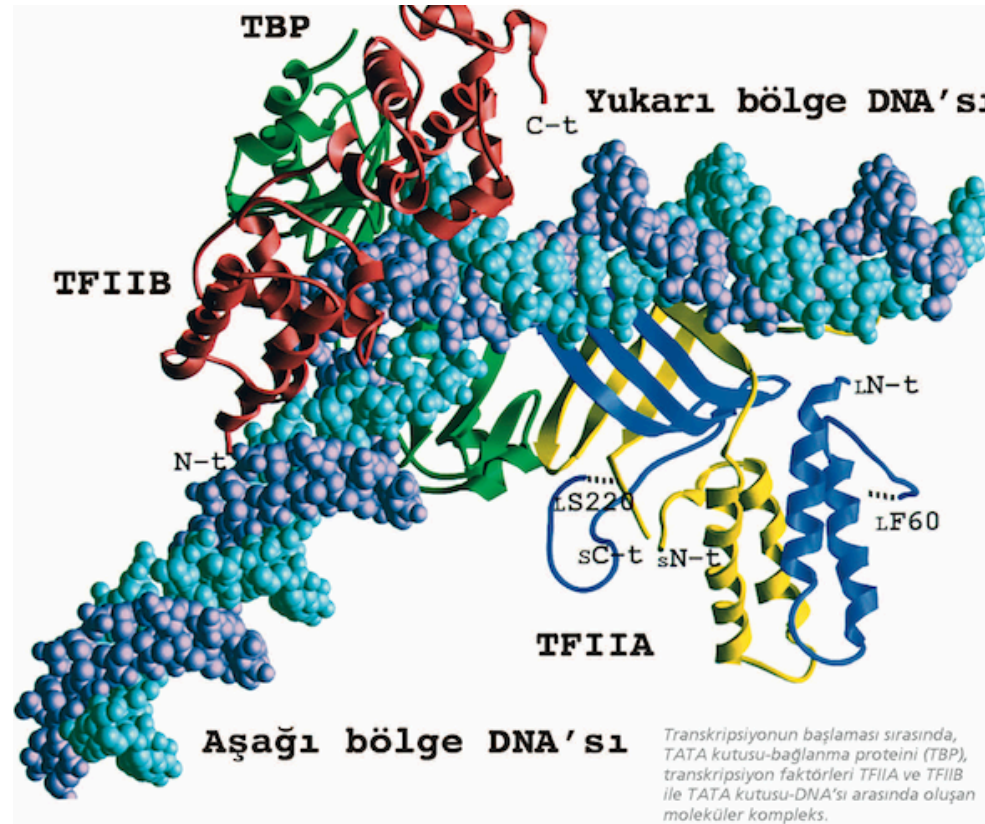


# ÖKARYOTLARDA GEN İFADESİNİN DÜZENLENMESİ



# Giriş

- Çok hücreli ökaryotlarda gen ifadesinin farklı şekillerde düzenlenmesi, embriyonik gelişim için son derece önemlidir.
- Örn; pankreas hücreleri retinal pigment yapamazken, retinal hücreler de insülin üretmez.
- O halde organizma, farklı hücre tiplerinde farklı gen takımlarını nasıl çalıştırmaktadır?

# Giriş

- Bu olayın temelinde, genomun özgöl kısımlarını etkin hale getiren ve diğer genleri baskılayan mekanizmalar vardır.
- Gen ifadesinin regülasyonu şu şekillerde gerçekleşir:
  - Pozitif regülasyon (transkripsiyonun aktivasyonu)
  - Negatif regülasyon (transkripsiyonun baskılanması)
- Bir genin kendisi yapısal olarak normal olsa bile, yanlış hücre tipinde, yanlış zamanda ve anormal miktarda ifade edilmesi, sağlıksız bir fenotipe neden olabilir.

# Ökaryotlarda gen regölasyonu prokaryotlardan farklıdır

- Ökaryotlardaki gen regölasyonunun prokaryotlara göre daha karmaşık olmasının çeşitli nedenleri vardır.
- şimdi bu nedenleri sırasıyla inceleyelim.

# 1. neden

- Ökaryotik hücreler daha fazla miktarda genetik bilgi taşır.
- Ökaryotik DNA, histonlarla ve diğer bazı proteinlerle kompleks oluşturmuştur.
- DNA'nın az yoğun (transkripsiyona açık) veya çok yoğun (transkripsiyona kapalı) olması, proteinlerle kompleks oluşturmasına bağlıdır.
- DNA-protein kompleksi, gen regülasyonu için önemli bir açma-kapama düğmesidir.

## 2. neden

- Ökaryotlardaki genetik bilgi birden fazla kromozom üzerinde taşınır.
- Bu kromozomlar, çift katlı çekirdek zarının içinde yer alırlar.

## 3. neden

- Ökaryotlarda transkripsiyon ve translasyon, yer ve zaman açısından birbirinden ayrılmıştır.
- Transkripsiyon çekirdekte olurken, translasyon daha sonra sitoplazmada gerçekleşir.

## 4. neden

- Ökaryotik genlerin transkripsiyon ürünleri, sitoplazmaya aktarılmadan önce moleküler işlemlerden geçirilir.



## 5. neden

- Ökaryotik mRNA'ların yarı ömrü, prokaryotlara göre daha uzundur.
- Prokaryotların çoğu tek hücreli canlılardır.
- Çevresel değişikliklere çok hızlı yanıt vermeleri gerekir.
- Bu organizmaların mRNA'larının daha hızlı bozunması, hızlı cevap oluşturmak için gereklidir.

## 6. neden

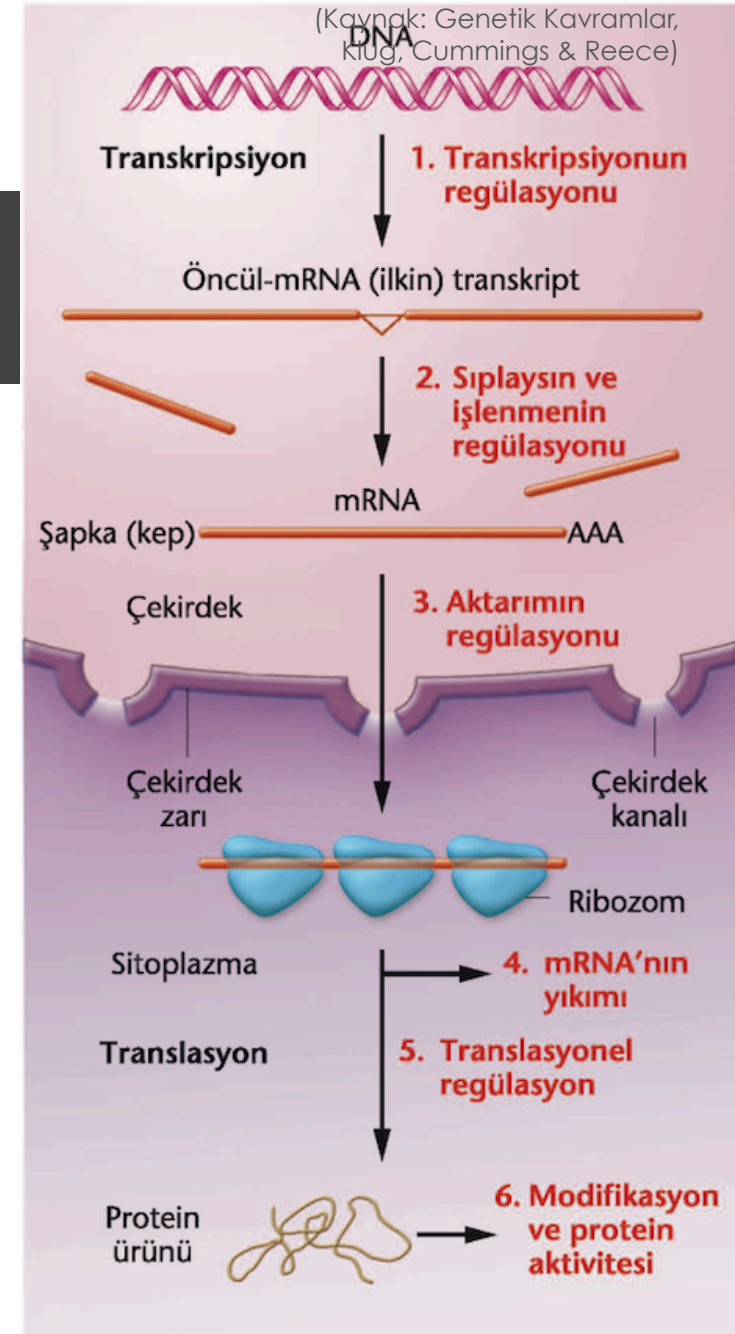
- mRNA yapısının daha kararlı olmasından dolayı ökaryotlar, translasyonel seviyedeki kontrolü çok yaygın olarak kullanırlar.

## 7. neden

- Ökaryotların çoğu, farklılaşmış hücre tiplerine sahiptir.
- Her hücre, tam bir gen takımına sahiptir.
- Ancak farklı hücre tipleri, farklı proteinler yapmak için farklı gen takımlarını harekete geçirirler.

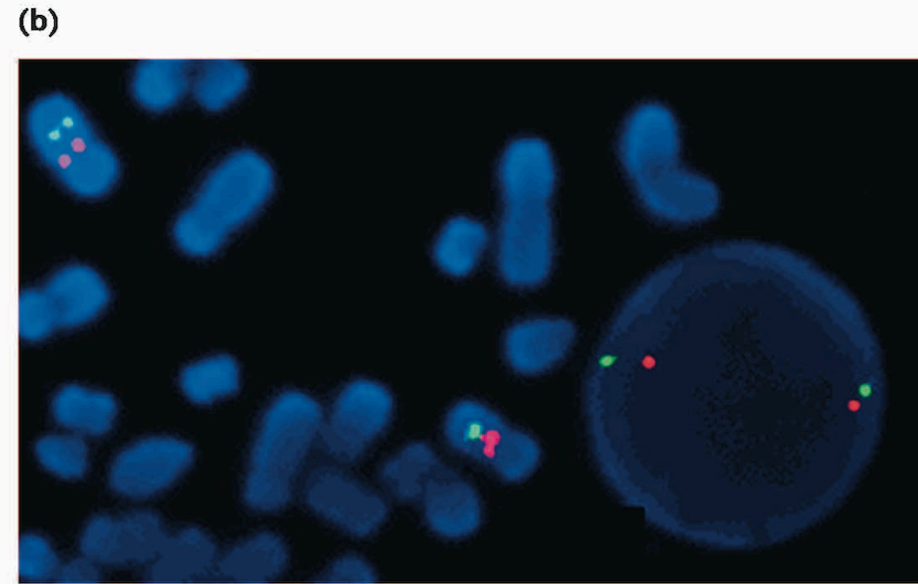
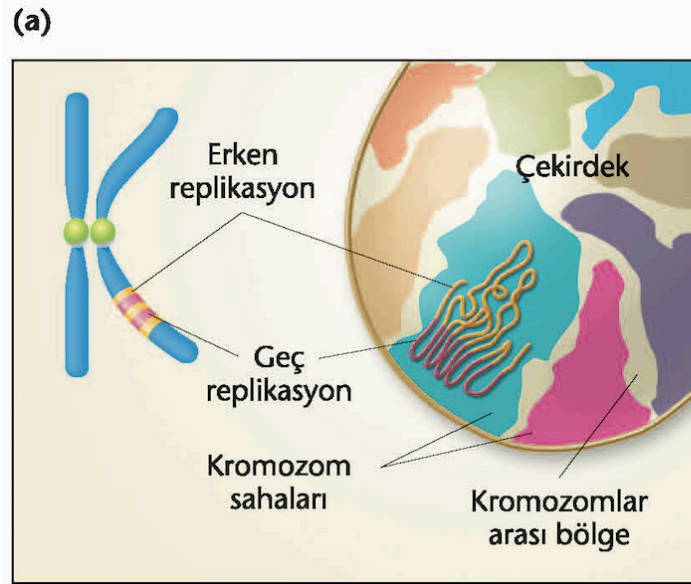
## Ökaryotlarda gen ifadesi regülasyonu çok basamaklıdır

- Transkripsiyonel kontrol
- Transkripsiyon sonrası kontrol
- Sitoplazmaya aktarım
- mRNA kararlılığı
- Translasyonel kontrol (örn; hangi mRNA'nın translasyona uğrayacağını seçimi)
- Protein ürünlerinin translasyon sonrası değişimi



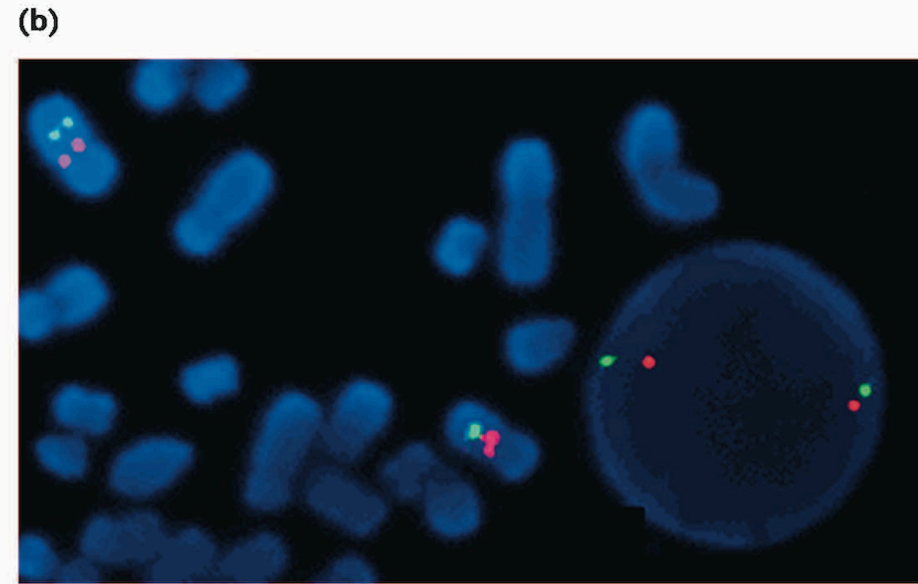
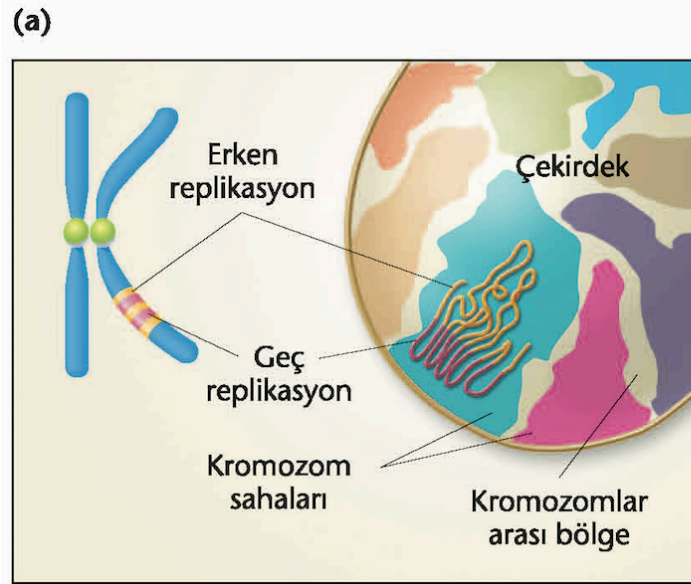
# Çekirdekteki kromozomların organizasyonu

- Interfaz çekirdeğindeki her kromozom, kromozom sahası (chromosome territory) denilen ve onu diğer kromozomlardan ayıran bir bölgeyi kapsar.



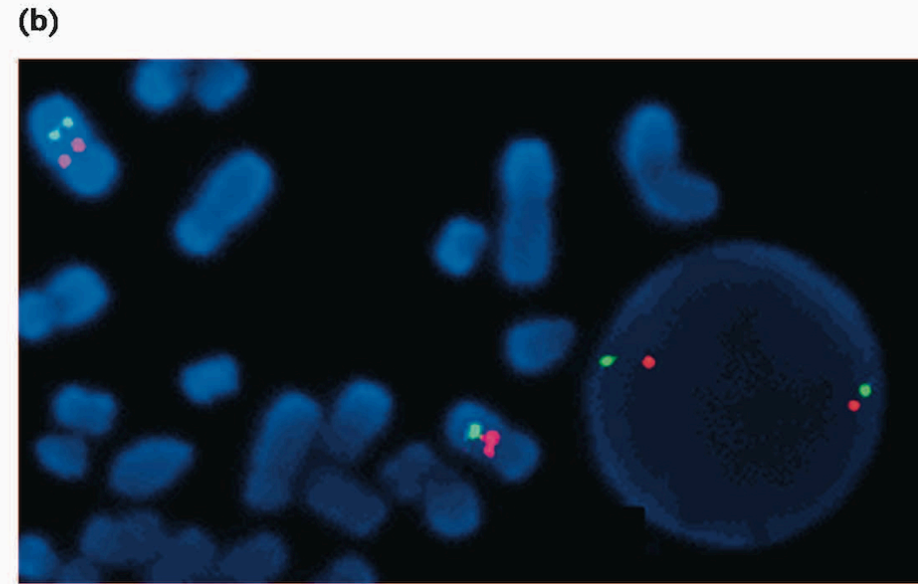
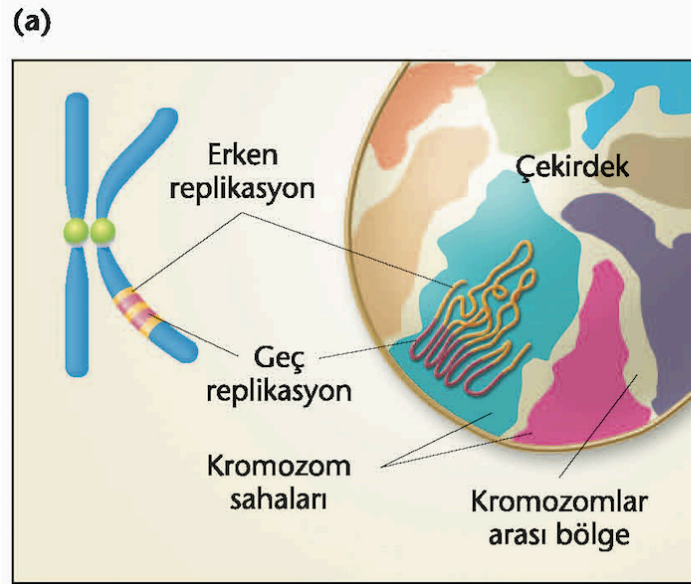
# Çekirdekteki kromozomların organizasyonu

- Kromozomlar büyükliklerine ve içerdikleri gen yoğunluğuna göre çekirdekte organize olurlar.



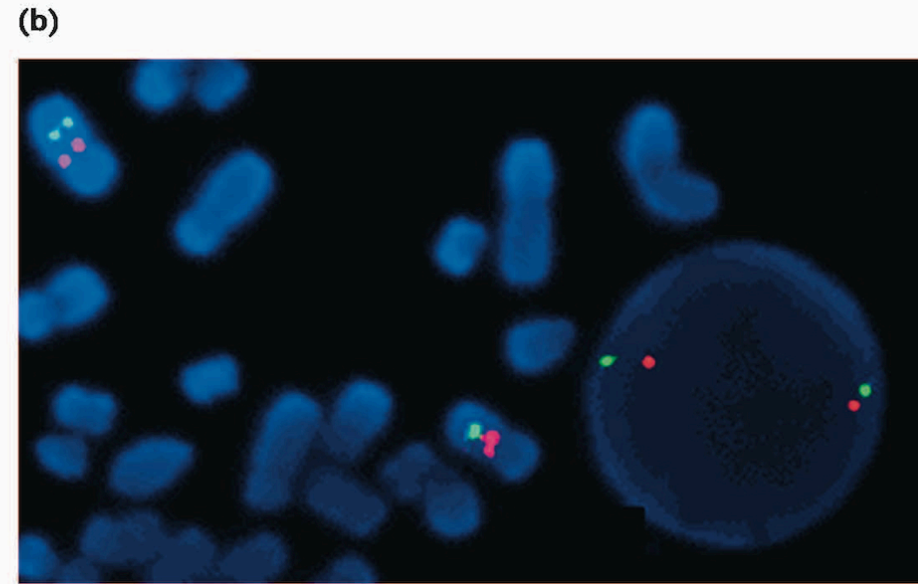
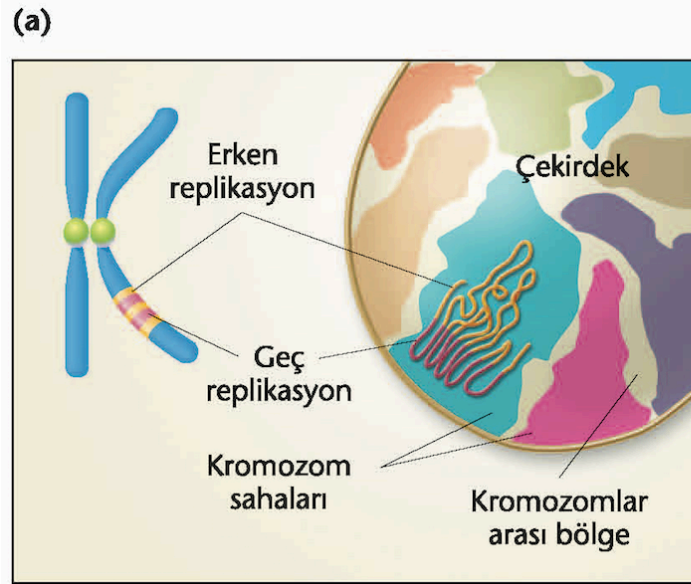
# Çekirdekteki kromozomların organizasyonu

- Daha az sayıda gen içerenler dış çevrede yerleşirken, daha yoğun olanlar iç bölgelerde bulunur.



# Çekirdekteki kromozomların organizasyonu

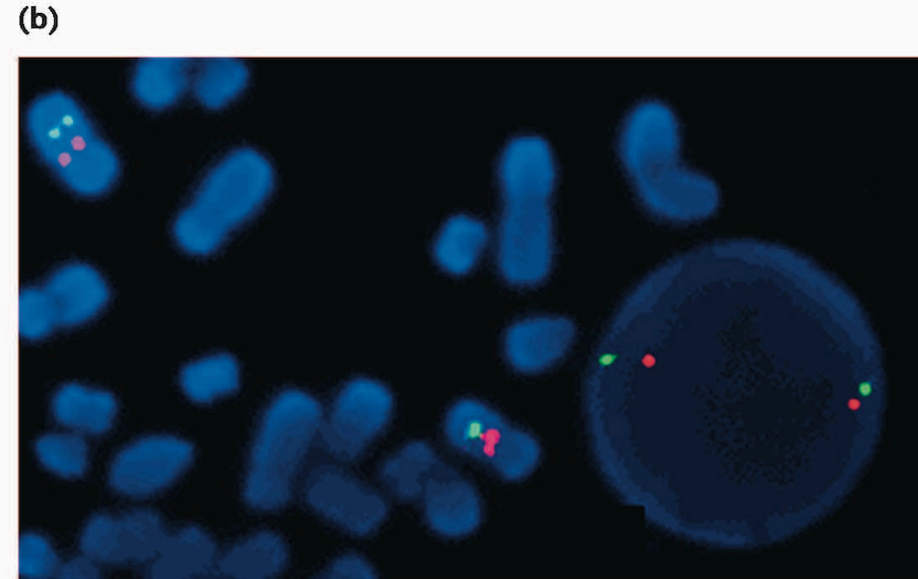
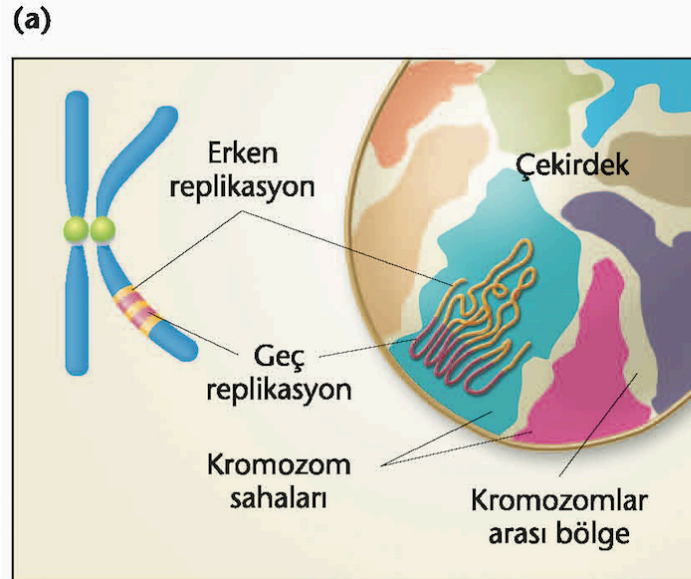
- Kromozomlar arasındaki bu kanallara, kromozomlar arası bölmeler (interchromosomal regions) adı verilir.





# Çekirdekteki kromozomların organizasyonu

- Kromozomlar devamlı olarak yeniden düzenlenir.
- Transkripsiyona uğrayan aktif genler, kromozomlar arası bölmelerin sınırlarına doğru konumlanırlar.

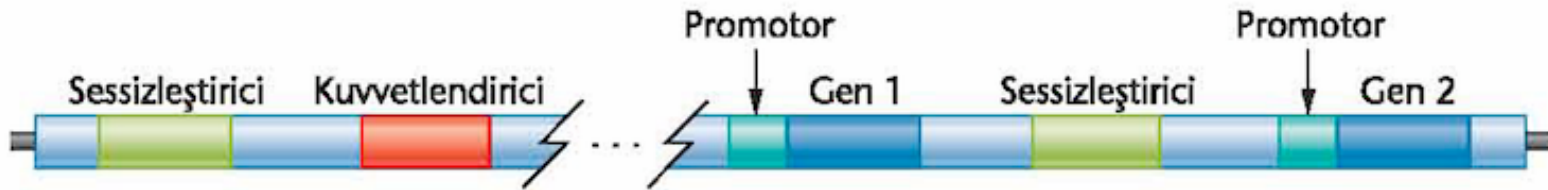


# Çekirdekdeki kromozomların organizasyonu

- Bir gen, kromozom sahasının kenarına geldiğinde gen ifadesinin başlaması için iki adım gereklidir:
  - Enzimler tarafından nükleozom yapısının değiştirilmesi, aktivasyonun sağlanması ve promotorun kullanılabilir hale gelmesi
  - Transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II gibi faktörleri biraraya getirecek ko-aktivatörlerin bulunması

# Transkripsiyonun başlaması önemli bir gen regülasyonudur

- Ökaryotik genlerde transkripsiyonu düzenleyen üç adet cis-regülasyon dizisi bulunmaktadır:
  - Promotorlar
  - Sessizleştiriciler (silencers)
  - Kuvvetlendiriciler (enhancers)



**ŞEKİL 17-3** Ökaryotik genlerin ifadesi promotor gibi gene yakın düzenleyici elementler ve kuvvetlendiriciler ve sessizleştiriciler gibi transkripsiyon biriminden uzakta olan diziler tarafından kontrol edilir.

# Promotorların organizasyonu

- Promotorlar, transkripsiyon için tanıma noktası olarak görev yapan nükleotit dizileridir.
- Kontrol ettikleri genlerin hemen başında yer alırlar.
- Genellikle yüzlerce nükleotit uzunluğundadırlar.

# TATA kutusu

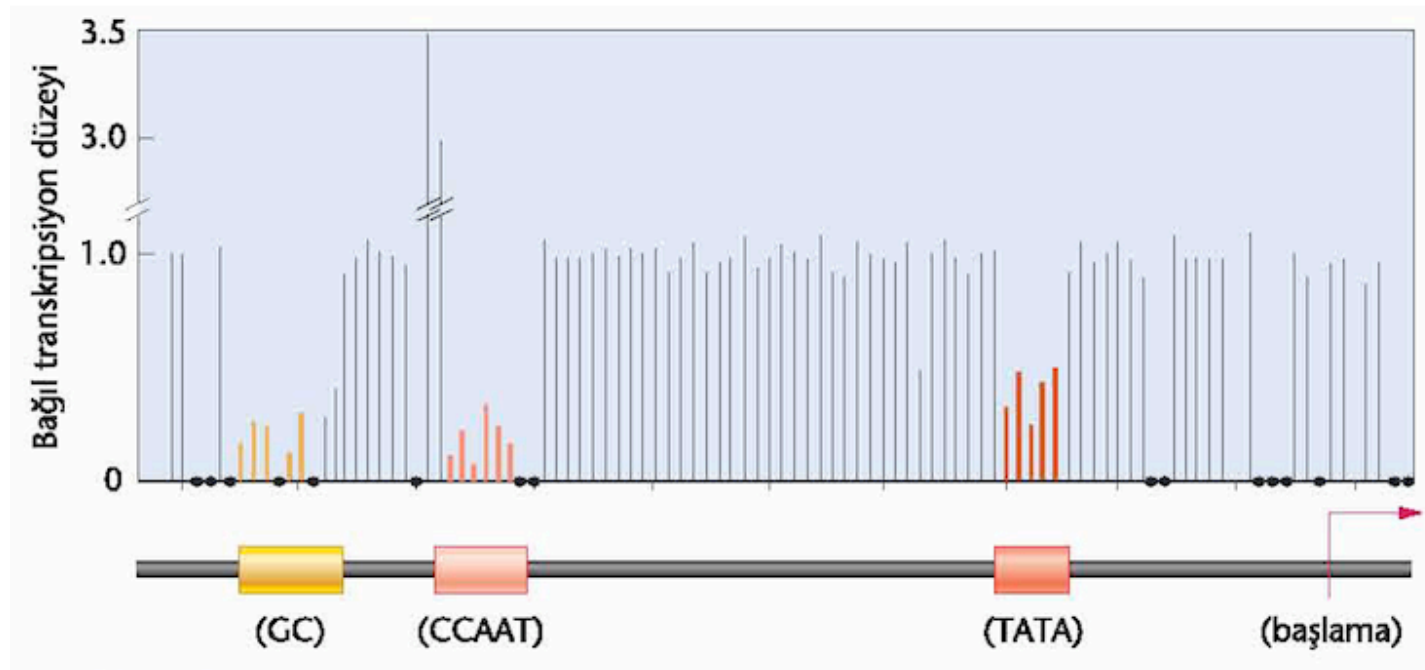
- Çoğu promotor bölge; TATA, CAAT ve GC kutuları gibi çok sayıda element içerir.
- RNA polimeraz II'nin bağlanacağı bölge TATA kutusu olarak adlandırılır.
- TATA kutusuna, öz promotor (core promotor) adı da verilir.
- Transkripsiyonun başladığı ilk noktadan yaklaşık olarak 25-30 baz yukarıda yer alır (-25 ila -30).

# TATA kutusu

- Genellikle iki yanında AT bakımından zengin 7-8 bç uzunluğunda konsensus diziler bulunur.
- TATA kutusunda meydana gelen mutasyonlar transkripsiyonun etkinliğini düşürmektedir.

# TATA kutusu

- Ayrıca bu bölgedeki delesyonlar, transkripsiyonun başlangıç noktasını değiştirebilmektedir.



# CAAT kutusu

- Birçok promotor ayrıca CAAT kutuları içerir.
- Bu elementler CAAT ya da CCAAT konsensus dizileri içerirler.
- CAAT kutusu genellikle başlama noktasından 70-80 bp yukarısında yer alır.
- CAAT kutusu, proteinlerin DNA'ya bağlandıkları bölgedir.
- Bu nedenle transkripsiyonda çok kritik bir göreve sahiptir.



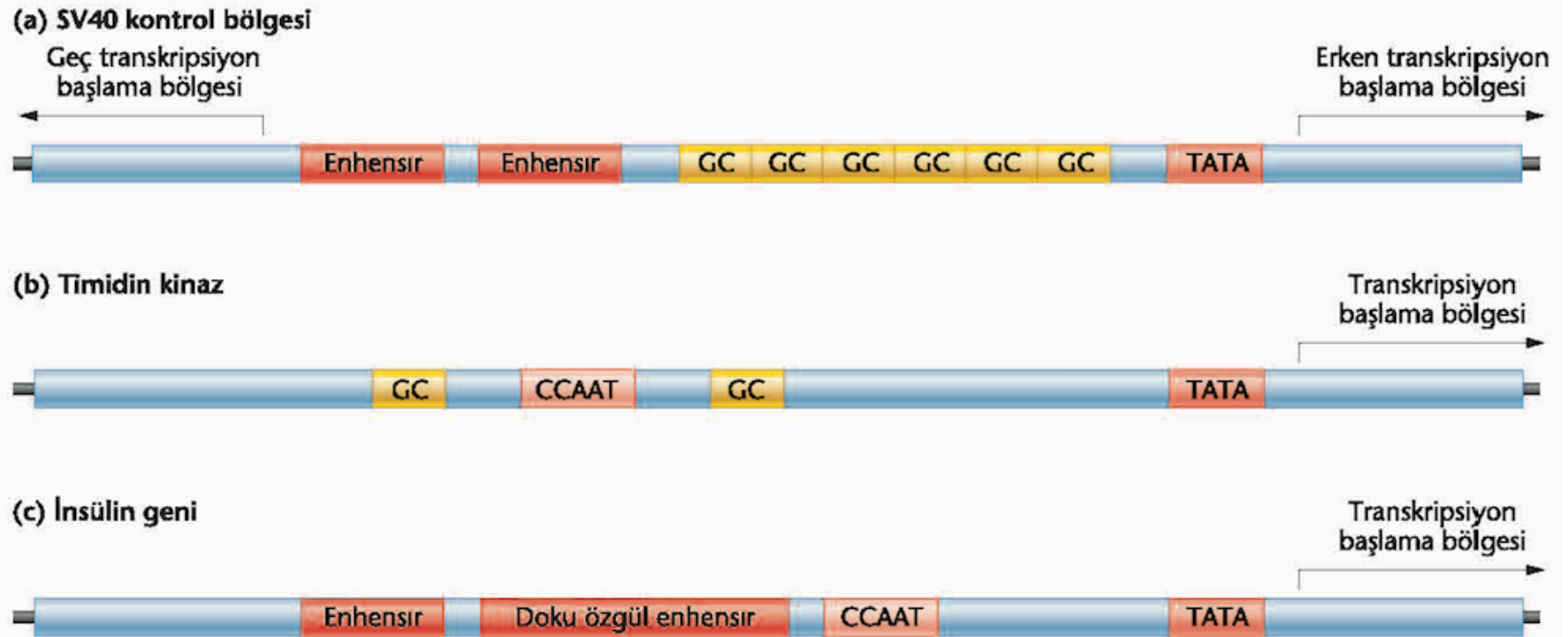
# GC kutusu

- GGGCGG konsensus dizisine sahiptir.
- -110 bölgesinde yerleşim gösterir.
- Bu bölge de transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesi olarak görev yapar.
- Ayrıca kuvvetlendiriciler (enhancers) olarak da rol oynarlar.

# Promotorlar dinamik yapılardır

- Promotor diziler, yerleşim ve pozisyon açısından değişebilen birimlerdir.
- Promotorların evrensel bileşenleri yoktur.
- Genler; promotor elementlerinin tipi, sayısı, yerleşimi ve yerleşim yönü açısından farklıdır.

# Promotorlar dinamik yapılardır



**ŞEKİL 17-5** Ökaryotik hücrelerde ifade edilen çeşitli genlerdeki promotor bölgelerinin organizasyonu, kontrol elementlerinin değişken doğası, sayısı ve düzeni gösterilmektedir.

# Kuvvetlendiriciler (enhancers)

- Genin her iki tarafında, genden biraz uzakta ya da genin içinde bulunabilirler.
- Yapısal genin yanında buldukları için “cis” regülatörler olarak adlandırılırlar.
- Birçok düzenleyici protein ve transkripsiyon faktörü ile etkileşirler.
- Böylece transkripsiyonun başlama kapasitesini artırabilir ya da promotoru aktif hale getirebilirler.

# Kuvvetlendiriciler (enhancers)

- Bu diziler içinde negatif regülatörlerin bağlanma bölgeleri bulunabileceği gibi, pozitif regülatörlerin de bağlanma bölgeleri bulunmaktadır.
- Bu nedenle prokaryotların operatör ve aktivatör bölgeleri ile enhansırlar arasında analogi olduğu söylenebilir.
- Ancak enhansırlar yapı ve işlev bakımından daha karmaşıktır.

# Kuvvetlendiriciler (enhancers)

- Enhansırlar ile promotor dizilerini birbirinden ayıran özellikler şunlardır:
  - Enhansırlar, kontrol ettikleri genin aşağısında, yukarısında ya da içinde bulunabilirler.
  - İşlev üzerinde herhangi bir kritik etki göstermeksizin ters yönlü yerleşim gösterebilirler.
  - Genomun başka bir bölgesine taşınırsa yeni bölgedeki genin transkripsiyonu artar.

## Immunoglobulin ağır zincir geni (gen içi enhansır)

- Genin içinde bulunan ve bulunduğu geni regüle eden enhansırlara örnek olarak verilebilir.
- Bu enhansır, kodlayıcı iki bölge arasındaki bir intronun içine yerleşmiştir.
- Sadece immunoglobulin genlerinin aktif olduğu hücrelerde aktiftir.

## $\beta$ -globin geni (gen dışı enhansır)

- İnsan  $\beta$ -globin ve tavuk timidin kinaz geninde enhansırlar genin dışında bulunur (downstream enhancer).
- Tavuklarda  $\beta$ -globin ve  $\epsilon$ -globin genleri arasında yer alan enhansır,
  - Embriyonik gelişim sırasında  $\epsilon$ -globin genini regüle edecek yönde ve
  - Erişkin dönemde ise  $\beta$ -globin genini regüle etmek üzere ters yönde çalışmaktadır.

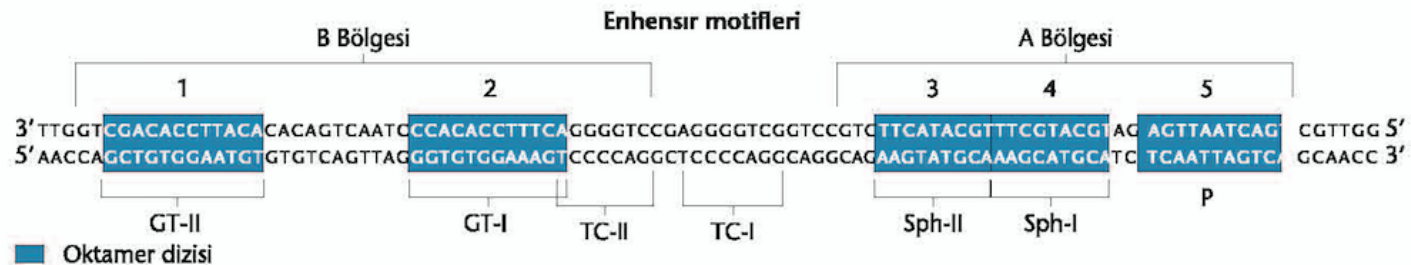


## Upstream activator sequences (UAS)

- Mayalarda ise yukarı aktivatör diziler (upstream activator sequences, UAS) bulunmaktadır.
- UAS'lerin enhansırlardan farkı, transkripsiyonun başlama noktasının aşağısında işlev görmemesidir.

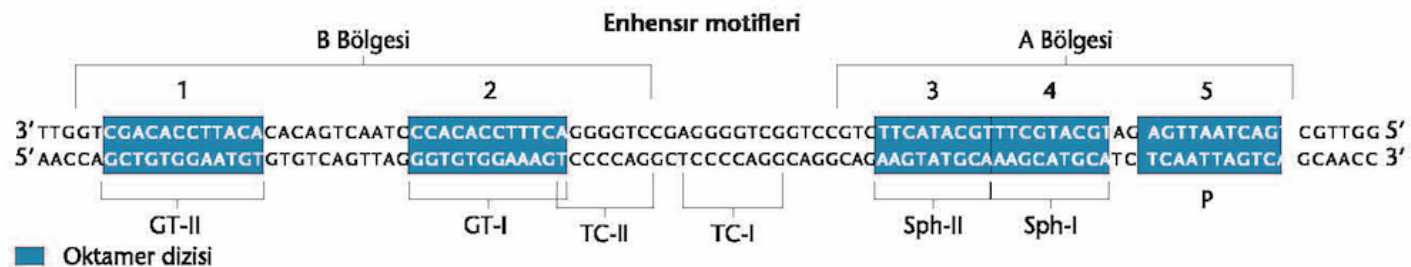
# SV40 virüsünün enhansır dizisi

- Bu virüsün enhansırı, transkripsiyonun başlama noktasından yaklaşık 200 baz yukarıda yer alır.
- Birbirine bitişik 72 bç'lik iki diziden oluşmaktadır.
- 72 bç'lik bölgelerin her biri, transkripsiyonun maksimum oranda olmasını sağlayan beş dizi içerir.



# SV40 virüsünün enhansır dizisi

- Bu 72 bç'lik bölgelerden birisi ortadan kalktığında, transkripsiyon üzerinde herhangi bir farklılık meydana gelmemektedir.
- Ancak ikisi birden ortadan kalkınca transkripsiyonun etkinliği büyük ölçüde azalmaktadır.



# Enhansırların çalışma mekanizması

- Enhansırlar, zamana ve dokuya özgül gen ifadesinden sorumludurlar.
- Enhansırların işlev mekanizmalarını iki grup altında toplamak mümkündür:
  - Transkripsiyon faktörleri enhansırlara bağlanır ve kromatinin konfigürasyonunu değiştirir.
  - DNA'yı bükerek ya da halka yapısı oluşturarak, uzaktaki enhansırları ve promotorları, transkripsiyon faktörleri ve polimerazlar ile kompleks oluşturmasını sağlayacak kadar yakınlaştırırlar.

## Enhansırların alışma mekanizması

- Oluşan yeni konfigürasyon, transkripsiyonu en üst seviyede uyararak RNA sentez oranını artırır.

# Ökaryotlarda transkripsiyon çok basamaklıdır

- Ökaryotlarda transkripsiyonun aktivasyonu bir seri basamak ile gerçekleşir.
- İlk adım DNA'yı açmak ve kromatinin konfigürasyonunu değiştirmektir.
- DNA açıldıktan sonra transkripsiyon faktörleri RNA polimeraz ile birlikte promotor bölgeye bağlanır.
- Böylelikle transkripsiyon başlama kompleksi oluşur.

# Kromatinin yeniden şekillenmesi

- Ökaryotlarda DNA, kromatin yapısını oluşturmak üzere histon ve histon olmayan proteinlerle birleşmiştir.
- Interfaz çekirdeğinde bazı kromozom bölgeleri oldukça yoğunlaşmıştır.
- Transkripsiyon açısından hareketsiz olan bu bölgelere heterokromatin adı verilir.
- Bu bölgeler, in vitro koşullarda DNAaz I enzimi ile parçalanmaya karşı dirençlidir.

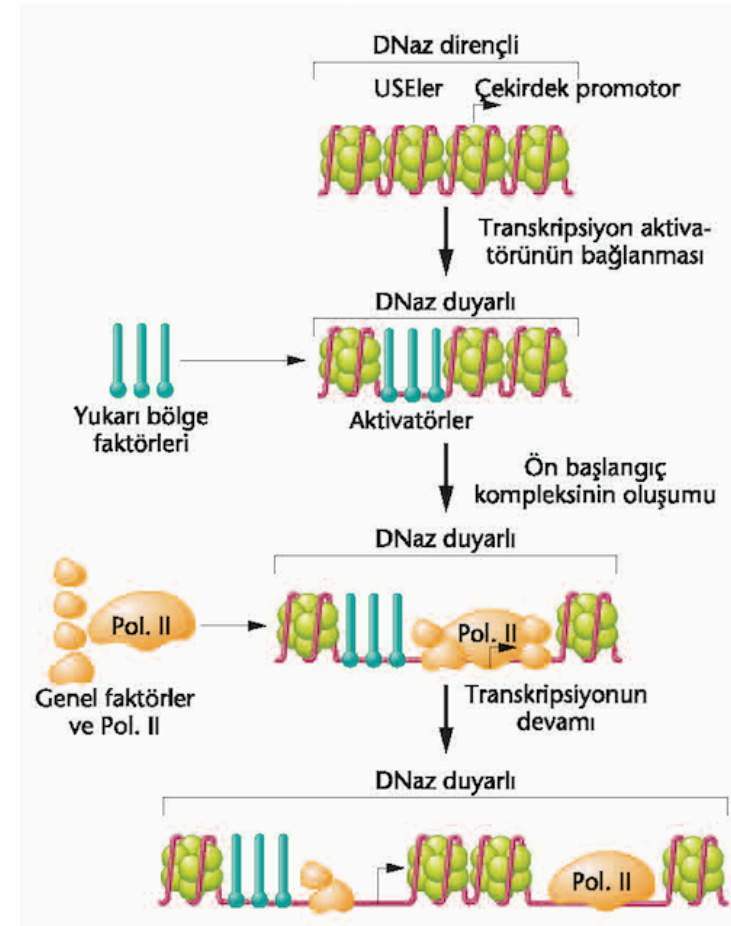
# Kromatinin yeniden şekillenmesi

- Ökromatin bölgeler ise açık kromatin yapısındadır ve DNAaz I ile parçalanmaya duyarlıdır.
- Bu bölgelerdeki genler transkripsiyona uğrar.
- Kromozom organizasyonundaki değişiklikler, kromatinin yeniden şekillenmesi (chromatin remodelling) olarak adlandırılır.



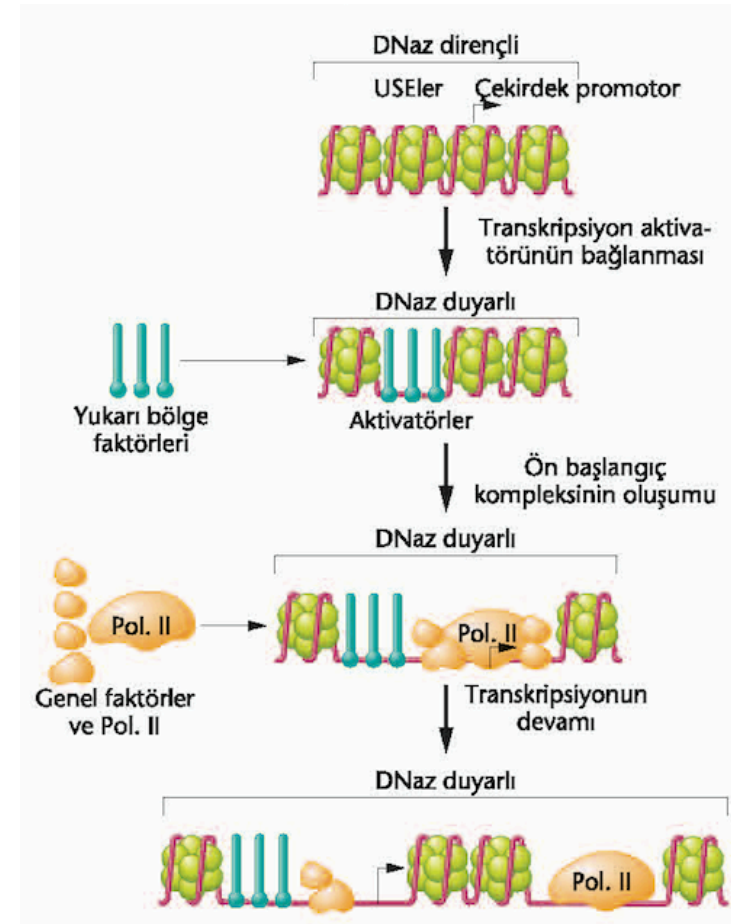
# Kromatinin yeniden şekillenmesi

- Bu olay aşağıdaki işlemler için gereklidir:
  - Polimerazın bağlanması
  - Transkripsiyonun başlaması
  - DNA replikasyonu
  - DNA tamiri
  - DNA rekombinasyonu



# Kromatinin yeniden şekillenmesi

- Kromatinin yeniden şekillenmesi tamamlandığında promotor dizileri histonlardan arınmıştır.
- Böylelikle transkripsiyonu başlatacak proteinlere açık hale gelir.



## Yeniden şekillendirme kompleksleri: SWI/SNF

- Kromatinin yeniden şekillenmesi, ATPaz aktivitesine sahip olan çeşitli protein kompleks grupları ile gerçekleşir.
- Yeniden şekillendirme komplekslerinden en iyi bilineni SWI/SNF kompleksidir.
- 11 alt birimden oluşan büyük bir kompleksdir.
- İlk defa mayalarda tanımlanmış, daha sonra insanlar da dahil diğer ökaryotlarda da yaygın olarak görülmüştür.

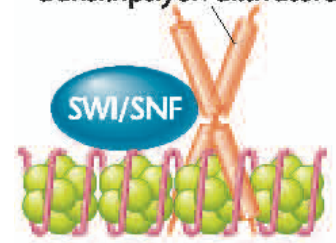
## Yeniden şekillendirme kompleksleri: SWI/SNF

- Alt birimlerden biri, DNA'ya özgöl olmayan bir şekilde bağlanmayı sağlayan bir bölge içerir.
- Diğer alt birim ise ATPaz'dır.
- Bu komplekste yer alan proteinler, transkripsiyon uyarıcıları olarak bilinmektedir.

# Nükleozom yeniden şekillendirme kompleksleri

- Yeniden şekillendirme kompleksi olan SWI/SNF, çeşitli yollarla özgül DNA bölgelerine yönlendirilir:
  - Lösin fermuar bölgeleri içeren transkripsiyon faktörleri bağlanmayı yönlendirebilir (a)
  - Asetilasyonla değişikliğe uğratılan nükleozomun histon bileşenleri SWI/SNF'nin hedefi olabilir (b).
  - Metillenmiş DNA bölgeleri de SWI/SNF için hedef bölgeler olabilir (c).

(a) Lösin fermuar transkripsiyon aktivatörü



(b)

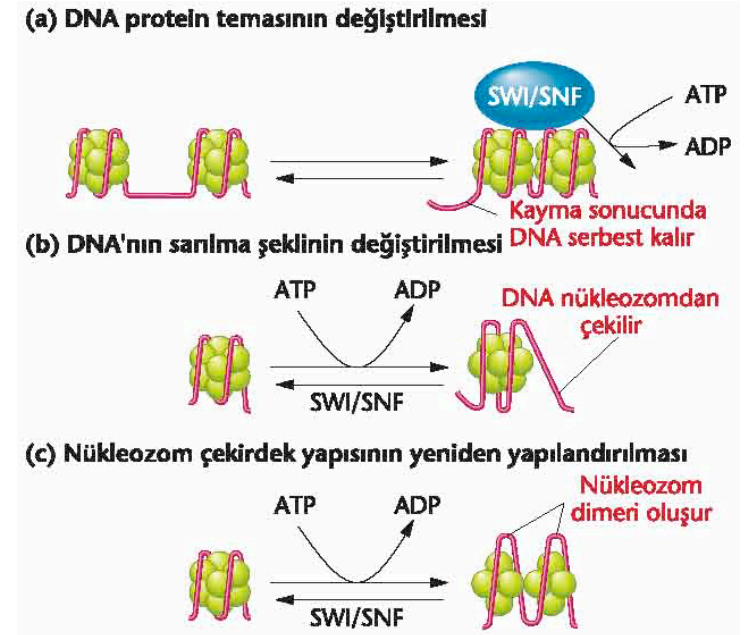


(c)



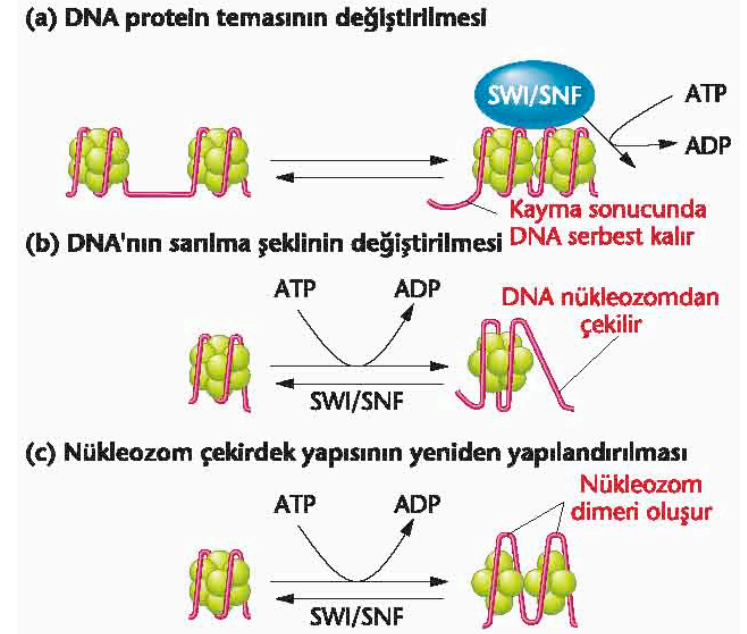
# SWI/SNF, nükleozomun yapısını nasıl değiştirir?

- Nükleozom şekillendirme kompleksleri, nükleozom yapısını çeşitli mekanizmalarla değiştirir.
- Nükleozomun DNA üzerinde aşağıya doğru kaymasına neden olur (a).



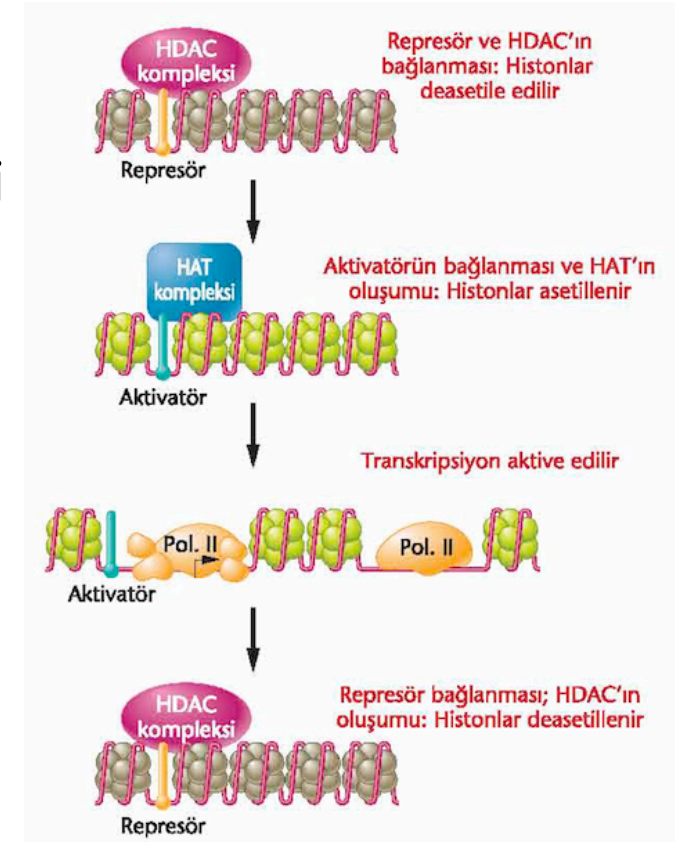
# SWI/SNF, nükleozomun yapısını nasıl değiştirir?

- Nükleozom çekirdek partikülü etrafındaki DNA'nın sarılma yolu değiştirilir (b).
- Nükleozom dimeri oluşturulacak şekilde nükleozom çekirdek yapısının kendisi değişir (c).



# Histon modifikasyonu

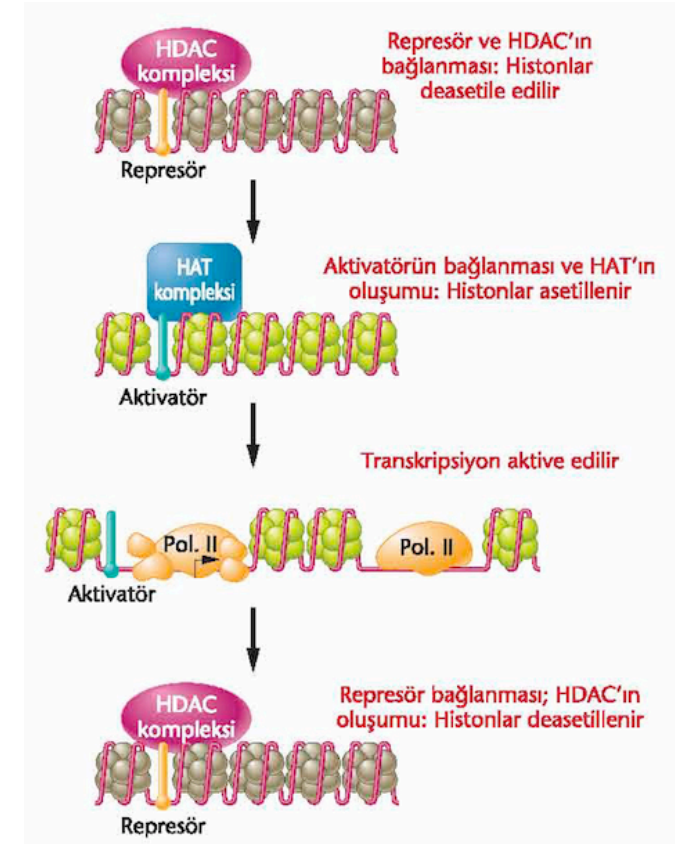
- Nükleozomlardaki histon bileşenlerinin kimyasal değişiklikleri histon asetil transferaz enzimleri (HAT) tarafından katalizlenir.
- Bu olayda, histon kuyruğundaki bazik aminoasitlere asetat grupları eklenmektedir.
- Bunun sonucunda bazik histon proteini ve asidik DNA arasındaki etkileşim gevşer.





# Histon modifikasyonu

- Bir bölge asetilasyon yoluyla açılabilirse, doğal olarak tekrar kapanabilmelidir.
- Bu durumda histon deasetilazlar (HDAC) adı verilen enzimler, asetat gruplarını histon kuyruklarından kaldırır.



# Yalıtım elementleri (insulators)

- Özgöl proteinleri bağlayan kısa DNA dizileridir.
- Yeniden şekillendirmenin komşu genlere yayılmasını önlemek için barikat görevi görürler.

# Bazal transkripsiyon kompleksinin oluşumu

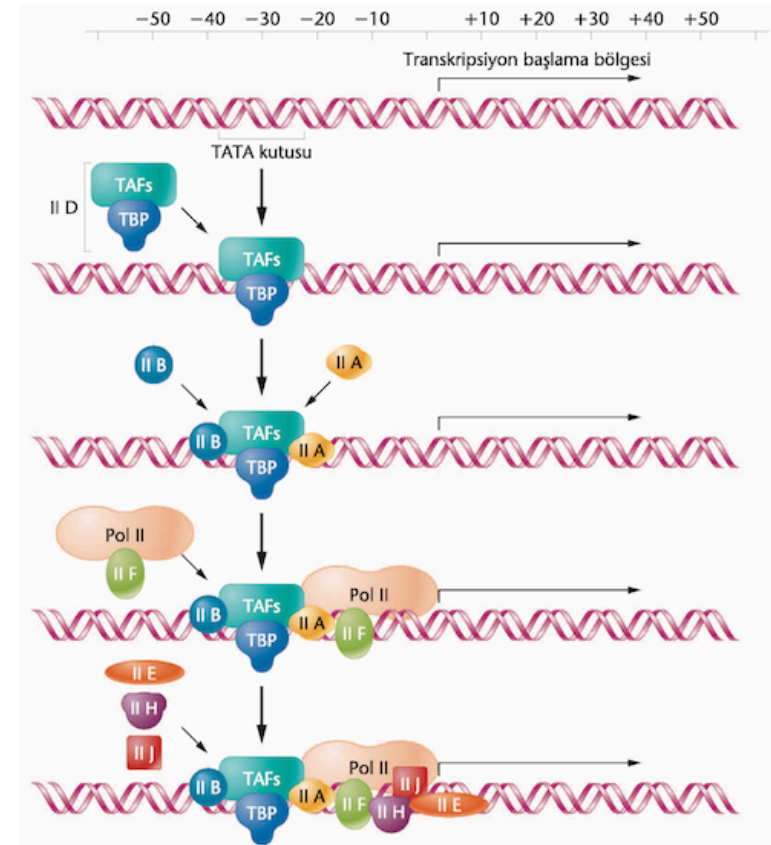
- Ökaryotlarda transkripsiyonun kontrolü için, DNA'ya bağlanan proteinler ile, promotor bölgelerinin yakınındaki DNA dizilerinin birbiri ile teması gereklidir.
- Yapılan ayrıntılı çalışmalarla genin yakın bölgesindeki regülatör diziler tanımlanmış, haritalanmış ve nükleotit dizileri belirlenmiştir.

# Transkripsiyon başlama kompleksinin oluşumu

- Bazal veya genel transkripsiyon faktörleri adı verilen bir seri protein, transkripsiyonun başlamasının kontrolü için “trans” olarak etki ederler.
- Bu proteinler, promotor üzerinde son derece özgül bir biçimde biraraya gelerek transkripsiyon ön başlama kompleksini (pre-initiation complex, PIC) oluştururlar.

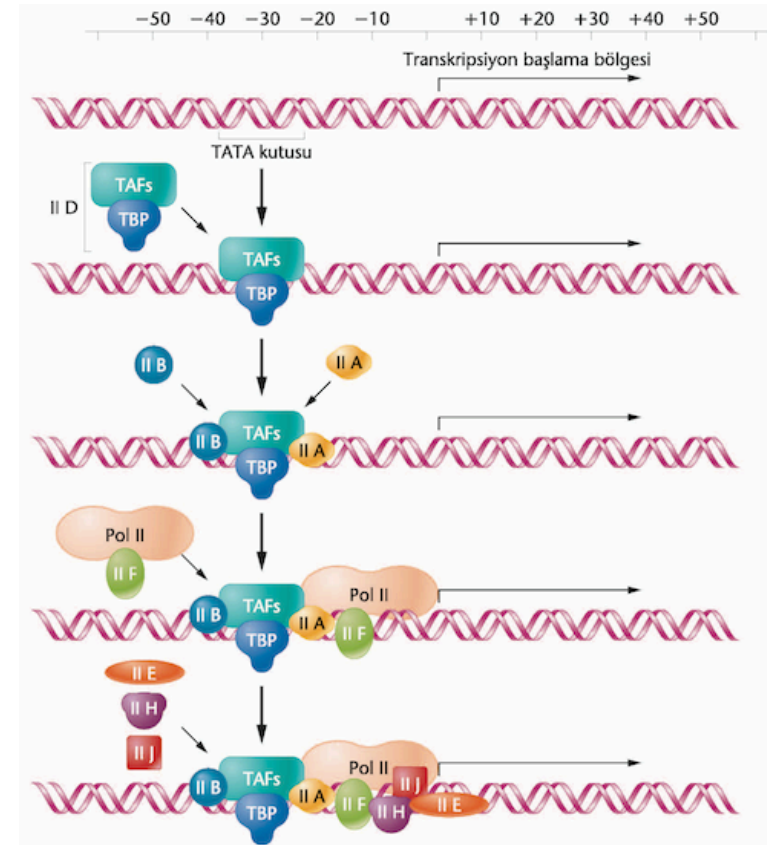
# Transkripsiyon başlama kompleksinin oluşumu

- Böylece RNA polimerazın promotoru tanımasını ve bağlanmasını sağlayacak bir platform oluşturulmuş olur.
- Transkripsiyon kompleksinin oluşumun başlatmak için TFIID adı verilen kompleks, kendi alt birimi olan TBP (TATA bağlanma proteini) ile TATA kutusuna bağlanır.



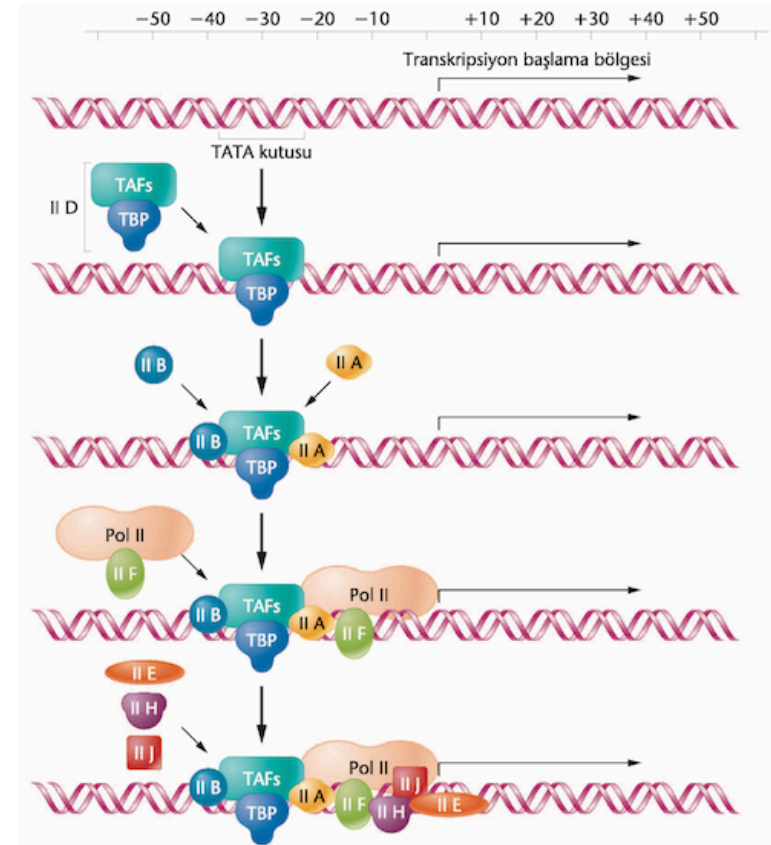
# Transkripsiyon başlama kompleksinin oluşumu

- TFIID'nin diğer bir alt birimi ise TAF'lardır (TATA asosiyе faktörleri, TATA katılım faktörleri).
- Hem TBP hem de TAF, yaklaşık 20 bç'lik bir DNA bölgesine bağlanırlar.
- Daha sonra başlama kompleksine TFIIB bağlanır.



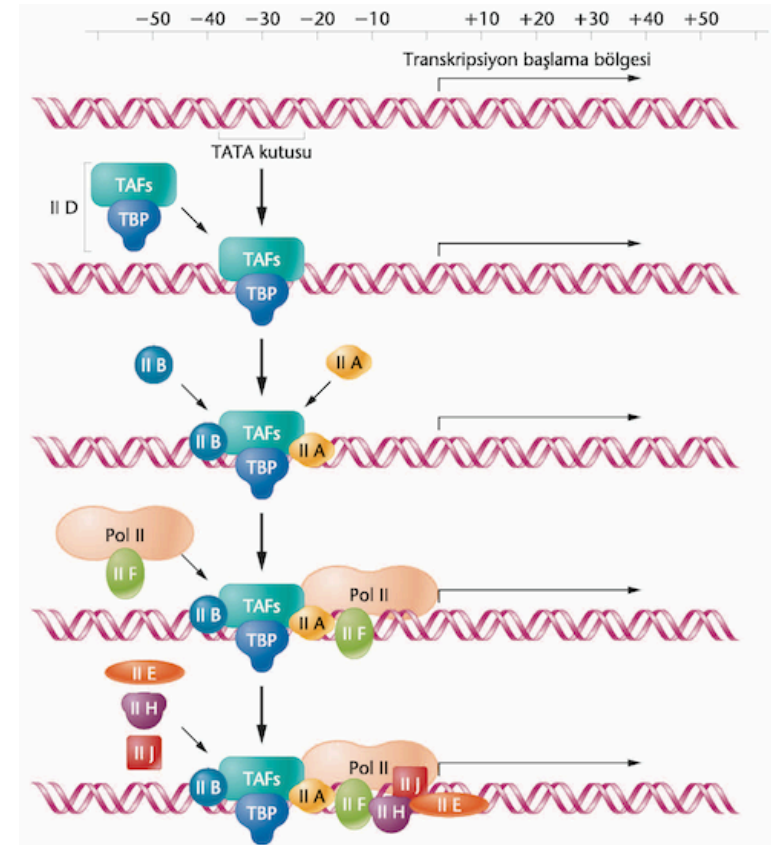
# Transkripsiyon başlama kompleksinin oluşumu

- Bu protein, TBP ve TATA kutusunun yukarısındaki DNA dizileri ile etkileşime giren bir proteindir.
- Daha sonra yapıya TFIIA, RNA polimeraz II ve TFIIF gibi ilave faktörler bağlanır.



# Transkripsiyon başlama kompleksinin oluşumu

- Bunu TFIIIE, TFIIH ve TFIIJ faktörlerinin bağlanması izler.
- Son basamakta RNA polimeraz II TATA kutusunu terk eder ve genin transkripsiyonu başlatılır.





# Pozitif/negatif faktörler

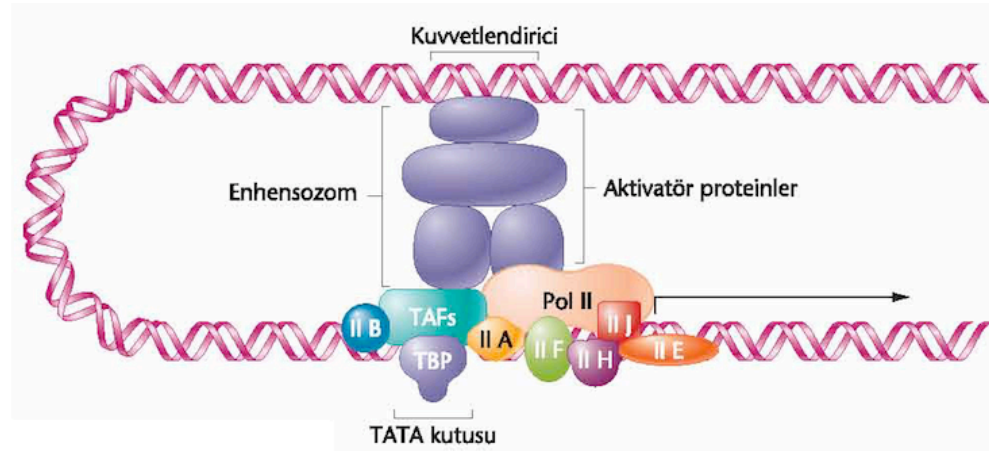
- TATA kutusuna bağlanan transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, kuvvetlendirici (enhancer) bölgelere bağlanan faktörler de vardır.
- Bu faktörler transkripsiyonun etkinliğini artırırsa pozitif faktörler olarak adlandırılırlar.
- Eğer transkripsiyonun etkinliğini azaltıyorlarsa negatif faktörler olarak bilinirler.

# Pozitif/negatif faktörler

- Bu proteinler, genin ne zaman ve nerede ifade olacağını ve transkripsiyonun oranını kontrol ederler.
- Aktivatörler, transkripsiyon oranını 100 kat artırabilir.

# Enhansozom (enhanceosome)

- Aktivatörler (pozitif faktörler) kuvvetlendirici (enhancer) dizilere bağlanarak enhansozom adı verilen kompleksleri oluştururlar.
- Enhansozom oluşuktan sonra burdaki proteinler, transkripsiyon kompleksindeki proteinlerle etkileşir.



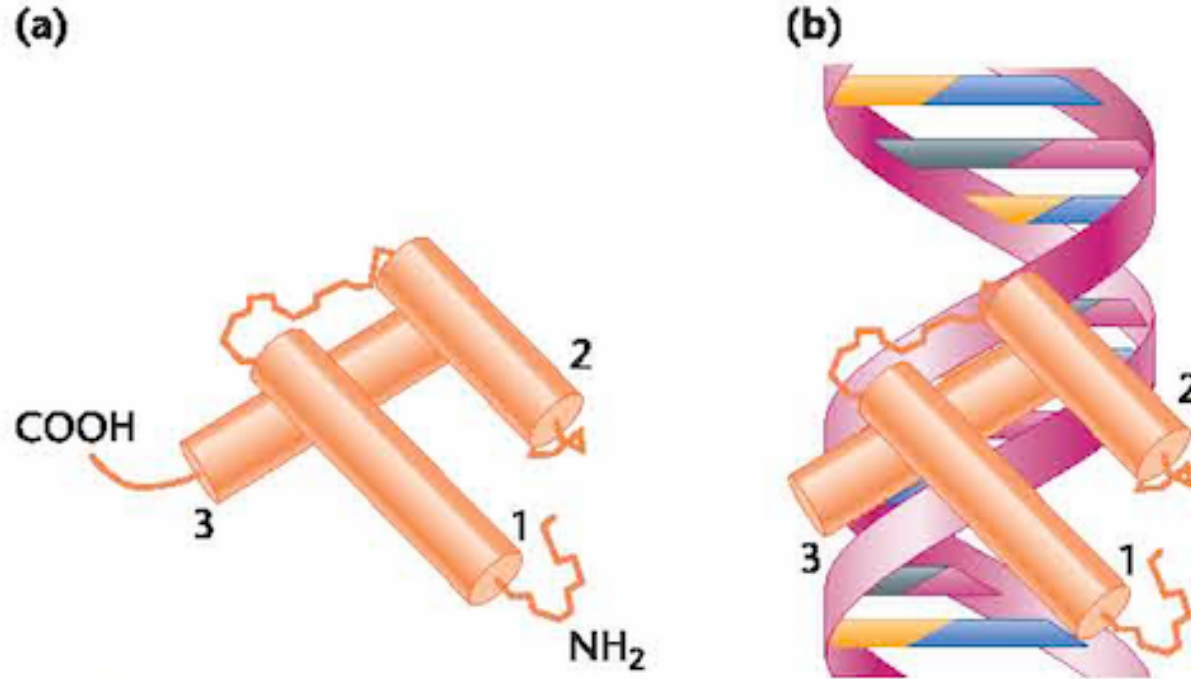
# Enhansozom (enhanceosome)

- Aktivatörlerde bu etkileşimi yapmak için iki işlevsel bölge bulunur:
  - Enhansırda bulunan DNA dizilerine bağlanan bölge (DNA bağlanma bölgesi, DNA binding domain)
  - Protein-protein etkileşimi ile transkripsiyonu aktive eden bölge (karşı aktivasyon bölgesi, trans-activation domain).

## DNA bağlanma domainlerinin çeşitleri

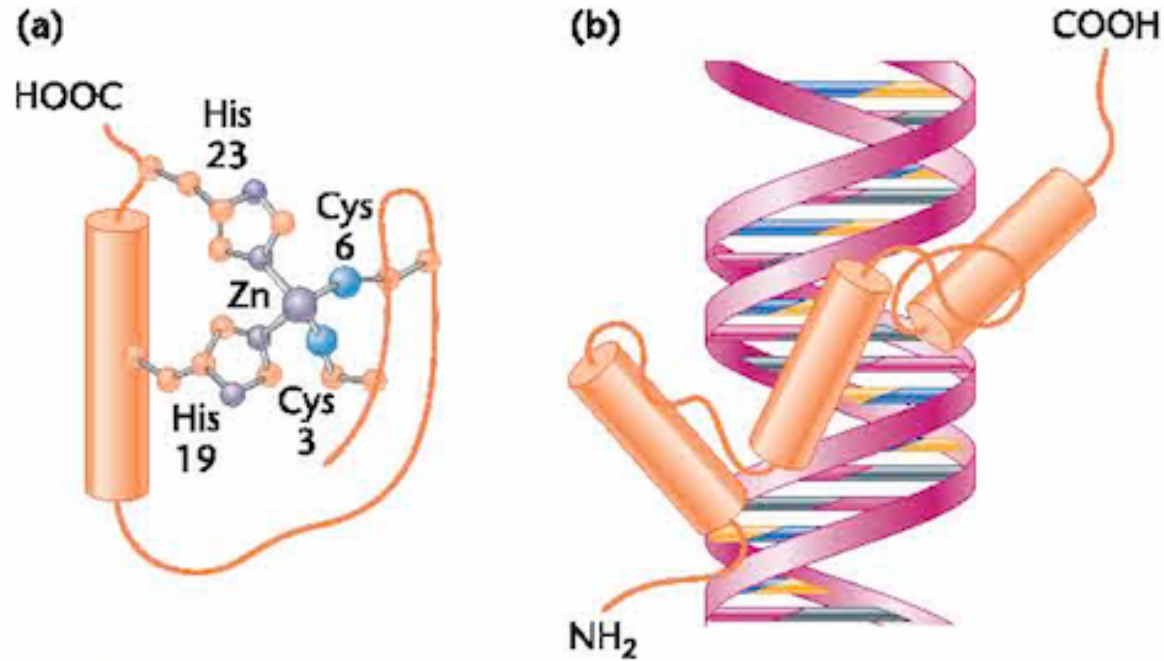
- Ökaryotlarda DNA bağlanma domainlerinin üç boyutlu özel yapısal şekilleri vardır:
  - Sarmal-dönüş-sarmal modeli (helix-turn-helix, HTH)
  - Çinko parmak modeli (zinc finger)
  - Bazik lösin fermuarı (basic leucine zipper, bZIP)

# Sarmal-dönüş-sarmal modeli (helix-turn-helix, HTH)



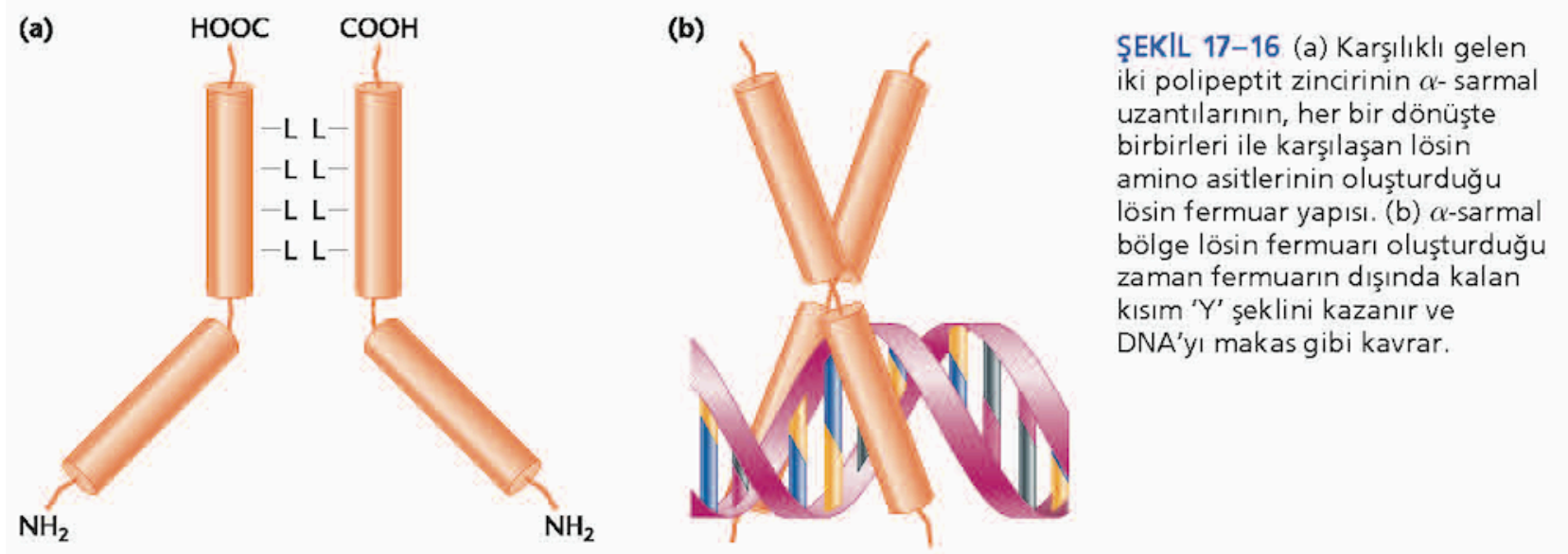
**ŞEKİL 17-14** Bir sarmal-dönüş-sarmal ya da homeodomain yapısı (a) proteinin  $\alpha$ -sarmal yapılarının oluşturduğu üç düzlem. (b) bu bölgeler DNA molekülünün oyuklarına bağlanır.

# Çinko parmak modeli (zinc finger)



**ŞEKİL 17–15** (a) Sistein ve histidin amino asitlerine  $Zn^{++}$  atomunun bağlı olduğu bir çinko parmak yapısı. (b) Bu bağlanma, amino asit zincirinin parmağa benzer bir şekilde dışa doğru halka (ilmik) oluşturmasına neden olur.

# Bazik lösin fermuarı (basic leucine zipper, bZIP)





## Mayanın gal genlerindeki pozitif uyarılma ve katabolit baskılama

- gal genleri, mayada galaktozun yıkımı için gerekli olan enzimleri şifreleyen genlerdir.
- gal genlerinin ifadesi uyarılabilir.
- Substratı olan galaktozun ortamda bulunup bulunmayışına göre düzenlenir.
- Galaktoz ortamda bulunmadığı durumda gen transkripsiyona uğramaz.

## Mayanın gal genlerindeki pozitif uyarılma ve katabolit baskılama

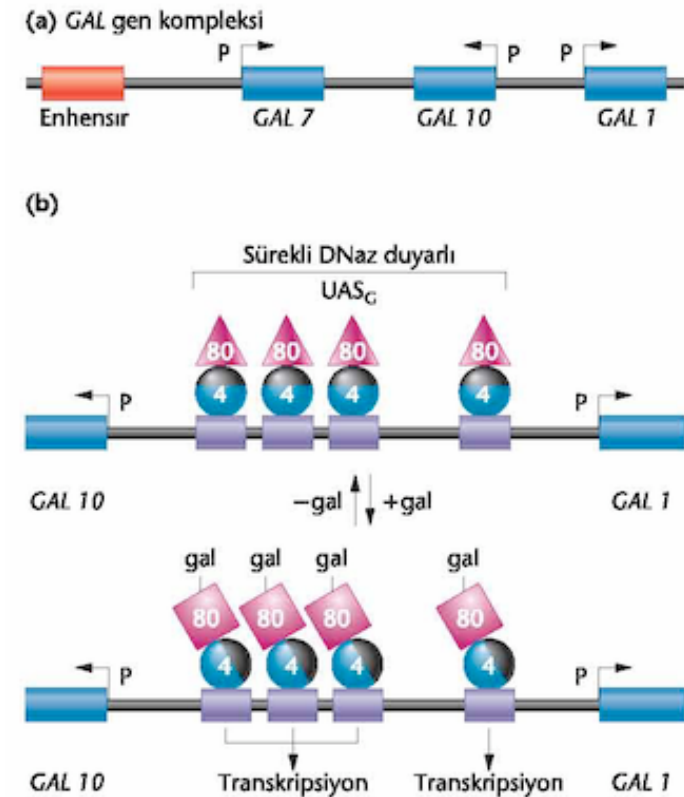
- Eğer ortama galaktoz ilave edilirse transkripsiyon hemen başlar ve sentezlenen mRNA miktarı 1000 kat artar.
- gal genleri, ikinci bir kontrol sisteminin, yani katabolit represyonunun kontrolü altındadır.
- gal genlerinin regülatörü olan GAL4'teki bir mutasyon, aktivasyonu önler.

# Mayanın gal genlerindeki pozitif uyarılma ve katabolit baskılama

- GAL4 reseptörünün varlığında gen transkripsiyona uğramaktadır.
- Şimdi GAL1 ve GAL10 adlı genlerin nasıl regüle edildiğini inceleyeceğiz.

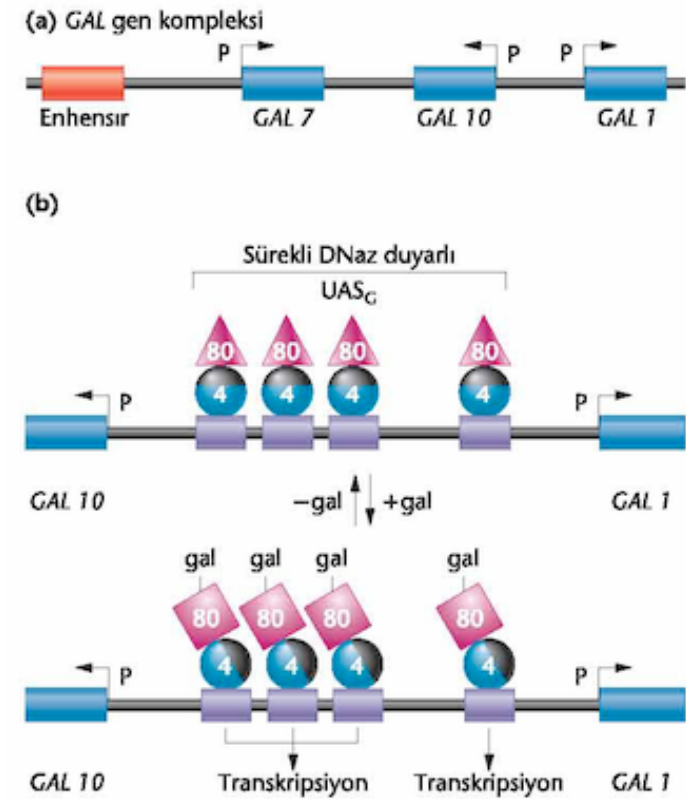
# GAL1 ve GAL10 genlerinin regülasyonu

- Bu iki genin transkripsiyonu, UAS<sub>G</sub> (upstream activating sequence, yukarı bölge aktive edici dizi) adı verilen 170 bç'lik bir kontrol bölgesi tarafından denetlenir.
- UAS'nin kromatin yapısı açıktır.



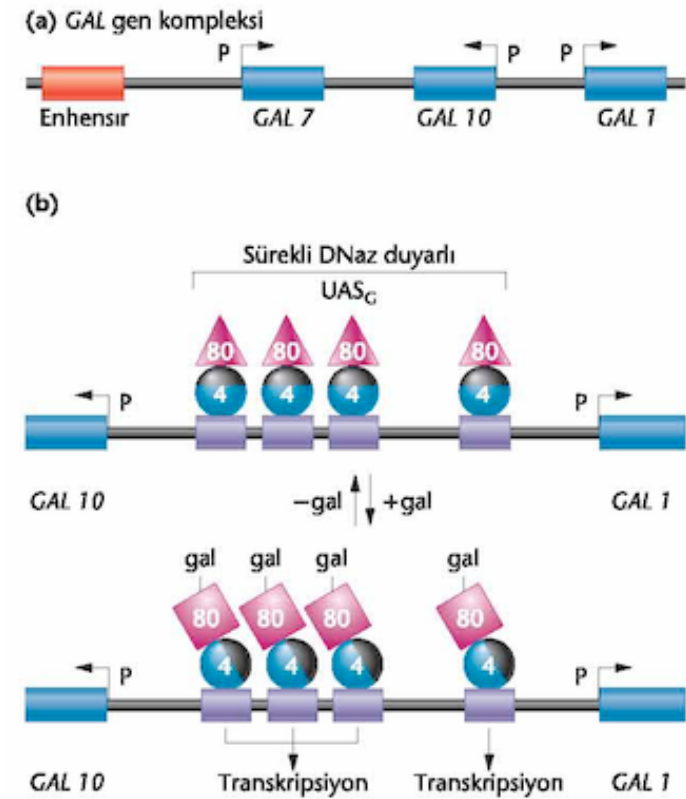
# GAL1 ve GAL10 genlerinin regülasyonu

- UAS içinde Gal4 proteini (Gal4p) için dört adet bağlanma bölgesi vardır.
- gal genleri aktive olsun ya da olmasın, Gal4p, diğer bir gal geni regülatörü olan Gal80p tarafından negatif olarak kontrol edilir.



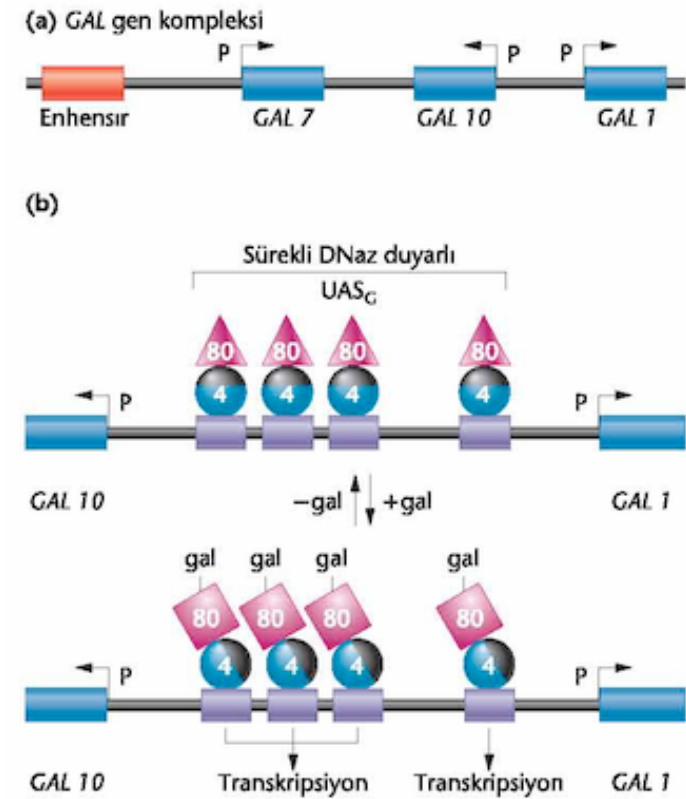
# GAL1 ve GAL10 genlerinin regülasyonu

- Yandaki şekilde koyu boyanan bölgeler Gal4p'nin aktif bölgeleridir.
- Ortamda galaktoz varken Gal4p'nin aktif bölgeleri açığa çıkar ve böylece uyarılma meydana gelir.



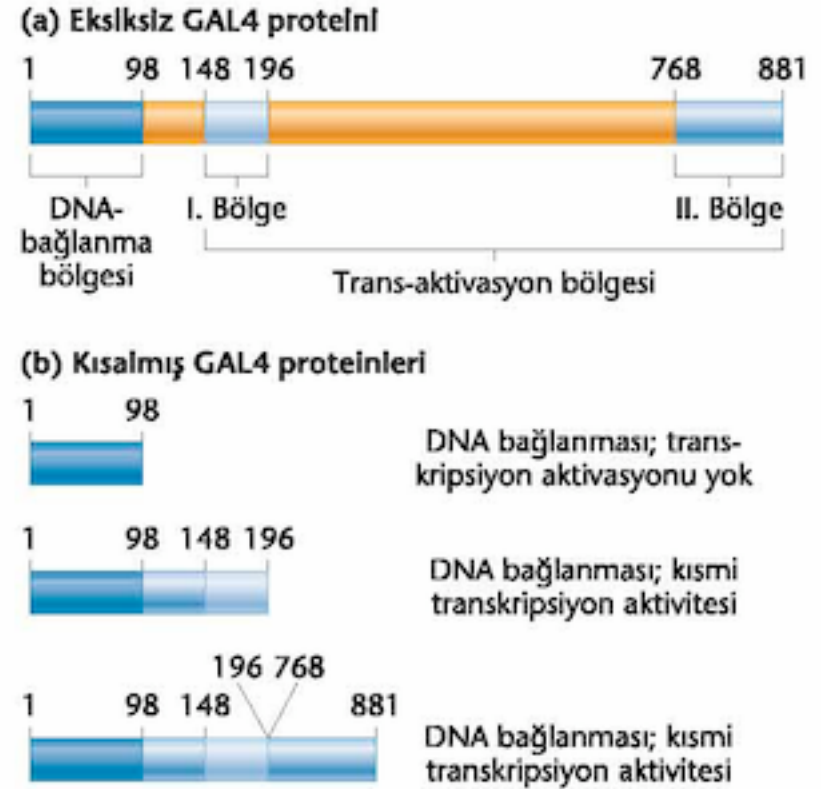
# GAL1 ve GAL10 genlerinin regülasyonu

- Ortamda galaktoz yokken Gal80p, Gal4p'nin aktif bölgelerini kapatacak şekilde bağlanır.
- Böylelikle Gal4p, GAL1 ve GAL10 genlerinin aktivasyonunu sağlayarak galaktozun metabolize edilmesini gerçekleştirir.



# Gal4 proteininin moleküler yapısı

- Gal4p'nin üç bölgesi vardır:
  - 1-98 veya 1-147 arası aminoasitler  $UAS_G$ 'deki DNA tanıma bölgesine bağlanırlar.
  - 148-196 ve 768-881 arasındaki aminoasitler transkripsiyonel aktivite için gereklidir.
  - 851-881 arasındaki aminoasitler Gal80p'nin bağlanması için gereklidir.





# DNA metillenmesi

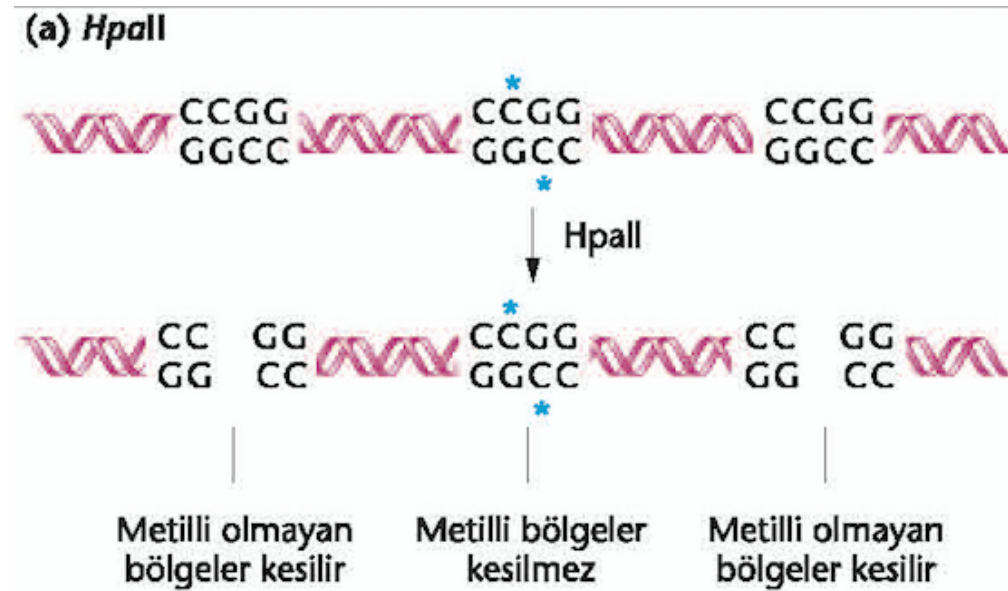
- Replikasyon sonrasında pekçok ökaryotik organizmanın DNA'sı metillenir.
- Bu işlem sırasında enzimler aracılığıyla bazlara ve şekerlere metil grupları eklenir.
- Metillemede genellikle sitozinlere metil grupları eklenir.
- Herhangi bir ökaryotik organizmanın genomundaki sitozinlerin yaklaşık % 5'i metillenmiştir.

# DNA metillenmesi

- Ancak metillenme derecesi dokuya özgüdür ve % 2-7 arasında değişiklik gösterir.
- Metillenme, sitozin bazının 5. pozisyonunda olur.
- Böylece metil grubu DNA sarmalının büyük oluğunda çıkıntı yapar ve proteinlerin DNA'ya bağlanmasını engeller.
- Metillenme, genellikle CG çiftleri halindeki sizotinlerde ve her iki zincirde birden gerçekleştirilir.

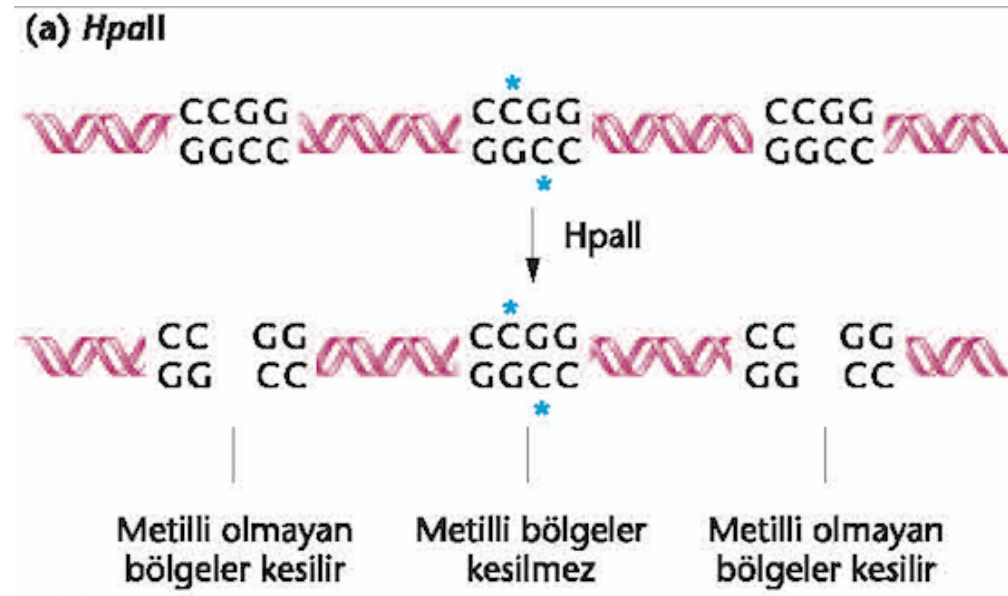
# Zincirin metilli olup olmadığının anlaşılması

- DNA'nın metilli olup olmadığı restriksiyon enzim analizi ile saptanabilir.



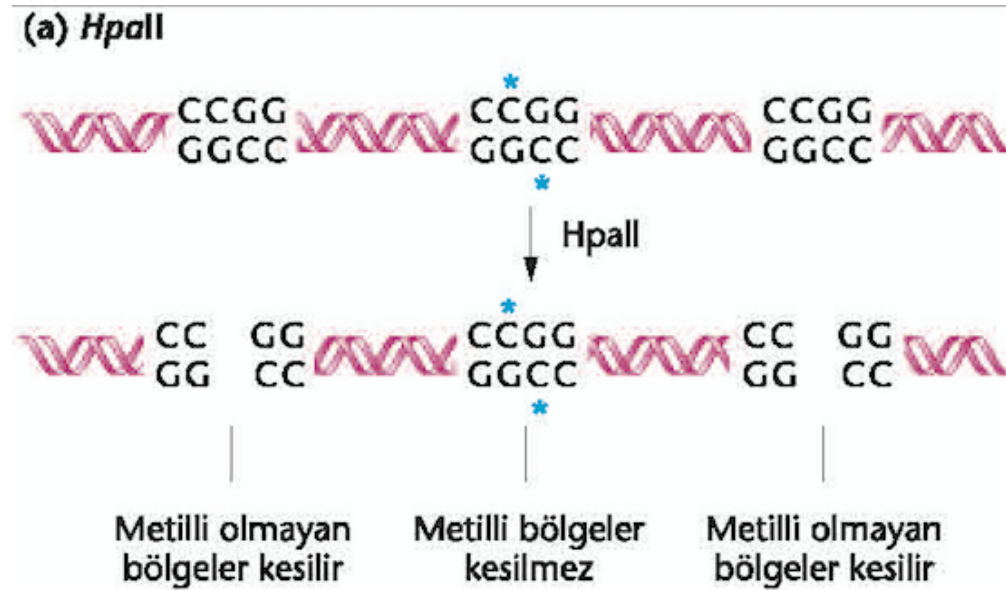
# Zincirin metilli olup olmadığının anlaşılması

- Restriksiyon enzimi HpaII'nin DNA'yı tanıma ve kesme dizisi CCGG'dir.



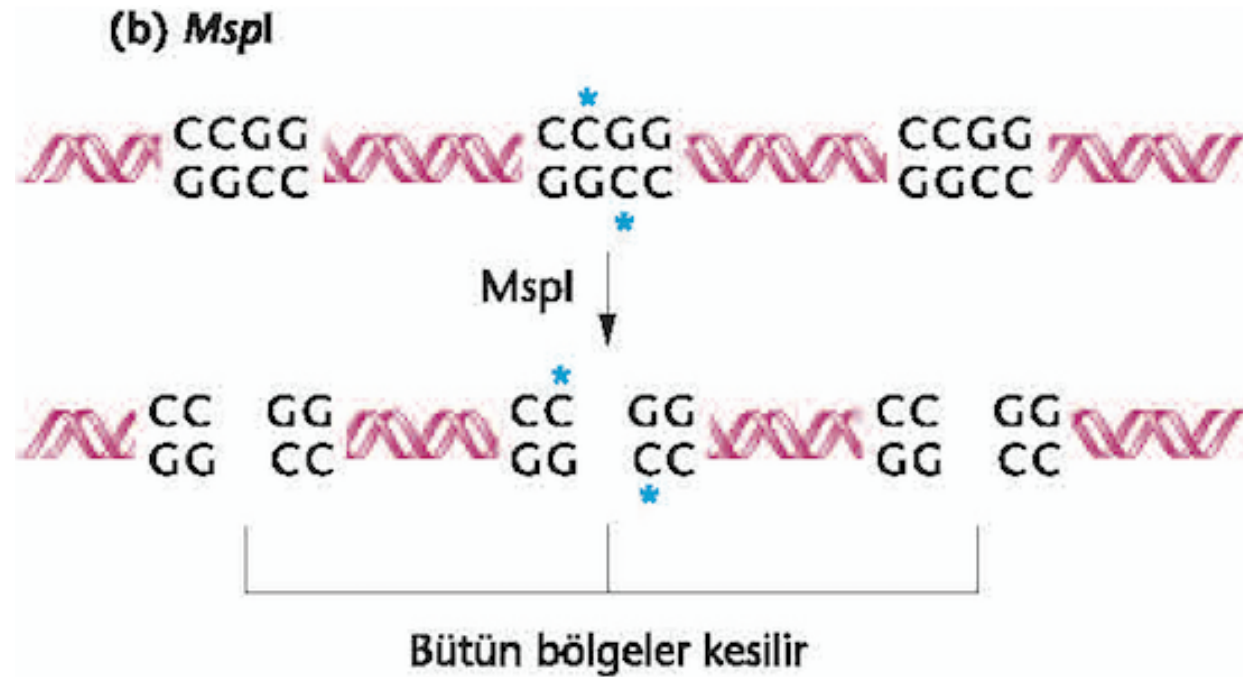
# Zincirin metilli olup olmadığının anlaşılması

- Ancak ikinci sitozin metillenmişse DNA'yı kesemeyecektir.



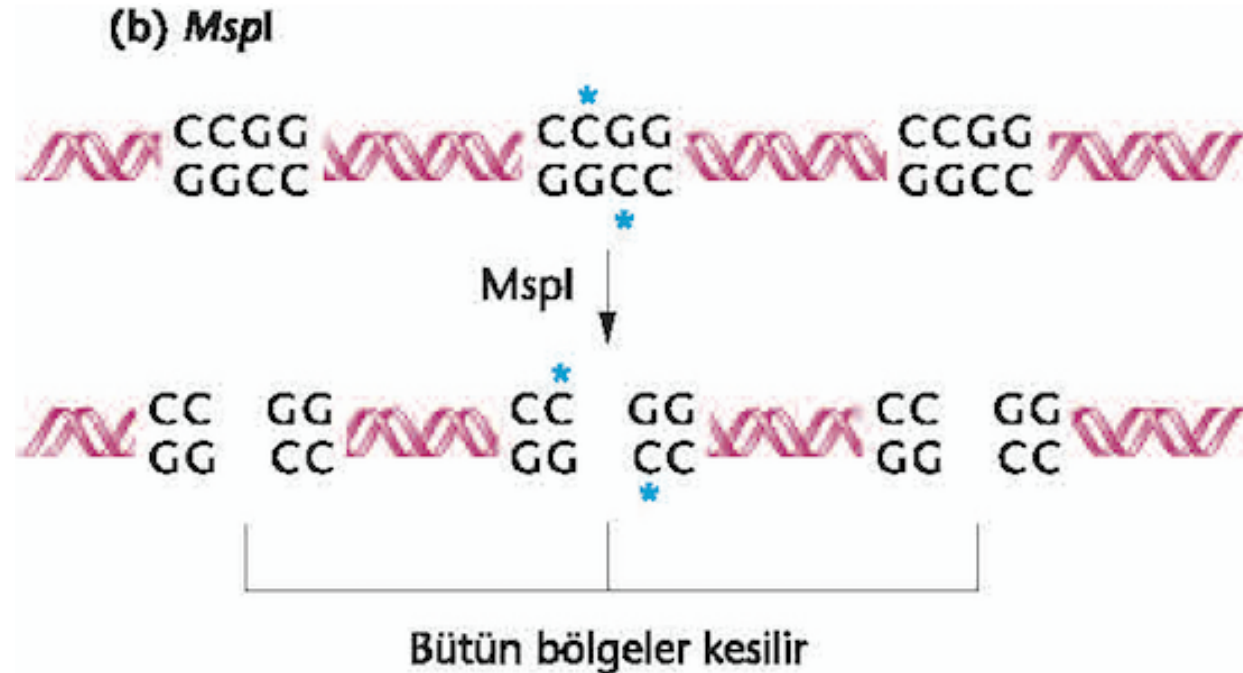
# Zincirin metilli olup olmadığının anlaşılması

- Diğer bir restriksiyon enzimi olan MspI de aynı CCGG dizisini tanır.



# Zincirin metilli olup olmadığının anlaşılması

- Ancak bu enzim, ikinci sitozin metilli olsun ya da olmasın kesim yapabilir.



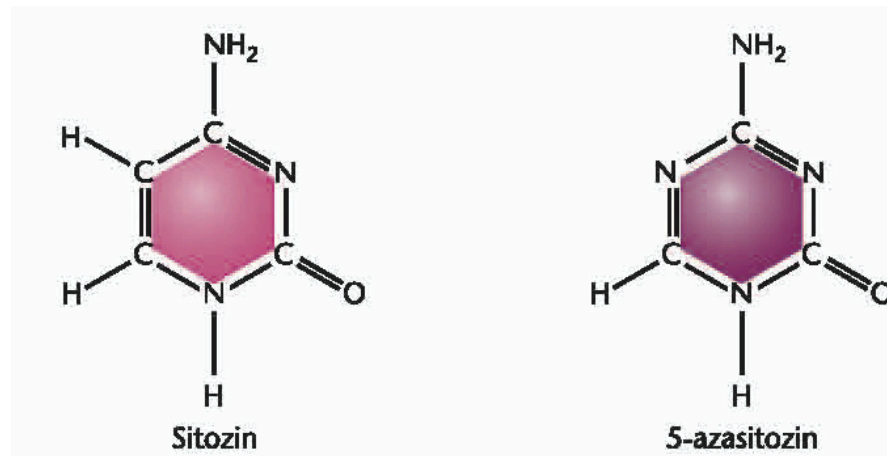
# Metillenme ile gen ifadesi arasındaki ilişki

- Bir genin metillenmesi ile ifadesi arasında ters bir ilişki vardır.
- Yani düşük derecede metillenme, yüksek oranda gen ifadesi anlamına gelmektedir.
- Memelilerdeki inaktif X kromozomu, aktif olan X'ten daha yüksek metillenme derecesine sahiptir.
- Metillenme dokuya özgüdür ve bir kere gerçekleşince o dokunun bütün hücrelerine aktarılır.



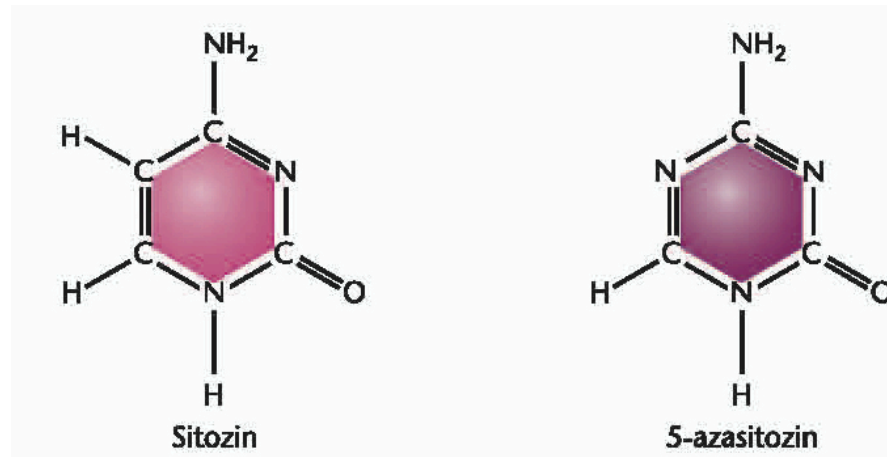
# 5-azasitidin nükleotiti

- Bir baz analogu olan 5-azasitidin, DNA'da sitozinin yerine girer.
- Bu molekül kimyasal olarak metillenmediği için girdiği bölgelerde metillenme derecesi düşer.



# 5-azasitidin nükleotiti

- Bu molekülün DNA'ya aktarılması gen ifadesini değiştirir.
- Bu olay, inaktif X kromozomu üzerindeki allellerin ifadesini uyarabilir.



# Orak hücre anemisinin tedavisi

- Orak hücre anemisinin tedavisinde klinik denemelerde 5-azasitidin kullanılmaktadır.
- Embriyogenez sırasında  $\epsilon$ - ve  $\gamma^G$ -globin genleri ifade olur.
- Fakat doğumdan hemen sonra  $\beta$ -globin sentezinin başlaması ile birlikte bu genler inaktif duruma geçer.
- Hasta bireylerde  $\beta$ -globin geni mutanttır.

# Orak h¼cre anemisinin tedavisi

- Bu bireylerde 5-azasitidin tedavisi ile  $\epsilon$ -globin ve  $\gamma^g$ -globin genlerindeki metillenme oranı d¼ř¼r¼l¼r.
- B¼ylelikle embriyonik ve f¼tal genlerin yeniden ifadesi sağlanır.

# Transkripsiyon sonrası regülasyon

- Pekçok organizmada görülen bir kontrol mekanizmasıdır.
- Ökaryotik hücrelerin çekirdeklerinde sentezlenen RNA molekülleri, translasyon öncesinde bazı değişikliklere uğrar.
- Intron dizileri çıkarılırken, kalan ekzonlar birleştirilir.
- mRNA'nın 5' ucuna bir kep (şapka) ve 3' ucuna poliA kuyruğu takılır.
- Daha sonra bu olgun mesaj sitoplazmaya geçirilir.
- Bu basamakların her biri birer regülasyon basamağıdır.

# mRNA'nın seçenekli sıplays yolları

- Seçenekli sıplays (alternative splicing) ile tek bir öncül mRNA molekülünden farklı formlarda pek çok olgun mRNA oluşması sağlanır.
- Böylece tek bir genin ifadesi ile, benzer ya da farklı işlevleri olan bir protein ailesi meydana gelir.

# mRNA'nın seçenekli sıplays yolları

- Küçük değişiklikler;
  - Enzimatik aktiviteyi
  - Reseptör bağlama kapasitesini
  - Hücre içinde proteinin yerleşimini değiştirebilir.

# mRNA'nın seçenekli sıplays yolları

- Sıplays kalıbındaki değişiklikler ayrıca aşağıdaki süreçlerde son derece önemlidir:
  - Gelişim
  - Apoptozis
  - Sinir sisteminde hücreler arası bağlantılar



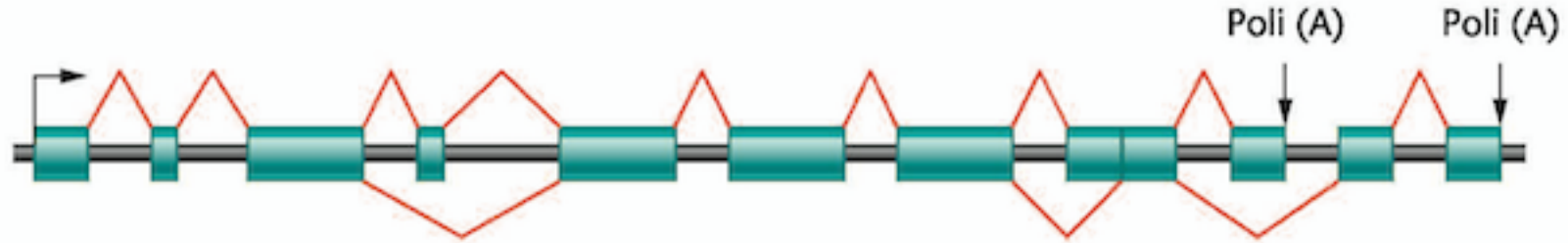
# mRNA'nın seçenekli sıplays yolları

- Sıplaysın doğru yapılmasını etkileyen mutasyonlar birçok genetik hastalığın temelini teşkil eder.
- Seçenekli sıplays, her bir genden meydana gelen protein sayısını artırır.
- Dolayısıyla hücrenin yapabildiği protein sayısı, genomundaki genlerin sayısı ile doğrudan bağlantılı değildir.

# mRNA'nın seçenekli sıplays yolları

- Protein eşitliliği gen sayısına göre önemli oranda fazladır.
- İnsan genomundaki genlerin yaklaşık % 30-60 kadarının seçenekli sıplays yolunu kullandığı tahmin edilmektedir.
- Böylece insan genomundaki 25.000-30.000 genden yüzbinlerce farklı protein oluşabilmektedir.

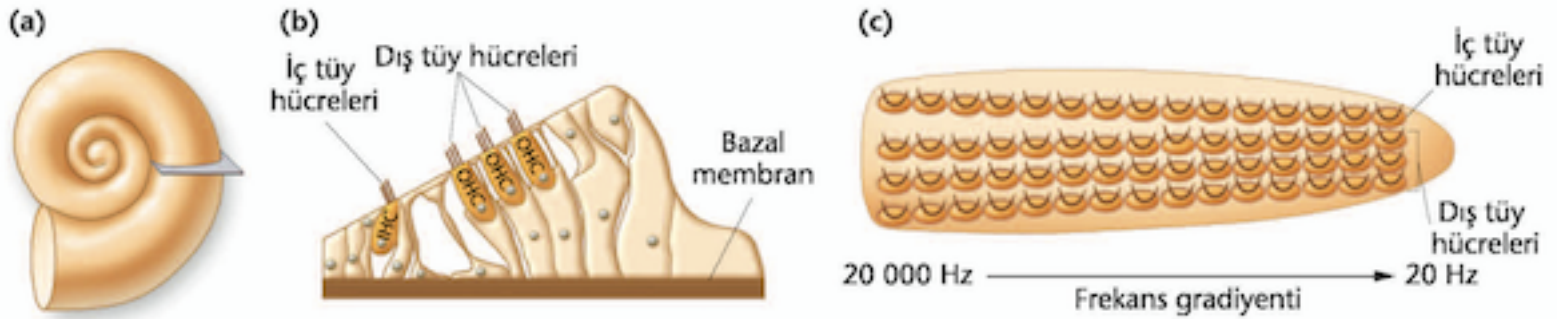
# mRNA'nın seçenekli sıplays yolları



**ŞEKİL 17–21** Ökaryotik mRNA'da seçenekli sıplays şekilleri. Ekzonlar silindir şeklinde gösterilmiştir. Normal sıplays şekli ekzonların üstünde, seçenekli sıplays şekilleri ekzonların altında gösterilmektedir. Seçenekli sıplays ile yeni poli (A) bölgesi ve ekzonların eklenebildiğine dikkat edin. Seçenekli sıplays bölgeleri sıklıkla tek bir kopyadan pek çok farklı mRNA'ların oluşmasına neden olacak şekilde çoklu kombinasyonlar halinde kullanılır.

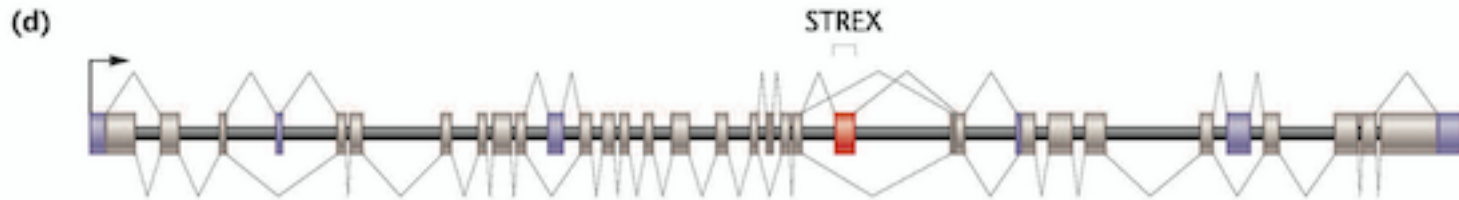
# Kohlea tüy hücreleri ve işitme

- Kulaklarımız, çevremizdeki sesleri işitmek için binlerce frekans aralığındaki ses dalgalarını algılar.
- İç kulaktaki kohlea'nın bazal membranında dört sıra tüy hücresi bulunur.



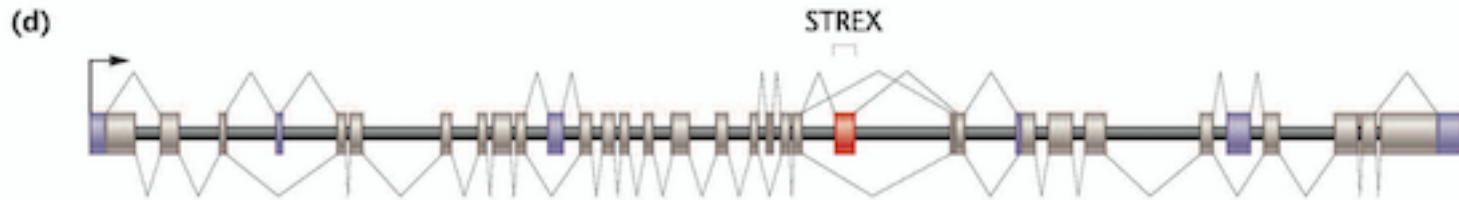
# Kohlea tüy hücreleri ve işitme

- Her hücre, farklı ve dar bir frekans aralığındaki seslere yanıt verir.
- SLO adlı genden elde edilen öncül mRNA'nın seçenekli sıplaysı ile tüylü hücrelerinin farklı frekansları almak üzere ayarlanması kontrol edilir.



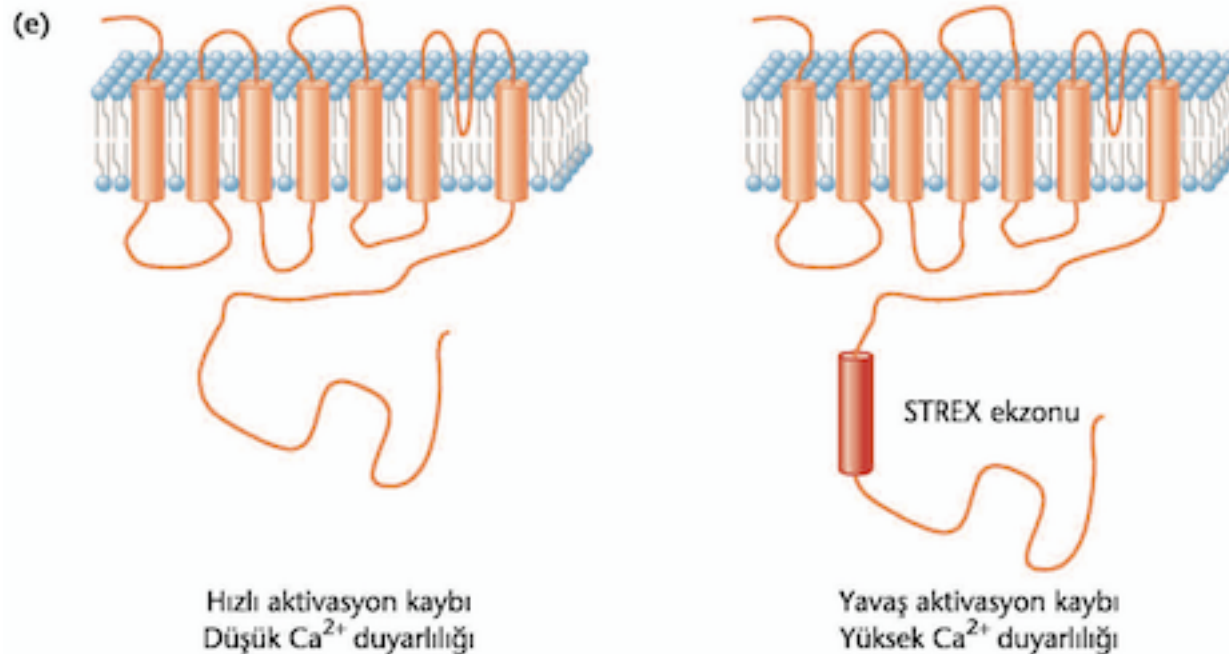
# Kohlea tüy hücreleri ve işitme

- SLO'dan elde edilen öncül mRNA'da en az sekiz seçenekli sıplays noktası vardır.
- Bu mRNA'daki seçenekli sıplays kombinasyonları ile 500'den fazla farklı mRNA oluşabilir.



# Kohlea tüy hücreleri ve işitme

- SLO proteinlerinin bazı şekilleri, çok geniş bir frekans aralığındaki sesleri işitmemizi sağlar.



## Aynı öncül mRNA'dan kaç farklı polipeptit üretilebilir?

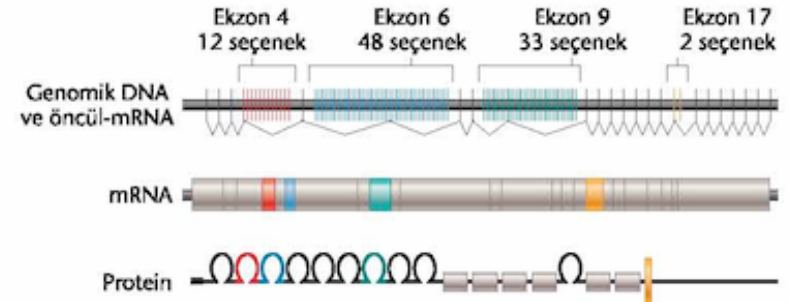
- Bu sorunun cevabı *Drosophila*'daki bir gen ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir.
- Sinir sistemi hücreleri gelişim sırasında birbiri ile doğru bir şekilde temas kurmalıdır.
- *Drosophila*'da bulunan Dscam geni, akson gelişimini yönlendiren, nöronların birbiri ile doğru bağlantı kurmasını sağlayan bir proteini şifreler.



# Aynı öncül mRNA'dan kaç farklı polipeptit üretilebilir?

## ■ Dscam öncül mRNA'sındaki;

- Ekzon 4 için 12 seçenek
- Ekzon 6 için 48 seçenek
- Ekzon 9 için 33 seçenek
- Ekzon 17 için 2 seçenek bulunmaktadır.



- Eğer bu seçeneklerin tümü kullanılırsa Dscam geni 38.016 farklı protein oluşturur.

# 'para' geni

- *Drosophila*'ya ait diğer bir uç örnektir.
- Bu gende 13 tane seçenekli ekzon vardır.
- Ayrıca bu yapı, 11 noktada editing (düzeltme) adı verilen transkripsiyon sonrası modifikasyona uğrar.
- Bu işlem transkripsiyondan ve sıplaystan sonra yapılan baz değişimini içermektedir.
- Bu iki işlem birlikte düşünöldüğünde 'para' geninden 1 milyondan fazla farklı transkript oluşturulabilir.

# 'para' geni

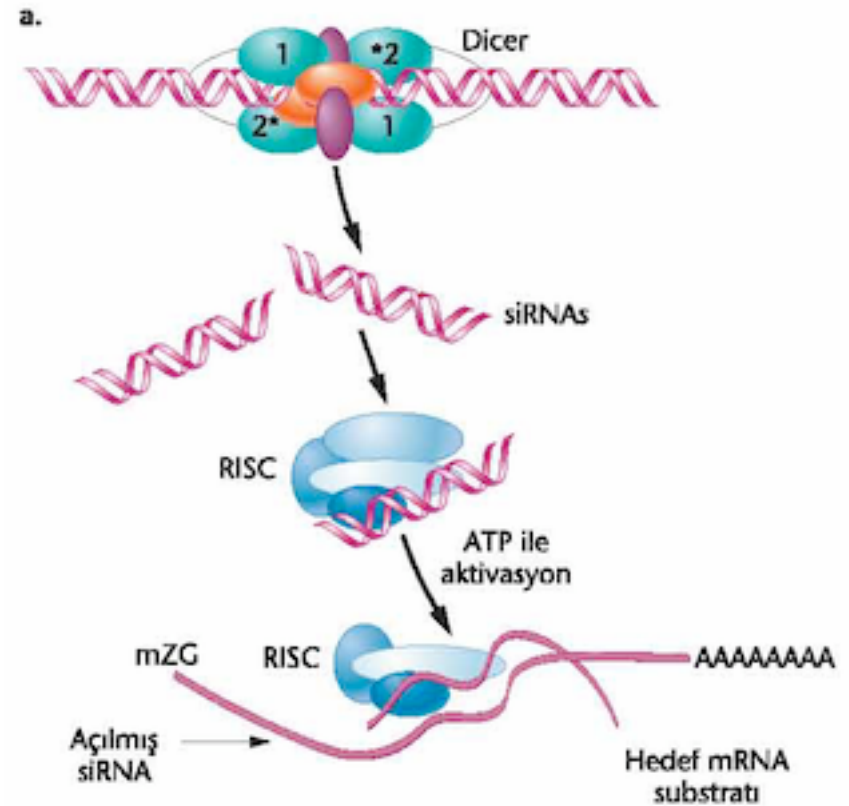
- *Drosophila* genomunda yaklaşık 13.000 gen bulunmaktadır.
- Ancak Dscam geninin tek başına 2.5 kat daha fazla protein oluşturabileceği görülmektedir.

# RNA sessizleştirmesi

- Bitkilerde keşfedilen 21 nükleotit uzunluğunda kısa RNA molekülleri, sitoplazmadaki mRNA'nın transkripsiyonunu baskılamaktadır.
- Bu yolla sitoplazmik mRNA'nın yıkımını sağlamakta ve gen ifadesini düzenlemektedirler.
- Son zamanlarda, çekirdekte de buna benzer RNA'ların kromatin yapısını değiştirdikleri ve gen sessizleştirmesini sağladıkları gösterilmiştir.

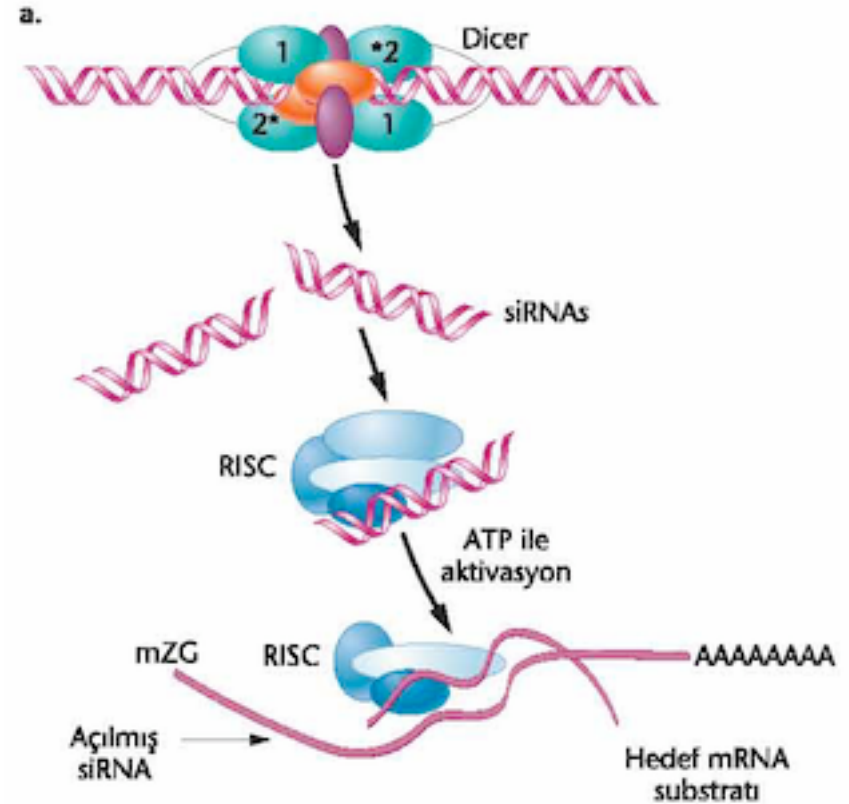
# RNA müdahalesi (RNA interference) (siRNA)

- En iyi çalışılan RNA sessizleştirme çeşididir.
- Bu süreçte Dicer adı verilen ve RNAaz aktivitesi olan bir protein büyük rol oynar.



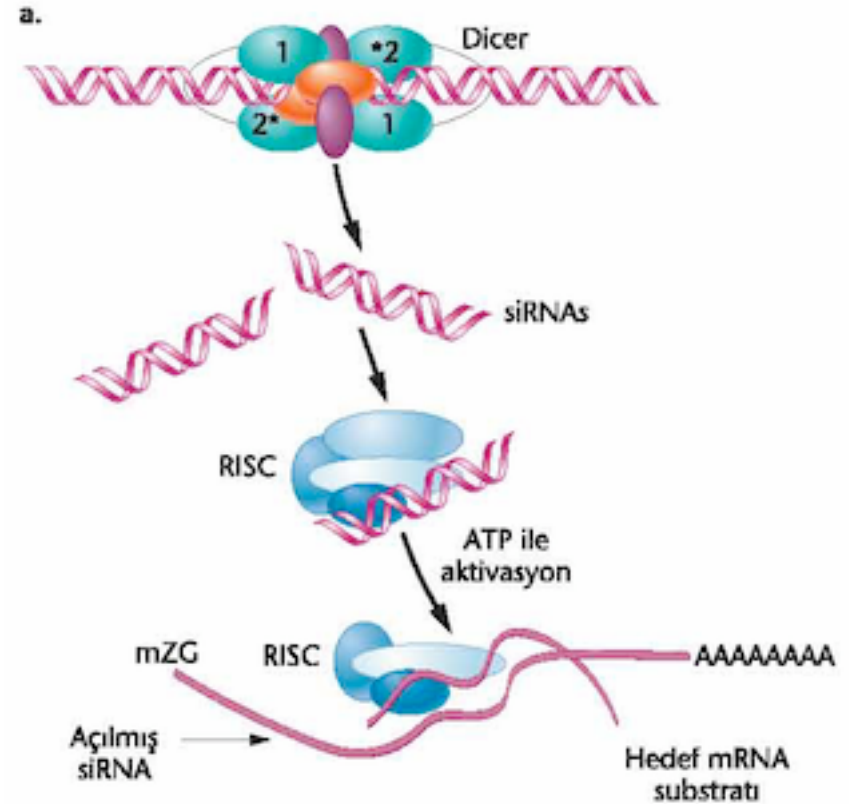
# RNA müdahalesi (RNA interference) (siRNA)

- Dicer, çift zincirli RNA moleküllerine bağlanır.
- Onları, siRNA'lar adı verilen 21 nükleotitlik moleküllere parçalar.



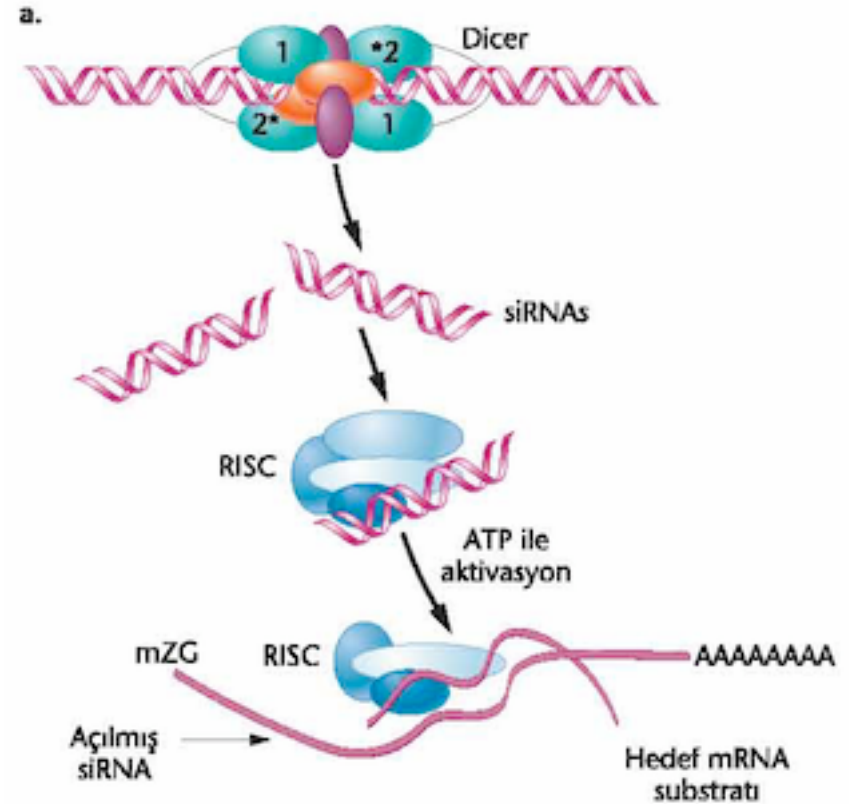
# RNA müdahalesi (RNA interference) (siRNA)

- Oluşan bu siRNA'lar, RISC kompleksleri tarafından tek zincirli RNA molekülleri haline dönüştürülürler.



# RNA müdahalesi (RNA interference) (siRNA)

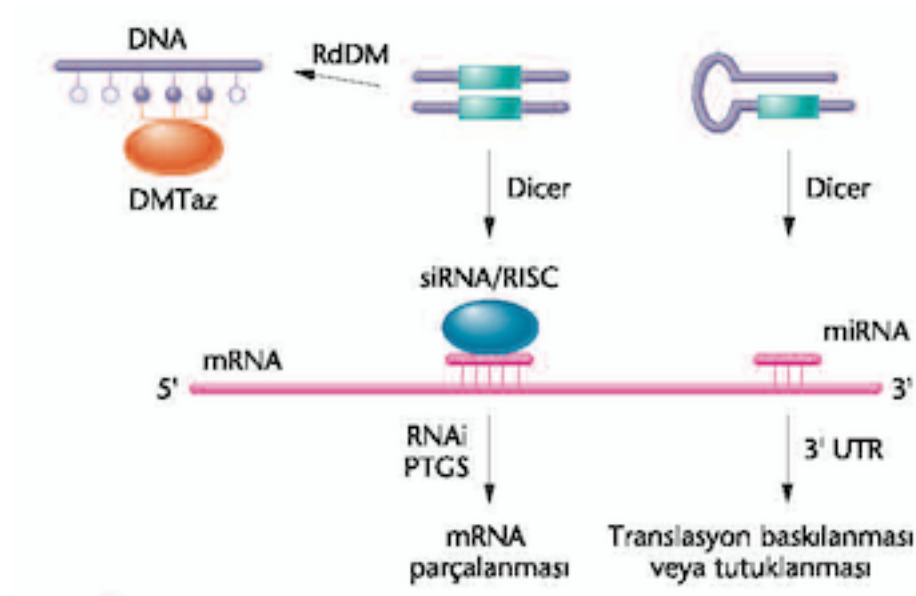
- Oluşan bu tek zincirli yapılar, mRNA'daki komplementer dizilere bağlanarak, onları, parçalanmak üzere hedef haline getirir.





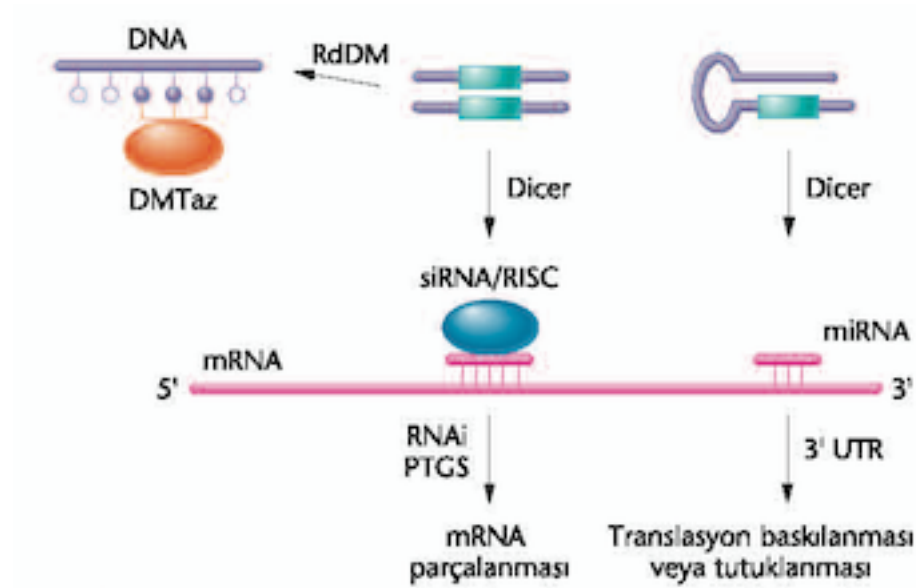
# MikroRNA (miRNA)

- Dicer aracılığıyla gerçekleştirilen bir başka sessizleştirme yöntemidir.



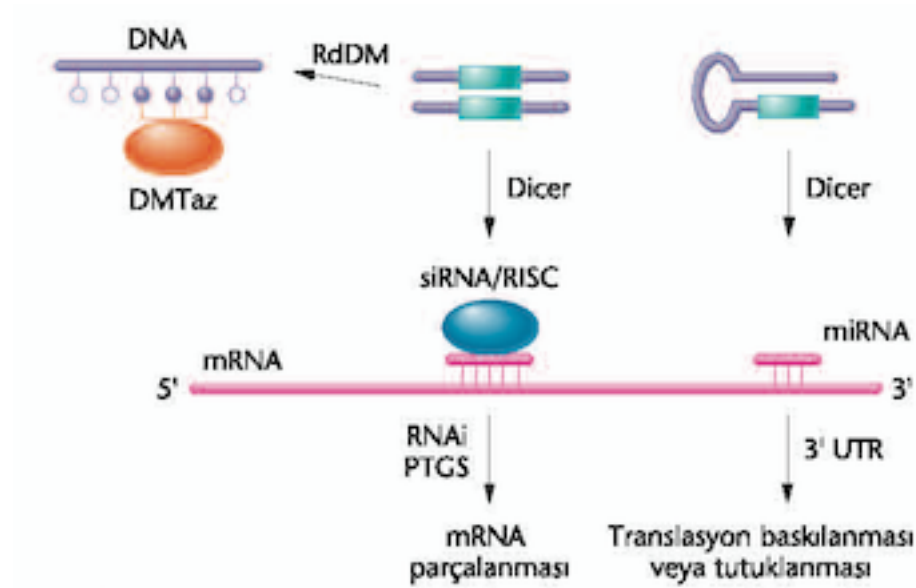
# MikroRNA (miRNA)

- Kısmi çift zincirli bir RNA molekülü Dicer tarafından işlenerek miRNA oluşturulur.



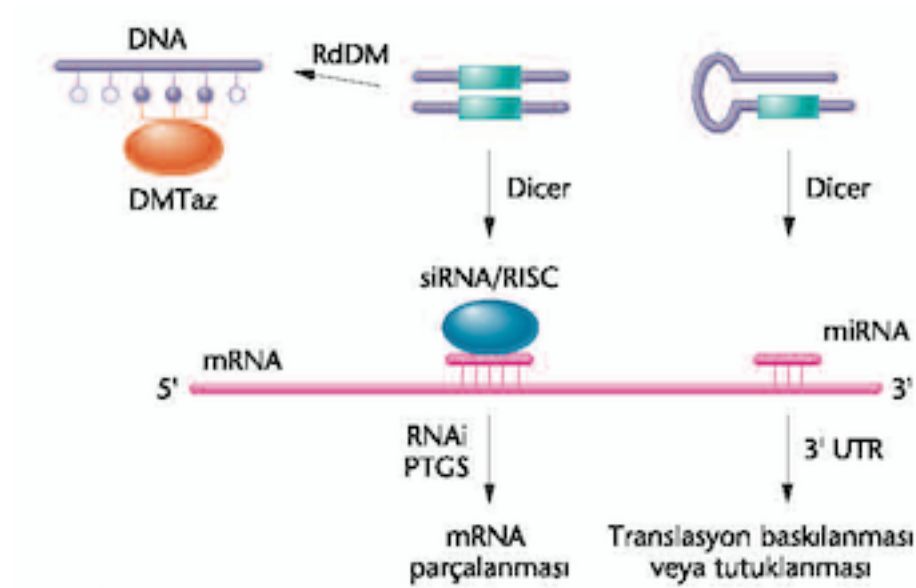
# MikroRNA (miRNA)

- Bu miRNA, mRNA'nın 3'-translasyona uğramayan bölgesindeki (UTR) eşlenik dizilere bağlanır.



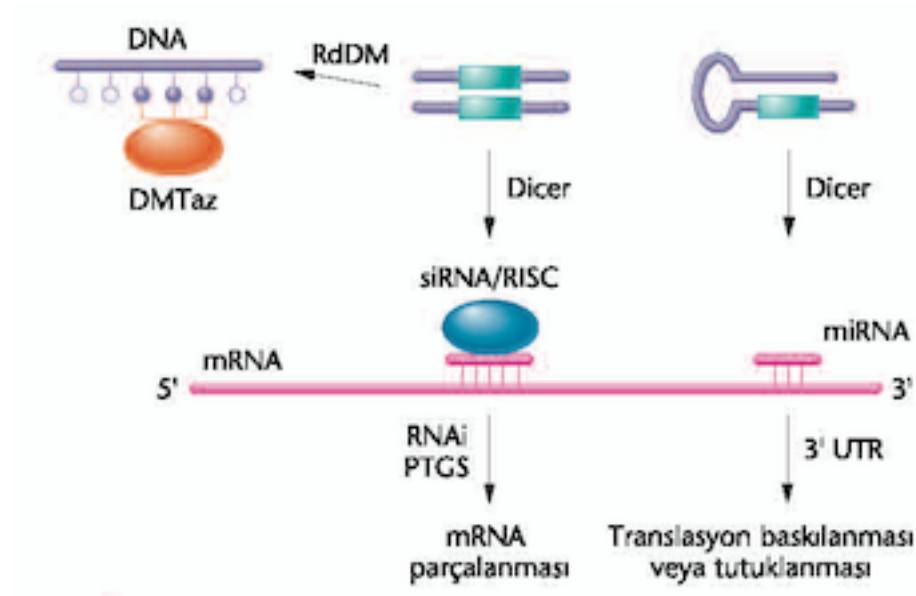
# MikroRNA (miRNA)

- Bu sayede translasyon engellenir.



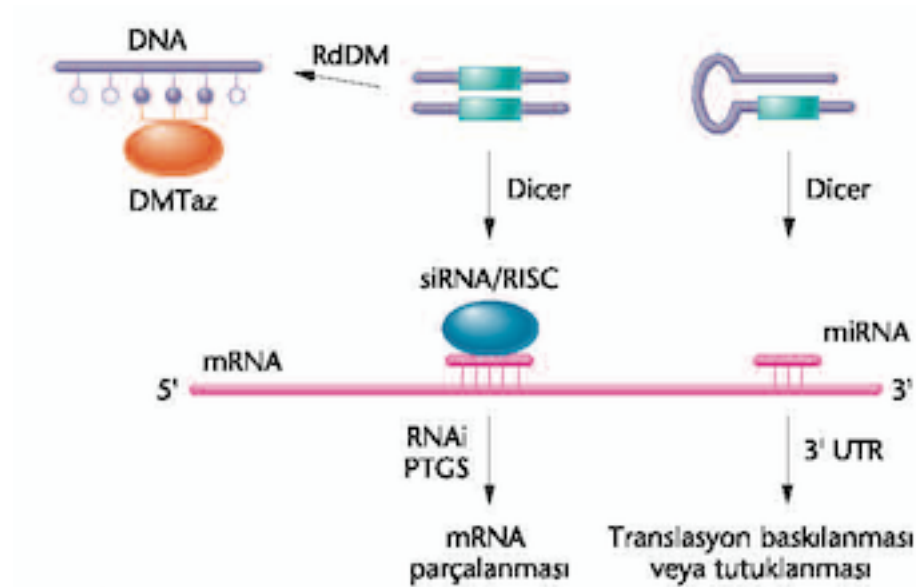
# RNA tarafından yönlendirilen DNA metilasyonu (RdDM)

- Bu işlemde de yine Dicer aktif rol oynar.



# RNA tarafından yönlendirilen DNA metilasyonu (RdDM)

- Dicer tarafından işlenen küçük RNA'lar, DNA metil transferaz (DMTaz) ile birleşerek promotor bölgesindeki sitozin bazlarını metiller ve geni sessizleştirir.



# RNA sessizleştirmesinin önemi

- RNAi, virüslerin istilasına karşı hücre sel savunmada ve transpozonların sessizleştirilmesinde önemli rol oynar.
- Bu diziler ayrıca gelişimin kontrolünde de görev alır.

## *Drosophila*'da cinsiyetin tayini: Seçenekli splayların regülasyonu için bir model

- *Drosophila*'da cinsiyeti, X kromozomlarının otozomal kromozomlara oranı belirler.
- Oran 0.5 (1X:2A) ise erkek bireyler meydana gelir (hatta Y kromozomu olmasa bile).
- Eğer oran 1.0 (2X:2A) ise dişi bireyler oluşur.
- Ara değerlerde ise (2X:3A) ara cinsiyetli (intersex) bireyler oluşur.

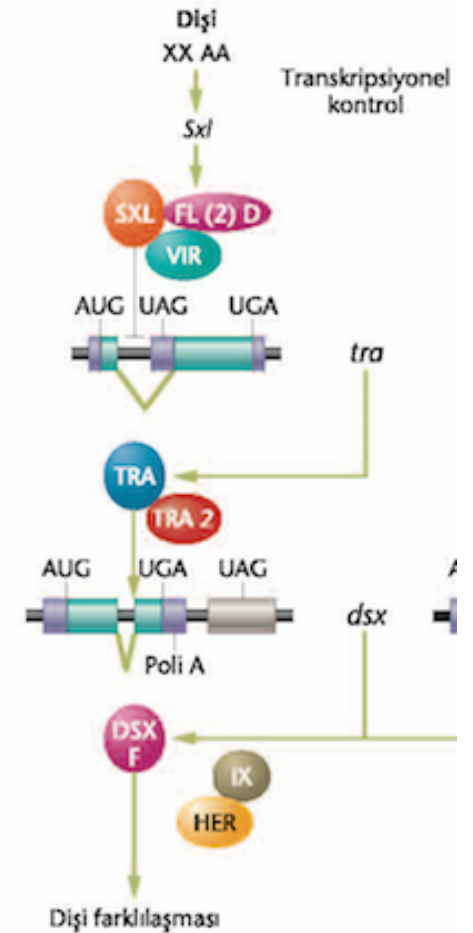


## *Drosophila*'da cinsiyetin tayini: Seçenekli sıplaysın regülasyonu için bir model

- Kromozom oranları, sıplays olayları zincirini başlatan az sayıdaki gen tarafından ayarlanır.
- Bu gelişim yolunda üç temel gen rol oynamaktadır:
  - Sex-lethal (Sxl)
  - Transformer (tra)
  - Doublesex (dsx)

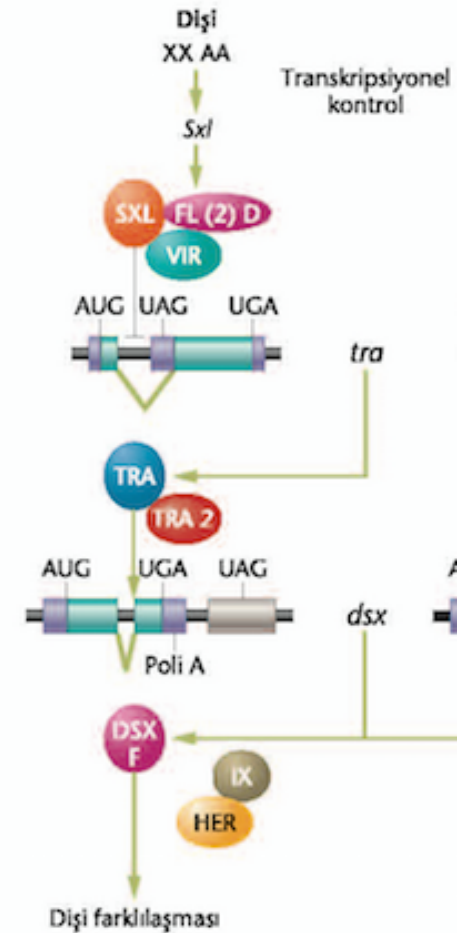
## *Drosophila*'da cinsiyetin tayini: Seçenekli sıplaysın regülasyonu için bir model

- Dişilerde X:A oranı, Sxl geninin transkripsiyonunu aktive eder.
- Sxl geninin ürünü olan SXL proteini ise tra genine ait öncül mRNA'ya bağlanır.
- Bu yolla sıplays işleminin dişiyeye özgül olmasını sağlar.



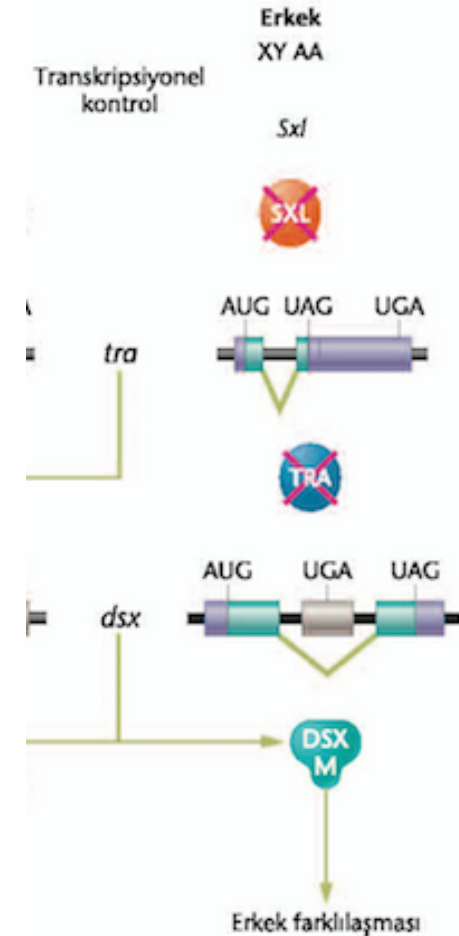
## *Drosophila*'da cinsiyetin tayini: Seçenekli sıplaysın regülasyonu için bir model

- Sentezlenen TRA proteini, TRA-2 proteini ile birlikte dsx öncül mRNA'sına bağlanır.
- Bu bağlanma sonucunda dsx öncül mRNA'sının dişiye özgül bir şekilde sıplays olmasını sağlar.
- Dolayısıyla dişiye özgül sıplays edilen dsx geninden, dişiye özgü DSX-F proteini sentezlenir.



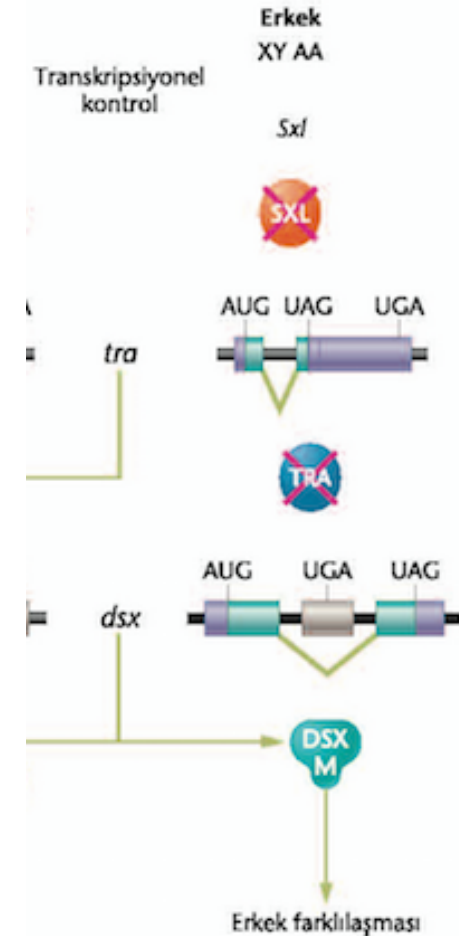
## *Drosophila*'da cinsiyetin tayini: Seçenekli sıplaysın regülasyonu için bir model

- DSX-F proteini, IX proteini ile birlikte hareket ederek erkek cinsiyet oluşum yolunu baskılar.
- Erkeklerde ise X:A oranı SXL'nin aktivitesine neden olmaz.
- Bu durumda tra öncül mRNA'sı erkeğe özgül bir şekilde işlenerek işlevsiz bir TRA proteini oluşturur.



## *Drosophila*'da cinsiyetin tayini: Seçenekli sıplaysın regülasyonu için bir model

- Bunun sonucunda dsx transkripsiyon ürünü de erkeğe özel işlenir.
- Böylelikle erkek cinsel gelişim yolunu aktive eden erkeğe özgü proteinin (DSX-M) sentezi gerçekleşir.



## *Drosophila*'da cinsiyetin tayini: Seçenekli sıplaysın regulasyonu için bir model

- Özetle, Sxl geni, dsx RNA ürününün dişiye zgl sıplaysını kontrol ederek cinsiyet gelişim yolunu seçen anahtar gendir.

# mRNA kararlılığı

- Tüm mRNA moleküllerinin yaşam süreleri oldukça karakteristiktir.
- Sentezlendikten bir süre sonra sitoplazmada parçalanırlar.
- Farklı mRNA moleküllerinin ömürleri de farklıdır.
- Bazıları sentezlendikten sonra birkaç dakika içinde parçalanır.

## mRNA kararlılığı

- Bazılarının ömrü ise saatler, aylar, hatta yıllarca sürebilir (oositte saklanan mRNA gibi).
- mRNA molekülünün kararlılığı ve buna bağlı olarak yıkım hızı (turnover rate), mRNA'nın nükleotit dizisine özgüdür.



# Translasyon seviyesinde kontrol

- mRNA kararlılığının diğer bir kontrol mekanizmasıdır.
- Mesajın translasyonu, mRNA'nın kendi kararlılığını kontrol eder.

## $\alpha$ - ve $\beta$ - tubulin sentezi

- Translasyon seviyesinde kontrolün en iyi çalışılmış örneğidir.
- Eğer hücre kolçisin adı verilen madde ile muamele edilirse, mikrotubuller hızla bozunur.
- Ortamdaki  $\alpha$ - ve  $\beta$ - alt birimlerinin sayısı artar.
- Bu durumda  $\alpha$ - ve  $\beta$ - tubulinlerin sentezi belirgin oranda düşer.

## $\alpha$ - ve $\beta$ - tubulin sentezi

- Ancak hücreler vinblastin ile muamele edilirse tubulinlerin sentezi artar.
- Aslına bakılırsa vinblastin de mikrotubullerin bozunmasına yol açmaktadır.
- Ancak bu madde, aynı zamanda ortamdaki serbest  $\alpha$ - ve  $\beta$ - alt birimlerinin çökmesine neden olarak konsantrasyonlarını azaltmaktadır.

## $\alpha$ - ve $\beta$ - tubulin sentezi

- Düşük konsantrasyonda tubulinlerin sentezi hızlanırken, yüksek konsantrasyonda sentez engellenir.
- Bu tip translasyonel regülasyona, otoregülasyon adı verilir.

## $\alpha$ - ve $\beta$ - tubulin sentezi

- Yandaki şekilde, ortamda yoğunluğu artan  $\alpha$ - ve  $\beta$ - tubulin alt birimleri, RNAaz'ı harekete geçirerek tubulin mRNA'sının parçalanmasını ve tubulin biyosentezinin durdurulmasını sağlamaktadır.

