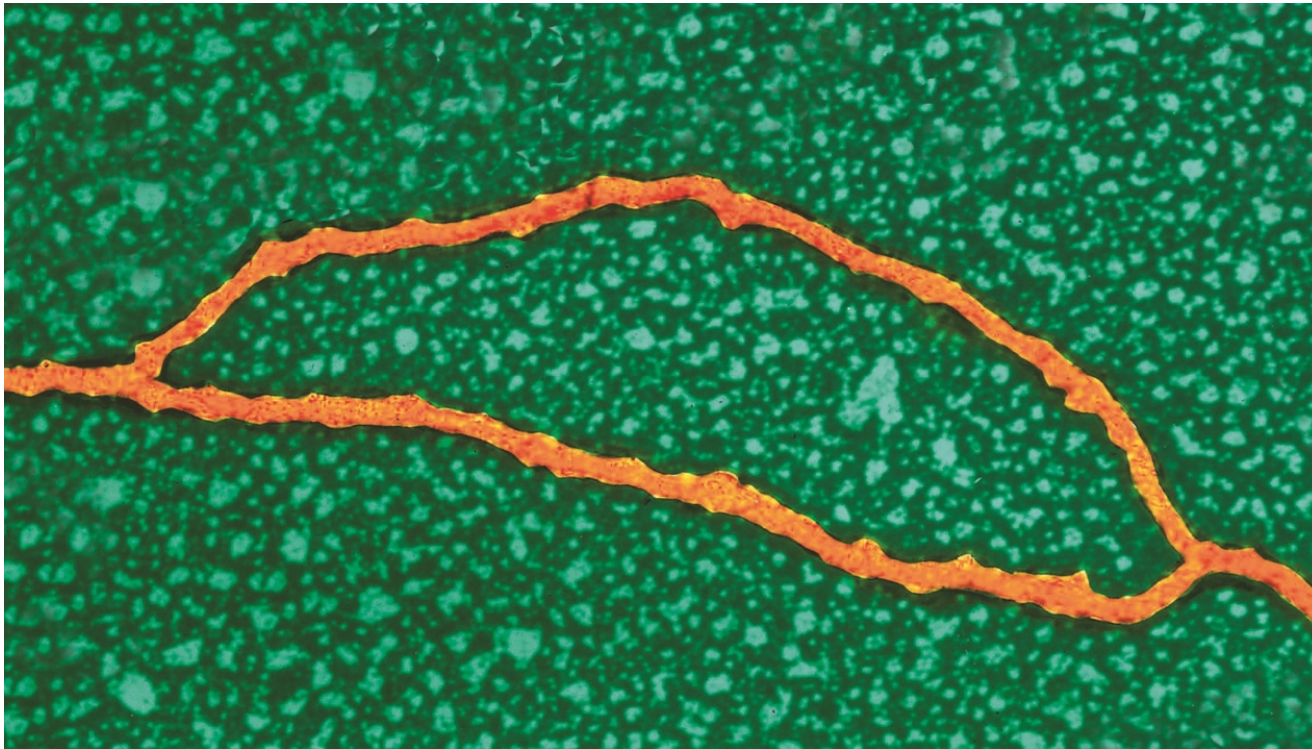


DNA REPLİKASYONU VE REKOMBİNASYONU



Replikasyon

- Watson ve Crick'in DNA'nın yapısını önermelerinin ardından bilim adamları DNA'nın nasıl kopyalandığı üzerinde yoğunlaşmıştır.
- DNA'nın kendini kopyalamasına replikasyon denir.
- Replikasyon genetik materyalin temel bir işlevidir.

Replikasyon

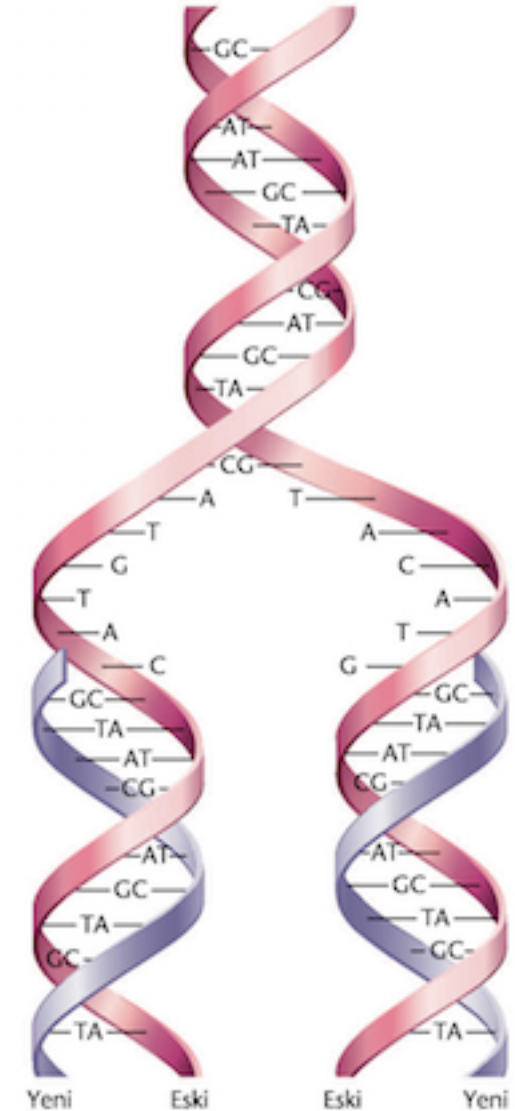
- Replikasyon genetik devamlılığın sağlanması için doğru bir biçimde gerçekleşmelidir.
- Watson ve Crick'in önerdikleri ikili sarmal modeli, replikasyonun nasıl olacağı hakkında ilk ipuçlarını vermektedir.
- Bu model yarı-saklı (semikonservatif) replikasyon olarak bilinir.

Replikasyon

- DNA'nın replikasyonu için sayısız enzim ve bir çok protein gereklidir.
- Bu bölümde,;
 - Kopyalamanın genel tarzını
 - DNA sentezindeki özgül ayrıntıları ele alacağız.

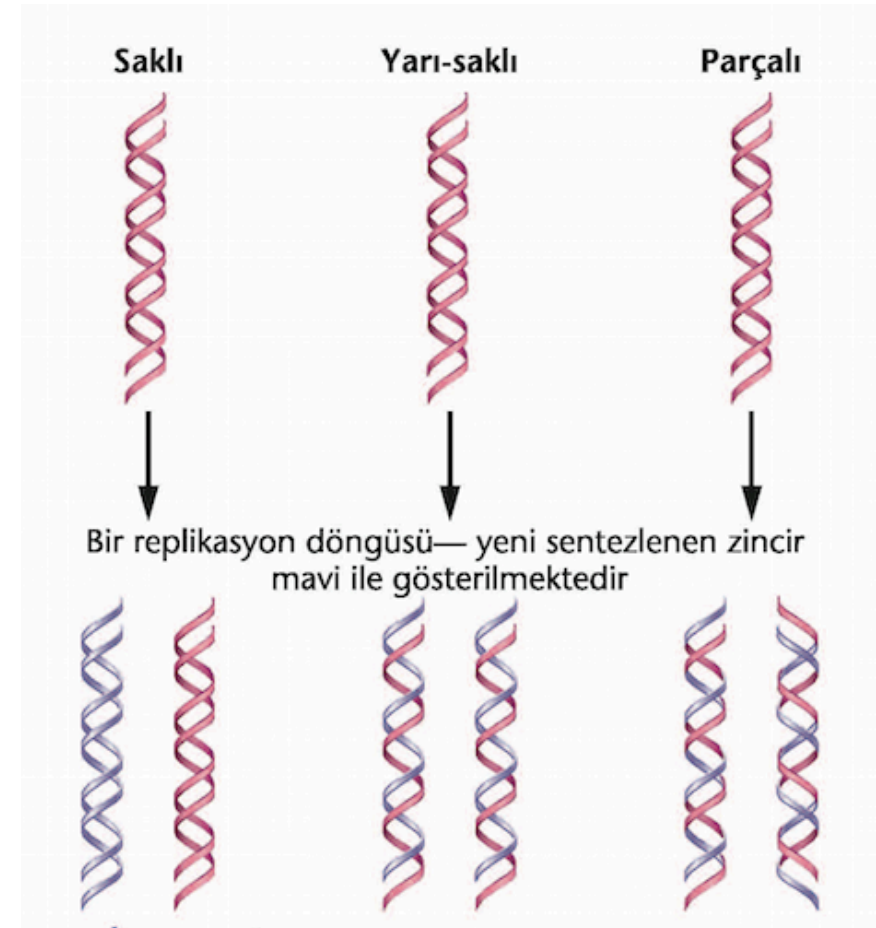
DNA'nın çoğaltılması

- DNA ikili sarmalının her bir zinciri, tamamlayıcı zincir için kalıp oluşturabilir.
- Zincir açıldığında bazlar birbirini çekerek eşleşir. Timin bazı adeninle, guanin bazı sitozinle eşleşecektir.
- Bu eşleşme potansiyel hidrojen bağlarıyla gerçekleşir.



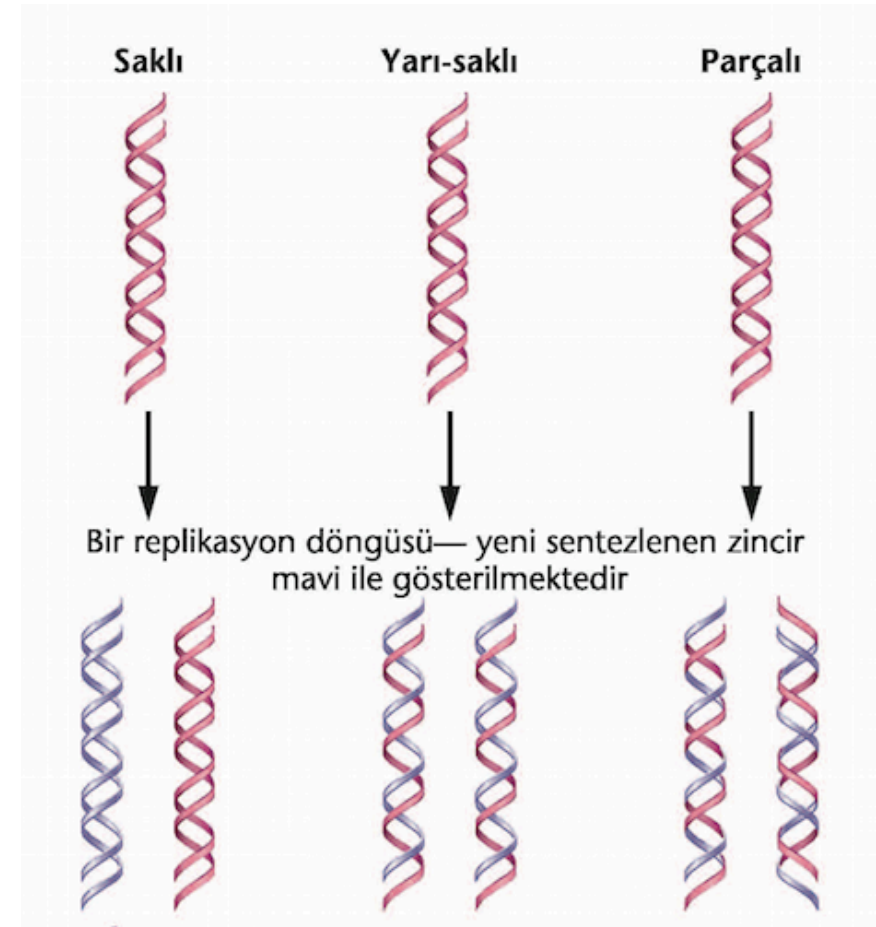
Alternatif DNA replikasyon modelleri

- DNA üç tip olası modele göre çoğalabilir:
 - Yarı-saklı (semikonservatif) replikasyon
 - Saklı (konservatif) replikasyon
 - Parçalı (dispersif) replikasyon



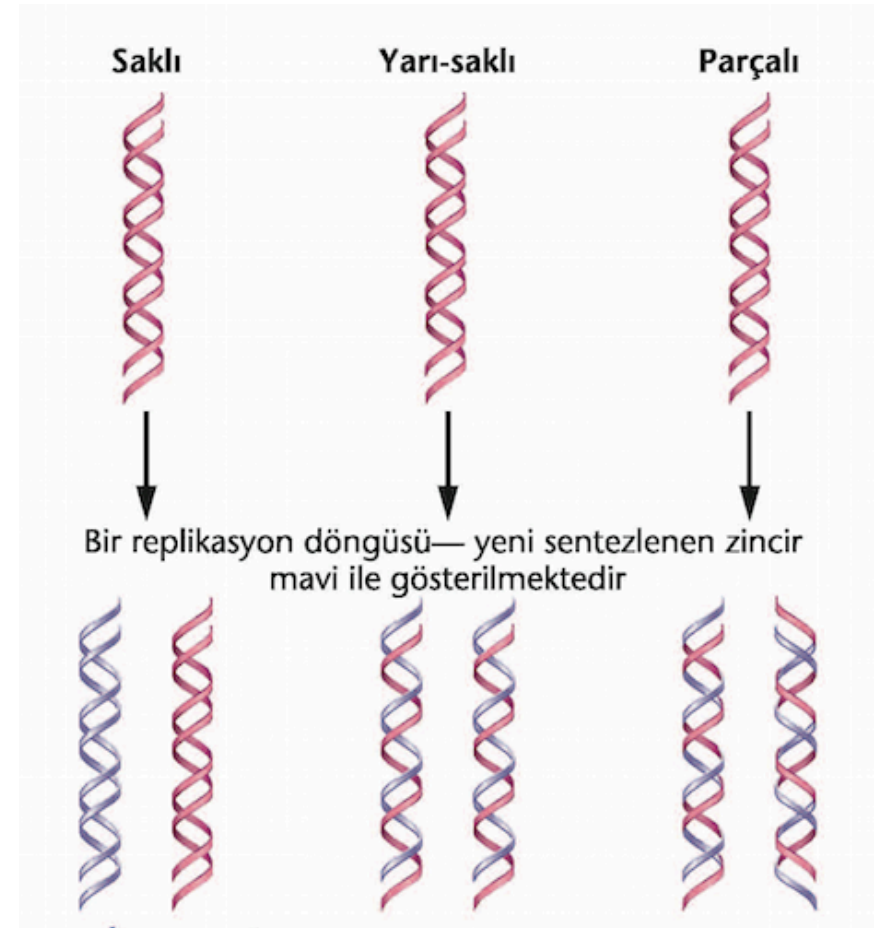
Yarı-saklı (semikonservatif) replikasyon

- Her iki kalıp boyunca nükleotitler kovalent bağlarla polinükleotitleri oluşturur.
- Sonuçta birbirine özdeş iki DNA zinciri oluşacaktır.
- Kopyalanan her bir DNA molekülünde bir 'yeni' ve bir 'eski' zincir bulunur.
- Bu tip çoğalma yarı- saklı (semikonservatif) replikasyondur.



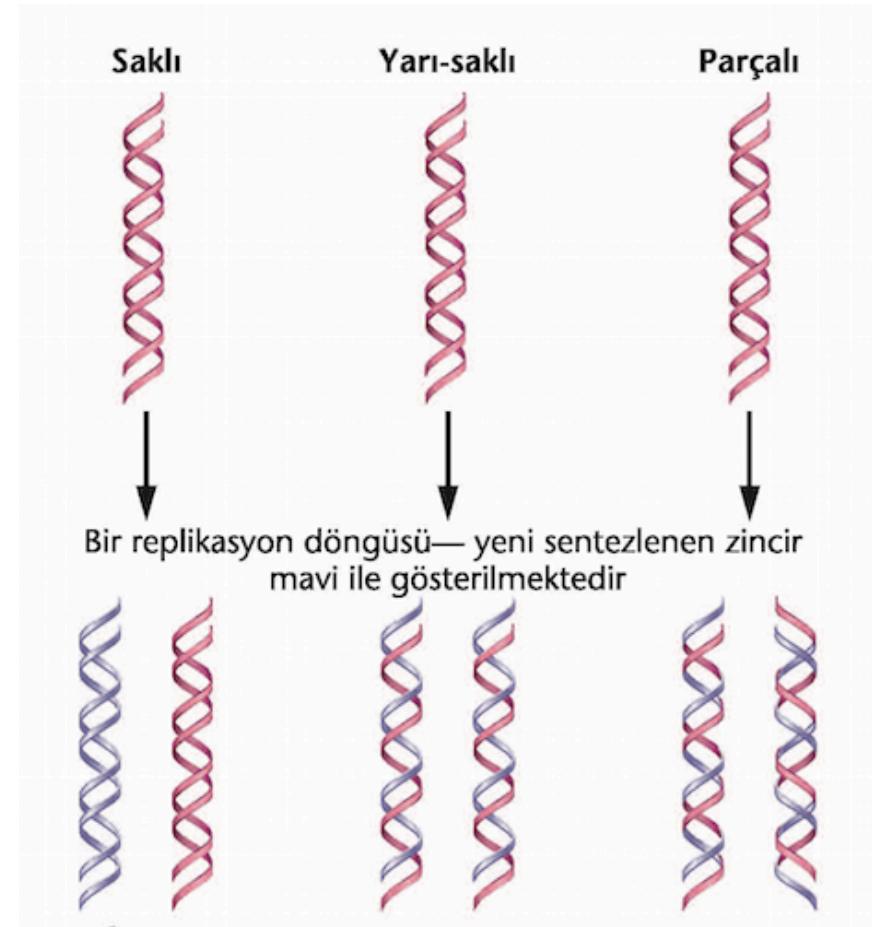
Saklı (konservatif) replikasyon

- Tamamlayıcı polinükleotit zincirleri aynı şekilde sentezlenir.
- Ancak, burada iki yeni zincir bir araya gelir.
- Atasal zincirler tekrar birleşir.
- Orijinal sarmal bu şekilde korunmuştur.



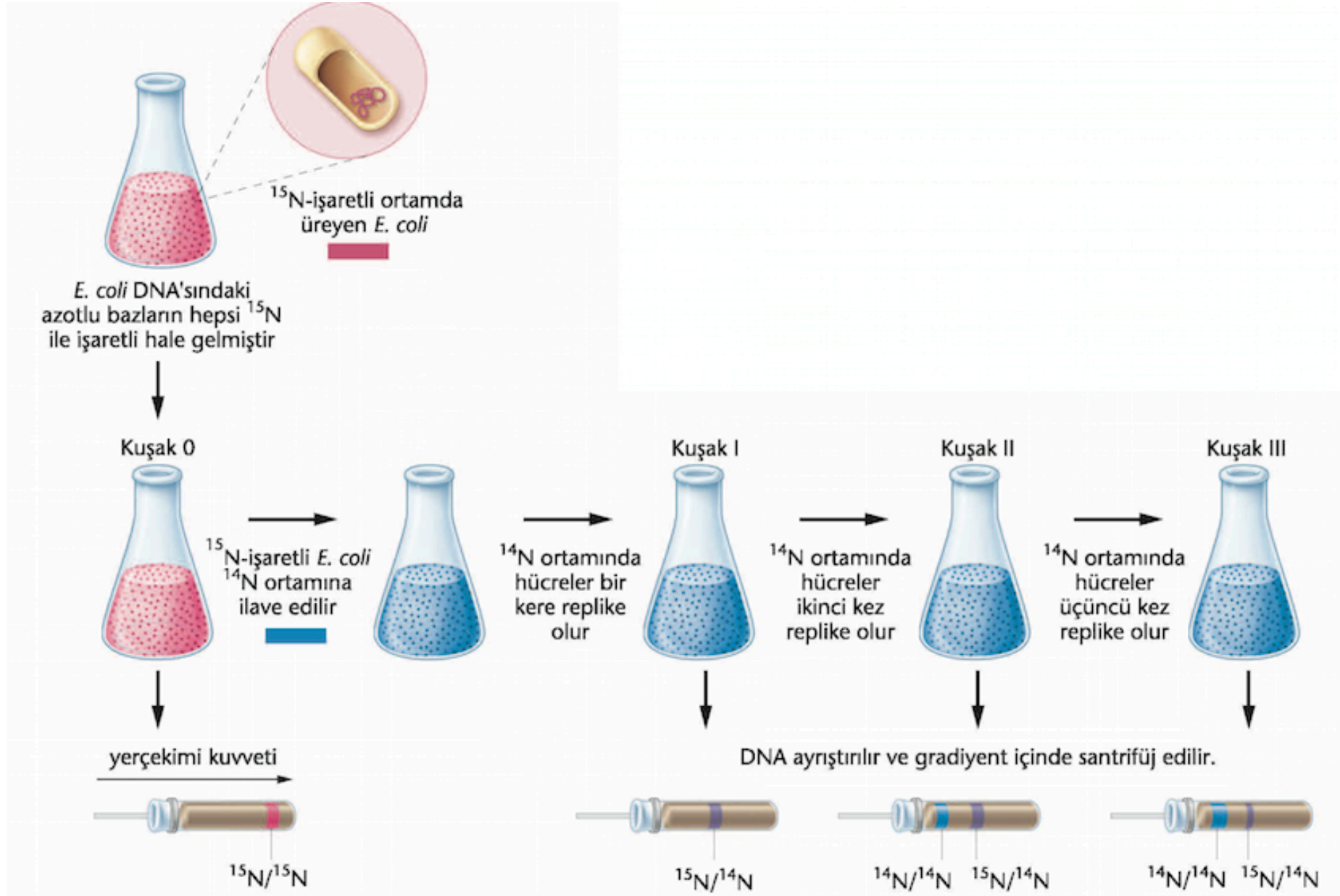
Parçalı (dispersif) replikasyon

- Atasal zincirler replikasyonun ardından iki yeni çift sarmal için dağılır.
- Böylece her bir zincirde hem eski hem de yeni DNA bulunur.
- Bu modelde atasal zincirler replikasyon esnasında kırılır.
- Karmaşıklığından dolayı bu yolun gerçekleşme ihtimali en zayıftır.



Meselson-Stahl deneyi

- 1958'de Marthew Meselson ve Franklin Stahl, bakteri hücrelerinin yeni DNA moleküllerinden yarı-saklı replikasyon ile sentezlenebildiklerine dair kuvvetli kanıtlar ortaya koyan deney sonuçları yayınlamıştır.



Meselson-Stahl deneyi

- Azot kaynağı olarak sadece $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (amonyum klorür) içeren ortamda *E. coli* hücrelerini bir çok nesil boyunca üretmişlerdir.
- ^{15}N , doğal izotopu olan ^{14}N 'e göre bir fazla nötron içerir.
- ^{15}N daha dayanıklıdır.

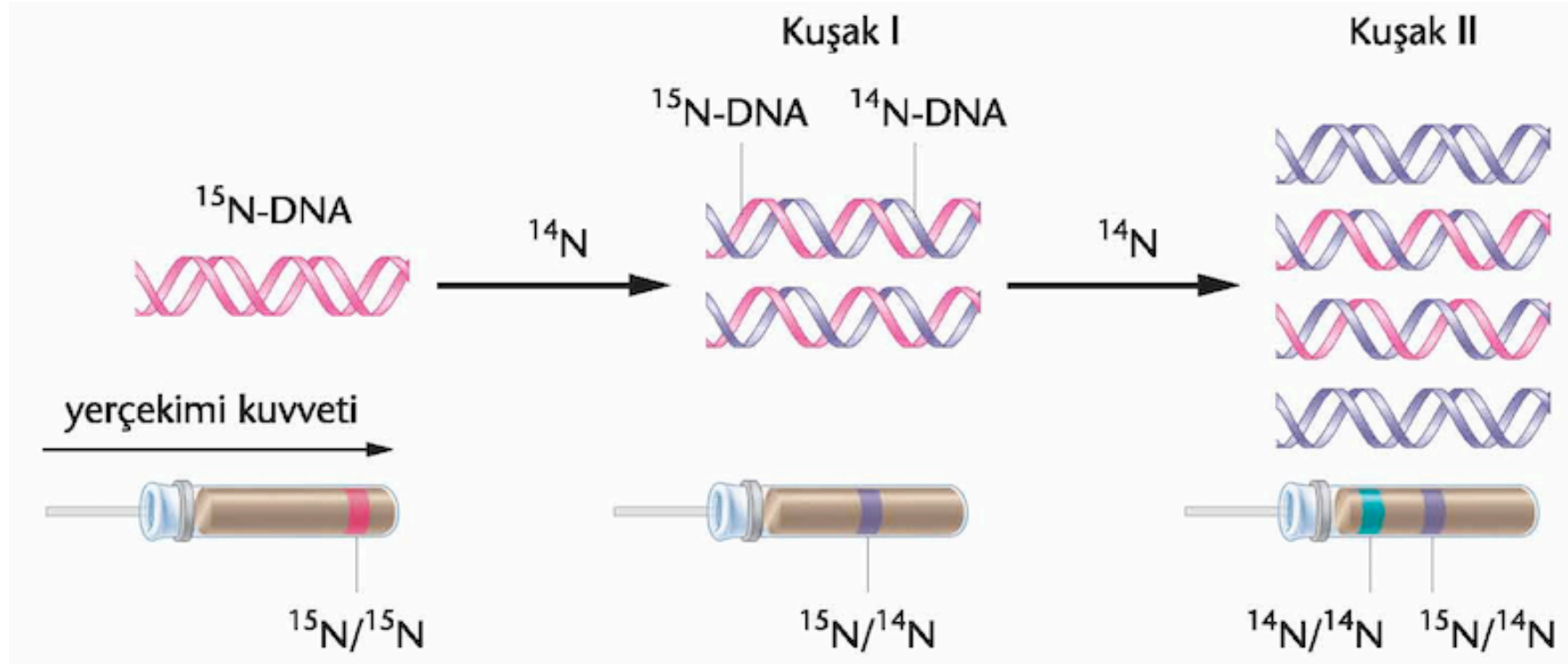
Meselson-Stahl deneyi

- ^{15}N içeren daha yoğun DNA santrifüjde daha alt kısımlarda yer alır.
- Meselson ve Stahl deneyinde, bir çok nesil boyunca *E. coli* hücrelerinde DNA'daki azotlu bazlar da dahil olmak üzere tüm azot taşıyan moleküller ^{15}N içermiş olur.

Meselson-Stahl deneyi

- Daha sonra hepsi aynı şekilde işaretili olan ^{15}N hücreleri, yalnız $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ içeren ortama aktarılır.
- Bu ortamda replikasyon sonucu DNA'lar azotun 'hafif' izotopunu taşır.

Meselson – Stahl deneyi

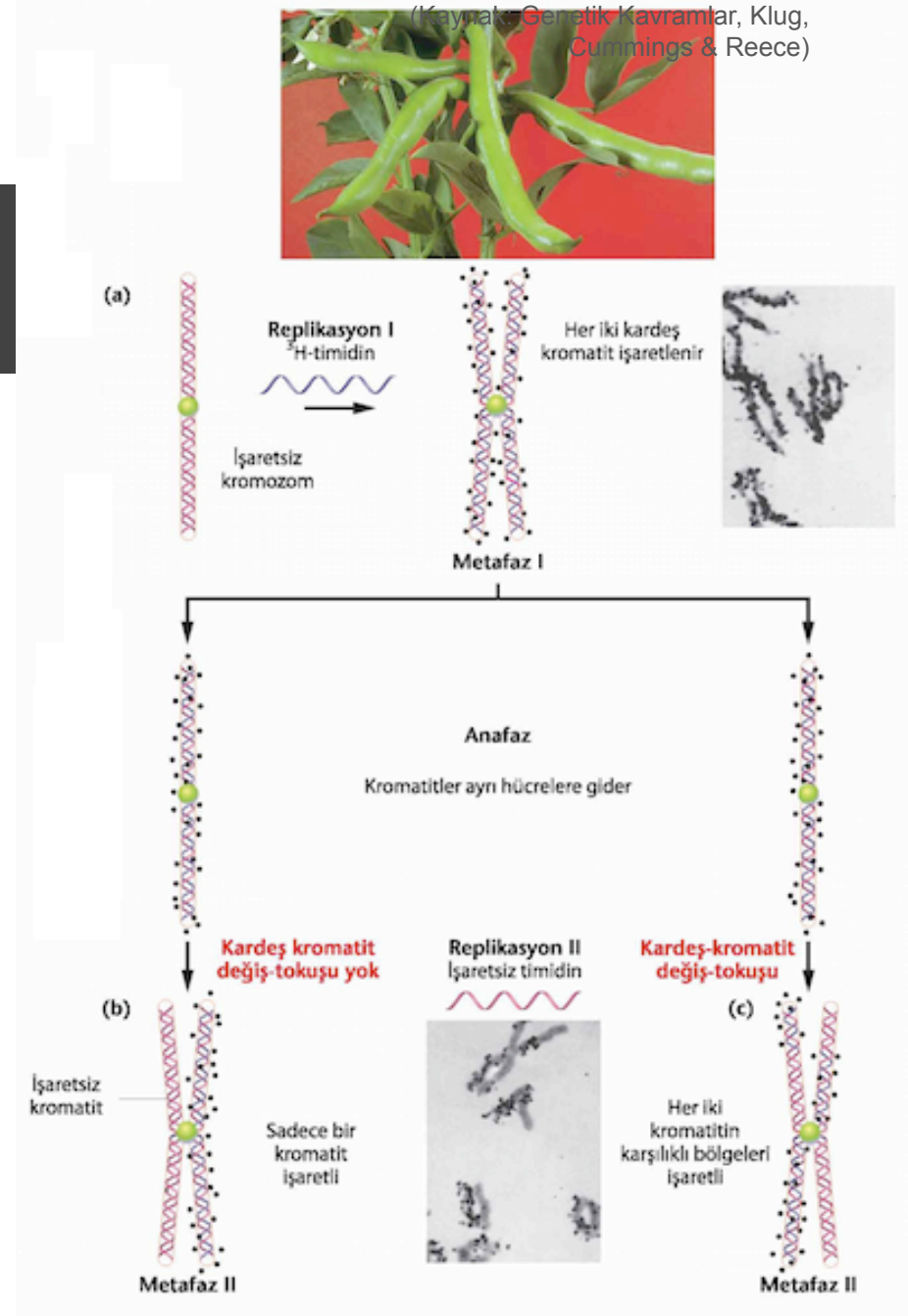


Ökaryotlarda yarı-saklı replikasyon

- Meselson ve Stahl'ın çalışmalarının yayınlanmasından önce de ökaryotlarda replikasyonun yarı-saklı mekanizmayla olduğunu gösteren bir kanıt sunulmuştu.
- *Vicia faba* (bakla) bitkisinin kök uçlarını kullanarak, bitkinin DNA'sını, DNA'nın radyoaktif öncülerinden olan ^3H -timidin ile işaretlemişlerdir.
- Otoradyografisini alarak replikasyonu izlemeyi başarmışlardır.

Ökaryotlarda yarı-saklı replikasyon

- İşaretli izotop ortamında birinci replikasyon döngüsü sonucu kardeş kromatitlerin her ikisi de radyoaktivite taşımaktadır.
- Yani her bir kromatitte bir 'yeni' sentezlenen radyoaktif işaretli DNA zinciri ve bir işaretsiz eski zincir bulunmaktadır.



Ökaryotlarda yarı-saklı replikasyon

- Otoradyografi, sitolojik olarak uygulandığında hücrelerde izotopun yerini saptayan bir tekniktir.
- Bilim adamlarının deneyleri sonucunda replikasyon mekanizmasının yarı-saklı olduğu açıkça kabul edilmiştir.

Birkaç soru soralım...

- Kromozom üzerinde DNA'nın replikasyonu nerden başlar?
- Tek bir orijin mi vardır yoksa sentez birden fazla noktadan mı başlar?
- Başlangıç noktası rastgele bir yerde mi bulunur yoksa kromozomda özgöl bir bölgede mi yer alır?
- Replikasyon başladıktan sonra tek bir yönde mi yoksa çift yönlü mü ilerler?

Replikasyon orijinleri, çatalları ve birimleri

- Kromozom üzerinde replikasyonun olduğu noktada sarmala ait zincirlerin açılmasıyla ortaya çıkan yapıya replikasyon çatalı denir.
- Bu atal önce sentezin orijin noktasında meydana gelir ve replikasyon devam ettikçe ilerler.
- Replikasyon ift yönlü ise orijinden itibaren zıt yöne doğru ilerleyen iki replikasyon çatalı oluşacaktır.

Replikasyon orijinleri, çatalları ve birimleri

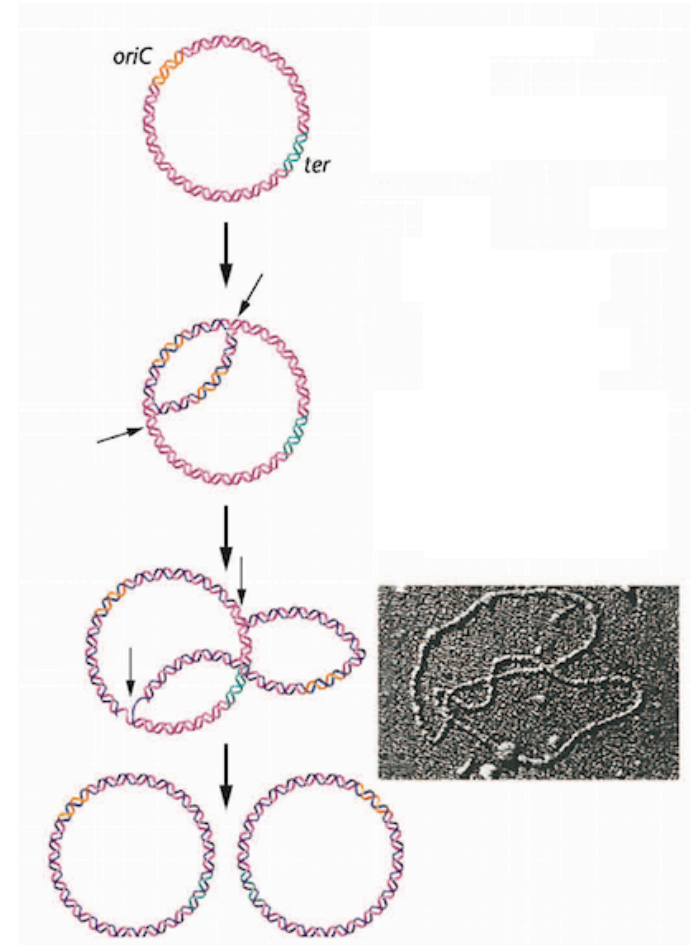
- Bir orijinden bir replikasyon başladıktan sonra, replike olan DNA'nın uzunluğunun bir birim olduğunu anlatmak için kullanılan terim replikon terimidir.
- John Cairns, *E. coli*'de replikasyonun bir orijinden başladığını göstermiştir.
- oriC olarak adlandırılan bu özgül bölgenin konumu *E. coli* kromozomu üzerinde haritalanmıştır.

Replikasyon orijinleri, çatalları ve birimleri

- Bakteriyofaj ve bakterilerde DNA sentezi bir noktada başlar.
- Bu sebeple kromozomun tümü bir replikondur.
- Tek bir halkasal kromozoma sahip bakterilerde bir orijin bulunması karakteristiktir.

Replikasyon orijinleri, çatalları ve birimleri

- Başka araştırmacılar tarafından ortaya konan çalışmaların sonucuna göre, replikasyon iki yönlüdür ve oriC'in her iki yönüne de hareket eder.



DNA sentezinde polimerazlar görev alır

- Replikasyonun yarı-saklı ve çift yönlü olduğunu öğrendik.
- Şimdi kalıp DNA üzerinden tamamlayıcı uzun polinükleotit zincirlerinin gerçek sentezinin nasıl olduğunu öğreneceğiz.
- Mikroorganizmalar yardımıyla DNA sentezinde polimerazların görev aldığı bilinmektedir.

DNA Polimeraz I

- DNA replikasyonundaki enzimoloji çalışmaları, 1957 yılında Kornberg ve arkadaşları tarafından yapıldı.
- Kornberg ve arkadaşları *E. coli*'den in vitro DNA sentezini yönlendiren bir enzim elde etmiştir.
- Bu enzim DNA polimeraz I olarak bilinmektedir.

DNA Polimeraz I

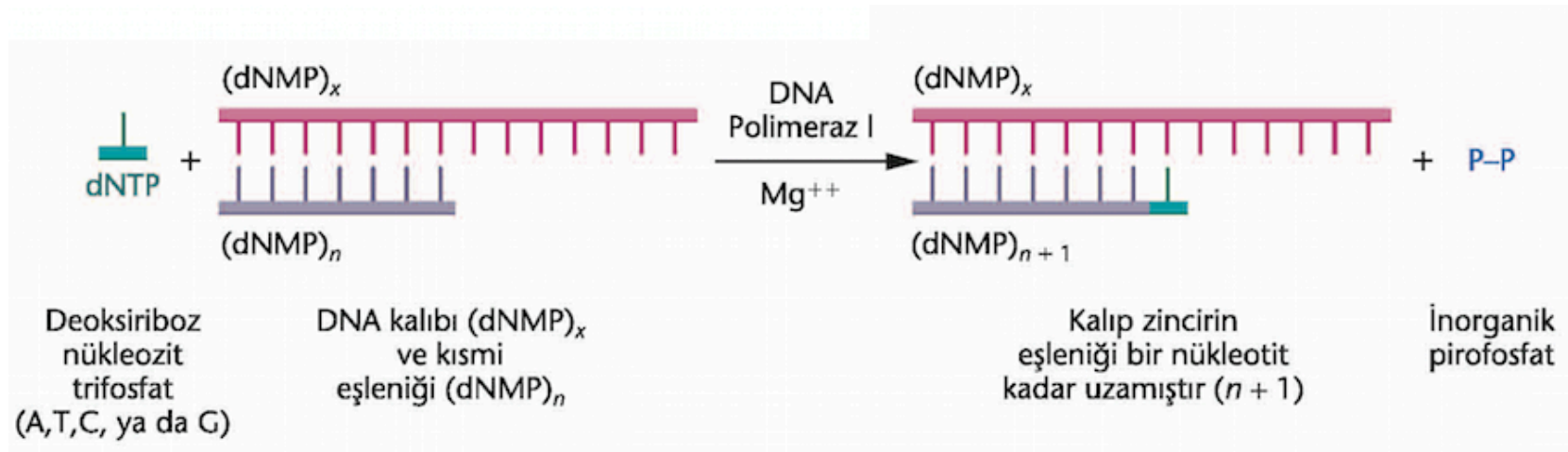
- Kornberg, DNA polimeraz I'in *in vitro* koşullarda DNA sentezleyebilmesi için 2 gereksinim olduğunu saptamıştır.
 - 4 tip deoksiribonükleozit trifosfat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
 - DNA kalıbı

DNA Polimeraz I

- Dört tip dNTP'lerden herhangi biri bulunmazsa sentez olmaz.
- Ortamda kalıp DNA bulunması da sentez için gereklidir.

DNA Polimeraz I

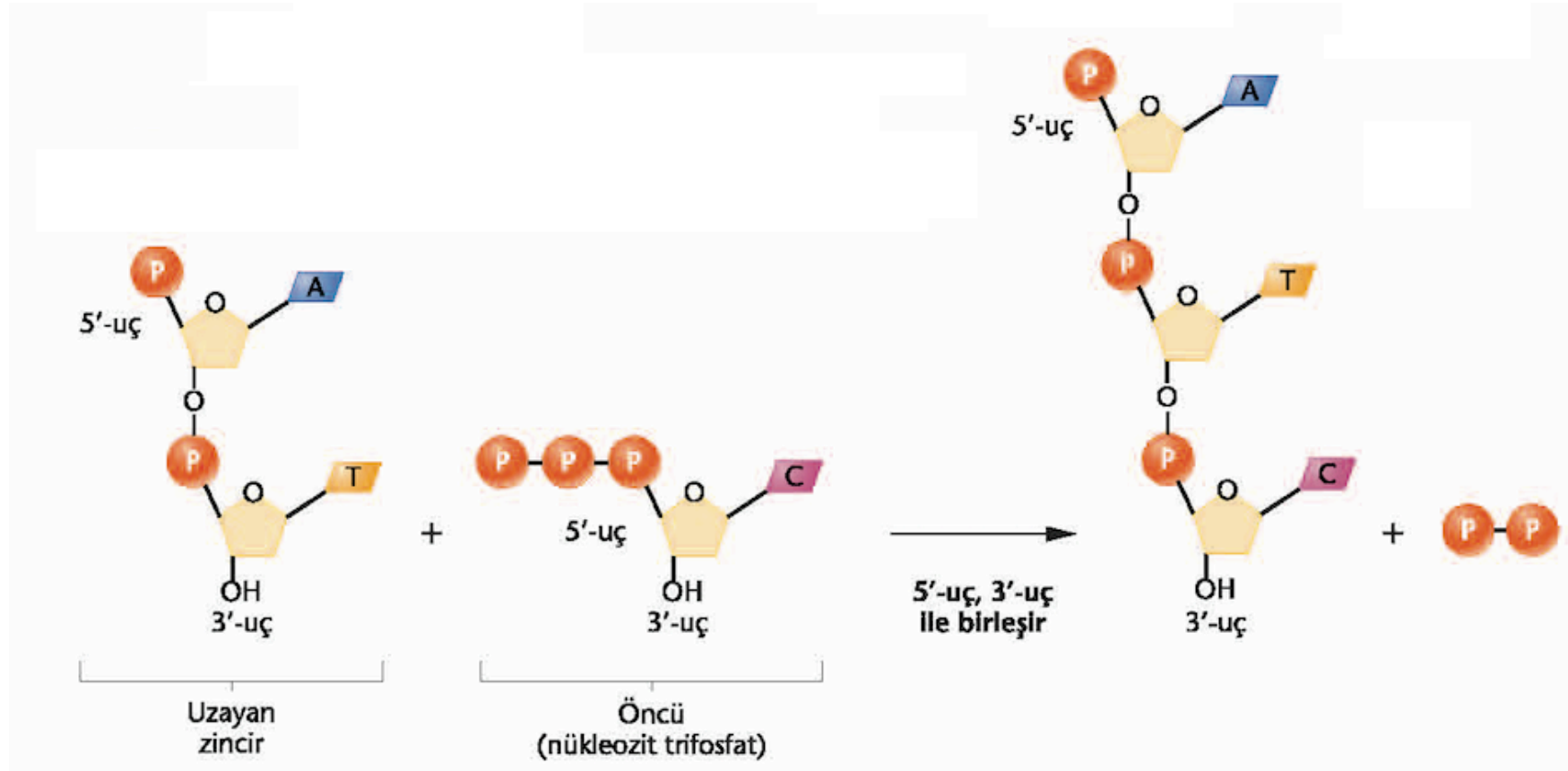
- DNA polimeraz I ile yönlendirilen sentez genelde yarı saklı replikasyondaki gibi gerçekleşir.



Zincir uzaması nasıl gerçekleşir ?

- Öncü dNTP'de, deoksiribozun 5' karbonuna üç adet fosfat grubu bağlıdır.
- Sentez esnasında uçtaki iki fosfat grubu kopar.
- 5' karbona bağlı fosfat grubu, ilave edileceği deoksiribozun 3' OH grubuna kovalent bağlanır.
- Böylece zincir uzaması 5'-3' yönünde devam eder.

Zincir uzaması nasıl gerçekleşir ?



DNA büyük doğrulukla sentezlenir

- Kornberg, DNA sentezinin nasıl gerçekleştiğini anladıktan sonra, enzimin DNA kalıbını ne derece doğrulukla sentezlediğini araştırmıştır.
- Bunun için DNA kalıbı ile yeni sentezlenen DNA'nın bazlarını karşılaştırmıştır.

	Kalıp		%A	%T	%G	%C
Organizma	ya da Ürün					
T2	Kalıp		32.7	33.0	16.8	17.5
	Ürün		33.2	32.1	17.2	17.5
<i>E. coli</i>	Kalıp		25.0	24.3	24.5	26.2
	Ürün		26.1	25.1	24.3	24.5
Dana	Kalıp		28.9	26.7	22.8	21.6
	Ürün		28.7	27.7	21.8	21.8

Kaynak: Kornberg (1960).

Polimeraz I DNA sentezinden sorumlu tek enzim midir?

- Kornberg'in çalışmalarına rağmen araştırmacıların tümü DNA polimeraz I'in hücrede DNA'yı kopyalayan tek enzim olduğuna ikna olmamışlardır.
- Bunun sebebi;
 - DNA'nın in vitro sentezinin in vivo sentezine göre çok yavaş olması
 - Enzimin tek zincirli DNA'yı, çift zincirli DNA'ya göre daha etkin bir biçimde kopyalaması
 - Enzimin DNA'yı yıkabilmesi yani ekzonükleaz aktivite göstermesiydi.

Polimeraz I DNA sentezinden sorumlu tek enzim midir?

- Kornberg'e göre DNA polimeraz I, *in vitro* koşullarda biyolojik olarak aktif DNA sentezleyebiliyorsa, hücre içinde de DNA sentezinin başlıca katalizörü olmalıydı.
- Biyolojik olarak aktif ifadesi, sentezlenen DNA'nın metabolik aktiviteleri destekleyebilmesi ve kopyalandığı organizmanın üremesini yönlendirebilmesi anlamında kullanılmaktadır.

Polimeraz I DNA sentezinden sorumlu tek enzim midir?

- Polimeraz I'in biyolojik olarak aktif DNA sentezinde görevli enzim olduğu saptanmıştı.
- Fakat Peter DeLucia ve John Cairns'in DNA polimeraz I aktivitesine sahip olmayan mutant bir *E. coli* suşunda yaptıkları deney, polimeraz I'in gerçek biyolojik rolü hakkında şüpheler uyandırmıştır.

Polimeraz I DNA sentezinden sorumlu tek enzim midir?

- Polimeraz I aktivitesi göstermeyen yani polA1 mutasyonu içeren bu *E. coli* suşu;
 - DNA'sını kopyalayıp üremeyi başarmış, ancak hücreler onarım bakımından çok yetersiz kalmıştır.
 - Örneğin mutant suş UV ya da radyasyona son derece hassastır.
 - Oysa mutant olmayanlar UV hasarını önemli derecede tamir edebilir.

Polimeraz I DNA sentezinden sorumlu tek enzim midir?

- Bu gözlemlerden 2 sonuç elde edilmiştir.
 - *E. coli*'de *in vivo* DNA replikasyonundan sorumlu en az bir enzim daha bulunmalıdır.
 - DNA polimeraz I'in *in vivo* koşullarda bir işlevi daha bulunabilir.
- Bugüne kadar polimeraz I aktivitesi olan veya olmayan hücrelerden 4 özgün DNA polimeraz elde edilmiştir.

DNA Polimeraz I,II ve III

- Bu üç enzimin hiçbiri bir kalıptan DNA sentezi başlatamaz.
- Üçü de primer adı verilen bir DNA zincirini kalıp boyunca uzatabilir.

BAKTERİ POLİMERAZLARI I, II VE III'ÜN ÖZELLİKLERİ

ÖZELLİKLER	I	II	III
Zincir sentezinin başlatılması	-	-	-
5'-3' polimerizasyonu	+	+	+
3'-5' ekzonükleaz aktivitesi	+	+	+
5'-3' ekzonükleaz aktivitesi	+	-	-
Hücre başına polimeraz molekülü	400	?	15

DNA Polimeraz I,II ve III

- DNA polimeraz enzimlerinin hepsinin ağırlığı 100.000 Dalton'un üzerindedir.
- Üçünün de 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi bulunur.

Ekzonükleaz aktivitesi ne demektir?

- Polimerizasyonu tek yönde gerçekleştirme, bir an duraksayıp yön değiştirerek ilave edilen nükleotidleri çıkarabilme aktivitesini ifade eder.
- Bu aktivite yeni sentezlenen DNA'da hata olup olmadığını kontrol eder (proof reading) ve yanlış girmiş nükleotidleri doğrusu ile değiştirir.

Ekzonükleaz aktivitesi

- DNA polimeraz I'in 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi de vardır.
- Bu aktivite, sentezin başladığı uçtan itibaren nükleotidlerin kesilmesini ve sonra sentez yönünde işlevine devam etmesini sağlar.

Kornberg neden DNA polimeraz III'e degil de I'e rastladı?

- Çünkü;
 - Hücrede polimeraz I daha fazla bulunur.
 - Polimeraz I daha dayanıklıdır.

Polimeraz III'ün işlevi

- Replikasyonda gerekli olan 5'-3' polimerizasyonundan sorumlu asıl enzimdir.
- Sentez sırasında hatalı bir nükleotid ile karşılaşıldığında onarım gerçekleştirir.
- Bu durumda sentez duraksar, polimeraz rotasını değiştirerek yanlış nükleotidi çıkarır.
- Sonra tekrar 5'-3' yönünde kalıp zincirin sentezine devam eder.

Polimeraz I'in işlevi

- Primeri uzaklaştırır ve sentez sırasında oluşan boşluklarda DNA sentezleyerek bu b6lgeleri doldurur.
- Enzimin ekzon6kleaz aktivitesi onun DNA onarımına katılmasını sağlar.

Polimeraz II'nin işlevi

- Polimeraz II, polimeraz IV ve V ile birlikte UV gibi dış etmenler sonucu hasar goren DNA onarımında yer alırlar.

Polimeraz III kompleks yapıdadır

- Polimeraz III enzimi holoenzim olarak adlandırılan yapıdadır.
- 10 farklı polipeptit zincirinden meydana gelmiş bir dimerdir.
- Molekül ağırlığı 900.000 daltondur.

Polimeraz III kompleks yapıdadır

- α alt birim ϵ ve θ alt birimleriyle birlikte holoenzimin çekirdek enzim kısmını oluşturur.
- Bu kısmın görevi polinükleotid zincirini uzatmak ve oluşan nükleotid hatalarını okumaktır.

Polimeraz III kompleks yapıdadır

- Beş alt birimin oluşturduğu (γ , δ , δ' , χ , ψ) 2. grup olan γ kompleksi, replikasyon çatallında enzimin kalıba oturtulmasında rol alır.
- Bu enzimatik işlev için ATP gereklidir.

Polimeraz III kompleks yapıdadır

DNA POLİMERAZ III HOLOENZİMİNİN ALT BİRİMLERİ

ALT BİRİM	İŞLEV	GRUPLAMA
α	5'-3' polimerizasyon	'Çekirdek" enzim:
ϵ	3'-5' ekzonükleaz	Polinükleotit zincirini
θ	çekirdek yapısının kurulması	uzatır ve hata okur
γ		
δ	Enzimi kalıba yükler	γ kompleksi
δ'	(kıskaç görevi görür)	
χ		
ψ		
β	Kıskaç yapısını kaydırır(işlerlik faktörü)	
τ	Çekirdek kompleksini dimer hale getirir	

Polimeraz III kompleks yapıdadır

- β alt birimi 'kıskaç' işini görür ve polimerizasyon sırasında çekirdek enzimin kalıptan kopmamasını sağlar.
- τ alt birimi, iki çekirdek polimerazın dimerize olmasını sağlar.
- Ayrıca replikasyon çatallında sarmalın her iki zincirinin eş zamanlı sentezini kolaylaştırır.

DNA replikasyonu sırasında karmaşık olayların özölmesi gerekir

- Sarmalın yer yer açılması ve her iki zincirde sentezin devam etmesi için bu 'açık' konfigürasyonunun dayanıklı olmasını sağlayan bir mekanizma bulunmalıdır.
- Sarmalın açılması ve sonrasında DNA sentezi ilerlerken, zincirin daha aşağı kısımlarında sarmalın sıkışması sonucunda ortaya çıkan gerilim düşürülmelidir.

DNA replikasyonu sırasında karmaşık olayların çözülmesi gerekir

- DNA polimeraz III'ün polimerizasyonu yönlendirebilmesi için bir çeşit primer sentezlenmelidir.
- Bu primer RNA'dır.
- RNA primeri sentezlendikten sonra DNA polimeraz III, atasal molekülün her iki zincirinin tamamlayıcısı olan DNA zincirini sentezlemeye başlar.

DNA replikasyonu sırasında karmaşık olayların çözülmesi gerekir

- Replikasyonun tamamlanmasından önce RNA primerlerinin uzaklaştırılması gereklidir.
- Oluşan geçici boşlukların bulunduğu yerler, kalıp DNA eşleniği ile doldurulmalıdır.
- Boşlukları doldurmak için sentezlenen DNA, bitişindeki DNA zinciri ile birleştirilmelidir.

DNA replikasyonu sırasında karmaşık olayların çözülmesi gerekir

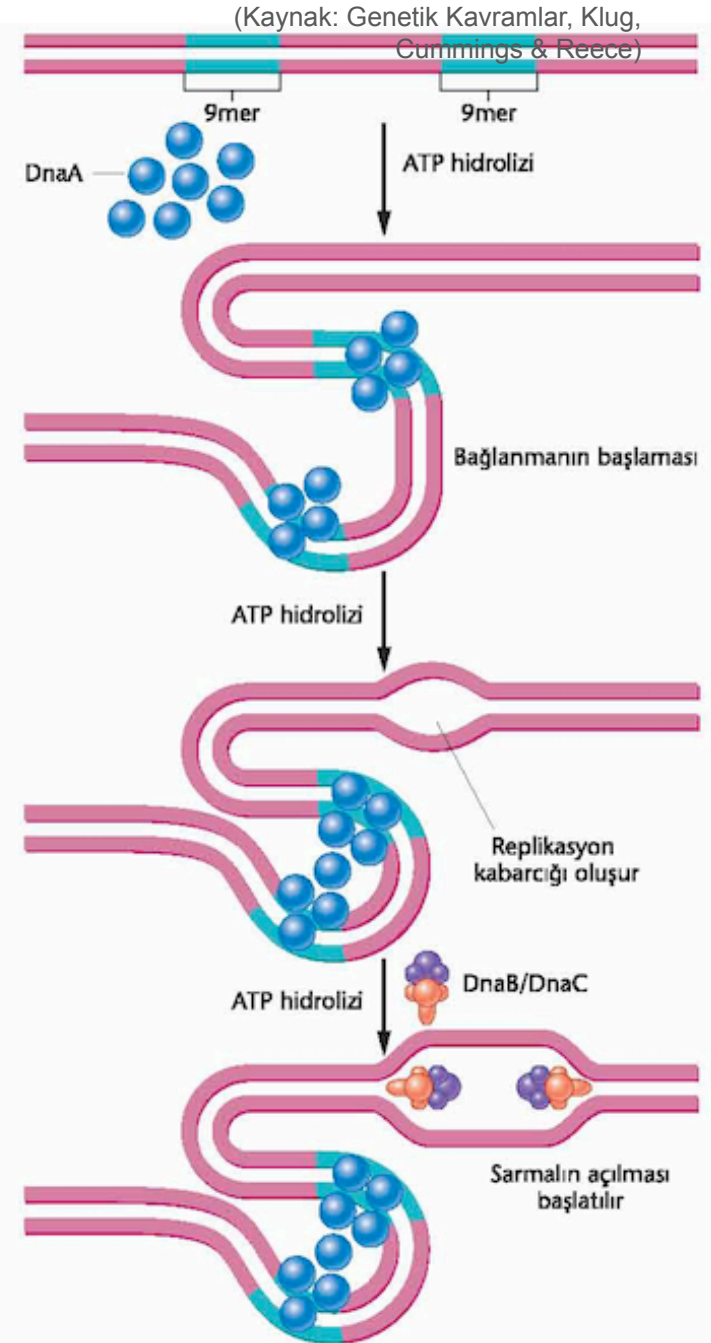
- Kopyalama sırasında DNA polimerazlar eşlenik bazları doğru biçimde takmaktadır, ancak hata olasılığı da vardır.
- Bazen sentezlenen zincire yanlış bazlar ilave edilebilir.
- Sentez işleminin bir parçası olan bir hata okuma mekanizması (proof reading) DNA sentezi sırasında oluşan hataları düzeltir.

DNA sarmalı açılmalıdır

- Çoğu bakteri ve virüslerin halkasal kromozomlarında, DNA sentezinin başladığı orijin noktası bulunur.
- Çoğunlukla *E. coli*' de çalışılan bu bölge oriC olarak adlandırılır.
- 9 ve 13 bazdan oluşur (9mer ve 13mer olarak adlandırılır) ve tekrar dizilerinin bulunduğu 245 baz çifti içerir.

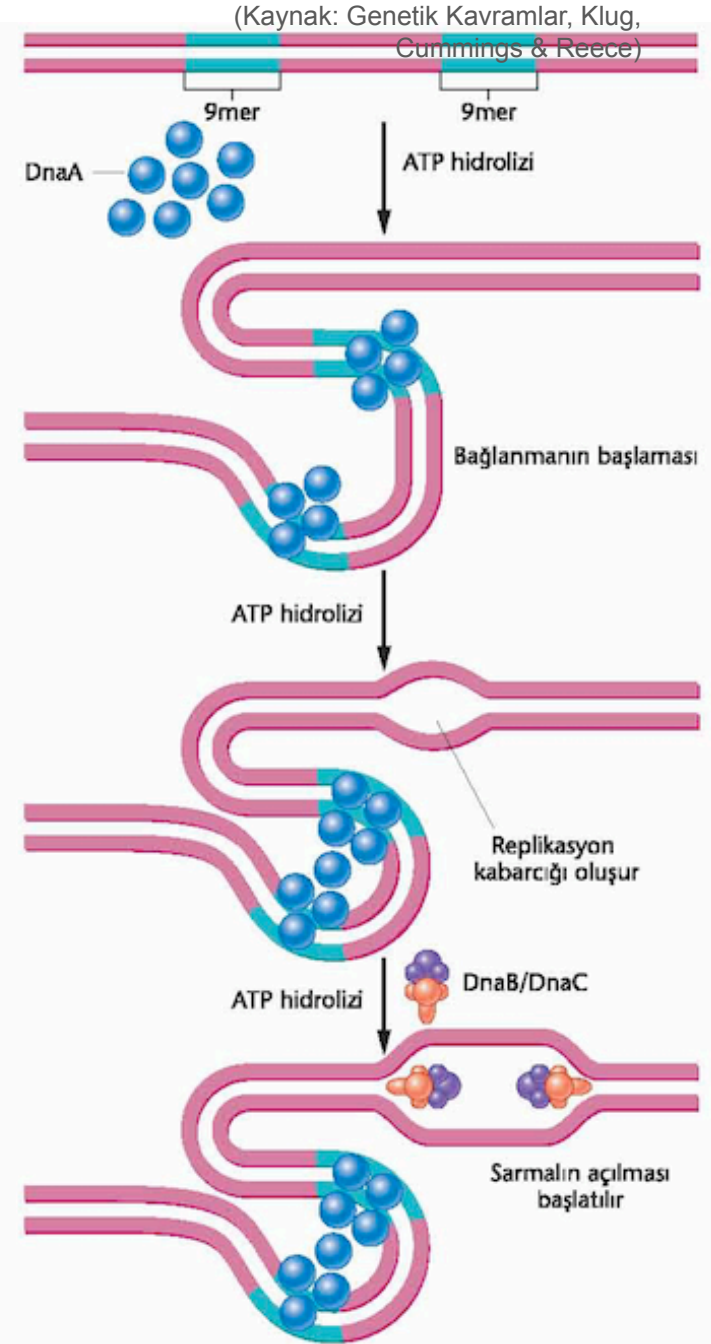
DNA sarmalı açılmalıdır

- DnaA denen özgül bir protein ilk basamakta sarmalın açılmasından sorumludur.
- DnaA proteinlerinin bazı alt birimleri bir çok 9mer dizisine bağlanır.
- Bu bağlanma, sarmalın daha fazla açılmasında ve kararlılığında rol alan DnaB ve DnaC proteinlerinin bağlanmasını kolaylaştırır.



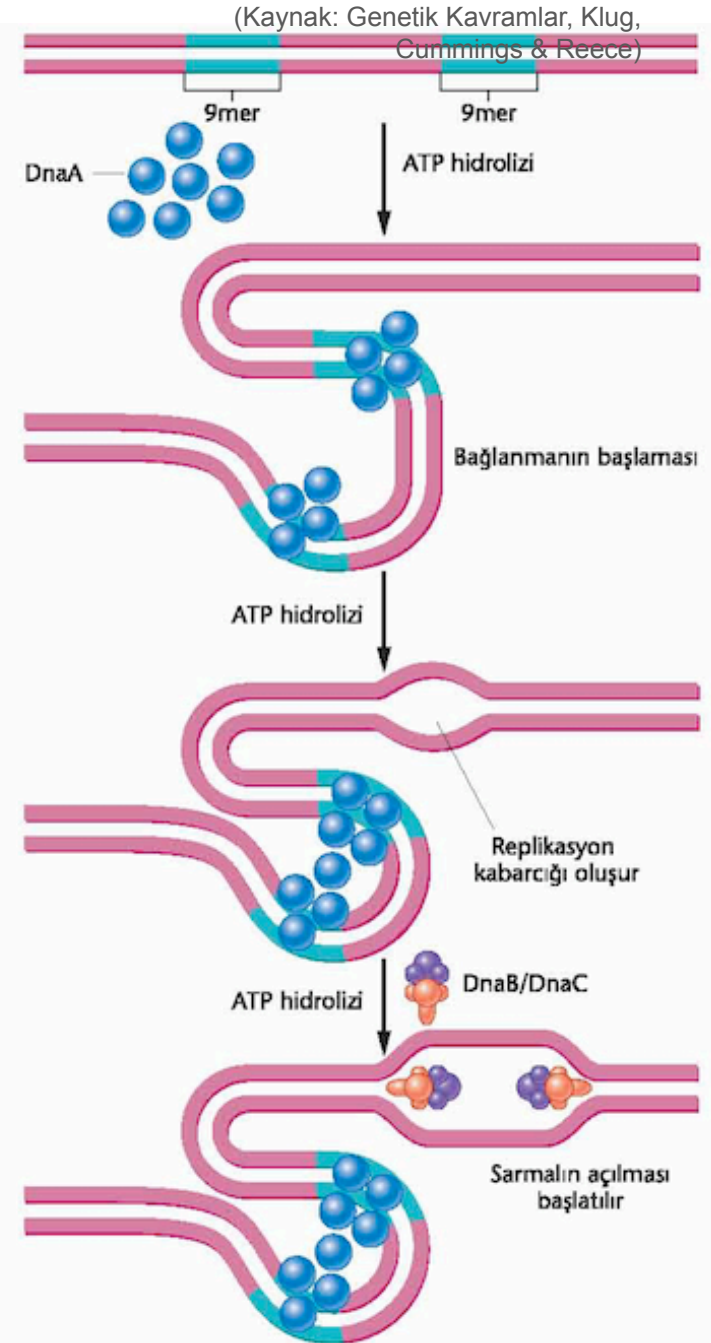
DNA sarmalı açılmalıdır

- Hidrojen bağlarını kırıp ikili sarmal yapıyı denatüre etmek için ATP hidrolizi ile sağlanan enerjiye gereksinim duyan DnaB ve DnaC gibi proteinler helikazlar olarak adlandırılır.
- Tek zincire bağlanan proteinler (single-stranded binding proteins,SSBP) olarak bilinen diğer bazı proteinler bu konformasyonu daha da kararlı kılar.



DNA sarmalı açılmalıdır

- Sarmalın açılması devam ettikçe, replikasyon çatalının önünde oluşan sarılma gerilimi, üstün kıvrılma (supercoiling) meydana getirir.
- Halkasal moleküllerde üstün kıvrılmalar, DNA'daki ek bükülmeler ve dönüşler sonucu oluşturulur.



DNA sarmalı açılmalıdır

- DNA topoizomeraazlar olarak adlandırılan geniş enzim ailesinin üyesi olan DNA giraz (DNA girase), bu tip üstün kıvrımları gevşetir.
- Giraz enzimi zincirlerde kırılmalar oluşturur ve aynı zamanda üstün kıvrılma oluşumu sırasında meydana gelen bükülmeleri ve düğümleri açma hareketini katalizler.

DNA sarmalı açılmalıdır

- Oluşan kırıklar daha sonra tekrar birleştirilir.
- Bu reaksiyonda ATP hidrolizinden çıkan enerji kullanılır.

DNA sentezi için RNA primeri gereklidir

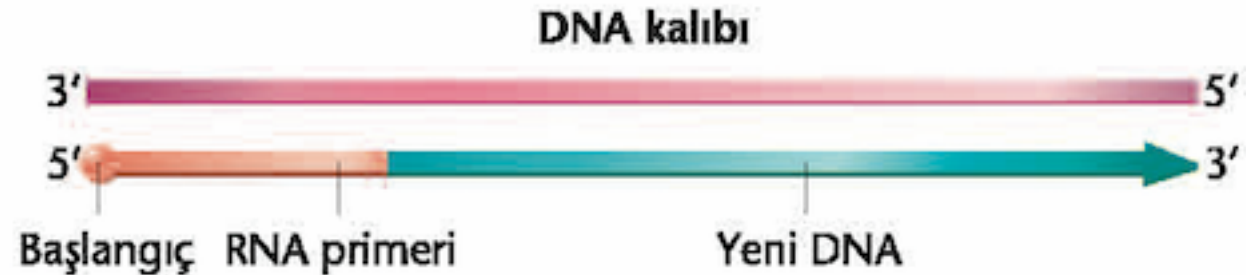
- DNA polimeraz III'ün polinükleotid zincirini uzatması için, serbest 3'-OH grubu olan bir primer gereklidir.
- Günümüzde bu primerin RNA olduğu açıkça bilinmektedir.

DNA sentezi için RNA primeri gereklidir

- Öncelikle kalıp DNA üzerinden DNA'ya eşlenik olan kısa bir RNA parçası sentezlenir.
- RNA sentezi, primaz olarak adlandırılan RNA polimerazın bir çeşidi tarafından katalizlenir.
- Primazın sentezi başlatması için serbest 3' ucu gerekmemektedir.
- DNA polimeraz III, bu kısa RNA parçasına 5'-deoksiribonükleotidleri takmaya başlayarak DNA sentezini başlatır.

DNA sentezi için RNA primeri gereklidir

- Sonraki aşamada, RNA primeri uzaklaştırılmalı ve yerini DNA'ya bırakmalıdır.
- Bu reaksiyonun DNA polimeraz I tarafından katalizlendiği düşünülmüştür.
- RNA primerinin oluşumu, virüsler, bakteriler ve çeşitli ökaryotik organizmalarda tanımlanan evrensel bir işlemdir.



Antiparalel zincirlerde DNA sentezi

- Sarmalın iki zinciri birbirine göre antiparaleldir (biri 5'-3' yönündeyken diğerinin 3'-5' yönünde).
- DNA polimeraz III, DNA sentezini sadece 5'-3' yönünde gerçekleştirebilir.

Antiparalel zincirlerde DNA sentezi

- Sentez, replikasyon çatalı boyunca zincirin birinde bir yönde, diğerinde zıt yönde ve aynı anda gerçekleşir.
- Sonuç olarak çatalı boyunca sadece bir zincir sürekli DNA sentezi için kalıp olarak kullanılır.

Kesintisiz ve kesintili DNA zincirleri

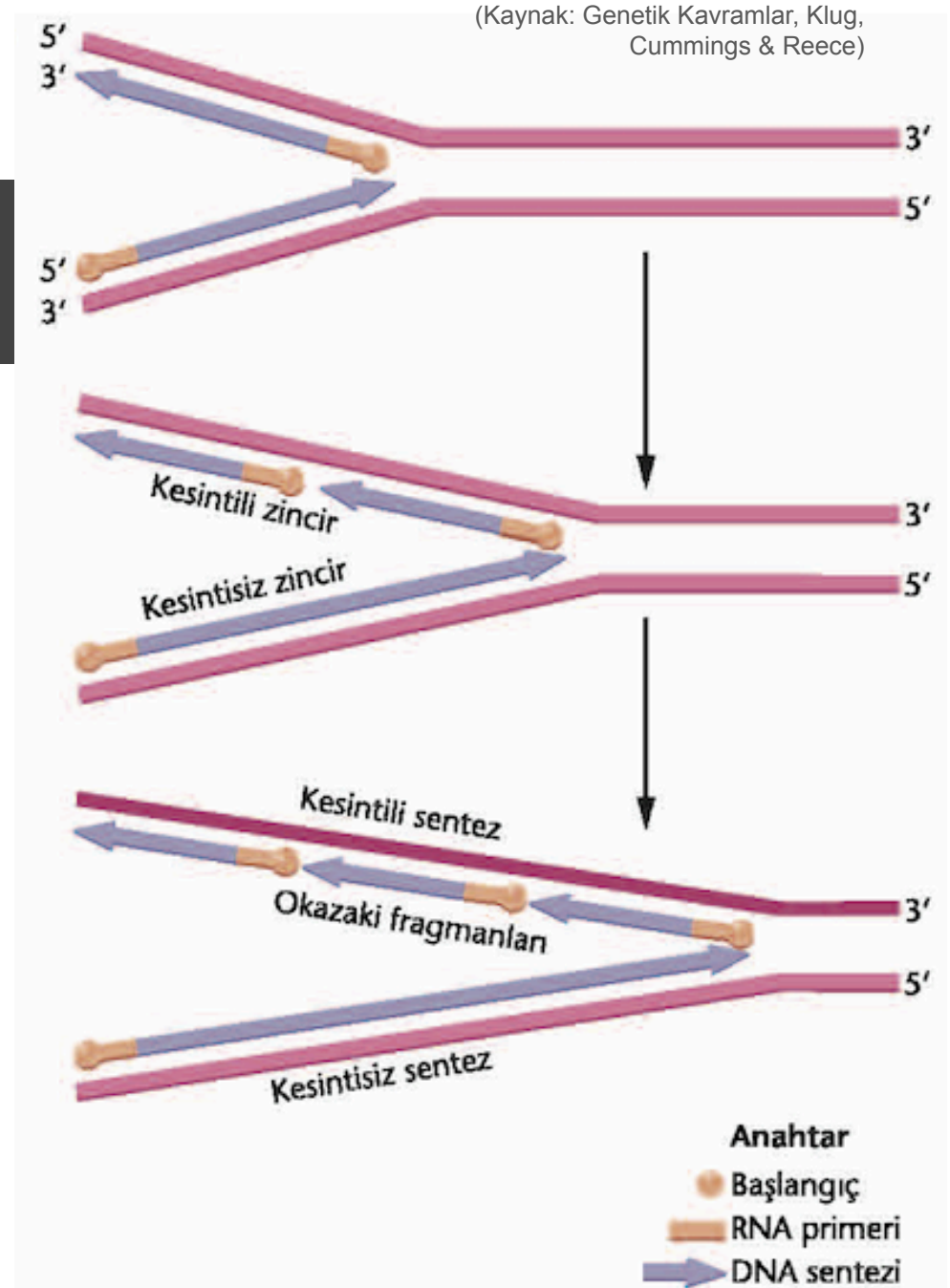
- DNA sentezi sonucu oluşan yeni zincire kesintisiz zincir (leading strand) denir.
- Diğer zincirde ise DNA sentezi ilerledikçe bir çok başlangıç noktası gereklidir.

Kesintisiz ve kesintili DNA zincirleri

- Sonuç olarak bu zincirde kesintili DNA sentezi yapılır.
- DNA sentezi, zincirin birinde kesintili, diğesinde kesintisiz meydana geldiği için bu işlemin tümü için yarı kesintili sentez (semi discontinuous synthesis) terimi kullanılır.

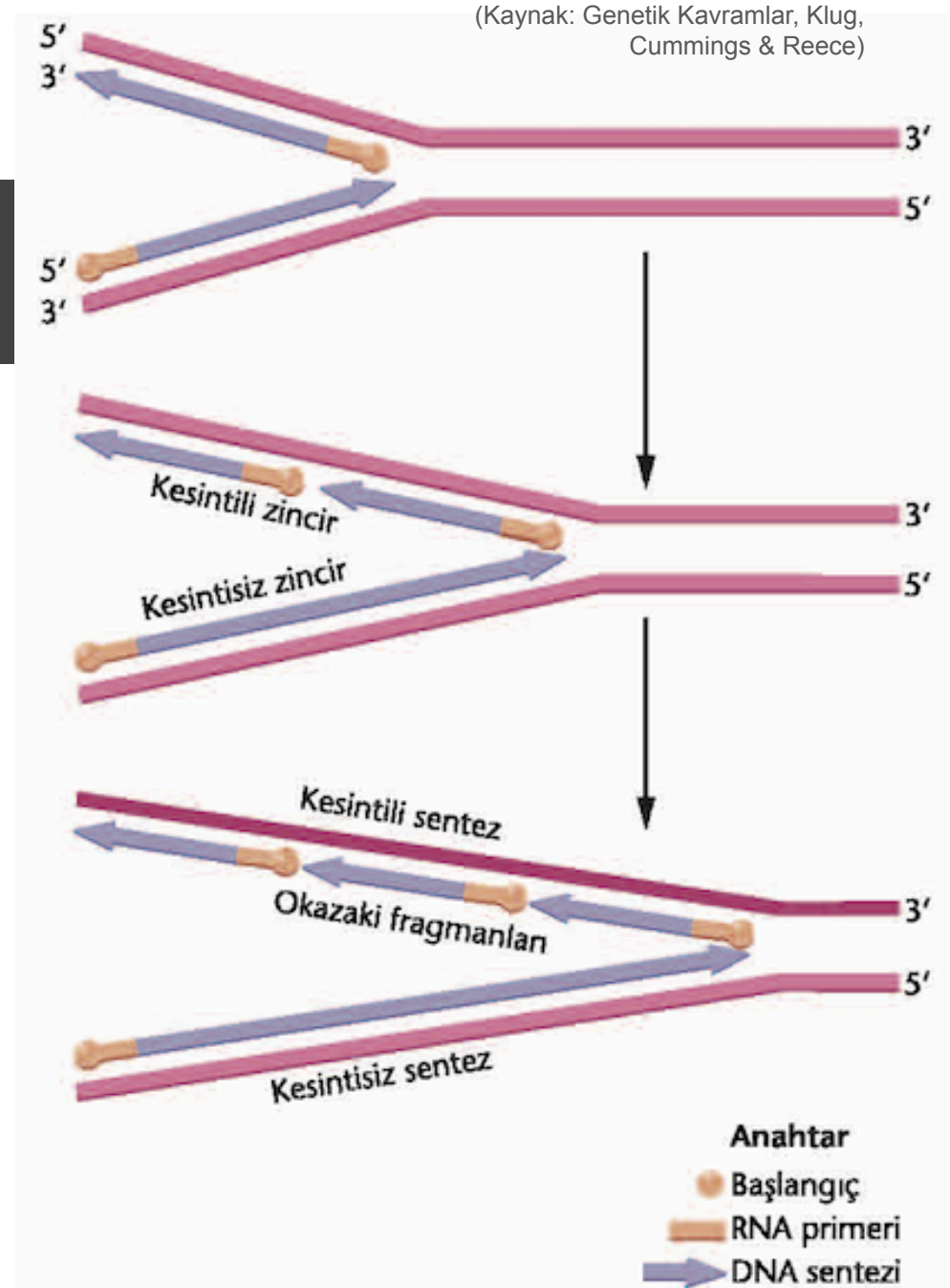
Kesintili-kesintisiz zincir ve Okazaki fragmentleri

- DNA zincirleri birbirine antiparalel olduğu için ve DNA polimeraz III sadece tek yönde sentez gerçekleştirdiği için,
- Kesintili zincirde sentez sürekli değildir ve okazaki fragmentleri ortaya çıkar.



Kesintili-kesintisiz zincir ve Okazaki fragmentleri

- Kesintisiz zincirde sentez süreklilik gösterir.
- Her iki zincirde de sentezi başlatmak için RNA primeri kullanılır.



Kesintili DNA sentezini destekleyen kanıtlar

- Bu kanıtlar ilk olarak Reiji ve Tuneka Okazaki tarafından elde edilmiştir.
- Bu araştırmacılar, *E. coli*'de bakteriyofaj DNA'sının replikasyonu sırasında sentezlenen DNA'nın bir kısmının küçük parçalar halinde olduğunu göstermiştir.

Okazaki fragmentleri

- RNA primeri, DNA'nın bir bölümünü oluşturan küçük parçaların bir kısmını oluşturmaktadır.
- Okazaki parçaları olarak adlandırılan bu parçacıklar sentez devam ettikçe moleküler ağırlıklarını arttırarak daha uzun DNA zincirlerine dönüşür.

DNA ligaz ve DNA polimeraz I

- DNA polimeraz I, primerin uzaklaştırılması ve eksik nükleotidlerin yerine konulmasından sorumludur.
- Fragmanların birleştirilmesi işini DNA ligaz yapar.
- DNA ligaz kesintili sentezlenen zincirler arasındaki boşluğu kapatır.

Birkaç soru !!!

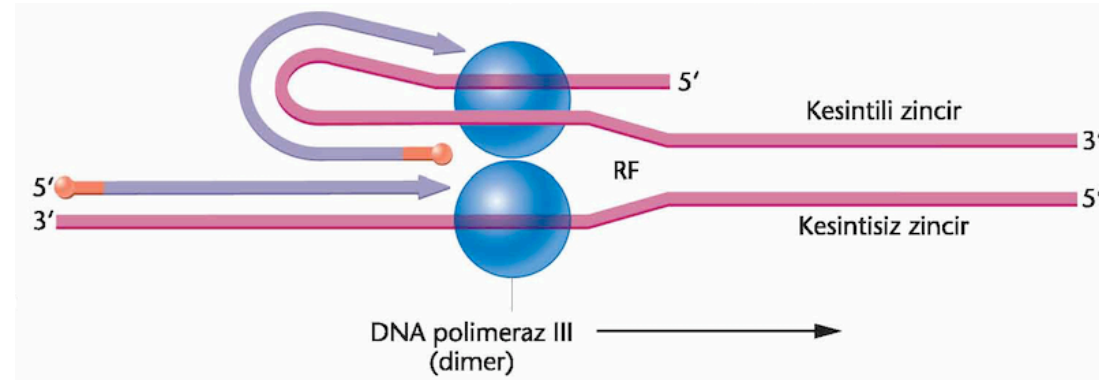
- Okazaki modelinde, DNA polimeraz III, DNA sentezini kesintili ve kesintisiz zincirlerde nasıl eş zamanlı olarak gerçekleştirir?
- Bu iki zincir aynı replikasyon atalında aynı anda mı kopyalanır yoksa bu işlemler enzimin kopyasını içeren iki ayrı olay mıdır?

Sentez kesintili ve kesintisiz zincirlerde aynı anda yapılır

- Nükleotid polimerizasyonu, enzimin dimerik bir formu tarafından her iki zincirde birden gerçekleştirilir.
- Elde edilen veriler her iki zincirin aynı anda kopyalandığına işaret etmektedir.

Sentez kesintili ve kesintisiz zincirlerde aynı anda yapılır

- Sentezin fiziksel yönünü değiştirmek için kesintili zincir ilmek oluşturur.
- Ancak sentezin biyokimyasal yönü değişmez (5'-3').
- Enzim dimer olarak işlev görür ve dimerin enzimlerinden her biri zincirlerden birinin ya da diğerinin üzerinden sentezi gerçekleştirir.



Hata okuma (proof reading) ve düzeltme

- DNA replikasyonda, her nükleotidi tamamen kalıp zincirin eşleniği olan yeni bir zincir sentezlenir.
- DNA polimeraz, sentezi çok doğru yaptığı halde kusursuz değildir.
- Eşlenik olmayan bir nükleotid zincire girebilir.

Hata okuma (proof reading) ve düzeltme

- Eşlenik olmayan nükleotid zincire girdiği zaman bu tip hataların giderilmesi için belirli aktiviteler gözlenir.
- DNA polimerazların hepsi 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi gösterir.
- Bu özellik DNA polimerazlarla yanlış eşleşen nükleotidleri saptama ve yapıdan çıkarma potansiyeli sağlar.

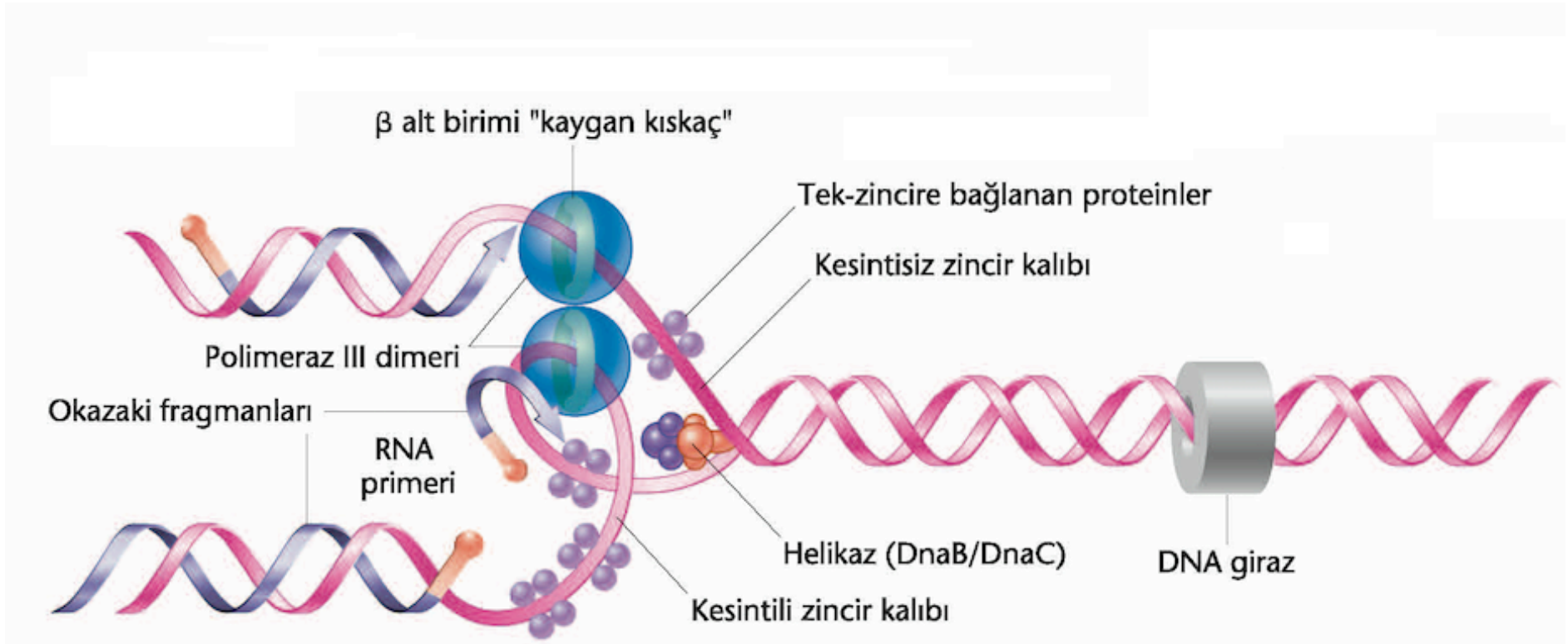
Hata okuma (proof reading) ve düzeltme

- Yanlış eşleşmiş nükleotid çıkarıldıktan sonra sentez 5'-3' yönünde yeniden devam eder.
- Hata okuma denen bu işlev, sentezin doğruluğunu 100 kez arttırır.
- DNA polimeraz III'n ϵ (epsilon) alt birimi hata onarım basamağına doğrudan katılır.

DNA replikasyonu uygun bir modelle açıklanır

- Replikasyon çatallında gerçekleşen DNA kopyalanmasını uygun bir model üzerinde inceleyebiliriz.
- İlerleyen çatalda, helikaz enzimi ikili sarmalı açar.
- Sarmal açılınca, tekrar sarmal oluşmasını engellemek için açılan zincirlere tek zincirlere özgü proteinler bağlanır.

DNA replikasyonu uygun bir modelle açıklanır



DNA replikasyonu uygun bir modelle açıklanır

- İlerleyen replikasyon çatallında DNA giraz, kıvrımların yarattığı gerilimi azaltma görevi görür.
- Polimeraz dimerini oluşturan her bir çekirdek enzim, kalıp zincirlerden birine kaygan kısaç yardımıyla bağlanır.
- Sentezin her iki zincirde de aynı anda gerçekleşmesi için kesintili zincir ilmek oluşturmaktadır.

Replikasyonu kontrol eden genler

- Virüs ve bakteride DNA kopyalanması hakkındaki bilgilerimizin çoğu bu işlemlerin genetik analizlerine dayanır.
- Genetik analizlerde genellikle bir koşulda kendini gösteren ancak başka bir koşulda gözlenmeyen koşullu mutasyonlar kullanılır.
- Örneğin sıcaklığa-hassas mutasyon, belirli bir sıcaklık koşulunda etkisini göstermez.

Gen ürünlerinin görevleri

- Gen ürünleri;
 - Replikasyon orijinlerinin belirlenmesi
 - Sarmalın açılması
 - Sarmalın dayanıklılığı
 - Sentezin başlaması
 - Primer oluşumu
 - Üstün kıvrılmanın gevşemesi
 - Hata onarımı ve serbest uçların birleştirilmesiolaylarına katılır.

Ökaryotik DNA sentezi prokaryotik DNA sentezine benzerdir

- Araştırmalara göre ökaryotik DNA sentezi bir bakıma bakterilerdekine benzemektedir.
- Her iki sistemde de DNA, replikasyon orijinlerinden açılarak, replikasyon çatalı oluşur.
- DNA polimerazın yönetiminde, kalıplardan çift yönlü DNA sentezi kesintisiz ve kesintili zincirleri oluşturur.

Ökaryotik DNA sentezi prokaryotik DNA sentezine benzerdir

- Ökaryotik polimerazların da bakteriyel sistemde olduğu gibi temel gereksinimleri vardır.
- İki sentezde de;
 - Dört tip deoksiribonükleosit trifosfat
 - Kalıp DNA
 - Primer gereklidir.

Ökaryotik DNA sentezi ile prokaryotik DNA sentezi arasındaki 'farklar'

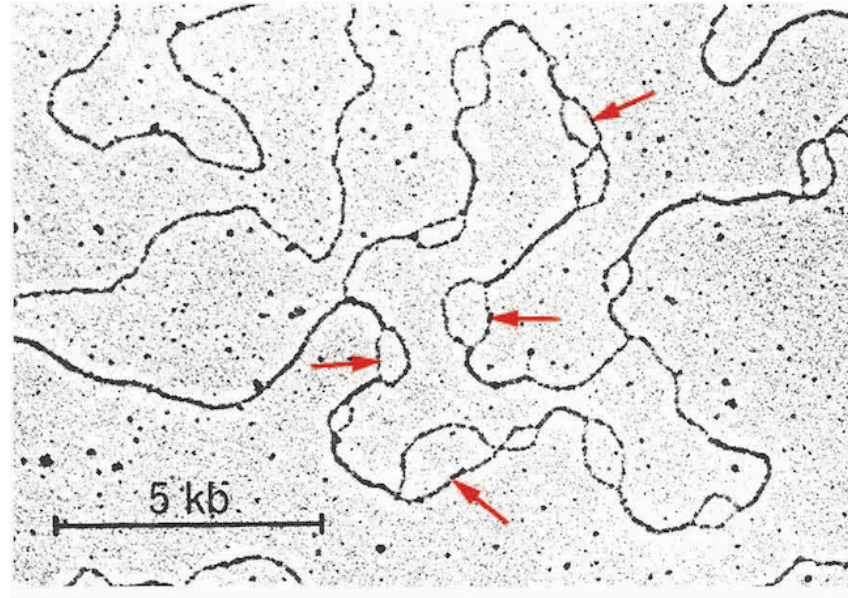
- Ökaryotik hücrelerde hücre başına düşen DNA miktarı fazla olduğundan ökaryotik kromozomlar, halkasal yerine doğrusaldır.
- Ökaryotik hücreler, bakterilerin karşılaşmadığı bazı sorunlarla yüz yüze gelir çünkü kompleks canlılardır.

Çoklu replikasyon orijini

- Prokaryotik ve ökaryotik DNA replikasyonu arasındaki en belirgin fark çoklu replikasyon orijinidir.
- *E. coli* kromozomunda bir replikasyon orijini bulunurken, ökaryotik kromozomda bir çok replikasyon orijini bulunur.

Çoklu replikasyon orijini

- Elektron mikroskopunda sarmal açıldıkça 'replikasyon baloncukları' olarak görüntülenen çoklu orijinlerin her biri birer potansiyel replikasyon çatalı sağlar.



Çoklu replikasyonda ilk bulgular

- Birden fazla orijinin ve bu orijinlerden DNA sentezinin başlamasının moleküler mekanizmasına açıklık getiren birçok kavram artık ortaya çıkarılmıştır.
- İlk bulguların çoğu 250-400 replikonu bulunan mayalardan elde edilmiştir.
- Mayadan elde edilen replikasyon orijinlerine, 'özerk replike olan diziler' (Autonomously Replicating Sequences, ARS) denir.

Orijin tanıma kompleksi (ORC)

- Polimerazın, kompleks DNA arasında ARS dizilerini nasıl bulduğu açıkça bir moleküler tanıma sorunudur.
- Çözüm, S fazından önce başlayan bir mekanizmadır.
- Hücre döngüsünün G₁ fazı sırasında bütün ARS dizilerine bazı özgül protein grupları bağlanır ve orjin tanıma kompleksi (Origin Recognition Complex, ORC) meydana gelir.

Ökaryotik DNA polimerazlar

- Ökaryotik replikasyonların en karmaşık yönü DNA sentezini yönlendiren bir dizi polimeraz içermesidir.
- Safılaştırılan enzim formlarının yalnızca dört tanesi DNA'nın replikasyonunda yer alır, geri kalanlar tamir işlemleriyle ilgilidir.

Polimerazın DNA'ya bağlanması

- Polimerazın DNA bağlanabilmesi için;
 - İlk olarak sarmalın topolojisinin değişmesi gerekir.
 - Orijin bölgesinde sentezin başlaması tetiklenince ikili sarmal AT-zengin bir bölgeden açılarak helikaz enziminin girişi sağlanır.
 - Helikaz DNA sarmalını daha da açarak ilerler.

Polimerazın sentezi başlatmasından önce gerekenler

- DNA ile kompleks yapmış olan histon proteinlerinin uzaklaştırılması gereklidir.
- DNA sentezi ilerlediköe histonlar her sentezlenen dubleksle tekrar bir araya gelerek nükleozom yapısını oluşturur.

Ökaryotik DNA polimerazın özellikleri

- Ökaryotik DNA polimerazların üçü yani pol α , δ ve ϵ (alfa, delta ve epsilon) ökaryotik hücrelerde çekirdek DNA'sının replikasyonu için gereklidir.
- Diğer ikisinin (pol β ve ζ) DNA tamirinde görev aldığı düşünülmektedir.
- Altıncı ise pol γ , mitokondri DNA'sının sentezinde yer alır.

	Polimeraz α	Polimeraz β	Polimeraz δ	Polimeraz ϵ	Polimeraz γ	Polimeraz ζ
Yerleşimi	Çekirdek	Çekirdek	Çekirdek	Çekirdek	Mitokondri	Çekirdek
3'-5' Ekzonükleaz Aktivitesi	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır
Çekirdekteki Replikasyon İçin Gerekli mi?	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Hayır

Doğrusal kromozomların uçlarının replikasyonu sorunludur

- Prokaryotik ve ökaryotik DNA sentezi arasındaki son fark kromozomların yapısı ile ilgilidir.
- Bakteri ve fajların çoğunda bulunan kapalı halkasal kromozomların tersine, ökaryotlardaki kromozomlar doğrusaldır (linear).

Doğrusal kromozomların uçlarının replikasyonu sorunludur

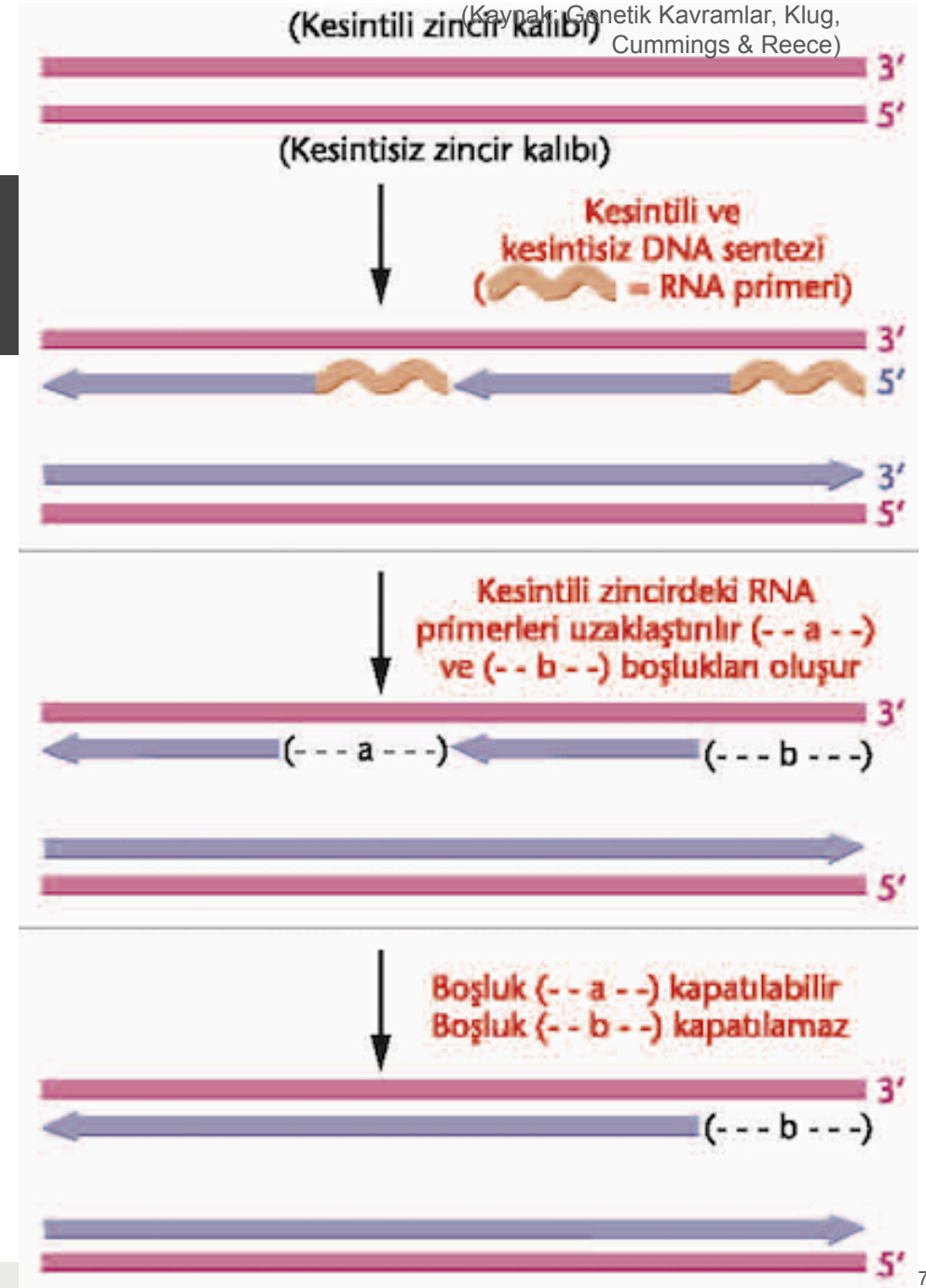
- Replikasyon esnasında, telomerler olarak adlandırılan doğrusal kromozom uçlarında özel bir sorunla karşılaşılır.
- Bu probleme yönelmeden önce telomerler hakkında bilgi vereceğiz.

Telomerler

- Telomerler, telomer-ilifkili özel proteinlerin bağlandığı kısa tekrar dizileri içeren uzun DNA dizilerinden oluşur.
- Telomerlerin eşsiz nitelikleri kromozomların bütünlüğünün ve dayanıklılığının korunmasını sağlar.
- Telomerlerin ökaryotik kromozom uçlarını parçalanmadan koruduğu düşünölmektedir.

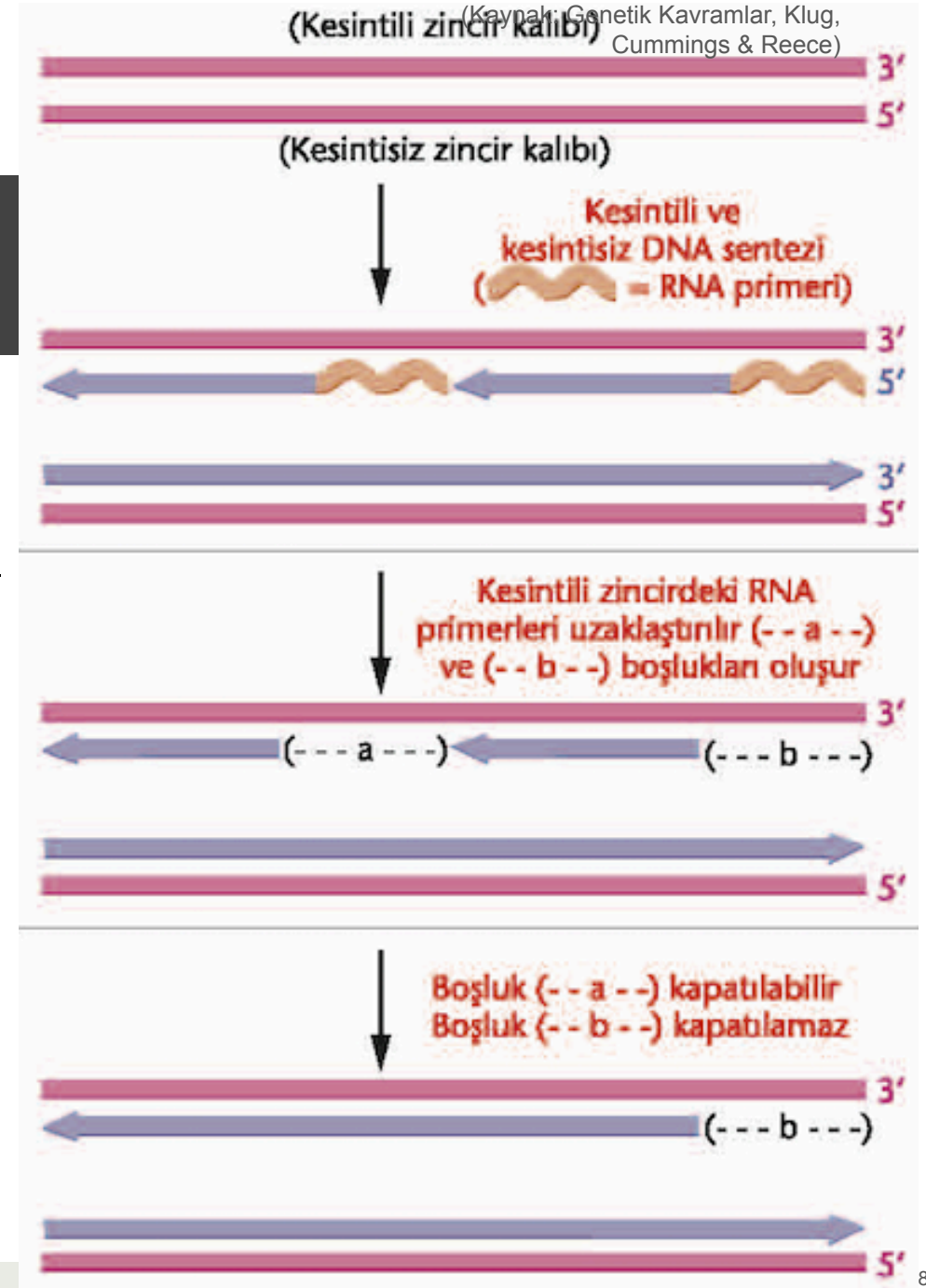
Doğrusal kromozomların uçlarının replikasyonu sorunludur

- Şimdi ikili sarmal bir DNA molekülünün, ucuna yakın bir yarı-saklı replikasyonu düşünelim.
- Kesintisiz zincirdeki sentez normal olarak kromozom ucuna kadar devam ederken, kesintili zincirdeki RNA primeri uzaklaştırıldığı zaman sorun ortaya çıkar.



Doğrusal kromozomların uçlarının replikasyonu sorunludur

- Normal olarak kesintili sentez sırasında oluşan 3'-OH grubuna nükleotid ilavesi yapılarak yeni oluşan boşluklar doldurulmalıdır.
- Ancak burası DNA molekülünün ucu olduğu için 3'-OH grubunu sağlayacak kalıp zincir yoktur.



Doğrusal kromozomların uçlarının replikasyonu sorunludur

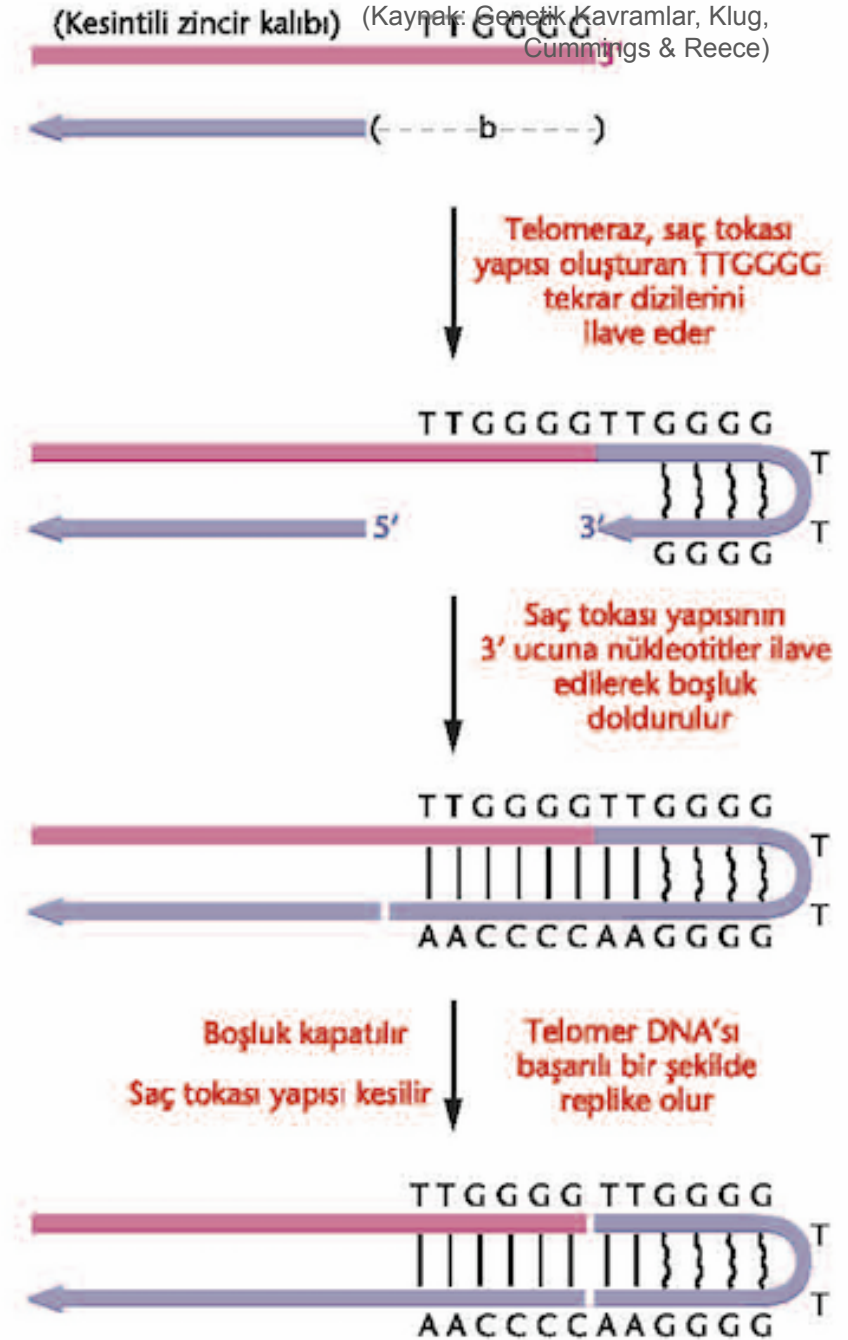
- Dolayısıyla teorik olarak, her sentezin sonunda kromozom RNA primerinin boyu kadar kısalacaktır.
- Bu durum potansiyel bir problemdir.
- Bu nedenle moleküler bir çözümün geliştirildiğini ve hemen hemen bütün ökaryotlarda bu mekanizmanın korunduğu bilinmektedir.

Telomeraz enziminin aktivitesi

- Bu enzim, ilk olarak silli bir protozoa olan *Tetrahymena*'da keşfedilip, telomeraz olarak adlandırılmıştır.
- Ökaryotlarda telomerik DNA'da birçok kısa tekrar nükleotid dizileri bulunur.
- Örneğin; *Tetrahymena* kromozomunun ucunda kesikli zinciri oluşturan kalıp DNA'da 5'-TTGGGG-3' dizisi bir çok kez tekrarlanır.

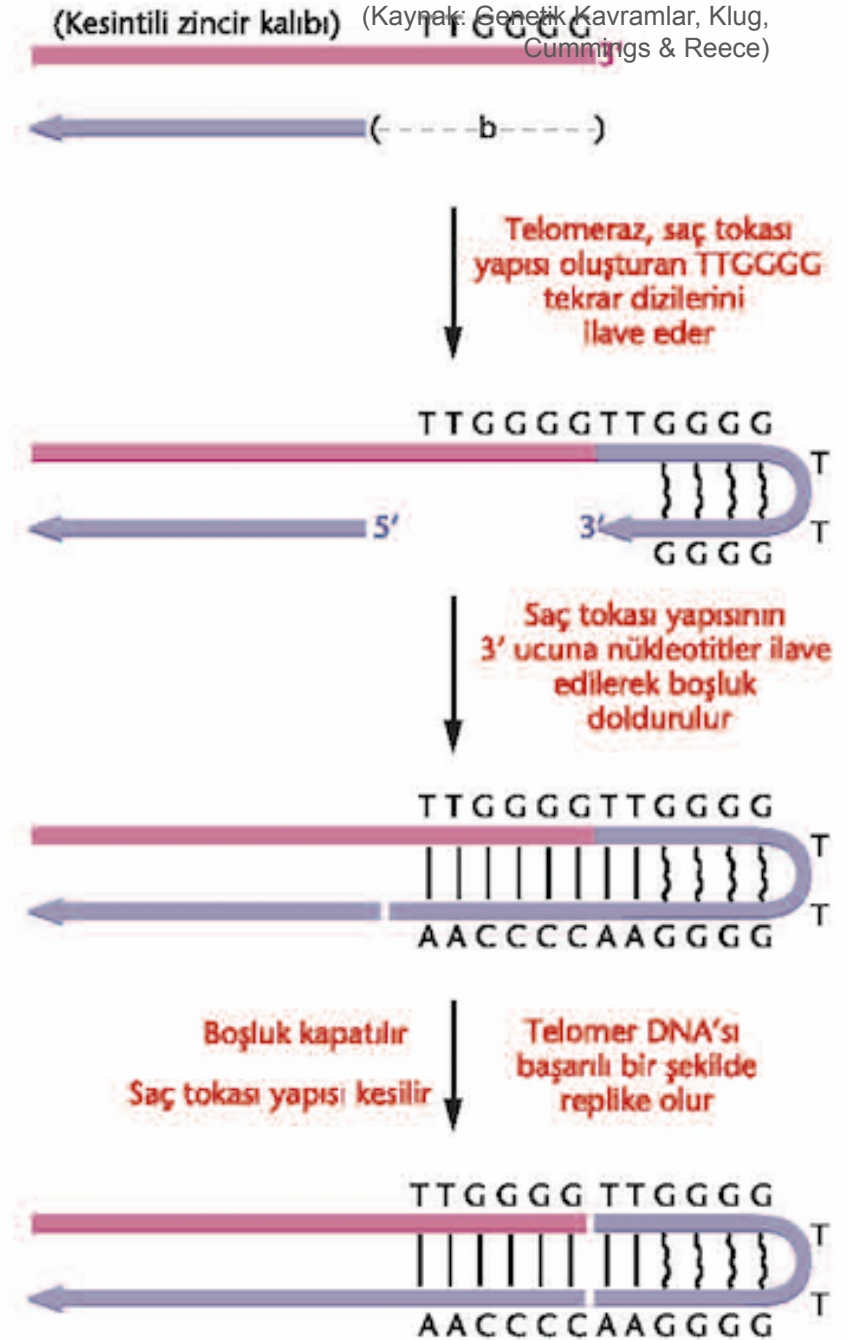
Telomeraz enziminin aktivitesi

- Telomeraz enzimi, bu altı nükleotidlik tekrar dizisinin birçok kopyasını kesintili zincirin 3' ucuna ilave eder (5'-3' sentez yönünde).
- Böylece kromozomun kısalmasını engeller.



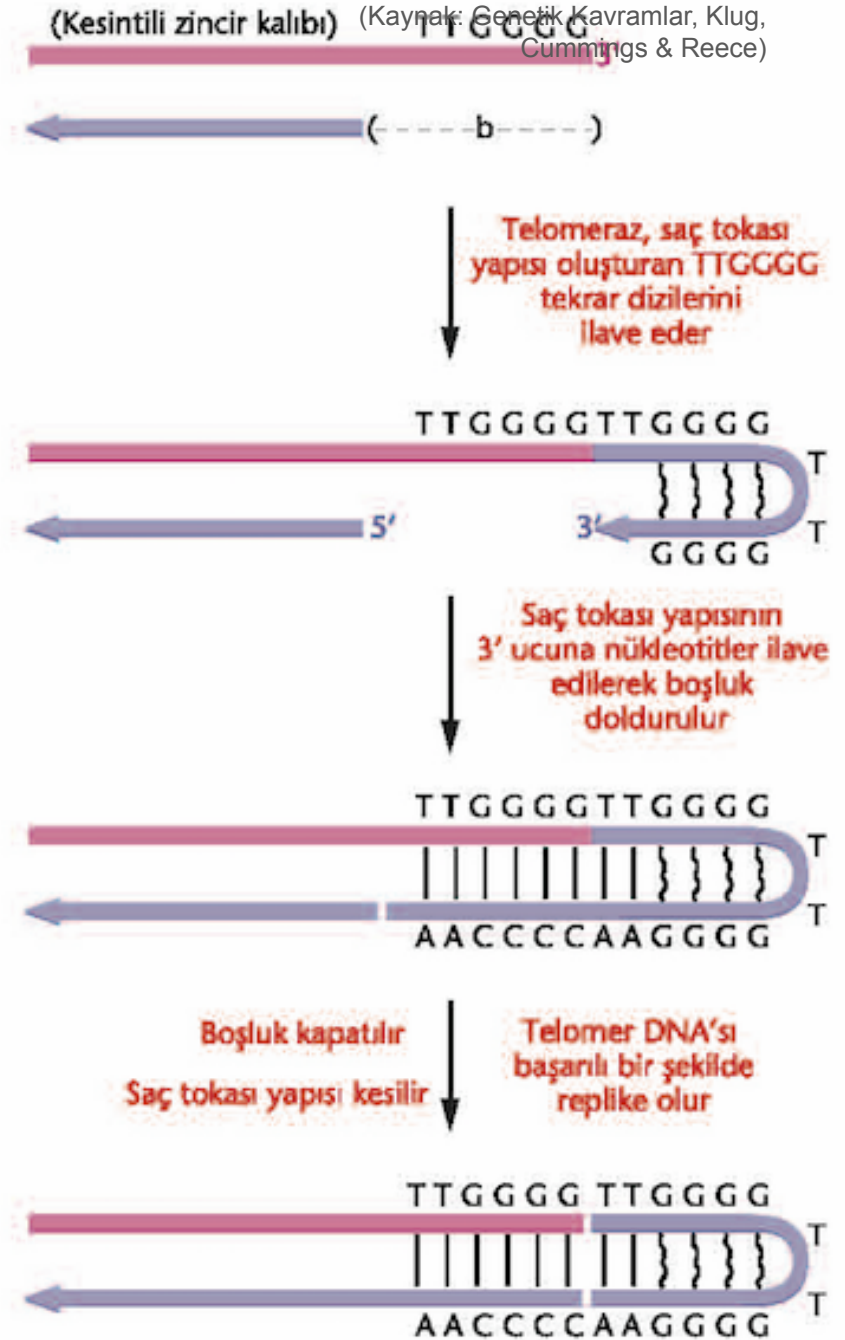
Telomeraz enziminin aktivitesi

- İlave edilen diziler saç tokası gibi kendi üstlerinde kıvrılır.
- Karşı karşıya gelen guaninler arasında alışılmadık bir şekilde anortodoks hidrojen bağları ($G=G$) kurularak yapının dayanıklılığı sağlanır.



Telomeraz enziminin aktivitesi

- Saç tokasının sonunda ortaya çıkan serbest 3'-OH ucu DNA polimeraz I'in substratı olarak iş görür.
- Böylece kısalmış olacak kromozomdaki boşluk doldurulmuş olur.
- Bundan sonra saç tokası yapısı uç kısımdan kırılır ve birbirini izleyen replikasyon döngüsü sonucu DNA kaybı engellemiş olur.



Revers transkripsiyon

- Elizabeth Blackburn ve Coral Greider tarafından *Tetrahymena* telomerazının sentezi nasıl başardığının daha ayrıntılı olarak incelenmesi ile olağanüstü bir bulgu ortaya çıkmıştır.
- Enzim; yapısında katalitik aktivitesi için gerekli olan kısa bir RNA parçası bulunduran, çok özgün yapıda bir ribonükleoproteindir.
- Enziminin RNA bileşeni, DNA sentezi için hem yol gösterici hem de kalıp işlevi görür.
- Bu, revers transkripsiyon denilen olaydır.

Ökaryotlarda telomeraz

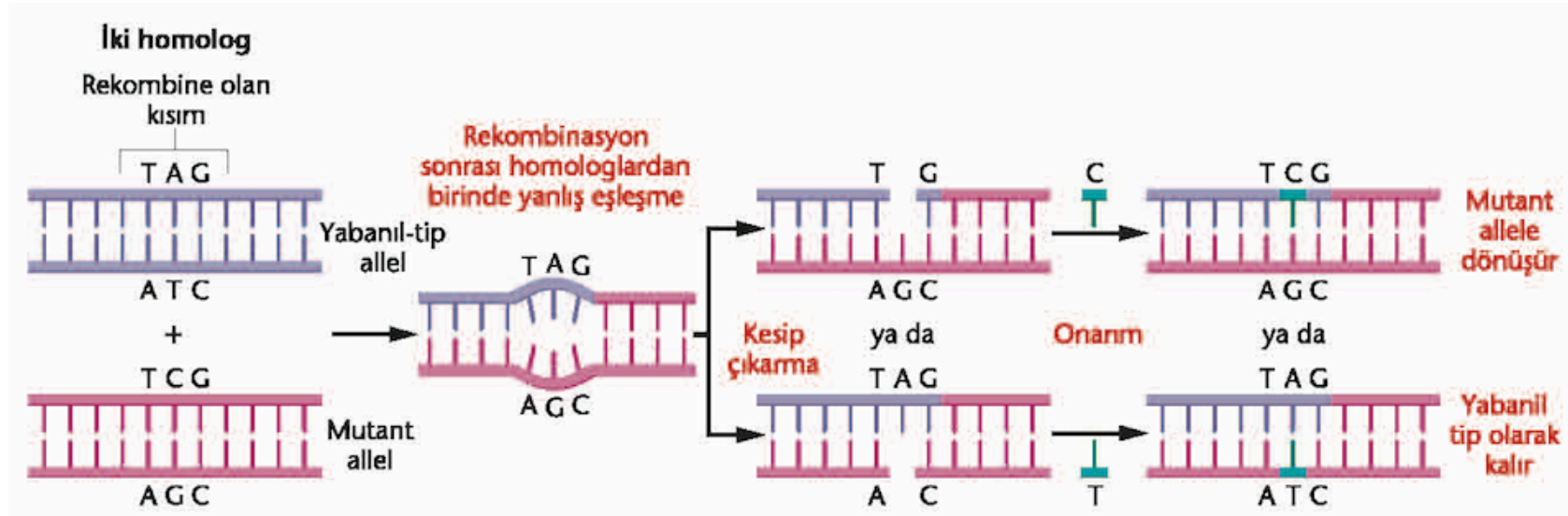
- Ökaryotlarda, somatik hücrelerin çoğunda telomeraz aslında aktif değildir.
- Bu nedenle her hücre bölünmesi sonucunda kromozomların telomerleri kısalır.

Ökaryotlarda telomeraz

- Bir çok bölünmeden sonra telomerde ciddi aşınmalar olur ve hücre daha fazla bölünme kapasitesini yitirir.
- Kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesi korunmuştur.
- Bu hücreler ölümsüzdür.

Yanlış baz eşleşmesinin tamir yolları

- Yanlış eşleşme olan bölgeler, zincirlerden birinin çıkarılıp kalan zincirin kalıp olarak kullanılarak eşleniğinin sentezlenmesiyle tamir edilebilir.



TEŐEKKÜRLER

Bu sunumun hazırlanmasındaki katkılarından dolayı aŐağıda isimleri verilen öğrencilerime teŐekkür ederim.

HİLAL BÜŐRA TOKGÖZ

İPEK TÜRKDÖNMEZ

ÖZLEM MORÇAL

TUĞBA GÜMÜŐ