



**Genetik kodun çözümlenmesi, hiç şüphesiz 20. yüzyılın en önemli bilimsel olaylarından biriydi ve tıbbın anlaşılması ve uygulanması üzerinde büyük etkileri oldu. Bilimsel yöntemin tanıtılmasının ardından tıpta bir devrimin doruk noktası olarak geldi.**

# Genetik Kodun Yorumlanması

Merve Çaltır ve Dr. Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

## Tıpta Bilimsel Devrim 1770–1970

Etkili ve akılcı tıbbi uygulama, hem insan biyolojisinin hem de hastalığın temelini oluşturan süreçlerin anlaşılmasını gerektirir. Ayrıca bireysel hastaların, ailelerin teşhisine ve araştırılmasına yönelik sistematik bir yaklaşımı ve son olarak hastalığı önlemek, iyileştirmek veya hafifletmek için uygun tedaviyi önerme kapasitesini içerir. Antik çağa kadar uzanan oldukça doğru hastalık tanımları vardır, ancak bu bölümde, biyolojinin temel süreçlerinin, yani büyüme, metabolizma, üreme ve evrimin, yaklaşık 1770'den itibaren bilimsel yöntemin kullanılmaya başlanmasıyla açıklığa kavuşturulduğunu, 200 yıl sonra genetik kodun aydınlatılması ve doruğa ulaştığını tartışacağız. 17. yüzyıldan önce vücudun nasıl çalıştığına dair kesinlikle çok az anlayış vardı ve kan dolaşımını keşfeden William Harvey'in tıbbi bilgiyi yeni çağa taşıdığına dair güçlü bir iddia yapılabilir. Ancak gerçek şu ki, önümüzdeki 150 yıl boyunca insan fiziolojisinin anlaşılmasında çok sınırlı ilerleme kaydedildi. Dini dogma, antik Yunan ve Roma'ya kadar uzanan inançlara saygı ve bazen saf icatlar, biyoloji ve tıp uygulamalarına güvenilmez bir arka plan sağladı. İnsan diseksiyonu ve doğru anatomik çizimler Rönesans'tan beri yayınlanmıştır ve o zamandan beri cerrahi tekniklerin geliştiğine dair iyi kanıtlar vardır. Bununla birlikte, fizyolojik süreçler açıkça tanımlanmamıştı ve çeşitli organların işlevleri konusunda kafa karışıklığı vardı. 18. yüzyıl, bilimsel düşüncede büyük bir değişim dönemiydi ve yüzyılın sonlarına doğru başlayan biyolojideki bilimsel devrim, tartışmalı olarak 1770'lerde Antoine-Laurent Lavoisier'e kadar uzanabilir. Sadece birkaç yıl içinde, flojiston teorisinin doğasında var olan hataları gösterdi ve ayrıca havanın bir element olmadığını (Aristoteles'e kadar uzanan bir inanç), en az iki elementten oluştuğunu gösterdi. Sistem fiziolojisinin büyük bir bölümünün, ilk olarak Lavoisier tarafından ortaya atılan çok basit bir kavramla desteklendiği artık biliniyor. Metabolik süreçler, bir dizi kontrollü oksidatif reaksiyonu içerir ve bu tür oksidatif yolların son elektron alıcısı, moleküler oksijendir. Akciğerlerin ve dolaşım sisteminin amacı, bu tür reaksiyonların meydana gelmesine izin vermek için vücutta yeterli miktarda oksijen taşımaktır. Bilimsel yöntemin biyolojiye uygulanmasının etkisi sonraki 200 yılda görüldü. Olağanüstü ilerlemeler, Gregor Mendel, Louis Pasteur, Charles Darwin, Robert Koch, Hans Krebs, Alexander Fleming ve diğerleri tarafından yapılan keşifleri takip etti ve 1940'larda biyolojik sistemlerin nasıl çalıştığına tam olarak anlaşılmasının önündeki en büyük engelin proteinlerin nasıl yapıldığı ve yapılarının nesilden nesle nasıl aktarıldığı hakkında çok sınırlı bilgiydi. Proteinler veya polipeptit enzimler, hücre iskeleti elementleri, moleküler taşıyıcılar, spesifik istilacı patojenlerle, inflamatuvar mediatörlerle, hormonlarla ve diğer birçoklarıyla savaşan ajanlar olarak hizmet edebilirler ve bir hücrenin özelliklerinin olmasını sağlayan, tüm karmaşıklıklarıyla bu moleküllerin korunmuş yapılarıdır. Hücre bölünmesi sırasında bir başkasında çoğaltılır. Belirli bir hayvanın veya bitkinin özellikleri de üreme sırasında nesilden nesle kopyalanır. Önceki bölümde tartışıldığı gibi, genetik bilgi hem hücre bölünmesi hem de üreme sırasında DNA'da taşınır ve DNA'nın nükleotit dizisi, herhangi bir türde bulunan birçok proteinin amino asit dizisini kodlar.



## Genetik Kodun Keşfi

Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü, 1968'de genetik kodun aydınlatılmasına katkılarından dolayı üç bilim insanına verildi. Onlar Marshall W. Nirenberg, Har Gobind Khorana ve Robert W. Holley idi. Khorana ve Holley, oligonükleotitlerin ve transfer RNA'nın yapısı ve sentezi üzerinde çalışan seçkin kimyagerlerdi. Ancak bu bölümde, esas olarak Nirenberg'in protein sentezi ve bir proteinin amino asit dizisinin DNA dizisi içinde nasıl kodlandığı üzerinde çalışan bilim insanlarının katkılarına odaklandık. Bu bölümün odak noktası, keşiflerinin klinik tıpla olan ilgisidir ve bu bağlamda, kodun açıklanmasına odaklanmak mantıklı görünmektedir. Pek çok bilimsel keşif, haklı olarak yalnızca bir veya iki bilim insanına atfedilirken, tümü, bu zorluğu üstlenen ancak hiçbir zaman tam olarak ilerleme kaydedemeyen diğerlerinin yaptığı önemli erken katkıları kabul ediyor. Genetik

kodun aydınlatılmasında bu kesinlikle doğrudu. Keşfi çevreleyen olaylar ve dâhil olanların kişilikleri, ilgi çekici bir hikâye oluşturmak için bir araya geliyor. Biyokimya alanı 20. yüzyılın ilk yarısında sağlam bir şekilde kuruldu ve hüresel içeriklerin kimyasal doğası 'öğüt ve bul' yaklaşımıyla ortaya çıktı. Dokular bozuldu ve hüresel içerikleri serbest kaldı. Daha sonra, farklı kimyasal sınıflarını, özellikle makromolekülleri tanımlamak için çeşitli teknikler uygulandı. Bunlar arasında en çok proteinler bulunurken, daha az miktarda polisakaritler ve lipitler de gözlemlendi. En az bol bulunan grup, en büyük bireysel molekülleri içermelerine rağmen nükleik asitlerdi. Tüm proteinlerin, genellikle 20000 ila 300000 Da aralığında moleküler ağırlıklara sahip doğrusal polimerler olduğu bulundu. Monomerik alt birimler 18-20 farklı amino asitten oluşuyordu ve her bir proteinin belirli bir amino asit dizisi

ve kesin olarak tanımlanmış bir uzunluğu vardı. Karbonhidratların ve lipidlerin yapıları çok daha basitti ve biyosentezleri spesifik enzimler tarafından katalize ediliyordu. Bununla birlikte, proteinlerin biyosentezi çok daha karmaşıktı. İlk ipucu 1941'de Torbjörn Caspersson'un en fazla nükleik asit içeren hücrelerin proteinleri en hızlı sentezleyen hücreler olduğunu bildirdiği zaman geldi. O zamana kadar, yapıları bilinmemekle birlikte, hem DNA hem de RNA tanımlanmıştı. Kısa bir süre sonra Oswald Avery, Colin MacLeod ve Maclyn McCarty DNA'nın genetik bilgi içerdiğini gösterdiler. O dönemde çalışanlar DNA yapısı sorununa çok farklı açılardan saldırdılar. Erwin Chargaff, kimyasına odaklandı ve DNA'da adenin ve timidin içeren nükleotidlerin miktarlarının eşit olduğunu ve ayrıca sitozin ve guanozin içeren nükleotidlerin miktarlarının da aynı olduğunu tespit etti. X-ışını kristalografı,



özellikle Maurice Wilkins ve Rosalind Franklin, molekülün üç boyutlu yapısı konusunu ele aldılar, ancak ilk başta yeterli kalitede DNA kristalleri elde etmek için mücadele ettiler. Bununla birlikte, temel deneylerinde DNA'nın sarmal bir konfigürasyonda doğrusal bir polimer olduğunu kanıtlamaya devam ettiler. Linus Pauling ve diğerleri, tümü yanlış olan çeşitli yapısal modeller önerdiler ve sonunda James D. Watson ve Francis Crick önceki sonuçları (esas olarak Chargaff ve Franklin'inkiler) yeniden yorumladılar ve ünlü çift sarmalı baz çiftiyle önerdiler. O noktada DNA'nın yapısı biliniyordu ve metabolik rolü kesin görünüyordu. Bununla birlikte, etki mekanizması (mekanizmaları) ve proteinlerin yapısını nasıl kodladığı, büyük bir zorluk teşkil ediyordu. Birkaç yıl sonra iki önemli keşif yapıldı. İlk olarak, Elliot Volkin ve Lazarus Astrachan, 1956'da DNA'dan yeni viral partiküllerin sentezinin, RNA'nın geçici sentezini içerdiğini rapor ettiler. İkincisi, bir proteindeki (insülin) amino asitlerin birincil dizisi ilk kez belirlendi. Kısa süre sonra diğer proteinlerdeki amino asitlerin dizilişini izledi ve DNA'nın yapısını karşılık gelen protein(ler)le eşleştirmeye çalışmak için ortam hazırlandı. Bununla birlikte, genetik kodu aydınlatmaya yönelik deneysel strateji, DNA ve protein yapılarının doğrudan karşılaştırılmasını içermiyordu. Benimsenen yaklaşım, protein sentezinin, sekansı genomik DNA'yı tamamlayıcı olan kararsız bir RNA ara ürün içerdiğinin farkına varılmasına dayanıyordu. Daha sonra, amino asitlerin proteinler halinde bir araya getirildiği mekanizmalar, büyüyen

polipeptit zinciri ile ara RNA'nın yapısı ilişkilendirilerek incelenmiştir. Protein sentezinin mekanizmalarını çözmeye yönelik girişimler, birkaç on yıldır aktif olarak, ancak başarısız bir şekilde sürdürüldü. Genel yaklaşım, polipeptitleri sentezleyebilen hüresiz bir sistem bulmaktı. Genellikle iki farklı yöntem söz konusuydu. Birincisi, artan katalitik aktivitesi kolayca ölçülebilen, genellikle bir enzim olan spesifik bir proteinin artan miktarlarının görünümünü izlemektir. İkinci yaklaşım da protein içeren yeni virüs parçacıklarının ortaya çıkması denendi. 1950'den sonra, radyonüklidlerin hazır mevcudiyeti, radyoaktif amino asitlerin yeni sentezlenmiş proteinlere dahil edilmesinin ölçülmesine izin verdi ve yöntem giderek daha fazla uygulandı. Pek çok farklı laboratuvar bu sorunla aktif olarak ilgilendi ve bunların en önemlileri İngiltere'de Ernest Gale ve Joan Folkes,

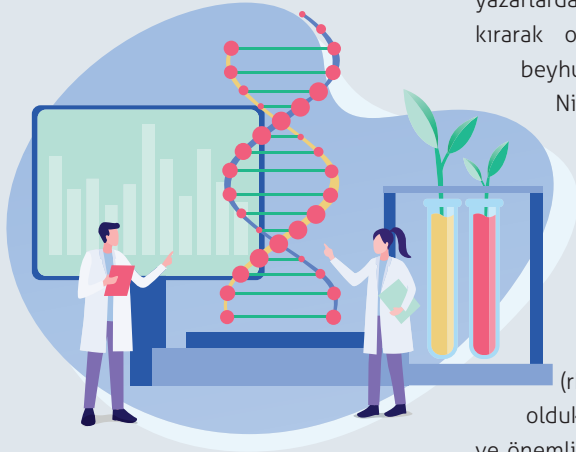
Fransa'da Jacques Monod ve ABD'de David Novelli, Sol Spiegelman, Paul Zamecnik ve Severo Ochoa idi. Protein sentezinin nükleik asitler, gerekli amino asitlerden oluşan bir havuz ve muhtemelen spesifik enzimler gerektirdiği konusunda geniş bir kabul vardı. Bir tür enerji kaynağı, belki de ATP de gerekli olabilir. Memeli hücrelerinin elektron mikroskobu, mikrozomal parçacıklar olarak adlandırılan ve protein sentezi bölgeleri olduğuna inanılan elektron yoğun "topaklar" içeren büyük lipoprotein plakaları ortaya çıkardı. Bakterilerde plakalar mikroskopik olarak tanımlanamadı, ancak 'topaklar' bakteri ekstraktlarında kolayca bulundu. İlk başta bu hücre içi organeller üzerinde çalışan bilim adamları arasında bir dereceye kadar kafa karışıklığı vardı ve 1958'de protein sentezi üzerine bir sempozyumun raporunda organizatör Richard Roberts şunları kaydetti:

“

Bazı katılımcılar için mikrozomlar, diğer protein ve lipid materyali ile kontamine olmuş mikrozom fraksiyonunun ribonükleoprotein parçacıkları anlamına gelir; diğerlerine göre mikrozomlar, parçacıklarla kontamine olmuş protein ve lipidden oluşur. "Mikrozomal parçacıklar" ifadesi yeterli görünmüyor ve "mikrozom fraksiyonunun ribonükleoprotein parçacıkları" çok garip. Toplantı sırasında 'ribozom' kelimesi önerildi; bu çok tatmin edici bir isim gibi görünüyor ve hoş bir sesi var. 20 ila 100 S boyut aralığındaki ribonükleoprotein parçacıklarını belirtmek için 'ribozom' benimsenirse, mevcut karışıklık ortadan kaldırılabilir.







1950'lerin ikinci

yarısına geldiğinde, bu malzemeleri içeren birçok farklı 'hüresiz sistem' geliştirildi. Çoğu kararsızdı veya yeniden üretilemezdi ve yeni proteinin getirileri her zaman oldukça küçüktü. Bu sıralarda, yeni bir RNA tipinin keşfi bildirildi (daha önce bilinen tek ribozomal RNA idi). Bu yeni bulunan RNA molekülleri ("çözünür RNA") oldukça küçüktü ve hücre özütlerinde serbest olarak bulundu. Kısa bir süre sonra Nirenberg ve meslektaşları, çözünür RNA moleküllerinin amino asitlere bağlandığını ve amino asitlerin gelişen polipeptit zincirine iletilmesinde rol oynadığını gösterdiler. Protein sentezi ve genetik kodun gizemi üzerine araştırmaları büyük bir heyecan sardı ve hangi moleküllerin (muhtemelen nükleik asitlerin) hangi amino asitlerin dahil edildiğini belirlediğini ve proteinlerdeki amino asitlerin spesifik dizisinin nasıl kontrol edilebileceğini doğrulamak için özel çabalar sarf edildi. Çoğu, belirli bir nükleik asit baz dizisinin her bir amino asidi belirlediğini varsayan birkaç teori öne sürüldü. George Gamow, 1954 gibi erken bir tarihte, 18-20 farklı amino asit ve yalnızca 4 nükleik asit bazı olduğundan, belirli bir amino asidi belirtmek için en az 3 bazın gerekli olacağını tahmin etmişti. ABD'deki Ulusal Sağlık Enstitülerinden Marshall Nirenberg, biyokimyanın diğer alanlarında çalışıyordu, ancak protein sentezi sorunu üzerinde de çalışmayı düşündü. Bundan meslektaşlarına bahsettiğinde, tepkileri her zaman destekleyici olmadı. Bruce Ames bunun 'intihara meyilli' olduğunu söyledi! Bu alanda çalışmış olan mevcut

yazarlardan biri, Nirenberg'in cesaretini kırarak ona başkalarının yaptığı tüm beyhude girişimleri hatırlattı.

Nirenberg'in tepkisi, "Modern biyokimya ile yapılabileceğini düşünüyorum" oldu. Bu zamana kadar, protein sentezinin üç ayrı RNA türü, yani haberci RNA (mRNA) gerektirdiği açıktı. (çözünür RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA)). Farklı RNA'ların işlevleri

oldukça hızlı bir şekilde ortaya çıktı ve önemli bir makalede, François Gros ve meslektaşları, E. coli ile yapılan deneylerden, ribozomal RNA'nın kendisinin genetik bilgiyi taşımadığına, ancak üzerinde RNA'ların transfer edileceği sabit bir yüzey sağladığına dair iyi kanıtlar sağladılar. Spesifik amino asitlerini haberci RNA şablonuna getirebilirler. Kısa bir süre sonra Heinrich Matthaei ve Marshall Nirenberg tarafından kritik bir keşif ve önemli bir teknik ilerleme bildirildi. Protein sentezini ölçmek için E. coli'den yeni, hüresiz bir sistem tanımladılar. Radyoaktif amino asitlerin dahil edilmesi, DNA'nın varlığından bağımsız olarak ribozomal RNA varlığında büyük ölçüde arttı. Nirenberg'in yeni prosedürü ile daha önce kullanılan diğer tüm prosedürler arasındaki en büyük fark, bir indirgeyici madde olan  $\beta$ -merkaptetanolün dahil edilmesiydi. Daha önce hiç kimse, en seçkin Nobel Ödüllü biyokimyacılar bile, enzimleri indirgenmiş bir durumda tutmanın basit bir yolunu düşünmemişti. Nirenberg'in modern biyokimya hakkındaki tahmini tamamen doğrulanmış görünüyordu! Nirenberg'in adı bu araştırma alanında ilk kez duyulmuştu. Makale, Moskova'daki 1961 Uluslararası Biyokimya Kongresi ile yaklaşık aynı zamanda yayınlandı.

Nirenberg, hüresiz sistemindeki fenilalanin (ve sadece fenilalanin) katılımının, poliüridik asit (polyU, sadece bir baz, urasil içeren sentetik bir RNA) varlığında büyük ölçüde arttığını ortaya koyduğu on dakikalık bir rapor sundu. Francis Crick, birkaç gün sonra protein sentezi üzerine özel bir sempozyum düzenlemiş ve hemen Nirenberg'in çok daha geniş bir kitleye konuşması için yer açmıştı. 'Rna'daki polyU'nun fenilalanini kodladığı' haberi hızla yayıldı. Genetik kodun ilk ögesi, en azından E. coli'de kırılmıştı. Kısa bir süre sonra Nirenberg, birleştirilmeden önce AMP-fenilalanin'in artık transfer RNA olarak adlandırılan şeyin rolünü tanımlayan 'çözünür RNA'ya' bağlandığını gösterdi. Severo Ochoa da dâhil olmak üzere birçok bilim insanı çabalarını hemen Nirenberg'in hüresiz sistemine kaydırды. Ochoa'nın büyük bir araştırma grubu vardı ve aynı zamanda hüresiz bir sistem (Alcaligenes faecalis'ten) geliştirmek için başarısız bir şekilde çalışıyordu. RNA'nın hangi 'kod harflerinin' hangi amino asidi belirlediğini belirlemek üzere kendi araştırmasını genişletmek için Nirenberg'in sistemini hızla benimsedi. Diğerleri de protein sentezinin diğer yönlerini keşfetmek için yöntemi benimsedi. En önemli gelişmelerden biri, Nirenberg'in duyurusundan sadece dört ay sonra, Crick ve meslektaşları dikkate değer bir çalışma sunduğunda ortaya çıktı. Kodun muhtemelen nükleotid üçlülerini (veya üçlülerin katlarını) içerdiğini, birden fazla üçlü kodla dejener olduğunu gösterdiler. "Baz dizisinin sabit bir başlangıç noktasından okunduğu" sonucuna vardılar. Kısa bir süre sonra, çok zekice bir deneyde, François Chapeville ve meslektaşları, belirli bir tRNA molekülü (spesifik amino asidine



komplekslenmiş) arasındaki tanıma bölgesinin özgülüğünü ve belirli polipeptidi kodlayan mRNA'yı gösterdiler. Yaklaşımları, amino asidin Raney nikel katalizörü ile indirgeme yoluyla tRNA ile kompleks haline getirildikten sonra yapısını değiştirmekti. Sisteini alanine indirdiler, ardından alanin, sisteini kodlayan bir bölgede büyüyen polipeptit zincirine dâhil edildi. Doğru bir şekilde, kodun özgülüğünün, amino asidin değil, karşılık gelen tRNA'nın mRNA tarafından tanınmasına bağlı olduğu sonucuna vardılar. Yaklaşık 1961'den itibaren, Robert

Holley ve Cornell Üniversitesi'ndeki meslektaşları tarafından alanin transfer RNA'nın yapısı üzerine önemli ve çok zorlayıcı bir dizi deney rapor edildi. Deneysel yaklaşımları, karşılık gelen parçaların yapısal analizi ile bir dizi bölünme reaksiyonunu içeriyordu. Elde ettikleri sonuçlar ilk kez bir nükleik asidin dizisini ortaya çıkardı ve daha da önemlisi (tRNA'yı kodlayan DNA'nın karşılık gelen bazlarında uygun modifikasyonla) bir genin ilk nükleotit dizisini ortaya çıkardılar. Daha sonraki deneylerde grup, tRNA'nın klasik "yonca yaprağı" üç boyutlu yapısını

göstermeye devam etti. Kısa zincirli oligonükleotitlerin kimyasal sentezi ve sıralı analizi, Har Gobind Khorana ve yaklaşık aynı zamanlarda Wisconsin Üniversitesi'nde çalışan meslektaşları tarafından üstlenildi. Laboratuarda polinükleotidler üretmek için gerekli olan polimerizasyon reaksiyonları ve belirli sekanslara sahip polinükleotidlerin sentezi için yöntemler geliştirdiler. Khorana ve Holley'in çalışmaları burada daha fazla tartışılmamakla birlikte, alana önemli katkıları, Marshall Nirenberg ile 1968 Nobel Ödülü'ndeki paylarında kabul edildi.

Ulusal Sağlık Enstitülerinde, Nirenberg'in çalışmasının önemi hemen fark edildi. Ona yeni araştırma pozisyonları açıldı ve birçok farklı laboratuvarından bilim insanı ona yardım etmek için kendi araştırmalarından vazgeçti. Enstitülerin tarihinde parlak bir andı. En dikkate değer olanları Robert Martin ve Maxine Singer'dı. Martin, nükleotitlerin dimerlerini sağladı ve Singer'ın uzmanlığı nükleik asit enzimolojisiydi. Aralarında Oliver W. Jones, Samuel Barondes, Brian Clark, William Sly, Philip Leder ve Sidney Pestka'nın da bulunduğu pek çok yeni doktora sonrası öğrenci Nirenberg ile çalışmaya geldi. Nükleik asit bazlarının tekrar eden çiftleri ve üçlüleri ile sentetik RNA benzeri polimerler oluşturmak çok önemli hale geldi ve bu Martin tarafından başlatıldı. Her spesifik nükleotit sekansı için, tüm amino asitler birleşme için test edildi. Her polimer, radyoaktif amino asitlerle birlikte Nirenberg sistemine eklendi. İnkübasyondan sonra, herhangi bir yeni polipeptitin çokaltılması için trikloroasetik asit ilave edildi. Bunlar bir filtrede tutuldu, kurutuldu ve radyoaktivite sayıldı. Zahmetli ama etkiliydi. Leder daha sonra üzerine çoklu filtrelerin yerleştirilebileceği bir manifold tasarladı ve bu da analizlerin hızını önemli ölçüde artırdı. Genetik kodun "sözcükleri" sonunda bu yöntemlerin uygulanmasıyla ortaya çıktı. Yine de yapılacak çok iş vardı. Dünya çapında birçok laboratuvar bu sorun üzerinde çalışmaya başladı ve çok geçmeden "yeni" kod sözcükleri bildiren

yayınlar çıktı. En dikkate değer olanı, Severo Ochoa'nın laboratuvarından gelen birçok makaleydi. Zaten bir Nobel Ödülü (1959) almıştı ve büyük bir laboratuvarı vardı, kesinlikle Nirenberg'inkinden çok daha büyüktü. O zamanlar bazıları tarafından neredeyse etik dışı olarak görülen bir haksız rekabet duygusu gelişti. Daha yaşlı ve güçlü bir rakip, daha önce bilinmeyen genç bir bilim insanının araştırma hattını gasp ediyordu. Bu tutum, birçok bilim insanının ellerinden gelen her şekilde ona yardım etmek için Nirenberg'in yanına koşmasına neden oldu. Şaşırtıcı bir şekilde Nirenberg, Ochoa'nın girişini düşmanca görmedi. Onu daha çok çalışmaya teşvik ettiği için yararlı olduğunu hissetti. Gerçekten de, birkaç yıl sonra, Nirenberg ve Ochoa (ve eşleri) bir yabancı toplantıdaydılar ve yemeklerini birlikte yedikleri aynı küçük misafirhanede tutuldular. Nirenberg, Ochoa'yı tanıdığını ve ondan hoşlandığını söyledi. Nirenberg, çok alçakgönüllü birisiydi. Gerçekten de, yıllar sonra Crick, Nirenberg'e halkla ilişkilere yeterince zaman ayırmadığını tavsiye etti, ancak Nirenberg, yayınlanan çalışmanın kendi adına konuşması gerektiğini hissetti. Bilimsel literatürün doymak bilmez bir okuyucusuydu ve günlük koleksiyonunun mahzende kaybolmasını önlemek için evdeki çalışma odasının zemininin mahzenden özel olarak güçlendirilmesi gerekiyordu. Çok çalışkandı, özellikle devlet sektöründe çalışan biri için alışılmadık saatlerde çalışırdı. Genellikle öğleden kısa bir süre sonra

işe gelir ve laboratuvarı gezdirirdi. Yeni deneyler ve araştırma yolları için fikirlerle dolup taşan doktora sonrası çalışmaları, bir önceki tamamlanmadan önce yeni bir araştırma hattına yönlendirilmemek için bir ölçüde öz disipline ve eldeki göreve kesin bir odaklanmaya ihtiyaç duyuyordu. Bununla birlikte, bir faaliyet alanında, yani bilimsel makalelerin yazılmasında, Nirenberg ayrıntılar konusunda titizdi, son derece odaklanmıştı, işbirlikçilerini çileden çıkarıyordu. Üretken bir yazar değildi (genetik kodla ilgili literatüre yaptığı tüm katkı 30'dan az makalede yer alıyordu), ancak yazdığı her şeyin olabildiğince açık, doğru ve genel olarak mükemmel olmasını istiyordu. Sorun, Nirenberg'in, son teslim tarihine kadar çalışmadığı sürece, yazdığı bir taslağı kurcalamaktan asla vazgeçmemesiydi. Laboratuvarında, Proceedings of the National Academy of Sciences ofisi, makalelerin teslimi için her ay bir kapanış tarihi ve saati belirleme uygulamasından vazgeçerse, bir daha asla makale yayınlamayacağını iddia edenler vardı. Dergi sonunda 'son tarih' politikasını iptal etti ve Nirenberg orada yayınlamaya devam etti, ama aslında daha yavaş. Kodun bir öğesinin, yani lisin öğesinin özellikle anlaşılması zor olduğu ortaya çıktı. Son olarak, polilisin ürününün trikloroasetik asit içinde çözünür olduğu ve bu nedenle çokelmediği ve bir filtre üzerinde tutulmadığı tespit edildi. Bu, tungstik asit dahil edilerek aşıldı. Birkaç yıl boyunca, amino asitlerin her biri için kod sözcükler oluşturuldu, ancak birkaç kod sözcüğü herhangi bir amino asidin dahil edilmesini teşvik etmedi ve "saçma" olarak adlandırıldı. "Saçma" kod kelimelerinin "dur"u kodladığı gösterildi ve metionini kodlayan RNA dizisi AUG'nin de başlangıç kodunu olarak görev yaptığı gösterildi. E. coli'de yeni sentezlenen polipeptitlerin formil-metiyonin ile başladığı zaten biliniyordu. On yıl içinde tüm kod sözcükleri deşifre edildi ve protein sentezinin temel mekanizmaları oluşturuldu. Moleküler biyolojideki önemli sıçramalar başlamak üzereydi.



## Genetik Kodun Klinik Tıp İçin Etkileri

Bugün tıpta veya ilgili bir alanda çalışan herkes, DNA'nın yapısının keşfedilmesinden ve DNA'nın açıklanmasından kaynaklanan olağanüstü gelişmeleri tanıyacaktır. Moleküler biyoloji yöntemlerinden hiçbirinin yalnızca tek bir keşfe dayandığı söylenemez, ancak polipeptitlerin ve proteinlerin birincil yapısının genomik veya cDNA dizilimi ile belirlenmesi, biyokimya büyük bir gelişme olmuştur. cDNA, karşılık gelen RNA'dan bir DNA dizisinin üretilmesini sağlayan viral bir enzim (ters transkriptaz) kullanılarak laboratuvarında üretilir. Bir proteinin dizilişini belirlemeye yönelik bu dolaylı yöntem, genetik kodun anlaşılmasına bağlıdır ve DNA'nın dizilimi, proteinlerin N-terminal analizi veya kütle spektrometresi ile doğrudan dizilenmesinden kesinlikle çok daha hızlı ve daha ucuzdur. DNA ve protein dizisinin hızlı bir şekilde belirlenmesi için yöntemler geliştirildikten sonra, çok kısa bir süre içinde şunları yapmak mümkün oldu:

Bunlar ve moleküler biyolojinin diğer birçok tekniği, teşhis prosedürlerinin, aşıların, farmasötiklerin, ilaç tarama sistemlerinin, enzim değiştirme protokollerinin ve gen terapilerinin geliştirilmesinde geniş çapta uygulanmıştır. Bununla birlikte, insan genetiği alanında, moleküler biyolojinin birçok uygulaması ve oldukça özel olarak genetik kod bilgisi, insan hastalığını anlamamıza yönelik en çarpıcı ilerlemelerden bazılarını sağladı ve gelecekteki gelişmelerin özellikle ortaya çıktığı yeri. Mendel yasalarına göre aktarılan tek gen bozuklukları, uzun yıllardır biliniyordu ve moleküler genetiğin ilk günlerinde ilk dikkat çekenler onlardı. Örnekler arasında orak hücre hastalığı, hemofili, kistik fibroz, Huntington koresi, Duchene musküler distrofi ve diğerleri sayılabilir. Bununla birlikte, insan hastalıklarının araştırılması, insan genom projesinin tamamlanmasıyla 2003 yılında önemli ölçüde değişti.

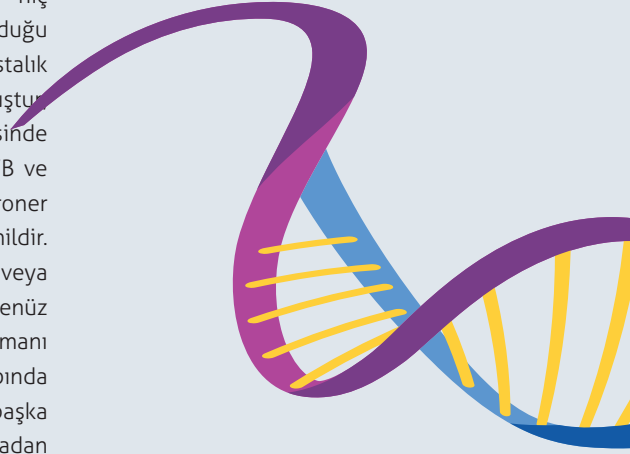
Sonraki yıllarda, daha hızlı DNA dizileme teknikleri geliştirildi ve insan genomunun değişkenliğinin boyutu ortaya çıktı. Değişkenliğin çoğu, bir bireyden alınan bir DNA dizisi içindeki tek bir bazın, diğer bireylerdeki aynı konumdaki bazdan farklı olduğunun bulunduğu tek nükleotid polimorfizmlerine (SNP'ler) dayanmaktadır. Çok hızlı bir şekilde, genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında, etkilenen yüzlerce hatta binlerce kişide belirli bir hastalık ile bir ilişki için yüzbinlerce SNP'yi test etmek mümkün hale geldi. Açıkça, tek bir bireyin bir geninde belirli bir SNP'nin varlığı veya yokluğu mutlaka hastalık için belirleyici değildir. Öte yandan, eğer bir hastalık gerçekten de belirli bir gende bir veya daha fazla SNP'nin varlığıyla ilişkiliyse, bu ilişki, SNP, bir hastalıktan etkilenen yeterince fazla sayıda bireyde daha sık tanımlandığında eninde sonunda gün ışığına çıkacaktır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının faydalarından biri, karmaşık (çok genli) bozukluklardaki genetik etkiyi ilk kez araştırma olanağı olmuştur. Artık, çoklu veya daha nadir allellerin kombinasyonlarının katkısını incelemek mümkündür. Bir örnek, oldukça düşük bir kalıtım derecesine sahip olan Crohn hastalığı olabilir; beş hastadan birinde birinci derece akraba etkilenmiştir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, Crohn hastalığı olan hastalarda 30'dan fazla DNA varyantı (SNP) göstermiştir; bunların 3'ü oldukça yaygındır (popülasyonda %9 civarındadır) ve buna 1,5 ila 4 kat artış eşlik eder. Bununla birlikte, geri kalan DNA varyantları çok daha az yaygındır ve tespit edilmeleri için çok büyük araştırmalar gerektirir. Bugüne kadar 40'tan fazla DNA varyantının tanımlandığı Tip 1 diyabetle ilgili çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bunlardan sadece birkaçı Tip 1 diyabetin kalıtımına önemli bir şekilde katkıda bulunurken, çoğunluğu çok az katkıda bulunur. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları

- (i) Çok çeşitli teşhis ve deney protokollerinde gerekli olan, bilinen proteinlerin kimyasal olarak küçük parçalarını sentezlemek.
- (ii) Yabancı DNA'yı bakterilere dahil edin ve karşılık gelen proteinden büyük miktarlarda üretmek.
- (iii) Belirli hücresel süreçleri çözmek veya değiştirmek amacıyla vahşi tipte veya yapısal olarak değiştirilmiş DNA'yı kültürlenmiş ökaryotik hücrelere veya tüm organizmalara transfekte etmek.



sirasında SNP'lerin tanımlandığı DNA zincirlerini analiz etmek artık nispeten basit bir konudur. Bu belirli DNA dizileri tarafından kodlanan proteinler, genetik kod tarafından açığa çıkarılır ve birçok ilginç ve çok beklenmedik keşifler olmuştur. Bazı kalıtsal bozukluklar, daha önce bu durumda herhangi bir rolü olduğu düşünülmeyen genlerle ilişkilere sahiptir. Bir örnek, yaşlılarda görme bozukluğunun önemli bir nedeni olan yaşa bağlı makula dejenerasyonu (YBMD) olabilir. Durum, kromozom 1'de bulunan ve önemli bir enflamasyon yolunda yer alan bir proteini kodlayan kompleman faktörü-H (CFH) genindeki 24 SNP'lerle ilişkilidir. DNA varyantı, CFH molekülünün heparin ve C-reaktif proteini bağlayan bir bölgesinde bulunan CFH'deki amino asit 402'de bir tirozinden histidine bir değişiklik verir. CFH, komplement aktivasyonunun alternatif yolunun bir parçasıdır ve kaskadı inhibe etmede (diğer proteinlerle kombinasyon halinde) bir rolü vardır. YBMD'li hastalarda kompleman yolunun anormal düzenlenmesine, Bruch zarında ve komşu retinal pigment epitel hücrelerinde kontrolsüz bir inflamatuvar yanıt eşlik eder ve bu da sonunda görme bozukluğuna yol açar. Bu ilişki rapor edilene kadar,

yaşa bağlı makula dejenerasyonunun (adından da anlaşılacağı gibi), çok az inflamatuvar bileşen içeren veya hiç olmayan dejeneratif bir durum olduğu düşünülüyordu. Beklenmedik gen-hastalık ilişkilerinin diğer örnekleri bulunmuştur: bunlara hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan genlerle (sırasıyla CDKN2A/B ve CDKAL1 genleri) ilişkili olan hem koroner kalp hastalığı hem de Tip 2 diyabet dahildir. Bu keşiflerin koroner kalp hastalığı veya Tip 2 diyabet gelişimindeki önemi henüz belirlenmedi, ancak şüphesiz zamanı gelince ortaya çıkacaktır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının bir başka beklenmedik yararı, SNP'lerin sonradan birden fazla hastalıkla ilişkili olduğu gösterilen genlerde ortaya çıkabileceğinin bulunması olmuştur. Yıllardır yapılan klinik gözlemler, doktorların bir dereceye kadar kalıtsallığa sahip birkaç koşulun birbiriyle ilişkili bulunabileceğini fark etmelerine yol açmıştır - buna bir örnek çölyak hastalığı ve dermatitisherpetiformis olacaktır. Bununla birlikte, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, geçmişte doktorların dikkate bile almadığı çok sayıda hastalık ilişkisi olduğunu ortaya çıkardı. Daha çarpıcı ve en az beklenen bulgular arasında şunlar vardı:



- (i) Tek bir gendeki (LRRK2) SNP'lerin hem Parkinson hastalığı hem de Crohn hastalığı ile ilişkili olduğu
- (ii) Başka bir gendeki (KITLG) SNP'lerin testis kanseri ve sarı veya kahverengi saçla ilişkili olduğu
- (iii) Tip 2 diyabet ve prostat kanseri (JAZF1) ile ilişkili bir gendeki SNP'lerin aynı zamanda yetişkin boyunu da tahmin ettiği

Birlikte aktarılan koşulların her durumda tek bir gendeki bir SNP ile ilişkili olması gerekliliği yoktur, ancak yukarıda belirtilen durumlarda muhtemelen öyledir. Belirli hastalıklarla veya bazen hastalıkların normal fiziksel özelliklerle (saç rengi, boy, vb.) oldukça tanınmayan çağrışımlarının sıklığı, kesinlikle şaşırtıcı bir şey olarak geldi. Ayrıca, bu bulguların gelecekte önemli klinik etkileri olabilir. Erken teşhisin prognoz üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceği kanser gibi birçok durum için tarama programları hâlihazırda yürürlükte.

Popülasyonlar genellikle belirli hastalıklar için, söz konusu duruma ilişkin algılanan artmış risk temelinde tanır. Bu

nedenle, herkesin her şey için tarandığı zamana kadar, tarama için gelecekteki hasta seçiminin, belirli bir hastalığın herhangi bir sayıda kalıtsal özellik veya ilişkili patolojik durumla tanınmış ilişkilerine giderek daha fazla dayanması muhtemel görünmektedir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları başlangıçta bir hastalığın nedenini tam anlamıyla patolojik terimlerle ortaya koymaz. Bununla birlikte, başka koşullarda yapılmayan ve hastalığın nedenini açıklayan bir araştırma hattını tetikleyebilirler. Bir örnek, yukarıda açıklanan CFH genindeki SNP'lerin yaşa bağlı makula dejenerasyonu ile ilişkisi olabilir. Genom çapında araştırmalar, kalıtsal hastalıkların genomik DNA'da nasıl taşındığına dair bilgilerimizin eksik kaldığını da göstermiştir. Hastalıkla ilişkili SNP'lerin büyük çoğunluğu, ya bir gen içinde gömülü (intronik) ya da DNA'nın genler arasında bazen uzun olan bölgelerinde (intergenik) yer alan kopyalanmamış DNA dizilerinde bulunur. Genetik kod, bu bölgeleri tartışmasız bir şekilde bir proteini kodlayan DNA'dan uzak olarak tanımlar. Ayrıca, büyük çoğunluk, transkripsiyon kontrolünde yer alan pek çok düzenleyici proteinin herhangi birini bağlayan DNA alanları ile ilgili değildir.

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, kesinlikle hem temel hücre biyolojisi hem de klinik tıp için çıkarımlar içeren daha ileri araştırma yollarına yol açacaktır. Bu bölümde, genetik kodun keşfinin, canlı organizmaları yönlendiren süreçlerin, yani büyüme, metabolizma, üreme ve evrimin genel hatlarıyla anlaşılmasına yol açan bir dizi keşfin son adımı olduğunu tartıştık. Yaklaşık 1770'ten itibaren 200 yıllık bir süre boyunca, biyoloji ve tıba bilimsel yöntem tanımlandı. Genetik kodun keşfinden bu yana geçen 40 yılda, olası etkisinin yalnızca ilk ipucunu gördük.

