Transkripsiyon başlatıcı komplekslerinde σ alt ünitesi, 5’→ 3’ DNA zincirindeki promotor dizinin (konsensüs dizisi) tanınması ve enzimin buraya bağlanmasından sorumludur. Eğer çekirdek polimeraz σ alt ünitesi içermezse, enzim: DNA kompleksi spesifik bir şekilde meydana gelmez. Değişik σ alt üniteleri (σ faktörleri olarak da adlandırılır), değişik enzimlerin farklı promotor bölge spesifitelerini belirler. Yine *E. coli* fajları tarafından sentezlenen σ faktörleri de tanımlanmıştır. Bu σ faktörleri çekirdek polimerazda bakteriyel σ faktörleri ile değiştirilerek, faj genlerinin transkripsiyonu daha etkin hale getirilmektedir. Farklı σ faktörlerinin bağlandığı promotorlar farklıdır. Bu farklılığa rağmen, tüm haloenzimlerde bağlanma mekanizması aynıdır. σ faktörü yokluğunda çekirdek polimerazın promotorlara bağlanma ilgisi herhangi bir DNA serisine bağlanma ilgisinden yüksek değildir.

Böyle bir enzim ile DNA bağlanması meydana geldiğinde, enzimin stabilitesi çok düşüktür. σ alt ünitesi aynı zamanda stabil enzim:DNA komplekslerin oluşumundan sorumludur. Özetle σ alt ünitesi;

1. Promotor dışı serilere enzimin bağlanma ilgisini düşürür
2. Spesifik promotor serilerine bağlanma ilgisini artırır. Spesifik bağlanmanın meydana gelebilmesi için, haloenzimin kendi serisini buluncaya dek DNA’ya sürekli bağlanma ve ayrılma aktivitesi gösterdiği düşünülmektedir. Bu promotor arama reaksiyonu, enzimin DNA’ya tek boyutlu diffüzyonu şeklinde sürer ve her bir bağlanma-çözülme esnasında (3sn) 2000 baz çifti taranır. Restriksiyon endonukleazlar gibi, birçok DNA bağlanma aktivitesi gösteren enzimde bu mekanizma benzerdir.

Enzimin promotoru araması çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesine rağmen, transkipsiyonun başlatılması oldukça yavaş bir süreçtir. Çünkü transkripsiyonun

\*(- entalpi değişimi (ΔH ) sistemin ısıl değişimi (ekzotermik ve endotermik) - entropi (S): rastgele organize olan bir sistemin düzenli hale getirilmesi için gerekli enerji. Entropideki artış bir sistemin başlangıç aşamasından daha düzensiz veya rastgele organize olduğuna işaret eder).

başlayabilmesi için DNA ikili sarmalının açılması ve bir primerin sentezlenmesi gerekmektedir. Her iki aktivite de RNA polimeraz enzimi tarafından katalize edilmektedir. Transkripsiyonun başlama bölgesinde DNA’nın denatürasyonu, bir izomerizasyon reaksiyonu ile meydana getirilir. RNA polimeraz ( R ) ve promotor (P) ikili sarmalın korunduğu kapalı bir kompleks halinde iken, promotor bölgede 18 baz çiftinin açılması ile açık bir kompleks haline dönüşür (şekil 18). Bu açılma bölgesi, transkripsiyon balonu adını almaktadır. Transkripsiyon balonu -10 bölgesinden oluşmaya başlar. σ70 faktörü konsensüs serisinde, -10 bölgesi adenin ve timin bazlarınca zengindir ve bu nedenle kolay denatüre olur. Ancak σ faktörlerinin tanıdığı bazı promotorlarda, -10 bölgesinde guanin ve sitozin bazları da bulunabilmektedir. Açılma kompleksinin oluşabilmesi için adenin ve timin bazları zorunlu değildir. Açık kompleks oluşum hızını limitleyen faktör, reaksiyonun enerjiye ihtiyaç duymasıdır. İn-vivo koşullarda promotor bölgelerde negatif süper halkasal dönüşler bulunduğu için, açık kompleks in-vitro koşullardakinden daha hızlı oluşur. Bu koşullarda, açılma bölgesindeki negatif süper dönüşlerin kaldırılması nedeniyle, DNA’nın denatürasyonu termodinamik açıdan uygun duruma gelmektedir.

Açık kompleks oluştuktan sonra, şablon DNA zinciri enzimin polimerizasyon bölgesine yerleştirilir. Takip eden aşamada enzimin aktif bölgesine diffüze olan iki nukleozit trifosfat ile şablon zincirin +1 ve +2 nukleotidleri arasında hidrojen bağları oluşturulur. Bu reaksiyon, zincir uzamasında RNA zincirine bir nukleozit trifosfatın ilave edildiği analog reaksiyondan daha yavaştır. RNA primeri 10 nukleotide ulaştığında, transkripsiyonun başlama aşaması tamamlanmış olur. Ancak RNA primeri, DNA şablon zincirine çok zayıf bir şekilde bağlandığından, şablondan ayrılma eğilimi gösterir. Bu olay tamamlanmamış (abortif) başlama adını alır. Primer yaklaşık 10 nukleotide ulaştığında RNA polimeraz haloenzimi başlatıcı durumdan, zincir uzama moduna geçer ve promotordan uzaklaşır. Bu aşama da promotorun boşaltılması olarak tanımlanmaktadır.

KB(bağlanma sabiti) Kf(izomerizasyon oranı)

R + P RPc  RPo

(RNA polimeraz) (promotor) (kapalı kompleks) (Açık kompleks)

Promotorun gücünü, KB , Kf ve promotorun boşaltılması kombinasyonu determine eder. Proteinlerin yapısal genlerinde bu güç, promotor sekansı ile doğrudan ilgilidir. Genellikle -10 bölgesi yalnız izomerizasyon üzerinde etkili iken -35 bölgesi bağlanma ve

izomerizasyon reaksiyonlarının her ikisine de etki edebilmektedir. Eğer konsensüs serileri ile tamamen aynı seriler içeren bir promotor ise, maksimum bağlanma sabiti ve izomerizasyon oranı içerir. Promotor boşaltılmasından büyük oranda +1 bölgesi sekansları sorumludur. Haloenzim, diğer DNA sekanslarından çok daha yüksek bir ilgi ile promotor serilere bağlandığı için, başlama bölgesinden ileriye harekete direnir. Ancak zincir uzaması yüksek katalitik aktiviteye sahiptir. Bu nedenle, enzim bu aşamada tüm DNA serilerine zayıf bir şekilde bağlanır. Enzimin zincir uzaması aktivitesine geçişi, σ faktörünün ayrılması ile meydana gelen konformasyonel değişim sonucu olur. σ faktörünün ayrılması, enzimin promotora spesifik bağlanma ilgisini yok eder ve başlama bölgesinden ayrılması mümkün olur. σ faktörünün ayrılması, primerin (yaklaşık 10 nukleotit) sentezlenmesi bittikten sonra meydana gelir. Bu aşamada birkaç farklı yardımcı protein çekirdek polimeraza bağlanarak, transkripsiyonun protein sistemini oluşturur. Yardımcı proteinlerden biri nusA proteinidir (MA=65000 Dalton). NusA, RNA polimeraza bağlanarak zincir uzaması süresince σ faktörünün yeniden enzime bağlanmasını engeller. NusA, ayrıca, diğer yardımcı proteinlerle interaksiyon vererek, transkripsiyonun sonlandırılmasında da rol oynamaktadır(Şekil 19).

Bir bakteri hücresinde ortalama 5000 RNA polimeraz enzimi bulunmaktadır. Promotor bölge boşaltıldığında, boşalan bölgeye bir başka haloenzim bağlanır. Bazı genlerde promotorun boşaltılması yavaş olduğu için RNA polimeraz molekülleri promotor serilerde lokalize olmuş durumdadır. Ancak büyük çoğunlukla, uzama durumundaki transkripsiyon komplekslerinde farklı pozisyonlarda yer alırlar. Dinlenme halindeki RNA polimeraz molekülleri sitosolde değil, spesifik olmayan bir biçimde DNA’ya bağlı halde bulunurlar. Bu enzimler, dinlenme durumunda ne transkripsiyonu başlatma ne de zincir uzaması aktivitesi gösterirler*. E. Coli’*de replikasyon bir bölgeden başlar ve terminasyon noktasına ulaşıncaya dek iki yönlü ilerler. DNA replikasyonunda rol alan protein makinesi büyük bir yapıdır ve saniyede 500-1000 nukleotit sentezi yapar. Transkripsiyon kompleksi de yüksek katalitik aktiviteye sahip ve büyüktür, Ancak, replikasyon çatalından 10 kez daha yavaş ilerler. Replikasyon çatalları transkripsiyon kompleksleri ile karşılaşırsa ne olur? Eğer replikasyon çatalı, replikasyon yönünde (5′→3′) ilerliyorsa transkripsiyon komplekslerine yetişecektir. Bazı türlerde DNA replikasyon sistemi, içerdiği “cow catcher” (yakalayıcı) proteini sayesinde replikasyon çatalı önündeki proteinleri DNA’dan ayırır. Ancak, *E. coli*’ de transkripsiyon bitene dek bu yöndeki replikasyon çatalının ilerlemesi yavaşlatılmaktadır. İkinci yöndeki replikasyonda (3′→5′), replikasyon ve transkripsiyon komplekslerinin karşı karşıya gelmesi söz konusudur. Bazı genlerin bir defada yaklaşık 70 aktif transkripsiyon kompleksi içerdiği göz önünde bulundurulur ise, bu karşılaşmaların 3′ →5′ yönündeki DNA replikasyonunu çok yavaşlatacağı ve hücrenin işlevini yitirmesine yol açacağı aşikardır. Ancak Bonita Brewer, *E. coli’*de aktif transkribe edilen tüm genlerin transkripsiyonunun daima replikasyon ile aynı yönde ilerlediğini göstermiştir. Yani genomda yer alan aktif genler, replikasyon ve transkripsiyonun karşılıklı gelmesini önleyecek şekilde oryente olmuşlardır.

RNA polimeraz, zincir uzaması aşamasında DNA’da yaklaşık 30 baz çifti uzunlukta bir bölge ile temas eder. Burada 18 nukleotit uzunluğunda bir bölge açılır ve enzim ile şablon DNA zincirinin temas etmesine olanak sağlanır. Şablonun 12 nukleotidi, yeni sentezlenen RNA ile eşlenerek RNA:DNA hibrit sarmalını oluşturur (Şekil 20). Bu uzunluk sarmalın A konformasyonu ile ilişkilidir (A konformasyonunda bir tam dönüşte 12 baz vardır). Oniki nukleotit uzunluktaki DNA:RNA hibridi, zincir uzaması aşamasını engellenmeksizin, yeni sentezlenen RNA zinciri ile şablon DNA zinciri arasındaki interaksiyon miktarının maksimizasyonunu sağlar. Eğer RNA:DNA hibridi sarmalın bir dönüşünden sonra ilerleyecekse; yeni sentezlenen RNA zinciri, transkripsiyon balonundan geçerek ilerideki şablon DNA bazları ile hibrit oluşturmalıdır. Transkripsiyonun uzama aşaması olarak tanımlanan bu evrede şu aşamalar karakteristiktir:

1. Transkripsiyon balonunun ilerleme yönünün aksinde bir baz çifti açılarak RNA:DNA hibridinin boyu kısaltılması işlemi başlatılır.
2. Bir baz çifti de transkripsiyon balonunun ilerleme yönündeki DNA ikili sarmalında açılır (Transkripsiyon balonu eski uzunluğuna kavuşur).
3. Transkripsiyon balonunun ilerleme yönünün aksinde DNA ikili sarmalında bir baz eşleşmesi meydana getirilir.
4. RNA polimeraz DNA zincirinde 1 nukleotit ilerler (aktif bölge spesifitesi ile) ve şablon moleküldeki baz karşısına, yeni bazı (RNA zincirine) ilave eder.

Bu topolojik reaksiyonlar, *E. coli*’de RNA polimeraz alt üniteleri tarafından katalizlenir.Transkripsiyon balonunda bir baz çiftinin açılması başka bir yönde bir baz çiftinin eşleşmesi ile beraber yürür. Bu şekilde termodinamik denge korunmuş olur.

Zincir uzama reaksiyonu, daha önce belirtilen 4 aşamayı tanımlayan P.H. von Hippel tarafından analiz edilmiştir. Bu aşamalar için gerekli enerji; nukleotidil transferi esnasında fosfoanhidrit bağlarının hidrolizinden sağlanmaktadır. DNA’da çift zincir oluşumu enerjetik açıdan uygun bir durum olduğu için, her bir baz çiftinin renatürasyonunda (-)1- (-)3 kcal mol-1 enerji salınır. Bu enerjinin çoğu RNA polimeraz enzimi tarafından tutularak, denatürasyon-renatürasyon dengesi sağlanır. Bu reaksiyonda termodinamik açıdan en uygun durum; transkripsiyon balonunda, iki adet guanin-sitozin baz çiftinin oluşumu ile, bir adenin-timin ve bir adenin-urasil baz çiftinin açılmasıdır.Termodinamik açıdan en uygun olmayan durum; iki guanin-sitozin baz çiftinin açılması ve bir adenin-timin ile bir adenin-urasil baz çiftinin oluşumudur (ΔG0 = +5 kcal mol-1). Bu durum, nukleotit diziliminin transkripsiyon oranı üzerindeki etkinliğini açıklamaktadır.

Transkripsiyonda bir diğer topolojik sorun; transkripsiyon kompleksinin genlerindeki hareketidir. Burada iki durum söz konusudur; ya DNA üzerindeki enzim helisel dönüş yapar, ya da DNA dönerek transkripsiyon kompleksi içerisinden geçer. RNA polimeraz enziminin önünde yer alan pozitif süper halkasal DNA dönüşleri ve arkasında yer alan negatif süper halkasal DNA dönüşleri nedeniyle, muhtemelen, her iki durum da meydana gelmektedir. Bakteriler ve ökaryotlarda DNA’da, RNA ve protein kombinasyonu sonucu büyük ikili sarmal açılma bölgeleri oluşur. Söz konusu ikili sarmal açılma bölgelerinde, süper halkasal dönüşlerin yardımı olmaksızın, zincir uzama kompleksinin ilerlemesi oldukça güçtür. DNA replikasyonunda olduğu gibi, transkripsiyonda da süper halkasal dönüşlerin oluşturulması ve kaldırılması topoizomerazların aktivitesidir. Sonuç olarak topoizomerazlar transkripsiyon oranını etkileyen bir diğer ajandır.

Replikasyon sonlandırılması da, başlaması gibi, transkripsiyon kompleksinin aktif bir reaksiyonudur. Sonlandırma sinyalleri, DNA sekansındaki bölgelerden verilir. Bu bölgeler RNA’ya transkribe edilir. Sonlandırma serilerini, özel proteinin bağlanmalarının gerçekleştiği ve bu proteinler aracılığı ile zincir uzama komplekslerinin DNA’dan ayrıldığı bölgeler olarak tanımayabiliriz. Ancak bu mekanizma prokaryotlarda bulunmamaktadır. Bunun yerine zincir uzama kompleksi spesifik DNA sekanslarında stabilitesini yitirerek, transkripsiyonun sonlandırılması başlatılır. Bu durumda sonlandırma için yeni sentezlenen RNA, bir sonlandırma faktörü ile interaksiyona girer.

Daha önce de söz edildiği gibi, zincir uzaması sürecince transkripsiyon oranı DNA baz dizisine bağlıdır. Transkripsiyon kompleksi; guanin ve sitozin bazları bakımından zengin serilerde, transkripsiyon balonunun açılması ve DNA:RNA denatürasyonu daha zor meydana geldiği için, yavaşlar. Bu yavaşlama normalden 10-100 kez daha düşük transkripsiyon oranı ile tanımlanır. Gen üzerindeki bu transkripsiyon yavaşlama bölgeleri, duraksama bölgeleri adını alır. Bu bölgeler palindromdur (iki yönlü simetri gösterir). Bir palindrom seri transkribe edildiğinde, yeni sentezlenen RNA kendi üzerine kapanarak, saç tokası kıvrımı oluşur (Şekil 21). Saç tokası kıvrımı RNA’yı transkripsiyon balonu içerisinde dik duruma getirir. Böylece, RNA zincirinin bir kısmının ayrılması ile, uzama kompleksindeki DNA:RNA hibridi destabilize olur. Transkripsiyon balonundaki bu kısmi ayrılma, hibrit yeniden oluşuncaya kadar, transkripsiyon kompleksinin zincir sentezi yapmasını durdurur. RNA:DNA hibridi düzensiz termal dalgalanma sonucu yeniden oluşturulur. Zira düzensiz termal dalgalanma saç tokası yapısını oluşturan baz çiftlerini açar ve RNA:DNA bazları ile yeniden eşlenir. Bazı durumlarda, saç tokası kıvrımı yapısı transkripsiyon kompleksindeki nusA proteinine bağlanır. NusA saç tokası kıvrımı yapısını daha stabil hale getirerek palindrom serilerde duraksamayı artırır (Şekil 21a). Saç tokası kıvrımının yapısına da bağlı olarak, transkripsiyon kompleksi bu bölgelerde 10 saniyeden 30 dakikaya kadar durdurulabilir. Duraksama bölgeleri, hem transkripsiyonun oranı ve hem de sonlandırılması üzerinde etkili oldukları için, fizyolojik açıdan büyük önem taşımaktadır.

*E.* *coli’*de transkripsiyon iki tip reaksiyonun biri ile sonlandırılır. Bunlar, basit sonlandırma ve rho-bağımlı sonlandırmadır. *E. coli* genlerinin sonunda yer alan baz dizileri, transkripsiyonun sonlandırılmasından sorumludur. Bu transkripsiyon sonlandırma dizilerinin çoğu guanin ve sitozin bakımından zengin olup, iki yönlü simetri gösterirler (palindromik). Bu dizilerin uç kısımlarında, şablon DNA zinciri için adenin ve şablon olmayan DNA zinciri için de timin yoğun bölgeler yer alır. Dolayısı ile, palindromik bölge transkribe edildiğinde saç tokası kıvrımı oluşur ve DNA:RNA hibridi destabilize olur. DNA:RNA hibridi saç tokası oluşumunda sadece A:U (adenin şablon DNA zincirinde: urasil RNA’da) baz çiftlerinde korunur. Bu eşleşme zayıf olduğu için bazların ayrılması ve RNA’nın salınımı kolaylaşır. mRNA salınımından sonra, açılan DNA bölgesi renatüre edilir ve RNA polimeraz genden ayrılır (Şekil 21b). Yukarıda izah edilen basit sonlandırma, bazı proteinlerin katılımı ile etkin hale getirilebilir. Örneğin; nusA proteini, RNA saç tokası yapısı ile interaksiyon vererek terminasyon etkinliğini artırır. Bazı sonlandırma serilerinde ise, τ (tau) faktörü bağlanması sonucu transkripsiyonun sonlanma etkinliğinin büyük ölçüde artırıldığı saptanmıştır. τ faktörün sonlandırma etkinliğini nasıl artırtığı bilinmemektedir. Bu tipteki transkripsiyonun sonlandırılması genel bir sistem değildir. Bazı genler, ne 3’ uçlara yakın bölgelerinde guanin ve sitozin bakımından zengin palindromik seriler ve ne de 3’ uç bölgelerinde timin uzamaları içerir. Bu durumda transkripsiyonun sonlandırılması için rho olarak adlandırılan özel bir düzenleyici proteinine ihtiyaç duyulur. Bu tip sonlandırıcılar (terminatörler) rho bağımlı terminatörler adını alır. Eğer rho ortamda olmazsa, transkripsiyon durmaz ve RNA polimeraz DNA şablon zincirinden kopya çıkarmaya devam eder. Rho proteini, 6 aynı alt üniteden oluşmuş bir hekzamer halinde sitosolde bulunur. Rho proteini hem tek zincir RNA ilgisi içeren güçlü bir ATPaz ve hem de RNA:DNA hibritlerini açan helikaz olarak etki gösterebilmektedir. Rho tek zincir RNA’ya bağlanarak, arkasında durdurulmuş bir transkripsiyon kompleksi bırakır. Söz konusu protein, transkripsiyonun sonlanma aşamasında, kendi çevresine yaklaşık 80 nukleotid uzunluğunda bir RNA bölgesini sarar. Bu süreçte ATP, AMP+PP’a hidrolize edilir ve RNA transkripsiyon balonundan ayrılır. Rho bağımlı mekanizma halen tam anlamı ile açıklığa kavuşmamıştır. Terminasyon hem RNA:DNA hibridinin destabilizasyonu ve hem de Rho faktörünün transkripsiyon kompleksi ile direkt teması (kendi çevresine RNA zincirini sarması) olayları sonucu meydana gelir. Rho, ayrıca, nusA ve diğer yardımcı proteinlere de bağlanabilmektedir. Bu bağlanma transkripsiyon kompleksinde konformasyonel değişime ve enzim organizasyonunun bozulmasına yol açmaktadır (Şekil 22).

Bakteri hücrelerinde transkripsiyon, translasyon ile kesintisiz bir ilişki içindedir. Protein sentezi, mRNA sentezi henüz devam ederken, ribozomun bağlanması ile başlatılır. Ribozom bağlanması tek zincir mRNA’yı büyük ölçüde işgal edeceği için, bu durum rho bağlanmasını engeller. Ancak, transkripsiyon kompleksi protein sentezinin sonlandırıldığı bölgeden geçtiğinde tek-zincir RNA yeniden ortaya çıkar ve rho bağlanmasına olanak sağlar. Transkripsiyon duraksama bölgesi genin sonunda yer alır ve bu bölgede transkripsiyon yavaşlar. Son aşamada rho RNA transkriptine bağlanır transkripsiyon kompleksini yakalar ve transkripsiyon sonlanır. Eğer protein sentezi, amino asitlerin ya da transkripsiyon sistemindeki diğer elemanların eksikliği sonucu yavaşlar ise, rho faktörünün ribozomsuz RNA aktivitesinden dolayı gendeki duraksama bölgelerine bağlanması mümkün olur ve rho proteini, bu serileri sonlandırma serilerine dönüştürür. Bu koşullarda, mRNA ribozomlar tarafından daha fazla korunamaz ve rho bağlanarak transkripsiyonu durdurur. Bu mekanizma ile translasyonu yapılmayacak olan mRNA’nın üretimi engellenmiş olur.

*E.coli*’de tek RNA polimeraz enzimi ile yürütülen transkripsiyon süreci, ökaryotlarda benzer birkaç enzim ile gerçekleştirilir. Ökaryotlarda, çekirdekteki genlerin transkripsiyonu 3 farklı çekirdek RNA polimeraz enzimi ile yapılır. Diğer polimerazlar ise, mitokondri ve kloropolastlarda yer alır. Çekirdek RNA polimeraz enzimleri değişik sınıf genlerin transkripsiyonuna katılır. RNA polimeraz I: büyük ribozomal RNA moleküllerini kodlayan I. sınıf genlerin, RNA polimeraz II, proteinleri ve bazı küçük RNA moleküllerini (az miktarda) kodlayan II. sınıf genlerin, RNA polimeraz III ise: tRNA, 5S rRNA gibi küçük rRNA moleküllerinin dahil olduğu III. sınıf genlerin, transkripsiyonuna katılır. Bu üç polimeraz, bazı ortak küçük polipeptitler içermelerine rağmen, alt ünite kompozisyonu bakımından birbirinden ayrılır. Bu küçük alt ünitelerin varlığı ökaryotik RNA polimeraz enzimlerini, prokaryotik RNA polimerazlardan daha karmaşık hale sokar. Alt ünitelerin miktarı, organizmalar arasında farkllıklara sahiptir. Ökaryotik RNA polimeraz enzimlerinde küçük alt üniteler 7-12 adet arasında değişim gösterebilmekte, ancak iki büyük alt ünite tümünde yer almaktadır. Bu büyük alt üniteler( β ve β’ ) *E. coli* RNA polimerazındakiler ile aynıdır. Yine *E. Coli* β’ alt ünitesi ile, *Saccharomyces cerevisia* ve *Drosophila melanogaster* RNA polimerazlarının en büyük alt üniteleri arasında da kayda değer bir homoloji vardır. Ökaryotik hücrelerde RNA polimeraz enzimlerinin her bir tipi, hücrenin farklı bölgelerindeki farklı genleri transkribe eder. Bu enzimler, transkripsiyon aktivitesi için değişik yardımcı transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyar. Hücresel transkripsiyonun bu üç enzim arasında bölüşülmesi, etkin bir iş bölüşümünü yansıtmaktadır. Üç çekirdek RNA polimerazı arasında rastlanan yüksek orandaki benzerlik, evrimsel süreçte tek bir polimeraz enziminden türediklerine işaret etmektedir. Mitokondriyel RNA polimeraz, nuklear genom tarafından kodlanan tek alt üniteli bir enzimdir. Mayalardaki mitokondriyel RNA polimeraz, T3 ve T7 bakteriyofajları RNA polimeraz enzimleri ile büyük oranda sekans(dizi) homolojisi(benzerlik) göstermiştir. Bu homoloji enzimlerin ortak atasal molekülden türediğine işaret etmektedir. Mitokondrilerin aksine, kloroplastlardaki RNA polimeraz enzimi, kloroplast DNA tarafından kodlanmaktadır ve gerçek bakterilerdeki DNA polimeraz enzimi ile aynı sekanslara sahiptir. Bu bulgu da, ökaryotik hücrelerdeki klorpolastların, bakteriyel parazitlerden türediği teorisini desteklemektedir.

Ökaryotların özelleşmiş ve karmaşık RNA polimeraz enzimlerine sahip olmaları, bu organizmaların transkripsiyon süreçleri açısından, prokaryotlara göre önemli farklılıklar içerebileceğine işaret etse de, çok benzer bir mekanizmaya sahiptirler. Hem prokoryotlarda ve hem de ökaryotlarda transkripsiyon; başlama ve zincir uzaması ana aşamalarını içermekte ve bu aşamalarda birbirinin benzeri reaksiyonlar meydana gelmektedir. Ökaryotik transkripsiyon; her bir RNA molekülünün sentez bölgesi, transkripsiyon sonrası modifikasyon ya da işleme ve transkripsiyon sisteminin karmaşıklığı açısından, prokaryotik transkripsiyon sisteminden ayrılmaktadır. Bu farklılıklar ökaryotik genomun büyüklüğü ve düzenli kromatin yapısında organize oluşu ile ilişkilidir. Daha önce de belirtildiği gibi ökaryotik DNA, nukleozom ve diğer kromozomal proteinlerle birleşir. Replikasyon ve transkripsiyonda nukleozomlara ne olur? RNA Polimerazlar, hücresel koşullarda bu proteinleri aşarak DNA’ya nasıl bağlanır?

Metafaz kromozomunda görülen sıkı paketlenmiş kromatin yapısı replikasyon ve transkripsiyon etkinliği için uygun değildir. Mayozun ve mitozun ileri aşamalarında (metafaz kromozomları görüldüğünde) ökaryotik hücrede transkripsiyon yapılmaz. Transkripsiyon yalnız kromatinin bir tele dizilmiş boncuk konformasyonu gösterdiği zaman yapılır. 30 nm yapıları gibi, diğer tüm yoğun paketlenmiş konformasyonlarda, DNA-bağlanma proteinlerinin ve transkripsiyon komplekslerinin DNA ile interaksiyonu engellenir. Bu söylenenlerin delili, *D. Melanogoster’*in tükrük salgı kanallarındaki hücrelerde saptanmıştır. Bu hücrelerde kromozomlar, uzamış ve aynı bölgede tekrarlanan replikasyon sonucu çok sayıda kromozom kopyasının bir arada kaldığı, büyük yapılar halindedir. Politen kromozomlar olarak adlandırılan bu yapılar incelendiğinde, kromozomların belirli bölgelerinin şişmiş olduğu görülür. Bu şişkinlikler transkripsiyon aktivitesi ile ilgilidir. Şişkinliklerdeki DNA; paketlenmemiş, uzamış ve daha az yoğun yapısını, transkripsiyonun sonuna dek korur. Aktif transkribe edilen birçok gen, nukleaz aktivitesine duyarlıdır. Nukleaz kesim örnekleri, II. sınıf genlerin nukleozom yapıları içinde transkribe olabileceğine işaret etmiştir. Ancak, I. sınıf genlerin nukleozomlar halinde transkripsiyonu yapılmamaktadır. Bu durum, büyük olasılıkla, söz konusu genlerin yüksek transkripsiyon aktivitesinden kaynaklanmaktadır.

Her ne kadar ökaryotik ve prokoryotik transkripsiyon temel reaksiyonlarda benzerlik gösterse de, ökaryotik genomun daha kompleks bir yapı içermesinden kaynaklanan ilave reaksiyonlar bu sürece dahil olur. Hiç bir ökaryotik RNA polimeraz DNA’ya doğrudan ve özel bölgeden bağlanmaz. Bunun yerine söz konusu aktiviteyi gösterecek sekans spesifik yardımcı proteinler olan, transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyar. Prokaryotların aksine, ökaryotik transkripsiyon faktörleri RNA polimeraz alt üniteleri halinde değildir. Transkripsiyon faktörleri, transkripsiyon kompleksine RNA polimerazdan bağımsız bir şekilde bağlanır. Genel transkripsiyon faktörleri tüm genler için zorunlu iken, diğer transkripsiyon faktörleri sadece belirli genlerin transkripsiyonunda rol oynar.

RNA polimeraz III, hücresel transkripsiyonun %10’ unu yürütür. Bu enzimin transkribe ettiği genler protein kodu içermez. 5S rRNA, U6 snRNA (Splicosome yapısında bulunur) tRNA ve 7S RNA (sinyal tanıma partiküllerinin bileşeni) gibi küçük RNA moleküllerini kodlar. RNA polimeraz III, ökaryotik RNA polimerazlar içinde transkripsiyonu üzerinde en fazla çalışmış olan enzimdir. Çünkü III. sınıf genler, I. ve II. sınıf genlerden daha basit bir şekilde transkribe edilmektedir. III. sınıf genlerin transkripsiyonunda TFIIIA, TFIIIB ve TFIIIC olmak üzere, 3 transkripsiyon faktörü rol oynamaktadır. 5S rRNA ve tRNA genlerinde promotor sekansların, genin transkribe edilen bölgesinde bulunması ilginçtir. Eğer bu seriler DNA yapısından çıkarılır ise, transkripsiyon etkinliği kaybolmaktadır. Diğer yandan, 5S rRNA geninde yalnız +50 +83 arasındaki sekansların çıkartılması halinde ise, transkripsiyonun başlaması gerçekleşmemektedir. Transkripsiyonun başlamasından sorumlu olan bu bölge, transkripsiyonun doğru yerden başlamasını (+1 bölgesi) kontrol etmez. Ökaryotlarda bu aktiviteyi gösteren promotor yapılar ayrıdır ve iç kontrol bölgeleri (ICRs) olarak adlandırılmaktadır. İç kontrol bölgeleri, akraba ökaryotik türlerde oldukça benzerdir. Değişik türlere ait tRNA ve 5S rRNA genlerinde yürütülen karşılaştırmalı analizler sonucu, iç kontrol bölgelerinin konsensüs serileri belirlenmiştir. Bu seriler iç kontrol bölgeleri blokları olarak tanımlanmaktadır. 5S rRNA geni ayrıca, transkripsiyon kompleksinin oluşumunda rol oynayan, korunmuş seriye sahip bir merkezi element içerir. Bu sekansların özellikleri aşağıda verilmiştir;

+8 +52

A C

tRNA T GC--AG -GG---------------GGTTCGA-TCC

G T

A bloku B bloku

+51 +70 +79

GTT C A

5S rRNA AA-C---------GC--------T--------G TGGG

CCC G

A bloku merkezi C bloku

element

Transkripsiyonun tRNA geninden başlamasından önce, TFIIIB ve TFIIIC iç kontrol bölgeleri ile stabil bir transkripsiyon kompleksi meydana getirir. Büyük multimerik protein olan TFIIIC, öncelikle B blokuna çok sıkı bir şekilde bağlanır ve daha sonra A blokundaki nukleotitlerle temas eder. TFIIIC stabil hale geldikten sonra; TFIIIB, TFIIIC: tRNA geni kompleksine bağlanır. TFIIIB DNA’ya bağlanmaz. Bu protein kompleksi, RNA polimeraz III’ ün tRNA geni üzerinde +1 bölgesinden transkripsiyonu başlatmasına olanak sağlar. Başlatıcı kompleks, bağlanma bölgesinden ayrılmadan yeni RNA polimerazların bağlanmasına ve ardışık transkripsiyonları başlatmasına olanak sağlar. Dolayısı ile genin her transkripsiyonunda başlatıcı kompleksin yeniden gene bağlanması söz konusu değildir (Şekil 23a). 5S rRNA genlerinin transkripsiyonu da stabil bir transkripsiyon kompleksinin oluşumu ile başlar. Bu stabil kompleks TFIIIA ,TFIIIB ve TFIIIC proteinlerini içerir. TFIIIA, DNA’ya bağlanan ilk proteindir. Bu protein öncelikle, gen üzerinde bulunan C blokundaki spesifik nukleotitlere sıkı bir şekilde bağlanır. Daha sonra, iç kontrol bölgesinin merkezi elementi ve A blokundaki nukleotitler ile temas ederek oryantasyonunu tamamlar. TFIIIA bağlandıktan sonra; TFIIIC, hem TFIIIA ve hem de DNA ile temas ederek komplekse katılır. Son aşamada, TFIIIA: TFIIIC: 5S rRNA geni kompleksine; TFIII B, protein-protein interaksiyonuyla bağlanır ve RNA polimeraz III enzimi komplekse dahil olarak +1 bölgesinden transkripsiyonu başlatır (Şekil 23b). U6 ve 7S RNA genleri daha karmaşık promotorlar içerirler. Bu genler, transkripsiyonu yapılan gen bölgesinin arkasında yer alan ve iyi tanımlanmamış promotor sekanslar içermektedir. Ancak, U6 ve 7S RNA genleri de; tRNA ve rRNA ve 5S rRNA genleri ile aynı transkripsiyon faktörlerini kullanmaktadır. RNA polimerazın da son evrede katılımı sonucu, 1000 kilo Dalton’dan (kDa) büyük transkripsiyon kompleksinin oluşumu tamamlanır. RNA polimeraz ileriye doğru hareket ettikçe, geride kalan denatüre DNA bölgesi kapanır ve ikili sarmal yapı oluşur.

RNA polimeraz II, proteinlere dönüştürülen amino asit koduna sahip tüm genleri transkribe eder. Bunun yanında, RNA işlenmesi sürecine katılan küçük RNA moleküllerinin transkripsiyonundan da bu enzim sorumludur. Bu enzimin sentezlendiği protein kodlu RNA, ilk aşamada heterojen çekirdek RNA (hn RNA) adını alır. hnRNA, daha sonra işlenerek olgun mRNA moleküllerine dönüştürülür. Her bir ökaryotik hücrede yaklaşık 40000 RNA polimeraz II enzimi bulunmaktadır. Çekirdekte yapılan RNA sentezinin %20-40’ı bu enzimin aktivitesi sonucu oluşturulmaktadır. Değişik türlerde (mayalar, meyve sineği, insan ve buğday) II. sınıf genlerin transkripsiyonu, sekans analizleri ve ayak izi tekniği kullanılarak elde olunan veriler ışığında aydınlatılmaya çalışılmıştır. İkinci sınıf genlerin çoğunun; transkripsiyon başlama bölgesinin arkasında yer alan - 9 ile -27 bazları arasında, prokoryotik promotor bölgelerin karakteristiği olan TATA kutusu benzeri seri yer alır. Bu seri de, TATA kutusu ya da bulucusunun adıyla Hogness kutusu adını almaktadır. DNA ikili sarmalı bu bölgeden açılmaya başlar. Bölgenin (serinin) konsensüs dizisi TATANA’ dır (N değişken herhangi bir DNA bazını tanımlamaktadır). Memelilerde TATA kutusuna, TFIID olarak adlandırılan transkripsiyon faktörü bağlanmaktadır. Diğer ortak promotor elementi transkripsiyonun başlama bölgesinin arkasında yer alan (- 80 ile -60 bazları arasında) CAAT kutusudur. Bu kutunun konsensüs serisi GGNCAATCT’dir. Söz konusu seri palindrom olmamasına rağmen, iki yönlü oryantasyon gösterir. Bu bölgeye transkripsiyon faktörü (CTF) bağlanmaktadır. İkinci sınıf genlerin, transkripsiyon faktörleri için başka bağlanma bölgeleri de içerdiği bilinmektedir. Bu genler için tespit edilen üçüncü konsensüs serisi GGGCG’dir. Bu seri de iki yönlü oryantasyon gösterebilmekte ve genellikle çok kopya halinde bulunmaktadır. GGGCG serisi, daima transkripsiyonun başlama bölgesi gerisinde lokalize olur ve SP1 transkripsiyon faktörü için bağlanma bölgesi teşkil eder. Daha önceki örneklerde belirtildiği gibi, genel transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgelere bağlanmasından sonra, RNA polimeraz II nin doğru transkripsiyon başlama bölgesine yerleşmesi sağlanır. Bu doğru bağlanma TATA kutusunda bulunan TFIID faktörü sayesinde olur. TFIIA faktörü ise, TFIID’nin TATA kutusuna bağlanmasına yardım eder. TFIIA DNA’ya spesifik olmayan bir şekilde bağlanır ve TFIID’nin bağlanma bölgesini bulmasına yardımcı olur. Memeli hücrelerinde transkripsiyonıu başlatılmasına katılan TFIIB, TFIIF ve TFIIE’nin üstlendiği rol henüz açıkça belirlenememiştir. Teorik bir ökaryotik ikinci sınıf genin promotor bölge organizasyonu Şekil 24’te gösterilmektedir.

Ökaryotik hücrelerde rRNA moleküllerinin üç geni tek öncü olarak transkribe edilmektedir. Ökaryotik hücrelerin çoğunda rRNA genleri, 100-5000 kopyadan oluşan gen grupları halinde bulunurlar. Bunlar, çekirdekçik bölgesinde RNA polimeraz I enzimi tarafından transkribe edilirler. Ökaryotik hücreler yaklaşık 40000 RNA polimeraz I enzim molekülü içerirler. Her hücre bölünmesinde (1 jenerasyonda) rRNA’nın 10 milyon kopyasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle söz konusu moleküller için hücrede yoğun transkripsiyon aktivitesi bulunmaktadır. Birinci sınıf genlerin promotor serileri, transkripsiyon başlama bölgesinin hemen arkasında ve bir tekrarlanan gen ünitesinin önünde yer alır. Bu promotor seriler, tür içi spesifite içerir, ancak farklı organizmalar arasında zayıf homoloji gösterir. Tüm I. sınıf genlerin promotorlarının 3 önemli bölge içerdiği saptanmıştır. Birinci bölge -40 ile +20 bazları arasında yer alan, transkripsiyonun başlama bölgesidir. İkinci bölge -40 ile -15 bölgeleri arasında yer alır ve transkripsiyon faktörü TFID için bağlanma bölgesi teşkil eder. TFID regülatör bir proteindir ve RNA polimeraz I’in transkripsiyonu doğru bölgeden başlatmasını garanti altına alır. Üçüncü bölge ise, -150 ile -100 bölgeleri arasında bulunur ve UBF1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasına yardım eder (Şekil 25).

Ökaryotik organizmalarda transkripsiyonunun sonlandırılması, prokoryotlara oranla çok az aydınlatılmıştır. Ökaryotlarda hem deneysel analizin zor oluşu ve hem de olgun RNA moleküllerinin 3’ ucunun transkripsiyon sonrası işleme tabi tutulması gibi nedenlerle, sonlanma serilerinin özelliklerinin tanımlanması güçleşmektedir. Birçok genden transkripsiyonun ayrılma bölgesi bilinmemektedir. Bu güçlüklere rağmen ökaryotik sonlandırma serilerinin, şablon olmayan DNA zincirinde timin uzaması içerdiği saptanmıştır. Bu timin uzamaları, büyük olasılıkla, memeli hücrelerinde transkripsiyonun sonlandırılması ile ilgili tek sekansdır.

Tüm genler aynı oranda transkribe edilmez. Hücrelerde protein üretiminin artırılması, çevresel sinyallerle düzenlenir. Bazı genler belirli koşullarda transkribe edilmez. Örneğin; yalnız yapraklarda bulunan enzim genleri, kök hücrelerinde sentezlenmez. Sadece belirli koşullarda ifade edilen genler, regüle edilen genler adını alır. Regülasyon, gen ifadesinin herhangi bir sürecinde meydana gelebilir. Ancak çoğu kez transkripsiyon aşamasında regülasyon söz konusudur. Daha önce belirtildiği gibi, transkripsiyonda, DNA ve çözülebilir proteinlerin etkileşimi söz konusudur. Bu elementlerin her ikisi de, transkripsiyon seviyesinde gen ifadesinin regülasyonu için yönlendirilebilir. Örneğin; promotor bölge konsensüs sersinde bir bazın değişmesi ile, güçlü promotor zayıf promotora dönüşür ve bu promotordan yapılan transkripsiyon oranı düşer. Benzer olarak, transkripsiyon faktörlerinin kullanım düzenlenmesine tabi tutulması ya da yeni faktörlerin ilavesi ile belirli genlerin transkripsiyon etkinliği artırılabilir veya azaltılabilir. Söz konusu regülasyon mekanizmaları ileride transkripsiyon oranı daha detaylı bir şekilde anlatılacaktır.