

## NUKLEOLUS ve RİBOSOMAL RNA BİYOGENEZİ

Prof. Dr. Nebahat YAKAR-TAN

İstanbul Üniversitesi, Botanik ve Genetik Kürsüsü

İlk olarak nukleus içersinde nukleoluslerin mevcudiyeti Fontana tarafından 1781 yılında gözlenmiş ve yoğun tanecikler olarak nitelendirilmiştir. 19. yüzyılın sonlarına doğru nukleoluslerin büyüklüğü ve bazofilik özelliği ile hücrenin sentetik aktivitesi arasında bir ilişkinin bulunduğu göze çarpmıştır. Örneğin sperm hücreleri gibi az protein sentezi gösteren hücrelerde nukleoluslerin ya çok küçük olduğu, ya da hiç bulunmadığı, buna karşit oosit ve salgı hücreleri gibi protein sentezince aktif hücrelerde ise nukleoluslerin belirgin bir şekilde büyük olduğu gözlenmiştir.

Yine 19. yüzyılın sonunda Hertwig tarafından temel sitoplasmada içersinde nukleus gibi bazik boyalarla kuvvetle boyanan cisimlerin bulunduğu ortaya konmuş ve bu cisimler kromidyal sitoplasmada veya bazofilik sitoplasmada olarak adlandırılmıştır. Garnier (1887) bu bölgelere, biyosentezde esas rol oynadıkları düşüncesiyle ergastoplasmada denmesinin daha uygun düşeceği kanısına varmış ve zamanımıza kadar da sitoplasmada bazik boyalarla boyanma gösteren bölgeler için ergastoplasmada deyimi kullanılmagelmiştir. Ergastoplasmaya özellikle sinir hücrelerindeki Nissl cisimlerinde, karaciğer hücrelerindeki bazofilik kümelerde, ve bazı salgı hücrelerinin (parotid ve pankreas bezleri ve midenin salgı hücreleri gibi) bazal sitoplasmada rastlanmaktadır.

Diğer taraftan sitoplasmada içersinde 50-150  $\mu$  çapında, ışık mikroskopuyla görülemiyecek kadar küçük granüllerin bulunduğu karanlık alan mikroskopu ile, ayrıntılı olmasa bile gösterilmiş, mikrosom denen bu granüllerin aşağı yukarı bütün hücre kitlesinin %15-20 sini teşkil ettiği saptanmıştır. Mikrosomlar da ergastoplasmada gibi bazofilik

özelliğe malik olan cisimlerdir. Gerek ergatoplasmanın, gerek mikrosomların hem bazofilik özelliklerinin, hem 2600 A° daki ultraviyole ışınlarını emme yeteneklerinin ribonukleazın etkisinden sonra kaybolduğu göz önüne alınarak ribonukleik asidi (RNA) tabiatında oldukları kabul edilmiştir (Brachet ve arkadaşları, 1940; Caspersson, 1940).

Palade (1953) homojen görünüşlü hiyaloplasma içerisinde ribosom denen submikroskopik (yaklaşık 100-150 A°) cisimlerin bulunduğunu tanıtladıktan sonra ribosomların kimyasal analizleri yapılmış ve ribonukleoprotein makromoleküllerinden oluştuğu kesinleşmiştir. Ribosomlar eşit miktarda RNA ve proteinden ibarettir. İhtiva ettiği proteinlerin (+) yükleri RNA'nın (-) yükleriyle denk gelmemesinden ötürü ribosomlar negatif elektrik yükü taşımaktadırlar ve dolayısıyla kationları ve bazik boyaları bağlama yeteneğindedirler.

Yapılan elektron mikroskopu çalışmaları ergastoplasmanın endoplasmik retikulumla bağlı ribosomların yoğunlaştığı bölgeler olduğunu, mikrosomların ise vakuoller sistemin ribosom ihtiva eden kesecik veya tüpçüklerinin kopmasıyla meydana gelen granüllerden oluştuğunu ortaya koymuştur. Yapılmış olan gözlemler sitoplasmanın bazofilik özelliğinin sitoplasmadaki ribosom miktarına bağlı olarak doğru orantıda arttığını ortaya koymuştur. Sitoplasmada ister ergastoplasma, ister mikrosomların kümeler teşkil ettiği bölgeler olsun bazofilik özellikleri ribosomların burada yoğun halde bulunmasından ötürüdür.

Yukarıda işaret edildiği gibi daha 18. yüzyılda nukleolus büyüklüğü ve bazofilik özelliği ile sitoplasmanın sentetik aktivitesi arasında bir ilişkinin bulunduğu gösterilmiş, daha sonraları sitoplasmadaki bazofilik bölgelerin biyosentezde önemli rol oynadıkları ve sitoplasmadaki bu bazofilyanın yoğunluğunun nukleolus büyüklüğüne bağlı olarak arttığı işaret edilmiştir. Son zamanlarda ribosomların keşfi ve protein sentezindeki rollerinin ortaya konmasıyla ribosomların biyogenezinde nukleolusun rolü olduğu fikri kuvvetlenmiştir.

Gerek izole nukleolusların kimyasal analizi, gerek sitokimyasal araştırmalar nukleolusun esas yapısının RNA ve proteinden ibaret olduğunu göstermektedir. Nukleolusun 2600 A° daki ultraviyole ışınlarını emme ve pironin-metilyeşili karışımı ile pironinin kırmızı rengini alma özelliklerini ribonukleazın etkisinden sonra kaybetmiş olması nukleik asitlerinden RNA yı ihtiva ettiğini göstermektedir. Bezelye embriyolarında nukleolustaki RNA miktarının bütün nukleer RNA'nın % 10-20 sini teşkil ettiği gösterilmiştir (Stern ve arkadaşları, 1959; Maggio ve arkadaşları, 1963). Nukleoler RNA'nın baz kompozisyonunun rRNA

nın baz kompozisyonuna çok benzediği gösterilmiştir. İzole nukleolusların analizi nukleolusların protein muhteviyatının oldukça yüksek olduğunu ve non-histon bir protein olduğunu kanıtlamıştır.

Her ne kadar nukleolusların Feulgen-negatif olduğu DNA ihtiva etmediğini göstermekteyse de nukleolus etrafında genellikle Feulgen-pozitif bölgeler gözlenmektedir. Bu bölgeler nukleolar kromozomların heterokromatik nukleolar bölgeleridir, ve literatürde nukleoluse-arkadaş kromatin olarak adlandırılmıştır. Bazı nukleoluslarda nukleolar kromozomların nukleoluse temas ettiği bölgelerde nukleolus içersinde Feulgen-pozitif granüllere de rastlanmaktadır.

Elektron mikroskopu araştırmaları nukleolusun nisbeten açık, protein yapısındaki bölgelerin arasını dolduran ribonukleoproteinden ibaret ipliksi ve genellikle nukleolusun çevresinde yoğun bir şekilde toplanmış granüler partiküllerden oluştuğunu göstermektedir (Miller, 1966). Çoğunlukla nukleoluse-arkadaş kromatinden nukleolus içersine dallanma gösteren DNA yapısındaki intranukleolar kromatin olarak adlandırılan ipliksi bir kısım görülür. Ultrasentrifugasyon ve radyotografi deneyleri fibriler partiküllerin granüler partiküllerin; hem fibriler, hem granüler partiküllerin ise sitoplasmik ribosomların prekürsörü olduğunu göstermiştir.

Eskidenberi mitoz bölünmesinde nukleolusların siklik bir değişme gösterdiği bilinmektedir. Bölünmenin başında kromozomların kuvvetle boyandıkları zaman nukleolusların kayboldukları, bölünmenin sonunda kromozomların gözden kaybolmasıyla telofazda tekrar meydana geldikleri bilinmektedir. Telofazda nukleolusların nukleolar kromozomların nukleolus-yapıcı bölgelerdeki prenukleolar cisimlerin bir araya gelmesiyle oluştuğu düşünülmekteydi (Lafontaine, 1963). Soğan (*Allium cepa*) ın meristem hücrelerinde nukleolus ve nukleolar kromozomdan çıkan kromatin ipliğinin mevcudiyeti görülmüştür. Bu ipliğin profazda kromozomun nukleolar bölgesinde toplanıp spiralleştiği esnada nukleolar granül ve fibrillerin de nukleoplasmaya yayılmasıyla nukleolus gözden kaybolur. Telofazın başı ve ortasında nukleolar kromozomların nukleolus yapıcı bölgesindeki kromatin spirallerinin çözülmesiyle meydana çıkan kromatin ipliği ve etrafında fibriler ve granüler ribonukleoprotein partiküllerinin toplanmasıyla nukleolus yeniden meydana çıkar (Chouinard, 1969). Diğer taraftan H<sup>3</sup>-valin ile yapılan deneylerle bazı nukleolus proteinlerinin bölünmeden sonra tekrar nukleoluse geçtiği görülmüş ve bu proteinlerin nukleolus teşekkülünde rol oynadığı kanısına varılmıştır (Harris, 1961; Sirlin, 1962).

Daha 1950 de Duryee kurbağa oositlerinde nukleolusun vital haldeyken sitoplasmaya geçişini göstermiştir. Bazı kimyasal maddelerin etkisiyle Lettré (1955) piliç prosenkima fibroblast kültürlerinde nukleoler maddenin, Yakar-Olgun (1959) tütün dumanının etkisiyle bakla kökü embriyonik hücrelerinde nukleolusun nukleus zarını parçalayarak sitoplasmaya atıldığını gözlemişlerdir. Johansen ve Flint (1959) *Lilium* megasporositinin büyümesi esnasında nukleolus maddesinin sitoplasmaya içersine atıldığını işaret etmişlerdir.

İnce kesitlerden yapılan elektron mikroskopu araştırmaları nukleus zarının her iki yanında yoğun partiküllerin mevcudiyeti, ribosomların nukleustan sitoplasmaya atıldığına delil olarak gösterilmiştir (De Robertis, 1954). Miller (1966) amfibya oositlerinde 1000 kadar küçük nukleoluse benzer granüllerin pakiten safhasında nukleolusun çevresinde toplandığını ve büyük bir olasılıkla kökeni nukleolus olan bu maddelerin nukleer zarın porlarından sitoplasmaya çıktığını gözlemiştir. Stevens (1966) *Chironomus* ün tükrük bezlerinde nukleus zarının a n n u l u s lerinden ribonukleoproteinin uzamış yapılar halinde geçtiğini işaret etmiştir. Bununla beraber bu partiküllerin mRNA olabileceği ihtimalinin mevcut olduğunu da kabul etmiştir. Benzer gözlemler yine Stevens (1968) tarafından *Amoeba proteus* da da yapılmış, nukleer porlardan geçen helezon şeklinde, RNA'ya malik partiküllerin nukleoler kökenli ribosomal partiküller olduğu kabul edilmiştir.

rRNA'nın biyogenezi prokaryotik ve evkaryotik hücrelerde farklıdır. Prokaryotik hücrelerde, örneğin bakterilerde rRNA genomun özel bölgesinde (sistron) şifrelenerek doğrudan doğruya serbest hale geçer. Evkaryotik hücrelerde ise rRNA nukleoler kromozomların heterokromatik yapısındaki nukleolus-yapıcı bölgesinde teşekkül etmekte, ve sitoplasmaya geçmeden önce nukleoluste toplanmaktadır. Profazın sonunda metafaz kromozomlarının ihtiva ettiği az miktardaki RNA hariç, aşağı yukarı bütün nukleer RNA sitoplasmaya geçer.

Amfibya oositleri nukleolusun sitokimyasal ve ultrastrüktürel yapısının incelenmesinde ve ribosomların biyogenezinin aydınlatılmasında en uygun materyel teşkil etmektedir. *Xenopus* un oositinde pakiten safhasında nukleolus etrafında Feulgen-pozitif granüllerden ibaret fazla miktarda DNA'nın biriktirdiği Painter ve Taylor (1942) tarafından görülmüştür. Bu bölgedeki DNA duplikasyonu daha sonra H<sup>3</sup>-timidin tekniği ile gösterilmiştir. Önce nukleolus etrafında toplanan bu fazladan DNA daha sonra yüzlerce küçük granüller halinde nukleolus içersine dağılır (Mc Gregor, 1968; Gall ve Pardue, 1969). Bu fazladan meydana gelen DNA'nın rRNA'nın teşekkülünde rol oynadığı, H<sup>3</sup>-ribosomal RNA hibridleşme metodu ile gösterilmiştir. Ezme

preparatlarda H<sup>3</sup>-ribosomal RNA bu DNA ile hibrid meydana getirmektedir. Radyoaktif madde ile işaretlenmiş RNA'nın özellikle rDNA bölgesinde depo edildiği görülür. Nukleus etrafındaki kitlesel yapının 25 - 30 pg rDNA ihtiva ettiği hesap edilmiştir ki, aşağı yukarı 3000 nukleolus-yapıcısına tekabül etmektedir (Gall ve Pardue, 1969).

Amfibya nukleolusleri izole edilirse bazı şartlar altında granüler komponentlerin boncuk dizisinden ibaret kolyelere benzeyen iplikli yapılar haline dönüşerek genişlediği görülür (Miller, 1966). Bu yapı düzensiz bir ribonukleoprotein matrisi ile örtülü tek bir DNA molekülünden oluşmuştur. Bu DNA molekülünde 7-8 µ uzunluğunda matrisli, 4,5-5 µ uzunluğunda matrisiz parça almaç göstermektedir. Bu gözleme göre nukleolusteki 45 S lik RNA molekülünü şifreleyen her rDNA sistronunun rRNA meydana getirmeyen bölge ile ayrıldığı, ve her filament parçasının bir 45 S lik RNA ünitesine tekabül ettiği düşünülmektedir (Miller, 1970). Kökenini nukleolus-yapıcı bölgeden alan rDNA'dan meydana gelen 45 S büyüklüğündeki RNA nukleolusde toplanarak 28 S ve 18 S büyüklüğündeki rRNA'nın prekürsörlerini teşkil eder. Nukleolusde biriken 45 S büyüklüğündeki RNA molekülü art arda değişikliğe uğrayarak sitoplasmadaki ribosomal subunitelere ulaşır. rDNA'nın amfibya oositlerindeki artışı, ribosomların biyogenezinde vukua gelen çok fazla artışla birlikte meydana gelmektedir.

Nukleolusun rRNA'nın sentezinde rol oynadığının direkt ispatı Brown ve Gurdon (1964) tarafından amfibyalardan *Xenopus laevis* de yapılmıştır. *X. laevis* in nukleolus ihtiva etmeyen mutanti rRNA sentezi yapma yeteneğinden yoksundur. Yabani tipin diploid hücreleri iki, heterozigot mutantların yalnız bir nukleolus ihtiva ettikleri, homozigot mutantların ise nukleolussuz oldukları görülmüştür. Nukleolussuz hemozigot mutantların embriyolarının kuyruk teşekkülüne başlarken öldükleri görülür. Bu devreye kadar yaşamış olmaları maternal ribosomların protein sentezinde rol oynamaları olasılığını akla getirmektedir.

Williams ve arkadaşları (1973) *Lilium* polen-ana-hücrelerinin meiyoz bölünmesinde amfibya oositlerinin olgunlaşması esnasında nukleolus-yapıcı bölgelerde meydana gelen ek nukleoluslerle kıyaslanabilecek cisimlerin bulunduğunu gözlemişlerdir. Hem optik, hem elektron mikroskopu ile yaptıkları araştırmalarda pakiten ve diploten safhalarında nukleolus-yapıcı bölgelere yakın zincirler halinde *nukleoid* denen nukleoluse benzer globüllerin teşekkül ettiğini görmüşlerdir. Bu globüllerin geç profazda nukleus içersine dağıldığını, bölünmeden sonra da sitoplasmaya çıktığını H<sup>3</sup>-uridin ile yapılan deneylerle göstermişlerdir. Bunun meiyotik profazda azalan sitoplasmadaki

ribosomların hızla yeniden teşekkül etmesiyle ilgili olduğunu düşünmüşlerdir. Aynı gözlemler daha önce bazı Angiosperm bitkilerinin mikrosporogenezisi esnasında da Gavaudan ve Yu Chin-Chen (1936), ve Gavaudan (1948) tarafından yapılmıştır.

Williams ve arkadaşları yaptıkları gözlemlere dayanarak nukleoid denen ek nukleoluslerin amfibya oositlerinde gösterildiği gibi nukleolus-yapıcı bölgelerde teşekkül edip sitoplasmaya iletildiği kanısına varmışlarsa da, sitokimyasal araştırmalar nukleoidlerin fazladan DNA ihtiva etmediğini göstermiştir. Bu gözlemlerine dayanarak ek nukleoluslerin oluşumunda Gall (1969) in kabul ettiği gibi rRNA senteziyle ilgili sistronların çoğalmasıyla fazladan teşekkül eden DNA'nın rolü olmadığı, Chouinard (1969) in kabul ettiği gibi nukleolus materyelinin sentezini düzenleyen genetik faktörü taşıyan intranukleoler kromatinin nukleolus-yapıcı bölgeden çözülüp açılarak rRNA sentezini sağlayıp, nukleoidleri meydana getirdiği düşüncesine varmışlardır.

Sonuç olarak seneler evvel nukleoluslar ile sitoplasmanın sentetik aktivitesi arasında göze çarpan ilişki son senelerde yapılan araştırmalar ile kısmen aydınlığa kavuşmuş, ribosomların protein sentezinin meydana geldiği bölgeler olduğu, ve moleküler biyolojinin yeni metodlarından faydalanılarak ribosomların komponenti olan rRNA biyogenezinde de nukleoluslerin önemli yer işgal ettiği kanısı kuvvetlenmiştir.

#### BİBLİYOGRAFYA

- 1 — DE ROBERTIS, E.D.P., NOWINSKY, W.W. and SAEZ, F.A. (1970) : Cell Biology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.
- 2 — GALL, J.G. (1969): The Genes of Ribosomal RNA in Oogenesis. Genetics supplement 61 (1), 121.
- 3 — GAVAUDAN, P. (1948) : Échanges de matériaux figurés entre noyau et cytoplasme. Gallica Biol. Acta 1, 205.
- 4 — WILLIAMS, E., HESLOP-HARRISON, J. and DICKINSON, H.G. (1973) : The Activity of the Nucleolus Organising Region and the Origin of Cytoplasmic Nucleoids in Meiocytes of *Lilium*. Protoplasma 77 (1), 79.
- 5 — YAKAR-OLGUN, N.(1959) : Action of Cigarette Smoke Tar on Root Tips. Rev. Fac. Sc. Univ. Istanbul, Sér. B. 21, 49.
- 6 — YAKAR-OLGUN, N. (1961) : Nukleolus, Türk Biologi Dergisi 11 (4), 97.