DEOKSİRİBONUKLEİK ASİT (DNA)

 Canlı organizmaların binlerce özelliği arasında şüphesiz ki en önemlisi yaşamın sürekliliğidir. Yani canlı bir sistem çoğalma özelliği göstermelidir. Çoğalabilmek için, organizmanın kendini tam anlamı ile ifade eden bir öze sahip olması gereklidir. Bu öz, hücre için zorunlu her aşamayı spesifiye ederek tam bir eş (kopya) çıkarma işlevi görür. Hücrede söz konusu eşleme için gerekli bilgi deoksiribonukleik asit olarak adlandırılan molekülde kodludur.

 Eğer bir mekanizma ifade edilebilirse üzerindeki bilgi kullanışlı hale gelir. Biyolojik sistemlerde DNA’daki bilgi RNA molekülüne kopyalanır (messenger RNA, mRNA). Bu kopyalama süreci transkripsiyon olarak adlandırılmaktadır. mRNA molekülünün içerdiği bilgi son aşamada proteinlere çevrilir. 1869 yılında İşveç’li bilim adamı Friedrich Meischer kırmızı kan hücresi öncülerinin (retikülositler) özütlerinden hücre çekirdeğini izole ettikten sonra; karbon, hidrojen, oksijen, azot ve yüksek oranda fosfor içerdiğini belirlemiştir. Meischer bu yapıya, asit özelliğinden dolayı, nuklein adını vermiştir. Nuklein’in yapısal olarak tanımlanması süreci çok yavaş bir gelişme göstermiştir. Nuklein’in bulunuşundan yaklaşık 60 yıl sonra Albert Kossel ve Phoebus Levene nukleinin bir deoksiribonukleik asit olduğunu ispat eden kimyasal deneyleri yürütmüşlerdir. Bu kimyasal analizler, DNA’daki temel tekrarlanan alt ünitenin bir nukleotit olduğunu ve bir şeker (2′-deoksi-D-riboz), bir fosfat ve 4 heterosiklik azotlu bazdan birini içerdiğini göstermiştir. Bu bazlardan ikisinin purin (adenin ve guanin), diğer ikisinin ise primidin (sitozin ve timin) olduğu saptanmıştır. Levene daha sonra bu elemanların birbirine bağlanma özelliklerini incelemiş ve bazların (A, G, C veya T) 2′ deoksiriboza, 1. karbon atomundan (C-1) bir β-N glikozodik bağı ile bağlandığını; ayrıca fosfatın, şekerin 3′ ya da 5′ karbon atomuna bağlandığını bulmuştur. DNA’nın içerdiği fosfat grubu ilave edilmemiş olan baz şeker birimi nukleozit, fosfatlanmış nukleozit ise nukleotit olarak adlandırmıştır. Levene’in diğer bir kritik bulgusu ise; bir nukleotidin hidroksil grubu ile diğer nukleotidin fosfat grubu arasında kovalent fosfodiester bağı oluşturularak nukleotitlerin birbirine bağlandığının belirlenmesidir. DNA’ daki fosfodiester bağları, ardışık şekerlerin 5′ ve 3′ karbon atomları arasında oluştuğu için, bu bağa 5′ ve 3′ fosfodiester bağı adı verilmiştir. 2′ deoksiribonukleotitlerin 5′-3′ fosfodiester bağları bir polinukleotit zincirini oluşturur. Bir polinukleotit zincirdeki tüm nukleotitler aynı bağıl düzeni korurlar. Bundan dolayı eğer 5′ karbon atomu pentoz halkası üzerinde ise, 3′ karbon atomu ilk nukleotit de altta olacaktır ve bu durum söz konusu polinukleotit zincirinde daima korunacaktır. Yani tüm nukleotitlerde 5′ karbon atomu pentoz halkası üzerinde olacaktır ve polinukleotit zinciri 5′→3′ doğrultusunda yönlenecektir.

 Bir DNA örneğindeki bazların her birinin molar oranı baz kompozisyonunu verir. Baz kompozisyonu, DNA’nın hidrolize edilmesi ve kantitatif analizi ile belirlenebilir. Ayırma ve kantitatif analizin oldukça zor oluşu nedeniyle DNA’nın baz kompozisyonu nukleinin keşfinden yaklaşık 80 yıl sonra belirlenebilmiştir. 1940’lı yıllarda Erwin Chargaff değişik organizmalardan izole ettiği DNA örneklerinin baz kompozisyonlarını, kağıt kromotografisi tekniği ile saptamıştır. Chargaff tüm DNA örneklerinde Adenin’in Timin’e, Guanin’in ise Sitozin’e eşit molar oranlar içerdiğini belirlemiştir. Ancak o yıllarda bu bulgunun önemi anlaşılamamıştır.

 Bu özet tarihçe ışığında, 1950’li yıllara gelindiğinde DNA’nın 2′-deoksiribonukleotitlerin 5′-3′ fosfodiester bağlar ile biraraya gelerek oluşturduğu bir lineer polimer olduğu bilinmekteydi. Ayrıca deoksiadenin (dA), deoksitimin (dT), Deoksiguanin (dG) ve deoksisitozin (dC) olmak üzere dört nukleotit içerdiği ve polinukleotit zincirinde dA ile dT ve dG ile dC’nin eşit oranlarda olduğu saptanmıştır. Ancak DNA’nın üç boyutlu yapısı bilinmiyordu, dolayısıyla moleküler biyoloji henüz ilk evresindeydi. DNA’nın kovalent yapısının önemli özelliklerinin belirlenmesinden yaklaşık 20 yıl sonra; 1953’de James Watson ve Francis Crick, Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins’in DNA fibrillerinin x-ray kırınım verilerinden yola çıkarak DNA’nın üç boyutlu yapısını tanımlamıştır. Watson, Crick ve Wilkins bu buluşla Nobel ödülünü almıştır.

 DNA bir ikili sarmal moleküldür. Her bir polinukleotit zincir genellikle sağ el konfigürasyonuna göre, sanal bir merkezi eksen etrafında döner. Bu uzaysal konfigürasyonu, yaşamdan spiral bir merdiven örneği ile tanımlayabiliriz. Bu durumda her bir polinukleotit zincirindeki şeker-fosfat iskeleti merdivenin trabzanlarını, eşleşen bazlar ise basamaklarını oluşturacaktır. Bu ikili sarmalda yer alan ve polinukleotit zincirlerini oluşturan fosfodiester bağları, zincirlerde zıt yönlerde ilerler. Dolayısı ile DNA’daki çift zincirler antiparalel özeliktedir. (Şekil 1 ve 2). Her bir zincirdeki adenin, diğer zincirdeki timin, guanin ise sitozin ile hidrojen bağı yapar. Prensip olarak purin bazlarının primidin bazları ile bağ oluşturması genel bir kural ise de (A=T, G≡C gibi) bazların kimyasal yapılarından dolayı adenin sitozin ile timin de guanin ile hidrojen bağı oluşturamaz. DNA bazlarında bulunan hidrojen atomları; bir azot atomu ile diğeri ya da bir azot atomu ile bir oksijen atomu arasında yer değiştirebilir. Bu proton hareketi, tautomerizasyon reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Hidrojen atomları arasındaki bu pozisyonel değişim, baz çiftleri arasında hidrojen bağ dönörleri (vericileri) ve akseptörlerinin (alıcıları) oluşmasını ve nihayet eşleşmeyi sağlar. Ancak normal fizyolojik şartlarda tautomerizasyon dengesi, doğrudan amino ve keto gruplarının yönüne bağlıdır. Adenin’in purin halkasındaki azot atomları ile sitozinin primidin halkasındaki azot atomları, imino formundan çok (=NH), amino (C-NH2) formundadır. Guaninde 6. karbon atomuna bağlı oksijen atomları ve yine timinde 4. karbon atmonu bağlı oksijen atomları, genel kural olarak enol (C-OH) değil, keto (C=O) formundadır. Protonların bu stabil düzeni, bazların hidrojen bağ esterlerini oluşturur. Sonuçta, A=T arasında iki, G≡C arasında ise üç hidrojen bağı tesis edilerek DNA baz çiftleri meydana gelir. Diğer yandan, Adenin ile Sitozin ya da Guanin ile Timinin eşleşmesi durumunda; bir bağ bölgesinde iki hidrojen atomu yer alırken, diğer bir bağ bölgesinde hidrojen atomu bulunmaması nedeniyle, spesifik H bağı oluşumu engellenir. Bu ilişki DNA moleküllerinde G/C, A/T oranlarının 1’e eşit olduğunu saptayan Chargraff’ın bulgularını açıklamaktadır. DNA zincirindeki baz eşleşmesi, ileride görüleceği gibi replikasyonun esasını oluşturmaktadır(Şekil 3).

 DNA’daki şekerler ve bazların birbirine bağlanmasını sağlayan glikozidik bağlar, biribirine doğrudan zıt yönde meydana gelmez. Bu nedenle ikili sarmalın çevresinde oluşan iki yiv birbirine eşit açıda olmaz. Helisin 180° den büyük bir açı ile dönşü sonucunda büyük yiv, 180° den daha küçük bir açı ile dönüşü sonucunda ise küçük yiv meydana gelir(Şekil 1). Büyük ve küçük yivlerdeki bazlar çözücülerle muamele edilerek tanımlanabilir. Diğer bir deyişle ikili sarmal yapısı bozulmadan molekülde bulunan belirli bazlar saptanabilir. Baz kompozisyonuna bağlı olarak farklı fiziksel koşullar altında DNA farklı konformasyonlar gösterebilir. Tüm bu konformasyonlarda baz eşleşmeleri yukarıda söz edilen kurala göre olur. Konformasyonel değişimler DNA’nın enformatik yapısında rol oynamaz. Ancak yapısal değişim gen ifadesinin regülasyonunda önemlidir. Örneğin; DNA’daki konformasyonel değişim, bu moleküle proteinlerin bağlanma ilgisini farklı yönlerde etkileyebilir. Bilindiği gibi protein bağlanması, genetik regülasyonda önem taşımaktadır.

 Bugüne dek canlı sistemlerde saptanan en yaygın konformasyon B-DNA formudur. Watson ve Crick tarafından tanımlanan bu formda ikili sarmal özellikleri şöyle belirlenmiştir;

1. Her bir zincirdeki ardışık nukleotitler birbirine 34,6° lik bir açı ile dönerler. İkili sarmalın tam bir dönüşü yaklaşık 10,4 baz çiftinde tamamlanır.
2. İkili sarmalın bir tam dönüşünde oluşan uzunluk 3,40 nm’dir. Buradan, yaklaşık her bir baz çiftinin DNA uzamasına 0,33 nm katkıda bulunduğu ortaya çıkmaktadır.
3. İkili sarmalın çapı 2,37 nm’dir.

 B-DNA kristallerinden su uzaklaştırıldığında ya da bu kristallerin tuz oranı azaltıldığında; uzun ve ince B-DNA moleküleri kısalmaya ve kalınlaşmaya başlar. Bu A-DNA formu olarak tanımlanmaktadır. B-DNA formunda ardışık baz çiftleri sarmal eksenine simetrik bir şekilde dizilirken, A-DNA formundaki baz çiftleri geniş açılı yüzeyleri ile eksene dönerler. A-DNA’da büyük yiv kısalmış ve daralmış durumdadır. Ancak, küçük yivde genişleme ve uzama görülür. Herbir tam dönüşte oluşan uzunluk 3,40 nm’den 2,46 nm’ye düşer ve tam dönüşlerdeki baz sayısı yaklaşık 11 adete ulaşır. A-DNA, fizyolojik koşullarda belirlenmiş bir form değildir. Hem A-DNA ve hem de B-DNA formunda şeker grubu ve baz antikonformasyon gösterir, yani glikozidik bağın zıt bölgelerinde yer alırlar. Bu antikonformasyonda şeker ve baz arasında stearik (atomların uzaysal konfigürasyonu) atomik bağ oluşumu minimize edilmiştir. Ancak ortamda yüksek oranda katyon bulunması halinde şeker ve baz glikozidik bağın aynı bölgesi üzerinde yer alır, yani “syn” olarak adlandırılan konformasyona dönerler. Bu koşullarda oldukça farklı bir DNA yapısı ortaya çıkar. Guanin ve sitozin nukleotitlerin oldukça yoğun tekrarlandığı bölgelerde oluşan bu formda; guaninler glikozidik bağda “syn” konformasyonda iken, sitozinler “anti” konformasyonda bulunur. Tekrarlanan “syn” ve “anti” konformasyonlar da DNA zincir zigzaglarını oluşturur. Bu nedenle, söz konusu DNA yapısı Z-DNA (zigzag DNA) olarak adlandırılmaktadır. Z-DNA, B-DNA’dan daha uzamış ve incelmiş bir yapıdır. Z-DNA’da ikili sarmalın bir dönüşü 12 baz çiftinde bir meydana gelir ve tam dönüş uzunluğu 4,56 nm’dir. İkili sarmal çapı ise 1,84 nm’ye düşer. B-DNA’daki büyük yiv, Z-DNA’da konveks bir yüzeye dönüşmüş haldedir ve buradaki yapı için artık bir yivden söz etmek mümkün değildir. Küçük yiv ise Z-DNA’da keskin bir -v- şekli almıştır. Hücrelerde en yaygın DNA formu B-DNA formudur. Ancak, G-C zengin DNA bölgelerinde Z-DNA formu meydana gelmektedir. Bu bölgeler birbirinden belirgin bir şekilde ayrılır. Z-DNA bölgeleri düzenleyici proteinlerin DNA molekülü ile interaksiyonunda rol oynamaktadır.

 Nukleik asitler, proteinler ve membranlar gibi kompleks hücresel yapılar, tüm hücre tiplerinde yapısal bütünlüğü koruyacak stabilite (değişmezlik) gösterirler. Ancak kısıtlı konformasyonel esneklikleri sayesinde, değişik fizyolojik koşullara adapte olma yeteneğine de sahiptirler. Biyolojik sistemlerde kovalent bağlar, moleküllerdeki atomlar arasında güçlü ve stabil bağ oluşturma özelliklerinden dolayı, büyük önem taşır. Kovalent bağlar yanında; hidrofobik etkiler, van der Waals güçleri, hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşim de, biyomoleküllerin uzaysal yapılarının oluşumunda rol oynayan ana etmenler olarak sayılabilir. DNA’in stabilitesi üzerinde etkili başlıca dört faktörden söz edilebilir:

1. Hidrofobik özellikleri, baz çiftlerini stabilize eder. Bazların hidrofobik purin ve primidin halkaları, su moleküllerinin yüksek iç kohezyon etkisiyle ikili sarmalın merkezine doğru itilmiştir. Buna karşın bazların hidrofilik bileşenleri yivlerde çözücü ile temas halindedir.
2. Polinukleotit zincirindeki ardışık bazlar van der Waals güçlerinden etkilenir. DNA molekülünün merkezinde yer alan baz çiftleri ile ardışık baz çiftleri arasında van der Waals güçleri; B-DNA formunda purin ve primidin halkalarının aynı kalınlıkta olmasından dolayı meydana gelir. Ardışık bazlar arasında oluşan van der Waals güçleri zayıf güçlerdir, ancak bir DNA molekülünün 104’den fazla baz içerdiği düşünülür ise, bu güçlerin DNA’nın stabilitesinde önemli bir ilave güç olduğu ortaya çıkmaktadır.
3. Baz çiftleri arasında hidrojen bağları meydana gelir: G≡C baz çifti bir fazla hidrojen bağı içermesi nedeni ile, A=T baz çiftinden daha stabildir.
4. DNA iskeleti katyonlarla interaksiyon verir: DNA’nın şeker fosfat iskeleti pH 7,0’de asidiktir. Zira yüksek düzeyde negatif yük içerir. Negatif fosfodiester gruplarının elektrostatik gücü ikili sarmalın stabilitesini etkileyecek bir potansiyeldir. Ancak özellikle Mg+2 gibi hücresel katyonlar DNA’nın fosfodiester iskeletine sıkı bir şekilde bağlanarak ikili sarmalı stabilize eder.

 DNA çift sarmalı; replikasyon, transkripsiyon ve genetik rekombinasyonda lokal (bölgesel) olarak açılır. İn-vitro (hücre dışı) koşullarda meydana gelen, DNA zincirlerinin birbirinden tamamen ayrılması olayına DNA’nın denaturasyonu adı verilmektedir. Bu olay helis-halka dönüşümü olarak da tanımlanmaktadır. Denaturasyon, DNA moleküllerinin belirli bir sıcaklığa ya da ayrışma noktasına kadar ısıtılması halinde, bazlar arasındaki hidrojen bağlarının kırılması ile meydana gelmektedir. DNA’in denaturasyonu, DNA’nın ultraviyole ışık absorbansındaki değişimlerin spektrofotometrik ölçümü ile saptanabilir. DNA’nın ultraviyole ışığı absorbe etme yeteneği, 260 nm’de en yüksek düzeye ulaşır. DNA zincirleri tamamen birbirinden ayrıldığında, bazların ultraviyole ışık absorbsiyon özellikleri 260 nm dalga boyunda, doğal DNA formuna göre %37 oranında artış gösterir. Isıtılmış ya da ayrıştırılmış DNA örneklerinin ultraviyole ışık absorbanslarında, doğal DNA formlarına göre meydana gelen değişimleri şematize eden eğriler, DNA ayrışma eğrileri adını alır. Sigmoidal yapıdaki eğri, ardışık olarak dizilmiş ve karşılıklı bağlanmış baz çiftlerinin arasındaki interaksiyonları göstermektedir. Bu kooperatif interaksiyonlar iki zincirin tamamen ayrılması ile son bulur ve artık daha fazla absorbans değişimi görülmez. DNA’nın yarı denaturasyonu için gerekli optimum sıcaklık değeri, ayrışma sıcaklığı (Tm) olarak adlandırılmaktadır. Bu sıcaklıkta DNA’nın absorbansı doğal forma göre %18,5 oranında artar(Tam denatürasyondaki oranın -%37- yarısı). DNA’nın ayrışma sıcaklığını, baz kompozisyonu belirler. A=T baz çiftleri, G≡C baz çiftlerinden bir adet az hidrojen bağı içerdiğinden, G≡C baz çiftlerine oranla daha düşük bir stabiliteye sahiptir. Bu ikili sarmalın A=T bakımından zengin bölgelerinin önce ayrılacağı anlamına gelmektedir. G≡C baz çiftlerindeki artış ikili sarmalın ayrışma sıcaklığını (Tm) artırır. Zıddı durumda ise Tm değeri düşer(Şekil 4).

 DNA zincirleri birbirinden ayrıldıktan sonra renatürasyon meydana getirilebilir. Eğer ayrıştırılmış DNA örneği yavaş bir şekilde soğutulur ise, solusyonun absorbansında düşüş izlenir. Bu, DNA bazlarının eşleşmeye başladığına ya da diğer bir deyişle çift zincirinin birbirine bağlandığına işaret eder. Renatürasyon, Tm değeri altındaki herhangi bir sıcaklıkta meydana gelebilir. En hızlı olduğu sıcaklık ise, Tm değerinin ortalama 20 °C civarı altındadır. Bu işlemde solusyonun yavaş soğutulması esastır. Eğer hızlı bir şekilde soğutulur ise polinukleotit zincirlerinde yanlış eşleşmeler, katlanmalar ve kırılmalar meydana gelir, bu durumda renatürasyon oranı önemli ölçüde düşer. Denatüre edilecek zincirlerde bir kaç baz halen eşlenik durumda ise, renatürasyon oldukça hızlı bir şekilde meydana gelir. Tamamen ayrışma olan durumlarda, zincirlerin doğru bölgelerden eşlenme sorunu nedeniyle, yeniden bağlanma oranı özellikle başlangıç aşamasında yavaştır.

 Bazı ikili sarmal DNA moleküllerinin iki ucu kovalent bir şekilde bağlanır(çevrimsel yapı). Bakteriler, mitokondriler, kloroplastlar ve bazı virüslerde böyle kendi üzerine kapanmış çevrimsel DNA formları bulunmaktadır. Dinlenme durumundaki B-DNA ikili sarmalında bir baz çiftinin ardışık diğer baz çiftine açısı 34,6’dır ve zincirin tam dönüşü 10,4 bazda bir tamamlanır. Yani zincirler 10,4 baz çiftinde bir 360° dönüş yapar. Eğer ikili sarmalda 40° bir dönüş açısı olur ise, zincirler 9 bazda bir 360° dönüş yapacaktır. Aynı şekilde bu açı 33° ye inerse 360° dönüş 11 bazda bir meydana gelir. İşte bu yüksek ya da düşük açı ile bazların birbirine dönmesi DNA’da süper halkasal dönüşler ya da süper kangal dönüşler olarak adlandırılmaktadır. Bu baz dönüş açılarının değiştirilmesi için, öncelikle DNA’nın denatüre edilmesi gereklidir. Eğer çevrimsel DNA molekülleri 34.60’den küçük baz dönüş açısı içeriyor ise; negatif süper halkasal dönüşlü, yüksek açı içeriyor ise; pozitif süper halkasal dönüşlü olarak tanımlanır. Süper halkasal dönüş oluşan DNA bölgelerinde artan gerilim kuvvetlerinin etkisi ile ikili sarmal molekül kendi üzerine döner ve kovalent bağ bölgeleri meydana gelir. Bu kovalent bağ bölgeleri süper helisel (süper sarmal) dönüşler adını alır (Şekil 5). Negatif süper halkasal dönüşler içeren DNA molekülleri, in-vivo (hücre içi) koşullarda saptanmıştır. Pozitif süper halkasal dönüşler ise, genellikle in-vitro (hücre dışı) koşullarda oluşur. Bakterilerdeki çevrimsel DNA molekülleri genellikle negatif süper halkasal dönüşler içerirler ve tipik olarak 1000 baz çiftinde bir süper sarmal (helisel) dönüşlere sahiptirler. Negatif süper halkasal dönüşler içeren çift zincir çevrimsel DNA molekülü, torsiyonel (eski haline dönme eğilimli) bir yapıdır. DNA’ya bir negatif süper halkasal dönüşün ilavesi molekülün standart serbest enerjisinde 9 kilokalorilik bir artışa neden olur. Bu nedenle termodinamik açıdan, süper halkasal dönüşlerin DNA’dan eliminasyonu tercih edilir. DNA’nın lokal denatürasyonu ile süper halkasal dönüşler ortadan kaldırılabilir. RNA transkripsiyonu ve DNA replikasyonu, DNA ikili sarmalın lokal ayrışması ve süper halkasal dönüşlerin kaldırılması enzimatik bir süreçle meydana gelir. Bir DNA molekülündeki süper halkasal dönüş miktarı, sayısal olarak saptanabilir. Çevrimsel bir DNA molekülünün, düz bir zeminde sabitlenmesi durumunda, bir zincirinin diğerinin üzerine yaptığı tam dönüş sayısı, bağlantı sayısı (L) olarak ifade edilir. Bağlantı sayısı, yalnız kovalent bir şekilde kendi üzerine kapanan çevrimsel DNA (ccc DNA) moleküllerinde sabittir. Çevrimsel ikili sarmal B-DNA’ya negatif süper halkasal dönüşlerin ilave edilmesi durumunda bağlantı sayısı düşer, pozitif süper halkasal dönüşlerin ilavesi edilmesi durumunda ise bağlantı sayısı artar. Örneğin; SV 40 olarak adlandırılan bir hayvansal virüste çevrimsel DNA 5200 baz çiftinden oluşmaktadır. B-DNA ikili sarmalı 10,4 bazda bir tam dönüş yaptığından, süper halkasal dönüş içermeyen SV 40 DNA molekülünde bağlantı sayısı yaklaşık 500 olacaktır. Ancak SV 40 DNA molekülü 25 negatif süper halkasal dönüş içerir ve bundan dolayı bağlantı sayısı 475’dir.

 Herhangi bir ccc DNA molekülünde bağlantı sayısı; yalnız bir ya da iki zincirde fosfodiester bağlarının kırılması, DNA’nın yeniden bağlanması ve kovalent bağın yeniden meydana getirilmesi halinde değişebilir. Bu süreci katalizleyen enzimler DNA topolojisini düzenlediğinden, DNA-topoizomeraz olarak adlandırılmaktadır. Tüm bakteriler ve ökaryotik hücreler, DNA’da süper halkasal dönüşler oluşturan ya da süper halkasal dönüşleri ortadan kaldıran veya her iki görevi de yapan DNA topoizomeraz enzimlerini içerir. Tip I topoizomerazlar DNA’nın tek zincirini kırarak, bir adet bağlantı sayısını değiştirirler (DNA’da bir negatif ya da pozitif süper halkasal dönüşü kaldırırlar). Tip II topoizomerazlar ise DNA’nın her iki zincirini de kırarak iki adet bağlantı sayısını değiştirirler (DNA’ya iki süper halkasal dönüş ilave ederler). Her iki topoizomeraz enzimi de DNA’nın replikasyonu için zorunludur. *E. coli* DNA topoizomeraz I enziminin üzerinde yürütülen model çalışmada; enzimin negatif süper halkasal dönüş bölgesine bağlanmasından sonra DNA çift zincirinde kısmi bir çözülmenin meydana geldiği saptanmıştır. Daha sonra ikili sarmal DNA’nın bir zincirinde, topoizomeraz I enzimi DNA fosfodiester bağına, aktif bölgesindeki tirozin amino asidi aktivitesi ile spesifik bağlantı sağlayarak bu zinciri 5′ ucundan keser. Bu aşama, bir fosfodiester bağının değiştirilmesi ya da transesterifikasyon adını alır. Kırılan DNA zincirinin 3′ bölgesi enzimin aktif bölgesinde tutulur, ancak enzim ile kovalent bir bağ yapmaz. Bir süper halkasal dönüş kaldırıldıktan sonra DNA’nın bağlantı sayısı artar ya da azalır. Bu aşamada ikinci DNA zinciri enzimin temas ettiği DNA bölgesinde süreklilik arz eder. Kırılan zincirin 3′ OH grubu aktif bölgedeki tirozin amino asidi ile temas ederek bir başka transesterifikasyon sonucu diğer uçla birleştirilir(Şekil 5).

 *E. coli* DNA topoizomeraz II enzimi (DNA giraz olarak da adlandırılmaktadır), dakikada yaklaşık 100 negatif süper halkasal dönüşü DNA’ya ilave etme özelliğindedir. Bu enzim yaklaşık 400.000 Dalton moleküler ağırlıkta bir tetramerdir (iki A ve iki B alt ünitesi içerir). Her bir katalitik reaksiyon, DNA molekülüne 2 adet negatif süper halkasal dönüş ilave eder. Bu reaksiyon için gerekli enerji ATP’in hidrolizinden temin edilir. DNA topoizomeraz II enziminin öngörülen aktivite mekanizması; söz konusu enzimin DNA molekülüne bağlanmasından sonra, bu bağlanma bölgesinde pozitif süper halkasal dönüş eşdeğeri bir bükülme meydana gelmesi ve eş zamanlı olarak bağlantı bölgesi dışında bir negatif süper halkasal dönüş oluşumunun teşvikini esas almaktadır. Zira bir DNA molekülündeki bağlantı sayısının sabit kalabilmesi için; DNA’da bir bölgede pozitif süper halkasal dönüş oluşturulmuş ise, bir başka bölgede bir negatif süper halkasal dönüşün meydana getirilmesi zorunluluğu vardır. Sürecin ikinci aşamasında her bir A alt ünitesinin aktif bölgesindeki tirozin amino asidi, ikili sarmalın bir zincirini pozitif süper halkasal dönüş bölgesinden keser. Sonuçta her bir A alt ünitesi aktif bölgesinde yer alan tirozin amino asidi, DNA’nın bir zincirine 5′ bölgeden kovalent bir şekilde bağlanır. Bu süreçte meydana gelen transesterifikasyon reaksiyonu, topoizomeraz I enzimi için tanımlanan reaksiyonun tamamen aynısıdır. İki alt ünitenin beraber çalışması ile DNA’nın iki zinciri de kırılır. Daha sonra enzim, DNA molekülünün her iki zincirinin çakışan bölgesine geçer ve burada fosfodiester bağları yeniden oluşturulurken, negatif süper halkasal dönüş meydana getirilir.

 Miescher’in nukleinin keşfinden 10 yıl sonra, 1879’da Walter Flemming bir ışık mikroskobunu kullanarak ökaryotik hücrelerin nukleusu üzerinde yaptığı çalışmada, nukleusun belirli boyalarla boyanması halinde, nukleusta boyalı bant veren bölgeleri gözlemiştir. Flemming boyanmış materyale kromatin adını vermiştir. Bundan kısa bir süre sonra 1881 yılında E. Zacharias, kromatinin alkali ya da asit solusyonlarla muamele edilmesi halinde, nuklein ile aynı reaksiyonları verdiğini saptamıştır. Bu bulgu nedeniyle Zacharias kromatin ve nukleinin aynı bileşik olduğunu ileri sürmüştür. Ancak, daha sonraki araştırmalar kromatinin nuklein (DNA) ve protein kompleksleri olduğunu göstermiştir.

 Kromatin yapısı, ökaryotik moleküllerin paketlenerek düzenlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Hücre bölünmesinin çoğu aşamasında kromatin incelir ve ipliksi hal alır (30 nm fibrilleri olarak adlandırılır). İnsan hücrelerinde 30 nm (çap) bir kromatin boyu 1 milyon kez büyütülür ise; boyu 20 km, eni 3 cm olur. Aynı büyütme söz konusu olduğunda, çekirdek bölgesi 9 m çapında bir alan kapsar. Bu alan içine 20 km uzunluğunda ve 3 cm çapında bir halatın (kromatin) sığdırılması zorunludur. Bu alanda ayrıca, diğer kromozomlar da bulunacaktır. Bu nedenle bir paketleme söz konusudur. Bu paketleme, DNA replikasyonuna ve genetik bilginin ifadesine de olanak sağlamalıdır. Daha önce de belirtildiği gibi kromatin; DNA ve proteinlerin oluşturduğu kompleksdir. Kromatinin protein bileşeni histonlar olarak adlandırılan beş farklı protein içerir. Histon proteinler H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olarak tanımlanmıştır. Her bir hücrede bu beş tip proteinin her bir tipinin yaklaşık 60 milyon kopyası bulunmaktadır. Bir hücrede toplam histon protein miktarı ile DNA miktarı yaklaşık olarak eşittir.

 Tüm organizmalarda histonların özellikleri oldukça basittir. Öncelikle histonlar çok sayıda arjinin ve lisin amino asidi içerir. Bu nedenle baziktirler ve pozitif yüke sahiptirler. Histonlar, pozitif yükleri sayesinde DNA’nın negatif yüklü fosfodiester iskeletine kolayca bağlanır. Her bir histon proteinin primer yapısı tüm organizmalarda hemen hemen aynıdır. Bu primer yapı benzerliği tersiyer yapıya ve dolayısı ile de fonksiyonlarına da yansımaktadır. Örneğin; H4 histon proteininin amino asit dizisi canlılarda yüksek düzeyde korunmuştur. İnek H4 histon proteini ile bezelye H4 proteini arasında 102 amino asitten sadece ikisi farklılık göstermektedir. Buzağı timus hücrelerindeki H4 proteininde 60. pozisyondaki valin ve 77. pozisyondaki lisin, bezelye H4 proteininde sırasıyla izölösin ve arjinin ile yer değiştirmiştir. İnek ve bezelye hücrelerinin 1 milyar yıldan daha uzun bir süre önce farklılaştığı düşünülür ise, H4 proteinin yüksek düzeyde korunduğu açıkça görülmektedir. Bu, H4 proteinindeki her bir amino asidin, kromatinin yapısal organizasyonu için önemli bir fonksiyon üstlendiğine işaret etmektedir. Histonların primer yapısında evrim sürecinde önemli bir değişim meydana gelmemişse de, her bir histon proteini hücresel yaşam siklusunda değişik düzenlemelere uğrar. Örneğin, H4 histon proteini, N-terminal amino asitlerde bazı değişikliklere neden olan çok sayıda kovalent modifikasyonları katalizleyen enzimler için batarya görevi görür. H4 proteinlerinin asetilasyonu ve fosforilasyonununa yol açan bu enzimler histonları modifiye etmekte (histonların DNA ve diğer proteinlere bağlanma ilgilerini değiştirmekte) ve bu yolla DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda düzenleyici rol oynamaktadır.

 Kromatin yapısı üzerinde ilk bulgular, X-ray kırınım örneklerinden elde edilmiştir. Bu bulgulara göre; kromatinin, her 10 nm’de bir tekrarlanan bir motif içerisinde organize olduğu ileri sürülmüştür. Daha sonra; D. Hewish ve L. Burgoyne DNA’in enzimatik hidrolizi sonucu hemen hemen aynı boyda kromatin fragmentlerinin oluştuğunu saptamıştır. Bu fragmentler histon proteinler ve DNA içermekteydi. Bu kromatinin, DNA ve histon proteinler kompleksi olduğunu ispat etmiştir. Kromatin çok yoğun bir yapıdır. Kromatin preparatları, düşük iyonik güçteki (0-5 mM) solusyonlar ile muamele edilerek elektronmikroskopta incelenir ise bir tele dizilmiş boncuklar halinde görülür. R. Kornberg ve arkadaşları bu boncukların DNA ve histon kompleksleri olduğunu saptamış ve “nukleozomlar” olarak adlandırmıştır. Bir nukleozom H2A, H2B, H3 ve H4 proteinlerinin her birinin iki kopyası, bir adet H1 proteini ve 200 baz çifti uzunlukta bir DNA içermektedir. DNA protein yapısının dışında yer almaktadır. H1 histon proteininin, DNA’nın diğer histon proteinlere sarılmasında rol aldığı düşünülmektedir. Kromatinin nukleazlarla kısmi hidrolizi sonucu 200 baz çifti uzunluktaki fragmentin yaklaşık dörtte birinin ve histon H1 proteinin nukleozomdan ayrıldığı saptanmıştır. Bu nukleaz duyarlı bölge linker (bağlayıcı) DNA olarak adlandırılmıştır. Nukleaz muamelesinden sonra kromatinin kalan fragmentine ise “nukleozom çekirdek partikülü” adı verilmiştir. Bu yapı 146 baz çifti (bp) uzunlukta DNA ve 8 adet histon proteini içermektedir (2 adet H2A, 2 adet H2B, 2 adet H3, 2 adet H4). Bu proteinler histon oktamerlerini oluşturur. Nukleozom çekirdek partikülünün kristal örneklerinden sağlanan X-ray kırınım bulguları, bu yapının 8,5 nm çapında ve 6,7 nm eninde bir diske benzediğini göstermiştir. B-DNA’nın histon oktameri çevresindeki 1,8 dönüşü (sol el konfigürasyonuna göre) oktamerde 2,75 nm’lik bir yükselmeye yol açmakta ve çapı 8,8 nm’ye çıkarmaktadır. DNA’nın nukleozomlardaki bu paketlenmesi, uzunluğunu yaklaşık 6 kez azaltmaktadır(Şekil 6).

 Daha önce her bir nukleozomun yaklaşık 10 nm çapında olduğu belirtilmişti. Bundan dolayı “tele dizilmiş boncuk” yapısı, 10 nm fibrilleri olarak adlandırılmaktadır. Kromatinin elektron mikroskobik incelenmesinde 30 nm fibrileri de belirlenmiştir. 30 nm fibrilleri, 10 nm fibrillerinin üçünün bir arada paketlenmesi ile oluşmaktadır. 30 nm kromatin fibrili, H1 proteini ve bağlayıcı DNA’in kooperatif interaksiyonu ile bir arada tutulur. H1 histon molekülleri iki nukleozomun temas bölgesi ile interaksiyon verir ve 30 nm fibrillerinin stabilizasyonundan sorumludur. 30 nm fibrillerinin nukleozomları helisel bir düzende dönüşler içerir, bu dönüşler (halkalar) selenoid olarak adlandırılır. Bir DNA molekülü ilk nukleozomda ve daha sonra 30 nm fibrillerinde paketlendiği zaman boyu 50 kez kısalır. Ancak hücre bölünmesinde kromatinin kromozomlar içinde yoğunlaşması halinde bu uzunluk 7000 kez azalır. 30 nm fibrillerinin kromozom yapısında daha ileri organizasyonu üzerinde çok az şey bilinmektedir. Bazı bulgular kromatinin büyük ilmekler içinde bir protein iskelete bağlanarak organize olduğuna işaret etmektedir.

 Uzun yıllar bakteriyel DNA’nın, ökaryotik DNA’nın aksine kromatin benzeri bir düzenlemeye sahip olmadığına inanılmaktaydı. Ancak son yıllarda çok hassas izolasyon ve saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi ile *E. coli* kromozomunun da boncuk benzeri paketler içerisinde organize olduğu ve bu yapıların histon benzeri bazik proteinleri içerdiği saptanmıştır. Bu proteinlerden DNA bağlanma proteini II’nin; dimer yapıda ve her bir monomerin 9500 Dalton moleküler ağırlıkta olduğu saptanmıştır. Prokaryotik DNA ikili sarmalı bu proteine bağlanmaktadır. Bu bulgular prokaryot ve ökaryot hücrelerde kromatin organizasyonunun büyük olasılıkla aynı olduğuna işaret etmektedir.

 Her bir DNA molekülü ayrı bir kromozomda paketlenir. Bir organizmadaki farklı kromozomların tümünde bulunan toplam genetik bilgi (haploit), o organizmanın genomunu oluşturur. *E. coli* bakterisinde kromozomal DNA 4.7x106 nukleotit çifti uzunluktadır. İnsan genomu ise, yaklaşık 3x109 nukleotit çifti içerir. İnsan gibi diploid canlılarda biri anadan diğeri ise babadan gelen eş kromozomlar ikişer adettir. DNA molekülü kromozomda organize olduğuna göre, kromozomların replikasyon ve dağılım yeteneği bulunmalıdır. Replikasyonun meydana gelebilmesi için, DNA moleküllerinin “DNA replikasyon orjini” olarak adlandırılan özel nukleotidler içerdiği saptanmıştır. İkinci önemli yapı ise kromozomların hücre bölünmesinin M fazında iğ ipliklerine bağlanarak kutuplara çekilmesinde rol oynayan yapı, yani sentromerdir. Eşlenen yapının ana hücre bölünmeden önce belirlenen yavru hücre bölgelerine eşit şekilde dağılımını kontrol eder. Son olarak, her bir lineer kromozom uç bölgesinde telomer adını alan özel seriler içerir ki, bu seriler replikasyonun sonlandırılmasından sorumludur. Konu DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonu başlıkları altında detaylı bir şekilde incelenecektir.

**Ribonukleik Asit (RNA)**

 Miescher’ in nukleini keşfinden hemen sonra aynı laboratuvarda çalışan bilim adamları, DNA’ya çok benzeyen başka bir yapı keşfetmiştir. Günümüzde RNA olarak bilinen bu molekül, ilk kez mayalardan daha sonra da bakteri ve bitkilerden izole edilmiştir. Uzun yıllar RNA’ in hayvanlarda bulunmadığı düşünülmüştür. 1914 yılına kadar, hayvanlarda bulunan RNA’nın; bu canlılara, yedikleri bitkilerden geldiğine inanılmaktaydı. Bu görüş, 1914 yılında Robert Feulgen’ in DNA’yı boyayan ancak RNA ile reaksiyon vermeyen ya da RNA’yı boyayan, ancak DNA ile reaksiyon vermeyen boyaları tanımlaması sonucu yıkılmıştır. Bu boyalarla boyanan tüm hücrelerin RNA içerdiği saptanmıştır.

 RNA’ in kovalent iskeleti; 5′-3′ fosfodiester bağları ile bağlanan ribonukleotit ünitelerinin lineer bir polimeridir. Bu açıdan RNA ve DNA birbirinin aynıdır. Ancak RNA, 3 özelliği bakımından yapısal olarak DNA’ den ayrılır:

 1- RNA’da şeker grubu ribozdur ( DNA’da 2’-deoksiriboz)

 2- DNA’ da timin yerine urasil bulunur. Timinin 5’ karbon atomundaki metil grubunun bir hidrojenle yer değiştirmesi sonucu urasil oluşur. Diğer üç baz (A, G, C) ortakdır.

 3- RNA molekülleri genellikle tek zincir formundadır. Adenin ile Urasil ve Guanin ile Sitozin arasında Watson-Crick baz eşlenmeleri meydana gelebilir. Bu tip baz eşlenmeleri ikincil yapıyı oluşturur. Bu ikincil yapılar, saç tokası kıvrımları ya da ilmekler şeklinde olup protein-RNA interaksiyonlarında rol oynar (Şekil 7).

 Sadece bazı RNA molekülleri çift zincir içerir. Bu moleküller A-DNA yapısı ile büyük oranda benzerlik gösterir. RNA-RNA ikili sarmalı, her 11 bazda bir tam dönüş (3600) yapar. Bu yapı baz çiftlerini merkezi eksenden uzaklaştırır ve şekerlerin 2. karbon atomunda bulunan OH grupları sarmalın dışına doğru itilir. RNA-RNA sarmallarının B-DNA formu ile benzerlik göstermeleri, 2’ OH grubunun ardışık baz ve fosfat grupları arasındaki sterik uyuşmazlığı nedeniyle, olanaksızdır. Hücrelerde değişik zamanlarda, bir zinciri DNA diğeri ise RNA’dan oluşan ikili sarmallar meydana gelir. Örneğin; transkripsiyonda DNA’nın bir zincirinin karşısında ve RNA polimeraz enziminin katalizörlüğünde, RNA sentezi yapılır. Bu RNA molekülü, söz konusu DNA bölgesinin tamamlayıcısıdır. DNA-RNA hibritleri, dA(deoksiadenin) ile U(Urasil) ya da dT(deoksitimin) ile A(adenin) ve dC(deoksisitozin) ile G(guanin) ya da dG(deoksiguanin) ile C(sitozin) arasında oluşur. X-ray kırınım tekniği ile incelenmeleri sonucu, DNA-RNA komplekslerinin de A konformasyonunda olduğu saptanmıştır.

Hücrelerde, genetik bilginin ifade süreçlerine katılan değişik RNA molekülleri bulunmaktadır. RNA moleküllerinin sınıflandırılmasında kullanılan ana kriterler, bu moleküllerin hücresel lokasyonları ve fonksiyonlarıdır. Prokaryotlarda başlıca 3 tip RNA molekülü tanımlanmıştır:

1- Haberci RNA (mRNA): Genetik bilgiyi DNA’dan protein sentezinin yapıldığı ribozomlara taşıyan RNA molekülleridir.

2- Ribozomal RNA (rRNA): Ribozomların yapısal bileşenlerinden biridir. Hücrelerde bulunan RNA’nın yaklaşık %75’i rRNA’dan ibarettir. Hücrelerle, farklı tür rRNA molekülleri bulunmaktadır (Bakınız; ribozomların yapısı)

3- Transfer RNA (tRNA): Protein sentezi süresince peptit zincirine ilave edilen amino asitleri taşıyan RNA molekülleridir.

Ökaryotik hücrelerde, bu üç tip RNA dışında; olgun mRNA moleküllerinin öncüleri olan heterojen çekirdek RNA (hnRNA), proteinlere kompleksler halinde bağlanan küçük çekirdek RNA (snRNA), mRNA’nın sentezinde önemli rol oynayan küçük, çekirdek nukleoprotein partikülleri ve stoplazmada özel proteinlerle reaksiyon veren küçük RNA molekülleri bulunmaktadır. Ayrıca, DNA replikasyonu esnasında sentezlenen RNA primerleri de hücresel RNA populasyonunun üyeleridir.

RNA’da, DNA’daki 2’-deoksiriboz yerine, riboz şekerinin bulunuşu küçük bir farklılık olarak görülebilir. Ancak, ribozun 2. karbon atomuna bağlı OH grubu; RNA’da B konformasyonunun oluşumunu engellemekte, üçüncül (tersiyer) yapı interaksiyonlarına olanak sağlamakta ve en önemlisi kimyasal reaksiyonları yönlendirmektedir. Zira 2’-OH molekül içi bir katalisttir. DNA molekülü 2’ OH grubu içermediği için bazik solusyonlarda stabilitesini korur. RNA molekülü, Örneğin; 0.1 M alkali bir solusyonla (250 C ortam sıcaklığında) muamele edildiğinde, birkaç saat içerisinde 2’ ve 3’ nukleozit monofosfatlara parçalanır. Aynı koşullarda DNA molekülünde yapısal değişime neden olacak reaksiyonlar gerçekleşmez. RNA molekülleri, hücrede meydana gelen birçok enzimatik süreç için hayati önem taşır. Bu reaksiyonların çoğunda RNA moleküllerinin yapısal rolü vardır. Ancak, katalitik özelliğe sahip(enzimatik aktivide gösteren) RNA molekülleri de mevcuttur.