız sistemlerde bulunmaz. Klasik termodinamiğin konusunu oluşturan bu alanda

kendiliğinden gerçekleşen olaylar her zaman entropide artışla sonuçlanır. Canlılarda gözlenen negatif entropi ise maddenin yukarıdaki örnekteki benzer biçimde eşitsiz dağılması (örneğin özgün içortamın oluşması ya da makromoleküllerin sentezi) ilkesine dayanır. Bu eşitsiz dağılımı gerçekleştiren, koruyan, kısaca Maxwell Şeytanı tanımına uyan etmenler ise, enzimler ve daha geniş kapsamda aktif proteinlerdir. Gerçekten, protein moleküllerinin özgün üçboyutlu yapıları aynı zamanda biyolojik işlevleri için gerekli bilgiyi de içerir. Buna göre, normalde olasılığı çok az olan bir düzenin ortaya çıkması ve entropide azalma aktif proteinlerin (ve onların biyolojik işlevi için gerekli bilgiyi içeren karmaşık üçboyutlu yapıları ile özgün yüzeyleri) yardımıyla olabilmektedir. Molekül düzeyde biyolojik bilginin (informasyonun) esasını **yapısal uyum** oluşturur.

Gelişmiş sistemlerde bir durum değişikliğine (dönüşüme) neden olan her türlü dış etki ve uyaran, o sistem için bilgi değeri taşır. Sistem tarafından alınarak; ölçülür ve başka bilgilerle karşılaştırılarak değerlendirilir. Bu şekliyle bilgi ölçülebilen bir büyüklüktür.

6.3. Bilgi kuramı

Bilgi kuramı, bilginin niceliğini belirlemek, bilginin saklanma ve iletilme olanaklarını araştırmak için geliştirilmiş bir disiplindir. Bilgi ile enerjetik açıdan yukarıda görülen ilişkinin ışığında, bilgi kuramı aynı zamanda termodinamiğin önemli bir uygulama alanını oluşturur.

Bilgi, bu bilgiye sahip ve gönderici olarak tanımlanan bir birey tarafından bir haber şeklinde alıcıya gönderilir. Bilginin haber olarak iletimi gerek gönderici ve gerekse alıcı tarafından bilinen bir şifrenin kullanılmasını ve bilginin bu şifreye göre gönderici tarafından

yazımını gerektirir (Şekil 6-3). Çok basit bir örnek verilecek olursa, elma sözcüğü aslında kendi başına anlam taşımayan seslerden oluşmuştur. Ancak, Türkçe bilen bir kişi bu sözcüğü değerlendirebilecek şifreye sahip olduğundan, bunu bir bilgi olarak algılayacaktır. Türkçe bilmeyen bir kişi için ise, bu sözcük bir anlam taşımayacaktır.

Şekil 6-3. Bilginin iletilmesi.

Ses, ışık, elektromagnetik dalga, vb. değişik araçlarla gönderilen bilgi şifresinin çözülmesiyle alıcıya ulaşmış olur. Canlılarda böyle bir bilgi iletiminin tipik örneği olarak DNA'da bulunan kalıtsal bilginin proteine çevrilmesi gösterilebilir. Şifrelenmiş bilginin mRNA aracılığıyla ribozomlara aktarılması, şifrenin ribozom düzeyinde çözülerek proteine çevrilmesiyle sonuçlanır. Bir protein hormonun getirdiği bilginin hedef hücre membranındaki reseptör aracılığıyla hücre içine aktarılması, biyolojik şifrenin çözümü ile moleküler eşleme arasındaki bağlantıya diğer bir örnek oluşturur. Hormona özgü reseptör

proteinlerine, dolayısıyla şifrenin çözümü için gerekli anahtara, sahip olmayan hücrelerde bilgi hücre içine iletilemez. Burada biyolojik şifrenin çözümü molekül düzeyindeki etkileşme ve uyum ilkesine dayanmaktadır. Şifreleme ve şifrenin çözümü, haberleşme için gerekli bir koşulu oluşturmaktadır. Burada şu özelliği ayrıca vurgulamak gerekir. Bir simge yalnız başına bir anlam taşımamasına karşın, farklı haberler içinde farklı bilgiler içerebilir. Buna en güzel örnek ünlem (!) işaretidir. Bu işaretin noktalama işaret sistemi, matematiksel işaret sistemi ve trafik işaret sistemi içinde taşıdığı anlamlar ve içerdiği bilgi miktarı farklıdır. Benzer şekilde, sinir sisteminde aksiyon potansiyeli farklı duyuşal yollarda ışık, basınç, sıcaklık gibi bilgiler taşıyabilir. Şifreleme için (günlük yaşamda da tanıdığımız) iki yöntem bilinmektedir.

a) Kavram benzeri simgelerin kullanıldığı yöntem. İfade olanakları kısıtlı bu yöntemle ancak basit ve kolay anlaşılır haberleri iletmek olasıdır.

b) Daha karmaşık kavramları şifrelemeye uygun yöntem. Bu yöntemde, tek başlarına bir anlam ifade etmeyen simgelerin gruplar halinde birleştirilmesiyle oluşturulan sözcükler kavram karşılığı olur. Bu sistemde simgelerin oluşturduğu alfabeden 'n' kerelik seçimle (n sayısında simge içeren) sözcükler oluşturmak olasıdır. Bu ikinci şifreleme sistemine günlük yaşamdan örnek olarak kullandığımız Latin alfabesi ya da Arap rakamların oluşturduğu sayım sistemi gösterilebilir. B sayısında simgeden meydana gelen bir alfabede n kerelik seçimle (ve n sayıda simgeden) oluşturulan sözcük olasılıkları B^n 'ye eşittir. Rakamlarla buna bir örnek verilecek olursa, 0'dan 9'a kadar toplam 10 rakamdan oluşan iki haneli sayılar için 100 olasılık mevcuttur.

$$B^n = 10^2 = 100$$

Aynı şekilde, dört harften (örneğin nükleik asitleri oluşturan dört bazı simgeleyen A, G, C, T (U) harflerinden) oluşan bir alfabede üç harf içeren sözcükler (kalıtsal şifre sözcükleri) için,

$$4^3 = 64$$

olasılık (=sözcük) bulunmaktadır. Görüldüğü gibi, bu ikinci yöntemle alfabenin içerdiği simge sayısına ve sözcüklerin büyüklüğüne göre ayarlanabilen, kuramsal olarak sınırsız anlatım olanakları ortaya çıkmaktadır. Böyle B sayıda simgeden oluşan alfabede, n sayıda simge içeren sözcüklerin meydana getirdiği dağarcığa **ana sözcük dağarcığı** adı verilir.

Bilgi iletimi gerek gönderici ve gerekse alıcıda bir kavram (sözcük) seçim işlemi gerektirir. Bilgi kuramına göre, bir dağarcıktaki belirli bir sözcüğe (bilgiye) ulaşabilmek için en uygun yol, her kez iki seçenek arasında bir seçimi gerektiren aşamalardan geçen yoldur. Bu ikili (=biner("binary") ya da dual) seçenekler genellikle 0 ve 1 simgeleriyle (=elementer simgeler= 'binary digits'(bits)) gösterilir. Burada $B=2$ 'dir. Böyle bir seçim yolunun izlenmesiyle elde edilen dağarcıkta, sözcük başına düşen elementer simge sayısı, geçilen seçim aşamalarına, (n)e, eşittir. Üç seçim aşamasından sonra elde edilen sekiz sözcüklü dağarcıkta her bir sözcüğün içerdiği simge gereksinmesi 3 elementer simge (=3 'binary digit' ya da 3 bit) olmaktadır (Şekil 6-4).

Bu seçim yolu sonunda oluşan,

$$\text{elementer (ana) dağarcık (ED)} = 2^n, \quad (6-1)$$

olmaktadır. Seçim aşamalarının sayısı olan n, elementer dağarcığın sözcüklerinin seçim ya da bilgi içeriği olarak tanımlanabilir.

$$n = \log_2 N = 1d N \quad (6-2)$$

(N= elementer dağarcıktaki sözcüklerin sayısı;

1d= logaritmus dualis= $\log_2$ 'yi taban alan logaritma= $3,32 \log_{10}$).

Şekil 6-4. İkili seçim sistemi ile üç seçim aşamasından sonra elde edilen dağarcıktaki sözcüklerin simge içeriklerinin belirlenmesi.

Yukarıda anlatılanlar özetlenecek olursa, N sayıda bilgi içeren bir dağarcıkta belirli bir bilgiyi (sözcüğü) seçmek için $\log_2 N$ sayısında ikili seçim işlemi gerekecektir. Böyle bir dağarcıktaki belirli bir sözcüğün bilgi içeriğini, (n), hesaplamak için,

$$n = \log_2 \frac{P_0}{P_1} \quad (6-3)$$

eşitliği de kullanılabilir. Her bilginin (sözcüğün) eşit sıklıkta karşılaştığı örneğimizde P_0 , bu bilgilerin herbirine tek bir seçimde ulaşma olasılığına, yani $1/8$ 'e, $\sum P_0$ ise olasılıkların toplamına (=1)

karşılık gelmektedir. Burada mesaj alınmadan önceki olasılık P_1 , mesaj alındıktan sonraki olasılık P_0 olarak da tanımlanabilir.

$$n = \log_2 \frac{1}{1/8} = \log_2 8 = 3 \text{ bit,}$$

olmaktadır. Daha basit olarak bu eşitliği paranın yazı ya da tura gelme örneğinde kullanalım. Atılan paranın tura gelme olasılığı $P_1 = 1/2$ 'dir. Eğer tura gelmişse (mesaj alınmışsa) $P_0 = 1$ olur. Bu durumda alınan

$$\text{bilgi miktarı } n = \log_2 \frac{1}{1/2} = \log_2 2 = 1 \text{ bit bulunur.}$$

n sayıda seçim aşamasından sonra erişilen dağılımındaki bir bilgiyi ifade için n 'den daha az biner simgenin de yetip yetmeyeceği sorulabilir. Her bir bilginin eşit sıklıkla karşılaşıldığı (her bilginin olasılığının eşit olduğu) durumda bilgilerin n 'den ya da $\log_2 N$ 'den az simge (ya da bit) ile anlatımı gerçekten olası değildir.

Örneğin A, B, C ve D bilgilerini eşit olasılıkla içeren dağılımda her bilgi için gerekli simge $n = \log_2 4 = 2$ bit olacaktır (Şekil 6-5).

Şekil 6-5. Eşit olasılıkta bilgi içeren bir dağarcıkta olasılık ve simge içeriği arasındaki ilişki.

n ile p arasında ters orantı (ve logaritmik) bir ilişki mevcut olduğundan (bir bilginin olasılığı ne kadar yüksekse ona ulaşmak için gerekli seçim aşamaları o derece azdır), n'nin değerini, olasılığın resiprokunun (bir bölümünün) dual logaritmasından bulmak olanaklıdır.

$$n = \log_2 N = \frac{1}{p} \quad (6-4)$$

Yukarıdaki örnekte (Şekil 6-5) her bilginin olasılığı $p = 1/4$ olduğundan

$$n = \log_2 \frac{1}{1/4} = \log_2 4 = \log_2 2^2 = 2 \cdot \log_2 2 = 2 \text{ bit}$$

her bilgi en az 2 elementer simge ya da bit ile ifade edilecek demektir. Buna göre bir dağarcıkta bulunan sözcükler olasılıklarının büyümesi ölçüsünde daha az simge ile ifade edileceklerdir. Bu nedenle yukarıdaki bilgilerin (A, B, C, D) sırasıyla 1/2, 1/4, 1/8, 1/8 olasılıkla mevcut olduğu

bir dağarcığı oluşturmak için izlenecek seçim yolu da (bilgilere eşit olasılıkların dağıldığı örnektekinden) değişik olacaktır (şekil 6-6).

şekil 6-6. Bilgilerin değişik olasılıklarla bulunduğu bir dağarcığın oluşturulması.

Dağarcıkta $1/2$ olasılıkla mevcut bilgiye oluşmak için tek bir seçim aşaması gerektiğine göre A bir tek simge (1 bit), B ise iki seçim aşaması gerektirdiğinden (olasılık $1/4$) iki simge (2 bit) C ve D ise üç seçim aşaması gerektirdiğinden (olasılık $1/8$) ve simge (3 bit) ile gösterilecektir.

Hesaplayacak olursak;

$$\text{Bilgi A için: } P_A = \frac{1}{2}, n = \log_2 \frac{1}{P_A} = \log_2 \frac{1}{1/2} = \log_2 2 = 1 \text{ bit}$$

$$\text{Bilgi B için: } P_B = \frac{1}{4}, n = \log_2 \frac{1}{P_B} = \log_2 \frac{1}{1/4} = \log_2 4 = 2 \text{ bit}$$

$$\text{Bilgi C için: } P_C = \frac{1}{8}, n = \log_2 \frac{1}{P_C} = \log_2 \frac{1}{1/8} = \log_2 8 = 3 \text{ bit}$$

$$\text{Bilgi D için: } P_D = \frac{1}{8}, n = \log_2 \frac{1}{P_D} = \log_2 \frac{1}{1/8} = \log_2 8 = 3 \text{ bit}$$

Bu dağarcıktaki sözcüklerin ortalama simge sayısı ise,

$$H = \sum_{i=1}^{n=4} P_i \log_2 \frac{1}{P_i} . \quad (6-5)$$

Shannon formülüne göre,

$$H = 1/2 (1) + 1/4 (2) + 1/8 (3) + 1/8 (3) = 14/8 = 1,75 \text{ bit},$$

hesaplanır. Yani bir dağarcıkta her bilginin (sözcüğün) bit ile ifade edilen simge (ya da seçim, bilgi) içeriği

$$n = \frac{1}{P_i} \text{ — bit.} \quad (6-6)$$

Anlatılanların ışığında, bir sözcüğün bilgi içeriği ne kadar az ise (ve o sözcüğün olasılığı ne kadar çok ise), o sözcüğün simge gereksinimi o ölçüde az olacak demektir. Bu ilkeye uygun örnekleri günlük yaşamda görmek mümkündür. Bilgi içeriği az olan kavramlar az sayıda simgeden (bir ya da iki heceden) oluşan sözcüklerle, bilgi içerikleri yüksek olan karmaşık nitelikteki kavramlar ise daha uzun sözcüklerle anlatılır. Bilginin anlatımı için gerekli ikili simge sayısının bir alt sınır olmasına karşın, bir üst sınır zorunluğu yoktur. Aynı bilgi gerektiğinden daha çok simge ile de iletilebilir. Gereğinden fazla olarak bulunan simgeler fazlalık olarak tanımlanır. Simge fazlalığı ileti için gereksiz olabileceği gibi, bilginin doğru olarak iletilmesi yönünden yarar da sağlayabilir:

Cuma, 25 Temmuz 1975, sabah saat 10.00,

haberi böyle fazla, haberin yinelenmesi niteliğinde sözcük içermektedir. Ancak, (örneğin telgrafla gönderilecek) bu fazlalıklar mesajın doğru olarak iletilmesini güvenceye alma amacını gütmektedir. Şifrelemedeki fazlalığın bu önemine diğer bir örnek olarak tekrar iki biner simge ile gösterilen 4 bilgi,

A	00
B	01
C	10
D	11,

gösterilebilir. Bu bilgilerin (sözcüklerin) içerdikleri simgelerde iletim sırasında meydana gelecek bir karışıklık, örneğin $0 \rightarrow 1$, A'nın B' ya da C'ye, B ve C'nin ise D'ye dönüşmesine yol açarken, mesajı alınacak birey bu yanlışlığın farkına varamayacaktır. Sözcüklerin içerdikleri bu simgelere bir üçüncüsü, sözcüklerin simge içeriğindeki farkı ikiye çıkaracak biçimde, eklendiğinde, kodlamada $1/3$ oranında bir fazlalık ortaya çıkacaktır:

A	000
B	011
C	101
D	110

Ancak, şimdi kodlama ya da iletim sürecinde ortaya çıkabilecek bir simge karışıklığı, 0'ın 1'e, ya da 1'in 0'a dönüşmesi, yanlışlığın mesajı alan tarafından fark edilmesini ve gönderici ile alıcı arasında ek bir haberleşme sonucu, düzeltilmesini sağlayabilecektir.

6.4. Bir mesajın ikili sistemde anlatımı

Bir bilgi istenilen bir alfabe ile, özellikle ikili alfabe ile, bu bağlamda Türk alfabesinin simgeleri ikili sistemle anlatılabilir. Türk alfabesinde 29 küçük, 29 büyük harf, 12 yazım simgesi olmak üzere toplam 70 simge olduğu düşünülürse, $N = 2^n$ bağıntısına göre her biri için kaç elementer simge kullanılması gerektiği hesaplanabilir.

$$N = B^n,$$

$$70 = 2^n$$

Her iki tarafın logaritması alınırsa,

$$\log 70 = \log 2^n$$

$$\log 70 = n \log 2$$

$$n = \frac{\log 70}{\log 2} \cong 7$$

Görüldüğü gibi, yalnızca 0 ve 1 elementer simgelerinin bir mesaj içinde 7 kez yinelenmesiyle Türk alfabesinin 70 simgesi ayrı ayrı anlatılabilir.

Bunlar,

a- 0000001

b- 0000011

.....

.....

A- 0110000

B- 1110000

.....

şeklinde yazılabilir.

Diğer bir örnek verelim. 20 farklı amino asitten 1000 tanesinin sıralanması ile oluşmuş bir protein molekülü oluşturmak için kaç farklı dizilim elde edilir?

$$N = 20^{1000}$$

Bu dizilimlerden herhangi birinin olasılığı nedir?

$$P = \frac{1}{N} = \frac{1}{20^{1000}}$$

Böyle bir proteinin bilgi içeriği ne kadardır?

$$\log_2 N = \log_2 20^{1000} = 1000 \log 20 = 4320 \text{ bit}$$

İkili sistem ile sayılar da anlatılabilir. Örnek olarak 14 sayısı ikili sistemde anlatılacak olursa, izlenecek pratik yol 14 içinde bulunan en büyük 2'nin kuvvetlerini toplamaktır.

$$14 = 2^3 + 2^2 + 2^1 \text{ dir.}$$

İkili sistemde ifade etmek için

$$2^3, 2^2, 2^1, 2^0$$

$$1 \quad 1 \quad 1 \quad 0 \quad \text{ yazılır.}$$

4 adet elektrik ampulünü seri bağlar, 1 durumu için ampuller yakılır, 0 durumu için yakılmazsa bu sayı anlatılmış olur. Gerçekten de hesap makinaları bu ilkeye göre çalışmaktadır. İkili sistemde toplama $1 + 1 = 10$ elde edilecek şekilde yapılır.

$$\begin{array}{r} (53) \ 110101 \\ (25) \ 11001 \\ + \underline{\hspace{1cm}} \\ (78) \ 1001110 \end{array}$$

6.5. Kanal kapasitesi

İletişim sistemlerinde bir kanalda iletilen toplam bilgi miktarı (n) kadar, bu kanalda birim zamanda (t) gönderilebilecek bilgi miktarı da önemlidir.

Simgesel olarak,

$$C = \frac{n}{t} \frac{\text{bit}}{\text{saniye}}, \quad (6-7)$$

şeklinde anlatılan bu kavram **kanal kapasitesi** olarak ta tanımlanır. Örneğin kulağın bilgi işleme kapasitesi (kanal kapasitesi) 200 bit/s, göz için 10^6 - 10^9 bit/s arasındadır.

6.6. Hücrenin bilgi içeriği

Termodinamik açıdan olasılığı çok düşük bir durum oluşturan canlı sistemlerin (ve onların en küçük birimi olan hücrenin) varolmasında bilgi belirleyici etken olmaktadır. Canlılar gelişme ve çoğalma süreçlerinde yaklaşık 500 milyon yıllık bir biyolojik evrim sürecinin ürünü olan bu bilgiyi okur ve kopyalar. DNA molekülünde saklı olan bu bilgi (ya da program) canlının gelişmesi, çoğalması, çevre koşullarına uyumu, kısaca varolması için gerekli olan, tüm ayrıntıları içerir.

DNA molekülündeki bilgi bir bilgisayar şeridindeki bilgiyle benzeşiktir. Her iki tür bilgi de tek boyutlu nitelikte olup, harflerin (sözcüklerin) ardaşık dizilişi ile oluşmuştur. Ancak, bu bilgi protein moleküllerine geçiş sonrasında üçboyutluluk kazanır. Protein molekülü başta (DNA molekülünde olduğu gibi) yapıtaşları olan amino asitlerin ardaşık dizilişiyle oluşur, ancak daha sonra iç katlanmalar sonucu özgün üçboyutlu yapısına dönüşür. Biyolojik açıdan aktif olan bu karmaşık ve düşük entropi içerikli üçboyutlu yapı kendiliğinden oluşur. Bu oluşumda protein molekülünün çevresinde bulunan su moleküllerinin dizilimi belirleyicidir (bkz.Bölüm 4.3.2.3). Protein molekülünün birincil yapısı, yani polipeptit zinciri, yalın, dolayısıyla entropi içeriği yüksek bir yapı düzenine karşılık gelir. Ancak, bu yapı düzeni su evresi üzerinde bir zorlama yaratır. Özellikle, polipeptit zincirinin içerdiği hidrofobik nitelikli amino asitlerin çevrelerinde bulunan su molekülleri devinimlerini yitirir. Bu durum, su evresi açısından entropide (negatif entropi) azalma anlamına gelmektedir. Polipeptit zincirinin kendi içine katlanarak hidrofobik amino asitlerini gizlemesi, su evresini “rahatlatır” ve entropi artışına yol açar. Buna koşut olarak amino asitler arasında

kurulan bağlarda sistemin (yani protein molekülünün) iç enerjisinde azalmaya neden olur. Böylece, su evresiyle etkileşim karmaşık ve entropi içeriği düşük bir yapının oluşumunu kendiliğinden gerçekleştiren bir olay olarak ortaya çıkarır. Protein molekülünün örneğinde görülen bu şekillenme, hücrenin diğer altyapılarının, supramoleküllerin, organellerin ve de hücre yapısının oluşumunda da geçerlidir. Sonuçta, DNA molekülünün içerdiği bilginin anlatımı hücrenin üçboyutlu organizasyonunu da belirler.

Hücrenin bilgi içeriğini ölçme ve biner terimlerle anlatmada belirli güçlüklerle karşılaşılır. Amino asitlerin proteinlerin değişik yapı düzenlerinde kazandıkları anlam ve bilginin farklı olması bunda rol oynar. Örneğin polipeptit zinciri üzerinde sıradan bir yerde bulunabilecek bir amino asidin, proteinin üçboyutlu yapısında aktif bölgede yer almasıyla, hatta bu bölgede gerçekleşen enzimatik katalizde görev yapmasıyla, kazanacağı önem farklı olacaktır.

6.7. Kibernetik ilkeleri

Bilgi Kuramı, bilginin şifrelenme ve iletilme mekanizmalarıyla uğraşır, ancak bilginin yazgısıyla ve ne şekilde değerlendirildiğiyle ilgilenmez. Buna karşın, Kibernetiğin ana konularını bilgi ileti yollarının etkileşmesiyle ortaya çıkan yönetim ve düzenleme mekanizmaları oluşturur. **Kibernetik** düzenleme mekanizmalarıyla uğraşan bir disiplin olarak Biyoloji, Sosyoloji ve Teknik gibi birbirine uzak görünen sahaların bir kesişme noktasını oluşturur.

Açık sistemler olarak canlılar, çevreleriyle sürekli bir değişim içindedir. Bu olgu canlıları çevre koşullarına özellikle bağımlı bir duruma getirir. Çevre koşullarında olumsuz yönde gelişme, çevrede

ortaya çıkan yeni türler canlının yaşam şanslarını olumsuz etkileyebilir. Böyle durumlarda yeni koşullara en iyi uyumu sağlayabilen canlılar varlıklarını öncelikli olarak sürdürebilir. İşte canlıların gerek çevreye uyumu ve gerekse iç ortamlarında olayların hız ve boyutlarının gereksinimlere göre ayarı evrim sürecinde gelişmiş düzenlenme mekanizmalarıyla sağlanır.

Biyolojik düzenleme mekanizmalarının bazılarını teknikten alınan model sistemlerin örneğinde incelemek ve açıklamak olasıdır. Biyolojik **geri besleme (“feed-back”)**, **“hem o-hem bu”** ya da **“ya o-ya bu”** mekanizmaları çok daha basit olarak bu model sistemlerde gösterilebilir. Bir elektrik devresinde açılıp kapanabilen bir anahtar ile bir lamba düşünelim. Bu devre bir transistör, bir elektron lambası ya da bir sinir hücresi hatta kişinin oy kullanması (olumlu ya da olumsuz) olabilir. Bilgi Kuramında ikili sistemde anahtar açık ise 0, kapalı ise 1 olarak gösterilir (Şekil 6-7).

Şekil 6-7. İkili sistemdeki elementer simgelerin (0,1) bir elektrik devresinde anlatımı.

İki anahtarı seri bağladığımızı düşünelim. A_1 ve A_2 anahtarlarının ikisi de kapalı olduğunda L lambası yanar. Biri açık olduğunda ise yanmaz (Şekil 6-8).

Şekil 6-8. Hem o-hem bu mekanizmasının bir elektrik devresi ile anlatımı.

<u>A₁</u>		<u>A₂</u>		
1	x	1	= 1	lamba yanar
0	x	1	= 0	lamba yanmaz
1	x	0	= 0	lamba yanmaz
0	x	0	= 0	lamba yanmaz

Biyolojik sistemlerde, ardaşık sıralanmış reaksiyonlarla sınırlı bir reaksiyon dizisinde (örneğin glikolizde) ürünün oluşması için tüm reaksiyonların gerçekleşmesinin gerekliliği buna bir örnektir. Bir sinir hücresinde iki farklı sinapstan uyarıların eşzamanlı gelmesiyle eşik değerin aşılabilmesi hem o-hem bu ilkesine örnek oluşturur.

Aşağıdaki gibi anahtarları birbirlerine paralel bağlanmış devrede, A₁ ve A₂ anahtarlarının ayrı ayrı 0 ve 1 durumlarını düşünüldüğünde, lambanın yanabilmesi için bir anahtarın devreyi tamamlaması yeterli olacaktır (Şekil 6-9).

Şekil 6-9. Ya o-ya bu mekanizmasının bir elektrik devresi ile anlatımı.

<u>A₁</u>		<u>A₂</u>	-		
1	+	0		1	lamba yanar
0	+	1		1	lamba yanar
1	+	1		1	lamba yanar
0	+	0		0	lamba yanmaz

Bu mekanizma ya o-ya bu ilkesi olarak adlandırılır. Devre iki lambalı olarak da çizilebilir (Şekil 6-10). Bu durumda A₁ kapalı ise L₁ yanacak, A₂ kapalı ise L₂ yanacaktır.

Karşıt yöndeki iki tepkimeyi katalizleyen enzimlerin (örneğin glikojen sentezini sağlayan glikojen sentetaz ve glikojen yıkımını tetikleyen fosforilazın) etkinliklerinin bir hormonun (örneği epinefrinin) yol açtığı fosforillenme yoluyla düzenlenmesi ya o-ya bu ilkesine uygun bir örnek oluşturur.

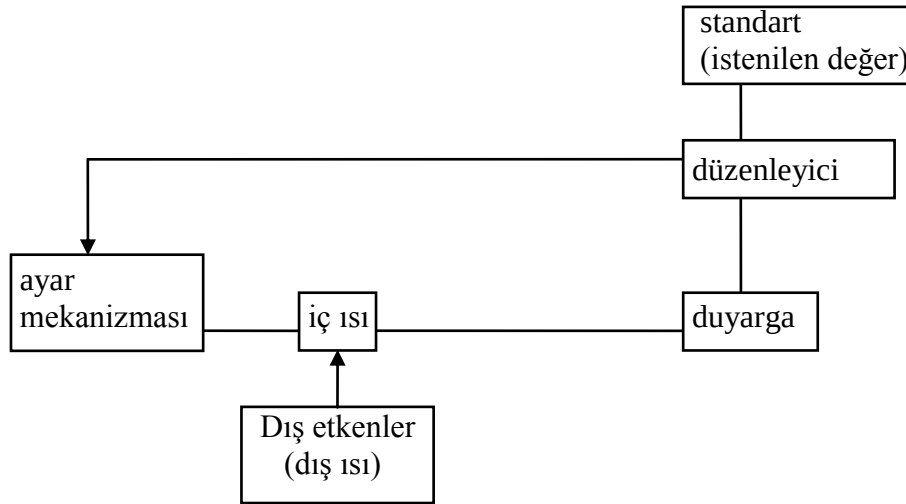
Şekil 6-10. Ya o-ya bu mekanizmasının (başka bir) elektrik devresi.

Bu enzimlerden glikojen sentetaz, glikoz-1-fosfatı glikojene, fosforilaz ise glikojeni glikoz-6-fosfata çevirir. Burada fosforillenme glikojen sentetazı inaktifleştirirken, fosforilazı aktif duruma getirir. Böylece, çift yönlü bir ayar mekanizması ile glikoz-glikojen metabolizması düzenlenmiş olur (Şekil 6-11).

Şekil 6-11. Ya o-ya bu mekanizmasına glikoz-glikojen metabolizması örneği.

Yukarıda görüldüğü gibi, canlıların en büyük bir çabası belirli (tuz derişimleri, sıcaklık vb) değerleri organizmada çevre koşullarına karşın sabit tutabilmektedir. Teknikte (ve günlük yaşamda) canlılardaki düzenlenme mekanizmalarını anımsatan mekanizmaların basit örneklerini

termostat ile ısıları ayarlanan fırınlarda ya da su banyolarında görmek olasıdır. Bütün bu cihazlara ortak düzenleme devresi şematik olarak gösterilebilir. Böyle bir devre, ayarlanması sözkonusu değişkenin (örneğin sıcaklığın) gerçek değerini ölçen bir “duyargadan”, ölçülen değeri istenilen değerle (standartla) karşılaştıran bir düzenleyici öğeden ve iki değer arasındaki farkı düzelten bir ayar mekanizmasından oluşur: (Şekil 6-12).



Şekil 6-12. Isı ayar mekanizması için genel düzenleme devresi.

Böyle bir devre,

1. aralıksız (ya da sürekli),
2. aralıklı (açılıp, kapanan),

nitelikte ayar mekanizmaları içerebilir. Aralıksız çalışan ayarlama mekanizmasına bir fırının sıcaklığını sabit tutabilmek için kurulmuş aşağıdaki şekilde bir düzenek örnek verilebilir (Şekil 6-13).

Şekil 6-13. Aralıksız çalışan ısısının sabit kalmasını sağlayan teknik model (Fırın örneğı).

Düzenleme devresinin iyi ayarlanmasıyla ısısının düzgün bir şekilde istenen düzeye erişerek, kalması sağlanabilir. Düzenleme devresinin elverişsiz bir şekilde kurulması ise, iç sıcaklığın hızla yükselip, kapağın kapanmasına ve dolayısıyla ocağın sönmesine yol açabilir. Genellikle beklenen ise, ısıdaki ön çıkışı hafif bir inmenin

izlemesi ve bu sapmaların yüksekliklerinin zamanla azalarak sıcaklığın istenen düzeyde dengelenmesidir: (Şekil 6-14).

Şekil 6-14. Aralıksız çalışan, sıcaklığın sabit kalmasını sağlayan bir teknik modelde sıcaklık değerlerinin zamanla değişimi.

Aralıkla çalışan bir düzenleme devresini ise kontakt termometre ile çalışan bir su banyosunda görmek olasıdır. Burada kontakt termometre duyarga ve aynı zamanda standart görevini görür. Termometrenin içindeki devre tamamlanmadığı (kontakt sıvısının sıcaklık artışına paralel olarak yükselerek standart niteliğindeki tele erişmediği) sürece ayar mekanizması ısıtıcı devrenin çalışarak banyo sıvısını ısıtmasını sağlar. Isının standart (istenen) değere ulaşmasıyla termometrenin içindeki kontakt (kontakt sıvısının standartla teması sonucu) kapanarak rölenin açılmasına ve ısıtıcı devrenin durmasına yol açar (Şekil 6-15).

Aralıklı düzenleme sisteminde, bir diyagramla gösterildiği gibi, sıcaklık önce istenen düzeye yükselir, daha sonra bu düzey çevresinde belirli bir sıklıkla salınır. Sapmaların (x) nedenini,

$$x = \frac{dx}{dt} \cdot T_0 \quad (6-8)$$

Şekil 6-15. Aralıklı çalışan ısıının sabit kalmasını sağlayan bir teknik model (Su banyosu).

Şekil 6-16. Aralıklı çalışan, ısıının sabit kalmasını sağlayan bir teknik modelde ısıının zamanla değışimi.

$\frac{dx}{dt}$ formülüyle açıklamak olasıdır. (—) kontakt sıvısının düzeyinin iniş çıkışındaki hızı T_0 (latens ya da ölü süre) ise banyodaki ısı artışının termometre (duyarga) tarafından saptanmasına kadar geçen zamanı ifade etmektedir. Buna göre, kontakt sıvısının düzeyindeki oynamaların hızı ve ölü sürenin uzunluğu (örneğin kontakt termometresinin ısıtıcı devreden uzaklığı) istenen değerden sapmaların büyüklüğünü belirler.

Çeşitli teknik model sistemlerinde görülen bu mekanizmalar ilke olarak canlılarda karşılaşılan tüm düzenleme sistemlerine uyarlanabilir. Hücre siklüsünün enerji metabolizmasına bağlı olarak düzenlenmesi buna bir örnektir. Bölüm 12-2'de ayrıntıyla ele alınacağı gibi, hücre siklüsünün düzenlendiği ve sentez (S) evresi için gerekli enerjetik koşullar G1 evresinde ortam koşullarına göre sağlanır. Maya hücreleri gibi glikolizin önplanda olduğu hücrelerde enerji metabolizmasında G1 evresinde cereyan eden düzenleme olaylarını aşağıdaki gibi bir model sistemde açıklamak olanaklıdır: (Şekil 6-17).

Hücrenin G1'den S evresine geçişi (ve DNA sentezinin başlaması) glikojen düzeyine göre ayarlanan bir aralıklı düzenleme mekanizmasıyla belirlenmektedir. Buna karşın, glikolizin hızı (fosfofruktokinazın etkinliği) hücrenin ATP (ADP) havuzundaki ATP (ADP) düzeyiyle aralıksız bir mekanizma ile ayarlanmaktadır.

Şekil 6-17. Maya hücrelerinde enerji metabolizmasının düzenlenmesi.

7. Enzimler- Fiziksel İlkeler

7.1. Giriş

Canlılar açık termodinamik sistemler olarak çevreleriyle sürekli bir madde ve enerji değişiminde bulunurlar (bkz.Bölüm 6.1). Yaşam gereksinimlerine göre düzenlenen bu alışveriş sürecinde canlıların içortamı büyük ölçüde sabit kalır. Çevreyle alışveriş ve etkileşimlerinin akardenge (“**homeostaz**”) ilkelerine göre gerçekleşmesi, canlıların içortamlarının değişmezliğinde belirleyici rol oynar. Akardenge ilkelerinin tipik bir örneği bir önceki Bölümde ATP derişiminin hücre içinde ayarlanması bağlamında verilmiştir (bkz.Şekil 6-18). Akardenge klasik termodinamik dengeden farklı olarak devingenlik ve hız faktörlerine bağımlıdır. Hücresinin ATP içeriğinin ($\sim 5 \times 10^6$ ATP molekülü), yenisi sentezlenmediği takdirde, gereksinimleri yalnızca iki saniyelik bir süre karşılayabilmesi, zaman ve hız faktörlerinin yaşamdaki önemini sergiler. Açık sistemlerin termodinamiğinde, akardenge, entropi bağlamında, klasik termodinamiğin durağan dengesine eşdeğer bir anlam taşır. Tıpkı, düzenli, sabit hızda çalışan bir makinanın örneğinde olduğu gibi, akardenge entropi oluşum hızının en düşük düzeyde tutulduğu duruma karşılık gelir.

Canlı sistemlere özgü düzenin oluşumu nasıl gerçekleşir? Bu tür negatif entropi oluşumuyla gerçekleşen süreçlere geçen yüzyılda Maxwell şeytanı kavramıyla bir açıklama getirilmeye çalışılmıştır (bkz.Bölüm 6.2). Szilard tarafından irdelendiği gibi, Maxwell Şeytanı sözkonusu süreci gerçekleştirebilmek için yalnızca (molekülleri tanıma ve musluğu işletme yönünde) özgün bir bilgiye gerek duyar. Cansız sistemler için kuramsal bir anlam taşıyan Maxwell Şeytanı’nın karşılığını

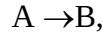
canlılarda aktif proteinler ve özellikle enzimler oluşturur. Aktif proteinler ligantlarını bağlayarak maddenin sistemde eşitsiz bir dağılımına yol açabilir. Ayrıca, enzimler maddelerin dönüşüm hızlarını artırarak benzer bir eşitsiz dağılıma yol açar. Gene ATP örnek olarak alınacak olursa, hidrolizi sonucu açığa çıkan önemli serbest enerji miktarına ($\Delta G = -7,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ derece⁻¹) karşın, bu nükleotidi içeren bir çözelti normal koşullarda oldukça kalımlı kalabilmektedir. (ATP çözeltisinin oda sıcaklığında günlerce kalsa bile, yalnızca küçük bir bölüm ADP'ye hidrolizlenir). Ancak, ortama çok küçük ("katalitik") miktarlarda eklenen ATPaz enziminin varlığında, ATP dakikalar içinde tümüyle ADP ve Pi'a dönüşmektedir. Buna göre, bir sistemin ATP çözeltisi içeren iki bölmesinden birine ATPaz eklenecek olursa, maddenin, tıpkı Maxwell Şeytanı'nın etkisinden bekleneceği gibi, eşitsiz dağılımı söz konusu olacaktır. Böylece, enzim bulunduğu bölmedeki ATP→ADP dönüşümünü, termodinamiğin öngördüğü biçimde, ancak çok kısa bir sürede, gerçekleştirerek entropide azalmaya neden olacaktır. Bu açıklamalardan görüleceği gibi, enzimler etkilerini tepkime hızını artırarak göstermektedir.

7.2. Tepkime hızları

Enzimlerin etki mekanizmalarının irdelenmesinden önce kimyasal kinetik ve tepkime hızı kavramlarının ele alınması uygun olacaktır. Kimyasal tepkimelerin hızı (v) zaman biriminde dönüşüm ya da ürünün oluşum hızı olarak anlaşılır ve $\text{mol.l}^{-1}.\text{san}^{-1}$ olarak ifade edilir. Tepkime hızı tepken derişimine bağlı olup, bu bağlantı,

$$v = k (\text{hız dursayısı}) \times [\text{tepken(ler)}]^n,$$

eşitliği ile tanımlanır. Bu eşitlikte üstel değer (n) tepkime derecesini belirler.



dönüşümünün gerçekleştiği basit bir örnekte, ürün(B)nin oluşum ya da kısaca tepkime hızı tek tepken(A)in derişimi ile orantılıdır. Bu tür tepkimeler tıpkı radyoaktifliğin bozunumunda görüleceği gibi **birincil derece tepkimeler** olarak adlandırılır:

$$v = \frac{dA}{dt} = k[A] \quad (7-1)$$

Bu eşitliğin tümlevinin (intregralinin) alınmasıyla türetilen eşitlikler,

$$\ln \frac{[A]}{[A_0]} = -kt, \quad (7-2)$$

$$\text{ya da} \quad \frac{[A]}{[A_0]} = e^{-kt}, \quad (7-3)$$

tepkenin derişiminin zaman içinde üstel olarak azaldığını ortaya koyar (Şekil 7-1). A_0 = tepkenin başlangıçtaki, yani ($t = 0$) derişimi. Bu eşitliklerden hareketle tepkenin derişiminin yarıya indiği süre, yarılanma süresi ($t_{1/2}$),

$$\ln 2 \frac{[A_0]}{[A_0]} = kt_{1/2}, \quad (7-4)$$

$$\ln 2 = 0,69 = kt_{1/2}, \quad (7-5)$$

$$t_{1/2} = \frac{0,69}{k}, \quad (7-6)$$

eşitliğine göre hesaplanabilir (bkz.Bölüm 3.5.1).

tepkinin birincil dereceli olduğunu ortaya koyacaktır.

Şekil 7-1. Birincil derece tepkime. Zamana göre tepken (A) derişimindeki azalma (a) logaritmik olarak ifade edildiğinde (b) elde edilen doğrusal bir ilişki

İkincil derece tepkimelerde ise, tepkime hızı iki tepkenin farklı derişimlerinin çarpımı ya da tek bir tepkenin derişiminin karesiyle orantılıdır:

$$\begin{array}{c} k \\ 2A \rightarrow C, \text{ tipi bir tepkimede,} \\ v = k[A]^2 \end{array} \quad (7-7)$$

$$\begin{array}{c} k' \\ \text{ya da } A + B \longrightarrow C, \text{ tipi bir tepkimede,} \\ v = k[A][B]. \end{array} \quad (7-8)$$

Tek bir tepkenin bulunduğu ya da iki farklı tepkenin derişimlerinin eşit olduğu durumlarda ($[A] = [B]$),

$$\frac{dC}{dt} = k[A]^2, \quad (7-9)$$

eşitliğinin tümlevinin alınmasıyla,

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A_0]} = kt, \quad (7-10)$$

eşitliği elde edilir.

Tepkenlerin ve derişimlerinin farklı olduğu, örneğın A>B, durumda, eşitlik,

$$\ln \frac{B_o(A)}{A_o(B)} = k(A_o - B_o)t, \quad (7-11)$$

olarak türetilir.

İkincil derecede tepkimelerin yarılanma sürelerinin belirlenmesinde,

$$t_{1/2} = \frac{1}{k A_o}, \quad (7-12)$$

eşitliğı kullanılır. Bu eşitliğı göre, bu tür tepkimelerde yarılanma süresi tepken derişimiyle ters orantılı olup, sınırlı derişimlerde tepkime süresinin önemli ölçüde uzaması sözkonusudur.

7.3. Tepkime hızı ve aktifleşme enerjisi

Moleküllerin tepkimeye girebilmeleri için bir aktifleşme sürecinden geçmeleri gerekir. Tepkimenin başlamasını zorlaştıran böyle bir enerji engeli tepkime hızı üzerinde de belirleyici olur. Birincil derecede bir tepkimede moleküllerin, yalnızca belirli bir bölümü bir zaman diliminde dönüşüm sürecine girebilmektedir. İkincil derecede tepkimelerde ise iki farklı tür molekülün aktifleşmiş temsilcilerinin karşılaşma olasılığıyla sınırlı bir dönüşüm gerçekleşebilir. Ortamın sıcaklığının artırılmasıyla tepkime hızlarında gözlenen artış bu düşüncüyü doğrular (bkz. Bölüm 5.2). Tepkime, moleküllerin başta tabi olduğı ($\pm$ simgesiyle gösterilen) bu aktifleşme ya da geçiş sürecinden sonra

gerçekleşir. Buna göre, tepkime, klasik termodinamiğin öngördüğü serbest enerji değişiminin ötesinde, başlama aşamasında aktifleşme enerjisine ($\Delta G^\pm$) gereksinir (Şekil 7-2).

Şekil 7-2. Aktifleşme enerjisi. Tepkime sürecinde serbest enerji değişim diyagramı. a) Klasik termodinamiğin tepkimeye ilişkin sağladığı bilgi; b) Moleküllerin $A \rightarrow B$ geçiş sürecinde ($\pm$) serbest enerji diyagramı; c) Aynı diyagram; her iki yöndeki tepkime süreçlerinde serbest enerji değişimleri ($\Delta G^\pm$). G_A ve G_B , A ve B moleküllerinin ortalama serbest enerji düzeyleri.

Aktifleşmiş $[A^{\pm}]$ ve durağan $[A^0]$ durumdaki moleküller arasındaki denge,

$$[A^{\pm}] = [A^0].e^{-\Delta G / RT} \quad (7-13)$$

eşitliği ile ifade edilir. Tepkime hızı aktifleşmiş moleküllerin derişimiyle $[A^{\pm}]$ orantılı olduğu için, bu tür moleküllerden hareketle başlayan tepkimenin hız dursayısı yeniden düzenlenmiştir.

$$k = Qe^{-\Delta H / RT} \quad (7-14)$$

eşitliği ile tanımlanır. (Q= Arrhenius aktifleşme entropisi dursayısı; $\Delta H^{\pm}$ =aktifleşme enerjisi (entalpisi)). Eşitlik (7-14) logaritmasının alınmasıyla,

$$\ln k = \ln Q - \Delta H^{\pm} / RT, \quad (7-15)$$

$\ln k$ 'nın, $\frac{1}{T}$ nin işlevi olarak gösterilmesiyle elde edilen doğrunun eğiminden,

$\Delta H^{\pm}$ hesaplanabilir (Şekil 7-3).

Böylece, $\Delta H^{\pm}$ değeri üzerinden deneysel verilerden hareketle tepkimenin önündeki enerji engelinin büyüklüğü belirlenir. Buna karşın, tepkime için belirlenen ΔG ya da K (tepkime denge dursayısı) değerleri

bu enerji engelinin büyüklüğü ya da tepkimenin hızı konusunda bilgi sağlamaz.

Şekil 7-3. Aktifleşme enerjisinin deneysel verilerden hesaplanması. T mutlak sıcaklık (K) üzerinden anlatılmaktadır.

7.4. Kataliz kavramı- enzimlerin etki mekanizması

Katalizleyici etmenler (bu kapsamda enzimler) aktifleşme enerjisini azaltarak tepkime hızını artırır. Katalizleyicinin tepkimenin denge dursayısı üzerinde bir etkisi yoktur. Aktifleşme sürecindeki serbest enerji miktarındaki değişmeler ($\Delta G^\pm$) aktifleşme enerjisi ($\Delta H^\pm$) ve konformasyon entropisi ($\Delta S^\pm$) tarafından belirlenir:

$$\Delta G^\pm = \Delta H^\pm - T\Delta S^\pm$$

Yüksek bir pozitif $\Delta H^\pm$ değeri ile negatif $\Delta S^\pm$ değeri tepkimenin yavaş gerçekleşmesine yol açar.

Moleküllerin (enzimatik tepkimelerde substrat olarak tanımlanan ligantların) tepkimeye girmeleri için gereksinilen enerji miktarı onların enzimin aktif bölgesine geçiş konformasyonuna benzeşik bir ara ürün (A^*) biçiminde bağlanmalarıyla ($A \rightarrow A^*$) azalır. Ara ürünün bağlanma sonucu, görelî olarak, düşük enerji düzeyli, dolayısıyla görelî kalımlı bir duruma gelmesi aktifleşme enerjisinin ($\Delta H^\ddagger$) azalmasında başlıca etkendir (Şekil 7-4). Böylece bir sonraki kimyasal dönüşüm olasılığı ($A^* \rightarrow B$) artar.

Şekil 7-4. Enzimlerin aktifleşme enerjisini azaltıcı etkisi.

Entropi faktörü, tepkimeye girecek moleküllerin tepkime için uygun konumda bulunma zorunluğunu yansıtır. Ancak, tepkime için uygun koşulların olasılığı düşük olup, bu olgu negatif konformasyon entropisi kavramıyla tanımlanır. Özellikle ikincil dereceden tepkimeler için geçerli olan bu zorunluk, aktif bölgeye bağlanan moleküllere verilen

özgün yönelim yoluyla sağlanır (Şekil 7-5). Ayrıca, enzimin aktif bölgesinin sudan arındırılmış niteliği, su moleküllerinin hidratlaşma yoluyla tepken moleküllerin etkileşmesini engelleyen etkisini ortadan kaldırır. Buna göre, enzimin aktif bölgesi, üstlendiği düzey (matriks) işlevi ile, bağladığı moleküllere tepkime için uygun konformasyon, reaktif gruplara uygun yönelim ve sudan arındırılmış niteliğiyle de tepkime için uygun ortam sağlar.

Katalizleyici etmenler olarak enzimlerin diğer bir özelliğini aktif (ya da katalitik) bölgelerinde çeşitli reaktif yan gruba sahip amino asidin bulunması belirler. Bu grupların bazıları karbon atomu üzerinde gerçekleştirdikleri nükleofilik etki, asidik gruplardan ayrılan H^+ iyonu ise elektron yoğun gruplar (örneğin karboksil grubu içindeki oksijen atomu) üzerinde elektrofilik etki yapar. Böylece, substrat moleküllerindeki yük

Şekil 7-5.Enzimin, aktif bölgesinde substrat moleküllerine tepkime için verilen uygun yönelim.

dağılımını bozarak, kovalent bağların kırılmasına, ikinci aşamada ise yeni bağların oluşumuna yol açar (Şekil 7-6).

Enzimlerin katalitik bölgelerinde gerçekleşen bu tür nükleofilik ve elektrofilik etkimelerin bir örneğini kemotripsinin aktif bölgesinde gerçekleşen proteolitik tepkime sürecinde görmek olasıdır (Şekil 7-7).

Şekil 7-6. Tepkime sürecinde nükleofilik ve elektrofilik etkiler. Hidrolitik tepkimeler örneğinde bu etkilerin sonucu ara ürün ve ürün oluşumu.

Şekil 7-7. Kemotripsinin etki mekanizması.

Kemotripsin, tripsinin yanısıra, serin proteazların bir temsilcisi olup, fenilalanin ve tirosinin karboksil gruplarıyla katıldıkları peptit bağlarını keser. Tepkime sürecinde aktif bölgede bulunan serin kalıntısı nükleofilik etkisiyle proteolitik kesimin gerçekleşmesinde belirleyici rol oynar.

7.5. Enzim kinetikleri

Enzim kinetiklerinin irdelenmesine temel oluşturan düşünce, enzim (E) ile substrat(S)'ın birleşmesiyle enzim-substrat(ES) kompleksinin oluşumunu ve ikinci (katalitik) aşamada bu kompleksten ürün (P)'ün açığa çıkışını öngörür. ES kompleksinin oluşumunun çok hızlı gerçekleştiği, ürünün (P) görece olarak yavaş açığa çıktığı ve bu ikinci aşamanın geridönüşümsüz olduğu varsayılır. ES kompleksinden E ve P'nin açığa çıktığı katalitik aşama birincil derecede bir tepkime niteliği gösterir.

$$v = k_{cat}[ES] \quad (7-16)$$

Enzim kinetiklerini ayrıntıyla ilk olarak inceleyen Michaelis ve Menten, bu düşünceyle bağlantılı olarak, ES kompleksinin, tepkime süresince, E ve S ile denge durumunda olduğunu ileri sürmüştür.

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (7-17)$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_S} \quad (7-18)$$

$[E] = [E_t] - [ES]$ olduğuna göre (E = serbest enzim molekülleri; E_t = tüm enzim molekülleri),

$$[ES] = \frac{[E_t] [S] - [ES] [S]}{K_s} \quad (7-19)$$

$$[ES] + \frac{[ES] [S]}{K_s} = \frac{[E_t] [S]}{K_s} \quad (7-20)$$

$$[ES] \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right) = \frac{[E_t] [S]}{K_s} \quad (7-21)$$

$$[ES] \frac{K_s + [S]}{K_s} = \frac{[E_t] [S]}{K_s} \quad (7-22)$$

$$[ES] = \frac{[E_t] [S]}{K_s} \cdot \frac{K_s}{K_s + [S]} = \frac{[E_t] [S]}{K_s + [S]} \quad (7-23)$$

Bu eşitliğin (7-16)ya yerleştirilmesiyle,

$$v = k_{cat} \frac{[E_t] [S]}{K_S + [S]} \quad (7-24)$$

eşitliği elde edilir.

Michaelis-Menten eşitliği olarak tanımlanan bu eşitlik, daha önce bir aktif proteinin ligandı ile etkileşiminde de (bkz.Bölüm 4.3.2.4) görüldüğü gibi hiperbolik bir eğrinin denklemidir. Substrat derişiminin çok yüksek olduğu, yani enzimin substrat ile doyurulduğu, durumlarda tepkime hızı bir sınır (maksimum) değere yaklaşacaktır: (Şekil 7-8)

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} v = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{[S]} = k_{cat}[E_t] = V_{max}. \quad (7-25)$$

V_{max} değerinden hareketle k_{cat} (enzimin dönüştürme katsayısı (“turn-over number”) s^{-1} cinsinden hesaplanabilir.

Michaelis-Menten kinetikleri ES kompleksinin oluşumunun (k_1), ürüne dönüşüm aşamasına (k_{cat}) oranla, çok daha hızlı gerçekleştiği düşüncesine dayanır. Ancak, k_{cat} değerinin k_1 ve özellikle k_{-1} değerlerine göre oldukça büyük olduğu durumlarda bulunur. Briggs ve Haldane tarafından önerilen modelde ise, oluşum ve ayrışımının kısa bir sürede bir yatışkın (durağan) duruma (“**steady-state**”) ulaşmasıyla, ES derişimi tepkime süresince ve substratın tükenmesine değin sabit bir düzeyde kalır.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E] [S] - k_{-1}[ES] - k_{cat}[ES] \quad (7-26)$$

yatışkın durumda, $d[ES]/dt = 0$ olacağına göre,

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}} [E] [S]. \quad (7-27)$$

Şekil 7-8. Enzim tepkime hızının substrat derişimine bağımlılığı. Michaelis-Menten kinetiğı olarak tanımlanan tepkime süresi.

Dursayıların (k_1 , k_{-1} , k_{cat}) yerine kapsamlı K_m teriminin kullanılması,

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \quad (7-28)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} = \frac{[E] [S]}{[ES]} \quad (7-29)$$

ve K_m 'in, K_s yerine konulmasıyla, Michaelis-Menten eşitliğine benzer bir eşitlik elde edilir:

$$v = k_{cat} \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (7-30)$$

K_m teriminin k_{cat} içermesi burada başlıca farkı oluşturur. K_m bu bağlamda gerçek bir ayrışım dursayısına karşılık gelmemektedir. Ancak $k_{cat} < k_{-1}$ durumunda büyük ölçüde bu değere yaklaşır.

Michaelis dursayısı (K_m) derişim boyutuna sahiptir ve mol.l^{-1} ile anlatılır. . Genelde, enzimin substratına olan ilginliğini yansıtır ve bir tür ayrışım dursayısı niteliğiyle ilginlikle ters orantılı bir ilişki gösterir. Buna göre, K_m 'in sayısal değerinde azalma ilginliğinin artışı anlamına gelir. Ancak, içerdği k_{cat} teriminin yüksek değeri enzimin ilginliğiyle orantılı olmayan, yüksek bir K_m değerinin hesaplanmasına yol açarak yanıltıcı olabilir.

Yukarıda belirtildiği gibi, k_{cat} enziminin katalitik etkenliğinin ölçüsünü yansıtan bir dursayıdır. s^{-1} birimiyle anlatılan k_{cat} , buna göre, saniyede enzim tarafından dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısını verir. Substratın çok düşük derişimlerinde ise k_{cat}/K_m özel bir anlam kazanır. Hemen hemen tüm enzim moleküllerinin serbest durum da olacağı bu koşullarda,

$$v = \frac{k_{cat}[E_t].[S]}{[S] + K_m}, \quad (7-31)$$

eşitliği,

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m} [E] \cdot [S], \quad (7-32)$$

eşitliğine indirgenir. Bu eşitlikte k_{cat}/K_m ikinci derecede bir tepkime dursayısı olarak enzim etkinliğinin bir ölçütü niteliğini kazanır.

(7-30) sayılı eşitliğe göre, K_m V_{max} 'ın yarı değerini veren substrat derişimine karşılık gelir ve Şekil 7-8'den yaklaşık olarak hesaplanabilir. Ancak, K_m ve de V_{max} üzerinden k_{cat} değerlerinin daha güvenli olarak hesaplanabilmesi için (7-30) sayılı eşitliğin resiproku alınarak Lineweaver-Burk'e göre yeniden düzenlenebilir:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}. \quad (7-33)$$

Bu eşitlikten hareketle, $1/v$ nin, $1/[S]$ 'ın işlevi olarak gösterilmesiyle elde edilen doğru, $1/v$ eksenini $1/V_{max}$, $1/[S]$ eksenini ise $-K_m$ değerlerinde keser. (Şekil 7-9).

Lineweaver-Burk çizilimine bir seçenek ise,

$$v = \frac{K_m \cdot v}{[S]} - \frac{K_m \cdot v}{V_{max}}, \quad (7-34)$$

Şekil 7-9. Çift resiproklú Lineweaver-Burk çizimi.

(“double reciprocal Lineweaver-Burk plot”).

eşitliğine göre, tepkime hızının (v) $v/[S]$ değerinin işlevi olarak gösterilmesidir (Bölüm 4.3.2.4 ile karşılaştırınız). Eadie-Hofstee olarak adlandırılan bu yöntemle elde edilen doğrunun eğimi $-1/K_m$ ’e karşılık gelir (Şekil 7-10).

7.6. Enzim inhibisyonu

Enzimlerin etki mekanizmalarını incelemeye enzim inhibitörlerinin büyük rolü olmuştur. Enzim inhibitörleri geridönüşümlü ve geri- dönüşümsüz etkilerine göre iki sınıfa ayrılır. Geridönüşümlü inhibisyon

Şekil 7-10. Eadie-Hofstee çizimi.

enzim ile inhibitör arasında zayıf bağlar üzerinden oluşan bir kompleksin varlığına dayanır. Bu tür inhibisyon inhibitörün ortamdan uzaklaşmasıyla sonlanır. Geridönüşümlü inhibisyonlar enzim etkinliğinin düzenlenmesi açısından özel önem taşır. Geridönüşümsüz inhibisyon ise inhibitörün enzime genelde kovalent bağlarla bağlanmasından kaynaklanır.

Geridönüşümlü inhibisyonun başlıca iki türü bulunur. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonda (“competitive inhibition”), substrat molekülüne benzeşik bir molekül enzimin katalitik bölgesine bağlanarak gerçek substratın bu bölgedeki dönüşümünü engeller (Şekil 7-11).

Oluşan inhibisyonun ölçüsü inhibitörün katalitik bölgeye olan ilginliğine ve derişiminin substrat derişimine olan oranına bağıdır. Yarışımlı inhibisyon substrat ile inhibitörün aynı bağlanma bölgesine yönelik yarışımına dayandığından, substrat derişimini, dolayısıyla substratın bu bölgeye

Şekil 7-11. Yarışımlı inhibisyon.

bağlanma olasılığını artırarak, bu tür inhibisyonu ortadan kaldırmak olasıdır. Ancak, bunun sonucu V_{max} (ve $1/2 V_{max}$) değerinin erişilebilmesi için gerekli substrat derişim değeri artar ve görünür K_m değeri yükselir. V_{max} değeri bu tür inhibisyonda değişmez (Şekil 7-12). Yarışımlı inhibisyonun matematiksel açılımı,

Şekil 7-12. Yarışımlı inhibisyonun enzim tepkime sürecine etkisi.

$$v = \frac{k_{cat} \cdot [E_t] \cdot [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (7-35)$$

olarak verilir. Eşitlikte, K_i , enzim yarışımlı inhibitör (EI) kompleksinin ayrışım dursayısına karşılık gelir. Bu eşitlik, resiprokunun alınmasıyla, yeniden düzenlenebilir:

$$1/v = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{V_{max} \cdot [S]} \quad (7-36)$$

Böylece hazırlanan Lineweaver-Burk çizimlerinden, farklı inhibitör derişimlerine karşılık gelen, görünür K_m değerleri belirlenebilir (Şekil 7-13).

Diğer yandan, bu inhibisyon türünde doğrular $1/v$ ekseninde $1/V_{max}$ değerine karşılık gelen noktada kesişir. Diagramdan inhibitörün artan derişimlerine bağılı olarak, eğimin $(1 + I/K_i)$ oranında arttığı görülebilir:

$$\text{eğim} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{K_m \cdot I}{V_{max} K_i} \quad (7-37)$$

Şekil 7-13. Enzim tepkime sürecine farklı yarışımlı (kompetetif) inhibitör derişimlerinin etkisi (Lineweaver-Burk çizimi).

Bu eşitliğe göre, eğimin inhibitör derişiminin (I) bir işlevi olarak çizimiyle elde edilen doğrunun I eksenini kestiği nokta $-K_i$ değerini verecektir (Şekil 7-14).

Tıpta ve biyolojide yaygın kullanım bulan pek çok madde ve ilacın belirli enzimatik tepkimelere özgü kompetetif inhibitör olduklarının burada belirtilmesi yerinde olacaktır.

Yarışımlı (kompetetif) olmayan inhibisyonda (“noncompetitive inhibition”), inhibitör katalitik bölgenin dışındaki bir bölgeye bağlanarak yol açtığı konformasyon değişikliğiyle enzim etkinliğini durdurur (Şekil 7-15). Bu tür inhibisyonu substrat derişimlerini artırarak ortadan kaldırma olanağı yoktur. Enzimin substrata olan görünür

Şekil 7-14. Enzim tepkime sürecine farklı yarışımlı (kompetitif) inhibitör derişimlerinin etkisi. Lineweaver-Burk çiziminden elde edilen doğruların eğimlerinden K_i değerinin belirlenmesi.

ilginliği (dolayısıyla görünür K_m değeri) inhibitör varlığında değişmez, ancak tepkimenin V_{max} değerinde azalma olur (Şekil 7-16). Bu tür inhibisyonun matematiksel açılımı,

$$v = \frac{[k_{cat}/(1 + [I]/K_i)] [E_t].[S]}{[S] + K_m} = \frac{V_{max}^{görünür} [S]}{[S] + K_m} \quad (7-37)$$

eşitliği ile verilmektedir. Bu eşitliğin çifte resiprokal düzenlenmesi ve Lineweaver-Burk yöntemiyle değerlendirilmesiyle, yarışımlı olmayan bir inhibisyon varlığındaki K_m ve V_{max} değerlerinin de hesaplanması olanaklıdır (Şekil 7-17). Görünür $1/V_{max}$ değerlerinin, inhibitör (I) derişimlerinin işlevi olarak çizimiyle elde edilen doğrunun I eksenine

kesişme noktası yarışımlı olmayan inhibitörün aksi değerli ayrışım dursayısını (K_i) verecektir.

Şekil 7-15. Yarışımlı (kompetitif) olmayan inhibisyon.

Yarışımlı olmayan inhibisyonun özel bir çeşidine (“uncompetitive inhibition”) inhibitör serbest enzim yerine substrat-enzim kompleksi içindeki enzim molekülüne bağlanır.

7.7. Enzim etkinliğinin düzenlenmesi

Büyüyen, çoğalan ve çevresiyle devingen ilişkiler içinde olan canlıların, bu ilişkilerinden doğan gereksinimlerinin karşılanması, ya da değişen ortam koşullarına uyumları enzim etkinliğindeki düzenlenmelerle sağlanır. Örneğin, hücresel moleküllerin biyosentez, yıkım ve taşıma hızlarının ayarlanmasını bu tür enzimatik düzenlemeler belirler.

Enzim etkinliğinin düzenlenmesi çeşitli yollardan gerçekleşebilir:

Şekil 7-16. Yarışımlı olmayan inhibisyonun enzim tepkime sürecine etkisi.

- **Enzim indüklenmesi (hücre gereksinimlerine göre yeni enzim moleküllerinin sentezi).** Bu mekanizma gen etkinliğinin düzenlenmesi yoluyla gerçekleşir ve bir maddenin değerlendirilmesinden sorumlu enzimlerin yapımını düzenler. Böyle bir değerlendirme sürecinde birbirini tamamlayan işlevlere sahip enzimlerin genleri genelde ortak bir düzenleyici bölgenin (operatör) denetimi altında bulunur. Operatör ve denetimi altındaki (yapısal) genler topluca **operon** adı verilen düzenleme birimini oluşturur. Genelde, hücrenin gereksinmediği proteinleri (enzimleri) şifreleyen genler operatöre bağlı **represör** adı verilen proteinler tarafından baskılanmıştır. Represör değerlendirilmesi sözkonusu maddeyle (ligantla) özgün etkileşim sonucu operatör bölgeden ayrışır. Böylece operon gereksinilen enzimlerin sentezi için aktifleşmiş olur (Şekil 7-18).

-

- Şekil 7-17. a. Enzim tepkime sürecine farklı yarışımlı olmayan (“noncompetetive”) inhibitör derişimlerinin etkisi: Lineweaver-Burk çizimi.
b. Görünür V_{max} değerlerinin I ’nın bir işlevi olarak çiziminden K_i değerinin belirlenmesi.

Şekil 7-18. Operon aktifleşmesi.

1950 ve 1960'lı yıllarda, laktozun E.coli'de glikoz ve galaktoza dönüşüm sürecinde laktozun oynadığı tetikleyici rolü tanımlamaya yönelik çalışmalarla aydınlatılan **lac** operonu enzim indüksiyon mekanizmalarının klasik bir örneğini oluşturmaktadır. Represör proteinlerin görev aldığı bu tür negatif düzenlemelerin yanı sıra aktifleyici proteinlerin görev aldığı pozitif düzenleme mekanizmaları da bulunmaktadır. Şekil 7-19'da represör ve aktivatörlerin ligantlarla etkileşimine bağlı çalışan farklı operon sistemleri özetlenmektedir.

- **Geri beslemeli (feed-back") düzenlenme.** Bu mekanizma bir reaksiyon dizisinin son ürününün, belirli bir derişime eriştiğinde, dizinin ilk aşamasını katalizleyen **alosterik enzime** bağlanarak onun etkinliğini durdurmasına dayanır (Şekil 7-20). Allosterik enzimler daha önce hemoglobin örneğinde görüldüğü gibi birden ok altbirimden oluşan

Şekil 7-19. Farklı operon sistemlerinin işleyiş biçimleri.

ve aktif bölge taşıyan proteinlerdir. Bu enzimlerin her altbirimi üzerinde bir katalitik bölge, ayrıca allosterik ya da düzenleyici bölgeler bulunur. Allosterik bölgelere bağlanan aktivatör ya da inhibitör niteliğindeki ligantlar üçboyutlu yapıda yol açtıkları değışikliklerle bu enzimlerin etkinliğini düzenler.

Şekil 7-20. Enzim etkinliğinin geri beslemeli düzenlenmesi.

Allosterik düzenlemeyi açıklamaya yönelik başlıca iki model geliştirilmiştir.

Monod, Wyman ve Changeux tarafından önerilen **toplu düzenlenme modeli (“concerted model”)** allosterik enzimlerin ikişer özdeş altbirim içeren dimerik düzenleyici birimlerden oluştuğunu öngörür. Bu birimlerden allosterik enzimlerde bir ya da katları sayılarda bulunur. Her düzenleyici birimin altbirimleri birlikte gevşek (“relaxed,R”) ya da gergin (“tight,T”) konformasyonda bulunabilir. R substrata yüksek, T ise düşük ilginliğe sahip konformasyona karşılık gelir (Şekil 7-21). Modelin varsayımına göre, özdeş altbirimler yalnızca RR ya da TT konformasyonlarında bulunabilir. RT konformasyonu ise olanaklı değildir. Substrat yokluğunda dimerik konformasyonlar T_o ve R_o olarak gösterilir, L ile bu konformasyonlarda bulunan dimerik birimlerin derişimlerinin oranları simgelenir:

$$R_o \rightleftharpoons T_o \quad (7-38)$$

$$L = T_o/R_o \quad (7-39)$$

Şekil 7-21. Allosterik bir enzimin gevşek (R) ve gergin (T) konformasyonları.

Dimer, R durumunda bir ya da iki substrat molekülü bağlayabilir, R_1 ve R_2 . K_R bu bağlanmaların ayrışım dursayısını simgeler:



$$K_R = \frac{2[R_0][S]}{[R_1]} = \frac{[R_1][S]}{2[R_2]} \quad (7-42)$$

Düşük ilginlikte de olsa, benzer bir etkileşim sırası T durumu için de geçerli olacak, substrat molekülünün bağlanmasıyla dimer topluca R durumuna geçecektir (allosterik denge sağa kayacaktır) (Şekil 7-22).

Dimerin bağlanma bölgelerinin substratla doyum oranı (v) daha önce aktif proteinler konusunun işlendiği (4.3.2.4) bölümündekine benzer bir eşitlikle gösterilebilir:

Şekil 7-22. Allosterik düzenlenme. Toplu düzenlenme modeli (“concerted model”).

$$v = \frac{[\text{Substrat bağı bölgeler}]}{[\text{Tüm katalitik bölgeler}]} = \frac{[R_1] + 2 [R_2]}{2([T_0] + [R_0] + [R_1] + [R_2])} \quad (7-43)$$

(Yalınlık amacıyla T_0 durumunun bu örnekte substrat bağlamadığı varsayılmıştır). Bu eşitliğin (7-42) ile birleştirilerek yeniden düzenlenmesiyle türetilen eşitlik substrat derişimine bağı olarak sigmoidal bir eğri verecektir.

$$v = \frac{[S]}{K_R} \cdot \frac{1 + [S]/K_R}{L + (1 + [S]/K_R)^2} \quad (7-44)$$

Sigmoidal eğri, bağlanma sürecinde altbirimler arasındaki işbirliğinin bir ifadesi olup, enzim tepkime hızına yansır.

$$v = v \cdot V_{\max} \quad (7-45)$$

Allosterik bölgelere bağlanan aktivatör ya da inhibitörler $T \rightleftharpoons R$ dengesini sağa ya da sola kaydırırlar (Şekil 7-23). Dolayısıyla allosterik denge dursayısının (L) değerini azaltarak ya da yükselterek etkilerini gösterirler (Şekil 7-23, 7-24).

Allosterik etkileşimlerde homotropik etki ile özdeş ligant etkileri arasındaki ilişki (örneğin substrat moleküllerinin kooperatif etkisi),

heterotropik etki ile ise farklı ligantların etkileri arasındaki ilişki (örneğin aktivatör ya da inhibitörün substrat ilginliğini etkilemesi) anlaşılır. Etkinin biçimine göre ayrıca pozitif (kooperatif) ya da negatif etkiler tanımlanır.

Şekil 7-23. Aktivatör ve inhibitörün allosterik enzime bağlanması.

Toplu düzenleme modeli , homotropik etkilerin pozitif olması gerektiğini, heterotropik etkilerin ise pozitif ya da negatif olabileceğini öngörür.

Şekil 7-24. Aktivatör ve inhibitörün allosterik enzimin substrata olan ilginliği ve dolayısıyla substrat ile doyumuna etkisi.

Sırasal düzenlenme modeli (“sequential model”) Koshland tarafından önerilmiştir. Toplu düzenlenme modelinde olduğu gibi, R ve T konformasyonlarının varlığını öngörür. Ancak altbirimlerin bu konformasyonları doğrudan substrat ile etkileşime bağlıdır. Substrat bağlanmasına koşut olarak altbirimin konformasyonu (örneğin $T \rightarrow R$ yönünde) değişir. Substrat bağlayan altbirimin konformasyon değişikliği komşu altbirimlerin konformasyonunu etkilemez, ancak onların substrat ilginliğini artırıp, azaltabilir (Şekil 7-25). RT'nin substrat ilginliği TT'ninkinden yüksek olması durumunda bağlanma kooperatif olacaktır. Sırasal düzenlenme modeli R ve T konformasyonları arasında bir denge öngörmez. Konformasyon değişimi substrat bağlanmasıyla gerçekleşir (“induced-fit”). Altbirimlerin konformasyon değişikliklerinin topluca gerçekleşmesi zorunluğu olmadığından, bu modelde RT türleri de

Şekil 7-25. Allosterik düzenlenme. Sırasal düzenlenme modeli (“sequential model”).

bulunmaktadır. Her iki model de allosterik düzenlemenin çeşitli örneklerinde geçerliği olmakla birlikte bazı gözlemleri açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Özellikle bu enzimlerin konformasyon durumlarının yalnızca R ve T konformasyonlarıyla kısıtlı kalması modellerin yetersiz yanını belirlemektedir. Enzimlerin allosterik

özelliklerinin bütünüyle kavranabilmesi için daha karmaşık modellerin geliştirilmesi gerekli gözükmemektedir.

- **Sentez ötesi modifikasyonlar**. Proteinlerin üçboyutlu yapıları, dolayısıyla biyolojik etkinlikleri, yapılarına kovalent bağlarla eklenen özgün grupların aracılığıyla değişebilmektedir. Proteinlere bu tür sentez ötesi aşamada en yaygın olarak fosfat grupları aktarılır. ATP'nin fosfat vericisi olarak işlev gördüğü ve kinaz adı verilen enzimler tarafından katalizlenen bu reaksiyonlar **fosforillenme** olarak adlandırılır. Fosforillenmenin ötesinde, aktarılan gruba bağlı olarak, ADP-ribozillenme, metillenme ve asetillenme reaksiyonlarının örnekleri de bilinmektedir. Bu reaksiyonlarda aktarılan grubun etkisiyle, örneğin aktarılan fosfat grubunun elektronegatifliğiyle, alıcı (akseptör) protein önce aktifleşerek gergin bir yapıya dönüşür. Bunu izleyen gevşeme sürecinde ise protein, enerji salınımıyla, yeni, kalımlı bir üçboyutlu yapı kazanır. Bu yeni yapı proteinin biyolojik açıdan aktifleşmiş yapısına karşılık gelir (Şekil 7-26). Sentez ötesi reaksiyonlar bazan da aktif proteinlerin inaktifleşmesine yol açabilir. Yukarıda da belirtildiği gibi, fosforillenme hücre içinde sentez ötesi modifikasyonların en yaygın ve etkili türünü oluşturmaktadır. Fosforillenme özellikle ters yönlü reaksiyonların etkili olduğu metabolik olaylarda reaksiyonların eşgüdümünü sağlamakta belirleyici olur (bkz.Bölüm 6.7). Fosforillenmeye dayalı düzenlenme ayrıntılara girme-den glukoz-glikojen metabolizmasının eşgüdümünde örneklenebilir

Şekil 7-26. Enzimlerin fosforillenmesinin enerjetiği.

(Şekil 7-27). İlgili enzimlerin fosforillenmediği koşullarda (Şık 1), bu reaksiyonlar glikojenin oluşumuna yöneliktir. Ancak, hormon (örneğin epinefrin) etkisiyle tetiklenen fosforillenme süreci glikojen sentezinin kısıtlanmasını, buna koşut olarak ta, glikozun hızla açığa çıkmasını sağlar.

- **İzoenzimlere dayalı düzenlenme.** Bazı enzimlerin hücre içinde çeşitli şekilleri bulunabilir. Enzimin molekül ağırlık açısından genelde eşit, ancak elektrik yükü açısından farklı olan bu çeşitleri **izoenzim** olarak tanımlanır. İzoenzimler farklı genlerin ürünleri olup, bu genlerin nükleotit dizilerindeki değişiklikleri birincil yapılarında ve örneğin farklı elektroforetik devinimlerinde yansıtırlar (Şekil 7-28).

Şekil 7-27. Glikoz-glikojen metabolizmasının fosforillenmeye baēlı eēēūdümü.

Yapısal farklılıkları nedeniyle izoenzimlerin substrat ilginlikleri ve etkinlikleri farklı olabilir. İzoenzimlerin farklı daēılımına baēlı olarak, bulundukları dokuların göstereceēi enzim etkinliēi farklı olabilir.

Şekil 7-28.Laktat dehidrogenaz(LDH) izoenzimleri. Dört altbirimli(tetramerik) bir enzim olan LDH iki farklı tür(H ve M) altbirimi farklı oranlarda içerebilir. Böylece oluşan izoenzimler nişasta gel elektroforeziyle ayrıştırılıp, boyanarak görüntülenebilir.

- **Simojen aktifleşmesi**. Organizmada bazı enzim türleri, özellikle proteazlar (örneğin sindirim sisteminde pepsin ve tripsin, kanın pıhtılaşmasında rol oynayan protein faktörler) normal koşullarda aktif olmayan bir öncül molekül (**simojen**) biçiminde bulunur. Gereksinim doğduğunda belirli bölgelerinin proteolitik sindirimi ile simojen aktif enzime dönüşür. Sürekli aktif kaldıklarında biyolojik çevre için sakınca oluştura-bilecek bu tür enzimler böylece denetim altında tutulmuş olur (Şekil 7-29).

Şekil 7-29. Simojen aktifleşmesi.

8. Molekölseel Biyofizik

8.1. Giriş :

Biyolojik sistemler, varlıklarını sürdürebilmek için kendilerine özgü yapıları oluşturur ve yenilerler. Bunun için gerekli enerjiyi çeşitli metabolik yollardan elde etmek, saklamak ve gerektiğinde değerlendirmek zorundadırlar. Bir organizma için yaşamsal önemi olan bütün bu işlemlerin yürütülmesi için gereken bilgi nükleik asitlerde saklanır. Bu biyolojik bilgi bir organizmanın olduğu kadar, bütün türlerin varlığı için de elzem bir niteliktedir. Bir türün varlığı, ancak bu özgül bilginin bir kuşaktan diğerine aynen aktarılabilmesi sonucu korunur. Uzun yıllar kalıtsal bilgi olarak adlandırılan bu bilgiyi taşıma ve iletme işlevini proteinlerin üstlenmiş olduğu düşünülmüştür. Proteinlerin 20 değişik çeşit yapıtaşından (amino asitten) oluşmaları ve doğada karşılaşılan en çeşitli ve en karmaşık yapıli molekülleri oluşturmaları nedeniyle bu düşünce özellikle kırklı yıllara dek benimsenmiştir. Ancak, 1944-1952 yılları arasında yürütölen iki değişik yaklaşımlı çalışma ile nükleik asitlerin özellikle DNA'nın kalıtsal bilgiyi taşıyan makromolekül çeşidi olduğu kanıtlanmıştır.

- Bu çalışmalardan ilki 1944 yılında Avery, MacLoad ve McCarty tarafından zatürreye yol açan Diplococcus pneumoniae (ya da kısaca pnömokok) bakterisi üzerinde yürütölmüş olup, 1928 yılında Griffith tarafından yapılan bir gözleme dayanır.

Pnömokoklar;

1. kapsüllü, patojen (hastalığa yol açabilen) ve kültürde üretildiklerinde düzgün koloniler oluşturanlar, ve
2. kapsülsüz, patojen olmayan ve kültürde pürüklü koloniler oluşturanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılır.

Griffith'in bulgularına göre birinci grup ölü pnömokoklarla karıştırılmaları sonucu canlı ikinci grup pnömokoklar birinci grubun özelliklerini kazanabilir. Nitekim, ölü birinci grup pnömokokların varlığında patojenleşen ikinci grup pnömokoklar bir fareye verildiğinde, hayvanın ölümüne yol açabilir. Ölü bakterilerin varlığının canlı bakterilerin özelliklerini değiştirici etkisine dayanan bu olgu **transformasyon** olarak adlandırılmıştır. Griffith'in gözlemini izleyen yıllarda transformasyona neden olan madde özellikle proteinler arasında aranmıştır.

Avery ve arkadaşları, ölü bakterilerden hazırladıkları özütün ve bu patojen olmayan, kapsülsüz pnömokokların kalıtsal özelliklerinde değişime yol açtığını saptayarak, kalıtsal bilgi ile DNA arasındaki bağlantıya ilk kez ışık tutmuştur. Ayrıca ölü patojen pnömokoklardan alınan DNA'nın patojen olmayan canlı pnömokokların ortama verilmeden bir deoksiribonükleaz (DNAz; DNA moleküllerini parçalayan enzim) etkisinde bırakılmasıyla transformasyon özelliğinin ortadan kalktığını da göstermiştir (Şekil 8-1)

Avery ve arkadaşlarının bu önemli buluşu yıllarca hakim kalıtsal bilgi ile proteinler arasındaki bir bağıntıyı benimseyen görüşe ters düştüğünden, önceleri bilim dünyasında tereddütle karşılanmıştır. Ancak, 1952 yılında Hershey ve Chase daha değişik ve daha doğrudan bir

yaklaşımlla Avery'nin bulgularını doğrulamış ve DNA'nın gerçekten kalıtsal bilgiyi taşıyan molekül olduğunu göstermiştir.

Şekil 8-1: Griffith deneyi (transformasyon deneyi)

Hershey ve Chase, ilk aşamada T4 fajını ^{32}P ve ^{35}S radyoizotopları içeren bir ortamda üreterek faj DNA'sını özgün olarak ^{32}P ile, faj proteinlerini ise ^{35}S ile işaretlemiştir. Bundan sonra E.coli bakterisinin bu iki değişik radyoizotopla işaretli T4-fajlarıyla enfeksiyonu sonucu hangi makromoleküle özgü radyoizotopunun bakteri hücresi içine girdiği incelenmiştir. (Virüslerin çoğalımı, enfeksiyon sonucu hücre içi ortamda gerçekleşebileceğine göre, yalnızca hücre içinde bulunacak makromolekülün kalıtsal bilgi taşıyıcısı olması sözkonusudur). T4 fajının kılıfının bakteri yüzeyinde yapışıp kaldığı bilindiğinden, enfeksiyon yani kalıtsal bilginin hücre içine iletimi için gerekli sürenin (10 dak 37°C) geçmesinden sonra kültürün şiddetle çalkalanmasıyla kılıflar hücrelerden koparılmış ve bir santrifüj işlemiyle hücreler çöktürülerek üst sıvıda kalan serbest faj ve faj kılıflarından arındırılmıştır. Hücre içine yalnızca ^{32}P -radyoizotopunun girmiş olduğunun gösterilmesiyle de DNA'nın kalıtsal bilgiyi taşıyan molekül olduğu en kesin biçimde kanıtlanmıştır. (Şekil 8-2).

8.2. Nükleik asitler; DNA ve RNA

Nükleik asitler, DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit) adları altında iki ana gruba ayrılır. Bazı RNA virüslerinin dışında tüm virüs ve organizmalarda kalıtsal bilgiyi taşıyan molekülün DNA olduğu görülür. DNA molekülü üzerinden kalıtsal bilgi dikey olarak bir kuşaktan sonrakine iletilirken, bilginin aynı hücrede (yatay yönde) anlatımı RNA moleküllerinin aracılığıyla olur (Şekil 8-3).

Şekil 8-2. Hershey ve Chase'in DNA'nın kalıtsal bilgiyi taşıyan molekül olduğunu kanıtlayan deneyi.

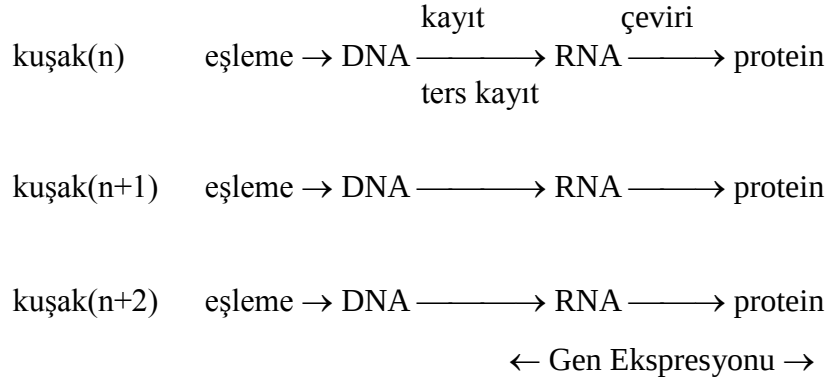
8.3. Kalıtsal bilginin anlatımı (gen ekspresyonu)

DNA molekülünün taşıdığı bilginin protein moleküllerine çevrilmesi gen ekspresyonu olarak adlandırılır. Gen ekspresyonu iki aşamada gerçekleşir: Transkripsiyon ya da yazılma (kayıt) adı verilen ilk

aşamada, DNA'nın taşıdığı bilgi RNA moleküllerine aktarılır. Translasyon ya da çeviri adı verilen ikinci aşamada kalıtsal bilgi RNA'dan proteine çevrilir. Gen ekspresyonunun izlediği bu yola ilk defa Crick dikkat çekmiş ve daha sonraları Crick'in bu düşüncesi molekülse biyolojinin santral dogması niteliğini kazanmıştır.

Crick başlangıçta kalıtsal bilginin tek yönlü akımını varsaymış olmakla birlikte, yakın geçmişte RNA'ya bağımlı DNA polimerazın ya da ters transkriptazın bulunması transkripsiyonun geri dönüşlü olabileceğini göstermiştir.

Bu iki değişik tip nükleik asidin bir seleksiyon baskısının sonucu ortaya çıkmış olduğu düşünölebilir. Hücrede geçerli akardenge (homeostaz) koşullarında tüm moleküllerin sürekli olarak oluşumu, yıkımı ve yeniden oluşumu sözkonusudur. Örneğin bir hücrede bulunan yaklaşık 5×10^6 ATP molekölü için yarı ömür 1 saniye olarak saptanmıştır. Başka bir anlatımla hücredeki tüm ATP molekülleri 2 saniye içinde yenilenmektedir. Hücrenin içinde bulunduğu ortam koşullarına uyumu, bu oluşum ve yıkım mekanizmasına bağılı olarak sağlanır. Hücrenin gereksinim duyduğu maddelerin ya da koşulların sağlanması gerekli protein (enzim) moleküllerinin oluşumu ile mümkün olurken, gereksinim ortadan kalktığında, onu karşılayan enzim moleküllerinin de yıkılarak ortadan kaldırıldığı görülür. Bu yıkım olaylarından etkilenmeden yapısının bütönlüğünü hücrenin tüm yaşam süresi boyunca yalnızca DNA korur. DNA'nın bu kalımlılığının RNA moleküllerinin varlığıyla sağlanmış olduğu görülür. Zira, oluşum ve yıkıma bağılı düzenleme mekanizması



Şekil 8-3. Kalıtsal bilginin yatay ve dikey aktarımı

RNA (ve onların yönlendirimiyle oluşan protein) molekülleri üzerinde etkili olur.

Bunun yanı sıra hücrede sentezlenen proteinler için gerekli bilgi birimlerinin (genlerin) genellikle birer nüsha olarak sıralandığı DNA molekülü basım işlerinde kullanılan bir baskı kalıbına benzetilebilir (Şekil 8-4).

Gereksinime göre bir genin şifrelediği proteinin hücre içinde kısa sürede bin ya da onbinlerce adet oluşumu gerekir. Bilginin (ya da onların molekülse karşılığı olan proteinlerin) hücre içinde çoğaltımı bir “teksir” aygıtına benzetilebilecek enzimatik sistemlerin (RNA polimeraz ve ribozomların) etkisi altında gerçekleşir. Çoğaltımın RNA moleküllerinin

Şekil 8-4. Hücresel bilgi çoğaltımının şematik gösterilişı.

aracılığıyla gerçekleşmesi sayesinde ilk aşamada kalıp moleküllerinin (RNA) sayısının arttırılması dolayısıyla kısa bir zaman kesitinde çok daha fazla sayıda protein molekülünün oluşumu mümkün olur (Şekil 8-5).

8.4. Prokaryotik ve ökaryotik DNA'nın özellikleri

Prokaryotik ve ökaryotik hücre tiplerinde bulunan DNA molekülleri; yapıları, hücre içinde bulundukları yer ve diğer makromoleküllerle (özellikle proteinlerle) olan ilişkileri yönünden önemli farklılıklar gösterir. Bakteri hücresi sitoplazmasında bulunan prokaryotik DNA (molekül ağırlığı: 3×10^9 dalton) halkasal bir yapıya sahip olup, belirli

Şekil 8-5. Protein sentezinin RNA aracılığı ile gerçekleşmesinin sentez hızına katkısı. (Şekil bir bakteriye aittir)

bir bölgesinden hücre membranına bağlıdır. Bakteri hücresindeki bu ana (kromozomal) DNA'nın diğer bir özelliği diğer hücre makromolekülleriyle kalımlı bir ilişki göstermemesi ve hücre içi sıvısında çıplak bir biçimde bulunmasıdır. Bakteri hücresinde asıl kromozomal DNA'nın yanısıra ekstrakromozomal (ya da epizomal) DNA olarak tanımlanan ikinci bir DNA (molekül ağırlıkları: 10^7 - 10^8 dalton) çeşidi de bulunur. Ekstrakromozomal DNA zaman zaman kromozomal DNA'ya bağlanarak onun bir bölgesi haline gelebilir. Bu tip ekstrakromozomal DNA **epizom** olarak adlandırılır. E.coli hücrelerinin “cinsiyetini” belirleyen bilgiyi taşıyan F-faktörü böyle bir epizomda bulunur. Diğer yandan bakteri hücresinde bazı ekstrakromozomal DNA çeşitleri epizomlar gibi bakteri kromozomuna eklenebilme özelliği gösteremezler. **Plazmit** olarak adlandırılan bu DNA çeşitlerinin örnekleri arasında R-faktörleri ve Col-faktörleri sayılabilir. Epizomlar ve plasmitler de halkasal tipte DNA molekülleridir. R (Rezistans) faktörleri bakterilerde belirli antibiyotiklere karşı dirençliliği belirleyen bilgileri taşır. R-faktörlerinin taşıdığı bu bilgi sayesinde bakteri hücresinde antibiyotiklerin yakımını sağlayan enzimlerin oluşması mümkün olur. Col-faktörleri ise **Kolisin** adı verilen ve yabancı bakteri cinslerinin yok olmasına neden olan proteinlerin sentezi için gerekli bilgiyi taşır.

Ökaryotik hücrede ise kromozom DNA'sı (molekül ağırlığı bakteri DNA'sının 10^2 - 10^5 katı) çekirdek içinde paketlenmiş ve proteinlerle kompleksleşmiş bir biçimde bulunur. (bkz. Bölüm 10.1) Bu DNA-protein kompleksi interfazda **kromatin** olarak adlandırılır. Kromatinin hücre bölünmesi sırasında üstün derecede katlanması sonucu ise **kromozomlar** oluşur. Kromatinin çok yoğun bir şekilde proteinlerle örtüldüğü bölgeler

heterokromatin, kromatinin daha az protein içerdiği bölgeler ise **ökromatin** olarak adlandırılır. Heterokromatin bölgelerinde RNA sentezi görülmez ve bu bölgelerdeki genler kapalı (inaktif) durumda bulunur. Buna karşın, ökromatin DNA'sı RNA sentezinde etkin genleri içerir. Ökaryotik DNA'sı ile etkileşen çekirdek proteinleri **histon** ve **histon olmayan (non-histon)** proteinler olarak iki sınıfa ayrılır. (bkz.Bölüm 10.1) Histon kesimi başlıca 5 değişik protein tipini içerir. Bu proteinlerin çoğu bazik nitelikte (arginin ve lizin gibi) amino asitlerden zengin olup, triptofan ve sistein gibi amino asitleri içermez. Değişik ökaryot türlerinden elde edilen histonların birincil yapıları incelendiğinde evrim boyunca çok az değişmiş oldukları saptanmıştır.

Histonların genleri kapatıcı bir görevleri olduğu sanılmaktadır. Histonların özellikle heterokromatin bölgelerinde daha yoğun bulunmaları ve deney tübünde DNA molekülüne eklendiklerinde RNA sentezini durdurmaları bu düşünceyi destekleyen bulgulardır. Histonların her tür ve her doku kromatininde yaklaşık eşit miktarda bulunmaları bu proteinlerin genlerin özgün biçimde etkinleşmesini ve dolayısıyla hücre ve doku özelleşmesini belirleyen proteinler sınıfından olmadığı kanısını vermektedir. Histonlar DNA üzerinde özel baz dizilerini okuma yeteneğinden yoksun olup, DNA-histon ilişkileri DNA'nın asidik grupları ile histonların bazik grupları arasında elektrostatik çekim ilkesine dayanır. Son yıllarda dört değişik histon tipinden ikişer molekülün bir araya gelerek DNA üzerinde **nükleozom** adı verilen yapıları oluşturdukları gösterilmiştir. Histonlar nükleozomların çekirdeğini oluşturmakta 200 baz çifti karşılığı bir DNA

bölümü histonların çevresinde dolanmaktadır. Nükleozomların hücre içindeki işlevi halen bilinmemektedir.

Histonların aksine, non-histonlar pek çok sayıda (400) ve çeşitli proteini kapsıyan heterojen bir protein sınıfını oluşturur. Histon olmayan çekirdek proteinleri arasında genlerin etkinliğini düzenleyici tipte proteinler ve çekirdek enzimleri (kinazlar, asetilazlar, metilazlar, ADP-riboz polimerazlar, DNA polimerazlar) bulunur. Histon olmayan proteinler genellikle asidik nitelikteki proteinleri içerir. Gen etkinliğini düzenleyici görevlerine koşut olarak, değişik dokularda değişik histon olmayan protein tiplerinin bulunduğu saptanmıştır. Düzenleyici nitelikteki bu proteinlerin DNA üzerinde özgün baz sıralarını içeren bölgelere bağlanmaktadır, yani histon olmayan proteinlerle DNA etkileşimleri büyük ölçüde özgün niteliktedir.

Ökaryotik DNA'nın büyüklüğünün gen içeriğiyle tam orantılı olmadığı ve büyük bir bölümünün yinelenen baz dizilerinden oluştuğu saptanmıştır. Yinelenen bu DNA bölgelerinin gen aktivitesinin düzenlenmesinde bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Ökaryot hücrelerinde çekirdeğin yanısıra mitokondrilerde de bir DNA molekülü bulunur. Mitokondri DNA'sının molekül ağırlığı yaklaşık 1.5×10^7 dalton olup, bu büyüklükte bir DNA molekülü ancak çok sınırlı sayıda proteinin sentezi için gerekli bilgiyi içerebilir. Mitokondri DNA'sının özellikle mitokondri membran proteinlerinin bazılarının sentezi için gerekli bilgiyi taşıdığı sanılmaktadır. Mitokondriler, kendilerine özgü bir DNA molekülünün yanısıra yine kendilerine özgü bir protein sentez mekanizmasına (ribozom ve protein sentez enzimlerine) sahiptirler. Mitokondri ribozomları ökaryotların 80S ribozomlarından çok

prokaryotların 70S ribozomlarına benzer. Mitokondrilerin ökaryotik hücrede gösterdikleri bu kısmi genetik özgürlük, bu organellerin evrim süresince ökaryot hücrelerle bir simbiyozda girmiş mikroorganizmalardan oluşmuş olabileceklerini sezindirmektedir.

8.5. Eşleme (Replikasyon)

Bir DNA molekülünün eşini oluşturarak çoğalmasına **replikasyon** (**eşleme** ya da **ikileşme**) adı verilir. Watson ve Crick modelinin en büyük önemi; komplementerlik ilkesiyle kalıtsal bilginin eşleme sırasında eksiksiz ikileşebilmesi sorununa fiziksel ve kimyasal verilere dayanan bir açıklama getirmesidir. DNA zincirlerinin karşılıklı bazlarının komplementerliği ilkesinin replikasyon süresince uygulanması sonucu baz sıralarının (ve dolayısıyla kalıtsal bilginin) doğru bir şekilde yavru DNA zincirlerine aktarılması sağlanır. Ayrıca DNA'nın ikileşmesi kalıtsal bilginin, hücre bölünmesi (**mitoz**) sonunda, eksiksiz olarak ve eşit paylarda yeni kuşaklara aktarılmasını mümkün kılar.

Watson ve Crick modeline göre DNA molekülü için başlıca iki eşleme mekanizması sözkonusu olabilir.

- 1) Koruyucu (konservatif) mekanizmada, ana DNA molekülünün bütünlüğünü koruması koşuluyla onun eşi ikinci bir DNA molekülü oluşur.
- 2) Yarı koruyucu (semi-konservatif) mekanizmaya göre ise, eşleme sırasında DNA molekülünün iki zinciri birbirinden ayrılarak; her bir zincir üzerinde onu tamamlayıcı (komplementer) yeni bir zincir oluşur. Bu mekanizmaya göre; eşleme sonucu ortaya çıkan iki DNA molekülünün her biri ana DNA molekülünün bir zinciri ile ona komplementer yeni bir zincir içerir.

1957 yılında Meselson ve Stahl adında iki araştırmacı düzenledikleri bir deneyle **yarı koruyucu** eşleme mekanizmasının doğruluğunu kanıtlamışlardır. Bu deneyde E.coli bakterisi önce ağır nitratlı (yani ^{15}N izotopunun bulunduğu) bir ortamda, bütün DNA molekülleri ^{15}N izotopu içinceye dek üretilmiş, daha sonra normal nitratlı (^{14}N içeren) bir ortama aktararak, bu ortamda iki kuşak boyunca bırakılmıştır. Ortam değişiminden önce ve ortam değişimini izleyen her kuşakta alınan bakteri örneklerinden elde edilen DNA **sezyum klorür gradiyenti santrifüjü** adı verilen bir yöntemle incelenmiştir. Sezyum klorürün kesiksiz bir konsantrasyon (yoğunluk) gradiyenti oluşturduğu bu yöntemle değişik yoğunluktaki her bir DNA molekülü bu yoğunluğa özgül bir bölgede çöker. Ortam değişikliğinden önce oluşmuş DNA yalnız ağır nitrat (^{15}N) içeren DNA'nın çözeldiği bölümde, ortam değişikliğini izleyen ilk bakteri kuşağından elde edilen DNA ise eşit miktarlarda ^{15}N ve ^{14}N içeren melez bir DNA molekülünün çökmesi gereken bölümde bulunmuştur. Hafif ortamdaki ikinci bakteri kuşağından elde edilen DNA'nın analizi ise eşit oranlarda hafif (yani yalnız ^{14}N içeren) ve melez özellikte DNA çeşitlerinin çökelmeleri beklenen bölgelerde bulunmuştur (Şekil 8-6).

8. 6. DNA'nın enzimatik oluşma mekanizması

Watson-Crick modelinde öngörülen DNA molekülü fizikokimyasal düşüncelere dayanarak geliştirilmiş varsayımlara dayalı bir yapı idi. Özellikle adenin ve timin ile guanin ve sitozin arasında düşünülen etkileşimlerin doğada da bir rol oynayıp oynamadığı bilinmemekteydi. O sıralarda Kornberg ve çalışma arkadaşları nükleotit trifosfatları DNA zincirlerine dönüştüren bir enzim buldular. **DNA-**

polimeraz adı verilen bu enzimin, kalıp işlevini üstlenmiş bir DNA molekülünü ve Mg^{2+} iyonlarının

Şekil 8-6. Yarı koruyucu eşleme mekanizmasına göre beklenen DNA molekülü (DNA zincir çifti) çeşitleri ve CsCl-gradyent santrifüjünde analiz sonuçları.

varlığında, dezoksiribonükleotit-5'-trifosfatları substrat olarak kullanarak molekül ağırlıkları milyonlarca daltonu bulan yeni DNA zincirleri oluşturduğu gösterilmiştir. DNA-polimeraz kalıp DNA zincirlerinin baz sırasını aynen izleyerek, yeni DNA zincirlerine geçirir (Şekil 8-7).

Enzim deoksiribonükleotit 5'-trifosfatların (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) pirofosfat kısımlarını ayırıp, deoksiribonükleotit-5'-monofosfat bölümünü oluşturmakta olduğu DNA-zincirlerinin 3'-OH ucuna ekler.

Buna göre DNA-polimerazın oluşturduğu DNA zincirleri 5'-OH ucundan 3'-OH ucuna doğru büyür. DNA-polimerazın etkisi için serbest bir 3'-OH ucunun varlığını gereksinmesi nedeniyle, kalıp DNA zincirinin yanısıra bir polinükleotit zincirinin varlığı replikasyonun başlaması için gerekmektedir. Bu poliribonükleotit (RNA) niteliğindeki zincir **“primer”** ya da **başlatıcı RNA zinciri** olarak adlandırılır. Eşleme, bu kısa zincirin 3'-OH grubuna DNA polimeraz tarafından fosfodiester bağı üzerinden eklenen ilk deoksiribonükleotit-5'-monofosfat ile başlar.

DNA-polimerazın çalışma mekanizması şematik olarak aşağıda gösterilmiştir (Tablo 8-1).

DNA-polimeraza çeşitli organizmalardan elde edilen değişik baz içerikli DNA molekülleri kalıp olarak sunulduğunda, yeni oluşan molekülünün baz içeriğinin her seferde kalıp DNA'nın baz içeriği ile aynı olduğu görülür.

Bu bulgu DNA-polimerazın kalıp DNA'sının baz içeriğini doğru olarak kopya ettiğini göstermekle birlikte, enzimin kalıp baz sırasını aynen okuyup yeni DNA molekülüne aktardığını kanıtlamaktan uzaktır. Polimerazın kalıp DNA zincirindeki baz sırasını izleyerek onu tamamlayıcı bir DNA zincirini oluşturduğu ikinci bir deney ile gösterilebilir.

İki değişik baz çeşidinin sırayla yer değiştirerek dizildiği bir polideoksiribonükleotit zinciri kalıp olarak kullanıldığında, DNA polimerazın oluşturduğu deoksiribonükleotit zincirinde yalnız kalıp baz çeşitlerine komplementer bazların yer aldığı görülür. Örneğin, adenin ve timinin sırayla yer değiştirdiği bir polideoksiribonükleotit zincirinin kalıp görevi gördüğü bir ortamda, substrat olarak kullanılan dört değişik

deoksiribonükleotittrifosfattan (dATP, dGTP, dTTP ve dCTP) sırasıyla tek birinin α -fosfat grubu ^{32}P radyoizotopu ile işaretlendiğinde, yeni oluşan

Şekil 8-7. DNA polimerazın işlevi.

polideoksiribonükleotit zincirine yalnız giren radyoaktivitenin ancak dATP ve dTTP kanalı ile olduğu görülür. Böyle bir deney sisteminde, DNA polimerazın çalışma mekanizmasının gerçekten baz çiftleri kurallarına uyduğu “**nearest-neighbor**” (en yakın komşu). adı verilen bir yöntem ile

Kalıp DNA'nın elde edildiği canlı	Kalıp DNA'nın baz içeriği (A+T/G+C)	DNA-polimerazın oluşturduğu DNA'nın baz içeriği (A+T/G+C)
T2-fajı	1.84	1.78
<u>E.coli</u>	0.97	1.00
Sığır	1.35	1.32

Tablo 8-1. Değişik canlı türlerinden elde edilen kalıp DNA'nın ve DNA polimeraz ile replikasyonu sonucu oluşan DNA'nın baz içeriklerinin karşılaştırılması.

kanıtlanabilir. Reaksiyona substrat olarak eklenen dATP ile dTTP'den yalnız dATP'nin α -fosfat grubunun ^{32}P radyoizotopu ile işaretli ise ve eğer kalıbın 5' ATATAT 3' sırası aynen kopya edilmiş ise yeni polideoksiribonükleotit zincirinde her deoksiadenozinin 5'- ve her deoksitimidinin 3'-grubu arasındaki bağda ^{32}P -fosfatın bulunması gerekir. Bunu göstermek için dalaktan saflaştırılan ve 5'-fosfat ester bağlarını özgün biçimde parçalayan bir **fosfodiesteraz** kullanılır. DNA polimerazın oluşturduğu deoksiribonükleotit zinciri ikinci aşamada fosfodiesterazın etkisi altında parçalandığında adenozin-3'-monofosfat ve timidin-3'-monofosfat oluşur. Bu deoksiribonükleotit-3'-monofosfatlar kromatografik olarak birbirinden ayrıldığında, başlangıçta dATP'nin taşıdığı ^{32}P radyoizotopunun timidin-3'-monofosfata aktarılmış olduğu görülür. Bu bulgu DNA polimerazın oluşturduğu polimerin de ATATATAT sırasını

izlediğinin bir kanıtıdır. Aşağıda “nearest neighbor” yöntemi ana hatlarıyla gösterilmiştir (Şekil 8-8).

1968 yılında Gouliau, Kornberg ve Sinsheimer, DNA polimerazın kalıp DNA’nın baz sırasını aynen kopya ettiğini çok açık bir şekilde kanıtlamış ve virüs DNA’sının kalıp olarak kullanıldığı bir deneyde DNA polimerazın yepyeni virüs partikülleri oluşturduğunu göstermeyi başarmıştır. Bir reaksiyon tüpünde oluşan bu virüs partiküllerinin hücrelere girerek, üreyebilme yeteneğine sahip olmaları, DNA polimerazın kalıp DNA’nın taşıdığı kalıtsal bilgiyi yeni DNA moleküllerine aynen aktarabildiğinin en açık kanıtıdır.

DNA polimerazın oluşmakta olan DNA zincirlerini yalnız 3’-OH ucundan uzatması yarı koruyucu eşleme mekanizması yönünden ortaya bazı sorunlar çıkarmaktadır. Yarı koruyucu mekanizmaya göre, DNA polimerazın DNA molekülünün zıt yön izleyen iki zincirinden yalnız 3’→ 5’ yönündeki zincirine komplementer bir zinciri oluşturması mümkün olabilir. DNA polimerazın, 5’ → 3’ yönünü izleyen ikinci DNA zinciri üzerinde sentezi gerçekleştirmesi normal koşullar altında beklenemez. Diğer yandan DNA’yı 5’-OH ucundan uzatan DNA polimeraz çeşitlerinin varlığına ilişkin bir gözlem bulunmamaktadır. Son zamanlarda elde edilen bulgular, polimerazın 5’ → 3’ yönlü DNA zincirinin replikasyonunu geriye gider bir şekilde gerçekleştirdiğini sezindirmiştir. Bu geri dönüşümlü DNA sentezinin kesikli yani parça parça gerçekleştiği ve bu parçaların ikinci aşamada **ligaz** adı verilen enzimler tarafından birleştirildiği bulunmuştur. Replikasyon, çatalın 3’ ile biten zincirinde kesiksiz olarak (leading: önde olan iplikçik), 5’ ile biten

zincirde yine 5'→3' yönünde yaklaşık 1000 nükleotitlik geriye dönüşler halinde gerçekleşir (lagging: aksayan, geride kalan iplikçik). Bu parçalara Okazaki fragmentleri denir. Okazaki fragmentleri RNA primerine kovalent bağlı DNA nükleotitlerinden oluşur. (Şekil 8-9)

Normalde replikasyon çatalında eşgüdümü sağlamak amacıyla replikasyon çatalında iki DNA polimeraz bulunur. Aksayan iplikçiğin kalıp DNA'sının polimeraz üzerinde bir tur sarılmış olarak yer almasıyla enzimin çatalın uzağına doğru işlev görmesi önlenmiş olur. (Şekil 8-10)

DNA ile ilgili işlevleri olan enzimlerden birkaçı Şekil 8-11'dedir.

DNA iplikçiklerinin birbiri çevresinde dolanmış olması DNA'ya özel bir topoloji kazandırır. (bkz.Bölüm 4.3.4.1) Replikasyon, transkripsiyon gibi iplikçiklerin birbirinden ayrılmasını gerektiren işlemlerde, ayrılan kısmın öncesi ve sonrasındaki kısımlar sıkışır ve birbirine dolanma eğilimleri artar. Bu sıkışmadan doğan gerilmeyi ortadan kaldırmakla görevli **Topoizomeraz** adı verilen enzimler vardır. Topoizomerazların iki tipi vardır. Tip I topoizomerazlar tek iplikçikte kesik yaparak diğer iplikçiğin kendi çevresinde serbestçe dönebilmesini sağlarlar. (Şekil 8-12). Tip II topoizomerazlar çift iplikçikli DNA'nın her iki zincirinde geçici bir kesik yaparak başka bir çift iplikçikli DNA'yı buradan geçirirler. ve düğümlenmeyi önlerler. Replikasyon sırasında bu tür düğümlenmeler olduğu için topoizomerazlar hücreler için yaşamsal önemdedir. Bazı antikanser ilaçların ve antibiyotiklerin de hedefini oluştururlar. Prokaryotik tip II topoizomerazlara DNA giraz da denir.

Şekil 8-8. En yakın komşu, “Nearest neighbor” yöntemi.

Şekil 8-9. Okazaki fragmentleri

8.7. DNA polimeraz çeşitleri

1950 yıllarında bulunan ve Kornberg enzimi ya da DNA polimeraz-1 olarak adlandırılan enzimin yanısıra son yıllarda DNA polimeraz-2 ve 3 olarak gösterilen iki enzim daha bulunmuştur. Uzun yıllar DNA polimeraz-1'in bakteri hücresinin eşleme enzimi olduğu düşünülmüş olmakla birlikte DNA polimeraz-1'den yoksun mutantların tıpkı yaban tipi bakteriler gibi üreyebilmeleri, gerçek eşleme enziminin bir başkası olması gerektiğine işaret etmiştir. Günümüzde DNA polimeraz-3'ün büyük bir olasılıkla gerçek replikasyon enzimi olduğu görüşü ağırlık kazanmıştır. Bu enzimin diğerlerine (1 ve 2 numaralı enzimlere) kıyasla daha yüksek bir katalitik etkinliğe sahip olması (Tablo 8-2) bu görüşü desteklemektedir.

DNA polimerazların, eşleme sırasında DNA molekülündeki bilgiyi yanlışsız olarak yeni DNA zincirine aktarmaları 3'-eksonükleaz aktivitesi sayesinde güvence altına alınmaktadır. Oluşmakta olan DNA zincirinin 3'-ucuna eklenen bir yeni nükleotidin kalıp DNA zincirindeki karşıtı

nükleotit ile uyum içinde olmaması (onunla hidrojen köprüleri kuramaması) DNA polimerazın 3'-eksonükleaz aktivitesinin etkinlik

Şekil 8-10. Replikasyon çatalı

kazanarak enzimin kendisi tarafından eklenmiş bu nükleotidi tekrar zincirden ayırmasına yol açmaktadır (**Okumalı düzeltme, “Proof reading” mekanizması**) (Şekil 8-13).

Uyum içinde olmayan bu nükleotidin ayrılmasından sonra DNA polimerazın sentezleyici aktivitesi tekrar devreye girerek, doğru nükleotidin zincire eklenmesini sağlar. Bu mekanizma sayesinde eşlemede hata oranının 10^{-6} - 10^{-9} gibi çok düşük düzeyde tutulması sağlanır.

Şekil 8-11. DNA ile ilgili tepkimelerde işlev gören enzimlere örnekler.

Şekil 8-12. Tip I topoizomerez ve işlevi

DNA polimeraz-1'inayrıca 5'-eksonükleaz aktivitesine sahip olması, onun endonükleaz ve ligaz enzimleriyle birlikte hücrede DNA onarımını gerçekleştiren başlıca enzim olduğunu sezindirmektedir.

E.coli	I	II	III
Polimerizasyon 5'→3'	+	+	+
Eksonükleaz aktivitesi : 3'→5' 5'→3'	+	+	+
	+	-	-
Sentez başlangıcı: bütün DNA primer + tek zincir primer + tek zincir + tek zincir bağlayıcı protein	- + +	- - -	- - +
in vitro zincir uzama hızı (nükleotit/dak)	600	400	30000
hücre başına molekül sayısı	400	?	10-20

Memeli hücresi	α	β	γ	δ
Polimerizasyon: 5'→3'	+	+	+	+
Eksonükleaz aktivitesi 3'→5' (proof reading)	+	-	-	+
Sentez başlangıcı: RNA primeri DNA primeri	+ -	- -	- +	+ +
Birlikte bulunan DNA primaz	+	-	-	-
Aphidicolin'e duyarlılık	+	-	-	+
Hücre içindeki yeri çekirdek mitokondri	+ -	+ -	- +	+ -

Tablo 8-2. Prokaryot ve ökaryot DNA polimerazların bazı özellikleri.

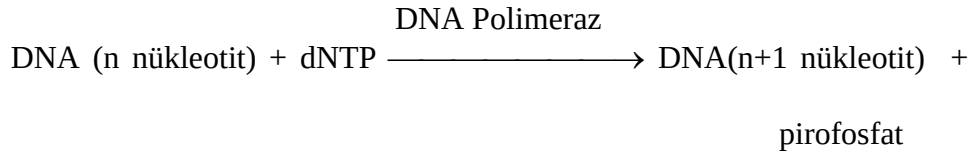
Şekil 8-13. Okumalı düzeltme (“Proof-reading”) mekanizması

8.8. DNA sentezinin enerjietiği

DNA sentezi sırasında substrat olarak deoksiribonükleotit trifosfatlar (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) kullanılır ve kalıp DNA'daki baz dizisinin belirlediği bazları taşıyan nükleotit trifosfatların γ - β difosfat kısımlarının ayrılmasından sonra kalan nükleotit-(α)-monofosfat bir ester bağı ile oluşan zincirin 3'-OH grubuna eklenir.

Yüksek enerjili ester bağının oluşması enerji tüketen bir reaksiyon olup, gerekli enerji pirofosfat grubunun nükleotit trifosfattan ayrılmasıyla açığa çıkan enerjiden sağlanır. Bununla birlikte bu iki reaksiyon sonucu serbest enerjide büyük ölçüde bir azalma görülmez ($\Delta G = 0 - 1 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Buna göre reaksiyon ilk bakışta geriye dönüşlü nitelikte görülmekte ise de; zincire yeni eklenen bazın komplementeriyle kurduğu hidrojen bağları, bir önceki bazla girdiği hidrofobik ve van der Waals etkileşimleri ayrıca özellikle ortaya çıkan pirofosfat grubunun pirofosfataz tarafından iki organik fosfat molekülüne ayrılması ($\Delta G = -7 \text{ kcal.mol}^{-1}$) reaksiyon dengesinin sağa kaymasını ve eşlemenin gerçekleşmesinin güvence altına alınmasını sağlamaktadır (Şekil 8-14).

Reaksiyon I.



$$\Delta G \cong -0 - 0.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

$$K = \frac{[\text{DNA}(n+1 \text{ nükleotit})] [\text{pirofosfat}]}{[\text{DNA}(n \text{ nükleotit})] [\text{dNTP}]} \cong 1-5$$

Şekil 8-14. DNA'ya bir nükleotit eklenmesi reaksiyonunun enerjetik açıdan değeriendirilmesi.

Reaksiyon II.

Pirofosfat ===== 2 Pi

$$\Delta G = -7 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

$$\Delta G = - R T \ln K$$

$$\Delta G = - 2.3 \times R T \log K$$

$$-7 \text{ 000 cal mol}^{-1} = -2.3 \times 1.98 \text{ cal K}^{-1}\text{mol}^{-1} \times 298 \text{ K} \times \log K$$

$$\frac{-7000 \text{ cal mol}^{-1}}{-1357 \text{ cal mol}^{-1}} = \log K$$

$$5.16 = \log K$$

$$K = 1.44 \times 10^5$$

DNA polimeraz +
pirofosfataz
DNA(n nükleotit) + dNTP ===== DNA (n+1 nükleotit) + 2 Pi

$$\Delta G = -6.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Pirofosfataz reaksiyonunun, nükleik asitlerin ve proteinlerin sentezinin yanısıra, daha başka biyosentez olaylarında da ileri itici güç olarak yer alması, hücre içinde olayların hiçbir zaman tek başlarına değil,

daima bütün metabolik olaylar çerçevesinde düşünülmesi gerektiğini vurgulayan bir örnek olarak önem taşımaktadır. Pirofosfatazın yokluğunda polinükleotit ve polipeptit zincirlerine eklenecek her yeni yapıtaşıyla pirofosfat konsantrasyonunun artması sonucu kitle etki yasasına uygun olarak reaksiyonun geriye dönüşmesi beklenecekti. Substrat olarak nükleotit trifosfatların kullanılması ve pirofosfatın varlığı sayesinde organizmanın yaşamıyla bağdaşamayacak bir durum (DNA'nın ve diğer makromoleküllerin yıkımının ağırlık kazanması) önlenmiş olmaktadır.

8.9. Komplementer bazlar arasındaki hidrojen köprülerinin DNA yapısının kalımlılığında ve şifrenin doğru okunmasındaki önemi

Bir hidrojen bağının oluşumu, enerji salan bir olay olup, serbest enerjide yaklaşık 4 kcal.mol^{-1} ölçüsünde azalmaya yol açar. Buna göre bir hidrojen bağının yeniden parçalanabilmesi için sisteme aynı ölçüde ($\cong 4 \text{ kcal.mol}^{-1}$) enerji getirmek gerekir. Bir van der Waals bağının kurulması sırasında yalnızca 1 kcal.mol^{-1} enerji açığa çıktığına ve ısısal (Termik) molekül enerji 0.5 kcal olduğu düşünülürse, bir hidrojen bağının (van der Waals bağına kıyasla) ısısal molekül devinime karşı olan yüksek kalımlılığı daha iyi anlaşılır. Hidrojen bağının oluşumu sırasında serbest enerjide meydana gelen azalma değerinden aralarında bir hidrojen bağı kurabilen iki grubun birleşme dursayısını (K_a 'yı) hesaplamak mümkündür:

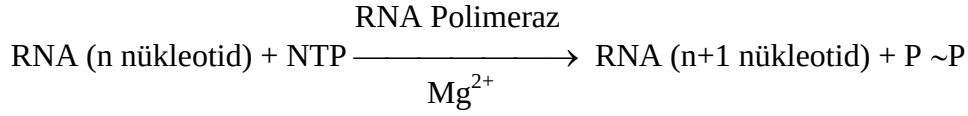
$$-4000 \text{ cal.mol}^{-1} = -2.3 \times 1.98 \text{ cal.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \times 300 \text{ K}^{-1} \times \log K_a$$

$$K_a = 10^3$$

Bu saptamaya göre, bu iki grubun birleşme olasılığı ayrışmalarına kıyasla 1000 kat daha fazla olacaktır. Aralarında 2 hidrojen bağı kurulabilen iki grup için, örneğin A ve T, $K_a > 10^6$ olacaktır. A, T ve C bazlarını içeren bir eriyikte A = T kompleksinin oluşumu A ile C ya da T ile C arasındaki etkileşime kıyasla 10^6 kat daha olasıdır. Binlerce komplementer bazın karşılıklı sıralandığı çift sarmal yapıları DNA moleküllerinin kalımlılığı böylelikle termodinamik açıdan açıklanabilir. Aynı şekilde eşleme, transkripsiyon ya da protein sentezi sırasında kodon-antikodon etkileşimleri sırasında şifreli bilginin okunması termodinamik kurallara bağlıdır. Örneğin eşleme sırasında DNA polimeraz tarafından kalıptaki baz sırasına göre oluşmakta olan DNA ipliğinin 3' ucuna eklenen her A ya da T içerikli nükleotid için yanlış yapma olasılığı 10^{-6} , her G ya da C içerikli nükleotid için ise 10^{-9} olacaktır. DNA polimerazların 3'-eksonükleaz etkinliğine dayanan okumalı düzeltme mekanizması bu (termodinamik) kurala bağımlı bir enzim etkinliğidir. Bu değer etkinleşen bazların yapısal özelliklerine dayanan termodinamik parametre tarafından belirlenmiş olup, 3'-eksonükleaz etkinliği bu değer hücrede sağlanması ile görevlidir (Anımsama: Enzimler reaksiyonların denge dursayısını 'K' ya da serbest enerji değişimini etkilemez).

8.10. DNA'nın transkripsiyonu (Kayıt aşaması) - RNA sentezi

Proteinlerin yapımı, doğrudan DNA kalıbı üzerinde gerçekleşmez. DNA'daki bilginin proteinlere aktarılması çeşitli RNA tiplerinin katılımını gerektirir. RNA moleküllerinin sentezi ile başlayıp, protein sentezi ile devam eden gen ekspresyonu sürecinin ilk aşamasına **transkripsiyon (kayıt)** adı verilir. Transkripsiyon DNA'nın anlamlı ipliğinin ("**Gen**") adı verilen belirli bir bölgesinin tek bir ürün vermek üzere kopyalanmasından ibarettir. 3 temel RNA tipi rRNA (ribozomal RNA), tRNA (transfer RNA) ve mRNA (haberci RNA) komplementerlik ilkelerine sadık kalınarak DNA kalıbından transkribe edilir. Bu 3 RNA tipinden sadece mRNA proteinlerin sentezlenmeleri için bilgi taşır. rRNA ve tRNA protein sentez mekanizmasında görevli altyapıları oluştururlar. Haberci RNA (mRNA) kavramı ilk defa F.Jacob ve J.Monod tarafından 1960'da formüle edilmiştir. Polinükleotid yapıda, çeşitli büyüklüklerde, DNA komplementeri, ribozomlarla geçici ilişki kurabilen, kısa ömürlü moleküllerdir. Kısa bir süre sonra da gerçekten DNA kalıbından RNA sentezleyen bir enzim bulunarak **RNA polimeraz** adı verilmiştir (J.Hurwitz ve S.Weiss, 1960). RNA polimerazın RNA sentezini gerçekleştirebilmesi için; a) DNA kalıbı (genellikle çift iplikli "ds-double stranded"), b) ribonükleotidtrifosfatlar (ATP, GTP, CTP ve UTP), c) Mg^{2+} iyonu'na (ya da Mn^{2+}) ihtiyaç vardır. RNA sentezi formül olarak aşağıdaki gibi ifade edilebilir.



Bu reaksiyonda $\Delta G = -2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ 'dür. Buradan $K = 30$ bulunur. Her ne kadar reaksiyon sağa kaymış görünümünde ise de, emniyetli bir sentez için yeterli olmaz. Zaten bu reaksiyon in vivo ortamda (hücre içinde) pirofosfatın (P~P) hidrolizi ile sürdürülür (DNA sentezinin enerjeliğine benzer şekilde). RNA sentezinin yönü de DNA'ninkine benzer şekilde $5' \rightarrow 3'$ yönündedir. (Yeni gelen nükleotid daima $3'$ -OH ucuna eklenir).

RNA polimerazlar büyük molekül ağırlıklı ve oligomerik proteinlerdir. Bakteri hücrelerinde her 3 RNA tipini de tek bir enzim sentezler. Ökaryotlarda ise 3 ayrı RNA polimeraz enzimi mevcuttur (Tablo 8-3). RNA polimeraz I (ya da A), rRNA'yı, RNA Polimeraz II (ya da B) mRNA'yı, RNA Polimeraz III (ya da C) tRNA'yı sentezler. Ökaryot RNA polimerazları 8 - 14 altbirimden oluşur.

E.coli RNA polimerazı 390 kD molekül ağırlıklı 5 farklı altbirimden oluşan (2α , β , β' , ω , σ) kompleks bir enzimdir. Altı altbirimi de içeren (toplam 6 peptid zincirli) enzime **holo enzim** adı verilir. σ altbirimi kalıp DNA üzerindeki doğru başlangıç yerini (promoteri)

RNA polimeraz tipi	Sentezlediği RNA tipi	α -amanitine duyarlılık	Sentezlendiği yer
RNA Polimeraz I(A)	rRNA	α -amanitine duyarsız	çekirdekçik
RNA Polimeraz II(B)	mRNA	α -amanitine duyarlı	çekirdek plazması
RNA Polimeraz III(C)	tRNA	α -amanitine az duyarlı	çekirdek plazması

Tablo 8-3. Ökaryot RNA polimeraz çeşitleri.

bulup sentezi başladıktan sonra RNA polimeraz holo enzimden ayrılır. σ altbirimi içermeyen RNA polimeraza **iç enzim (core enzim)** adı verilir. Sentezi sürdüren bu RNA polimeraz core enzimdir (Tablo 8-4).

Alt birim	Adet	Molekül ağırlığı (kD)	Görevi
α	2	36,5	Sentezi başlatır
β	1	151	Fosfodiester bağı kurar
β'	1	155	DNA kalıbına bağlanır
ω	1	11	?
σ	1	70	Promoteri tanıyıp sentezi başlatır.

Tablo 8-4. E. coli RNA polimerazı alt üniteleri

8.11. Transkripsiyonun düzenlenmesi

Transkripsiyonun en önemli adımlarından birisi, promoterin tanınması ve mRNA sentezinin uygun yerden başlamasının sağlanmasıdır. Prokaryotlarda promoter bölgenin hemen önünde, transkribe edilecek DNA parçasının 35 baz öncesinde (-35) yer alan TTGACA ve 10 baz öncesinde (-10) yer alan TATAAT bölgeleri (ikinci bölgeye Pribnow kutusu da denir) RNA polimeraza başlayacağı bazı göstermektedir. (Şekil 8-15)

Şekil 8-15. Genin başlangıç yerini gösteren elemanlar

Prokaryotlarda σ alt ünitesi RNA polimerazı holo enziminin doğru yeri bulmasından sorumludur. Promoterde her iki iplikçikler ayrılıp ilk dört nükleotitin birbirine eklenmesiyle sentez başladıktan sonra kompleksten ayrılır, RNA polimeraz sentezi sürdürür.

Ökaryot genlerinin transkribe edilecek bölgesinin önünde çoğunlukla -80 konumunda CCAAT dizisi, -30 konumunda TATA dizisi bulunur. Farklı diziler içeren genler de vardır. Ökaryotlarda transkripsiyon başlangıcı çok değişiktir. Transkripsiyon faktörleri adı verilen bir dizi proteinin DNA ve RNA polimeraz ile etkileşimi gereklidir. (Tablo 8-5)

Transkripsiyonun başlangıç kompleksinin oluşumunda ilk adım TFIID'nin TBP altbiriminin promoterdeki TATA kutusuyla, ya da TAF alt biriminin/alt birimlerinin diğer başlangıç dizileriyle etkileşimidir. TFIIB, TFIID'ye bağlanır. RNA polimeraz II, TFIIF ile bağlı durumda komplekse katılır. TFIIE ve TFIIH komplekste yerini alır. TFIIH helikaz aktivitesi ile iplikçikleri birbirinden ayırır, RNA Polimeraz II'nin karboksi uç motifini fosforile eder ve transkripsiyon başlar. Transkripsiyon başlangıç kompleksi oluşuktan sonra uzama aşamasında TFIIH artık görev almaz ve olasılıkla RNA polimerazdan ayrılır (Şekil 8-16).

8.12. RNA'nın işlenmesi ("splicing")

Ökaryotik genlerin protein şifreleyen bölgeleri (ekzon) araya giren ve herhangi bir proteini şifrelemeyen bölgeler (intron) tarafından kesintiye uğratılır. Kayıt sırasında geni bütünüyle kapsayan birincil mRNA sentezlendikten sonra gerekli proteini şifreleyen bölümler kalır diğer bölümler (intronlar) çıkarılır. Bu işleme RNA'nın işlenmesi denir. (bkz. Bölüm 10.1) (Şekil 8-17 ve Şekil 8-18)

Tom Cech ve ark. T. Thermophila'da rRNA işlenmesini incelerken RNA'nın kendi kendini kesip bir kısmını çıkardığını (intron) ve kalan kısımlarını (ekzon) tekrar birleştirdiğini gözlediler. O zamanki anlayışta böyle işlemleri yalnız enzimler yürüttüğünden bu RNA'ya

“RİBOZİM” adını verdiler. Bugün ribozimlerin sentez de yaptıkları, yani gerçek anlamda enzim oldukları anlaşıldı. Bu bulguya göre: 1) Bazı katalitik işlevlerden sorumlu olan bir RNA olabilir. 2) Ribozom gibi ribonükleoproteinlerde protein sentezini gerçekleyen RNA olabilir. 3) Yaşamın ilk oluşumunda ilkel molekül RNA olabilir.

Hücre çekirdeğinde bir dizi protein ile küçük RNA moleküllerinin (genellikle 250 nükleotit ya da daha küçük) oluşturduğu kompleksler bulunur. Bu komplekslere küçük çekirdeksel ribonükleoproteinler denir ve işlenme faktörleri (U1, U2, ..., U12) olarak adlandırılır. RNA polimeraz mRNA’yı sentezledikten sonra bu ribonükleoproteinlerde bir grubu özel baz dizilerini tanıyarak mRNA üzerine yerleşir, işlenme taneciği (“spliceosome”) adı verilen bir yapı oluşur ve mRNA’nın intron bölgeleri çıkartılarak ekzonlar birleştirilir.

RNA işlenmesi gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kullanılan önemli bir mekanizmadır. Değişik dokularda aynı genlerden üretilen aynı birincil mRNA’lar değişik biçimlerde işlenerek değişik protein ürünlerinin sentezini sağlayabilirler.

8.13. Kolineerlik ve kalıtsal şifre

Nükleik asitler ile proteinler arasında görülen birincil yapılarının doğrusal özelliği belirli bir yönelim göstermeleri, birden çok tip yapıtaşından oluşmaları gibi özellikler DNA’nın proteinlerin birincil yapısını koşullayan nitelikte bir bilgi taşıdığını sezindirmekte idi. DNA’nın baz dizisinde yer alan değişikliklerin proteinlerin yapısında değişiklikler ortaya çıkardığı daha sonraları gösterildi ve proteinlerin amino asit sıralarının

DNA'nın baz sırasına olan bağımlılığı **kolineerlik** kavramı ile ifade edildi.

1954 yılında Gamow ve Crick DNA ile proteinler arasındaki benzerliklere dikkati çekti ve **kalıtsal şifre** kavramını ortaya atarak, böyle bir şifrenin koşullarını kuramsal olarak incelediler. Crick nükleik asitlerin dört, proteinlerin ise yirmi yapıtaşından kurulmaları nedeniyle, bir amino asit için düşünülebilecek en kısa sözcüğünün, üç nükleotitten oluşması gerektiğini ileri sürdü. Dört çeşit bazın üçlü dizileri için 64 olasılık olduğuna

göre, Crick'in düşüncesi yirmi amino asitten bazıları için birden fazla şifre sözcüğünün varlığını öngörmekte idi.

1961 yılında Nirenberg ve Mathaei, sentetik poliribonükleotid poliuridilikasidin (poli U) varlığında, E.coli bakterisinden elde edilmiş bir özütte, yalnız fenilalanin (Phe)den kurulu polipeptid zincirlerinin (polifenilalanin ya da kısaca poli Phe) ortaya çıktığını gözledi. UUU üçlüsünün fenilalanini şifrelediğini gösteren bu buluşu izleyen yıllarda kalıtsal şifrenin tümüyle çözülmesi mümkün oldu. Bu çalışmalar sonunda

Şekil 8-16 Transkripsiyon başlangıç kompleksi oluşması.

Faktör	Alt birim sayısı	Molekül Ağırlığı ^a	İşlev
TFIID ^b : -TBP ^c	1	38	TATA'yı tanır
- TAF'lar ^d	12	15 - 250	TFIIB'yi bağlar TATA dışındaki promoterleri tanır.
TFIIB	1	35	Pol. II - TFIIF kompleksini bağlar
TFIIA	3	12, 19, 35	TBP bağlanmasını sağlar
TFIIF	2	30, 74	Pol. II'nin promotere bağlanmasını sağlar
TFIIE	2	34, 57	TFIIH'nin işlevini kolaylaştırır.
TFIIH	8	32,34, 38, 40, 44, 62, 80, 89	- helikaz - CTD ^e kinaz - Nükleotit çıkarma onarımında görev alır - Hücre siklusu ile ilişkili

Tablo: 8-5 Transkripsiyon faktörleri

^a) kD olarak.

^b) TF: transkripsiyon faktörü; II: Üzerinde en çok çalışılmış olan RNA polimeraz II'yi gösteriyor. Faktörler büyük harflerle adlandırılıyorlar.

^c) TATA'ya bağlanan protein

^d) TBP ile ilişkili faktörler.

^e) Karboksi terminal domain, RNA polimerazın en büyük alt biriminin karboksi ucunda yer alan protein motifi.

Şekil 8-17. RNA işlenmesinin mikrografı

Şekil 8-18. RNA'nın işlenmesi

olası 64 sözcüğün her birinin şifrelediğı amino asit incelenerek saptandığında, üç sözcüğün (UAA, UAG, UGA) dışında her sözcüğün bir

amino asit anlamına geldiği bulundu. Crick'in varsıyımının öngördüğü gibi, bazı amino asitleri şifreleyen birden çok sözcüğün varlığı böylelikle gösterilmiş oldu. İlk önce yalnız E.coli bakterisinden elde edilen özütlerde yürütülen çalışmalar, daha sonra insan dahil diğer çeşitli türlerde yinelenildiğinde kalıtsal şifrenin evrensel nitelikte olduğu, yani bakterilerden insana kadar tüm sistemlerde değişmemiş olduğu görüldü. (Şekil 8-19)

8.14. Protein sentezi (Translasyon)

mRNA'nın taşıdığı bilgi translasyon ya da çeviri aşamasında **ribozom** adı verilen organeller tarafından okunarak proteine çevrilir. Ribozomlar büyük ve küçük altbirimler olarak tanınan iki altbirimden kurulur. Her bir altbirim bir, iki ya da üç ribozomal RNA molekülünden ve çeşitli sayıda proteinlerden oluşur. Ribozomlar ve altyapıları bir ultrasantrifüj işlemi sırasında gösterdikleri sedimentasyon katsayısı ile adlandırılırlar. Pokaryot ve ökaryot ribozomların bazı özellikleri Şekil. 8-20'de gösterilmiştir.

	AGA									UUA
	AGG									UUG
GCA	CGA						GGA			CUA
GCC	CGC						GGC		AUA	CUC
GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUG
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	K

				AGC						
				AGU						
			CCA	UCA	ACA			GUA		
			CCC	UCC	ACC			GUC	UAA	
AAA		UUC	CCG	UCG	ACG		UAC	GUG	UAG	
AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU	UGA	
Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	Dur	
K	M	F	P	S	T	W	Y	V		

Şekil 8-19. Genetik şifre.

Protein sentezinin diğer bir ögesini tRNA oluşturur. tRNA molekülleri amino asitleri, 3' uçlarında yüklü olarak ribozoma taşır. Bir mRNA'nın şifre sözcüklerinin taşıdığı bilgi doğrudan doğruya amino asitlere çevrilmez. Bunun için tRNA moleküllerinin aracı rolü gereklidir. tRNA moleküllerinin taşıdığı **antikodon** adı verilen bir bölge, tRNA'nın taşıdığı amino asidi gösteren mRNA şifre sözcüğüne yani kodona komplementer bir baz üçlüsü taşır. Her amino asite özgü en az bir tRNA molekülü bulunur. tRNA molekülleri içerdikleri belirli nükleotid dizilerinin birbirleriyle hidrojen bağları kurmaları sonucu yonca yaprağını andıran bir yapısal özellik gösterir. (Şekil 8-21)

Protein sentezinin gerçekleşmesi 4 aşamada olur:

1) tRNA'ların kendilerine özgü amino asit ile yüklenmeleri

(amino asit aktivasyonu):

Bu işlem, **aminoasil-tRNA sentetaz** adı verilen enzimler tarafından ATP'nin varlığında yürütülür. İlk olarak ATP'nin α - β -pirofosfat kısmı enzim tarafından parçalanarak ayrılır ve amino asit ile AMP arasında bir aminoasil-AMP molekülü oluşur. Bundan sonraki enzimatik aşamada amino asit tRNA molekülünün tRNA'nın bir ucundaki adenosini molekülün 3' -OH grubuna aktarılır ve amino asidin karboksil grubu ile 3' -OH grubu arasında bir ester bağı oluşur.

2) Başlama fazı (inisiyasyon)

Protein sentezi mRNA'nın bir protein içi yeterli bilgi taşıyan bölümünün yani sistronunun başında bulunan AUG kodonu ya da baz üçlüsünden başlar. Bu şifre sözcüğünün verdiği işaret üzerine özel (inisiyasyon) başlangıç faktörlerinin etkisi altında amino grubuna HCO- (formil) grubu takılı metyonin taşıyan tRNA molekülü (kısaca fMet-tRNA) ribozoma bağlanır. Her yeni oluşan protein, amino ucunda buna göre bir fMet grubu taşır. Yüksek organizmalarda proteinlerin amino ucunda yer alan Met grubunun ek HCO (formil) grubu taşınması gerekli değildir. Proteinin sentezin sonuna doğru bir fMet grubu

Şekil 8-20. Prokaryot ve ökaryot ribozomlarının bileşenleri.

Şekil 8-21. transfer RNA (t-RNA)

özel enzimler tarafından polipeptitten ayrılır (Şekil 8-22). Protein sentezinde ribozomlar mRNA'daki bilgiyi 5' ucundan 3' ucuna doğru okuyarak protein moleküllerine çevirir. Polipeptidin NH₂- ucundan - COOH ucuna doğru yürür; başka bir deyimle mRNA'daki kodon dizisinin belirlediği sırayla amino asitler oluşmakta olan polipeptid zincirinin - COOH ucuna peptid bağıyla eklenir.

3) Uzama fazı (elongasyon)

Polipeptidlerin uzama fazı, protein sentezi boyunca tekrarlanan bir olaylar dizisinden, yani uzama siklüsünden meydana gelir. 1964 yılında Watson tarafından önerilmiş ve genel olarak olumlu yankı uyandırmış teoriye göre, her bir ribozomda tRNA moleküllerinin bağlanabileceği iki

yer vardır. Bu yerlerden birine AA-tRNA molekülü özel bir şekilde bağlandığı için, **amino asil** ya da **A yeri** adı verilir. İkinci bağlama yeri ise, özellikle doğmakta olan polipeptid zincirinin ekli bulunduğu tRNA'yı yani peptidil-tRNA molekülünü taşır. Bu bağlama yeri bu sebepten **peptidil** ya da kısaca **P yeri** olarak adlandırılır.

Prokaryotlarda uzama siklusunun çeşitli aşamalarını şematik olarak gösteren Şekil 8-23'de izlenebileceği gibi, ribozoma bağlanan her yeni AA-tRNA önce A yeri'ne yerleşir. A yerine girecek AA-tRNA'nın çeşidi mRNA molekülünün A yerinde bulunan kodonu tarafından saptanır.

AA-tRNA'nın ribozomun A yerine bağlanmasını, peptidil transfer reaksiyonu izler. Peptidil transferazın katalitik etkisi altında P yerinde bulunan peptidil-tRNA'nın peptidil kısmının karboksil grubu, AA-tRNA'nın amino asil kısmının amino grubuna transfer olur. Böylelikle polipeptid zinciri bir amino asit ölçüsünde uzamış ve polipeptid P yerindeki tRNA molekülünden A yerindeki AA-tRNA molekülüne aktarılmış olur.

Peptidil transfer reaksiyonunu, A yerinde yeni oluşmuş peptidil-tRNA molekülünün, bağlı olduğu mRNA kodonu ile birlikte P yeri'ne sürüldüğü **kaydırma (translokasyon)** adımı izler. Bu arada, daha P yerinde bulunan ve peptidil kısmını kaybetmiş olan tRNA ribozomdan dışarı itilir. Böylelikle A yerine yeni bir kodon girmiş ve yeni bir AA-tRNA molekülünün bağlanabilmesi için A yeri serbest kalmış olur.

AA-tRNA'nın ribozoma bağlanması, peptidil transfer reaksiyonu ve translokasyon adımı uzama siklusunu meydana getirir. Bu olaylar dizisinde uzatma faktörleri gereklidir. AA-tRNA molekülünün ribozoma bağlanması bir uzatma faktörünün etkisi altında olur.

Mikroorganizmalarda EF-Tu uzatma faktörü, yüksek organizmaların hücrelerinin sitoplazmasında ise, EF-1 uzatma faktörü, AA-tRNA'yı GTP ile birlikte bir üçlü kompleks kurarak ribozoma bağlar. Ribozoma bağlandıktan sonra GTP molekülü GDP ve P_i 'ye parçalanır ve GDP molekülü uzatma faktörü ile birlikte ribozomu terk eder. Bu GTP molekülünün parçalanması ile ortaya çıkan enerjinin ribozom tarafından ne maksatla kullanıldığı halen bilinmemektedir. Mikroorganizmalarda EF-G olarak adlandırılan ikinci bir uzatma faktörünün kaydırma reaksiyonunu gerçekleştirdiği ve bu faktörün ribozoma bağladığı ikinci GTP molekülünün parçalanması ile serbest kalan enerjinin kaydırma işleminde kullanıldığı sanılmaktadır. Bununla beraber GTP'nin, uzama fazının çeşitli adımlarında daha çok bir allosterik etkileyici rolü oynaması olasılığı vardır.

4) Sonlanma fazı (terminasyon)

Protein sentezinde sonlanma fazının ribozomlar üzerinde tamamlanması UAA, UAG, UGA sonlanma kodonlarını tanıyan ayırma faktörlerini gerektirir. Memelilerde her üç sonlanma kodonunu da tanıyan bir tek ayırma faktörü bulunduğu halde, bakteri sisteminde kodona özgü 2 ayırma faktörü vardır. Bunlardan RF-1 (RF: Release Factor) UAA ve UAG'yi; RF-2 ise UAA ve UGA'yı tanırlar. Ribozomlar sonlanma kodonlarından birine eriştiğinde, bu kodonu tanıyan ayırma faktörü, GTP'nin varlığında ribozomla etkileşerek, tamamlanmış polipeptidi bağlı olduğu tRNA'dan ayırır. Ribozom tekrar kullanılmak üzere mRNA'yı terkeder (Şekil 8-24).

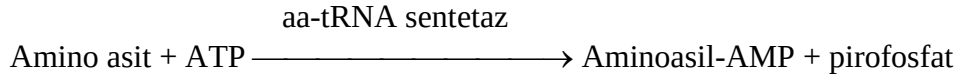
Şekil 8-22. Protein sentezinin başlama aşaması

Şekil 8-23. Prokaryotlarda uzama döngüsünün çeşitli aşamaları.

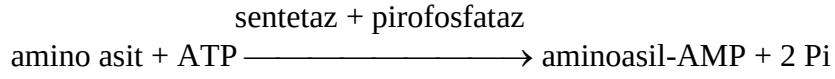
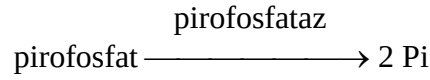
Protein sentezini bozan kemoterapötiklerin etki yerleri şekil 8-25’de gösterilmiştir.

8.15. Protein sentezinin enerjietiği

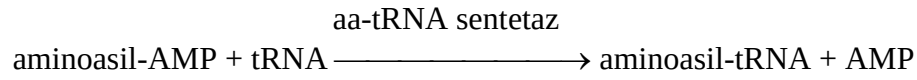
Peptit bağının kurulması amino asitlerin gerekli enerji düzeyine getirilmeleri (aktifleştirilmeleriyle) olanaklıdır. mRNA sözcüklerinin belirledikleri amino asitleri ribozoma taşımakla görevli tRNA moleküllerinin 3’-OH gruplarıyla amino asitlerin -COOH grupları arasındaki ester bağının hidrolizi peptit bağının gerektirdiğinden daha da fazla enerji salan bir reaksiyon olduğuna göre ($\Delta G = -7 \text{ kcal.mol}^{-1}$) amino asit aktifleşmesi amino asitlerin kendilerine özgü tRNA’lara yüklenmeleriyle gerçekleşmektedir. Amino asit-tRNA sentetaz enzimleri tarafından yürütülen bu reaksiyon için gerekli enerji ise ATP molekülünden sağlanmaktadır. Amino asit aktivasyonunun ilk aşamasında aminoasil-tRNA sentetaz enziminin katalitik bir bölgesinde ATP, AMP ve pirofosfat gruplarına parçalanarak, aminoasil-AMP adenilat, ara ürünü oluşmaktadır:



Yüksek enerjili anhidrit bağının kurulması için gerekli enerji; ATP’nin hidrolizi ile ancak karşılanabildiğinden, bu reaksiyonda serbest enerjide büyük ölçüde bir azalma olmamakta, ancak pirofosfatın burada da pirofosfataz tarafından parçalanması mümkün olmaktadır:



Amino asit aktivasyonunun ikinci aşamasında ise, sentetazın diğer bir substrat bağlama bölgesine bağlanan tRNA molekülünün 3'-OH grubu ile amino asitin aktive olmuş -COOH arasında yukarıda belirtilen ester bağı kurulmaktadır.



Uzamanın ilk basamağında bir, translokasyon aşamasında bir tane daha GTP, GDP ve P_i'a hidroliz olmaktadır. Sonuç olarak hidroliz olduğunda 5 kcal.mol⁻¹ enerji açığa çıkacak bir bağı kurulması için 4 x 7.3 = 29.2 kcal.mol⁻¹ enerji harcanmaktadır.

Bu enerjinin harcanma nedeni, polimerizasyonun yüksek oranda bilgi içermesidir. Herhangi bir polimer değil, doğru sıraya sahip bir polimer sentezlenmektedir.

Şekil 8-24. Protein sentezinin sonlanma aşaması.

8.16. Gen ekspresyonunun düzenlenmesi

Gen ekspresyonu birçok ayrı düzlemde denetlenebilir. Denetim mekanizmalarının çokluğu canlının çevre koşullarına uyumunu arttırmaktadır. Şekil 8-26'da 6 ana denetleme noktası gösterilmektedir: Transkripsiyon, RNA işlenmesi, RNA taşınması, mRNA degradasyonu, translasyon ve protein aktivitesinin denetlenmesi.

mRNA moleküllerinin oluşması ve ömürleri hücre içindeki denetim mekanizmalarına bağlıdır. Bu mekanizmalar sayesinde bir protein hücrede gereksinimle orantılı olarak sentezlenir. Özellikle bakterilerde gen ekspresyonunun düzenlenmesi transkripsiyon düzeyinde olur. Böyle denetim mekanizmalarının klasik bir örneğini E. coli bakterisinde Lac-operonundaki genlerin etkinliklerinin düzenlenmesi oluşturur. **Laktoz** şekerini E. coli bakterisinde değerlendirmekle görevli enzimlerin şifrelendiği Lac-operonunun çalışma mekanizmasına ilişkin bilgiler 1961 yılında Jacob ve Monod tarafından ortaya atılan bir modelden kaynaklanır (Bakınız: Bölüm 7-7). Bu modelde öne sürülen mekanizmalar daha sonraları pek çok araştırmacı tarafından deneysel yöntemlerle eleştirel bir bakışla incelenmiş ve doğruluğu saptanmıştır. Lac-operonunun tanımını yapmadan önce E. coli'de laktoz metabolizmasına göz atmak gereklidir.

Şekil 8-25 Protein sentezini baskılayan kemoterapötikler ve etki yerleri

Şekil 8-26. Gen ekspresyonunun denetlenme aşamaları

Laktoz bir glukoz ve bir galaktoz molekülünün bir **β -galaktosit** bağı ile birleşmesi sonucu oluşur. Laktozun bakteriler tarafından değerlendirilmesi için en az iki enzimin varlığı gerekir:

1) Hücre membranına bağlı ve laktozun dış ortamdan hücre içine alınmasını sağlamakla görevli **permeaz**,

2) Laktozu glukoz ve galaktoza ayıran **β -galaktosidaz**.

Normal koşullar altında, yani bakteriye laktoz yerine başka bir çeşit karbonhidrat verildiği zaman, bu iki enzimin hücre içindeki miktarı son derece azdır: Hücre başına yaklaşık 1-5 molekül. Bakteriler laktoz içeren bir ortama geçirildiklerinde, bu iki enzimin hücre içindeki miktarlarının hızla artarak hücre proteininin % 3'ünün karşılığı bir düzeye

eriştikleri görülür. Laktozun bu enzimlerin hücrede oluşumunu bu şekilde etkilemesine **indüksiyon** adı verilir. Laktoz'un benzeri bir molekülün isopropiltiyogalaktosit'in (kısaca IPTG) de böyle bir indüksiyona yol açtığı bilinmektedir. Laktoz'un metabolizmasında **Tiyogalaktosit-transasetilaz** adı verilen üçüncü bir enzimin halen ayrıntıları bilinmeyen bir rol oynadığı sanılmaktadır. Bununla birlikte, üçüncü enzimin sentezini olumsuz bir şekilde etkileyen mutasyonlar sonunda bile bakteri laktozu permeaz ve β -galaktosidaz sayesinde değerlendirilmektedir. Diğer yandan tiyogalaktosittransasetilazın sentezi de laktoz tarafından indüklenebilir.

Jacob ve Monod'un modeline göre laktoz metabolizmasının bu üç enziminin genleri arka arkaya sıralı olarak E. coli DNA'sında bulunur (Şekil 8-27).

Bu genlerin taşıdığı kalıtsal bilginin anlatımı bir represör protein tarafından düzenlenir. Repressör proteini düzenleyici nitelikte (I) geninin ürünüdür. Represör ya sitoplazmada serbest olarak ya da DNA'ya bağlı olarak bulunur. DNA'da bağlanma yeri laktoz enzimlerinin gen sırasının hemen önündeki operatör bölgesidir. Operatörün de önünde **promoter** adı verilen diğer bir DNA bölümü bulunur. Promoter, RNA polimerazın DNA

Şekil 8-27. E. coli’de laktoz metabolizması düzenlenmesi

üzerinde bağlanarak, söz konusu enzimlere özgü mRNA’nın sentezine başladığı yerdir.

Normal koşullar altında, yani laktozun ortamdaki yokluğunda, represör operatöre bağlı olduğundan, operonun yapısal genlerinin transkripsiyonu mümkün değildir. Dolayısıyla laktozun özıştürümünden sorumlu permeaz ve β -galaktosidaz enzimleri sentezlenemez. Ortama eklendiğinde, laktoz hücre içine girerek represöre bağlanır ve onun operatörden ayrılmasını sağlayarak transkripsiyonun başlamasını sağlar.

8.17. RNA yazılımı (“editing”)

RNA yazılımı mRNA düzeyinde bilgi içeriğinin değiştiği bir işlemdir. RNA'nın transkribe edildiği DNA'dan farklı diziye sahip olduğu iki değişik durum gözlenmiştir. Memeli hücrelerinde mRNA'da bir bazın yerine bir başkasının geçmesiyle şifrelenen proteinin amino asit dizisi değişir. İlkel bir ökaryot olan tripanazomalarda ise çok daha geniş çaplı değişiklikler olur.

Apolipoprotein-B (apo-B) geni 4563 kodondan oluşur. Karaciğerde transkribe edilen gen 4563 aminoasit içeren proteini sentezler. Aynı genden incebarsakta sentezlenen mRNA'nın 2153. kodonundaki sitozin urasile dönüştürülür. Glutamini şifreleyen CAA kodonunun sonlanma kodonu olan UAA'ya dönüşmesi sonucu aynı proteinin kısa bir biçimi ortaya çıkar. Bu türden yazılım enderdir, ama apo-B tek örnek değildir. Sıçan beyin hücrelerindeki glutamat reseptörü bu konuda başka bir örnektir.

Tripanazoma mitokondrilerinde ise mRNA transkribe edildikten sonra bir kılavuz RNA ile eşleştirilir ve kılavuz RNA tarafından belirlenen yerlere urasil nükleotidleri eklenir (Şekil 8.28). Farklı koşullarda farklı kılavuz RNA'lar üretilir. Uridin eklenmesi dışında sitidin eklenmesi ya da uridin çıkarılması gibi değişiklikler de saptanmıştır.

Şekil 8-28. RNA yazılımı örnekleri

8.18. Ters Transkripsiyon

Tümör oluşturan virüslerden retrovirüs infeksiyonunun, DNA sentezi inhibitörleri (örneğin Amethopterin, 5-Fluorodeoksiuridin ve sitozin arabinosit) ile engellenmesi, RNA virüslerinin çoğalabilmesi için DNA sentezinin gerekli olduğunu ima ediyordu. Bu beklenmedik sonuçtan yola çıkan Temin 1964’lerde DNA provirüs hipotezini ortaya attı.

RNA Tümör virüs → DNA Provirüs → RNA Tümör virüs

Bu şema genetik bilginin tek yönlü oluşumunu öngören santral dogmayı zedelemekte olduğundan, önceleri pek taraftar bulmamıştı. Ama 1970’de Temin ve Baltimor birbirinden bağımsız olarak RNA kalıbından DNA’yı sentezleyen bir enzim keşfettiler. Ve adına da transkripsiyon aşamasının ters yönde de oluşabileceğini göstermek üzere **“ters transkriptaz enzimi (Rtase - reverse transcriptase)”** ya da diğer polimerazlara benzeterek **“RNA’ya bağımlı DNA polimeraz”** adı verildi.

150000 D ağırlığındaki enzim α ve β olmak üzere 2 altbirimden ibarettir. Virüs partikülü başına 50 - 70 adet bulunan ters transkriptazın 3 genel enzimatik aktivitesi mevcuttur.

1) RNA kalıbını çift iplikli (ds) DNA’ya kopya ederken primer gerektirirler ve dNTP’leri 3’-5’ bağı ile bağlayarak DNA’yı 5’ → 3’ yönünde uzatırlar (Şekil 8-29). 3’ ve 5’ uçlarında birbirlerine komplementer diziler bulunur. Böylece dsDNA dizileri halkasal hale gelebilir.

2) Primerli tek iplikli (ss) DNA’yı çift iplikli (ds) DNA’ya kopya edebilirler (Bilinen DNA polimeraz etkisi).

3) RNAz-H aktiviteleri vasıtasıyla DNA-RNA hibritindeki RNA’yı yıkıma uğratırlar.

Bugün ticari olarak da satılan bu enzim, gen teknolojisinin en önemli araçlarından biridir. Ters transkriptaz enzimini kullanarak in vitro koşullarda tek iplikli bir RNA molekülünü, örneğin mRNA’yı komplementer DNA molekülüne çevirmek mümkündür.

Şekil 8-29. Ters transkripsiyon sırasında dsDNA'nın halkasal duruma gelmesi

Böyle bir reaksiyonda ters transkriptazın'ın saflığı (RNAz-free) ters transkriptaz /mRNA oranı, ortam pH'sı (genellikle $\text{pH} = 8.3 \pm 0.5$), K^+ ve Mg^{2+} iyonlarının varlığı ve dNTP konsantrasyonlarının 200 μM olarak seçilmesi cDNA'nın tam boyda sentezlenebilmesi için gerektir (Şekil 8-30).

8.19. Prion Hastalıkları

1970'lerde; bilinç yitimi, bunama, otonom sinir sistemi düzensizlikleri gibi sinirbilimsel belirti ve bulgular gösteren, kimisinde bir kaç ayla 10 yıl arasında kuluçka süresi olan enfeksiyon, kimisinde kalıtsal geçiş gösterilmiş bir grup hastalık dikkat çekmeye başladı: Kuru, scrapie, Creutzfeld-Jakob hastalığı, Gerstmann-Sträussler-Scheinker hastalığı, ölümcül ailesel uykusuzluk hastalığı.

Bu hastalıkların hasta hayvan beyinlerinden hazırlanan özütlerle sağlam hayvanlara bulaştırılabilmesi etkenlerinin yavaş etki eden (kuluçka

Şekil 8-30. Viral RNA'dan DNA sentezi..

süresi uzun) virus olduğunu düşündürdü. Özütlarin hastalık oluşturma yeteneğinin DNaz, RNaz, mor ötesi ya da iyonize edici radyasyona dirençli olması; proteaz, formol ve deterjanlarla etkinliğini yitirdiğinin saptanması etkenin nükleik asit içermediğini, yalnızca proteinden oluştuğunu ortaya koydu. Bu proteinlere **Prion** (PrP) adı verildi.

PrP'nin araştırılan her memelide bulunduğunun ve insanda 20. kromozomun kısa kolunda yer alan, tek bir ekzon içeren bir gen tarafından şifrelenen 35.000 D'luk bir hücre yüzey glikoproteini olduğunun anlaşılması hastalık kuramının oluşturulmasının sağladı. Prionun birincil yapıları aynı, ikincil yapıları ayrı iki biçimi vardır. Hastalık yapan biçimin (PrP^{Sc}) ortamda bulunması, nomalde yapım ve yıkımı dengede olan biçimin (PrP^C) ikincil biçiminin değişmesine, çökmesine, birikmesine ve sinir hücrelerine zarar vermesine yol açmaktadır(Şekil 8-31).Bu hastalıkların henüz sağaltımı bulunmamaktadır.

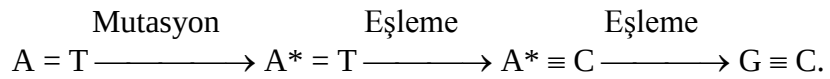
Şekil 8-31. Prion proteinlerinin (PrP^{Sc}) normal proteinlerin (PrP^{C}) yapısının değışerek birikmesine yol açmaları

8.20. Mutasyonlar

Mutasyonlar DNA’da meydana gelen kalıtsal nitelikte yapısal değişiklikler olarak tanımlanabilir. Mutasyonlar, oluşum biçimleri, koşulları, oluştukları hücre tipi ya da yol açtıkları durumlara bağlı olarak değişik biçimlerde sınıflandırılabilir.

Oluşum koşullarına göre doğal (kendiliğinden oluşan) ve yapay (deneysel) mutasyon tipleri ayırt edilebilir. Doğal mutasyonların oluşum olasılığı 10^{-9} - 10^{-12} mutasyon/nükleotit arasında değişir. Eşleme sırasındaki yanlış okumadan da kaynaklanabilmekle birlikte, bu tip mutasyonların başlıca nedeni olarak DNA’daki bazların devingen eşitsizlik (tautomer) durumları düşünülmektedir (Şekil 8-32). Bu tip mutasyonların tipik bir örneği adenin ile timin arasındaki ilişkilerde görülür.

Normal koşullarda adeninin 6-amino grubu bir hidrojen vericisi, N-1 atomu ise bir hidrojen alıcısı özelliği taşır. Bu koşullarda adenin timin ile hidrojen bağları kurarak bir baz çifti oluşturur. Çok seyrek de olsa, adeninin bir enol konformasyonuna geçmesi sonucu 6-amino grubundan 6-imino grubu oluşur ve N-1 atomu bir hidrojen vericisi niteliği kazanır. Bu yeni konformasyonda adenin yalnız sitozin ile hidrojen köprüleri kurabildiğinden, A-T baz çifti yerini G-C çiftine bırakır:



(A*: Adenin tautomerik formu)

Şekil 8-32. Timin yerine sitozin ile hidrojen bağları kuran adenin tautomeri.

Deneyisel yollardan mutasyonlar oluşturabilmek için en çok kullanılan yöntemlerden biri, modifiye edilmiş bazlardan (baz benzerlerinden) kurulu nükleotitleri nükleik asit yapıtaşları olarak kullanmaktadır. Böyle baz benzerleri arasında en çok kullanılan bir mutajen 5-bromourasil'dir. 5-bromourasil timin molekülünün 5-metil grubunun yerini bir brom atomuna bırakması sonucu oluşur. Timin ve 5-bromourasilin yapılarının benzerliği nedeniyle DNA polimeraz yeni DNA zincirlerini oluştururken, 5-bromourasili bir substrat olarak kullanır. Böylelikle DNA molekülünde timinin yerini alan 5-bromourasil normal koşullar altında aynen timin gibi hareket eder. Bununla birlikte brom atomunun getirdiği elektronegatif yük bazın yapısındaki düzeni bozarak, bazın normal keto biçiminin enol biçimine dönüşmesine neden olabilir. Hidrojen köprüleri kurma özellikleri değişen 5-bromourasilin eşleme sırasında adenin yerine bir guanin

molekölü ile eşleşmesi sonucu, T-A baz çifti yerini G-C çiftine bırakır. 5-bromourasil'in keto ve enol şekillerinin hidrojen köprüleri kurma özellikleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 8-33).

5-Bromourasil gibi bir baz analogunun mutajenik etkisinin gerçekleşmesi için, aynen doğal mutasyonların örneğinde de gördüğümüz gibi bir replikasyonun yer alması gerekir. Buna karşın diğer bazı kimyasal maddeler bazların yapısını doğrudan değiştirerek mutasyona neden olur. Böyle mutajenik maddeler arasında HNO₂, hidroksilamin (H₂NOH), ve nitroguanidin sayılabilir. Bu maddeler özellikle bazların amino gruplarının kaybolmasına yani “dezaminasyon”a neden olur. Örneğin sitozinin 6-amino grubunun ortadan kalkmasıyla bir urasil bazı oluşur.

Doğal olarak ya da laboratuvar koşullarında ışınlar (Röntgen, UV-ışınları ya da radyoaktif ışınlar) da mutasyonlara yol açabilir. Bu ışınların etkisi altında iyonlaşmış bazlar, baz kopmaları (riboz ya da deoksiriboz ile pürin ya da pirimidin bazları arasındaki bağların kırılmaları),

Şekil 8-33. Timin gibi davranan 5-Bromourasil adenin yerine guanin ile hidrojen bağları yapar.

poli(deoksi)ribonükleotit zincirinde fosfodiester bağlarının kırılmaları ya da daha önce değinilen timin dimerleri gibi DNA onarım mekanizmasını uyaran değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler onarılmadığı takdirde daha sonraki kuşaklara -eşleme mekanizması için anlamsız nitelikte olmaları nedeniyle- iletilmeleri sözkonusu değildir. Diğer yandan bu yapısal bozulmaların onarımı sırasında, onarıma (örneğin onarım sırasındaki yanlış okumaya) bağımlı mutasyon oluşum olasılığının küçümsenemeyecek kadar yüksek olduğu bulunmuştur.

Yüksek organizmalarda mutasyonları ayrıca mutasyonun meydana geldiği hücre tipine göre **somatik (normal vücut hücrelerini etkileyen)**

ve **genetik (eşem hücrelerini etkileyen)** mutasyonlar olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Somatik mutasyonların bir yandan hücre özelleşmesinde (yani fizyolojik bir olayda) ve diğer yandan da kanser oluşumunda önemli bir rol oynayabileceğine işaret eden bulgular bulunmaktadır. Oluşum mekanizmalarına ve okuma kalıbını etkileme biçimlerine göre de mutasyonları iki sınıfa ayırmak mümkündür. Baz dizisindeki bazların sayısında bir değişime yol açmayan, buna karşın bazı bazların yerlerini başkalarına bırakmalarına neden olan birinci tip mutasyonların tipik temsilcilerini nokta mutasyonları teşkil eder. Baz dizisindeki tek bir baz değişikliği sonucu,

- a) bu bazın bulunduğu şifre sözcüğünün anlamı değişmeyebilir. (= eşanlamlı mutasyon; örneğin prolini şifreleyen sözcüklerinin -CCC, CCA, CCG, CCU- üçüncü harflerini etkileyen mutasyonlar gibi),
- b) şifre sözcüğü anlamını değiştirip, başka bir amino asidi şifreleyebilir (= yanlış anlamlı mutasyon), ya da
- c) önce bir amino asit şifreleyen bir sözcük bir bitiş sözcüğüne (UAA, UGA, UAG) dönüşebilir (= anlamsız mutasyon).

Aşağıda görüleceği gibi, normal bir bitiş şifre sözcüğü böyle bir mutasyon sonucu bir amino asidi şifreleyen sözcüğe de dönüşebilir.

Baz dizisindeki baz sayısında değişikliğe yol açan **eksilme (delesyon)** ya da **ekleme (adisyon)** mutasyonları sonucu bu mutasyonlardan aşağıda kalan tüm dizinin okuma kalıbı dolayısıyla şifrelenen amino asit dizisi değişir (Şekil 8-34).

Mutasyonlar, ayrıca organizma için doğurdıkları sonuçlara göre sessiz, olumsuz etkili ve ölümcül nitelikte olabilirler. Genellikle bir mutasyon seleksiyon baskısı altında ve evrimin süzgecinden geçerek

oluşmuş bir protein tipinin özelliklerinin yitimine yol açmaya aday bir olay olarak olumsuz niteliktedir. Bununla birlikte çok seyrek de olsa, bir mutasyon sonucu amino asit dizisindeki değışiklik proteinin işlevini daha etkin ve daha hızlı yapmasını olası kılan bir yapının ortaya çıkmasına yol açabilir. Bu tip mutasyonların evrimin oluşumunu gerçekleştiren etmenler olduğu sanılmaktadır.

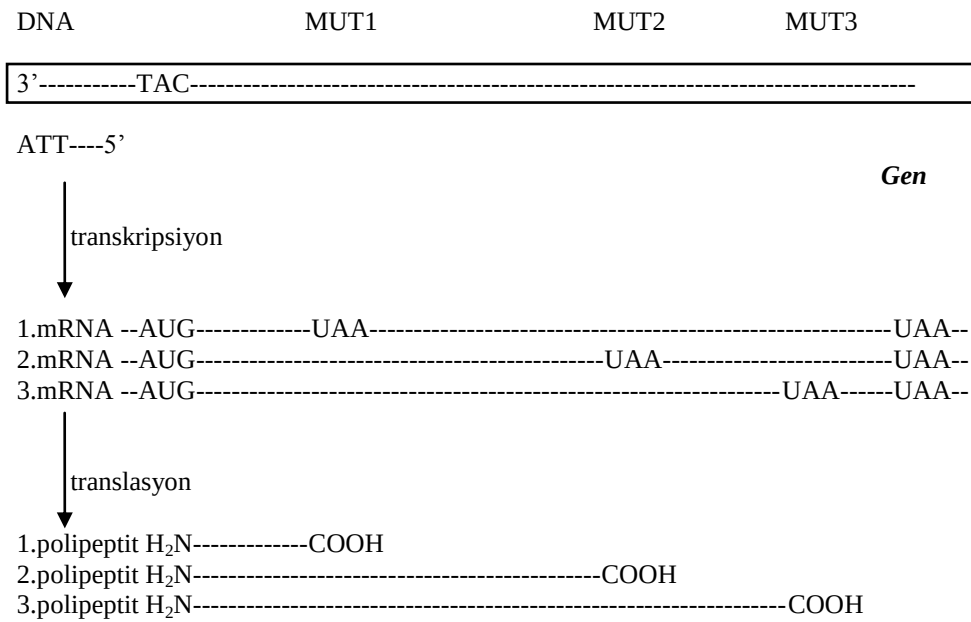
Şekil 8-34. Ekleme ve eksilme mutasyonlarının okuma kalıbında yaptığı değışiklik ve bu tür mutasyon etmenlerine örnekler.

DNA molekülünde belli bir bazın yerini başka bir baza bırakmasıyla ortaya çıkan ve öncekinden başka bir amino asidin şifrelenmesine yol açan yanlış anlamlı mutasyonların pek çok örneğini anormal hemoglobin olarak gösterilen HbA'nın mutant tiplerinde görmek

olasıdır. Orak hücreli anemide görülen ve normalde β -globin zincirinin NH_2 ucundan itibaren 6. konumda bulunan glutamik asidin yerini bir valin grubuna bırakmasıyla oluşan hemoglobin S ve aynı konumdaki (glutamik asit $\rightarrow$ lizin) değişikliğiyle oluşan hemoglobin C tiplerinin oluşmasına yol açan mutasyonlar aşağıda gösterilmiştir.

DNA	mRNA	protein (β -globin)
3'---CAT---5'	$\longrightarrow$ 5'---GUA---3'	$\longrightarrow$ valin (HbS)
3'---CTT---5'	$\longrightarrow$ 5'---GAA---3'	$\longrightarrow$ glutamik asit (HbA)
3'---TTT---5'	$\longrightarrow$ 5'---AAA---3'	$\longrightarrow$ lizin (HbC)

Tıp literatüründe gerek HbS ve gerekse HbC'ye sahip bir kişiyle ilgili yayın β -globin genlerinin insan haploit DNA'sındaki sayısının iki olduğunu ve bu hastanın anne ve babadan aldığı genlerle HbS ve HbC için çifte heterozigot olduğunu göstermiştir. DNA'daki bir baz değişikliği anlamsız bir sözcüğün oluşmasına ve polipeptid zincirinin sentezinin zamansız (erken) durmasına yol açabilir (anlamsız mutasyon). Bunun sonucu ortaya çıkan normal uzunlukta olmayan polipeptid zincirleri -COOH uçlarında mutasyonun gen üzerinde olduğu yere göre uzunluğu değişen bir bölgeden yoksundur. Zaten anlamsız mutasyonun bulunduğu yere göre durumun yaşamla bağdaşıp bağdaşmayacağı belirlenir. mRNA 5' ucundan itibaren okunduğuna (ve polipeptid sentezi NH_2 -ucundan başladığına) göre genin başlangıç bölümüne ve mRNA'nın 3' ucuna ve doğal bitiş sözcüklerine yakınlığına orantılı olarak, mutasyonun proteinin işlevini olumsuz etkileme olasılığı azalır (Şekil 8-35).



Şekil 8-35. Anlamsız mutasyonun ortaya çıktığı yer ile protein uzunluğu arasındaki ilişki

Nokta mutasyonlarının yanı sıra okuma kalıbında bir kaymaya yol açan ekleme ya da eksilme mutasyonları da polipeptit zinciri için yepyeni bir kodunun oluşmasına neden olabilirler. Diğer taraftan okuma kalıbındaki kayma ya da nokta mutasyonları doğal durma yerinin ötesine yürünmesine de neden olabilir. Hemoglobin Constant Spring ve hemoglobin Wayne adı altında tanınan anormal hemoglobin tipleri böyle bir mekanizma sonucu ortaya çıkmıştır. Normal hemoglobin moleküllerinde bulunan α -globin zincirinin 142 amino asit içermesine

karşın, aynı zincir Hb Constant Spring'te 172, Hb Wayne'de ise 149 amino asit uzunluğundadır:

Bu hemoglobin tipleri (Hb Wayne ve Hb Constant Spring) buna göre α -globini şifreleyen mRNA'nın doğal bitiş sözcüğünün ötesinde en azından 93 nükleotit içermesi gerektiğini göstermektedir.

8.21. Baskılama (Supresyon)

Bir mutasyonun etkisi bazan aynı gende ya da başka bir gende meydana gelen ikinci bir mutasyon ile baskılanabilir (= supresyon). Baskılayıcı nitelikte bir mutasyonun etkisiyle aynı gende ilk mutasyonun etkisinin kalkmasına (gen içi supresyona) örnek olarak bir ekleme mutasyonunu izleyen bir eksilme (ya da tersi) mutasyonu gösterilebilir. Bu sayede ilk mutasyondan aşağıdaki tüm bir baz dizisinin okunmasında bir kayma önlenmiş olur ve mutasyonun etkisi (iki mutasyon arasındaki uzaklığa bağlı olmak üzere) amino asit dizisindeki bir iki değişiklikle sınırlanır.

Normal α -globinin -COOH ucunda görülen amino asit dizisi (ve karşılığı nükleotit sırası):

NH₂..... Serin-lisin-tirosin-arginin (-COOH)
5'..... UCC AAA UAC CGU UAA.... 3'
140

α -globin Wayne:

serin (ASP) (THR) (VAL) (Lys) (Leu) (GluA) (Pro) (Arg) -COOH

UCG AAU ACC GUU AAG CUG GAG (CCU) CGG UAG

A

eksilme mutasyonu

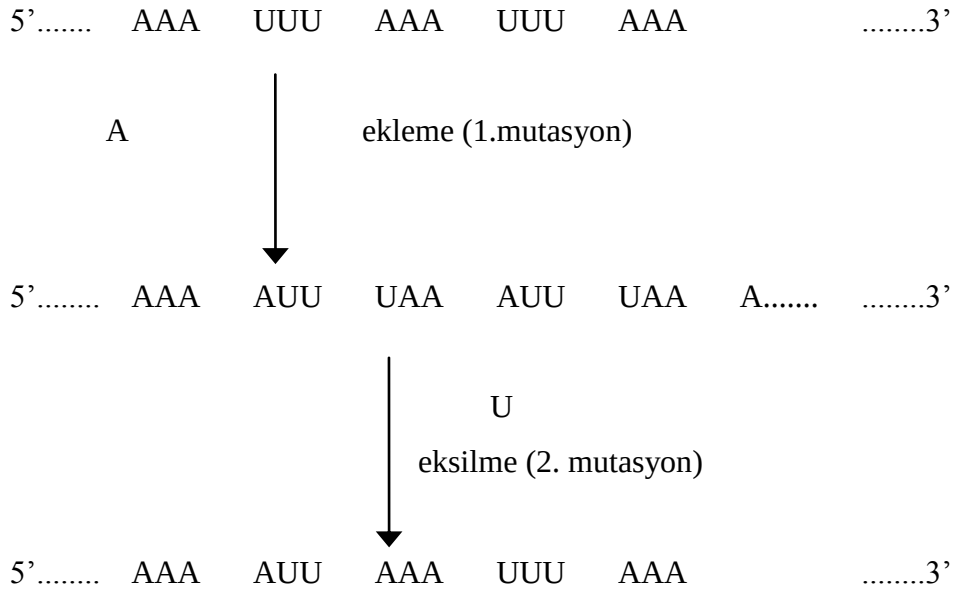
α -globin Constant Spring:

serin lisin tirosin arginin glutamin alanin glisin GluA -COOH

UCC AAA UAC CGU C AA GCU ...GGA...GAG UAA
140

U

nokta mutasyonu



(Bunun yanı sıra teorik olarak, bir nokta mutasyonunun etkisinin onu geriye dönüştüren ikinci bir mutasyonla kalkabileceği de düşünülebilir:

1.mutasyon U → C; 2.mutasyon C → U).

Bir mutasyonun etkisi genler arası supresyon mekanizmasında tRNA moleküllerinin (supressor tRNA'ların) aracılığıyla da baskılanabilir. Bu ikinci mekanizmada supresyona yol açan tRNA molekülünün antikodonunu şifreleyen DNA baz dizisinde ikinci bir mutasyonun olduğu görülür. Antikodonundaki bu değişiklik sayesinde tRNA molekülü birinci mutasyonun sonucu ortaya çıkabilecek (anlamsız) bir kodonu bir amino asitmiş gibi okuyarak sentezin zamansız durmasını önler. Örneğin tirozini kodlayan UAC kodonu bir mutasyon sonucu anlamsız kodon UAG'ye dönüşebilir. Tirozine özgü tRNA moleküllerinin

birinin antikodonunun (AUG) ikinci mutasyon sonucu mRNA'daki UAG'yi tanıyan AUC antikodonuna dönüşmesiyle anlamsız mutasyona karşın normalde beklenen proteinin yapılması olanaklı olabilir (Şekil 8-36)

Böyle bir supresor tRNA'sının varlığının mutasyonu bastırıcı ve dolayısıyla yararlı nitelikteki etkisinin yanı sıra hücre için olumsuz sonuçlara yol açabilecek iki etkisi de düşünülebilir. Yukarıda verilen örnekte:

1. Supresor tRNA'sının doğal tirozin sözcüklerini okuyamaması protein sentezini tirozini kodlayan sözcüklere gelince durmasına yol açabilir.

2. Supresor tRNA tüm UAG kodonlarıyla etkileşeceğinden sentez doğal terminasyonun ötesinde de sürebilir.

Birinci hususla ilgili olarak tirozine özgü iki değişik tRNA tipinin bulunduğu, sepresyonun etkilediği tRNA tipinin diğerine kıyasla hücrede çok daha az miktarlarda var olduğu ve genellikle bu ikinci "minor" tRNA tipini kodlayan genin DNA'da ikileşmiş (iki nüsha) olarak bulunduğu ve bunlardan yalnız tekinin supresyona yol açan bir mutasyona uğrayabileceği gözönünde bulundurulmalıdır. Supresor tRNA'sına karşın protein sentezinin bitiş mekanizmasında bir aksamanın olmaması ise mRNA'nın kodlayan bölgesinin sonunda birden çok anlamsız kodonun (...UAG-gibi) arka arkaya sıralanmasıyla bitişin belirlendiğinin

Şekil 8-36. Anlamsız kodona yol açan mutasyonun
baskılanması

ve güvence altına alındığının bir ifadesidir. Anlamsız mutasyonların yanı sıra yanlış anlamlı mutasyonları ve ekleme mutasyonlarını bastıran supresor tRNA'lar da bulunmuştur.

Mutasyonların çeşitli sınıflandırılma tipleri vardır. Bunlar Tablo 8-6'da gösterilmiştir.

Doğal	Deneysel	Genetik	Somatik	Oluşma mekanizmasına göre		Sonuçtaki sözcüklerin anlamına göre			Yol açtıkları duruma göre		
Radyasyon (α , β , γ)	HNO ₂ (C→U)	(Cinsiyet hücreleri) Diğer kuşaklara aktarılır.	Vücut hücrelerindeki mutasyonlar (örn: lenfositler)	Nokta mut. (Tek baz değişikliği)	Ekleme veya eksilme	Eş anlamlı:	Yanlış anlamlı:	Anlamsız:	Kapalı: Eş anlamlı ve yakın anlamlı (Benzer aa)	Olumsuz Etkili Yanlış anlamlı Farklı aa	Ölümcul: Anlamsız Ekleme Eksilme
UV-ışınları X ışınları ısı, pH viruslar Kendi-liğinden (tautomerik kayma)	Hidroksil-amin Boyalar (ekleme, eksilme) (Akridin...) Baz analogları	(Üro-genital bölge korunma-lıdır)	Sadece bireyin yaşamını etkiler	UUUAAA ↓ UUAAAA HbS, HbC p21	ekleme: UUUAAA ↓ UUUAUAA eksilme: UUUAAA ↓ UUAAA Hb Wayne Hb Tours	CGA → CGU CGC CGG AGA AGG (Arg)	GGA → (Gly)	UGA (Son)	AGA→AGG AGA→AAA (Arg) Lys)	HbS, HbC	Doğal sonlanmaya yakınsa yaşama şansı artar.

Tablo 8-6: Mutasyonların sınıflandırılması

8.22. DNA onarım mekanizmaları

Canlı sistemler kendi işleyişlerini olumsuz etkileyen zararlı etmenlerle sürekli içiçedirler. Bu etmenlerin başlıcaları Şekil 8-37'tedir. Dış etkiler (özellikle kimyasal kirlilik, radyasyon) ve doğal iç etmenler (tautomerik kaymalar, ısı, pH) sonucunda DNA'da hasarlar oluşur. Günde yaklaşık 10 000 bazın hidroliz sonucu yittiği, bir saat süresince yüzbinlerce değişik hasarlanmalar olduğu tahmin edilmektedir. Bu hasar oranları düşünüldüğünde yaşamın ancak onarım varlığında olanaklı olabileceği rahatlıkla söylenebilir. Bu hasarlar ve onlara verilen yanıtlar hücre yaşlanması ve ölümü ile de yakından ilgilidir.

DNA molekülünün yapısındaki değişikliklerin geriye dönüşü olmayan nitelikte olacağı ve böyle değişikliklerin kalıtsal bilgisinin de değişmesine yol açacağı uzun süre varsayılmıştır. Son yıllardaki çalışmalar ise, organizmanın, DNA'da meydana gelen değişikliklerin bazılarını onarabilecek güçte bir mekanizmaya sahip olduğunu göstermiştir. (Şekil 8-38).

Özellikle morötesi (UV) ışınının etkisi altında DNA molekülünün birincil yapısında sanıldığından çok daha sık değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin en tipik örneğini UV ışınının altında iki komşu timin bazı arasında oluşan timin dimerleri oluşturur. (Şekil 8-39). Ayrıca değişik kimyasal etkilere maruz kalınması sonucunda (oksidasyon, alkilasyon, dezaminasyon v.b) anormal bazlar oluşabilir. İplikçikler arasında çapraz bağlar, ya da DNA'da çift zincir kırıkları gibi büyük yapısal bozukluklar oluşabilir. Canlı sistemlerin bu bozuklukları gidermek için çeşitli onarım mekanizmaları vardır.

Şekil 8-37. Hücrelerin karşılaştığı başlıca zararlı etmenler

1) Direkt onarım (Foto Reaktivasyon): Bilindiğı gibi morötesi ışınlar bakterilerde mutasyonlara yol açar. Morötesi ışınlara maruz bırakılan bakteriler, görünür ışık altına konulduklarında mutasyon

oranlarının düştüğü, yani DNA hasarlarının onarıldığı gözlenir. Bu gözlem üzerine yapılan çalışmalar DNA fotolizaz enziminin varlığını ortaya çıkarmıştır.

Şekil 8-38. DNA'daki yapısal kusurlar.

FADH₂ (Flavin adenin dinükleotid) kofaktör olarak kullanılır. FADH₂ mavi ışııkta aktiflenir ve bu enerjiyi pirimidin (çoğunlukla timin) dimerlerinin onarılması için kullanır. Bu onarımda bazların çıkarılması gerekmez. Bu tür enzimlerin bir başka örneğı, yine bakterilerde O⁶-metilguanini direkt olarak onaran O⁶-metilguanin-DNA metil transferazdır.

2) Uyumsuzluk (“Mismatch”) Onarımı

DNA polimeraz eşleme sırasında yanlış bazlar yerleştirebilir (Örneğin guanin karşısına timin gibi). Bu uyumsuz bazların tanınması ve düzeltilmesi eşleme işleminin aslına sadıklığını 100 ile 1000 kat artırır. Uyumsuzluklar her zaman eski iplikçik doğru kabul edilerek yeni sentezlenen iplikçikteki bazın değiştirilmesiyle düzeltilir. Fakat onarım sistemi DNA iplikçiklerinden hangisinin eski, hangisinin yeni sentezlenmekte olduğunu bilmelidir. *E. coli*'de iplikçiklerin ayırt edilmesi Dam metilaz adı verilen bir enzimin işlevi ile ilintilidir. Dam metilaz 5'-GATC sırası içinde bulduğu her adenin bazını N⁶ konumuna bir metil (-CH₃) grubu ekler. Eşlemeden hemen sonra ilk birkaç dakika eski iplikçik metile olmuş, yeni iplikçik henüz metillenmemiş durumdadır (Şekil 8-40). Bu yüzden ilk birkaç dakika süresince eski ve yeni iplikçikler birbirinden ayrılabilir.

Şekil 8-39. Timin dimeri oluşumu.

.

Şekil 8-40. E. coli Dam metilaz enzimi ve DNA
metilasyonu

Uyumsuzluk onarımının ana prensibi yanlış eşlenmiş bir baz çiftiyle karşılaşıldığında (örneğin G=T) eski iplikçikteki bazı doğru kabul ederek karşısındaki bazı değiştirir. Uyumsuz bazların tanınmasında E. coli'de 3 protein görev alır; bu proteinlerin birisi GATC dizilerine bağlanarak iplikçiklerin ayrımını sağlar (MutH), diğeri yanlış eşlenmiş baz dizilerine bağlanır (MutS), üçüncüsü diğeri ikisinin bir araya gelmesini sağlar (MutL) (Şekil 8-41). Endonükleazın açtığı çentik sonrası ekzonükleaz yeni sentezlenen iplikçiği yıkar. Sonra bu boşluk DNA

polimeraz III ile yeniden sentezlenerek doldurulur, ligaz ile birleştirilir ve onarım tamamlanmış olur.

Ökaryotlarda bu onarım yolu daha çok proteinin rol aldığı daha karmaşık yapıdadır. İnsanda kalınbarsak kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinde bu onarım yolunda işlev gören proteinlerde mutasyonlar saptanmıştır.

3) Baz kes-yama onarımı: Bir bazın hidrolizle yerinden ayrılması, oksidasyonu, alkilasyonu gibi hasarların onarılmasına yönelik bir mekanizmadır. Bu onarım yolunun anahtar enzimi DNA glikozilazdır. DNA glikozilaz; hasar görmüş bazı baz ile nükleotidin deoksiriboz parçası arasındaki N-glikozilik bağı kırarak ayırır. Bazın uzaklaştırılmasıyla oluşan AP-bölgesi (Apürinik/apirimidinik bölge) AP endonükleaz tarafından kesilerek çıkartılır, DNA polimeraz I tarafından yeniden sentezlenir, ligaz tarafından bağlanarak onarım tamamlanır. (Şekil 8-42)

4) Nükleotit kes-yama onarımı: Timin dimerleri gibi yapısal değişikliklere yol açan DNA lezyonlarının çıkarılmasını izleyerek sağlam iplikçiğin kalıp olarak kullanılmasıyla yeni DNA sentezlenmesi işlemidir.

DNA üzerinde yapısal hasar oluşturan lezyon tanındıktan sonra TFIIH (RNA polimeraz II'nin H ile adlandırılan transkripsiyon faktörü) onarıma katılır. TFIIH'nin sahip olduğu alt birimler iplikçikleri birbirinden ayırır. Hasarlı bölgenin 3' ve 5' tarafında birer kesi yapılarak bu bölge çıkartılır. Oluşan boşluk sağlam iplikçik kalıp olarak kullanılarak

Şekil 8-41. Uyumsuzluk (mismatch) onarımı

DNA polimeraz ϵ tarafından doldurulur ve ligaz ile bağlanır (Şekil 8-42).

Bir transkripsiyon faktörü olan TFIIH'nin DNA onarımında ve hücre siklusünün düzenlenmesinde de görev aldığı bulunmuştur. DNA onarımının bozulmuş olduğu Xeroderma pigmentosum hastalığının yanısıra Cockayne sendromu ve trikotiyodistrofi gibi transkripsiyonun

Şekil 8-42: Nökleotit-kes-yama onarımı

buzulduğu hastalıklar da aynı gen ürünlerinin bozukluğunun sonucudur.

5) Rekombinasyonla onarım: Diploid canlılar olan ökaryotlarda DNA çift zincir kırıkları ve tek iplikçikte oluşan lezyonlar; öteki, sağlam olan zincirle homolog rekombinasyon yapılarak onarılabılır.

DNA onarım bozukluğuyla bağlantılı olduğu gösterilen bazı kalıtsal hastalıklar Tablo 8-7’de dir.

Hastalık adı	Hastalığın belirti ve özellikleri
Ataksiya telenjektazya (AT)	nörolojik bozukluklar, ataksi, telenjektaziler, iyonlayıcı ışınlarla aşırı duyarlılık, kendiliğinden oluşan kromozom kırıkları
Bloom sendromu	büyüme geriliği, güneş ışınlarına (UV) aşırı duyarlılık, kromozom bozuklukları
Fanconi anemisi	Kemik iliği yetmezliği, anatomik bozukluklar, mutajenlere duyarlılık, kromozom bozuklukları
Kseroderma pigmentosum (XP)	güneş ışınlarına ve UV-ışınlarına aşırı duyarlılık, güneş gören deri bölgelerinde tahribat, uzunsürede bu bölgelerde %100’e yakın kanserleşme olasılığı

Tablo 8-7. DNA onarım bozukluğuyla ilgili hastalıklara örnekler.

9. Gen Mühendisliği

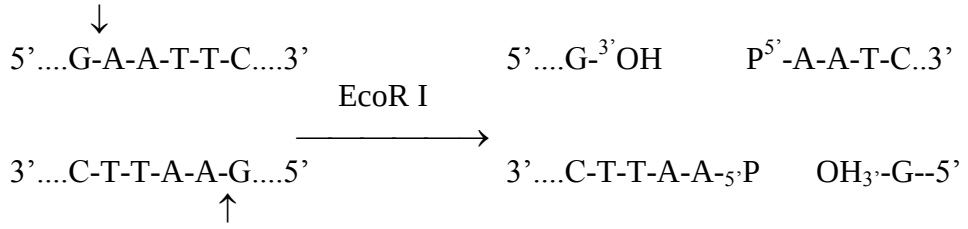
9.1. Restriksiyon nükleazları

Nükleik asitleri belirli baz dizilerini tanımadan özgün olmayan biçimde kıran nükleazların yanı sıra son zamanlarda **restriksiyon nükleazları** adı verilen yeni bir (endo-)nükleaz çeşidi bulunmuştur. Bakteri hücrelerini yabancı (virüs) DNA'sına karşı dirençli kılan bu enzimler DNA molekülünde yalnız belirli baz dizilerine özgüdür. Bu özellik onların yapay gen aktarma işlemlerinde ve ayrıca çeşitli DNA moleküllerinin primer yapılarının incelenerek, baz dizilerinin saptanmasında büyük bir önem kazanmalarına neden olmuştur. Her biri daha değişik bir baz dizisini tanımakla beraber, bütün restriksiyon nükleazlarının ortak özelliği DNA'da tanıdıkları baz dizilerinin çift yönlü bir simetri göstermesidir. Aşağıda iki değişik restriksiyon nükleazının tanıdıkları baz dizileri gösterilmiştir (Tablo 9-1).

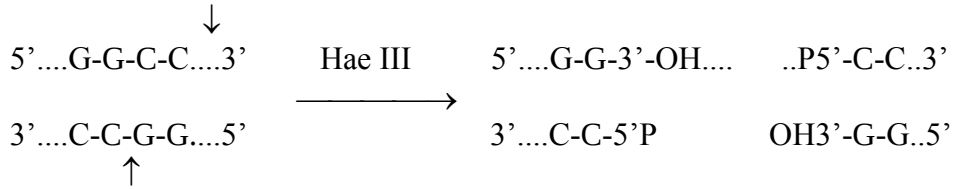
Restriksiyon nükleaz tipi ve elde edildiği mikroorganizma	DNA'da tanıdığı dizi ve kırdığı bağ
EcoR I (Escherichia coli)	↓ 5'....G-A-A-T-T-C....3' 3'....C-T-T-A-A-G....5' ↑
Hind III (Haemophilus influenza)	↓ 5'....A-A-C-G-T-T....3' 3'....T-T-G-C-A-A....5' ↑

Tablo 9-1. EcoR I ve Hind III restriksiyon nükleazları.

Görüldüğü gibi, bu enzimlerin tanıdıkları bölgeler komplementer iki DNA zincirinde belirli bir uçtan (5' ya da 3' ucundan) başlayarak okunduğunda aynı baz dizisini içermektedir. **Palindrom (= ters yönde okunduğunda da aynı anlamı veren)** adı verilen bu dizileri tanıyan restriksiyon nükleaz, her zincirde tek bir fosfodiester bağını kırmaktadır. Eco RI enziminin örneğinde görülebileceği gibi, kırılmanın sonucu 5' ve 3' uçlarında değişik uzunlukta, fakat birbirlerine komplementer “yapışkan” iki uç ortaya çıkmaktadır.



(Restriksiyon enzimi, kıracağı yere bağlı olarak eşit uzunlukta zincirler de çıkarabilir. Bir örnek altında ortaya çıkan uçlar gösterilebilir).



Böyle özgül dizilerin bir DNA molekülü üzerinde bulunma olasılığı bu enzimler tarafından DNA molekülünde kırılması sözkonusu yerlerin sayısını belirler. Örneğin maymunlarda kansere yol açan SV40

virüsünün DNA'sında (molekül ağırlığı = 3×10^6 dalton) Eco RI'in tanıdığı dizi sayısı 1, λ -faj DNA'sında (molekül ağırlığı = $2,5 \times 10^7$ dalton) yine yalnız 5'tir. T-7 faj DNA'sında (molekül ağırlığı = $2,5 \times 10^7$ dalton) böyle tek bir dizi mevcut değildir. Restriksiyon nükleazların etki mekanizmasında bu dizi özgüllüğü sayesinde, onların kırıdıkları DNA moleküllerinden yalnız belirli uzunluk ve sayıda DNA parçalarının ortaya çıkabileceği görülmektedir. Bu özellik, DNA üzerinde baz dizilerini tanımadan, yeterince zaman ve uygun reaksiyon koşulları verildiğinde, tüm DNA moleküllerini yiyip, mononükleotitlere dönüştüren diğer nükleazlarla, restriksiyon nükleazlarının arasındaki en önemli ayrıcalığı belirlemektedir.

Konak hücrelerin dış etkenlere (örneğin virüslere) karşı oluşturduğu restriksiyon nükleazlarına özgü baz dizileri kendi DNA'sında da bulunabilir. Hücre kendi DNA'sı bir öz yıkımdan böyle bölgelerde bulunan bazıları metile ederek (onlara $-\text{CH}_3$ gruplarını ekleyerek) korur.

Son 5-6 yıl içinde gerçekleştirilen aşamaların sonucu günümüzde genlerin birincil yapılarını incelemek, mutasyona uğramış genlerde mutasyonların etkilediği baz(lar)ı bulmak ve genlerin içerdiği baz dizilerini çok kısa bir sürede saptamak mümkün olabilmektedir. Bu tip çalışmaları olası kılan aşamalardan birini restriksiyon nükleazların bulunması oluşturur. Bu enzimlerin etkisiyle DNA'yı belirli özgün parçalara kırmak ve daha sonra ortaya çıkan DNA parçalarını molekül ağırlıklarına göre elektroforez yöntemiyle ayırmak mümkündür (Şekil 9-1).

Bundan sonraki aşamada, ayrılmış parçalar (ve onların gelde verdiği bantlar) arasında özgün gen dizilerini içerenler belirlenir. Bu

amaçla önce elektroforez geli ısıtılarak, DNA parçalarının denatürleşmesi ve çift sarmal yapısının tek ipliklere dönüşmesi sağlanır. Daha sonra gene özgü diziye komplementer bir radyoaktif polideoksiribonükleotit zinciri (Probe = komplementer DNA ya da cDNA'yı) içeren bir eriyiğin gel üzerindeki DNA bantlarıyla etkileşimi ve komplementer dizilerin hibritleşmesi sağlanır.

9.2. Yüksek organizmalara özgü mRNA'ların saflaştırılması ve radyoaktif cDNA'ların hazırlanması:

Yukarıdaki tip çalışmalar için bir önkoşulu özgün gen dizileri içeren DNA iplik parçalarıyla birleşerek onların yerini belirleyecek radyoaktif cDNA örneklerinin hazırlanması oluşturur. Bunun için izlenen yollardan birisinde sözkonusu genin transkripsiyon ürünü olan mRNA saflaştırılır. İkinci aşamada bu saf mRNA örneği kalıp olarak kullanılarak, üzerinde RNA'ya bağımlı DNA polimeraz (ters transkriptaz) enzimiyle cDNA oluşturulur. Normalde hücre içindeki binlerce değişik makromolekül ve RNA molekülü arasından istenen mRNA'yı saflaştırmak oldukça zor bir görevdir. Bununla birlikte sözkonusu mRNA ve üzerinde bulunan ribozomların (= özgün polizomları) mRNA'nın şifrelediği proteine özgü antikorlarla çöktirmek olasıdır.

Daha sonra çökekte bulunan polizomlardan fenol ile özütlenen (ekstrakte edilen) mRNA, rRNA ve tRNA karışımı arasından mRNA'yı yalıtmak gerekir. Bunun için ökaryot mRNA'larının ortak bir özelliğini de

değerlendirmek mümkündür. Ökaryot mRNA molekülleri bir iki ayrık (istisna) dışında 3'-uçlarında çeşitli uzunluklarda bir poli(A) dizisi taşırlar. Bu dizinin mRNA'yı sitoplazmada 3'-eksonükleazların etkisinden koruduğu sanılmaktadır. Sözkonusu RNA karışımı selüloz yatağına kısa deoksitimidilat zincirleri takılı, bir kolondan geçirildiğinde, mRNA molekülleri taşıdıkları poli(A) dizilerinin dT-zincirleriyle etkileşimi

Şekil 9-1. Restriksiyon nükleazın etkisiyle ortaya çıkan parçaların elektroforez işlemiyle ayırımı. Elektroforezin yürütüldüğü gel molekülselelek işlevi görür ve gelin oluşturduğu molekülsele örgünün gözeneklerinden en kolay geçebilen en kısa parçalar en hızlı devinimi gösterir. Gel üzerinde birbirlerinden ayrılmış ve boyanmış DNA fragmentleri (2., 3. ve 4. bantlar) gene özgü dizileri içermektedir.

sonucu kolon üzerinde kalır, rRNA ve tRNA kolonda tutulmadıkları için tamponla aşağı yıkanır. İkinci aşamada poli(A) ile dT-dizileri arasındaki hidrojen bağlarını kırarak mRNA kesimini saflaştırmış olarak kolondan indirmek olasıdır. (Şekil 9-2)

Saflaştırılmış böyle bir mRNA üzerinde daha sonra RNA tümör virüslerinden elde edilen ters transkriptaz (Temin, Baltimore 1969; Nobel Ödülü 1975) enziminin yardımıyla ve radyoaktif deoksiribonükleotit trifosfatların substrat olarak kullanılmasıyla radyoaktif cDNA sentezlenir (Şekil 9-2).

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak bir genin klonlanması 4 aşamada gerçekleştirilebilir.

1) Gen izolasyonu:

- a) mRNA'sından komplementer DNA (cDNA)nın sentezlenmesi,
- b) Gen kütüphanelerinin kullanılması: Aranan genin etiketli kopyası ya da etiketli mRNA'sı elde mevcutsa tüm genomu parça parça içeren klonlar arasından aranan geni içeren klon tespit edilip, bol miktarda gen izolasyonunda kullanılabilir.

2) Uygun gen taşıma aracı (Vektör):

- a) Plazmitler: En çok kullanılan pBR322 plazmiti Ampisilin ve Tetrasiklin antibiyotiklerine direnç bölgeleri içerir. E.coli'de çok kopyalı olarak bulunur. Pek çok restriksiyon enzimi için tek bir kesme yerine sahip olup, 6000 bp'e kadar yabancı DNA parçaları taşıyabilir.
- b) Virüsler: 1978'de yapılan Asimolar konferansında en az tehlikeli ve en çok incelenmiş virüs olarak λ -fajı kullanılmaya karar verilmiştir. λ DNA'sı 49 kb boyunda çift iplikli bir moleküldür. Her iki ucunda birbirlerine komplementer 12 nükleotitlik tek iplikli zincirlere sahiptir. Bu

Şekil 9-2. cDNA eldesi

uçlara “cos” (cohesive = yapışkan) uçlar denir. İnfekte olmuş hücrede DNA’ları cos bölgelerinden birbirine bağı peşpeşe DNA zincirleri halinde sentezlenir ve sonra faj halinde paketlenirler.

c) Cosmidler: Plazmit ve fajların kullanışlı özelliklerini bünyesinde toplayan melez bir vektördür. 35 000 - 45 000 bp'ye kadar DNA parçalarını klonlamada kullanılabilir. λ fajını paketleyen enzimlerin "cos" bölgelerini tanımasından yararlanılır. λ fajının "cos" bölgeleri örneğin pBR322'nin tet^r geni içine klonlanır. Amp^r geni sağlam kalır. Yabancı DNA nispeten büyük parçalara kesilip herbiri (biraz şans ile) "cos" bölgesi plazmit ile birleştirilir. Bakteriler ekilerek ampisiline dirençli, tetrasikline duyarlı olanlar seçilir.

d) Ekspresyon vektörleri: Yabancı genin ekleneceği bölgenin önünde tercihli bir promoter bölge içeren yapay plazmitlerdir. Klon edilecek genin ürünü olan proteinin sentezlenmesi arzu ediliyorsa ekspresyon vektörleri kullanılır.

3) Genin hücreye sokulması:

a) Plasmid ya da virüslerle,

b) Kimyasal yöntemle: $Ca_3(PO_4)_2$ kullanılarak DNA'yı tuzakladıktan sonra seçici bir ortamda ($\pm$ tk geni ile seçerek),

c) Fiziksel yöntem: Hücre çekirdeğine sokulacak cam (ya da plastik) mikropipetlerle (uçları 0,1 - 0,5 mikron olmalı) DNA injeksiyonudur.

Bu yöntemle herhangi bir DNA parçası herhangi bir hücreye direkt olarak sokulabilir.

d) Füzyon ile: Lipozomlar ya da eritrosit hayaletler (içlerindeki hemoglobin ve diğer proteinler boşaltılmış, bütünlüğü korunmuş eritrosit membranları) kullanılarak içerdikleri DNA'nın hücre erimesi yöntemiyle diğer bir hücre ile birleştirilmesi yöntemidir..

4) Geni içeren hücrenin seçimi:

a) Antibiyotiklere dirençlilik,

b) Seçici ortamlar (örneğin HAT: Hipoksantin, Aminopterin ve Timin) ortamında tk⁻ hücreler üreyemez. Çünkü Aminopterin, dCTP → dTDP yolunu bloke eder.

Yabancı geni içeren hücre seçildikten sonra uygun koşullarda saklanabilir ya da arzu edildiğinde adı geçen geni üreten bir fabrika gibi kullanılabilir. Günümüzde değerli proteinlerin genleri (insülin, büyüme hormonu vb.) ekspresyon vektörlerine klon edilmiş olarak mevcuttur. Hatta çeşitli firmalardan ücreti ödenerek temin edilebilir.

9.3. Kalıtım Mühendisliği

Türler kendilerine özgü kalıtsal bilgileri taşıyan DNA molekülünün korunmasında özellikle titiz davranırlar. Yüksek organizmalarda bu tutumu cinsel çiftleşme mekanizmaları yansıtır. Ancak aynı türün bireyleri arasındaki kromozom birleşmeleri yeni bir bireyin oluşabilmesini sağlar. Mikroorganizmalarda genelde aynı türün bireyleri arasında bile kromozoma özgü kalıtsal bilgi alışverişinin olmadığı görülmektedir. Bu bakımdan bir ayırık oluşturan ve **konjügasyon** adı verilen olayda F-faktörü olarak tanımlanan epizomun donör hücrelerinden akseptör hücrelere aktarılabilirdiği görülür.

Son yıllarda kalıtsal bilgi mühendisliği olarak tanımlanabilecek çalışmalar sonucu türler arasındaki bu engel aşılmış ve moleküler biyoloji alanında geliştirilmiş yöntemler sayesinde değişik organizmalardan elde edilen DNA molekülleri ve içerdikleri bilgi bir mikroorganizmaya

aktarılabilmektedir. Böyle bir bilgi transferinin gerçekleşebilmesi için bazı koşulların yerine getirilmesi gerekir;

1. İki değişik organizmadan elde edilen DNA moleküllerini özel yöntemlerle birbirlerine eklemek (Şekil 9-3),
2. Deney tüpünde oluşturulan hibrit DNA molekülünü hücre içine sokmak (Şekil 9-4),
3. Hücre içine sokulmuş yabancı DNA molekülünün hücredeki replikasyonunu ve içerdiği genlerin ekspresyonunu sağlamak,
4. Yabancı DNA molekülüyle yeni özelliklerin aktarıldığı hücreleri diğer hücrelerden ayırt edebilmek (Şekil 9-4).

Çeşitli enzimlerin yardımıyla DNA moleküllerini bir deney tüpünde birbirlerine eklemek için uygulanan başlıca iki yöntemden birinde halkasal nitelikteki bir DNA molekülü, örneğin bir plazmit, önce endonükleazların etkisi altında kırılarak doğrusal bir biçime çevrilir. DNA ipliklerinin 5' uçlarının özel bir ekzonükleazın etkisi altında yıkılması sonucu 3'-uçları serbest kalarak tek iplik şekline dönüşür. 3' uçlarına terminal transferaz enzimiyle belirli uzunlukta tek bir baz tipi içeren nükleotit zinciri (örneğin AAA) eklenir. Aynı şekilde ikinci, yabancı bir DNA molekülünün 3' uçlarına birinci molekülün 3' uçlarında bulunan bazlara komplementer (bu örnekte: TTT) nükleotitler eklenir. 3' uçları komplementer nitelikteki bu iki DNA molekülünün bir araya karıştırıldıklarında birleştikleri görülür. Aradaki boşlukların DNA polimeraz tarafından doldurulması ve uçların ligaz tarafından birleştirilmesi sonucu iki değişik DNA molekülünden oluşan hibrit bir DNA molekülü ortaya çıkar (Şekil 9-3). Böyle hibrit DNA molekülünün bakteri hücrelerine sokulması amacıyla söz konusu bakterilerin membran

geçirgenliği CaCl_2 tuzunun etkisiyle arttırılır. Bu sayede DNA gibi makromoleküllerin hücre içine sokulabilmeleri olası olur (Şekil 9-4). Normalde DNA molekülünün yabancı bir organizmada replikasyonu ve taşıdığı genetik bilginin ekspresyonu (RNA ve protein molekülüne çevrilmesi) olası değildir. Çünkü, organizmanın bir DNA'daki bilgiyi değerlendirebilmesi ancak DNA'nın bu organizmaya özgü işaretleri (özel baz dizileri) içermesi durumunda söz konusu olur. Yabancı bir DNA, hücreye özgü bir DNA molekülüne, örneğin bir plazmite, yukarıdaki yöntemler yoluyla eklendiğinde bu koşul yerine getirilir. Yabancı bir kalıtsal bilginin bir bakteri hücrelerine sokulup değerlendirilmesi sonucu böyle bir bakteri yeni özellikler kazanır. Bu hücrenin bölünerek çoğalması sonucu ortaya çıkan hücreler de aynı özellikleri taşırlar. (Belirli özelliklere sahip bir hücrenin çoğalmasıyla oluşan ve aynı özelliklere sahip hücre grubuna **klon** adı verilir). Normalde CaCl_2 tuzunun varlığına karşın hibrit bir DNA molekülünün bir bakteri hücrelerine girme olasılığı çok azdır. Tüm hücreler böyle bir DNA'nın aktarılma deneyinden sonra, yalnız aktarılan yeni özelliklere sahip hücrelerin yaşamasına imkan veren bir ortamda yetiştirildiğinde, seleksiyon sonucu yalnız bu yeni tip hücreler sağ kalıp çoğalacağından, gen aktarmanın başarı ile sonuçlanıp sonuçlanmadığını saptamak yine de olası olur. Örneğin tetrasikline karşı dirençliliğe (yani tetrasikline karşı bir R-faktörüne) sahip bir E.coli hücrelerine ayrıca kanamisin dirençliliği aktarılsın. Bunun için ilk aşamada kanamisine karşı dirençli hücrelerden elde edilen plazmit DNA'sı tetrasikline dirençli hücrelerden elde edilen plazmit ile birleştirilir.

Şekil 9-3. Rekombinant DNA molekülünün hazırlanması

Şekil 9-4. Ana hatlarıyla gen aktarma işlemi.

Hibrit plazmit tetrasikline dirençli E.coli hücrelerine sokulduktan sonra hücreler gerek tetrasiklin ve gerekse kanamisin içeren bir ortamda yetiştirilir. Böylelikle hibrit DNA'nın aktarıldığı, yani her iki antibiyotiğe de dirençli hücreleri yalnız tetrasikline dirençli olanlardan arımak ve bu tip hücreleri klon halinde elde etmek mümkün olur. İlk önce bir mikroorganizma türünün değişik tipleri arasında gerçekleştirilen bu gen aktarmaları son zamanlarda daha da geliştirilmiş ve ökaryotik DNA'yı da bakteri hücrelerine aktarmak mümkün olmuştur. Örneğin hemoglobin genini mikroorganizmalara aktararak ökaryotlara özgü bu proteini bakteri hücrelerinde oluşturmak gibi. Kalıtım mühendisliği ökaryotlara özgü proteinleri (örneğin hormonları) bakteri hücrelerinde çok miktarda oluşturmak olanağını vermektedir.

9.4. Gen mühendisliğinin uygulama alanları:

1. Kalıtım mühendisliğiyle bir yabancı gen ile donatılan bir bakteri hücresinin çoğalmasına koştur olarak yabancı genin de sayısal çoğalması olası olur. Dolayısıyla tıpkı bir hücre tipinin klonlanmasından esinlenerek, böyle bir genin sayısının (taşındığı hücrenin bölünmesine bağımlı olarak) artması da **Rekombinan DNA Teknolojisi**. Gen klonlanması yöntemleriyle bir genin kopyalarının bu şekilde çoğaltımı genin yapısının incelenmesi (örneğin gen haritalanması ya da baz dizi analizi) için yeterli miktarda maddenin eldesini mümkün kılar. (Klon: tek bir [ata] hücrenin çoğaltımı sonucu oluşan ve hepsi baştaki [ata] hücrenin özelliklerine sahip hücrelerin oluşturduğu grup ya da topluluk [popülasyon]).

2. Daha verimli, daha ekonomik sanayi bakteri suşlarının geliştirilmesi. Endüstriyel mikrobiyoloji günümüzde gittikçe önem

kazanan ve önümüzdeki yıllarda ülkelerin ekonomilerinde ve daha önemlisi sağlık konularında daha da ön plana geçecek bir sanayi dalıdır. Bakterilerin katılımıyla üretilen çeşitli ilaç hammaddeleri arasında; bütün antibiyotikleri, vitaminleri, tüberkülostatikleri, mantar infeksiyonlarında etkin maddeleri, bazı antiseptikleri saymak olasıdır. Bunun yanı sıra, havadaki N_2 'i alarak amino asitler üzerinden proteinlere dönüştüren bakteri tipleri, ileride açlıkla ve özellikle protein yetmezliğiyle savaşmada çok önemli bir rol oynayabileceklerdir. Bu tip sanayi bakterilerinde etkin maddelerin oluşumunda rol oynayan enzimleri şifreleyen genler negatif bir denetim altında olduklarında, enzimlerin ancak indüksiyon yoluyla (hücrel gereksinimlere bağımlı olarak) sentezlenmeleri mümkündür. Dolayısıyla böyle bir mekanizma -gerekli enzim moleküllerinin yeterli sayıda olmamaları- etkin maddenin oluşumunu sınırlayıcı faktör niteliğini kazanabilir. Bu tip enzimleri şifreleyen genlerin etkinliklerinin düzenlenmesini sağlayan özgün başlangıç (operatör) dizilerinin kalıtım mühendisliği yoluyla değiştirilmesi enzimlerin ("konstitütif" biçimde) sürekli oluşumunu ve etkin maddelerin sentezinde de verimliliğin artmasını sağlamaktadır. Başka bir yaklaşımda belirli bir etkin maddenin daha çabuk ve etkin olarak sentezini sağlayan ek enzim'leri şifreleyen gen(ler) yine kalıtım mühendisliği yoluyla çeşitli bakterilerin genomuna katılmıştır.

3. Bu yöneme en büyük önemi kazandıran bir özelliği hiç kuşkusuz insanda kalıtsal hastalıkların tedavisinde getirdiği yeni olanaklar oluşturmaktadır. İnsanda günümüze dek ikibine yakın kalıtsal hastalık bulunmuştur. Bütün bu hastalıklar, genlerdeki mutasyonlar

sonucu, gen ürünü olan proteinlerin eksik, bozuk ya da hiç yapılamamasından kaynaklanır.

Bu proteinlerin bazıları hücre dışına salgılanarak (protein hormonları örneğinde olduğu gibi) etkilerini hedef hücrelerin yüzey reseptörleriyle etkileşerek gösterir. Diğer bazıları ise, (koagülasyon faktörleri örneğinde olduğu gibi) kanda ya da hücreler arası sıvıda etkindir. Bu tip hücre dışı bölümlerde etkinlik gösteren proteinlerin eksikliklerine dayanan hastalıkları bu proteinleri başka kaynaklardan sağlayarak hastalara vermekle tedavi edilebilir. Yalnız bunun için kaynak sorununun çözülmesi gerekir. Şekerli diyabet olgularında hastaların insülin gereksinimi yıllarca -insülinin etkisi için tür özgünlüğü göstermediği için- sığır ya da domuz pankreasından elde edilen insülinle karşılanmıştır. Bununla birlikte uzun süre -ağır olgularda insülin yaşam boyu verilir- bu hastalarda türe özgü olmayan insüline karşı oluşan antikorlar nedeniyle tedavinin etkinliğini yitirdiği görülür. Kalıtım mühendisliği yoluyla insan insülin genini bakteri plazmitlerine takarak insan insülinini bakteride üretmek günümüzde olanak içine girmiştir. İnsana özgü bir genin plazmite takılarak insülin sentezinin bakteride gerçekleştirilmesinde çeşitli tekniklerin ustalıkla uygulanması gerekmiştir. Önce insülinin organizmada (yaklaşık 84 amino asit içeren) bir öncü protein molekülü olarak sentezlendiğinin vurgulanması gerekir. Sentezlenen proinsülin molekülünün sentez ötesi mekanizmalarla kırılması sonucu ortaya biyolojik açıdan etkin insülin çıkar.

Etkin insülini şekilde görüldüğü gibi proinsülinin orta bölgesinden yaklaşık 30 amino asitlik bir polipeptidin kopmasıyla ortaya çıkan iki polipeptid zinciri oluşturur. Etkin molekülde bu zincirler iki -S-S-

köprüsüyle birleşmiştir. Bu zincirlerin oldukça kısa olması (uzun zincir 30, diğeri 21 amino asit içerir) nedeniyle kalıtsal sözlüğe bakarak bu zincirleri şifreleyerek polideoksiribonükleotit dizilerini kimyasal yollarla sentezlenebilmiştir. Oluşturulan bu DNA zincirleri ayrı ayrı yukarıda anlatılan yöntemlerle lac-operonunun içinde β -galaktosidaz düzenlenmesi) takılmıştır. (Normalde bu dizilerin -başlarında bakteriye özgü promoter bölgelerine sahip olmamaları nedeniyle transkripsiyonu söz konusu olamayacaktı). Böylelikle insüline özgü bu dizilerin bakteri hücrelerinde β -galaktosidaz enziminin bir parçası gibi sentezi sağlanmıştır. (Şekil 9-5). Daha sonra Şekil 9-6'de görüldüğü gibi bakteri hücrelerinden oluşan hibrit polipeptit zinciri protein kimyasında çok sık uygulanan bir yöntemle metyoninin bulunduğu bölgelerden kırılmıştır (Sentetik olarak insülin dizisinin başına ve sonuna metyonini şifreleyen ek sözcükler takıldığı için insüline özgü polipeptid zinciri tümüyle açığa çıkmıştır. İnsülinin birincil yapısında metyoninin bulunmaması bu girişimin başarısını belirleyen başlıca bir faktör olmuştur. Her biri ayrı ayrı sentezlenen iki zincirin saflaştırılarak birleştirilmesiyle de normal insan insülinini elde etmek olanaklı olmuştur. Halen benzer yöntemler insan büyüme hormonu ve insan interferonlarının üretimi için de uygulanmaktadır.

9.5. Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (PCR)

Bir DNA parçasının baz dizisi korunarak büyük miktarda çoğaltmak amacıyla kullanılan bir tekniktir. Pek çok alanda yaygın kullanım yeri bulmuştur (Şekil 9-7).

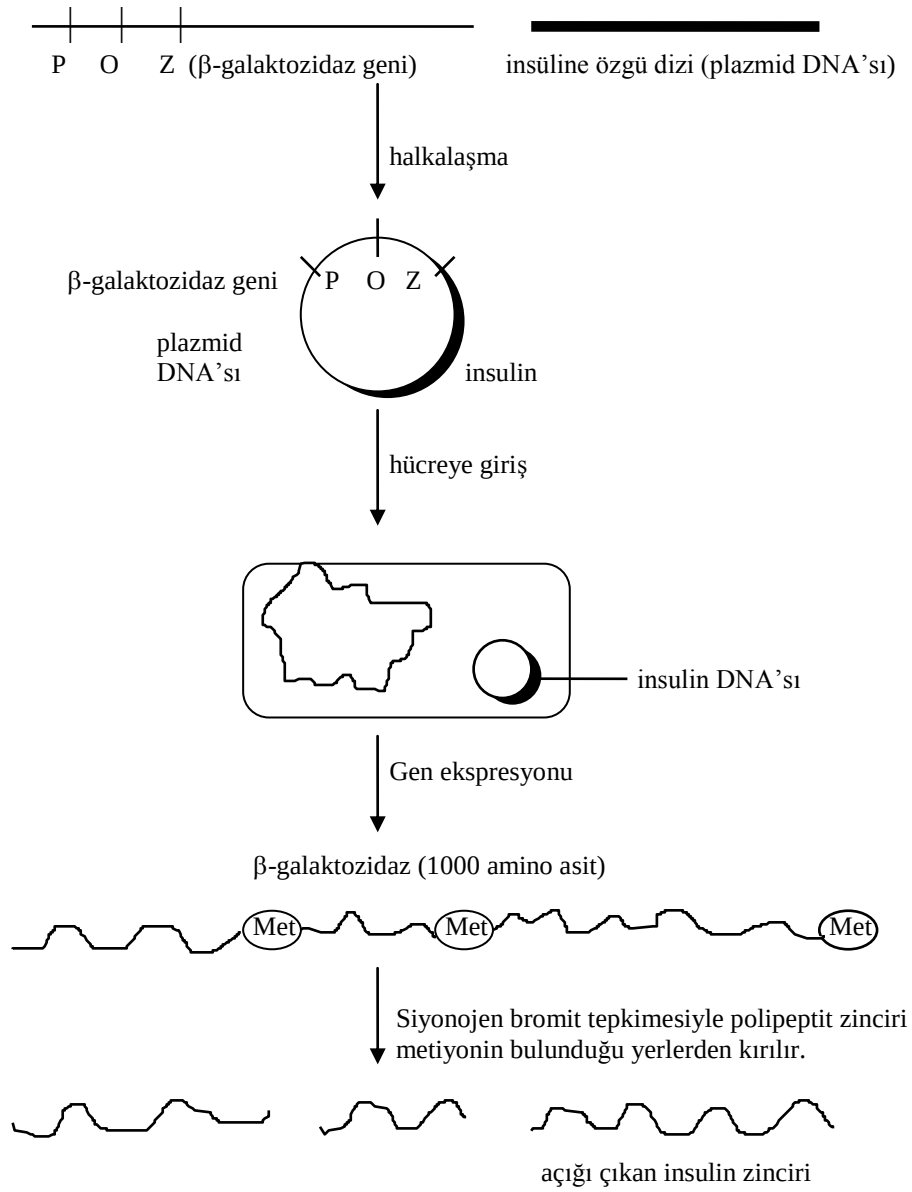
Bu yöntemde DNA zincirlerinin saflaştırılması gerekmez. Çünkü sadece primerin bağlandığı DNA parçası 5' ucuna okunup yenisi sentezlenir. Tek koşul, amplifiye edilmek istenen DNA parçasının önündeki dizinin bilinip komplementlerinin (oligonükleotid) yaptırılması.

Alternatif: - Genomdaki bazı tekrarlanan diziler örn.ALU segmentleri
Achoered PCR (Revers Tase)

9.6. DNA Dizi Analizi (Sanger Yöntemi):

M13 fajı 6704 nükleotid boyunda, halkasal ve tek iplikli DNA içerir. Çevresindeki kapsit sadece 3 genin ürünü olan 3 proteinin çoklu kopyalarından oluşur. E. coli'yi infekte ederken, iki hücreyi eşeysel konjugasyon sırasında birleştiren piluslardan DNA'sını içeri sokar. Bu (+) ipliği hücrede kalıp olarak davranır ve (-) ipliği sentezleterek çift iplikçikli DNA ara formunu oluştururken hücre DNA'sına katılması gerekmez.

Dizisi belirlenmek istenen DNA EcoRI endonükleazı ile kesilir ve M13 fajına aktarılır (Şekil 9-8). M13 fajındaki kesim bölgesinin hemen önündeki diziye komplementer bir primer seçilerek aktarım sonrası Sanger yöntemiyle dizi belirlenir (Şekil 9-9). Dizisi belirlenen parçanın sıralamasının bilinmesi için ise aynı genetik materyelin başka bir restriksiyon endonükleazı ile kesilerek dizisinin çıkarılması ve üstüste binen bölgelerin karşılaştırılması gerekir.



Şekil 9-5. İnsülin eldesi

Şekil 9-6. Proinsulinden kırılma sonucu etkin insülin oluşması.

9.7. Kalıtsal hastalıkların doğum öncesi (prenatal) tanısı

Kalıtsal hastalıklar; hastanın, bozukluğun fiziksel ve ruhsal baskısını yaşamı boyunca taşımasına, çevresine ve topluma genellikle yaşam boyu külfet olmasına neden olan hastalıklardır. Ağır homozigot olgular, erken yaşta ölüme neden olabilir. Hafif, sessiz olgularda ise, hastanın erişkin yaşa erişerek çocuk sahibi olması mutant genlerin sonraki kuşaklara geçmesiyle sonuçlanabilir. Sağaltımı günümüzde daha mümkün olamadığından, bir toplum sağlığı sorunu oluşturan bu tip hastalıkları önleme yoluyla denetim altına almak çabaları son yıllarda ağırlık kazanmıştır. Aile planlaması bir yana, bu yöndeki çalışmalar ön planda doğum öncesi tanıda yoğunlaşmıştır. Bu amaçla hamileliğin 14 - 15. haftasında amniyosentez yöntemiyle yaklaşık 25 ml amniyon sıvısı alınır (İşlem sırasında zarar vermemek için önceden fetusun konumunun

Şekil 9-7. Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (PCR)

Şekil 9-8. Dizisi çıkarılacak DNA'nın M13'e sokulması

Şekil 9-9. Sanger'in DNA dizi analiz yöntemi

örneğin sonogram [ultrason] yoluyla saptanması gereklidir) (Şekil 9-10).

Alınan sıvı içinde bulunan fetusa özgü canlı fibroblastların kültürde yetiştirilmesi ve kromozomlarının (karyogramda) incelenmesi sonucu 40 yaşının üstündeki annelerde olasılığı çok artan trizomi 21 (Down sendromu ya da mongolismus) gibi kromozom anormalliklerinin zamanında tanınarak aborsiyon yoluna gidilmesi mümkün olabilmektedir. Bunun yanı sıra gene bu hücrelerdeki kromozom incelemeleriyle (ya da Barr cisimciğinin varlığının araştırılmasıyla, a) fetusun cinsiyetinin saptanması, hemofili ya da ilerleyici (progresif) kas distrofisi (Duchenne) gibi, X-kromozomuna bağlı olarak iletilen ve taşıyıcı annenin erkek çocuğunda yaklaşık % 50 olasılıkla ortaya çıkan, kalıtsal hastalıkların da erken tanısını olası kılar.

Amniyon sıvısındaki biyokimyasal incelemeler ile kalıtsal hastalıklara dayanan çeşitli özütürümsel (metabolik) bozukluklar saptanabilir. Bu yöntem; sıklık dereceleri yüksek olmayan bu hastalıkların yanı sıra orak hücre anemisi ve talasemi gibi (Türkiye'nin de belirli yörelerinde) çok sık görülen bazı kalıtsal kan hastalıklarıyla savaşında büyük bir önem kazanmaya adaydır. Yalnız bu hastalıkların tanısında hemoglobin bozukluğunun saptanması için fetus kanının eldesi gereklidir. Günümüzde bu amaçla geliştirilmiş olan **“fetoskop”** cihazı iğneyle amniyon kesesine girildikten sonra plasentanın yüzeyinin gözlenmesini sağlayan optik bir aygıtla donatılmıştır. Böylelikle plasentanın yüzeyindeki fetal arterlerden ponksiyonla hematolojik incelemeleri olanaklı kılacak miktarda kan alınabilir. Bununla birlikte bu son yöntem (fetoskopi) büyük beceri ve deneyim gerektirir ve usulüne uygun olarak uygulandığı zaman bile yüksek oranda (% 10) fetusun

ölümüne yol açabilir. Genlerin haritalanmasını ya da DNA’da baz dizilerinin saptanmasını olanaklı kılan yöntemlerin yardımıyla ise doğrudan fetus fibroblastlarının DNA’sında mutan genlerin varlığı saptanabilmektedir. Böylelikle talasemide ve orak hücresi anemisinde de doğum öncesi tanı normal (fetusun ölümüne yol açma tehlikesi çok daha az olan[%1]) amniyosentez yoluyla olanaklı olmaktadır.

Chorion biopsisi - amniyosentez ile tanı konabilen hastalıklar:

- I) Büyük kromozom anomalileri (sayı ya da yapı kusurları): Down sendromu (Trisomi 21). Özellikle anne yaşı ile orantılı olarak artar.
- II) AFP (alfafetoprotein) düzeyinin ölçülmesi ile tanınan malformasyonlar: Nöral tüp defektleri, anensefali, spina bifida vb. Bu hastalıklarda AFP düzeyi artar.

Şekil 9-10. Chorion biopsisi - amniyosentez uygulanması

III) Cinsiyete bağlı bozukluklar: X kromozomu ile taşındığı için erkeklerde daha sık görülür. Hemofili vb. Barr cisimciğine bakılarak fetusun cisiyeti de saptanır.

IV) Biyokimyasal kusurlar. Genellikle bir enzim eksikliğinden kaynaklanırlar. DNA analizi ile tanınabilirler.

9.8. Doğum öncesi tanı yöntemleri

İnsan genomundaki total baz sayısı yaklaşık 3.10^9 bp (baz çifti) düzeyindedir. Gen sayısının ise 50.000 olduğu düşünülmektedir. Bunlardan yaklaşık 3500 gen şecere (pedigree) analizi ile saptanmıştır. 600 genin özgül kromozomlardaki yerleşimleri başarılmıştır.

Klasik kromozom bandlama yöntemi ile: kromozom başına 15-20 band görüldüğünü varsayarsak; yaklaşık bir hesapla,

$$\frac{3.10^9 \text{ baz çifti}}{46 \text{ kromozom}} = 6.10^7 \text{ baz çifti/kromozom bulunur.}$$

Her kromozomda 15 band görülebiliyorsa;

$$\frac{6.10^7}{15} = 4.10^6 \text{ baz çifti/tek bir band (yani bir tek band 4 milyon baz çiftine karşılık geliyor)}$$

bu da çok kaba bir tahminle her bir gen için 10000 bp olduğunu varsayarsak, $4.10^6 \text{ bp} = 400$ gen sonucu elde edilir ki, 1 kromozom bandı aslında 300 geni temsil ediyor demektir. Halbuki rekombinant DNA yöntemleri kullanılarak tek tek genleri hatta tek bazların yerleşimlerini dahi izlemek olanaklıdır. (Genetik Haritalama için bak. Şekil 9-11)

Kalıtsal hastalıkların doğum öncesi tanısının yapılabilmesi için gerekli olan fetüsün hücreleri: fetoskopi (kordon kanında örnekleme), Amniyosentez (karından girerek amniyon sıvısının 1/10'unun alınması) ve chorion biopsisi (chorion villusların kürete edilmesi) yöntemlerinden birisi (duruma uygun olan) kullanılarak elde edilir.

Kalıtsal hastalıkların çoğu tek gen kusurlarından kaynaklanır ve kesin tedavileri (günümüz tekniği ile) olası değildir. Bunların büyük çoğunluğu çok nadir hastalıklar olmakla birlikte, bazıları bölgesel olarak artma gösterebilirler. Örneğin Talassemiler Akdeniz çevresinde nüfusun % 20'sini etkilemektedir. Tay-Sachs Hastalığı Eskinazilerde (Polonyalı yahudilerde) % 4'tür.

Kalıtsal hastalıklar tıbbın çok geliştiği günümüzde artmaya başlamıştır. Zira hasta kişiler çocuk sahibi olabilecek uzunlukta yaşayabilmektedirler. Bu durumda yapılması gereken fetusun DNA'sında yaşamla bağdaşamayacak bir kusur olup olmadığının en erken devrede araştırılmasıdır. 3 milyon gen içinde kaybolmuş bir tek baz kusuru nasıl tanınabilir:

Gen kusurlarının lokalizasyonu; Aranan genin dizisinin bilinip bilinmemesine göre farklılıklar gösterir. Buna göre;

1) Aranan genin dizisi biliniyorsa,

a) Tam mutasyon noktasının tanınması:

İyi bir şans yardımıyla tam mutasyon noktasını tanıyan restriksiyon enzimi bulunursa kullanılır.

Şekil 9-11. Genetik haritalama

Bu yöntem tanının doğruluk derecesini artırır ve uygulama kolaylığı sağlar. Örnek olarak HbS (orak hücre anemisi)nin MstII restriksiyon enzimi kullanılarak tanınması (Şekil 9-12, 9-13).

Dizisi bilinen genin kusur bölgesinin 19 nükleotitlik sentetik komplementeri temin edilir (arzu edilen dizi DNA sentezleyen bir kuruluşa ısmarlanabilir). Farklı kusurlar için farklı oligonükleotidler sentezleneceğinden, her aile için o aileye özgü kusuru tanıyacak bir oligonükleotit sağlanmalıdır (Şekil 9-14, 9-15).

2) Aranacak gen hakkında çok az ya da hiçbir bilgi yoksa, Gen

b) Sentetik oligonükleotidler yardımıyla mutasyon bölgesinin kütüphaneleri yardımıyla RFLP (Restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizmi) yöntemi.

Kusurlu gen yakınında sadece kusurlu kişilerde belirli bir restriksiyon enzimi için yeni bir kesim yeri oluşması ya da mevcut kesim yerinin ortadan kalkması sonucu oluşan DNA parçalarının normalden farklı boylarda olmasından yararlanan bir yöntemdir. Diğer bir deyişle, restriksiyon kesim yeri (herhangi bir mutasyon sonucu kaybolan ya da yeni oluşan) kusurlu gen için bir marker (işaret) olarak kullanılır (Şekil 9-16 ve Şekil 9-17). Kusurlu gen, işarete ne kadar yakınsa, nesilde nesile aktarılırken rekombinasyon sırasında beraber kalıtılma olasılığı da o kadar fazla olur. Genetik rekombinasyon (çaprazlama) mayoz sırasında oluşur ve her mayozda yaklaşık 10^8 bp için 1 çaprazlama meydana gelir. Örneğin kusurlu gen ile marker bölge arası 5000 bp ise, bunların rekombinasyon olasılığı ($10^8/5.10^3 = 20000$) 20000'de 1 (yani 20000 mayozda 1 kere kusur ile işaret ayrı düşebilir) dir ki, bu da çok az bir

olasılıktır. O halde, RFLP oldukça doğru bir yaklaşım olarak kullanılabilir.

Şekil 9-12. Hemogloblin β -altbirim mutasyonlarının tanınması

Şekil 9-13. Faktör VIII mutasyonlarının tanınması.

Şekil 9-14. Mutasyonların saptanmasında genin PCR yöntemi ile çoğaltılıp dizi analizi yapılması

HUGO Projesi:

İnsan DNA'sını oluşturan yaklaşık 3 milyar bazı tek tek okumak ve kataloglamak amacıyla 1988 yılında James D. Watson önderliğinde bir proje başlatıldı. Bu projeye HUGO (HUMAN GENOM ORGANISATION) adı verildi. Çok merkezli sürdürülen bu proje DNA dizi okuma teknolojisinin gelişmesini hızlandırdı. Projenin 2005 yılında bitirilmesi öngörülüyor. Proje bitirildiğinde elde edilecek bilgiler bütün insanlığı etkileyebilecektir.

Şekil 9-15. Sentetik oligonökleotidler yardımıyla mutasyon bölgesinin tanınması

Şekil 9-16. RFLP yaklaşımının temeli

Şekil 9-17. RFLP ile orak hücre anemisi tanısının konması

9.9. İnsan Gen Tedavisi

İlk Kuşak Gen Tedavisi:

Hastanın somatik (üremede görevli olmayan) hücrelerindeki düzeltme ve onarımlar kalıtılmaz, oysa üreme hücrelerindeki değişiklikler daha sonraki kuşaklara aktarılır.

Yakın gelecekte değiştirilecek gen “her an açık” tipte olmalıdır. yani bir başka genin kontrolunda olmamalıdır. Hormonlar (insülin vb.) ve globin genleri ($\alpha/\beta \sim 1$) için gen terapisi birden çok genin katılımını gerektirdiğinden yakın gelecekte gerçekleşme olasılığı azdır.

Gen Tedavisi İçin Aday Hastalıklar:

Faktör VIII Eksikliği (Hemofili): Faktör VIII eksikliği pıhtılaşma bozukluğuna yol açmaktadır. Ancak sürekli ekspresyona bağlı yüksek düzeyin sorun yaratmayacağı düşünülmektedir.

HPRT (Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz) Eksikliği (Lesch-Nyhan Sendromu): Bu enzim purin sentez yolağında görev alır ve eksikliği dokularda ürik asit birikmesine neden olur. Bunun sonucu olarak hiperürisemi, mental retardasyon, spastisite görülür. Bugün için sağaltımı olanaklı değildir.

PNP (Purin Nükleosid Fosforilaz) Eksikliği: Bu hastalıkta purin metabolizması bozulur, ürik asit oluşumu azalır, dGTP birikir ve T lenfositlerini toksik etki yaparak, bağışık yetmezlik oluşturur.

ADA (Adenozin DesAminaz) Eksikliği: dATP artışına bağlı olarak T ve B lenfositlerinde işlev bozukluğu görülür. Bağışık yetmezlik ortaya çıkar.

Fenil ketonüri: Fenilalanin hidroksilaz (PH) eksikliği sonucunda fenilalanin ve diğer metabolitler kanda ve dokularda birikir. Sinir dokusuna toksik etkileri nedeniyle mental retardasyonu yol açarlar.

Halen gen transferinde kullanılabilen yegane insan dokuları deri ve kemik iliği hücreleridir. Diğer hücrelerin kültürde yaşatılıp organizmaya geri verilmeleri henüz olanaklı değildir.

İdeali: Gen organizmaya injekte edilmeli (İV) doku ya da hücreye özgü olmalı (seks hücrelerine gitmemeli) 23 çift kromozomda ~ 60.000 fonksiyonel gen içeren genomda tek bir baz hatası olmadan doğru yere yerleşmelidir.

İkinci Kuşak Gen Tedavisinde Olası Yaklaşımlar:

1) *Hedefe Gen Yerleştirilmesi ve Tripleks DNA:* Bu amaçla geliştirilen bir teknikte, genin yerleştirilmek istendiği bölgenin baz dizisine uygun bir vektör hazırlanır. Şekil 9-18'de hedef genin iki ekzon'dan oluştuğu görülmektedir. Hazırlanan vektörde 2. ekzonun içine neomisin direnç geni (*neo^r*), vektörün ucuna da timidin kinaz (*tk*) geni yerleştirilir. Vektör fare embryo hücrelerine sokularak homolog rekombinasyonla yerine yerleşmesi beklenir. Doğru bölgedeki rekombinasyon sırasında *tk* geni çıkarılmalıdır. Sonra neomisin ve gansiklovir içeren ortamda vektörü alan hücreler seçilir. Vektörü alan hücreler neomisine dirençli olacaktır, vektör doğru yere yerleşmiş ise alan hücreler, çıkarılan *tk* geni nedeniyle gansiklovire de dirençli olurlar.

Şekil 9-18. Hedefe gen yerleştirilmesi.

Beyin tümörlerinde gen tedavisi: Beyin tümörlü hastaların tümör hücrelerine retrovirustan oluşturulmuş bir vektör yardımıyla timidin kinaz (*tk*) geni aktarılır. Sonra gansiklovir ile sanki bir viral infeksiyonmuş gibi tedavisi sağlanır. Gansiklovir timidin kinaz enzimi ile fosforillenerek DNA sentezinin güçlü bir inhibitörüne dönüştüğü için yalnız *tk* geni almış hücreleri etkiler (Şekil 9-19). Bu yöntemle ikisi metastatik 8 hasta tedavi edilmiştir.

Şekil 9-19. Beyin tümörlerinde gen tedavisi.

Bu yöntem tümör hücreleri kadar olmasa da normal hücrelerin de çoğalmasından dolayı yaygın kullanılamamaktadır. Ancak aşırı çoğalan hücrelerin bulunduğu bölgenin tecrit edilebilmesi durumunda uygulanabilir. İyi bir örnek restenozise karşı domuzlarda uygulanmış ve %50-90 başarı sağlamıştır. Bu yöntemle angioplastiden sonra çift balonlu ve şönlü özel bir katater ile adenovirusa benzer bir virusa takılmış *tk* ortama verilmesinden sonra yukarıda anlatıldığı gibi gansiklovir ile aşırı çoğalan düz kas hücreleri yok edilir (Şekil 9-20).

Şekil 9-20. Özel katater yardımıyla artere gen tedavisi

Diğer yaklaşımlar arasında çıplak DNA aşısı, insansılaştırılmış ya da mini antikorlar, anti sense RNA ve tripleks DNA tedavisi sayılabilir. Bunlar sihirli mermiler olarak da adlandırılmaktadırlar.

Tripleks DNA Tedavisi, pürin bazlarının büyüklüklerinden dolayı iki pirimidin bazıyla aynı anda hidrojen bağı kurabilmeleri temeline dayanır. DNA'da transkribe edilmesi istenmeyen (örneğin viral DNA) bölümüne komplementer, A = T baz çifti için timin, G $\equiv$ C baz çifti için sitozin bazları kullanılarak kısa bir DNA parçası sentezlenir. Baz tripletlerinin oluşmasıyla iplikçiklerin birbirinden ayrılması ve dolayısıyla transkripsiyon engellenir. (Şekil 9-21)

2) *Çıplak DNA Aşısı* uygulamasında mikroorganizma DNA'sı doğrudan ilgili hücrelere sokularak bu DNA ürünleri immün sisteme tanıtılır (Şekil 9-22).

3) *Antisense (zıt anlamlı) RNA tedavisi* 1980'lerde küçük nükleer RNA'ların (snRNA) gen ekspresyonunu düzenlediğinin gözlenmesi ile başlamıştır. Hücreye zararlı protein üreten mRNA'yı ya da onun geninin okunmasını engellemek üzere hücresel enzimlerle sindirilemeyecek (fosfodiester bağlarında $-S^-$, $-CH_3$ ile değiştirilmiş) ufak komplementer RNA ya da DNA parçalarının hücreye verilmesinden ibarettir. (Şekil 9-23)

Şekil 9-21. Tripleks DNA tedavisi

Şekil 9-22. Çıplak DNA Aşısı

Şekil 9-23: Antisense RNA tedavisi

4) *Monoklonal antikor* üretim teknikleri geliştirildikten sonra bu antikorların tedavide kullanımları düşünülmüştür. Ancak fare kaynaklı antikorlar bağışık tepkimelere neden oldukları için, antijeni tanıyan aşırı değişken (“hipervariable”) bölgeler ya tek başlarına ya da insan antikorlarının kristalleşebilen bölgeleri (“Fc”) ile değiştirilerek kullanılır.

İkinci Kuşak Gen Tedavisinin Yakın Bir Gelecekteki Hedefleri:

Ailesel Hiperkolesterolemi hastalığında karaciğer hücrelerinde LDL reseptörleri eksiktir. Retroviruslara takılan LDL reseptör geniyle karaciğer hücrelerinin infeksiyonu sonucunda 10^{-3} - 10^{-4} hücrede LDL reseptörü ekspresyonu gözlenmiştir.

Deri kanserinde immun sistemi uyarmak amacıyla ürünü antijenik olan bir gen üzerinde çalışılmaktadır.

Meme ve yumurtalık kanserlerinde kemik iliğı hücrelerinin yüksek doz kemoterapiyi tolere edebilmelerini sağlamak amacıyla MDR geni üzerinde çalışılmaktadır.

AIDS'te antisense RNA'lar ile CD4 lenfositlerdeki viral replikasyonu engellemek amaçlanmaktadır.

Beyin kanserinde yukarıda değinilen tk geni ile ilişkili tedaviler gündemdedir.

10. Hücreden yüksek canlılara geçiş

Bir bakteri hücresinin sahip olduğu işlevler yaşamı ve çoğalması için en gerekli olanlarla kısıtlıdır. İşlev zenginliği ise değişik görevleri üstlenmiş farklı hücre topluluklarının varlığı ve işbirliğiyle sağlanabilir. Böyle hücre toplulukları (dokular), üstlenmiş oldukları değişik görev ve işlevlere bağlı olarak değişik yapı ve morfolojik görüntüye sahip olan, farklılaşmış hücreler içerir. Hücre topluluklarının örgütlenmesiyle ortaya çıkan canlılar **yüksek (çok hücreli) canlılar** olarak adlandırılır.

Yüksek canlıları oluşturan hücrelerin bir özelliğini, kendine özgü bir membranla hücrenin diğer bölümlerinden ayrılmış, bir çekirdeğin varlığı belirler. Bu tip hücreler **çekirdekli (ökaryotik) hücreler**, yüksek canlılar ise **ökaryotik canlılar** olarak adlandırılarak, çekirdeksiz (prokaryotik) hücrelerden oluşan (mikro)organizmalardan ayrılır. Çok hücreli canlıları genelde ökaryotik olarak tanımlamak mümkün olmakla birlikte, her ökaryotik canlı farklılaşmış hücrelerden oluşan bir yüksek canlı niteliğinde değildir. Örneğin ökaryot kapsamına maya, protozoa gibi tek hücreliler de girer. Tablo 10-1’de prokaryotik ve ökaryotik organizmaların karşılaştırmalı olarak başlıca özellikleri özetlenmektedir.

10.1. Çekirdekli (ökaryot) hücre ve genomu

Ökaryot hücrenin başlıca özelliğini büyüklüğü belirler. Bakteri hücresinin çapı 1-2 μ arasında değişirken, ökaryot hücrenin çapı 100 μ m’ye (genelde 20-50 μ m) ulaşabilmektedir. Cisimlerin yüzeyleri çaplarının karesi, hacimleri ise çaplarının kübü ile orantılı olduğuna göre, çapının büyümesiyle ökaryot hücrenin yüzey/hacim oranının küçülmesi gerekir. Ancak, hücrelerin çevreleriyle etkileşimleri açısından büyük önem

Prokaryotik Canlı

- tek hücreli
- çekirdeksiz hücre
- yaşam için gerekli işlevler tek hücre içine sığdırılmış
- “ölümsüz” nitelikte
- eşemsel olmayan çoğalma
- haploit

Yüksek Canlı

- çok hücreli (10^{10} - 10^{15})
- çekirdekli (“ökaryotik”) hücreler
- hücre farklılaşmış ve
- “ölümlü”
- eşemsel çoğalma
- diploit

Ökaryot Hücrenin Bazı Özellikleri

- çekirdeğe sahip
- büyük (20-50 μm ϕ)
- gelişmiş hücre içi membran sistemleri (ER, mitokondri, lizozom, peroksizom, vb.)
- büyük ve karmaşık içerikli DNA (yinelene diziler)
- kromatin yapısı-çekirdek içi proteinlerle kompleksleşmiş DNA
- genler intron içerikli $\rightarrow$ hnRNA - “splicing”- kırpılmış $\rightarrow$ mRNA

Tablo10-1. Ökaryot ve prokaryotların özellikleri.

taşıyan bu oran ökaryot hücrelerde gelişmiş ve toplam yüzeyin yaklaşık % 98'ini kapsayan hücre içi membran sistemlerinin varlığıyla güvenceye alınmıştır (Şekil 10-1, Tablo 10-2). Hücre içi membran sistemlerinin işlevi salt madde değişimi ile sınırlı değildir. Bu sistemler aynı zamanda hücrenin farklı görevler üstlenmiş bölmelerini (organelleri) çevreler ve salgılanan proteinlerin ve lipidlerin sentezi ile glikosillenme gibi reaksiyonların gerçekleştiği endoplazmik retikulumu da (ER) kapsar.

Ökaryot hücrelere adını veren çekirdek, bu hücrelerin içerdiği en çarpıcı organeli oluşturur. Çekirdek, türe göre, E.coli genomunun 5 (maya) ile 10000 (fasulye) katı arasında değişen bir büyüklüğe sahip ökaryot genomunu içerir (Tablo 10-3).

Çeşidi	%
Hücre Membranı	2
Endoplazmik Retikulum	51
Pürtlü	35
Pürtüksüz	16
Golgi Aygıtı	7
Mitokondri Membranı	39
Çekirdek Membranı	0,2
Lizozom Membranı	0,4
Peroksizom Membranı	0,4

Tablo 10-2. Ökaryot hücre membran sistemleri.

Tür	Genom büyüklüğü (bç)
Bakteri	10^6 - 10^7
Maya	10^7 - 10^8
Bitki	10^8 - 10^{11}
Böcek	10^8 - 10^{10}
Yumuşakçalar	$\sim 10^9$
Köpek balıkları	3×10^9
Kemikli Balıklar	3×10^8 - 3×10^9
İki yaşayışlılar (amfibi)	5×10^8 - 10^{11}
Sürüngen	$\sim 2 \times 10^9$
Kuş	$\sim 10^9$
Memeliler (insan)	$\sim 3 \times 10^9$

(bç= baz çifti)

Tablo 10-3. Değişik türlerin genom büyüklükleri.

Ökaryot genomunun 5 μ m çapındaki çekirdeğin içine sığdırılması ancak DNA molekülünün kendi içine katlanarak paketlenmesiyle gerçekleşir. Söz konusu katlanma DNA molekülünün çekirdekiçi proteinlerle kompleksleşerek oluşturduğu kromatin yapısı sayesinde mümkün olur. Buna göre, ökaryot DNA'sı, prokaryot DNA'sının aksine, çekirdek içinde ve proteinlerle birleşik olarak bulunur.

DNA ile etkileşen çekirdekiçi proteinler, histonlar ve histon olmayan proteinler (“non-histon” proteinler) olarak iki ana sınıfta toplanır. Histon sınıfı beş çeşit (H1, H2A, H2B, H3 ve H4) bazik nitelikli ve molekül ağırlıkları 10000 ile 25000 dalton arasında değişen proteini kapsar (Tablo 10-4).

Şekil 10-1. Hücre hacim/yüzey oranları.

$$\begin{aligned} e_1 &= 1 \mu\text{m} & \text{yüzey}_1 &= 6 \mu\text{m}^2 & \text{hacim}_1 &= 1 \mu\text{m}^3 \\ e_2 &= 10 \mu\text{m} & \text{yüzey}_2 &= 600 \mu\text{m}^2 & \text{hacim}_2 &= 1000 \mu\text{m}^3 \\ O_1 &= \text{yüzey}_1 / \text{hacim}_1 = 6 \mu\text{m}^{-1} \\ O_2 &= \text{yüzey}_2 / \text{hacim}_2 = 0,6 \mu\text{m}^{-1} \\ O_1 / O_2 &= 10 \end{aligned}$$

Histonların birincil yapıları evrim boyunca büyük ölçüde korunmuştur, örneğin fasulye ve sığır H4 histonlarının içerdiği toplam 102 amino asidin yalnızca ikisi farklıdır. Genelde, birincil yapıları bu denli

Histon	Molekül ağırlığı (dalton)
H1 (lizin bakımından zengin)	21000
H2A (lizin ve arginin bakımından zengin)	14000
H2B (lizin bakımından oldukça zengin)	13000
H3 (arginin bakımından zengin)	15300
H4 (glisin ve arginin bakımından zengin)	11300

Tablo 10-4. Histonların çeşit ve özellikleri.

korunmuş proteinler herhangi bir yapısal değişikliği kaldıramayacak ölçüde yaşamsal işlevler üstlenmiştir. Histonlar, hücrede büyük miktarlarda (herbir çeşidinden 5×10^7 - 10^8 kopya) bulunur. Bu olgu histonların öncelikle kromatinin üstyapısının oluşumunda rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Gerçekten yaklaşık 3 m uzunluğundaki insan DNA'sının 5-10 μ çapındaki çekirdek içine sığdırılması ancak histonların aracılığıyla olanaklıdır.

Nükleozom, histonların DNA ile oluşturduğu en küçük yapı birimine karşılık gelir. Bu yapı ikişer H2A, H2B, H3 ve H4 molekülünün birleşmesiyle oluşan bir çekirdek yapı ile bunun çevresinde (2 kez) sarılı DNA'dan oluşur (Şekil 10-2). Nükleozomlar ile aralarında kalan ("spacer") DNA elektronmikroskopunda iplik üzerinde boncuklar görünümü verir (Şekil 10-3). Nükleozom yapısı 2 nm çapındaki DNA

Şekil 10-2. Nükleozom yapısı. Sekiz histon molekülünden oluşan (oktamer) çekirdek yapı ve DNA ile birleşme sonucu ortaya çıkan “iplik üzerinde boncuklar” düzeni.

molekülünün 11 nm’lik bir kalınlığa ulaşmasını, buna koşut olarak DNA uzunluğunun ~5 cm’den ~ 1 cm’ye inmesini sağlar. Belirli sayıda (5-10) nükleozomun, aralarında köprüler oluşturan H1 molekül-leri aracılığıyla, bitişik sıralar, bu sıraların da aralarında paralel dizilerek çiftler (“solenoid” yapı düzeni) oluşturmaları ile kromatin kalınlığı 30 nm’ye ulaşır (Şekil 10-4).

Şekil 10-3. Kromatinin ana yapı düzenlerinin elektron mikroskobu görüntüleri. a) “paketlenmiş nükleozom” (“solenoid”) (30 nm) yapısı; b) “iplik üzerinde boncuklar” düzeni.

Şekil 10-4. “İplik üzerinde boncuklar” (11 nm) düzeninden “paketlenmiş nükleozomlar” (30 nm) düzenine (“solenoid” yapı düzenine) geçişe ilişkin modeller.

Ortaya çıkan bu yapının ilmikler oluşturacak biçimde kıvrılmasıyla kromatin daha kalınlaşır (300 nm çaplı yapı). İlmiksi bölgeler önemli kalıtsal birimler oluşturur. Her ilmiğin bir geni ya da yakın işlevlere sahip ve ortak düzenlenme mekanizmalarına bağlı gen kümelerini barındırması olasıdır. İlmiksi yapı düzeninin yer yer daha da kıvrılmasıyla çapı 700 nm’ye ulaşan yoğun kromatin bölgeleri meydana gelir (Şekil 10-5). Bu süreç sonunda, interfaz süresinde çekirdek içinde yer aldığı şekliyle kromatin yapısı ortaya çıkar. Hücre bölünmesi sırasında kromatinin yeniden katlanmasıyla metafaz kromozomları oluşur. Açık ilmik yapılarının bulunduğu bölgeler daha önceleri mikroskop altında verdikleri görüntü nedeniyle **ökromatin** olarak tanımlanmıştır. Bu

Şekil 10-5. Kromatinin metafaz kromozoma dönüşme sürecinde geçirdiğı yapı düzenleri.

Bu bölgeler genelde RNA sentezinin gerçekleştiğı aktif genleri içerir. **Heterokromatin** olarak adlandırılan yoğun kromatin bölgeleri ise, inaktif genlerin ya da şifreli bilgi içermeyen dizilerin bulunduğu DNA bölümlerine karşılık gelir.

Histonlara oranla, histon olmayan çekirdek içi proteinlerin çeşit sayısı fazla olup, yüzlerle ifade edilir. Bunların yapısal özellikleri çok

değişken, hücre içindeki kopya sayıları ise sınırlıdır (örneğin 3×10^3 /hücre). Düşük kopya sayılarının ışığında, böyle proteinlerin DNA ile ancak 10^5 - 10^6 baz çiftinde bir etkileşebilmeleri olanaklı olabilir. Genelde, histon olmayan proteinler DNA'ya özgün baz dizilerini tanıyarak bağlanır ve daha çok düzenleyici bir işleve ya da enzimatik bir etkinliğe sahiptir. Gerçekten de, histon olmayan proteinlerin kapsamına gen etkinliklerini **baskılayıcı (represör)** ya da **artırıcı (aktivatör)** nitelikli düzenleyici proteinler ile eşleme, transkripsiyon, DNA onarımı ve benzeri tür çekirdek içi tepkimelerden sorumlu enzimler girer. Düzenleyici etkinliğe sahip proteinlerin, histonların aksine, DNA ile etkileşmeleri özgün nitelikte olup, bu proteinler DNA üzerinde bağlandıkları bölgelerdeki baz dizilerini tanıma yeteneğini gösterir. İçerdikleri sarmal-dön(üş)-sarmal("helix-turn-helix"), sarmal-ilmik-sarmal ("helix-loop-helix"), çinko parmak ("zinc finger" ya da lösin fermuar ("leucin zipper") motifleri bu proteinlerin DNA oyuklarını (özellikle büyük oyugu) tarayarak buradaki özgün baz dizileriyle etkileşmelerine olanak tanır (Şekil 10-6).

Uzunluğu türe göre 10^8 ile 10^{11} baz çifti arasında değişen ökaryot DNA'sının büyüklüğü genlerin sayısı ile orantılı değildir. **Cot** analizlerinin de ortaya koyduğu gibi ökaryot genomunun yaklaşık yarısı yinelenen diziler içerir (bkz.Bölüm 4.3.3.1).

Şekil 10-6. DNA dizileriyle etkileşebilen protein motifleri.
a) çinko parmak; b) sarmal-dön(üş)-sarmal;
c) lösin fermuar motifleri ve DNA ile etkileşim biçimleri.

Haploit ökaryot genomundaki genlerin sayısının türe göre 5000 ile 100000 arasında değişebileceği düşünülmektedir. Normal büyüklükteki (molekül ağırlığı yaklaşık 50000 dalton (M_r 50000) olan) bir proteinin birincil yapısı yaklaşık 500 amino asit içerdiğine, bu sayıda amino asit $3 \times 500 = 1500$ bazlık bir sistron tarafından şifreleneceğine göre, yaklaşık 2×10^6 gen içerebilecek bir kapasiteye sahip genomun yalnızca yaklaşık % 5'i proteinleri şifreleyen, yani “sistron” niteliğindeki bölgelere karşılık gelmektedir. Ancak, ribozomal RNA ve tRNA genleri

(rDNA ve tDNA), proteinleri şifreleyen genlerin aksine, orta sıklıkta şifrelenen diziler kapsamına girer. rRNA ve tRNA genlerinin ekspresyonu proteinlerin sentezinde olduğu gibi (translasyon aşamasında) ikinci bir amplifikasyon sürecine tabi olmamaktadır. Artan gereksinimin karşılanması, bu tür (son ürünü RNA olan) genlerin kopya sayılarının çokluğu ($n= 10^2-10^3$) ve yoğun transkripsiyon etkinliği ile olanaklıdır. Bazı şifrelemeyen , yaklaşık 300 bç uzunluğundaki diziler (örneğin insanda Alu dizileri)de orta sıklıkla yinelenen diziler kapsamına girer. Kısa, ardaşık sıralanmış, örneğin $-(ATAAAACT)_n-$ gibi diziler, çok yinelenen diziler olarak, sentromer konumlu **uydu DNA (“satellite DNA”)** kesimini oluşturur. Ökaryot DNA’sının şifrelemeyen, genelde çok kez yinelenen bu dizilerden oluşan bölümünün işlevine ilişkin kesin bilgiler bulunmamaktadır. Mutasyon olasılığı istatistiksel olarak DNA uzunluğuyla orantılı olarak artacağına göre (ve DNA polimerazın eşleme sırasında $10^{-9}-10^{-8}$ sıklıkla yanlışlık yapabileceği gözönüne alındığında) DNA’nın bu bölümünün bir ölçüde mutasyon baskısından kaynaklanabileceği düşünülebilir. Ökaryot DNA’sının içerdiği dizi çeşitleri Tablo 10-5’te özetlenmektedir.

Yinelenen Diziler

Kısa, ardaşık sıralanmış diziler, örneğin (ATAAACT)_n -
sentromer konumlu-

Orta uzunlukta (~300 bç) diziler, örneğin Alu dizileri

Şifreleyen, gen nitelikli diziler, örneğin rRNA ve tRNA genleri

Yinelenmeyen Diziler

(Protein genleri) - Eksonlar/Şifreleyen ve
İntronlar/Şifrelemeyen Diziler-

Tablo 10-5. Ökaryot DNA'sının içerdiği diziler.

Şifrelemeyen bölgeler, genler arasında olabildiği gibi, genlerin içinde de bulunabilir. Genlerin şifreleyen bölümlerinin (eksonların) arasına serpiştirilmiş olan şifrelemeyen bölgeler **intronlar** ya da **ara diziler** olarak tanımlanır. İntronlar, eksonlar gibi, **yinelenmeyen ("unique")** nitelikli dizilerden oluşur. Sayıları ve uzunlukları genlere göre değişen intronların ökaryot genlerin çok büyük bir bölümünü kapsadıkları görülür (Tablo 10-6).

Ökaryot genlerinin, intronların varlığından kaynaklanan, bütünlüğü bozulmuş ve şifrelenen bilgiyle orantısız büyümüş yapısı transkripsiyon sonucu oluşan birincil RNA (=heterogen nükleer RNA ya da kısaca hnRNA) moleküllerinin büyüklüğüne de yansır.

Gen	DNA (kb)	Transkripsiyon süresi	mRNA (b)	Intron sayısı
β -globin	1,5	38s	0,6	2
Insulin	1,7	43s	0,4	2
Albumin	25	10dak	2,1	14
Tiroglobin	300	2sa	8,7	36
Distrofin	>2000	14sa	17	>50

Tablo10-6. Bazı ökaryot genlerin ekson/intron içerikleri.

İntronlara karşılık gelen, bölümlerin transkripsiyon sonrası çekirdek içinde gerçekleşen bir **kırpılma (“splicing”)** sürecinde çıkarılmasıyla hnRNA molekülleri eksonlara karşılık gelen büyüklüğe indirgenir (Şekil 10-7). RNA moleküllerinin işlenmesi (**“RNA processing”**) adı verilen bu süreçte, hnRNA molekülleri mRNA moleküllerine dönüşecek biçimde olgunlaşır.

Bu kapsamda mRNA moleküllerinin 5’ uçları 7-metilguanosa grubu (“cap”) ile kapatılır ve 3’ uçlarına değişik uzunlukta bir poliA dizisi eklenir. Uçlarında meydana gelen bu değişiklikler mRNA moleküllerine eksonükleazlara karşı direnç kazandırır ve prokaryot mRNA türlerine oranla daha kalımlı kılar. 5’ “cap” grubu bunun ötesinde protein sentezinin başlamasından sorumlu bazı (inisiyasyon) faktörlerinin mRNA’ya bağlanması için gerekli sinyali oluşturur. HnRNA moleküllerini mRNA moleküllerine dönüştüren işleme sürecinin benzeri ribozomal RNA moleküllerinin oluşumu sırasında da gerçekleşir.

Şekil 10-7. Ökaryot genlerin yazılım ile hnRNA moleküllerine hnRNA'nın kırpılma ile mRNA moleküllerine dönüşmesi.

RNA moleküllerinin hücre sitoplazmasına ancak kırpılma ve işlenme süreci sonunda ulaşabilmeleri, ökaryotlarda transkripsiyon ve translasyon olaylarının ayrı hücre bölmelerinde gerçekleşmesinin nedenlerinden biri olarak düşünülebilir. Kırpılma işlemi sırasında eksonların biraraya getirilmesinin hatasız çalışan bir mekanizma ile gerçekleştirilmesi gerekir. Aksi halde, tek bir bazlık kaymalar bile okuma

kalıbında açacakları kaymalarla bilginin yitirilmesine yol açacaktır. Diğer yandan, kırılma bölgesindeki kontrollü kaymalar sonucu aynı hnRNA molekülünden değişik polipeptitleri şifreleyen mRNA molekülleri oluşabilir. Bu mekanizma ökaryotların yanı sıra küçük bir genoma mümkün olabilecek en çok bilgiyi sığdırma zorunluğunda olan virüslerin genlerinin anlatımında yaygın biçimde gözlenir.

100-150 kilobaz çiftlik (kbç) geniş bir DNA bölgesine yayılabilen bir genin transkripsiyonu ve oluşan hnRNA moleküllerinin işleme ile mRNA molekülüne dönüştürülmesi zaman gerektiren bir süreçtir (bkz.Tablo 10-6). Bu nedenle böyle bir genin ikincil ürünü olan proteinin hücre içindeki derişiminin gerekli eşik düzeye ulaşması hücrenin yaşam sürecini de aşan bir zaman gerektirebilir. Bu durumda, kritik derişim düzeyi, sentezlenen proteinin zaman içinde birikimine bağlı olarak, belirli sayıda hücre bölünmesinden sonra ortaya çıkar. Bu tip süreçlerin, ileride irdeleneceği gibi, biyolojik zamanı belirleyen birer içsaat olarak işlev görmesi olasıdır.

10.2. Diploiyitlik ve eşemsel çoğalma

Yüksek canlıların ve genelde ökaryotların çok önemli bir ortak özelliğini diploiyit olmaları oluşturur. Diploiyitlik ise, zorunlu olarak eşemsel çoğalmayı gerektirir. Eşemsel çoğalmada eşem hücreleri, diploiyit soma hücrelerinin aksine, geçirdikleri meyozy sürecinde haploiyit duruma indirgenir. Eşem hücreleri (yumurta ve sperm) döllenme aşamasında birleşerek diploiyit zigotu oluşturur (Şekil 10-8). Bunu izleyen embriyonik süreç içinde gerçekleşen hücre çoğalması ve farklılaşması sonunda çok hücreli, diploiyit yüksek canlı ortaya çıkar.

Şekil 10-8. Diploiyit canlıların yaşam döngüsü.

Diploiyitlik ve eşemsel çoğalmanın getirdiğı üstün genetik rekombinasyon olanakları türlere önemli selektif üstünlükler sağlar.

- Meyoz sürecindeki 1.hücre bölünmesinde anne ve babadan gelen benzeşik (homolog) kromozomların birbirlerinden ayrılmaları ve rastlantısal dağılımları (segregasyonu) yeni kombinasyonların ortaya

çıkmasını ve çeşitliliğin gelişmesini sağlar (Şekil 10-9). Buna göre, meyoz sonunda ortaya çıkan eşem hücrelerinin genotiplerinin çeşit sayısı (gamet çeşidi sayısı) 2^n (n = haploit kromozom sayısı ya da kromozom çeşidi sayısı) ile ifade edilir (Şekil 10-10). Örnekte 2^2 olan gamet çeşit sayısının insanda buna göre 2^{23} olması beklenir. Bunun ötesinde, homolog kromozomların meyozdaki 1.hücre bölünmesinin profaz evresi sırasındaki uzunca birliktelikleri kromozom başına ortalama beş kesişme (krossover) olayının meydana gelmesiyle sonuçlanır (Şekil 10-11). Bu mekanizma, kesişme sayısı ile orantılı olarak, olasılıklarda yeniden üstel bir artışa yol açar. Özetle, eşemsel çoğalma biçimi diploit organizmalarda, belirtilen genetik rekombinasyon mekanizmalarıyla özelliklerin etkin biçimde harmanlanmasını olanaklı kılar. Bunun sonunda,

- Olumlu allellere sahip soyların evrimi çabuklaşır;
- Gen duplikasyonu ve rekombinasyon mekanizmaları üzerinden yeni özelliklerin kazanılması mümkün olur; zira diploit türlerde bir genin mutasyona uğrayarak yeni bir işlev kazanabilmesini olanaklı kılan yedek bir kopya (allel) bulunmaktadır;
- Ayrıca, ölümcül **çekinik** (“**resessiv**”) genlerin etkisi enaza indirilir ve bu tip genlerin türlerde birikimi önlenir.

10.3. Embriyonik gelişme

Yukarıda görüldüğü gibi, diploiyit canlılar yaşam süreçlerinde eşemsel çoğalmanın gereği tek hücreli bir evreden (döllenmiş yumurta hücresi) geçmektedir. Döllenmiş yumurta hücresinin (zigotun), 10^{10} - 10^{14} hücre içeren yüksek canlıya dönüşmesi ise, birbirine koşut yürüyen,

- hücre çoğalması ve
- hücre farklılaşması

olaylarını kapsayan embriyonik gelişme sürecinde gerçekleşir.

Şekil 10-9. Meyoz, benzeşik kromozomların ayrılmaları (segregasyonu).

Şekil 10-10. Homolog kromozomların rastlantısal biçimde ayrılmalarıyla ortaya çıkacak olasılıklar.

Döllenmeyi izleyen kısa süreli (saniyelerle ölçülen) süreçte yumurta hücresinin içortamında özgün değışiklikler meydana gelir. Hücre içindeki depolarından açığa çıkan Ca^{2+} 'un sitoplazmadaki derişimi hızla yükselir ve döllenmeden yaklaşık 100 saniye sonra normaldekinin bin katı bir değere (10^{-4}M) ulaşır. Ca^{2+} derişimi daha sonra yeniden aynı hızla azalarak yaklaşık 200 saniye sonunda normal düzeyine (10^{-7}M) döner (Şekil 10-12).

Şekil 10-11. Meyoz sırasında benzeşik (homolog)
kromozomlar arasında kesişim.

Şekil 10-12. Yumurta hücrelerinde döllenmeyi izleyen sürede Ca^{2+} derişimi ve pH değeriinde değışiklikler.

Öte yandan, protonların hücre dışına pompalanması sonucu, ilk 200 saniyelik süre içinde hücre içi pH değeri yükselir. Bu özgün ortam değışikliklerinin hücre çoğalması ile sonuçlanan bütün diğer olaylarda da cereyan ettiğı ve daha sonra ele alınacağı gibi inositol trifosfat metabolizması ile yakından bağlantılı olduğu bilinmektedir. Nitekim, bu değışiklikler sonunda hızlı bir hücre çoğalma süreci ve dolayısıyla embriyonik gelişme tetiklenir. Döllenmeyi izleyen diğer bir özgün değışiklik ise, yumurtanın birden çok sperm tarafından döllenmesinin önlenmesinde etkili olan membran ters kutuplanmasıdır (depolarizasyon) (Şekil 10-13).

Şekil 10-13. Yumurta hücrelerinde döllemeyi izleyen sürede membranda ters kutuplanma (depolarizasyon).

Embriyonik gelişme çok hızlı bir hücre çoğalması ve ortaya çıkan farklılaşmış hücrelerin özelliklerinin korunmasına yansıyan tek yönlü niteliğiyle göze çarpar. Farklılaşmış hücrelerin özellikleri kalıtsal biçimde onlardan türeyen hücrelere aktarılır. Bir yandan değişik gen gruplarının aktifleşmesini yansıtan bu olay, diğer yandan farklılaşmış hücrelerin gereksinmedikleri genleri bir şekilde yitirmiş olabileceğini düşündürmüştür. Ancak, Briggs ve Gurdon tarafından soğukkanlı canlıların (özellikle **Xenopus laevis** (kurbağa)) yumurta hücrelerinde yürütölen deneyler farklılaşmanın çekirdek düzeyinde geri dönüşümsüz bir olay olmadığını ve farklılaşma sırasında genomun bütönlüğünün korunduğunu göstermiştir (Şekil 10-14).

Şekil 10-14. Briggs-Gurdon deneyi (klonlanmış kurbağaların oluşumu).

Bu deneyde, özetle, kurbağa larvalarının(çoğalma özelliğini koruyan bir farklılaşmış hücre tipi olan) barsak epitel hücrelerinden çekirdekler alınır. Bunların, UV-ışınlanması sonucu, çekirdekleri (genomları) inaktifleştirilmiş yumurta hücrelerine aktarılmasıyla normal kurbağalar oluşturulur. Türetilen bu kurbağaların, epitel hücrelerinin vericisi

kurbağa ile aynı genoma sahip olmaları nedeniyle, yeni bireylerin yaratılmasında kullanılan, bu yaklaşım **klonlama** olarak adlandırılır. (Klon= aynı genotipe sahip, aynı atadan türemiş bireyler topluluğu).

Klonlama, hayvancılık (üstün özellikli hayvanları çoğaltma) için çekici gözüke bile, temel biyolojik kurallara, özellikle, genetik rekombinasyona dayalı çoğalmaya ters düşen bir yaklaşımdır. Diploit organizmalara eşemsel çoğalmanın evrimsel açıdan sağladığı üstünlükler ve rekombinasyon olanakları klonlamada tümüyle yitirilmiştir.

Briggs ve Gurdon deneyi, kalıtsal faktörlerin yanı sıra, çekirdek sitoplazma ilişkilerinin ve ortam faktörlerinin embriyonik gelişmedeki önemini ortaya koymuştur. Zira, larvanın epitel hücre çekirdeğinin içerdiği ve yeni bir bireyi oluşturmak için gerekli kalıtsal bilgi, ancak yumurta hücresinin özgün ortamında etkinleşmektedir.

Briggs ve Gurdon deneylerinden farklılaşmanın genomda kırılma ve eksilmeler olmadan gerçekleşen bir olay olduğu sonucunu genel bir kural olarak çıkarmak olanaklıdır. Fakat her kural gibi, bunun da ileride ele alınacak lenfosit örneğinde, istisnaları olduğu görülecektir.

Hücre farklılaşması, **programlanma** (“**determination**”) olarak tanımlanan bir önaşamayı izler. Programlanma aşamasında hücrelerde morfolojik özelliklerine henüz yansımayan özgün molekül değişiklikler meydana gelir. Burada, farklılaşmanın klasik morfolojinin geliştirdiği bir kavram olduğunu vurgulamak yerinde olacaktır. Hücreleri, mikroskop altındaki görüntülerini ve boyanma özelliklerini ölçüt alarak, sınıflandıran bu yaklaşımın sınırlı ayırım gücü sayıları en çok birkaç yüzle anlatılabilecek hücre çeşidinin belirlenebilmesini olanaklı kılmıştır. Ancak, günümüzde hücrelerin molekül kimliğini de

belirleyebilen güçlü teknikler farklılaşma ile ortaya çıkan ve birbirlerinden molekül sel yapı, işlev ve özgünlük gibi kriterlere göre ayırt edilebilen hücre çeşitlerinin sayısını mily onlara çıkarabilmektedir. Programlanmış hücre bu açıdan molekül sel düzeyde **farklılaşmış hücre** olarak tanımlanabilir.

Önce çevre faktörlerinin etkisiyle gelişen programlanma süreci daha sonra kalıtımsal nitelik kazanır ve çevre koşullarından bağımsız olarak gelişmesini sürdürür. Bu bağlamda, yumurta hücresinin iç ortamı embriyonik gelişme ve hücre farklılaşmasında belirleyici bir rol oynar. Yumurta hücresinin sitoplazmik ortamının programlanmaya etkisini embriyonik gelişmenin ilk aşamalarında ve gene en belirgin biçimde soğukkanlıların yumurtalarında gözlemlemek mümkündür. Ortaya çıkacak bireyin boyutları, yani

- anterior-posterior (ön-arka),
- ventral-dorsal (karın-sırt),
- mediyal-lateral (sağ-sol),

eksenler boyunca gelişmesi, yumurta hücresinde döllenmeyi izleyen sürede gözlenebilen, kutuplarca belirlenmektedir. Yumurta hücresinde yumurta sarısı maddesinin eşitsiz dağılımıyla oluşan hayvansal ve bitkisel kutuplar dorsal - ventral eksen i, spermin yumurta hücresiyle birleştiği noktadan ekvatoryal düzlemde arkaya uzanan gri orak adı verilen şerit ise anterior-posterior eksen i oluşturur (Şekil 10-15).

Şekil 10-15. Kurbağa örneğinde embriyonik gelişmenin
ana aşamaları.

Döllenmeyi izleyen ilk sürede embriyonik gelişme soğukkanlılarda yumurta hücresinin kütleinde bir değışikliğe yol açmayan iç bölünmelerle (“**cleavages**”) gerçekleşir. İç bölünmeler sonucu ortaya çıkan blastula ve gastrula hücreleri yumurta hücresindeki eşitsiz madde dağılımından paylarını konumlarına, yani bulundukları kutuba, bağı olarak alır. Bunun gastrula hücrelerinde bir “konum” bilincine yol açtığı ve belirli yönde farklılaşma için gerekli genlerin aktifleşmesini sağladığı düşünülmektedir. Memelilerde, günümüzün teknikleriyle soğukkanlılardaki gibi kolay izlenememekle birlikte, benzer mekanizmaların rol oynaması söz konusudur. Gastrula aşamasında hücrelerde, aralarındaki sitoplazmik köprüler aracılığıyla, oluşan madde derişim gradyentleri hücrelerin benzer biçimde programlanmasında etkili olmaktadır.

Embriyonal gelişmenin molekül düzeyde en ayrıntılı biçimde incelendiğı bir organizma olan karasinek (**Drosophila melanogaster**)te yürütölen çalışmalara göre, özgün bir gen grubu embriyonun üçboyutlu gelişimini sağlayan kutupların oluşumundan sorumludur. Kutuplar, yumurta hücresinde döllenmeden daha önceki sürede belirlendiğı için, embriyonun eksenler boyunca gelişimi öncelikle anneden gelen (maternal) genlerin etkisi altındadır. Bu tür maternal genleri etkileyen mutasyonlar genelde yaşamla bağdaşmayacak ölçülerde büyük bozukluklara (göğüs ya da başın olmaması gibi) yol açar. Böyle mutant yumurtalara normal yumurtadan alınan sitoplazmanın mikroiğeksiyonla eklenmesiyle döllenme sonrası normal (eksiksiz) bireyler ortaya çıkabilmektedir. Bu olgu, maternal kökenli sitoplazmik faktörlerin önemini ortaya sermektedir.

Konumlarına bağlı olarak hücrelerde farklı genlerin anlatımı ve farklı hücrelerin ortaya çıkışı için düşünülebilecek bir mekanizma şematik biçimde gösterilebilir. Buna göre, bir embriyo hücresinde (a ve b) maddelerinin oluşturdukları derişim gradyentleri farklı programlanmış iki hücrenin (A ve B hücrelerinin) ortaya çıkmasına yol açar (Şekil 10-16). İçerdikleri (a ve b) maddelerinin farklı derişimlerine bağlı olarak bu hücrelerde ayrıca farklı, yeni gen grupları aktifleşir. Örneğin, solda a maddesinin etkisiyle C grubu, sağda b maddesinin etkisiyle de D grubu genler etkinleşebilir. Bu genlerin ürünleri olarak ortaya çıkan (c ve d) maddelerinin farklı dağılımı ise, ikinci hücre bölünmesinden sonra AC, AD, BC ve BD tipi hücrelerin ortaya çıkmasını sağlayabilir (Şekil 10-17). Embriyonal gelişme sürecinde özgün gen gruplarının bu biçimde (ve üçboyutlu olarak düşünülmesi gereken) sırasal aktifleşmesi, erişkin bireyi oluşturan çok sayıda farklı hücre tipinin ortaya çıkmasına olanak sağlayacaktır.

Farklılaşmış hücrelerin bir özelliğini, yukarıda da belirtildiği gibi, farklılaşmışlığı belirleyen özgün genlerin, bir kez aktifleştikten sonra, etkinliklerini artık çevre koşullarından bağımsız olarak yaşam boyu korumaları belirler. Bu özelliği ise, maddelerin hücre içinde geçici olarak gösterdikleri derişim farklılıkları ile açıklamak mümkün değildir. Ancak, bu genlerin etkinlikleri önce bazı pozitif **“feed-back”** mekanizmaları ile kalımlı nitelik kazanabilir. Daha uzun evrede ise, kromatinin özgün yapısı gen etkinliklerinin korunmasında belirleyici faktör olarak önem kazanır.

Şekil 10-16. Yumurta hücresinde maddenin (o ve o) eşitsiz dağılımı. Oluşan derişim gradyentleri sonucu A ve B hücre tiplerinin belirlenmesi.

Farklılaşmış hücrenin gereksinmediğı gen gruplarının bulunduğu bölgelere bağlanan kromatin proteinleri (histon ve bazı histon olmayan proteinlerin) bu bölgelerin aşırı biçimde katlanarak “**heterokromatin**” yapı düzenine dönüşmesine yol açar. Kromatinde (farklılaşmış hücreye özgü) aktif genlere karşılık gelen ilmiği bölgeler ise açık, gevşek

yapıları (=“**ökromatin**”) ile göze çarpar. Kromatinin, DNaz gibi enzimlere özellikle duyarlı olan, bu bölgeleri, içerdikleri aktif genler nedeniyle, “**aktif kromatin**” olarak da adlandırılır.

Şekil 10-17. Yumurta hücresinin iç bölünmeyle ortaya çıkan A ve B hücrelerinde farklı gen ekspresyonu. Oluşan (c) ve (d) maddelerinin derişim gradyentlerine bağılı olarak yeni hücre tiplerinin belirlenmesi.

Embriyonal gelişme sırasında yumurta hücresinin DNA’sında bulunan tek boyutlu kalıtsal bilgi yukarıdaki (anterior-posterior, dorsal-ventral, mediyal-lateral) koordinatlarla verilebilecek üçboyutlu bir

bilgiye dönüşmektedir. Ancak, erişkin, normal bireyin oluşumunda, bu koordinatların ötesinde, zaman parametresi de dördüncü boyut olarak ağırlığını gösterir. Embriyonal gelişmede, buna göre, farklı hücre gruplarının erişkin bireyde beklenen topografiyi verecek zamansal sırada ortaya çıkması büyük önem taşır. Programın zaman boyutundaki bozukluklar etkileri ağır, ancak (yukarıda belirtilen maternal genleri etkileyen mutasyonların aksine) yaşamla bağdaşabilen sakatlıklara yol açabilir.

Embriyonal gelişmede zamansal sırayı belirleyen ve biyolojik içsaat olarak işlev yapan mekanizmalar bu açıdan önem kazanır. Şekil 10-16 ve 10-17’de verilen örnekler mekansal sıranın yanı sıra, zamansal sıranın belirlenmesinde de etkin bir mekanizma olarak düşünülebilir. Bunun ötesinde, genlerin aktifleşmesi (ya da kapatılması) için gerekli düzenleyici proteinlerin belirli bir eşik derişim değerinden sonra etkinlik kazandıkları düşünülebilir. Bir kum saati mekanizmasını öngören bu modelde etkinin ortaya çıkması için değişik iki yol sözkonusu olabilir. İlkinde, baştan, örneğin oogenez sürecinde, sentezlenerek yumurta hücresinde depolanan, ancak embriyonal gelişme sırasında yeniden sentezlenmeyen bir protein rol oynayabilir. Hücre bölünmelerine koşut olarak, böyle bir proteinin hücre içi derişiminin eşik düzeyin altına inmesi etkisinin ortadan kalkmasına yol açabilir (Şekil 10-18).

Şekil 10-18. Transkripsiyonun, blastula oluşumunun ileri aşamalarında, zamana bağı olarak devreye girişı (bir model).

Aynı mekanizma için düşünölebilecek ikinci olasılıkta, ilkinin aksine, etkisinin ortaya çıkması için, düzenleyici proteinin embriyonal gelişme sürecinde birikerek kritik eşiğe ulaşması gerekebilir (Şekil 10-19). Geniş (~150 kb çiftlik) DNA bölgelerine serpişmiş bazı ökaryot genlerinin transkripsiyonu ve oluşan büyük hnRNA moleküllerinin işlenerek olgun mRNA moleküllerine dönüşümünün gerektireceğı sürelerin uzunluğu, yukarıda da irdelendiğı gibi, bu bağlamda önem kazanmaktadır. RNA sentez saniyede ortalama 40 nükleotidin eklenmesiyle yürüdüğüne göre, böyle bir genin üzerinde tek bir hnRNA molekülünün sentezi yaklaşık 1 saat içinde tamamlanabilecektir.

Şekil 10-19. Zamana baēlı olarak belirli genlerin aktifleşmesi (olası bir mekanizma).

Bu bağlamda, transkripsiyonun başlama (inisiyasyon) sıklığı da bu genin üzerinde zaman sürecinde oluşacak hnRNA (ve mRNA) moleküllerinin sayısını ve dolayısıyla ikinci aşamada oluşacak proteinin hücre içi derişimini belirleyecektir. Şekil 10-20 genlerin transkripsiyon yoğunluğunun (dolayısıyla gen etkinliğinin) inisiyasyon sıklığına baēlı olarak ayarlanmasını örneklemektedir. Aşaēıda başka bağlamda ele alınacak olan homeogenler bu tip bir zamansal düzenleme mekanizmasının gerçekleşmesi için gerekli tüm özellikleri taşımaktadır.

Şekil 10-20. Genlerin transkripsiyon yoğunluğunun inisiyasyon sıklığına bağı olarak ayarlanması.

Otuzlu yıllardan başlayarak yürütölen bir dizi çalışma, karasinekte embriyonal gelişmeyi etkileyen bir grup mutasyonun varlığını ortaya koymuştur. Karasinek larvasında, görünüşte farklılaşmamış hücre grupları (imago diskleri) bulunur. Aslında programlanmış hücrelerden oluşan bu diskler (toplam 19 adet) larvanın erişkin sineğe dönüşmesinden sorumludur. Bu dönüşüm (metamorfoz) sürecinde, özgün hormonal değişikliklerin etkisiyle herbir disk, girdiğı farklılaşma sonucu, belirli bir segmentte ve yalnızca o segmente özgü organların oluşumuna yol açar. Disk hücrelerinin normal konumlarından

başka yerlere aktarılmaları ya da uzun süre kültürde tutulmaları, programlanmış hücre tanımına uygun olarak, onların hormonal uyarı üzerine oluşturacakları organ tiplerini değiştirmez. Buna karşın, **homeotik mutasyonlar** adı verilen mutasyonlar sonucu, bu disklerden oluşacak yapıların ve organların doğal konumlarından başka segmentlere kaydıkları görülür, örneğin, kafadan ayakların çıkışı ya da kanatların bulunduğu segmente komşu bir torakal segmentte yeni bir çift kanadın oluşması gibi.

Homeotik mutasyonlar hücrelerin farklılaşmasının yönünün ve zamanının programlanmasında etkili düzenleyici genleri (=homeogenleri) bozar. Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin yardımı ile önce karasinek ve daha sonra memelilerde bir dizi homeogen klonlanarak incelenebilmiştir. Dizileme çalışmaları (yukarıda da belirtildiği biçimde) geniş DNA bölgelerine serpişmiş eksonlardan oluşan bu genlerin 3' uçlarında yaklaşık 180 baz çiftlik bir ortak ve özgün diziye (=homeokutu "**homeobox**") sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 10-21).

Şekil 10-21. Homeogen ve homeoproteinlerin birincil yapıları.

Homeokutunun yalnızca aynı türdeki değişik homeogenler arasında değil, ayrıca türler arasında da ortak olduğu gösterilmiştir. Evrim boyunca korunmuş niteliğiyle, homeokutu , homeogenlerce şifrelenen homeoproteinlerin, özgün (5'-TCTAATGGCT-3') DNA dizisiyle etkileşen, homeo bölgesine karşılık gelmektedir. Homeobölge ile bu dizi arasındaki etkileşim Şekil 10-22'de gösterilmektedir.

Mutagenез çalışmaları değişik homeogenler arasında bir yarışımın bulunduğunu göstermektedir. Gözlemlere göre, her segment ona özgü homeogenlerin (ve bu genlerin şifrelediği homeoproteinlerin) denetimi altındadır. Ancak, özgün bir homeogenin mutasyon sonucu yitirilmesiyle onun sorumlu olduğu segment komşu segmente özgü homeogenlerin etkisi altına girmektedir.

Şekil 10-22. Homeobölgenin özgün DNA dizisiyle etkileşimi.

Bulgular, homeogenlerin embriyonal gelişme sürecinde bireyin anterior-posterior (AP) eksen boyunca oluşan topografisinden sorumlu düzenleyici genler olarak işlev yaptığını ortaya koymaktadır. Bu genler, şifreledikleri homeoproteinler aracılığıyla özgün gen gruplarını aktifleştirerek etkilerini göstermektedir (Şekil 10-23). Homeogenlerin DNA’da, 5’→ 3’ doğrultusunda dizilimleri ile etkiledikleri organların AP eksenini boyunca dizilimleri arasında eşdoğrultusal (kolineer) bağlantı bulunmaktadır (Şekil 10-24). Homeogenlerin başlıca özellikleri Tablo 10-7’de özetlenmiştir.

Şekil 10-23. Homeogenler ve aktifleştirdikleri genler.

Şekil 10-24. Homeogen/AP eksenlerinin eşboyutluluğu.

- Yüksek canlıların anterior-posterior (AP) boyutundaki yapılanmalarından sorumlu genler.
- Transkripsiyon faktörleri şifreleyen bir gen ailesi.
- Maternel gen ürünleri → Homeogenlerin aktifleşmesi.
- DNA'daki dizilimleri embriyonun AP yönündeki yapılanma sırasıyla eşdoğrultuda ("ko-lineer").
- Büyük genler (>150 kbç).
- 3'-uçlarındaki ekson= homeokutu.
- Homeokutu (DNA) → homeobölge (Protein).
- Homeobölge homeoproteinlerin DNA bağlama bölgesi.
- Farklı homeoproteinlerin homeobölgeleri benzeşik.
- Homeobölge üzerinden hedef genlerin promoter/enhancer bölgelerine bağlanma → Hedef genlerin aktifleşmesi.

Tablo 10-7. Homeogenler - yapısal ve işlevsel özellikleri.

Değişik gen gruplarına özgü olmalarına karşın, içerdikleri ortak homeokutu homeogenler için bir çelişki gibi gözükebilir. Ancak, ökaryot genlerin promoter bölgelerinin gösterdikleri özelliklerin ışığında çelişki gibi gözüken bu olguya bir açıklık getirilebilmektedir. Bu bölgeler modüler yapıları, yani içerdikleri, çok çeşit ve sayıda düzenleyici proteinin, etkileştiği dizilerin varlığı ile göze çarpar (Şekil 10-25). Promoter bölgelerin bu modüler yapı düzeni, gelen çeşitli sinyallerin, anlamlı bir hücrel yanıt dönüşmesine hizmet eder.

Şekil 10-25. Ökaryot genlerin modüler yapısı. UAP, "upstream activator sequence"; pol II, RNA polimeraz II; TFII/D, A, B, E ve F, RNA polimeraz II'ye özgü genlerde RNA sentezinin başlamasından sorumlu transkripsiyon faktörleri; CAAT ve TATA, promoter dizileri; INT, transkripsiyon başlama noktası.

Homeoproteinler ortak homeobölgeleri üzerinden farklılaşmadan sorumlu çok sayıda genin promoter bölgesine bağlanabilir (Şekil 10-

26). Ancak her tip homeoproteininin homeokutu dışındaki **“transaktivatör”** bölgelerinin özellikleri onun normal embriyonal süreçte hangi gen grubu üzerinde etkisini göstereceğini belirler (Şekil 10-27). Etkileştikleri ortak diziler nedeniyle homeoproteinler arasında yoğun bir yarışım mevcuttur. Hangi gen grubunun aktifleşebileceği ve buna bağlı olarak farklılaşmanın hangi yönde olacağı, bu durumda değişik homeoproteinlerin hücre içindeki derişimlerinin oranı ile belirlenebilir. Mutasyon sonucu bir homeogenin devre dışı kalmasıyla hücrede onunla yarışım içindeki homeogen etkinlik kazanır. Yarışımın genelde komşu segmentlere özgü homeogenler arasında olması, bu genlerin ürünleri olan homeoproteinlerin sentezlendikleri hücrelerden hareketle (sitoplazmik köprüler üzerinden) çevreye yayılmalarından kaynaklanmaktadır (Şekil 10-28). Homeoproteinlerin bu yolla oluşturdukları derişim gradyentleri aktifleşecek genleri belirler.

Şekil 10-26. Farklı homeoproteinlerin etkileştikleri ortak diziler.

Şekil 10-27. Homeoproteinlerin etki mekanizması. TBP, "TATA binding protein"; TAF, "TBP associated factor"; TBP ve TAF birlikte transkrişyon faktör II/D (TFII/D)'yi oluşturur.

Şekil 10-28. Homeoproteinlerin AP boyutundaki dağılımının gösterilmesi.

11. Hücre farklılaşması açısından lenfosit modeli

Farklılaşmış hücre, klasik tanımda, üstlendiği işleve bağlı olarak, özgün morfolojik özellikler gösterir. Bu tanıma ve hücrelerin morfolojik görüntülerine göre, erişkin bir yüksek canlıyı oluşturan farklılaşmış hücre çeşitlerini yaklaşık 200 ile sınırlandırmak olanaklıdır. Ancak, bu sınırlı sayı daha önce de belirtildiği gibi, geleneksel yöntemlerin bir ölçüde sınırlı ayırım gücünden kaynaklanır. Moleküler Biyolojinin ve Moleküler Biyofiziğin geliştirdiği yöntemler ise farklılaşmış bir hücre sınıfının temsilcilerinin de birbirlerinden işlev, molekül sel yapı ve içerik açısından büyük ölçüde farklılaşmış olabileceğini ortaya koymaktadır.

Morfolojik açıdan farklılaşmış tek bir hücre tipinin molekül sel ve işlevsel açıdan farklı milyonlarca hücre tipini kapsayabileceğinin en açık bir örneğini lenfositler oluşturur. Bunun ötesinde, aşağıda görülebileceği gibi, farklı özgünlükte lenfosit tiplerinin gelişiminde, Briggs ve Gurdon deneylerinden çıkarılan sonucun aksine, DNA’da belirli bazı değişiklikler meydana gelebilmektedir.

Lenfositler, çok yönlü gelişmeye açık (pluripotent) kemik iliği kök hücrelerinden türeyen değişik kan hücre tiplerinden biridir(Şekil 11-1). Bu yolla oluşan lenfositlerin sayısı erişkin insanda yaklaşık 10^{12} ’ye ulaşır. Lenfositler, yüksek canlıyı yabancı (mikroorganizmalar, virüsler, toksinler, vb.) etmenler ve yapılardan korumakla görevli olan bağışıklık sisteminin ana ögesini oluşturur. 1960’lı yıllardaki çalışmalar bu hücrelerin iki farklı grubunun varlığını ortaya koymuştur. B (Bursa Fabricius) ve T (timus) lenfositleri adlarını farklılaşmalarının gerçekleştiği dokulardan alırlar.

Şekil 11-1. Pluripotent kemik iliğı kök hücrelerinden gelişen hücre tipleri.

Memelilerde B-lenfositlerinin farklılaşmasının, adlarını borçlu oldukları (ancak kanatlılara özgü bir lenf bezi olan) Bursa Fabricius yerine, memelilerde B-lenfositlerinin farklılaşmasının kemik iliğinde gerçekleştiğı kabul edilir (Şekil 11-2). Lenfositlerin ilgili dokuların özgün ortamlarında hangi mekanizmalarla B- ya da T-lenfosit yönünde farklılaştığı henüz açıklığa kavuşmuş değildir.

B-lenfositleri antikor moleküllerinin sentezine dayalı humoral bağışıklık, T-lenfositleri ise, hücresel bağışıklık olarak adlandırılan (ve aşağıda ayrıntıyla ele alınacak) bağışıklık biçimlerinden sorumludur. Ancak, bağışık yanıtın (özellikle humoral yanıtın) gelişebilmesi her iki grup kapsamındaki lenfositlerin etkin işbirliğini gerektirir.

Şekil 11-2. B- ve T-lenfositlerinin gelişimi.

Lenfositler yabancı yapıları tanıyan, onları canlının kendi yapılarından ayırdedebilen ve yeniden karşılaştıklarında anımsayabilen hücrelerdir. Bu özellikleri lenfositlerin oluşturduğu bağışıklık sistemi (sinir sisteminin yanısıra) biyolojik bellekten söz ödebilecek başlıca sistem olarak belirler. Canlıya yabancı yapılar **antijen** olarak tanımlanır. Makromoleküler ya da daha büyük yapılar olan antijenler üzerinde lenfositlerin özgün biçimde etkileştikleri (taşıdıkları) bölgelere **epitop** ya da **antijenik bölge** adı verilir. Her lenfosit, baştan belirli bir epitopu ya da benzeşik sınırlı sayıda epitopu tanımak üzere programlanmıştır. Lenfositler, epitopları yüzeylerinde taşıdıkları özgün reseptörler aracılığıyla, anahtar-anahtar deliği örneğinden bilinen yapısal uyum ilkesine bağlı olarak tanır.

Lenfositlerin özgün antijenleriyle etkileşmesi, **klonal seleksiyon** mekanizması üzerinden, bağışıklal yanıtın ortaya çıkmasına yol açar (Şekil 11-3). Normalde durağan, bölünme yeteneğinden yoksun ve çok düşük düzeyde RNA ve protein sentezi etkinliğı gösteren lenfositler, özgün antijenleriyle (somut olarak antijen üzerindeki epitoplarla) etkileştikleri zaman, aktifleşerek hızlı bir çoğalma sürecine girer. Ortaya çıkan lenfositlerin hepsi (ata) lenfositle aynı genotipe ve aynı özelliklere (ve antijen özgünlüğüne) sahip olduklarından **klon (soy)** olarak adlandırılır. Bu soy, bağışıklal yanıtın esasını oluşturur. Soyun, bu yanıtın gerçekleşmesinde etkili olan temsilcileri **eylem hücreleri** (B-lenfositlerinin örneğinde **plazma hücreleri**) olarak adlandırılır. Bu hücrelerde yoğun bir protein sentezi etkinliğı ve, sentezlenen proteinlerin salgılanmasının ifadesi olarak, gelişmiş bir endoplazmik retikulumun varlığı gözlenir. Bağışıklal yanıtın son bulmasıyla (antijenin ortadan kalkmasıyla), eylem hücreleri de ortadan kalkar. Antijenik uyarıyı izleyen sürede, özgün lenfositlerin çoğalması sırasında, eylem hücrelerinin yanı sıra **bellek hücreleri** adı verilen lenfositler de ortaya çıkar. Bellek hücreleri, antijenle yeniden karşılaşma durumunda yeni bir yanıtı daha hızlı ve daha etkin biçimde başlatma görevini üstlenmiştir. Bu hücreler, bağışıklal yanıt sonrasında da varlıklarını sürdürür.

Belirli bir antijenle karşılaşmadan önce organizmada ona özgü, yani onun üzerindeki epitopları tanıyabilen, lenfositlerin sayısı çok azdır.

Şekil 11-3. Klonal seleksiyon.

Bu nedenle de antijenle ilk karşılaşmayı izleyen sürede (doğal olarak klonal seleksiyon esasına dayalı) yanıt yavaş gelişir, şiddeti ve etkinliği sınırlı kalır. Birincil yanıt sürecinde gelişen bellek hücreleri, aynı

özgünlüğü paylaştıkları bu (ata) lenfositlerden sayıca çok daha fazla olup, ayrıca pozitif seleksiyon sonucu antijenle daha etkin biçimde etkileşebilir. Böylece, antijenle yeniden karşılaşıldığında, yanıtın daha hızlı ve etkin biçimde gerçekleşmesi olanaklı olur (Şekil 11-4).

Şekil 11-4. Birincil ve ikincil bağışıklık yanıtının zamana bağlı gelişimi.

Sınırlı sayılarının ve yüksek canlılığının makroboyutlarının ışığında, normalde, lenfositlerin özgün antijenleriyle karşılaşabilme olasılığının çok düşük olması beklenir. Ancak, lenf dolaşım sistemi ile lenf bezlerinin anatomik özellikleri bu karşılaşmanın kısa sürede gerçekleşebilmesini güvenceye alır. Dokulardan toplayıcı lenf yolları aracılığıyla lenf

bezlerine ulaşan antijenin buradaki retiküler (hücresele örgü niteliğindeki) yapıdan süzülürken, özgün B-lenfositler ve/ya da özgün T-lenfositleriyle karşılaşma olasılığı büyük ölçüde artar.

Bağışık sistemin doğadaki tüm antijenleri tanıyabilme ve onlarla karşılaştığında gerekli yanıtı verme yetkinliğine sahip olduğu kabul edilir. Doğada antijen niteliğindeki yapıların sayıları milyonlar ile ifade edildiğine göre, bu denli çok sayıda (herbiri ayrı özgünlükte bir reseptöre sahip) lenfosit çeşidinin organizmada ortaya çıkabilmesi nasıl mümkün olabilmektedir? Bu soru, rekombinant DNA teknolojisinin katkılarıyla başta ve öncelikle B-lenfositlerinin örneğinde yanıtlanmıştır. B-lenfositlerinin çeşitliliğinin antikor genlerindeki değişikliklerden kaynaklanması ve de antikor moleküllerinin yapılarında yansması bu konuda belirleyici olmuştur. Başta lenfositlerin yüzeylerinde antijenlere özgü reseptör işlevini üstlenen antikorlar, B-lenfosit aktifleşmesi (bağışık yanıt) sürecinde plazma hücrelerinde yoğun biçimde sentezlenerek, salgılanır. Antikorlar, bu nedenle, serumda ve diğer vücut sıvılarında büyük miktarlarda bulunur. Ayrıca, plazma hücrelerinin kanserleşmesiyle ortaya çıkan miyelom olgularında, tümör hücreleri tek tip ve özgünlükte antikoru çok büyük miktarlarda sentezler. Antikor hafif zincirleri ise, miktarlarındaki fazlalık sonucu, Bence-Jones proteini şeklinde idrara geçer. Bu özellikleri, antikorların saflaştırılmalarını ve yapılarının incelenmesini büyük ölçüde kolaylaştırmıştır.

T-lenfositlerinin çeşitliliğini (antijen özgünlüğünü) ise membranın ayrılmaz bir ögesi olan T-reseptörü belirler. Membran proteinleriyle çalışmanın getirdiği güçlükler (miktarlarının azlığı, membrandan çözündürülerek saflaştırılmalarında karşılaşılan güçlükler)

nedeniyle T-reseptörleri üzerindeki çalışmalar ancak son yıllarda ilerlemeler göstermiştir.

11.1. Antikorlar-vapıları, sınıfları ve oluşum mekanizmaları

Antikorların (immünglobulinlerin) oluşumu, yapısal farklılıkları, lenfositlerin farklı özgünlükte ve farklı sınıflarda antikorları sentezleyecek biçimde programlanmaları tıp ve biyolojinin ilginç konularından birisini oluşturmuştur.

Antikor sentezi, bağışık yanıtın çok önemli bir aşamasını oluşturur. Antikorların virüs, bakteri hücresi, vb. organizmaya yabancı etmenlerle (kısaca antijenlerle) birleşerek onları sabitleştirmeleri humoral bağışıklığın esasını teşkil eder.

Antikorlar (immünglobulinler), **immünglobulin G (IgG), immünglobulin M (IgM), immünglobulin A (IgA), immünglobulin D (IgD) ve immünglobulin E (IgE)** olarak gösterilen beş ana sınıfa ayrılır. IgG serumdaki immünglobulinlerin yaklaşık % 80'ini oluşturur ve virüslerle savaşta ön planda rol oynar. Gerek partikül nitelikli, gerekse çözünmüş antijenler (toksinler) ile etkileşim gösterir. İkincil bağışık yanıtın oluşumunu sağlayan, plasentadan fetüse geçen tek immünglobulin tipidir. IgM, genellikle, IgG ile ortak işlevler üstlenmiş olup, bağışık yanıtın gelişmesi sırasında serumda ilk ortaya çıkan ve birincil yanıtın esasını oluşturan immünglobulin tipidir. IgM ayrıca (IgD) gibi lenfosit yüzeylerinde antijen reseptörü işlevini de üstlenir. IgA, seromüköz salgılarda bulunur ve organizmanın dış yüzeylerinin korunmasında rol oynar ve salgılanan immünglobulin olarak da tanımlanır. IgE ise, özellikle allerjik reaksiyonlarda rol oynayan

immünglobulin tipidir. İmmünglobulin sınıflarının bazı özellikleri Tablo 11-1’de verilmiştir.

Özellikleri	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
Ağır zincir	μ	δ	γ	α	ϵ
Hafif zincir	λ κ	λ κ	λ κ	λ κ	λ κ
Ig molekülündeki ana birim sayısı	5	1	1	1-2	1
Komplement aktifleştirme	++++	-	++	-	-
Plasentadan geçiş	-	-	++	-	-
Makrofaja bağlanma	-	-	+	-	-
Mast hücrelerine bağlanma	-	-	-	-	+

Tablo11-1. Antikor (Ig) sınıfları.

Organizmada en sık karşılaşılan ve immünglobulinlerin en büyük kesimini oluşturan immünglobulin tipi olması nedeniyle, çalışmalar ön planda IgG üzerinde yürütülmüştür. İki ağır (M_r 50000) ve iki hafif (M_r 25000) polipeptit zincirinden oluşan ana yapısı tüm immünglobulin tiplerine ortak olduğundan, IgG molekülüne ilişkin bilgiler diğer immünglobulin sınıflarının temsilcilerinin yapı ve işlevlerine de ışık tutacak niteliktedir. İmmünglobulin G yaklaşık 6,6S sedimentasyon katsayılı (bu nedenle 7S immünglobulin olarak gösterilen) 150000 dalton molekül ağırlıklı, uzun Y-biçiminde bir moleküldür (Şekil 11-5).

Eşdeğer iki yarım molekülden oluşan, simetrik bir yapıya sahiptir. Her yarım molekül bir hafif ve bir ağır zincirden oluşur. Bu zincirler, hafif zincirin 214., ağır zincirin ise 215. sıradaki sisteyin grupları arasında oluşmuş S-S köprüsü üzerinden kovalent olarak bağlanmıştır. Ağır zincirler arasında oluşmuş S-S köprüsü ise, iki yarı molekülü kovalent olarak birleştirir. Y-biçimindeki yapının iki ucu antikor molekülünün antijen bağlama bölgelerine karşılık gelir. Buna göre, her antikor molekülü iki değerliklidir. Proteaz (papayin) ile işlem gördüğünde, bu uçlara karşılık gelen iki parça (“Fab= antigen binding fragments”) ile Y-yapısının sapına karşılık gelen ve kolayca kristalleştirilebilen bir parça (“Fc= crystallizable fragment”) açığa çıkar. Fab parçası bütün bir hafif zinciri ve ağır zincirin NH₂-ucundan itibaren ilk 200 amino asitlik bölümünü içerir. Fc parçası ise, molekülün ağır zincirlerinin son 200 amino asitlik bölümlerini kapsar. Ağır zincirlerin papayin etkisine açık bölgesi antikorun “menteşesi” olarak tanımlanır. Bu bölge özellikle esnek yapısı ile antijen bağlayan kolların (=“Fab”ların) aralarında oluşturdukları açının değişken olmasını sağlar. Molekülün sap bölümünün yapısal özellikleri değişik Ig sınıflarına ait antikor molekülleri arasındaki farklılıkları belirler (Şekil 11-6). Sap bölgesi aynı zamanda antijenleriyle etkileşen antikorların organizmada ikinci aşamada tetikledikleri reaksiyonların çeşidini ve yerini belirler (Şekil 11-7).

Şekil 11-5. Antikor molekülü. Değişken bölümler gölgeli,
çok değişken diziler ise çizgili gösterilmiştir.

Şekil 11-6. Ağır zincirlerin sap (Fc) bölümlerinin
antikor sınıflarını belirleyici rolü.

Şekil 11-7. Sap (Fc) bölümünün antijen-antikor etkileşimini izleyen reaksiyonları belirlemesi. Antijen-IgG kompleksinin özgün γ -Fc reseptörleri üzerinden makrofajların içine alınması (fagositoz).

IgG molekülün yapısına ilişkin bilgide en büyük aşama çeşitli hafif ve ağır zincirlerin birincil yapılarının aydınlanmasıyla gerçekleşmiştir. Normalde, serumda bulunan IgG kesiminin, değişik amino asit içerikli IgG moleküllerinin oluşturduğu çoktürel (heterojen) bir karışım olması, birincil yapılarının aydınlanmasına başlangıçta bir

engel oluşturmıştır. Ancak, yukarıda belirtildiği gibi, miyelom hastalarında serumdan IgG, idrardan ise, hafif zincir kesimlerinin saf olarak ve büyük miktarda eldesiyle çok sayıda değişik hafif ve ağır zincir üzerinde dizileme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, zincirlerin NH₂-uçlarından başlayarak, yaklaşık ilk 110 amino asidi kapsayan bölümündeki amino asit içeriği değişkendir. Zincirlerin yaklaşık 110. amino asitten -COOH ucuna kadar uzanan bölümünün amino asit dizisi ise değişmez (sabit) niteliktedir. Değişken bölümlerin 28.-35., 50.-65. ve 90.-110. amino asitleri arasını kapsayan altbölümleri ise, özellikle büyük değişkenlik gösterir (Şekil 11-8).

Birincil yapıları, zincirlerin, yinelenen bir motifin (“özgün amino asit dizisinin”) ardışık sıralanmasıyla, oluştuğunu göstermektedir. 100-110 amino asitlik bu diziler hafif zincirlerde iki, ağır zincirlerde ise dört kez yinelenmektedir. Diziler, içerdikleri ortak motife bağlı olarak amino asit içeriklerinde % 30’un üzerinde bir benzeşiklik gösterir. Her dizide ayrıca 50-60 amino asit ile ayrık iki sisteyin grubu ve bunların aralarında oluşturduğu zincir içi S-S-köprüsü bulunur (Şekil 11-9). Bu bulgular, topluca Ig zincirlerinin ilkel bir genin evrim sürecindeki çoğalımı sonucu oluştuğunu ortaya koymaktadır. Zincirlerin X-ışınları saçılımı analizine göre her motif, kendi içinde bütünlüğü olan bir üçboyutlu yapıya

Şekil 11-8. Farklı hafif zincir değışken bölümlerinin.
amino asit dizileri.

Şekil 11-9. Antikor zincirlerinde yinelenen motif.

(**“domain”**) karşılık gelmekte ve katlanan B-plili tabakalardan meydana gelen bir iskelet içermektedir (Şekil 11-10). Değişken bölümlerin oluşturduğu, gene aynı özelliklerdeki, “domain” yapı içinde, çok değişken diziler bir araya gelerek epitoplara kavrayan oyuklar (=antijen bağlama bölgelerini) oluşturur. Epitop yüzeyini tümleyici nitelikleri nedeniyle, çok değişken diziler komplementerliği belirleyen bölgeler (**“complementarity determining regions (CDRs)”**) olarak tanımlanmaktadır.

Şekil 11-10. Hafif zincirin değişken ve sabit bölümlerine karşılık gelen “domain”ler.

11.2. Antikor-antijen etkileşimi

Aktif proteinlerin bir sınıfını oluşturan antikorların özgün antijenleriyle etkileşimi, aktif protein-ligant etkileşimleri için geçerli kurallara bağlıdır. Antikor-antijen etkileşimlerinin incelenmesinde **hapten** adı verilen küçük bileşikler önemli bir rol oynar. Bu küçük bileşikler, makromolekül niteliğinde olmamakla birlikte, bir makromoleküle, örneğin bir proteine, bağlandıklarında antijen özelliği kazanır, kendilerine yönelik antikorların oluşumuna yol açar. Hapten, daha sonra oluşan özgül antikorlarla yalnızca da etkileşebilir. Küçük moleküller olarak haptenler, tek değerlikli olup, tek bir antikor bağlama bölgesiyle etkileşim gösterir. Haptenler, bu özellikleriyle antijen üzerindeki epitoplara karşılık gelir. Çeşitli radyoaktif işaretli hapten ve türevlerinin özgül antikorlarla etkileşimi denge diyalizi ile incelenerek, ayrışım sabitleri (K_d) saptanabilir. Antijen antikor etkileşimi hapten ile antikor etkileşiminden daha karmaşık niteliktedir. Makromolekül nitelikleriyle antijenler üzerinde birden çok sayıda ve çeşitte antijenik bölge bulunabilir. Normalde, tek değerlikli bir haptene karşı da (onunla

değişik ilginlikle etkileşebilen) birden çok özgün antikor çeşidi bulunabilir. Buna göre, bir antijene karşı oluşan antikor çeşitlerin sayısı da antijen molekülünün karmaşıklığıyla orantılı olarak fazla olacaktır. Diğer yandan, değişik antijen (örneğin protein) molekülleri ortak antijenik bölgelere (örneğin aynı amino asit dizilerine) sahip olabilir. Bunun sonucu, ortak bölgeye yönelik olan antikorlar bu bölgeye sahip diğer antijenlerle de etkileşebilir.

Bağışıklama sürecinde başta, birincil yanıt sırasında, serumda ortaya çıkan antikorlar antijene karşı genelde düşük bir ilginlik gösterir ($K_d \geq 10^{-5}M$). Ancak, bağışıklığın gelişmesine koşut olarak ortaya çıkan yeni antikor çeşitlerinin ilginliği çarpıcı ölçüde yüksektir ($K_d = 10^{-9}-10^{-10}M$). Bu olgu, daha önce de değinilen pozitif seleksiyon mekanizmasından kaynaklanır. Bu mekanizma, bağışıklama sürecinde antijenle daha iyi etkileşebilen antikorların sentezi doğrultusunda programlanmış bellek hücrelerinin gelişiminden sorumludur.

Antijen ve antikorlar arasındaki etkileşim zayıf bağların oluşumuna bağımlı olup, tersinir (geri dönüşümlü) niteliktedir. Ancak, bu etkileşim gerçekte ileri derecedeki kalımlılığıyla göze çarpar. Tek değerlikli bir haptten ile antikoru arasında gözlenebilecek tersinir etkileşim çok değerlikli bir antijen molekülünün özgün antikorlarıyla etkileşiminde görülmez. İki çok değerlikli makromolekülün arasında kurulan çok sayıdaki zayıf bağların sonucu ortaya çıkan birleştirici güç, tüm bağların güçlerinin sayısal toplamından çok daha fazladır. Bu tür etkileşimlerin kalımlılığ **ilginlik (“affinity”)** yerine **kooperatif bağlanma (“avidity”)** kavramı ile açıklanır. İlginliğin ölçütü olan ayrışım dursayısı çok değerlikli etkileşimlerde üstel bir artış gösterir.

Bunu iki farklı antikorun aynı antijenin farklı epitopları ile etkileşimi (Şekil 11-11) sırasında meydana gelen toplam serbest enerji değişimini gösteren eşitliklerden çıkarmak

olanaklıdır: ($K = \text{birleşme denge dursayısı} = \frac{1}{K_d}$) (bkz.Bölüm 5.3):

$$\Delta G_1 = -(2,3)RT \log K(1) , \quad (11-1)$$

$$\Delta G_2 = -(2,3)RT \log K(2) , \quad (11-2)$$

$$\Delta G_T = -(2,3)RT(\log K(1) + \log K(2)) , \quad (11-3)$$

$$= -(2,3)RT(\log K(1) \times K(2)) ,$$

$$= -(2,3)RT(\log K_{\text{avidity}}) .$$

Örneğin, $K(1) = 10^4 M$ ve $K(2) = 10^2 M$ olduğunda,

$$K_{\text{avidity}} = 10^6 M.$$

Kooperatif bağlanmanın kalımlılığının nedeni, iki makromolekül arasında tersinir nitelikteki çok sayıda bağdan bir zaman kesitinde, sürekli olarak bazılarının kırılmasına karşın, diğerlerinin kurulu kalmasıdır.

Buna karşılık, haptenin bağlanmasında etkili, sınırlı sayıda zayıf bağın tümünün aynı zaman diliminde yeniden kırılma olasılığı yüksektir. Bu durum, haptin molekülünün yeniden ayrışmasına yol açarak, haptin-antikor etkileşiminin görece kalımsızlığını belirler. Kooperatif bağlanma, özellikle bağışıklanma sürecinde oluşan ve organizmaya giren

antijene karşı gelişen antikorların tümünü içeren antiserum ile antijen arasındaki etkileşimlerde belirleyici olur.

Şekil 11-11. İki farklı antikorun aynı antijenin farklı epitopları ile etkileşimi.

Antijen ve özgün antikorlar arasındaki çok değerlikli etkileşim, ayrıca üçboyutlu olarak düşünülmesi gereken bir molekül sel örgünün ortaya çıkmasına yol açar (Şekil 11-12). Antijen ile özgün antikor molekülleri arasında bu kalımlı örgünün meydana gelişi antijen-antikor etkileşiminin ürünü olarak düşünülebilecek bağışık çökeleğin (immünpresipitatın) esasını oluşturur. Bağışık çökelek, antijenle antikorun eşit değ erlilik veren derişimlerde etkileşime girmesiyle görülür (Şekil 11-13). Antijen ya da antikorun fazlalığında gerçekleş en etkileşimlerde ise çözünür nitelikte bir bağışık kompleks oluşur. Aynı şekilde, tek değ erlikli haptenin antikoruyla etkileşimi çözünür bir bağışık kompleks oluşumuyla sonuçlanır.

Şekil 11-12. Antikor-antijen etkileşimi sonucu ortaya çıkan örgü yapı.

Antikor-antijen etkileşmesi sonucu ortaya çıkan sabit, suda çözünmeyen ürün organizmanın diğer korunma sistemlerini (örneğin makrofajları ve komplementi) tetikler. Komplement sisteminin ilk ögesi antijene (örneğin, yabancı hücrenin yüzeyindeki antijenik bölgelere) bağlanan antikorun F_c -bölümünce aktiveştirilir. Komplementin ilk ögesinin aktiveşmesinden sonra, belirli bir sıraya göre komplementin herbir ögesinin kendisinden bir sonrakini aktiveşirmesiyle oluşan zincirleme (“cascade”) reaksiyonda en son açığa çıkan etkin 9.öge hedef hücrelerin membranlarının parçalanmasına ve hücrelerin eriyip, ortadan kalkmasına (lizise) yol açar (Şekil 11-14).

Şekil 11-13. Bağışık çökelek oluşumunun antijen
ile antikor değerklik oranlarına bağılılığı.

Şekil 11-14. Komplement sistemi.

11.3. Antikorların çeşitliliğini belirleyen molekül sel mekanizmalar

Doğada antijen adayı maddelerin yüksek sayısı ile orantılı olarak bu maddeleri tanıyabilen özgün antikorların sayısının da yüksek olması gerekir. Bu denli çok sayıda antikor çeşidi organizmada nasıl oluşabilmektedir? Bu sorunun son yıllarda bulunan yanıtına geçmeden, konuyla ilgili bazı noktaların irdelenmesi yararlı olacaktır.

Antikorların bağlama bölgeleri hafif ve ağır zincirin değişken amino asit dizili bölümlerinden oluşur. Bu diziler ise antijen bağlama bölgesinin üçboyutlu yapısını ve de antijen özgünlüğünü belirler. Antijen bağlama bölgesinde iki zincirin değişken dizilerinin bir araya gelmesi özgünlüğün çeşitlenmesinde büyük bir ekonomi sağlar. Bu dizilerin çeşitli düzenlenişlerle bir araya gelmesi antikor olasılıklarını üstel olarak artırır. Örneğin, 10^3 değişik hafif ve 10^3 ağır zincirin değişik tertiplerle oluşturabileceği antikor olasılığı 10^6 olacaktır. Ancak, biner (hatta yüzer) farklı hafif ve ağır zincir geninin varlığı bile, bu zincirlerin değişmez bölümleri ile bağdaşmaz gözükmemektedir. Zira, değişmez bir amino asit dizisini şifreleyen ve genomda çok kez yinelenen bir genin mutasyona uğramaması olası değildir. Ayrıca, değişmez bölümlere özgü alotiplerin Mendel kurallarına uygun segregasyonu da değişmez bölümü şifreleyen çok sayıda gen düşüncesiyle uyumamaktadır. Zincirlerin değişken ve değişmez nitelikteki iki ayrı bölümden meydana gelmeleri ise, bu zincirlerin 1 gen $\rightarrow$ 1 polipeptit kuralına bağlı olamayacağını ortaya koymaktadır. Ancak, bütün bu noktaları ökaryot genlerinin ekson ve

intronlardan oluşan özel yapı düzeni ile açıklamak mümkündür. Değişken bölümü şifreleyen farklı ve çok sayıda ekson bulunabilir. Bunlar değişik tertiplerde değişmez bölümü şifreleyen tek (ya da çok az sayıdaki) ekson(lar)la birleşebilir. Bu düşünce, ilk kez Dreyer ve Bennet tarafından önerilen bir modelde dile getirilmiştir (Şekil 11-15). Bu araştırmacılar, bir antijene karşı birincil yanıt sırasında, önplanda, IgM sınıfı, ikincil yanıt sırasında ise, IgG sınıfı antikorların oluşmasına bir açıklama getirmeye çalışmıştır. Yukarıda da anlatıldığı gibi, IgM ve IgG sınıfı antikorların (λ ve K tipi) hafif zincirleri ortak olmakla birlikte, (μ ve γ tipindeki) ağır zincirleri, değişmez bölümlerinin birincil yapıları açısından, farklıdır. Aynı antijen ile etkileşim göstermeleri, IgM ve IgG moleküllerinin ağır zincirlerinin değişken bölümlerinin (farklı sınıf özellikleri gösteren değişmez bölümlerine karşın) ortak olduğunu ortaya koyar. Dreyer ve Bennet modelinde, sözkonusu $\text{IgM} \rightarrow \text{IgG}$ değişikliği, değişken bölge eksonunun birincil yanıtta μ -eksonu ile, ikincil yanıtta ise γ -eksonu ile birleşmesiyle açıklanmıştır (Şekil 11-15).

Dreyer ve Bennet modelinin ana hatlarıyla geçerliliği rekombinant DNA teknikleriyle gösterilmiştir. Bu tekniklerin kullanıldığı çalışmalar son 15 yıllık sürede ayrıca antikor çeşitliliğine ilişkin soruya da ayrıntılı yanıtı getirmiştir. Bu çalışmalar hafif zincir genleri (insanda (λ) 22. ve (κ) 2.kromozom) ve ağır zincir genleri (insanda 14.kromozom) üzerinde yürütülmüştür. Bulgular, değişken bölümlerin farklı bölgelerine karşılık gelen (birden) çok sayıda gen segmentinin varlığını ortaya koymuştur. Bunlar, yukarıda da irdelendiği gibi, değişik tertiplerde birleşerek (**=somatik rekombinasyon**) antikor çeşitliliğini sağlar. κ

genlerini kapsayan DNA, bölümlerinde değışken bölümlerin NH₂-ucundan başlayarak ilk 98 amino asidi şıfreleyen 150-250 farklı gen segmenti (ekson) bulunur. Değışkenlik (“variability” ya da kısaca V) segmentleri olarak adlandırılan bu segmentler birbirlerinden büyük (10-15 kbç) uzaklıklarla ayrılmıştır.

Şekil 11-15. Dreyer ve Bennet Modeli.

Her V-segmentinin önünde, sentezlenecek zincirlerin endoplazmik retikuluma aktarımını sağlayacak olan öncü amino asit dizisini (“leader sequence”) şifreleyen L-segmenti bulunur. V-segmentlerini, henüz belirlenemeyen bir uzaklıkta, beş farklı birleştirici (“joining” ya da kısaca J-) gen dilimi izler. Değişken bölümlerin son 12 amino asidini şifreleyen J-segmentleri birbirlerinden 300-350 bp uzunlukta intron bölgelerce ayrılmıştır. Sonuncu J-segmentinin (J κ_5) 2 kb gerisinde ise, yukarıdaki irdelemeleri doğrular biçimde, sabit bölümü şifreleyen tek bir (“constant” ya da C) segmenti bulunur (Şekil 11-16). Ancak, açıklanan bu düzen embriyonik DNA’ya özgüdür. Farklılaşmış lenfositler, plazma hücreleri ya da miyelom hücrelerinde ise V-segmentlerinden birinin rastlantısal olarak J-segmentlerinden biriyle birleşmiş olduğu gözlenir. Buna göre, zincirlerin değişkenliği ve lenfositlerin özgülleşmesi somatik (V/J) rekombinasyonuyla belirlenmektedir. V/J birleşme noktasındaki esneklik (birleşmenin her zaman aynı nükleotit yerine bir iki nükleotitlik kaymalarla gerçekleşmesi) bu noktadaki amino asidin özellikle değişken olmasını sağlar. Nitekim, buradaki dizi, antijen bağlama bölgesini oluşturan en değişken üç diziden birine karşılık gelir. Belirli farklılıklara karşın, λ lokusunda benzer bir düzen bulunur.

Ağır zincir genlerinde durum daha karmaşıktır. Ağır zincirlerin NH₂-uçlarından başlayarak ilk 88 amino asidi şifreleyen yaklaşık 80 V-geni bulunur. Ağır zincirlerin 89.-97. amino asidi arasındaki bölüm ise, sayıları 50 civarında olan çeşitlilik (“diversity” ya da D) geni tarafından, 97.amino asitten 110.’u amino aside dek uzanan bölüm ise 6 değişik J-geni tarafından şifrelenir. Ağır zincirlerin değişken bölümlerini

şifreleyen bu bölgeyi sırayla, ağır zincirlerinin sabit bölgelerini şifreleyen, μ , δ , γ , ε ve α genleri izler (Şekil 11-17).

Şekil 11-16. Hafif zincir genleri arasında somatik rekombinasyon.

Sabit bölge genlerinin herbiri ayrı bir “domain”e karşılık gelen üç ekson içerir. V/D/J birleşmeleri çok sayıda olasılığın ortaya çıkmasını mümkün kılar. Aynı şekilde, V/D ve D/J kaynaşma noktalarındaki esneklik bu noktalara karşılık gelen kodonların özellikle değişken olmasını sağlar ve

dolayısıyla olasılıkların artmasına neden olur. Somatik rekombinasyon, böylelikle hafif zincirlerde (K zincirlerinde) $150(V) \times 5(J) \times 3(V/J \text{ esnekliği}) \sim 2250$ değişik olasılığın, ağır zincirlerde ise $80(V) \times 50(D) \times 5(V/D \text{ esnekliği}) \times 6(J) \times 5(D/J \text{ esnekliği})$ yaklaşık 600000 değişik olasılığın ortaya çıkmasını olanaklı kılar.

Hafif (~ 2250) ve ağır (~ 600000) zincirlerin de değişik tertiplerle birleşmeleri, değişik antijen özgünlüğüne sahip, yaklaşık 1.4×10^9 değişik antikor çeşidinin (ve değişik özgünlükte B-lenfosit çeşidinin) ortaya çıkmasına olanak sağlayacaktır.

Miyelom hücrelerinin normalde belirli V/J hafif zincir ve V/D/J ağır zincir kombinasyonlarına sahip olmaları beklenir. Ancak, kültürde çoğaltıldıkları zaman, bu hücrelerden, birbirlerinden farklılaşan ve yeni antikor çeşitleri salgılayan, soylar türediği gösterilmiştir. Bu bulgu, belirli değişken bölgeleri şifreleyecek biçimde düzenlenmiş hafif ve/ya da ağır zincir genlerinin zaman içinde somatik (nokta) mutasyonlara uğradığını ortaya koymaktadır. Bu mutasyonlar özellikle çok değişken dizileri etkiler. Bu dizilerin yaklaşık 30 amino asitlik bir uzunluğu olduğu ve mutasyonların 10 farklı amino asit çeşidinde değişikliklere yol açtığı varsayarsa, ortaya 10^{30} olasılık çıkacaktır. Buna göre, somatik rekombinasyonların ötesinde devreye giren bir **somatik mutasyon** mekanizması antikor çeşitliliğini çok daha yüksek düzeylere çıkarır.

Şekil 11-17. Ağır zincir genleri arasında somatik rekombinasyon. IgM → IgG geçişi.

Somatik mutasyon mekanizması bağışıklama sürecinde yüksek ilginlikli yeni antikor çeşitlerinin gelişmesini olanaklı kılar.

Hafif zincir genlerinde V/J, ağır zincir genlerinde ise V/D ve D/J birleşmelerini sağlayan somatik rekombinasyonun molekölse mekanizmaları bir ölçüde aydınlanmış bulunmaktadır. V, D ve J

genlerinin iki yanlarında yedilik bir -CAC(A)GTG- dizisi ile bundan 12 ya da 23 baz çiftlik bir ara bölgeyle ayrılan dokuzluk bir -ACATAACC- dizisi bulunur. Bu dizilerin DNA çift sarmalındaki bir düzenlemeyle ilmi yapı düzenine dönüşmesi kırpma sürecini kolaylaştırır. Böylece V, (D) ve J segmentleri (doğal olarak değişik kombinasyonlarda) bitişik konuma gelerek değişken bölümü şifreleyen bir gene dönüşür (Şekil 11-18).

Her lenfosit, iki hafif (κ ve λ) zincir ve bir ağır zincir gen bölgesine (lokusa) ve ayrıca her lokus için iki allele sahiptir. Somatik rekombinasyonun lenfositin özgülleşmesi sürecinde her lokusta ve allele diğerlerinden bağımsız, ancak onlara koşut yürüdüğü düşünülmektedir. Bu durumda lenfosit içinde 4 çeşit (2κ ve 2λ) hafif zincir ve 2 çeşit ağır zincirin ve bunların değişik olasılıklarda birleşmesiyle 32 değişik antikor çeşidinin meydana gelmesi sözkonusu olacaktır. Ancak, her lenfositin yalnızca tek tipte ve özgülükte antikor sentezlediği bilinmektedir. **Allellerin dışlanması (“allelic exclusion”)** olarak tanımlanan bu olgu, hafif ve ağır zincir genlerindeki rekombinasyon olaylarının yüksek hata olasılığından kaynaklanabilir ve meydana gelen düzenlenmelerin çoğu anlamsız nitelikte olabilir. Somatik rekombinasyonun tamamlandığı ilk allelin ürününün diğer allelleri baskılaması bu bağlamda düşünülebilecek diğer bir olasılıktır.

Şekil 11-18. İntronların uç dizileri ve V/J, V/D ve D/J birleşmeleri.

Diğer yandan, birincil yanıtta ortaya çıkan μ zincirleri DNA düzeyinde etkili bir geri besleme “feed-back” mekanizması üzerinden değişken bölge (V/D/J) geninin γ (ya da diğer) genlerle birleşmesine yol açacak yeni bir rekombinasyon sürecini (dolayısıyla IgM $\rightarrow$ IgG geçişini) tetikleyebilir.

T-reseptörü üzerindeki çalışmalar, antikor moleküllerinin yapı ve genleri üzerindeki çalışmaları, yukarıda da belirtildiği gibi, oldukça gecikmeli olarak izlemiştir. Ancak, son yıllarda bu konuda da önemli ilerlemeler sağlanmıştır. T-reseptörü α (molekül ağırlığı 27000 dalton)

ve β (molekül ağırlığı 32000 dalton) olarak tanımlanan, glikosillenmiş, iki polipeptit zincirinden oluşan bir heterodimerdir. α ve β zincirleri, antikor zincirlerinde olduğu gibi, NH_2 -ucuna yönelik bir değişken ve COOH -ucuna yönelik bir sabit bölümden meydana gelmektedir. Hücre yüzeylerinde, yani antijenle etkileşebilecek konumda bulunan değişken bölüme karşın, sabit α -sarmal yapılı dizi membranı boylamasına geçer (membran içi altbölüm), COOH -uçları ise sitoplazmaya sarkar (sitoplazmik altbölüm) (Şekil 11-19).

Şekil 11-19. T-lenfosit reseptörü.

T-reseptörlerinin α ve β zincirlerinin değişken bölgelerinin çeşitliliği de antikorun moleküllerinde olduğu gibi çok sayıda V, D ve J geninin değişik olasılıklarla somatik rekombinasyon mekanizmasıyla birleşmesiyle ortaya çıkar (Şekil 11-20).

Şekil 11-20. T-reseptör genleri.

11.4. T-lenfositleri

Reseptörleri tarafından belirlenen antijen özgünlüklerinin yanı sıra T-lenfositleri işlevleri açısından üç altsınıfa ayrılır:

1) Sitotoksik T-lenfositleri: Eylem hücreleri niteliğinde olup, yabancı

hücreleri ya da aynı organizmanın (ya da soyun) virüs ile infekte olmuş

hücrelerini doğrudan etkiyle öldürür.

2) Yardımcı (“Helper”) T-lenfositleri: Düzenleyici nitelikte olup, humoral bağışık yanıtın ve/ya da sitotoksik T-lenfositlerine dayalı hücrel yanıtın oluşmasına yardımcı olur, makrofajları aktifleştirir.

3) Süpresör T-lenfositleri: Gene düzenleyici nitelikte olup, B- ve T-lenfositleri tarafından başlatılan yanıtları baskılar.

T-lenfosit alt sınıf temsilcileri, taşıdıkları yüzey proteinlerine göre de tanımlanırlar: yardımcı T-lenfositleri CD4, süpresör ve sitotoksik T-lenfositleri ise CD8 yüzey proteinlerine sahiptir. Bu yüzey antijenleri, T-lenfositlerinin antijenleriyle etkileşiminde belirleyici rol oynar.

T-lenfositlerinin antijenle etkileşimi T-reseptörü üzerinden (ve tıpkı B-lenfositlerinde olduğu gibi) özgün biçimde gerçekleşir. T-

lenfositleri bu etkileşim üzerine genel etkinlikte, belirli bir antijene (epitopa) özgünlüğü olmayan protein molekülleri salgılar (Şekil 11-21). Bu tür, T-lenfositlerince salgılanan proteinler kapsamına interlökinler ve perforin girer. Küçük miktarlarda salgılanmaları ve düşük derişimleri nedeniyle bu proteinler T-lenfositlerinin yakın çevrelerinde etkili olabilir. Buna karşın,

Şekil 11-21. B- ve T-lenfositlerinin antijen tanıma ve yanıt verme şekilleri. yukarıda görüldüğü gibi, antikor molekülleri B-lenfositleri (plazma hücreleri) tarafından büyük miktarlarda sentezlenerek salgılanır. Güdümlü bir mermi gibi antijeni, özgün epitopları üzerinden, organizmanın uzak köşelerinde bile tanır.

11.5. T-lenfositleri ve ana doku uyuşum kompleksi (“major histokompatability complex (MHC)”)

T-lenfositlerinin antijenlerini özgün reseptörleri aracılığıyla tanıyıp, yanıt oluşturmalarında MHC proteinlerinin aracılığı gereklidir.

MHC kompleksi MHC1 ve MHC2 olarak iki ana gruba ayrılır. Her iki grubun temsilcileri de T-reseptörleri gibi transmembran konumlu iki değişik çeşit polipeptit zincirinden oluşur. Normalde tüm çekirdekli vücut hücrelerinin yüzeylerinde bulunan MHC1 daha önceden tanımlanmış transplantasyon antijenlerine karşılık gelir. MHC1 böylece bireyler arasında doku (ya da organ) aktarımının sonucundan öncelikle sorumludur. Bunun ötesinde, sitotoksik T-lenfositlerinin virüsle infekte olmuş hücreleri tanımları, virüs antijenlerinin bu hücrelerin yüzeylerinde, bireye özgü MHC1 antijenleriyle birlikte konumlanmalarıyla (“sunulmalarıyla”) olanaklı olmaktadır (Şekil 11-22).

MHC2 sınıfı antijenler ise, MHC1 sınıfı antijenlerin aksine, bağışık sistemin temsilcileri olan hücrelerin (makrofajlar, B- ve T-lenfositleri gibi) yüzeylerinde bulunur. Yardımcı T-lenfositlerin bağışık yanıtı oluşturan lenfositleri (B- ya da T-eylem hücrelerini) uyarmalarını sağlar. Ancak, bu süreçte, yardımcı T-lenfositlerinin önce, antijeni içine alıp sindirdikten sonra epitoplari yüzeylerinde sunan makrofajlar gibi,

Şekil 11-22. Sitotoksik T-lenfositleri yalnızca özgül virüs epitoplarnı kendilerinden olan (MHC1 uyumlu) somatik hücre yüzeylerinde gördüklerinde etkin olabilmektedir.

“sunucu hücreler” tarafından uyarılmaları gerekir. Yardımcı T-lenfositlerinin sunucu hücreler tarafından uyarılabilmeleri epitoplarn bu hücrelerin yüzeyinde MHC sınıf 2 antijenleriyle birlikte bulunmalarına bağılıdır (Şekil 11-23).

Şekil 11-23. Yardımcı T-lenfosit özgül epitopunu ancak sunucu hücrelerin yüzeyinde MHC sınıf 2 antijenleriyle birlikte tanır.

MHC sınıf 1 antijenleri insanda HLA (insan lökosit antijenleri “human leukocyte antigens”) genleri HLA-A, HLA-B ve HLA-C, MHC sınıf 2 antijenleri ise HLA-D genleri tarafından şifrelenir (Tablo 11-2).

	Sınıf 1	Sınıf 2
Gen lokusu (insanda)	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-D
Kromozom (insanda)	6	6
Altbirim yapısı	45000 daltonluk bir glikoprotein + β_2 -	α -zinciri (33000 dalton) + β -zinciri

	mikroglobulin	(28000 dalton)
Konum	Bütün çekirdekli vücut hücre yüzeyleri	B T-lenfositleri ve makrofajların yüzeylerinde
Antijenle birlikte sunulduğu hücre	Sitotoksik T-lenfositleri	Yardımcı T-lenfositleri
Polimorfizm	+++++	++

Tablo 11-2. MHC sınıf 1 ve 2 glikoproteinlerin özellikleri.

Bu genlerin çok polimorfik olmaları (yani her gen için düzinelerle değişik allelin bulunmasıyla) göze çarpar. Bu polimorfizm bir seleksiyon baskısından kaynaklanabilir. Bağışık sistem ile mikroorganizmalar arasındaki savaşta mikroorganizma ya da virüsler, bir yandan özgün lenfositleri uyaran epitoplarından, diğer yandan antijenlerinin MHC antijenleriyle etkileşimi için gerekli bölgelerinden kendilerini arındırma özelliği gösterir. Bu koşullar yerine geldiğinde “kılıf” değiştiren patojenlerin büyük kıyımlara yol açacak salgınlara neden olmaları beklenebilir. Polimorfizm böyle durumlarda patojenlerin yeni kılıfıyla birleşebilecek MHC moleküllerine sahip bireylere, dolayısıyla türe, varlığını sürdürülme yönünde bir güvence oluşturabilir.

Yukarıda da belirtildiği gibi, aktifleşmeleri özgün antijenle etkileşimlerine bağlı olmasına karşın, T-lenfositlerinin aktifleştikten sonra sentezleyip salgıladıkları proteinler (antikorların aksine), genelde antijen özgünlüğüne sahip değildir. Örneğin, sitotoksik T-lenfositleri, özgün (viral) antijenleri MHC sınıf 1 antijenleriyle birlikte yüzeylerinde taşıyan somatik hücrelere bağlandıktan sonra, işlevlerini salgıladıkları

perforin tipindeki proteinler aracılığıyla gerçekleştirir. Sitotoksik T-lenfositlerinin ve yakın işlevli katil T-hücrelerinin salgıladıkları perforin molekülleri hedef hücre membranına yerleşir. Bu proteinlerin Ca^{2+} varlığında polimerleşmesiyle meydana gelen kanal yapısındaki gözenekler hedef hücrenin kısa sürede litik ölümüne yol açar (Şekil 11-24 ve 11-25).

Antijen tarafından aktiveleştirilmelerini izleyen sürede, yardımcı T-lenfositlerinin sentezleyip salgıladıkları proteinler (interlökinler)de bağışıklık yanıtı kapsamlı biçimde etkiler (Tablo 11-3). Salgılanan interlökinler özgün reseptörlere sahip lenfositlere bağlanarak bunları aktiveleştirir. Buna göre, interlökinler yardımcı T-lenfositlerinin antijene yanıt olarak, bağışık sistemin çeşitli temsilcilerini aktiveleştirmek üzere salgıladığı, ancak, antikorların aksine, antijenle doğrudan etkileşmeyen proteinlerdir. İnterlökinler, yardımcı T-lenfositlerinin yanı sıra, sunucu nitelikli hücrelerce de, örneğin makrofajlarca, sentezlenir.

Şekil 11-24. Sitotoksik T-lenfositlerinin hedef hücreyi perforin aracılığıyla öldürmesi.

11.6. Bağışık yanıtın oluşumunda hücresel ve molekülse mekanizmalar

Genelde, bağışık yanıtın (humoral yanıt dahil) oluşumu için yardımcı T-lenfositlerinin işbirliğine gerek vardır. Bununla birlikte, T-lenfositlerinin varlığını gereksinmeyen humoral yanıtlar da bulunduğundan, humoral bağışık yanıt genelde T-lenfositlerinden bağımsız ve T-lenfositlerine bağımlı olmak üzere iki sınıfa ayrılır.

T-lenfositlerinden bağımsız humoral yanıt bakteri hücre duvarının öğelerinin (=poliklonal B-hücresi aktiveştiricilerinin) varlığında gerçekleşir. Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) kesimleri bu tür etkileriyle

Şekil 11-25. Komplement sistemi öğeleri ile perforinin etki mekanizmalarındaki benzerlik.

tanınır. Bakteriyel LPS'e bağlı antijenin yanı sıra, T-hücrelerinden bağımsız humoral yanıt düzenli biçimde yinelenen yapıları (epitopları) taşıyan (çok değerlikli) başka antijenlere karşı da gerçekleşir. Bu tip yanıtın oluşumunda belirtilen tür çok değerliklik antijenin, B-lenfositinin yüzey antikorlarıyla eşzamanlı etkileşerek bunlar arasında köprü tipinde bağlantılar kurması önem taşır (Şekil 11-26). Bu şekilde birleşme çok değerlikli antijenin yüzey antikorları ile birlikte endositoz yoluyla hücre içine alınmasına ve dolayısıyla aktifleşme için gerekli olan uyarıya yol açar.

	Molekül ağırlık (dalton)	Biyolojik etki	Kaynağı
IL-1	15000	timüs hücrelerinin çoğalması;pirojen etki;IL-2 indüklenmesi	makrofajlar, monositler, B-lenfositleri
IL-2	15000	T-lenfosit çoğalması, (G ₀ evresinden çıkış)	aktifleşmiş T-hücreleri
IL-3	25000	hemopoetik kök	aktifleşmiş T-lenfo-

		hücrelerinin farklılaşması	sitleri ve miyelomatositik lösemi hücreleri (WEHI-3)
IL-4 ("B-cell stimulating factor 1") (BSF-1))	20000	B-lenfositlerinin aktifleşmesi; B-hücreleri üzerinde MHC2 antijenlerinin sergilenmesi	aktifleşmiş yardımcı T-hücreleri
IL-5 ("B-cell growth factor 2") (BCGF-2))	50000	B-lenfositlerinin çoğalması ve olgunlaşması	IL-4 gibi
IL-6 ("B-cell stimulating factor 2") (BSF-2))	25000	B-lenfositlerinin Ig-salgılayan hücrelere dönüşmesi	Yardımcı T-lenfositleri ve makrofajlar
IL-7	17000	T-lenfositlerinin çoğalma ve farklılaşması. B- ve T-lenfosit gelişiminin düzenlenmesi	(?)
IL-8	8000	Nötrofillerin endotelial hücrelere yapışmasını sağlar	Monositler, fibroblastlar
IL-9	(?)	T-hücre soylarının yaşamalarını ve eritroit koloni oluşumunu sağlar	(?)

Tablo 11-3. Bazı interlökinler (IL)in özellikleri.

Şekil 11-26. Çok değerlikli antijen lenfosit etkileşimi.

Genelde, çözünmüş olarak bulunan ve yüzeylerinde sınırlı sayıda epitop taşıyan antijenlere karşı humoral yanıtın oluşumu yardımcı T-lenfositlerinin işbirliğini gerektirir. Bu işbirliği, B-lenfosit ile aynı antijen üzerindeki başka epitoplarla etkileşen yardımcı T-lenfositlerinin arasında gerçekleşebileceği gibi (Şekil 11-27, Şık 1), aynı epitopa özgü T-lenfositlerinin yardımıyla da (Şık 2) gerçekleşebilir. İkinci şıkta B-lenfosit ilk aşamada yüzey antikorlarıyla bağladığı antijeni endositozla içine alır. Antijenin hücre içinde sindirimini (işlenmesini) ikinci aşamada özgün epitopların MHC sınıf 2 antijenleriyle birlikte yeniden hücre yüzeyinde sunulması izler. Her iki mekanizmada da özgün B- ve T-lenfositlerinin işbirliği için yakın konuma gelmeleri gerekmektedir. B-lenfositinin böylelikle yardımcı T-lenfosit tarafından salgılanan IL-4, IL-5 ve IL-6 gibi interlökinlerin uyarıcı etkisiyle aktifleşmesi ve klonal seleksiyona yönelik sürecin başlaması olanaklı olur.

Şekil 11-27. B-lenfositlerinin T-lenfositleri tarafından aktifleştirilmesi (Şık 1).

Mekanizmayı bir adım daha öteye giderek makrofajların işbirliğini de içerecek biçimde genişletmekle organizmada gerçekleşen olayları daha uygun biçimde yansıtan bir model geliştirilebilir. Bu modelde, aynı antijeni alıp işleyerek, özgün epitoplarını MHC sınıf 2 antijenleriyle birlikte yardımcı T-lenfositine sunan makrofajların eklenmesiyle, B-lenfosit, makrofaj ve arada yardımcı T-lenfositinden oluşan gruplaşmalar meydana gelir. Bu düzende, ek olarak makrofajlar tarafından da uyarılan yardımcı T-lenfosit ikinci aşamada B-lenfositini daha etkin biçimde uyarabilecektir (Şekil 11-28).

Yardımcı T-lenfositleri, makrofajlarla etkileşimleri sonucu, salgıladıkları IL-2 üzerinden ayrıca özgün sitotoksik T-lenfositlerini (CTL) uyarabilir ve bu yolla hücrel yanıtın şiddetini düzenleyebilirler (Şekil 11-29).

Şekil 11-28. B-lenfositlerinin T-lenfositleri tarafından
aktifleştirilmesi.

Şekil 11-29. Yardımcı T-lenfositleri aracılığıyla
sitotoksik T-lenfositlerinin (CTL)
uyarılması.

11.7. Bağışık yanıtın düzenlenmesi

Antijenik uyarı üzerine başlayan (lenfositlerin çoğalmasına ve özgün antikorların oluşumuna bağılı) bağışık yanıtın fizyolojik sınırlar içinde kalmasını güvence altına alan çeşitli mekanizmalar mevcuttur (Şekil 11-30).

Şekil 11-30. Bağışık yanıtın düzenlenmesi.
Sayılar metinde
açıklanan düzenleme mekanizmalarına karşı-
lık gelmektedir.

Bu mekanizmalar,

- 1) oluşan antikorların antijene bağlanarak onu etkisizleştirmesini;
böylelikle serbest antijen derişiminin ve dolayısıyla bağışık yanıtı uyarıcı etkinin azalmasını (=negatif geri besleme (“feed back”)),
 - 2) antijenin katabolik yıkımıyla uyarıcı etkinin ortadan kalkışını,
 - 3) bağışık yanıtı oluşturan B-lenfositlerinin etkinliğinin süpresör T-lenfositleriyle baskılanmasını,
 - 4) bağışık (humoral) yanıtın idiyotipik bölgelerine karşıt (anti-) idiyotipik antikorların oluşumunu,
- kapsar.

11.8. Anti-idiotipik sistem

Protein nitelikleriyle antikorların kendileri de antijenik bölgelere sahiptir. Özellikle antikor moleküllerinin antijen bağlama bölgeleri (idiotipik bölgeler) aynı tür (ve de aynı organizmada) antijen olarak etki gösterebilir. Bir antikor molekülünün antijen bağlama bölgelerine aynı organizmada karşıt antikor moleküllerinin oluşabilmesi, bağışık reaksiyonların denetim altında tutulabilmesi için büyük önem taşıyabilir. Normalde, yani antijenin yokluğunda, özgün antikorlar organizmada çok az miktarlarda bulunduğundan, idiotipik bölgeye karşı antikorlar oluşmaz. Antijenin varlığında özgün antikorların serum derişimlerinin yükselmesi organizmada idiotipik bölgelere yönelik karşıt antikorların oluşmasına yol açar (Şekil 11-31). Bu mekanizma bağışık yanıtın sınırlı kalmasını ve yeniden gerilemesini sağlayabilir. Jerne'ye göre böyle bir antikor ve karşıt antikor moleküllerinden oluşan bir ağ sistemi bağışık reaksiyonların denetimi için önem taşır.

Şekil 11-31. Anti-idiotipik antikorların oluşumu.

11.9. Bağışık tolerans

Bağışık sistem yukarıda organizmaya yabancı makromoleküler yapıları tanıyabilen bir sistem olarak tanımlanmıştır. Bu tanımdan (ve organizmanın kendi makromoleküllerine karşı olan tepkisizliğinden) bağışık sistemin kendine özgü ve yabancı yapılar arasındaki ayırımı nasıl yapabildiği sorusu ortaya çıkmaktadır.

Organizmaya özgü makromoleküller bağışık sistemin yaşamın ilk evrelerinden başlayarak karşılaştığı yapılardır. Embriyonik süreçte özgünleşmelerini tamamlayan lenfositlerden bazılarının bu makromolekülleri de antijenik olarak tanınması beklenir. Genelde benimsenen düşünceye göre, bu şekilde uyarılan lenfositler (ve, böylece, onlardan türeyecek soylar) embriyonik evrede ortadan kaldırılır (**klonal delesyon**). Böylece bağışık sistemin yanıtı yalnızca doğum sonrası karşılaşılabileceği yapılarla sınırlanır. Gerçekten, deney hayvanları doğum öncesi ya da doğumun hemen sonrası evrede karşılaştıkları yabancı kaynaklı makromoleküllere karşı tepkisiz kalır. Antijen uyarısına

daha duyarlı olan T-lenfositleri, bu uyarılar tarafından B-lenfositlerine oranla, daha etkili ve hızlı biçimde aktifleşir. Bu nedenle, klonal delesyon önplanda T-lenfositleri üzerinde etkili olup, onların timüsteki olgunlaşma ve özelleşme sürecinde gerçekleşir. Timüs dokusunda organizmaya özgü antijenlerin MHC molekülleriyle birlikte sunulduğu, buna göre, özgün T-lenfositlerinin ortadan kaldırılışına) ve bunun sonucu bu antijenlere karşı tolerans oluşumuna yol açar. Yardımcı T-lenfositlerinin katkısı olmadan gerçekleşen antijen uyarısı ise, özgün B-lenfositlerinin aktifleşme yerine baskılanmasıyla sonuçlanır.

11.10. Otoimmün hastalıklar (öze bağışıklıktan kaynaklanan hastalıklar)

Bağışık sistemin embriyonik evrede fizyolojik ve anatomik nedenlerle karşılaşmadığı bazı hücre tipleri ve bunların içerdiği makromoleküllerle yaşamın daha ilerki dönemlerinde karşılaşması, bu makromoleküllere karşı antikorların oluşumuna yol açar. Örneğin ergenlik sonrası spermatogenezle oluşan sperm hücrelerine karşı, normalde, organizmadan yalıtılmış bir bölmedeki konumları nedeniyle, bağışık yanıt gözlenmez. Ancak, özel koşullarda (örneğin kısırlaştırma amaçlarıyla erişkin erkeklerde gerçekleştirilen vasktomu sonucu) sperm antijenlerine karşı antikor oluşumu gözlenebilir. Dolaşım sisteminden testis ölçüsünde yalıtılmamış organ ve hücrelerin özgün antikor oluşumuna neden olması olasılığı ise daha düşüktür.

Embriyonik evreden başlayarak bağışık sistemle karşı karşıya gelen bir dokunun makromoleküllerine karşı antikor oluşumunu baskılayan mekanizmaların araştırılmasında tiroit bezi ve tiroglobulin bir model sistemi olarak kullanılmıştır. Tiroit bezinin çıkarılmasından sonra

deney hayvanına verilen tiroglobulinin bu proteine yönelik antikorların oluşumuna yol açmadığı gösterilmiş, aynı deney tiroglobulinin Freund adjuvanı ile birlikte verilmesiyle yinelenmesi üzerine ise, özgün antikorların sentezlendiği gözlenmiştir. Freund adjuvanı ölü tüberküloz basilleriyle madensel bir yağdan hazırlanan emülsiyona karşılık gelir ve bağışık sistemi özgün olmayan biçimde uyarır. Freund adjuvanı tiroit bezi çıkarılmamış hayvanlarda da (tiroglobulinle birlikte zerkedildiğinde) özgün antikorların oluşumuna ve ayrıca tiroit bezinde (insanda kronik tiroit yangısını anımsatan) bir tepkimeye yol açar. Organizmanın kendi yapılarına özgü lenfositlerin embriyonik evrede yok edildiğini varsayan düşünceyle çelişkili gözükken bu bulgunun arkasında yatan mekanizma şu şekilde özetlenebilir:

Normalde, antijenlerce B-lenfositlerinin uyarılması ve özgün antikorların oluşumuyla ortaya çıkan humoral bağışık yanıt yardımcı (ve aynı antijen tarafından uyarılan) özgün T-lenfositlerinin varlığına gereksinim gösterir. Daha kolay uyarılabilmeleri, embriyonik evrede yok edilen lenfositlerin ön planda T-tipindekiler olmasını belirler. Buna karşın, B-lenfositleri yardımcı T-lenfositlerinin etkisi ortadan

Şekil 11-32. Otoimmün tepkinin oluşumuna ilişkin model.

kalktığından uyarılmaz ve yok edilmekten de kurtulur. Freund adjuvanı ise özgün olmayan bir mekanizmayla yardımcı T-lenfositlerinin işlevini üstlenir. Ayrıca, yapay yollarla hapten niteliğinde yeni antijenik bölgeler (örneğin sülfanilik asit) takılmış tiroglobulin molekülü de hayvana verildiğinde, bağışık yanıtı yol açar. Şekil 11-32’de gösterildiği gibi, tiroglobulin üzerindeki bu yeni epitop üzerinden tiroglobulinle etkileşen yardımcı T-lenfositleri özgün B-lenfositleri uyararak humoral yanıtı başlatır. Bu tür çalışmalardan esinlenerek insanda başlatılan araştırmalar oluşum nedeni bilinmeyen çeşitli hastalıkta öze yönelik antikorların bulunduğunu ortaya koymuştur (Tablo 11-4).

Hastalık	Antijen
Hoshimoto tiroyiditi (tiroyit bezi yangısı)	Tiroglobulin
Tiroyitoksikoz (Basedow-Graves hastalığı)	TSH-reseptörleri
Pernisiyöz anemi	İntrinsik faktör
Bazı hemolitik anemi tipleri	Eritrosit
İnsulin yetmezliğine dayanan şeker	Pankreas, β -adacıkları

hastalığı	
Miyastenya gravis	Asetil kolin reseptörleri
Multiple skleroz	Miyelin
Kronik hepatit	Karaciğer hücresi yüzey lipoproteinleri
Biliyer siroz	Mitokondri
Romatoyit artrit	IgG
Kollagen hastalıklar- Dermatomyosit Skleroderma Sistemik lupus eritematodes	Nukleoprotein DNA IgG

Tablo 11-4. İnsanda bazı otoimmün hastalıklar.

12. Hücre çoğalması ve kanser problemi

Döllenmiş yumurta hücresinin 10^{12} - 10^{14} arasında değişen hücreden oluşan bir yüksek canlıya dönüşmesi embriyonik gelişme sırasındaki hızlı hücre çoğalması sonucu gerçekleşir. Ancak, her fizyolojik olay gibi embriyonik evrede hücre çoğalması da belirli denetim ve düzenleme mekanizmalarına bağlıdır. Ergenliğe ulaşılmasıyla organizmanın doku ve organlarını oluşturan farklılaşmış hücreler çoğalmalarını büyük ölçüde yavaşlatır ya da tümüyle durdurur. Buna karşın, yapısal düzeninde meydana gelen özgün değişiklikler sonucu bir hücre organizmanın denetiminden çıkıp bağımsız biçimde çoğalmaya başlayabilir. Transformasyon olarak tanımlanan bu olay, kanserin başlangıç noktasını oluşturur. Özellikle, son 15 yıllık sürede yoğun biçimde yürütülen çalışmalar transformasyona yol açan mekanizmaların önemli ölçüde aydınlanmasına yol açmıştır. Bu bölümde önce hücre çoğalmasına ilişkin görüş ve bilgiler özetlenecek, daha sonra bu bilgilerin

ışığında kansere yol açan moleküler ve hücreler mekanizmalar ele alınıp irdelenecektir.

12.1. Hücre kültürü sistemleri

Yüksek canlı, çok sayıda farklılaşmış, değişik hücrenin ortaklaşa oluşturduğu bir bütün niteliğiyle, hücrelerin tek tek özelliklerinin incelenmesine uygun bir sistem değildir. Bu nedenle uzun yıllardan beri hücrelerin, bulundukları organizmaların dışında, in vitro yaşamalarını sağlayacak koşulların belirlenmesi ve geliştirilmesine çalışılmaktadır. Bu yüzyılın daha ilk yarısında doku parçalarını uygun ortamda uzun süre in vitro yaşatmak olanaklı olmuştur. 1940'lı yılların sonlarından başlayarak Earle, Eagle, Puck ve diğer bazı araştırmacıların önderliğinde hücreleri çoğaltabilmek için gerekli sistemler geliştirilebilmiştir. Bu çalışmalar sırasında hücrelerin çoğalabilmeleri için kültüre belirli bir yoğunlukla aktarılması gerektiği gözlenmiştir. Bu husus hücrelerin çoğalmaları için gerekli bazı faktörleri bulundukları ortama kendilerinin salgıladıklarını, yani otokrin olduklarını düşündürmüştür. Nitekim, baştan hacmi çok küçük tutarak (örneğin 0.1 ml) tek bir hücreyi bile çoğaltarak klon oluşturmak mümkün olabilmektedir. Ayrıca, çok sayıda hücrenin bulunduğu bir kültür ortamı, ikinci aşamada, besleyici ortam olarak, başka, seyrek sayıda hücrenin bulunduğu bir kültüre eklendiğinde hücre çoğalmasını uyaramaktadır. Günümüzde hücreleri kültürde çoğaltmak için gerekli bir kaynak olarak steril koşullarda alınmış fetal dana serumu kullanılmaktadır. İleride de görüleceği gibi, fetal serum içinde hücrelerin çoğalmaları için gerekli çeşitli protein faktörü (=hücre çoğalma faktörleri ("cell growth factors")) bulunur. Hücrelerin

bulundukları dokudan yalıtılarak kültürde (in vitro) çoğaltılabilmeleri için gerekli işlemler ise şu şekilde özetlenebilir:

- Dokunun mutlak steril koşullarda elde edilerek makas ya da skalpel aracılığıyla küçük parçalara ayrılması,
- Küçük doku parçalarının proteolitik bir enzimin aracılığıyla (örneğin tripsin ya da kollagenaz) sindirilmesi. (Böylelikle hücreler arasındaki protein nitelikli yatağın (intersellüler matriksin) sindirilerek hücrelerin açığa çıkarılması olanaklıdır).
- Hücrelerin düşük devirli, yinelenen santrifüj işlemleriyle fizyolojik bir tuz ortamında yıkandıktan sonra gene fizyolojik derişimlerde tuz ve vitamin içeren, pH'sı 7,4'e ayarlı ve doğal olarak fetal serum ve bir enerji kaynağı içeren bir ortamda (kültür medyum) 37°C'ta çoğalmaya alınması.

Tablo 12-1'de böyle bir kültür ortamının içeriğini görmek olanaklıdır. Eagle tarafından geliştirilen sözkonusu ortam fibroblast gibi hücrelerin çoğalmasında gerekli en az sayıda öğeyi içerdiği için (**temel Eagle ortamı**) ("**basal medium Eagle**") olarak tanımlanır. Bu ortamı çoğaltılacak hücrenin tipine ve gereksinimlerine göre ek katkı maddeleriyle zenginleştirerek başka ortamlar geliştirmek de olanaklıdır. Böyle bir ortamda canlı hücrelerin bir süre sonra hücre siklus süresine karşılık gelen 8-24 saat aralıklarla bölünerek sayılarını katladıkları görülür.

Dokudan hücre kültürüne alınan ilk hücreler **birincil (primer)** hücreler, birincil hücrelerden uygun ortam ve serum varlığında çoğalan hücreler ise **ikincil (sekonder)** hücreler olarak tanımlanır. İkincil hücreler, kültürde çoğalmalarının yanısıra, birbirleriyle ilişkilere girerek

alındıkları dokuları anımsatan yapılar oluşturur. İkincil hücreler, çoğalmaları için en uygun koşullarda bile, genelde (alındıkları türe, dokuya ve bireyin yaşına bağlı olarak) 30 ile 50 bölünmeden sonra, çoğalmalarını durdurarak ölürler. İkincil hücrelerin organizma içindeki yaşama sürelerinin normalde geçirecekleri bölünme sayısına bir şekilde yansıdığı kabul edilir. Buna göre, normal hücrelerin kültürdeki sınırlı yaşamları, hücre yaşlanması ve ölümünde etkin mekanizmaları molekül düzeyde incelemek için uygun bir sistem oluşturmaktadır.

Normal hücrelerin sabit sayıda hücre bölünmesini geçirdikten sonra ölmelerine karşın, ikincil hücrelerden türeyen bazı hücreler,

Öğeler	Derişim (mg/litre)
L-Arginin HCl	21,06
L-Sistin disodyum tuzu	14,20
L-Glutamin	292,30
L-Histidin HCl H ₂ O	10,50
L-İzolösin	26,23
L-Lösin	25,23
L-Lizin HCl	36,53

L-Metyonin	7,46
L-Fenilalanin	16,51
L-Treonin	23,82
L-Triptofan	4,08
L-Tirozin disodyum tuzu	22,51
L-Valin	23,43
Biotin	1,00
D-Ca-pantotenat	1,00
Kolin klorit	1,00
Folik asit	1,00
İ-Inositol	2,00
Nikotinamit	1,00
Piridoksal-HCl	1,00
Riboflavin	0,10
Tiamin-HCl	1,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	264,90
KCl	400,00
KH ₂ PO ₄	60,00
MgCl ₂ .6H ₂ O	170,70
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,00
NaCl	6800,00
NaHCO ₃	1680,00
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	158,30
Na ₂ HP0 ₄	47,50
Fenol kırmızısı sodyum tuzu	17,00
Sodyum suksinat.6H ₂ O	100,00
Suksinik asit	75,00
Kolin bitartarat	1,80
D-Glukoz	1000,00

Tablo 12.1. Temel Eagle ortamı

sınırsız biçimde çoğalabilir. Bu şekilde “ölümsüzlük” özelliği kazanmış hücre soyları (**yerleşik hücre soyları “established cell lines”**) olarak tanımlanır. Normal somatik hücreleri yerleşik hücre soylarına dönüştürerek sınırsız olarak kültürde tutmadaki zorluklara karşın, kanser hücreleri en önemli bir özellikleri olarak baştan ölümsüzlük, sınırsız bölünme yeteneği gösterir

12.2. Hücre siklusü

Hücre siklusü, hücre bölünmesi ve ara evre (interfaz) olarak iki ana bölüme ayrılır. Ara evre boyunca hücre kütlesini yaklaşık ikiye katlar ve mitoz için gerekli molekülleri de sentezledikten sonra bölünme sürecine girer. Ara evre kendi içinde G1 (“gap(ara)phase 1”), S (sentez) ve G2 (“gap(ara)phase 2”) olmak üzere üç alt evreye ayrılır (Şekil 12-1).

Şekil 12-1. Hücre siklusünün evreleri.

Yoğun biyosentetik olaylar bu üç alt evrede de gözlenmekle birlikte, S evresi adını önplanda kalıtsal bilginin katlandığı, yani DNA’nın sentezlendiği, evreye karşılık gelmesine borçludur. Genelde kabul edilen görüşe göre her evrede bir sonraki evrenin başlaması için gerekli moleküller sentezlenir.

Kültürdeki hücreleri belirli bir alt evrede toplamak olanaklıdır. Bu amaçla, hücre siklusü (örneğin, kolsemit ile mitozda, amino asit gibi biyosentezde kullanılan yapıtaşlarının kısıtlanmasıyla G1 evresinde, timin derişiminin artırılmasıyla -substrat fazlalığının yol açtığı

inhibisyonla-S evresinde) durdurulabilir. Ayrıca, mitoz evresindeki hücreler bulundukları katı yüzeylerden ayrıştırılıp ortama geçirilerek, toplanabilir. Böyle belirli bir evrede toplanmış hücreler çoğalmaları için gerekli koşullar sağlandığında eşzamanlı (senkron) olarak aynı evrelerden geçerler. Mitoz evresinde bulunan hücreler ile hibritleme işlemiyle (bakınız aşağıda) birleştirildiklerinde, G1 evresindeki hücrelerin çekirdeklerindeki kromatinin yoğunlaşarak kromozom yapılarına dönüştüğü gözlenebilir. Buna göre, mitoz aşaması pozitif denetim altında olup, mitozun gerçekleşmesi için bazı **“mitogenik”** faktörlerin, örneğin G2 evresinde, sentezi gerekmektedir. Bu faktörler **“trans”** nitelikleriyle başka evrelerde bulunan hücreler üzerinde de etkin olabilmektedir.

Hücre siklüsü kültürde en uygun koşullar altında 8-10 saatte tamamlanabildiği gibi, koşullara bağlı olarak 100 günde bir ya da daha seyrek gerçekleşebilir. Bazı, nöronlar gibi, farklılaşmış hücrelerde çoğalma tümüyle durmuş olabilir. Bulgular hücre siklüsünün süresinin düzenlendiği evrenin G1 evresi olduğunu göstermektedir. Besin maddelerinin kısıtlandığı, ortama serum eklenmediği, hücrelerin kültürde çoğalarak birbirleriyle temas kurdukları (=kontakt inhibisyonu) ya da hücrelerin yaşlandığı koşullarda, hücre siklüsünün G1 evresinde durduğu gözlenir. Aynı husus çoğalmalarını durdurmuş olan farklılaşmış hücreler için de geçerlidir. Böyle hücrelerde G1 yerine G0 evresinden de söz edilir.

Hücre siklüsünün toplam süresi hücrelerin kültürde sayılarının ikiye katlandığı süreye karşılık gelir. Radyoaktif timidinin kullanımıyla S evresinde bulunan hücreleri işaretlemek mümkündür. Otoradyogram

yoluyla belirlenen bu hücrelerin sayılarının toplam hücrelerin sayısına oranı X toplam hücre siklusu süresi, S evresinin süresini verir. Aynı şekilde, bölünmeleri sırasında yüzeylerden ayrışarak üstsıvıya geçen hücrelerin sayısının toplam hücre sayısına oranı X toplam hücre siklusu süresi, mitoz evresinin süresini verecektir. Mitozda üstsıvıda toplanan hücrelerin S evresine (bakınız timidinle işaretleme) dek geçirdikleri süre ise $G1$ evresine eşittir. $G1$, S ve M evrelerinin toplamının hücre siklusu süresinden çıkarılmasıyla da $G2$ evresi hesaplanabilir. Böylece, 24 saatlik bir hücre siklusunda $G1$, S , $G2$ ve M evrelerinin süreleri yaklaşık 10, 8, 4 ve 2 saat olarak bulunacaktır.

12.3. Hücre çoğalma faktörleri-sinyal iletim yolları

Yukarıda belirtildiği gibi, fetal serum, hücrelerin kültürde çoğalabilmeleri için gerekli olan faktörlerin kaynağı olarak kullanılır. Bu faktörler son yıllarda saflaştırılarak tanımlanmaya başlanmıştır. Bunlardan bazıları normal erişkin organizmada dokunun zedelenmesi üzerine açığa çıkarak yaraların kapanmasında etkili olur. Diğer bazıları, genelde çoğalma özelliklerini koruyan, hematopoetik ya da epitel hücreler üzerinde etkilerini gösterir. Hepsi polipeptit nitelikli olan bu faktörlerin bir bölümü Tablo 12-2’de verilmektedir.

Adı	Biyolojik işlev
- PDGF (=“Platelet-derived growth factor”)-trombosit kaynaklı çoğalma faktörü)	Mezenşim kökenli hücreler için mitogen
- EGF (“epidermal growth factor”) - epidermal çoğalma faktörü)	Ektoderm ve mesoderm kökenli hücreler için mitogen

- TGF-A (=“transforming growth factor”) -transforme edici nitelikli çoğalma faktörü)	EGF’ye benzer etki ve yapı. Kanseri hücrelerinde yüksek düzeylerde bulunur.
- TGF-B (=“transforming growth factor”) -transforme edici nitelikli çoğalma faktörü)	Bazı hücreler için mitogen,diğerleri için inhibitör niteliğinde
- NGF (=“nerve growth factor”) -sinir büyüme faktörü)	Sempatik sistem ve embriyonik nöronların gelişimi
- IGF-I (=“Insulin-like growth factor I”) (Somatomedin C) -İnsüline benzer çoğalma faktörü	Büyüme hormonunun etkisiyle karaciğerde sentezlenen ve bu hormonun iskeleti uzatıcı etkisini gerçekleştiren faktör
- IL-1-4	(bak Immunoloji)
- GM-CSF (=“granulocyte macrophage colony stimulating factor”)	Granülosit ve makrofaj öncülerinin çoğalması
- G-CSF (=“granulocyte colony stimulating factor”)	Granülositlerin oluşumu
- M-CSF (=“macrophage colony stimulating factor”)	Makrofajların oluşumu
- Eritropoetin	Eritrositlerin yaklaşık (pro)eritroblast aşamasından itibaren olgunlaşması

Tablo 12-2. Bazı hücre çoğalma faktörleri.

Hedef hücrelerde bu faktörler çok yönlü etkilere yol açar ve özgün genlerin aktifleşmesiyle hücrelerin G1’den S evresine geçişini sağlar. Çoğalma faktörleri ve genelde polipeptit nitelikli faktörlerin getirdiği sinyalin iletiminde izlenen başlıca üç ana yolun varlığı bilinmektedir. Bu ana yolların sürecinde, sinyal iletimi,

- ikincil haberci niteliğindeki küçük moleküllerin oluşumu,
 - iyon akımları,
 - kinazların aktifleşmesi,
- gibi olaylar üzerinden gerçekleşir.

12.4. Fosfolipaz C, diasilgliserol, inositol trifosfat yolu

Proteinlerin fosforillenmelerinde Ca^{2+} 'un hücre içi derişimindeki değışmeler önemli rol oynar. Çoğalmayı uyaran çeşitli olaylar sırasında, örneğin yumurta hücresinin sperm tarafından döl lenmesini izleyen sürede ya da lenfositlerin antijen tarafından uyarılması üzerine (bkz.Bölüm 10 ve 11), özgün kapıların açılmasıyla sitoplazmaya sızan Ca^{2+} 'un derişimi $10^{-4}M$ düzeyine dek yükselir. Ca^{2+} 'un yükselen derişimi çeşitli kinazları aktifleştirerek, çoğalma faktörlerinin (=birincil habercilerin) reseptörleri üzerinden ulaştırdıkları uyarının hedef hücrelerde yanıt dönüşmesini sağlar. Bu özelliğiyle hücrede ikincil bir haberci gibi işlev gören Ca^{2+} , etkisini, kalmodulin üzerinden gerçekleştirir. Ca^{2+} , hücrede açığa çıktıktan sonra kalmodulinin ($M_r \sim 17000$) bağlanma bölgelerine bağlanır ($n= 4$; $K_d \sim 10^{-6} M$). Bu bağlanma, üçboyutlu yapısında yol açtığı değışiklik üzerinden, kalmodulinin hedef enzimlere (öncelikle özgün kinazlara) bağlanmasını ve böylece bu enzimlerin etkinliklerinin düzenlenmesini sağlar (Şekil 12-2).

Şekil 12-2. Kalmodulin etkisi

Bazı çoğalma faktörlerinin, örneğin PDGF'nin, reseptörleriyle etkileşimi sonucu, hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde aktifleşen fosfolipaz C enzimi Ca^{2+} 'un açığa çıkmasında kilit rolü oynar. Fosfolipaz C, hücre membranının sitoplazmaya bakan yanında konumlanmış bir lipid türü olan fosfotidil inositol 2,5-bifosfatın, inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) ve diasilgliserole (DG) parçalanmasını sağlar. Açığa çıkan inositol trifosfat, hücre içi Ca^{2+} derişiminin yükselmesinde etkin bir rol oynarken, diasilgliserol, Ca^{2+} varlığında, membranın gene sitoplazmik yüzeyinde bulunan protein kinaz C enziminin aktifleşmesine yol açar (Şekil 12-3). Adını Ca^{2+} 'a bağımlı işlevine borçlu olan protein kinaz C, hedef proteinleri serin ya da treonin grupları üzerinden fosforiller. Fosfotidil

inositol türevlerine bağımlı hücresel düzenleme sistemleri Tablo 12-3'te gösterilmiştir. Protein kinaz C ise membrana bağlı bir iyon pompasını aktifleştirerek protonların hücreden pompalanmasını sağlar, ancak, hedef proteinleri arasında insülin reseptörü, β -adrenerjik reseptörler, glikoz iletim sistemi de bulunur.

Sinyal	Hedef sistem	yanıt
Asetilkolin	Pankreas/düz kas	İnsülin salgısı/kasılma
Vasopresin	Karaciğer	Glikojen yıkımı
Trombin	Trombosit	Trombosit topaklaşması
Antijen	Lenfosit	DNA sentezi
Çoğalma faktörleri	Fibroblast ve diğer hücreler	DNA sentezi

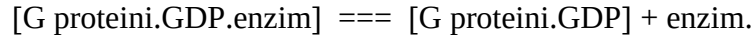
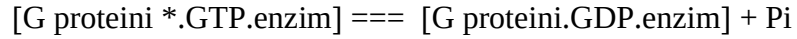
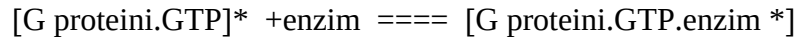
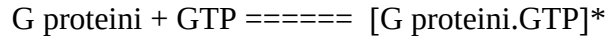
Tablo 12-3. Fosfotidil inositol türevlerine bağımlı bazı düzenlenme sistemleri.

Şekil 12-3. Fosfolipaz C, diasilgliserol ve inositol trifosfata bağımlı sinyal iletim yolu.

12.5. G-proteinleri-hücre uyarıcılarının aracısı düzenleyici proteinler

Hücreleri, yüzeylerindeki reseptörlerle etkileşerek, uyarıcı çeşitli etmenlerin (epinefrin gibi hormonların ya da PDGF gibi çoğalma faktörlerinin) ulaştırdıkları uyarı genelde doğrudan hücre içine

aktarılmaz. Reseptör ile hücre içindeki ilgili (örneğin fosfolipaz C ya da adenilat siklaz gibi) efektör sistemler arasındaki bağlantıyı böyle durumlarda bir G proteini kurar. G proteinleri guanin nükleotitlerle (yani GTP ya da GDP ile) geçici olarak etkileşen proteinlerdir. Bu proteinler, GTP ile kompleksleşmiş durumda, yüksek ilginlikle hedef enzim (efektör) sistemine bağlanır. G proteini.GTP kompleksinin bağlanmasıyla hedef enzim sistemi aktifleşir; aynı zamanda G proteini üzerinde GTP'yi -GDP ve inorganik fosfata (Pi)-hidrolizleyen bir GTPaz etkinliği ortaya çıkar. Taşıdığı GTP'nin GDP'ye dönüşmesiyle, G proteini bağlı bulunduğu enzim sistemine olan ilginliğini yitirerek ondan ayrışır:



$[G \text{ proteini.GTP}]^* =$ Enzim sistemine yüksek ilginlik gösteren kompleks; $\text{Enzim}^* =$ G proteini.GTP kompleksinin bağlanmasıyla aktifleşen enzim (efektör); $G \text{ proteini}^* =$ Enzim üzerinde GTPaz etkinliği kazanan G proteini.

Yukarıdaki eşitliklerden hareketle epinefrinin reseptörüyle etkileşimi üzerinden adenilat siklazın aktifleşmesine yol açan olaylarda G protein(ler)inin rolü daha somut biçimde yandaki örnekte gösterilebilir (Şekil 12-4).

Şekil 12-4. G proteinlerinin etki mekanizmaları

Epinefrin ile etkileşim üzerine, reseptör, G proteininin GTP ile kompleksleşmesini sağlar. Oluşan G proteini.GTP kompleksi adenilat siklaza bağlanıp onu uyarırken, G proteininin aktifleşen GTPaz etkinliği sonucu, GTP, GDP'ye dönüşür. Adenilat siklazdan ayrılan G proteini.GDP kompleksinin, yeniden G proteini.GTP kompleksine dönüşümü için yeni bir epinefrin molekülünün reseptörle etkileşimi gereklidir.

Buna göre, G proteininin varlığı, adenilat siklazin, gelen uyarı üzerine ve (zil örneğinde olduğu gibi) yalnızca uyarı sürdüğü sürece, aktif kalmasını güvenceye almaktadır. Bu mekanizmadaki bir bozukluk adenil siklazin sürekli uyarımıyla sonuçlanır. Örneğin, kolera toksininin etkisiyle (ADP-ribozillenerek) değişikliğe uğrayan G proteini GTP'yi bağlayabilir, ancak GTPaz etkinliğini yitirir. (Zilin takılması örneğinde olduğu gibi) sürekli uyarı durumunda kalan adenilat siklaz, koleranın özgün klinik tablosunun ortaya çıkmasına yol açar.

Çoğalma uyarısının hücre içine aktarımı sürecinde fosfolipaz C'nin aktifleşmesi de bir G proteininin aracılığı ile gerçekleşir. Bu süreçte işlev gören bir diğer G proteini ise, **ras** proteini p21'dir. Bu proteinin GTPaz etkinliğinin **ras** genindeki mutasyonlar sonucu ortadan kalkması çeşitli kanser olgularında önemli rol oynar.

12.6. Adenilat siklaz-cAMP yolu

Adenilat siklaz bu yol üzerindeki efektör enzim sistemini oluşturur. Özgün G proteini aracılığıyla uyarılan adenilat siklaz, ATP'yi siklik AMP'ye (cAMP) dönüştürür. cAMP hücrede çok yönlü etkinliği olan ikincil bir haberci molekül olup, özgün (cAMP'ye bağımlı, kısaca A tipi) kinazlara bağlanarak onları aktifleştirir. Aktifleşme, cAMP'nin düzenleyici altbirimlere bağlanarak, onları katalitik altbirimlerden ayırmasıyla gerçekleşir. Aktifleşen A tipi kinazlar ara aşama kinaz enzimlerini fosforilleyerek aktifleştirir. Bunlar ise, hedef enzim sistemlerinin etkinliklerini aynı şekilde fosforilleme yoluyla (aktifleşme ya da inaktifleşme yönünde (bkz.Bölüm 8)) düzenler (Şekil 12-5). Daha ağırlıklı olarak metabolik düzenlemelerde rol oynayan bu sistemde, fosforillenme, protein kinaz C'de olduğu gibi serin ve treonin kalıntıları

üzerinden gerçekleşir. İkincil habercilerin etkili olduğu bu iki sistemde de (fosfolipaz C-DG/IP3 ve adenilat siklaz-cAMP yollarında) gelen sinyal bir yükselme (“amplifikasyon”) süreciyle hücre içine iletilerek dağılır.

12.7. Reseptör-tirosin kinaz (RTK) sistemi

Yukarıdaki iki yolun ötesinde, çoğalma faktörleri tarafından getirilen sinyalin, öncelikle, izlediği yol reseptör-tirosin kinaz sistemidir. Serin ve treonin üzerinden fosforillenme, hücre çoğalmasının yanı sıra, özellikle, genel metabolik olayların düzenlenmesinde rol oynarken, tirosin üzerinden fosforillenme yalnızca hücre çoğalmasına yönelik sinyal iletim sürecinde gözlenir. Bu süreçte hücre çoğalma faktörüyle etkileşen reseptör aynı zamanda tirosin kinaz etkinliğine sahip olup, ilgili katalitik bölge reseptör proteininin sitoplazmik bölümünde konumlanmıştır. Çoğalma faktörünün bağlanmasıyla iki reseptör proteini birleşerek aktif bir dimer yapı oluşturur. Böylece açığa çıkan kinaz etkinliği, reseptörün kendisinin ve çevredeki hedef proteinlerin fosforillenmelerine yol açar (Şekil 12-6). Ortak etki biçimlerine karşın farklı reseptör-tirosin kinaz sistemlerinin, özellikle, hücre yüzeyinde konumlanmış ligant etkileşim bölgeleri farklı “domain” yapılar (örneğin Ig-benzeri- ya da SH-gruplarınca zengin motifler) içerir (Şekil 12-7).

Şekil 12-5. Adenilat siklaz-cAMP yolu.

Şekil 12-6. Reseptör-tirosin kinaz dimeri. PLC, Fosfolipaz C; P, reseptöre bağlanan fosfat grupları; GRB, "growth factor binding protein".

Şekil 12-7. Reseptör-tirosin kinaz çeşitleri ("domain yapılar").

Çoğalma faktörlerinin bağlanmasıyla tirosin kinaz-reseptörlerin çevresinde gerçekleşen fosforillenme olayları, ayrıntıları kanser araştırma çalışmalarıyla bağlantılı olarak aydınlanan, bir iletim yolunu aktifleştirir (Şekil 12-8). Hücre membranından çekirdeğe dek uzanan ve ardaşık sıralanmış yirminin üstünde aşamadan oluşan bu yol özgün bazı genlerin ("erken genlerin") aktive edilmesiyle sonuçlanır. Erken genlerin (**myc/fos/jun**) ürünleri ise hücrenin G1 evresinden S evresine geçişi için gerekli tepkimeleri tetikler.

Şekil 12-8. Reseptör-tirosin kinaz-ras-MAK sinyal iletim yolu. MAK, mitogenlerce aktifleşen kinazlar yolu; raf, MAK yolunun ras ile etkileşen ilk ögesi

Şekil 12-9. Reseptör-tirozin kinaz yolunda ras proteinlerinin rolü

Reseptör-tirosin kinaz yolunda **ras** proteini çeşitli sinyallerin birleştiği bir kavşak işlevini üstlenmiştir. Küçük G-proteinleri ailesinden olan **ras** proteini (M_r 21000 nedeniyle, kısaca p21) çoğalma faktörü uyarısıyla aktifleşen ve guanin nükleotit değişim faktörü (“guanine nucleotide exchange faktor”) işlevine sahip SOS proteini ile etkileşerek taşıdığı GDP molekülü yerine bir GTP molekülünü bağlar. Bu şekilde aktifleşen p21, **raf** proteinine (“mitogen activated kinase (MAK) kinase”)

bağlanarak onu aktifleştirir. **ras** p21-raf kompleksine bağlanan **ras**-GAP (**ras**'a özgü GTPaz aktifleştirici protein) etkisiyle aktifleşen GTPaz etkinliği ise, GTP'nin GDP'ye dönüşümünü ve p21'in **raf**'tan ayrışmasını sağlar (Şekil 12-9). Diğer G protein örneklerinde de bilinen bu tür etkileşimler (ve özellikle p21'in GTPaz etkinliği) **ras** geninde meydana gelen bazı mutasyonlar sonucu ortadan kalkar. Özellikle 12., 13., 59. ve 61. sıradaki glisin (G12), glisin (G13), alanin (A59) ve glutamin (Q61)i etkileyen nokta mutasyonları bu yolla hücre transformasyonuna (bkz.aşağıda) yol açar. 12.konumdaki glisinin yerine, prolin dışında, geçebilecek herhangi bir amino asit transformasyon için yeterli olmaktadır. 59.konumdaki alanin yerine geçen treonin, transformasyona uğramış hücrede fosforillenmiş olarak bulunur. 13.konumdaki glisinin aspartik aside, 61.konumdaki glutaminin lisin ya da lösine dönüşmesine koşut olarak, transformasyon gerçekleşir. GTPaz etkinliğinin ortadan kalkmasıyla sonuçlanan bu mutasyonlar, **ras** p21'in GAP ile etkileşimini bozup, **ras** p21.GTP.**raf** kompleksini sabitleştirir. Onu (tıpkı adenilat siklaza özgü G proteininin ADP-ribozillenmesinde gözleendiği gibi) denetimden çıkmış bir sinyal üretim noktasına dönüştürür.

ras p21'in efektörü olan **raf**'ı aktifleştirmesi, sinyalin bir dizi serin/treonin kinaz enzimi (MAK) üzerinden çekirdeğe iletilmesiyle sonuçlanır. Bu dizinin ilk ögesi olan **raf**'ın aktif **ras** p21.GAP kompleksinin yanısıra, protein kinaz C tarafından da uyarılması, farklı iletim sistemleri arasındaki etkileşimlerin bir örneğini oluşturur. RTK tarafından fosforillenen proteinler arasında, inositol trifosfat (PI3)-kinaz ve fosfolipaz C gibi, fosfotidil inositol bifosfat/fosfolipaz C yolunun

önemli öğelerinin bulunması, bu iki yol arasındaki bağlantılara işaret etmektedir.

12.8. Hücre siklüsü ve siklinler

Yukarıda bir öntanımı yapılmış olan hücre siklüsü kurulu bir saat düzeniyle yürüyen, ardaşık sıralı evrelerden oluşan bir döngüdür. Bu döngü, G1 evresi dışında, dış etmen ve ortam koşullarından bağımsız olarak, kendi iç zamanlamasıyla çalışır. Döngünün iç kurallarının işlemeye bağladığı aşama S evresinde, DNA sentezi ile birlikte devreye girer ve hücre bölünmesinin sonuna dek sürer.

Bir dizi özgün **siklin** adı verilen protein ile bunların etkileştiği kinaz (sikline bağlı kinazlar “cyclin dependent kinases (CDK’s)”) hücre siklüsünün işleyişinden sorumludur. Etkili oldukları evreye (ya da kritik geçiş aşamasına) bağlı olarak, siklinler iki sınıfa ayrılır. Birinci sınıf siklinler S(G2) ve M evreleri ile G2/M geçişini düzenler ve **mitotik siklinler** olarak adlandırılır. Siklin A ve B bu sınıfın temsilcilerini oluşturur. İkinci sınıf siklinler ise G1 evresi ve G1/S geçişinden sorumlu olup, **G1 siklinleri** olarak ta adlandırılır. Siklin C, D (1-3) ve E, G1 sınıfı siklinler arasında bulunur. Siklinlere bağlı kinazlardan (CDK’lardan) başlıcaları Tablo 12-4’te, siklinler ve CDK’lar ile etkili oldukları evreler ise Şekil 12-10’da gösterilmektedir.

Kinaz	Etkileştiği siklin
cdc2 (CDK1)	A ve B
CDK2	A, E ve D
CDK3	bilinmiyor
CDK4	D

CDK5	D (ve belki başkaları)

Tablo 12-4. Siklinler ve sikline bağımlı kinazlar (CDK).

Şekil 12-10. Siklinler ve CDK'ların etkili oldukları evreler.

12.9. G1 evresi-çoğalma faktörleri ile siklin/CDK etkileşimleri

S evresinin başlaması, bir “geç gen” ürünü olan transkripsiyon faktörü E2F'nin etkisine gereksinim gösterir. E2F replikasyon için gerekli genlerin transkripsiyonunda etkili olup, normalde (G1/S geçişi dışındaki süreçte) retinoblastoma proteini (pRb) ile kompleksleşmiş olarak bulunur. Çoğalma faktörlerinin uyarısı üzerine aktifleşen erken

genlerin (**jun/fos/myc**) ürünleri D/E siklinlerinin aktifleşerek, özgün CDK'lar ile kompleksleşmelerini sağlar. D (siklin D).CDK ya da E (siklin E). CDK kompleksinin pRb'ni fosforillemesiyle açığa çıkan E2F G1/S geçiş sürecini tetikler (Şekil 12-11).

12.10. P53 ve apoptoz

Hücre yaşamında kilit konumunda olan G1/S geçiş aşaması, sıkı denetleme mekanizmalarına tabidir. Hücre genomunda hasara yol açan koşullarda ya da TNF gibi faktörlerin etkisiyle, bir dizi baskılayıcı protein (p16, p21, p27) bu aşamada yavaşlamaya ya da tümten durmaya yol açabilir. Örneğin, genom hasarı üzerine aktifleşen, çekirdek içinde merkezi bir denetleyici işleve sahip olan p53, p21'in indüklenmesini sağlar. p21 CDK ile etkileşerek, onun siklin D/E'ye bağlanarak aktifleşmesini engeller. pRb'nin fosforillenmesinin ve, buna bağlı olarak, E2F'in açığa çıkmasının engellenmesi, G1/S geçişini yavaşlatır ya da tümten durdurabilir. Genomun bekçisi olarak da tanımlanan p53, bu yolla, S evresine geçiş süresinin uzamasını sağlayarak, gerekli DNA onarım mekanizmalarının devreye girmesine olanak sağlar. DNA hasarının çok (örneğin onarılmayacak ölçüde) büyük olduğu durumlarda ise, p53 programlı hücre ölümü (**apoptoz**) sürecini başlatır (Şekil 12-12).

Şekil 12-11. Siklin D.CDK etkisi altında Rb'nin fosforillenmesi. Transkripsiyon faktörü E2F'nin serbestlenmesiyle replikasyon sürecinin başlaması. Yıldız (*) aktifleşmiş kompleksi göstermektedir.

Şekil 12-12. p53'ün apoptoz sürecindeki etkisi.
Yıldız (*) aktifleşmiş kompleksi ve öğeleri
göstermektedir.
(—|, inhibisyon; →, aktifleşme ya da
indüklenme)

Programlı hücre ölümü (apoptoz), yüksek canlıların normal gelişmeleri kapsamında gerçekleşen ve doku ve organların yeni yapılanmalarının gerektirmediği hücrelerin ortadan kaldırılmalarıyla sonuçlanan bir süreçtir. Apoptoz ayrıca çeşitli ölümcül etmenlere karşı kalıtsal denetlenen bir hücre sel yanıt olarak ortaya çıkar (Şekil 12-13 a ve b). Apoptoz morfolojik olarak, çekirdeğin ve sitoplazmanın kondensasyonu ve kromozomal DNA'nın parçalanması ve hücrenin ufalanmasıyla gelişen bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Sürecin sonunda hücre kalıntıları fagositoz yoluyla ve çevreye en az zarar verecek biçimde ortadan kaldırılır. (Apoptoz bu özellikleriyle fiziksel hasar üzerine ortaya çıkan, hücre organellerinin ve zarının ortadan kalkmasıyla gerçekleşen ve çevrede yangısal tepkimelere yol açan diğer hücre ölümü süreci olan nekrozdan belirgin farklılıklar gösterir). Moleküler düzeyde apoptoz süreci pro-interlökin 1 β -ya özgü dönüştürücü

enzim (“pro-interleukin 1 β -converting enzyme(ICE)”) benzeri proteazların aktifleşmesiyle tetiklenir. Proteolitik sürece koşut olarak endonükleaz (örneğin DNAaz 1) aktifleşmesi ise, DNA’nın parçalanmasıyla sonuçlanır. Apoptoz **bax** ve **bcl-2** genlerinin karşıt yönlü etkileriyle düzenlenmektedir. **bcl-2** apoptozu engelleyici bir etki göstermekte ve bu etkisiyle kanser oluşum sürecinde hücrenin ölümsüzleşmesinde belirleyici bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak, etki biçimi henüz yeterince tanımlanmamıştır. **bcl-2**’nin **ras** P21 ve protein kinaz C (PKC)’nin pozitif kontrolü altında olduğu, buna karşın, cAMP’nin, cAMP’ye bağımlı kinazlar (PKA) üzerinden, apoptoz sürecini uyarıcı etkisi olduğu belirtilmektedir. Apoptozun moleküler mekanizmasının ayrıntıları henüz belirlenme aşamasındadır.

12-11. Mitoz-siklin/CDK düzenlenmesi

Mitotik siklinler A ve B ile etkileştikleri CDK’lar (CDK1 (cdc2), cdc25) ile hücre siklusunun S, G2 ve M evreleri boyunca geçişini düzenler. S ve G2 evrelerinde inaktif bir siklinB-cdc2 (CDK1) kompleksi bulunur.

Şekil 12-13. Apoptoz. a) Tetiklene apoptoz sürecinde hücrede yer alan olaylar b) Apoptoz sürecinde hücrenin ufalanarak dağılması. Hücre artıklarının makrofajlarca sindirimi. (TNF, tumor necrosis factor).

14. konumdaki treonin (T14) ve 15. konumdaki tirozin (Y15) ile 161.konumdaki treoninin (T161) fosforillenmiş olması, p34 cdc2'nin inaktif konformasyonunu belirler. G2/M geçişinde p54-80 cdc 25 etkisiyle T14 ve Y15 defosforillenir. Böylece aktifleşen siklin B-p34 cdc2 (CDK1) kompleksi mitoz sürecini tetikler. Mitoz evresinin bitişine koşut olarak siklin B'nin proteolitik yıkımı gerçekleşir (Şekil 12-14).

Şekil 12-14. a) Mitotik siklinlerin fosforillenmelerinin mitoz sürecine etkisi. b) İnterfaz ve mitoz süreçlerinde MPF (“mitosis promoting factor”) etkinliği ve B siklin düzeyinde değişimler.

12.12. Hücre kültürlerinde kanser hücrelerinin davranışı

Kanser hücrelerinin kültürde gözlenen en önemli bir özelliği olan ölümsüzlüklerine, yani sınırsız çoğalabilme yeteneklerine, yukarıda değinilmiş bulunmaktadır. Bu hücrelerin ayrıca çoğalma faktörlerine normal hücreler kadar gereksinim duymamaları ve hatta transformasyona

yol açan faktörler (TGF)i salgılayabilmeleri onların değişmiş çoğalma özelliklerini yansıtır.

Kanser hücrelerinin diğer bazı davranışlarını, onların değişmiş yüzey özellikleri ve çevreye yayılma eğilimlerinin ışığında, irdelemek mümkündür. Bu bağlamda, normal hücrelerin karşılıklı temas üzerine, çoğalmalarının durmasına yol açan kontakt inhibisyonu kanser hücrelerinde gözlenmez. Bu nedenle, kanser hücreleri bulundukları kültür şişelerinin tabanlarını örtecek bir yoğunluğa geldikten sonra da çoğalmalarını sürdürüp hücre yığınları oluşturur (Şekil 12-15). Kanser hücreleri, aralarındaki ilginin düşük olması nedeniyle, normal somatik hücrelerin kültürlerinde gözleendiği gibi, normal dokuları anımsatan yapılar oluşturmazlar.

Bu hücrelerde normal hücrelerde görülen, katı yüzeylere bağlanarak çoğalma eğiliminin de büyük ölçüde ortadan kalkmış olduğu gözlenir. Buna karşın, normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri düşük lektin derişimlerinde bile topaklaşmaya uğrarlar. (Lektinler= membran proteinlerinin şeker molekülleriyle etkinleşen çok sayıda bağlanma bölgesine sahip bitki kökenli proteinler). Kanser hücrelerinin, normal hücrelerin bir örümcek ağı gibi çevrelerinde ördükleri, fibronektin ağından yoksun olmaları, bunun ötesinde, sıklıkla çevrelerine plasminojeni

Şekil 12-15. Kanser hücrelerinde kontakt inhibisyonun

kakması.

aktifleştiren bir proteaz salgılamaları, yüzeylerinde meydana gelmiş yapısal ve işlevsel değişiklikleri yansıtan özellikler arasında sayılabilir. Aktif mikrofilamentlerinin yokluğundan kaynaklanan bozuk hücre iskeleti ve Warburg etkisi olarak tanınan ve glikozu büyük ölçüde glikolitik yolla değerlendirme eğilimleri, değişik kanser türlerinin hücrelerinin ortak olan diğer genel özellikleri arasında sayılabilir. Kanser hücrelerinin yukarıda açıklanan genel özellikleri Tablo 12-5'te topluca verilmektedir.

12.3. Hücre hibritlemesi ve uygulama alanları

Hücrelerin yapay yollarla kaynaştırılmasıyla (füzyon) hücre melezlerinin (hibritleri) oluşturulması **hibritleme** olarak adlandırılır. Bu işlemde, Sendai virüsünün ya da, daha yaygın olarak, yüksek derişimde kullanılan polietilenglikolun (PEG) varlığında, hücreler bitişir. İkinci aşamada ise, membranlarının kaynaşmasıyla birleşen, hücrelerden iki (ya da füzyona giren hücrelerin sayısına bağlı olarak daha çok sayıda) çekirdek içeren heterokaryonlar oluşur. Heterokaryonların geçirdiği ilk hücre bölünmesinden sonra çekirdeklerinde birleşmesiyle hibrit hücreler meydana gelir.

Çoğalmalarıyla ilgili özellikler

- Sınırsız çoğalma yeteneği (ölümsüzlük),
- Seruma ve onun içerdiği çoğalma faktörlerine fazla gereksinim duymama,
- TGF sentezleyip, salgılama,

Yüzeylerine ve çevreyle ilişkilerine ilişkin özellikler

- Kontakt inhibisyonundan yoksun,
- Benzer hücreler arasındaki ilgi düşük,
- Katı yüzeylere bağlanma eğilimi az,
- Düşük lektin derişimlerinde bile topaklaşma (“agglütinasyon”),
- Çevreleri fibronektin ağından yoksun,
- Çevrelerine plasminojen aktifleştiricisi proteaz salgılama,

Sitoskeleton (hücre iskeleti)

- Aktin mikrofilamentlerinden yoksun,

Metabolik özellikler

- Warburg etkisi.

Tablo12-5. Kanseri hücrelerinin genel özellikleri.

Hücre hibritleme işlemi, kromozomların haritalanması ve hücre siklusünün araştırılmasının yanı sıra membran yapısının (örneğin membran akışkanlığının) incelenmesinde başarıyla kullanılmıştır.

Hücre hibritleme yöntemlerine dayalı olarak gelişen hibridoma teknolojisi tıpta ve biyolojide son yıllarda çıkır açan teknolojilerden birisidir. Hibridoma teknolojisinde, genelde belirli bir antijene karşı bağışıklama sonucu elde edilen lenfositler ölümsüz kanser (mutant miyelom) hücreleriyle hibritleştirilir. Daha sonra normal hibritleşmemiş lenfositleri, miyelom hücrelerini ve hibrit hücrelerini içeren karışım

selektif bir ortamda (=HAT medyumunda) kültüre alınır. Selektif ortam, normalde zengin ortamda ölümsüz olan mutant miyelom hücrelerinin yaşamasını olanaklı kılmayarak, ölmelerine yol açar. Normal lenfositler kültürde yaşama yeteneğinden yoksun olduğundan, 4-5 günlük bir sürede ortadan kalkar. Lenfosit-miyelom hibrit hücreleri ise bir yandan miyelom hücreleri gibi ölümsüz olma ve sınırsız çoğalma özelliklerine, diğer yandan, normal lenfositlerin getirdiği sağlam genler sayesinde, selektif ortamda da yaşama yeteneğine sahip olduklarından çoğalmalarını sürdürür. Bunun ötesinde, hibrit hücrelerin bazıları hibritleme öncesi antijenle uyarılan lenfositlerden oluştukları için, sözkonusu antijen üzerindeki özgün epitoplara karşı antikor sentezleyerek, ortama salgırlar. Böyle hibritler (hibridomalar) seyreltilerek, tek tek çoğaltıldığında, herbiri belirli bir epitopa özgü antikor salgılayan klonlar (monoklonlar) geliştirilebilir. Bu klonların sentezlediği monoklonal antikor olarak tanımlanan antikorlar, epitop özgünlükleri nedeniyle, makromoleküllerin immünolojik haritalarının çıkarılmasında, farklılaşmış hücrelerin özgün yüzey antijenlerine göre altgruplarına ayrılmasında (örneğin T-lenfositlerinin altgruplarının yüzey antijenlerine göre belirlenmesinde) ya da klinik tanıda çok etkin ve geniş kullanım bulmaktadır. Bunun ötesinde, özellikle tümör hücrelerine özgü yüzey antikorlarına karşı geliştirilen monoklonal antikorlar, kanserle savaşmada etkili silahlar olarak kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 12-16).

12.14. Kanser problemi

Transformasyon sonucu ortaya çıkan kanser hücresinin özelliklerinin kalıtsal niteliği -bu özelliklerin kanser hücresinden türeyen tüm hücrelere aktarımı-, baştan beri, kanserin birincil nedeninin

DNA düzeyinde aranması gerektiğini sezindirmiştir. Bu noktadan hareketle, DNA'ya etkiyerek kansere yol açması beklenebilecek başlıca iki ana mekanizma üzerinde durulmuştur.

1) **Somatik mutasyon** ya da **fiziksel ve kimyasal karsinogenez**.

Bu mekanizmayı savunanlar transformasyon olayının mutasyonları anımsatan özelliklerini vurgulamıştır. Buna göre, fiziksel ya da kimyasal etmenler (örneğin iyonlaştırıcı ışınlar ya da kimyasal maddeler) somatik hücrelerin genomlarında yol açtıkları mutasyonlar üzerinden kansere neden olur.

2) **Viral karsinogenez**. Bu görüşte ise, DNA ile etkileşen virüslerin transformasyona, dolayısıyla da, kansere neden olduğu savunulmuştur.

Uzun yıllar karşılıklı savunulan bu iki karşıt görüşün yerini 1969 yılında Hübner ve Todaro tarafından geliştirilen **onkogen kuramı** almıştır (Şekil 12-17).

Şekil 12-16. Hibridoma hücrelerinin geliştirilmesinde ana aşamalar.

Şekil 12-17. Onkogen kuramı.

Her iki mekanizmaya da yer veren ve bunları uzlaştırmayı görüşleri içeren bu kurama göre, yüksek canlı hücrelerinin genomlarında normalde bastırılmış olarak kanser genleri (onkogenler) ve viral genler bulunur. Bir kuşaktan diğetine aktarılan bu genler, bazı kimyasal (karsinogenik) maddelerin ve ışınların etkisiyle ya da çok daha seyrek olarak kendiliklerinden etkinleşebilir. Viral genlerin etkinleşmesiyle, virüs genomunun hücre genomundan ayrılarak litik bir çoğalma sürecini başlatması beklenebilir. Diğeryandan, aynı etmenler onkogenleri aktifleştirerek transformasyona yol açabilir. Üçüncü bir olasılıkta ise, onkogen ve viral genlerin aynı anda etkinleşmesiyle, ortaya onkogenleri taşıyan tümör virüsleri (onkovirüsler) çıkar.

Rekombinant DNA tekniklerinin kullanımıyla sürdürülen çalışmalar yukarıdaki üç değişik kuramın da belirli ölçülerde doğruluğunu ortaya koymuştur.

12.14.1. Somatik mutasyonlar ve kanser:

Bu kavram, fiziksel ya da kimyasal etmenlerin karsinogen olarak tanımlanabilmeleri için önce mutagenliklerinin kanıtlanması koşulunu getirmektedir. Kimyasal maddelerin kansere yol açabileceği uzun zamandan beri bilinen bir olgudur. 18. yüzyılda Potts, ilk olarak, baca temizleyicilerinde oluşan skrotum kanseri sıklığına ve bununla kurum ve zifirde bulunan maddeler arasındaki olası bağlantıya dikkati çekmiştir. Kimya sanayinin gelişmesine orantılı olarak, karsinogen (kanser oluşumuna yol açma) niteliği saptanan maddelerin sayısı zamanla artmıştır. Kanser oluşumuyla bağlantısı saptanan bazı maddeler ile bunların doku özgünlükleri Tablo 12-6’da gösterilmiştir.

Kimyasal karışım	Kanser oluşturduğu doku tipi
Zifir, kurum	Deri, akciğer

Sigara zifiri	Akciğer, solunum yolları
<u>Kimya sanayi ürünleri</u>	
Benzidin	İdrar kesesi
2-Naftilamin	İdrar kesesi
Nikel ve krom içerikli bileşikler	Akciğer
Asbest	Akciğer
Benzen	Lösemi
<u>İlaç ana maddeleri</u>	
Fenasetin	Böbrek
Dietilstilbestrol	Vagina
<u>Gıda içerikleri</u>	
Aflatoksin (fıstık türleri)	Ağız mukozası, karaciğer
Nitrosamin (sosis, vb.)	Karaciğer, böbrek

Tablo 12-6. Kansere yol açabilen bazı kimyasal karışımlar ve maddeler.

Kanser oluşumuyla bağlantısını gösterebilmek amacıyla, karsinogen niteliğinden kuşku duyulmayan, zifirin etkin maddesi olan, benziprenin bakterilerdeki mutagenliği incelenmiştir. Ancak benziprenin (mutagen etkinin en kolay incelenebildiği) bakteri hücrelerinde bir mutasyona yol açmaması bu görüşün uzun süre zayıf noktasını teşkil etmiştir. 1975 yılında Ames burada işlenen düşünce hatasını farkederek, karsinogen

maddelerin mutagen etkisini araştırmak için yeni bir sistem geliştirmiştir. Ames'e göre, karsinogen olarak tanımlanan maddenin yüksek organizmaya girmiş olması, kanserleşme sürecinde bir önkoşul oluşturmaktadır. Dolayısıyla, maddenin kendisinden çok, ökaryot hücrenin enzimlerinin etkisi altında oluşan, bir türevi gerçek karsinogen madde olabilir. Bu durumda, eğer kanser mutasyon yoluyla oluşmakta ise, bakteri hücresinde ana maddeden çok türevinin mutasyona yol açması beklenir. Gerçekten, karaciğer özütüyle işlem gördükten sonra bakteri hücrelerine eklenen benziprenin mutagen etkinliğinde büyük artış görülmüştür. Daha sonraki çalışmalar, benziprenin aril hidroksilaz (AHH) enziminin katalizlediği bir tepkime sonucu, karsinogen ve mutagen olan 5,6-epoksit türevine dönüştüğünü göstermiştir. AHH çok halkalı aromatik hidrokarbon bileşiklerinin organizmadan atılmasından sorumlu enzim sisteminin bir ögesidir. Bu enzim sistemi organizma için zararlı metabolizma ürünlerinin, ilaç maddesi artıklarının ve yabancı maddelerin organizmadan, suda çözünür bir şekle sokularak, atılmasını sağlar. AHH bu sürecin ilk aşamasını katalizlemekte olup, ayrıca, dönüşümünü sağladığı hidrokarbon bileşiklerince indüklenebilir (Şekil 12-18).

Şekil 12-18. Çok halkalı aromatik hidrokarbon
bileşiklerinin zararsızlaştırılma
(detoksifikasyon) süreci.

Kimyasal maddelerin yanısıra, fiziksel etmenlerin de, somatik mutasyonlarla kansere yol açabileceğini güçlü biçimde destekleyen bulgular mevcuttur. **Xeroderma pigmentosum** gibi DNA onarım bozukluğunun görüldüğü kalıtsal hastalıklarda, bireyler, hemen hemen istisnasız olarak, genç yaşlarda gelişen kanserin kurbanı olmaktadır. Karsinogen maddelerle ve rekombinant DNA tekniklerinin yardımıyla yürütülen çalışmalar, 1980'li yılların başında, kanser araştırmalarında önemli atılımlardan birinin gerçekleşmesine zemin hazırlamıştır. Weinberg ve grubu, benzipren gibi çok halkalı aromatik bir bileşik olan, benzantrasen uygulamasıyla, deney hayvanlarında oluşturdukları tümörlerde aktive olmuş kanser genini bularak, tanımlamak üzere **transfeksiyon** adını verdikleri yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemle, tümör

hücrelerinin DNA'sı hazırlanarak, restriksiyon enzimleri aracılığıyla parçalanmış ve oluşan parçalara daha ileride kolayca tanınabilmeleri için özgün (örneğin bakteriden elde edilmiş) DNA dizileri indikatör olarak takılmıştır.

Bu DNA parçalarıyla, kültürde Ca^{2+} tuzlarının varlığında, karıştırıldıklarında 3T3 fare fibroblast hücrelerinin (=ölümsüz, yerleşik bir hücre soyu) bazılarının transformasyona uğrayarak odaklar oluşturduğu saptanmıştır. Transformasyondan, bu aşamada 3T3 hücresine giren, birden çok sayıda tümör DNA'sı parçasının sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, transformasyona uğrayan 3T3 hücrelerinden hazırlanan DNA, yeniden aynı restriksiyon nükleazı enzimiyle kırılmış ve oluşan parçalarla yeni 3T3 hücreleri transforme edilmiş ve bu işlem çok kez yinelenmiştir. Böylece, son transfeksiyon işleminden sonra da transformasyona uğrayan, ayrıca farelere aktarıldığında tümör oluşturabilen hücrelerin, baştaki tümör DNA'sından hazırlanan parçaların birinden fazlasını taşıması olasılığı istatistiksel olarak ortadan kaldırılmıştır. Bulgular kimyasal karsinogenler aracılığıyla aktifleşen tek bir (kanseri) genin(in), 3T3 fibroblastlarına transfeksiyon yoluyla aktarıldığında, transformasyon için yeterli olabileceğini göstermiştir. Çalışmalarda son transfeksiyon işleminde transformasyona uğratılan hücrelerin DNA'sı yeniden parçalanarak bu kez bakteriyofaj genomlarına eklenmiştir. Rekombinant fajların, petri tabaklarındaki bakteri tabakalarında yol açtığı plaklar arasından, başta takılan indikatör diziyi, dolayısıyla, kanseri taşıyan bakteriyofaj plağı belirlenmiştir (Şekil 12-19). Faj genomunda klonlanan bu kanseri geninin **ras** geni olduğu gösterilmiştir. Bu yaklaşımla, daha sonraki yıllarda, insan tümörleri dahil

çeşitli tümör dokusundan hazırlanan DNA örneklerinde kanser genleri (onkogenler) elde edilerek tanımlanmıştır.

12.14.2.Viral karsinogenez:

Kansere yol açtığı saptanmış ilk virüsün (Rous sarkom virüsünün) 1912 yılında bulunmuş olmasına karşın, viral onkogeneze düşüncesi, somatik mutasyon kuramının yanında, arka planda kalmıştır. Bu ön planda araştırmacıların uzun yıllar kanserli dokuda hastalığa yol açan virüs partiküllerini sonuçsuz kalan çabalarla aramış olmalarından kaynaklanmıştır.

Şekil 12-19. Transfeksiyon deneylerinin akış diyagramı.
o--o, onkogen: •, DNA parçalarına takılan
indikatör dizi.

Günümüzde, virüs infeksiyonunun hücrede değişik yollar izleyebileceği, hücreye giren virüsün çoğalarak hücrenin ölümüne yol açabileceği (litik mekanizma) gibi, hücre kromozomuna girerek onun bir bölümü gibi mitozla birlikte yavru hücrelere iletilebileceği (lizojenik mekanizma) bilinmektedir. Özellikle, lizojenik mekanizmayı izleyerek, hücre kromozomunun bir bölümü haline gelen ve **provirüs** olarak adlandırılan virüs genomlarının karsinogen etkenler olarak rol

oynayabilecekleri son yıllarda yeterince kanıtlanmıştır. Tümörlere yol açtığı bilinen virüslerle yapılan çalışmalarda karşılaşılan bir diğer güçlük, bu virüslerle infeksiyonun (deney hayvanlarında) her zaman kansere yol açmaması olmuştur. Ancak, deney hayvanlarının bağışık direncinin bastırılmasıyla, (tümör) virüsü infeksiyonlarının kansere yol açma oranı büyük ölçüde artırılabilmiştir. Günümüzde, virüslerin tümörlere yol açabileceği bir olgu olarak kabul edilmektedir. Nitekim, istatistikler insanda kanser olgularının % 10-15'inin viral kökenli olduğunu ortaya koymaktadır (Tablo 12-7). Tümör virüsleri, DNA ve RNA virüsleri olarak iki ana gruba ayrılır. Bu iki grubun konakçı hücreyle etkileşimi ve transformasyona yol açış mekanizmaları temelden farklılıklar gösterir.

12-15. DNA tümör virüsleri

DNA tümör virüslerinin başlıca temsilcileri arasında maymun ve fareye özgü simian virüsü 40 (SV 40) ve poliyoma virüsü ile insana özgü papiloma virüsleri (HPV), adenovirüsler, herpes simpleks virüsleri (HSV) ve hepatit B-virüsü bulunur (Tablo 12-8).

Kanserin yeri	Olgu sayısı	Yüzde	Neden(ler)	
			Bilinen	Olası
Akciğer	157.000	15	Tütün	
Kolon ve rektum	155.000	15	Hayvansal yağ, düşük lif içerikli	Alkol, hareketsiz yaşam biçimi

			beslenme	
Göğüs	150.900	15	Over hormonları	
Prostat	106.000	10	Testosteron	Östrojen
İdrar kesesi	49.000	5		
Non-Hodgkin lenfoma	35.000	3	(HIV, HTLV-I)	
Uterus (endometrium)	33.000	3	Östrojen	
Ağız boşluğu ve farinks	30.500	3	Tütün, alkol	
Pankreas	28.100	3	Tütün	
Lösemi	27.800	3	X-ışınları	
Melanom	27.600	3	Ultraviyole ışınları (güneş yanığı)	
Böbrek	24.000	2	Tütün	Ağrı kesiciler, idrar sökücüler
Mide	23.200	2	Tuz, tütün	Helicobacter pylori
Over	20.500	2	Ovulasyon	
Beyin ve diğer sinir sistemi	15.600	2	Travma, X-ışınları	
Serviks	13.500	1		Papilloma virüsler
Karaciğer	13.100	1	Hepatit virüsleri, alkol	Tütün
Larinks	12.300	1	Tütün, alkol	
Tiroid	12.100	1		İodin fazlalığı
Multipl miyeloma	11.800	1		
Yemek borusu	10.600	1	Alkol, tütün	
Hodgkin hastalığı	7.400	<1		
Testis	5.900	<1		In utero östrojen
Bütün diğer yerler	69.500	7	Çeşitli etmenler	
Toplam	1.040.000	100		

Tablo 12-7. 1990 yılında ABD'de belirlenen yeni kanser olguları, yerleri ve ana nedenleri

SV 40, poliyoma virüsü ve HPV, papova virüsü grubu kapsamına giren küçük tümör virüsleridir. SV 40'ın içerdiği çift sarmal halkasal DNA molekülünün ağırlığı yaklaşık 3 000 000 Dalton olup, üç proteini

şifrelediği bulunmuştur. Bu proteinlerden ikisi virüsün kapsül proteinleridir. Tümör ya da T-antijeni olarak adlandırılan üçüncü protein ise, konakçı hücrenin DNA sentezinde rol oynayan bir çok enzimin etkinliğinde artışa yol açar. Konakçı hücrenin transformasyonunda rol oynamaya başlıca aday protein T-antijenidir. Sistemin bu denli basit oluşu ve pek çok özelliğinin şimdiden

1 <u>Papova virüsleri</u>
- Simiyan virüsü 40 (SV 40)
- Poliyoma virüsü
- Papiloma virüsü
2 <u>Hepadnavirüs Grubu</u>
- Hepatit B virüsü
3 <u>Herpesvirüs Grubu</u>
- Epstein - Barr virüsü
4 <u>Adenovirüs Grubu</u>

Tablo 12-8. DNA tümör virüsleri.

ayrıntılı olarak bilinmesi, SV 40'ı karsinogenez mekanizmasına ışık tutabilecek bir model sistem olarak belirlemiştir. Papova virüs grubunun diğer temsilci HPV insanda anogenital kanser olgularına, örneğin rahim

kanserine yol açması nedeniyle, özel bir önem taşımaktadır. HPV E6/E7 proteinleri kültürde hücreleri ölümsüzleştirme etkisine sahiptir.

Genellikle soğuk algınlıklarına yol açmalarıyla bilinen adenovirüsler ve ağız uçuklarının (herpes simpleksin) nedenini teşkil eden herpes simpleks virüsleri (HSV) de deney hayvanlarında kansere yol açtıkları kanıtlanmış virüslerdir. Herpes virüslerinin bir alt grubunu teşkil eden Epstein-Barr virüsü (EBV) son yıllarda insanda kanserle bağlantısı gözlenen ilk virüs olarak önem kazanmıştır. Normalde anjin ve lenf bezlerinin şişmesiyle cereyan eden infeksiyöz mononükleoz hastalığını yol açan bu virüs, Afrika'da çocuklarda endemik olarak gelişen lenf tümörlerinde de (Burkitt lenfomalarında) bulunmuştur. Kültürde B-lenfositlerini ölümsüzleştirici etkisi gözlenen EBV, bu etkisini EBNA 1/EBNA 2 gibi proteinler üzerinden gösterir. Diğer yandan, Burkitt tümörlerinde gözlenen 8/24, 8/2 ve 8/22 translokasyonları ile EBV ilişkisi henüz açıklanmamıştır.

DNA tümör virüslerinin taşıdıkları onkogenlerin şifrelediği proteinler, konakçı hücrede replikasyonu tetiklemelerinin yanı sıra, bu virüslerin çoğalabilmeleri için de elzemdir. DNA tümör virüslerinin şifrelediği bazı özgün (onko)proteinler G1/S geçişini denetim altında tutan pRb ve p53 gibi proteinlerle etkileşme özelliği göstermektedir (Şekil 12-20). Bu yolla, DNA tümör virüslerinin bu proteinlerin denetim işlevini devre dışı bırakarak replikasyon sürecini başlattıkları düşünülmektedir (Şekil 12-21). DNA tümör virüsleri transformasyona yol

Şekil 12-20. DNA tümör virüslerinin onkoprotein-
lerinin pRb ve p53 gibi düzenleyici
proteinlerle etkileşimi.

açabildikleri gibi, “**permissive**” hücrelerde litik çoğalma sürecine de girebilir. Bu hücreler virüsün normalde enfeksiyona yol açtığı türden hücre kültürlerine aktarılmış hücrelerdir.

12-16. RNA tümör virüsleri

İlk bulunan tümör virüsünün (Rous sarkom virüsünün) bir RNA virüsü olmasına karşın, bu virüslerin DNA düzeyinde cereyan ettiği varsayılan bir olaya etkisi uzun bir süre anlaşılamamıştır. Bu virüslerin varlığı gen anlatımına ilişkin düşüncelerle çelişkili bile görülmüştür. 1960’larda Temin bu çelişkiyi çözmeye aday bir mekanizma olarak, RNA_

Şekil 12-21. DNA tümör virüslerinin onkoproteinlerinin etkileşimleri sonucu G1/S geçişinin denetimden çıkışı. Rb-P, fosforillenmiş retinoblastoma proteini

tümör virüslerinde, RNA'yı kalıp olarak kullanarak, onu tamamlayıcı (komplementer) DNA zinciri oluşturabilen bir ters transkriptaz (RNA'ya bağımlı DNA polimeraz) enziminin varlığını önermiştir. Bu düşünce 1969 yılında sözkonusu enzimin bulunmasıyla kanıtlanmıştır. Buna göre, hücreye giren virüs RNA'sının ters transkripsiyon yoluyla DNA'ya

çevrilmesi, virüs genomunun (DNA virüslerinde olduğu gibi) konakçı hücre kromozomuna yerleşmesine olanak sağlamaktadır.

Ters transkriptazın, RNA zinciri üzerinde oluşturduğu DNA zincirini ikinci aşamada kalıp olarak kullanarak ona komplementer DNA zincirini oluşturmasıyla çift sarmallı virüs DNA molekülü ortaya çıkar. RNA tümör virüslerinin birliklerinde getirdikleri tRNA molekülleri DNA sentezi için “primer”, başlatıcı nükleik asit görevini üstlenir. Diğer DNA polimerazlarında olduğu gibi, ters transkriptazda bir başlatıcı molekülün 3'-OH grubuna ilk nükleotidi ekleyerek sentezi başlatır.

RNA tümör virüslerinin hepsi tek bir sınıfa, retrovirüs sınıfına girer (Tablo 12-9).

<u>Retrovirüs Grubu</u>	
- İnsan T-hücresi lösemisi virüsü (HTLV-1)	T-hücresi lenfoması
- İnsan immun yetmezlik virüsü (HIV-1, AIDS-virüsü)	Kaposi sarkomu, vb.
-"Acute Transforming Retroviruses"	

Tablo 12-9. RNA tümör virüsleri.

Retrovirüs, hücreye girdikten ve genomu çift sarmal DNA'ya dönüştükten sonra, kalıcı biçimde hücre DNA'sına yerleşir. Transkripsiyon yoluyla oluşan yeni RNA virüs genomları sitoplazmada virüs proteinlerinin oluşumu için kalıp işlevini de yürütür ve sonra bunlarla birleşerek virüs partiküllerini oluşturur. Meydana gelen virüs

partikülleri ise, hücre yüzeyinden “**tomurcuklanma**” mekanizmasıyla açığa çıkar (Şekil 12-22). Buna göre, RNA tümör virüsleri (DNA tümör virüslerinin litik mekanizmayla yaptığı gibi) konak hücrenin ölümüne yol açmaz.

Şekil 12-22. RNA tümör virüslerinin genomunun hücre kromozomuna girişı ve virüs partiküllerinin hücrede çoğalımlı.

Ancak, kalıcı biçimde genomuna yerleştikleri bu hücreyi, tomurcuklanmayla çevreye yayılan, pek çok sayıda yeni virüs partikülünün kaynağı durumuna dönüştürür.

RNA virüslerinin kapsülleri içinde bulunan RNA, sedimentasyon katsayısı 70S olarak bulunduğundan, 70S RNA'sı olarak da tanınır. 70S RNA'sı iki eşdeğer (molekül ağırlığı 3×10^6 dalton) 35S RNA zincirinden oluşmuştur. RNA zinciri kapsül proteini (**gag**), ters transkriptaz (**pol**) ve zarf proteini (**env**)nin sentezi için gerekli bilgiyi taşır. Lineer şekliyle iki ucundaki tekrarlanan diziler ("long terminal repeat" (LTR)) virüs genomunun hücre genomuna yerleşmesinde oynadıkları rolün ötesinde içerdikleri güçlü promoter ve "enhancer" bölgeler aracılığıyla virüs **gag**, **pol**, ve **env** genlerinin öncelikli transkripsiyonunu sağlar (Şekil 12-23).

DNA tümör virüslerinin onkogenlerinin aksine, RNA tümör virüslerinin onkogenleri bunların çoğalmaları için gerekli değildir. Dolayısıyla, RNA virüslerinin kansere yol açmayan, fakat çoğalma yeteneklerini koruyan mutantları bulunmuştur. Genellikle eksilme mutantları olan bu virüsler normal virüsün genomunun yaklaşık % 15'inden yoksun olabilir. Virüslerin onkogenleri, rekombinant DNA teknikleriyle 1980'li yıllarda klonlanarak, tanımlanmıştır. Retrovirüs onkogenlerinin normal ve kanserli dokularda varlığını saptamak için yürütülen moleküler hibritleme çalışmaları ise, bu genlerin hücrelerde bulunduğunu göstermiştir (Şekil 12-24).

Şekil 12-23. Mutant (onkogenden yoksun) retrovirüslerin yardımıyla onkogenlerin normal virüs genomundan kazanımı. Klonlanan onkogenin hücre DNA'sı ile hibritlenme işlemi.

Şekil 12-24. Yinelenen, uzun uç diziler (LTR) üzerinden retrovirüs genomunun hücre genomuna yerleşmesi.

12.17. Onkogenler (ve proto-onkogenler)

Bir yandan transfeksiyon deneyleri, diğeryandan çeşitli retrovirüsler ile çalışmalar yaklaşık iki düzine onkogenin varlığını ortaya çıkarmıştır. Klonlanan bu genlerin dizi analizleri yapılmış ve şifreledikleri proteinler kısmen tanımlanmıştır. Klonlanmış retrovirüs onkogenleriyle yapılan hibritleme çalışmaları, bunlara karşılık gelen dizi ve genlerin yüksek canlı hücrelerinin genomlarındaki varlığını göstermektedir. Bu bulgulara göre, retrovirüs onkogenleri normalde hücre genomunda bulunan fizyolojik işlevli genlere karşılık gelmektedir. Bu genlerin hücre

genomundan ayrıışan virüs genomuna transdüklenmeleri, onların viral LTR bölgelerinin denetimi altına girmeleriyle sonuçlanmaktadır. Bu genler fizyolojik koşullarda hücrelerin çoğalmasından sorumlu olup, viral kontrol bölgelerinin denetimi altında sınırsız aktifleşmeyle, kanser genleri niteliğini kazanmaktadır. Nitekim, bulunan onkogenlerin hemen tümü çoğalma sinyali iletimi yollarındaki aşamalardan sorumlu genlerin mutant ve/ya da transdüklenmiş türevleridir.

Bu doğrultuda, onkogen ürünü **ErbB** proteini, EGF (epitelyal çoğalma faktörü) reseptörünün, yalnızca membran içi ve sitoplazmik bölümlerini içeren, bir türevidir. **sis** proteininin ise PDGF'nin kendisi olduğu bulunmuştur. **ras** proteinini etkileyen mutasyonların transformasyondaki rolü ise yukarıda irdelenmiştir. Bütün bu bulgular, çoğalma sinyali iletiminin değişik aşamalarından sorumlu protoonkogenlerin, aşağıda anlatılacak mekanizmalar aracılığıyla, denetimsiz aktifleşmesinin transformasyona yol açabileceğini gösterir.

Retroviral onkogenler, hücrel proto-onkogenlerle karşılaştırıldıklarında, önemli bazı farklılıklar gösterir. Bunlar hücrel kontrol bölgelerinden olduğu kadar, proto-onkogenlerin intronlarından da yoksundur. Bu husus, retroviral onkogenlerin ancak, transkripsiyon ve bunu izleyen kırılma işlemlerinden sonra, retrovirüsün RNA niteliğindeki genomunun bir bölümü haline dönüşebilmeleriyle açıklanabilir. Çoğalma sinyali iletimi yollarından sorumlu olan protoonkogenlerin evrim boyunca büyük ölçüde korunmuş yapılara sahip oldukları bulunmuştur. Örneğin, mayada da bulunan **ras** proto-onkogenlerinin birincil yapıları aradan geçen çok uzun bir evrim sürecine karşın insan **ras** proto-onkogenleriyle yaklaşık % 70 oranında benzerlik

göstermektedir. Bu, proto-onkogenlerin yüksek canlıların yaşamında üstlenmiş oldukları önemli işlevlerin bir kanıtı olarak düşünülebilir. Bu bulgu ayrıca sözkonusu işlevin, daha önce, histonların örneğindeki gibi, yapıdaki bir değişikliği çok sınırlı ölçüde kaldırabilen bir niteliğe sahip olduğunu gösterir. Retroviral ve transfeksiyon deneyleriyle belirlenen hücrel onkogenler Tablo 12-10'da topluca verilmiştir.

12.18. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşmesi

Retrovirüs genomuna transdüklenerek aktifleşmesinin yanısıra (hücrel) proto-onkogenlerin başlıca iki ana mekanizmayla aktifleşmesi ve transformasyona yol açması olanaklıdır.

- 1) Proto-onkogenlerin şifrelediği proteinlerin hücre içindeki miktarlarında artışa yol açan mekanizmalar. Normalde, özellikle erişkin organizmada, hücre çoğalmasından sorumlu genler baskılanmış olarak bulunur. Buna bağlı olarak ta, bu genlerin şifrelediği proteinler (örneğin hücre çoğalma faktörleri ve reseptörleri) hücrelerde çok düşük miktarda sentezlenir. Hücrel baskıyı ortadan kaldıran her mekanizma hücrelerin çoğalmasını sağlayarak proteinlerin denetimsiz sentezine, dolayısıyla transformasyona yol açabilir. Bu bağlamda,

		Tümör Transfeksi-	

Adı	Kaynak Retrovirüs	yon deneyleri	İzole edildiği tür
src	Rous sarkom virüsü	-	Tavuk
yes	Y73 Sarkom virüsü	-	Tavuk
fps(=fes)	Fujinami(St Felin) sarkom virüsü	-	Tavuk (kedi)
abl	Abelson murin lösemi virüsü	Lösemi	Fare (insan)
ros	UrII avyan sarom virüsü	-	Tavuk
fgr	Gardner-Rasheed felin sarkom virüsü	-	Kedi
ErbB	Avyan eritroblastoz virüsü	-	Tavuk
fms	McDonough felin sarkom virüsü	-	Kedi
mos	Maloney murin sarkom virüsü	Lösemi	Fare
raf(=mil)	3611 Murin sarkom virüsü	-	Fare
sis	Simyan sarkom virüsü	-	Maymun
Ha-ras	Harvey murin sarkom virüsü	Karsinom	Sıçan (insan)
Ki-ras	Kirsten murin sarkom virüsü	Karsinom,Lösemi ve Sarkom	Sıçan (insan)
N-ras	-	Lösemi,Sarkom	İnsan
myc	Avyan miyelositomatoz virüsü	-	Tavuk
N-myc	-	Nöroblastom	İnsan
myb	Avyan miyeloblastoz	Lösemi	Tavuk (insan)
fos	FBJ osteosarkom virüsü	-	Fare
ski	Avyan SKV 770 virüsü	-	Tavuk
fel	Retiküloendotelyoz virüsü	-	Hindi
ErbA	Avyan eritroblastoz virüsü	-	Tavuk
Blym	-	Lenfoma	İnsan (Tavuk)
mam	-	Karsinom	İnsan (Fare)
neu	-	Nöroblastom	Sıçan

Tablo 12-10. Onkogenler.

- a. Kimyasal mutagenler, proto-onkogenlerin düzenleyici bölgelerinde yol açtıkları mutasyonlarla, hücrel denetimi devre dışı

bırakabilir;

- b. Retrovirüs genomu, çevresine yerleşerek, proto-onkogeni denetimi altına alabilir. Böyle bir durumda retrovirüsün kendisinin bir onkogen taşımasına gerek yoktur. Ayrıca, LTR'in içerdiği enhancer" bölgeler nedeniyle virüs genomunun proto-onkogenin arkasına (3'-yanına) yerleşmesi de aktifleşme için yeterli olabilir (Şekil 12-25).

Şekil 12-25. Proto-onkogenlerin, çevresine yerleşen virüs genomunun etkisiyle, aktifleşme.

- c. Proto-onkogenin aktif bir kromozoma translokasyonu gerçekleşebilir. Bu mekanizmayla kanser oluşumunun tipik bir

örneği, Burkitt tümörlerinde (B-hücrelerinin oluşturduğu lenfomalarda) görülmektedir. Burkitt hücrelerinde aktifleştiği görülen **myc** proto-onkogeni normalde kromozom 8'de bulunur. Burkitt hücrelerinde ise, kromozom 8 ile, büyük sıklıkla, kromozom 14, daha seyrek olarak ise, kromozom 2 ya da 22 arasında karşılıklı translokasyonların olduğu gözlenmiştir (Şekil 12-26). **myc** geninin Ig genlerinin bulunduğu (yani yoğun bir transkripsiyon etkinliğinin gerçekleştiği) bu kromozomlara translokasyonla aktarımı sonucu aktifleştiği sanılmaktadır. Nitekim, rekombinant DNA çalışmaları bu olgularda translokasyon sonucu **myc** geninin Ig genleriyle kafa kafaya bir konuma (ve Ig genlerinin güçlü "enhancer" bölgesinin yakınına) geldiğini göstermektedir (Şekil 12-26). Burkitt tümörlerinde bulunan Epstein Barr virüsünün bu translokasyonların oluşumunda bir rol oynayıp oynamadığı şu anda kesinlikle bilinmemektedir.

İnsanda kansere yol açtığı bilinen diğer bir translokasyon örneğini Filadelfiya kromozomu oluşturur. Filadelfiya kromozomu, 9. ve 22. kromozomlar arasındaki karşılıklı ("resiprok") translokasyon sonucu, 22. kromozomdan türeyen kromozoma verilen addır. Bu translokasyon **abl** proto-onkogeninin 9.kromozomdan 22.kromozoma aktarılmasıyla sonuçlanır.

Şekil 12-26. Burkitt tümörlerinde kromozom 8
ve 14 arasında translokasyon.

Filadelfiya kromozomunun oluşumu, sırasıyla, kronik miyelogen lösemi (“chronic myelogenic leukemia”(CML)), akut, lenfositik olmayan lösemi (“acute nonlymphocytic leukemia”(ANLM)) ve akut lenfositik lösemi (“acute lymphocytic leukemia”(ALL)) olgularında rol oynar.

Şekil 12-27. Burkitt tümörlerinde **myc** geninin (kromozom 8), Ig ağır zincir genlerinin bulunduğu lokusa (kromozom 14), karşılıklı (resiprok) translokasyon sonucu aktarımı.

- d. Son bir mekanizmada ise bu proteinlerin hücrede miktarlarının artması, gen amplifikasyonu, yani proto-onkogenlerin sayılarının artmasıyla, orantılı olarak ortaya çıkar.
- 2) Protoonkogenlerin, düzenleyici bölge ya da sayılarında meydana gelen değişiklikler yerine, şifreleyen bölümlerinde (eksonlarında) meydana gelen mutasyonlarla da kanser oluşabilir. Böyle bir durumda şifrelenen proteinin hücre içindeki miktarından çok niteliği değişecektir. Bunun en tipik örneğini insanda kanser olgularının pek çoğunda aktifleşmiş olarak bulunan **ras** geninde gözlemek olanaklıdır. Daha önce de belirtildiği gibi, yapısal geninde meydana gelen nokta mutasyonları sonucu **ras** proteini p21 GTPaz etkinliğini yitirir, ancak GTP bağlama

özelliğini korur. Bunun hedef enzim (**raf**) sisteminde sürekli uyarıya yol açabileceği yukarıda tartışılmıştır.

12.19. Onkogenlerin şifrelediği proteinler-Kanser proteinleri

Onkogenlerin, şifreledikleri proteinlerin hücre içindeki konumu ve biyokimyasal özelliklerine göre, sınıflandırılması Tablo 12-11’de verilmiştir. Kanser proteinleri, konumlarına göre, membranla bağlantılı, sitoplazmik, çekirdek içi ve hücre dışı olmak üzere başlıca dört ana gruba ayrılabilir (Şekil 12 - 28). Moleküler özellikleri açısından bunlardan,

Şekil 12-28. Onkogen ürünlerinin (kanser proteinlerinin) hücre içi konumları.

Ad	Hücre Konumu	Sınıf	İşlev
Src	Plazma membranı		
Yes	Plazma membranı (?)		

fps (=fes)	Sitoplazma	(1)	Tirozin Kinaz
Abl	Plazma membranı		
Ros	Sitoplazma, plazma membranı		
Fgr	Plazma membranı		
erbB	Plazma membranı		
Fms	Sitoplazma	(2)	Sınıf (1) ile bağlantılı kinaz
Mos	Sitoplazma		
raf (=mil)	Sitoplazma		
Sis	Hücre dışı	(3)	Hücre çoğalma faktörü türevi
Has-ras	Plazma membranı	(4)	G-proteinleri
Ki-ras	Plazma membranı		
N-ras	Plazma membranı		
Myc	Çekirdek	(5)	Regülatif kromatin proteinleri
N-myc	Çekirdek		
Myb	Çekirdek		
Fos	Çekirdek		
Ski	Çekirdek		
Rel	(?)	(6)	Sınıflandırmayan

Tablo 12-11. Onkogenlerin şifreledikleri proteinlerin (onkoproteinlerin) özelliklerine göre sınıflandırılması.

özellikle membran bağlantılı konumu olanların Tablo 12-10'daki sınıf 1 temsilcileri) tirokin kinaz, Tablo 12-10'daki sınıf 2 proteinlerinin ise serin ya da treonin kinaz etkinliğine sahiptir. **ras** sınıfı proteinler daha önce de

belirtilmiş olduğu gibi, G-proteinleridir. Çekirdek içi konumlu ve **myc** proteininin başı çektiği proteinler ise, düzenleyici nitelikli (örneğin, transkripsiyon faktörü gibi) kromatin proteinleridir.

Diğer yandan, hücre çoğalması gibi, çok önemli bir olayın negatif geri besleme mekanizmalarıyla pek çok aşamada sıkı bir denetim altında olması beklenir. Böyle olunca, tek bir aşamadan sorumlu genin aktifleşmesinin transformasyon için yeterli olup olmadığı tartışmalıdır. Genellikle, transformasyon için en az iki onkogenin (özellikle **ras** ve **myc** onkogenlerinin) aktifleşmesinin gerektiği kabul edilmektedir. Nitekim, Weinberg tarafından yürütülen transfeksiyon deneylerinden çıkarılan, **ras** geninin tek başına transformasyon için yeterli olduğu, sonucunu burada düzeltmemiz gerekir. Zira, bu deneylerde kullanılan 3T3 fibroblastları ölümsüz, yani transformasyon için gerekli ilk koşulu gerçekleştirmiş (ve **myc** geninin aktifleşmiş olduğu) hücrelerdir. En son çalışmalar kanserleşme için mutasyona uğraması gerekli gen sayısının beş ya da altıya çıkabileceğini göstermektedir. Bu olgu kanserin **uzun süreli, çok aşamalı** oluşum süreci ile uyumludur.

12.20. Süpresör genler

Onkogenlerin yanısıra, son yıllarda, hücre çoğalmasında ve kanser oluşumunda rol oynayan ikinci bir gen grubu bulunmuştur. Bu grubun temsilcileri **tümör süpresör genleri** olarak adlandırılmaktadır. Süpresör genler hücre çoğalması sürecinde G1/S geçişini ve replikasyonu denetleyen ve baskılayan genlerdir. Onkogenlere karşıt yönlü işleve sahip olan bu genlerin, mutasyonlar sonucu, inaktifleşmesi transformasyona yol açar. Tümör süpresör genlerinin bilinen temsilcileri arasında retinoblastom (Rb), p53, nörofibromatoz (NG-1), DCC ("deleted in colon

carcinoma”), Wilms tümörü (WT) ve erbA genleri bulunmaktadır. Bu genlerin arasında en iyi tanımlanmış olan Rb geni, insanda 13.kromozomda (q^{14}) bulunur. Bu genin geniş delesyonlarla ortadan kalktığı olgular bilinmektedir. 13.kromozomda böyle bir mutant bölge taşıyan bireylerin yaşamları sırasında, ikinci Rb allelinin de yeni bir mutasyon sonucu devre dışı kalması, retinoblastom oluşumuna yol açar. P53 geni ise, insan kanserlerinin çok büyük bir yüzdesinde inaktifleşmiş olarak bulunmuştur. pRb ve p53’ün yukarıda açıklanan etki mekanizmalarının ışığında, onların genlerini inaktifleştiren mutasyonların ya da DNA tümör virüslerinin pRb ve p53’ü bağlayarak, tutuklayan onkoproteinlerinin, hücrelerin S evresine geçiş sürecini denetimden çıkardığı anlaşılmaktadır (bkz.Şekil 12-21). Son dönem çalışmaları, yukarıda belirtildiği gibi, özellikle, p53’ün inaktifleşmesine yol açan mutasyonların, insanda, kanser olgularının yaklaşık yarısından sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, çeşitli kimyasal mutagenlerin p53 geninde yol açtıkları mutasyonlar tanımlanmıştır. Aflatoksinin bu tür mutasyonlarla primer karaciğer kanserine yol açtığı, son olarak ta benziprenin epoksi türevinin akciğer (bronş epitel) hücrelerinde p53 geninin 157., 248. ve 273. kodonlarındaki guanin gruplarına kovalent bağlandığı gösterilmiştir. Bu kodonlar p53’ün DNA ile etkileşim bölgelerinde bulunan amino asitlere karşılık gelmekte ve akciğer kanserinde en sık mutasyona uğrayan kodonlar olarak bilinmektedir (Şekil 12-29). Bu bulgular sigara ile akciğer kanserinin oluşumu arasındaki ilişkiyi de en açık biçimde ortaya sermektedir. Konu bir genelleme ile bağlanacak olursa, proto-onkogenlerin denetimsiz aktifleşmesi ve/ya da süpresör genlerinin inaktifleşmesi transformasyona yol açmaktadır.

Şekil 12-29. Akciğer kanserinde p53 mutasyonlarının sıklığı.

12.21. Sonuç

Kanser oluşumunda dış (örneğin kimyasal ve fiziksel) ve iç etmenlerin bir olgudan diğerine değişen oranda katkı gösterdikleri görülür (Şekil 12-30 ve Şekil 12-31). Bunların kanserleşmedeki payı bir spektrum üzerinde gösterildiğinde, spektrumun bir ucunda iç etmenlerin, diğer ucunda ise, dış etmenlerin etkisi altında karşılaşılan kanser olguları bulunur. Sayısal açıdan ağırlık taşımayan bu uç örneklerin yanısıra, kanser olgularının büyük çoğunluğunda değişen ölçüde her iki tip etmenin de rol oynadığı görülür:

İç ve (ya da) dış etmenlerin etkisiyle transformasyona uğrayan hücrelerin tümör gelişimine yol açıp açmayacağı ise, ortaya çıkan kanser

hücrelerinin sayısına, çoğalma ve çevreye yayılma yeteneklerine (habislik derecesine), antijenik özelliklerine ve ayrıca makroorganizmanın bağışık konumuna bağlıdır.

Şekil 12-30. İç ve dış karsinojenik etmenlerin spektrumu.

-

Şekil 12-31. Kanser oluşumunun akış diyagramı.

→ kanserleşme yönünde aktifleşme

—| baskılama (inhibisyon)

* kalıtılan mutasyonlar (örneğin süpresör genlerini ya da DNA onarım sistemini inaktifleştirici mutasyonlar)

K A Y N A K L A R (Genel)

1. Alberts,B., Bray,D.,Lewis,J.,Raff,M.,Roberts,K., and Watson,JD.: Molecular Biology of the Cell, Garland, New York (1989).
2. Cameron,R.J.,Skofronick,J.G.: Medical Physics, A Wiley-Interscience

Publication New York (1978).

3. Caner,Y.: Biyofizik, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları (1996).
4. Cromer,H.H.: Physics for the Life Sciences, McGraw Hill Book Company, New York (1977).
5. Çelebi,G.: Biyofizik I, Çağlayan Kitabevi. İstanbul (1989).
6. Çelebi,G.: Editör. Spektroskopi ve Tıbbi Görüntüleme Yöntemleri. V.Ulusal Biyofizik Kongresi Panel Metinleri. Biyofizik Derneği Yayınları, İzmir, (1993).
7. Freifelder,D.: Physical Biochemistry. Implications to Biochemistry and Molecular Biology. W.T.Greeman and Company, San Francisco (1982).
8. Guggenheim,E.A.: Thermodynamics, North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1967).
9. Guyton,A.C.: Textbook of Medical Physiology, W.B.Saunders Company (1986).
10. Hallett,F.R.,Speight,P.A.,Stinson,R.H.: Introductory Biophysics, Halsted Press John Wiley and Sons Inc. New York (1977).
11. Hope,W.,Lohmann,W.,Markl,H.,Ziepler,H.: Biophysics, Springer Verlag (1983).
12. Klotz,I.: Introduction to Biomolecular Energetics. Academic Press, New York (1986).
13. Laskowski,W., and Pohlit,W.: Biophysik I&II, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1974).
14. Lehninger,A.: Bioenergetik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974).

15. Nurten,R.: Editör. VI. ve VII.Ulusal Biyofizik Kongrelerinde
Ödül Alan Posterler. Biyofizik Derneği Yayınları, İstanbul, (1996).
16. Nurten,R.: Düzenleyen. Biyofizik Uygulama Notları, İstanbul
(1996).
17. Pehlivan,F.: Biyofizik, Pelin Ofset Matbaası, Ankara (1989).
18. Stanford,A.L.: Foundation of Biophysik, Acad.Press.New York
(1975).
19. Stryer,L.: Biochemistry, Wilt. Freeman and Company, New York
(1976).
20. Volkenstein,M.V.: Biophysics Mir PUBLISHERS- Moscow (1983).
21. Watson,J.,Hopkins,H.N.,Roberts,J.W.,Steitz,J.A., and Weiner,A.M.
Molecular Biology of the Gene, 4.Edition, The Benjamin/Cummings,
Redwood City (1987).
22. Yıldırım,H.: Biyofizik, Anadolu Üniversitesi Basımevi (1985).

Ek Okuma Kaynakları

BÖLÜM 2:

- Olmstead,E.G.: Mammalian Cell Water, Lea and Fabiger (1966).

- Cameron,J.R.,Skofronick,J.G.: Medical Physics. Wiley Interscience Publication (1978).

BÖLÜM 3:

- Lawrance,C.W.: Cellular Radiobiology. Willian Clowes and Sons, London (1971).
- Özalpan,A.: Radyobioloji, Fen Fakültesi Basımevi İstanbul (1980).
- Sencer,E., Tiryaki,D., (düzenleyen) "Radyoimmunassay ve Tümör Antijenleri Belirleme Yöntemleri", Kurs notları. İstanbul Tıp Fakültesi Basımevi, (1981).

BÖLÜM 4:

- Gary,F.: DNA. Sci.Am.253, (4), 58-67 (1985).
- Darnell,J.E.: RNA. Sci.Am.253, (4), 68-87 (1985).
- Doolittle,R.F.: Proteins Sci.Am.253, (4), 88-99 (1985).

BÖLÜM 5:

- Morowitz,H.J.: Entropy for Biologist. Academic Press (1970).
- Warrick,H.M., and Spudick,J.A.: Myosin Structure and Function in Cell Biology, 3, 379-421 (1987).
- Edsall,J.T.,Gutfreund,H.: Biothermodynamics. The Study of Biochemical Processes of Equilibrium, John Wiley and Sons Inc. (1983).
- Matsudaira,P.: Modular Organization of Actin Crosslinking Proteins. TIBS 16, 87-103 (1991).
- Stein,W.D.: Transport and Diffusion Across Cell Membranes Academic Press Inc. New York (1986).
- Bagshaw,C.R.: Muscle Contraction. Chapman and Hall London (1993).

- Goca,N.,Şahin,Y. Molekülün yapısı. Cilt 1 ve 2. Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Ofset Tesisleri (1993).
- Sackman,E.: Physical Foundations of the Molecular Organisation and Dynamics of Membranes. In: Biophysics Hoppe,W.,Lohmann,W., Markl,H.,Ziepler,H. Springer Verlag Berlin (1983) Chapter 12.
- Appleton,G.J.,Krishnamoorthy,P.N. (Çeviren Y.Atakan): Radyoizotopların Emniyetle Kullanılmasında Sağlık Fiziği. T.C.Atom Enerjisi Komisyonu Yayınları, Bilimsel Yayınlar Seri B/18. Ankara (1966).
- Çokyüksel,O.,Öber,A.,Camuşcu,S.,Numan,F.: Röntgen Fiziğine Giriş. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları İstanbul (1987).
- Nurten,R.: Editör. VI. ve VII. Ulusal Biyofizik Derneği Yayınları, İstanbul, (1996).

BÖLÜM 6:

- Hope,W.,Lohman,W.,Markl,H.,Ziepler,H.: Biophysik, Springer Verlag Berlin (1977).
- Wiener,N.: Sibermetik, Say Kitabevi, İstanbul (1982).
- Songar,A.: Sibermetik, Temel Matbaa İstanbul, (1980).
- Steinbuch,K.: Automat und Mensch, Springer Verlag Berlin (1971).
- Wyard,S.J.: Solid State Biophysics Mcgraw Hill Book Company New York (1969).
- Changeux,J.P.: Beyinde kimyasal sinyaller, Bilim, Ocak, 38-45 İstanbul (1994).
- Alberts,B.,Bray,D.,Lewis,J.,Raff,M.,Roberts,K.,Watson,J.D. Molecular

Biology of the Cell. 2.edition Garland Publishing Inc. New York (1989).

BÖLÜM 7:

- Katchalsky,A.,Curran,P.F. Non-equilibrium Thermodynamics in Biophysics, Harvard,Cambridge (1965).
- Morris,J.G.A. Biologists Physical Chemistry. 2.edition Edward Arnold London (1976).
- Dixon,M.,Webb,E. Enzymes. 2.Edition Longmans Green London (1967).
- Gutfreund. Enzymes. Physical Principles. Wiley-Interscience London (1972).
- Stryer,L.: Biochemistry. Freeman Comp. San Francisco (1975).
- Rawn,J.D.: Biochemistry. Neil Patterson Publ. (1989).

BÖLÜM 8:

- Maniatis,T.,Fritsch,E.F.,Sambrook,J.: Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Lab. (1982).
- Watson,J.D.,Witlowski,Gilman,Zoller.: Recombinant DNA Scientific American Books (1992).
- Weatherall,D.J.: The New Genetics and Clinical Practice Oxford Univ. Press (1991).

BÖLÜM 9:

- Hershfield et.al. New Eng.J.Med. 316, 589-596 (1987).
- Capecchi,M.R. Targeted Gene Replacement Sci.Am. March 34-41 (1994).
- Culver,K.W.,Ram,Z.,Walbridge,S.,Ishi,H.,Oldfield,E.H., Blaese,R.M. In Vivo Gene Transfer with Retroviral Vector-producer Cells for Treatment of Experimental Brain Tumors Science 256, 1550-1552(1992)

- Randall,T. Gene Therapy for Brain Tumors in Trials, Correction of Inherited disorders a hope. JAMA 269 (17), 2181-2182 (1993)
- Newman,R.,Alberts,J.,Anderson,D.,Carner,K.,Heard,C.,Norton,F., Raab,R.,Reff,M.,Shuey,S.,Hanna,N. Primatization of Recombinant Antibodies for Immonotherapy of Human Diseases: A Macaque/Human Chimeric Antibody Against Human CD4. Biotechnology 10, 1455-1460 (1992).

BÖLÜM 10:

- Gehring,W.: The Molecular Basis of Development. Scientific American 253, 153-162 (1985).
- Grunstein,M.: Histones as Regulators of Genes. Sci.Am. 267, 40-47 (1992).
- Murray,A.W. and Kirschner,M.W.: What Controls the Cell Cycle. Scientific American 264, 34-41 (1991).
- Duboule,D.,Dolie.,Gaunt,S.J.: Development of Genes in Mammals. The World Scientist 38, 24-34 (1991).
- Beardsley,T.: Smart Genes. Scient.Amer. 265, 86-95 (1991).
- Kenyon,C.: If Birds Can Fly, Why Can't We? Homeotic Genes and Evolution. Cell 78, 175-180 (1994).
- Lawrance,P.A. and Morata,G.: Homeobox Genes: Their Function in Drosophila Segmentation and Pattern Formation. Cell 78, 181-189 (1994).
- Krumlauf,R.: Hox Genes in Vertebrate Development. Cell 78, 191-201 (1994).
- Gehring,W. et al.: Homeodomain-DNA Recognition. Cell 78, 211-223

(1994).

BÖLÜM 11:

- Roitt, I.M.: Essential Immunology, ELBS/Blackwell Scientific Publications (1988).
- Kennedy, R.C., Melnick, J.L. and Dreesman, G.R.: Anti-idiotypes and Immunity Sci.Am. 255, 40-48 (1986).
- Marrack, P. and Kappler, J.: The T cell and its Receptor, Sci.Am. 254, 28-37 (1980).
- Tonegawa, S.: The Molecules of the Immune System. Sci.Am. 253, 122-131 (1985).
- Young, J.D.E. and Cohn, Z.A.: How Killer Cells Kill. Sci.Am. 258, 28-34 (1988).
- Aaronson, S.: Growth Factors and Cancer. Science 254, 1146-1152 (1991).
- v.Boehmer, H. and Kisielow, P.: How the Immune System Learns About Self. Scientific American 265, 74-81 (1991).
- Kisielow, P.: Tolerans in T-Cell-Receptor Transgenic Mice Involves Deletion of Non-mature CD⁴⁺⁸⁺ Thymocytes. Nature 333, 742-746 (1988).
- v.Boehmer, H.: Developmental Biology of T Cells in T Cell-Receptor Transgenic Mice. Ann.Rev.Immun. 8, 531-556 (1990).
- Nossal, G.J.V.: Cellular Mechanisms of Immunological Tolerance. Ann.Rev.Immun. 1, 33-62 (1983).
- Smith, H.R. and Steinberg, A.D.: Autoimmunity-A perspective. Ann.Rev.Immun. 1, 175-210 (1983).
- Jerne, N.K.: In, Idiotypes-Antigens on the Inside, ed.I. Western-Schnurr,

pp. 12-15 Basel: Editiones Roche.

- Bretscher,P. and Cohn,M.: A Theory of Self-Nonself Discrimination: Paralysis and Induction Involve the Recognition of One and Two Determinants on an Antigen Respectively. Science 169, 1042-1049(1970).
- Leder,P.: Genetics of Antibody Diversity. Sci.Am. 246, 72-83 (1982).

BÖLÜM 12:

- Bermek,E.: Kanser-Virüs İlişkisi. XXV.Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı 2, 219-222 (1992).
- Berridge,M.J.: The Molecular Basis of Communication within the Cell. Sci.Am. 253, 142-152 (1985).
- Ames,B.N.: Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer. Science 204, 587-593 (1979).
- Gilman,A.: G Proteins. Sci.Am. 267, 36-43 (1992).
- Zur Hausen,H.: Viruses in Human Cancers. Science 254, 1167-1173 (1991).
- Bishop,J.M.: Cellular Oncogenes and Retroviruses. Ann.Rev.Biochem. 52, 301-354 (1983).
- Baltimore,D.: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumor Viruses. Nature 226, 1209-1211 (1970).
- Huebner,R.J. and Todaro,G.J.: Oncogenes of RNA Tumor Viruses as Determinants of Cancer. Proc.Natl.Acad.Sci. 64, 1087-1094 (1969).
- Temin,H.: Nature of the Provirus of Rous Sarcoma. Natl.Cancer Inst.Monogr. 17, 557-570 (1964).
- Croce,C. and Klein,G.: Chromosome Translocations and Human Cancer.

Sci.Am. 252 (3), 44-61 (1985).

- Temin,H. and Mizutani,S.: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226, 1211-1213 (1970).
- Weinberg,R.A.: Oncogenes of Spontaneous and Chemical Induced Tumors. Adv.Cancer Res. 36, 149-164 (1982).
- Weinberg,R.A.: A Molecular Basis of Cancer. Sci.Am. 249 (5), 102-114 (1983).
- Wyllie,A.H.,Kerr,J.F.R. and Currie,A.R.: Cell Death: the Significance of Apoptosis. Int.Rev.Cytol. 68, 251-306 (1980).
- Clarke,A.R.,Purdie,C.A.,Harrison,D.J.,Morris,R.G.,Bird,C.C., Hooper,M.C. and Wyllie,A.H.: Thymocyte Apoptosis Induced by p53-Dependent and Independent Pathways. Nature 362, 849-852 (1993).
- Denissenko,M.F.,Pao,A.,Tang,M.S. and Pfeiffer,G.P.: Preferential Formation of Benzo(a)pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in p53. Science 274, 430-432 (1996).
- Barbacid,M.: ras genes. Ann.Rev.Biochem. 56, 779-827 (1987).
- Fantl,W.J.,Johnson,D.E. and Williams,L.T.: Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. Ann.Rev.Biochem. 62, 453-481 (1993).
- Nishida,E. and Gotoh,Y.: The MAP Kinase Cascade is Essential for Diverse Signal Transduction Pathways. Trends Biochem.Sciences 18, 128- 131 (1993).
- Sherr,C.J.: D-type cyclins. Trends Biochem.Sciences 20, 187-190(1995).
- Hale,A.J.,Smith,C.A.,Sutherland,L.C.,Stoneman,V.E.A., Longthorne,V.L.,Culhane,A.C. and Williams,G.T.: Apoptosis: Molecular Regulation of Death.Eur.J.Biochem. 236, 1-26 (1996).

- Hunter,T.: The Proteins of Oncogenes. Scient. Amer. 251, 60-69 (1984).

Şekil ve Resimler İçin Kullanılan Kaynaklar Listesi:

Bölüm 2:

Şekil 2-2., Halliday,D.,Resnick,R. : Physics (Part 2), Willey

International Edition New York (1960); (Fig.26-4).

Şekil 2-4., Suard,M.,Praud,B.,Praud,L.: Physikalische Chemie, Stuttgart (1976); (Abb.110).

Şekil 2-6 ve 2-9., Mathews,C.K., van Holde,K.E.: Biochemistry Benjamin/Cummings Publishing Co Redwood City Ca (1990); (Fig.2-5 ve 2-1).

Bölüm 3:

Şekil 3-9., Önen,S.: Radyasyon Biyofiziği (1993); (Sayfa 44).

Şekil 3-10,Şekil 3-12., Mathews,C.K., van Holde,K.E.: Biochemistry Benjamin/Cummings Publishing Co Redwood City Ca (1990); (Fig.T.16-3,Fig.T.21-1).

Şekil 3-13., Biorad Catalogue (1996); (Fig.4).

Şekil 3-23., Metzler,D.E.: Biochemistry Academic Press New York, (1977); (Fig.13-1).

Şekil 3-24,3-25,3-26,3-28), van Holde,K.E.: Physical Biochemistry. Foundations of Modern Biochemistry Series, Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey (1971); (Fig.8-3,Fig.8-4,Fig.8-5, Fig.8-13).

Şekil 3-33., Spektroskopi Yöntemleri (Derleyen G.Çelebi). 5.Ulusal Biyofizik Kongresi Panel Metinleri, İzmir (1993); (Şekil 8).

Bölüm 4:

Şekil 4-1., Laskowski,W.,Pohlit,W.: Biophysik. Stuttgart (1974); (Abb.5-2).

Şekil 4-7,Şekil 4-8,Şekil 4-9,Şekil 4-10,Şekil 4-11,Şekil 4-12,Şekil 4-13,

Şekil 4-18,Şekil 4-22., Mathews,C.K.,van Holde,K.E.: Biochemistry.

The Benjamin/Cummings Publ. (1990); (Fig.5-12a,Fig.5-12b,Fig.6-2,Fig.

6-7, Fig. 6-3, Fig. 6-15, Fig. 6-26, Fig. 7-9, Fig. 7-9

Şekil 4-26, Şekil 4-29., Streier, L.: Biochemistry 2. Edition. W.H. Freeman (1981); (Fig. 4-7, Fig. 23-7).

Şekil 4-29., Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D.: Molecular Cell Biology, New York (1986); (Fig. 3-51).

Şekil 4-30., Voet, D. and Voet, V.G. Biochemistry. John Wiley and sons Publ. New York (1990); (Fig. 28-6).

Şekil 4-31., Darnell, Lodish, Baltimore Molecular Cell Biology New York (1986); (Fig. 3-56).

Şekil 4-32, Şekil 4-33, Şekil 4-34., Mathews, C.K., van Holde, K.E.: Biochemistry. The Benjamin/Cumming Publ. (1990); (Fig. 4-15, Fig. 4-16, Fig. 4-20, Fig. 4-19).

Şekil 4-35., Muscle Contraction. Clive R. Bagshaw 2.ed. Chapman Hall London (1993); (Fig. 3-1).

Şekil 4-36, Şekil 4-37, Şekil 4-38., Metzler, D.E.: Biochemistry. Academic Press, London (1977); (Fig. 2-28, Fig. 2-29).

Şekil 4-39, Şekil 4-50., Lehninger, A.L.: Biochemistry, Worth Publ. New York (1970); (Fig. 11-1, Fig. 11-2, Fig. 10-6).

Bölüm 5:

Şekil 5-9., Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D.: Molecular Cell Biology (1986); (Fig. 20-24).

Şekil 5-12., Mathews, C.K., Holde, K.E.: Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publ. (1990); (Fig. 18-25).

Şekil 5-13., Stryer, L.: Biochemistry. Freeman, W.H. Company San Francisco. (1975); (Fig. 10-5, Fig. 10-6).

Şekil 5-14, 5-15., Bretscher,M.: The Molecules of the Cell Membrane. Sci.Am. 253, 100-109 (1983);

Şekil 5-17,5-18., Lienhard,G.E.,Slot,J.W.,James,D.E.: Mueckler,M.M.: Sci.Am. 266 (1), 34-39 (1992).

Şekil 5-38, 5-39., Bangshaw,C.R.: Muscle 2.edition Contraction, Chapman,Hall,London (1993); (Fig.3-1 ve Fig.3-2).

Bölüm 7:

Şekil 7-2,Şekil 7-4,Şekil 7-6,Şekil 7-7., Mathews,C.K.van Holde,K.E.: Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publ. (1990); (Fig.10-3, Fig.10-5, Fig.10-8, Fig.10-15).

Şekil 7-19,7-26., Alberts,B.,Bray,D.,Lewis,J.,Raff,M.,Roberts,K., Watson,J.D.: Molecular Biology of the Cell. Garland Publ. (1989); (Fig.10-13, Fig.3-61).

Bölüm 8:

Şekil 8-13., Lehninger,A.L.: Principles of Biochemistry. (1993); (Fig 24-6).

Şekil 8-16., Lehninger,A.L.: Molecular of the Cell. Third edition. (1994); (Fig.9-30).

Şekil 8-17, Şekil 8-21., Lehninger,A.L.: Principles of Biochemistry. (1993) (Fig.25-11, Fig.26-17).

Bölüm 9:

Şekil 9-18., Capecchi,M.R. Targeted Gene Replacement Sci.Am. March 34-41 (1994).

Bölüm 10:

Şekil 10-2,Şekil 10-3,Şekil 10-4,Şekil 10-5.Şekil 10-8,Şekil 10-11., Alberts,B.,Bray,D.,Lewis,J.,Raff,M.,Roberts,S.K.,Watson,J.D. Molecular Biology of the Cell. Garland Publ. New York (1983) ;(Fig.8-4,Fig. 8-3,Fig.8-5,Fig.8-24,Fig.14-3,Fig.14-9).

Şekil 10-22., Gehring,J.W.et al. Homeodomain-DNA Recognition, Cell. 78, 211-223 (1994).

Şekil 10-28., Beardsley,T. Smart Genes. Sci.Am. 265 (2), 86-95 (1991).

Bölüm 11:

Şekil 11-6,Şekil 11-7.Şekil 11-14., Alberts,B.,Bray,D.,Lewis,J.,Raff,M., Roberts,S.K.,Watson,J.D. Molecular Biology of the Cell. Garland Publ. New York (1983);(Fig.17-19,Fig.17-20,Fig.17-49).

Şekil 11-10., Silverton,E.W.,Navia,M.A.,Davies,D.R. Three-Dimensional Structure of an Intact Human Immunoglobulin. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 74, 5140-5144 (1977).

Şekil 11-8., Capra,J.D.,Kehoe,J.M. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 71, 4032 (1974).

Şekil 11-11.Şekil 11-18,Şekil 11-30., Roitt,I.M. Essential Immunology, ELBS Publ. Sixth Edition (1988); (Fig.4-9,Fig.3-24,Fig.8-11).

Şekil 11-24., Young,J.D.E.,Cohn,Z.A. How killer cells kill. Sci.Am. 258, 28-34 (1988).

Bölüm 12:

Şekil 12-19.,Weinberg,R.A. A Molecular Basis of Cancer. Sci.Am.

249 (5), 102-114 (1983).

Tablo 12-7., Zur Hausen,H. Viruses in Human Cancers. Science 1167-1173 (1991).

Şekil 12-23., Watson,J.D. Molecular Biology of the Gene. Third Edition W.A.Benjamin,Inc. (1977).

Tablo 12-8,Tablo 12-10., Hunter,T. The Proteins of Oncogenes. Sci.Am. 251 (2), 60-69 (1984).

Şekil 12-26,Şekil 12-27)., Crace,C.,Klein,G. Chromosome Translocations and Human Cancer. Sci.Am. 252 (3), 44-61 (1985).

Şekil 12-28., Hunter,T. The Proteins of Oncogenes. Sci.Am. 251 (2), 60-69 (1984).

Şekil 12-29., Denissenko,M.F.,Pao,A. Tang,M. Pfeifer Ged. Preferential Formation of Benzo(a)pyrene Aducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in p53. Science 274, 430-432 (1996).

Bazı Fizik ve Matematik Sabitleri

S1 Sisteminin Temel Birimleri:

Büyüklik	Adı	Sembolü	Tanım
Uzunluk	metre	m	Kripton-86 atomunun $2p_{10}$ ve $5d_5$ düzeyleri arasında geçiş sonucu yayınladığı ışığın dalga boyunun 1.650.763,73 katı(1960)
Kütle	kilogram	kg	Uluslararası Ağırlıklar ve Ölçümler Bürosu'nun Paris yakınlarındaki Sevres'deki laboratuvarında korunan belli bir platin-iridyum silindirin kütlesi
Zaman	saniye	s	Cesium-133 atomunun temel düzeyindeki ince yarılmalar arasındaki geçişimlerinin yaydığı radyasyonun periyodunun 9.192.631,770 katı (1967)
Elektrik akımı	amper	A	Boşlukta birbirinden 1 m uzağa konmuş,dairesel kesidi ihmal edilebilir boyutlu 1 m uzunluğunda iki telden geçen ve teller arasında 2×10^{-7} N kuvvet doğuran sabit akım
Termodinamik sıcaklık	kelvin	K	Suyun üçlü noktasının termodinamik sıcaklığının $1/273.16$ 'sı
Madde miktarı	mol	mol	karbon-12'nin 0.012 kilogramında bulunan atom sayısı kadar elementer nesne içeren sistem
Aydınlatma şiddeti	mum	cd	101.325 N/m^2 basınçta ve platin buharlaşma sıcaklığında bulunan bir siyah cismin $(1/600.000)\text{m}^2$ 'lik yüzeyde oluşturduğu aydınlatma.

S1 Sisteminin Türetilmiş Birimleri:

Büyüklik	Birimin Adı	Sembolü
alan	metrekare	m^2
hacim	metreküp	m^3
frekans	hertz	$Hz(s^{-1})$
kütle yoğunluğu	metreküp başına kütle	kg/m^3
hız	saniyede metre	m/s
açısal hız	saniyede radyan	rad/s
ivme	saniyede saniye başına metre	m/s^2
açısal ivme	saniyede saniye başına radyan	rad/s^2
kuvvet	newton	$N (kg.m/s^2)$
basınç	paskal	$Pa (N/m^2)$
iş, enerji, ısı	Joule	$J (N.m)$
güç	watt	$W (J/s)$
elektrik yükü	coulomb	$C (A.s)$
potansiyel farkı	volt	$V (W/A)$
elektrik alan şiddeti	metre başına volt	V/m
direnç	ohm	$\Omega (V/A)$
kapasitans	farad	$F (A.s/V)$
manyetik akı	weber	$Wb (V.s)$
induktans	henry	$H (V.s/A)$
manyetik akı yoğunluğu	tesla	$T (Wb/m^2)$
manyetik alan şiddeti	metre başına amper	A/m
entropi	kelvin başına joule	J/K
ısı iletkenliği	kelvin başına watt/metre	$W (m.K)$

Temel Fiziksel Sabitler

Sabit	Sembol	Değeri

Boşlukta ışık hızı	c	$2,997925 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$
Gravitasyon sabiti	G	$6,670 \cdot 10^{11} \text{ N/m}^2 \text{ kg}^{-2}$
Elementer yük	e	$1,6022 \cdot 10^{-19} \text{ C}$
Avogadro sayısı	N_A	$6,0222 \cdot 10^{26} \text{ mol}^{-1}$
Kütle ünitesi	u	$1,66053 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
Elektron durağan kütlesi	m_e	$9,1096 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$
Proton durağan kütlesi	m_p	$1,67262 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
Nötron durağan kütlesi	m_n	$1,67492 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ $1,008652 \text{ u}$
Faraday sabiti	F	$9,6487 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$
Planck sabiti	h	$6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$
Gaz sabiti	R_0	$8,3143 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $1,9872 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
Boltmann sabiti	k	$1,3806 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
Atomik mass unit(dalton)	amu	$1,661 \cdot 10^{-24} \text{ g}$
Elektronvolt	eV	$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ $3,828 \cdot 10^{-20} \text{ kal}$
Curie	Ci	$3,70 \cdot 10^{10}$ bozunum/saniye
1 Gray	Gy	1 Joule/kg= 100 Rad
1 rad (absorplanan ışın düzü)	rad	100 erg/g= Joule/g
1 Becquarel	Bq	3,7 kBq= 0,1 μCi
1 röntgen		Normal koşullarda 1 cm^3 kuru havada $2,08 \cdot 10^9$ iyon çifti oluşturan radyasyon miktarı

Uzunluk birimleri değerleri

1 fermi	$= 10^{-12}\text{m}$
1 angström(Å)	$= 10^{-10}\text{m}$
1 parsec	$= 3,084.10^{13}\text{km}$
1 astronomik birim	$= 1,495.10^8 \text{ km}$

Basınç birim değerleri

1 torr	$= 1 \text{ mm Hg } (0^\circ\text{C})$
	$= 1,333.10^2 \text{ newton/m}^2$
	$= 1,333.10^2 \text{ pascal}$
	$= 1,316.10^{-3} \text{ atmosfer}$

Enerji birim değerleri

1 kalori (cal)	$= 4,187 \text{ joule}$
1 kilokalori (kcal)	$= 1000 \text{ cal}$
1 erg	$= 10^{-7} \text{ joule}$
1 kilowatt/saat	$= 3,6.10^6 \text{ joule}$
1 beygir gücü	$= 2,685.10^6 \text{ joule}$
1 Joule	$= 1 \text{ kgm}^2\text{s}^{-2} = 10^7 \text{ erg} = 0,239 \text{ cal} = 1 \text{ watt/s}$

Önerilen Ünite Önekleri:

Katlar	Önekler	Semboller
10^{18}	exa	E
10^{15}	pecta	P
10^{12}	tera	T
10^9	giga	G
10^6	mega	M
10^3	kilo	k
10^2	hecto	h
10	deka	da
10^{-1}	deci	d
10^{-2}	centi	c
10^{-3}	milli	m
10^{-6}	micro	μ
10^{-9}	nano	n
10^{-12}	pico	p
10^{-15}	femto	f
10^{-18}	atto	a

Sıcaklık Birimlerini Dönüştürme Cetveli

Dönüştürülecek Birim:	$^{\circ}\text{K}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{F}$
$^{\circ}\text{K}$	-	$^{\circ}\text{K} - 273,15$	$1,8. ^{\circ}\text{K} - 459,67$
$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C} + 273,15$	-	$1,8. ^{\circ}\text{C} + 32$
$^{\circ}\text{F}$	$0,5. ^{\circ}\text{F} + 255,372$	$0,5. ^{\circ}\text{F} - 17,7$	-

Ölçü Değişim Tablosu

**Yaşam Bilimlerinde Son Altmış Yılda Molekül Düzeyde Yapılan
Başlıca Buluşlar ve Bu Buluşların Yol Açtığı Gelişmeler***

- 1938** “Moleküler biyoloji” deyiminin ilk kez Rockefeller Vakfı Başkanı Warren Weaver tarafından kullanılması.
Weaver, W. Report of the Rockefeller Foundation pp.203-203.
- DNA kristal yapısının X-ışınları kırınımı ile incelenmesi.
Astbury, W.T. and Bell, F.O. X-ray study of thymonucleic acid. Nature 141, 747-748.
- Hemoglobin ve kimotripsinin kristal yapılarının X-ışınları kırınımı ile incelenmesi.
Bernal, J.D., Fankuchen, I. and Perutz, M. An X-ray study of chymotrypsin and hemoglobin. Nature 141, 523-524.
- 1939** Ellis ve Delbrück tarafından çoğalma özelliklerinin tanımlanmasıyla bakteri fajlarının genetik analizde kullanılmaya başlanması.
Ellis, M.L. and Delbrück, M. The growth of bacteriophage. J.Gen.Physiol. 22, 365-384.
- 1940** Pauling’in kimyasal değerlilik kavramının (Pauling, The Nature of the Chemical Bond) biyolojik molekül ve süreçlerin betimlenmesinde kullanımı.
Pauling, L. and Delbrück, M. The nature of the intermolecular forces operative in biological processes. Science 92, 77-79.

- 1941** **Neurospora**'nın biyokimyasal genetik çalışmalarında kullanılmaya başlanması. Garrod'nun "Inborn Errors of Metabolism" başlıklı eserinden beri bu alandaki en önemli ilerlemeyi oluşturan bu çalışmanın model organizmanın doğru seçiminin önemini sergilemesi.
Beadle,G.W. and Tatum,E. Genetic control of biochemical reactions in **Neurospora**. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 27, 499-506.
- Virüslerin X-ışınları kırınımı ve elektron mikroskopisi ile incelenmeye başlanması.
Bernal,J.D. and Frankuchen,I. X-ray and crytalographic studies of plant virus preparations. J.Gen. Physiol. 25, 111-165.
- 1942** Bakteri fajlarının elektron mikroskopisi. T2 fajının görüntüleri karşısında bir mikrobiyoloğun bağırışı. "Mein Gott. They have tails!" (Tanrım, kuyrukları da varmış!).
Luria,S.E. and Anderson,T.F. Identification and characterisation of bacteriophages with the electron microscope. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 28, 127-130.
- 1943** Direncin bakterilerin var olan bir özelliği olduğunun , dirençli bakterinin bir bakteri topluluğu içindeki seleksiyonu ile izlenebileceğinin ve indükleyici ayıraçların etkisi ile yeni ortaya çıkan bir özellik olmadığının gösterilmesi
Luria,S.E. and Delbrück,M. "Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance". Genetics 28, 491-511.
- Hücre membranlarında potansiyel ve impedans ölçümlerinin yapılması
Goldman, D.E., Potantial, impedence and rectification in membranes. J. Gen. Physiol, 27, 37-60.

1944 **Pneumococcus**'un DNA transferi yoluyla transformasyonu.

Avery,O.T.,Macleod,C. and McCarty,M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from **Pneumococcus** type III. J.Exp.Med. 79, 137-158.

E.Schrödinger'in "What is Life?" başlıklı kitabının yayınlanmasıyla fizikçilerin moleküler biyolojinin ilginç konu ve problemlerine yönlendirilmeleri.

Schrödinger,E. What is Life? The Physical Aspect of the Living Cell, Cambridge University Press.

1945 Faj genomlarında mutasyonların ortaya çıkışının gösterilmesiyle fajların genetikte etkin biçimde kullanılmalarına başlanması.

Luria,S.E. Mutations of bacterial viruses affecting their host range. Genetics 30, 84-99.

1946 İkili biyokimyasal **E,coli** mutantlarının kullanımıyla bakterilerde rekombinasyonun gösterilmesi.

Lederberg,J. and Tatum,E.L. Gene recombination in E.coli. Nature 158, 558.

Nükleer magnetik rezonans tekniği birbirinden bağımsız olarak iki ayrı fizikçi tarafından bulundu.

Bloch, F.,Phys Rev. 70, 460

Purcell, E.M. ,Phys Rev. 70, 988

1948 Diploit hücrelerin haploit hücreden iki kat daha fazla DNA içerdiğinin gösterilmesi.

Boivin,A.,Vendrely,R. and Vendrely,C. L'acide desoxyribonucleique du noyau cellulaire, depositaires des caracteres hereditaires: arguments d'ordre analytique. C.R.Hebd.Seances Acad.Sci. , 226, 1061-1063.

- 1949** Normal bireylerin ve orak hücre anemili hastaların hemoglobin örneklerinin farklı elektroforetik devinim özelliklerinin gösterilmesi.

Pauling,L.,Itano,H.,Singer,S.J. and Wells,I.C.

Sickle cell anemia: a molecular disease. Science 110, 543-548.

Fajlarda rekombinasyon olaylarının gösterilmesi.

Hershey,A.D. and Rotman,D. Genetic recombination between host range and plaque-type mutants of bacteriophage in single bacteria

cells.

Genetics 34, 44-71.

- 1950** Chargaff tarafından DNA'daki A/T ve G/C oranlarına ilişkin kuralların ortaya konması.

Chargaff,E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanisms of their enzymatic degradation Experientia 6, 201-209.

Lisojenik infeksiyonun tanımlanması.

Lwoff,A. and Gutman,A. Recherches sur un **Bacillus megatherium** lysogene. Ann.Inst.Pasteur. 78, 711-739.

Lwoff,A.,Siminowitch,L. and Kjeldgaard,N. Introduction de la production de bacteriophages chez un bacterie lysogene. Ann.Inst.Pasteur. 79, 815-858.

- 1951** Proteinlerin α -sarmal yapılarının bulunması.

Pauling,L. and Carey,R.B. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 37, 235-285.

İnsülinin amino asit dizilimine ilişkin çalışmaların yayın-

lanması.

Sanger,F. and Tuppy,H. The amino acid sequence of the phenylalanyl chain of insulin. Biochem.J. 49, 463-490.

Mc Clintock tarafından mısırdaki hareketli genetik elementlere (transposonlara) ilişkin bulgu ve gözlemlerin yayınlanması

Mc Clintock,B. Chromosome organisation and gene expression. Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 16, 13-57.

1952

Faj DNA'sının faj proteinlerinden bağımsız olarak infeksiyöz olduğunun gösterilmesi.

Hershey,A.D. and Chase,M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J.Gen.Physiol. 36, 39-56.

Genetik çalışmalar için önemli tekniklerin geliştirilmesi.

Lederberg,J. and Lederberg,E.M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants J.Bacterial. 63, 399-406.

Sarmal yapının belirlenmesinde Fourier transform analizi yönteminin geliştirilmesi.

Cochran,W. and Crick,F.H.C. Evidence for the Pauling-Corey α -helix in synthetic peptides. Nature 169, 234-235.

Aksiyon potansiyelinin oluşumunu belirleyen mekanizmaların tanımlanması.

Hodgkin,A.L. and Huxley,A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J.Physiol. 116, 449-472.

Hodgkin,A.L. and Huxley,A.F. A quantitative

description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J.Physiol. 117, 500-544.

- 1953** DNA çift sarmal yapısı.
Watson,J.D. and Crick,F.H.C. Molecular structure of nucleic acids-a structure for deoxyribonucleic acid. Nature 171, 737-738.
- 1954** Kalıtsal şifre üzerinde kuramsal çalışmalar.
Gamow,G. Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structure. Nature 173, 318.
- In vitro** protein sentezi koşullarının geliştirilmesi.
P.C.Zamecknik and E.B.Keller. Relationship between phosphate energy donors and incorporation of labelled amino acids into proteins. J.Biol.Chem. 209, 337-354.
- Kas kasılmasına temel oluşturan yapısal değişikliklerin bulunuşu.
Huxley,A.F. and Niedergerke,R. Structural changes in muscle during contraction. Nature 173, 971-973.
- 1955** Proteinlerin kristal yapılarının X-ışınları kırınımı ile anali-

zinde ağır metallerin kullanımı.

Green,D.W.,Ingram,V. and Perutz,M. The structure of hemoglobin. IV.Sign determination by the isomorphous replacement method. Proc.R.Soc. London Ser. A 225, 287-307.

Gen haritalama çalışmalarının başlaması. rII bölgesinin yapısının haritalanması.

Benzer,S. Structure of a genetic region in bacteriophage. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 41, 344-354.

Nükleik asitlerin sentezini mümkün kılan polinükleotit fosforilaz enziminin bulunuşu.

Grunberg-Manago,M. and Ochoa,S. Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides: Polynucleotide phosphorylase. J.Am.Chem.Soc. 77, 3165-3166.

Adaptör hipotezi. Protein sentezinde adaptör moleküllerin DNA'daki şifre sözcüklerinin karşılığı amino asitlerin proteinlere yerleştirilmesinde işlev görebileceğinin ileri sürülmesi.

Crick,F.H.C. On degenerate templates and the adaptor hypothesis.a note for the RNA Tie Club.

Nükleik asitlerin kimyasal sentezinde daha sonraları geniş kullanım bulacak tekniklerin geliştirilmesi.

Michelson,A.M. and Todd,A.R. Nucleotides XXXII.Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3':5' internucleotide linkage. J.Chem.Soc. 4, 2632-2638.

1956

E.coli hücrelerinin fajlar tarafından enfeksiyonu sürecinde

hızlı dönüşümlü ve baz içeriği faj genomunun baz içeriğine benzeşik bir RNA kesimin ortaya çıkışının gözlenmesi. mRNA'nın varlığına ilişkin ilk bulumlar.

Volkin,E. and Astrachan,L. Phosphorus incorporation in **E.coli** ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. Virology 2, 146-161.

Saf tütün mosaik virüsü RNA'sının infeksiyöz olduğunun gösterilmesi.

Gierer,A. and Schramm,G. Infectivity of nucleic acid from tobacco mosaic virus. Nature 177, 702-703.

cAMP'nin bulunuşu-Hücre sel düzenlenme mekanizmalarına ilişkin bilgiye çok önemli bir katkı.

Sutherland,E.W. and Wosiliat,W.D. J.Biol.Chem. 218, 459.

1957

Kalıtsal şifre üzerine kuramsal çalışmaların devamı. Kalıtsal bilginin ardaşık sıralı, ancak örtüşmeyen sözcüklerle aktarımının gerektiğinin irdelenmesi.

Brenner,S. On the impossibility of all overlapping triplet codes in information transfer from nucleic acid to protein. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 43, 687-694.

Myoglobin'in üçboyutlu yapısının 6Å'lık ayırım da aydınlanması.

Kendrew,J.C.,Bado,G.,Dintzis,H.M., Perrish,R.G.. and Wyckoff,H.T. Three dimensional structure of sperm-whale myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. Nature 181, 662-666.

Ingram tarafından normal (HbA) ve orak hücre hemoglobini (HbS) arasındaki farkın tek bir amino asit değişikliğinden (glutamine → valin) kaynaklandığının gösterilmesi.

Ingram,V. Gene mutations in human hemoglobin the chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. Nature 180, 326-328.

Antikorların oluşumuna ilişkin olarak klonal seleksiyon kavramının ortaya atılması.

Burnet,F.M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. Austy.J.Sci. 20, 67.

1958 Crick tarafından adaptör moleküllerinin nükleik asit yapılı ve şifre sözcüklerini tümleyen (komplementer) diziler taşıyan moleküller olarak tanımlanması.

Crick,F.H.C. On protein synthesis. Symp.Soc. Exptl.Biol. 12, 138-163.

Crick'in adaptör moleküllerine ilişkin düşünceleri üzerine transfer RNA moleküllerinin bulunuşu.

Hoagland,M.B.,Stephenson,M.L.,Scott,J.F., Hecht,L.I. and Zamecnick,P.C. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. J.Biol.Chem. 231, 241-257.

DNA'nın yarı koruyucu mekanizma ile replikasyonunun gösterilmesi.

Meselson,M. and Stahl.F.W. The replication of DNA in E.coli. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 44, 671-682.

DNA polimerazın bulunuşu.

Lehman,I.R.,Besman,M.J.,Simms,E.S. and Kornberg,A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I.Preparation of substrates and partial

purification of an enzyme from **Escherichia coli**. J.Biol.Chem. 233, 163-170.

- 1959** Çalışması için dört nükleotit ve bir DNA başlatıcı molekülü gereksinen RNA polimeraz enziminin eldesi.
Weiss,J.B. and Gladstone,L. A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid. J.Am.Chem.Soc. 81, 4118-4119.
- 1960** Nükleik asit hibritleme yönteminin geliştirilmesi.
Marmur,J. and Lane,D. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: biological studies. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 46, 453-461.
Doty,P.,Marmur,J.,Eigner,J. and Schildkraut,C. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 46, 461-476.
Rich,A. A hybrid helix containing both deoxyribose and ribose polynucleotides and its relation to the transfer of information between the nucleic acids. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 46, 1044-1053.
- Kendrew ve Perutz gruplarının proteinlerin (miyoglobin ve hemoglobinin) kristal yapılarına ilişkin çalışmaları.
Kendrew,J.C.,Dickerson,R.E.,Strandberg,B.E., et al. Structure of myoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 2Å resolution. Nature 185, 422-427.
Perutz,M.F.,Rossman,M.G.,Cullis,A.F. et al. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5Å resolution, obtained by X-ray analysis. Nature 185, 416-422.

1961

Operon kuramı. Gen anlatımının düzenlenmesi ve mRNA'nın varlığına ilişkin, moleküler biyolojiyi derinden etkileyen düşüncelerin yayınlanması.

Jacob,F. and Monod,J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J.Mol.Biol. 3, 318-356.

mRNA'nın varlığının bir dizi çalışma ile kesin olarak kanıtlanması.

Brenner,S.,Jacob,F. and Meselson,M. et al. The presence of an unstable RNA in *E.coli* following infection by T-even phage. Nature 190, 576-581.

Gros,F.,Hiatt,H.,Gilbert,W. et al. Unstable ribonucleic acid revealed by pulse-labelling of *Escherichia coli*. Nature 190, 581-585.

Hall,B.D. and Spiegelman,S. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 47, 137-146.

rII mutantlarıyla yapılan çalışmalarla şifre sözcüklerinin üç-harfli olduklarının gösterilmesi.

Crick,F.H.C.,Barrett,L.,Brenner,S. and Watts-Tobin,J. General nature of the genetic code for proteins. Nature 192, 1227-1232.

Genetik şifrenin çözülmesine yol açan buluş. Poli U'nun kullanıldığı *in vitro* protein sentezleyen sistemde poli Phe'nin sentezlendiğinin gösterilmesi.

Nirenberg,M.W. and Matthaei,J.H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E.coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 47, 1588-1602.

1962

Şifre sözcüklerinin tanınmasında adaptör (tRNA) moleküllerinin (mRNA kodon-tRNA antikodon)

etkileşimin belirleyiciliği. tRNA'ya eklenen yanlış bir amino asidin o tRNA'ya özgü amino asit yerine proteine girmesinin gösterilmesi.

Chapeville,F.,Lipmann,F., von Ehrenstein,G. et al. On the role of soluble nucleic acid in coding for nucleic acids. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 48, 1086-1092.

Farklılaşmış bir hücre çekirdeğinin çekirdeği inaktifleştirilmiş yumurta hücresine aktarımı ile yeni bir kurbağanın oluşumu-Klasik klonlama deneyi.

Gurdon,J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of freedding tad poles. J.Embryol.Exq.Morph. 10, 622-640.

1963 Allosterik etkileşimlerin protein etkinliğinin düzenlenmesindeki rolü.

Monod,J.,Changeux,J-P. and Jacob,F. Allosteric proteins and cellular control systems. J.Mol.Biol. 6, 306-309.

Solid-faz peptit sentezi.

Merrifield,R.B. Solid phase peptide synthesis. I.The synthesis of a tetrapeptide. J.Am.Chem.Soc. 85, 2149-2154.

1964 DNA(mRNA) ve proteinlerde kolineerliğin (eşboyutluluğun) gösterilişi.

Yanofsky,C.,Carlton,B.C.,Guest,J.R., Helinski,D.R. and Henning,U. On the colinearity of gene structure and protein structure. Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 51, 266-272.

Rekombinasyon olaylarında DNA ipliklerinin davranışlarının ve ortaya çıkan ara yapıların ("Holliday structure") tanımlanması.

Holliday,R. A mechanism for gene conversion in fungi. Genet.Res. 5, 282-304.

- 1965** “amber” ve “ochre” mutasyonlarının bitiş (terminasyon) sözcüklerinden (UAG ve UAA) kaynaklandığının gösterilmesi.
Weigert,M.G. and Garen,A. Base composition of nonsense codons in **E.coli**. Evidence from aminoacid substitutions at a tryptophan site in the alkalinephosphatase. *Nature* 206, 992-994.
Brenner,S.,Stretton,A.O. and Kaplan,S. Genetic code: “nonsense” triplets code for chain termination and their suppression. *Nature* 206, 994-998.
- 1966** Lac represörünün elde edilip, tanımlanması.
Gilbert,W. and Muller-Hill,B. Isolation of the lac repressors. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 56, 1891-1898.
Protein sentezinin başlatıcısının N-formilmetyonil-(F-Met-) tRNA olduğunun gösterilmesi.
Adams,J.M. and Cappechi,M.R. N-formyl-methionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 55, 147-155.
Bretscher,M.S. and Marcker,K.A. Polypeptidyl-s-ribonucleic acid and amino-acid-s-ribonucleic acidbinding sites on ribosomes. *Nature* 211, 380-384.
- 1967** Lizozimin üçboyutlu yapısının ilk enzim olarak 2Å ayırımında belirlenmesi.
Blake,C.C.F.,Mair,G.A.,North,A.C.T., Phillips,D.C. and Sarma,V.R. On the conformation of the hen egg-white lysozyme molecule. *Proc.R.Soc.London Ser.B.* 167, 365-377.
Blake,C.C.F.,Johnson,L.N.,Mair,G.A.et al. Crystallographic studies of the activity of the hen

egg-white lysozyme molecule. Proc.R.Soc.London Ser.B. 167, 378-388.

1970

Ters transkriptazın bulunuşu.

Baltimore,D. Viral RNA-dependent DNA polymerase. Nature 226, 1209-1211.

Temin,H.M. and Mizutani,S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226, 1211-1213.

Ca²⁺ tuzlarının kullanımıyla hücrelerin transformasyonu.

Mandel,M. and Higa,A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J.Mol.Biol. 53, 159-162.

Restriksiyon nükleazların DNA kesimlerinde kullanılmaya başlanması.

Smith,H.O. and Wilcox,K.W. A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I.Purification and general properties. J.Mol.Biol. 51, 379-391.

1971

Restriksiyon nükleazların DNA haritalama çalışmalarında kullanılması.

Danna,K. and Nathans,D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68, 2913-2917.

1972

Rekombinant DNA döneminin başlaması.

Jackson,D.A.,Symons,R.H. and Berg,P. Bio-chemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of **E.coli**. Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 69, 2904-2909.

Mertz,J. and Davis,R.W. Cleavage of DNA by RI restriction endonuclease generates cohesive ends. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 69, 3370-3374.

1973

Rekombinant DNA tekniklerinin ilk uygulamalarıyla iki direnç geninin (kanamisin ve tetrasiklin direnç genlerinin) aynı plasmide yerleştirilmesi.

Cohen,S.N.,Chang,A.C.Y.,Boyer,H.W. and Helling,R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc.Natl.Acad. Sci.USA. 70, 3240-3244.

Analitik etidyum bromür-agaroz elektroforezi.

Sharp,P.A.,Sugden,B. and Sambrook,J. Detection of two restriction endonuclease activities in Hemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry 12, 3055-3062.

Hayvan hücrelerinin çıplak DNA ile transformasyonu (transfeksiyonu).

Graham,F.L. and Erb,A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology, 52, 456-457.

Farklı DNA ipliklerinin 3' uçlarına eklenen tümleyici homopolimerik kuyruklar (örneğin poli A ve poli T) aracılığıyla ligasyonlarının sağlanması.

Lobban,P.E. and Kaiser,A.D. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. J.Mol.Biol. 78, 453-471.

Bakteri ribozomlarının ayrıştırılarak, saflaştırılan ögelerin (rRNA ve ribosomal proteinlerin) birleştirilmesiyle yeniden oluşturulması ("ribosomal self-assembly").

Namura,M. Assembly of bacterial ribosomes. Science 179, 864-873.

- 1974** Rekombinant DNA teknolojisinin uygulamalarının olası sonuçlarının irdelenerek kamuoyuna duyurulması (“the Berg letter”).

Berg,P.,Baltimore,D.,Cohen,S.N. et al.

Potential biohazards of recombinant DNA molecules. Science 185, 303.

Kromatin yapısının aydınlanmasıyla sonuçlanan çalışmaların hız kazanması-Nükleozom kavramının ortaya atılması.

Kornberg,R.D. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histones and about 200 DNA base pairs. Science 184, 868.

- 1975** Elektroforez ayrılmış ya da transformasyona uğratılmış bakterilerin kolonilerinde özgün DNA dizilerinin varlığının hibritleme yöntemleri (“Southern blot” ve “colony hybridization”) ile belirlenmesi.

Southern,E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol. 98, 503-517.

Grunstein,M. and Hogness,D.S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 72, 3961-3965.

İkiboyutlu poliakrilamit gel elektroforezi.

O’Farrell,P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J.Biol.Chem. 250, 4007-4021.

Monoklonal antikor hibridoma tekniğinin geliştirilmesi.

Köhler,G. and Milstein,C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497.

1976

Ökaryot genlerinin cDNA klonlanması. Tavşan β -globin geninin eldesi.

Maniatis,T.,Kee,S.G.,Efstratiadis,A. and Kafatos,F.C. Amplification and characterization of a β -globin gene synthesized in vitro. Cell 8, 163-182.

Rabbitts,T. Bacterial cloning of plasmids carrying copies of rabbit globin messenger RNA. Nature 260, 221-225.

Somatik rekombinasyonun antikor çeşitliliğini belirlediğine ilişkin ilk kanıtlar.

Hozumi,N. and Tonegawa,S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 73, 3628-3632.
Viral onkogen (v-src)in hücresel karşıtının normal hücrelerde bulunuşu.

Stehelin,D.,Varmus,H.E.,Bishop,J.M. and Vogt,P.K. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature 260, 170-173.

Maya genlerin **E.coli**'de ekspresyonu.

Struhl,K.,Cameron,J.R. and Daview,R.W. Functional genetic expression of cloned yeast DNA in **E.coli**. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 73, 1471-1475.

Rekombinant DNA tekniklerinin doğum öncesi tanıda uygulanması.

Kan,W.Y.,Golbus,M.S. and Dozy,A.M. Prenatal diagnosis of alpha-thalassemia. Clinical application of molecular hybridization. N.Engl.J.Med. 295, 1165-1167.

“patch clamp” tekniğinin geliştirilmesi-Tek kanal Na^+ akımlarının gözlenmesi.

Neher,E. and Sakmann,B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260 799-802.

1977

Ökaryot genlerinin bölünmüşlüğüünün (“split genes”) gösterilmesi.

Berget,S.M.,Moore,C. and Sharp,P.A. Spliced segments at the 5’ terminus of adenovirus 2 late mRNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 74, 3171-3175.

Chow,L.T.,Gelinas,R.E.,Broker,T.R. and Robert,R.J. An amazing sequence arrangement at the 5’ ends of adenovirus 2 messenger RNA. Cell 12, 1-8 [This issue of Cell contained three other papers from the Cold Spring Harbor Laboratory group.]

DNA dizileme yöntemlerinin geliştirilmesi.

Maxam,A.M. and Gilbert,W. A new method for sequencing DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 74, 560-564.

Sanger,F.,Nicklen,S. and Coulson,A.R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 74, 5463-5467.

Kimyasal maddelerin hayvanlarda mutajenliklerinin belirlenmesinde yeni tekniklerin (“Ames test”) geliştirilmesi.

McCann,J. and Ames,B.N. The Salmonella/ microsome mutagenicity test: predictive value for animal carcinogenicity. In Origins of Human Cancer, H.H.Hiatt,J.D. Watson, and J.A.Winsten, eds. Cold Spring Harbor Laboratory.

- 1978** Ökaryot (memeli) genlerinin bakteride ekspresyonu.
Chang,A.C.Y.,Nunberg,J.H.,Kaufman,R.F. et al. Phenotypic expression in **E.coli** of a DNA sequence coding for mouse dihydrofolate reductase. *Nature* 275, 617-624.
- Büyük DNA parçalarının kosmit vektörler aracılığıyla klonlanması.
Collins,J. and Hohn,B. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable **in vitro** in bacteriophage lambda heads. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 75, 4242-4246.
- Yönlendirilmiş mutagenез yöntemi.
Hutchison,C.A.,Phillips,S.,Edgell,M.H. et al. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J.Biol.Chem.* 253, 6651-6660.
- 1979** 200 nükleotitik uzunluğa kadar inebilecek restriksiyon Fragmentlerinin insan genomunun haritalanmasında kullanılabilmesi.
Solomon,E. and Bodmer,W.F. Evolution of sickle variant gene. *The Lancet* I, 923.
- 1980** “Restriction fragment length polimorphism (RFLP)” yönteminin DNA analizinde kullanımının kuramsal analizi.
Botstein,D.,White,R.L.,Skolnick,M. and Davis,R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet.* 32, 314-331.
- Selektif olmayan bir genin selektif nitelikli bir genle birlikte ikili transfeksiyon yöntemiyle hayvan hücrelerine aktarımı.
Wigler,M.,Sweet,R.,Sim,G.K. et al. Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and eukaryotes. *Cell* 16,

777-785.

Adenil siklaz etkinliğinin düzenlenmesinden sorumlu G Proteinin saflaştırılmasıyla sinyal iletilisine (transdüksiyona) ilişkin mekanizmaların aydınlanmasıyla sonuçlanan çalışmalar.

Northup, J.K., Sternweis, P.C., Jmigel, M.D., Schleitar, L., Ross, E.M., Gilman, A.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 6516-6520.

1981

Tetrahymena ribozomal RNA'sının kendini kırpma özelliği RNA moleküllerinde katalitik etkime yetkinliğine sahip olabileceklerinin gösterilmesi.

Cech, T.R., Zauf, A.J. and Grabowski, P.J.

In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of **Tetrahymena**: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. Cell 27, 487-496.

“Enhancer” dizilerin bulunuşu.

Banerji, S., Rusconi, S. and Shaffner, W.

Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. Cell 27, 299-308.

Benoist, C. and Chambon, P. **In vitro** sequence requirements of the SV40 promoter region. Nature 290, 304-310.

Dölllenmiş fare yumurta hücresinin pronükleusunu mikroiinjeksiyon yoluyla gen aktarımı. Transgenik hayvan teknolojisi.

Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M. et al.

Somatic expression of Herpes thymidine kinase in mice following injektion of a fusion gene in eggs. Cell 27, 223-231.

1982 Bir nokta mutasyonunun kanser oluşumuna yol açabileceğinin gösterilmesi.

Tabin,C.J.,Bradley,S.M.,Bargmann,C.I. et al.
Mechanism of activation of a human oncogene.
Nature 300, 143-149.

**Reddy,E.P.,Reynolds,R.K.,Santos,E.
and Barbacid,M.** A point mutation is
responsible for the acquisition of trans forming
properties by the T24 human bladder carcinoma
oncogene.Nature300, 149-152.

1983 sis onkogeninin ürününün PDGF ile özdeş olduğunun gösterilmesi.

Waterfield,M.D.,Scrace,G.T.,Whittle,N. et al.
Platelet derived growth factor is structurally
similar to the putative transforming protein p28
of simian sarcoma virus. Nature 304, 35-39.

**Doollittle,R.F.,Hunkapiller,R.F.,Wood,R.E.
et al.** Simian sarcoma virus oncogene v-sis is
derived from the gene encoding a platelet-derived
growth factor. Science 221, 275-277.

Caenorhabditis elegans embriyonal kök hücre soylarının
yüksek canlıların embriyonal gelişmelerini incelemede
bir model sistem olarak kullanılması.

**Sulston,J.E.,Shierenberg,E.,White,J.G. and
Thomson,J.N.** The embryonic cell lineage of
the nematode **Caenorhabditis elegans**. Dev.Biol.
100, 64-119.

Ti plasmitlerinin bitki hücrelerinin transformasyonu ve
transgenik bitki soylarının geliştirilmesi yönünde
kullanımı

**Herrera-Estrella,L.,Depicker,A.,
van Montagu,M. and Schell,J.** Expression of

chimaeric genes transferred into plat cells using a Ti-plasmid derived vector. Nature 303, 209-213.

Bevan,M.W.,Flavell,R.B. and Chilton,M-D.

A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304, 184-185.

1984 Homeokutunun bulunuşu ve embriyonal gelişmedeki rolünün tanımlanması.

McGinnis,W.,Levine,M.S.,Hofen,E.,Kuroiwa,A. and Gehring,W.J. A conserved DNA sequence in homeotic genes of **Drosophila antennapedia** and bithorax complexes. Nature 308, 428-433.

McGinnis,W.,Hart,C.P.,Gehring,W.J. and Ruddle,F.H. Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of **Drosophila**. Cell 38, 675-680.

Büyük DNA (~ 500 kbq) parçalarının elektroforetik ayırımı.

Schwartz,D.C. and Cantor,C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37, 67-75.

Hücre içi sinyal iletiminde yeni bir ikincil habercinin, inositol trifosfatın bulunuşu.

Berridge,M.J. and Irvine,R.F. İnositol triphosphate, a noral second messenger in cellular signal transduction. Nature 312, 315-321.

1985 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)nun bulunması ve PCR teknolojisinin doğuşu.

Saiki,R.K.,Scharg,S.,Faloona,F. et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and

the restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230 1350-1354.

Homolog rekombinasyon yoluyla DNA dizilerinin ökaryot genomda özgün bölgelere yerleştirilmesi.

**Smithies,O.,Gregg,R.G.,Boggs,S.S.,
Koralewski,M.A. and Kucherlapati,R.S.**
Insertion of DNA sequences into the human
 β -globin locus by homologous recombination.
Nature 317, 230-234.

1987

Maya yapay kromozomlarının (“yeast artificial chromosomes (YACs)”) çok büyük DNA parçalarının klonlanmasında kullanımı.

Burke,D.T.,Carle,G.F. and Olson,M.V.
Cloning of large segments of exogenous DNA
into yeast using artificial chromosome vectors.
Science 236, 806-812.

Distrofinin Duchenne müsküler distrofi lokus ürünü olduğunun bulunması.

Hoffman,E.P.,Brown,R.H. and Kunkel,L.M.
Dystrophin: the protein product of the Duchenne
muscular dystrophy locus. Cell 51, 919-928.

Embriyonal kök hücre kültürlerinin geliştirilmesiyle, memelilerde genetik değişimleri olanaklı kılan güçlü bir sistemin kazanımı.

**Hooper,M.,Hardy,K.,Handyside,A.,Hunter,S.
and Monk,M.** HPRT-deficient (Lesch-Nyhan)
mouse embryos derived from germline colo-
nization by cultured cells. Nature 326, 295-298.

İnsan genomunun haritalanması ve dizi analizi çalışmalarının başlatılması.

Human Genome Initiative. Health and Environ-
mental Research Advisory Committee (HERAC)
of the Department of Energy (DOE).

Nitrik oksidin yeni bir nörotransmitter olarak Tanımlanması ve daha önce varlığı ileri sürülen endotel kökenli gevşeme faktörü ("endothel-derived relaxing factor(EDRF)") ile özdeş olduğunun gösterilmesi.

**Ignaro,L.J.,Buga,G.M.,Wood,K.S.,
Byrns,R.E.,Chaudhuri,G.**

Endothelium-derived relaxing factor produced and vein is nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 84, 9565-9269 (1987)

Palmer,R.M.J., Ferrige,A.G.,Moncada,S.

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 327, 524-526 (1987)

1988 Tümör oluşumunun supresör genlerin inaktifleşmesiyle de geliştirilebileceğinin gösterilmesi.

Whyte,P.,Buchkovich,K.J.,Horowitz,J.M. et al.

Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. Nature 334, 124-129.

1989
siklü-
sikline

1970'li yıllardan beri süren çalışmalar sonunda hücre sünün (özellikle mitozun) düzenlenmesinde siklin ve bağımlı kinaz(cdc2/p34)ın rolüne ilişkin tablonun belirginleşmesini sağlayan bir dizi yayınla sonuçlandı.

Gould,K.L. and Nurse,P. Nature 342, 39-45.

Pines,J. and Hunter,T. Cell 58, 833-846.

Booker,R.N.,Alfa,C.E.,Hyams,J.S. and

Beach,D.H. Cell 58, 485-497.

1990 "RNA editing"- Yazınım ürünü RNA'nın yeniden düzen-

lenmesi. Bir dizi çalışmayla gen ekspresyonuna yeni bir boyut katan bu mekanizmanın bir ölçüde açıklığa kavuşması.

Blum,B.,Bakalara,N. and Simpson,L. Cell 61, 879-884.

Sturm,N.R. and Simpson. Cell 61, 879-884.

**Blat,G.J.,Koslowsky,D.J.,Feagin,J.E.,
Smiley,B.L. and Stuart,K.** Cell 61, 885-894.

1991

1970'li yıllarda ilk kez dile getirilen, 1980'li yıllarda daha olgunlaştırılan apoptoz(programlı hücre ölümü) kavramını destekleyen bulguların bir devamı da tümör süppresör p53 ve onkoprotein c-myc'in bu süreçteki belirleyici rollerinin, bcl-2'nin ise apoptozu baskılayan rolünün tanımlanması.

**Yonish-Rouch,E.,Resnitzky,D.,Lotem,J.,
Sachs,L.,Kimchi,A. and Oren,M.** Nature 353, 345-347.

Williams,G.T. Cell 65, 1097-1098.

1991/1992

Hücre siklüsünde G1 → S geçişini belirleyen denetim mekanizmalarının ve aydınlanmaya başlayan S evresini tetikleyen transkripsiyon faktörü E2E'nin pRb ile etkileşimleri ve DNA tümör virüslerinin E2F için pRb ile yarışımının belirlenmesi.

**Chellappan,S.P.,Hiebert,S.,Mudry,M.,
Horowitz,J.M.,Nevins,J.R.** Cell 65, 1053.(1991)

Bagchi,S.,Weinmayn,R.,Raychandburi,R.
Cell 65, 1065.(1991)

**Chittenden,T.,Livingston,D.M.,
Kaehlin.Jr.W.G.** Cell 65, 1073.(1991)

Hiebert,S.W.,Chellappan,S.P.,Horowitz,J.M.,

Nevins,J.R. Genes Develop. 6, 117.(1992)

- 1993** DNA onarımı ile transkripsiyon arasındaki bağlantının gösterilmesi. Helikaz etkinliği taşıyan transkripsiyon inisiyasyon faktörü TFIIH'nin, kseroderma pigmentosum ve Cockayne sendromu ile ilintili, DNA onarımından sorumlu ERCC-3 geninin ürünü olduğunun belirlenmesi.
Schaeffer,L. et al. Science 260, 58.

Selby,C.P. and Sancar,A. Science 260, 53.

- 1996** HIV reseptörlerinin tanımlanmasıyla sağaltımına yönelik yeni açılımların ortaya çıkması.
Feng,Y.,Broder,CC.,Kennedy,P.E.,Berger,E.A. Science 272, 872

Cocchi F., et al. Science 270, 1881, (1995)

- 1997** Klonlanan koyun. Eski bir uygulamanın (bkz.Gurdon deneyi) yeniden daha ileri tekniklerle daha yüksek canlılara ayarlanmasıyla olası sonuçlara ilişkin etik tartışmaların yeniden alevlenmesi.
Wilmut,I.,Schnieke, A.E,McWhires, I.,Kind,A.I.,Campbell,K.H.S. Nature Feb 27, 810-813

* Bu listenin hazırlanmasında J.Witkowski'nin bir çalışmasından yararlanılmış, liste gerekli görülen yerlerde yapılan eklemelerle tamamlanmıştır. **Witkowski,J.** Fifty years on: molecular biology's hall of fame. Trends Biotech. 6, 234 (1988).

KISALTMALAR

A	Adenin
AMP	Adenozine monofosfat
cAMP	Siklik AMP
ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
C	Sitozin
D	Dalton
DEAE	Dietilaminoetil
dpm	Dakikadaki bozunum
DNA	Deoksiribonökleik asit
cDNA	Komplementer DNA
EF	Elongasyon Faktörü
FAD	Flavin adenin dinökleotid (okside form)
FADH ₂	Flavin adenin dinökleotid (redükte form)
fMet	N-formöl metyonun
G	Guanine
GDP	Guanozin difosfat
GMP	Guanozin monofosfat
GTP	Guanozin trifosfat
Hb	Hemoglobin
IF	İnisiyasyon Faktörü
K _m	Michaelis sabiti
Kb (ya da kbç)	Kilobaz çifti
Mb	Miyoglobin

NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit (okside form)
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit (redükte form)
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (okside form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (redükte form)
NMR	Nükleer magnetik rezonans
PAGE	Poliakrilamid gel elektroforezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEP	Fosfoenol piruvat
P _i	İnorganik fosfat
RF	Sonlanma Faktörü
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	(Mesenger) haberci RNA
tRNA	Transfer RNA
S	Swedberg ünitesi
SDS	Sodyum düdesil sülfat
T	Timin
TCA	Trikarbonil asit
U	Urasil
UV	Ultraviyole
V _{max}	Maksimum hız

DİZİN

	<u>Sayfa</u>
1,3-difosfoglisarat	201,209
2,3-difosfoglisarat	147,155
5-bromourasil	416-418
70S ribozom	362
80S ribozom	362
α -globin constant spring	424
α -globin Wayne	424
α -ışını	28
α -parçalanma	30
α -sarmal	127
β -galaktosidaz	406,408
β -ışını	28
β -parçalanma	30
β -yapısı (β -konfigürasyon)	125-127
γ -ışını	28
γ -parçalanma	30
γ -Fc reseptörleri	540
ΔG	199,205

- A -

A bandı	269
A-faj	440
abl proteini	636,638,641,642
açık sistem	187
açılal kuantum sayısı	5
ADA	474
adenil siklaz	595,597
ADP	311
ADP	203,210,308
ADP riboz polimerazlar	361
ağır element	26
aerobik oksitlenme	211
aflatoksin	644
agaroz gel elektroforezi	56
akar denge	281
akridin	420
aksiyon potansiyeli	256-258
aktif gen	493
aktif iletim	198,228,
	241,244,245
aktif kromatin	514
aktifleşme enerjisi	188,315-319
aktin	269,274
akut lenfositik lösemi (ALL)	639

Sayfa

akut lenfositik olmayan lösemi (ANLM)	639
allellerin dışlanması	557
allosterik düzenlenme	148,345
allosterik enzim	338
allosterik etki	339,343
allosterik mekanizma	130
altbirim	130
alıcı (acceptör)	21
Ames testi	618
amino asit	350
amino asitlerin asit-baz özellikleri	117
aminoasil t-RNA sentetaz	394,401
aminoasil yeri	397
ana doku uyuşum kompleksi (MHC)	561-562
ana kuantum sayısı	5
ana sözcük dağarcığı	287
anaerob canlılar	204
anensefali	463
anlamsız mutasyon	419
anti-idiotipik sistem	575
antiasense RNA	478
antijen	112,530
antijen bağlama bölgeleri	543
antijen özgürlüğü	535
antijenik bölge	530
antikodon	393
antikor (Ig) sınıfları	535,536
antikor çeşitliliği	550
antikor değişken bölgeleri	538
antikor değişken bölgeleri amino asit dizileri	542
antikor oluşum mekanizmaları	535
antikor yapıları	535
antikor-antijen etkileşimi	544
antinötrino	28
apolar ya da hidrofobik R-grupları	
içeren amino asitler	113
apoptoz	601,605,607
aralıklı	304
aralıksız	304
Arrhenius aktifleşme entropisi	
dursayısı	317
artırıcı (aktivatör) nitelikli düzenleyici	
proteinler	493
asetil CoA	213,214
asetilazlar	361

asidik amino asitler	117
asit	106
asosiyasyon	132
ataksiya teleenjektasya	437
atom çekirdeği	22
atom sayısı	22
atom yapısı	4,22
ATP	197,199,201,207,210,308,310,311,355
ATPaz	273,311
ayrışım denge dursayısı	105,106
ayrışım reaksiyonu	109

- B -

B bandı	269
B (Bursa Fabricius)lenfosit	528-530
B-lenfosit aktifleşmesi	534
bağıl refrakter dönem	265
bağışık çökelek	547
bağışık tolerans	576
bağışık yanıt	567
bağışık yanıt düzenlenmesi	573,574
bakteriyel lipopolisakkarit (LPS)	567
Bam H ₁	470
Basedow-Graves hastalığı	580
basit difüzyon	239
baskılayıcı (represör) nitelikli düzenleyici proteinler	493
baz	106
bazik amino asitler	117
bazkes-yama onarımı	434
başlama fazı (inisiyasyon)	394,399
bcl x proteini	606
bcl-2 proteini	606
bellek hücreleri	531
Bence-Jones proteini	534
benziprenin aril hidroksilaz (AHH)	618,619
biliyer siroz	580
birincil bağışıklık yanıt	533
birincil derece tepkimeler	312,313,315
birincil RNA (hnRNA=heterogen nükleer RNA)	496
birincil (primer) hücreler	583
birincil (primer) yapı	123
birleşme denge dursayısı	546
bit	287,291
biyoelement	92
biyoenerjetik	186
biyoenerjetik ilkeleri	237

biyolojik etkinlik	51
biyolojik eşdeğer	50
biyolojik iş	228
biyomolekül	91
biyosentez	55,197
Bloom sendromu	437
Blym proteini	636
Bohr atom modeli	4
Bonguer-Lambeert-Beer yasası	81
bozunum eğrisi	38
Briggs ve Haldane çizilimi	325
Briggs-Gurdon deneyi	507,528
Brönsted	106,118
Burkitt tümörleri	639
büyük oyuk	164

- C -

Ca ²⁺ -kalmodulin	590
cAMP	595
canlı sistemlerin molekül yapısı	4
Cap	497
CD4 yüzey proteini (antijeni)	561
CD8 yüzey proteini (antijeni)	561
Chargaff	161
Chorion biopsi-amniyo sentez	462,464
Cockayne sendrom	435
Compton olayı	41,42
“cos” uçlar	444
cosmid	445
Cot	171,172
Cot analizi	493
Coulomb eşitliği	12
CTR	632
Curie	39

- Ç -

çapraz bağlanma	48
çekinik (resessive)	501
çekirdek kalımlılığı	25
çekirdek kuramı	25
çekirdekli (ökaryotik) hücre	483
çekirdeksiz (prokaryotik) hücre	483
çevre	186,187
çıplak DNA aşısı	478
çift olay devresi	65
çift oluşum olayı	42
çinko parmak (zinc finger)	493
çizgisel tarayıcı	70

çok halkalı aromatik hidrokarbonlar

619

- D -

dalga boyu	33
dalga boyu	81
D-amino asit	85
deaminasyon	418
De Broglie	5
değişkenlik segmentleri	552
denge diyalizi	137
denge dursayısı	132,199
denge potansiyeli	251,252
deoksi hemoglobin	144
deoksiriboz	417
depolarizasyon	257,266
dermatomiyozit	580
devingen denge	282
dezaminasyon	417
diasilgliserol	589,591
dielektrik dursayısı	102,103
difüzenme	241
difüzenme akışı	240
difüzenme potansiyeli	254
diplococcus pneumoniae	350,351,352
diploit	484
dipol-dipol bağı	13,15
dipol-dipol etkileşimi	97
direkt onarım	431
DNA	59,62,285,298,299
DNA'nın denatürlenmesi	170
DNA B,A,Z yapısı	162,166,167
DNA çoğalması	62
DNA molekülü	157,160
DNA polimeraz	416
DNA polimeraz	355,361,364,371,374,376,378,380
DNA tümör virüsleri	623,625
Dot Blot	469
doğal ışınlar	28
domain	128,129
doz	44
dönme (rotasyon) enerjisi	79
dönüşüm hızı (turnover rate)	54
Dördüncül (kvarterner) yapı	130
döteryum	23
Dreyer-Bennet modeli	551
düzenleyici proteinler	112
düzlem polarlaştırma yöntemi	83

- E -

E.coli hücresi	96
E2F	603
EBNA 1,2	626
EBV	626
EcoRI	438-440
Eddie-Hufstee çizilimi	329,330
EGF	588
EGF-r	598
ekleme mutasyonu	419,425,427
eksilme mutasyonu	419,424,425
eksonükleaz	373,374,380,449
ekspresyon vektörleri	445
elektroforez	53
elektromagnetik dalga	5,28
elektromagnetik spektrum	74,80
elektron	4,22
elektron paramagnetik rezonans (EPR)	90
elektron spin rezonans (ESR)	90
elektron transportu ve solunum zinciri	215
elektronegatif	97
elektropozitif	97
elektrostatik kutuplaşma	97
element	22,27
E _{max} (maksimum enerji)	30
Emden-Meyerhof yolu	206
endonükleaz	373,449
endoplazmik retikulum	485
endositoz	229
enerji düzeyi	79
enol	417
entropi	191,310,319
env proteini	631
enzim inhibisyonu	329
enzim kinetiği	323-326
Enzimler	112,310,311,319-321
E _{ort} (ortalama enerji)	30
epitop	530,547
epizom	359
equilibrium labelling	54
ErbA proteini	641
ErbB proteini	634,636
erg	48
erime noktası	102
erişim uzaklığı	43
erişkin hemoglobin	156
esu	49
etkin (efektif) yarı ömür	38
eV	50

eylem hücreleri	531
eşemsel çoğalma	484
eşemsel olmayan çoğalma	484
eşik değeri	259
eşikaltı uyaran	260
eşiküstü uyaran	260
eşleme (replikasyon)	362

- F -

F aktin	274
F-faktörü	446
F.Haurowitz	151
Fab fragmenti	537,538
FAD	215
FADH ₂	431
faktör VIII.mutasyonu	468
fakültatif canlılar	204
Fanconi anemisi	437
farklılaşmış hücre	509
Fc fragmenti	537-539
feed-back	211,300
fermentasyon	204
fetal serum	582
fetal hemoglobin	156
fetoshop	461,464
fgr proteini	636,642
fil proteini	636
fiziksel karsinogenez	613
fos proteini	599,603,636
fosfodiesteraz	367,370
fosfoenol piruvat	201,208,209
fosfogliseritler	180
fosfolipaz C	589,592
fosforesans	23
fosforillenme	345-347
fosforillenmiş molekül	52
fosfotidil etonolamin	233
fosfotidil inositol	233
fosfotidil kolin	233
fotoçoğaltıcı	65
fotoçoğaltıcı tüp	66
fotoğrafik etki	48
fotoelektrik olay	40
foton	76
foton	49
fotosel (foto hücre)	65
frekans	89
Freund adjuvanı	578
fruktoz-6-fosfat	201

- G -

G aktin	275
G-proteinleri	593
G1 evresi	308,586,587
G2 evresi	586,587
gag proteini	631
gama kamera	71
gamet	501
GC-CSF	588
GDP	593
geçiş metal iyonları	13
Geiger-Müller sayacı	43,58,64
Geiger-Müller tüpü	64
genlik	89
genom	483
genotip	501
geri beslemeli (feedback) düzenleme	338
Gibbs-Donnan dengesi	246,250
Giriş	91
glikoforin	234
glikoliz	204
glikosillenme	485
glikosit bağı	177
glikoz-1-fosfat	201
gliserin-3-fosfat	201
GM-CS-F	588
Gray	49
GRB proteini	598
gruplaşma eğilimi	97
GTP	593

- H -

H bandı	271
H PRT	473
H1	490
Ha-ras	636,642
hafif element	26
hafif zincir değişken bölümüne	
karşılık domain	543,544
hafif zincir sabit bölümüne	
karşılık domain	543,544
haploit	484
hapten	544
Hasselbach	107
HAT medyum	612
Heins Scott ve Hildebrand	
Benessie eşitliği	135,136

Heisenberg	5
hem o hem bu	300
Hemoglobin	139,196
hemoglobin Constant Spring	423
hemoglobin O ₂ -doyum eğrisi	148
hemoglobin Wayne	423
Henderson	107
Henderson-Hasselbach eşitliği	107
Henry Becquerel	23
hep ya da hiç davranış	259
herpes simpleks virüsü (HSV)	623
Hertz	75
heterokromatin	360,492,493
heterotropik etki	343
Hibridoma	612
hibridoma hücreleri	614
hidratlaşma	103
hidrofilik	128
hidrofobik	128
hidrofobik bağ	19
hidrofobik etkileşimler	19
hidrojen bağı	16,18
hidrojen peroksit	47
hidroksil iyonu (OH ⁻)	104
hidroksil radikali	46
hidronyum iyonu (H ₃ O ⁺)	104
hidroperoksit radikali	47
Hill katsayısı	150-152
Hind III	438
hiperpolarizasyon	257
hipokromi	171
histon	360,487
histon olmayan (non histon) proteinler	360
HLA	234
holoenzim	382
homeobölge	523
homeokutu (homeobox)	519
homeostaz (akar denge)	310,355
homeotik mutasyonlar	519
homotropik etki	343
Hoshimoto tiroyiditi	580
hücre	483
HUGO Projesi	469
humoral bağışıklık	529
Hunt kuralı	6
hücre çapı	483
hücre çoğalma faktörleri	582,588
hücre çoğalması	581
hücre farklılaşması	484,528
hücre hibritlenmesi	610

hücre kültür sistemi	581
hücre siklusü	585
hücre solunumu	213
hücre yapıtaşları	91
hücre yüzeyi	483
hücreden yüksek canlılara geçiş	483
hücresel bağışıklık	529

- I -

ısı deposu (termoregülatör)	99
ışık şiddeti	82
ışılta (floresans) spektrometresi	83
ışın biyofiziği	73
ışın dozu	48

- I -

ICE	606,607
ICRU	49
İç bölünme (cleavages)	511
iç enerji	190
iç enzim (core enzim)	383
IGF-I	588
IGF-r	598
ikinci iyonlaşma olayı	63
ikincil bağışksal yanıt	533
ikincil (sekonder) hücreler	583
ikincil derece tepkimeler	314,315
ikincil (sekonder) yapı	123
ikincil radikaller	46
ikincil reaksiyon	55
ilginlik (affinity)	546
ilmiksi bölge	491
immunglobulin A (IgA)	535,536
immunglobulin D (IgD)	535,536
immunglobulin E (IgE)	535-536
immunglobulin G (IgG)	535-537,551
immunglobulin M (IgM)	535,536,551
immunglobulinler	535
immunoproteinler	112
inaktif gen	493
induced fit	344
indirgenme	221
indüksiyon	407
insan genetiği (sitogenetik)	61
insulin-r	598
interlökınler	566,569
intron	484
iyon toplama araçları	61

iyonik bağ	11,12
iyonlayıcı ışınlar	40
iyonlaşma	40
iyonlaşma enerjisi	77
iyonlaşma kamerası	63
iyonlaştırıcı etkinlik	43
izoenzim	347
izoenzimlere dayalı düzenlenme	347
izotop	22

- J -

J segmenti	553
Joule	49
jun proteini	599,603

- K -

K (tepkime denge dursayısı)	318
K_a	132
kalımlı izotop	26
kalımlılık	26
kalıtsal şifre	387
kanal kapasitesi	297
kanser	581
kanser olguları-yerleri,nedenleri	624
kanser hücre özellikleri	611
kanser proteinleri	641,642
kansere yol açan kimyasallar	617
kapalı sistem	187
karbonhidratlar	175
kas distrofisi	461
kayan filamentler	272
kaydırma (translokasyon)	397
kaynama noktası	102
Kayser	76
K_{cat} (turnover number)	325-327
K_d	132
kemateropötikler	405
kemik iligi kök hücresi	528
kemotripsin	321,322
kesişme (krossover)	501
keto	417
kırılma (splicing)	497
kızılaltı spektrumu	84
kızılaltı (infrared) spektrometresi	82
kibernetik	
kibernetik	281,282,299
kimyasal bağ	9
kimyasal bağlar ve moleküllerin	

oluşumu	9
kimyasal iş	228
kinazlar	361
klon	448,451,508,531
klonal delesyon	577
klonal seleksiyon	531,532
klonlama	508
Klotz (Lineweaver-Burk)	135,136,138
K_m	326-328,331
kohezyon	97
kolaylaştırılmış difüzyon	240
kolesterol	184
kolimatör	66
kolineerlik	387
kolisin	359
kollagen	269
kolşisin	59
komplement	548
komplement sistemi	549
komplementerliği belirleyen bölgeler	
(CDRS)	543
komplementerlik	161
konformasyon	87
Konformasyon entropisi	318
kontakt inhibisyon	586,610
kontraktıl proteinler	112
kontrol metresi	63
kooperatif bağlanma (avidity)	546
kooperatif etkileşim	150
koordinasyon bağları	13
kopya (allel)	501
kovalent bağ	9
kovalent bağ	321
kovalent olmayan etkileşim	21
K-ras proteini	636,642
kreatin fosfat	201,279
Krebs döngüsü	213,214
kromatin	359,484
kromozom	59,62,359
kronaksi	261
kronik hepatit	580
kronik miyelogen lösemi (CML)	639
kseroderma pigmentosum	435,620
küçük oyuk	164

- L -

L-amino asit	85
L-segmenti	553
lac operonu	338,404
laktat dehidrogenaz	348

Larmour frekansı	88
LDL-reseptörleri	482
lektinler	609
lenfosit	528
ligant	112
ligant kapılı kanallar	239
ligaz	368,373
likit sintilasyon sayacı	66
Lineweaver-Burk çizilimi	328,329,333,334
lipitler	179
lipozom	183
London-van der Waals bağı	13,15
lösün fermuar (leucin zipper)	493
Lowry	106,118

- M -

M-CSF	588
Madde yapısı	4
magnet kuantum sayısı	5
magnetik alan	88
magnetik moment	88
magnetik rezonans	89
magnetron	66
makromolekül	47,92,93
makromoleküller	111
mam proteini	636
Marie Curie	25
Maxwell Şeytanı	283,284,310,311
mekanik iş	198,268,277
mekanik kapılı kanallar	239
mekik sistemi	212
membran dinlenim potansiyeli	254
membran potansiyeli	250,252
menteşe	273
metafaz	59
metilazlar	361
MeV	50
meyoz	501
MHC sınıf 1 glikoprotein	565
MHC sınıf 2 glikoprotein	565,567
Michaelis ve Menten çizilimi	323-327
mikrodalga frekansı	90
mikromol	36
mikroorganizma	483
misel	20
mitogenik faktörler	586,587
mitokondri DNA'sı	361
mitokondriler	361
mitotik siklinler	608
mitoz	59,62

miyastinya graves	580
miyoglobin	139-142
miyoglobin O ₂ -doyum eğrisi	145
miyozin	269,272
molar soğurum (ekstinksiyon) katsayısı	82
moleküler biyofizik	112
moleküllerin membrandan iletisi	237
monoklonal antikor	481
monoklonlar	612
monokromatik	81
monosakkaritler	175
mos proteini	636,641,642
motif	494
MPF	608
mRNA	285
Mst II	466
Multiple skleroz	580
mutasyon	44
mutasyon	415-418
mutlak refrakter dönem	265
myb proteini	636,641
myc proteini	599,603,636,640-642

- N -

N-ras proteini	636,642
N-myc proteini	636,642
Na ⁺ -K ⁺ pompası	255
NAD	207,212
NADH	207,212,219,224
nearest-neighbor	366
negatif düzenleme	339
negatif entropi	129
neomisin direnç geni	474
nev proteini	636
NGF	588
NGF-r	598
nikotinamid-adenin dinükleotit	185
nitroselüloz filtre	56
nokta mutasyonu	424
nötrino	28
nötron	4,22
nükleer magnetik rezonans	87,89
nükleik asitler	156
nükleon	22
nükleosit	157
nükleotit	156,158,159
nükleozom	360,488
nükleozomlar	361
nüklit	25
nüklitler cetveli	25

- O -

Okazaki fragmentleri	371
Oksi hemoglobin	144
oksidatif fosforillenme	220
oksitlenme	48
oksitlenme	221
oligosakkarit	177
onarım	429
onkogen kuramı	613,615
onkogenler	633,635,636
operon	336,339
organel	95
otoimmün hastalıklar	577,580
otoimmün tepkinin oluşumu	579
otoradyografi	53
otoradyografi	58
ototrof	139,196
ouabain	255
ozmol	243
ozmotik basınç	242
ozmotik olaylar	243
ozmoz	241

- Ö -

ökaryotik hücre	358
ökromatin	360,491
öncül madde	52
özgün aktiflik (spesifik aktiflik)	40

- P -

p yörüngeçi	7
P=Pitch	125
p16	603
p21	600
p21	603
p27	603
p34	608
P ₅₀	143
p53	603
palindrom	439
Papilloni virüsü	625,627
parçalanma olasılığı (parçalanma sıklığı)	34
parıltı (sintilasyon)sayaçları	44,65

pasif iletim	238,244
Pauli kuralı	6
Pauling-Corey modeli	124
PCR	455,458,469
peptidil yeri	397
peptit bağı	120
periyodik sistemde değerlik	8
permeaz	406,408
permissive hücreler	627
pernisyöz anemi	580
pH	104
piranoz	176
pirimidin	417
pirofosfataz	377,378
pK	106
plazmit	359,443
pluripotent kemik iliği kök hücresi	528,529
PNP	473
PDGF	588
PDGF-r	598
pol proteini	631
polar kovalent bağ	11
polar nitelikte R-grupları	
içeren amino asitler	117
poli A	442,443
poli ADP riboz polimeraz	607
poli(deoksi)ribonükleotit	418
polisakkaritler	175
polizom	441
popülasyon	34
pozitron	28
pozitif düzenleme	339
pozitif entropi	129
prenatal tanı	457
Pribnow	384
primer	365,372
prion hastalıkları	413
probe	441
programlanma (determination)	508
prokaryotik hücre	358
promoter	407,525
proof-reading mekanizması	372,374,375
protein hormonlar	112
protein kinaz C	596
protein yapısında bulunan amino	
asitlerin özellikleri	122
proteinler	111,310,311
proteinlerin yapısal özellikleri	113
proto-onkogenler	633,635,637
proton	4,22

proton alıcısı	106
proton vericisi	106
provirüs	623
puls (akım atışları)	65
puls yüksekliği inceleme devresi	66
pulse chase	55
pulse labelling	54
purin	417

- R -

rad (radiation absorbed dose)	48
radyoaktif nükleit	34
radyoaktif parçalanma ve ışınlar	28
radyoaktif ürün	52
radyoaktif ışınların girginliği	43
radyoaktif ışınların madde ile etkileşimi (girginliği ve iyonlaştırıcı etkinliği)	40
radyoaktif ışınların yol açtığı kimyasal değişiklikler	44
radyoaktifliğin belirtimi	43
radyoaktiflik	23,39
radyoaktiflik ve ışın biyofiziği	22
radyobağışıklık testi (radioimmunassay)	57
radyofarmositik	68
radyofrekans	88
radyoizotop	23
radyoizotopların araştırmalarda kullanımı	51
Radyoizotopların belirtiminde kullanılan yöntem ve araçlar	58
radyoizotopların özellikleri	34
radyoizotopların sayısal belirtimi	58
radyonükleit	53
radyum	39
raf proteini	600,636,642
ras proteini	595,600,601,634,636,641,642
reaktif	44
redoks çifti	222
redoks potansiyeli	218,221
rekombinasyonla onarım	436
rem	44
reobaz	260
repolarizasyon	257,266
represör	336,339
reseptör	229
reseptör-tirosin kinaz çeşitleri	598
reseptör-tirosin kinaz (RTK)	596,598
restriksiyon enzimler	56

restriksiyon fragmentleri	56
restriksiyon nükleazları	438
retinoblastoma proteini (pRb)	603
RFLP	466,471,472
riboz	417
ribozom	361,395
RNA	157
RNA moleküllerinin işlenmesi (RNA processing)	497
RNA polimeraz	338,339,356,381,382,383
RNA tümör virüsleri	627,629
romatoyit artrit	580
Röntgen	23
röntgen (R) ışınlama dozu	48

- S -

S evresi	308,586,587
S yörüngeçi	7
sandviç	59
Sanger yöntemi	455,460
santral dogma	355
sarkolemma	269
sarkomer	270
sarkoplazma	271
sarkoplazmik retikulum	272
sarmal-dönüş-sarmal (helix-turn- helix)	493
sayı ölçeği	66
Scatchard eşitliği	137
Schrödinger	5
scr proteini	636,641,642
segregasyon	501
sentez ötesi modifikasyonlar	345,346
serbest enerji	193,311,315
serbest radikaller	44
sezyum klorür grandiyenti santrifüjü	363
sfigomiyelin	181
SI (Systeme International d'Unites)	39
sıcak bölge	69
sırasal düzenleme modeli (sequential model)	344,345
sikline bağımlı kinaz (CDK)	601,602
siklinler	601
simojen	348,349
sinaps	257
sinilasyon dedektör sistemi	66
sinial iletim yolları	587
sirküler dikroizm	83,86
sis kamerası	61
sis proteini	634,636,641

sistem	186,187
sistemik lup eritematodus	580
sistron	495
sitokrom	215,218
sitotoksik T-lenfositleri	560,572,573
skleroderma	580
soğuk bölge	69
soğurulan enerji dozu	48
soğurulan ışın enerjisi ile ilgili kavramlar	48
soğurulma	48
soğurum (absorpsiyon) spektrometresi	80
solenoid	490
solunum hızının düzenlenmesi	221
solunum yolu (şema)	216
somatik mutasyon	555,616
somatik rekombinasyon	551,556
sonlanma fazı (terminasyon)	398,403
SOS proteini	598
Southern emdirim (blot) yöntemi	56
spacer	488
spin kuantum sayısı	5
spliceosome	386
splicing (kırılma)	385,484
stacket	161
sterd -state	325
Stripping film	59
su	96
supercoiled	165,168
supramolekül	94,95
supresör genler	643
supresör T-lenfositleri	560
supressor tRNA	425,426
supresyon	423
suyun ayrışımı	104
suyun buharlaşma ısısı	99
suyun çözücü özelliği	101
suyun dielektrik dursayı	101
suyun erime ısısı	100
suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri	98
suyun iyonlaşması	103
suyun özgül ısısı	98
SV-40 virüsü	440
SV40-T antijeni	627

- Ş -

Şifrelemeyen dizi (intron)	496
Şifreleyen dizi (ekson)	496

- T -

T (timus)lenfosit	528-530,560
T-lenfosit reseptörü	559
T4 fajı	353
talassemi	464
tampon etkisi	109
tautomer	416,429
tek düzlemde polarlanma	83
temel Eagle ortamı	583,584
temperature of melting (T _m)	168
terminal transferaz	449
termodinamiğin birinci kuralı	188
termodinamiğin ikinci kuralı	190
termodinamik	186,310
termodinamik kuralları	186
ters kutuplanma (depolarizasyon)	506
ters transkriptaz	410,411,441,443
tesla	87
TFIIH	434-436
TGF	588
TGF-β	588
timidin	59
timidin kinaz geni	474-476
timin dimeri	432
tiroyitoksikoz	580
titreşim enerjisi (vibrasyon)	79,83
titreşim genliği	89
tiyogalaktoz-transasetilaz	407,408
Tomurcuklanma	630
Topoisomeraaz	369,373,607
tps proteini	636,641,642
Transaktivatör	525
Transfeksiyon	620,622
transformasyon	351
Transformasyona yol açan faktör (TGF)	609
transkripsiyon	354,357,388,427
transkripsiyon faktörleri	389
translasyon	355,357,392
transmitans (geçirgenlik)	81
trikotiyodistrofi	435
tripleks DNA tedavisi	478
trisyum	23
trizomi 21 (Down sendromu)	461,462
tRNA	394,396
tropomiyozin	275
troponin	276

- U -

uyaran	259
Uydu DNA (satellite DNA)	495
uyumsuzluk onarımı	432
uzama (elongasyon) fazı	396,400
uzaysal toplama	263

- Ü -

Üçüncül (tersiyer) yapı	128
valenz	97

- V -

V_{max}	325,326,328,331
(V/J) rekombinasyonu	553,554
V-segmenti (bkz.) değişkenlik segmenti	
van der Waals bağı	379
van der Waals yarı çapı	17
vektör	443
verici (donör)	21
Viral karsinogenez	613,621
virüs	443
voltaj kapılı kanallar	239

- W -

Watson Crick modeli	362
Watson-Crick	161,162

- X -

X-ışınları	23
X-ışınları saçılma yöntemi	161

- Y -

ya o ya bu	300
yalıtılmış sistem	187
yanlış anlamlı mutasyon	419
yapay ışınlar	28
yardımcı (Helper) T-lenfositleri	560,573
yarı ömür	34
yarı-logaritmik	36

yarılanma süresi (yarı ömür)	34
yarışmalı inhibisyon	330,331,334
yarışmasız inhibisyon	333,335-337
yerleşik hücre soyu	585
yes proteini	636,641,642
yinelenen dizi	496
yinelenmeyen dizi	496
yoğunlaşma çekirdeği	61
yok oluş ışınımı	43
yöresel yanıt	261,262
yörünge	4
yüksek enerjili fosfat bağları	200
yüksek (çok hücreli) canlı	483
yüzey gerilim	102

- Z -

Z çizgisi	269
zamansal toplama	263
zigot	501