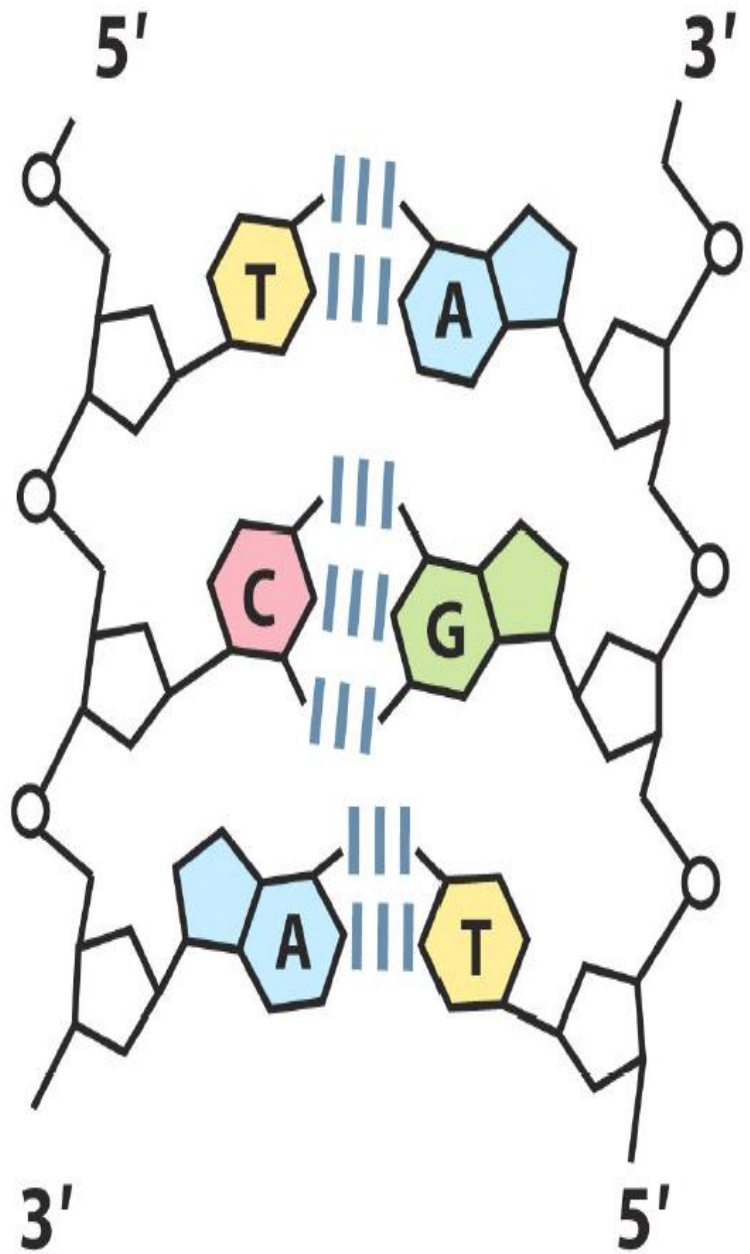
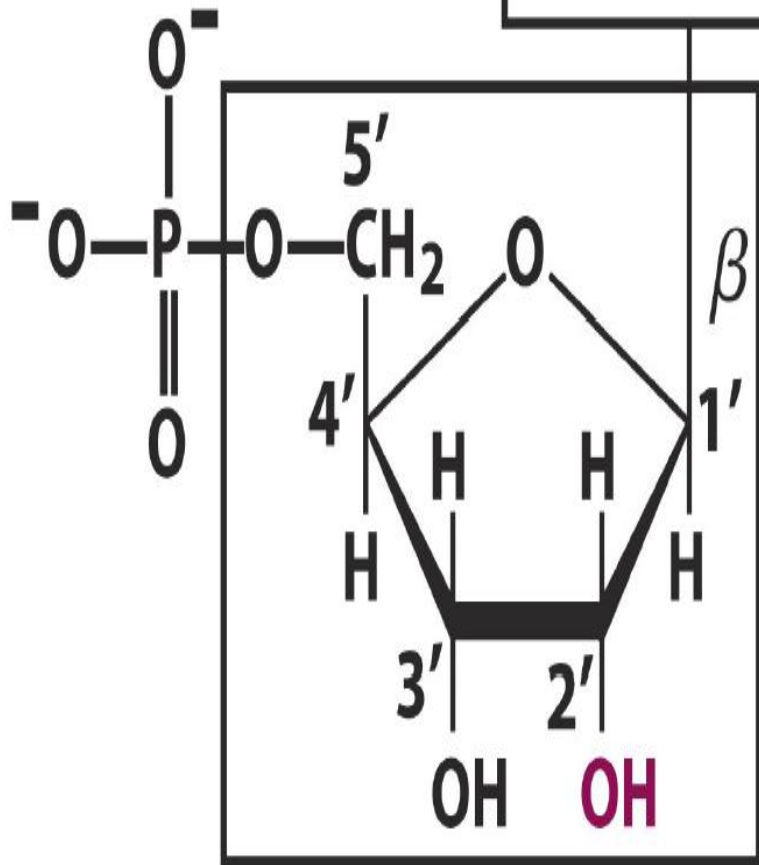


NÜKLEOTİDLER VE NÜKLEİK ASİTLER



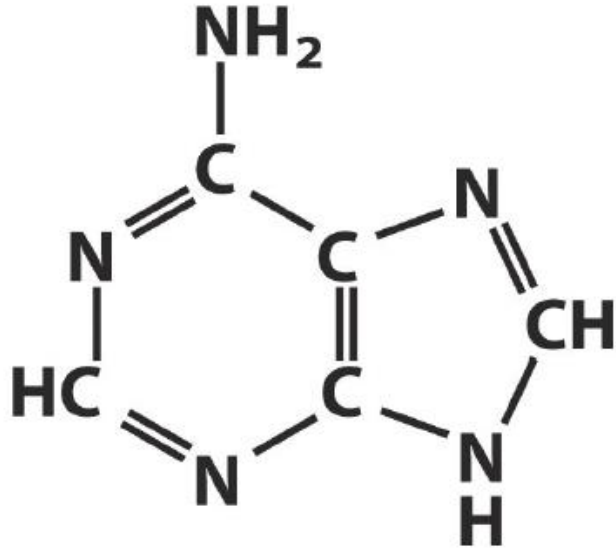
Phosphate

Purine or pyrimidine base

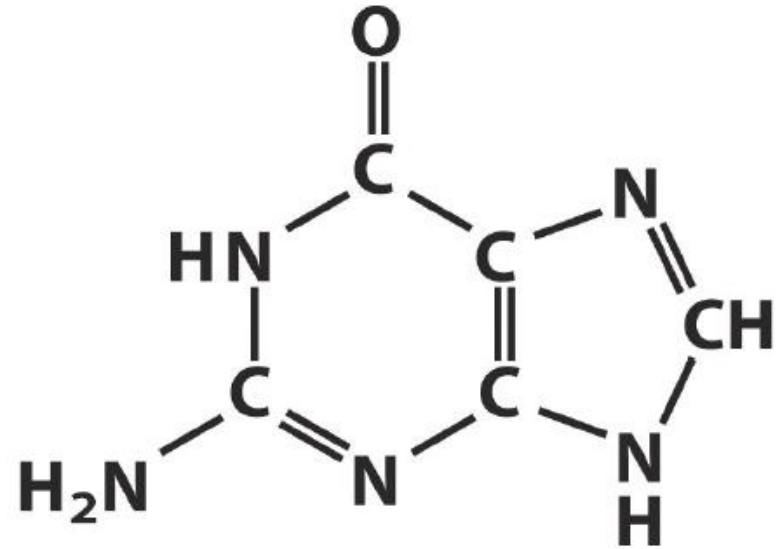


Pentose

Pürin Bazlar



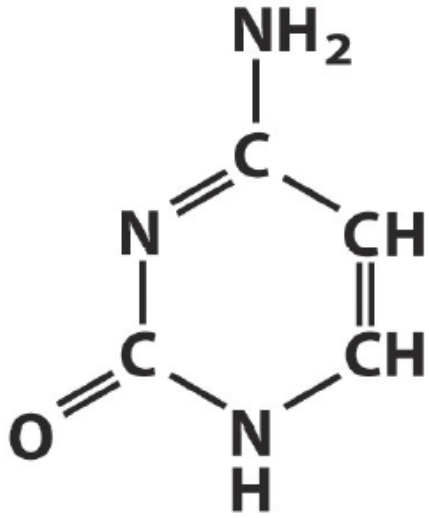
Adenine



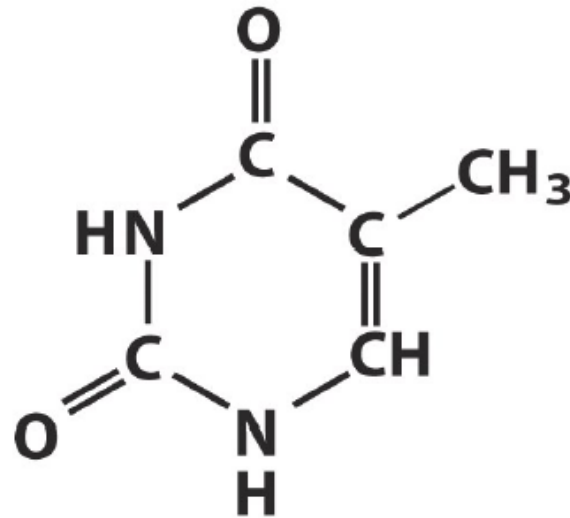
Guanine

Purines

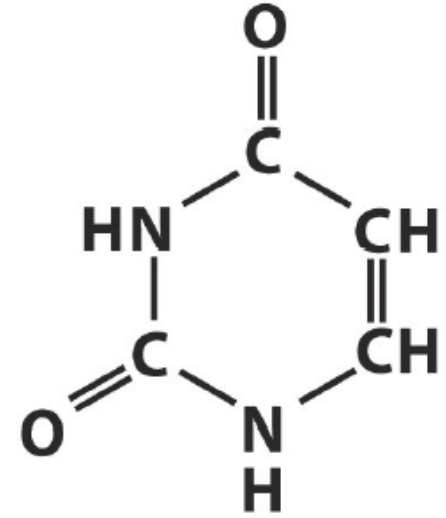
Pirimidin Bazlar



Cytosine



**Thymine
(DNA)**



**Uracil
(RNA)**

Pyrimidines

NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI

- **I. Deoksiribonükleotidlerin biyosentezi:**
- Nükleotid biyosentezinin başlangıç ürünleri ribonükleotidlerdir. Fakat DNA yapımı için, hücrenin deoksiribonükleotidlere sahip olması gerekir. **Bunlar ribonükleotidlerden 2'-OH grubunun bir hidrojenle yer değiştirilmesi ile oluşurlar.** Bu bir indirgenme olayı olup ribonükleotid reduktaz enzimi ile katalize edilir. Bu reaksiyon sıradışı bir reaksiyondur. Çünkü burada piridin nükleotidlerin doğrudan indirgeyici güçleri kullanılmaz fakat tioredoksinin indirgeyici gücü ve serbest radikal mekanizması ile reaksiyon gerçekleşir. Tioredoksin bir dithio/disülfid redüksiyon/oksidasyon döngüsü geçirir ve tioredoksin reduktaz enzimi ile disülfid durumundan dithiol durumuna indirgenir. Burada indirgeyici ajan olarak NADPH kullanılır.

NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI

- DNA deoksiüridin nükleotidlerinden meydana gelen timin içerir. Timidilat dUMP den oluşabilir. Deoksiüridin 5 monofosfat iki yolla oluşur: dCMP'nin deaminasyonu ve UMP'nin dUMP'ye indirgenmesi. Timidilat primidin halkasının C-5 pozisyonunda 5.10-CH₂-THF nin kullanılmasıyla dUMP'nin metilasyonu sonucu üretilir. Bu reaksiyon timidilat sentez enzimi ile katalize edilmektedir. THF hücrede düşük konsantrasyonda olduğu için DNA sentezi sırasında bunun dihidrofolat redüktaz enzimi ile sentezlenmesi gerekir.

NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI

- II. Nükleik asit yapısı
- Bitkilerde DNA çekirdek, mitokondri ve kloroplastlarda bulunur.
- Kloroplast genomundaki DNA miktarı yaklaşık 160000 baz çiftidir ve mitokondri genomunda 16000-2500000 baz çifti DNA içermektedir.
- DNA nükleik asitlerden meydana gelmektedir.

NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI

- Nükleik asitler bireysel nükleotidlerin birbirlerine 3'-5' fosfodiester bağları ile bağlanması sonucu oluşan polinükleotid zincirleridir. Nükleik asit ana zinciri zincir boyunca değişen fosfat ve şeker gruplarından oluşur. Fosfodiester bağının düzeni ve zinciri oluşturan bu bileşenler polinükleotid zincirine yön vermektedir. Bir uçta serbest 5'fosfat diğerinde ise esterleşmemiş 3'-OH bulunur. Standart durumda yapı 5'-fosfattan 3'-OH'ye doğru yazılır.

NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI

- Her fosfodiester bağlantısında 2'-hidroksil grubunun yokluğu fizyolojik koşullarda DNA'yı RNA'dan yaklaşık 1000000 kat daha stabil hale getirir. Benzer şekilde DNA fosfodiester bağları hidrolitik parçalanmaya proteinlerin peptit bağlarından 100 kat daha dayanıklıdır. Bu dayanıklılık DNA'yı ideal bir bilgi depolama molekülü yapmaktadır.
- DNA çift heliks yapısına sahiptir. Bu yapının ortaya çıkarılmasında A ile T ve G ile C oranlarının herhangi bir organizma için 1'e eşit olması önemli rol oynamıştır. Fakat A:T ve G:C miktarları organizmalar arasında değişiklik gösterir. Bunları göz önüne alan Watson ve Crick adenin timinle ve guanin sitozinle birbirlerine zıt yönde yakınlarsa hidrojen bağı ile bağlanabileceğini ortaya koymuşlardır. Daha sonra **Rosalind Franklin X-ray Diffraction ile DNA'nın çift helix** yapısına sahip olduğunu ve her sarmalin birbirlerine antiparalel olduğunu ortaya koymuştur.

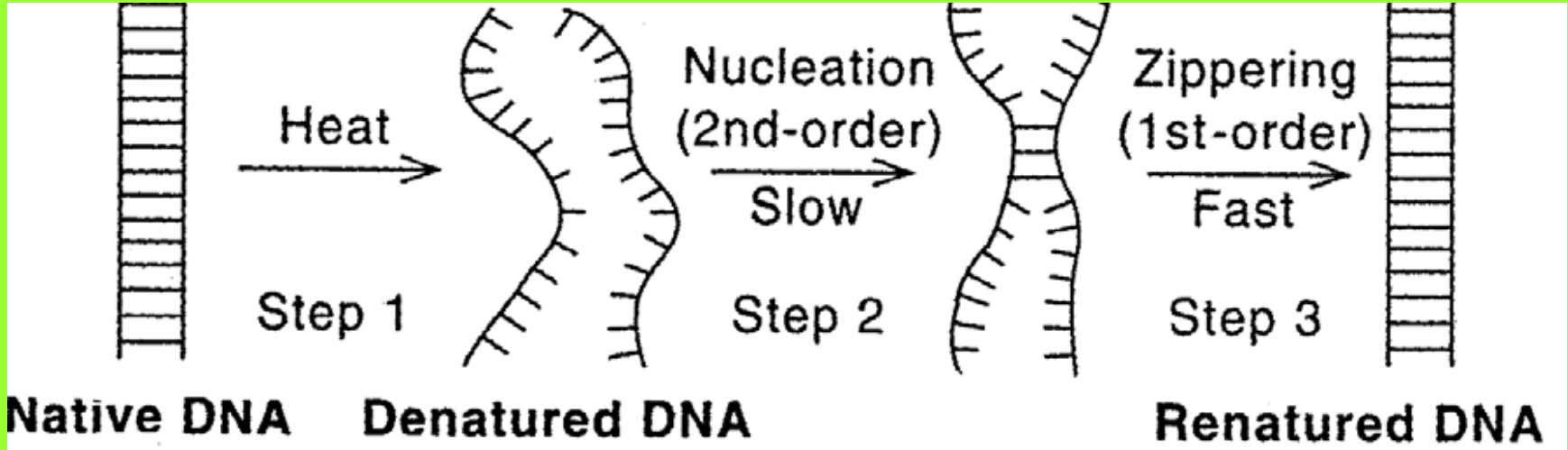
NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI

- Heliks bir döngüsünü her 3.4 nm de ve 10 bazda tamamlar.
- DNA iki ana konformasyonel formda bulunur, **B ve Z**. Z formu daha sıkı bir heliks yapısına sahiptir ve heliksin bir döngüsü için 12 baz gereklidir. Fakat, Z formunu almak için değişen G ve C veya T ve G veya A ve C nükleotidleri gereklidir. Z formunun biyolojik önemi henüz belli değildir.
- DNA ısıtıldığı zaman çift heliks yapısı zayıflar ve iki sarmal birbirinden ayrılır. Bu olaya denaturasyon denilir. DNA denature olduğunda UV absorbansı artar.

NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI

- DNA soğutulduğunda tekrar iki sarmal birbirlerine yapışır. Buna renaturasyon denilir. Böyle DNA da UV absorbansıda azalır. Soğutma hızlı olursa bazı yerlerde eşleşmeyen birleşmeler olur. Isıtma sırasında absorbans artışının orta noktasındaki sıcaklık T_m olarak adlandırılır.
- T_m DNA'nın baz bileşimine bağlıdır. G:C çiftleri A:T çiftlerinden sıcaklığa karşı daha dayanıklıdırlar. Bu yüzden G:C içeriği artarsa T_m değeri de artar.

NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI



DNA kloroplast, mitokondri veya bakterilerde olduğu gibi kapalı yuvarlak formda ise supercoil adını alır. Supercoil ya sağ el yada sol el şeklinde olabilir. Topoizomeraz denilen enzimler bu supercoil derecesini değiştirebilirler.

NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI

- III. DNA Paketlemesi
- Bakterilerde DNA dairesel bir şekilde bir arada tutulmuştur.
- Supercoil yapınınin looplari DNA-RNA-protein merkezinden çıkar ve DNA'yı organize bir halde ve kompakt bir yapı şeklinde kalmasını sağlar.

NÜKLEİK ASİTLER VE DNA YAPISI

- Ökaryotlar daha fazla DNA'yı oldukça iyi belirlenmiş bir çekirdek içerisinde bulundururlar. DNA doğrusal bir şekilde olsaydı hücrenin genişliğini defalarca aşardı. Bu büyüklükteki DNA'nın hücre içerisine sığdırılması için kompakt hale getirilmesi gerekir. DNA'nın kısımları kromozom olarak bilinen ünitelere ayrılmıştır ve kromatin adı verilen oldukça kompakt forma dönüştürülmüştür.
- Kromatin DNA'sı histon adı verilen proteinlerle kompleks halde bulunurlar. Kromatin DNA'sı yine nükleozom adı verilen yapısal üniteler şeklinde de organize olmuştur. Nükleozom bir çok histon proteini ve DNA'dan oluşur.

GENOMLAR

- IV. Genom projeleri
- 1995 yılında ilk defa bir organizmanın (**Haemophilus influenzae**) tüm genomu sekanslanmıştır. *H. influenzae* küçük gram negatif bir bakteridir ve insanların üst solunum yolunda yaşar. Dairesel kromozomu 1,830,137 baz çifti içerir. Bu kromozom üzerinde 1,743 gen belirlendi ve bunların % 58 ine bir fonksiyon tayin edildi.

GENOMLAR

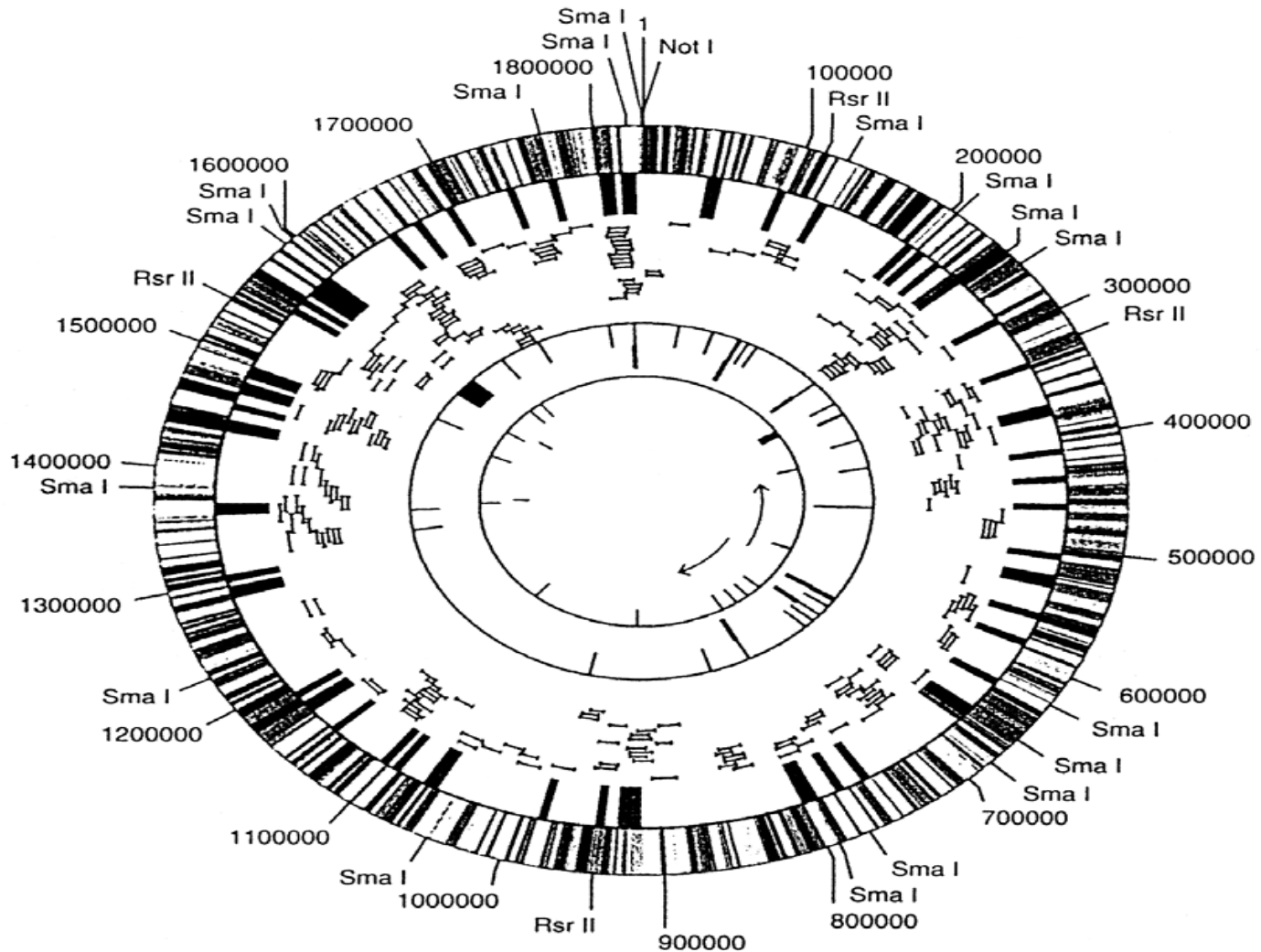
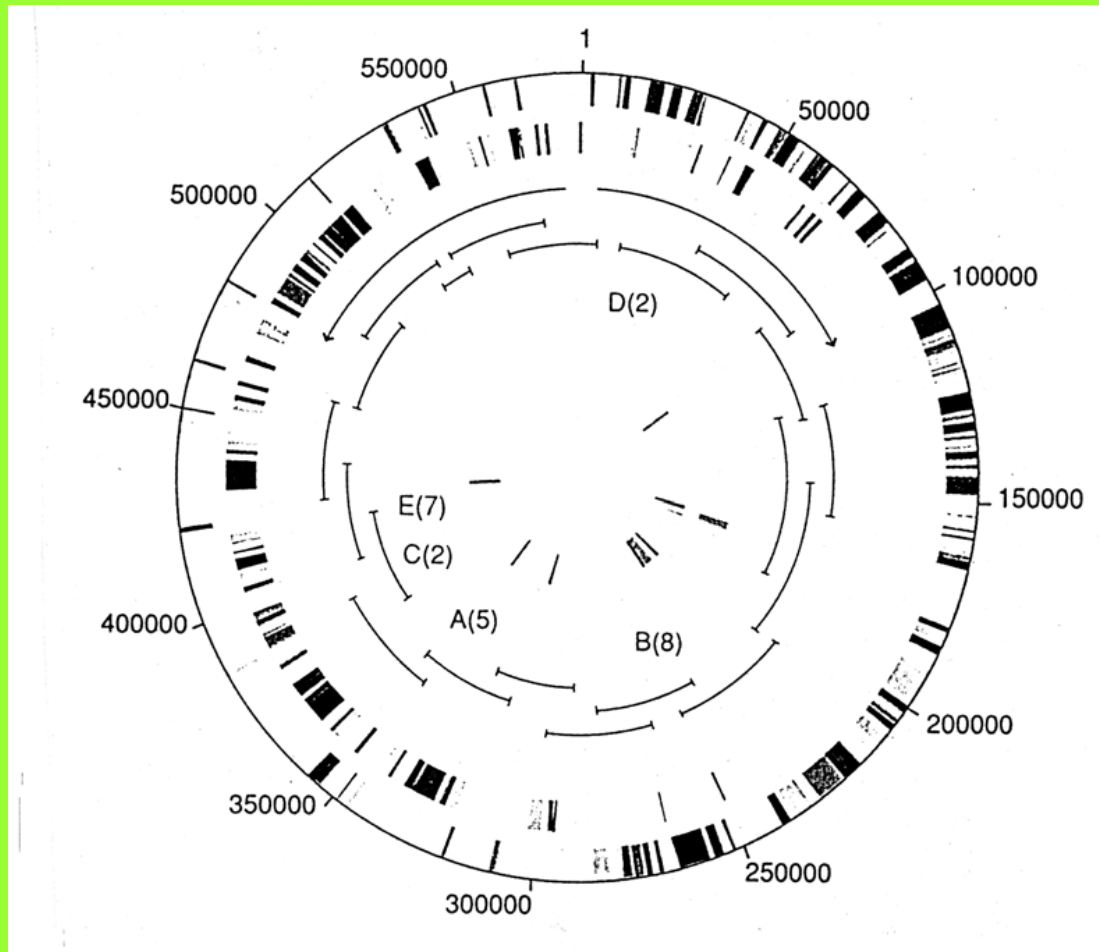


Fig. 1. A circular representation of the *H. influenzae* Rd chromosome illustrating the location of each predicted coding region containing a database match as well as selected global features of the genome.

GENOMLAR

- 1995'te ikinci bir organizma, **Mycoplasma genitalium** genomu sekanslandı. Bu bakteri en küçük genoma sahiptir. Sadece 580,070 baz çifti içerir. Parazitik bir organizma olduğu için metabolizma ile ilgili bir çok geni içermemektedir. Sadece 482 gen ihtiva etmektedir.
- 1996 yılında Methanococcus jannaschii nin genomu sekanslanmıştır. Bu canlı bakterilerle ökaryotlar arasında yer alan bir organizmadır. Genomu 1.66 megabaz çiftidir. Yaklaşık 1738 protein kodlayan gene sahiptir. Bu genom sekans bilgileri organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri ortaya koyma açısından önemlidir.

GENOMLAR



GENOMLAR

- 1996 yılında ilk ökaryotik genom (*Saccharomyces cerevisiae*) sekanslandı. Bira mayası 16 kromozoma ve 13 megabaz çiftine sahiptir.
- Yaklaşık 5900 protein-kodlayan gen, 140 ribozomal RNA genleri, 40 nüklear RNA genleri ve 275 tRNA genleri içermektedir.
- Daha sonra *Escherichia coli* genomu sekanslandı.

Table 2. Summary of gene content in *H. influenzae* and *M. genitalium* sorted by functional category. The number of genes in each functional category is listed for *H. influenzae* and *M. genitalium*. The number in parentheses indicates the percent of the putatively identified genes devoted to each functional category. For the category of unassigned genes, the percent of the genome indicated in parentheses represents the percent of the total number of putative coding regions.

| Biological role | <i>H. influenzae</i> | <i>M. genitalium</i> |
|---|----------------------|----------------------|
| Amino acid biosynthesis | 68 (6.8) | 1 (0.3) |
| Biosynthesis of cofactors | 54 (5.4) | 5 (1.6) |
| Cell envelope | 84 (8.3) | 17 (5.3) |
| Cellular processes | 53 (5.3) | 21 (6.6) |
| Cell division | 16 | 4 |
| Cell killing | 5 | 2 |
| Chaperones | 6 | 7 |
| Detoxification | 3 | 1 |
| Protein secretion | 15 | 6 |
| Transformation | 8 | 1 |
| Central intermediary metabolism | 30 (3) | 6 (1.9) |
| Energy metabolism | 112 (10.4) | 31 (9.7) |
| Aerobic | 4 | 3 |
| Amino acids and amines | 4 | 0 |
| Anaerobic | 24 | 0 |
| ATP-proton force interconversion | 9 | 8 |
| Electron transport | 9 | 0 |
| Entner-Doudoroff | 9 | 0 |
| Fermentation | 8 | 0 |
| Gluconeogenesis | 2 | 0 |
| Glycolysis | 10 | 10 |
| Pentose phosphate pathway | 3 | 2 |
| Pyruvate dehydrogenase | 4 | 4 |
| Sugars | 15 | 4 |
| TCA cycle | 11 | 0 |
| Fatty acid and phospholipid metabolism | 25 (2.5) | 6 (1.9) |
| Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides | 53 (5.3) | 19 (6.0) |
| 2'-Deoxyribonucleotide metabolism | 8 | 3 |
| Nucleotide and nucleoside interconversions | 3 | 1 |
| Purine ribonucleotide biosynthesis | 18 | 3 |
| Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis | 5 | 0 |
| Salvage of nucleosides and nucleotides | 13 | 10 |
| Sugar-nucleotide biosynthesis and conversions | 6 | 2 |
| Regulatory functions | 64 (6.3) | 7 (2.2) |
| Replication | 87 (8.6) | 32 (10.0) |
| Degradation of DNA | 8 | 1 |
| DNA replication, restriction, modification, recombination, and repair | 76 | 31 |
| Transcription | 27 (2.7) | 12 (3.8) |
| Degradation of RNA | 10 | 2 |
| RNA synthesis and modification, DNA transcription | 17 | 10 |
| Translation | 141 (14) | 101 (31.8) |
| Transport and binding proteins | 123 (12.2) | 34 (10.7) |
| Amino acids and peptides | 38 | 10 |
| Anions | 8 | 3 |
| Carbohydrates | 30 | 12 |
| Cations | 24 | 1 |
| Other transporters | 22 | 8 |
| Other categories | 93 (9.2) | 27 (8.2) |
| Unassigned role | 736 (43) | 152 (32) |
| No database match | 389 | 96 |
| Match hypothetical proteins | 347 | 56 |

GENOMLAR

- İnsan genom sekansı 2006 yılında tamamlandı. Bitkilerden ise Arabidopsis thaliana, pirinç ilk sekanslanan türlerdir. Bitkiler için çok sayıda EST de bulunmaktadır.
- **EST** tek bir mRNA'nın bir DNA kopyası olup bir genden oluşur ve aktif olarak ekspres olmaktadır. DNA kopyasının küçük bir kısmı sekanslanır ve bilgi gen bankasına konulur.

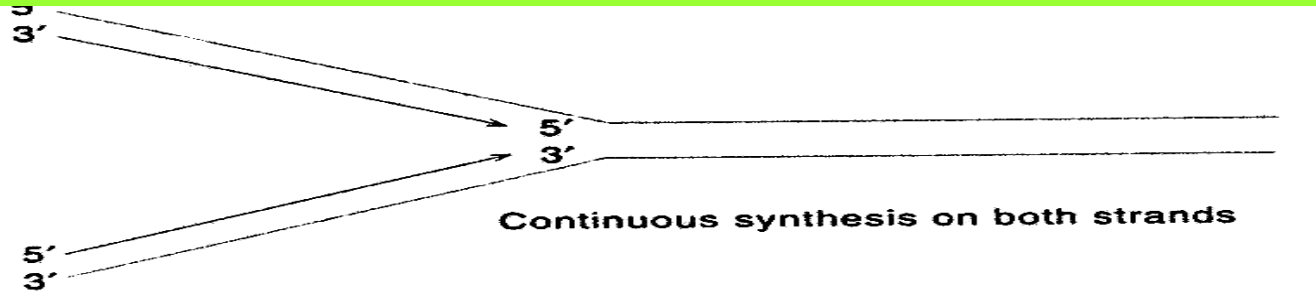
DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI

- I. REPLİKASYON
- The Watson-Crick'in çift heliks modeli DNA replikasyonunun mekanizmasını ışık tutmuştur. İki sarmal ayrılacak ve herbiri yeni sarmalların sentezlenmesi için kalıp olarak kullanılacaklardır. Böylece heliksin iki kopyası oluşacaktır. Herbiri hücre bölünmesiyle oluşacak bir yavru hücre için olacaktır. Her kopya yeni ve kalıp sarmalin karışımı veya iki kalıp bir yerde ve iki yeni oluşan sarmallarda bir yerde olabilir. **Meselson and Stahl** DNA'nın yarı konzervatif replikasyonu için deneysel kanıtları sürmüştür. Bunlar DNA duplikasyonu sırasında bakterilere ^{15}N vererek DNA'nın ne kadar yoğun olduğuna bakmışlardır. Normalde DNA ^{14}N içerir. Sonuçta DNA'nın ^{14}N -DNA ve ^{15}N -DNA arasında bir yoğunluğa sahip olduğunu gözlemişlerdir.
- Bir çok duplikasyon döngüsünden sonra, orta yoğunluktaki DNA varlığını korumuştur. Bu durum Duplikasyon şeklinin yarı konzervatif olduğunu ispatlamıştır.

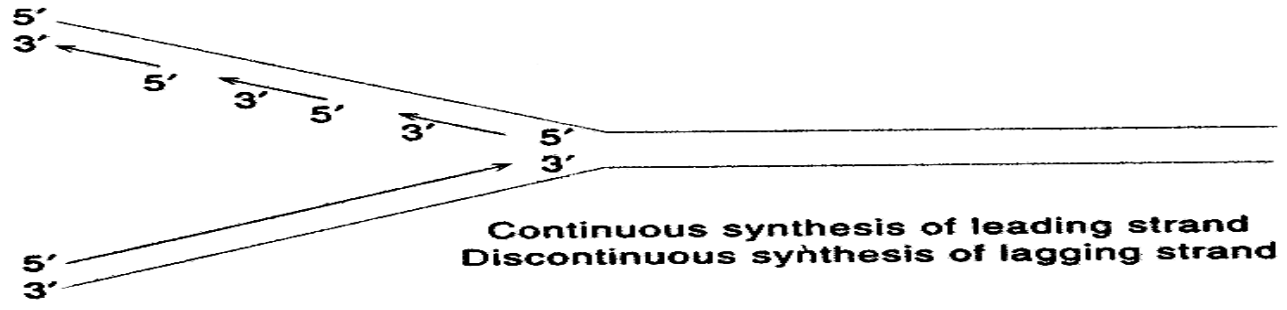
DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI

- Bakteride replikasyon en az 30 gene ait ürünlere ihtiyaç duymaktadır. Replikasyon kromozom üzerinde spesifik bir noktada başlar ve daire etrafında iki yönlü olarak devam eder.
- Replikasyonun başladığı kromozom yeri replikasyon orijini olarak bilinir. Bir sarmal üzerinde replikasyon bir yönde ilerlerken diğer sarmal üzerinde de diğer yönde ilerler. Fakat sonraki çalışmalar bir sarmal üzerinde DNA replikasyonunun devamlı olmadığını göstermiştir.

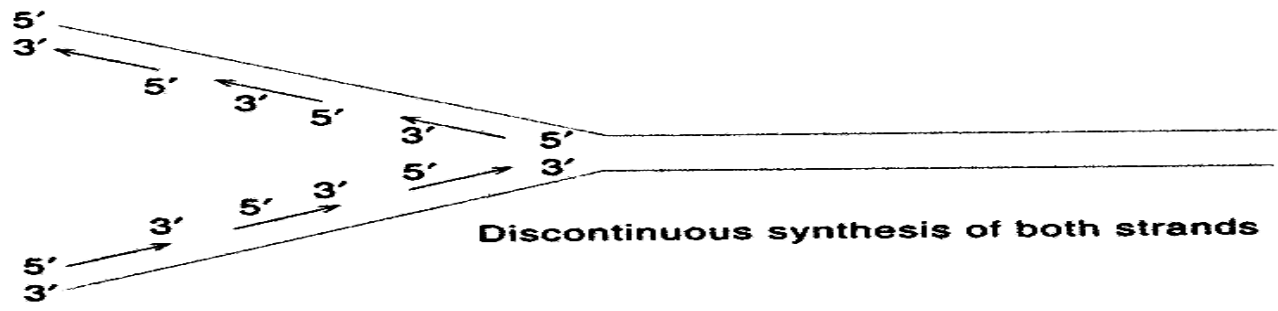
DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI



(a)

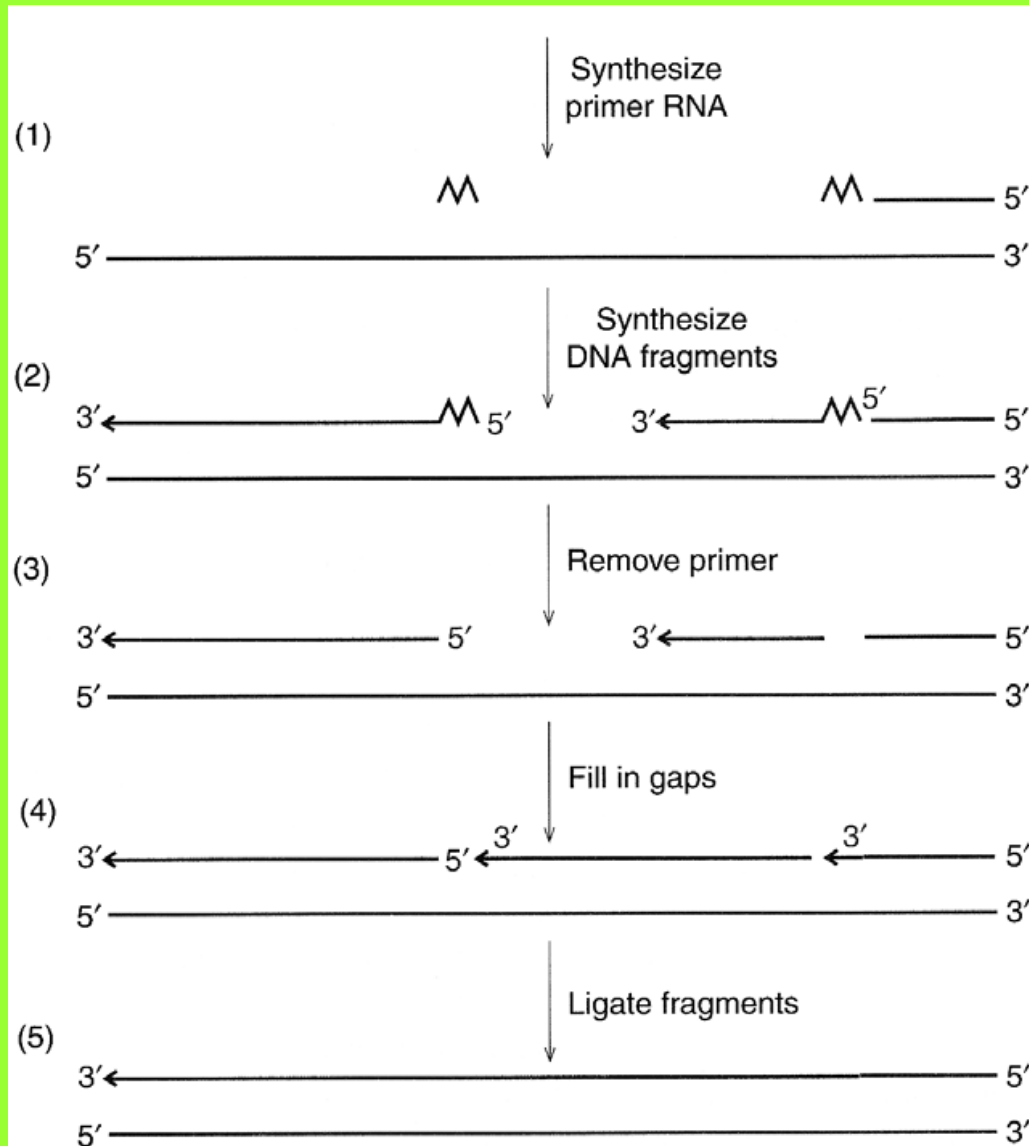


(b)



(c)

DNA REPLIKASYONU VE ONARIMI



DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI

- DNA replikasyonunun ilk aşamalarında kısa parçalar oluşur ve zaman geçtikçe bu parçalar daha büyük parçalara dönüştürülür. Bu parçalara Okazaki parçaları adı verilir. Yeni sentezlenen DNA sarmalının 5'-ucunda kısa bir RNA molekülü bulunur. Bu molekül polimerizasyon işlemi için primer olarak rol alır. Replikasyon için birçok protein ve enzim gereklidir. İlk izole edilen enzime **Poll** denilmiştir. Bu enzim kalıba bağlı bir şekilde sarmalin 3'-OH ucunda DNA'yı polimerize eder, fakat aynı zamanda 3' ucunda mononükleotidleri uzaklaştırabilir. Poll eşleşmemiş DNA-RNA hibritlerini veya eşleşmemiş bazları 5'→3' oryantasyonunda uzaklaştırılmasını da katalize eder. Poll'in rolünün RNA primerlerinin uzaklaştırılması olduğu düşünülmektedir.
- Fosfodiester bağlarını parçalayan enzimlere nükleazlar adı verilir. Poll kesildiğinde bir kısmı 5'→3' nükleaz aktivitesine ve diğer kısmıda polimeraz ve 3'→5' depolimeraz aktivitelerine sahiptir.

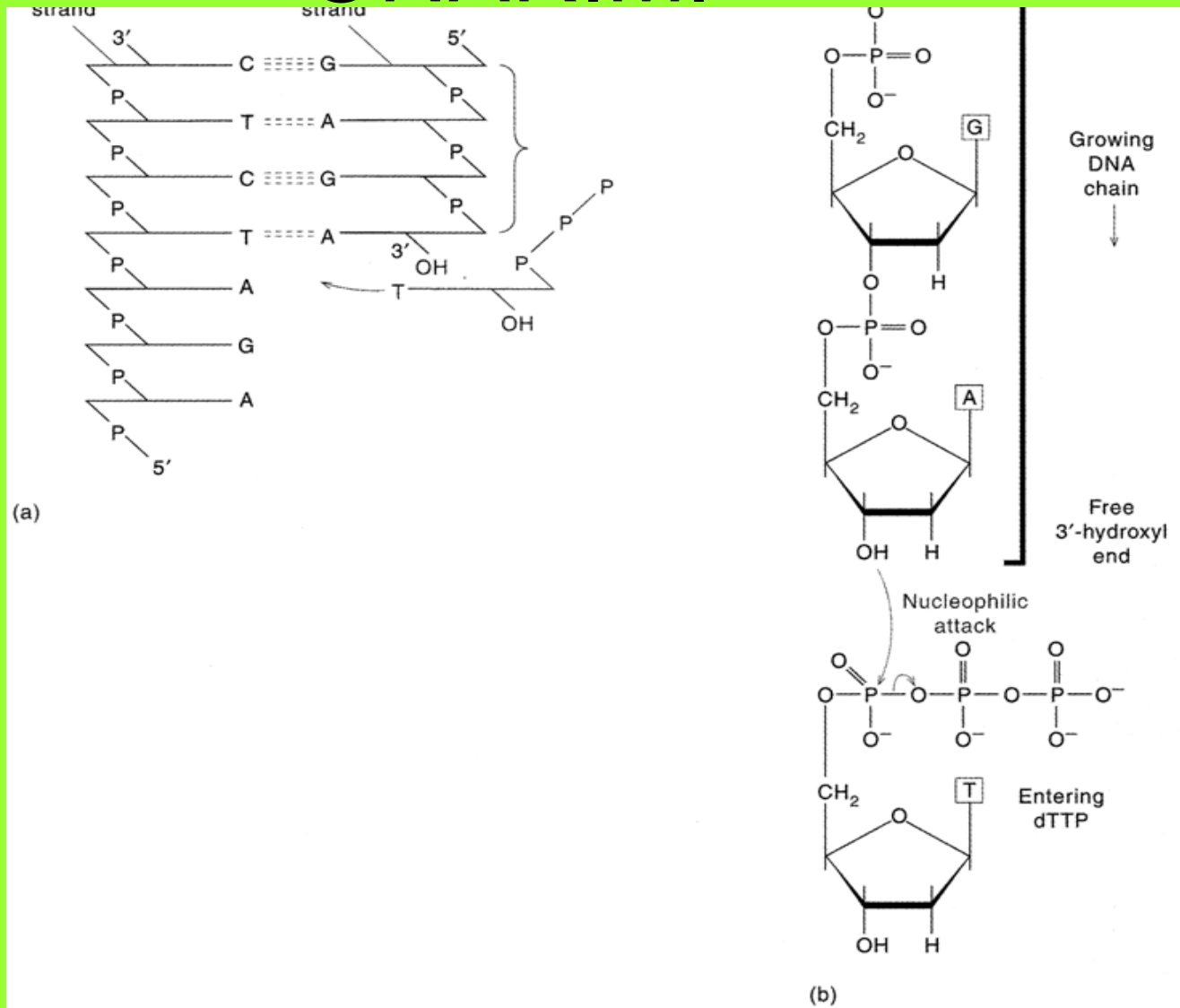
DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI

- En büyük parçaya Klenow parçası adı verilir. 3'-OH üzerinde bir proton uzaklaştırılır ve böylece bir nükleofilik -O⁻ oluşturulur. Tamamlayıcı baz kalıp sarmalı ile uygun pozisyona geldiğinde, -O⁻ gelen deoksiribonükleotidin alfa fosfatına bir nükleofilik saldırı yapmak için uygun pozisyon alır ve böylece bir pirofosfatı uzaklaştırarak fosfodiester bağı oluşturur.
- RNA primerlerinin polimerizasyonu başlattığı yerde oluşan sarmaldeki boşluklar Poll tarafından sonraki 3' parçacığa kadar doldurulur. Bu sarmalde bir nick (boşluk) bırakır. Nick, DNA ligaz enzimi ile kapatılır. Bu enzim bir AMP bağlar ve buda DNA sarmalının 5' fosfatı ile fosfodiester bağı oluşturur. Sonra 3'-OH 5' fosfat ile bir kovalent bağ yapar ve AMP uzaklaştırılır.

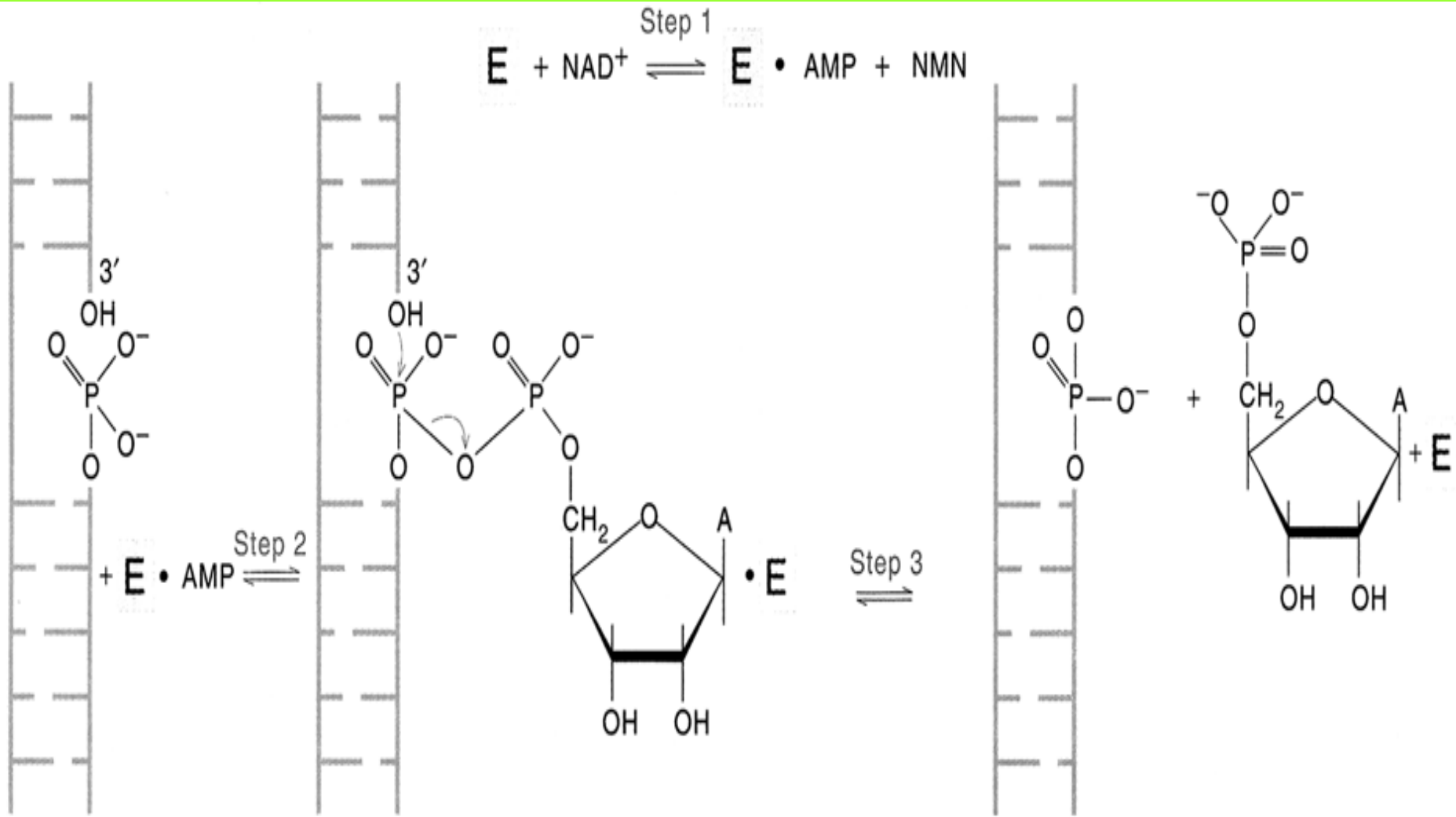
DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI

- Replikasyon için diğerk bazı enzim ve proteinlerde gereklidir. **Topoizomeraz** aktivitesi DNA'nın supercoiling durumunu rahatlatmak için gereklidir. Bu rahatlatma replikasyon olayının ilerleyebilmesi için gereklidir. Kalıp sarmalin açılması için **helikaz** enzimi heliksleri tekli sarmallere ayırır. Buda **single strand binding protein (SSB)** nin bağlanmasıyla takip edilir. SSB replikasyon çatalının açılmasında işlev gördüğü düşünülmektedir. Bu görevide tek sarmallı DNA'yı nükleazlardan koruma yoluyla veya sarmallerin açılıp kapanmasına yardım etmek süretiyle gerçekleştirir. **Primaz** Poll tarafından yeni sarmalin sentezlenmesi için gerekli olan RNA primerini sentezler.
- Replikasyon **oriC** adı verilen replikasyon orijininde başlatılır. Bunun için replikasyonun başlamasına yol açan sıralı bir protein birleşmesi vardır. Ökaryotlarda replikasyon bakterilerdeki gibi olup yukarıda adı geçen bütün enzimler rol alır. Fakat ökaryotlarda birden fazla replikasyon orijini mevcuttur. Bunlarda replikasyon birkaç yerde birden başlaması gerekir.

DNA REPLIKASYONU VE ONARIMI



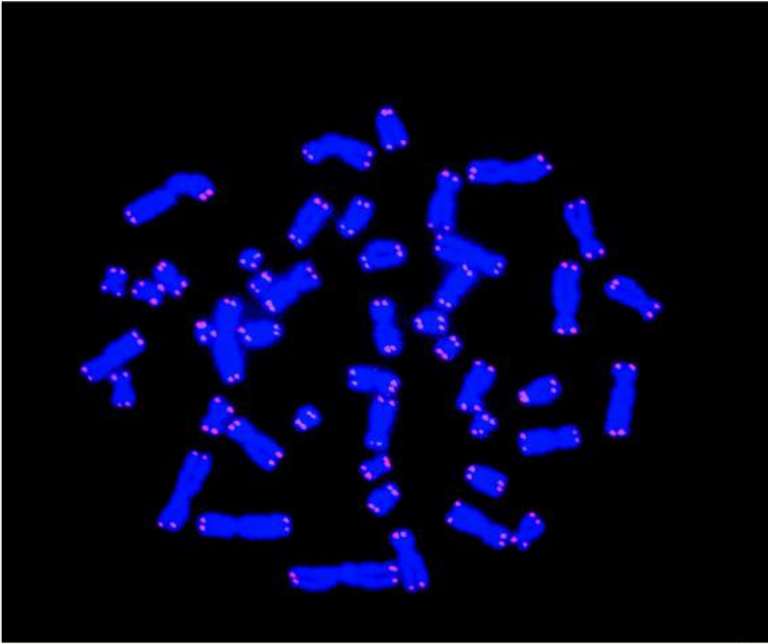
DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI



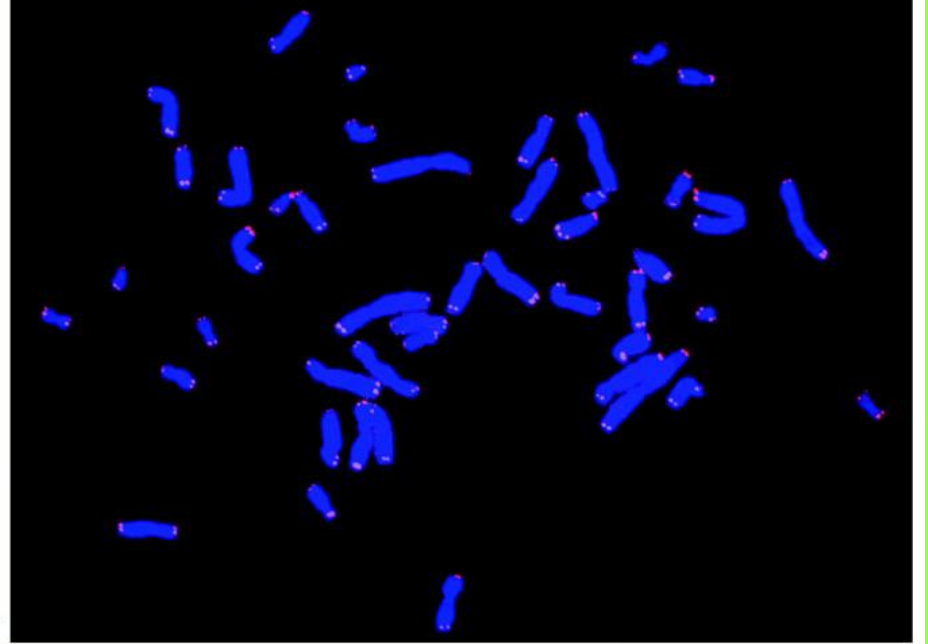
DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI

- Ökaryotlarda DNA doğrusaldır. Bakteriyel kromozomun replikasyonunda, RNA primerlerinin uzaklaştırılması ve boşluğun doldurulması zamanı geldiğinde, her zaman boşluğa doldurulması için bir parça 5' DNA vardır. Ökaryotlarda ancak bir kromozomun sonuna gelindiğinde bu durumla karşılaşılır. Eğer bir RNA primer 5'ucunun sonunda bulunursa o zaman kesme doldurma işlemi gerçekleşmez. Bu yüzden her seferinde kromozom replikasyon geçirdiğinde uç kısmı eksik olacak ve giderek kısalmaktadır. Bunun çözümünde **telomeraz** enzimidir. Kromozomun ucunda özel bir yapı ve sekansa sahip telomer denilen kısım vardır. Bir çok kısa tekrarlı sekanslardan (1000 or more TTAGGG hexamer tekrarlar) oluşmuştur. Telomeraz DNA'nın 3'ucuna bağlanan bir RNA bileşenine sahiptir ve enzim özel bir geriye transkriptaz gibi davranır ve RNA'yı kalıp olarak kullanmak suretiyle DNA sarmalini sentezler.

DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI



PD 16



PD 61

Şekil. Telomerler doğrusal kromozomların sonlarındaki tekrarlı DNA sekanslarıdır. Normal hücrelerin çoğunda telomer kısalması her hücre bölünümünden sonra olmaktadır. Telomerler kısaldığında hücrelerde bölünme durur ve büyüme gerçekleşmez. Telomeraz enzimi bu kısalmanın önüne geçer.

DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI

- DNA sarmalini sentezlemenin bir diğer yolu RNA'yı kalıp olarak kullanmaktır. Bunu yapan enzime geriye transkriptaz veya RNA'ya bağlı DNA polimeraz denilir.
- RNA virüsleri olarak bilinen bazı virüslerde RNA molekülünün içerdiği koddan üretilen bir DNA ara molekülünün karıştığı bir hayat döngüsüne sahiptirler. RNA (+ sarmalı DNA (- sarmalı) sentezi için kalıp olarak rol almaktadır. Bu enzim geriye transkriptaz enzimidir. İlaveten enzim DNA + sarmalini viral – DNA sarmalinden de sentezler ve aynı anda RNA-DNA heterodupleksindeki orijinal viral RNA yı parçalar.

DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI

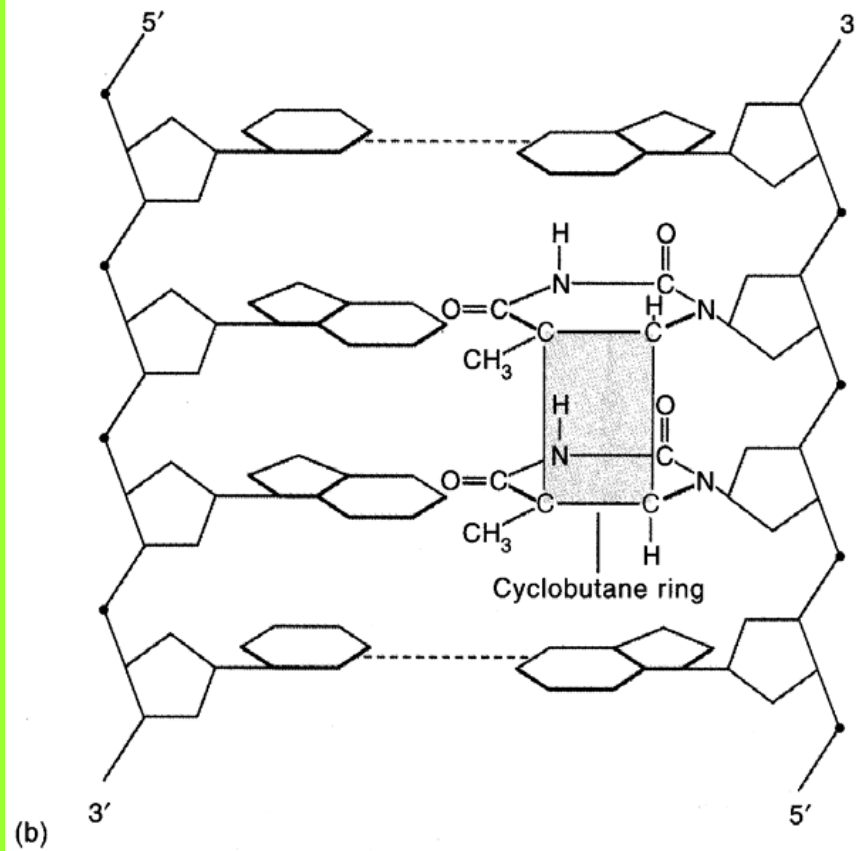
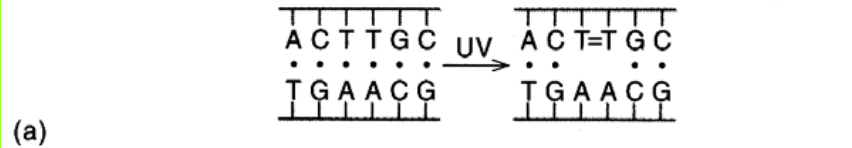
- **II. DNA Onarımı**
- DNA'ya hasar **SOS cevabı** denilen bir tepki uyarır. Bu tepki onarım mekanizmasını aşağıdaki gibi düzenler. DNA'ya hasar DNA parçalarının oluşmasına sebep olur. Bu parçalar recA denilen bir proteine bağlanır ve buda bir proteazı aktive eder. Bu proteaz DNA bağlanmasını düzenleyen bir proteini (lexA) parçalar. Bu protein normalde onarım genlerinin ekspresyonunu engeller. LexA parçalandığında DNA'dan ayrılır ve onarım genlerinin transkripsiyonu başlar ve proteine dönüşürler. Onarım genlerinin bir kısmı UV radyasyonu sonucu oluşan DNA hasarını onaracak enzimleri kodlamaktadır.
- DNA UV dalga boyundaki ışığı güçlü bir şekilde emer. DNA'nın aynı sarmalı üzerinde iki timin bazı yanyana bulunduğu zaman, UV ışık absorpsiyonu timin dimerlerinin oluşmasına sebep olur. Bu durum DNA yapısını, bilgi kodlamasını ve replikasyon fonksiyonlarını bozar.

DNA REPLİKASYONU VE ONARIMI

- Dimer, bu dimere bağlanan ve fosfodiester bağı parçalamadan görünür ışığı kullanarak dimeri parçalayan bir enzimle onarılabilir. Fakat diğer bir onarım mekanizması görünür ışığa ihtiyaç duymaz. Hasarlı bölge enzimatik olarak anormal bazları tanıyan ve deoksiriboz-fosfat kuyruğundan onları ayıran enzimlerle uzaklaştırılır. Bu bir apürinik veya apirimidinik bölge oluşturur. Hasarlı bölgeden 5'-3' yönünden birkaç baz ötede sarmalde kesikler yapılır, sonra bir helikaz ve Poll ve belki SSB kesilen oligomer bazları serbest bırakır, sonrada Poll kesilen bölgeyi yeniden sentezler ve açıklık ligaz enzimi ile yeniden bağlanarak onarım tamamlanır.

DNA REPLIKASYONU VE ONARIMI

Structure of a thymine dimer formed in DNA by exposure to short-wavelength ultraviolet light.

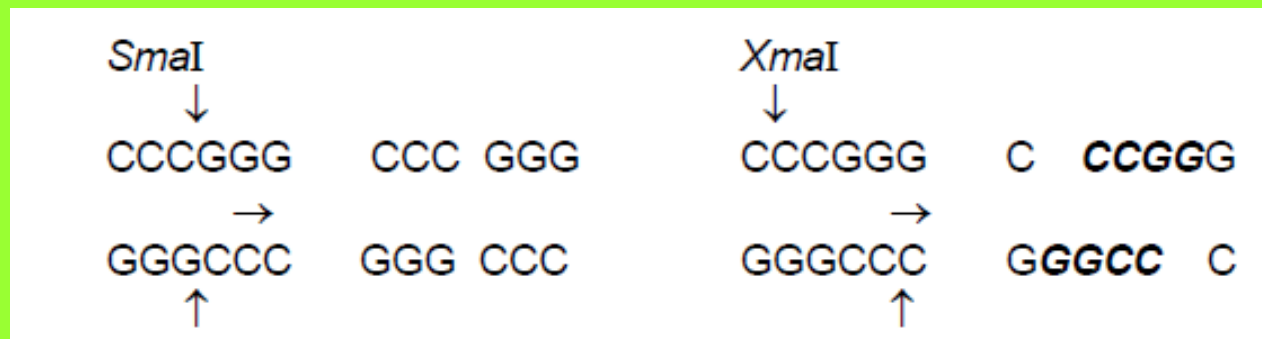


PCR, PLAZMIDLER, KESİM ENZİMLERİ

- DNA çok küçük miktarlarda izole edilebilir, küçük parçalara bölünebilir, klonlanabilir, çoğaltılabilir, sekanslanabilir, bir organizmadan diğerine transfer edilebilir, mutasyona uğratılabilir, birlikte kesilebilir, istenilen şekilde manipüle edilebilir. Genler ekspres, over ekspres edilebilir veya ekspresyonu azaltılabilir; bir başka organizmaya aktarılabilir, yok edilebilir veya organizmadan silinebilir.
- Modern moleküler biyoloji dört önemli faktörle yapılır: 1, kesim enzimleri; 2, plazmidler; 3, DNA sekanslama; ve 4, polimeraz zincir reaksiyonu veya PCR. Aslında çok sayıda metot vardır fakat yukarıdakiler en önemlileridir.

PCR, PLAZMIDLER, KESİM ENZİMLERİ

- Kesim enzimi DNA'nın iki sarmalini içsel sekans spesifik bölgelerde, her sarmaldeki fosfodiester bağlarını koparmak suretiyle kesen bir enzimdir. Bunlara endo nükleaz denilir. DNA sarmalleri iki şekilde kesilir. İki sarmal tam olarak aynı pozisyonda kesilir ve böylece iki keskin uç elde edilir veya kesimler yapışkan uç oluşturacak şekilde yapılır. Yapışkan uç oluşturan kesim enzimleri DNA klonlanmasında kullanılmaktadır. Bir çok kesim enzimi palindromik bölgelerde keser. Palindrome hem ileri hemde geriye okunduğunda aynı olan sekanslara denilir. Aşağıdaki sekanslar buna örnek verilebilir.
- Günümüzde 200 den fazla kesim enzimi ortaya çıkarılmış ve jherbirinin kestiği bölgeler farklılık göstermektedir.



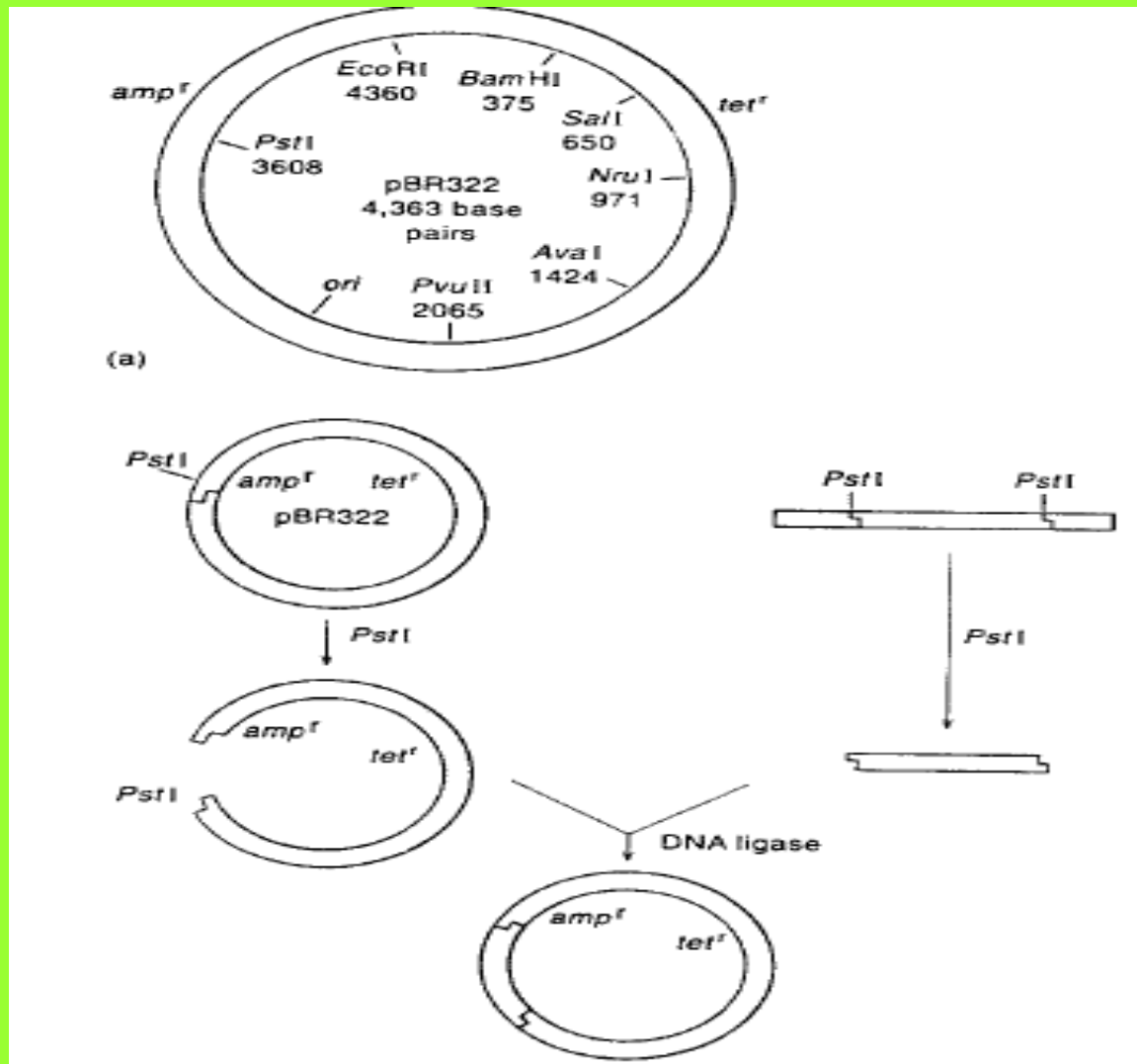
PCR, PLAZMIDLER, KESİM ENZİMLERİ

- Birkaç kesim enzimi kullanılarak bir DNA örneğinin haritası çıkarılabilir. DNA'nın farklı enzimlerle kesilmesi ve parçaların agaroz jelde ayrılması parçaların DNA zincirindeki düzenini belirlemek için bir metot olur. Böyle bir haritaya kesim (restriksiyon) haritası denir.

PCR, PLAZMİDLER, KESİM ENZİMLERİ

- **Plazmidler ekstra kromozomal DNA'lar** olup, genellikle kovalent olarak bağlı kapalı dairelerdir. Hücre içerisinde bulduklarında replike olma yeteneğine sahiptirler. 2000 bp den 20000 bp çiftine kadar değişik büyüklüklere sahiptirler. Bakteri içerisinde oldukları zaman bakterinin bir parçası gibi bölünüp çoğalırlar. Bir hücre bir kopyaya veya birkaç kopyaya sahip olabilir.
- Bazen de çok sayıda plazmid kopyasına sahiptir. Plazmidler herhangi bir plazmid kopyasına sahip olmayan bakteri hücrelerine transfer olabilirler. Bundan dolayı plazmidler gen klonlanması için önemli vektörlerdir.
- Bir kesim enzimi ile plazmid kesilip açılabilir ve yeni bir DNA parçası yerleştirilebilir. Rekombinant plazmid sonra bir bakteri hücrelerine transfer edilerek plazmid ve yerleştirilen DNA'nın çok sayıda kopyası elde edilebilir. Bu gen klonlamasının temelidir.

PCR, PLAZMIDLER, KESİM ENZİMLERİ



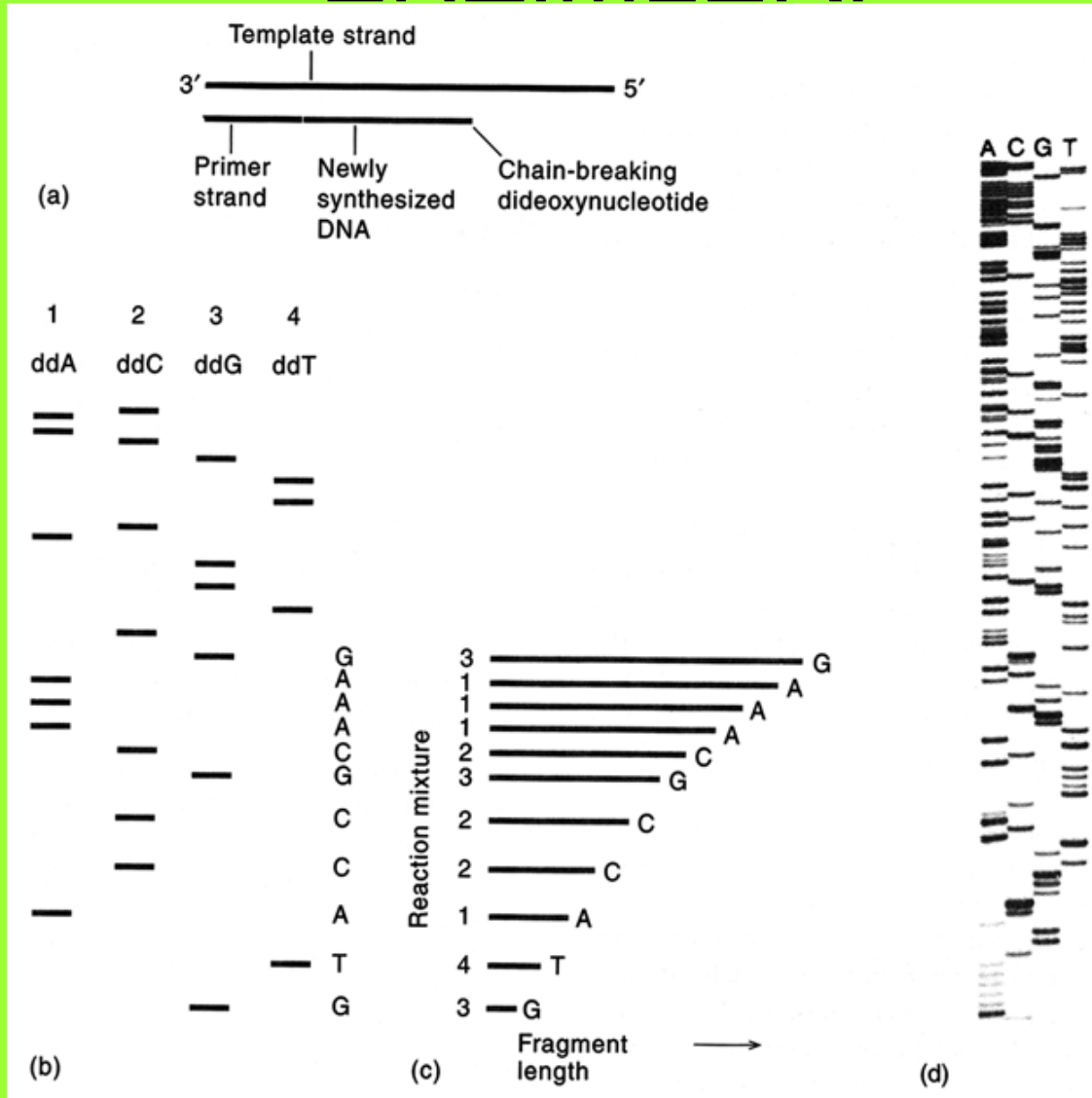
PCR, PLAZMIDLER, KESİM ENZİMLERİ

- DNA sekansı DNA sekanslama olarak bilinen metot ile kolayca belirlenebilir.
- DNA'nın bir sarmalini yapmak için 4 tip deoksiribonükleotide (**dATP**, **dGTP**, **dCTP**, ve **dTTP**) polimeraz enzimine ve bir kalıp sarmaline ihtiyaç vardır. Şimdi reaksiyon karışımına beşinci bir nükleotid ilave edildiğini ve bu nükleotidin diğerlerinden biraz farklı olduğunu yani OH yerine sadece H içerdiğini varsayalım.

PCR, PLAZMIDLER, KESİM ENZİMLERİ

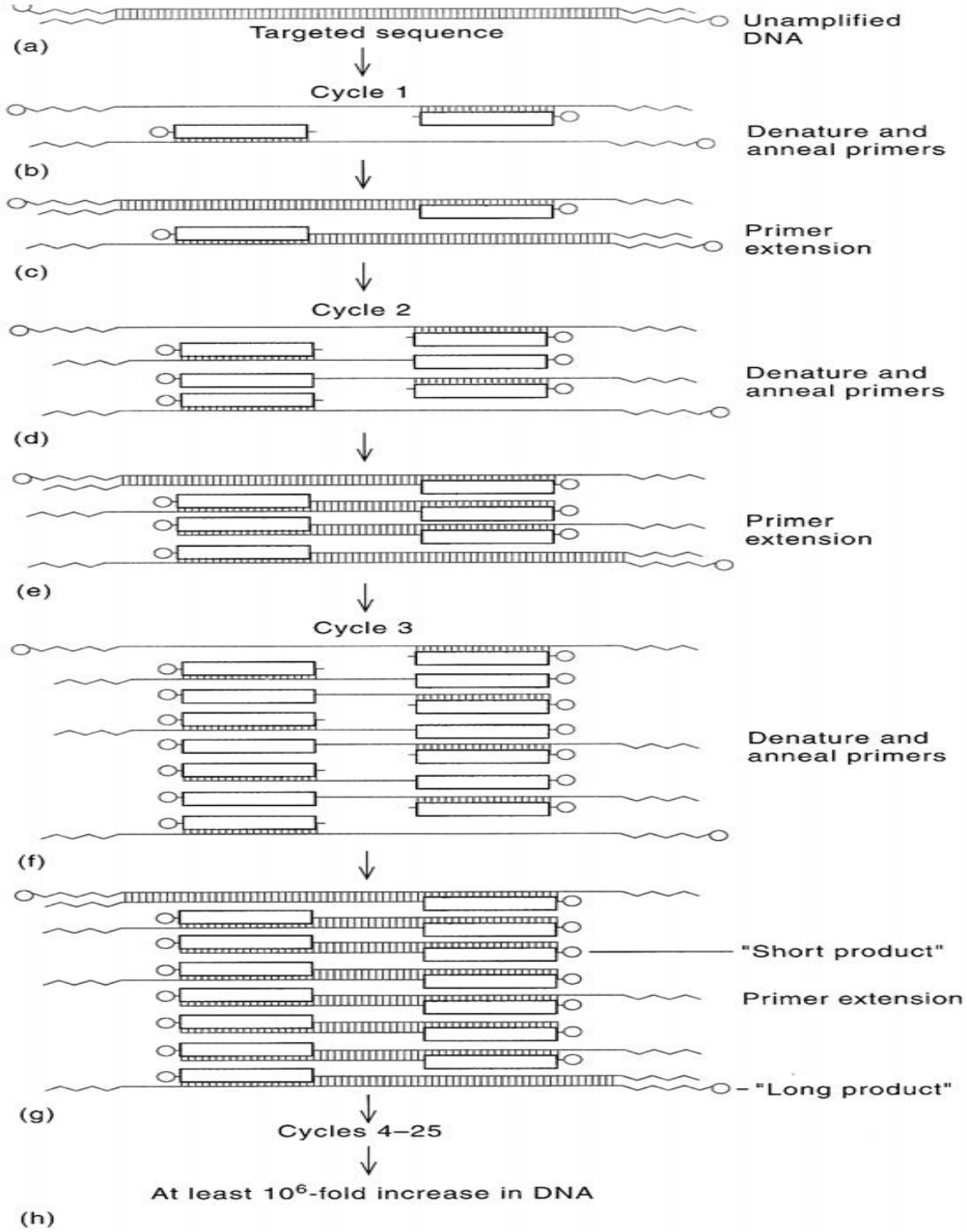
- DNA polimeraz bu nükleotidi büyüyen DNA sarmaline eklediği zaman bir sonraki nükleotidi eklemek için bir OH grubu olamayacağı için zincir uzaması duracaktır. Bu polimeraz reaksiyonu 4 farklı tüp içerisinde ve herbir tüpün farklı bir nükleotid içerirse ve deoksinin dideoksiribonükleotid oranı doğru olarak belirlenirse, uzayan sarmalin bir kısmında her nereye dideoksiribonükleotid eklenirse zincir uzaması duracaktır. Hassas bir metot ve zincirleri büyüklüklerine göre ayırt edecek bir yol ile, zincir uzunluğundan DNA sekansı okunabilir. Deoksiribonükleotidlere floresans boyaları eklenirse, dört reaksiyon aynı tüp içinde yapılabilir ve otomatik DNA sequenatör cihazı ile okunabilir. Tam sekansın belirlenmesi için elde edilen parçaların birbirleri ile çakışması gerekir. Böylece 1.6 megabazlık DNA için 5000 veya üzeri parça olabilir.

PCR, PLAZMIDLER, KESİM ENZİMLERİ



PCR, PLAZMİDLER, KESİM ENZİMLERİ

- PCR ile küçük bir DNA parçası kısa bir süre içerisinde çok büyük miktarlara kadar çoğaltılabilir. Teknik 1983 yılında geliştirildi. İşlem Thermophylic bir bakteriden izole edilen bir DNA polimeraz ile yapılır. Bu polimeraz ısıya oldukça dayanıklıdır. Isıtma iki DNA sarmalini eritir, hedef DNA da kısa bir DNA parçasına spesifik olarak bağlanan primerler yeni sarmallerin polimerizasyonunu başlatırlar, ve bu döngü bir çok kez tekrarlanır. Bu aynı DNA parçasının milyonlarca kopyasını meydana getirir. Bir DNA parçasının çok sayıda kopyasının olması, onun kolayca klonlanmasını, sekanslanmasını, modifiye edilmesini veya onunla herhangi bir işlmin yapılmasını kolaylaştırır.



TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON

- DNA kalıtsallık bilgisini taşıırken RNA da bu bilginin proteine dönüşmesini sağlayan moleküldür.
- Hücreler üç çeşit RNA içerirler. 100 bazdan daha az kısa polinükleotidler, **tRNA** veya **transfer RNA**; farklı büyüklükte ve oldukça fazla daha büyük polimerler, **rRNA** veya **ribozomal RNA**; ve küçükten (>100 baz) büyüğe (>20,000 baz) kadar tüm boyutlarda olan ve heterodisperse formlar, **mRNA** veya **mesajcı RNA**.

TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON

| PARAMETER | DNA SYNTHESIS | RNA SYNTHESIS |
|------------------------|---|--|
| Template | DNA; non-selective; both strands serve as template | DNA; selective to specific sequences (genes, other), only one strand at a time |
| Direction of Synthesis | 5' → 3' | 5' → 3' |
| Timing | only at specific stages of the cell cycle | cell-cycle independent; and cell-cycle dependent |
| Mechanism | DNA dependent DNA polymerase; initiation (10-60 nt RNA primer), elongation, termination (unknown) | DNA-dependent RNA polymerase; initiation (no primer), elongation, termination (recognition sequences for polymerase) |

DNA tüm RNA sentezleri için kalıp olarak görev yapar. Mesajcı RNA da, RNA aşağıdaki gibi (-) sarmalının tamamlayıcısıdır:

5' CGCTATAGCGTTT 3' DNA kalıp olmayan sarmal (+)

3' GCGATATCGCAA 5' DNA kalıp sarmal (-)

↓ **transkripsiyon**

5' CGCUAUAGCGUUU 3' RNA transkript

TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON

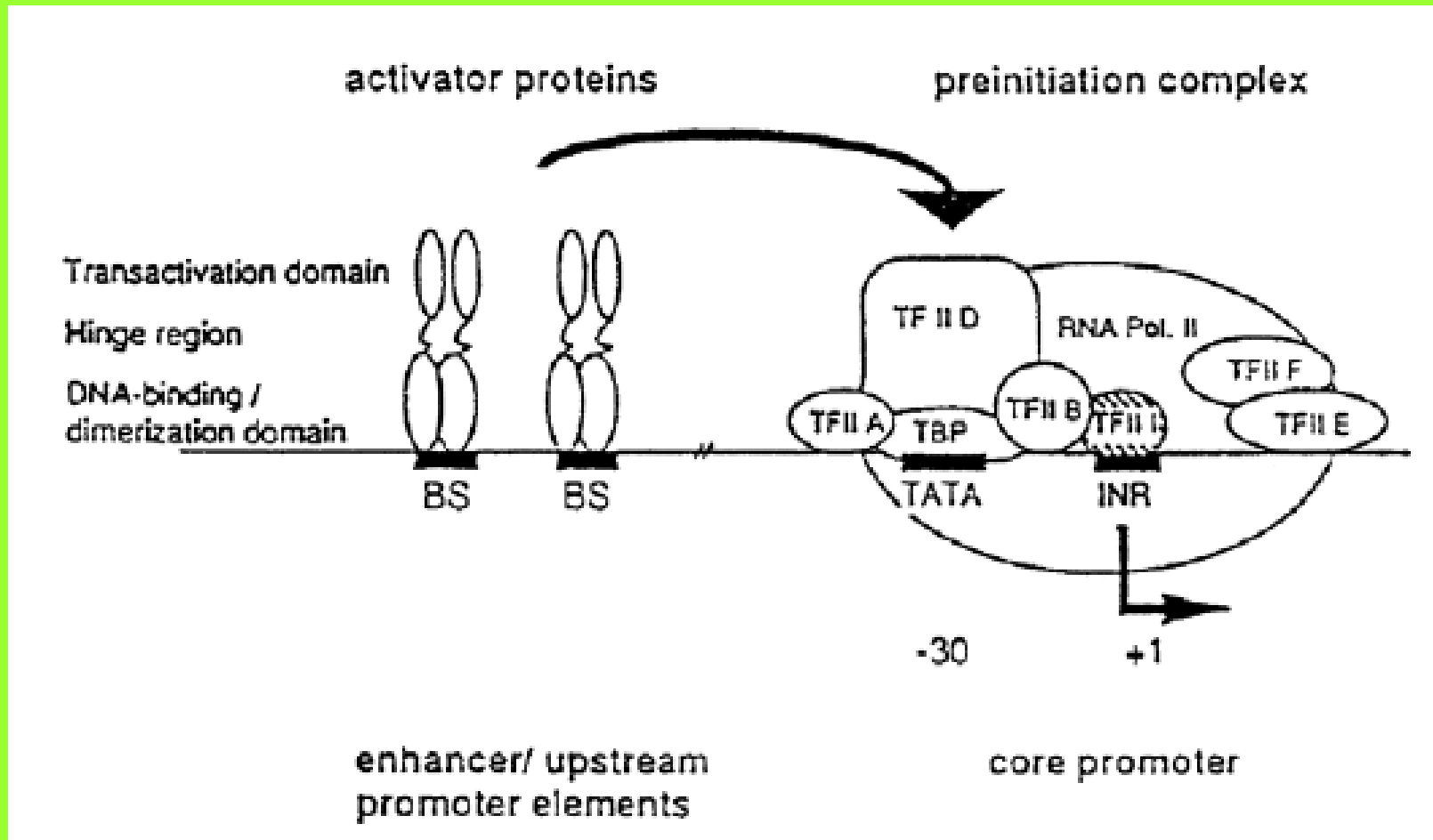
- **Messenger RNA (mRNA)** proteinlerdeki amino asit sekanslarının bilgilerini kodlamaktadır.
- **Transfer RNA (tRNA)** amino asitleri ribozomlara taşıyan ve protein sentezi için mRNA kalıbını okuyan bir adaptör molekülü olarak görev yapar.
- **Ribozomal RNA (rRNA)** bir protein grubu ile beraber ribozomal komplekslerdeki ribozomal altünitelerini oluşturur. Ribozomal RNA ribozomlarda bulunur. mRNA genel olarak doğrusal bir moleküldür. Fakat, tRNA'lar gövde ve üzerinde çıkıntılı yapılar ile yaprak şekilleri oluştururlar. Koli bakterisi için toplam RNA'nın % 90'ı rRNA, % 7'si tRNA ve % 3'ü mRNA dır.

TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON

- Prokaryot ve ökaryotlarda RNA transkripsiyonu yanda verilen benzerlik ve farklılıklara sahiptir.
- Ökaryotlarda transkripsiyon çok daha komplekstir. RNA polimeraz II hem bazal hemde uyarılmış transkripsiyonel faktörlere ihtiyaç duymaktadır.

| PARAMETER | PROKARYOTES | EUKARYOTES |
|---------------------------------|---|--|
| DNA-dependent RNA Polymerases | One polymerase for the transcription of all three classes of RNA | RNA polymerase I for pre-rRNA RNA polymerase II for pre-mRNA RNA polymerase III for 5S rRNA and tRNA |
| Template DNA | Very accessible to RNA polymerase; transcription can occur at many sites simultaneously | Only a small fraction of DNA is accessible to polymerase due to chromatin structure; DNA modifications |
| Initiation | Consensus sequences at promoter usually -35 to -10 from start of transcription | TATA box, CAAT box recognized by polymerase II |
| Elongation | 5' → 3' | 5' → 3' |
| Termination | Signals for polymerase; rho protein; run of adenines that form a hairpin loop | Termination signal not understood; |
| Post-transcriptional processing | None for mRNA | Yes, for rRNA and mRNAs |

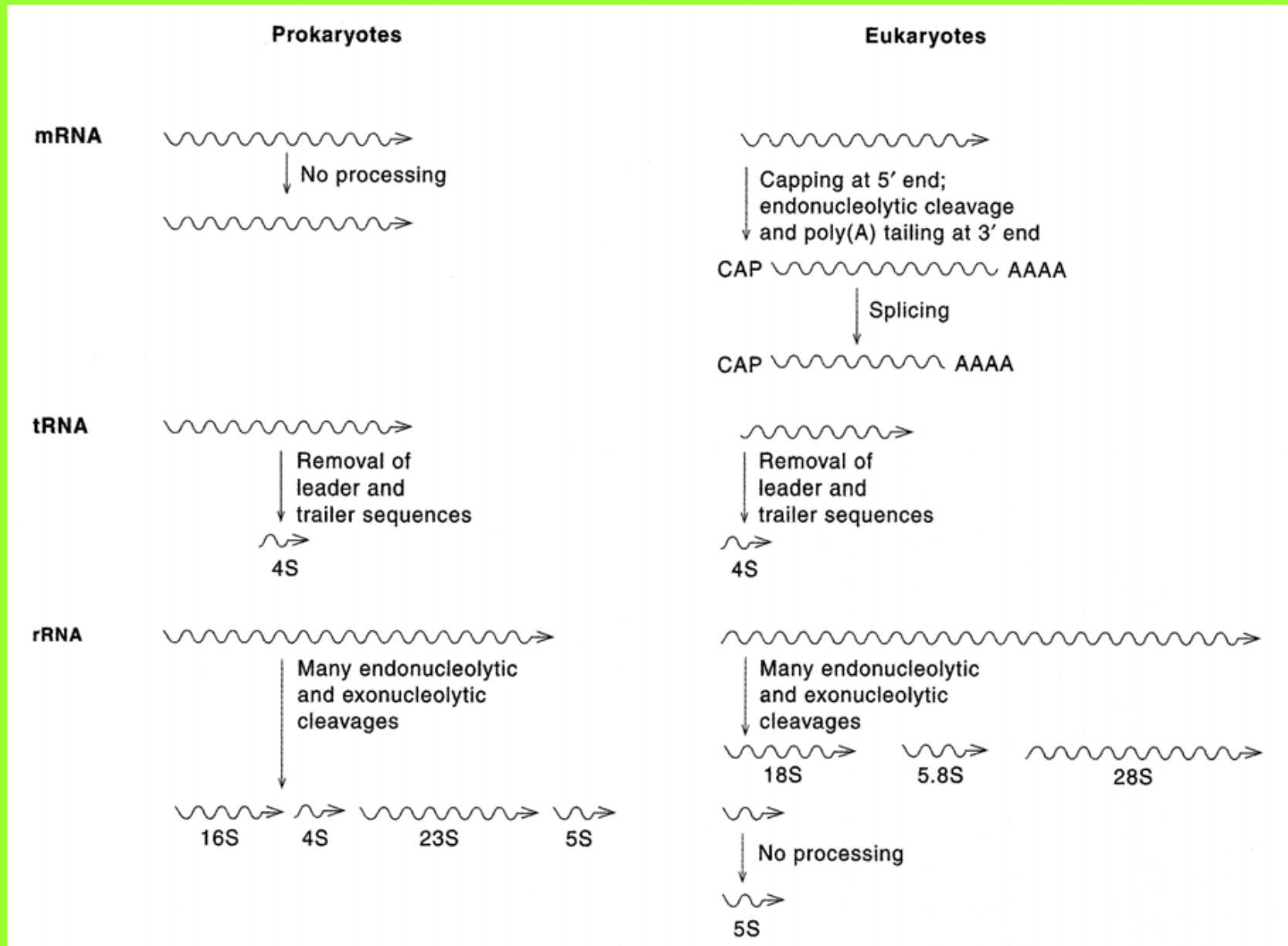
TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON



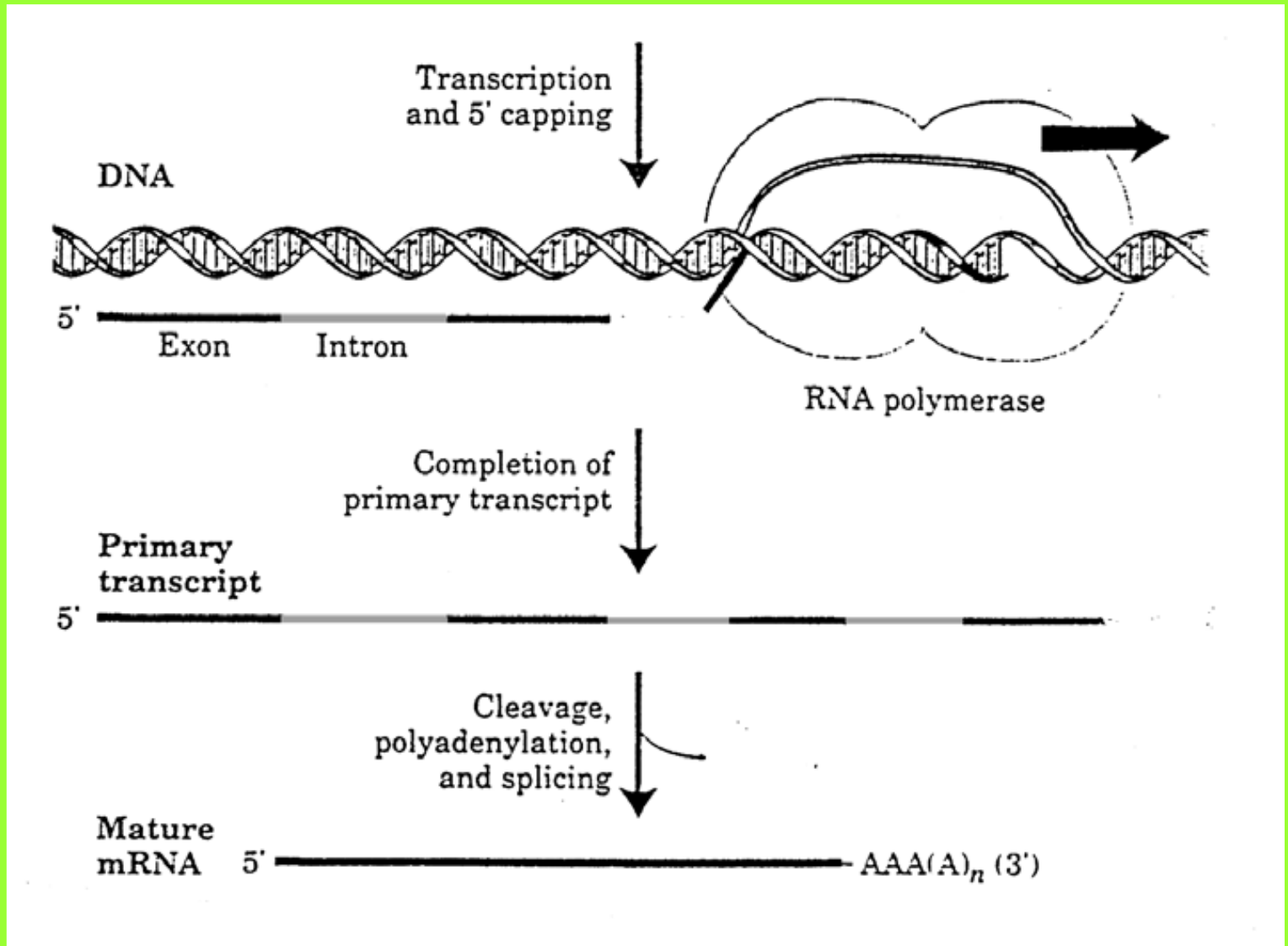
TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON

- Ön mRNA yapıldıktan sonra işlenir. 5' ucuna cap sekansı eklenir; intronlar kesilip uzaklaştırılabilir (splicing) ve 3' ucuna adeninler ilave edilebilir (poliadenilasyon). Cap ilavesinde bir 7-metilquanozine 5' uca 5', 5' trifosfat bağlantısı yoluyla eklenir. Bu modifikasyon transkripsiyonla aynı anda yapılır. Cap'ın mRNA'nın ribozoma bağlanarak translasyonu başlatmak için gereklidir. Aynı zamanda mRNA'nın parçalanmasını önlemektedir. mRNA'nın ucuna 25-250 bazlık bir poli (A) kuyruğu eklenir. Bir endonükleaz ve poli A polimeraz AAUAA sinyaline bağlanır. Transkript bu sinyalin 3' ucundan 11 ve 30 baz ötesini keser ve poliA eklenir.
- Kodlama sekansları içerisinde intron olarak bilinen kodlamayan bölgeler vardır. Kodlama bölgelerinde ekzon denilir. mRNA'nın protein sentezinde normal olarak fonksiyon göstermesi için intronların uzaklaştırılması ve ekzonların birleştirilmesi gerekir buna splicing denilir. Intronlar proteinlerin domeyn yerlerinde bulunur. Fonksiyonel protein domeynlerinin yer değiştirilmesinde ve yenilerinin ortaya çıkmasında rol alırlar. Ayrıca gen ekspresyonunun regulasyonunda da rolleri vardır.

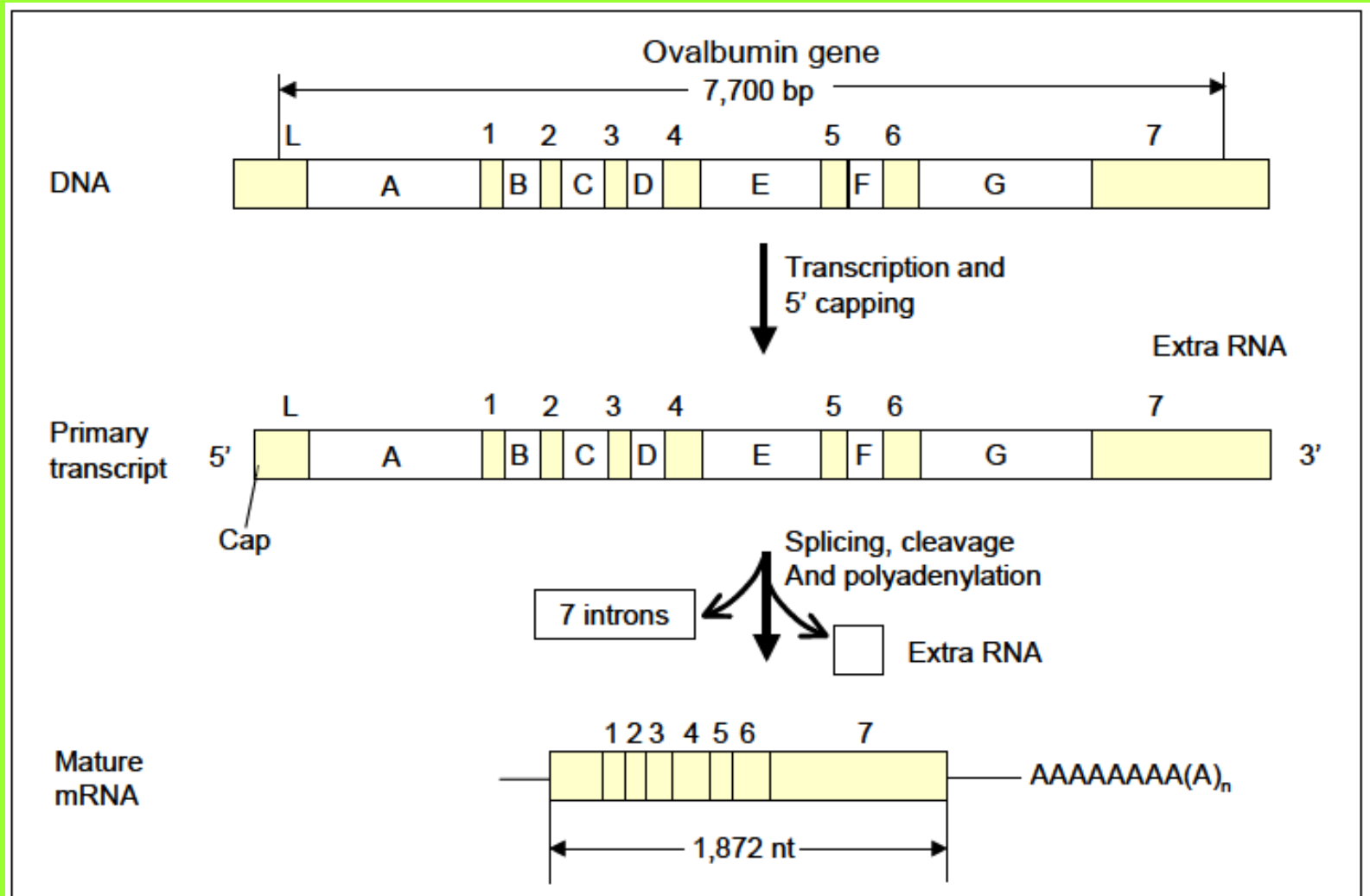
TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON



TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON



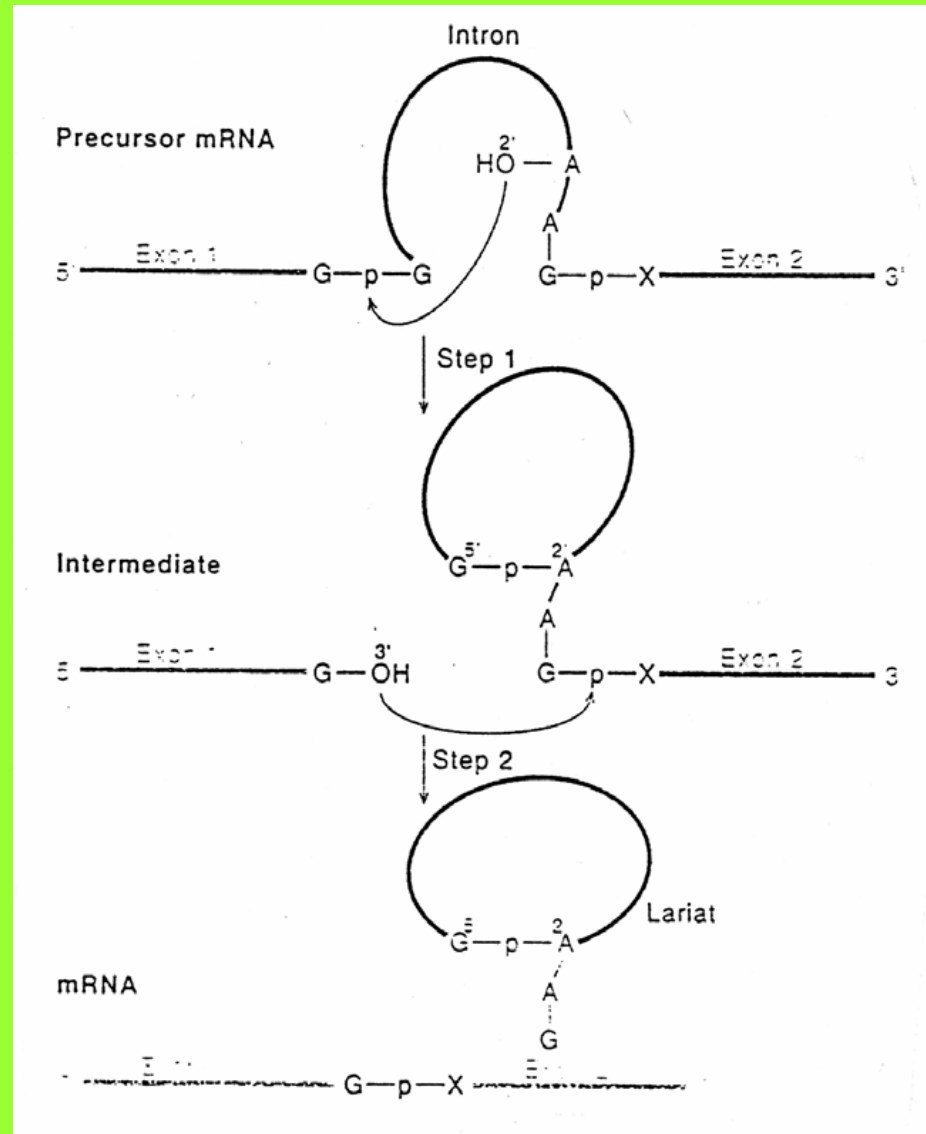
TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON



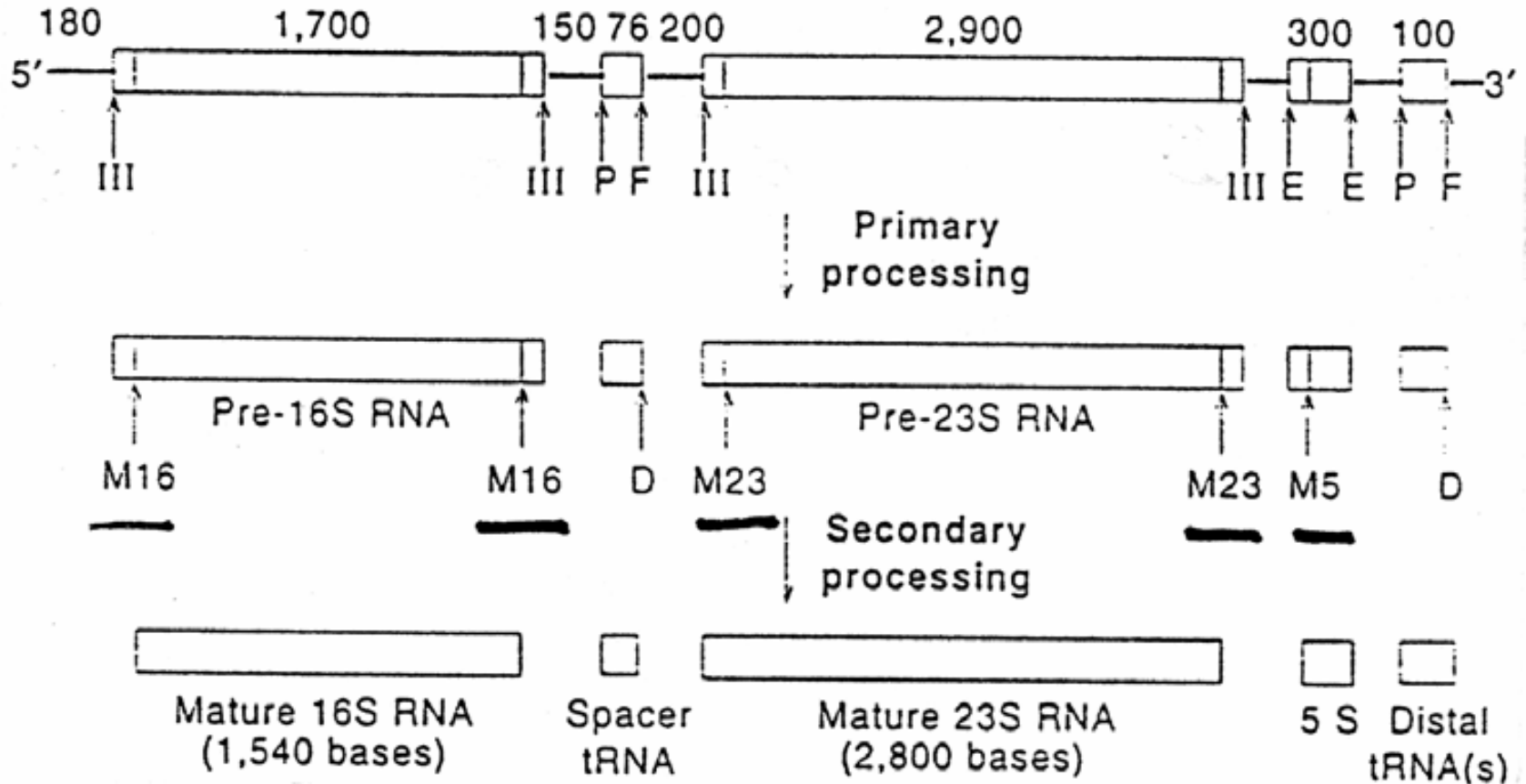
TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON

- Splicing olayı iki adımda meydana gelir. İlk adımda, uzaklaştırılacak sekansın 3' ucundaki bir adenozinin 2'-OH grubu intronun başlangıcındaki fosfata bir nükleofilik saldırı yaparak RNA'nın şeker-fosfat ana zincirini parçalar ve bir lariat ara bileşiği oluşturur. 5' kesim yerinden ayrılan OH grubu da nükleofilik karaktere sahiptir ve lariat ana bileşiğini içeren intronun 3' ucundaki bir G-p-X e yakın yerde yer almaya sevk edilir. Sonra ikinci bir nükleofilik saldırı gerçekleşir ve lariat serbest bırakılarak RNA sarmalının iki parçası yeniden birleştirilir.

TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON



TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON

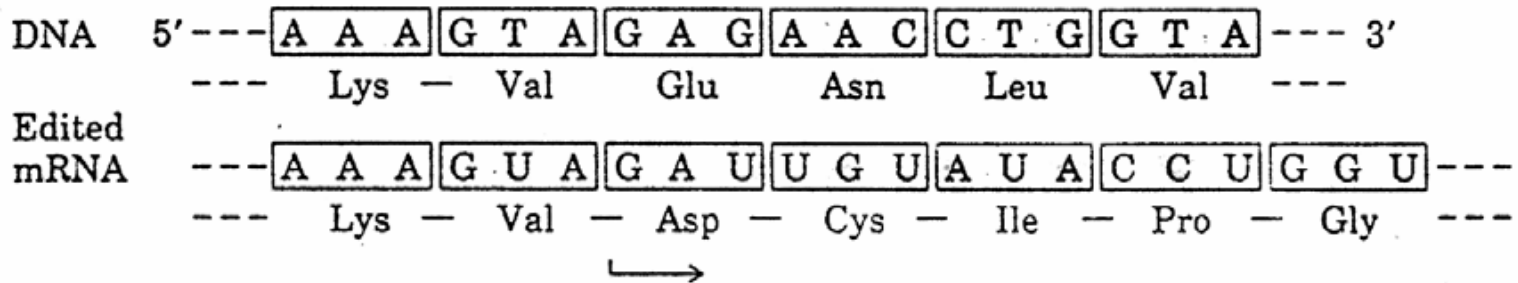


TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON

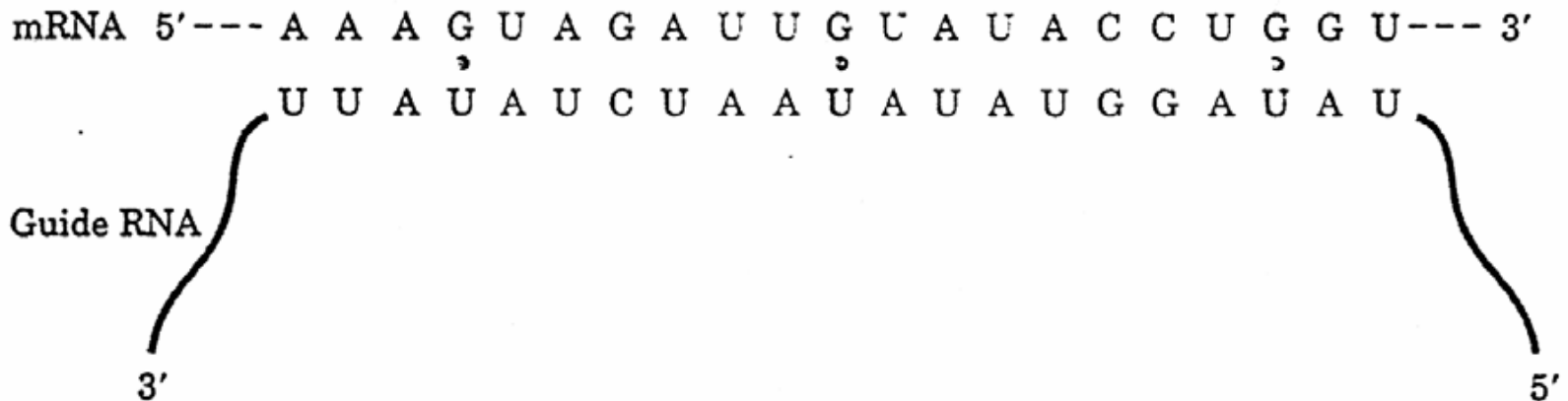
- Bazı organel genlerinin ve bazı protozoan genlerinin mRNA'ları edit edilir. Edit etme RNA daki baz hatalarının düzeltilmesi demektir.
- Edit olayı seçici baz yerdeğişikliklerinden ibarettir; bazen fonksiyonel bir RNA oluşturulması için gereklidir.

TRANSKRİPSİYON VE TRANSLASYON

Figure 2 RNA editing of the transcript of the cytochrome oxidase subunit II gene from mitochondria of *Tetrahymena brucei*.



(a)



(b)

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

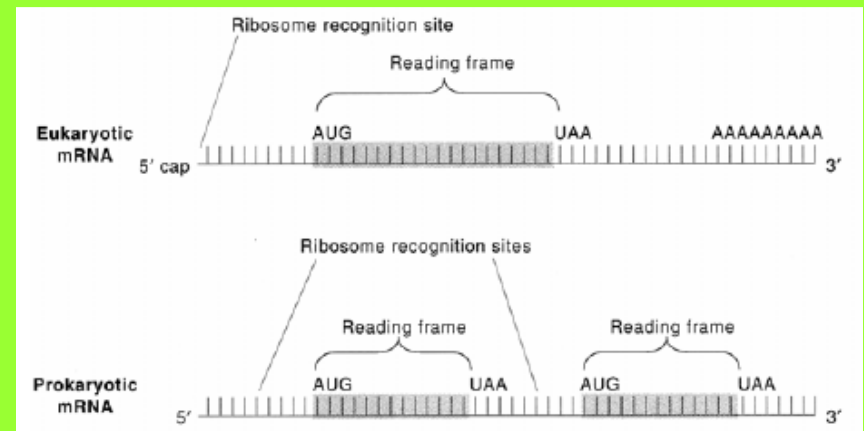
- Protein synthesis is the transliteration of the information content, originally contained in the DNA sequence, translated from the language of mRNA into the primary sequence of a protein. To execute the information transfer from DNA to protein requires all three classes of RNA listed in the previous handout. In fact for eukaryotes, a fourth class of RNAs is required, **snRNAs** (small nuclear RNAs) or "snrps." SnRNAs are a small group (a little more than a dozen) of highly conserved RNAs ranging in size from 100 to 220 nucleotides. They are very abundant with about 10⁶ copies each per nucleus. They function in the splicing of pre-mRNAs as part of a **ribonucleoprotein** complex. Each complex contains an RNA molecule and up to 12 proteins. SnRNAs **U1, 2, 4-6** are necessary for splicing and act as guides of the pre-mRNA intron/exon regions by binding to the pre-mRNA at the splice sites (How do they bind?). A large ribonucleoprotein complex forms at the splice sites (called a **spliceosome**). For the splicing reaction see upper figure on page 7 of Lecture 19 (note that the snRNAs are not shown).

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- The synthesis of protein has many similarities as well as some differences in prokaryotes and eukaryotes. Important features concerning protein synthesis include site of synthesis; timing of transcription and translation; number of proteins encoded by a mRNA and how translation is initiated and terminated.
- In order to understand how protein synthesis was accomplished, the genetic code needed to be understood. The breakthrough was achieved when synthetic RNAs were made and mixed with cell extracts that could synthesize protein. In the presence of **polyU**, a **polyphenylalanine** peptide was made. **PolyA** directed the synthesis of **polylysine**. Soon it was determined that each specific protein amino acid was coded for by a three base unit termed the **codon**.
- **Thus, the linear sequence of nucleotides directed the linear sequence of amino acids in a non-overlapping fashion.** The region of the mRNA containing the codon for the first amino acid of a protein and ending with the codon for the last amino acid of the protein is given the designation "**open reading frame.**" When you are looking for a gene in DNA sequence data, you often search for the longest open reading frame. Ideally, the protein coded for in a DNA or RNA sequence should be consistent with a protein you might purify from some biological material. There are specific codons that **initiate** and **terminate** protein synthesis as the mRNA is being decoded on the ribosome. Protein synthesis begins at

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- the first **AUG** of the mRNA and ends with **UGA, UAA, UAG** which are called the **stop codons**. The multiple stop codons illustrate the **degeneracy** of the genetic code. Sixty-four combinations of four types of bases and three bases per codon are possible, yet there are only 20(21) protein amino acids. Table to the left shows that one amino acid can be coded for by several codons, but one codon cannot specify for more than one amino acid.



GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

| Amino acid | Number of codons | Amino acid | Number of codons |
|------------|------------------|------------|------------------|
| Ala | 4 | Leu | 6 |
| Arg | 6 | Lys | 2 |
| Asn | 2 | Met | 1 |
| Asp | 2 | Phe | 2 |
| Cys | 2 | Pro | 4 |
| Gln | 2 | Ser | 6 |
| Glu | 2 | Thr | 4 |
| Gly | 4 | Trp | 1 |
| His | 2 | Tyr | 2 |
| Ile | 3 | Val | 4 |

The degeneracy as well as the codon specificity led **F. Crick** to propose the **Wobble Hypothesis** where there appeared to be flexibility in the third position of the codon. For example, the amino acid serine is coded for by UC(U,C,A,G). But how might wobble in the third position be possible? This question brings in the role of tRNAs in protein synthesis and answers tlarger question of how the genetic code is readthat the appropriate amino acid is added to the polypeptide chain in the proper sequence.

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- There is a specific **tRNA** molecule for each amino acid, and as the genetic code is degenerate, to a limited degree so are a number of tRNAs for certain amino acids. For example leucine can be coded for by UUG or CUG, so at least two tRNAs are needed to decode these two "words." On one of the loops of a tRNA is a three base sequence that is complementary to the codon on the mRNA. As the codon for leucine (UUG) passes through a ribosome, a tRNA with a leucine covalently attached and having the sequence AAC **hydrogen bonds** to the mRNA at the leucine codon. The AAC of this tRNA is termed the **anticodon** and the loop that it resides on is known as the **anticodon loop**. Once the codon and anticodon have **annealed**, at the proper site on the ribosome, the leucine attached to the tRNA is added to the C-terminal end of the polypeptide being synthesized. Thus, the informational content of DNA is copied into mRNA, and it is decoded by the tRNA at the ribosome and "**nonrandom**" protein synthesis is accomplished. As a result of this mechanism, rules to explain the wobble in the third position of the codon become relatively straight-forward.

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- Amino acids destined to be incorporated into a protein must first be activated by attachment to a tRNA for two reasons. The first has to do with the coding/decoding function of the tRNA as described above. The second reason is that for the amino acid to be covalently linked to another via a peptide bond, it has to be activated to make the reaction feasible. Having a specific tRNA for a specific amino acid makes possible a high degree of fidelity in getting the correct amino acid added at the correct time. However, the accuracy of the process is further ensured by taking advantage of the high specificity possible in enzyme catalysis. How? - "In the process of the attachment of the amino acid to its specific tRNA." This process is catalyzed by an enzyme specific for the amino acid and its corresponding tRNA; an **aminoacyl-tRNA synthase**. This enzyme links the amino acid to the tRNA in a two-step process. First the amino acid is linked to **AMP** liberating **PPi**. Then the amino acid of the **aminoacyl-AMP** is transferred to the tRNA forming an **aminoacyl-tRNA** releasing AMP. This will be on the exam so be sure to look at it closely; by what reaction mechanism are these two steps of the linking of the amino acid to the tRNA accomplished? Interestingly, if the wrong amino acid is somehow added to a tRNA, the aminoacyl-tRNA synthase has a proof-reading ability and will hydrolyze the ester linkage so that the wrong amino acid does not get into the polypeptide being synthesized.

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- II. Protein Synthesis
- Protein synthesis can be viewed as having five stages; **amino acid activation**; **initiation**; **elongation**; **termination** and **release**, and finally folding into a functional conformation. Table 26-6 lists some of the requirements for these stages of protein synthesis.
- In bacteria, a special methionine aminoacyl-tRNA for initiation is used to begin protein synthesis with a **formylated methionine**. A different tRNA is used for methionines that occur later in the polypeptide. The **initiator met-tRNA** is recognized by **initiation** and **elongation** factors. A recognition sequence in the mRNA known as the **Shine-Delgarno sequence** specifies for translation to begin at the next AUG in the mRNA. Generally the Shine-Delgarno sequence is purine rich (the trpA sequence is ...GAGGGG...).

Table 26-6 Components required for the five major stages in protein synthesis in *E. coli*

| Stage | Necessary components |
|------------------------------|---|
| 1. Activation of amino acids | 20 amino acids 20 aminoacyl-tRNA synthetases 20 or more tRNAs ATP Mg ²⁺ |
| 2. Initiation | mRNA N-Formylmethionyl-tRNA Initiation codon in mRNA (AUG) 30S ribosomal subunit 50S ribosomal subunit Initiation factors (IF-1, IF-2, IF-3) GTP Mg ²⁺ |
| 3. Elongation | Functional 70S ribosome (initiation complex) Aminoacyl-tRNAs specified by codons Elongation factors (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) Peptidyl transferase GTP Mg ²⁺ |
| 4. Termination and release | Termination codon in mRNA Polypeptide release factors (RF ₁ , RF ₂ , RF ₃) ATP |
| 5. Folding and processing | Specific enzymes and cofactors for removal of initiating residues and signal sequences, additional proteolytic processing, modification of terminal residues, attachment of phosphate, methyl, carboxyl, carbohydrate, or prosthetic groups |

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- The 16S rRNA has a pyridine rich sequence complement to the Shine-Delgarno sequence that helps to align the mRNA so that the AUG codon pairs with the anticodon of the initiator met-tRNA. Similarly, the eukaryotic mRNA has a sequence for ribosome binding which is found adjacent to the first AUG (see text). In bacteria, the 30S ribosomal subunit forms a complex with the mRNA, initiator met-tRNA, initiation factors (proteins) and GTP. Then the 50S subunit binds and the next stage, elongation, can begin. The **A site** on the ribosome is filled and peptide bond formation occurs. The growing polypeptide now attached to the tRNA in the A site moves to the **P site** and the A site is refilled with the next aminoacyl-tRNA. Finally, the termination or stop codon of the mRNA is reached and the release reaction occurs. Release factors and GTP are required to dissociate the ribosome from the mRNA.

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

– Abbreviations for different classes of RNA

- fRNA: Functional RNA — essentially synonymous with non-coding RNA
- miRNA: MicroRNA — putative translational regulatory gene family
- ncRNA: Non-coding RNA — all RNAs other than mRNA
- rRNA: Ribosomal RNA
- siRNA: Small interfering RNA — active molecules in RNA interference
- snRNA: Small nuclear RNA — includes spliceosomal RNAs
- snmRNA: Small non-mRNA — essentially synonymous with small ncRNAs
- snoRNA: Small nucleolar RNA — most known snoRNAs are involved in rRNA modification
- stRNA: Small temporal RNA — for example, lin-4 and let-7 in *C. elegans*
- mRNA : Messenger RNA
- tRNA : Transfer RNA

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- **Identifying novel small RNAs**
- Recent discoveries indicate that small RNA molecules (e.g. **siRNAs** [see lecture handout 16] and **microRNAs**) play a role in prokaryotic and eukaryotic gene regulation. These small RNA molecules may regulate gene expression through at least 2 different mechanisms: mRNA degradation (siRNAs) and translational inhibition (microRNAs). This research is still in its preliminary stages, but if bacterial systems are any indication, the regulatory mechanisms of eukaryotic small RNAs will likely turn out to be more diverse than anyone had previously imagined.
- **Small RNAs (sRNAs)** are important regulatory molecules found in both prokaryotic and eukaryotic cells. Although hundreds of sRNAs are found in eukaryotic cells, until recently only thirteen had been identified in *E. coli*.
- Unlike most RNA transcripts that encode proteins, sRNAs are non-coding transcripts – they function directly as RNAs. Eukaryotic sRNAs are largely involved in ribosomal RNA processing and modification. Previously identified prokaryotic sRNAs seem to be involved in a number of cellular processes, but none of which involve ribosomal RNA biogenesis.

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- The apparent difference between eukaryotic and prokaryotic sRNA functionality has prompted biologists to question whether this difference represents an evolutionary divergence or simply our incomplete knowledge of the full range of prokaryotic sRNA actions.
- Utilizing a multifaceted search strategy combining comparative genomics, RNA transcript analysis, microarray data and binding activity it was possible to develop a systematic method to predict and identify novel sRNAs in the fully sequenced *E. coli* genome. Seventeen novel prokaryotic sRNAs were identified. This experimental methodology has helped to serve as a blueprint for the systematic identification of sRNAs in other organisms with sequenced genomes.
- Next, the functional characterization of these newly identified sRNAs will lend valuable insight into the debate over whether the apparent differences between eukaryotic sRNA functions and prokaryotic sRNA functions are the result of an evolutionary divergence or our own lack of understanding.

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- In the past year, 28 new small RNAs (sRNA) have been identified in *Escherichia coli*. The function of most of these sRNAs, however, has not been determined. In the April 2nd, 2002 issue of *The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **Eric Massé** and **Susan Gottesman** showed that one of these sRNAs, the 90-nt **ryhB RNA (RhyB)**, is involved in inhibiting the expression of iron storage proteins and some iron-dependent enzymes, and provides a better understanding of how intracellular iron levels are regulated in bacteria. Moreover, they demonstrate the importance of sRNA molecules in bacterial gene regulation.
- A protein, called **Fur (Ferric uptake regulator)**, regulates the expression of operons for iron-metabolism. Fur is a repressor protein that uses iron as a co-repressor. With high iron concentrations, Fur binds to the promoter of iron transport operons and prevents transcription. Ironically, Fur also activates operons for iron storage proteins and some iron-dependent enzymes at high iron conditions. Until now, the mechanism of this latter function was unclear. New findings by Massé and Gottesman show that this regulation takes place indirectly through repression of the **ryhB RNA (RyhB)**. The authors show that when iron is abundant, Fur represses transcription of RyhB, probably by attaching to Fur binding sites in the RyhB promoter. Repression of RyhB, in turn, permits expression of iron storage proteins and some iron-dependent enzymes. OK, based on this explanation, draw a cartoon that depicts this mode of regulation in bacteria.

GENETİK KOD, TRANSLASYON VE PROTEİN DÖNGÜSÜ

- The mechanism of ryhB action is not fully understood, but may involve transcriptional inhibition. In some target operons, RyhB has complementarity to the ribosome-binding site of the mRNA, suggesting that RyhB inhibits translation. In another operon (**sdhCDAB**), the complementarity between RyhB and mRNA follows the first structural gene. In the absence of RyhB, transcription of the sdhCDAB operon proceeds past the first structural gene (sdhC). As RyhB concentration rises, the level of the operon mRNA declines. RyhB requires the RNA-binding protein, **Hfq**, for activity. Sequences within RyhB are complementary to regions within each of the target genes, suggesting that RyhB acts as an antisense RNA. Full-length sdhCDAB message disappears and a truncated message, equivalent in size to the region upstream of the complementarity, is detected when RyhB is expressed. These results suggest that, at least in this instance, transcription rather than translation is being terminated. In one model, the authors proposed that transcription termination might take place through recruitment of the **Rho** protein to the RNA-RNA interaction site.

- **MicroRNAs (miRNAs)**
- **MicroRNAs (miRNAs)** compose a class of short, noncoding RNAs, 20-24 nucleotides in length, that have been found in eukaryotic organisms ranging from roundworms, to fruit flies, to humans. The founding members of this class of RNAs are **lin-4** and **let-7**, two small RNAs that are processed from a longer stem-loop structure by the **Dicer enzyme**, and function to control developmental timing in the roundworm *C. elegans*. Over 150 other miRNAs have since been found in animals. In 2001, **David Bartel's** lab at the Whitehead Institute for Biomedical Research reported the exciting discovery of a new class of small genes. The genes don't code for proteins, but instead code for tiny RNAs called "microRNAs" —only 20 to 24 bases long—thought to be important in regulating protein levels. The results were published in the October 26 issue of *Science* along with two other papers with similar findings, one from **Thomas Tuschl's** lab at the Max Planck Institute for Biophysical Chemistry and the other from **Victor Ambros's** lab at Dartmouth Medical School.

- Previously, researchers had found two small RNAs that regulate translation of mRNA into proteins important in worm development. If these RNAs were missing, then the organisms didn't properly progress from the larval to the adult stages. The Bartel lab decided to survey all the RNA of the worm *C. elegans* and see whether they could find any more small regulatory RNAs of this type. They found a world of tiny RNAs that had almost escaped detection until now.
- Quickly another 55 RNAs with many hallmarks of the original two regulatory RNAs were found indicating there is a large class of RNAs that may be important in gene regulation. The Bartel lab and their colleagues at Dartmouth and Max Planck also found that these microRNAs are present in a broad range of organisms from fruit flies to humans, indicating their importance throughout evolution. This regulatory role for RNA appears to have been under appreciated. Until recently, researchers had focused on proteins as gene regulators. We are now exploring how extensively small RNAs are involved in normal gene regulation. These findings give cause to reevaluate what lies in the vast regions between protein coding genes. Scientists have primarily relegated these parts of the genome to containing either gene regulatory elements or "junk" DNA. We now know these regions contain many small genes.

- **How micro RNAs Work**

- Most of life's processes begin with gene expression—the transfer of information from DNA into "messenger" RNA (mRNA), and then the translation of that message into proteins. Because protein production is critical to the well being of an organism, this process can be controlled at the different stages of gene expression.
- The two previously identified small RNAs important for worm development, for instance, are playing a unique regulatory function by intercepting specific mRNAs and preventing them from being productively translated into proteins. Many think that microRNAs are produced by the cell from longer RNA precursors. An enzyme "scissor" called Dicer chops the precursor RNA into a small, active piece, which can then find a match with a specific target mRNA and block its protein production. This is a way for cells to control the amount and timing of the proteins they need.
- It will be interesting to learn which mRNAs are targeted by these new genes. They may act by blocking productive translation of their target mRNA; alternatively some microRNAs might increase protein production, or regulate by other mechanisms—such as influencing the stability, processing, or localization of a specific mRNA.

- **snoRNAs**
- Ribosome biogenesis in eukarya occurs in the nucleolar compartment of the nucleus. Several proteins and dozens of **snoRNAs** are involved in this process. snoRNAs can be divided into two major classes: **C/D box** and **H/ACA box RNAs**. The C/D box snoRNAs are efficiently precipitated with antibodies against **fibrillarin**. Most C/D box snoRNAs are involved in targeting ribose methylation within rRNA, whereas most H/ACA box RNAs are involved in targeting the conversion of uridine to **pseudouridine** within rRNA. snoRNAs not involved in nucleotide modification are required for proper endonucleolytic processing of the pre-rRNA.
- The general mechanism whereby C/D box snoRNAs target ribose methylation is well established. Each snoRNA contains a unique 9 to 20 nucleotide (nt) sequence located 5' to the D or D' box motif that is complementary to a sequence within small subunit (SSU) or large subunit (LSU) rRNA. During ribosome biogenesis, a snoRNA:rRNA helix is formed and methylation is directed to the rRNA nucleotide that participates in the base pair 5 nt upstream from the start of the D or D' box.

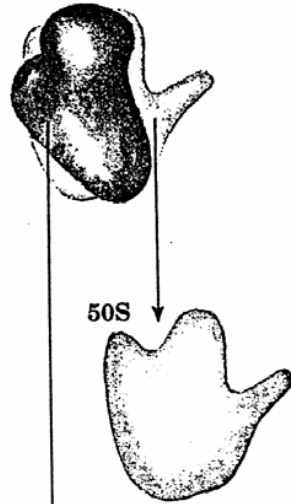
- In eukaryotes, it is likely that most, if not all, rRNA ribose methyl modifications are guided by snoRNAs. In the yeast *S. cerevisiae*, methylation guide snoRNAs have been assigned to all but four of the 55 rRNA ribose methylation sites. Although no single methylation site and no individual C/D box snoRNA involved only in methylation appear to be essential, global rRNA methylation in yeast is apparently essential. Inhibition of methylation is believed to severely compromise the ability of the rRNA to fold into or maintain the active higher order structure.
- SnoRNAs have been found mainly in eukaryotic species. Ribose methyl modification levels in bacterial rRNA are much lower. *Escherichia coli* rRNA contains only four ribose methyls created by individual protein enzymes. In contrast, the rRNA of the **archaeon *Sulfolobus solfataricus*** has many ribose methylation sites similar to that found in eukaryotes. **Archaea** are unicellular prokaryotic organisms that lack a nucleolus, but their genomes encode homologs to essential eukaryotic nucleolar proteins. *Sulfolobus acidocaldarius* contains several snoRNA-like C/D box sRNAs. Archaeal sRNAs are small, generally 50-60 nt in length, whereas human and yeast methylation guide snoRNAs average roughly 75 and 100 nt.

- **Nucleic Acids Research Small RNA Database**
(<http://www3.oup.co.uk/nar/database/summary/247>)
- The small RNA database is a compilation of small size RNA sequences from both prokaryotic and eukaryotic organisms. The database is updated with sequences submitted to GenBank on the World Wide Web. Small RNAs are broadly defined as the RNAs not directly involved in protein synthesis as mRNAs. Their size varies from tens to hundreds of nucleotides long, with some of the yeast small RNAs being over one thousand nucleotides long. This database includes nuclear, nucleolar, cytoplasmic and mitochondrial small RNA sequences from eukaryotic organisms and small RNAs from prokaryotic cells as well as viruses. If you are interested, you can find a wide variety of sequences at the database site.

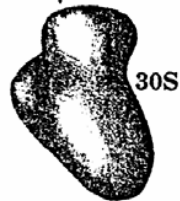
- Protein synthesis is a costly process. A total of three high-energy bonds is required for the formation of each peptide bond. The energy of an ATP is used to link each amino acid to its tRNA. Elongation and translocation steps require the hydrolysis of two GTPs. In addition, one GTP is hydrolyzed during initiation and another GTP is consumed during termination.
- While protein synthesis is similar in prokaryotes and eukaryotes, there are some important differences. Perhaps the most well known difference is the relative size and make up of the ribosomes for the two groups. Bacteria have 70S ribosomes and eukaryotes usually have two size classes; a 70S class that is found in mitochondria and the plastids of plants and an 80S class that is found in the cytosol. The diagram below points out some of the compositional differences. The "S" is a unit of migration through a dense solution during centrifugation. The greater the S value usually correlates with the greater mass.

- III. Protein Turnover
- During the last couple of lectures we have learned a great deal about transcription and translation (protein synthesis). Now that we know how proteins are synthesized, it is worthwhile to consider how they are modified and degraded. If proteins were only synthesized, cells would continuously accumulate them, would require much greater amounts of carbon skeletons for amino acid carbon chains and much more reduced nitrogen and sulfur. Since sources of respirable carbon for energy metabolism and intermediates, and N and S are limited, any cell or organism that is not economical with these materials will not belong for this world. In addition to needing to recycle carbon skeletons and reduced forms of nitrogen and sulfur, turnover of proteins provides another portentous capability to cells, that of **regulation**. The activity of many enzymes is determined by the amount of the given enzyme present. If not regulated by allosteric or other means, the only way the enzymatic activity of such proteins can be modulated is through controlling the balance between synthesis and degradation.
- Thus protein turnover becomes very important.

Bacterial ribosome
70S $M_r 2.5 \times 10^6$

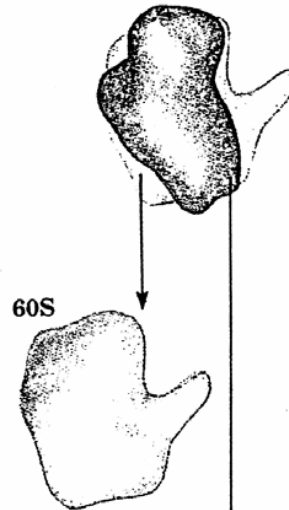


$M_r 1.6 \times 10^6$
5S rRNA
(120 nucleotides)
23S rRNA
(3,200 nucleotides)
34 proteins

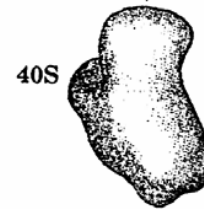


$M_r 0.9 \times 10^6$
16S rRNA
(1,540 nucleotides)
21 proteins

Eukaryotic ribosome
80S $M_r 4.2 \times 10^6$



$M_r 2.8 \times 10^6$
5S rRNA
(120 nucleotides)
28S rRNA
(4,700 nucleotides)
5.8S rRNA
(160 nucleotides)
~ 49 proteins



$M_r 1.4 \times 10^6$
18S rRNA
(1,900 nucleotides)
~ 33 proteins

Proteolitik enzimler: Beyond breakdown of proteins during digestion of ingested foods, proteolysis can result in **enzyme activation zymogen maturation**, function in **protein secretion, processing, and protein turnover** and **utilization of protein reserves**.

Proteases are classified by the **active site residue** that accomplishes or plays the central role in catalysis, **ATP dependence** and by **substrate specificity**. A further distinction into subclasses based on substrate specificity include: 1. Endoproteinases 2. Carboxypeptidases 3. Aminopeptidases

- In eukaryotes, a completely different **ATP-dependent** proteolytic pathway exists from that of bacteria. Proteins targeted for destruction are covalently linked to a small protein of 76 amino acids called **ubiquitin**. Once ubiquitinated, the protein is marked and rapidly undergoes proteolysis. Ubiquitination occurs on the **e-NH₂** of lysine residues. To add a ubiquitin to a targeted protein requires a three step process. First, ubiquitin is linked to a protein called **E1** by a thioester linkage that requires the hydrolysis of ATP. Next the ubiquitin is transferred to a second protein (**E2**) by a **transesterification** reaction. Once attached to E2, the ubiquitin is transferred to the target protein in a transfer reaction that requires a third protein **E3**. Ubiquitinated proteins are then degraded to amino acids by the action of a large multiprotein complex known as a **proteosome**. A proteosome is like a reverse cornucopia where a ubiquitinated protein enters but does not leave. Only the ubiquitin escapes degradation, while the targeted protein is converted to free amino acids. A major factor that determines how fast a protein is degraded by the ubiquitin pathway is the amino-terminal residue of the protein. Some proteins are long-lived and others are rapidly degraded. Depending on the residue that is present at the N-terminus, turnover can be rapid or it can be slow. This determinant of protein turnover is known as the **N-end rule**.
- A second determinant of how fast a protein might be degraded in animals is a region within the protein rich in Pro, Glu, Ser and Thr residues. Such regions are called PEST for the one-letter designation of the amino acids found in these regions. PEST regions range from 10 to 60 residues in length.

