

Aminoasitler, Peptitler ve Proteinler

Prof. Dr. Bektaş TEPE

Biyokimya

Bölüm 3



Proteinler Hücresel Yaşamın Temel Aktörleridir

- Proteinler, hücrede gerçekleşen süreçlerin neredeyse tamamında görev alan son derece çeşitli biyomoleküllerdir.
- Hücresel işlevleri anlamak için öncelikle proteinlerin moleküler mekanizmalarının ve biyolojik rollerinin incelenmesi gerekir.
- Proteinler hücrelerde en bol bulunan biyolojik makromoleküllerdir ve kuru hücre kütlelerinin yaklaşık yarısını oluşturur.
- Proteinlerin yapısı ve işlevi; amino asitler, peptitler ve proteinlerle çalışmada kullanılan yöntemler üzerinden ele alınır.





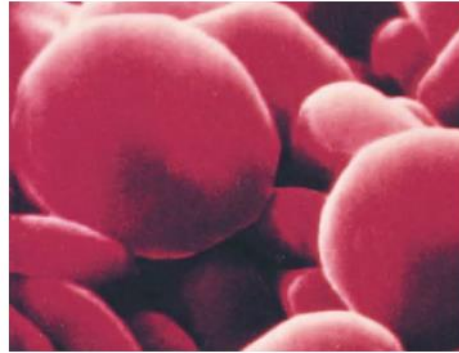
Proteinlerin Yapısal ve İşlevsel Çeşitliliği

- Proteinler, bakterilerden en karmaşık canlılara kadar tüm organizmalarda çok farklı tür ve yapılarda bulunur.
- En basit tek hücreli canlılarda bile binlerce farklı protein, birbirinden farklı moleküler işlevler üstlenir.
- Canlıların yapısal özellikleri, genetik bilginin ifade edilmesini sağlayan proteinler aracılığıyla ortaya çıkar.
- Proteinler, amino asitlerden oluşan polimerlerdir ve bazı proteinler birden fazla makromolekülle birlikte işlev görür.



Proteinlerin Biyolojik İşlevlerine Örnekler

- Ateş böceğinin ışık üretmesi, lusiferin ve ATP ile tepkimeyi katalizleyen lusiferaz proteini sayesinde gerçekleşir.
- Eritrositler, oksijen taşıyan hemoglobin proteini nedeniyle kırmızı renkte görünür.
- Keratin; saç, yün, tırnak, tüy ve boynuz gibi yapıların temel protein bileşenleri arasında yer alır.





Sınırlı Sayıda Amino Asitten Büyük Protein Çeşitliliği Doğar

- Proteinlerin çoğu, karakteristik doğrusal diziler hâlinde kovalent bağlarla birbirine bağlanan 20 yaygın amino asitten oluşur.
- Bu amino asitler, protein yapısının yazıldığı alfabenin 20 temel harfi olarak değerlendirilebilir.
- Hücreler, aynı amino asitleri farklı kombinasyonlarda kullanarak çok farklı özelliklere ve etkinliklere sahip proteinler üretir.
- Enzimler, hormonlar, antikorlar, taşıyıcılar, kas lifleri ve reseptörler bu çeşitliliğin başlıca örnekleridir.





Amino Asitler Proteinlerin Yapı Birimleridir

- Her amino asit kalıntısı, belirli bir kovalent bağ türüyle bir sonraki amino asit kalıntısına bağlanır.
- “Kalıntı” ifadesi, amino asitler birbirine bağlanırken suyun bazı bileşenlerinin uzaklaştırılmasını yansıtır.
- Proteinler hidroliz edildiğinde kendilerini oluşturan amino asitlere ayrılır ve en eski amino asit çalışmaları buradan gelişmiştir.
- Proteinlerde yaygın olarak bulunan 20 farklı amino asit tanımlanmıştır.





Amino Asitlerin Adlandırılmasının Tarihsel Kökenleri

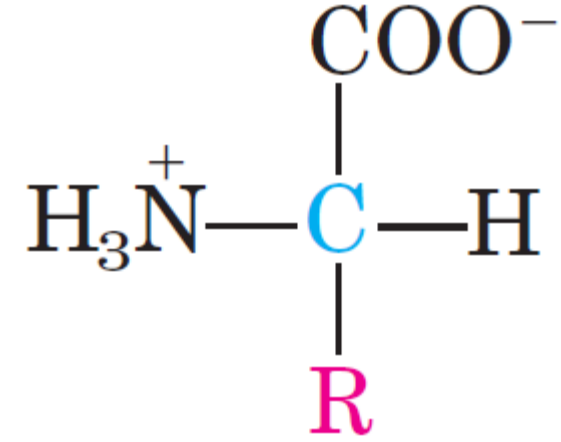
- Proteinlerden tanımlanan ilk amino asit, 1806 yılında keşfedilen asparajindir.
- Tanımlanan son yaygın amino asit treonindir ve bu amino asit 1938 yılında belirlenmiştir.
- Glutamat buğday glüteninden, tirozin peynirden ve glisin ise jelatinden elde edilerek adlandırılmıştır.
- Bazı amino asit adları kaynaklarını veya özelliklerini yansıtırken, diğerlerinin adları daha az açıklayıcıdır.





Amino Asitlerin Ortak α -Amino Asit Yapısı

- Yaygın 20 amino asidin tamamı α -amino asittir ve aynı α -karbon atomuna bağlı ortak gruplar taşır.
- α -Karbona bir karboksil grubu, bir amino grubu, bir hidrojen atomu ve bir de R grubu bağlanır.
- Amino asitler; yapı, büyüklük, elektriksel yük ve sudaki çözünürlüğü etkileyen R gruplarıyla birbirinden ayrılır.



İZLE



Yaygın ve Değiştirilmiş Amino Asitler

- Proteinlerde bulunan amino asit çeşitliliği yalnızca 20 yaygın amino asitle sınırlı değildir.
- Bazı nadir amino asit kalıntıları, protein sentezlendikten sonra yaygın amino asitlerin değiştirilmesiyle oluşur.
- Canlılarda bulunan yaklaşık 300 farklı amino asidin bir bölümü proteinlerin yapılarına katılmaz.

Bi Dünya Biyoloji



Bektaş Tepe
gezimania_tr

Amino Asitlerin Özelliklerinin Karşılaştırılması

- Yandaki tabloda amino asitler R gruplarının yapısına ve elektriksel özelliklerine göre sınıflandırılmıştır.
- Amino asitlerin bağlı moleküler kütleleri, iyonlaşma sabitleri ve izoelektrik noktaları tabloda karşılaştırmalı olarak verilmiştir.
- Hidropati indeksi, bir amino asit yan zincirinin hidrofobik veya hidrofilik davranışını yansıtır.
- Tablo ayrıca her amino asidin incelenen proteinlerdeki ortalama bulunma oranını da göstermektedir.

	Properties and Conventions Associated with the Common Amino Acids Found in Proteins							
Amino acid	Abbreviation/ symbol	M_r^*	pK_a values			pI	Hydropathy index [†]	Occurrence in proteins (%) [‡]
			pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH ₃ ⁺)	pK_R (R group)			
Nonpolar, aliphatic R groups								
Glycine	Gly G	75	2.34	9.60		5.97	−0.4	7.2
Alanine	Ala A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Proline	Pro P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Valine	Val V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Leucine	Leu L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
Isoleucine	Ile I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Methionine	Met M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
Aromatic R groups								
Phenylalanine	Phe F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tyrosine	Tyr Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	−1.3	3.2
Tryptophan	Trp W	204	2.38	9.39		5.89	−0.9	1.4
Polar, uncharged R groups								
Serine	Ser S	105	2.21	9.15		5.68	−0.8	6.8
Threonine	Thr T	119	2.11	9.62		5.87	−0.7	5.9
Cysteine [§]	Cys C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparagine	Asn N	132	2.02	8.80		5.41	−3.5	4.3
Glutamine	Gln Q	146	2.17	9.13		5.65	−3.5	4.2
Positively charged R groups								
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	−3.9	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	−3.2	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	−4.5	5.1
Negatively charged R groups								
Aspartate	Asp D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	−3.5	5.3
Glutamate	Glu E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	−3.5	6.3





Amino Asitler İçin Üç ve Tek Harfli Kodlar

- Proteinlerdeki yaygın amino asitleri göstermek için üç harfli kısaltmalar ve tek harfli semboller kullanılır.
- Üç harfli kısaltmalar genellikle amino asit adlarının ilk üç harfinden oluşturulur.
- Tek harfli kodlar, delikli kart döneminde amino asit dizilerinin daha az yer kaplaması amacıyla geliştirilmiştir.

	Properties and Conventions Associated with the Common Amino Acids Found in Proteins							
Amino acid	Abbreviation/ symbol	M_r^*	pK_a values			pI	Hydropathy index [†]	Occurrence in proteins (%) [‡]
			pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH ₃ ⁺)	pK_R (R group)			
Nonpolar, aliphatic R groups								
Glycine	Gly G	75	2.34	9.60		5.97	−0.4	7.2
Alanine	Ala A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Proline	Pro P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Valine	Val V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Leucine	Leu L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
Isoleucine	Ile I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Methionine	Met M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
Aromatic R groups								
Phenylalanine	Phe F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tyrosine	Tyr Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	−1.3	3.2
Tryptophan	Trp W	204	2.38	9.39		5.89	−0.9	1.4
Polar, uncharged R groups								
Serine	Ser S	105	2.21	9.15		5.68	−0.8	6.8
Threonine	Thr T	119	2.11	9.62		5.87	−0.7	5.9
Cysteine [§]	Cys C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparagine	Asn N	132	2.02	8.80		5.41	−3.5	4.3
Glutamine	Gln Q	146	2.17	9.13		5.65	−3.5	4.2
Positively charged R groups								
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	−3.9	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	−3.2	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	−4.5	5.1
Negatively charged R groups								
Aspartate	Asp D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	−3.5	5.3
Glutamate	Glu E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	−3.5	6.3





Tek Harfli Kodların Belirlenme İlkeleri

- Tek harfli kod mümkün olduğunda amino asit adının ilk harfinden seçilir ve benzersiz bir sembol oluşturur.
- Aynı harfle başlayan amino asitlerde, daha yaygın olan amino aside ilgili harfin öncelikle verilmesi amaçlanır.
- Alanin A, glisin G, lösin L, prolin P ve treonin T harfleriyle gösterilir.
- Asparajin N, glutamin Q, arginin R, fenilalanin F, triptofan W, aspartat D ve glutamat E sembollerini alır.

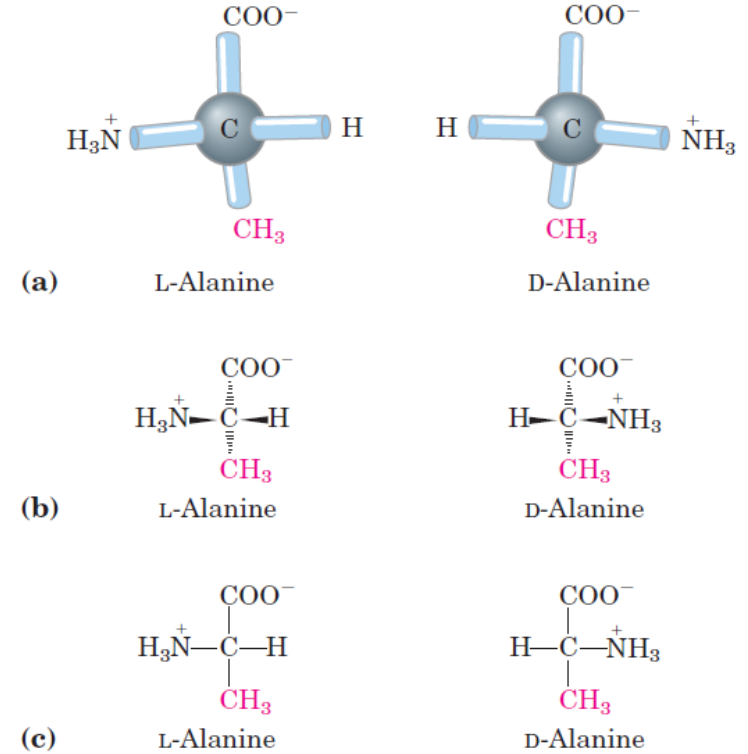
	Properties and Conventions Associated with the Common Amino Acids Found in Proteins							
Amino acid	Abbreviation/ symbol	M_r^*	pK_a values			pI	Hydropathy index [†]	Occurrence in proteins (%) [‡]
			pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH ₃ ⁺)	pK_R (R group)			
Nonpolar, aliphatic R groups								
Glycine	Gly G	75	2.34	9.60		5.97	−0.4	7.2
Alanine	Ala A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Proline	Pro P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Valine	Val V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Leucine	Leu L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
Isoleucine	Ile I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Methionine	Met M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
Aromatic R groups								
Phenylalanine	Phe F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tyrosine	Tyr Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	−1.3	3.2
Tryptophan	Trp W	204	2.38	9.39		5.89	−0.9	1.4
Polar, uncharged R groups								
Serine	Ser S	105	2.21	9.15		5.68	−0.8	6.8
Threonine	Thr T	119	2.11	9.62		5.87	−0.7	5.9
Cysteine [§]	Cys C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparagine	Asn N	132	2.02	8.80		5.41	−3.5	4.3
Glutamine	Gln Q	146	2.17	9.13		5.65	−3.5	4.2
Positively charged R groups								
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	−3.9	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	−3.2	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	−4.5	5.1
Negatively charged R groups								
Aspartate	Asp D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	−3.5	5.3
Glutamate	Glu E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	−3.5	6.3





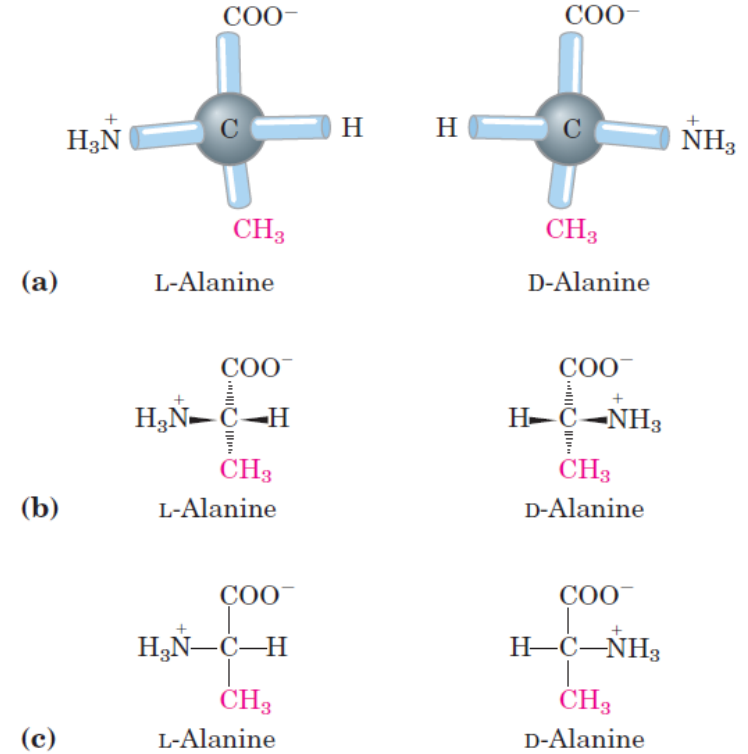
Amino Asitlerde Kiralite

- Glisin dışındaki bütün yaygın amino asitlerde α -karbon, dört farklı gruba bağlanır ve kiral merkez oluşturur.
- α -Karbon çevresindeki bağların tetrahedral düzeni, atomların uzaydaki iki farklı yerleşimine olanak verir.
- Birbirinin üstüne çakıştırılamayan ayna görüntüsü biçimindeki bu iki yapı, enantiyomer olarak adlandırılır.
- Yandaki figürde, L-alanin ve D-alaninin üç boyutlu yapıları ile gösterim biçimleri sunulmuştur.



Stereokimyasal Gösterimlerde Dikkat Edilmesi Gerekenler

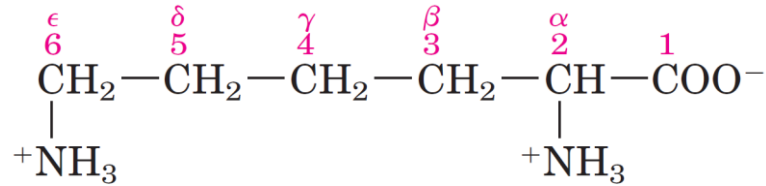
- Yandaki figürde alanin enantiyomerleri perspektif formüller ve Fischer projeksiyonları kullanılarak gösterilmiştir.
- Perspektif formüllerde kama biçimli bağlar kâğıt düzleminden dışarıya, kesikli bağlar ise düzlemin arkasına yönelir.
- Fischer projeksiyonlarında yatay bağların dışarıya, dikey bağların ise düzlemin arkasına uzandığı kabul edilir.
- Perspektif formüller kesin konfigürasyonu gösterirken, Fischer projeksiyonları bu amaçla her zaman yeterli olmayabilir.





Kiral Moleküller Optik Aktivite Gösterir

- Kiral merkeze sahip moleküller optik olarak aktiftir ve polarize ışığın yönünü değiştirebilir.
- Amino asitlerde karbon atomlarını tanımlamak için birbirini tamamlayan iki farklı adlandırma sistemi kullanılır.
- R grubundaki karbonlar α -karbondan başlayarak β , γ , δ ve ϵ harfleriyle sıralanabilir.
- Diğer sistemde karbonlar, en yüksek öncelikli grubu içeren karboksil karbonundan başlanarak numaralandırılır.



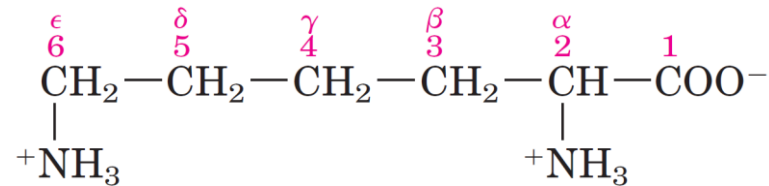
Lysine





Amino Asitlerde Karbonların Adlandırılması

- Numaralandırma sisteminde amino asidin karboksil karbonu C-1, α -karbonu ise C-2 olarak adlandırılır.
- Dallanmış yan zincirlerde eşdeğer karbonlar, Yunan harflerinden sonra verilen rakamlarla birbirinden ayrılır.
- Lösinin yan zincirindeki iki eşdeğer karbon, $\delta 1$ ve $\delta 2$ karbonları şeklinde gösterilir.
- Heterosiklik R gruplarında Yunan harfleriyle adlandırma belirsizleşebildiğinden numaralandırma sistemi tercih edilir.



Lysine





Amino Asitlerin D ve L Konfigürasyonları

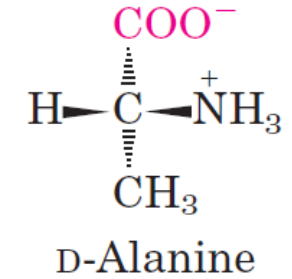
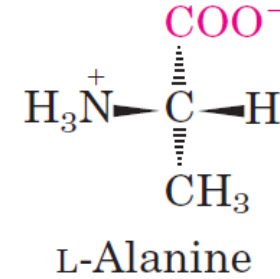
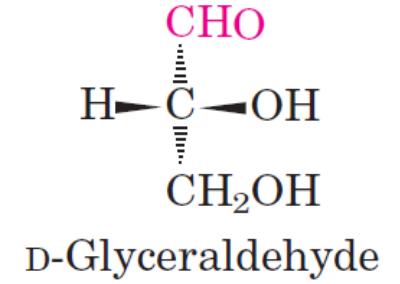
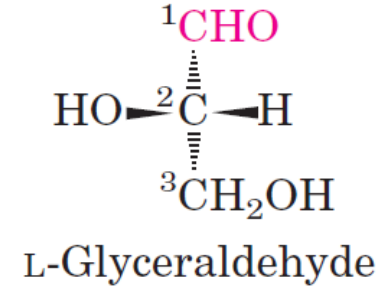
- Kiral bileşiklerin mutlak konfigürasyonları, Hermann Emil Fischer tarafından geliştirilen özel bir adlandırma sistemiyle belirtilir.
- Basit şekerlerin ve amino asitlerin stereokimyasal yapıları, D ve L sistemiyle tanımlanır.
- Bu sistemin referans bileşiği, üç karbonlu gliseraldehit ve onun iki farklı stereozomeridir.
- Fischer tarafından önerilen gliseraldehit konfigürasyonlarının doğruluğu daha sonra X-ışını kırınımıyla doğrulanmıştır.





Alanin ile Gliseraldehit Arasındaki Stereokimyasal İlişki

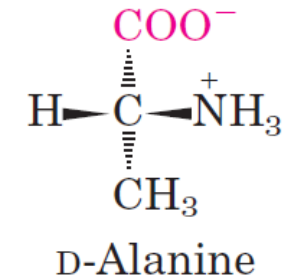
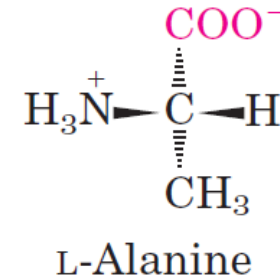
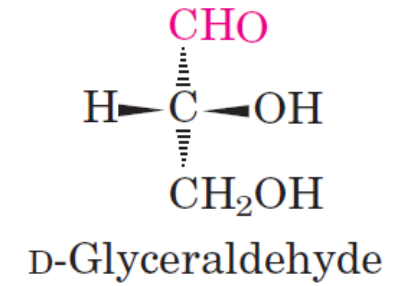
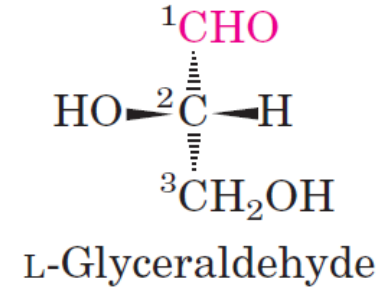
- Kiral bileşikler, L- veya D-gliseraldehit ile ilişkili üç boyutlu yapılarına göre L ya da D olarak sınıflandırılır.
- L-alaninin fonksiyonel grupları, basit kimyasal tepkimelerle L-gliseraldehittekimlerle eşleştirilebilir.
- L-alaninin karboksil grubu aldehite, amino grubu ise hidroksil grubuna dönüştürülebilir.
- Alanin enantiyomerlerinin gliseraldehit konfigürasyonlarıyla ilişkisi yandaki figürde gösterilmiştir.





D ve L Gösterimleri Birbirine Dönüşümü İfade Etmez

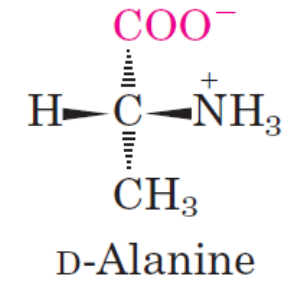
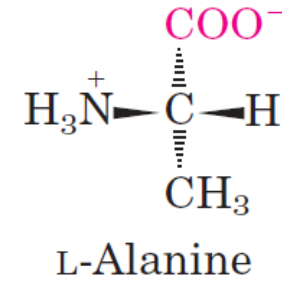
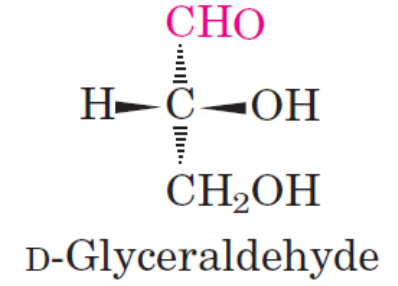
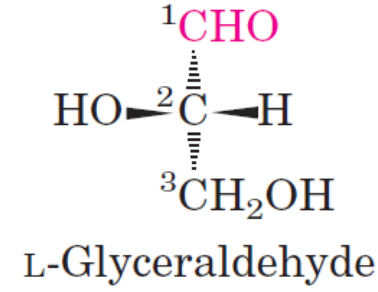
- Yandaki figürde kiral merkez çevresindeki gruplar Fischer projeksiyonlarına uygun biçimde sıralanmaktadır.
- R grubu, amino asitlere ait Fischer projeksiyonlarında kiral merkezin altında konumlandırılır.
- L-amino asitlerde amino grubu solda, D-amino asitlerde ise sağda yer alır.
- D ve L gösterimleri stereokimyasal ilişkiyi belirtir; bu moleküller basitçe birbirine dönüştürülemez.





D ve L Gösterimlerinin Gerçek Anlamı

- D ve L gösterimleri geçmişte polarize ışığı sağa veya sola çeviren moleküller için kullanılmıştır.
- Ancak bütün L-amino asitler ışığı sola çevirmediğinden, bu kullanım mutlak konfigürasyon hakkında belirsizlik oluşturur.
- Fischer yaklaşımında D ve L, optik özellikleri değil, kiral karbon çevresindeki grupların konfigürasyonunu belirtir.
- Birden fazla kiral merkez taşıyan moleküllerin konfigürasyonu ise RS sistemiyle daha ayrıntılı biçimde tanımlanabilir.





Proteinlerde L-Amino Asitler Baskındır

- Kiral merkeze sahip biyolojik bileşiklerin çoğu, doğal olarak D veya L biçimlerinden yalnızca biri hâlinde bulunur.
- Proteinlerin yapısına katılan kiral amino asit kalıntıları neredeyse tamamen L-stereoizomerlerden oluşur.
- D-amino asitler yalnızca bazı küçük peptitlerde, özellikle belirli bakteri hücre duvarlarında ve peptit antibiyotiklerde görülür.
- Bu nedenle L-amino asitlerin protein yapısındaki belirgin üstünlüğü, biyolojik sistemlerin temel özelliklerinden biridir.





Biyolojik Sistemlerde Stereokimyasal Seçicilik

- Sıradan kimyasal tepkimelerde kiral bileşikler oluştuğunda genellikle eşit miktarda D ve L izomeri meydana gelir.
- D ve L izomerlerinden oluşan bu rasemik karışım, özel yöntemler kullanılmadıkça birbirinden kolayca ayrılamaz.
- Buna karşılık hücrelerdeki enzimlerin aktif bölgeleri asimetriktir ve L-amino asitleri seçici biçimde tanır.
- Enzimlerin bu özgülüğü, katalizledikleri tepkimelerin stereospesifik olmasını sağlar.





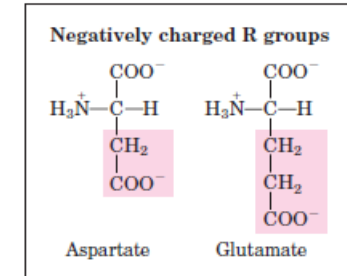
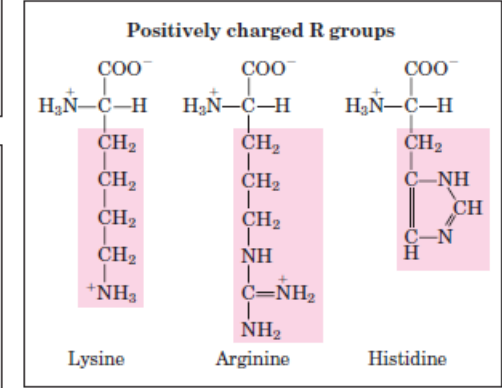
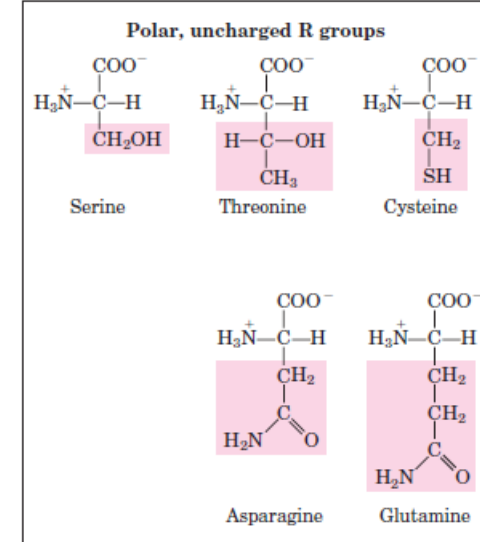
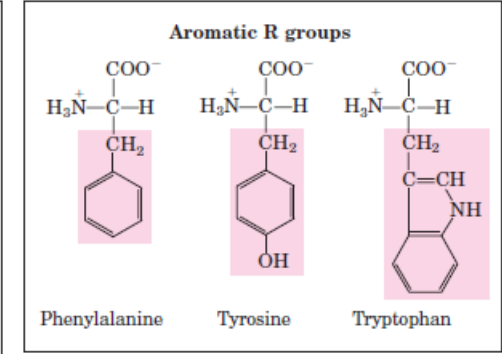
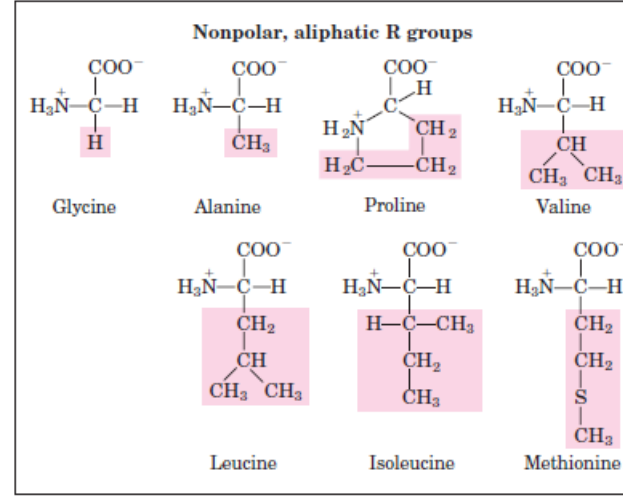
Amino Asitler R Gruplarına Göre Sınıflandırılır

- Amino asitlerin kimyasal özelliklerini bilmek, biyokimyasal yapı ve süreçlerin anlaşılması açısından temel önem taşır.
- Yaygın amino asitler, R gruplarının özelliklerine göre beş ana sınıf altında incelenebilir.
- Bu sınıflandırmada R gruplarının biyolojik pH'daki polaritesi, elektriksel yükü ve suyla etkileşimi dikkate alınır.
- R grupları, apolar ve hidrofobik yapılardan oldukça polar ve hidrofilik yapılara kadar geniş bir çeşitlilik gösterir.



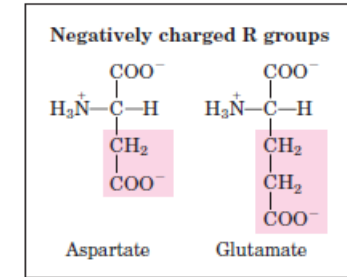
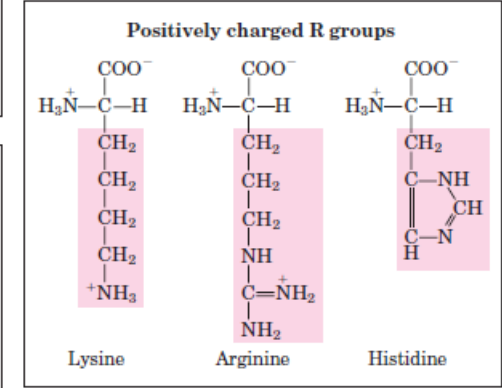
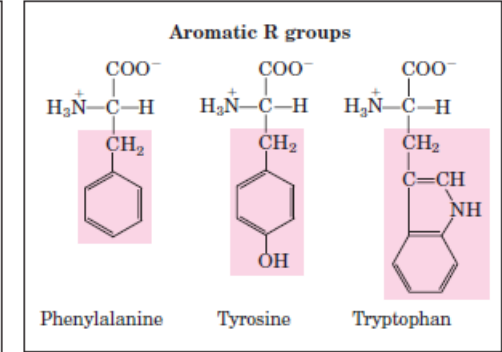
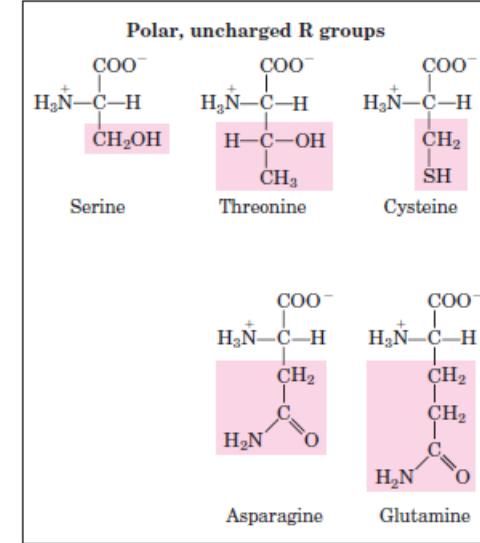
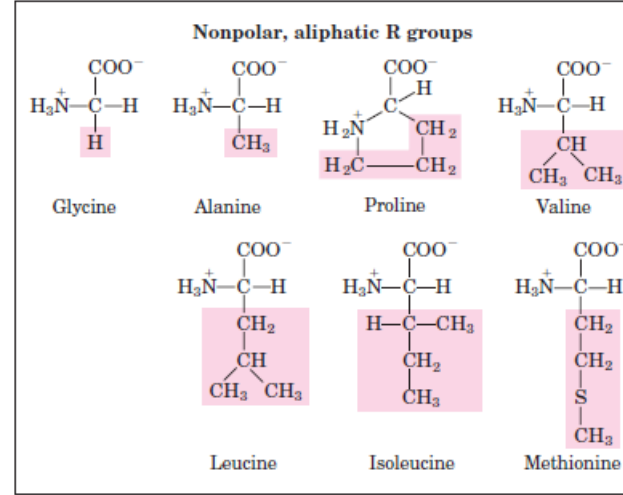
Yaygın Amino Asitlerin Beş Temel Sınıfı

- Yaygın amino asitler; apolar alifatik, aromatik, polar yüksüz, pozitif yüklü ve negatif yüklü gruplara ayrılır.
- Bu sınıflar arasındaki farklılıklar, R gruplarının polarite, büyüklük ve biçim özelliklerinden kaynaklanır.
- Yaygın 20 amino asidin yapıları ve sınıflandırılması yandaki figürde toplu olarak gösterilmiştir.



Apolar Alifatik R Grupları

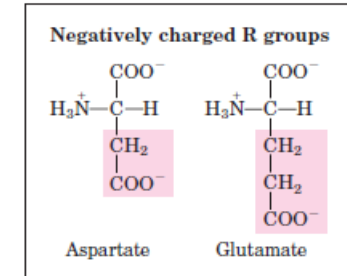
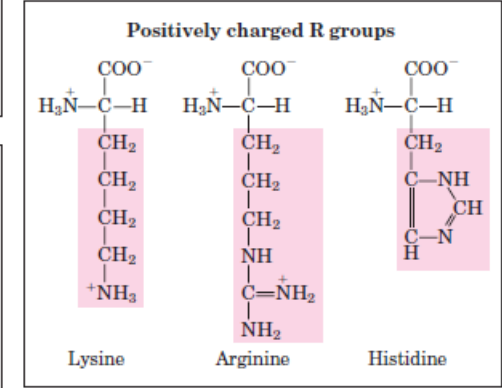
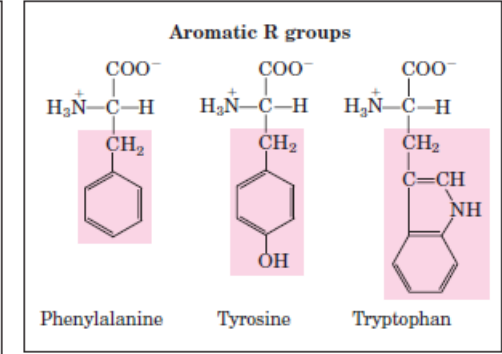
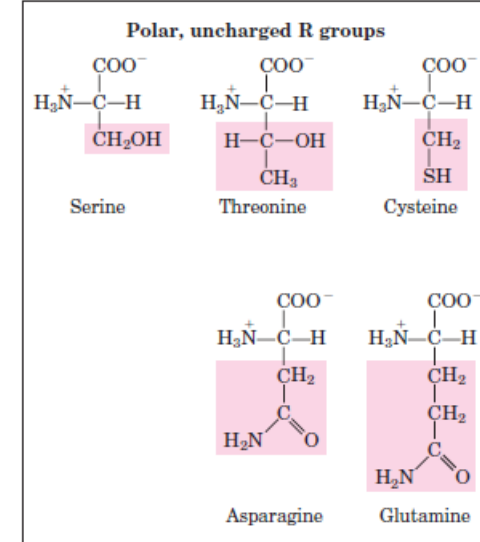
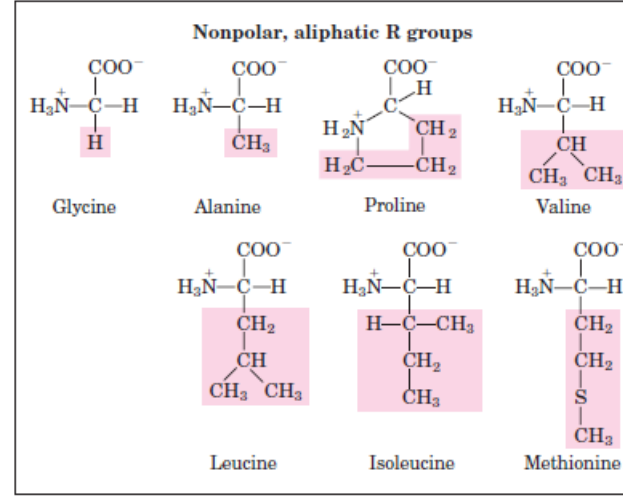
- Apolar alifatik sınıftaki amino asitlerin R grupları genellikle yüksüzdür ve suyla sınırlı etkileşim kurar.
- Alanin, valin, lösin ve izolösin proteinlerin içinde kümelenerek hidrofobik etkileşimlerle protein yapısını kararlı hâle getirir.
- Glisin yüksüz olsa da oldukça küçük yan zinciri nedeniyle hidrofobik etkileşimlere çok az katkı sağlar.
- Bu amino asitlerin yapıları, apolar alifatik R grupları başlığı altında yandaki figürde gösterilmiştir.





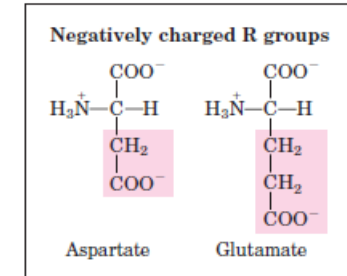
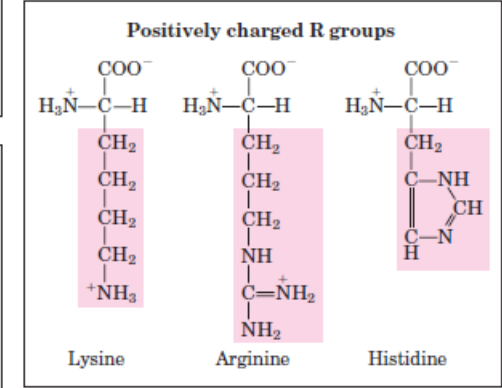
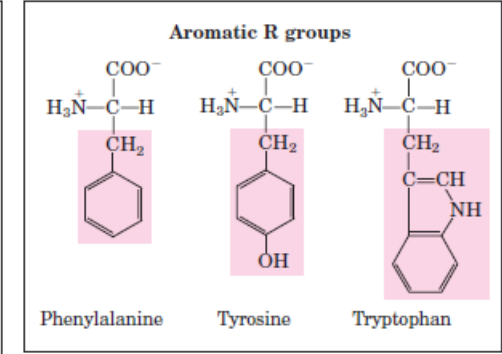
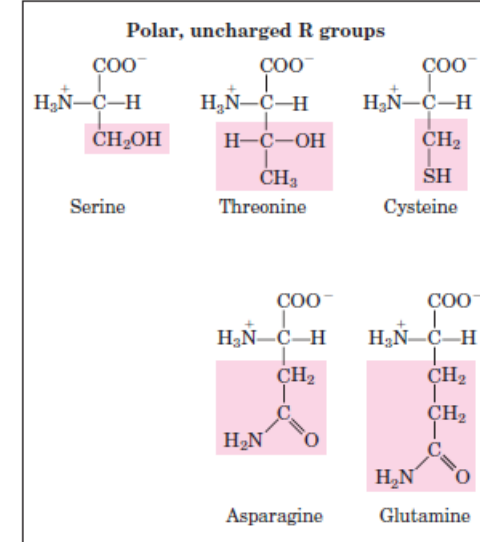
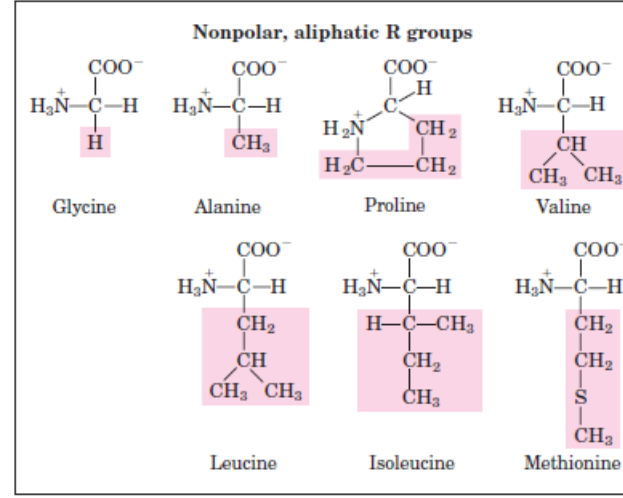
Methionin ve Prolinin Ayırt Edici Özellikleri

- Methionin, yan zincirinde apolar bir tiyoeter grubu taşıyan iki kükürtlü amino asitten biridir.
- Prolin, belirgin bir halkalı yapı içeren alifatik bir yan zincire sahiptir.
- Prolinin ikincil amino grubu, polipeptit zincirinin belirli bölgelerinde yapısal esnekliği azaltan katı bir konformasyon oluşturur.
- Methionin ve prolinin özgün yan zincir yapıları yandaki figürde karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Aromatik Amino Asitlerin Ortak Özellikleri

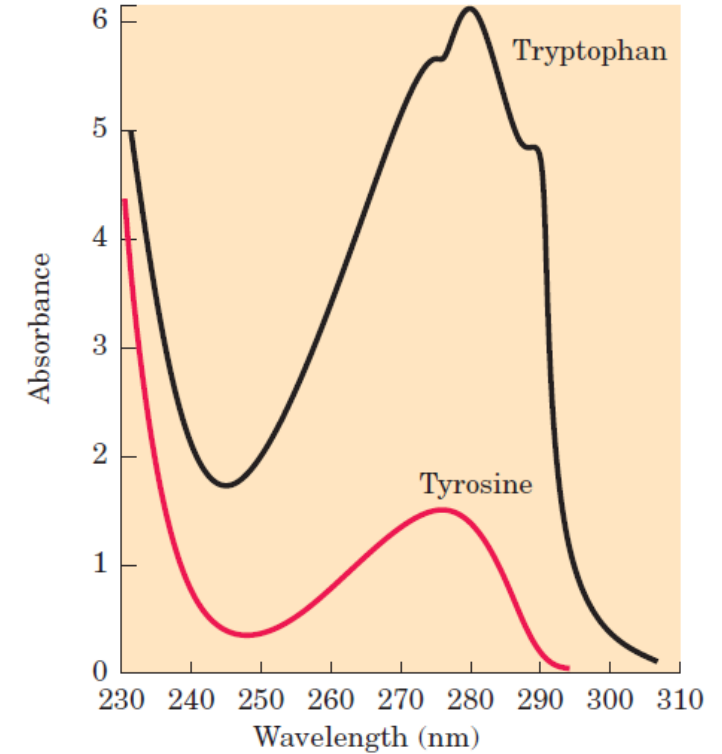
- Fenilalanin, tirozin ve triptofan aromatik yan zincirleri nedeniyle görece apolar amino asitlerdir.
- Bu üç amino asit de protein yapısının kararlı hâle gelmesini sağlayan hidrofobik etkileşimlere katılabilir.
- Tirozinin hidroksil grubu ve triptofanın indol halkasındaki azot atomu hidrojen bağları kurabilir.





Aromatik Amino Asitler Ultraviyole Işığ ı Soğ urur

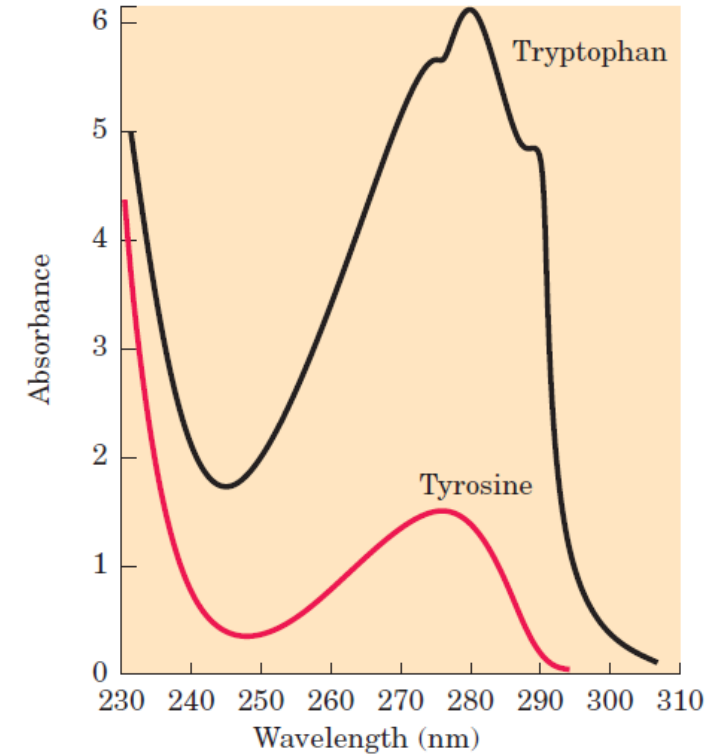
- Triptofan ve tirozin, fenilalanine göre ultraviyole ış ığı daha belirgin biçimde soğ urur.
- Triptofan ile tirozinin ış ık soğ urma düzeyleri, 230–310 nm aralığındadır.
- Her iki amino asidin en yüksek ış ık soğ urması yaklaşık 280 nm dalga boyu çevresinde gerçekleş ir.
- Fenilalaninin ış ık soğ urması ise proteinlerin spektroskopik özelliklerine yalnızca sınırlı katkı sağ lar.





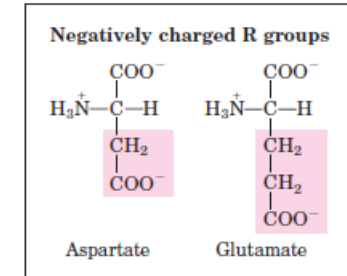
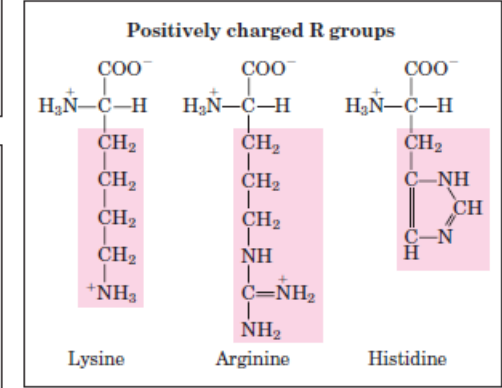
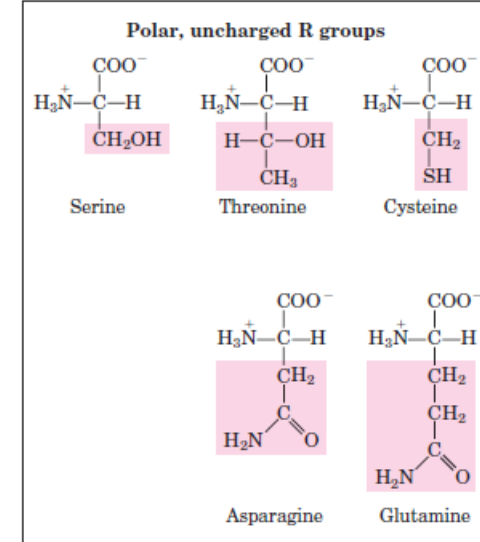
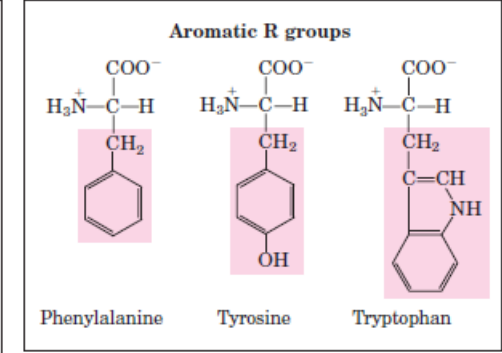
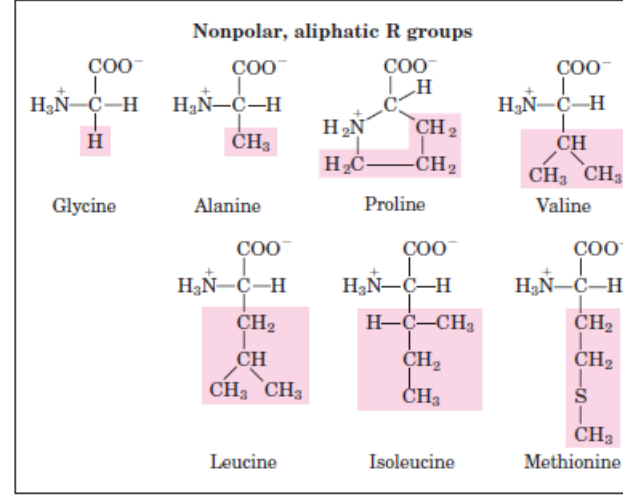
Proteinlerin 280 nm'de Işık Soğurması

- Yandaki figürde aynı koşullardaki triptofan ve tirozin çözeltilerinin ultraviyole soğurma spektrumları gösterilmektedir.
- Triptofanın ölçülen ışık soğurması, eşit miktardaki tirozininkinden yaklaşık dört kat daha yüksektir.
- Aromatik amino asitler, proteinlerin yaklaşık 280 nm'de karakteristik ve güçlü bir ışık soğurması göstermesini sağlar.
- Araştırmacılar bu özellikten proteinlerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi sırasında yararlanır.



Polar Yüksüz R Grupları

- Polar yüksüz amino asitlerin R grupları, apolar amino asitlerin yan zincirlerine göre suda daha iyi çözünür.
- Serin, treonin, sistein, asparajin ve glutamin bu sınıfta yer alır.
- Bu amino asitlerin yan zincirlerindeki fonksiyonel gruplar, su ve diğer polar gruplarla hidrojen bağları kurabilir.





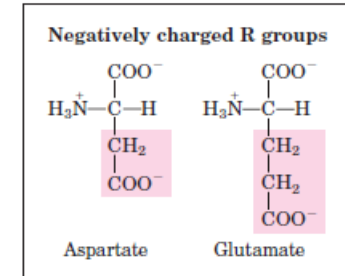
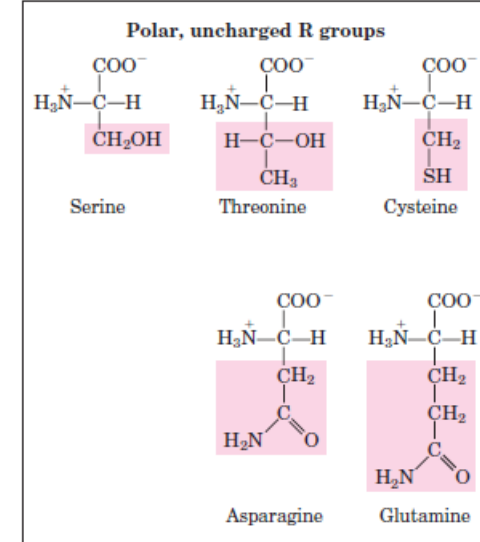
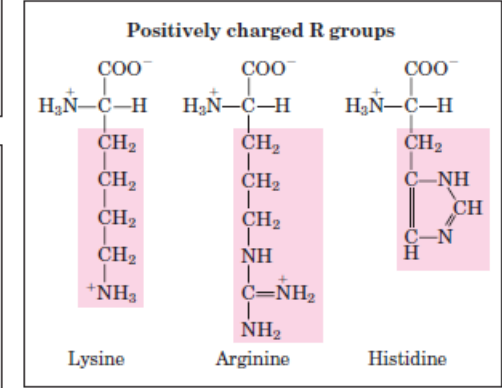
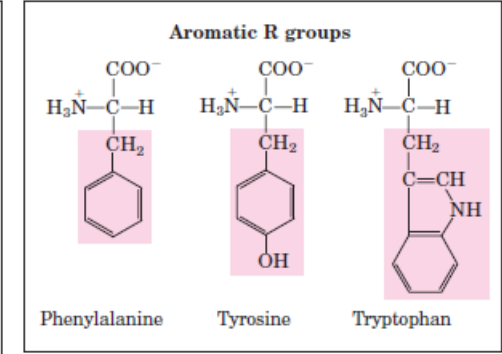
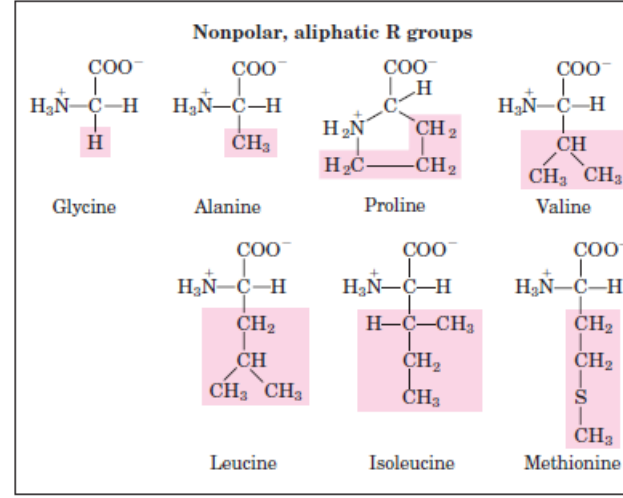
Polar Amino Asitlerin Hidrojen Bağı Oluşturması

- Serin ve treoninin polaritesi, yan zincirlerinde bulunan hidroksil gruplarından kaynaklanır.
- Sisteyinin sülfhidril grubu, oksijen veya azotla zayıf hidrojen bağları kurabilir.
- Asparajin ve glutaminin amid grupları ise hidrojen bağı oluşturma kapasitesine sahiptir.
- Bu etkileşimler, söz konusu amino asitlerin suyla ve proteinlerdeki diğer polar gruplarla ilişki kurmasını sağlar.



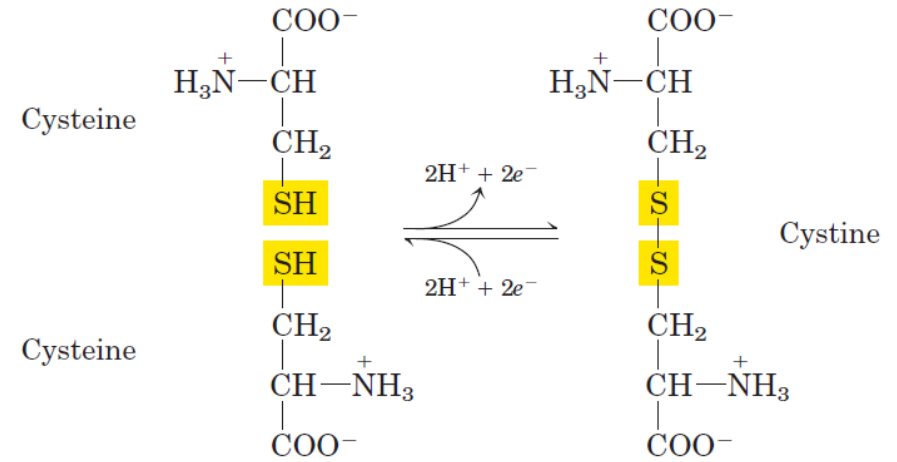
Asparajin ve Glutaminin Yapısal İlişkileri

- Asparajin ile glutamin, sırasıyla aspartat ve glutamatın amidleri olarak değerlendirilir.
- Bu amino asitlerin amid grupları, asparajin ve glutaminin kolayca hidrolize edilmesini sağlar.
- Hidroliz sonucunda asparajin aspartata, glutamin ise glutamata dönüşür.
- Asparajin ve glutaminin R grupları arasındaki yapısal benzerlik yandaki figürde gösterilmiştir.



Sistein Kalıntıları Disülfid Bağları Kurabilir

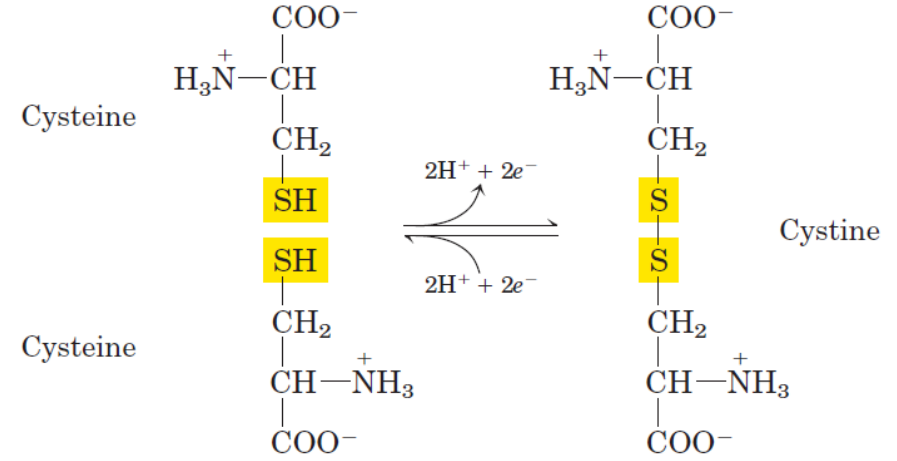
- İki sistein molekülü yükseltgendiğinde, kovalent disülfid bağı içeren sistin adlı dimerik amino asit oluşur.
- Sistein ile sistin arasındaki bu dönüşüm tersinirdir ve indirgenme yoluyla yeniden sistein oluşabilir.
- Disülfid bağının oluşumu ve tersinirliği yandaki figürde kimyasal olarak gösterilmiştir.
- Sistein kalıntıları arasındaki disülfid bağları, birçok proteinin yapısının kararlı hâle gelmesine katkı sağlar.





Disülfid Bağlarının Protein Yapısındaki Rolü

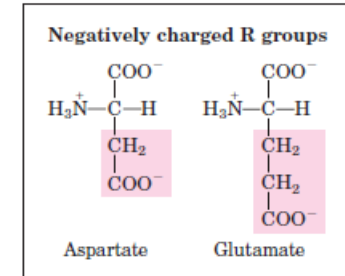
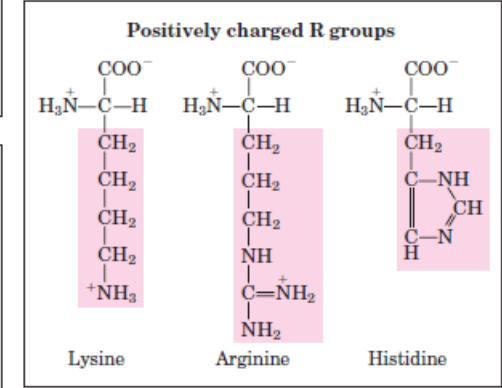
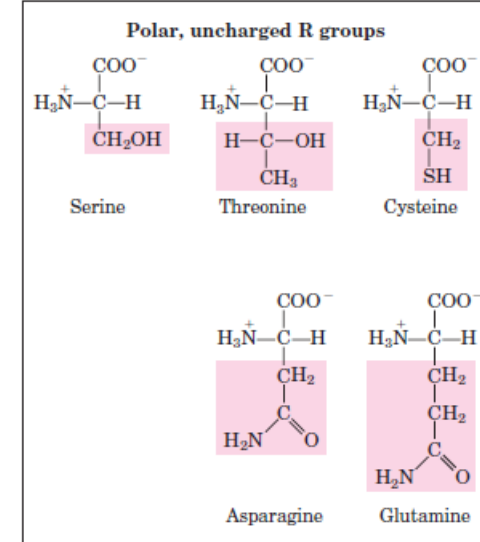
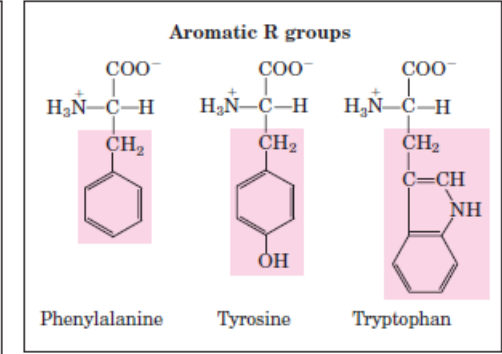
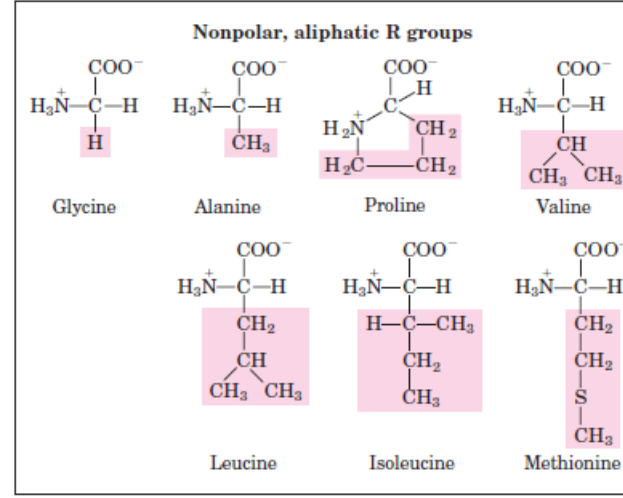
- Disülfid bağıyla birleşen sistein kalıntıları güçlü biçimde hidrofobik özellik gösterir.
- Disülfid bağları, aynı polipeptit zincirinin uzak bölümleri arasında kovalent bağlantılar kurabilir.
- Bu bağlar, iki farklı polipeptit zincirini birbirine bağlayarak daha büyük protein yapıları da oluşturabilir.
- Disülfid bağlarının proteinin kararlı yapısına katkısı yandaki figürde gösterilmiştir.





Pozitif Yüklü Bazik R Grupları

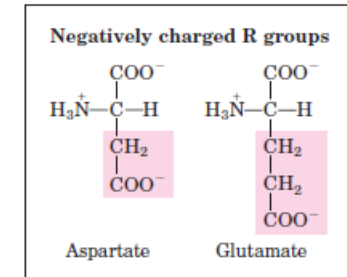
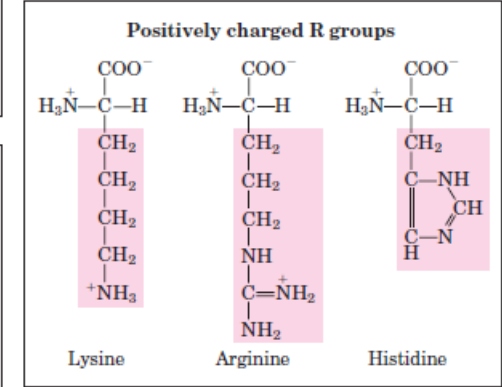
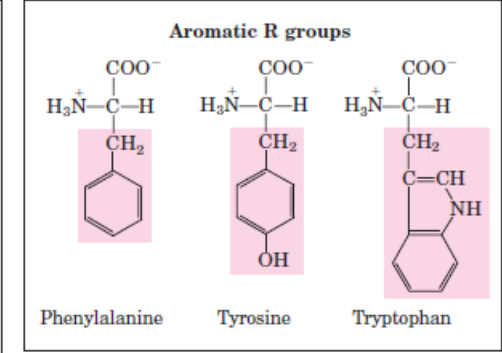
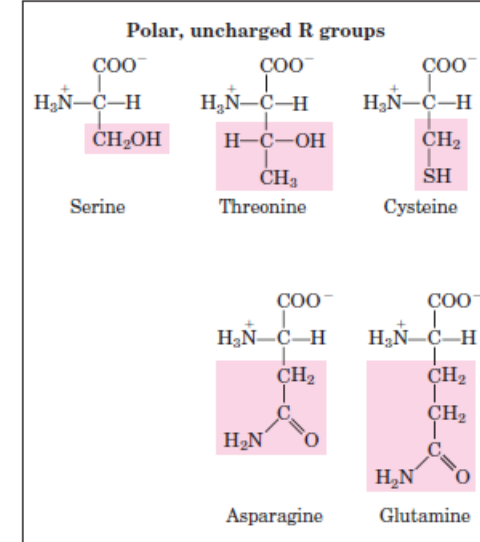
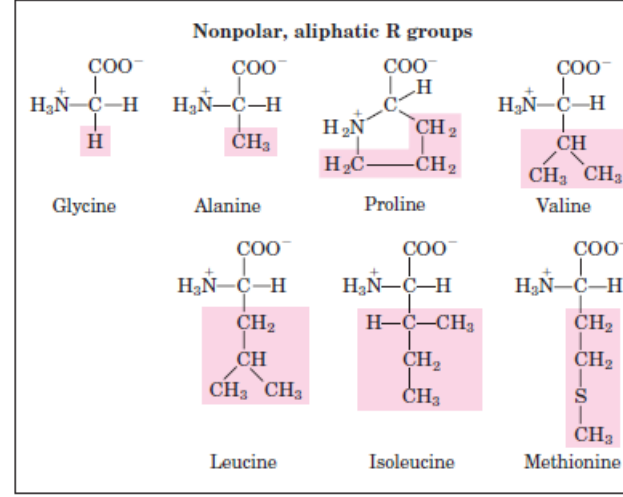
- En hidrofilik R grupları arasında, biyolojik pH'ta pozitif veya negatif yük taşıyan yan zincirler bulunur.
- Lizin, arginin ve histidin, pH 7.0 civarında belirgin pozitif yük taşıyabilen amino asitlerdir.
- Lizin alifatik zincirinin ϵ konumunda ikinci bir amino grubu taşır.
- Arginin pozitif yüklü guanidinyum, histidin ise aromatik imidazol grubu içerir.





Histidinin Değişken Yük Durumu

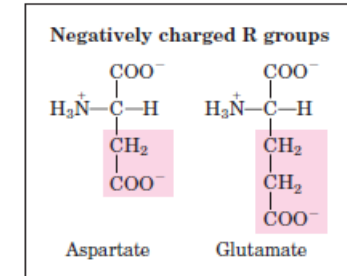
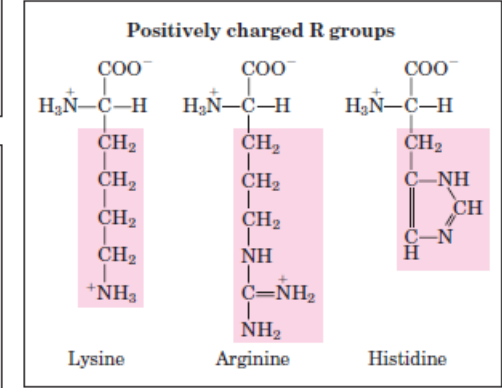
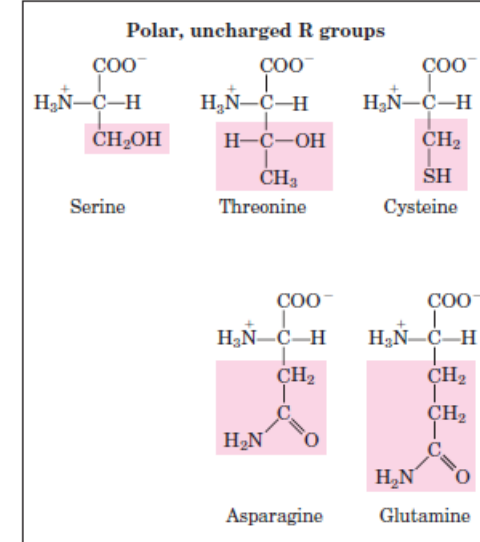
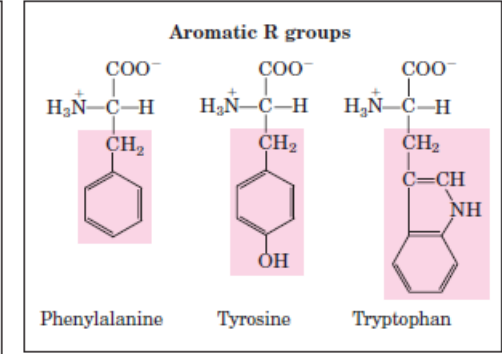
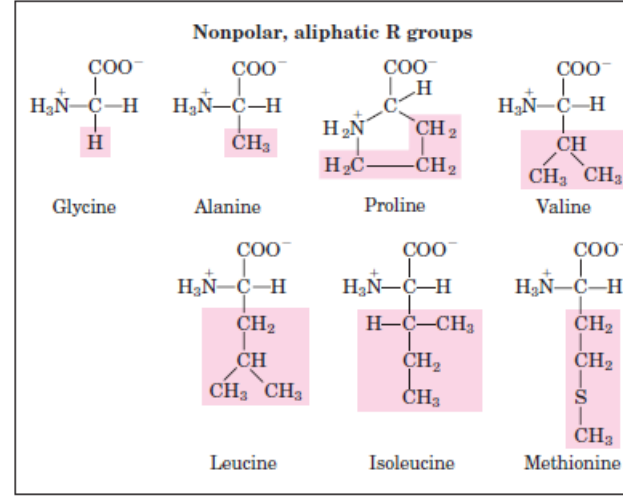
- Yaygın amino asitler arasında yalnızca histidinin iyonlaşabilir yan zincirinin pK_a değeri nötr pH'a yakındır.
- Bu nedenle histidin, pH 7.0'da protonlanmış ve pozitif yüklü ya da yüksüz biçimde bulunabilir.
- Histidinin yüksüz yapısı yandaki figürde gösterilmiştir.
- Histidin kalıntıları proton verici veya alıcı olarak davranarak enzimlerin katalizlediği birçok tepkimeyi kolaylaştırır.





Negatif Yüklü Asidik R Grupları

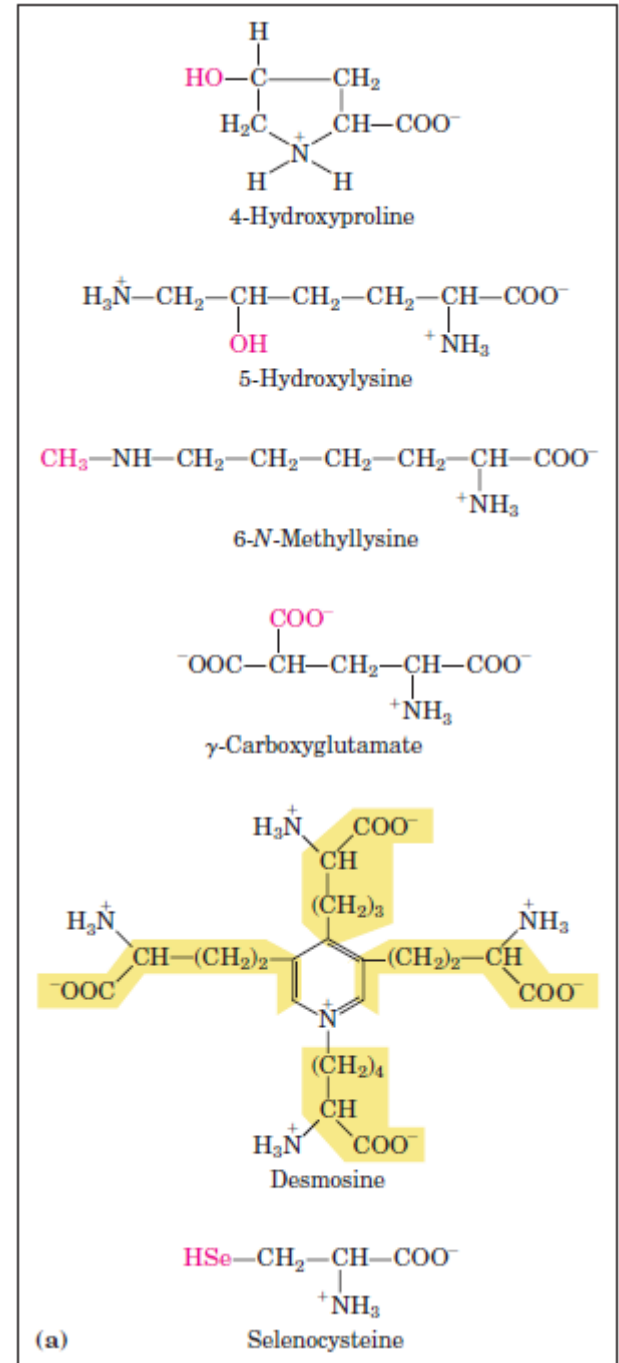
- Negatif yüklü R grubuna sahip iki yaygın amino asit aspartat ve glutamattır.
- Her iki amino asit de yan zincirlerinde ikinci bir karboksil grubu taşır.
- Bu gruplar pH 7.0'da iyonlaşarak aspartat ve glutamatın negatif yük kazanmasını sağlar.
- Aspartat ve glutamatın negatif yüklü yan zincirleri yandaki figürde gösterilmiştir.





Yaygın Olmayan Amino Asitlerin İşlevleri

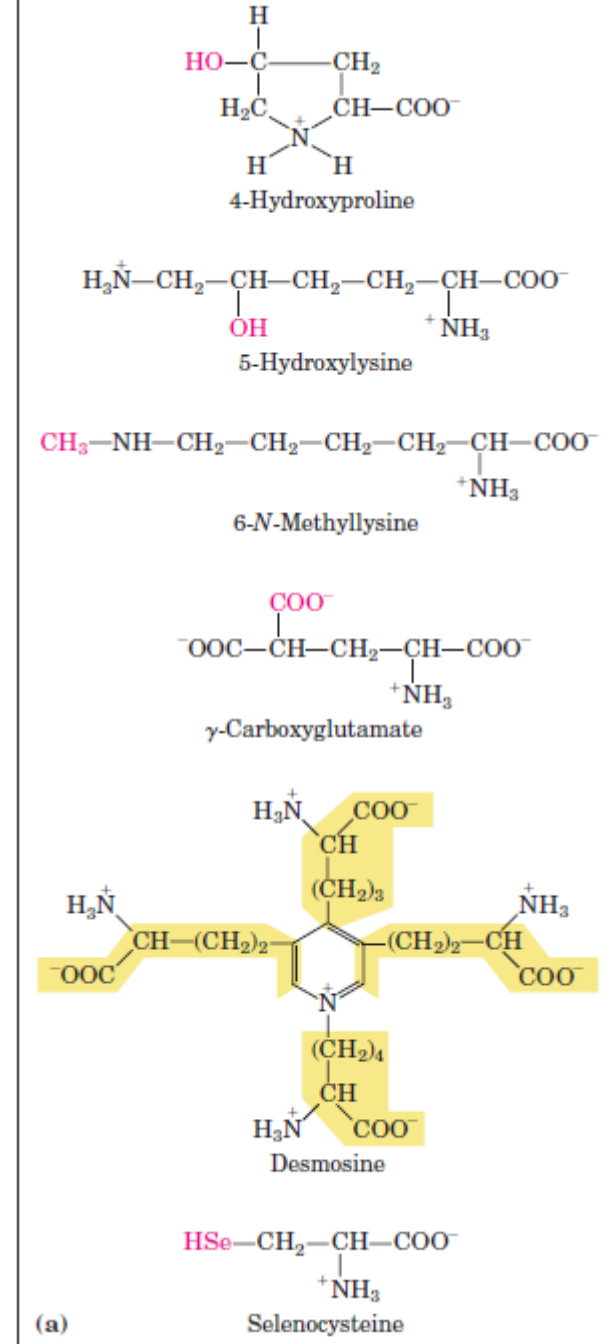
- Proteinlerde, yaygın 20 amino asidin polipeptit zincirine katıldıktan sonra değiştirilmesiyle oluşan kalıntılar da bulunabilir.
- Prolin türevi 4-hidroksiprolin ile lizin türevi 5-hidroksilizin bu amino asitler arasında yer alır.
- Her iki türev bitki hücre duvarı proteinlerinde ve bağ dokuların lifli proteini olan kollajende bulunur.
- Bu yaygın olmayan amino asitlerin oluşumu yandaki figürde gösterilmiştir.





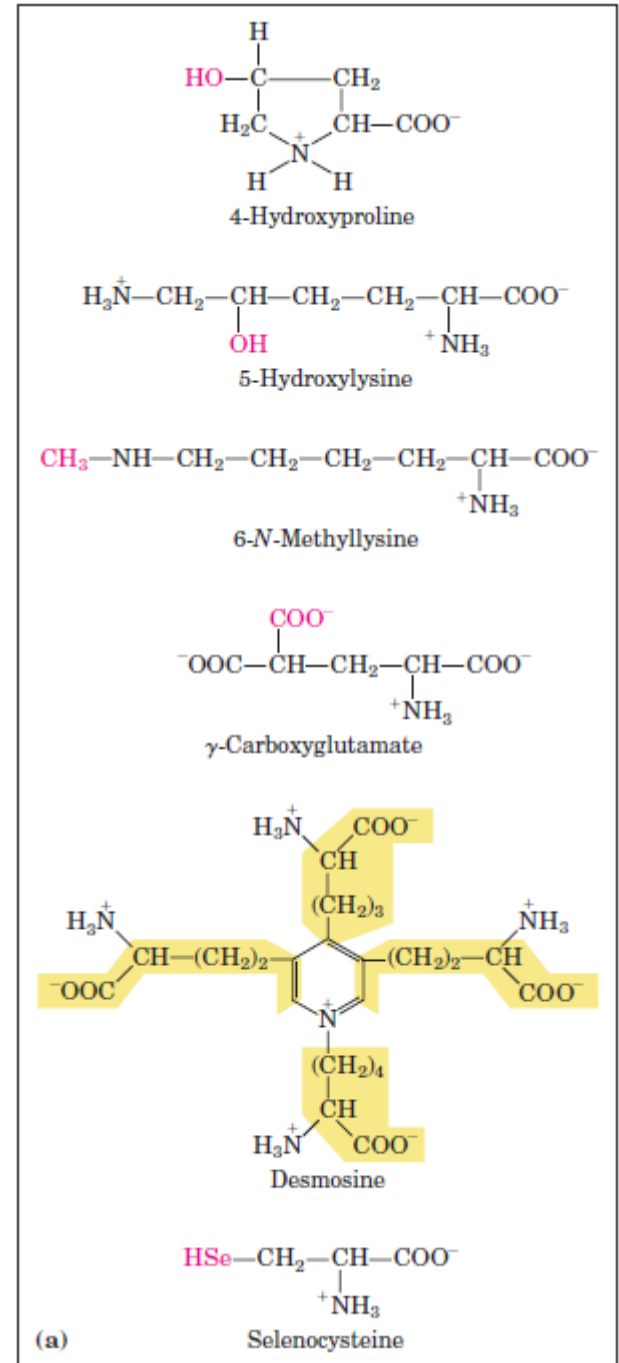
Proteinlere Özgü Bazı Değiştirilmiş Amino Asitler

- Miyozin proteini, lizin türevi olan 6-N-metillizin kalıntıları içerir.
- Kanın pıhtılaşmasında görev alan protrombin ve bazı kalsiyum bağlayıcı proteinler γ -karboksiglutamat taşır.
- Elastinde bulunan desmozin, dört lizin kalıntısından oluşan daha karmaşık bir amino asit türevidir.
- Desmozin, bağ dokusunda bulunan lifli elastin proteininin yapısal bileşenleri arasında yer alır.



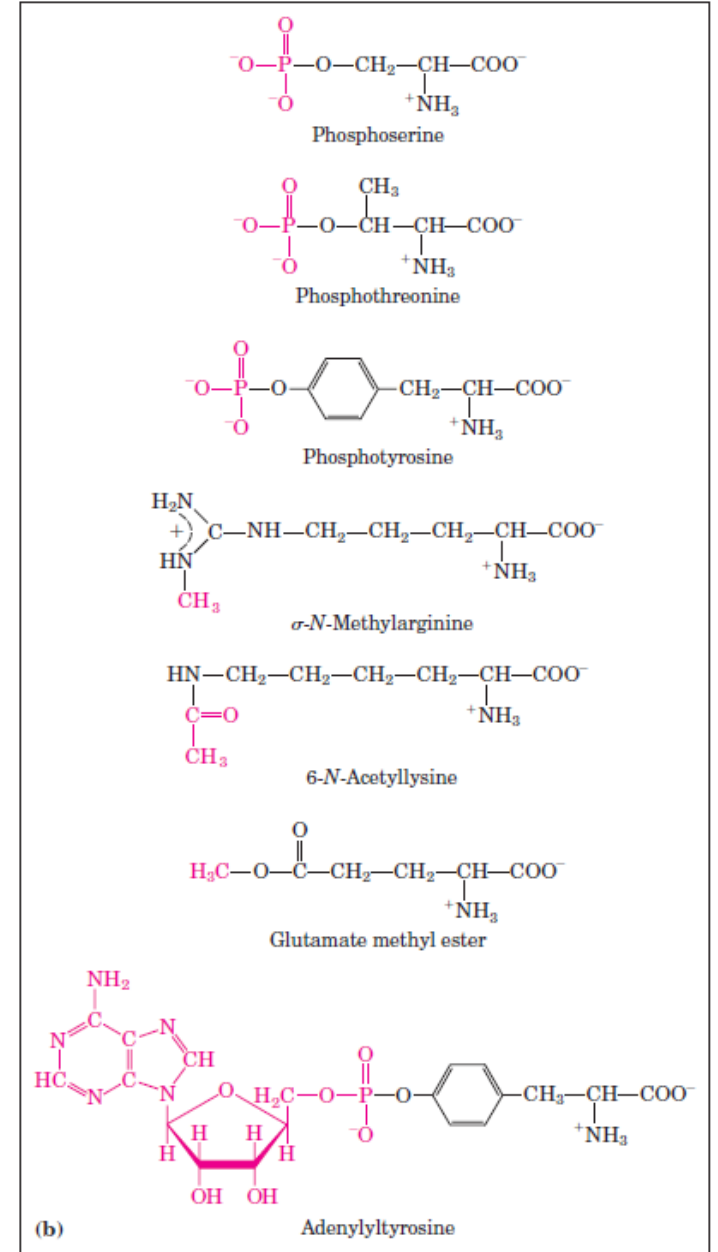
Selenosistein Özel Bir Amino Asittir

- Selenosistein, kükürt yerine selenyum atomu içeren ve sisteine benzeyen nadir bir amino asittir.
- Diğer bazı özel kalıntılardan farklı olarak, protein sentezinden sonra gerçekleştirilen bir değişiklik meydana gelmez.
- Selenosistein, serinden türetilir ve protein sentezi sırasında doğrudan oluşmakta olan proteine katılır.
- Bu özel amino asidin yalnızca birkaç proteinde bulunduğu bilinmektedir.



Geçici Protein Değişiklikleri

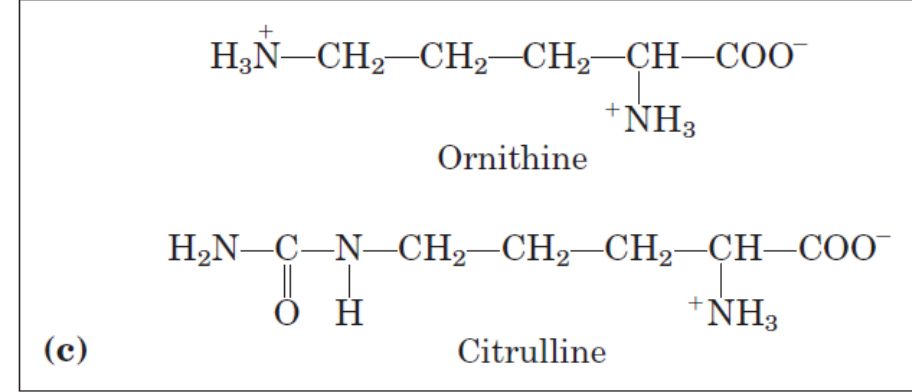
- Bazı protein kalıntıları, proteinin işlevini değiştirmek amacıyla geçici olarak kimyasal değişikliğe uğratılabilir.
- Fosforil, metil, asetil, adenil ve ADP-ribozil grupları belirli amino asitlere bağlanabilir.
- Bu grupların eklenmesi veya uzaklaştırılması, proteinin etkinliğini artırabilir ya da azaltabilir.
- Fosforilasyon, geçici düzenleyici değişikliklerin özellikle yaygın görülen bir örneğidir ve yandaki şekilde gösterilmiştir.





Proteinlerin Yapısına Katılmayan Amino Asitler

- Hücrelerde yaygın 20 amino aside ek olarak yaklaşık 300 farklı amino asit daha belirlenmiştir.
- Bu amino asitler çeşitli biyolojik işlevler üstlense de proteinlerin yapısal bileşenleri arasında yer almaz.
- Ornitin ve sitrülün, proteinlere katılmayan amino asitlerin önemli örnekleridir.
- Her iki amino asit de arginin biyosentezinde ve üre döngüsünde temel ara ürünler olarak görev yapar.





Amino Asitler Hem Asit Hem Baz Gibi Davranabilir

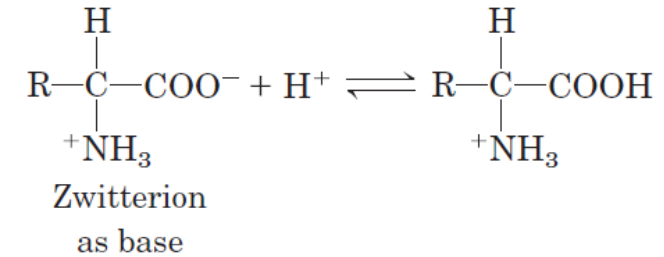
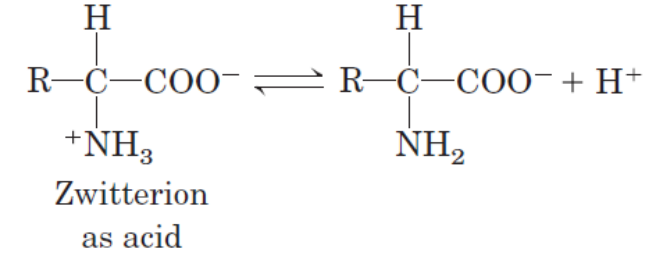
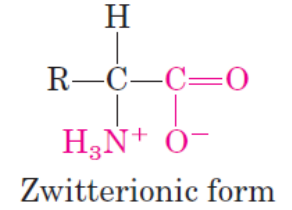
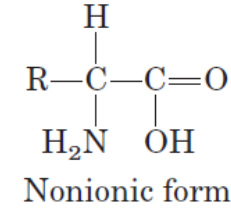
- Amino asitlerin amino ve karboksil grupları ile bazı R grupları iyonlaşabilir özelliktedir.
- İyonlaşabilir R grubu bulunmayan bir amino asit, nötr pH'taki sulu çözeltide dipolar iyon hâlinde bulunur.
- Zwitteriyon olarak adlandırılan bu yapı, hem proton verebilir hem de proton alabilir.
- Bu çift yönlü davranış nedeniyle amino asitler amfoterik bileşikler veya amfolitler olarak adlandırılır.





Amino Asitlerin Zwitteriyonik Yapısı

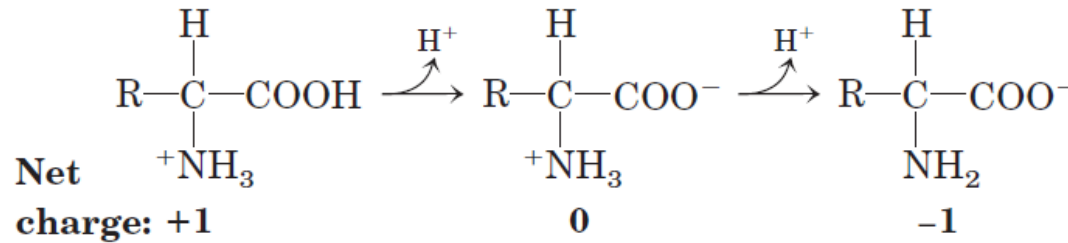
- Amino asitlerin yüksüz olarak çizilen non-iyonik biçimleri, sulu çözeltilerde önemli miktarlarda bulunmaz.
- Zwitteriyonik biçimde amino grubu pozitif, karboksil grubu ise negatif yük taşır.
- Zwitteriyon proton vererek asit, proton alarak baz gibi davranabilir.
- Amino asitlerin non-iyonik ve zwitteriyonik biçimleri ile asit–baz davranışları yandaki figürde gösterilmiştir.





Glisinin İyonlaşabilen Grupları

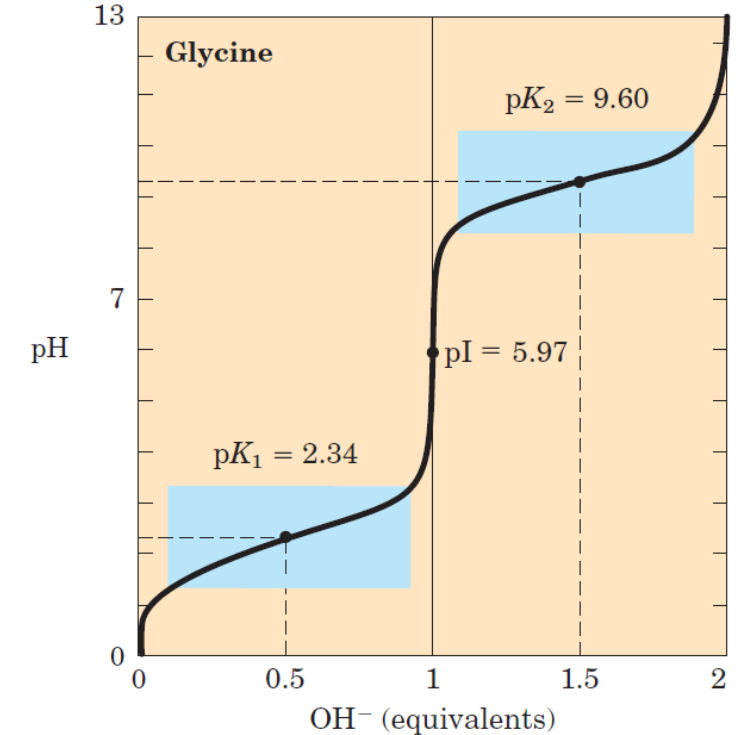
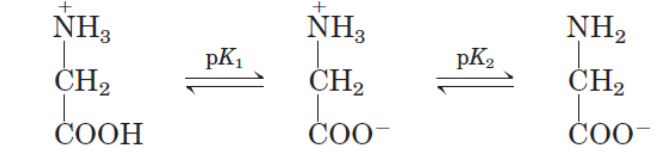
- Glisin gibi basit bir monoamino monokarboksilik α -amino asit, tamamen protonlandığında iki iyonlaşabilir grup taşır.
- Karboksil grubundaki protonun ayrılması, glisinin net yükünü +1'den 0'a düşürür.
- Amino grubundaki protonun daha sonra ayrılmasıyla net yük 0'dan -1'e iner.
- Glisinin protonlarını basamaklı biçimde kaybetmesi, çözeltinin pH'ına bağlı olarak gerçekleşir.





Amino Asitlerin Titrasyon Eğrileri

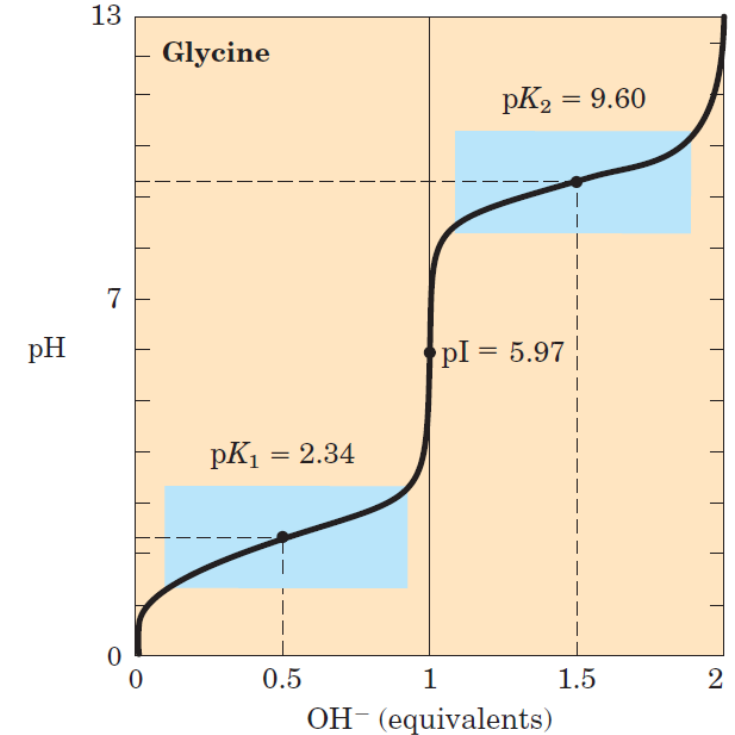
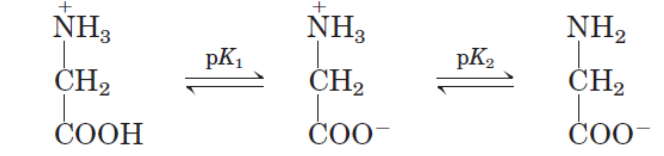
- Asit–baz titrasyonunda, başlangıçtaki asidik çözeltiye ölçülü miktarlarda baz eklenerek pH değişimi izlenir.
- Glisinin diprotik biçiminin NaOH ile titrasyonu, iki farklı iyonlaşabilir grubun proton kaybetmesini gösterir.
- Titrasyon eğrisindeki iki ayrı aşama, glisinin iki farklı grubunun de-protonlanmasına karşılık gelir.
- Glisinin titrasyon eğrisi ve baskın iyonik biçimleri yandaki figürde gösterilmiştir.





Glisinin İlk Titrasyon Aşaması

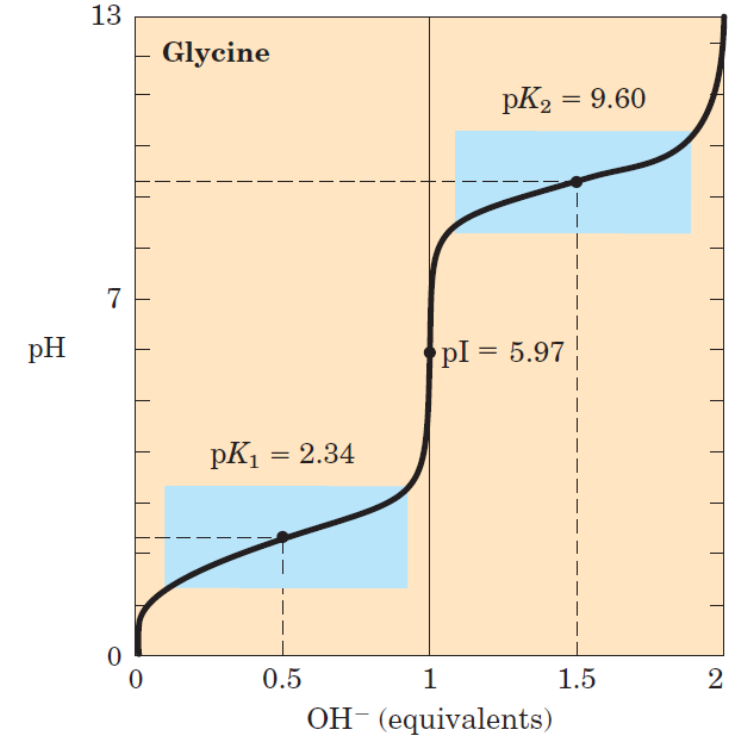
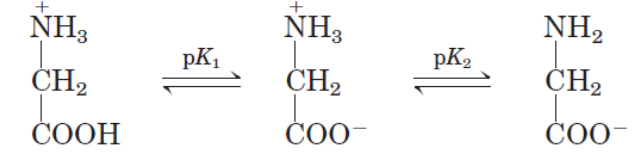
- Glisinin titrasyonunun ilk aşaması, monoproteik bir asidin titrasyon eğrisine benzer.
- Bu aşamada proton verici —COOH grubu ile proton alıcı —COO⁻ grubu birlikte bulunur.
- İlk aşamanın orta noktasında pH 2.34'tür ve bu değer karboksil grubunun pK_a değerine eşittir.
- Yandaki figürde karboksil grubuna ait bu değer pK₁ olarak gösterilmiştir.





Glisinin İzoelektrik Noktası

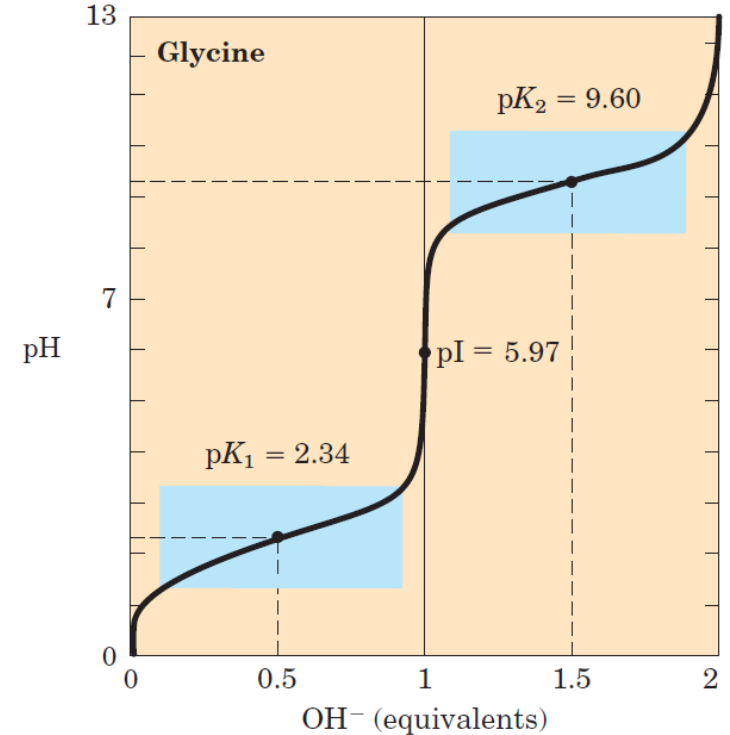
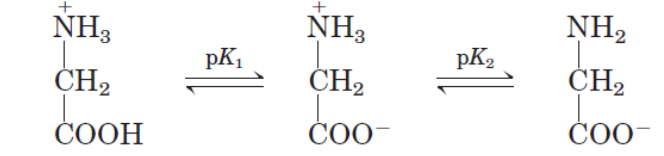
- Titrasyon ilerledikçe ilk protonun uzaklaştırılması tamamlanır ve amino grubundaki protonun ayrılması başlar.
- Bu geçişin ortasında glisinin baskın biçimi, net yükü sıfır olan dipolar zwitteriyondur.
- Glisinin net elektriksiz yük taşımadığı bu pH değeri izoelektrik nokta olarak adlandırılır.
- Glisinin izoelektrik noktası yandaki figürde pI 5.97 olarak gösterilmiştir.





Glisinin İkinci Titrasyon Aşaması

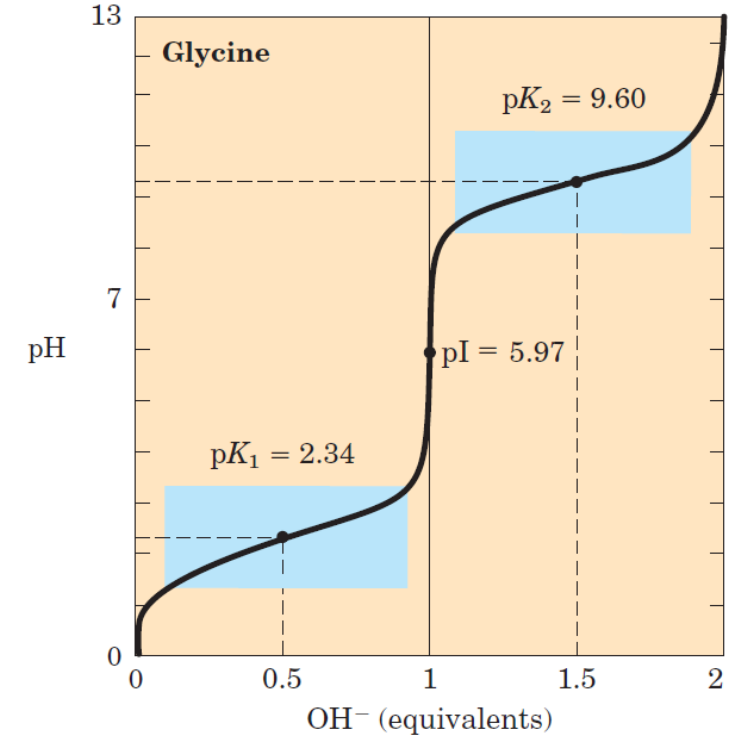
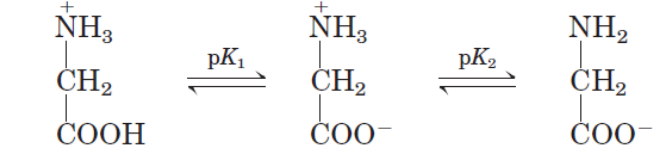
- Titrasyonun ikinci aşaması, glisinin protonlanmış amino grubundan proton uzaklaştırılmasına karşılık gelir.
- Bu aşamanın orta noktasında pH 9.60'tır ve protonlu ile protonsuz biçimler eşit miktarda bulunur.
- Amino grubuna ait pK_a değeri, yandaki figürde pK_2 9.60 olarak gösterilmiştir.
- Titrasyon ilerlediğinde glisinin baskın biçimi, net yükü -1 olan anyonik yapı hâline gelir.





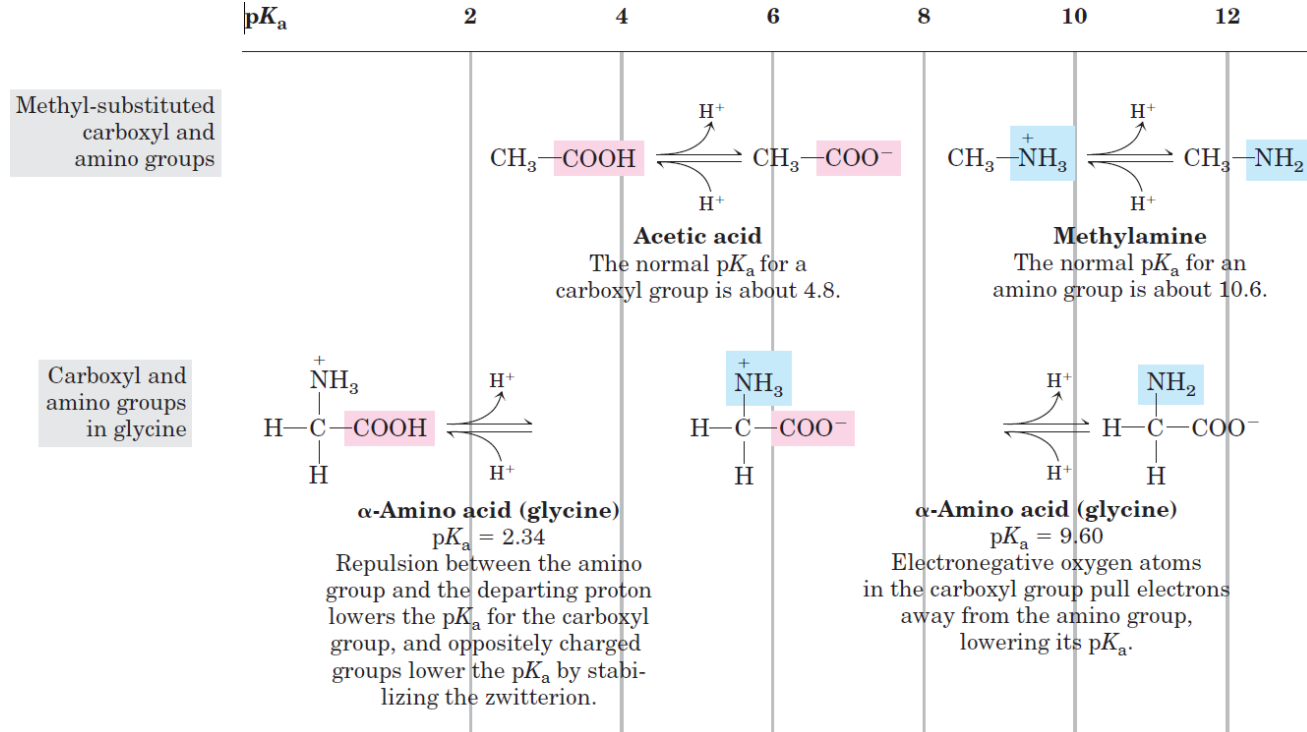
Titrasyon Eğrisi pK_a Değerlerini Gösterir

- Glisinin titrasyon eğrisi, moleküldeki iyonlaşabilir grupların pK_a değerlerinin nicel olarak belirlenmesini sağlar.
- Karboksil grubunun pK_a değeri 2.34, amino grubunun pK_a değeri ise 9.60'tır.
- —NH₃⁺ grubunun pK_a değeri, —COOH grubununkinden 100 kattan daha yüksek bir değere sahiptir.
- Bu fark, karboksil grubunun protonunu amino grubuna göre çok daha kolay verdiğini gösterir.



Kimyasal Çevre pK_a Değerini Değiştirir

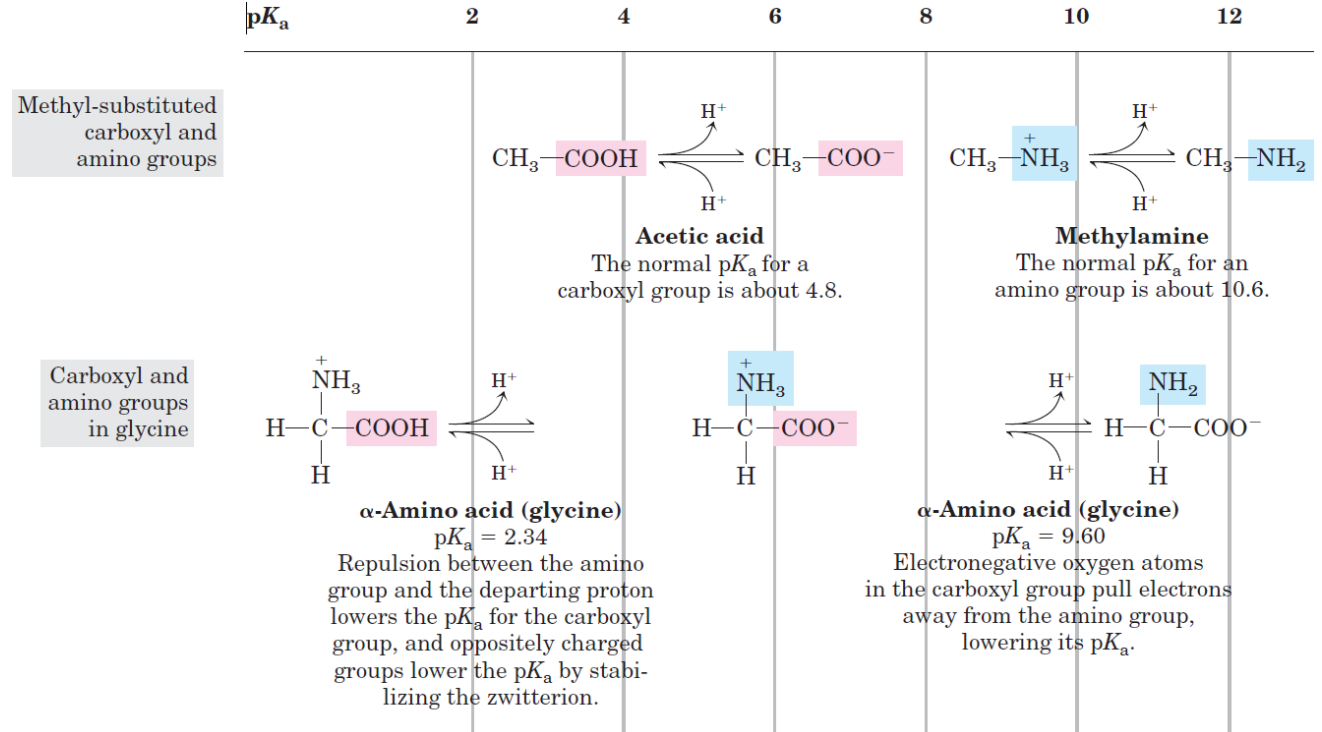
- Bir fonksiyonel grubun pK_a değeri yalnızca kendi yapısına değil, çevresindeki kimyasal gruplara da bağlıdır.
- Asetik asidin karboksil grubunun pK_a değeri 4,76 iken, glisindeki α -karboksil grubunun değeri 2.34'tür.
- Glisindeki pozitif yüklü amino grubu, karboksil grubundan proton ayrılmasını kolaylaştırarak karboksilat iyonunu kararlı hâle getirir.
- Kimyasal çevrenin karboksil ve amino gruplarının pK_a değerlerine etkisi yandaki figürde gösterilmiştir.





Amino Grubunun pK_a Değeri de Çevreden Etkilenir

- Metilaminin amino grubunun normal pK_a değeri 10.6 iken, glisinin amino grubunda bu değer 9.60'tır.
- Glisinin karboksil grubundaki elektronegatif oksijenler, elektronları amino grubundan kendilerine doğru çeker.
- Bu etki amino grubunun proton verme eğilimini artırır ve pK_a değerini düşürür.
- Yandaki figür, glisinin her iki iyonlaşabilir grubundaki pK_a değişimlerini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.





pK_a Değerleri Moleküler Ortama Duyarlıdır

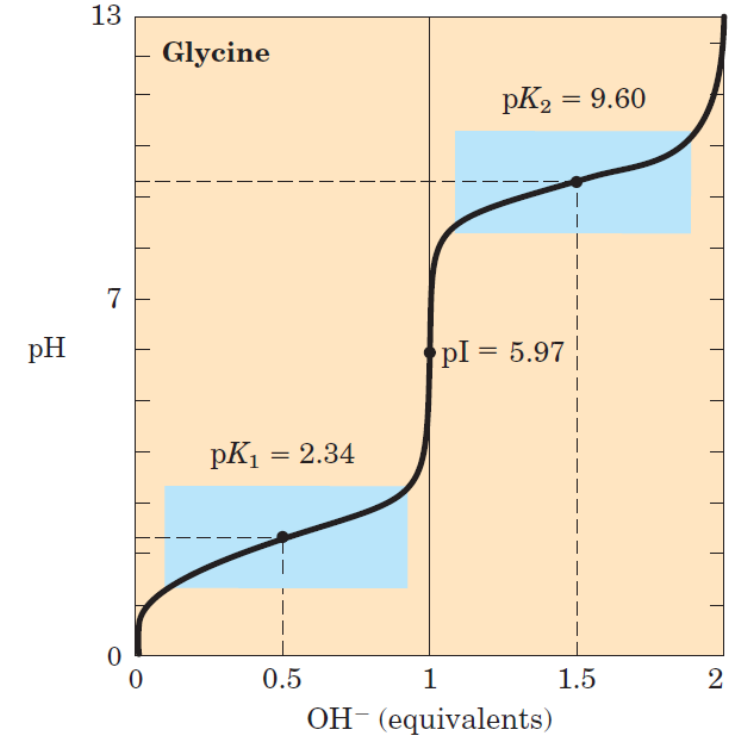
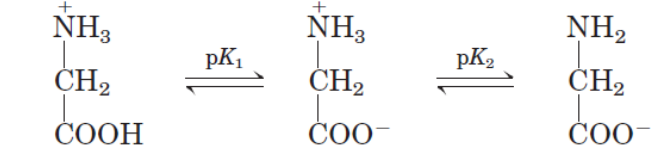
- İyonlaşabilir bir grubun pK_a değeri, içinde bulunduğu kimyasal çevreden büyük ölçüde etkilenebilir.
- Benzer değişimler, enzimlerin aktif bölgelerinde birbirine yakın konumlanan kimyasal gruplar arasında da ortaya çıkabilir.
- Enzimler, proton veren veya alan grupların değişen pK_a değerlerinden katalitik mekanizmalarında yararlanabilir.
- Bu nedenle serbest amino asitlerde gözlenen çevresel etkiler, proteinlerdeki işlevsel grupların davranışını anlamaya yardımcı olur.





Glisinin Tamponlama Bölgeleri

- Titrasyon eğrisi, glisinin pK_a değerlerinin çevresinde tamponlama gücü gösterdiği iki bölgeyi ortaya koyar.
- İlk tamponlama bölgesi pH 2.34'ün yaklaşık bir pH birimi altına ve üstüne uzanır.
- İkinci tamponlama bölgesi ise pH 9.60'ın yaklaşık bir pH birimi altını ve üstünü kapsar.
- Bu aralıkların dışında glisin, ilave edilen asit veya baza karşı güçlü bir tamponlama göstermez.





Glisinin Tamponlama Sınırları

- Glisin, hücre içi sıvı veya kandaki yaklaşık pH 7.4 çevresinde etkili bir tampon değildir.
- Bu pH değeri, glisinin her iki tamponlama bölgesinin dışında kalır.
- Henderson–Hasselbalch eşitliği, belirli bir pH'ta proton verici ve proton alıcı biçimlerin oranını hesaplamayı sağlar.
- Bu hesaplama, glisinin belirli koşullarda tampon olarak kullanılabilmesi için gereken oranları belirlemeye yardımcı olur.





Titrasyon Eğrisi Net Yük Değişimini Gösterir

- Amino asit titrasyon eğrisi, çözeltinin pH'ı ile molekülün ortalama net yükü arasındaki ilişkiyi gösterir.
- Glisin pI 5.97'de ağırlıklı olarak dipolar biçimde bulunur ve net elektriksel yük taşımaz.
- pI (izoelektrik nokta) değerinin üzerindeki pH'larda glisin net negatif, altındaki pH'larda ise net pozitif yük taşır.
- Bu nedenle glisinin elektrik alanındaki hareket yönü, ortam pH'ının pI değerine göre konumuna bağlıdır.

$$pI = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2) = \frac{1}{2} (2.34 + 9.60) = 5.97$$





İzoelektrik Noktada Elektriksel Hareket

- İzoelektrik nokta, molekülün net elektriksel yükünün sıfır olduğu karakteristik pH değeridir.
- Glisin pI değerinde bulunduğu anda elektrik alan uygulanmasına rağmen elektrotlardan herhangi birine yönelmez.
- pI üzerindeki glisin pozitif elektroda, pI altındaki glisin ise negatif elektroda doğru hareket eder.
- Çözelti pH'ı pI değerinden uzaklaştıkça molekülün net yükü ve elektriksel hareketi artar.





Glisinin İzoelektrik Noktası Nasıl Hesaplanır?

- Glisinin yan zincirinde iyonlaşabilir bir grup bulunmadığından pI değeri iki temel pK_a değerinden hesaplanabilir.
- İzoelektrik nokta, karboksil ve amino gruplarına ait pK_1 ile pK_2 değerlerinin aritmetik ortalamasıdır.
- Glisin için hesaplama $\frac{1}{2} (2.34 + 9.60)$ biçiminde yapılır.
- Bu hesaplama sonucunda glisinin izoelektrik noktası 5.97 olarak bulunur.

$$pI = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2) = \frac{1}{2} (2.34 + 9.60) = 5.97$$





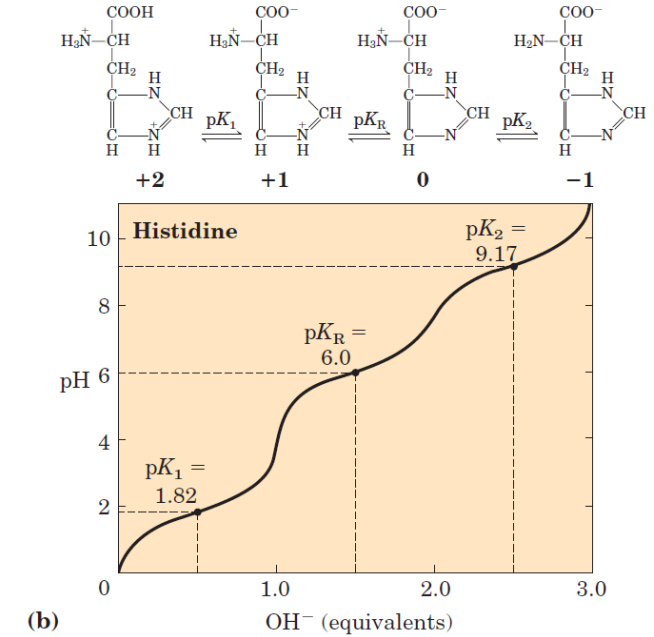
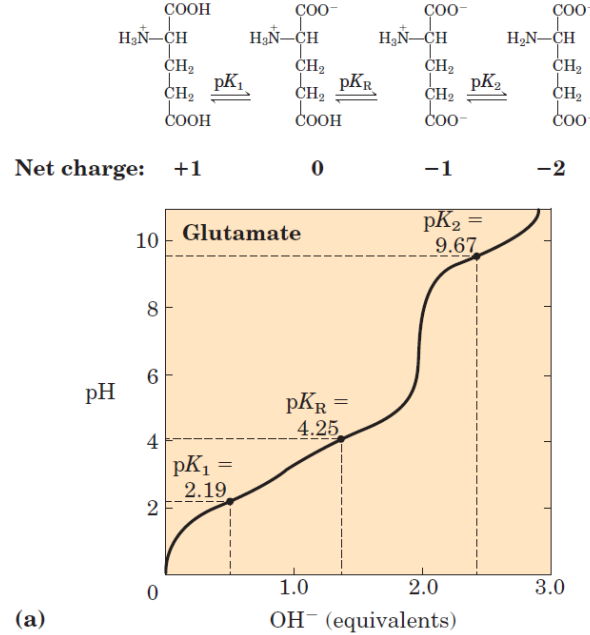
Amino Asitlerin Asit–Baz Özellikleri Farklılaşır

- Aynı α -amino, α -karboksil ve iyonlaşmayan R grubu düzenine sahip amino asitler glisine benzeyen titrasyon eğrileri gösterir.
- Bu amino asitlerde karboksil grubunun pK_a değeri yaklaşık 1.8–2.4 arasında değişir.
- Amino grubunun pK_a değeri ise yaklaşık 8.8–11.0 aralığında bulunur.
- pK_a değerlerindeki farklılıklar, her amino asidin R grubunun oluşturduğu kimyasal çevreden kaynaklanır.



İyonlaşabilir R Grupları Titrasyonu Karmaşıktır

- İyonlaşabilir R grubu taşıyan amino asitlerin titrasyon eğrilerinde üç ayrı iyonlaşma aşaması bulunur.
- Bu aşamalar, α -karboksil, α -amino ve iyonlaşabilir R grubunun proton kaybetmesine karşılık gelir.
- Yan zincirin titrasyonu diğer iki iyonlaşma aşamasıyla kısmen örtüşebilir.
- Glutamat ve histidinin üç aşamalı titrasyon eğrileri yandaki figürde gösterilmiştir.





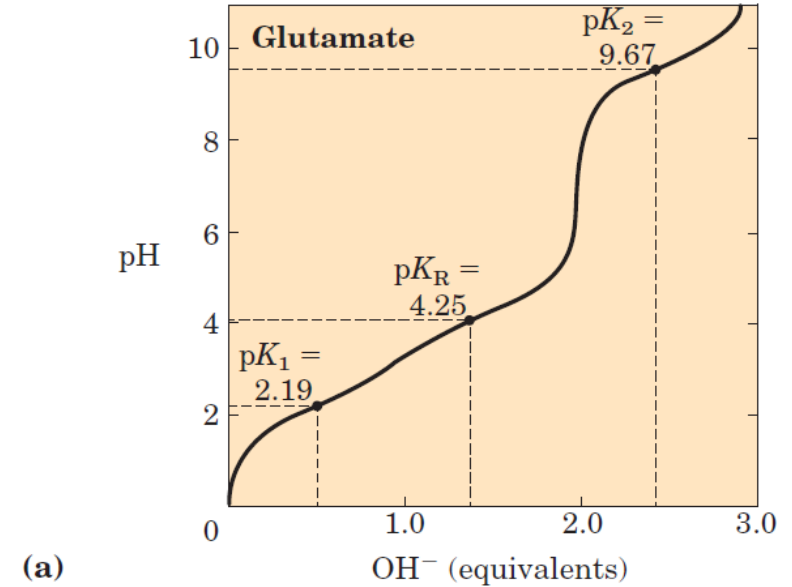
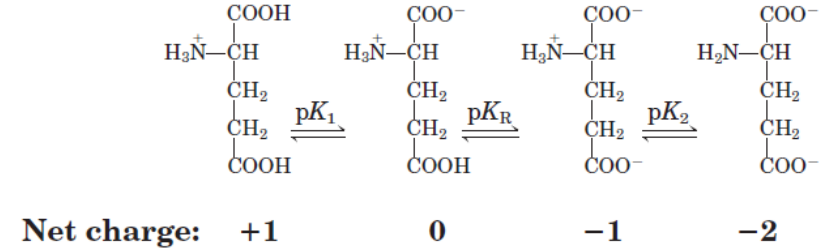
Glutamatın Titrasyon Eğrisi

- Glutamat, α -karboksil grubuna ek olarak R grubunda ikinci bir karboksil grubu taşır.
- Glutamatın pK_1 , pK_R ve pK_2 değerleri sırasıyla 2.19, 4.25 ve 9.67'dir.
- İkinci karboksil grubunun varlığı, glutamatın izoelektrik noktasını glisinden daha düşük bir değere indirir.
- Glutamatın proton kaybı ve net yük değişimleri yandaki figürde gösterilmiştir.

pK_1 : İlk iyonlaşan grup (genellikle α -karboksil)

pK_R : R grubunun pK_a 'sı

pK_2 : İkinci iyonlaşan grup (genellikle α -amino)





Glutamatın İzoelektrik Noktası

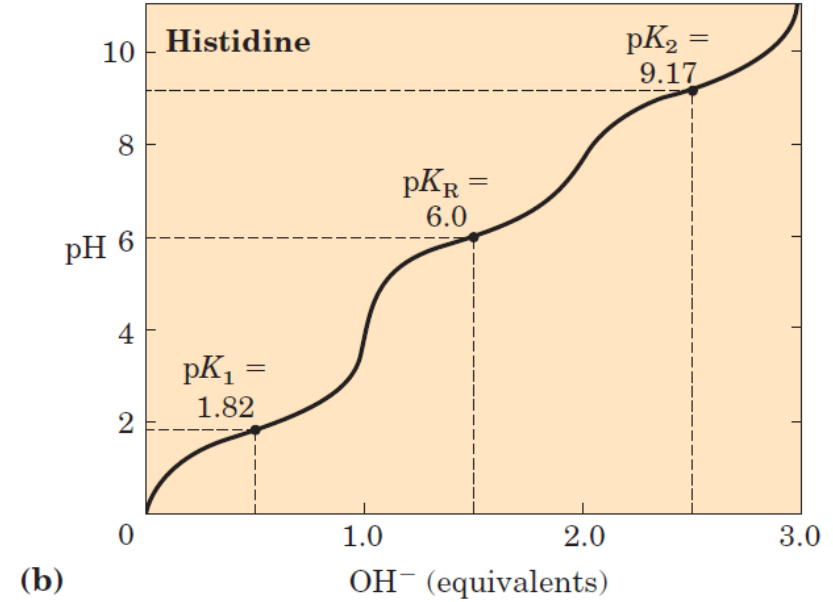
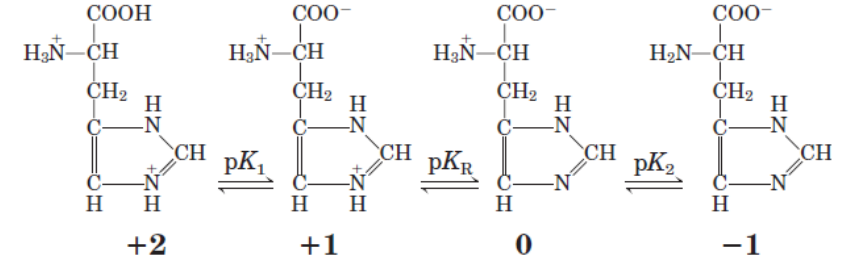
- Glutamatın izoelektrik noktası, molekülün net yüksüz biçimini çevreleyen iki düşük pK_a değerinden hesaplanır.
- Bu hesaplama sonucunda glutamatın pI değeri 3.22 olarak bulunur.
- Nötr pH 'ta iki karboksil grubu toplam -2 , protonlanmış amino grubu ise $+1$ yük oluşturur.
- Böylece glutamat, nötr pH 'ta toplam -1 net yüke sahip olur.





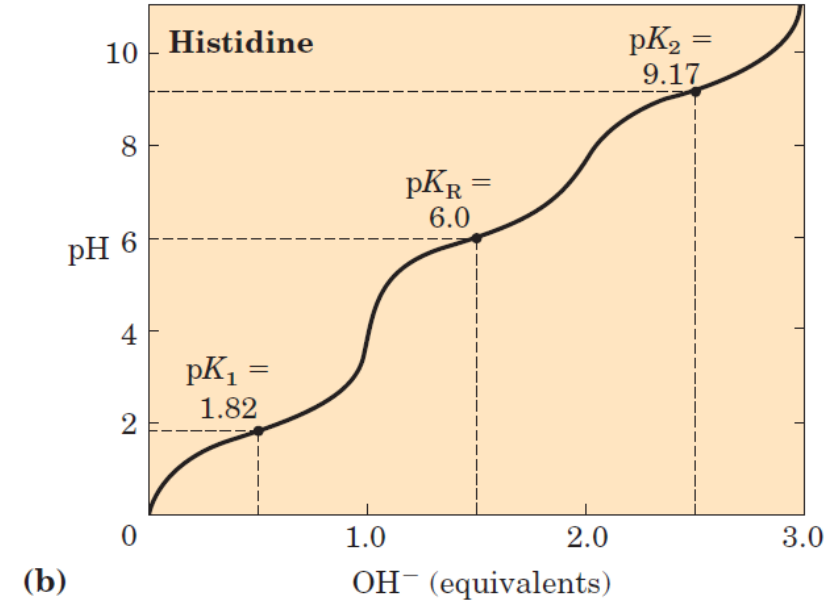
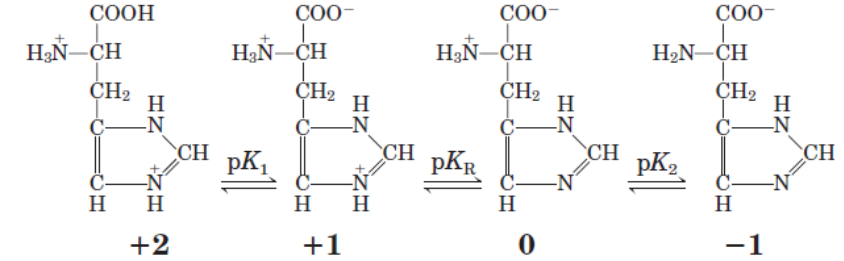
Histidinin Titrasyon Eğrisi

- Histidin, α -karboksil ve α -amino gruplarına ek olarak iyonlaşabilir imidazol yan zinciri taşır.
- Histidinin pK_1 , pK_R ve pK_2 değerleri sırasıyla 1.82, 6.0 ve 9.17'dir.
- Histidinin protonlanma durumu ve net yükündeki basamaklı değişimler yandaki figürde gösterilmiştir.
- İmidazol grubunun pK_a değerinin nötr pH'a yakınlığı, histidinin asit-baz davranışını belirgin biçimde etkiler.



Histidinin İzoelektrik Noktası ve Tamponlama Gücü

- Histidinin izoelektrik noktası, amino ve imidazol gruplarına ait iki pK_a değerinin ortalamasından hesaplanır.
- Bu hesaplamayla histidinin pI değeri 7.59 olarak belirlenir ve glisinin pI değerinden daha yüksek bulunur.
- İmidazol yan zincirinin pK_a değeri yaklaşık 6.0 olduğundan histidin nötr pH yakınında proton alıp verebilir.
- Histidin, bu özelliği sayesinde hayvan ve bakteri dokularındaki hücre içi ve hücre dışı sıvılarda tamponlama sağlayabilir.





Peptitler ve Proteinler Amino Asit Polimerleridir

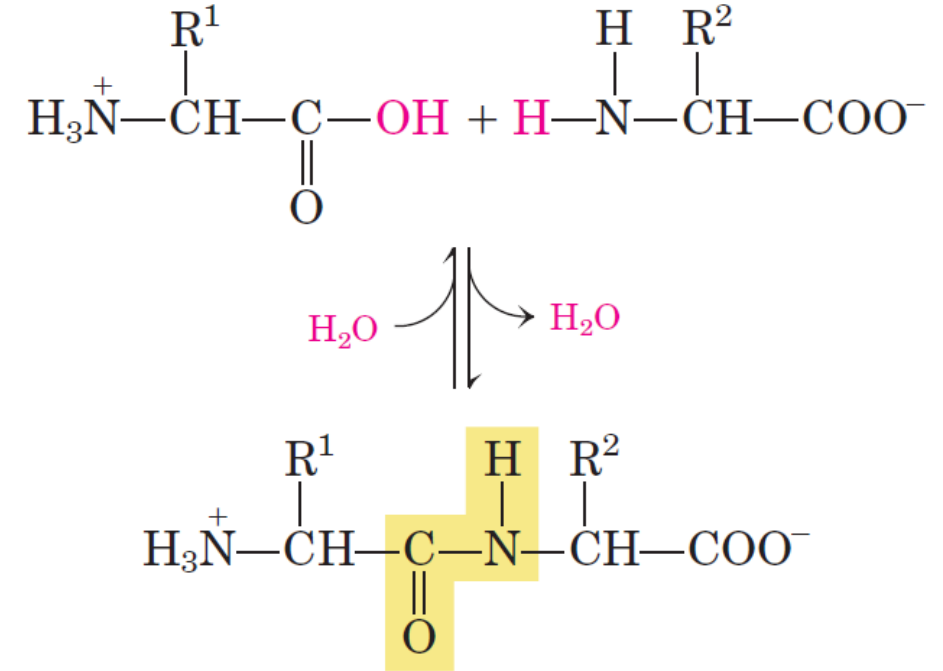
- Peptitler ve proteinler, amino asitlerin belirli bir düzen içinde birbirine bağlanmasıyla oluşan polimerlerdir.
- Doğal polipeptitler, yalnızca birkaç amino asitten binlerce amino asit kalıntısına kadar farklı uzunluklarda olabilir.
- Bu yapıların kimyasal özelliklerini anlamak için öncelikle amino asitleri birleştiren temel bağ incelenmelidir.

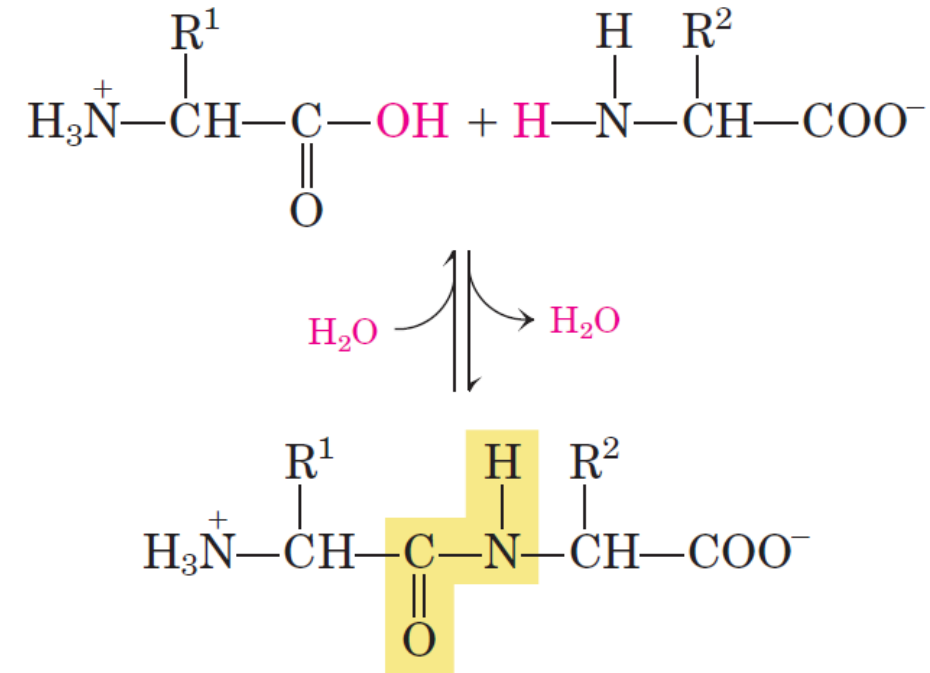




Amino Asitler Peptit Bağıyla Birleşir

- İki amino asit, süstitüe amid bağı niteliğindeki bir peptit bağıyla kovalent olarak birbirine bağlanabilir.
- Peptit bağı, bir amino asidin α -karboksil grubu ile diğerinin α -amino grubu arasında kurulur.
- Bağ oluşurken karboksil grubundan bir hidroksil, amino grubundan bir hidrojen uzaklaştırılarak su açığa çıkar.
- Peptit bağının kondensasyon yoluyla oluşumu yandaki figürde gösterilmiştir.







Peptit Zincirleri Uzunluklarına Göre Adlandırılır

- İki amino asidin tek peptit bağıyla birleşmesi sonucunda dipeptit oluşur.
- Üç amino asit tripeptit, dört amino asit tetrapeptit ve beş amino asit pentapeptit meydana getirir.
- Birkaç amino asitten oluşan kısa zincirler oligopeptit, çok sayıda amino asit içeren zincirler polipeptit olarak adlandırılır.
- Proteinler binlerce amino asit kalıntısı içerebilen bir veya daha fazla polipeptit zincirinden oluşabilir.





Peptit ve Protein Terimlerinin Kullanımı

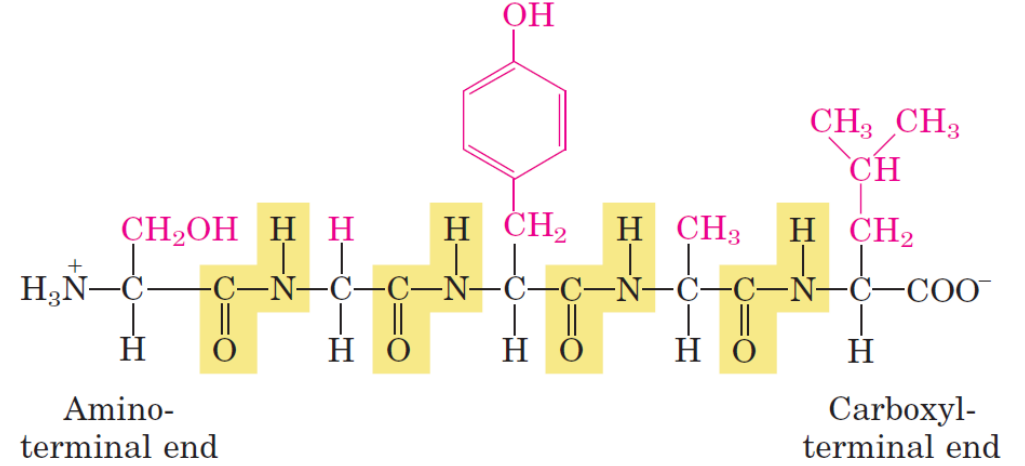
- Peptit ve polipeptit terimleri uygulamada zaman zaman birbirinin yerine kullanılabilir.
- Molekül kütlesi yaklaşık 10.000 Dalton'un altında bulunan yapılar genellikle peptit olarak adlandırılır.
- Bu sınırın üzerindeki moleküller ise çoğunlukla protein olarak değerlendirilir.
- Bununla birlikte peptitler ve proteinler arasındaki ayrım kesin bir molekül büyüklüğü sınırına dayanmaz.





Peptit Zincirinin İki Farklı Ucu Bulunur

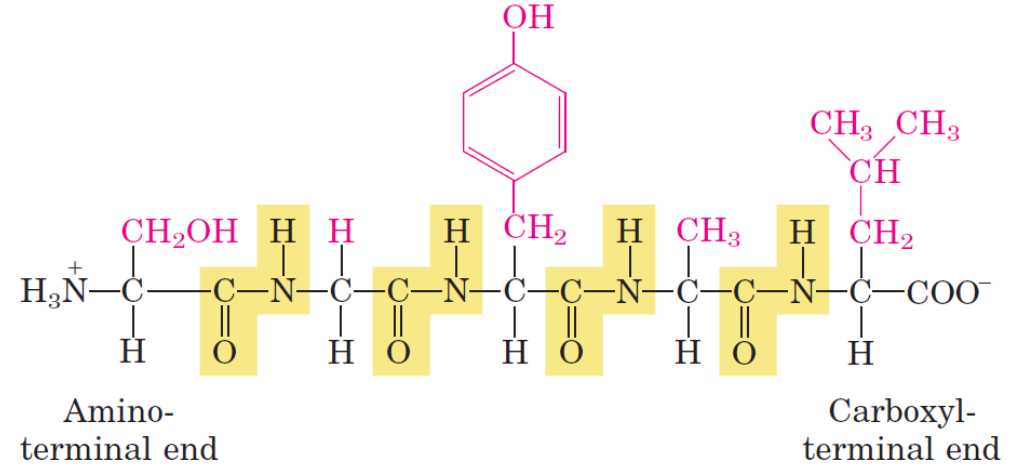
- Peptit içindeki her amino asit birimi, suyun bileşenlerini kaybettiği için amino asit kalıntısı olarak adlandırılır.
- Zincirin serbest α -amino grubu taşıyan ucundaki kalıntı amino-terminal veya N-terminal kalıntıdır.
- Serbest α -karboksil grubu taşıyan diğer uçtaki kalıntı ise karboksil-terminal veya C-terminal kalıntıdır.
- Peptit zincirinin amino ve karboksil uçları yandaki figürde gösterilmiştir.





Peptit Dizileri Belirli Bir Yönde Yazılır

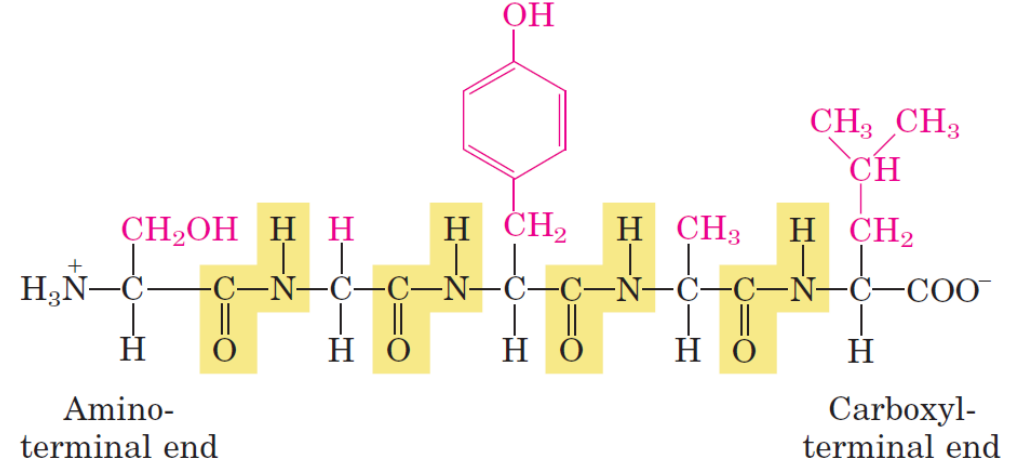
- Peptit veya protein dizisi gösterilirken amino-terminal kalıntı sol tarafa yerleştirilir.
- Karboksil-terminal kalıntı ise dizinin sağ tarafında bulunur.
- Amino asit dizisi, amino-terminal uçtan başlanarak soldan sağa doğru okunur.





Bir Pentapeptidin Yapısı ve Adlandırılması

- Yandaki figürde serin, glisin, tirozin, alanin ve lösinden oluşan bir pentapeptit gösterilmiştir.
- Bu peptit '*serilglisiltirozilalanillösin*' adıyla ifade edilir.
- Aynı dizi Ser–Gly–Tyr–Ala–Leu biçiminde veya SGYAL tek harfli koduyla da yazılabilir.
- Peptit adlandırılırken amino-terminal kalıntıdan başlanır ve yalnızca karboksil-terminal amino asidin tam adı kullanılır.





Peptit Bağları Hücresel Koşullarda Kararlıdır

- Peptit bağının hidrolizi enerji açığa çıkaran ekzergonik bir tepkimedir.
- Buna rağmen yüksek aktivasyon enerjisi nedeniyle bu hidroliz tepkimesi oldukça yavaş gerçekleşir.
- Çoğu hücre içi koşulda peptit bağlarının ortalama yarı ömrü yaklaşık yedi yıldır.
- Bu kinetik kararlılık, polipeptit zincirlerinin hücresel ortamda uzun süre korunabilmesini sağlar.





Peptitlerin İyonlaşabilen Grupları

- Peptitler, zincirin zıt uçlarında yalnızca bir serbest α -amino ve bir serbest α -karboksil grubu taşır.
- Bu uç gruplar, serbest amino asitlerde olduğu gibi iyonlaşabilir ancak iyonlaşma sabitleri farklı olabilir.
- Peptit bağlarına katılan α -amino ve α -karboksil grupları ise artık iyonlaşamaz.
- Bu nedenle peptitlerin asit–baz davranışına yalnızca serbest uç gruplar ile iyonlaşabilir R grupları katkıda bulunur.





Peptidin Net Yükü Yapısından Öngörülebilir

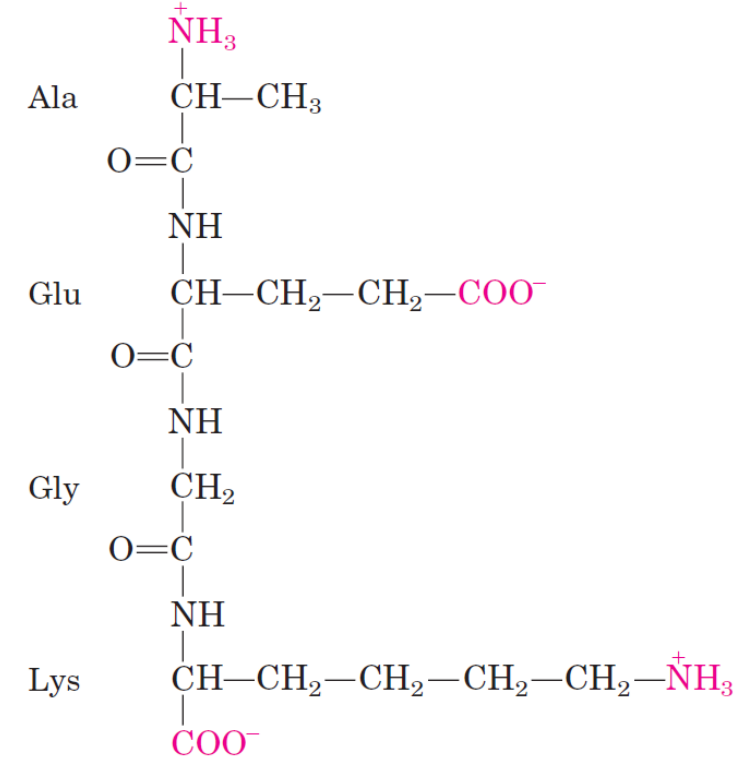
- Peptidin toplam asit–baz davranışı, serbest uç gruplar ile iyonlaşabilir R gruplarının özelliklerine bağlıdır.
- Peptidin net yükü, pH ile iyonlaşabilir grupların sayısı ve yapısı dikkate alınarak tahmin edilebilir.
- Peptitler de serbest amino asitler gibi karakteristik titrasyon eğrilerine ve izoelektrik noktalara sahiptir.
- Ancak peptitler, izoelektrik noktalarında mutlaka elektriksel bir alan içinde hareketsiz kalmaz.





İyonlaşabilen Bir Tetrapeptit Örneği

- Yandaki figürde '*alanilglutamilglisillizin*' dizisine sahip bir tetrapeptidin yapısı gösterilmektedir.
- Bu tetrapeptit bir serbest α -amino grubu, bir serbest α -karboksil grubu ve iki iyonlaşabilir R grubu taşır.
- Glutamatın karboksil yan zinciri ile lizinin amino yan zinciri peptidin toplam yüküne katkıda bulunur.
- Yandaki figürde pH 7.0'da iyonlaşmış durumda bulunan gruplar kırmızı renkle gösterilmiştir.





Peptitlerde R Gruplarının pK_a Değerleri Değişebilir

- Bir peptitteki iyonlaşabilir R grubunun pK_a değeri, serbest amino asitteki değerinden farklı olabilir.
- Değişimin yönü ve büyüklüğü, grubun yakınındaki diğer R gruplarıyla ve çevresel etkenlerle kurduğu etkileşimlere bağlıdır.
- Serbest amino asitler için bilinen pK_a değerleri, peptitlerdeki R grupları için yaklaşık bir rehber sağlar.
- Ancak bu değerler, peptitlerin özel moleküler çevrelerine kesin biçimde uygulanamaz.





Biyolojik Peptit ve Proteinlerin Büyüklükleri Değişkendir

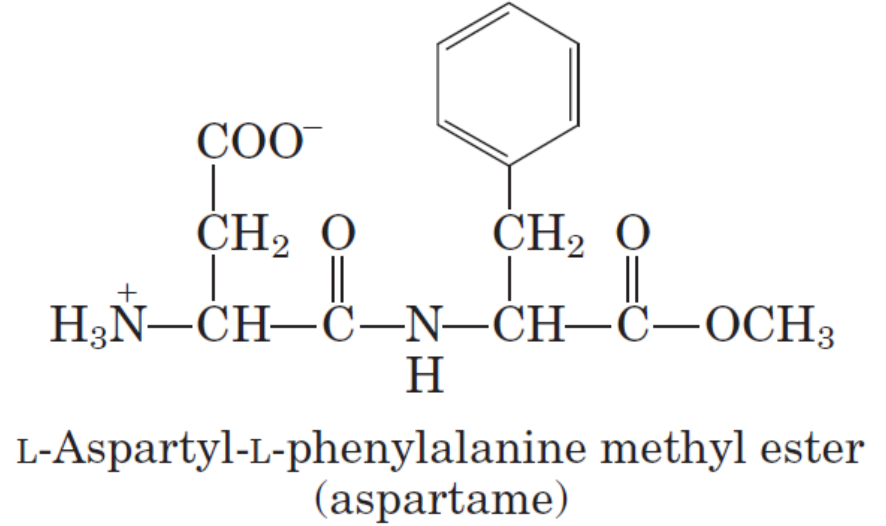
- Biyolojik olarak etkin peptitler ve proteinler için geçerli tek bir molekül büyüklüğü genellemesi yapılamaz.
- Doğal peptitlerin uzunlukları iki amino asitten binlerce amino asit kalıntısına kadar uzanabilir.
- En küçük peptitler bile canlı sistemlerde önemli biyolojik etkiler oluşturabilir.





Küçük Peptitler Önemli İşlevler Üstlenebilir

- Ticari olarak üretilen aspartam, yalnızca iki amino asit kalıntısı içeren bir dipeptit türevidir.
- Aspartam, L-aspartil-L-fenilalanin metil ester yapısında yapay bir tatlandırıcıdır.
- Omurgalı hormonlarının bir bölümü, çok düşük derişimlerde etkili olabilen küçük peptitlerden oluşur.
- Oksitosin dokuz, tirotropin salgılatıcı faktör ise üç amino asit kalıntısı içerir.





Zehirler ve Antibiyotikler Arasında Küçük Peptitler Bulunur

- Oksitosin arka hipofizden salgılanır ve rahim kasılmalarını uyarır.
- Tirotropin salgılatıcı faktör hipotalamustan salgılanarak ön hipofizden tirotropin salınmasını uyarır.
- Amanitin gibi bazı son derece zehirli mantar toksinleri küçük peptit yapısındadır.
- Bazı antibiyotikler de biyolojik etkinliğe sahip küçük peptitler arasında yer alır.





Proteinlerin Zincir Uzunlukları Büyük Farklılıklar Gösterir

- İnsan sitokrom c proteini, tek polipeptit zincirinde birbirine bağlanmış 104 amino asit içerir.
- Sığır pankreas kimotripsinojeni 245 amino asitten oluşur.
- Titin yaklaşık 27.000 amino asit ve yaklaşık 3.000.000 molekül kütlesiyle çok daha büyük bir proteindir.
- Bununla birlikte doğal proteinlerin çoğu, 2.000'den daha az amino asit içerir.





Proteinlerin Moleküler Özellikleri Karşılaştırılabilir

- Yandaki tablo, bazı proteinlerin molekül kütlelerini, amino asit sayılarını ve polipeptit zinciri sayılarını birlikte göstermektedir.
- Tablodaki örnekler, protein büyüklüğünün ve zincir sayısının proteinler arasında geniş ölçüde değişebildiğini ortaya koyar.
- Küçük proteinler genellikle tek zincirliken, bazı büyük proteinler çok sayıda polipeptit zinciri taşıyabilir.
- Örneğin glutamin sentetaz 12, RNA polimeraz ise beş polipeptit zincirinden oluşur.

Molecular Data on Some Proteins			
	Molecular weight	Number of residues	Number of polypeptide chains
Cytochrome <i>c</i> (human)	12,400	104	1
Ribonuclease A (bovine pancreas)	13,700	124	1
Lysozyme (chicken egg white)	14,300	129	1
Myoglobin (equine heart)	16,700	153	1
Chymotrypsin (bovine pancreas)	25,200	241	3
Chymotrypsinogen (bovine)	25,700	245	1
Hemoglobin (human)	64,500	574	4
Serum albumin (human)	66,000	609	1
Hexokinase (yeast)	107,900	972	2
RNA polymerase (<i>E. coli</i>)	450,000	4,158	5
Apolipoprotein B (human)	513,000	4,536	1
Glutamine synthetase (<i>E. coli</i>)	619,000	5,628	12
Titin (human)	2,993,000	26,926	1





Proteinler Tek veya Birden Fazla Zincir Taşıyabilir

- Bazı proteinler yalnızca tek bir polipeptit zincirinden oluşurken, diğerleri birden fazla zincir içerir.
- Çok zincirli proteinlerde polipeptit zincirleri birbirinin aynı veya birbirinden farklı olabilir.
- Aynı proteindeki ayrı polipeptit zincirleri, proteinin alt birimleri olarak adlandırılır.
- En az iki özdeş alt birim taşıyan proteinler oligomerik proteinler olarak tanımlanır.





Oligomerik Proteinlerde Protomer Kavramı

- Oligomerik bir proteindeki tekrarlayan yapısal birimler bir veya daha fazla polipeptit zincirinden oluşabilir.
- Bu tekrarlayan özdeş birimlerin her biri protomer olarak adlandırılır.
- Hemoglobin, ikisi α ve ikisi β olmak üzere toplam dört polipeptit zinciri içerir.
- Protein, dört zincirli bir tetramer veya iki $\alpha\beta$ protomerinden oluşan bir dimer olarak değerlendirilebilir.





Bazı Polipeptit Zincirleri Kovalent Bağlarla Birleşir

- Çok zincirli proteinlerin polipeptitleri çoğunlukla kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla bir arada tutulur.
- Bazı proteinlerde ise iki veya daha fazla polipeptit zinciri kovalent bağlarla birbirine bağlanabilir.
- İnsülindeki iki polipeptit zinciri, zincirler arasında kurulan disülfid bağlarıyla bir arada tutulur.
- İnsülin polipeptitleri, ayrı alt birimler yerine geleneksel olarak zincirler şeklinde adlandırılır.





Proteinlerin Amino Asit Bileşimleri Farklıdır

- Proteinlerin amino asit bileşimi, farklı proteinler arasında büyük ölçüde değişebilir.
- Yaygın 20 amino asit bir proteinde yaklaşık eşit miktarlarda bulunmak zorunda değildir.
- Bazı amino asitler belirli bir proteinde yalnızca bir kez yer alırken, diğerleri çok sayıda bulunabilir.
- Protein bileşimindeki bu değişkenlik, yandaki tabloda iki farklı protein üzerinden gösterilmiştir.

Amino Acid Composition of Two Proteins		
Amino acid	Number of residues per molecule of protein*	
	Bovine cytochrome c	Bovine chymotrypsinogen
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	14
Asp	3	9
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Total	104	245





Farklı Proteinler Farklı Amino Asit Dağılımları Gösterir

- Yandaki tablo, sığır sitokrom c ve sığır kimotripsinojeninin amino asit bileşimlerini karşılaştırmaktadır.
- Sitokrom c ile kimotripsinojen, farklı işlevlerine paralel olarak amino asitlerin göreceli miktarları bakımından belirgin biçimde ayrılır.
- Sitokrom c 104, kimotripsinojen ise 245 amino asitten oluşur.
- Tablodaki sayılar, her proteinin kendine özgü bir amino asit bileşimine sahip olduğunu göstermektedir.

Amino Acid Composition of Two Proteins		
Amino acid	Number of residues per molecule of protein*	
	Bovine cytochrome c	Bovine chymotrypsinogen
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	14
Asp	3	9
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Total	104	245





Aminoasit Sayısı Molekül Kütlesinden Yaklaşık Olarak Hesaplanabilir

- Yalnızca amino asitlerden oluşan basit bir proteindeki yaklaşık kalıntı sayısı, molekül kütlesinden hesaplanabilir.
- Yaygın 20 amino asidin ortalama molekül kütlesi yaklaşık 138 Dalton'dur.
- Proteinlerdeki amino asitlerin bulunma sıklıkları dikkate alındığında ağırlıklı ortalama yaklaşık 128 Dalton'a yaklaşır.
- Her peptit bağı oluşurken su uzaklaştırıldığı için proteinlerdeki bir amino asit kalıntısının ortalama kütlesi yaklaşık 110 Dalton'dur.





Bazı Proteinler Yalnızca Amino Asitlerden Oluşur

- Ribonükleaz A ve kimotripsin gibi birçok protein yalnızca amino asit kalıntıları içerir.
- Amino asitler dışında kalıcı bir kimyasal bileşen taşımayan bu yapılar basit proteinler olarak değerlendirilir.
- Ancak proteinlerin kimyasal bileşimi, yalnızca polipeptit zincirlerinden oluşan bu temel yapıyla sınırlı değildir.





Konjuge Proteinler Ek Kimyasal Bileşenler Taşır

- Bazı proteinler, amino asitlere ek olarak proteinle kalıcı biçimde ilişkili kimyasal bileşenler içerir.
- Bu tür proteinler konjuge proteinler, amino asit dışındaki bileşenleri ise prostetik grup olarak adlandırılır.
- Konjuge proteinler, prostetik gruplarının kimyasal yapısına göre sınıflandırılır.
- Prostetik gruplar çoğunlukla proteinin biyolojik işlevinde önemli bir rol üstlenir.





Konjuge Proteinlerin Başlıca Sınıfları

- Lipoproteinler lipit, glikoproteinler şeker grupları, metalloproteinler ise belirli metal iyonları içerir.
- Bazı konjuge proteinler birden fazla prostetik grubu aynı yapı içinde taşıyabilir.
- Prostetik grubun niteliği, konjuge proteinin kimyasal özelliklerini ve işlevsel kapasitesini belirleyen unsurlardan biridir.





Konjuge Proteinler Farklı Prostetik Gruplar Taşır

- Konjuge proteinler, polipeptit zincirlerine ek olarak kalıcı biçimde bağlanmış prostetik gruplar içerir.
- Bu proteinler, yapılarındaki prostetik grubun kimyasal niteliğine göre farklı sınıflara ayrılır.
- Lipitler, karbonhidratlar, fosfat grupları, hem, flavin nükleotitleri ve metaller başlıca prostetik grup örnekleridir.
- Konjuge protein sınıfları, prostetik grupları ve örnekleri yandaki tabloda verilmiştir.

Conjugated Proteins		
Class	Prosthetic group	Example
Lipoproteins	Lipids	β_1 -Lipoprotein of blood
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G
Phosphoproteins	Phosphate groups	Casein of milk
Hemoproteins	Heme (iron porphyrin)	Hemoglobin
Flavoproteins	Flavin nucleotides	Succinate dehydrogenase
Metalloproteins	Iron	Ferritin
	Zinc	Alcohol dehydrogenase
	Calcium	Calmodulin
	Molybdenum	Dinitrogenase
	Copper	Plastocyanin





Konjuge Proteinlerin Başlıca Örnekleri

- Kandaki β_1 -lipoprotein lipid, immüoglobulin G ise karbonhidrat yapısında prostetik grup taşır.
- Fosfoproteinlerden kazein fosfat grupları, hemoglobin ise demir porfirin yapısındaki hem grubunu içerir.
- Süksinat dehidrogenaz, flavoprotein sınıfında yer alır ve prostetik grup olarak flavin nükleotidi taşır.
- Bu proteinlerin sınıflandırılması ve prostetik grupları yandaki tabloda karşılaştırılmıştır.

Conjugated Proteins		
Class	Prosthetic group	Example
Lipoproteins	Lipids	β_1 -Lipoprotein of blood
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G
Phosphoproteins	Phosphate groups	Casein of milk
Hemoproteins	Heme (iron porphyrin)	Hemoglobin
Flavoproteins	Flavin nucleotides	Succinate dehydrogenase
Metalloproteins	Iron	Ferritin
	Zinc	Alcohol dehydrogenase
	Calcium	Calmodulin
	Molybdenum	Dinitrogenase
	Copper	Plastocyanin





Metalloproteinler Farklı Metal İyonları İçerebilir

- Metalloproteinlerin yapısında demir, çinko, kalsiyum, molibden veya bakır gibi metal iyonları bulunabilir.
- Ferritin demir, alkol dehidrogenaz çinko ve kalmodulin kalsiyum içeren metalloproteinlere örnektir.
- Dinitrogenaz molibden, plastosiyanin ise bakır içeren metalloproteinler arasında yer alır.
- Metal içeren konjuge proteinlerin örnekleri yandaki tabloda toplu olarak sunulmuştur.

Conjugated Proteins		
Class	Prosthetic group	Example
Lipoproteins	Lipids	β_1 -Lipoprotein of blood
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G
Phosphoproteins	Phosphate groups	Casein of milk
Hemoproteins	Heme (iron porphyrin)	Hemoglobin
Flavoproteins	Flavin nucleotides	Succinate dehydrogenase
Metalloproteins	Iron	Ferritin
	Zinc	Alcohol dehydrogenase
	Calcium	Calmodulin
	Molybdenum	Dinitrogenase
	Copper	Plastocyanin





Proteinlerle Çalışmanın Temel Gereklilikleri

- Proteinlerin yapı ve işlevlerine ilişkin bilgiler, çok sayıda farklı proteinin ayrı ayrı incelenmesiyle elde edilmiştir.
- Bir proteini ayrıntılı incelemek için öncelikle onu diğer proteinlerden saf biçimde ayırmak gerekir.
- Araştırmacı, proteinin saf olduğunu gösterebilmeli ve özelliklerini belirleyebilecek yöntemleri kullanabilmelidir.
- Proteinlerin ayrılması ve incelenmesi için geliştirilen yöntemler biyokimyasal araştırmaların merkezinde yer alır.





Protein Saflaştırmanın Amacı

- Bir proteinin özelliklerinin ve etkinliklerinin güvenilir biçimde belirlenebilmesi için saf bir preparata ihtiyaç duyulur.
- Hücreler binlerce farklı protein içerdiğinden, bu proteinlerden yalnızca birinin saflaştırılması sistematik bir yaklaşım gerektirir.
- Proteinler büyüklük, elektriksel yük ve bağlanma özellikleri gibi birbirinden farklı özelliklerinden yararlanılarak ayrılır.
- DNA klonlama ve genom dizileme yöntemleri bazı durumlarda protein saflaştırma sürecini kolaylaştırabilir.



Protein Saflaştırma Hücresel Ekstraktla Başlar

- Saflaştırılacak proteinin kaynağı çoğunlukla bir doku veya mikroorganizmadır.
- İlk aşamada hücreler parçalanır ve proteinlerin çözeltiye geçmesi sağlanır.
- Hücrelerin parçalanmasıyla oluşan protein içeren çözelti ham ekstrakt olarak adlandırılır.
- Gerektiğinde diferansiyel santrifüj kullanılarak hücre altı fraksiyonlar veya belirli organeller ayrılabilir.



Proteinler Fraksiyonlama Yoluyla Ayrılır

- Ham ekstrakt hazırlandıktan sonra proteinleri saflaştırmak için farklı ayırma yöntemlerinden yararlanılır.
- Proteinlerin büyüklük veya yük gibi özelliklerine göre farklı fraksiyonlara ayrılması fraksiyonlama olarak adlandırılır.
- Saflaştırmanın ilk aşamalarında genellikle çözünürlük farklılıklarından yararlanan yöntemler tercih edilir.
- Protein çözünürlüğü pH, sıcaklık, tuz derişimi ve diğer ortam özelliklerinin etkisi altında değişir.





Tuzla Çöktürme Protein Çözünürlüğünden Yararlanır

- Yüksek tuz derişimleri bazı proteinlerin çözünürlüğünü azaltarak çözeltiden çökmelerine yol açabilir.
- Bu olay “tuzla çöktürme” olarak adlandırılır ve farklı proteinlerin seçici biçimde ayrılmasını sağlayabilir.
- Belirli tuzların eklenmesi bazı proteinleri çöktürürken diğerlerinin çözeltide kalmasına izin verir.
- Amonyum sülfat, proteinleri tuzla çöktürmek amacıyla yaygın olarak kullanılan etkili bir tuzdur.





Diyaliz Küçük Çözünmüş Maddeleri Uzaklaştırır

- Tuzla çöktürülen proteinler, geride kalan çözeltiden santrifüj yoluyla ayrılabilir.
- Proteini içeren çözelti, sonraki saflaştırma aşamalarından önce diyaliz işlemine alınabilir.
- Diyalizde protein çözeltisi, yarı geçirgen bir zarla çevrili torba içine yerleştirilir.
- Zar küçük moleküllerin geçişine izin verirken büyük proteinleri torbanın içinde tutar.





Diyaliz Denge Oluşuncaya Kadar Devam Eder

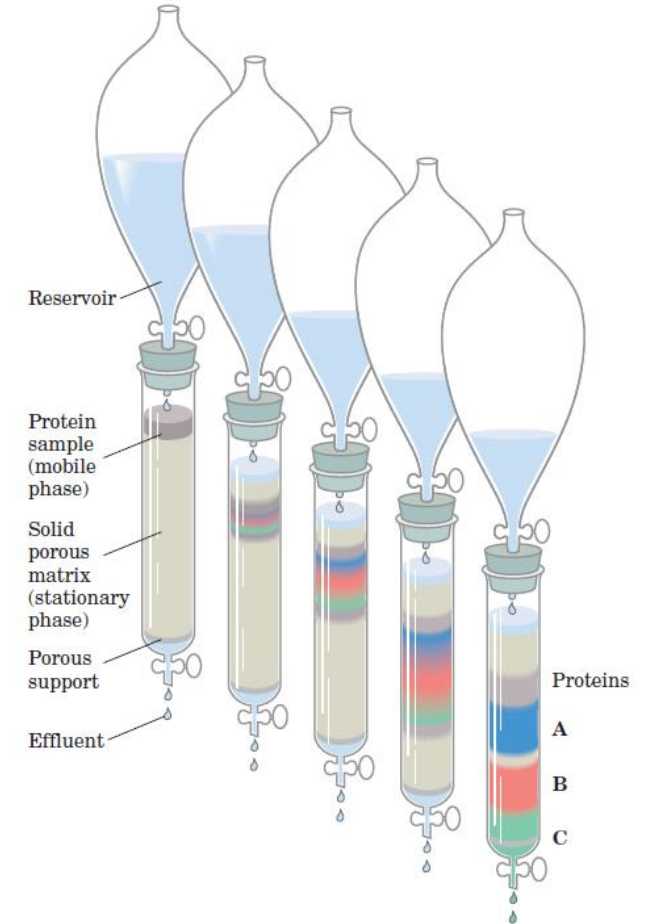
- Diyaliz torbası, uzaklaştırılmak istenen küçük maddeleri içermeyen büyük hacimli tampon çözeltiye bırakılır.
- Küçük maddeler, zarın iki tarafındaki derişimleri dengeye ulaşuncaya kadar zar boyunca hareket eder.
- Bu yöntem, protein preparatındaki amonyum sülfatı uzaklaştırmak veya kullanılan tampon çözeltisini değiştirmek için uygulanabilir.
- Diyalizden sonra protein çözeltisi daha ileri saflaştırma basamaklarına hazır hâle gelir.





Kolon Kromatografisi Güçlü Bir Ayırma Yöntemidir

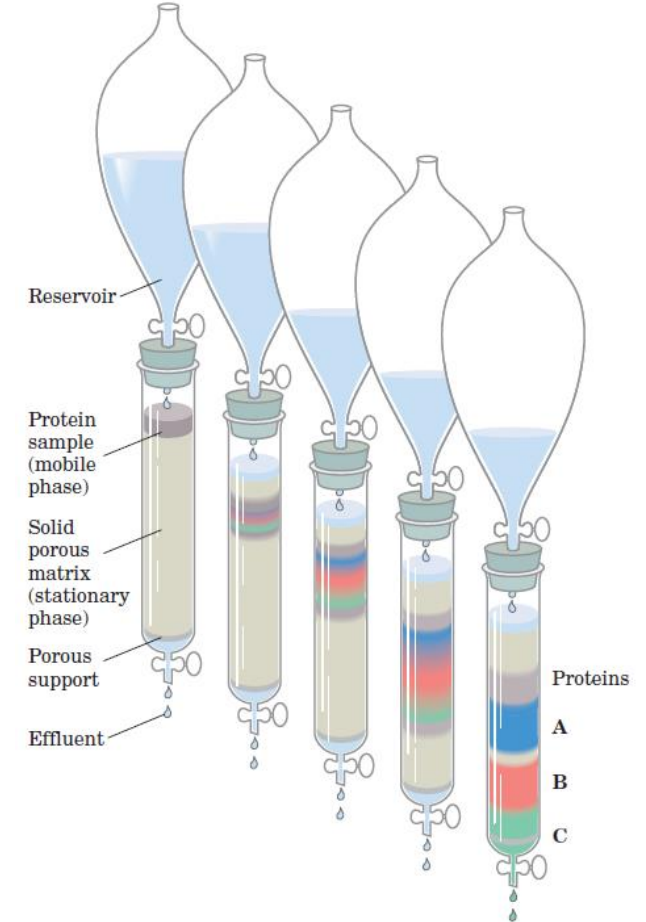
- Proteinlerin ayrılması ve fraksiyonlanmasında en güçlü yöntemlerin çoğu kolon kromatografisine dayanır.
- Bu yöntemler proteinlerin yük, büyüklük, bağlanma eğilimi ve diğer özelliklerindeki farklılıklardan yararlanır.
- Uygun kimyasal özelliklere sahip gözenekli katı bir madde, sabit faz olarak kolon içine yerleştirilir.
- Kolon kromatografisinin temel bileşenleri ve çalışma düzeni yandaki figürde gösterilmiştir.





Kolon Kromatografisinin Temel İşleyişi

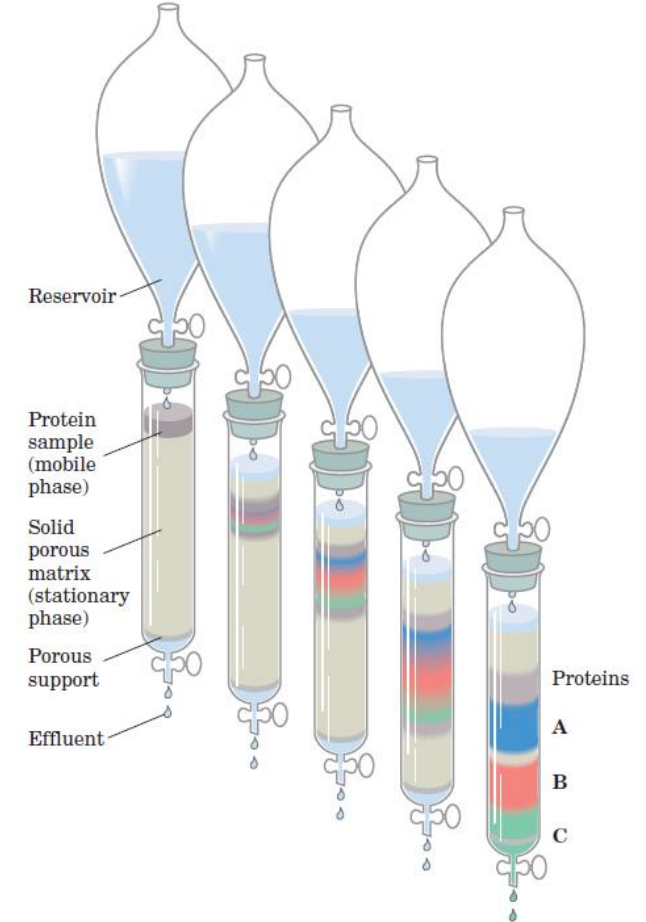
- Tampon çözelti hareketli faz olarak kolondaki gözenekli sabit fazın içinden geçirilir.
- Protein karışımı kolonun üst kısmına uygulanır ve ardından hareketli fazla birlikte kolon boyunca ilerler.
- Proteinler sabit fazla kurdukları farklı etkileşimler nedeniyle kolonda farklı hızlarda hareket eder.
- Kolonun altından çıkan elüat, art arda gelen farklı fraksiyonlar hâlinde toplanır.





Kromatografik Ayırımın Çözünürlüğü

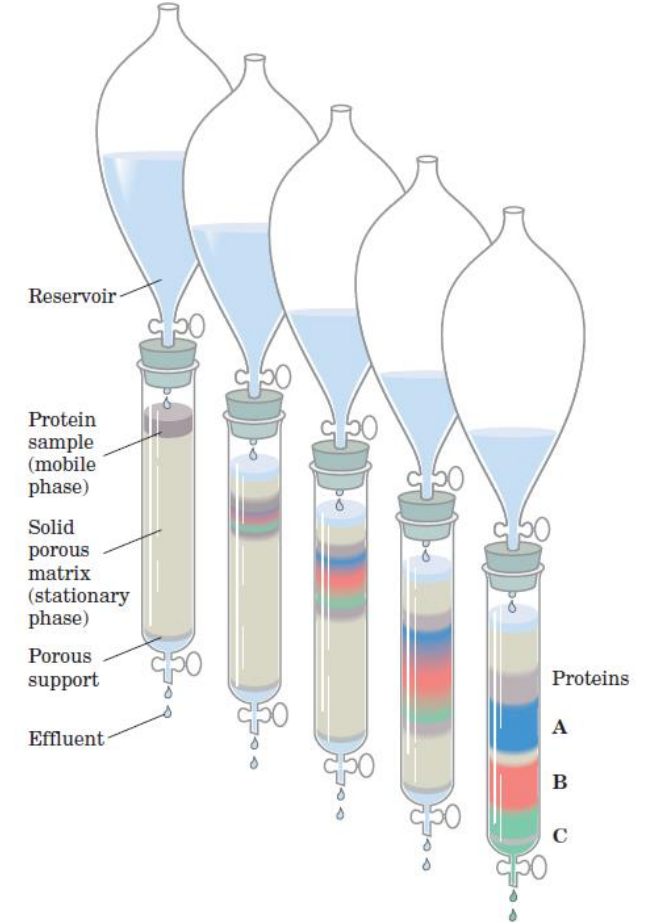
- Kolondaki protein bantları, ilerleme sırasında birbirinden farklı derecelerde ayrılabilir.
- İyi ayrılmış protein bantları kolondan farklı fraksiyonlar hâlinde çıkar ve ayrı tüplerde toplanabilir.
- Kolon uzadıkça farklı protein türleri arasındaki ayırımın çözünürlüğü genellikle artar.
- Ancak kolon uzunluğunun artması, protein bantlarının difüzyonla genişlemesine ve çözünürlüğün azalmasına da neden olabilir.





Proteinlerin Kolonda Ayrılması

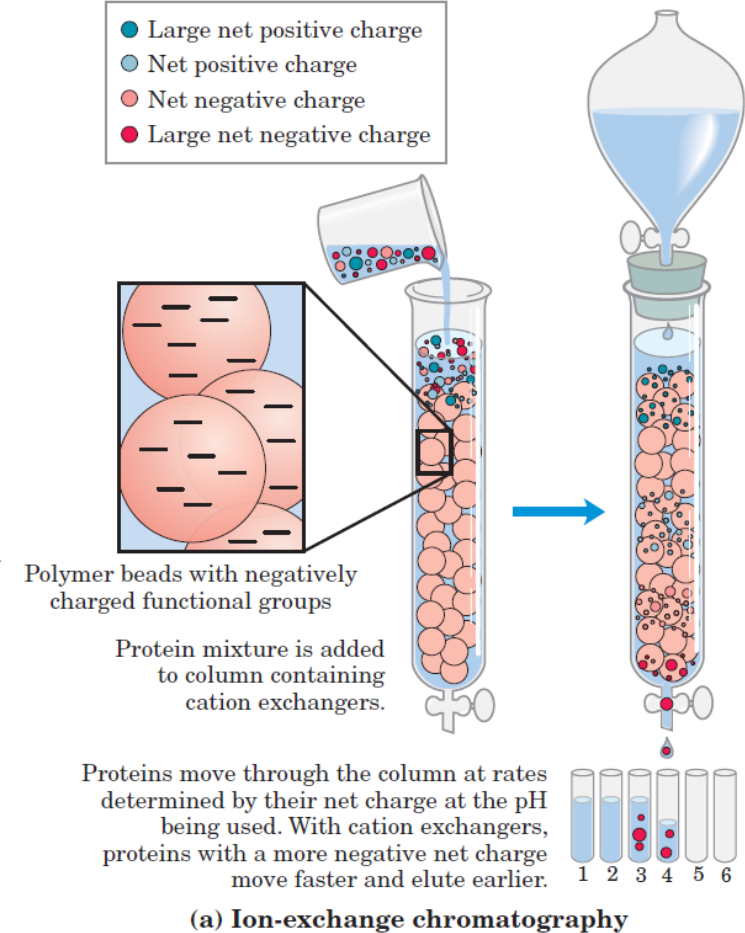
- Yandaki figürde A, B ve C proteinleri farklı özellikleri nedeniyle sabit fazla farklı düzeylerde etkileşir.
- A proteini kolonda daha hızlı ilerleyerek diğer proteinlerden ayrılır.
- Kırmızı ve mavi proteinler arasındaki difüzyon kaynaklı bant genişlemesi, tam ayrılmayı sınırlandırır.
- Dolayısıyla proteinlerin kolondaki davranışı hem etkileşimlere hem de difüzyona bağlıdır.





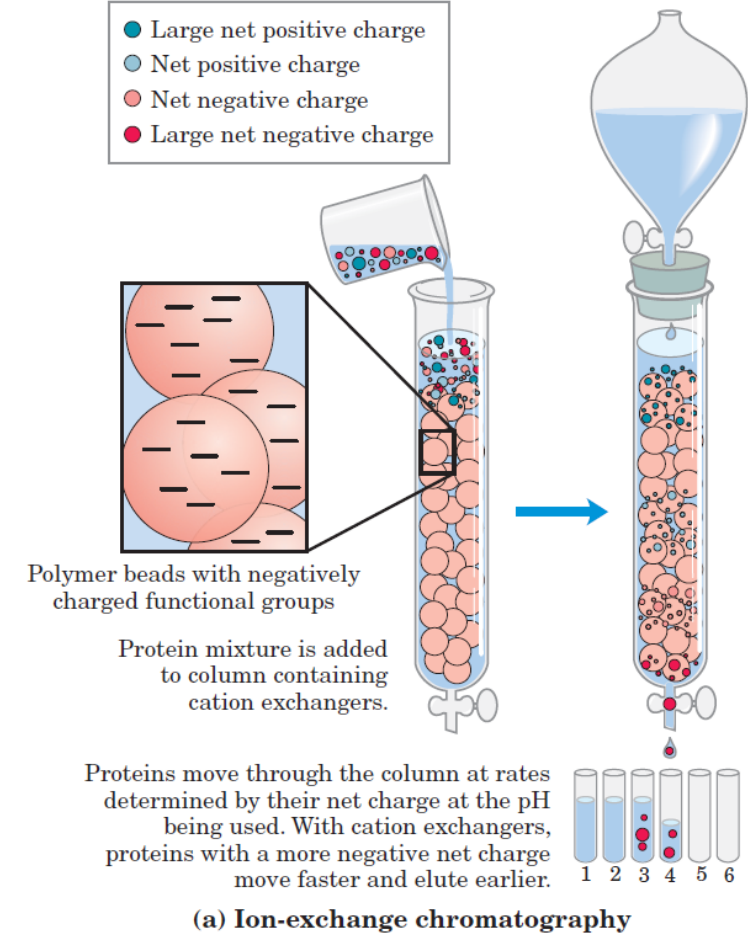
İyon Değişim Kromatografisi Protein Yükünden Yararlanır

- İyon değişim kromatografisi, proteinlerin belirli bir pH'taki net yük farklılıklarına dayanır.
- Kolon matrisi, zıt yüklü iyonları bağlayan sabit iyonik gruplar taşıyan sentetik bir polimerdir.
- Negatif yüklü gruplar içeren kolonlar katyon değiştirici, pozitif yüklü gruplar içerenler anyon değiştirici olarak adlandırılır.
- İyon değişim kromatografisinin çalışma ilkesi yandaki figürde gösterilmiştir.



Proteinlerin İyon Değiştiriciye Bağlanması

- Proteinlerin kolon matrisiyle etkileşimi, protein ve sabit faz üzerindeki yüklü grupların çekimine dayanır.
- Yandaki figürde yer alan katyon değiştiricide sabit faz negatif yüklü gruplar taşır.
- Net pozitif yükü daha fazla olan proteinler matrise daha güçlü bağlanarak daha yavaş ilerlerler.
- Net negatif yük taşıyan proteinler ise matrise daha az bağlandıkları için kolondan daha hızlı çıkar.





İyon Değişim Kolonundan Proteinlerin Elüsyonu

- Proteinlerin iyon değiştiriciye bağlanma gücü, ortam pH'ından ve çözeltideki tuz iyonlarının derişiminden etkilenir.
- pH, molekülün iyonlaşma durumunu ve dolayısıyla proteinin net elektriksel yükünü belirler.
- Proteinler, hareketli fazın pH'sı veya tuz derişimi kademeli olarak değiştirilerek kolondan ayrılabilir.
- Böylece bir pH veya tuz gradyanı oluşturularak farklı proteinlerin ardışık biçimde elüsyonu sağlanır.





Kolon Fraksiyonları Birleştirilerek Saf Protein Elde Edilir

- İyon değişim kolonlarında protein bantları, difüzyon nedeniyle hareketli faz içinde giderek genişleyebilir.
- Elüat ardışık tüplerde küçük fraksiyonlar hâlinde toplanarak protein dağılımı izlenir.
- Her fraksiyon, istenen proteinin varlığı veya toplam protein derişimi bakımından test edilir.
- İstenen proteini taşıyan fraksiyonlar birleştirilerek ilgili kromatografi basamağının saflaştırılmış ürünü elde edilir.

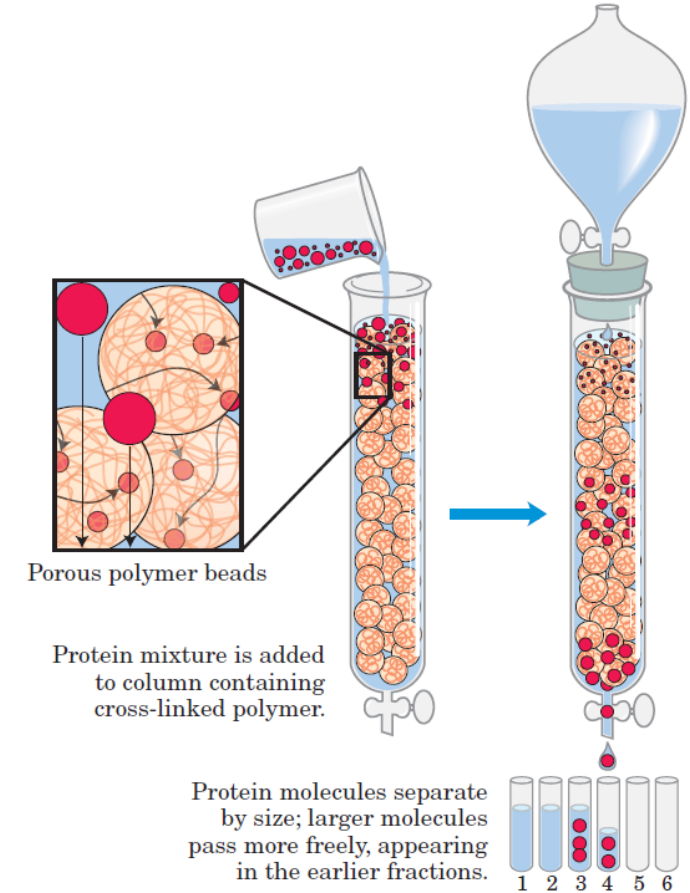




Boyut Dışlama Kromatografisi

Proteinleri Büyüklüklerine Göre Ayırır

- Jel filtrasyonu olarak da adlandırılan boyut dışlama kromatografisi, proteinleri büyüklüklerine göre ayırır.
- Sabit faz, belirli büyüklükte gözenekler veya boşluklar taşıyan çapraz bağlı polimer taneciklerinden oluşur.
- Büyük proteinler taneciklerin gözeneklerine giremezken küçük proteinler gözenekli yapı içinde ilerler.
- Boyut dışlama kromatografisinin çalışma ilkesi yandaki figürde gösterilmiştir.

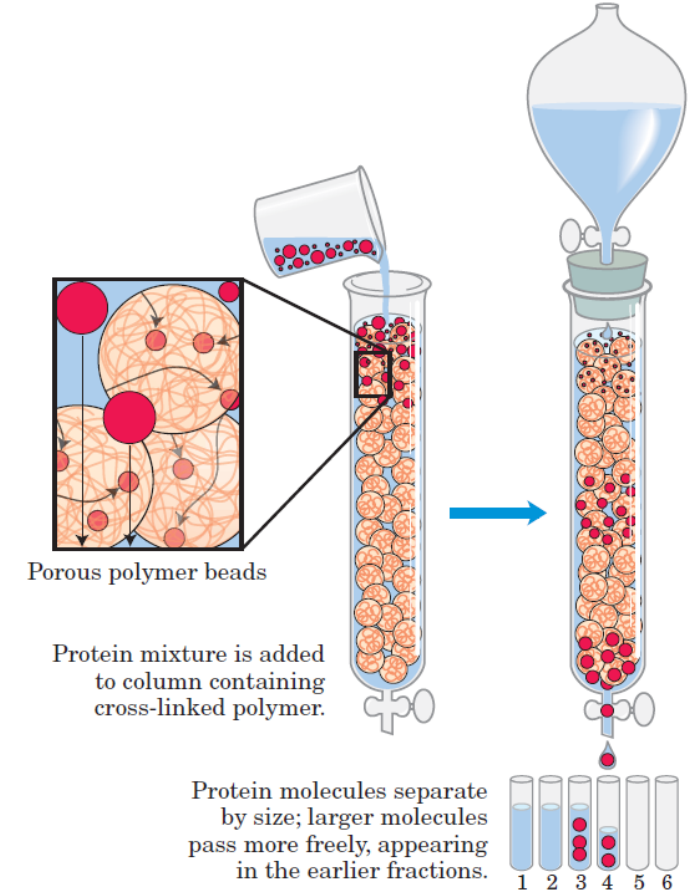


(b) Size-exclusion chromatography



Büyük Proteinler Kolondan Daha Erken Çıkar

- Büyük proteinler polimer taneciklerinin arasından daha kısa ve doğrudan bir yol izler.
- Küçük proteinler gözeneklere girerek tanecikler içinde daha uzun ve dolambaçlı bir yol takip eder.
- Bu nedenle büyük proteinler kolondan küçük proteinlere göre daha erken çıkar.
- Yandaki figürde farklı büyüklükteki proteinlerin ayrı fraksiyonlarda toplanması gösterilmiştir.

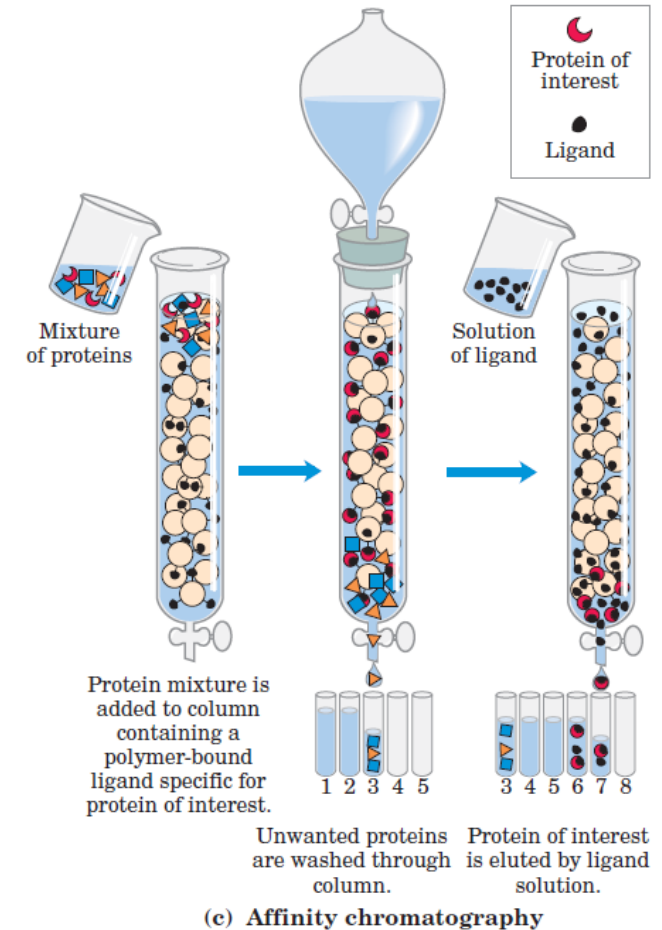


(b) Size-exclusion chromatography



Afinite Kromatografisi Özgül Bağlanmadan Yararlanır

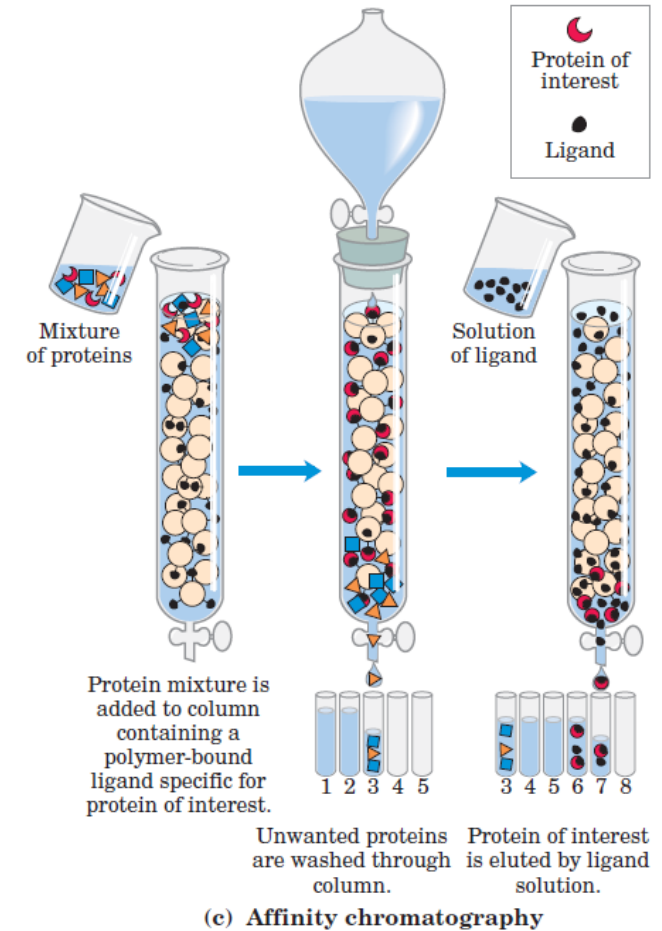
- Afinite kromatografisi, bir proteinin belirli bir kimyasal gruba özgül olarak bağlanmasına dayanır.
- Ligand olarak adlandırılan bu kimyasal grup, kolon matrisi üzerindeki taneciklere kovalent biçimde bağlanır.
- Protein karışımı kolondan geçirilirken liganda güçlü bağlanan proteinlerin hareketi yavaşlar.
- Afinite kromatografisinin seçici ayırma mekanizması yandaki figürde gösterilmiştir.





İstenen Protein Afinite Kolonundan Nasıl Ayrılır?

- Hedef proteine özgü ligand seçilerek bu proteinin kolon matrisi üzerinde tutulması sağlanabilir.
- Karışımındaki bağlanmayan proteinler hareketli fazla birlikte kolondan uzaklaştırılır.
- Hedef protein, yüksek tuz derişimi içeren bir çözelti veya serbest ligand kullanılarak elüe edilebilir.
- Yandaki figürde hedef proteinin liganda bağlanması ve ardından kolondan ayrılması gösterilmiştir.





ATP Bağlayan Proteinlerin Afiniteyle Saflaştırılması

- Bir proteinin işlevi ATP'ye bağlanmayı gerektiriyorsa ATP, kolonda ligand olarak kullanılabilir.
- ATP kolondaki taneciklere bağlandığında, ATP'ye afinitesi olan proteinlerin kolonda tutulmasını sağlar.
- ATP'ye bağlanmayan proteinler kolondan geçerken hedef protein sabit faz üzerinde kalır.
- Hedef protein daha sonra yüksek tuz derişimi veya serbest ATP içeren çözeltiyle kolondan ayrılabilir.





Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kromatografik yöntemlerin modern ve geliştirilmiş bir biçimidir.
- Bu yöntemde protein çözeltisi, yüksek basınçlı pompalar kullanılarak kolon boyunca hareket ettirilir.
- Kolon materyalleri, yüksek basınca dayanabilen ve ezilmeyen özellikte hazırlanır.
- Küçük taneciklerin kullanılması difüzyonla bant genişlemesini sınırlandırarak protein ayırımının çözünürlüğünü artırır.





Protein Saflaştırma Birden Fazla Basamak Gerektirir

- Ham ekstrakt içindeki hedef protein, çoğunlukla tek bir yöntem kullanılarak tamamen saflaştırılamaz.
- Farklı özelliklere dayanan çeşitli ayırma yöntemleri ardışık biçimde uygulanmalıdır.
- Örneğin iyon değişimle ATP bağlayan proteinler ayrıldıktan sonra afinitesi farklı olan proteinler başka yöntemlerle ayrılabilir.
- Yöntemlerin seçimi ve sıralaması genellikle deneme yanılma yoluyla belirlenir.





Saflaştırma Stratejisi Ekonomik Biçimde Planlanır

- En etkili saflaştırma yaklaşımını belirlemek için çok sayıda yöntem denenebilir.
- Deneme yanılma süreci, benzer proteinler için daha önce geliştirilmiş yöntemler temel alınarak azaltılabilir.
- Toplam hacim ve kirletici miktarı yüksekken tuzla çöktürme gibi düşük maliyetli yöntemler tercih edilir.
- Daha seçici ve pahalı kromatografik yöntemler, örnek hacmi küçüldükten sonraki aşamalarda uygulanır.





Saflaştırma Süreci Sayısal Verilerle İzlenir

- Varsayımsal bir enzime ait saflaştırma basamakları ve her aşamada elde edilen değerler yandaki tabloda verilmiştir.
- Saflaştırma ilerledikçe fraksiyon hacmi ve toplam protein miktarı belirgin biçimde azalır.
- Hedef enzime ait toplam etkinliğin bir bölümü, her ayırma basamağında kaybedilebilir.
- Buna karşılık birim protein başına düşen özgül etkinlik saflaştırma ilerledikçe yükselir.

Hipotetik Bir Enzimin Saflaştırma Çizelgesi

İşlem ya da basamak	Fraksiyon hacmi (mL)	Toplam protein (mg)	Aktivite (ünite)	Özgül aktivite (ünite/mg)
1. Ham hücresel özüt	1.400	10.000	100.000	10
2. Amonyum sülfatla çöktürme	280	3.000	96.000	32
3. İyon-değişim kromatografisi	90	400	80.000	200
4. Boyut-dışlama kromatografisi	80	100	60.000	600
5. Afinite kromatografisi	6	3	45.000	15.000





Saflaştırmanın İlerlemesi

- Ham hücresel ekstraktın özgül etkinliği 10 birim/mg iken afinite kromatografisi sonunda 15.000 birim/mg'a ulaşır.
- Toplam protein miktarı 10.000 mg'dan 3 mg'a, fraksiyon hacmi ise 1.400 mL'den 6 mL'ye düşer.
- Enzim etkinliği başlangıçtaki 100.000 birimden son aşamada 45.000 birime geriler.
- Yandaki tablo, protein miktarı azalırken hedef enzimin belirgin ölçüde zenginleştiğini göstermektedir.

Hipotetik Bir Enzimin Saflaştırma Çizelgesi

İşlem ya da basamak	Fraksiyon hacmi (mL)	Toplam protein (mg)	Aktivite (ünite)	Özgül aktivite (ünite/mg)
1. Ham hücresel özüt	1.400	10.000	100.000	10
2. Amonyum sülfatla çöktürme	280	3.000	96.000	32
3. İyon-değişim kromatografisi	90	400	80.000	200
4. Boyut-dışlama kromatografisi	80	100	60.000	600
5. Afinite kromatografisi	6	3	45.000	15.000





Elektroforez Proteinleri Elektrik Alanında Ayırır

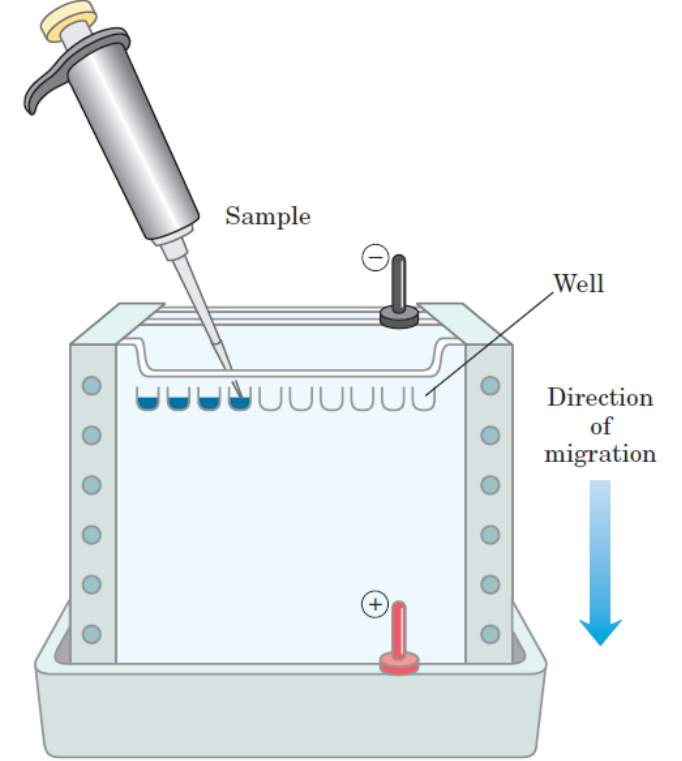
- Elektroforez, elektriksel yük taşıyan proteinlerin bir elektrik alanındaki hareketine dayanan bir ayırma yöntemidir.
- Bu yöntem genellikle büyük miktarlarda protein saflaştırmak için kullanılmaz.
- Proteinlerin ayrılmasının yanında görüntülenebilmesi, elektroforezi analitik açıdan oldukça kullanışlı hâle getirir.
- Elektroforez, protein karışımındaki protein sayısının ve preparatın saflık derecesinin hızlı biçimde belirlenmesini sağlar.





Elektroforez Proteinlerin Özelliklerini Gösterir

- Elektroforez bir proteinin izoelektrik noktası ve yaklaşık molekül kütlesi gibi özelliklerinin belirlenmesinde kullanılabilir.
- Proteinlerin elektroforezi genellikle çapraz bağlı poliakrilamid jeller içinde gerçekleştirilir.
- Poliakrilamid jel, proteinlerin hareketini yavaşlatan moleküler elek görevi görür.



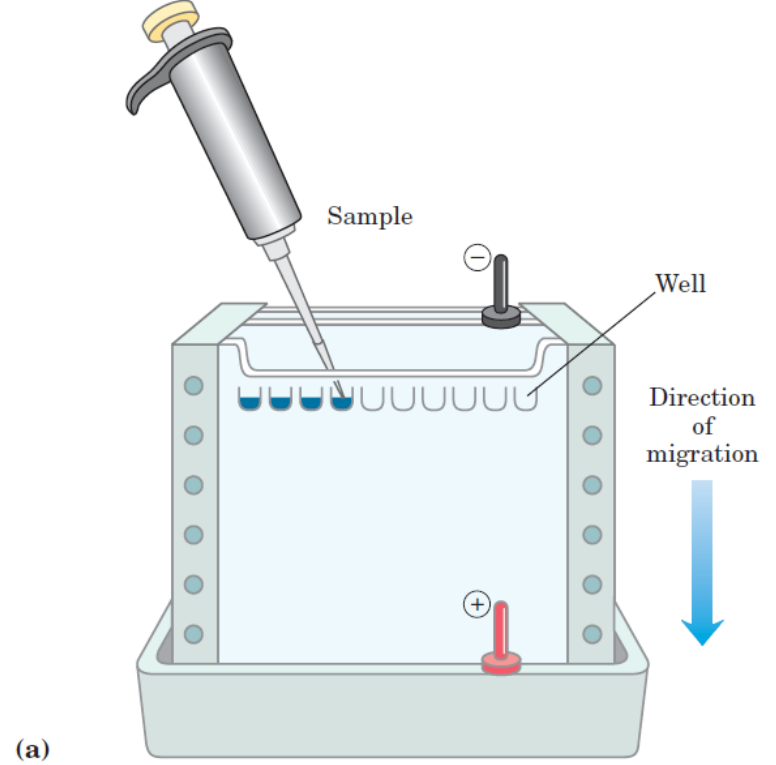
(a)





Elektroforetik Hareketlilik Yük ve Sürtünmeye Bağlıdır

- Elektrik alanındaki bir makromolekölü hareket ettiren kuvvet, elektriksel potansiyele ilişkilidir.
- Elektroforetik hareketlilik, molekülün hızının uygulanan elektriksel potansiyele oranı olarak ifade edilir.
- Bu değer net yükün sürtünme katsayısına oranına eşittir ve molekülün yükünden, büyüklüğünden ve biçiminden etkilenir.
- Bu nedenle doğal proteinlerin jel içindeki hareketi yalnızca molekül kütlelerine göre belirlenmez.





SDS Proteinlerin Yük Farklılıklarını Ortadan Kaldırır

- Saflık ve molekül kütlesi belirlemede yaygın olarak sodyum dodesil sülfat içeren elektroforez yöntemi kullanılır.
- SDS, çoğu proteine yaklaşık olarak her iki amino asit kalıntısı için bir molekül olacak biçimde bağlanır.
- Bağlanan SDS, proteine büyük bir net negatif yük kazandırarak proteinin özgün yükünü önemsiz hâle getirir.
- SDS ayrıca proteinlerin birbirine benzer biçimler kazanmasını sağlayarak biçim farklılıklarının etkisini azaltır.





SDS-PAGE Proteinleri Molekül Kütlesine Göre Ayırır

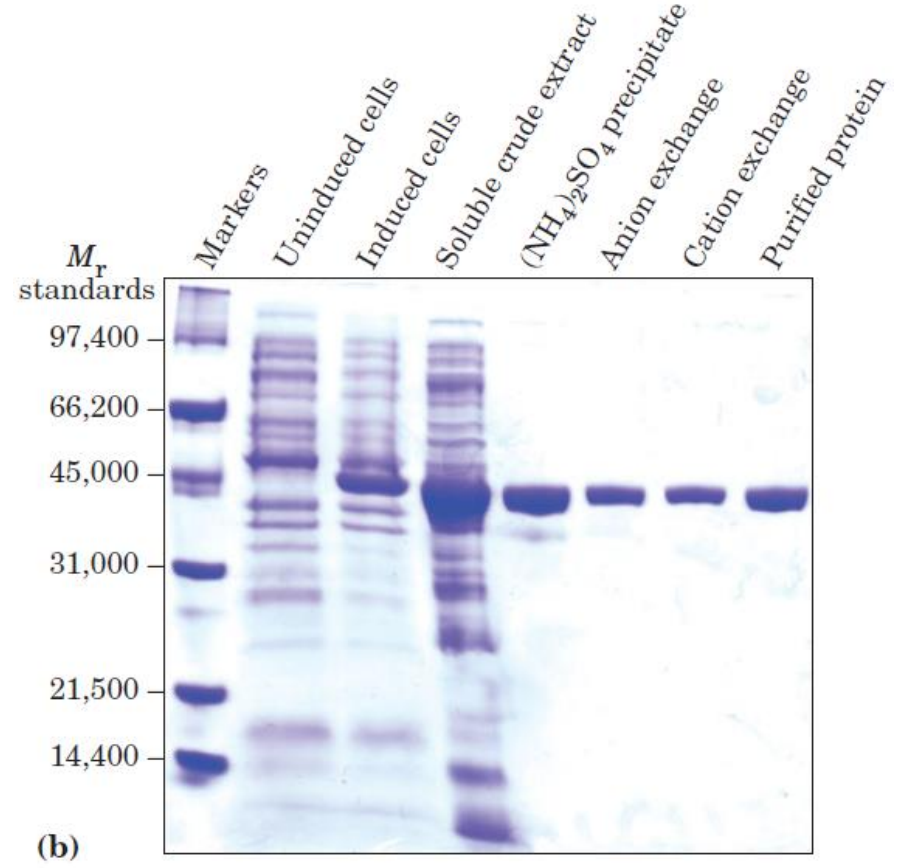
- SDS ile kaplanan proteinler birbirine benzer yük-kütle oranına ve genel biçime sahip olur.
- Böylece SDS içeren elektroforezde proteinler büyük ölçüde molekül kütlelerine göre ayrılır.
- Küçük polipeptitler jel matrisi içinde daha hızlı ilerlerken büyük polipeptitler daha yavaş hareket eder.
- Elektroforez sonunda küçük proteinler jelin alt kısmına daha yakın konumlarda bulunur.





Protein Bantları Boyama Yoluyla Görünür Hâle Getirilir

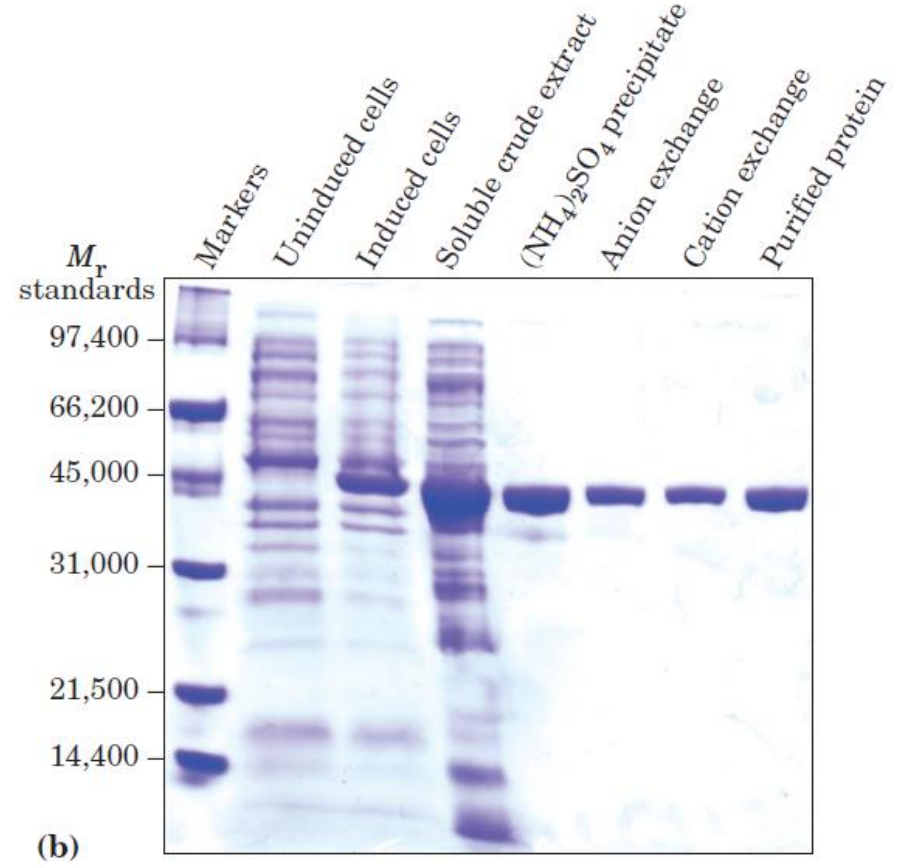
- Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, proteinlere bağlanan ancak jelin kendisini boyamayan bir boyayla işlenir.
- Coomassie mavisi bu amaçla yaygın olarak kullanılan protein boyalarından biridir.
- Jel üzerindeki her bant farklı bir proteini veya protein alt birimini temsil eder.
- SDS jel elektroforezinde protein bantlarının oluşumu ve konumları yandaki şekilde gösterilmiştir.





SDS-PAGE Saflaştırma Sürecini İzlemeyi Sağlar

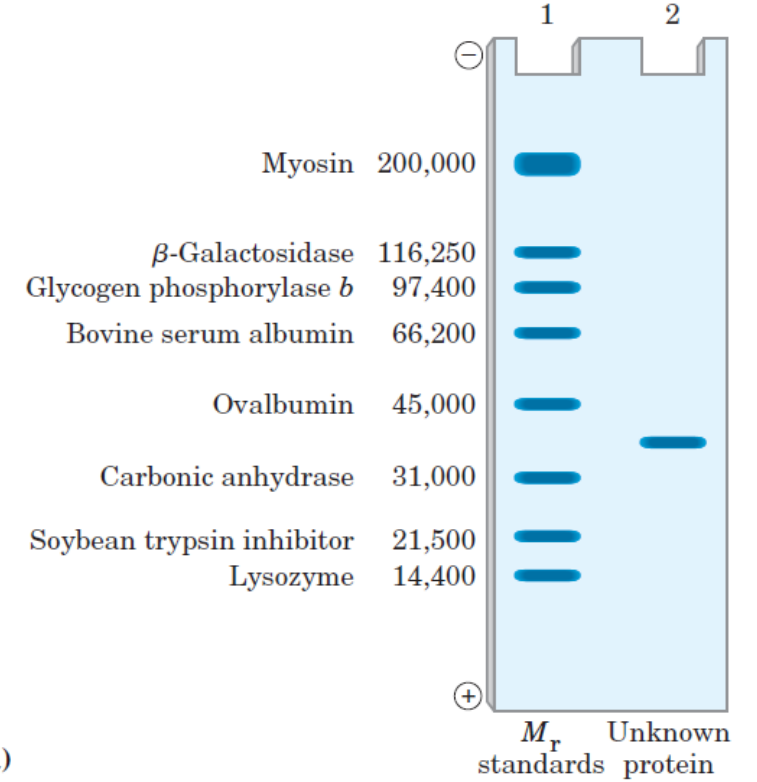
- Saflaştırmanın her aşamasından alınan örnekler SDS-PAGE ile karşılaştırılarak protein bantlarındaki değişimler izlenebilir.
- İlerleyen saflaştırma basamaklarında kirletici proteinlere ait bantların sayısının giderek azalması beklenir.
- Yandaki figürde, *Escherichia coli* RecA proteininin ardışık işlemlerle saflaştırılması gösterilmektedir.
- Sağdaki son hatta görülen tek bant, yaklaşık 38.000 molekül kütleli saf RecA polipeptidini temsil etmektedir.



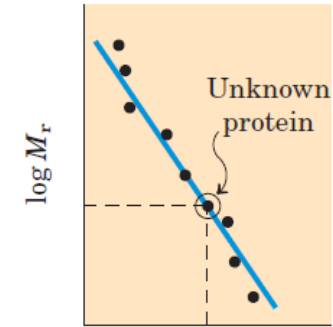


Molekül Kütlesi Protein Standartlarıyla Tahmin Edilir

- Molekül kütlesi bilinen standart proteinler, incelenen örneklerle birlikte aynı jel üzerinde yürütülebilir.
- Bilinmeyen bir proteinin jel içindeki konumu, standart proteinlerin konumlarıyla karşılaştırılır.
- Bu karşılaştırma, incelenen proteinin molekül kütlesinin yaklaşık olarak belirlenmesini sağlar.
- Standartlardan yararlanılarak molekül kütlesinin tahmin edilmesi yandaki figürde gösterilmektedir.



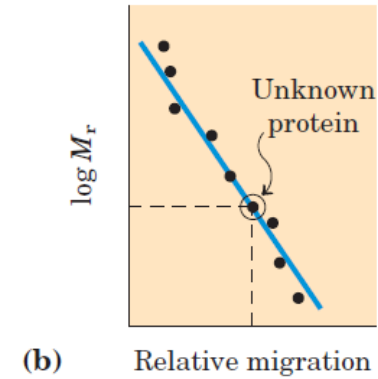
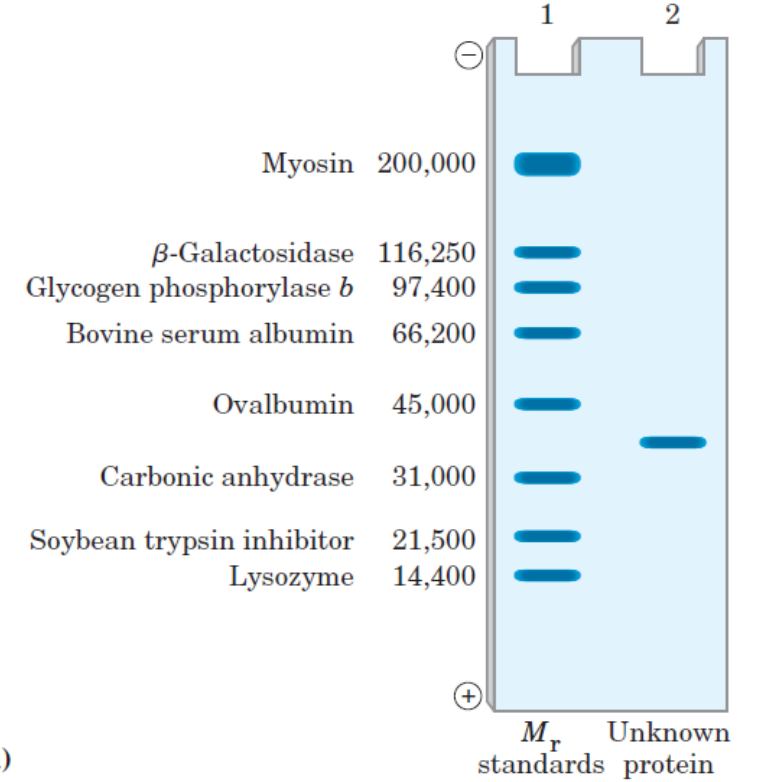
(a)



(b) Relative migration

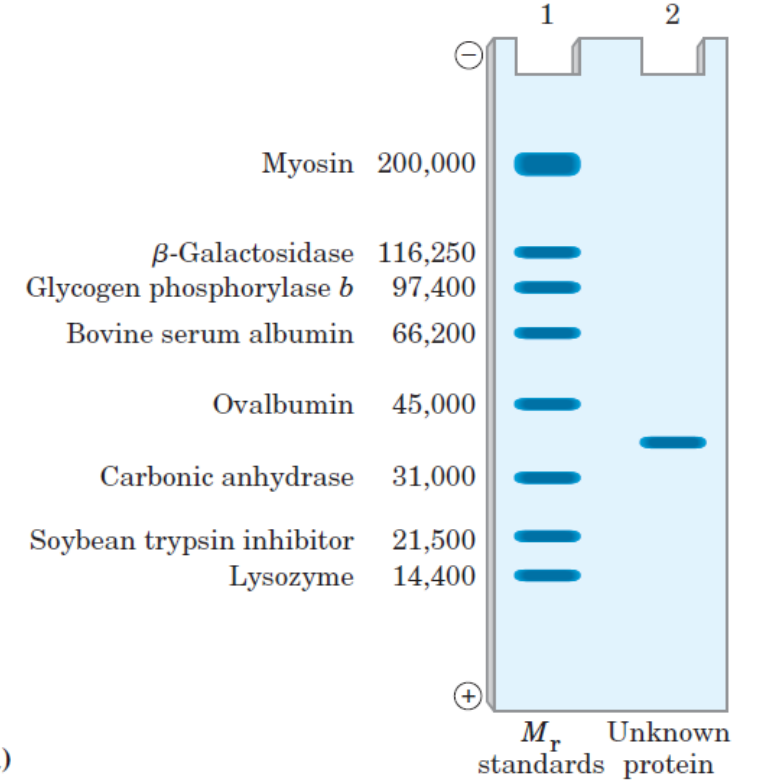
SDS-PAGE Protein Alt Birimlerini Ortaya Çıkarır

- Bir protein iki veya daha fazla farklı alt birim içeriyorsa SDS işlemi bu alt birimleri genellikle birbirinden ayırır.
- Ayrılan her farklı polipeptit alt birimi, jel üzerinde ayrı bir bant meydana getirir.
- Bu özellik, çok alt birimli proteinlerin polipeptit bileşimlerinin belirlenmesine yardımcı olur.

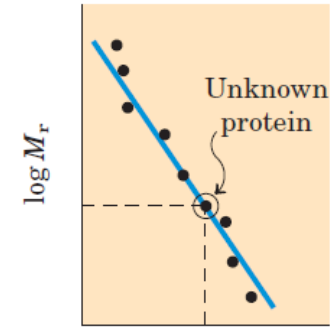


SDS-PAGE ile Molekül Kütlesinin Belirlenmesi

- SDS-poliakrilamid jel elektroforezindeki göreceli hareketlilik, proteinin bağıl molekül kütlesiyle ilişkilidir.
- Molekül kütlesi bilinen standart proteinler, incelenecek proteinle birlikte aynı jel üzerinde yürütülür.
- Küçük proteinler jel içinde büyük proteinlerden daha hızlı hareket eder.
- Standart ve bilinmeyen proteinlere ait bantların karşılaştırılması yandaki figürde gösterilmiştir.



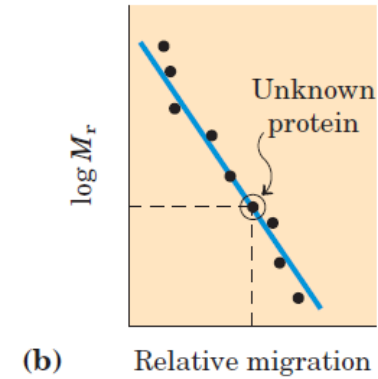
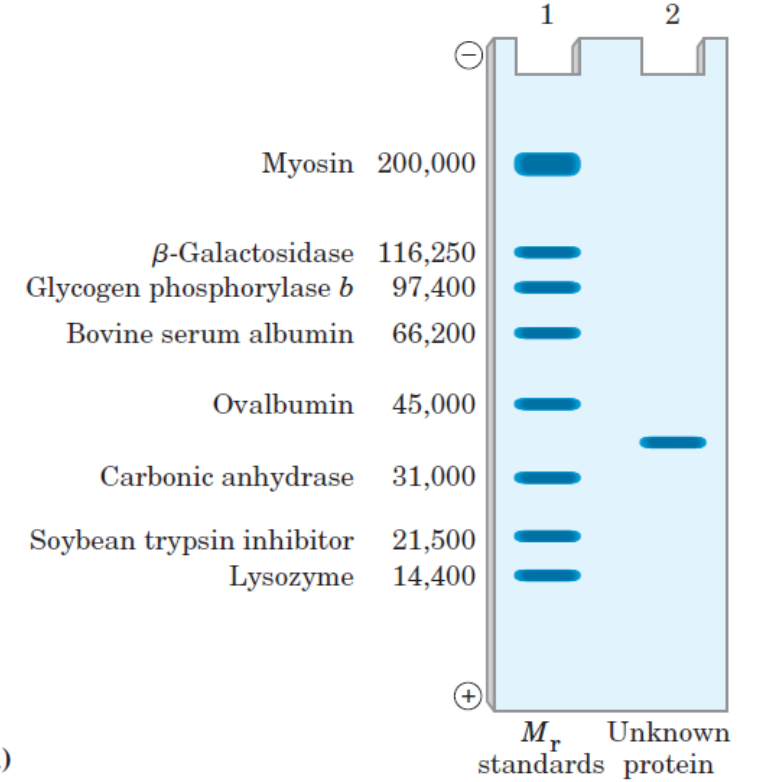
(a)



(b) Relative migration

Standart Eğri Bilinmeyen Proteini Tanımlar

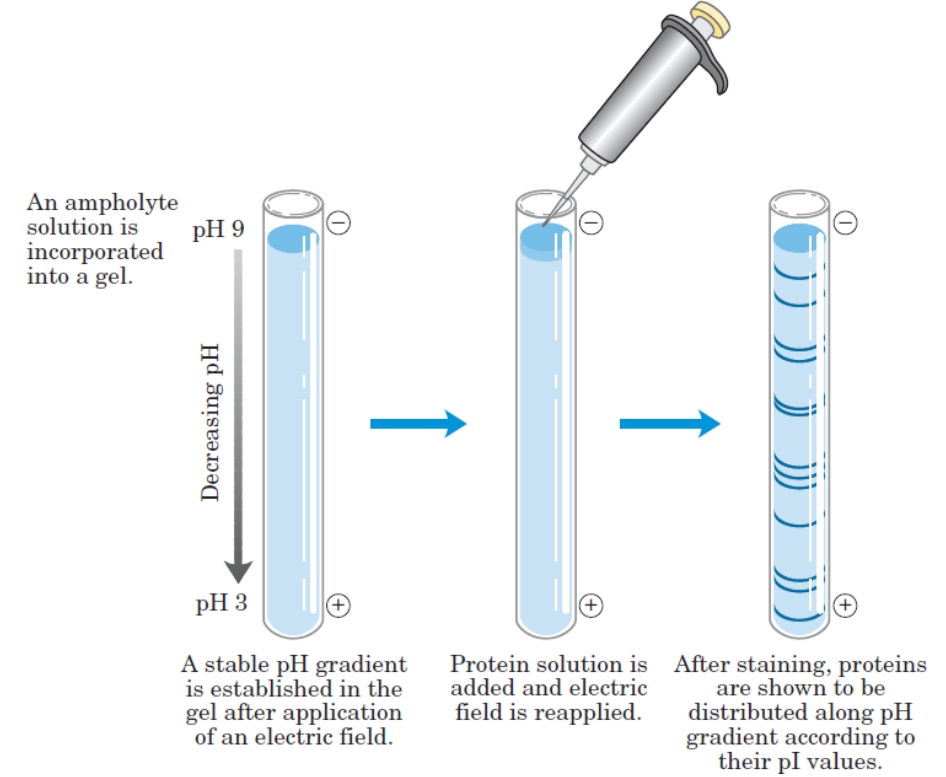
- Standart proteinlerin molekül kütlelerinin logaritması, jel içindeki görel hareketliliklerine karşı grafiğe aktarılır.
- Molekül kütlelerinin logaritması ile görel hareketlilik arasındaki ilişki yaklaşık olarak doğrusaldır.
- Bilinmeyen proteinin görel hareketliliği bu standart doğruyla karşılaştırılarak molekül kütlesi tahmin edilir.
- Molekül kütlelerinin standart grafik üzerinden belirlenmesi yandaki figürde gösterilmiştir.





İzoelektrik Odaklama Proteinleri pI Değerlerine Göre Ayırır

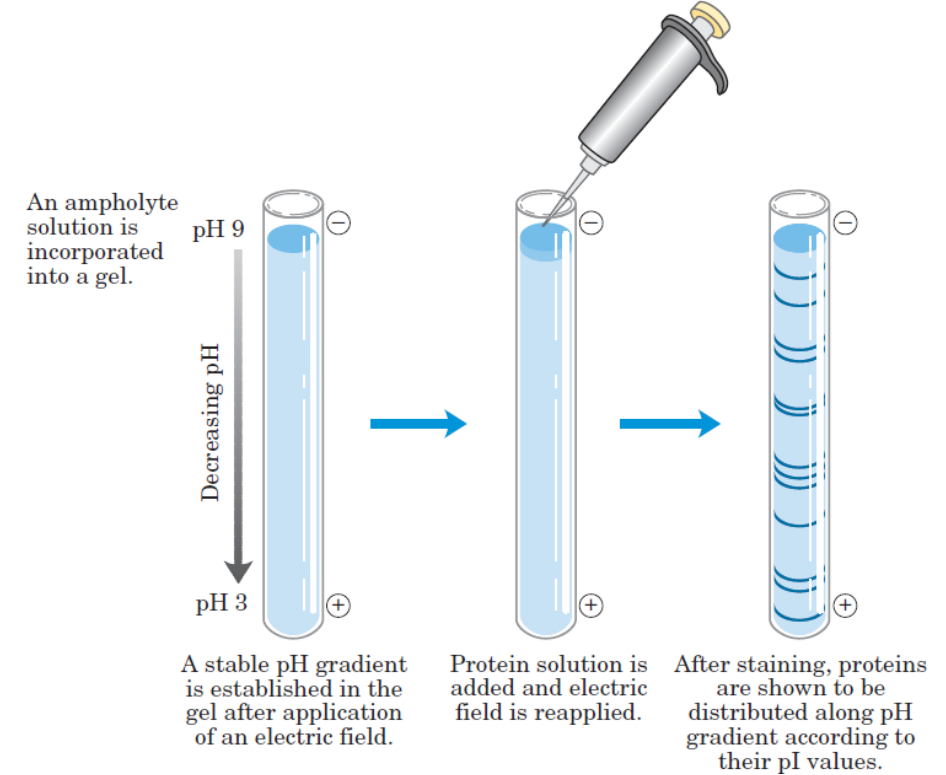
- İzoelektrik odaklama, bir proteinin izoelektrik noktasını belirlemek için kullanılan elektroforetik bir yöntemdir.
- Düşük molekül kütleli organik asit ve bazlardan oluşan amfolit karışımı jel boyunca kararlı bir pH gradyanı oluşturur.
- Protein karışımı jele uygulandığında her protein, net yükünün sıfırlandığı pH bölgesine doğru hareket eder.
- İzoelektrik odaklamanın temel çalışma ilkesi yandaki figürde gösterilmiştir.





Proteinler İzoelektrik Noktalarında Odaklanır

- Elektrik alanı uygulandığında proteinler, ortam pH'ı kendi pI değerlerine eşit oluncaya kadar jel içinde ilerler.
- Protein pI değerine ulaştığında net yükü sıfırlanır ve elektrik alanındaki hareketi durur.
- Farklı pI değerlerine sahip proteinler jel boyunca farklı bölgelerde bantlar oluşturur.
- Yandaki figürde proteinlerin pH gradyanı boyunca pI değerlerine göre dağılımı gösterilmektedir.





Proteinlerin İzoelektrik Noktaları Geniş Bir Aralıkta Değişir

- Farklı proteinlerin izoelektrik noktaları, amino asit bileşimlerine bağlı olarak birbirinden ayrılır.
- Pepsinin pI değeri 1.0'ın altındayken lizozimin pI değeri 11.0'dır.
- Serum albümin 4.9, hemoglobin 6.8 ve miyoglobin 7.0 pI değerlerine sahiptir.

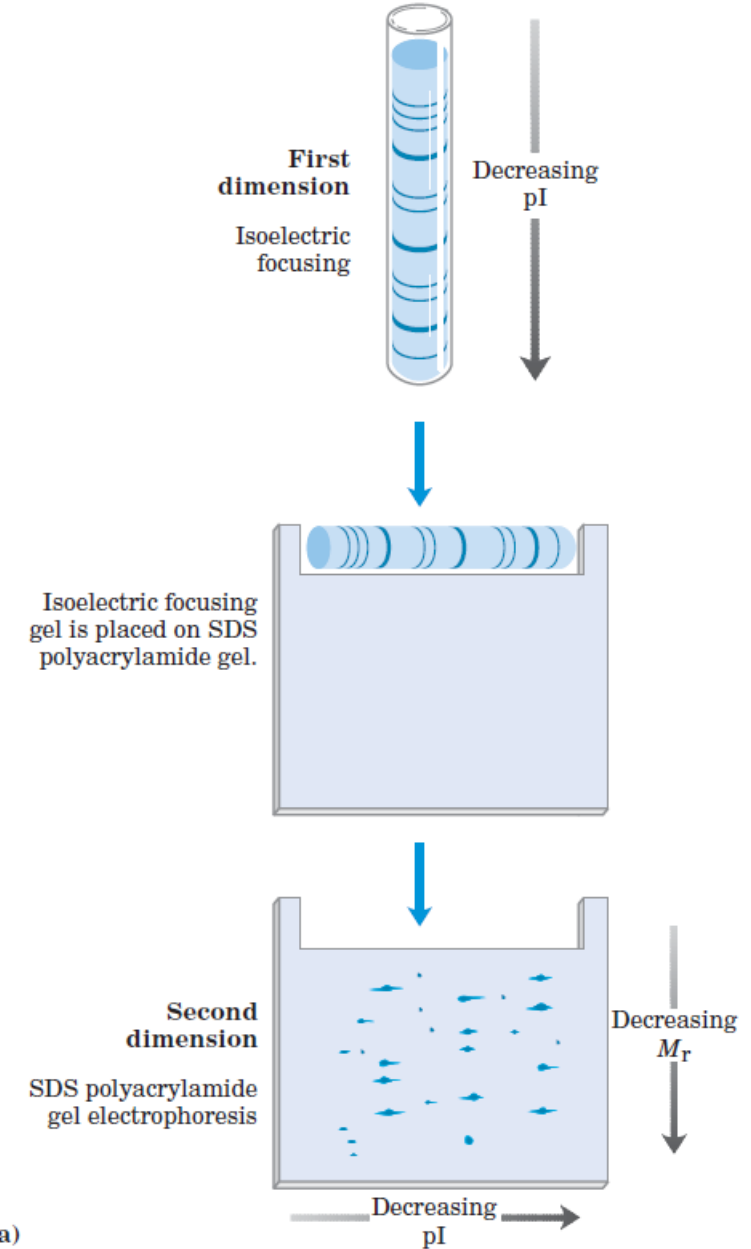
The Isoelectric Points of Some Proteins	
Protein	pI
Pepsin	<1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β -Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome c	10.7
Lysozyme	11.0





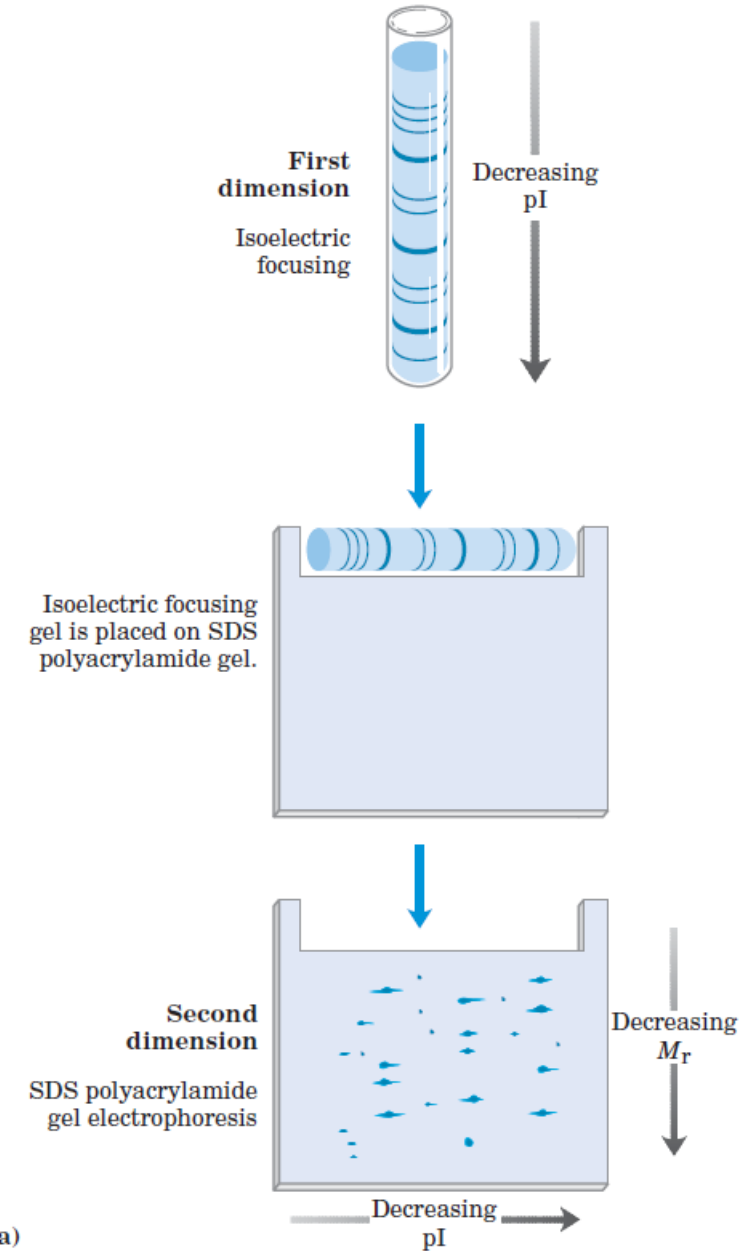
İki Boyutlu Elektroferez İki Ayırma İlkesini Birleştirir

- İzoelektrik odaklama ile SDS elektroferez ardışık biçimde uygulanarak iki boyutlu elektroferez gerçekleştirilir.
- Bu yöntem, karmaşık protein karışımlarının tek boyutlu elektroferezden daha yüksek çözünürlükle ayrılmasını sağlar.
- İlk boyutta proteinler izoelektrik noktalarına, ikinci boyutta ise molekül kütlelerine göre ayrılır.



İki Boyutlu Ayırmanın İlk Basamağı

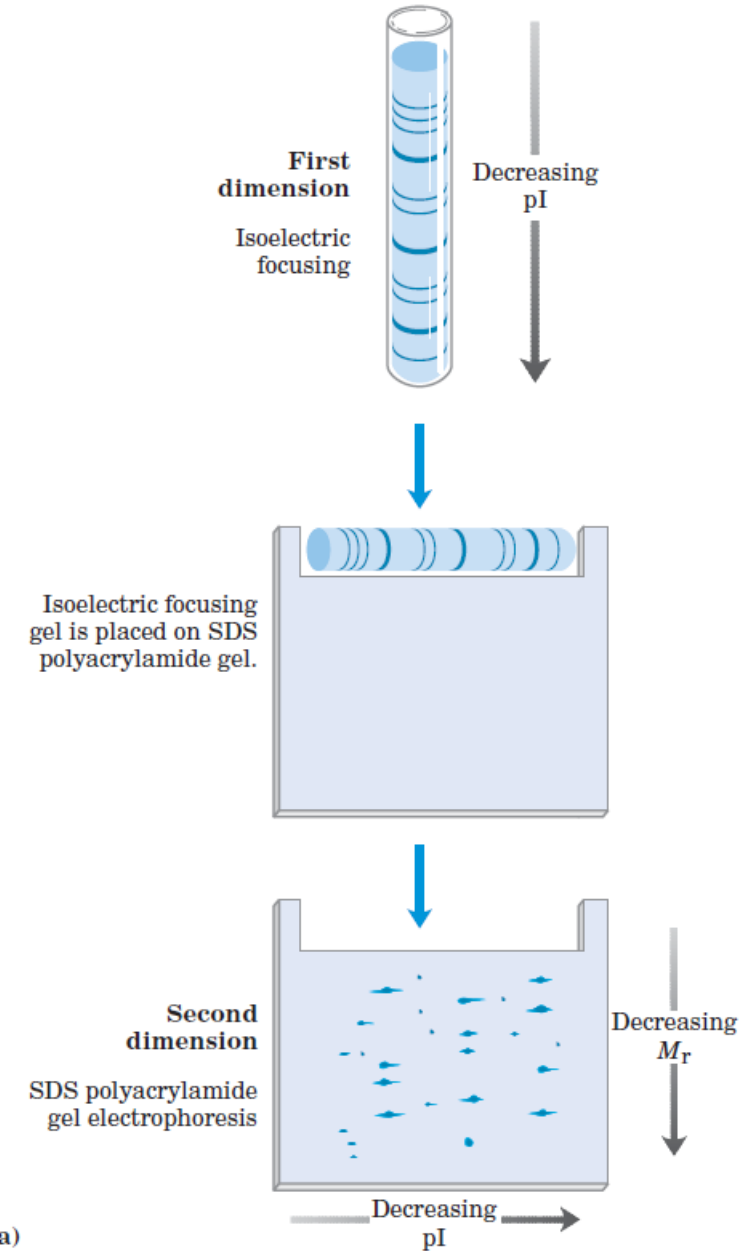
- İlk basamakta protein karışımı silindirik jel içinde izoelektrik odaklama işlemine alınır.
- Proteinler pH gradyanı boyunca hareket ederek kendi izoelektrik noktalarında ayrı bantlar oluşturur.
- İzoelektrik odaklamayı tamamlayan jel, ikinci ayırma işlemi için yatay konumda hazırlanır.
- Yandaki figürde ilk boyuttaki ayırımın azalan pI yönünde gerçekleştiği gösterilmektedir.





İki Boyutlu Ayırmanın İkinci Basamağı

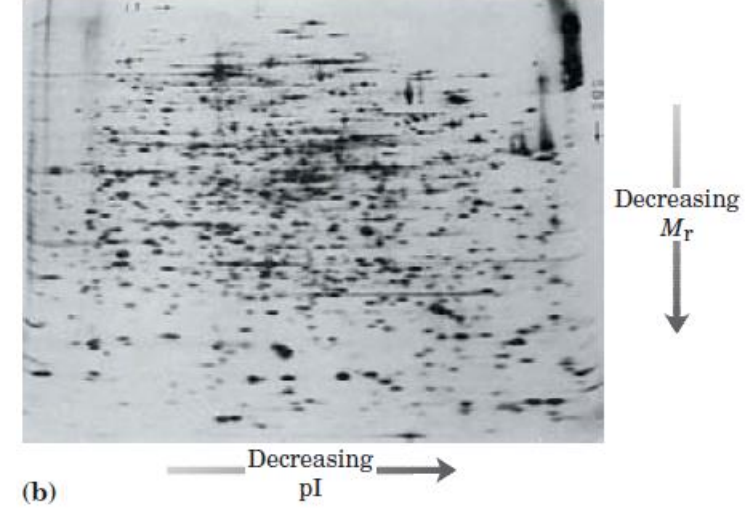
- İzoelektrik odaklama jeli, SDS içeren poliakrilamid jelin üst kısmına yatay olarak yerleştirilir.
- Proteinler ikinci boyutta SDS-PAGE ile bağlı molekül kütlelerine göre ayrılır.
- Yatay ayrılma pI farklılıklarını, dikey ayrılma ise molekül kütlesi farklılıklarını yansıtır.
- Böylece her protein jel üzerinde iki özelliğine bağlı özgün bir konumda görünür.





İki Boyutlu Elektrofrezin Ayırma Gücü

- İki boyutlu elektrofrez, aynı molekül kütlesine sahip ancak pI değerleri farklı proteinleri ayırabilir.
- Yöntem, benzer pI değerlerine sahip fakat molekül kütleleri farklı proteinleri de birbirinden ayırır.
- Tek bir iki boyutlu elektrofrez jeli, 1.000'den fazla farklı proteini çözümleyebilir.
- İki boyutlu elektrofrezle elde edilen karmaşık protein örüntüsü yandaki figürde gösterilmiştir.





Saflaştırılmamış Proteinler de Ölçülebilir

- Bir proteini saflaştırmak için her aşamada hedef proteinin varlığını belirleyecek bir ölçüm yöntemine ihtiyaç duyulur.
- Saflaştırma işlemi çoğu zaman proteinin büyüklüğü ve fiziksel özellikleri tam olarak bilinmeden başlatılır.
- Bu nedenle ham çözelti veya doku ekstraktındaki hedef protein seçici biçimde tanınmalı ve miktarı ölçülmelidir.
- Enzim proteinleri, katalizledikleri tepkimenin ölçülmesine dayanan etkinlik testleriyle takip edilebilir.





Enzim Etkinliği Ölçümü İçin Gereken Bilgiler

- Enzim ölçümü için katalizlenen tepkimenin genel denklemi ve kaybolan substratı veya oluşan ürünü ölçme yöntemi bilinmelidir.
- Enzimin metal iyonları veya koenzimler gibi kofaktörlere ihtiyaç duyup duymadığı belirlenmelidir.
- Enzim etkinliğinin substrat derişimine bağımlılığı ile optimum pH değeri bilinmelidir.
- Ayrıca enzimin kararlı kaldığı ve yüksek etkinlik gösterdiği sıcaklık aralığı belirlenmelidir.





Enzim Testleri Standart Koşullarda Yürütülür

- Enzim etkinliği testleri genellikle enzimin optimum pH ve uygun sıcaklık koşullarında gerçekleştirilir.
- Birçok memeli enzimi için uygun test sıcaklığı 25–38 °C aralığında bulunur.
- Substrat, tepkime hızının substrat derişimine bağımlı olmadığı kadar yüksek bir derişimde kullanılmalıdır.
- Bu koşullarda ölçülen başlangıç tepkime hızı, enzim derişimiyle doğru orantılıdır.





Enzim Etkinliği Birimi

- Bir enzim etkinlik birimi, tanımlanmış koşullarda belirli miktarda substratı ürüne dönüştüren enzim miktarını ifade eder.
- Çoğu enzim için bir birim, 25 °C'de dakikada 1.0 μmol substratı ürüne dönüştüren miktar olarak tanımlanır.
- Bazı enzimlerde etkinlik biriminin tanımı, ölçüm yöntemine ve enzimin özelliklerine göre farklılaşabilir.
- Toplam etkinlik, bir çözeltide bulunan enzime ait bütün etkinlik birimlerinin toplamıdır.





Özgül Etkinlik Saflaştırmanın Temel Göstergesidir

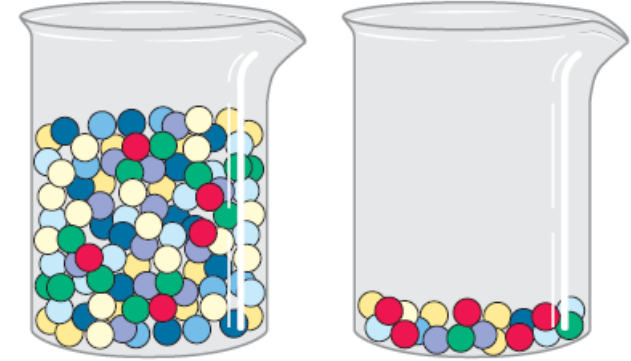
- Özgül etkinlik, toplam protein miktarının her miligramı başına düşen enzim etkinliği birimi olarak tanımlanır.
- Bu değer, bir enzim preparatının saflığını değerlendirmek için kullanılan temel ölçütlerden biridir.
- Saflaştırma ilerledikçe hedef enzimin toplam proteine oranı arttığından özgül etkinlik yükselir.
- Enzim tamamen saf hâle geldiğinde özgül etkinlik en yüksek ve sabit değerine ulaşır.





Toplam Etkinlik ile Özgül Etkinlik Arasındaki Fark

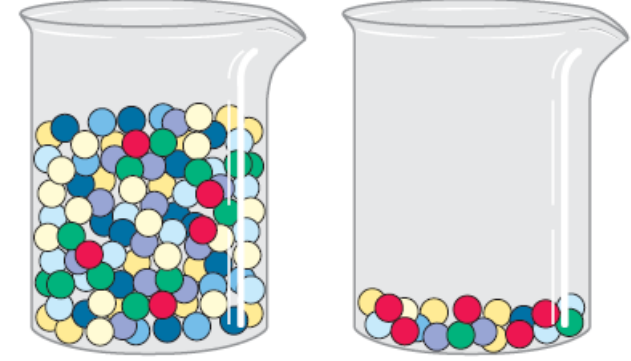
- Aynı sayıda hedef enzim molekülü içeren örnekler aynı toplam enzim etkinliğine sahip olabilir.
- Ancak örneklerde bulunan diğer proteinlerin miktarı, hesaplanan özgül etkinliğin birbirinden farklı olmasına neden olur.
- Daha az kirletici protein içeren örnekte hedef enzim toplam proteinin daha büyük bölümünü oluşturur.
- Toplam etkinlik ile özgül etkinlik arasındaki bu fark yandaki figürde renkli bilyelerle gösterilmiştir.





Saflık Nasıl Gösterilir?

- Figürde kırmızı bilyeler hedef enzimi, diğer renkler ise kirletici proteinleri temsil eder.
- İki kaptaki aynı sayıda kırmızı bilye bulunduğundan toplam etkinlik değerleri aynıdır.
- İkinci kaptaki toplam bilye sayısı daha düşük olduğundan kırmızı bilyelerin toplam içindeki oranı daha yüksektir.
- Bu nedenle ikinci kaptaki örneğin özgül etkinliği ve protein saflığı daha fazladır.



İZLE



Saflaştırma Basamaklarında Etkinlik Nasıl Değişir?

- Her saflaştırma basamağından sonra preparatın toplam etkinliği ve toplam protein miktarı ölçülür.
- Özgül etkinlik, toplam etkinliğin toplam protein miktarına oranlanmasıyla hesaplanır.
- Saflaştırma ilerledikçe hem toplam etkinlik hem de toplam protein miktarı genellikle azalır.

Bi Dünya Biyoloji



Bektaş Tepe
gezimania_tr



Saflaştırma Sırasında Etkinlik Kaybı Yaşanabilir

- Toplam etkinlik, enzimin inaktivasyonu veya kromatografi materyalleriyle geri dönüşümsüz etkileşmesi nedeniyle azalabilir.
- Saflaştırma sürecindeki amaç, hedef enzimin mümkün olduğunca büyük bölümünü etkin durumda korumaktır.
- Başarılı bir basamakta hedef olmayan protein kaybı, hedef enzimin etkinlik kaybından çok daha yüksek olur.
- Böylece toplam etkinlik azalsa bile özgül etkinlik artmaya devam eder.





Bir Proteinin Saf Olduğuna Nasıl Karar Verilir?

- Saflaştırma ilerledikçe özgül etkinlik yükselir ve enzim tamamen saflaştığında sabit bir değere ulaşır.
- Elektroforez gibi yöntemlerle yalnızca tek bir protein türü saptandığında preparat saf kabul edilebilir.
- Saflık değerlendirmesi, özgül etkinlik verileri ile proteinin fiziksel olarak görüntülenmesini birlikte gerektirir.





Enzim Olmayan Proteinler İşlevleriyle İzlenebilir

- Enzim niteliği taşımayan proteinler için hedef proteine özgü başka ölçüm yöntemlerinin geliştirilmesi gerekir.
- Taşıma proteinleri, taşınmasında görev aldıkları moleküle bağlanmaları üzerinden test edilebilir.
- Hormonlar ve toksinler, oluşturdukları biyolojik etkiler dikkate alınarak ölçülebilir.
- Örneğin bazı hormonların etkinliği, kültür ortamındaki belirli hücrelerin büyümesini uyarma yetenekleriyle belirlenebilir.



Her Protein İçin Uygun Bir İşlevsel Test Seçilir

- Bazı yapısal proteinler toplam doku kütlesinin büyük bir bölümünü oluşturduğundan kolayca tanınabilir ve saflaştırılabilir.
- Diğer proteinlerin takibi için ise hedef proteinin işlevine uygun özel bir fonksiyonel test geliştirilmelidir.
- Bu nedenle proteinleri saptamak ve miktarlarını belirlemek için kullanılan yaklaşımlar, proteinlerin kendileri kadar çeşitlidir.

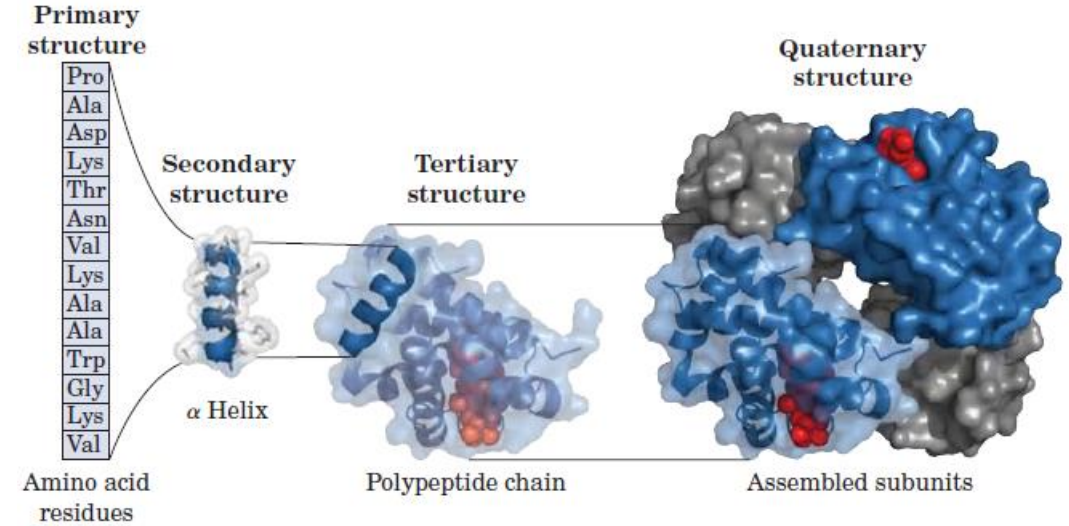


Protein Saflaştırma Yapısal İncelemenin Başlangıcıdır

- Bir proteinin saflaştırılması, onun yapısını ve işlevini ayrıntılı biçimde incelemek için başlangıç oluşturur.
- Proteinleri enzim, hormon, yapısal protein veya antikor yapan özelliklerin anlaşılması amaçlanır.
- Proteinler arasındaki en belirgin farklılıklar yapısaldır ve bu farklılıklar doğrudan gözle görülemez.
- Bu nedenle protein yapısı, birbiriyle bağlantılı farklı karmaşıklık düzeyleri üzerinden incelenir.

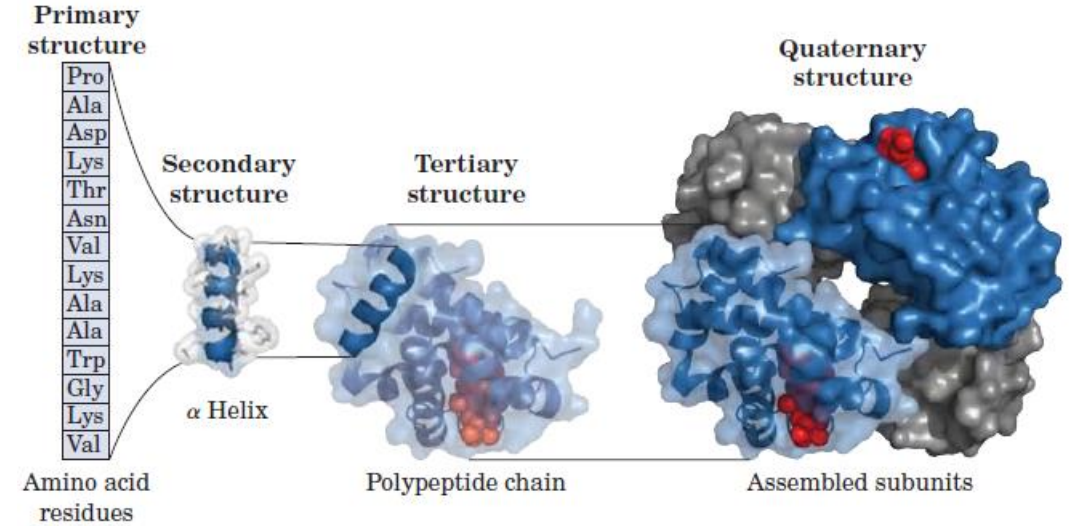
Protein Yapısı Dört Düzeyde Ele Alınır

- Protein yapısını tanımlamak için birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapı olmak üzere dört düzey kullanılır.
- Bu yapı düzeyleri, amino asit dizisinden çok alt birimli proteinlerin düzenine kadar uzanan kavramsal bir hiyerarşi oluşturur.
- Proteinlerin dört farklı yapı düzeyi ve aralarındaki ilişkiler yandaki figürde gösterilmiştir.



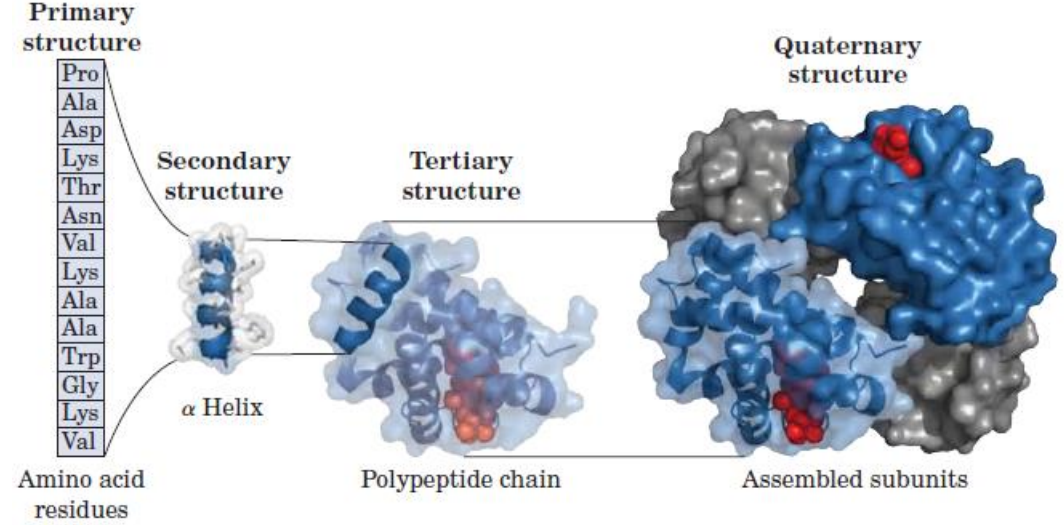
Birincil Yapı Amino Asit Dizisini Tanımlar

- Birincil yapı, polipeptit zincirindeki amino asit kalıntılarını birbirine bağlayan bütün kovalent bağları kapsar.
- Peptit bağları ve varsa disülfid bağları proteinin birincil yapısının parçalarıdır.
- Birincil yapının en önemli unsuru, polipeptitteki amino asit kalıntılarının izlediği dizidir.



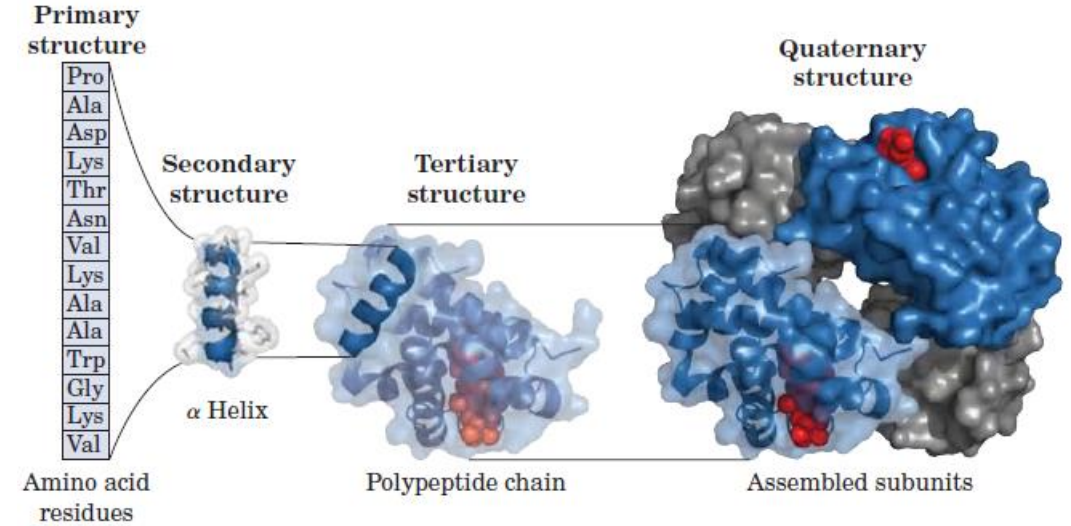
İkincil ve Üçüncül Yapı

- İkincil yapı, amino asit kalıntılarının düzenli ve tekrarlayan kararlı yerel düzenlenmelerini ifade eder.
- α -Heliks gibi yapılar, proteinlerin ikincil yapı örnekleri arasında yer alır.
- Üçüncül yapı, tek bir polipeptit zincirinin üç boyutlu katlanması bütünü kapsar.



Dördüncül Yapı Alt Birimlerin Düzenini Gösterir

- Bazı proteinler, birbirinden ayrı iki veya daha fazla polipeptit zincirinden oluşur.
- Bu proteinlerde alt birimlerin üç boyutlu düzenlenmesi dördüncül yapı olarak adlandırılır.
- Dördüncül yapı, onlarca veya binlerce alt birim içeren karmaşık protein düzeneklerine kadar uzanabilir.
- Hemoglobindeki alt birimlerin oluşturduğu dördüncül yapı yandaki figürde gösterilmiştir.



Birincil Yapı Protein Hakkında Temel Bilgiler Sağlar

- Proteinlerin birincil yapılarındaki farklılıklar, yapı ve işlev ilişkisini anlamada özellikle bilgilendiricidir.
- Her proteinin kendisine özgü bir amino asit dizisi bulunur.
- Bir proteinin birincil yapısı, onun kendine özgü üç boyutlu yapıya nasıl katlanacağını belirler.
- Oluşan üç boyutlu yapı da proteinin biyolojik işlevini belirleyen temel etkindir.

Her Protein Kendine Özgü Bir Dizi Taşır

- *Escherichia coli* hücresi 3.000'den fazla farklı protein üretir.
- İnsanlarda yaklaşık 25.000 gen, çok daha fazla sayıda proteinin üretimini kodlar.
- Her protein, kendisine özgü bir amino asit dizisine ve bunun belirlediği üç boyutlu yapıya sahiptir.
- Proteinin özgün yapısı, hücre içinde üstlendiği özgün işlevle yakından ilişkilidir.

Protein İşlevi Amino Asit Dizisine Bağlıdır

- Amino asit dizisi, proteinin üç boyutlu yapısını ve dolayısıyla biyolojik işlevini belirleyen temel bilgiyi taşır.
- Amino asit dizisindeki değişiklikler, proteinin yapısının ve işlevinin değişmesine neden olabilir.
- Protein dizileri ile biyolojik işlev arasındaki yakın ilişki, farklı deneysel gözlemlerle desteklenir.
- Bu ilişkinin anlaşılması, proteinlerin nasıl çalıştığını açıklamamanın temelini oluşturur.

Dizi Değişiklikleri Protein İşlevini Bozabilir

- Farklı işlevlere sahip proteinler, her zaman birbirinden farklı amino asit dizilerine sahiptir.
- Genetik hastalıklardaki protein kusurları, amino asit dizisinde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanabilir.
- Orak hücreli anemide dizideki tek bir amino asidin değişmesi protein işlevini etkiler.
- Duchenne kas distrofisinde polipeptit zincirinin büyük bir bölümünün kaybı, kısa ve işlevsiz bir proteinin oluşmasına yol açar.

Birincil Yapıdaki Küçük Değişiklikler İşlevi Etkileyebilir

- Bir proteinin birincil yapısındaki değişiklik, proteinin biyolojik işlevinde değişime neden olabilir.
- İşlevleri birbirine benzeyen farklı protein türleri, çoğunlukla benzer amino asit dizileri taşır.
- Benzer dizilerin korunması, belirli amino asit kalıntılarının protein işlevi açısından önemli olduğunu gösterir.
- Böylece amino asit dizilerinin karşılaştırılması, proteinlerin işlevsel ilişkileri hakkında bilgi sağlar.

Ubikitin Dizisi Güçlü Biçimde Korunmuştur

- Ubikitin, diğer proteinlerin parçalanmasının düzenlenmesinde görev alan 76 amino asitlik bir proteindir.
- Böcekler ve insanlar gibi çok farklı türlerde ubikitin amino asit dizisi birbirinin aynıdır.
- Ubikitin dizisinin güçlü biçimde korunması, amino asit sırasının biyolojik işlev açısından önemini gösterir.
- Uzak akraba türlerde benzer proteinlerin genel büyüklük ve dizi bakımından benzer kalması da bu ilişkiyi destekler.

Protein Dizileri Belirli Ölçüde Değişkenlik Gösterebilir

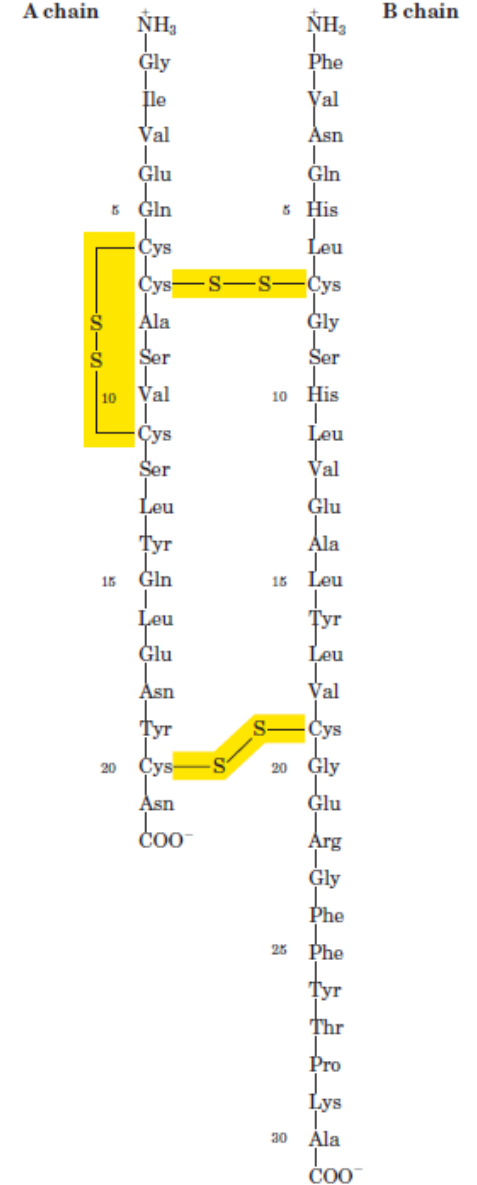
- Bir proteinin amino asit dizisi, her konumda mutlak biçimde değişmez olmak zorunda değildir.
- İnsan proteinlerinin yaklaşık %20–30'u, toplum içinde amino asit dizisi varyantları taşıyan polimorfik proteinlerdir.
- Bu varyasyonların çoğu, proteinin işlevi üzerinde çok az etki oluşturur veya hiç etki göstermez.
- Benzer işlevli proteinlerin genel büyüklük ve dizileri, uzak akraba türler arasında bile önemli ölçüde korunabilir.

Protein Dizilerinin Kritik Bölgeleri Korunur

- Amino asit dizisinin bazı bölgeleri, biyolojik işlevi etkilemeden önemli ölçüde değişebilir.
- Buna karşılık proteinlerin çoğunda, işlev için vazgeçilmez olan kritik bölgeler bulunur.
- Bu kritik bölgelerdeki amino asit dizileri güçlü biçimde korunma eğilimindedir.
- Dizinin korunması, birincil yapı ile üç boyutlu yapı ve işlev arasındaki ilişkiyi ortaya koyar.

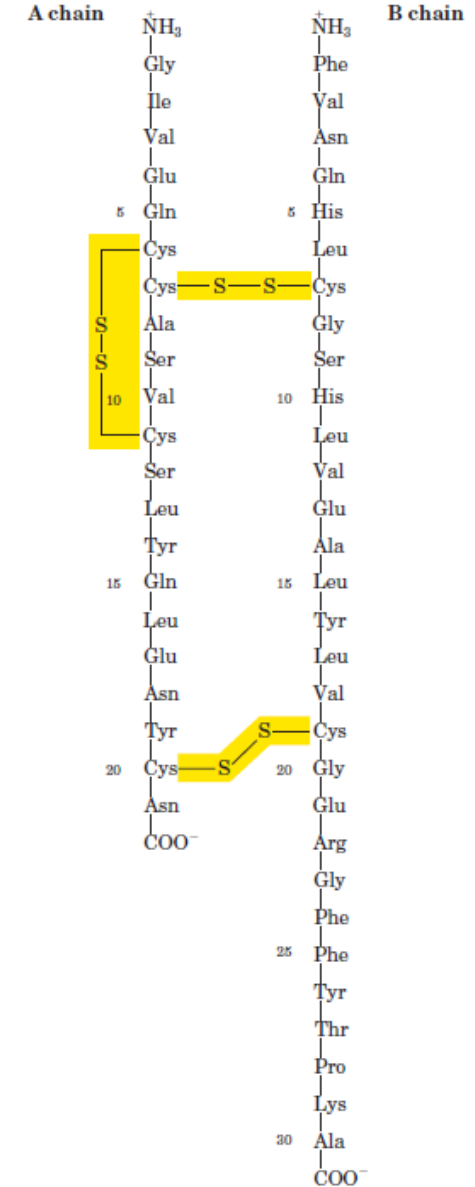
Protein Dizilerinin Belirlenmesinde 1953 Bir Dönüm Noktasıdır

- James Watson ve Francis Crick, 1953 yılında DNA'nın çift sarmallı yapısını ortaya koymuştur.
- Önerilen yapı, bir genin taşıdığı moleküler bilginin hassas biçimde kopyalanabilmesini açıklamıştır.
- Aynı yıl Frederick Sanger, sığır insülininin polipeptit zincirlerindeki amino asit dizisini belirlemiştir.
- Sığır insülininin iki polipeptit zinciri ve disülfid bağları yandaki figürde gösterilmiştir.



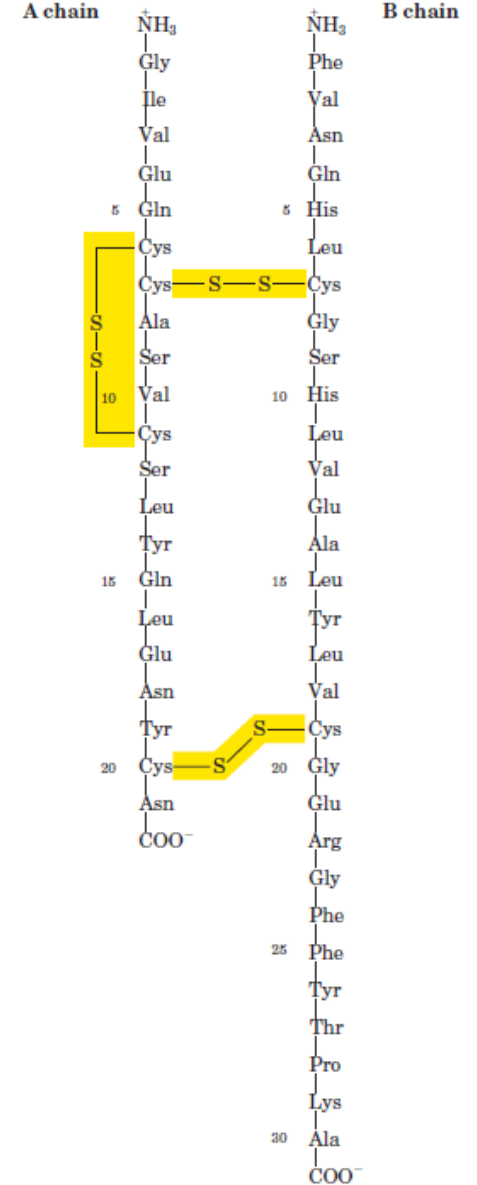
Sığır İnsülininin Birincil Yapısı

- Sığır insülini A ve B olarak adlandırılan iki ayrı polipeptit zincirinden oluşur.
- Bu zincirler, zincirler arası disülfid bağlarıyla birbirine bağlanır.
- A zincirinde ayrıca zincir içi bir disülfid bağı bulunur.
- Sığır insülininin amino asit dizisi ve disülfid bağlarının konumları yandaki figürde gösterilmiştir.



İnsülin Dizileri Türler Arasında Farklılaşabilir

- İnsülinin A zinciri insan, domuz, köpek, tavşan ve ispermeçet balinasında birbirinin aynıdır.
- İnek, domuz, köpek, keçi ve at insülinlerinin B zincirleri de aynı amino asit dizisini taşır.
- Bu durum, işlevsel bir proteinin dizisinin farklı türlerde büyük ölçüde korunabildiğini gösterir.
- Türler arasındaki bu benzerlik, amino asit dizisi ile protein işlevi arasındaki yakın ilişkiyi destekler.



DNA Dizisi ile Protein Dizisi Arasında Bağlantı Kurulur

- Başlangıçta bir polipeptidin amino asit dizisini belirleyen yapının bir nükleotit dizisi olabileceği düşünülmüştür.
- DNA'daki nükleotit dizisi ile proteinlerdeki amino asit dizisinin birbiriyle ilişkili olduğu kısa sürede anlaşılmıştır.
- Genetik kodun açıklanmasıyla DNA dizisindeki bilginin protein dizisine nasıl aktarıldığı ortaya konulmuştur.
- Böylece birçok proteinin amino asit dizisi, ilgili genin DNA dizisinden dolaylı olarak belirlenebilir hâle gelmiştir.

Genom Dizileme Protein Dizilerine Hızlı Erişim Sağlar

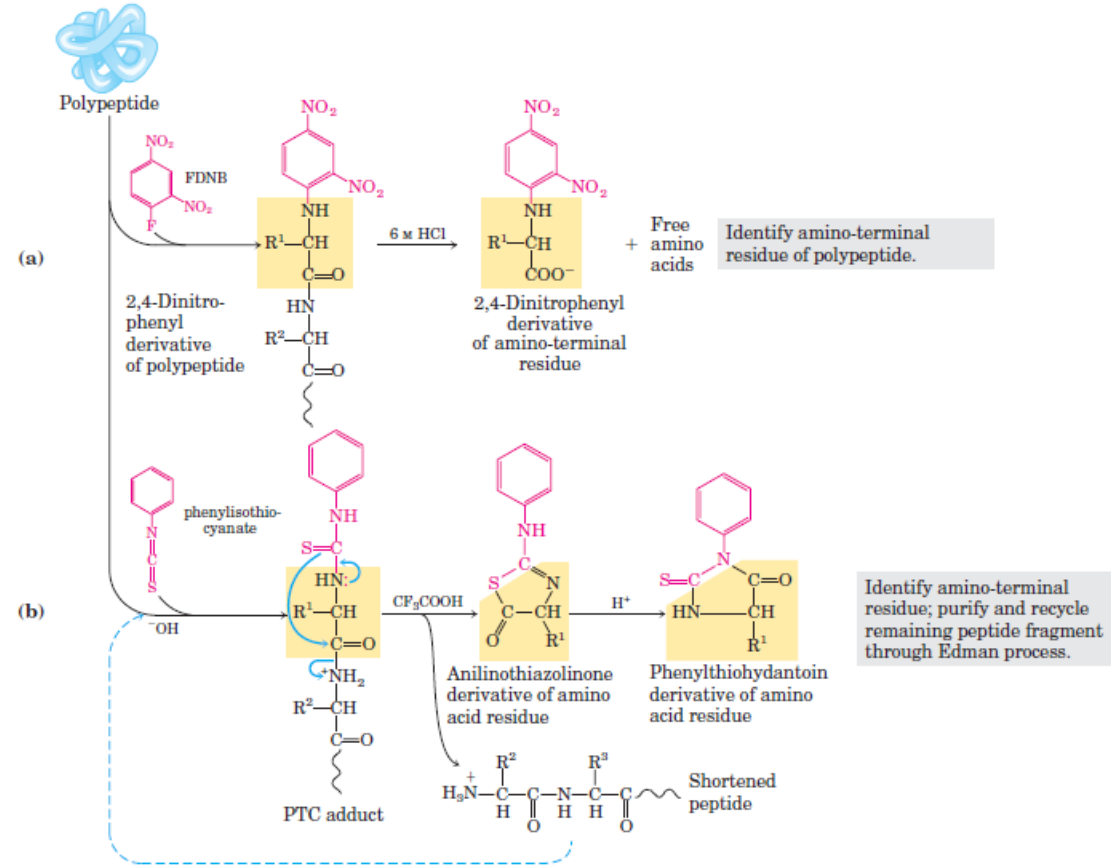
- Günümüzde çok sayıda protein dizisi, genomik veri tabanlarındaki DNA dizilerinden türetilir.
- Protein kimyasındaki modern yöntemler, geleneksel polipeptit dizileme yaklaşımlarına göre daha hızlı sonuç verebilir.
- Bununla birlikte geleneksel dizileme, protein sentezinden sonra oluşan kimyasal değişiklikleri doğrudan gösterebilir.
- Kimyasal protein dizileme ile yeni yöntemler, protein dizisine ulaşmak için birbirini tamamlayan bilgiler sağlar.

Kimyasal Dizileme Yeni Yöntemleri Tamamlar

- Gen dizisinden türetilen bilgi, proteinin amino asit dizisine ulaşmak için önemli bir yol sunar.
- Ancak DNA dizisi, protein sentezi sonrasında amino asit kalıntılarında gerçekleşen değişiklikleri doğrudan göstermez.
- Geleneksel polipeptit dizileme yöntemleri, bu değişikliklerin protein üzerindeki gerçek konumlarını ortaya çıkarabilir.
- Birden fazla yaklaşımın birlikte kullanılması, amino asit dizisi verilerinin doğruluğunu artırır.

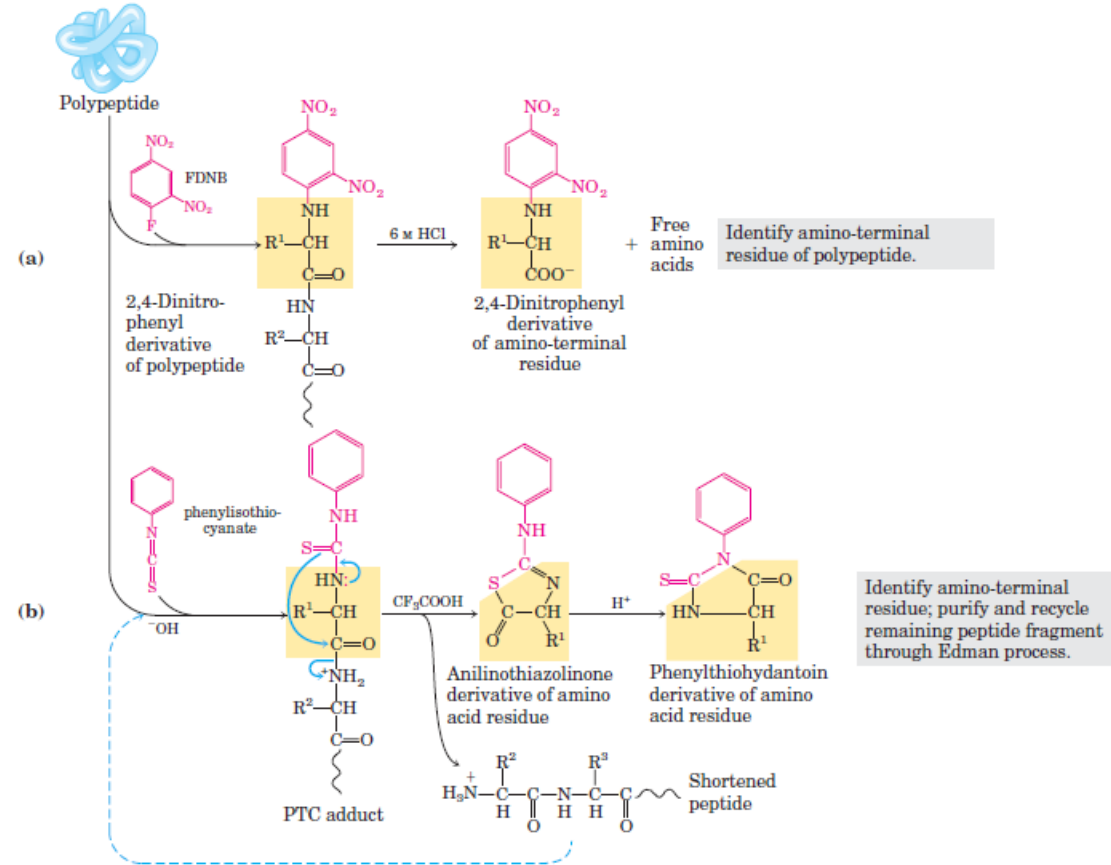
Kısa Polipeptitler Otomatik Yöntemlerle Dizilenebilir

- Proteinlerin birincil yapısını incelemek için amino-terminal kalıntının işaretlenmesini ve tanımlanmasını sağlayan yöntemler geliştirilmiştir.
- Frederick Sanger, amino-terminal amino asidi belirlemek için 1-floro-2,4-dinitrobenzen reaktifini geliştirmiştir.
- Dansil klorür ve dabsil klorür gibi başka reaktifler de amino-terminal kalıntıların işaretlenmesinde kullanılabilir.
- Amino-terminal amino asidin belirlenmesine yönelik temel yaklaşımlar yandaki figürde gösterilmiştir.



Sanger Yöntemi Amino-Terminal Kalıntıyı Belirler

- Sanger yönteminde FDNB, polipeptidin amino-terminalindeki serbest amino grubuyla tepkimeye girer.
- İşaretlenen polipeptit daha sonra 6 M HCl ile kendisini oluşturan amino asitlere kadar hidroliz edilir.
- Amino-terminal kalıntının dinitrofenil türevi diğer amino asitlerden ayrılarak tanımlanır.
- Bu yöntemin temel tepkime basamakları Figür a'da gösterilmiştir.



Sanger Yönteminin Sınırlılıkları

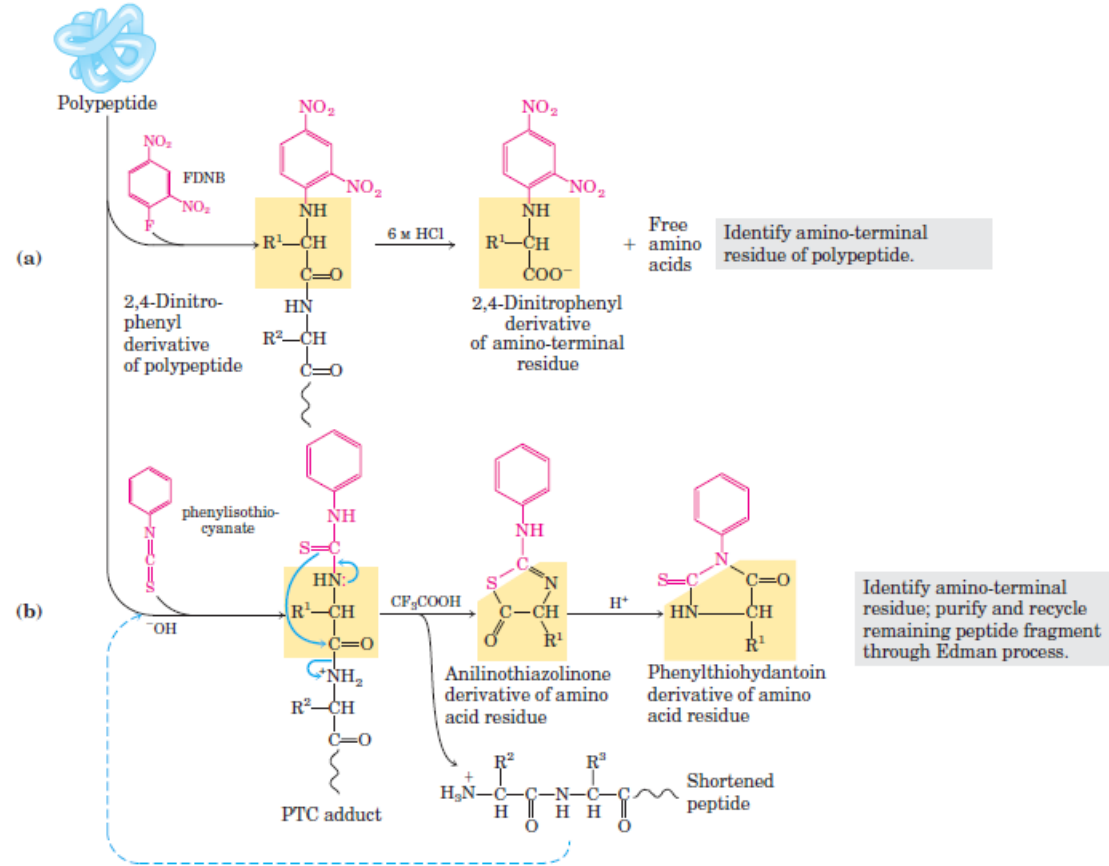
- Kuvvetli asit hidrolizi polipeptit zincirini bütünüyle parçaladığı için işlem yalnızca amino-terminal kalıntıyı belirler.
- Bu yöntem kullanılarak polipeptit dizisinin amino-terminalden sonraki bölümü doğrudan okunamaz.
- Buna karşılık yöntemin tekrarlanması, saflaştırılmış bir proteindeki farklı polipeptit zincirlerinin sayısını gösterebilir.
- İnsülinde fenilalanin ve glisinin işaretlenmesi, proteinin iki farklı amino-terminal uç taşıdığını ortaya koyar.

Floresan Reaktifler Duyarlılığı Artırır

- Dansil klorür ve dabsil klorür, amino-terminal amino asitleri işaretleme için kullanılan alternatif reaktiflerdir.
- Bu reaktiflerin oluşturduğu türevler güçlü floresans gösterdiği için kolayca saptanabilir.
- Yüksek duyarlılık, çok az miktardaki protein örneğinde amino-terminal kalıntının belirlenmesini kolaylaştırır.
- Ancak polipeptidin tamamını dizilemek için amino-terminal kalıntının ardışık biçimde uzaklaştırılması gerekir.

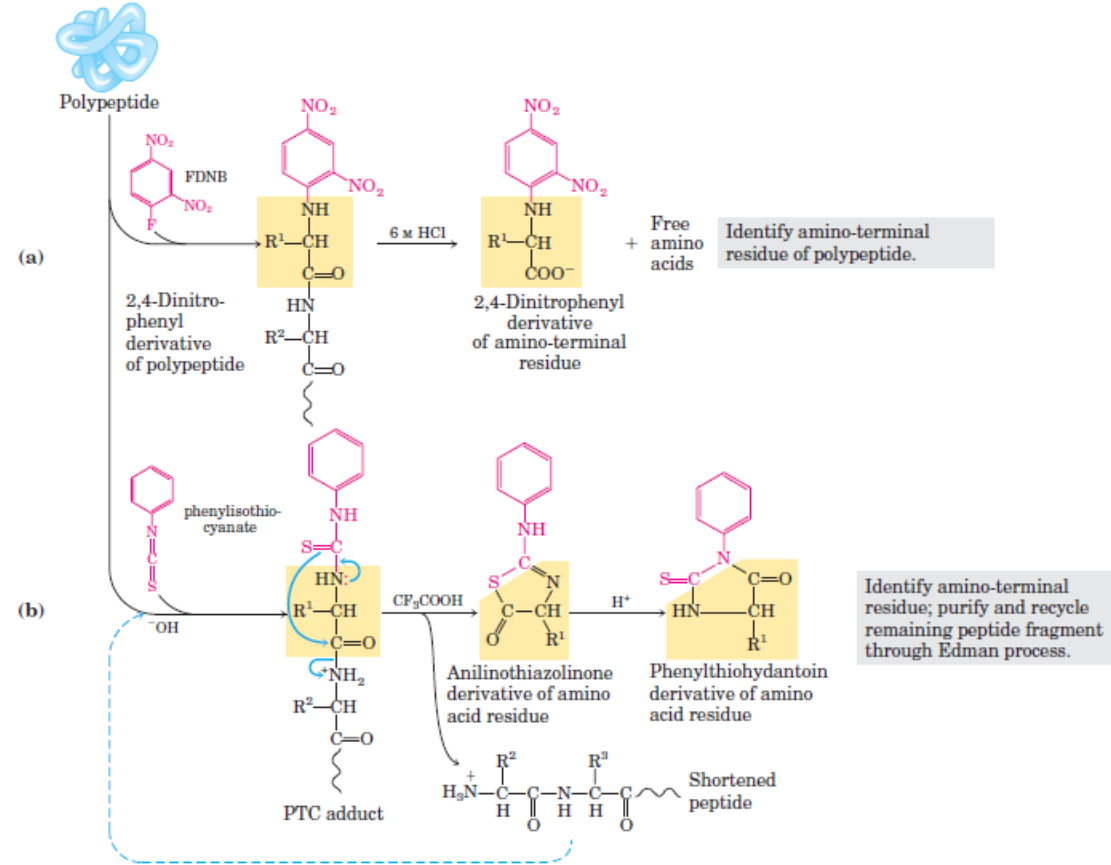
Edman Yıkımı Dizinin Ardışık Okunmasını Sağlar

- Pehr Edman tarafından geliştirilen yöntem, polipeptidin amino-terminal kalıntısını işaretleyip uzaklaştırır.
- İlk olarak amino-terminal amino asit, hafif alkali koşullarda fenilizotiyosiyanatla tepkimeye girer.
- Tepkime sonucunda feniltiyokarbamoil türevi oluşurken polipeptit zincirindeki diğer bağlar korunur.
- Edman yıkımının kimyasal basamakları figür b'de gösterilmiştir.



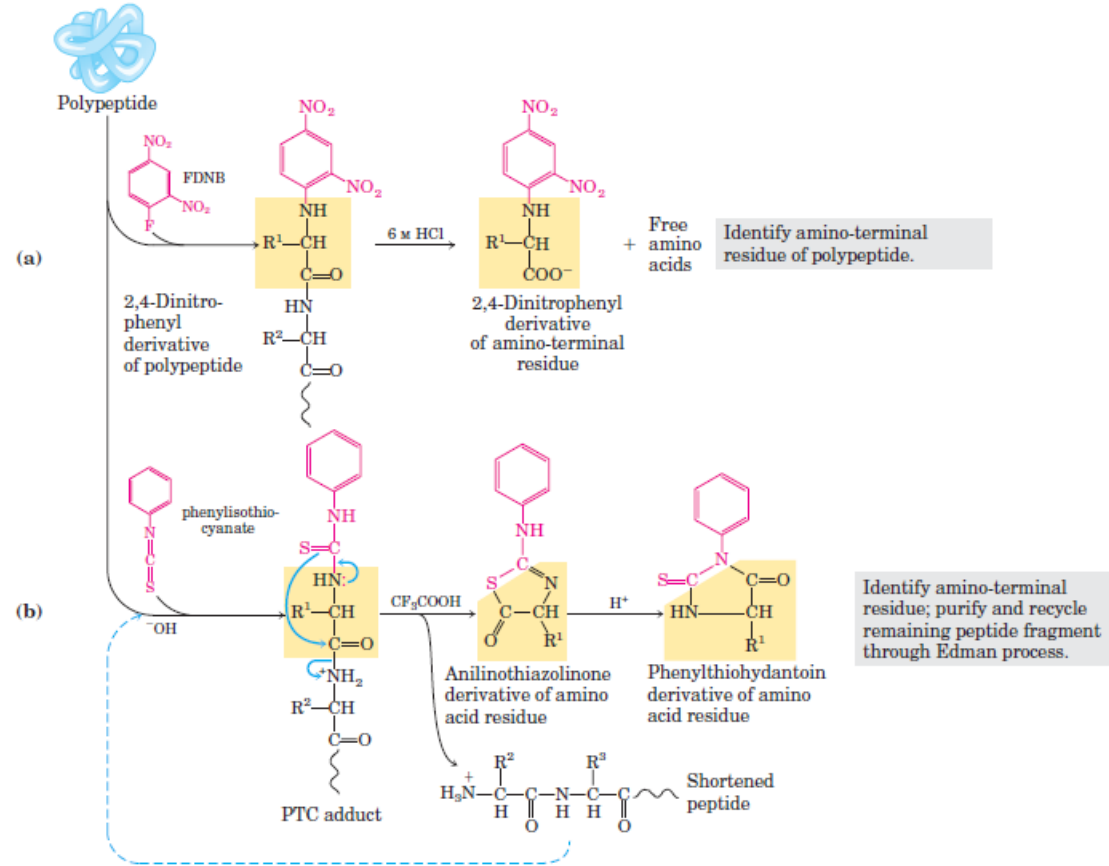
Edman Döngüsünde İlk Kalıntı Uzaklaştırılır

- Oluşan feniltiyokarbamoil türevi, susuz trifluoroasetik asit kullanılarak polipeptit zincirinden ayrılır.
- Bu sırada yalnızca amino-terminaldeki ilk peptit bağı parçalanır.
- Serbest kalan türev, kararlı bir feniltiyohidantoin türevine dönüştürülerek tanımlanır.
- Geriye amino-terminal ucundan bir kalıntı kısaltılmış ancak diğer peptit bağları korunmuş bir zincir kalır.



Edman Yıkımı Tekrarlanan Bir Süreçtir

- İlk amino asit uzaklaştırıldığında yeni bir amino-terminal kalıntı açığa çıkar.
- Aynı işaretleme, ayırma ve tanımlama basamakları yeni kalıntı üzerinde yeniden uygulanır.
- Döngüler tekrarlanarak polipeptidin amino asit dizisi amino-terminal uçtan itibaren okunur.
- Edman işleminin her döngüsünde açığa çıkan amino asit türevleri ayrılır, tanımlanır ve miktarları kaydedilir.



Otomatik Dizilemenin Verimliliği Sonucu Belirler

- Edman yıkımında doğru biçimde dizilenebilecek polipeptit uzunluğu, her kimyasal basamağın verimliliğine bağlıdır.
- Her döngüde tam olarak uzaklaştırılamayan kalıntılar, sonraki döngülerde arka plan sinyalinin artmasına yol açar.
- Bu birikim, belirli bir noktadan sonra sıradaki amino asidin güvenilir biçimde tanımlanmasını engelleyebilir.
- Bu nedenle dizileme veriminin yüksek olması, uzun ve doğru amino asit dizileri elde etmek için zorunludur.

Döngü Verimindeki Küçük Kayıplar Birikir

- Her döngüde %97 verimle çalışan bir yöntemde uzaklaştırılmayan kalıntılar giderek birikir.
- Glisin–Pro–Lizin dizisinde ilk döngüden sonra moleküllerin %3'ü amino-terminalde glisin taşımayı sürdürür.
- İkinci döngüden sonra örnekte amino-terminali glisin veya prolin olan farklı zincirler birlikte bulunur.
- Önceki döngülerden kalan kalıntılar arka planı artırarak dizinin izlenmesini giderek güçleştirir.

Modern Dizileme Daha Yüksek Verim Sağlar

- Modern dizileme cihazları her döngüde %99'dan daha yüksek verimlilik sağlayabilir.
- Bu verimlilik, 50'den fazla ardışık amino asidin doğru biçimde belirlenmesine imkân verir.
- Polipeptit dizileme otomatik hâle getirildiğinden kısa proteinler oldukça hızlı biçimde analiz edilebilir.
- Sanger ve çalışma arkadaşlarının yıllar içinde belirlediği insülin dizisi, günümüzde doğrudan dizilemeyle kısa sürede çözülebilir.

Büyük Proteinler Daha Küçük Parçalara Ayrılmalıdır

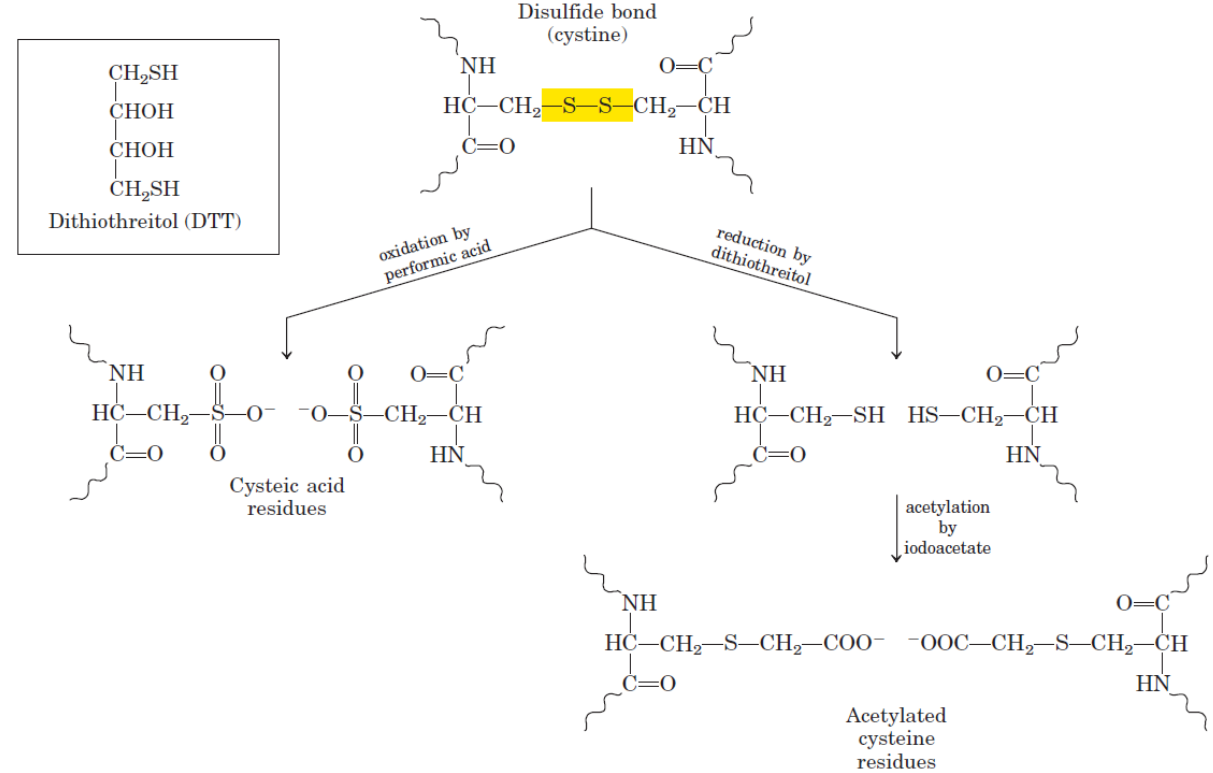
- Polipeptit uzunluğu arttıkça amino asit dizilemesinin genel doğruluğu azalır.
- Büyük proteinler, etkin biçimde dizilenebilecek daha küçük parçalara ayrılmalıdır.
- Öncelikle protein tek tek polipeptit zincirlerine ayrılır ve varsa disülfid bağları parçalanır.
- Elde edilen her parça saflaştırılır ve daha sonra Edman yöntemiyle ayrı ayrı dizilenir.

Parçaların Protein İçindeki Sırası Yeniden Kurulur

- Ayrı ayrı dizilenen parçaların özgün polipeptit zincirindeki sıraları belirlenmelidir.
- Parçaların birbiriyle örtüşen dizileri, özgün zincirdeki yerlerinin bulunmasına yardımcı olur.
- Ayrıca protein içindeki disülfid bağlarının hangi sistein kalıntıları arasında kurulduğu belirlenir.
- Böylece parçalanmış zincirlerden proteinin bütün birincil yapısı yeniden oluşturulur.

Dizilemeden Önce Disülfid Bağları Parçalanır

- Disülfid bağları, polipeptit zincirlerinin birbirinden ayrılmasını ve dizileme işlemini engelleyebilir.
- Sistin kalıntısı, Edman işlemiyle peptit bağı parçalandıktan sonra başka bir zincire bağı kalabilir.
- Bu nedenle disülfid bağları, polipeptit zinciri dizilenmeden önce indirgenerek parçalanmalıdır.
- Disülfid bağlarının kırma ve yeniden oluşmalarını önleme yaklaşımları yandaki figürde gösterilmiştir.



Polipeptit Zinciri Özgöl Noktalardan Kesilebilir

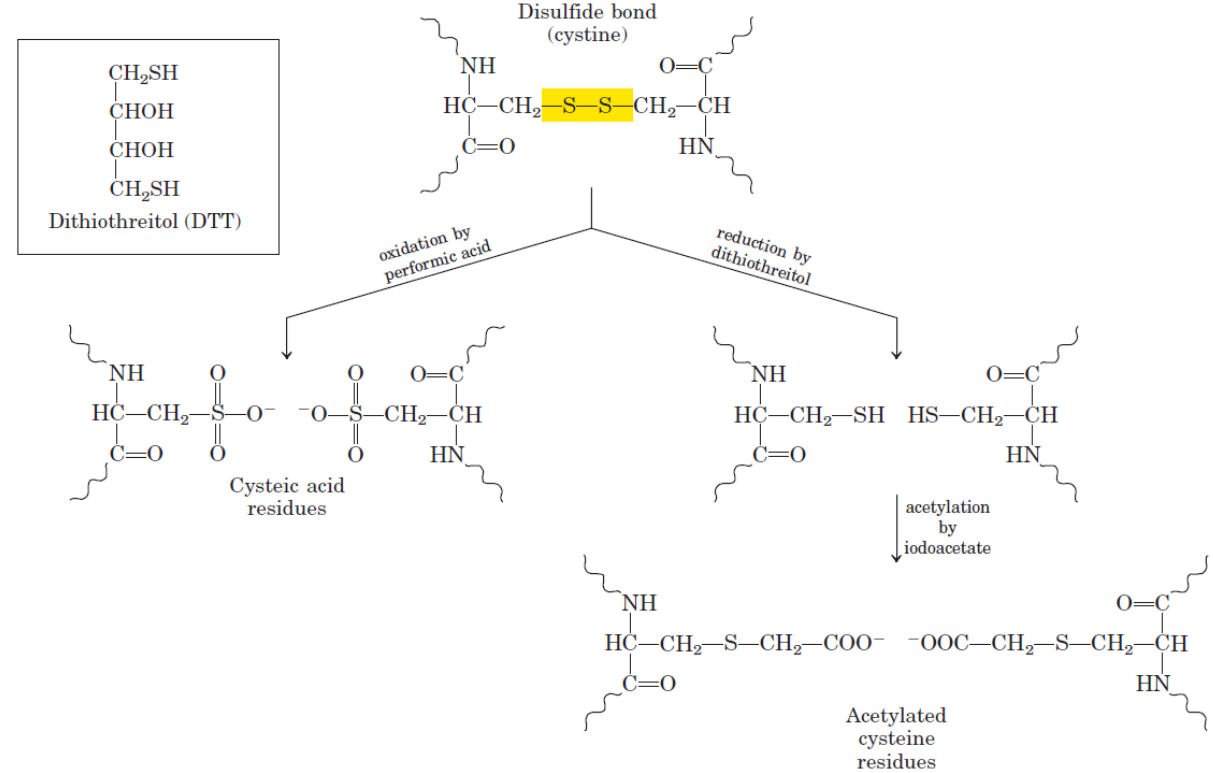
- Büyük polipeptit zincirlerinin küçük parçalara ayrılması için çeşitli yöntemler kullanılabilir.
- Proteaz olarak adlandırılan enzimler, proteinlerdeki peptit bağlarının hidrolizini katalizler.
- Bazı proteazlar yalnızca belirli amino asit kalıntılarının yanındaki peptit bağlarını parçalar.
- Proteazların kesim özgüllükleri, polipeptitlerin öngörülebilir ve yeniden oluşturulabilir biçimde parçalanmasını sağlar.

Kesim Yöntemleri Birbirini Tamamlar

- Polipeptit zincirleri enzimlerin yanında belirli kimyasal reaktifler kullanılarak da parçalanabilir.
- Bazı kimyasal reaktifler, belirli amino asit kalıntılarının komşuluğundaki peptit bağlarını seçici biçimde keser.
- Farklı kesim yöntemleri, özgün diziyi yeniden kurmak için gerekli örtüşen peptit parçalarını oluşturabilir.

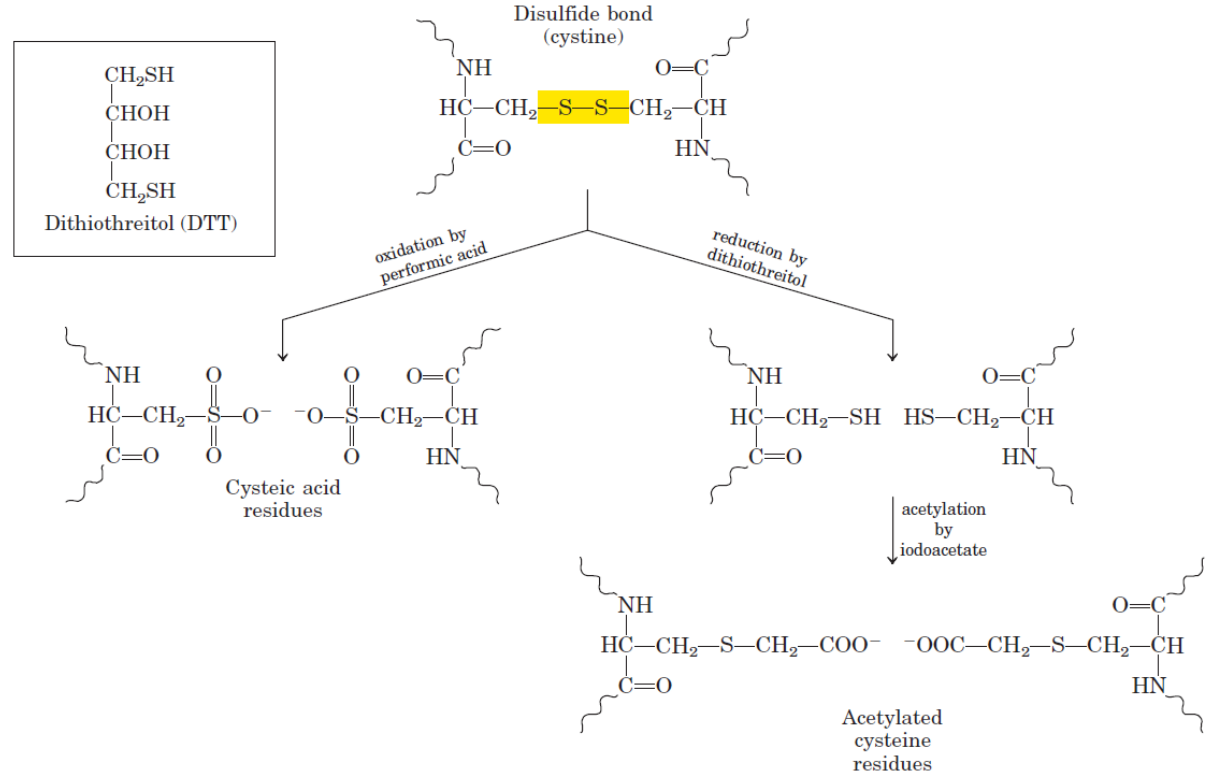
Disülfid Bağları Dizilemeden Önce Açılmalıdır

- Disülfid bağları, polipeptit zincirlerinin birbirinden ayrılmasını ve amino asit dizilerinin belirlenmesini güçleştirir.
- Bu bağların dizileme öncesinde kırılması için yükseltgenme veya indirgenme temelli iki farklı yaklaşım kullanılabilir.
- Her iki yaklaşım da sistin içindeki disülfid bağını ortadan kaldırarak bağlı polipeptit bölgelerini birbirinden ayırır.



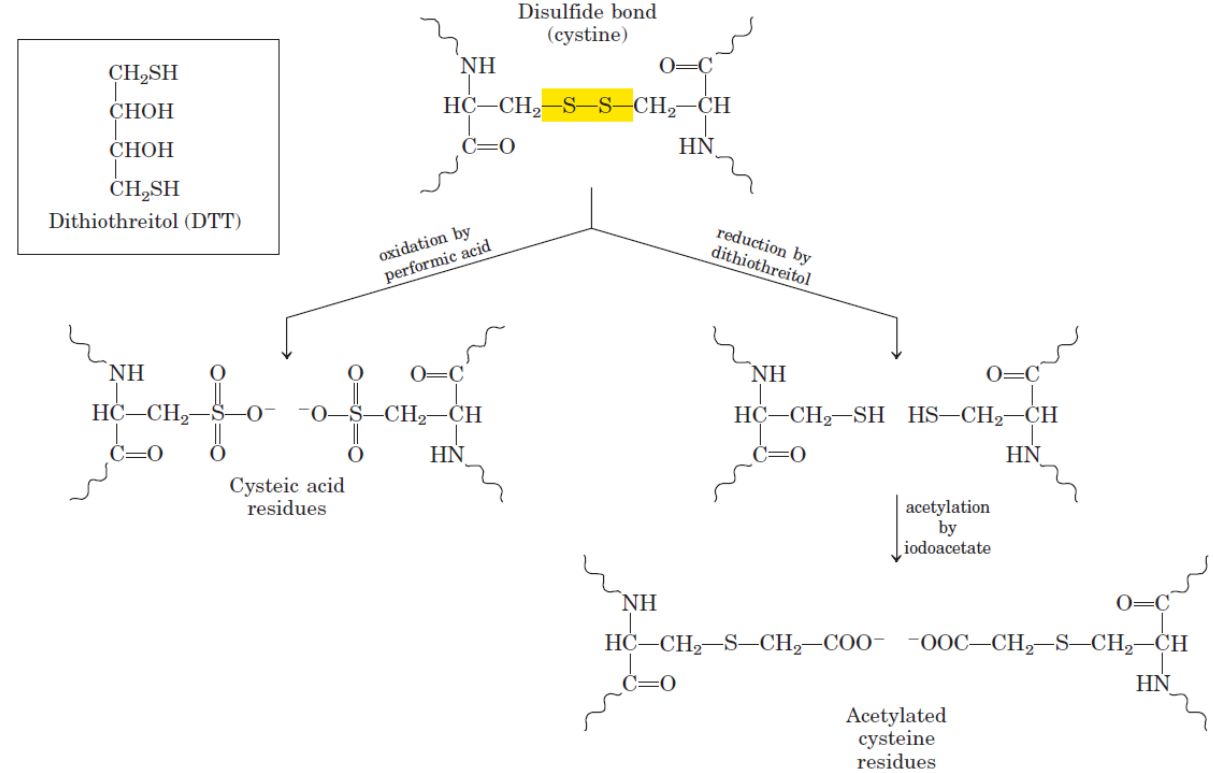
Performik Asitle Yükseltgenme

- Sistin kalıntısı performik asitle yükseltgendiğinde disülfid bağı kırılır ve iki sisteik asit kalıntısı oluşur.
- Bu yükseltgenme, sistenin kükürt içeren yan zincirini geri dönüşümsüz biçimde değiştirir.
- Böylece ayrılan polipeptit zincirleri arasında disülfid bağının yeniden kurulması önlenir.
- Performik asitle yükseltgenmenin kimyasal sonucu yandaki figürün sol kolunda görülmektedir.



Ditiyotreitol ile İndirgenme

- Disülfid bağları ditiyotreitol veya β -merkaptoetanol kullanılarak indirgenebilir.
- İndirgenme sonucunda sistin, serbest —SH grupları taşıyan iki sistein kalıntısına dönüşür.
- Serbest sülfhidril grupları daha sonra iyodoasetatla asetillenerek yeniden disülfid bağı oluşturmaları engellenir.
- İndirgenme ve ardından gerçekleştirilen asetilleme basamakları yandaki figürde gösterilmiştir.



Polipeptitler Özgöl Kesim Yöntemleriyle Parçalanır

- Uzun polipeptit zincirleri, dizilemeye uygun daha küçük peptit parçalarına ayrılabilir.
- Enzimsel ve kimyasal kesim yöntemleri, belirli amino asit kalıntılarının yakınındaki peptit bağlarını hedefler.
- Her kesim yöntemi, kendisine özgü bir peptit parçası örüntüsü oluşturur.

Tripsin Bazik Kalıntıların Ardından Kesim Yapar

- Tripsin, yalnızca lizin veya arginin kalıntılarının katkıda bulunduğu peptit bağlarının hidrolizini katalizler.
- Kesim, polipeptit dizisinin uzunluğundan veya amino asit kalıntılarının genel dağılımından bağımsızdır.
- Tripsin, lizin ve arginin kalıntılarının karboksil tarafındaki peptit bağlarını parçalar.

Tripsin Parçalarının Sayısı Öngörülebilir

- Tripsin kesimiyle oluşacak küçük peptitlerin sayısı, proteindeki lizin ve arginin kalıntılarının sayısından tahmin edilebilir.
- Bu kalıntıların özgün polipeptit dizisindeki sayısı, sağlam proteinin hidroliziyle belirlenen amino asit bileşiminden öğrenilir.
- Lizin veya arginin içermeyen küçük peptit parçaları da tripsin kesimi sonucunda ortaya çıkabilir.
- Tripsinle elde edilen parçalar, kromatografik veya elektroforetik yöntemlerle birbirinden ayrılır.

Tripsin Parçalarının Uçlarında Belirli Kalıntılar Bulunur

- Tripsinle oluşturulan peptitlerin biri dışında tümü karboksil-terminal uçlarında lizin veya arginin taşır.
- Bu özellik, tripsin parçalarının özgün polipeptit zinciri içinde sıralanmasına yardımcı olur.
- Ayrılan her tripsin parçası, Edman yıkımı veya kimyasal yöntemlerle ayrı ayrı dizilenir.
- Böylece uzun bir polipeptidin daha küçük ve yönetilebilir bölümlerine ait diziler elde edilir.

Proteazların Kesim Özgüllükleri Birbirinden Farklıdır

- Submaksillar bez proteazı arginin, endoproteinaz Lys-C ise lizin kalıntılarının karboksil tarafında kesim yapar.
- Kimotripsin fenilalanin, triptofan ve tirozin kalıntılarının karboksil tarafındaki bağları parçalar.
- *Staphylococcus aureus* V8 proteazı aspartat ve glutamatın karboksil tarafında kesim gerçekleştirir.

Bazı Proteazlar Amino-Terminal Taraftan Keser

- Asp-N proteazı aspartat ve glutamat kalıntılarının amino-terminal tarafındaki peptit bağlarını parçalar.
- Pepsin lösin, fenilalanin, triptofan ve tirozin kalıntılarının amino-terminal tarafında kesim yapar.
- Aynı amino asitleri hedefleyen yöntemler, kesimin gerçekleştiği taraf bakımından birbirinden ayrılabilir.

Siyanojen Bromür Kimyasal Kesim Sağlar

- Polipeptit zincirleri proteazların yanında siyanojen bromür gibi kimyasal reaktiflerle de parçalanabilir.
- Siyanojen bromür yalnızca metiyoninin karboksil grubunun katkıda bulunduğu peptit bağlarını keser.
- Böylece metiyonin kalıntılarının karboksil tarafında özgül peptit parçaları oluşturulur.

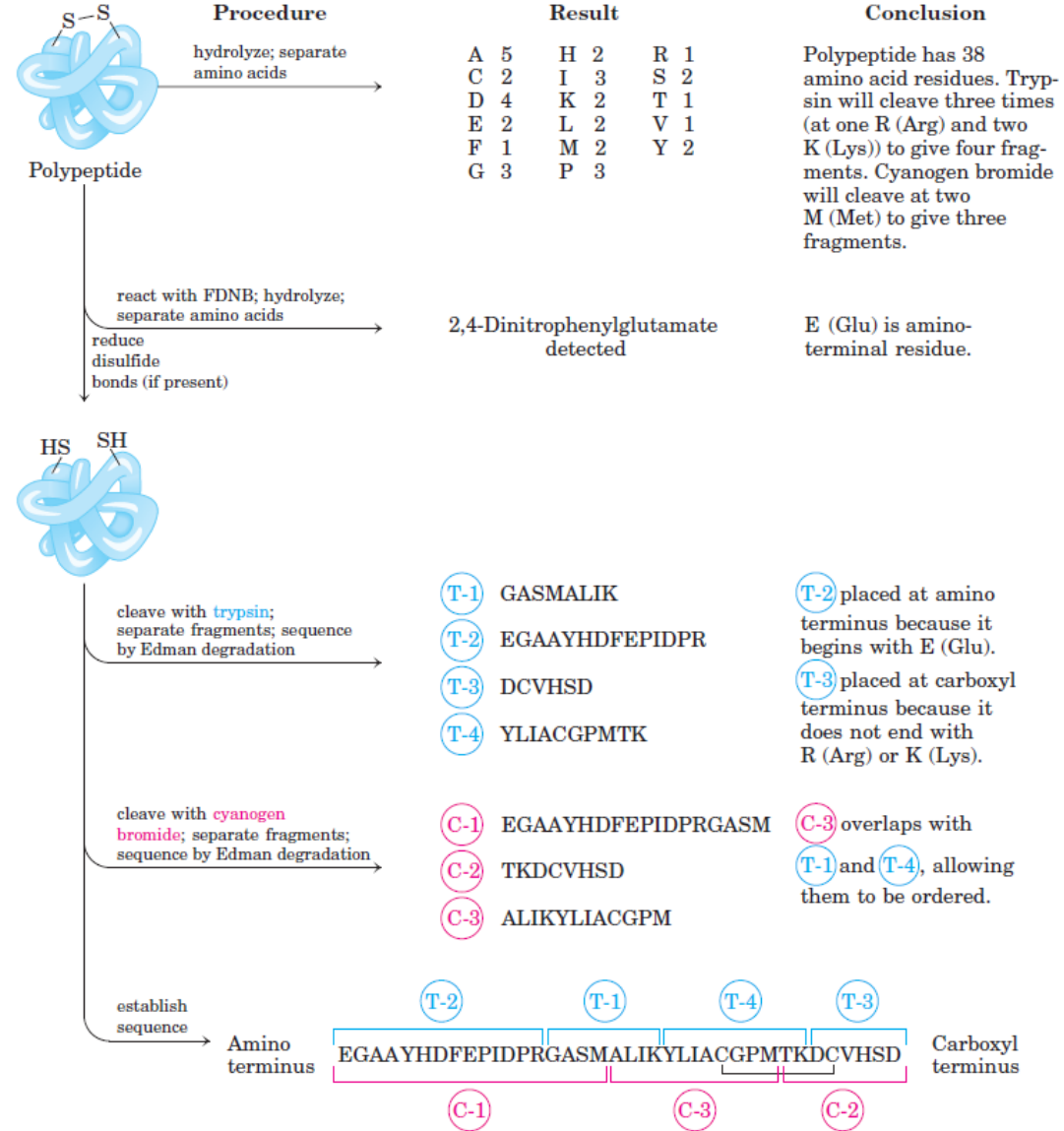
Peptit Parçalarının Özgün Sırası Belirlenmelidir

- Tripsinle elde edilen parçaların dizilenmesi, özgün polipeptitteki sıralarını tek başına göstermeyebilir.
- Bu nedenle aynı proteinin başka bir örneği, tripsinden farklı noktalarda kesim yapan ikinci bir yöntemle parçalanır.
- İkinci kesimden elde edilen parçalar da ayrılır ve daha sonra ayrı ayrı dizilenir.
- İki farklı yöntemin oluşturduğu peptit dizileri karşılaştırılarak özgün zincirdeki sıraları araştırılır.



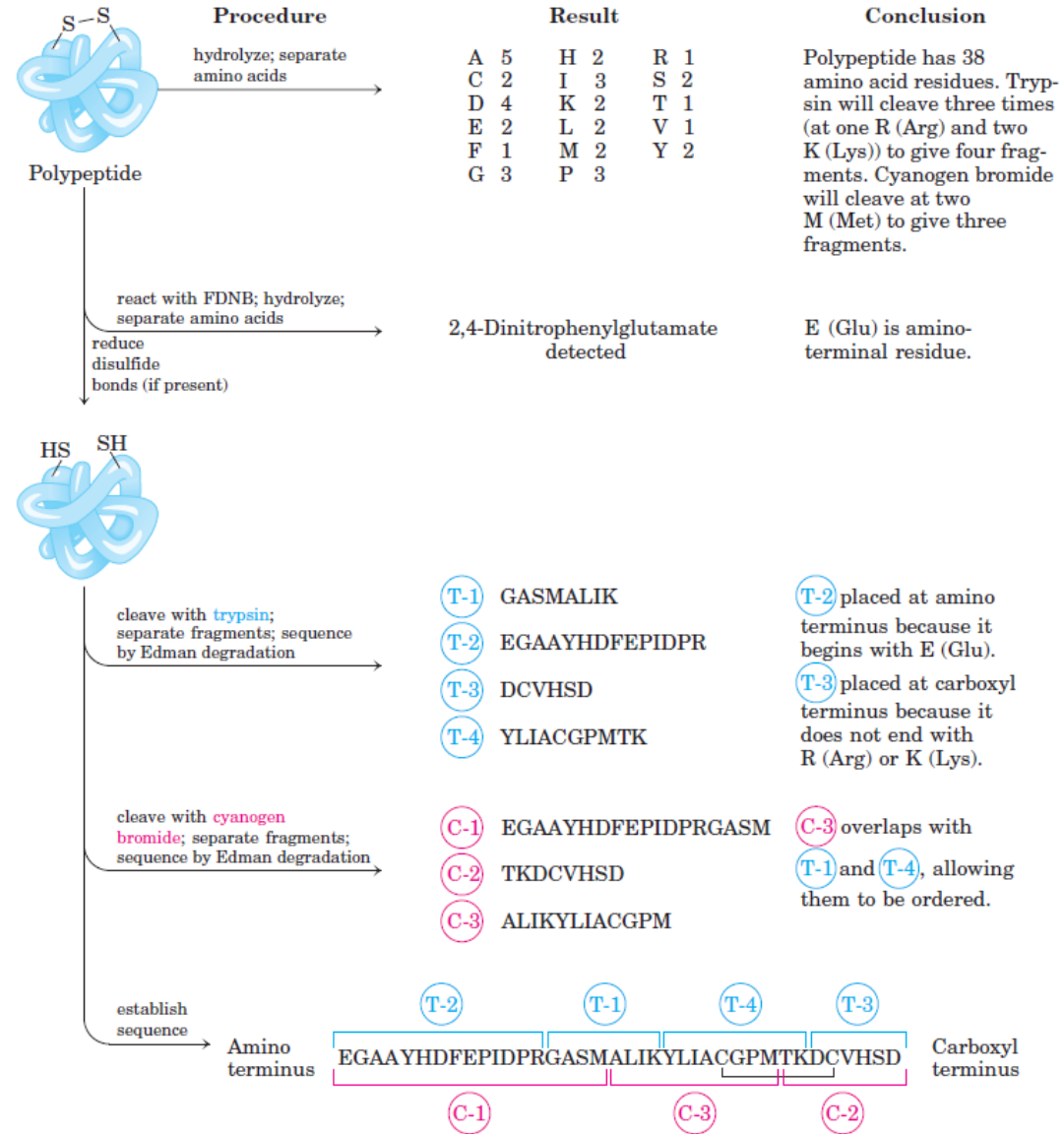
Örtüşen Diziler Peptitleri Birbirine Bağlar

- Farklı kesim yöntemleriyle oluşturulan bazı peptitler, ilk yöntemle elde edilen parçaların sınırlarını aşan diziler taşır.
- Bu örtüşen peptitler, ilk kesimden elde edilen parçalar arasında dizisel süreklilik kurulmasını sağlar.
- Amino-terminal amino asidin önceden belirlenmesi, hangi parçanın zincirin başlangıcında bulunduğunu gösterir.
- Peptitlerin örtüşen dizilerle sıralanması yandaki figürde örnek bir polipeptit üzerinden açıklanmaktadır.



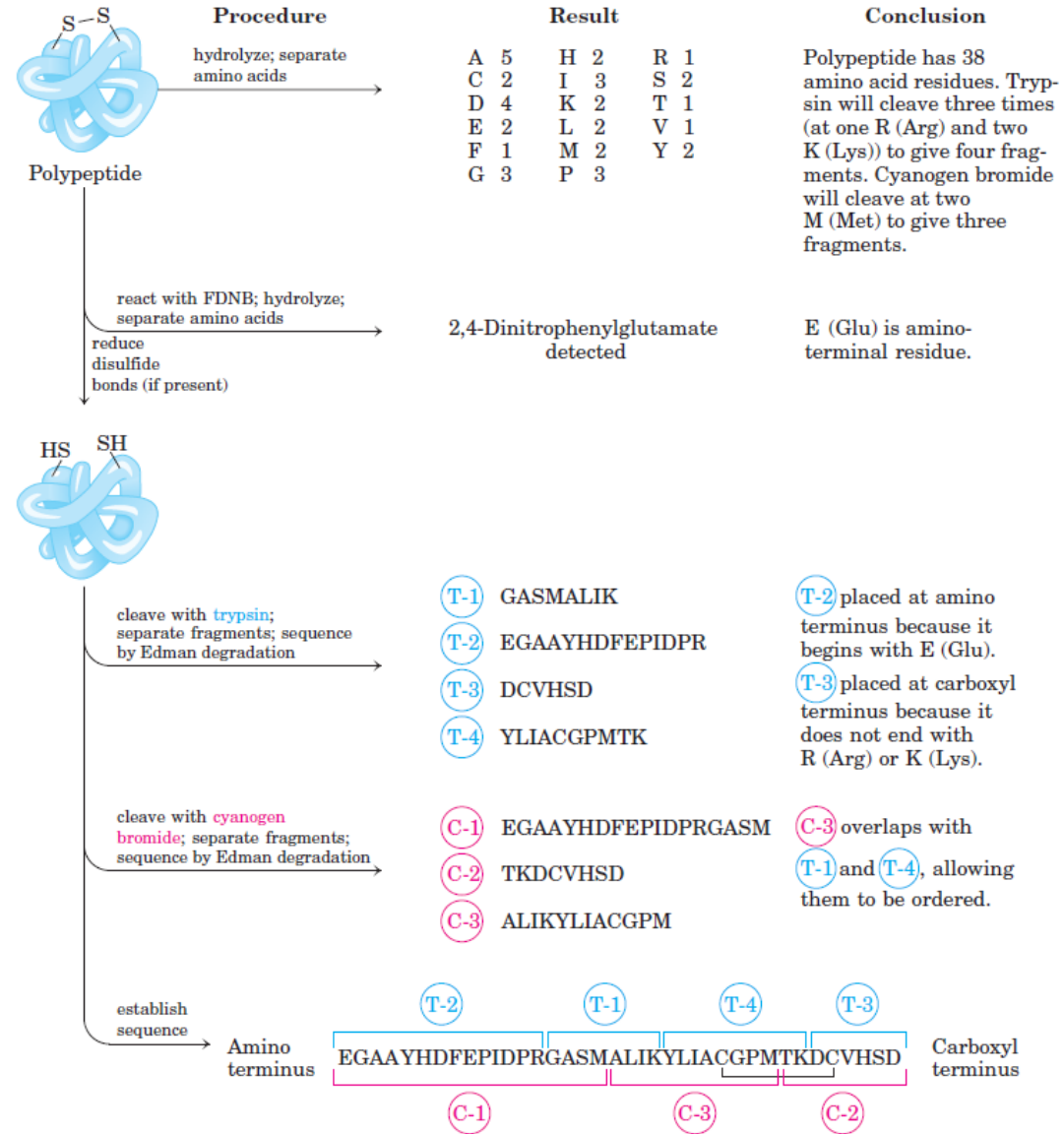
İlk Yapısal Bilgiler

- Örnek polipeptit hidroliz edildiğinde 38 amino asit kalıntısından oluştuğu belirlenir.
- Amino asit bileşimi, dizide üç arginin, iki lizin ve iki methionin bulunduğunu gösterir.
- FDNB ile gerçekleştirilen amino-terminal analizi, glutamatın zincirin ilk kalıntısı olduğunu ortaya çıkarır.
- Bu başlangıç bilgileri, daha sonra oluşturulan peptit parçalarının doğru biçimde sıralanmasını sağlar.



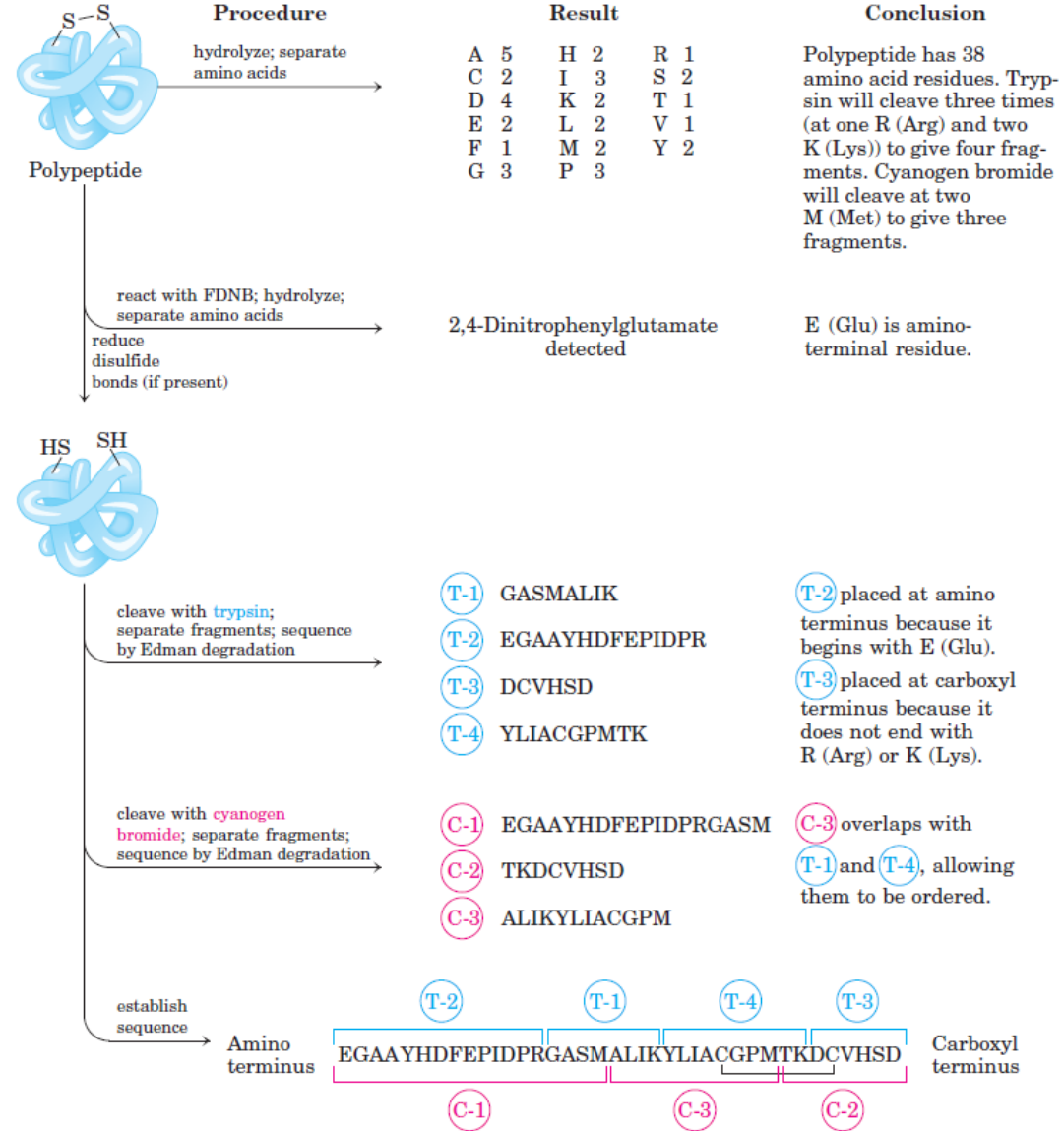
Tripsin ve Siyanojen Bromür Farklı Parçalar Oluşturur

- Yandaki figürde tripsin, bir arginin ve iki lizin kalıntısında üç kesim yaparak dört peptit oluşturur.
- Siyanojen bromür ise iki methionin kalıntısında kesim yaparak üç farklı peptit meydana getirir.
- Her iki yöntemle elde edilen peptitler ayrılır ve Edman yıkımıyla ayrı ayrı dizilenir.
- Farklı kesim ürünlerinin karşılaştırılması, özgün polipeptit dizisinin yeniden kurulmasını sağlar.



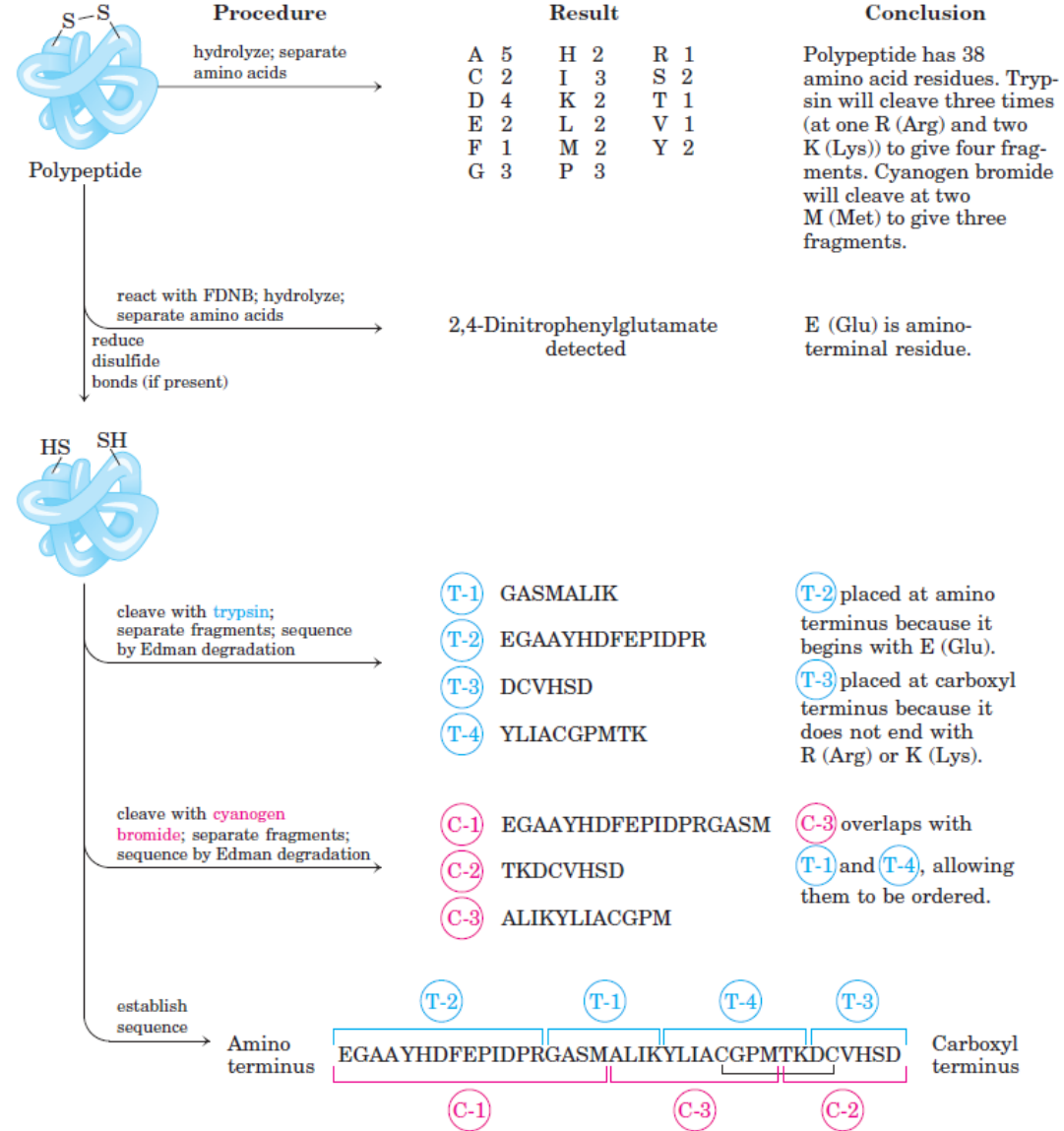
Örtüşen Peptitlerle Tam Dizi Kurulur

- Amino-terminali glutamatla başlayan tripsin parçası, polipeptit zincirinin ilk bölümü olarak konumlandırılır.
- Karboksil ucunda lizin veya arginin taşımayan tripsin parçası, zincirin sonuna yerleştirilir.
- Siyanojen bromür parçaları, tripsin parçalarıyla örtüşerek aralarındaki doğru bağlantıları ortaya çıkarır.
- Yandaki figürün alt bölümünde örtüşen parçalar kullanılarak oluşturulan tam amino asit dizisi gösterilmiştir.



Yetersiz Örtüşme Yeni Bir Kesim Yöntemi Gerektirir

- İkinci kesim yöntemi ilk parçalar arasında yeterli örtüşme sağlamazsa bütün dizinin sırası güvenilir biçimde kurulamaz.
- Böyle bir durumda farklı kesim özgüllüğüne sahip üçüncü bir enzim veya kimyasal reaktif kullanılabilir.
- Gerekirse dördüncü bir kesim yöntemiyle yeni ve örtüşen peptit parçaları elde edilir.
- Yeterli örtüşme sağlandığında parçaların özgün polipeptit içindeki sırası kesin olarak belirlenebilir.



Disülfid Bağlarının Konumları Ayrıca Belirlenir

- Birincil yapı disülfid bağları içeriyorsa, bunların konumları amino asit dizisi tamamlandıktan sonra belirlenir.
- Protein, bu kez disülfid bağları önceden kırılmadan tripsin gibi bir reaktifle parçalanır.
- Elde edilen peptitler elektroforezle ayrılır ve disülfid bağları açılmış örneğin parçalarıyla karşılaştırılır.
- Bu karşılaştırma, disülfid bağıyla birbirine bağlanan peptit bölgelerinin tanımlanmasını sağlar.

Disülfid Bağlı Peptitler Karşılaştırmayla Bulunur

- Her disülfid bağı için başlangıçtaki iki küçük peptit kaybolur ve bunların yerine daha büyük bir peptit ortaya çıkar.
- Kaybolan iki peptit, sağlam polipeptitte disülfid bağıyla birbirine bağlanan bölgeleri temsil eder.
- Bu peptitlerin dizilerindeki sistein kalıntıları, disülfid bağının hangi konumlarda bulunduğunu gösterir.
- İki sistein taşıyan proteinlerde bağın konumu tek olasılıkken, daha fazla sistein içerenlerde farklı olasılıklar değerlendirilir.

Kütle Spektrometrisi Peptit Dizilemesini Hızlandırır

- Amino asit dizilerinin belirlenmesi yalnızca kimyasal ve enzimsel parçalama yöntemleriyle sınırlı değildir.
- Kütle spektrometrisine dayanan yeni yöntemler, kısa polipeptitlerin dizilenmesine olanak verir.
- Yaklaşık 20–30 amino asit kalıntısı içeren polipeptitlerin dizisi yalnızca birkaç dakika içinde belirlenebilir.
- Bu yöntemler, polipeptit dizilerinin doğrudan ve hızlı biçimde analiz edilmesini sağlar.

Gen Dizileri Protein Dizilerini Açığa Çıkarır

- Hızlı DNA dizileme yöntemleri, proteinlerin amino asit dizilerinin genlerden dolaylı biçimde belirlenmesini mümkün kılar.
- Öncelikle proteini kodlayan gen izole edilir ve gendeki nükleotit dizisi belirlenir.
- Genetik kod kullanılarak her üç nükleotitlik kodonun belirlediği amino asit tanımlanır.
- DNA dizisi ile amino asit dizisi arasındaki ilişki yandaki figürde gösterilmiştir.

DNA ve Protein Dizileme Yöntemleri Birbirini Tamamlar

- Gen mevcutsa DNA'yı dizilemek, proteinin doğrudan dizilenmesinden daha hızlı ve doğru olabilir.
- Günümüzde proteinlerin çoğunun amino asit dizisi, ilgili genlerin DNA dizilerinden elde edilir.
- Gen henüz izole edilmemişse doğrudan peptit dizilemesi disülfid bağlarının konumunu gösterebilir.
- Kısmi amino asit dizisi, ilgili proteini kodlayan genin izole edilmesini de kolaylaştırabilir.

Protein Dizileri Genomlardan Elde Edilebilir

- Günümüzde araştırmacılar çok sayıda proteini inceleyebilmek için farklı organizmaların genom dizilerinden yararlanır.
- Bir organizmanın bütün DNA'sını oluşturan genomun tam dizisi, çok sayıda protein kodlayan geni ortaya çıkarabilir.
- Virüslerden bakterilere ve çok hücreli ökaryotlara kadar birçok organizmanın genom dizisi araştırmacıların kullanımına açıktır.

Proteom Bir Hücrenin Bütün Proteinlerini Kapsar

- Genom dizileri, önceden bilinen bir işlevi bulunmayan proteinleri kodlayan çok sayıda yeni gen ortaya çıkarır.
- Bir organizmanın bütün genomunu tanımlamak için kullanılan genom kavramına benzer biçimde proteom terimi geliştirilmiştir.
- Proteom, bir hücrede bulunan proteinlerin tamamını ifade eder.
- Proteomik çalışmalar, hücre ve organizmaların biyokimyasına ilişkin daha bütüncül bir görünüm sağlamayı amaçlar.

Proteomik Diğer Biyokimyasal Yaklaşımları Tamamlar

- Proteomik, hücresel ara metabolizma ve nükleik asit metabolizmasına ilişkin çalışmalarla birlikte yürütülür.
- Bu yaklaşımların birleştirilmesi, hücre ve organizma düzeyinde biyokimyanın giderek daha eksiksiz anlaşılmasını sağlar.
- Protein dizilerinin belirlenmesi, yeni proteinlerin işlevlerini araştırmak için önemli bir başlangıç noktası oluşturur.

Küçük Peptitler Kimyasal Olarak Sentezlenebilir

- Birçok peptit farmakolojik ajan olarak kullanılabilme potansiyeli taşır.
- Peptit üretimi önemli ticari uygulamalara sahip olduğundan belirli peptitlerin sentezi yoğun ilgi görür.
- Büyük proteinlerin belirli bölümlerinin sentezlenmesi, protein yapısı ve işlevinin incelenmesinde önem taşır.
- Bu nedenle peptitlerin laboratuvar ortamında kontrollü biçimde üretilmesi için farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir.

Peptit Elde Etmenin Üç Temel Yolu Bulunur

- Bir peptit doğal dokudan saflaştırılabilir ancak çok düşük derişimlerde bulunması bu yaklaşımı güçleştirebilir.
- Peptitler genetik mühendisliği yöntemleriyle üretilebilir veya doğrudan kimyasal olarak sentezlenebilir.
- Uygun yöntemin seçimi peptidin büyüklüğüne, kaynağına, miktarına ve kullanım amacına bağlıdır.
- Güçlü sentez yöntemleri, peptitlerin hem temel araştırmalar hem de ticari uygulamalar için hazırlanmasını sağlar.

Geleneksel Kimyasal Sentezin Sınırları

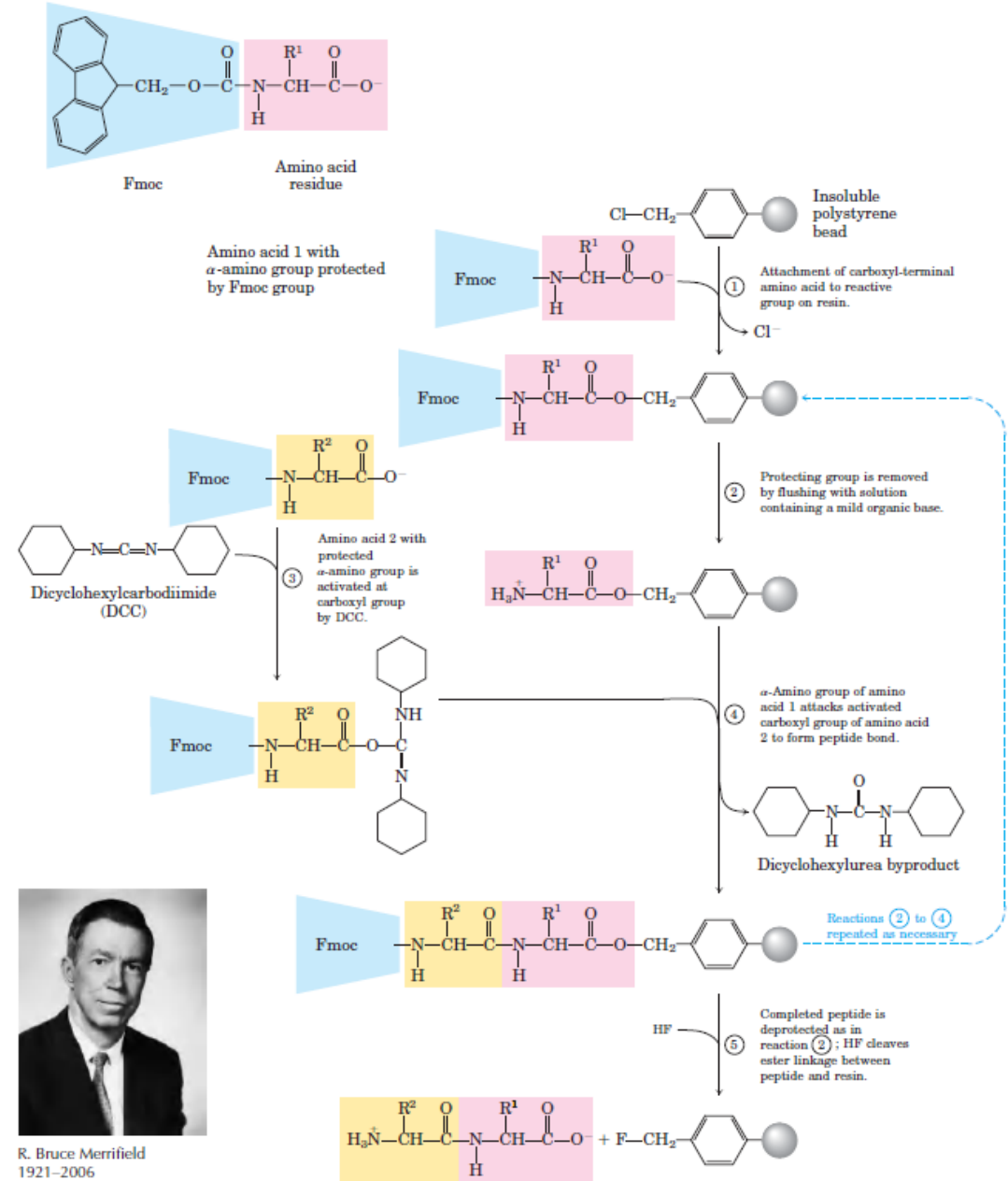
- Proteinlerin karmaşık yapısı, geleneksel organik sentez yöntemlerinin uzun peptitlere uygulanmasını güçleştirir.
- Klasik yaklaşımlar, dört veya beşten fazla amino asit içeren peptitlerde pratik olmaktan çıkabilir.
- Bu sınırlılık, peptit sentezini daha kontrollü ve verimli hâle getiren özel yöntemlerin geliştirilmesini gerekli kılar.

Geleneksel Peptit Sentezinin Temel Güçlüğü

- Geleneksel kimyasal yöntemlerle peptit sentezlerken her basamaktan sonra oluşan ürünün saflaştırılması gerekir.
- Peptit zinciri uzadıkça tekrarlanan saflaştırma işlemleri sentezi daha zahmetli ve verimsiz hâle getirir.
- R. Bruce Merrifield, 1962 yılında peptit sentezindeki bu temel güçlüğü azaltan yeni bir yaklaşım geliştirmiştir.

Katı Faz Peptit Sentezi

- Merrifield'in geliştirdiği yöntemde büyüyen peptit zinciri, bir ucundan çözünmeyen katı bir desteğe bağlanır.
- Katı destek, kromatografide kullanılan malzemelere benzeyen bir kolon içindeki çözünmeyen polimer reçinedir.
- Peptit zincirinin reçineye bağlı kalması, her basamaktaki ürünün ayrı ayrı saflaştırılması ihtiyacını azaltır.
- Katı faz peptit sentezinin temel aşamaları yandaki figürde gösterilmiştir.

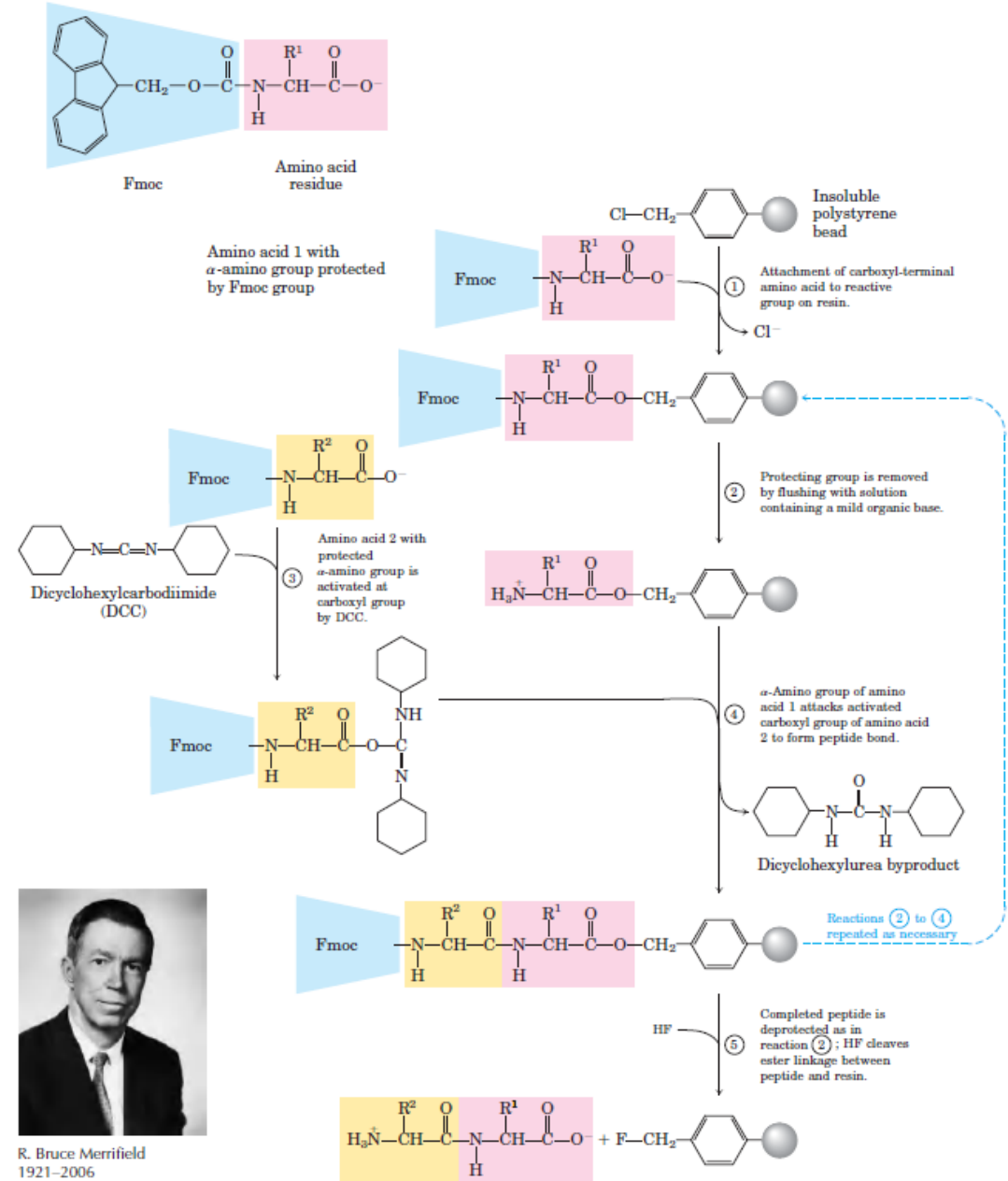


R. Bruce Merrifield
1921–2006



Sentez Karboksil-Terminal Uçtan Başlar

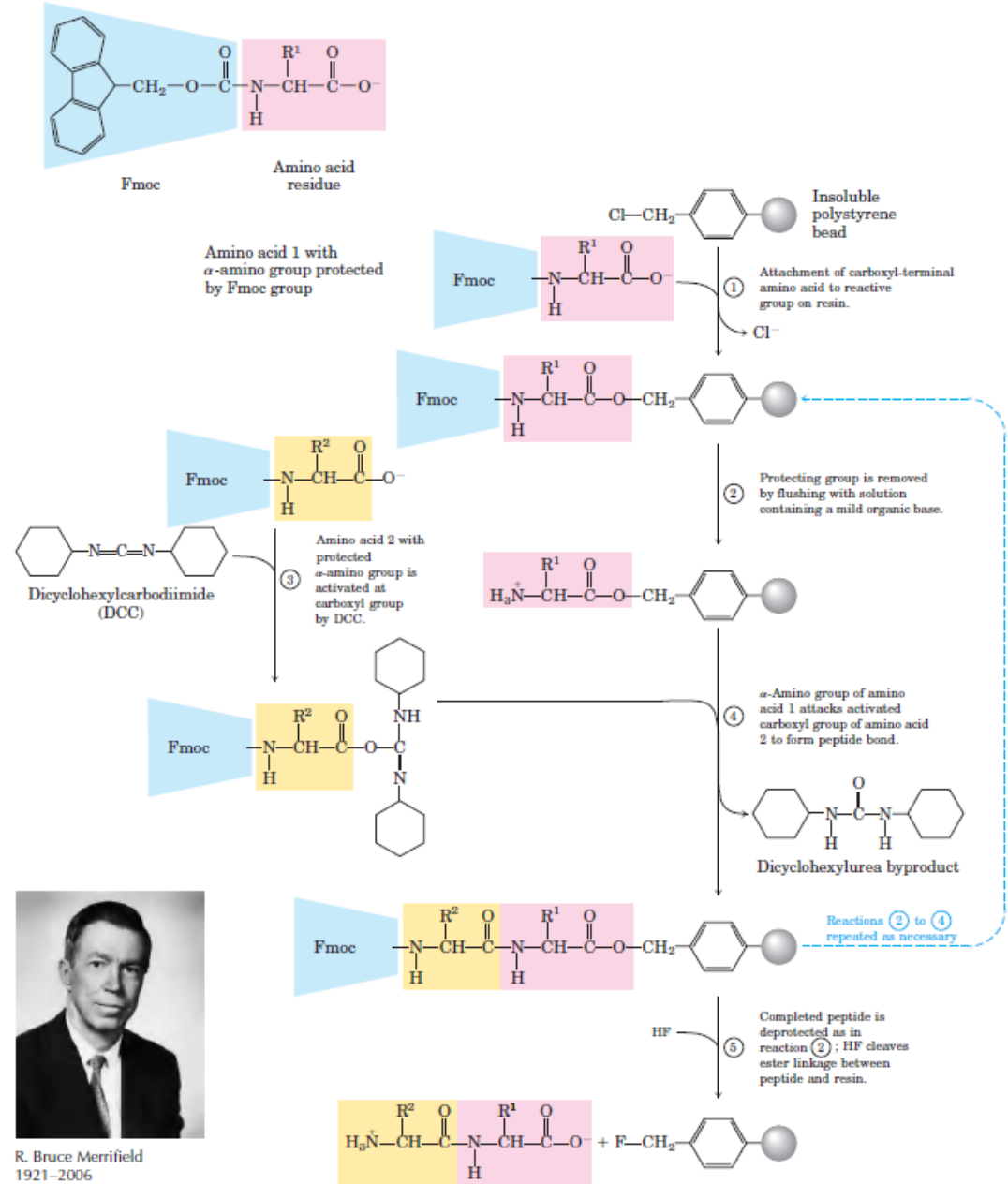
- Sentezlenecek peptidin karboksil-terminal amino asidi, reaktif karboksil grubu üzerinden polistiren reçineye bağlanır.
- Amino asidin α -amino grubu, istenmeyen tepkimeleri önlemek amacıyla Fmoc koruyucu grubuyla kapatılır.
- Reçineye bağlanma, ilk amino asidin daha sonraki sentez basamaklarında katı destek üzerinde tutulmasını sağlar.
- İlk amino asidin reçineye bağlanması yandaki figürdeki birinci basamakta gösterilmiştir.



R. Bruce Merrifield
1921–2006

Fmoc Grubu Amino Grubunu Korur

- Fmoc grubu, amino asit kalıntısının α -amino grubunun istenmeyen tepkimelere katılmasını önler.
- Bir sonraki amino asit eklenmeden önce Fmoc, hafif organik baz içeren çözeltiyle uzaklaştırılır.
- Koruyucu grubun çıkarılması, reçineye bağlı amino asidin α -amino grubunu yeni peptit bağı için serbest bırakır.
- Fmoc grubunun uzaklaştırılması yandaki figürdeki ikinci basamakta gösterilmiştir.

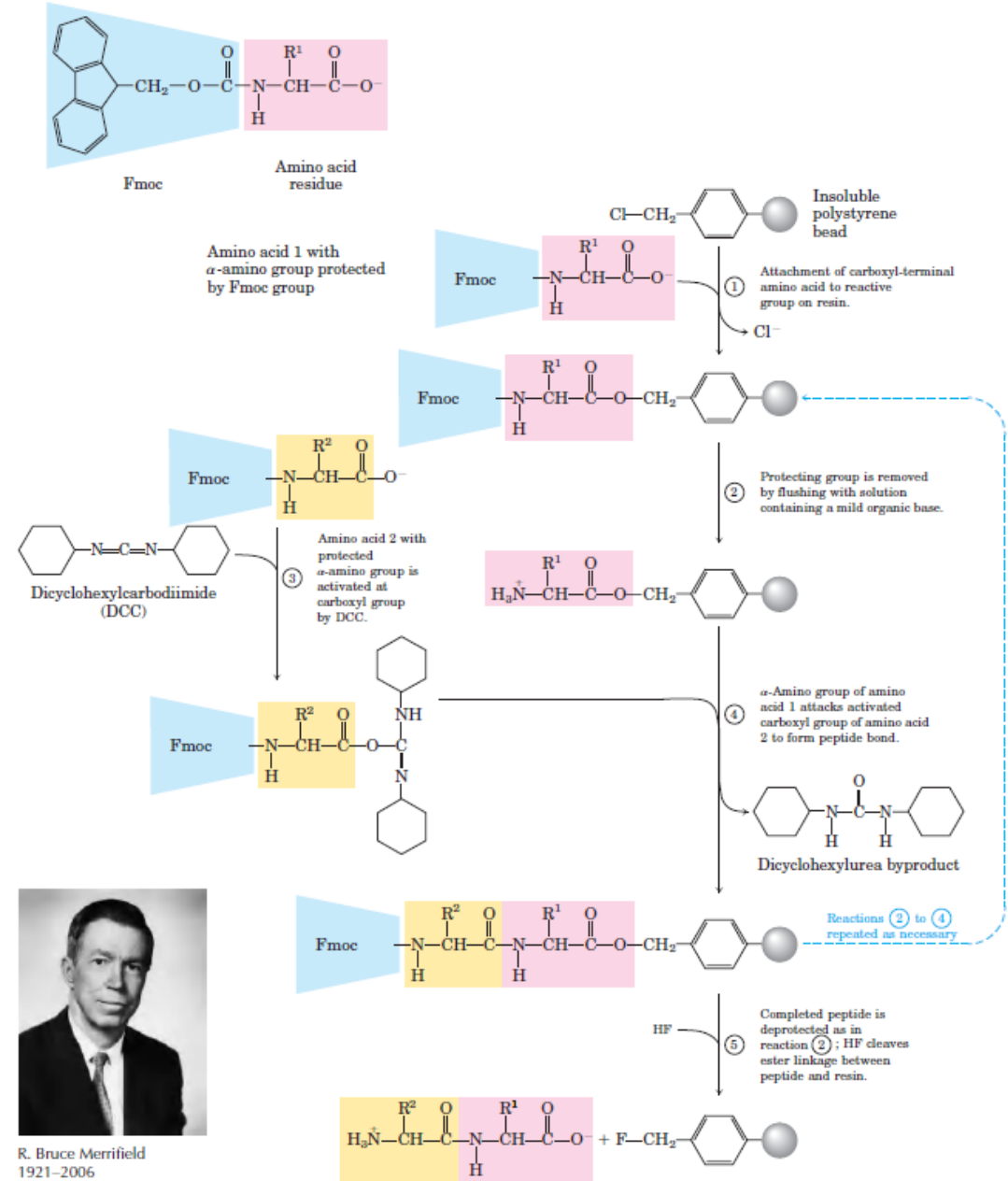


R. Bruce Merrifield
1921–2006



Yeni Amino Asit Zincire Eklenir

- Zincire katılacak ikinci amino asidin α -amino grubu Fmoc ile korunur.
- Bu amino asidin karboksil grubu, disikloheksilkarbodiimid kullanılarak etkinleştirilir.
- Etkinleştirilen karboksil grubu, reçineye bağlı ilk amino asidin serbest amino grubuyla peptit bağı oluşturur.
- İkinci amino asidin bağlanması yandaki figürdeki üçüncü ve dördüncü basamaklarda gösterilmiştir.



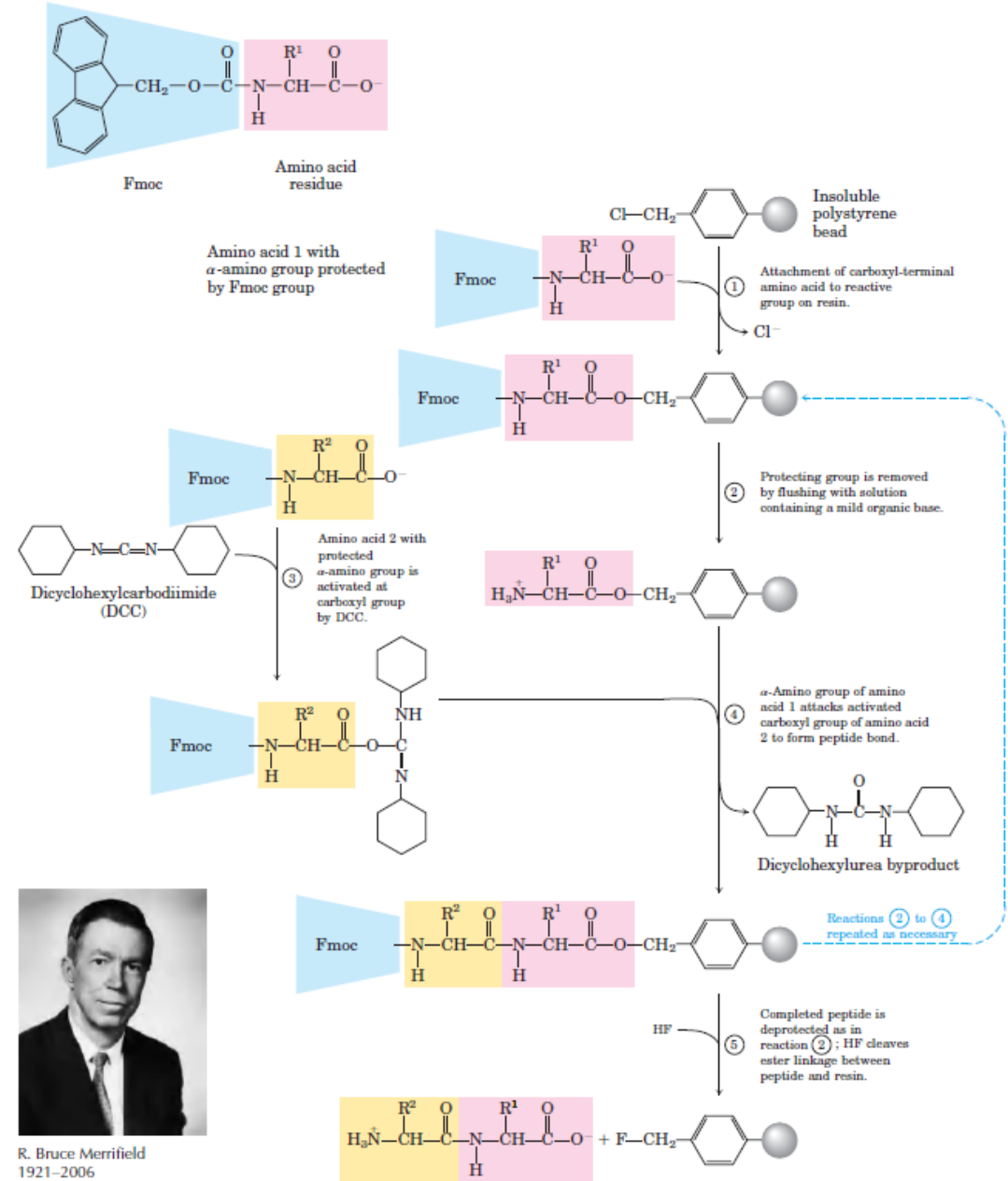
R. Bruce Merrifield
1921–2006



Bektaş Tepe
gezimania_tr

Peptit Zinciri Tekrarlanan Döngülerle Uzatılır

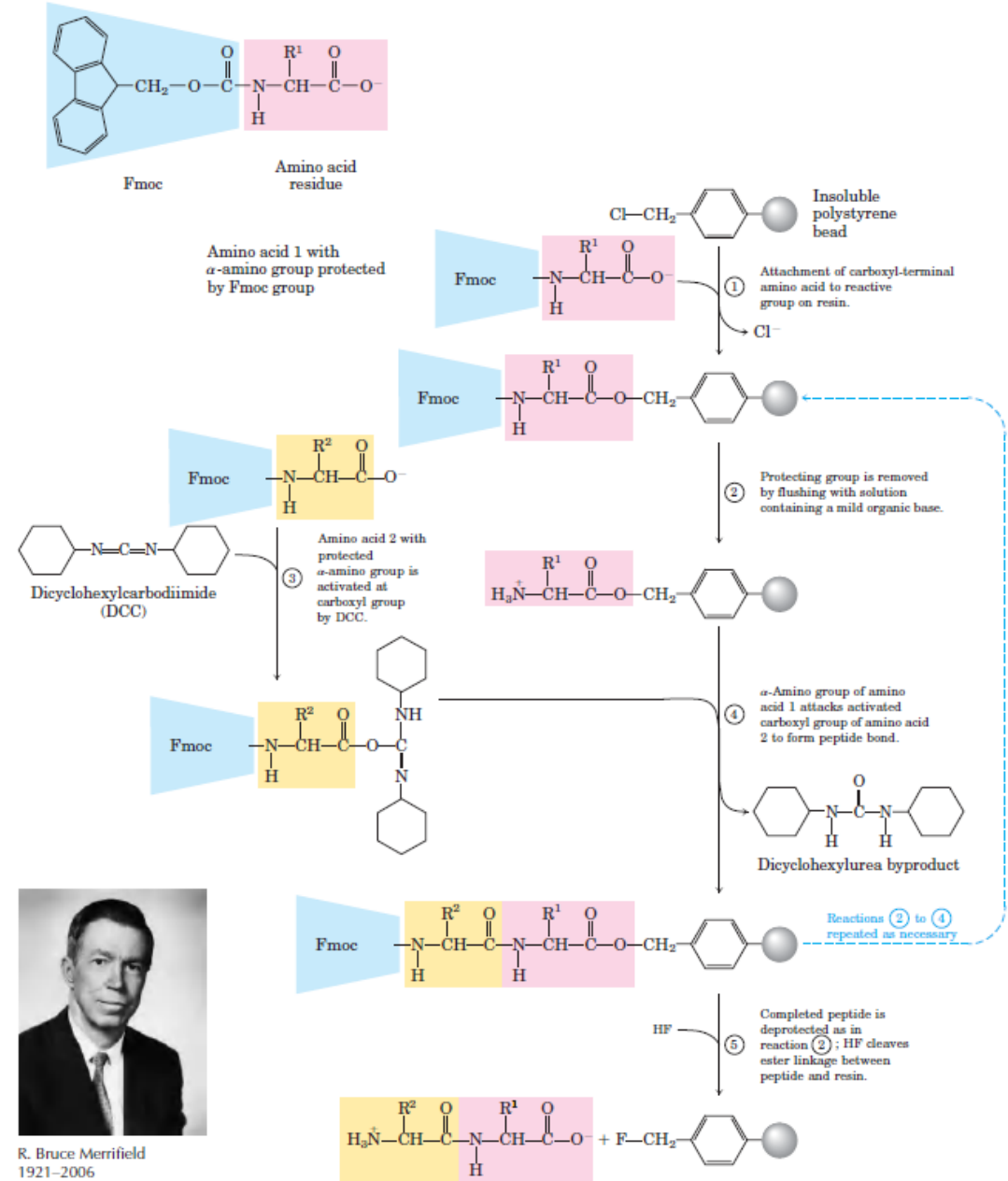
- Her yeni amino asit eklenirken Fmoc grubunun uzaklaştırılması ve karboksil grubunun etkinleştirilmesi basamakları tekrarlanır.
- Her döngünün başarılı tamamlanması, büyüyen zincire bir amino asit kalıntısı daha ekler.
- Peptit istenen uzunluğa ulaşınca kadar sentez döngüleri otomatik olarak sürdürülebilir.
- Tekrarlanan sentez döngüsü yandaki figürde kesikli okla gösterilmiştir.



R. Bruce Merrifield
1921–2006

Tamamlanan Peptit Reçineden Ayrılır

- İstenen amino asit dizisi tamamlandığında peptit üzerindeki koruyucu gruplar uzaklaştırılır.
- Hidrojen florür, peptit ile reçine arasındaki ester bağına parçalayarak tamamlanmış zinciri serbest bırakır.
- Böylece sentezlenen peptit, çözünmeyen polistiren destekten ayrılarak elde edilir.
- Son ürünü reçineden ayırma basamağı yandaki figürün alt bölümünde gösterilmiştir.



R. Bruce Merrifield
1921–2006

Kimyasal Sentez Biyolojik Sentezin Ters Yönünde İlerler

- Katı faz kimyasal sentezinde zincir, peptidin karboksil-terminal ucundan başlanarak oluşturulur.
- Amino asitler sırayla eklenirken büyüyen zincirin amino-terminal ucu uzatılır.
- Bu yön, canlı hücrelerde gerçekleşen protein sentezinin ilerleme yönünün tersidir.

Katı Faz Peptit Sentezi Otomatikleştirilebilir

- Kimyasal peptit sentezinde kullanılan tekrarlanan basamaklar otomatik cihazlarla gerçekleştirilebilir.
- Amino asitler, standart tepkime döngüleri aracılığıyla büyüyen peptit zincirine sırayla eklenir.
- Her döngüde gerçekleşen eksik tepkimeler, sonraki basamaklarda ürün verimini giderek azaltabilir.
- Bu nedenle her kimyasal döngünün verimliliği, sentezin toplam başarısını doğrudan belirler.

Basamak Verimi Toplam Ürün Verimini Belirler

- Her amino asit ekleme basamağındaki küçük verim kayıpları, peptit zinciri uzadıkça birikerek toplam verimi düşürür.
- Basamak verimi %96 olduğunda 11 kalıntılı peptidin toplam verimi %66'ya iner.
- Aynı basamak veriminde 51 kalıntılı peptidin toplam verimi yalnızca %13 olur.

Yüksek Basamak Verimi Uzun Peptit Sentezini Kolaylaştırır

- Basamak veriminin %99.8'e yükselmesi, uzun peptitlerin toplam sentez verimini büyük ölçüde artırır.
- Bu verimde 51 amino asitlik bir polipeptidin toplam verimi %90'dır.
- Yüz amino asitlik bir polipeptitte toplam verim %96 basamak veriminde %1.8, %99.8'de ise %82 olur.

Peptit Sentezinde Basamaklardaki Verimin Toplam Verime Etkisi		
Son polipeptitteki kalıntı sayısı	Her basamağın verimi aşağıdaki gibi olduğunda son peptidin toplam verimi (%)	
	%96,0	%99,8
11	66	98
21	44	96
31	29	94
51	13	90
100	1,8	82



Modern Sistemler Uzun Polipeptitler Üretebilir

- Kimyasal tepkimelerin iyileştirilmesi, yaklaşık 100 amino asitlik proteinlerin birkaç gün içinde sentezlenmesini mümkün kılmıştır.
- Buna karşılık aynı büyüklükteki bir protein, uygun bir bakteri hücresinde yaklaşık beş saniyede sentezlenebilir.
- Kimyasal yöntemler biyolojik sistemlerden daha yavaş olsa da belirli dizilerin kontrollü üretilmesini sağlar.

Peptit Parçaları Birbirine Bağlanabilir

- Peptitlerin etkin biçimde birleştirilmesine yönelik yeni yöntemler, daha büyük polipeptit ve proteinlerin hazırlanmasını kolaylaştırır.
- Özel kimyasal gruplar, doğal proteinlerde bulunmayan amino asitler dâhil olmak üzere belirli konumlara yerleştirilebilir.
- Böylece enzimin katalizini veya proteinin diğer işlevlerini sınamak için yeni protein biçimleri üretilebilir.
- Kimyasal sentez, doğal proteinlerde bulunmayan yapısal özelliklerin kontrollü biçimde incelenmesini sağlar.

Kimyasal Sentez Protein Yapısı Araştırmalarını Destekler

- Araştırmacılar, protein yapısı ve işlevi arasındaki ilişkiyi test etmek için özel diziler tasarlayabilir.
- Tasarlanan protein dizileri, doğal proteinlerin belirli yapısal özelliklerini taklit edecek biçimde hazırlanabilir.
- Bu yaklaşım, bir peptidin birincil yapısını çözültide benimsediği üç boyutlu yapıyla ilişkilendirmeye yardımcı olur.
- Yapay peptitler, protein katlanması ve işlevsel grupların rolü üzerine deneysel bilgi sağlar.

Amino Asit Dizileri Biyokimyasal Bilgi Taşıır

- Bir proteinin amino asit dizisi, onun üç boyutlu yapısı ve işlevi hakkında ilk ipuçlarını sağlayabilir.
- Bu bilgiler çoğunlukla yeni protein dizisinin, daha önce incelenmiş proteinlerin dizileriyle karşılaştırılmasından elde edilir.
- İnternet üzerinden erişilebilen veri tabanlarında binlerce protein dizisi bulunur.
- Yeni bir dizinin bu geniş veri birikimiyle karşılaştırılması, proteinler arasındaki ilişkileri ortaya çıkarabilir.

Dizinin İşlevi Belirleme Gücü Sınırlıdır

- Amino asit dizisinin üç boyutlu yapıyı nasıl belirlediği henüz bütünüyle anlaşılmış değildir.
- Yalnızca diziden hareketle bir proteinin işlevini her zaman güvenilir biçimde öngörmek mümkün değildir.
- Buna karşılık ortak yapısal veya işlevsel özelliklere sahip proteinler çoğunlukla belirgin dizi benzerlikleri gösterir.
- Bu benzerlikler, proteinlerin aileler hâlinde sınıflandırılmasını mümkün kılar.

Protein Aileleri Dizi Benzerliğiyle Tanımlanır

- Proteinler, amino asit dizilerinin benzerlik düzeyine göre farklı ailelere ayrılabilir.
- Aynı ailedeki proteinler çoğunlukla dizilerinin en az %25'inde özdeş amino asitler taşır.
- Protein ailesinin üyeleri genellikle bazı ortak yapısal ve işlevsel özellikleri paylaşır.
- Dizi benzerliğinin derecesi, proteinler arasındaki muhtemel ilişkiyi değerlendirmede temel ölçütlerden biridir.

Kritik Amino Asitler Küçük Motifler Oluşturabilir

- Bazı protein aileleri, işlev açısından kritik yalnızca birkaç amino asit kalıntısının özdeşliğiyle tanımlanabilir.
- Protein dizilerindeki iki ila dört amino asitlik kısa korunmuş bölgeler dizi motifleri olarak adlandırılır.
- Bu motifler, çoğu zaman proteinin biyolojik işlevi açısından önemli bölgeleri temsil eder.
- Kısa olmalarına rağmen dizi motifleri, bilinmeyen bir proteinin işlevsel ailesini belirlemede yol gösterici olabilir.

Protein Domainleri İşlevsel Birimler Oluşturur

- İşlevsel olarak ilişkili birçok proteinde domain olarak adlandırılan belirgin yapısal bölgeler bulunur.
- Protein domainleri, olağan dışı derecede kararlı olan veya belirli bir ortama uyum sağlayan yapısal konformasyonlar oluşturabilir.
- Belirli domainlerin varlığı, proteinlerin ortak yapısal veya işlevsel özellikler taşıdığını gösterebilir.
- Proteinler arasındaki ilişkiler, yalnızca kısa motiflere değil, daha geniş dizi bölgelerindeki domain benzerliklerine dayanılarak da belirlenebilir.

Sinyal Dizileri Proteinlerin Hücresel Hedeflerini Belirler

- Amino asit dizisindeki bazı bölgeler, bir proteinin hücre içindeki konumunu ve kimyasal değişikliklerini belirleyebilir.
- Amino-terminalde bulunan özel sinyal dizileri, belirli proteinleri hücre dışına yönlendirir.
- Diğer proteinler çekirdeğe, hücre yüzeyine, sitozole veya başka hücresel bölgelere taşınabilir.
- Bu yönlendirme bilgisi, yeni tanımlanan bir proteinin dizisindeki sinyal bölgelerinden anlaşılabilir.

Dizi Bilgisi Kimyasal Değişiklikleri Öngörebilir

- Bazı amino asit dizileri, proteine şeker gruplarının veya lipidlerin eklendiği bölgeleri belirler.
- Glikoproteinlerdeki karbonhidratlar ve lipoproteinlerdeki lipidler, belirli dizi sinyallerine göre proteine bağlanabilir.
- Yeni bir protein dizisinin incelenmesi, bu tür kimyasal değişikliklerin gerçekleşebileceği bölgeleri ortaya çıkarabilir.
- Böylece birincil yapı, proteinin hücre içindeki işlenme biçimi hakkında da bilgi sağlar.

Konsensus Dizileri Ortak Özellikler Gösterir

- DNA, RNA veya protein dizilerinde bulunan işlevsel bilgiler çoğunlukla konsensus diziler biçiminde ifade edilir.
- Konsensus dizi, birbiriyle ilişkili birçok dizinin karşılaştırılması sonucunda ortaya çıkarılır.
- Her konumda en sık bulunan nükleotit veya amino asit, konsensus dizinin ilgili konumuna yerleştirilir.

Konsensus Dizilerde Biyolojik Çeşitlilik Korunur

- Konsensus dizi, bir grubun üyelerindeki bütün farklılıkları ortadan kaldıran tek ve değişmez bir dizi değildir.
- Her konumda özellikle iyi korunmuş kalıntılar, çoğunlukla evrimsel olarak korunmuş işlevsel bölgeleri temsil eder.
- Konsensus dizilerin oluşturulması ve veri tabanlarında tanımlanması için çeşitli matematiksel araçlardan yararlanılır.
- Bu araçlar, protein dizileri arasındaki ortak özelliklerin daha sistematik biçimde belirlenmesini sağlar.

Biyoinformatik Dizilerden Bilgi Çıkarır

- Gen, protein dizisi ve makromoleküler yapı verilerindeki hızlı artış, biyoinformatik alanının gelişmesini sağlamıştır.
- Biyoinformatik, biyolojik veri tabanlarındaki bilgileri incelemek için bilgisayar programlarından yararlanır.
- Protein işlevi büyük ölçüde üç boyutlu yapıya bağlı olsa da yapı, birincil amino asit dizisi tarafından belirlenir.
- Bu nedenle protein dizilerinin karşılaştırılması, yapısal ve işlevsel ilişkilerin araştırılmasında temel bir yaklaşım oluşturur.

Biyoinformatik Araçlarının Gücü Sürekli Artar

- Protein dizisinden elde edilebilecek bilgi, yapısal ve işlevsel ilkelerin ne kadar iyi anlaşıldığıyla sınırlıdır.
- Sürekli gelişen biyoinformatik araçlar, proteinlerin olası işlevleri ve birbirleriyle ilişkileri hakkında yeni öngörüler sağlar.
- Bu araçlar, diziler ile üç boyutlu yapılar arasındaki bağlantıların kurulmasına yardımcı olur.
- Protein dizisi verileri, yaşamın tarihinin araştırılmasında da giderek daha önemli bir kaynak hâline gelir.

Protein Dizileri Yaşamın Tarihini Yansıtır

- Amino asit dizisi, proteinin zaman içinde geçirdiği değişimlere ilişkin önemli bilgiler taşır.
- Protein dizilerinin sayısı arttıkça bu verilerden bilgi çıkaran daha güçlü yöntemler geliştirilir.
- Gen ve protein dizilerini içeren geniş biyolojik veri tabanları, evrimsel ilişkilerin araştırılmasını kolaylaştırır.
- Protein dizileri üzerinden yaşam tarihinin incelenmesi moleküler evrim alanının temelini oluşturur.

Moleküler Evrim Dizilerdeki Değişimleri İzler

- Moleküler evrim alanı, Emile Zuckerkandl ve Linus Pauling'in nükleotit ve protein dizilerini kullanmasına kadar uzanır.
- Birbiriyle yakın ilişkili organizmalarda gen ve protein dizilerinin benzer olması beklenir.
- Organizmalar arasındaki evrimsel uzaklık arttıkça diziler arasındaki farklılıklar da genellikle artar.
- Dizilerde biriken değişiklikler, organizmaların evrimsel ilişkilerinin yeniden kurulmasında kullanılabilir.

Ribozomal RNA Dizileri Evrimsel Sınıflandırmayı Deęiřtirmiřtir

- Carl Woese, 1970'lerde ribozomal RNA dizilerinden yararlanarak Arkeleri ayrı bir canlı grubu olarak tanımlamıştır.
- Arkelerin Bakterilerden ve Ökaryotlardan farklı olduğu bu moleküler karşılaştırmalarla gösterilmiştir.
- Protein dizileri de yaşamın evrimsel tarihini ortaya çıkarmak için önemli bilgiler sunar.
- Moleküler veri tabanlarının büyümesi, biyolojik tarihin izlenebileceği dizi miktarını hızla artırır.



Protein Dizileri Evrimsel Bilgiyi Eşit Ölçüde Taşımaz

- Proteinin etkinliği için zorunlu olan amino asit kalıntıları, evrim boyunca güçlü biçimde korunur.
- İşlev açısından daha az önemli bölgelerdeki amino asitler zaman içinde daha fazla değişebilir.
- Amino asit değişiklikleri tamamen rastgele olmasa da bazı bölgelerde protein işlevini bozmadan gerçekleşebilir.
- Bu nedenle aynı proteinin farklı bölgeleri evrimsel değişime karşı farklı düzeylerde tolerans gösterir.

Proteinler Farklı Hızlarda Evrimleşebilir

- Bazı proteinlerde amino asitlerin diğerlerine göre daha fazla değişebildiği bölgeler bulunur.
- Farklı işlevlere sahip proteinler, birbirinden farklı evrimsel hızlarda değişebilir.
- Protein işlevinin korunması, bazı amino asit değişikliklerini sınırlandırırken diğerlerine izin verebilir.
- Dizi farklılıklarının yorumlanmasında proteinin işlevsel gereklilikleri mutlaka dikkate alınır.

Yatay Gen Transferi Evrimsel Yorumu Karmaşıklştırır

- Bir genin veya gen grubunun bir organizmadan diğerine aktarılması yatay gen transferi olarak adlandırılır.
- Aktarılan genler birbirine oldukça benzeyebilir çünkü aktarım zaman bakımından görece yakın dönemde gerçekleşmiş olabilir.
- Aynı organizmadaki diğer genler ise birbirleriyle daha uzak evrimsel ilişki gösterebilir.
- Bakterilerde antibiyotik direnci genlerinin aktarılması, yatay gen transferinin önemli örneklerinden biridir.

Yatay Aktarılan Proteinler Özel Evrimsel Bilgi Taşır

- Aktarılan genlerin kodladığı proteinler, alıcı organizmanın diğer proteinlerinden farklı bir evrimsel geçmişe sahip olabilir.
- Bakterilerde yatay genlerle taşınan proteinler, sınırlı evrimsel geçmişleri nedeniyle özel araştırma adayları oluşturur.
- Moleküler evrim çalışmaları, bu farklı geçmişleri dizi karşılaştırmaları aracılığıyla ayırt etmeye çalışır.

Moleküler Evrim Çalışmalarında Protein Aileleri Seçilir

- Moleküler evrim araştırmaları genellikle birbiriyle yakın ilişkili protein ailelerine odaklanır.
- Seçilen proteinlerin en eski canlı hücrelerde bulunmuş temel işlevlere sahip olması tercih edilir.
- Bu özellik, proteinlerin yakın dönemde yatay gen transferiyle kazanılmış olma olasılığını azaltır.
- Protein ailelerinden elde edilen dizi bilgileri, organizmaların evrimsel geçmişini izlemek için kullanılabilir.

EF-1 α ve EF-Tu Ortak Bir Protein Ailesine Aittir

- EF-1 α proteini tüm ökaryotlarda protein sentezinde görev alır.
- Bakterilerde aynı işlevi EF-Tu adı verilen benzer bir protein yerine getirir.
- EF-1 α ile EF-Tu, ortak atadan gelen proteinlerden oluşan aynı ailenin üyeleridir.
- Aynı protein ailesinin üyeleri homolog proteinler veya homologlar olarak adlandırılır.

Homolog, Ortolog ve Paralog Kavramları

- Homolog proteinler, ortak bir atadan türemiş protein ailesinin üyeleridir.
- Farklı türlerde aynı protein ailesine ait iki protein ortolog olarak adlandırılır.
- Aynı türün genomunda bulunan iki homolog protein ise paralog olarak tanımlanır.
- Ortolog ve paralogların belirlenmesi, protein ailelerinin evrimsel yollarını izlemeyi kolaylaştırır.

Protein Dizileri Bilgisayar Programlarıyla Hizalanır

- Homolog proteinler, seçilen iki veya daha fazla protein dizisini doğrudan karşılaştıran bilgisayar programlarıyla belirlenebilir.
- Programlar geniş veri tabanlarını tarayarak sorgu dizisinin olası evrimsel akrabalarını bulabilir.
- Elektronik arama süreci, dizilerin baştan sona karşılaştırılmasıyla iyi eşleşen bölgelerin belirlenmesine dayanır.
- Aynı protein ailesine ait kısa dizilerin hizalanması aşağıdaki figürde gösterilmiştir.

<i>E. coli</i>	TGNRTIAVYDLGGGTFDI	SIIEIDEVDGEK	TFEVLA	TNGDTH	LGGEDFD	SRLIHYL
<i>B. subtilis</i>	DEDQTILLYDLGGGTFDV	SILELGDG	TFEVRSTAGDNR	LGGDDFD	QVIIDHL	


 Gap

Dizi Hizalamasında Puanlama Kullanılır

- Dizilerin hizalanmasında aynı amino asitlerin karşılaştığı her konuma pozitif bir puan verilir.
- Hizalamanın toplam puanı, iki dizi arasındaki benzerliğin kalitesini değerlendirmek için kullanılır.
- Farklı programlar farklı puanlama sistemleri kullanabileceğinden sayısal değerler programlar arasında değişebilir.
- Yüksek hizalama puanı, diziler arasındaki benzerliğin daha güçlü olduğunu gösterir.

Dizi Uzunlukları Farklıysa Boşluklar Eklenir

- Karşılaştırılan proteinlerin uzunlukları farklıysa diziler aynı anda bütünüyle hizalanamayabilir.
- Program, en iyi eşleşmeyi sağlamak için dizilerden birine boşluklar ekler.
- Bu boşluklar dizilerdeki amino asit eklenmelerini veya kayıplarını temsil edebilir.
- *E. coli* ve *Bacillus subtilis* Hsp70 dizilerindeki boşluk kullanımı aşağıdaki figürde gösterilmiştir.

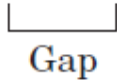
<i>E. coli</i>	TGNRTIAVYDLGGGTFD	ISIEIDEVDGEK	TFEVLATNGDTHLGGEDFDSRLIHYL
<i>B. subtilis</i>	DEDQTILLYDLGGGTFDV	SILELGDG	TFEVRSTAGDNRLLGGDDFDQVIIDHL


 Gap

Boşlukların Kullanımı Kontrollü Olmalıdır

- Teorik olarak yeterli sayıda boşluk eklenerek iki dizi içinde çok sayıda eşleşme oluşturulabilir.
- Bu nedenle hizalama programları, boşlukların açılması için negatif puanlar uygular.
- Program, boşluk sayısını sınırlandırırken özdeş amino asit kalıntılarının hizalanmasını en üst düzeye çıkarmaya çalışır.
- Böylece yapay biçimde yükseltilmiş benzerliklerin önüne geçilir.

E. coli TGNRTIAVYDLGGGTFDISII EIDEVDGEKTFEVLATNGDTHLGGEDFDSRLIHYL
B. subtilis DEDQTILLYDLGGGTFDVSILELGDG TFEVRSTAGDNRLLGGDDFDQVIIDHL



Gap

Koruyucu Amino Asit Değişimleri de Değerlendirilir

- Evrimsel ilişkileri belirlemek için yalnızca özdeş amino asitlerin sayılması her zaman yeterli değildir.
- Bir amino asidin benzer kimyasal özellikteki başka bir amino asitle değişmesi koruyucu değişim olarak değerlendirilir.
- Aspartatın glutamatla yer değiştirmesi, iki kalıntı da negatif yüklü olduğundan koruyucu bir değişimdir.
- Koruyucu değişimler, kimyasal açıdan uyumsuz değişimlere göre hizalamada daha yüksek puan alır.

İstatistiksel Testler Hizalamanın Anlamını Sınar

- Homolog dizileri belirlemek için kullanılan programlar, hizalamaların güvenilirliğini sınavan yöntemlerle desteklenir.
- Dizilerden biri karıştırılarak rastgele bir dizi oluşturulur ve hizalama işlemi çok sayıda tekrarlanır.
- Özgün hizalama puanı, rastgele dizilerden elde edilen puanlardan belirgin biçimde yüksek olmalıdır.
- Anlamlı bir puan, benzerliği desteklese de tek başına kesin bir evrimsel ilişkiyi kanıtlamaz.

Yapısal Benzerlikler Evrimsel İlişkiyi Destekleyebilir

- Bazı proteinlerin üç boyutlu yapıları, dizilerde belirgin homoloji bulunmasa bile evrimsel ilişkileri gösterebilir.
- Yapısal benzerlikler, zaman içinde amino asit dizisi benzerliğinin büyük ölçüde kaybolduğu durumlarda korunabilir.
- Bu nedenle proteinlerin evrimsel ilişkileri değerlendirilirken dizi ve yapı bilgileri birlikte ele alınabilir.

İmza Dizileri Belirli Grupları Tanımlar

- Bir taksonomik gruptaki proteinlerde bulunup diğer gruplarda bulunmayan bölgeler imza dizileri olarak kullanılabilir.
- İmza dizileri, ait oldukları grubun proteinlerini tanımaya yardımcı olan ayırt edici özelliklerdir.
- EF-1 α ve EF-Tu protein ailesindeki imza dizisi aşağıdaki figürde gösterilmiştir.
- Bu tür diziler, protein aileleri ile organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkileri değerlendirmeyi kolaylaştırır.

			Signature sequence	
Archaea	<i>Halobacterium halobium</i>	IGHVDHGKST	TMVGR	LYETGSVPEHVIEQH
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	IGHVDHGKST	TLVGR	LMDRGFIDEKTVKEA
Eukaryotes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGHVDSGKST	TTTGH	LIYKCGGIDKRTIEKF
	<i>Homo sapiens</i>	IGHVDSGKST	TTTGH	LIYKCGGIDKRTIEKF
Gram-positive bacterium	<i>Bacillus subtilis</i>	IGHVDHGKST	TMVGR	ITTV
Gram-negative bacterium	<i>Escherichia coli</i>	IGHVDHGKST	TLTAA	ITTV



EF-1 α /EF-Tu Ailesinin İmza Dizisi

- EF-1 α /EF-Tu protein ailesindeki imza dizisi, amino-terminal ucun yakınında bulunan 12 kalıntılık bir eklenmedir.
- Bu dizi bütün Arkelerde ve Ökaryotlarda bulunurken Bakterilerde yer almaz.
- Arke ve ökaryotlarda aynı eklenmenin bulunması, iki grubun ortak atasındaki önemli bir evrimsel olayı yansıtır.
- Korunmuş eklenme dizileri ve grubun imza bölgesi aşağıdaki figürde gösterilmiştir.

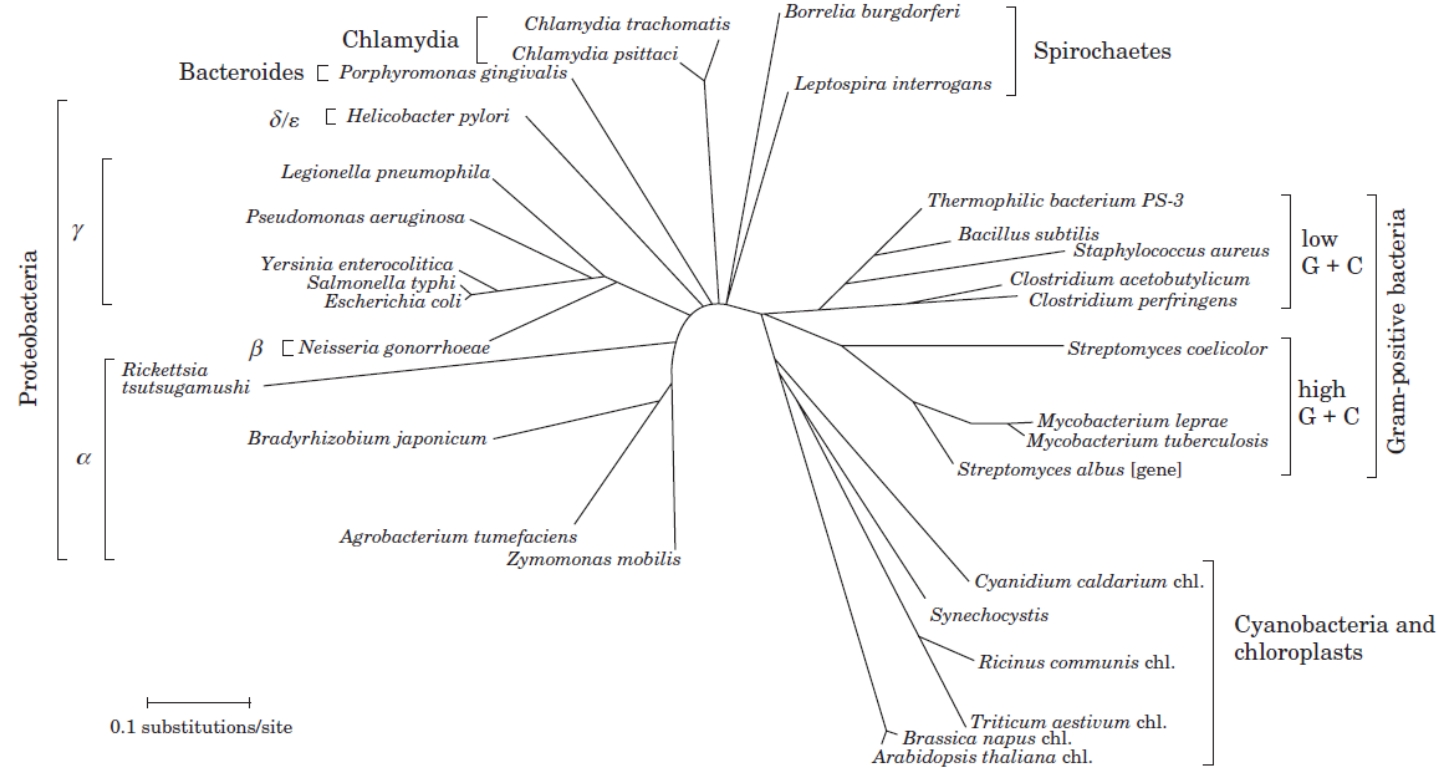
			Signature sequence	
Archaea	<i>Halobacterium halobium</i>	IGHVDH GKST	TMVGR	LYETGSVPEHV IEQH
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	IGHVDH GKST	TLVGR	LMDRGFIDEKT VKEA
Eukaryotes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGHVDS GKST	TTTGH	LIYKCGGIDKRT IEKF
	<i>Homo sapiens</i>	IGHVDS GKST	TTTGH	LIYKCGGIDKRT IEKF
Gram-positive bacterium	<i>Bacillus subtilis</i>	IGHVDH GKST	TMVGR	ITTV
Gram-negative bacterium	<i>Escherichia coli</i>	IGHVDH GKST	TLTAA	ITTV

İmza Dizileri Evrimsel Sınıflandırmayı Destekler

- İmza dizileri, Ökaryotlar ile Arkeler arasındaki evrimsel ilişkinin açıklanmasına katkı sağlar.
- Farklı imza dizileri, organizmaların evrimsel ilişkilerini belirlemek için birbirini tamamlayan kanıtlar sunabilir.
- Tek bir protein bölgesinden elde edilen bilgi, daha geniş dizi karşılaştırmalarıyla birlikte değerlendirilir.

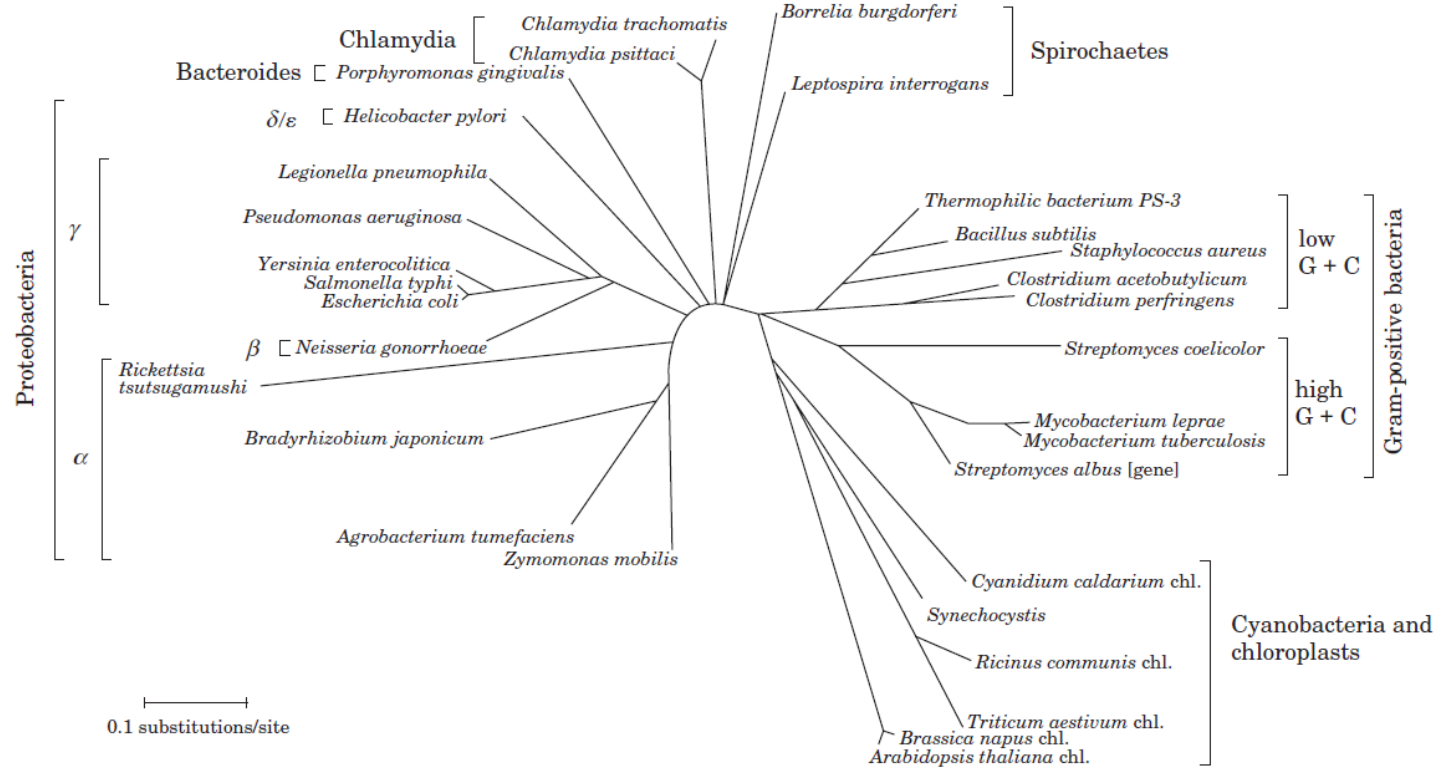
Evrimsel Ağaçlar Protein Dizilerinden Kurulabilir

- Bir protein ailesinin farklı türlerdeki dizileri karşılaştırılarak moleküler evrimsel ağaçlar oluşturulabilir.
- Evrimsel ağaç, protein dizilerinin zaman içinde birbirinden ayrılma düzenini temsil eder.
- Yandaki figürde bakteri GroEL protein ailesinin dizi farklılıklarından türetilen bir evrimsel ağaç gösterilmiştir.
- Aynı ağaçta bazı bakteri dışı türlerin kloroplast dizileri de yer almaktadır.



Evrimsel Ağacın Dalları Nasıl Okunur?

- Yandaki figürde her dalın serbest ucu, farklı bir mevcut türü temsil eder.
- İki dalın birleştiği iç düğüm, bu türlerin ortak atasını gösterir.
- Bir dış düğümü iç düğüme bağlayan dal uzunluğu, iki dizi arasındaki amino asit değişimlerinin sayısını yansıtır.
- Bu gösterim, türler arasındaki evrimsel uzaklıkların protein dizileri üzerinden karşılaştırılmasını sağlar.



Dal Uzunlukları Dizi Değişimini Yansıtır

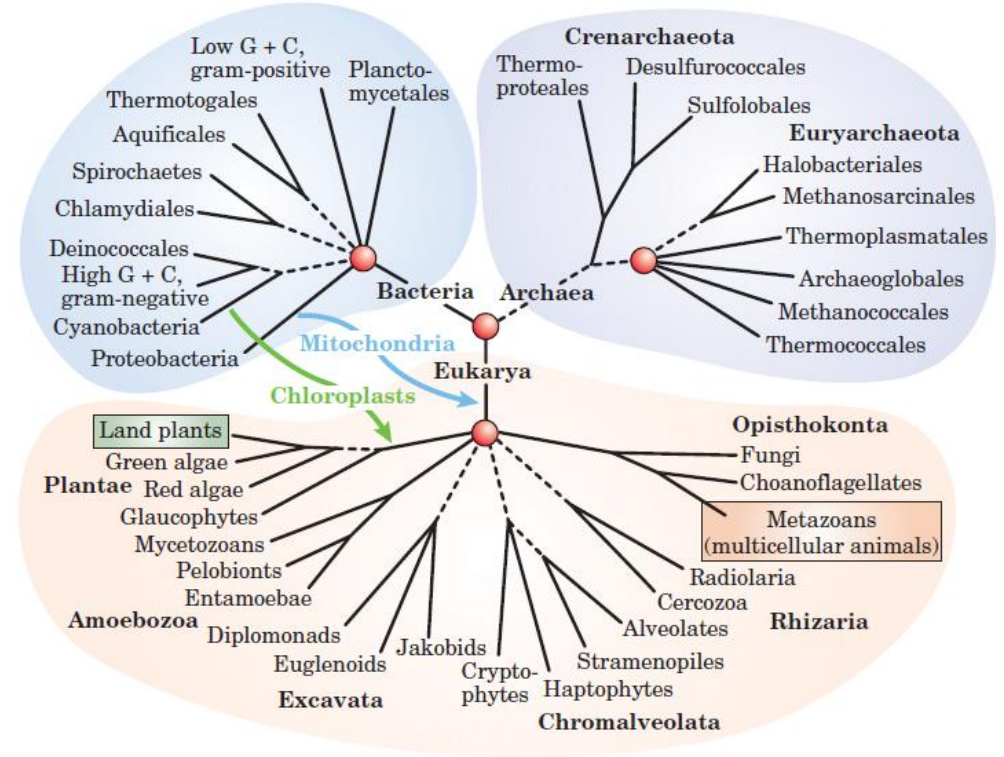
- İç düğümleri birbirine bağlayan dallar, ortak ataları ayıran amino asit değişimlerinin toplamını temsil eder.
- Dalların uzunluğu, bazı evrimsel ağaçlarda belirli bir ölçekte dizi farklılığını gösterecek biçimde çizilir.
- Farklı türlerin ayrılma zamanını belirlemek için ağaç, fosil kayıtlar ve diğer kaynaklarla kalibre edilmelidir.
- Bu nedenle dizi değişimi ile mutlak zaman arasındaki ilişki ek verilere dayanır.

Çoklu Diziler Daha Ayrıntılı Ağaçlar Sağlar

- Veri tabanlarında daha fazla dizi biriktikçe birden fazla proteine dayalı evrimsel ağaçlar oluşturulabilir.
- Ek genomik bilgiler ve gelişmiş analiz yöntemleri, bu ağaçların ayrıntılarının iyileştirilmesini sağlar.
- Çok sayıda proteinin birlikte incelenmesi, tek bir proteinden kaynaklanabilecek sınırlılıkları azaltabilir.
- Bu çalışmalar, Dünya'daki yaşamın ayrıntılı evrimsel tarihini ortaya çıkarmaya yöneliktir.

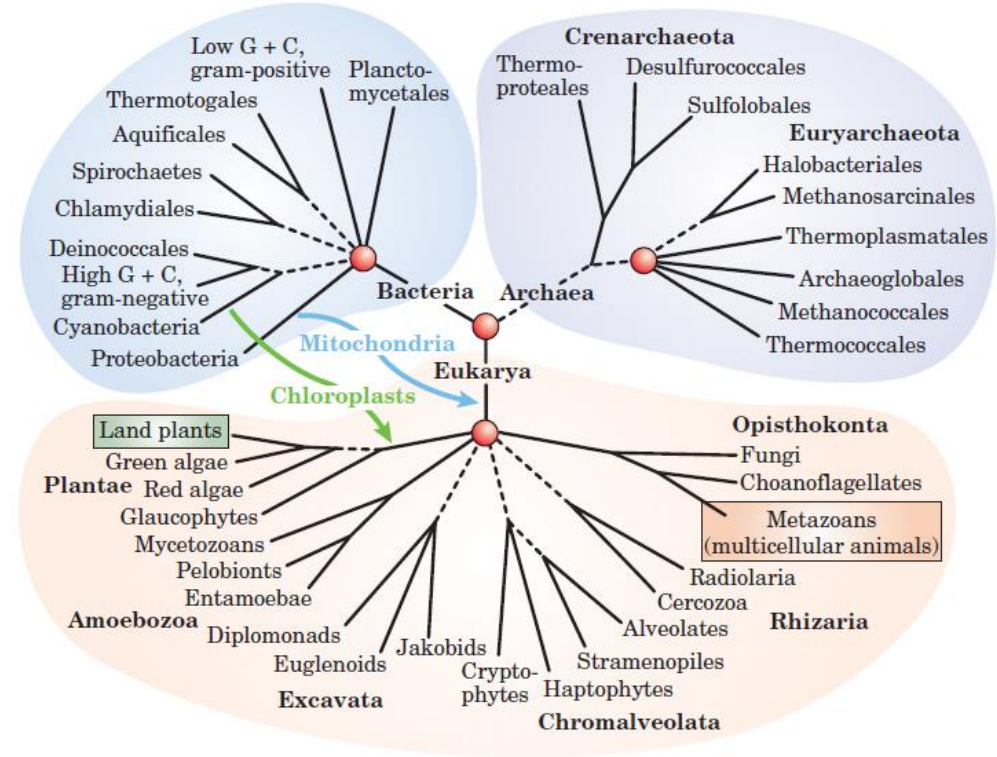
Yaşamın Konsensus Ağacı

- Çok sayıda protein dizisi ve ek genomik özellik birlikte değerlendirilerek yaşamın konsensus ağacı oluşturulur.
- Yandaki figür, Bakteriler, Arkeler ve Ökaryotlar arasındaki geniş evrimsel ilişkileri göstermektedir.
- Kesintisiz çizgili dallar üzerinde çalışmalar sürerken, kesikli çizgiler bazı ilişkilerin henüz belirsiz olduğunu belirtir.
- Gösterilen ağaç, mevcut bilgilerin ve çözülmeyi bekleyen evrimsel sorunların yalnızca bir bölümünü temsil eder.



Yaşam Ağacı Sürekli Geliştirilen Bir Modeldir

- Yandaki figürde yer alan her canlı grubu, kendi içinde oldukça karmaşık bir evrimsel geçmiş taşır.
- Moleküler evrim araştırmaları, daha fazla dizi ve genom verisi biriktikçe yaşam ağacını yeniden değerlendirmeyi sürdürür.
- Dünya'daki organizmaların evrimsel tarihinin anlaşılması, henüz tamamlanmamış ve sürekli gelişen bir araştırma alanıdır.
- Moleküler evrim, canlıların kökeni ve çeşitlenmesi hakkındaki temel soruların yanıtlanmasına katkı sağlar.



Teşekkür ederim

Prof. Dr. Bektaş TEPE

