

Kalıtımın Moleküler Temeli

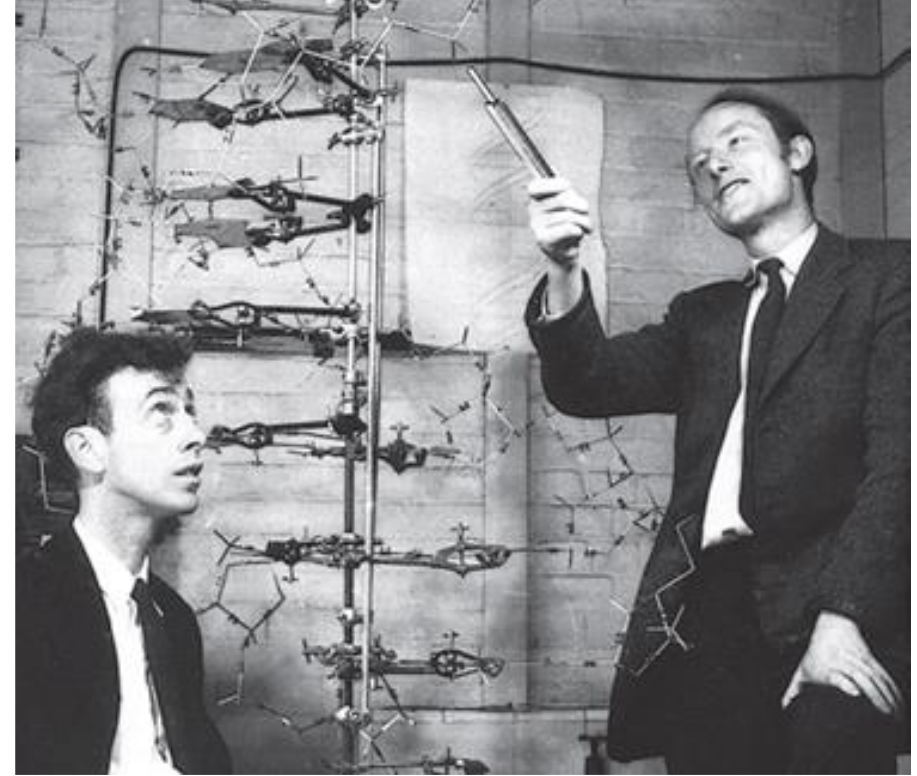
Prof. Dr. Bektaş TEPE

Genel Biyoloji

Bölüm 16

Yaşamın “Çalışma Talimatları”: DNA’ya Giriş

- DNA’nın zarif çift sarmal yapısı, modern biyolojinin simgesi haline gelmiştir.
- James Watson ve Francis Crick, Nisan 1953’te metal ve telle kurdukları modelle bu yapıyı bilim dünyasına duyurdu.
- Mendel’in kalıtım birimleri ve Morgan’ın kromozomlardaki genleri aslında DNA’dan oluşur.
- Kimyasal açıdan genetik mirasımız, anne ve babamızdan aldığımız DNA’dır.



Kalıtımın Maddesi Olarak DNA

- DNA, kalıtımın maddesi olarak çağımızın en çok tanınan molekülüdür.
- Nükleik asitler, monomerlerinden başlayarak kendi kopyalarını yönlendirebilme açısından doğada benzersizdir.
- Çocukların anne babalarına benzemesi, DNA'nın doğru kopyalanmasına ve nesiller arasında aktarılmasına dayanır.
- Bu doğruluk ve süreklilik, biyolojik bilginin korunmasını sağlar.

DNA Bilgiyi Nasıl Yönlendirir?

- DNA'daki kalıtsal bilgi, biyokimyasal, anatomik ve fizyolojik özelliklerin gelişimini yönlendirir ve davranışları kısmen etkiler.
- Bu bölümde DNA'nın genetik madde olduğunun nasıl anlaşıldığını adım adım göreceğiz.
- Watson ve Crick'in yapıyı nasıl çözdüğünü, DNA'nın nasıl kopyalandığını ve hücrelerin DNA'yı nasıl onardığını inceleyeceğiz.
- Son olarak DNA'nın kromozomda proteinlerle birlikte nasıl paketlenildiğini keşfedeceğiz.

DNA Genetik Maddedir!

- Günümüzde DNA'yı herkes duymuştur ve bilim insanları DNA ile laboratuvarlarda rutin olarak çalışır.
- Oysa 20. yüzyılın başlarında, “kalıtımın molekülü”nü bulmak biyologlar için büyük bir meydan okumaydı.
- Bu tarihsel arayış, bilimsel sorgulamanın güzel bir örneğini sunar.
- İzleyen slaytlardaki kanıtlar, DNA'nın genetik madde olduğunu ortaya koyacaktır.

Genetik Maddenin Adayları: DNA mı Protein mi?

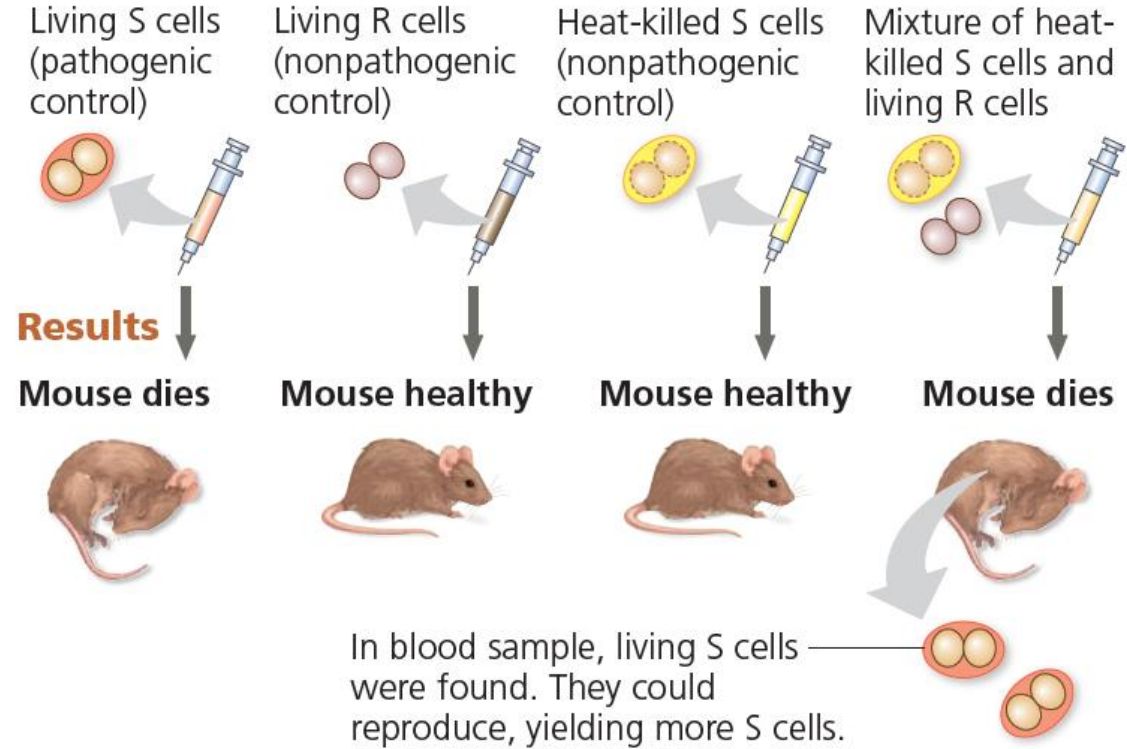
- Morgan'ın grubu genlerin kromozomların parçaları olduğunu gösterince, adaylar DNA ve protein oldu.
- 1940'lara kadar proteinler, işlev çeşitliliği ve özgüllüğü nedeniyle daha güçlü aday sayıldı.
- Nükleik asitlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri “fazla uniform” görülüyordu.
- Bu nedenle pek çok araştırmacı, kalıtsal çeşitliliği proteinlerin daha iyi açıklayacağını düşündü.

Bakışın Değişmesi: Basit Sistemler, Büyük İpuçları

- Zamanla görüş, bakteriler ve onları enfekte eden virüsler üzerinde yapılan çalışmalarla değişti.
- Bu sistemler, meyve sineği veya insana göre daha sade oldukları için temel ilkeleri açığa çıkardı.
- Böylece DNA'nın kalıtımdaki rolü adım adım aydınlandı.
- Süreci, bir bilimsel sorgulama öyküsü olarak izleyeceğiz.

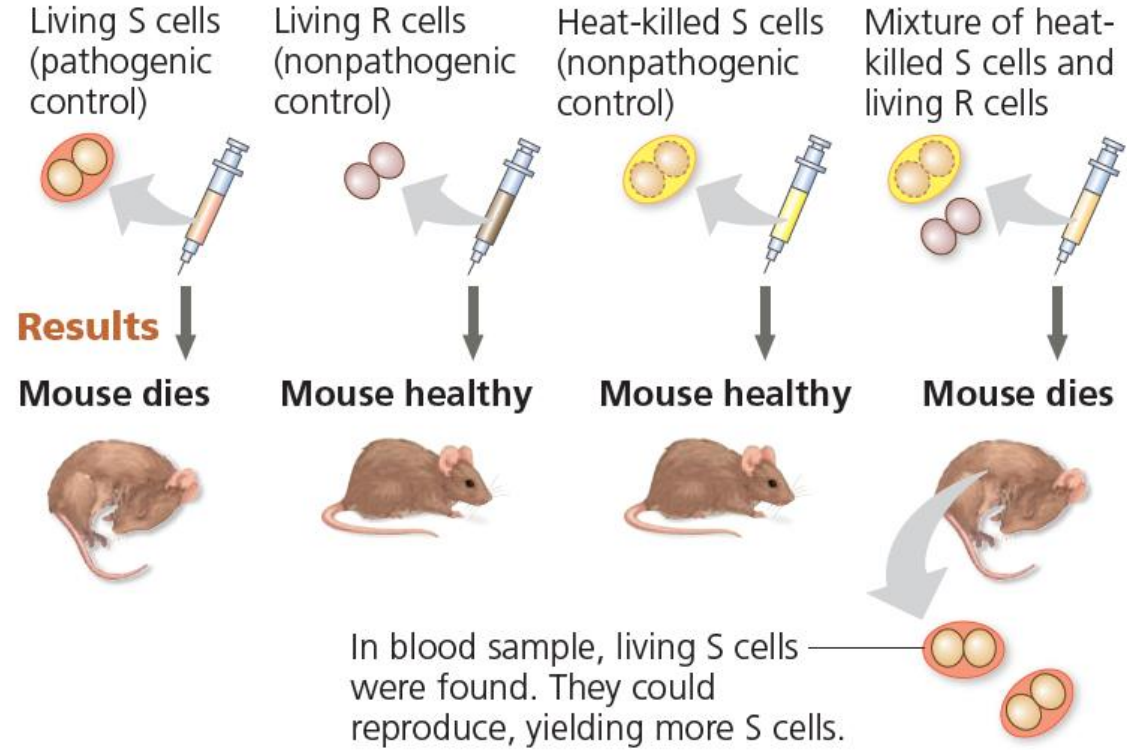
Griffith'in Dönüşüm Deneyi: Şaşırtan Gözlem

- 1928'de Frederick Griffith, pnömoniye karşı aşı geliştirmeye çalışırken *Streptococcus pneumoniae* ile çalışıyordu.
- Biri patojenik, diğeri zararsız iki bakteri suşu kullandı.
- Patojenik suş enjekte edildiğinde fare ölürken, zararsız suş enjekte edildiğinde fare hayatta kaldı.



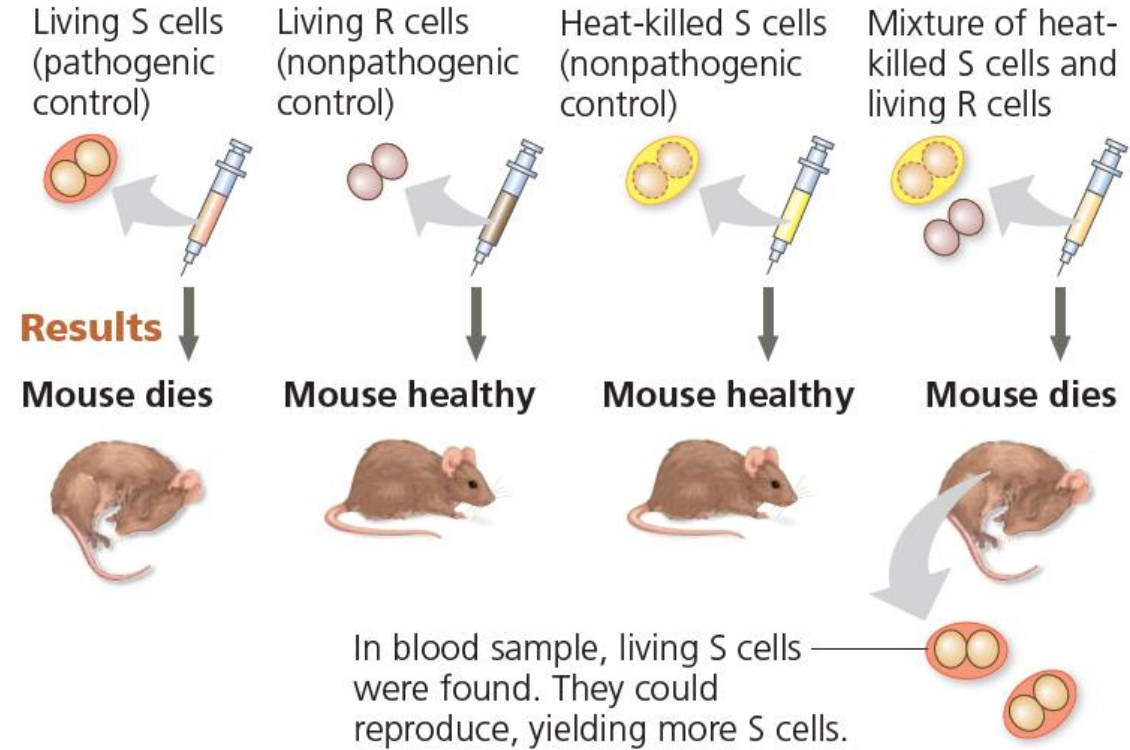
Griffith'in Dönüşüm Deneyi: Şaşırtan Gözlem

- Isıyla öldürülen patojenik hücre kalıntıları, zararsız canlı hücrelerle karıştırılınca fareler beklenmedik şekilde yine öldü.
- Yapılan incelemeler, bazı zararsız canlı hücrelerin patojenik hale geçtiğini ortaya koydu.
- Üstelik bu yeni patojenlik, oluşan kolonilerin tüm torunlarına geçti.



“Dönüşüm”ün Anlamı

- Griffith, kalıtsal değişimi oluşturan bir kimyasal bileşenin ölü patojenlerden canlı hücrelere geçtiğini düşündü.
- Bu olguya “transformasyon” adını verdi ve dönüşümü dış DNA’nın alınmasıyla genotip ve fenotipin değişmesi olarak tanımladı.
- Deney, kalıtımsal bilginin hücreler arasında aktarılabilirliğini gösterdi.
- Ancak dönüştürücü maddenin kimliği o aşamada bilinmiyordu.

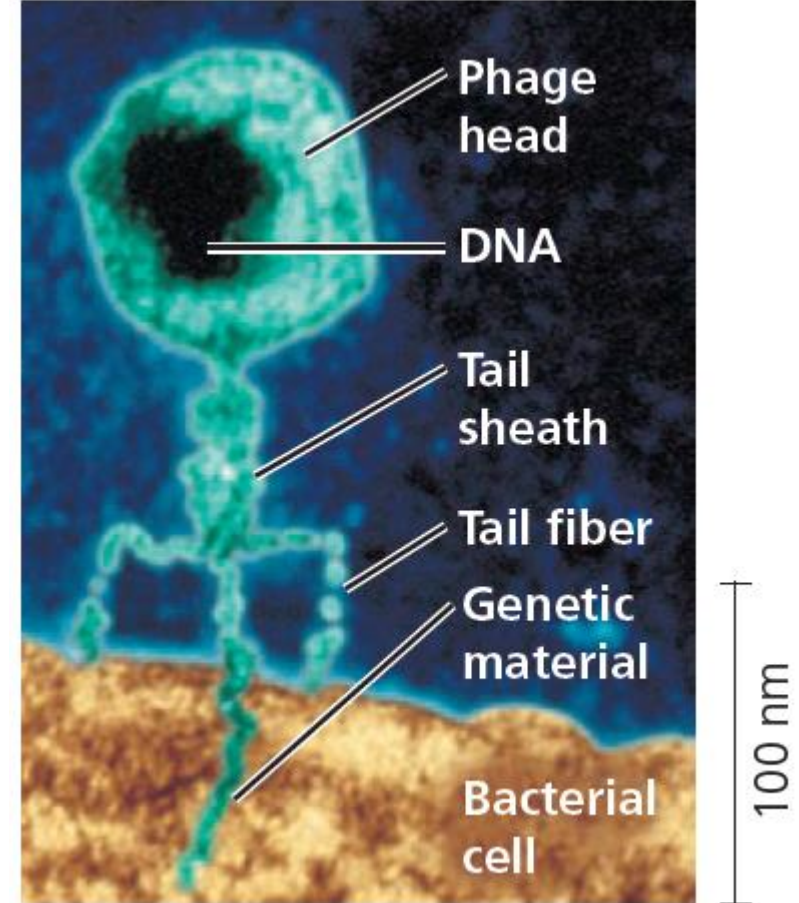


Dönüştürücü Maddenin Kimliği: DNA

- Daha sonra Oswald Avery, Maclyn McCarty ve Colin MacLeod, dönüştürücü maddenin DNA olduğunu gösterdi.
- Yine de bazı bilim insanları proteini daha iyi aday görmeye devam etti.
- Bakteri genlerinin, karmaşık organizmaların genleriyle aynı ilkeleri paylaşp paylaşmadığı da sorgulandı.
- Kuşkuların en büyük nedeni, o dönemde DNA hakkında bilginin henüz çok sınırlı olmasıydı.

Bakteriyofajlar ve DNA'nın Rolüne Dair İlk İpuçları

- Bakterileri enfekte eden virüslere bakteriyofaj denir ve araştırmalarda sıkça “faj” olarak anılır.
- Virüsler hücrelerden çok daha basittir ve temel olarak bir DNA ya da bazen RNA molekülü ile bunu saran protein kılıftan oluşur.
- Çoğalmak için bir hücreyi enfekte eder, hücrenin metabolik düzenini ele geçirir ve yeni virüsler üretir.

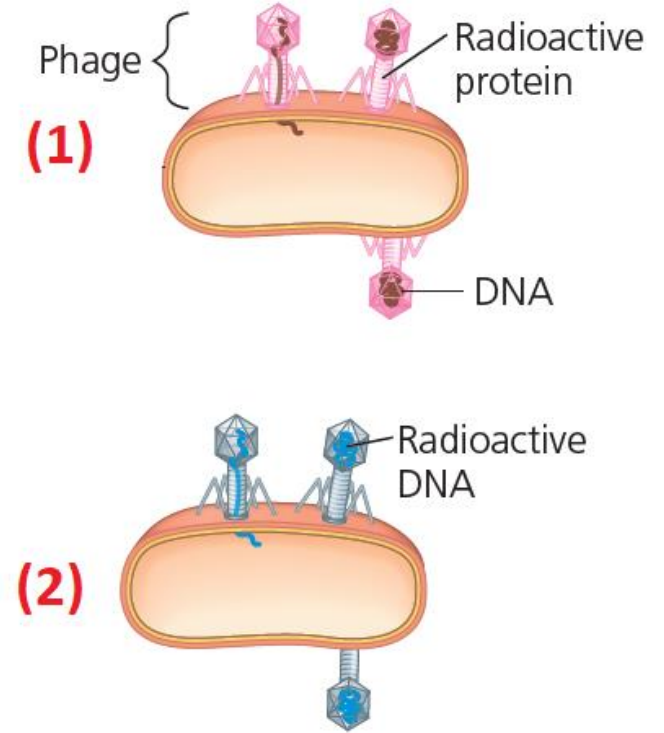


T2 Fajı, *E. coli* ve Temel Soru

- 1952’de Alfred Hershey ve Martha Chase, T2 adlı bir fajın genetik materyalinin ne olduğunu sınavan deneyler yaptı.
- T2, *E. coli*’yi hızla bir “T2 üretim fabrikasına” dönüştürebilir ve hücre parçalandığında çok sayıda yeni faj açığa çıkar.
- O dönemde T2’nin neredeyse bütünüyle DNA ve proteinden oluştuğu biliniyordu.
- Temel soru şuydu hangi bileşen hücreyi yeniden programlıyor protein mi yoksa DNA mı

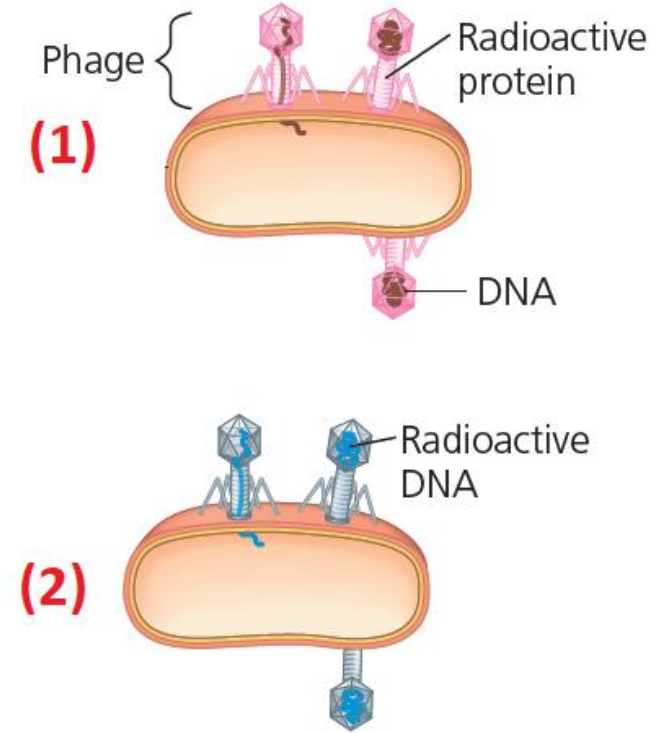
Hershey–Chase Deney Düzenegi

- Proteinleri izlemek için radyoaktif kükürt içeren fajlar, DNA'yı izlemek için radyoaktif fosfor içeren fajlar hazırlandı.
- Kükürt proteinde bulunur DNA'da bulunmaz bu nedenle kükürt yalnızca protein kılıfa işlendi.
- Fosfor ise fazlasıyla DNA'da yer alır protein kılıfta bulunmaz bu nedenle fosfor yalnızca DNA'yı etiketledi.



Enfeksiyon ve Hangi Molekül Hücreye Giriyor

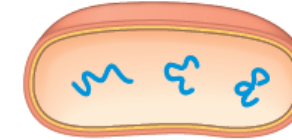
- Radyoaktif proteinli ve radyoaktif DNA'lı fajlar ayrı ayrı, radyoaktif olmayan *E. coli* kültürlerine bulaştırıldı.
- Enfeksiyonun hemen ardından hücrelerin içine hangi etiketli molekülün girdiği sınıandı.
- İçeri giren bileşenin, hücreyi yeniden programlama potansiyeline sahip olduğu varsayıldı.



Bulgular ve Çıkarım

- Faj DNA'sının konak hücreye girdiği, ancak faj proteinlerinin girmediği saptandı.
- Enfeksiyon tamamlandığında, E. coli'den çıkan yeni fajların bir kısmında radyoaktif fosfor bulundu.
- Bu sonuç DNA'nın enfeksiyon sürecinde etkin rol oynadığını ve talimat taşıyan molekül olduğunu gösterdi.
- Hershey–Chase çalışması, en azından bazı virüslerde kalıtım materyalinin nükleik asitler olduğunu güçlü biçimde ortaya koydu.

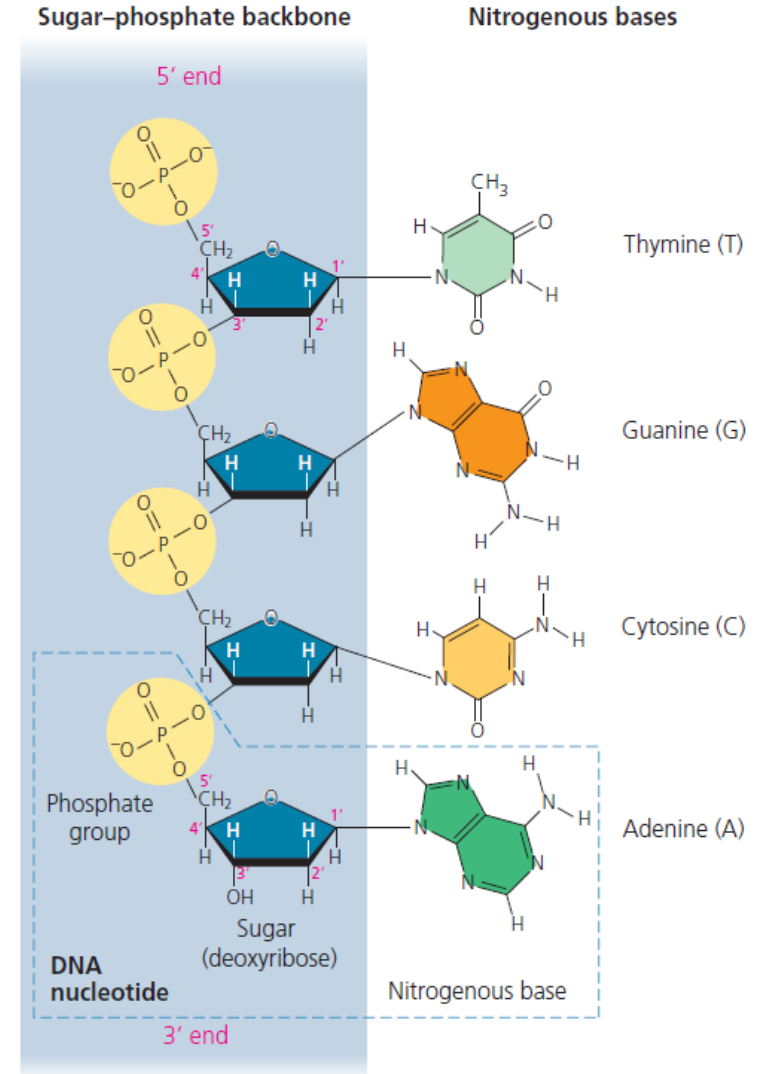
Radioactivity
(phage protein)
found in liquid



Radioactivity
(phage DNA)
found in pellet

DNA'nın Yapı Taşları ve Chargaff'ın Yaklaşımı

- DNA, bir azotlu baz, deoksiriboz şekeri ve fosfattan oluşan nükleotidlerin polimeridir.
- Bazlar adenin (A), timin (T), guanin (G) ve sitozin (C) olarak adlandırılır.
- Erwin Chargaff, farklı organizmalardan izole ettiği DNA'ların baz bileşimlerini sistematik olarak analiz etti.



Türler Arası Bileşim Farklılığı ve DNA'nın Adaylığı

- 1950'de Chargaff, DNA baz bileşiminin türden türe değiştiğini rapor etti.
- Örneğin A yüzdesi deniz kestanesinde 32.8 iken insanda 30.4 ve E. coli'de 24.7 olarak bulundu.
- Bu moleküler çeşitlilik, DNA'yı kalıtım materyali için daha inandırıcı bir aday haline getirdi.

Chargaff Kuralları ve Örnek Gözlem

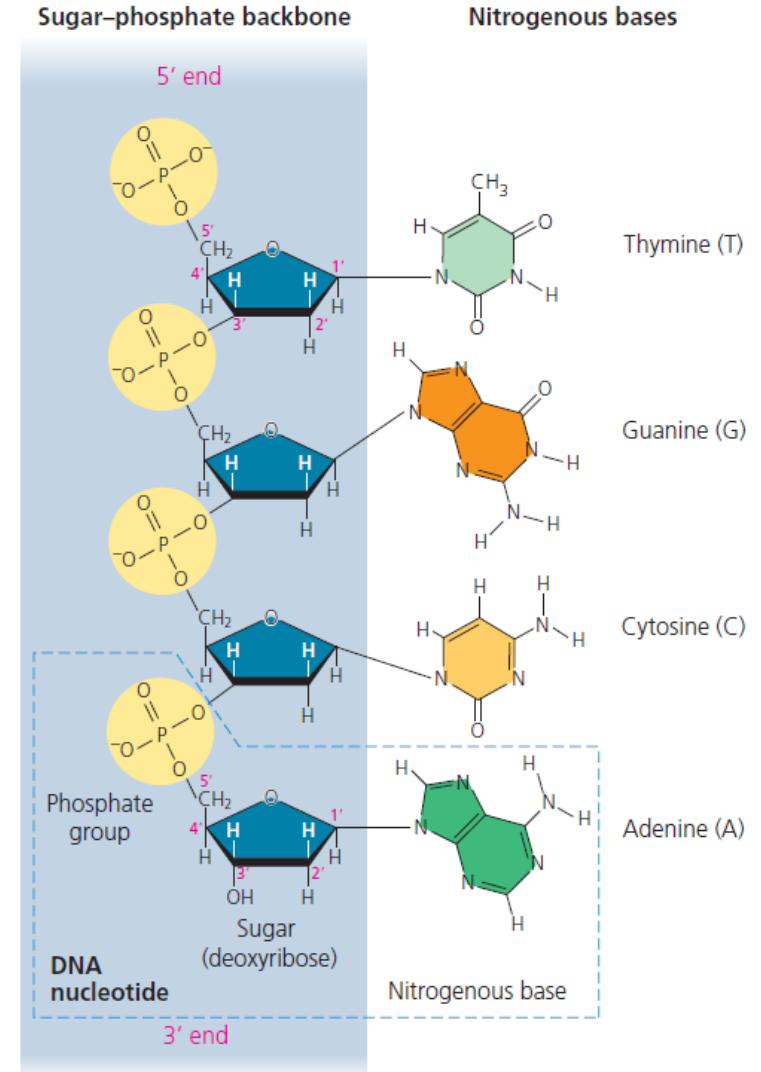
- Chargaff iki düzenlilik tanımladı A ile T oranları birbirine yaklaşık eşittir G ile C oranları da birbirine yaklaşık eşittir.
- Deniz kestanesi DNA'sında A % 32.8, T % 32.1, G % 17.7 ve C % 17.3 olarak raporlandı.
- Yüzdelerin tam eşit olmaması kullanılan tekniklerin sınırlılığı ile açıklanmaktadır.
- Bu kuralların temel nedeni, çift sarmal keşfedilene kadar açıklanamamıştı.

DNA'nın Yapısı Neden Araştırıldı

- DNA'nın kalıtımın taşıyıcısı olduğu kabul edilince, yapının bu rolü nasıl açıkladığı sorusu temel hedefe dönüştü.
- Araştırma odağı, DNA'nın biçiminin kalıtımsal işleyişi nasıl mümkün kıldığına kaydı.
- Bu arayış, moleküler biyolojinin yönünü belirleyen bir bilimsel sorgulama örneği oldu.

DNA Sarmalının Temel Taşı: Nükleotid

- Her nükleotid bir azotlu baz, bir deoksiriboz şekeri ve bir fosfat grubundan oluşur.
- Komşu nükleotidler, şeker ile fosfat arasında kurulan kovalent bağlarla “iskelet”i oluşturur ve bazlar bu iskeletin içe bakan kısımlarından uzanır.
- Zincirin yönlülüğü 5' ucunda fosfat, 3' ucunda şekerin OH grubu olacak biçimde düzenlenir ve bu ayırım şeker halkasındaki karbon numaralarına dayanır.



Üç Boyutlu Yapıyı Bulma Yarışısı

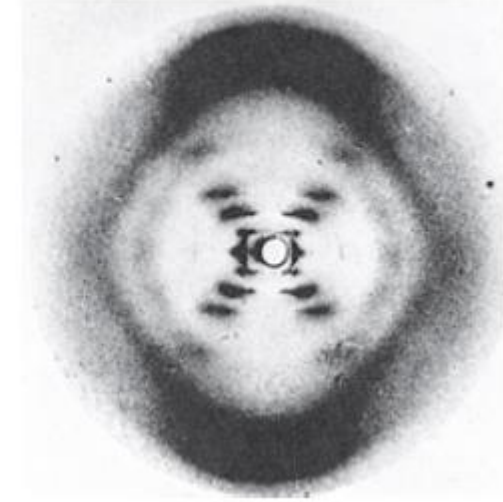
- 1950'lerin başında, DNA'nın kovalent düzeni biliniyordu ve odak üç boyutlu mimariye çevrildi.
- Linus Pauling, Maurice Wilkins ve Rosalind Franklin bu konuda çalışan önemli bilim insanları arasında yer aldı.
- Tam çözüme ilk ulaşanlar James Watson ve Francis Crick oldu.

X-Işını Kristalografisi Ortaya Ne Koydu?

- Watson, Cambridge'e geldiğinde Crick'in protein yapısı çalışmalarında kullandığı X-ışını kristalografisi tekniğiyle tanıştı.
- Watson, Wilkins'in laboratuvarında Rosalind Franklin'in çektiği bir DNA X-ışını kırınım görüntüsünü gördü ve bunun helikal bir düzeni işaret ettiğini fark etti.
- Kırınım desenindeki noktalar ve gölgeler, hizalanmış DNA liflerinden geçen X-ışınlarının sapmasına karşılık gelir.

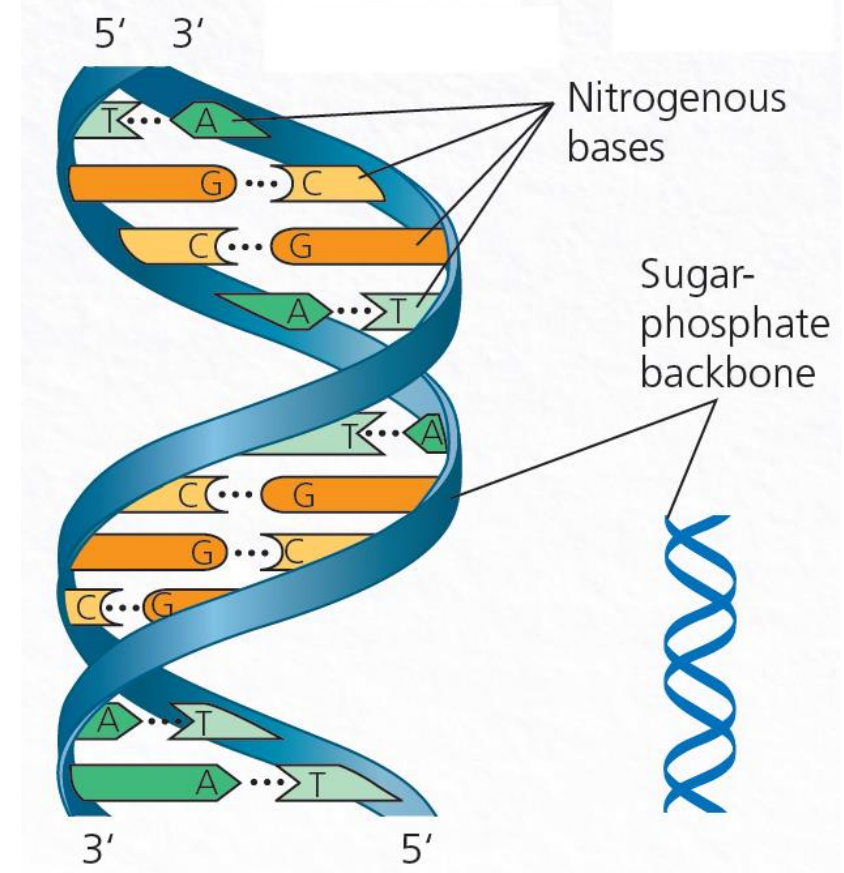


◀ Rosalind Franklin



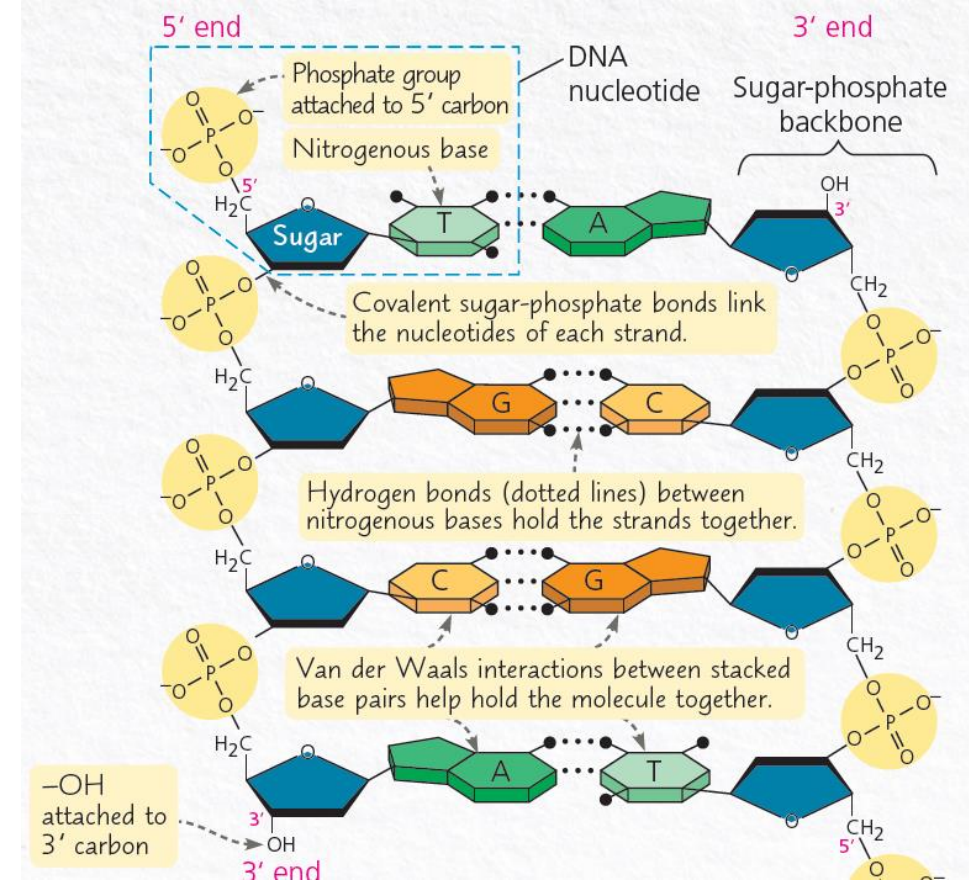
Çift Sarmal Fikrinin Güçlenmesi

- Franklin'in verileri heliksin genişliği ve bazların aralığına dair önceki bulguları destekledi.
- Desen, Linus Pauling'in kısa süre önce önerdiği üç zincirli modele karşı çıkarak iki zincirli bir yapıyı ima etti.
- İki zincirli yapı "çift sarmal" kavramını doğrudan gündeme taşıdı.



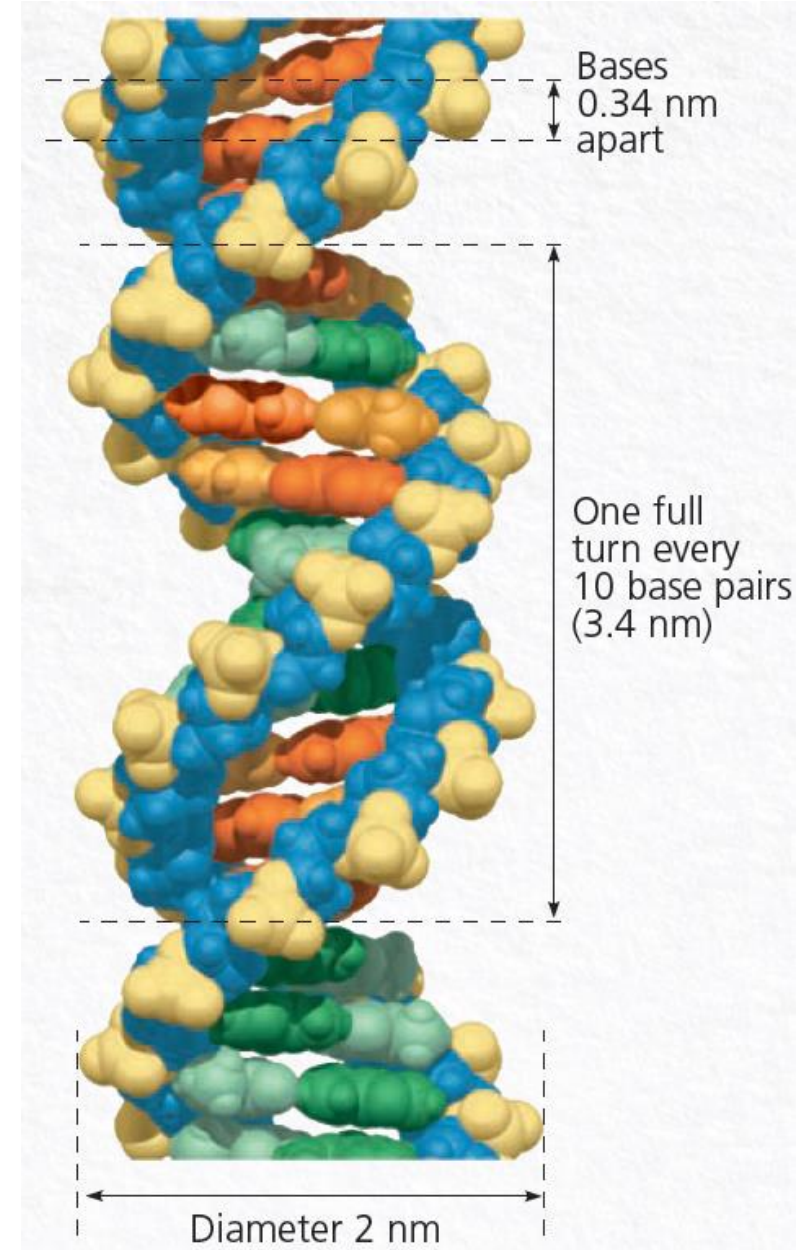
Model Kurmak ve Antiparalel Düzen

- Watson ve Crick, X-ışını ölçümleri ve DNA kimyasına dair bilinenlerle, Chargaff eşdeğerlik kuralını da gözetten modeller kurdu.
- Franklin'in sonuçları, şeker-fosfat iskeletlerinin dışta yer aldığını ve hidrofob bazların içte korunduğunu düşündürdü; Watson bu düzeni temel alan bir model inşa etti.
- İki iskelet antiparalel ilerlemektedir.



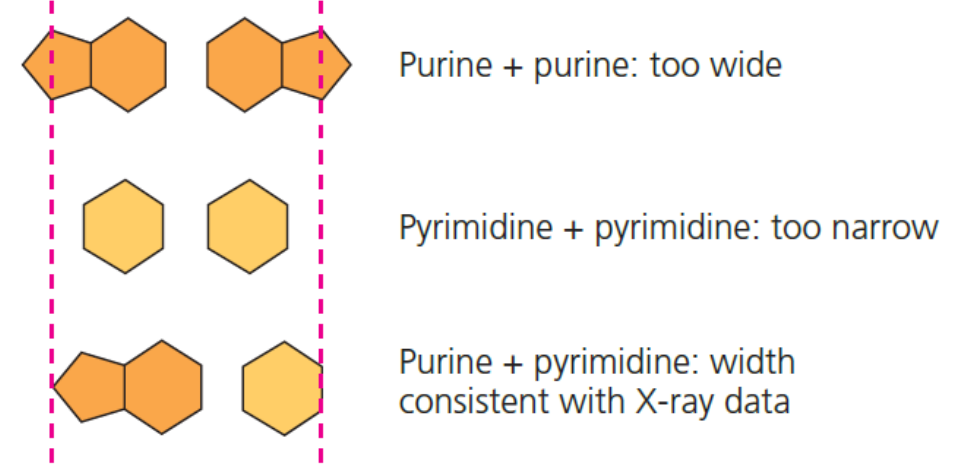
Heliksin Adımları ve Ölçüler

- Franklin'in X-ışını verileri heliksin her 3.4 nm'de bir tam tur yaptığını ortaya koydu.
- Bazlar 0.34 nm aralıklarla dizilir ve her tam turda on katman baz çifti yer alır.
- Bu düzen, halat merdiven benzetmesiyle anlatılabilir.



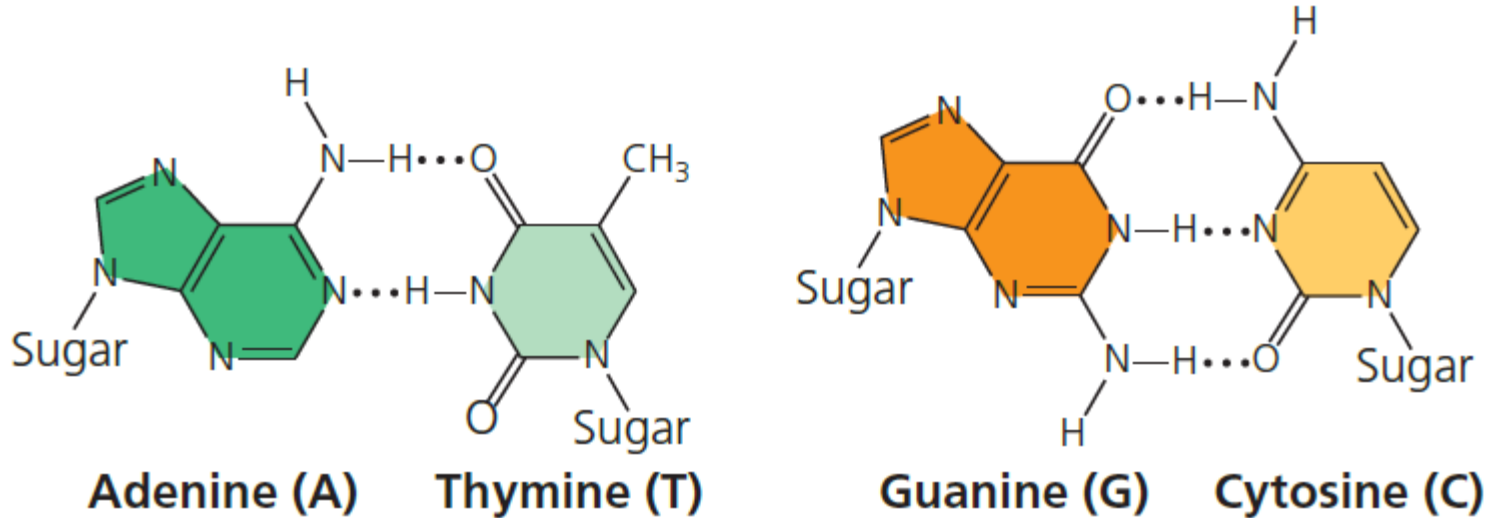
Neden A-T ve G-C Birlikte?

- Başlangıçta “aynı tür bazlar eşleşir” düşüncesi, çift sarmalın çapının uniform olmasını açıklayamadı.
- Pürinler iki halkalı, pirimidinler tek halkalıdır; bir pürin ile bir pirimidin eşleştiğinde çap sabit kalır.
- Bu nedenle A, T ile ve G, C ile eşleştiğinde heliksin genişliği tutarlı olur.



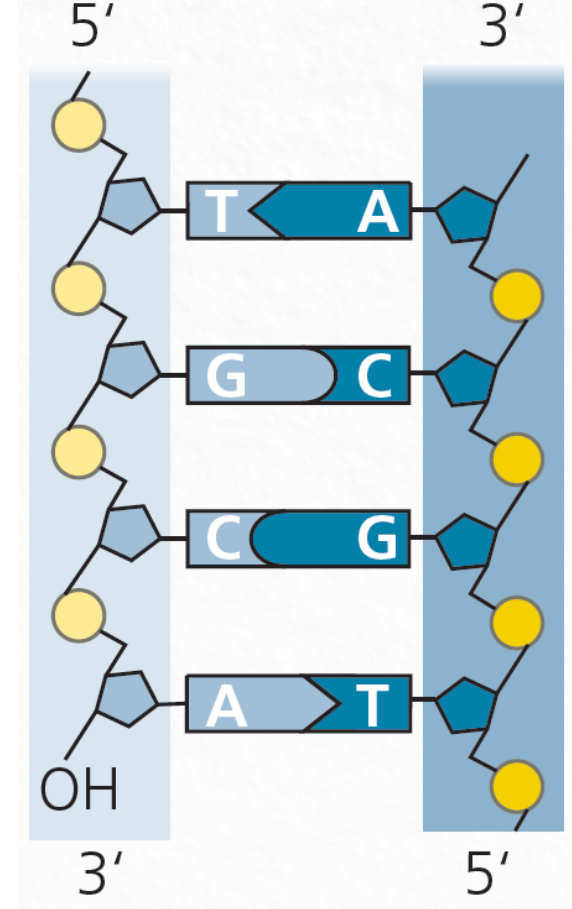
Hidrojen Bağlarıyla Özgüllük

- Bazların yan grupları belirli sayıda hidrojen bağı kurabilecek biçimde konumlanır.
- Adenin yalnızca timinle iki hidrojen bağı kurar; guanin yalnızca sitozinle üç hidrojen bağı kurar.
- Bu eşleşme özgüllüğünün şematik gösterimi aşağıda verilmiştir.



Chargaff Oranlarının Açıklanması

- Bir zincirde A varsa karşı zincirde T bulunur; G varsa karşısında C yer alır.
- Böylece her canlıda A miktarı T'ye, G miktarı C'ye eşit olur; modern dizileme teknikleri bu eşitliği doğrulamıştır.
- Baz eşleşme kuralları kombinasyonları belirler ancak dizilimin sırasını sınırlamaz; her gen kendine özgü bir baz dizisine sahiptir.



1953 Makalesi ve Bilime Etkisi

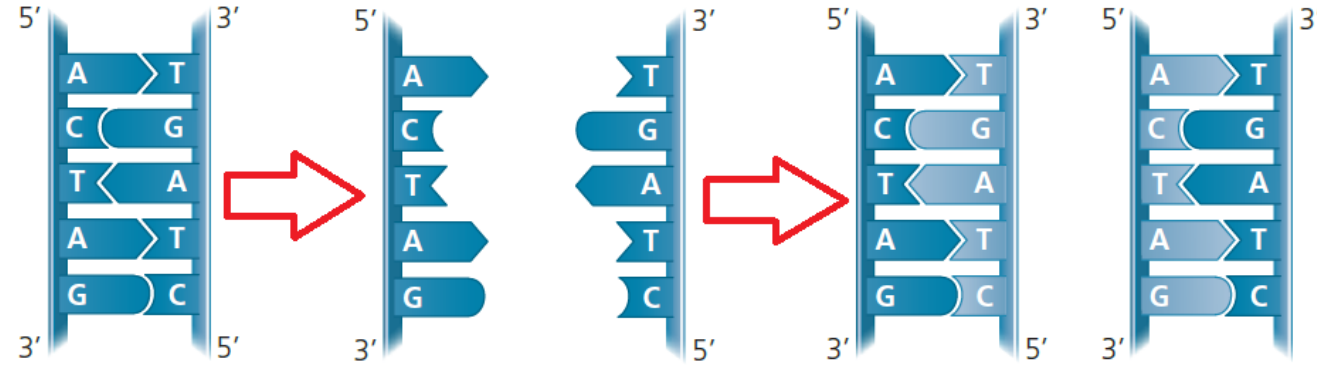
- Watson ve Crick, Nisan 1953'te DNA'nın çift sarmal modelini bir sayfalık özlü bir makaleyle duyurdu.
- Watson, Crick ve Wilkins 1962'de Nobel Ödülü'nü aldı; Rosalind Franklin 1958'de vefat ettiği için ödüle aday olamadı.
- Modelin en çarpıcı yanı, DNA'nın kopyalanma mekanizmasını yapısının kendisinin ima etmesiydi.

Yapı-İşlev Bağı ve Kopyalanma Fikrinin Doğuşu

- DNA'nın çift sarmal yapısı, yapı ile işlev arasındaki ilişkiyi somut biçimde gösterir.
- Watson ve Crick, özgül baz eşleşmesi fikriyle çift sarmal modeline ulaştıklarında kopyalanma olasılığını da sezdiler.
- “Önerdiğimiz özgül eşleşme genetik materyal için olası bir kopyalama mekanizmasını akla getiriyor” ifadesi bu sezgiyi özetler.

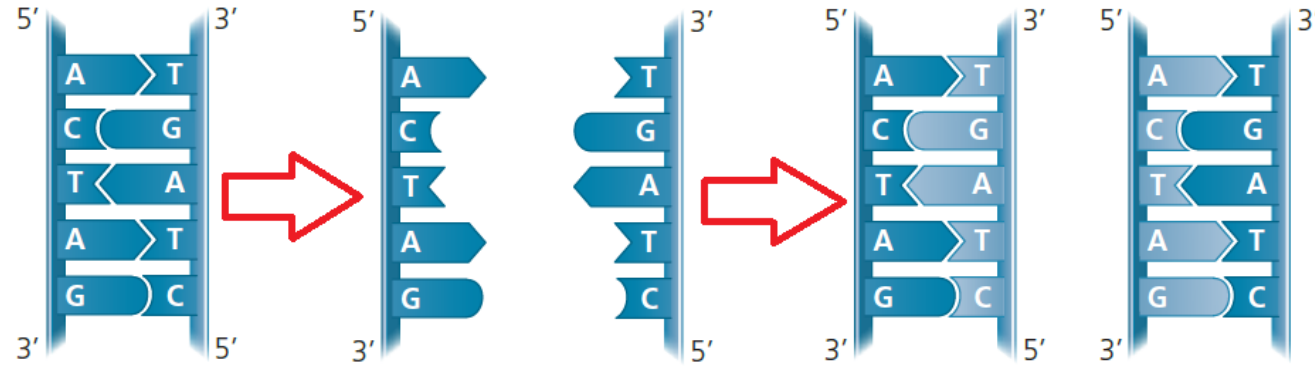
Temel İlke: Kalıp İpliğe Göre Baz Eşleşmesi

- Watson ve Crick'in hipotezine göre DNA, birbirine tamamlayıcı iki kalıptan oluşur.
- Çift sarmal kopyalanmadan önce hidrojen bağları çözülür, iki zincir açılarak birbirinden ayrılır.
- Her bir zincir, üzerine yeni bir eş zincirin kurulacağı kalıp görevi görür.
- Sonuçta, başlangıçtaki tek çift sarmalın yerini dizilimi aynen korunmuş iki çift sarmal alır.



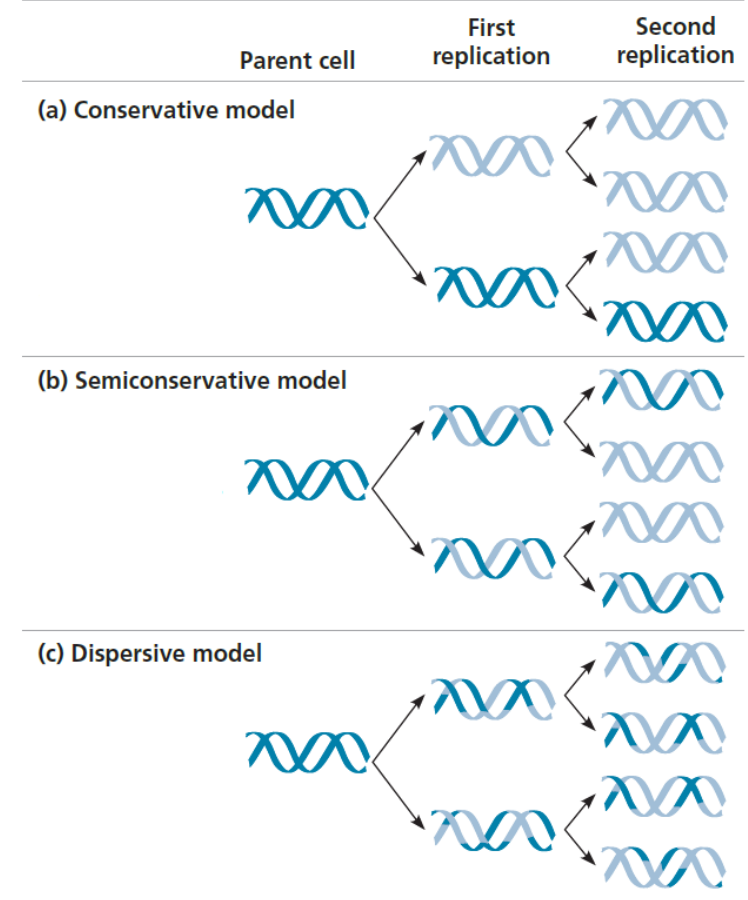
Tamamlayıcılık

- İki zincir tamamlayıcıdır ve biri kapatılsa bile diğeri üzerinden kapalı zincirin dizisi çıkarılabilir.
- Kopyalama sırasında nükleotitler kalıp ipliğe, baz eşleşme kurallarına uyarak sıralanır ve yeni iplik bağlanarak uzar.
- Başlangıçtaki tek çift sarmaldan kısa süre sonra ikisi de “ebeveyn” molekülün kopyası olan iki çift sarmal elde edilir; bu durum fotoğraf negatif-pozitif benzetmesiyle açıklanır.



Replikasyon Modelleri: Yarı-Korunumlu, Korunumlu ve Dispersif

- Yarı-korunumlu modele göre her yeni DNA molekülü bir eski ve bir yeni iplik içerir.
- Korunumlu modele göre iki ebeveyn ipliği yeniden birleşir ve ebeveyn molekül bütünüyle korunur.
- Dispersif modele göre kopyalama sonrası tüm ipliklerde eski ve yeni DNA parçaları bir arada bulunur.



Modelin Sınanması İhtiyacı

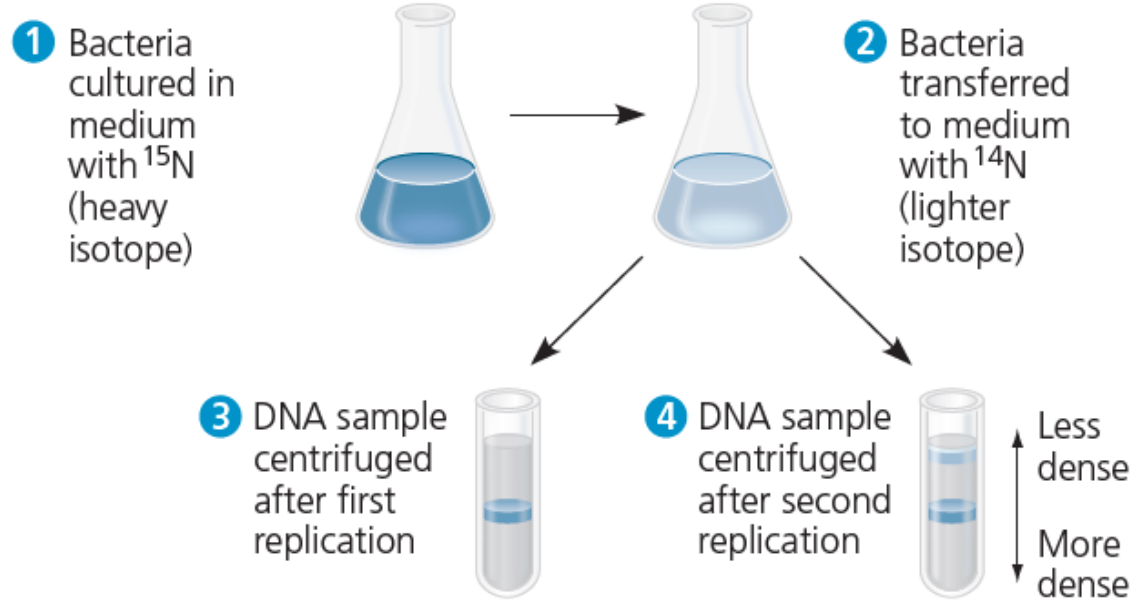
- Çift sarmal yayımlandıktan sonra bu kopyalanma modeli bir süre doğrudan test edilemedi.
- Gerekli deneyler kavramsal olarak basit, fakat uygulamada zorlu teknik adımlar içeriyordu.
- Modeller geçerliliğini, doğrudan deneysel kanıtla dışlanıncaya dek korudu.

Meselson–Stahl'ın Klasik Deneyi

- Meselson ve Stahl, 1950'lerin sonlarında Caltech'te yaptıkları hazırlıkları takiben üç modeli ayırt edecek bir düzenek tasarladılar.
- Yandaki figürde özetlenen deney, yarı-korunumlu modelin öngörülerini destekleyen sonuçlar verdi.
- Bu çalışma, zarif tasarımıyla biyolojide klasik bir örnek olarak kabul edilir.

Deneyin Aşamaları

- *E. coli*'yi, ağır bir azot izotopu olan ^{15}N ile işaretlenmiş nükleotid öncülleri içeren bir ortamda birkaç nesil boyunca kültüre aldılar.
- Daha sonra bakterileri, yalnızca daha hafif bir izotop olan ^{14}N içeren bir ortama aktardılar.
- İlk DNA replikasyonundan sonra bir örnek, ikinci replikasyondan sonra bir örnek daha aldılar.
- Örneklerdeki bakterilerden DNA izole ettiler ve ardından farklı yoğunluklardaki DNA'ları ayırmak için her DNA örneğini santrifüjlediler.



Deneyin Sonuçları

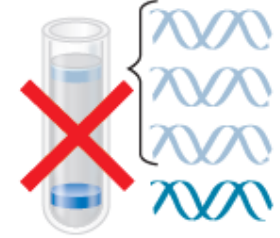
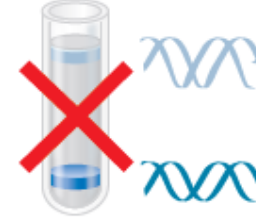
- ^{14}N ortamındaki ilk replikasyon, bir hibrit (^{15}N - ^{14}N) DNA bandı üretti.
- Bu sonuç, korunumlu modeli ortadan kaldırdı.
- İkinci replikasyon ise hem hafif hem de hibrit DNA üretti; bu sonuç, dispersif modeli çürütüp yarı korunumlu modeli destekledi.
- Dolayısıyla, DNA replikasyonunun yarı korunumlu olduğu sonucuna vardılar.

Predictions:

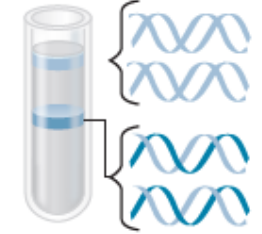
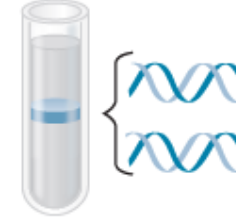
First replication

Second replication

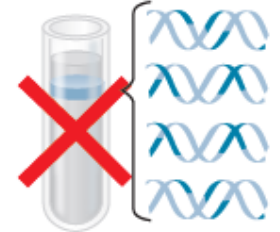
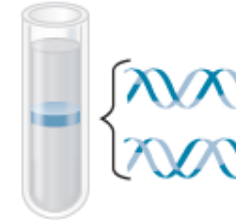
Conservative model



Semiconservative model



Dispersive model



Basit İlke, Karmaşık Gerçeklik

- DNA kopyalanmasının ilkesi yalındır, ancak uygulamada karmaşık biyokimyasal düzenekler devreye girer.
- Sürecin yürütülmesi ve onarımı, çok sayıda proteinin uyumlu çalışmasını gerektirir.
- Bir sonraki adımda bu “biyokimyasal jimnastik” ayrıntılarıyla incelenecektir.

DNA Kopyalanmasının Ölçeği ve Kusursuzluğu

- *E. coli*'nin tek dairesel kromozomu yaklaşık 4,6 milyon baz çifti içerir ve elverişli koşullarda bir saatten kısa sürede kopyalanıp iki özdeş hücre oluşturur.
- İnsan somatik bir hücrede çekirdekte 46 DNA molekülü bulunur ve toplamda yaklaşık 3 milyar baz çifti yer alır.
- Bu bilgi miktarı, bu yazı boyutunda yazılsaydı yaklaşık 1.400 biyoloji ders kitabını doldururdu.
- Hücrelerimiz interfazın S evresinde bu devasa DNA'yı birkaç saat içinde çok az hata ile kopyalar; hata oranı yaklaşık her 10 milyar nükleotidde bir kadardır.

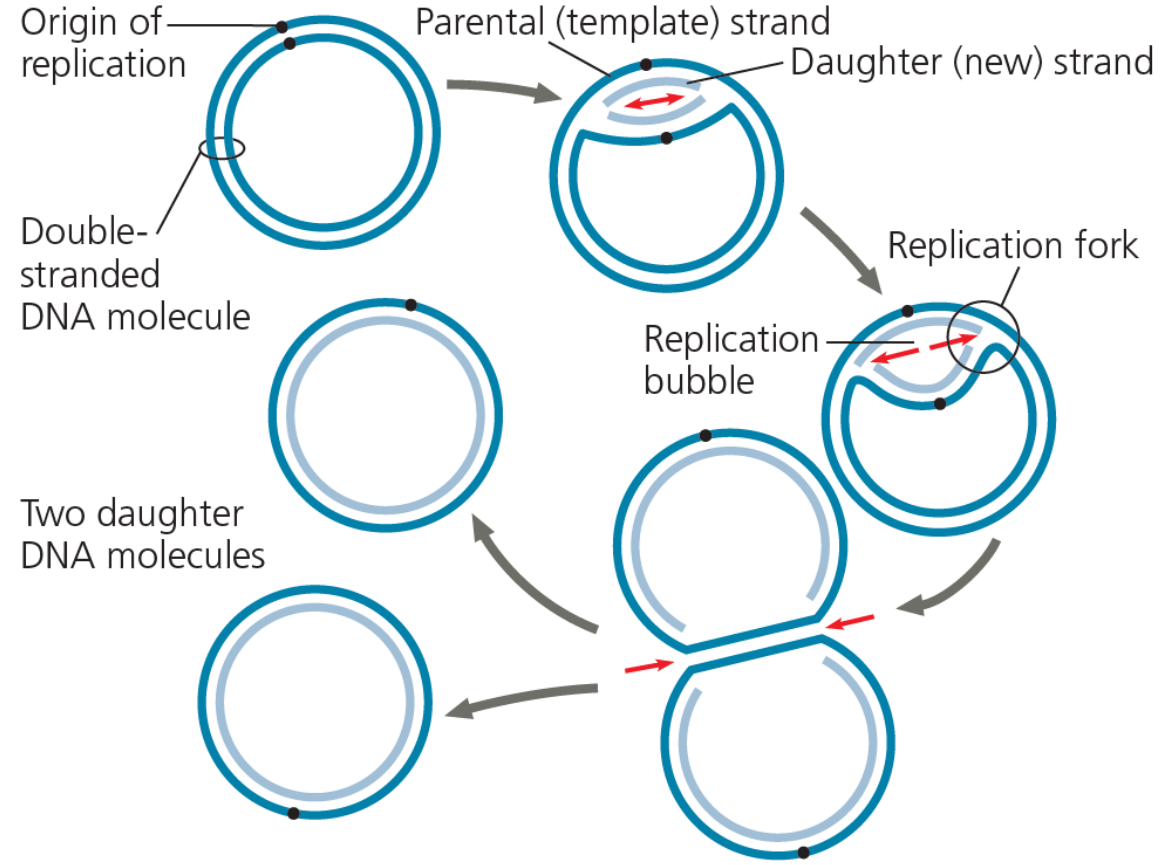
Replikasyon Makinesi ve Organizmalar Arası Benzerlik

- DNA replikasyonuna bir düzineden fazla enzim ve protein birlikte katılır.
- Mekanizmanın ayrıntıları bakterilerde daha iyi anlaşılmış olmakla birlikte burada temel adımlar *E. coli* üzerinden aktarılır.
- Elde edilen bulgular, ökaryotlarda da sürecin özünde benzer işlediğini düşündürür.
- Yani prokaryotlar ve ökaryotlar arasında replikasyonun temel mantığı büyük ölçüde ortaktır.



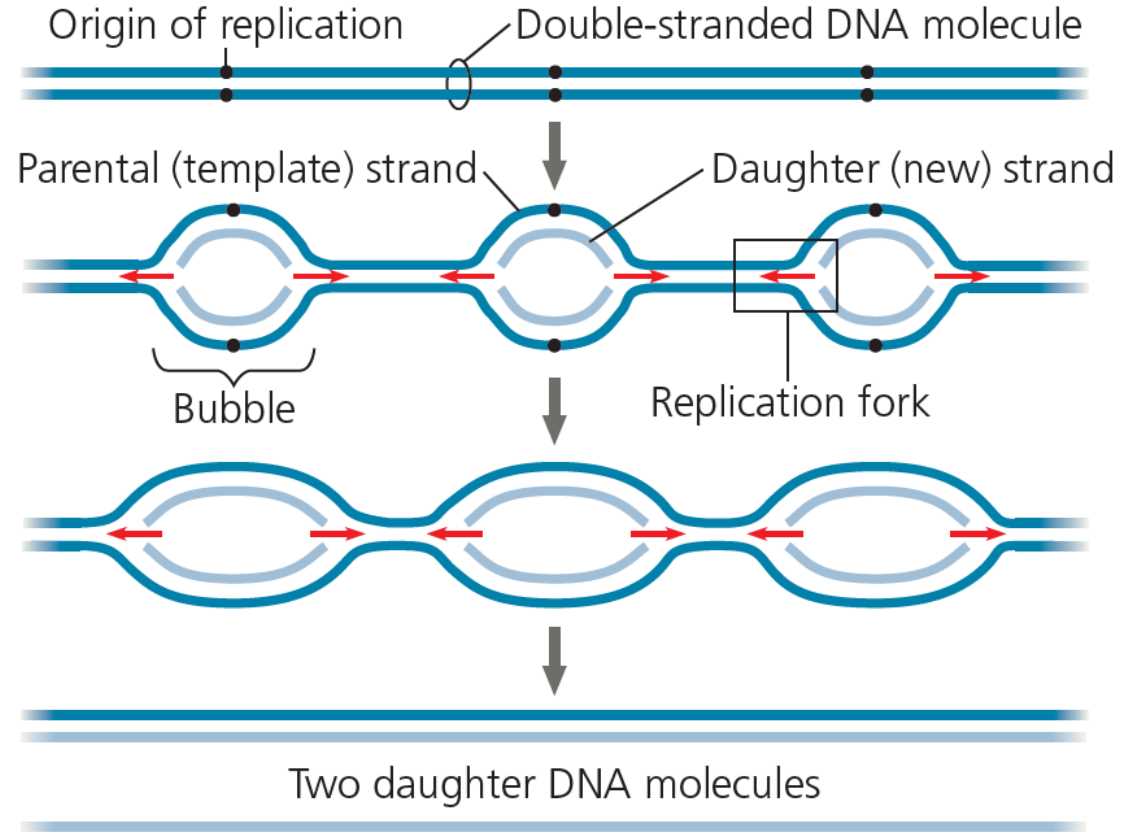
Replikasyon Orijinleri ve Replikasyon Baloncuğu (Bakteriler)

- Kromozomal DNA replikasyonu belirli nükleotid dizilerine sahip replikasyon başlangıç noktalarında başlar.
- *E. coli*'nin dairesel kromozomu tek bir başlangıç noktasına sahiptir.
- Başlatıcı proteinler bu diziyi tanır, iki zinciri ayırır ve bir replikasyon baloncuğu açar.
- Kopyalama baloncuğun her iki yönüne doğru ilerler ve tüm molekül kopyalanana dek sürer.



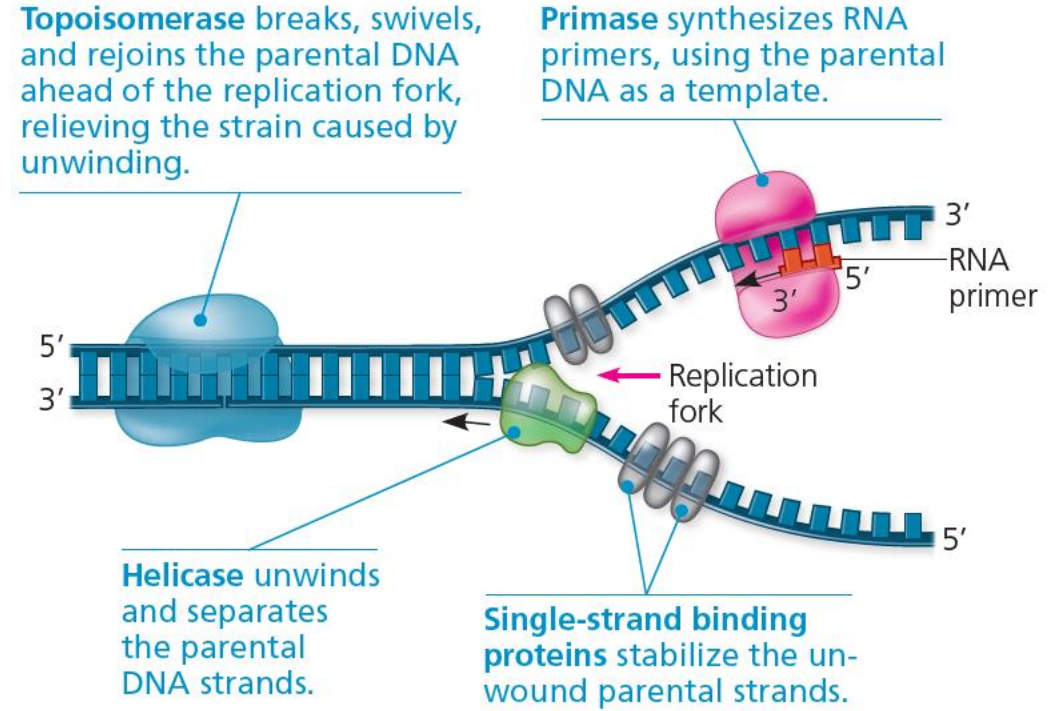
Çoklu Replikasyon Orijinleri ve Baloncukların Kaynaşması (Ökaryotlar)

- Ökaryotik kromozomlar yüzlerce hatta birkaç bin başlangıç noktasına sahip olabilir.
- Birçok replikasyon baloncucu aynı anda oluşur ve uzun DNA moleküllerinin hızlı kopyalanması için zamanla birbirleriyle kaynaşır.
- Ökaryotik replikasyon da her başlangıçtan iki yöne doğru ilerler.



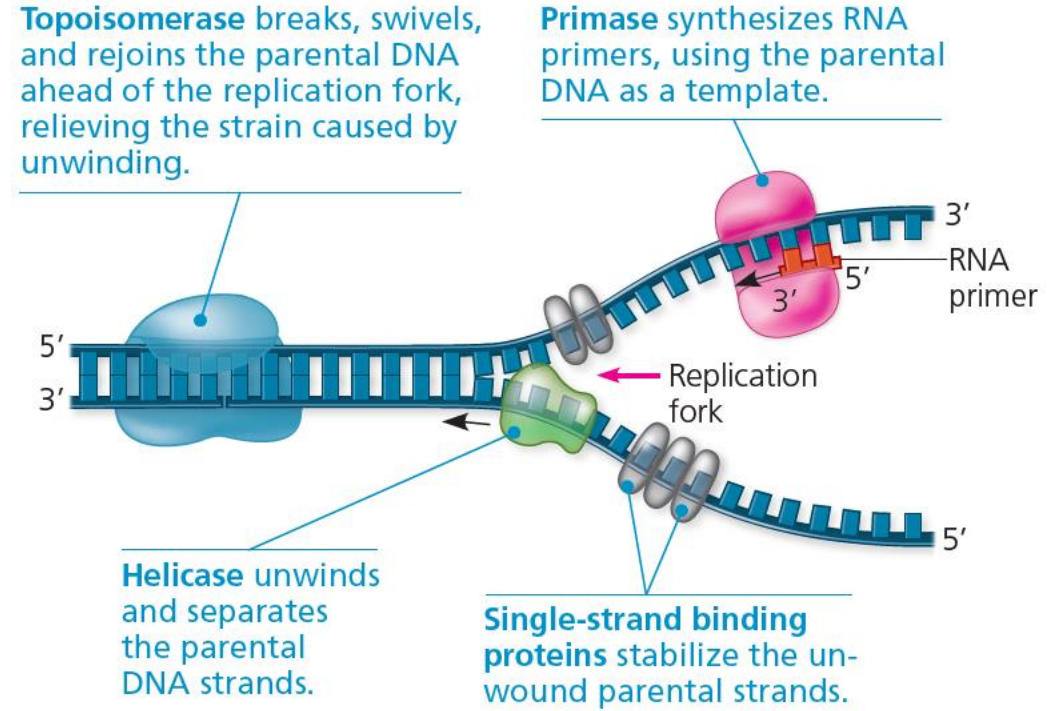
Replikasyon Çatalı ve Zincirlerin Açılması

- Her baloncuğun uçlarında, ebeveyn DNA zincirlerinin açıldığı Y biçimli bölgeler replikasyon çatalı adını alır.
- Helikaz enzimleri çatalda çift sarmalı gevşetir ve iki ebeveyn zinciri ayırarak kalıp olarak erişilebilir kılar.
- Tek zincire bağlanan proteinler (SSBP) ayrılan DNA'yı yeniden eşleşmekten alıkoyar.
- Topoizomeraz, çatalın önündeki gerilimi azaltmak için DNA zincirlerini kırar, döndürür ve yeniden birleştirir.



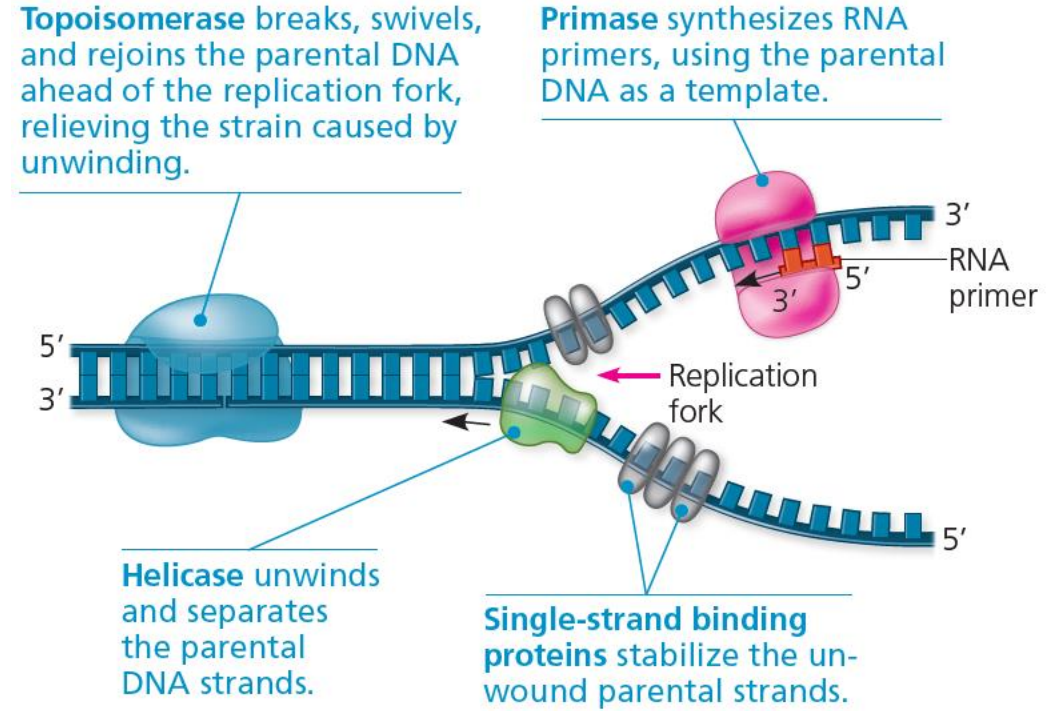
Yeni Zincirin Temeli: Kalıp ve Başlangıç İhtiyacı

- Açılmış ebeveyn DNA iplikleri, yeni tamamlayıcı ipliklerin sentezi için kalıp görevi görür.
- DNA sentezleyen enzimler senteze sıfırdan başlayamaz, yalnızca var olan bir zincirin ucuna nükleotid ekleyebilir.
- Başlangıç için kısa bir nükleik asit parçasına ihtiyaç vardır (primer) ve bu parça DNA değil RNA'dır.
- Yeni DNA zinciri daima RNA primerinin 3' ucundan başlamış olur.



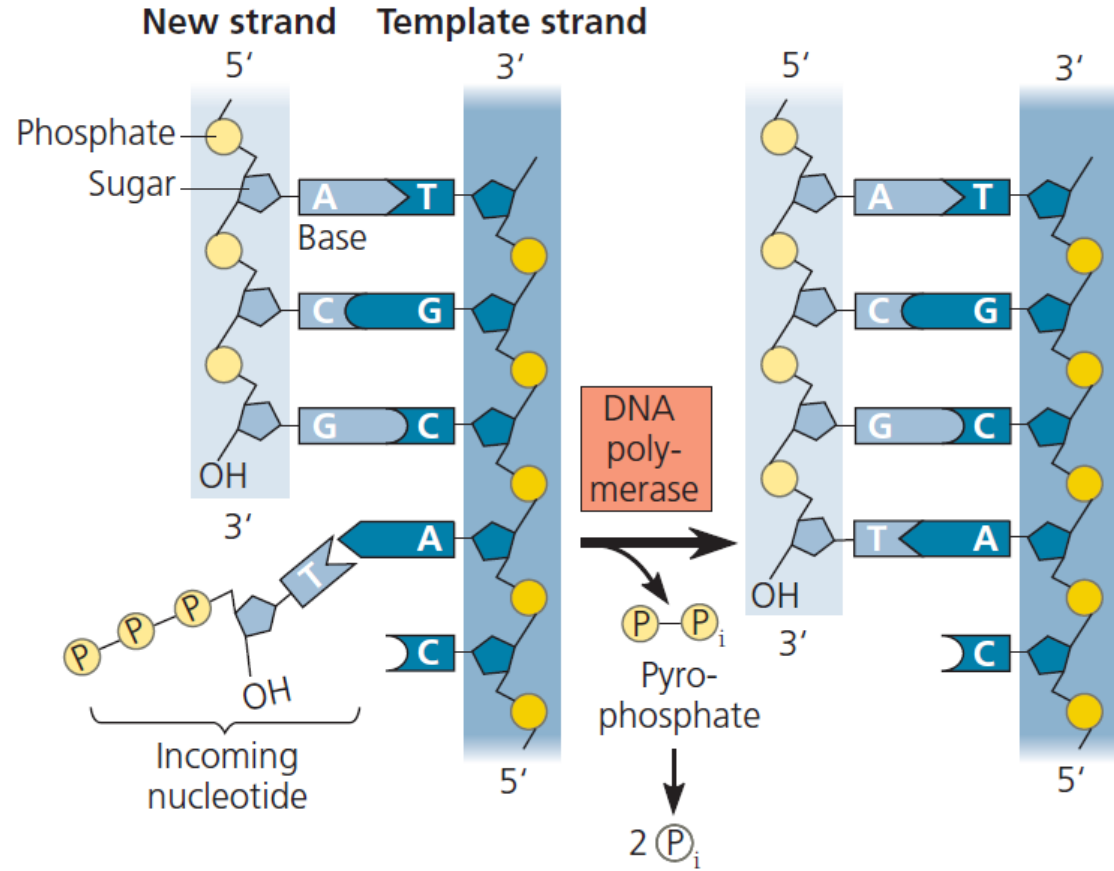
Primaz ve RNA Primeri

- Primer adı verilen kısa RNA zinciri primaz enzimi tarafından sentezlenir.
- Primaz, kalıp DNA'yı okuyarak önce tek bir RNA nükleotidi koyar ve sonra nükleotidleri teker teker ekler.
- Tamamlanan primer genellikle 5–10 nükleotid uzunluğundadır ve kalıp iplikle baz eşleşmesi yapar.
- Bu primer, DNA polimerazın replikasyonu devam ettireceği başlangıç noktasını oluşturur.



DNA Polimerazların Genel İlkeleri

- DNA polimerazlar yeni DNA'yı, var olan bir zincirin 3' ucuna nükleotid ekleyerek uzatır.
- Çoğu DNA polimeraz bir primer ve tamamlayıcı bir DNA kalıp ipliği olmadan çalışmaz.
- *E. coli*'de başlıca iki enzim görev alır, DNA polimeraz III ve DNA polimeraz I.
- Ökaryotlarda durum daha çeşitlidir, en az 11 farklı DNA polimeraz tanımlanmıştır ancak temel ilkeler aynıdır.



Uzama Aşamaları ve Hız

- *E. coli*'de DNA polimeraz III, RNA primerine bir DNA nükleotidi ekleyerek başlar ve uzatmayı sürdürür.
- Bakterilerde uzama hızı saniyede yaklaşık 500 nükleotiddir.
- İnsan hücrelerinde uzama hızı saniyede yaklaşık 50 nükleotittir.
- Bu hızlar, hücre tipine ve koşullara bağlı süreçlerin genel bir görünümünü sunar.

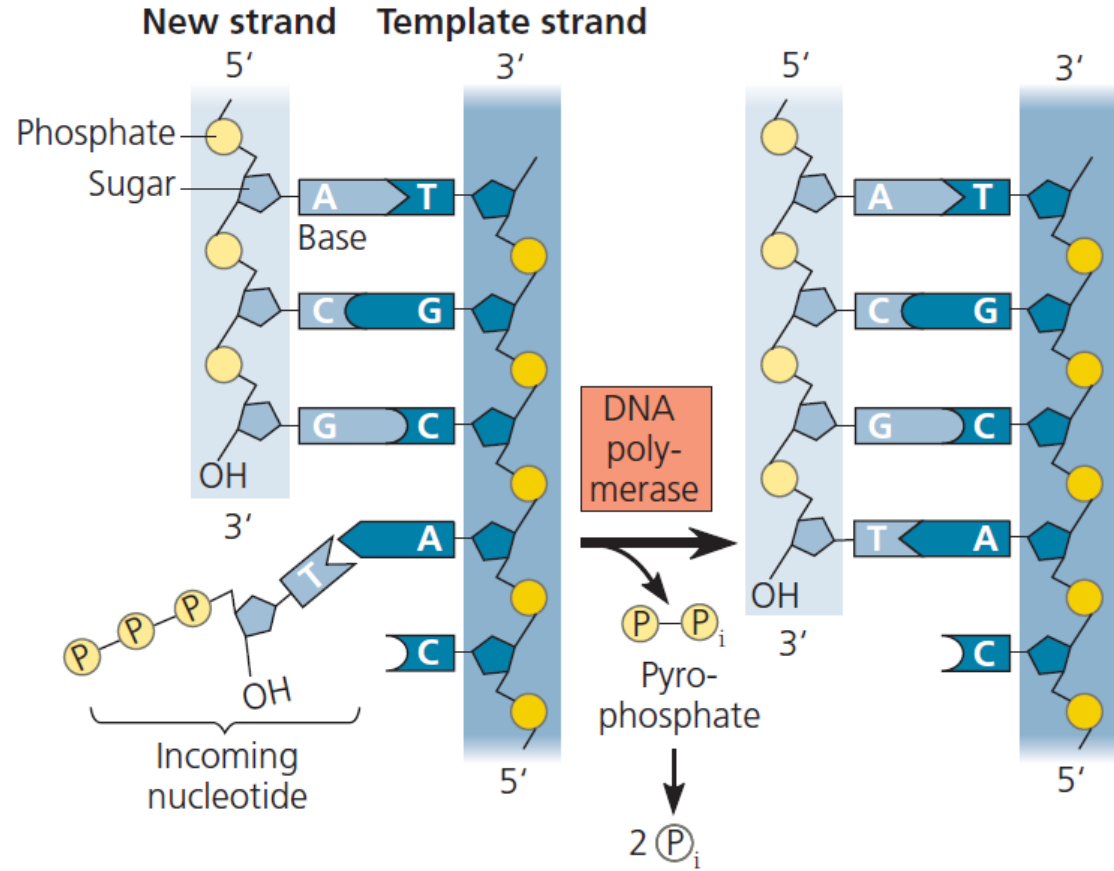
dATP ve ATP Arasındaki İnce Fark

- DNA sentezinde eklenen her bir yapıtaş, bir şeker, bir baz ve üç fosfat grubu taşır.
- Enerji metabolizmasında bildiğimiz ATP ile DNA sentezinde kullanılan dATP arasındaki temel fark şeker türüdür.
- ATP'de şeker riboz iken dATP'de şeker deoksiribozdur.
- Üç fosfatlı kuyruk, birikmiş negatif yük nedeniyle kimyasal olarak tepkiseldir.



Polimerleşmenin Kimyası

- DNA polimeraz, her monomerin eklenmesini bir dehidrasyon reaksiyonu ile katalizler.
- Her eklemede iki fosfat grubu ayrılır ve pirofosfat olarak uzaklaşır.
- Pirofosfatın iki inorganik fosfata hidrolizi eşlenik ve ekzergonik bir tepkimedir.
- Bu hidroliz, polimerleşmenin ileri yönde ilerlemesine yardımcı olur.

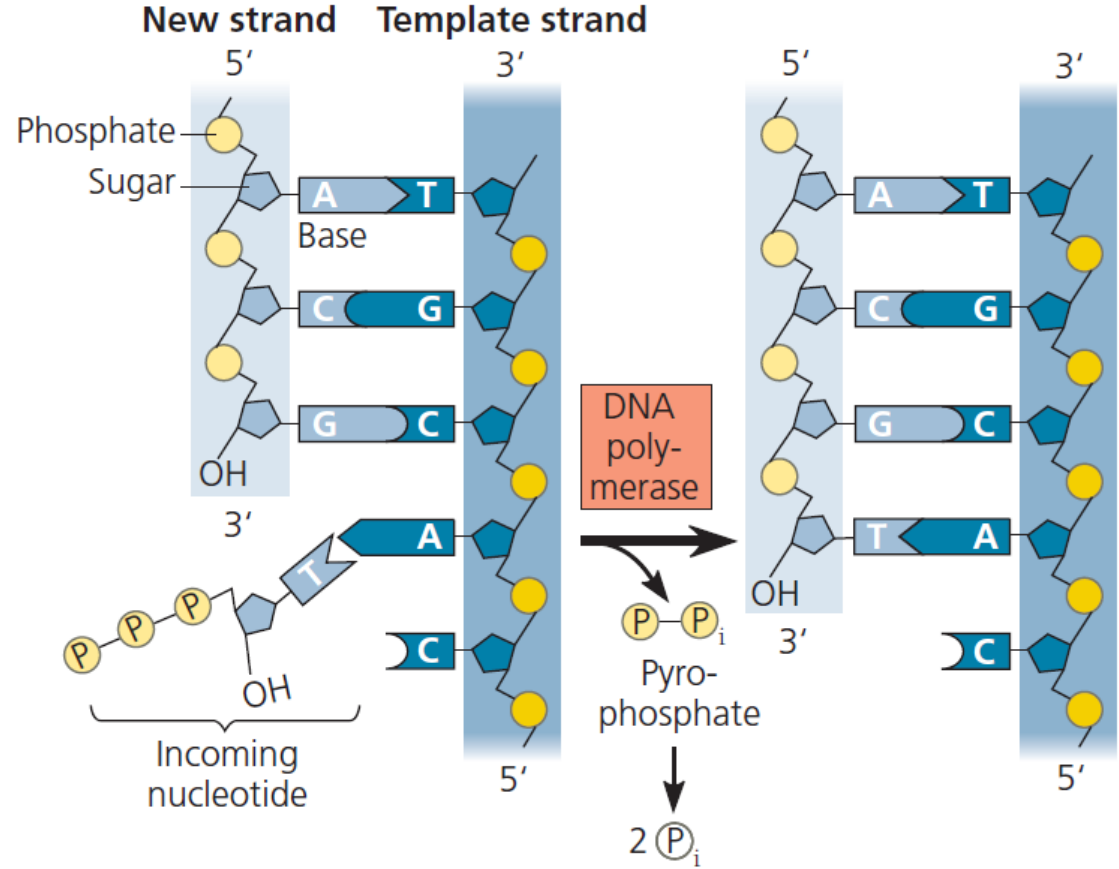


Özet: Başlat, Uzat, Enerjiyle Sürdür

- Başlatma, primaz tarafından yerleştirilen kısa RNA primeri ile güvence altına alınır.
- Uzatma, DNA polimerazların 3' uca nükleotid eklemesiyle kesintisiz ilerler.
- Enerji, nükleotidlerin üç fosfatlı yapısından ve pirofosfat hidrolizinden pratik olarak sağlanır.
- Tüm süreç, kalıp ipliğe sadık baz eşleşmesi prensibiyle yüksek doğrulukta yürür.

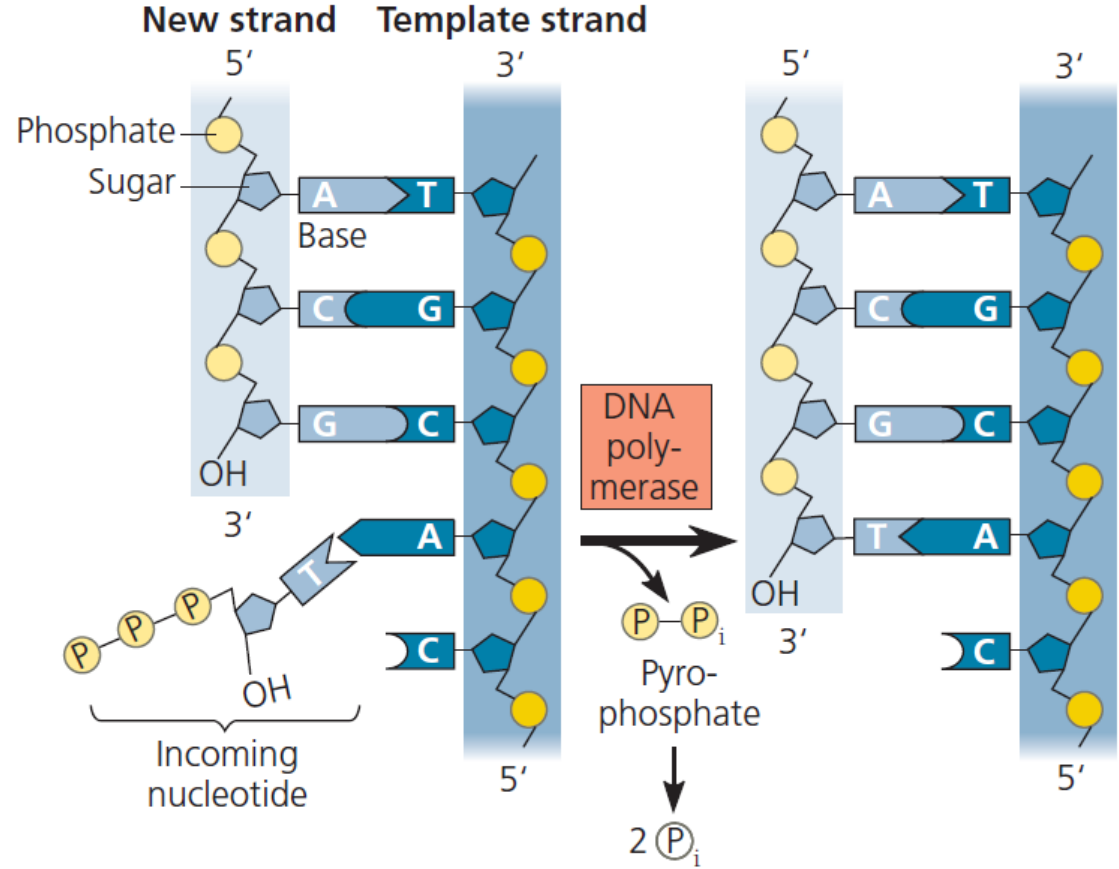
DNA'da Yönlülük ve Antiparalellik

- DNA ipliklerinin iki ucu farklıdır ve her iplik tek yönlü bir “yol” gibi davranır.
- Çift sarmaldaki iki iplik birbirine göre ters yönelimlidir ve bu durum antiparalellik olarak adlandırılır.
- Replikasyon sırasında oluşan yeni iplikler de kendi kalıp ipliklerine antiparalel olmak zorundadır.
- Bu yönlenme kuralı replikasyonun nasıl ilerlediğini doğrudan etkiler.



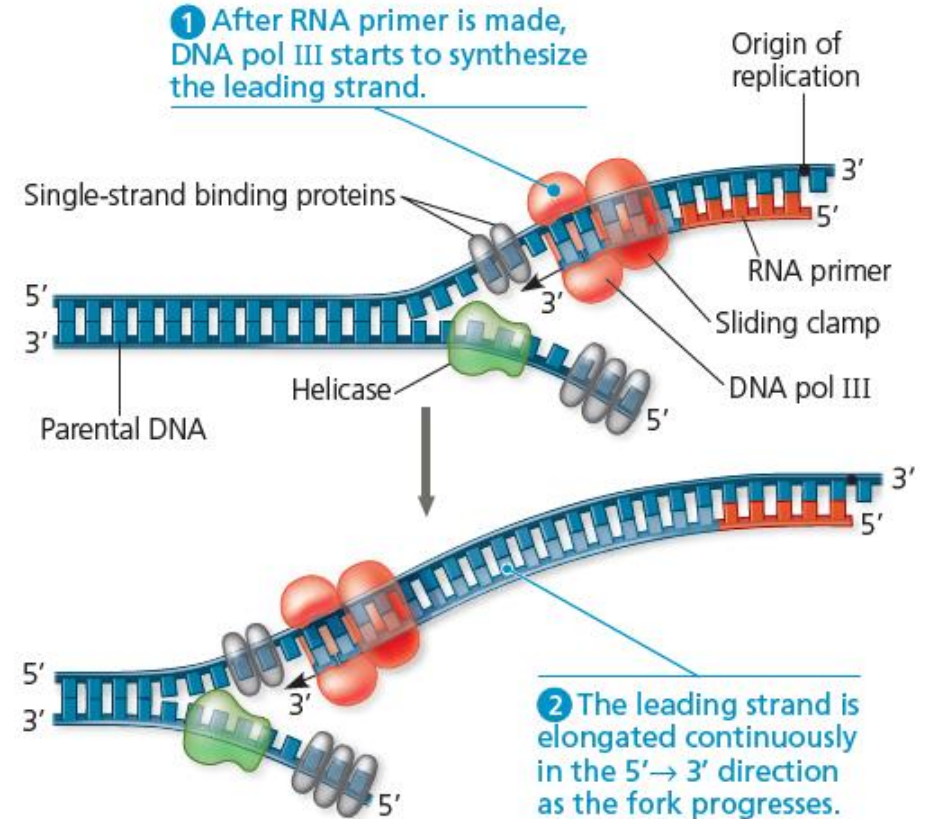
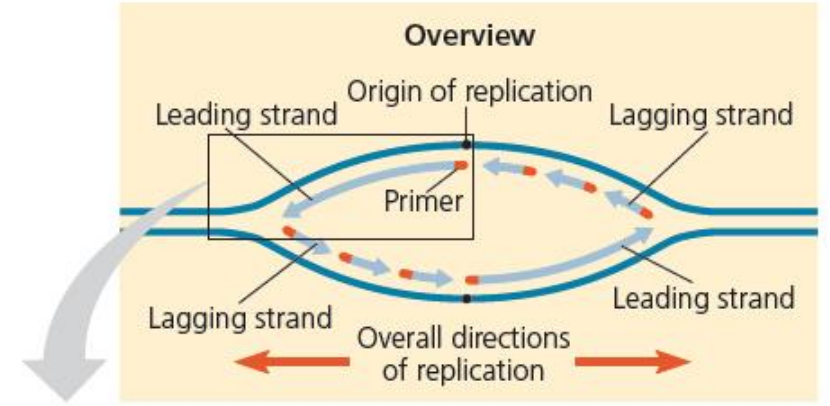
DNA Polimerazların Yön Sınırlaması

- DNA polimerazlar yalnızca serbest 3' ucuna nükleotid ekleyebilir ve 5' ucuna ekleme yapamaz.
- Bu nedenle yeni DNA ipliği yalnızca 5'ten 3'e doğru uzayabilir.
- Bu kural, replikasyon çatalında iki ipliğin farklı şekilde kopyalanmasına yol açar.



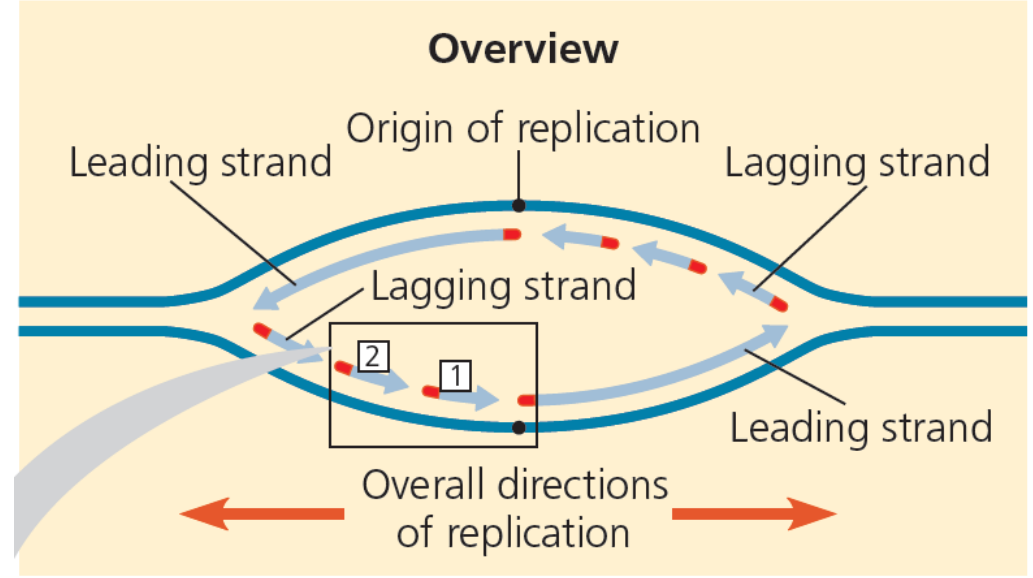
Öncü (Leading) İplik Sentezi

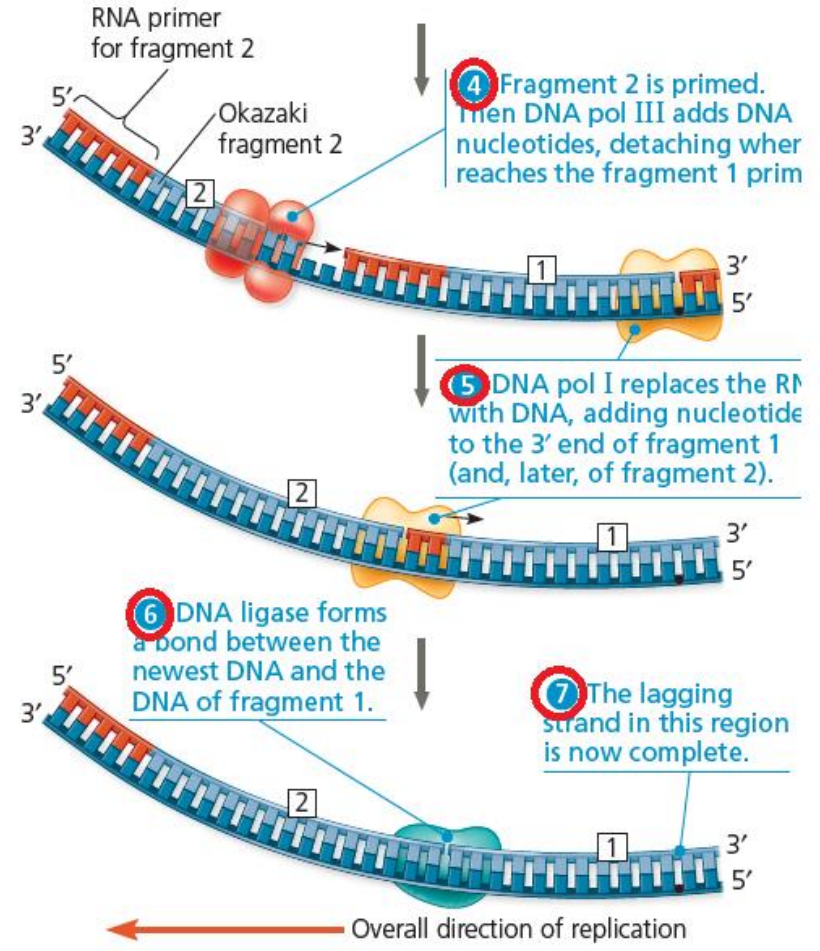
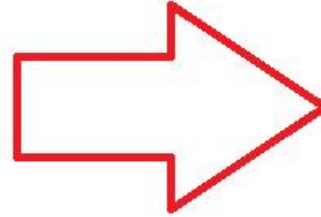
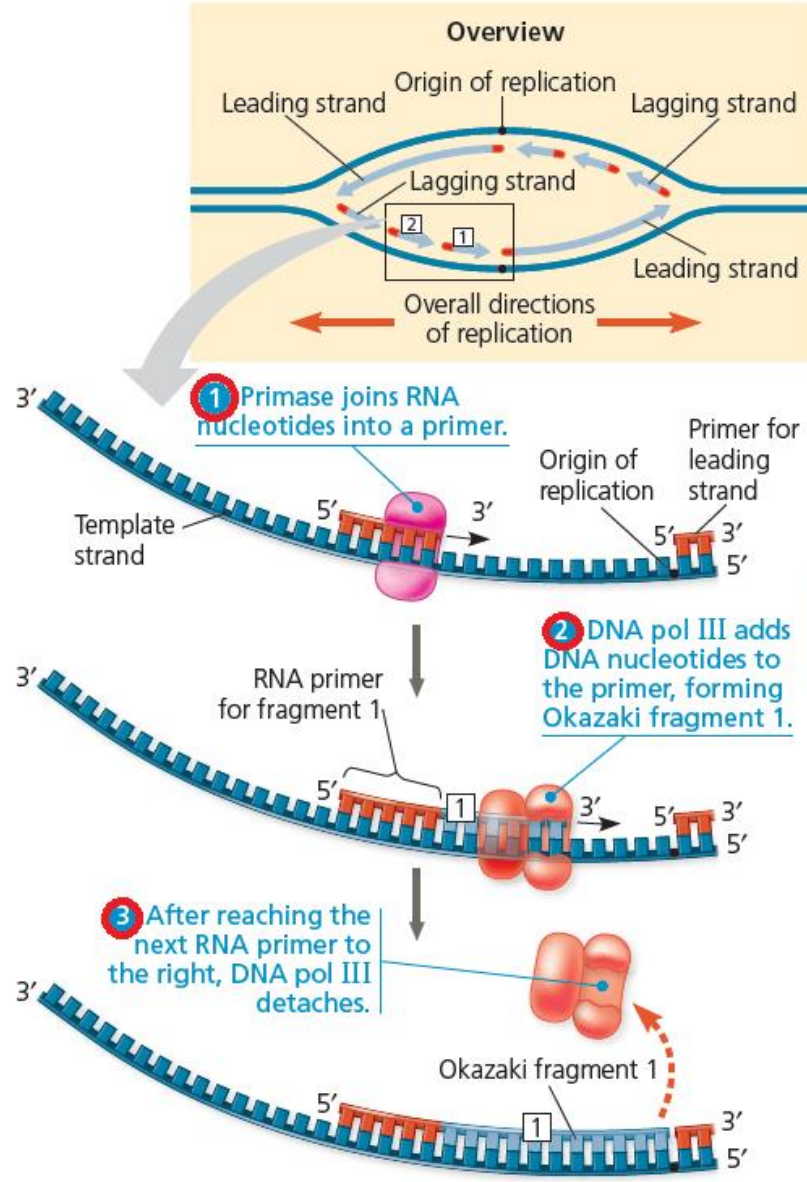
- Bir replikasyon çatalında DNA polimeraz III, kalıp ipliğin birinde yeni ipliği 5'ten 3'e doğru kesintisiz uzatabilir.
- DNA polimeraz III, çatalın içinde kalır ve çatal ilerledikçe yeni tamamlayıcı ipliğe sürekli nükleotid ekler.
- Bu mekanizma ile oluşan iplik "öncü iplik" olarak adlandırılır.
- Öncü ipliğin tamamı için tek bir primer yeterlidir.



Geciken (Lagging) İplik Mantığı

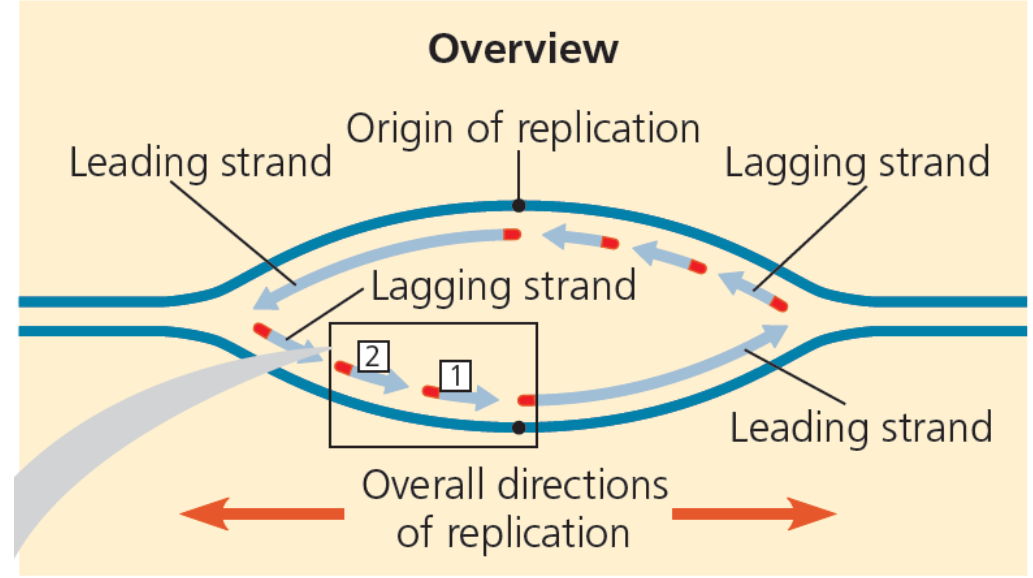
- Diğer kalıp iplikte, DNA polimeraz III yine 5'ten 3'e uzatmak zorunda olduğu için çatala zıt yönde çalışır.
- Bu iplik “geciken iplik” olarak adlandırılır ve kesintili şekilde sentezlenir.
- Geciken iplik, Okazaki fragmentleri denen kısa DNA parçaları halinde üretilir.
- Bu fragmentler *E. coli*'de yaklaşık 1.000–2.000 nükleotid, ökaryotlarda yaklaşık 100–200 nükleotid uzunluğundadır.

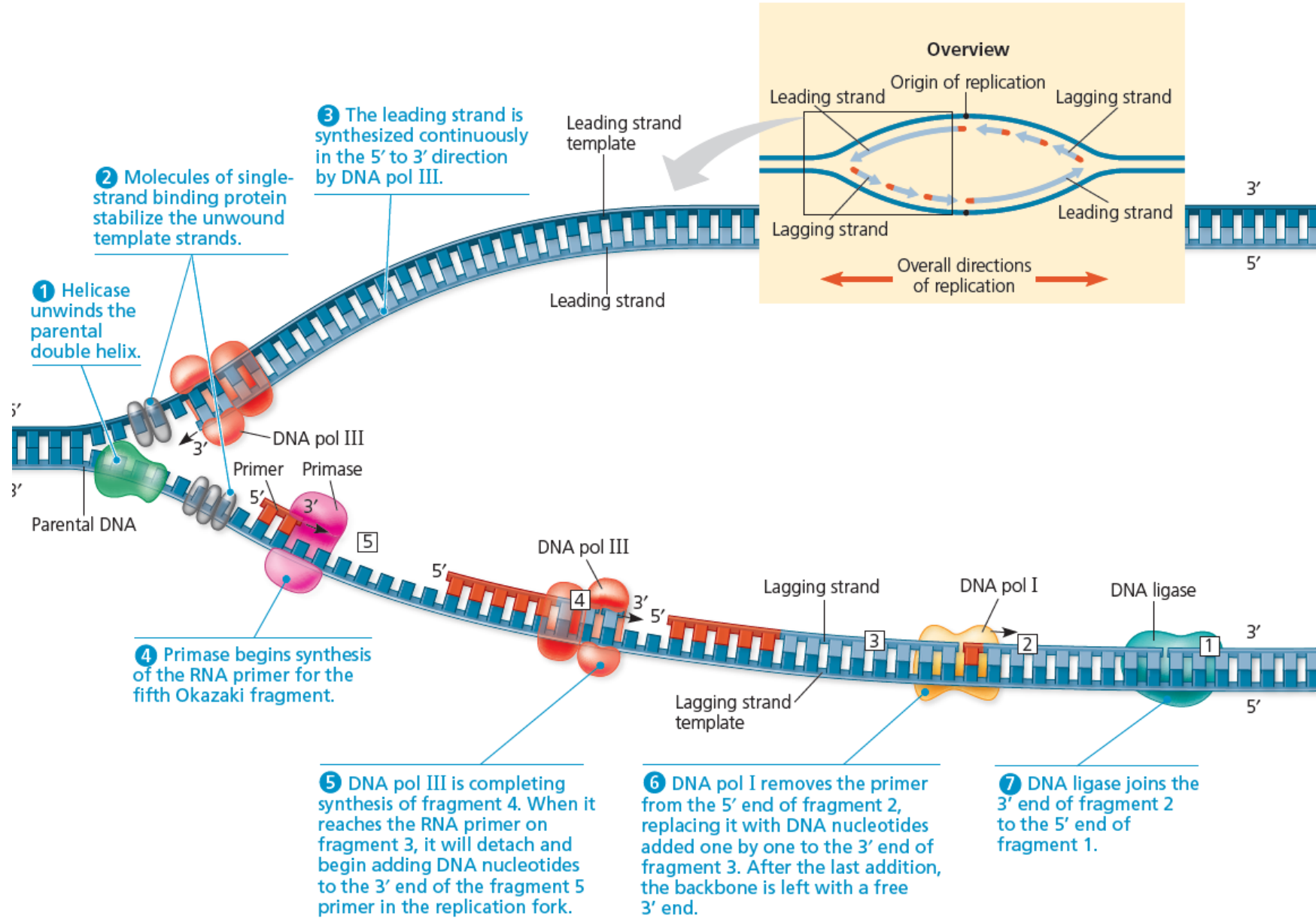




Eşzamanlılık ve İsimlendirme

- Öncü ve geciken iplik sentezleri aynı anda ve aynı hızda gerçekleşir.
- Geciken iplik adı, sentezin bir miktar gecikerek parça parça başlamasından gelir.
- Her yeni fragmanın başlaması için çatalda yeterli kalıp bölgesinin açığa çıkması beklenir.
- Bu bekleme, sentezin kesintili görünmesine yol açar.





Enzimler-Genel Tekrar-1

- **Helikaz:** Replikasyon çatallarındaki çift sarmalı çözer.
- **Tek zincire bağlanan protein:** Tek zincirli DNA'ya bağlanır ve bu zincir kalıp olarak kullanılana kadar yapıyı stabilize eder.
- **Topoizomeraz:** DNA zincirlerini kırarak, döndürerek ve yeniden birleştirerek replikasyon çatallarından önce aşırı sarılma gerilimini hafifletir.
- **Primaz:** Öncü zincirin 5' ucunda ve geciken zincirin her bir Okazaki parçasının 5' ucunda bir RNA primeri sentezler.

Enzimler-Genel Tekrar-2

- **DNA pol III:** Ebeveyn DNA'sını kalıp olarak kullanarak, bir RNA primerine veya önceden var olan bir DNA zincirine nükleotidler ekleyerek yeni bir DNA zinciri sentezler.
- **DNA pol I:** Primerin 5' ucundaki RNA nükleotidlerini (primerleri) çıkarır ve bunları bitişik parçanın 3' ucuna eklenen DNA nükleotidleriyle değiştirir.
- **DNA ligaz:** Geciken zincirin Okazaki parçalarını birleştirir; öncü iplikte, primerin yerini alan DNA'nın 3' ucunu öncü iplik DNA'sının geri kalanına birleştirir.

“DNA Replikasyon Makinesi” Kavramı

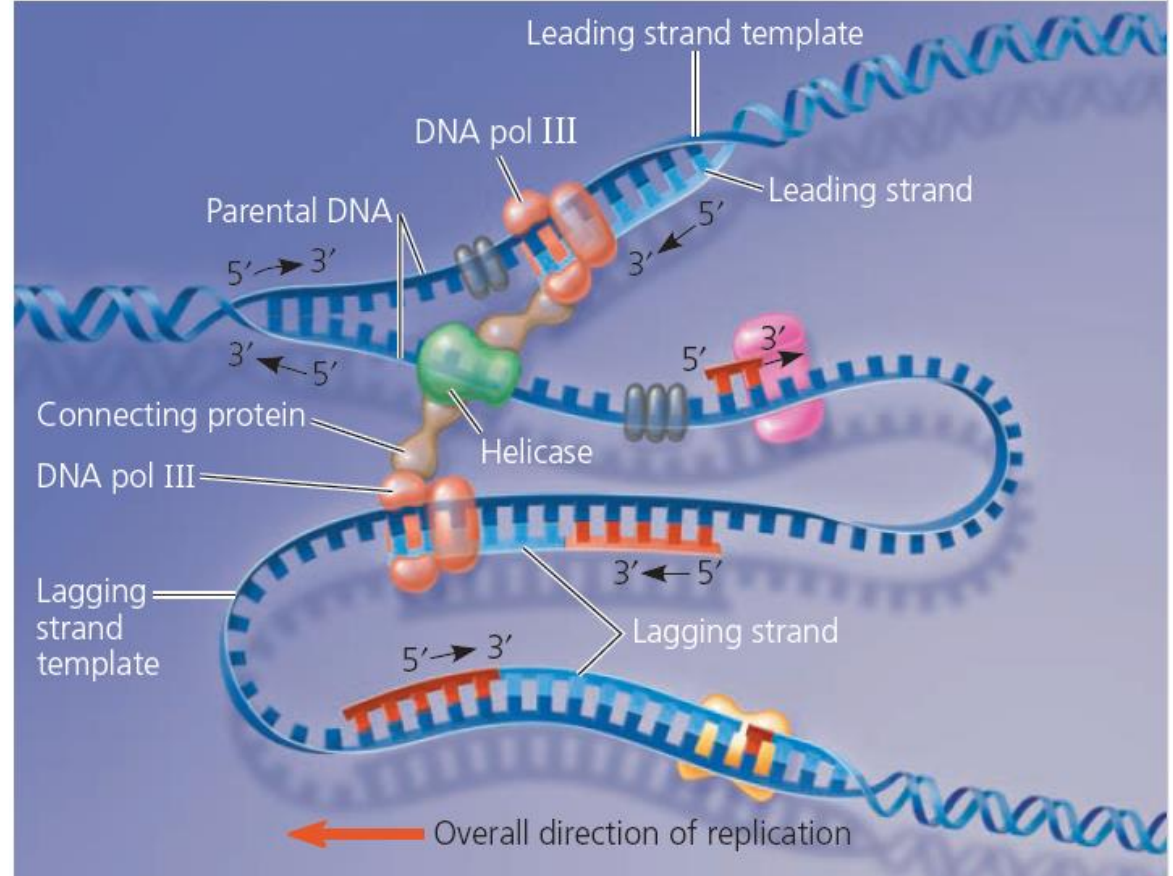
- Replikasyonu tek tek “lokomotif” polimerazlar gibi düşünmek yerine, büyük bir protein kompleksinin birlikte çalışması olarak görmek daha doğrudur.
- Çeşitli protein-protein etkileşimleri bu kompleksin verimini artırır ve işleri eşgüdüm içinde yürütür.
- Primazın, çataldaki diğer proteinlerle etkileşerek bir tür “moleküler fren” gibi davranması bu eşgüdüme örnektir.
- Bu etkileşim, primer yerleşimini ve öncü ile geciken iplikteki hızların uyumunu koordine eder.

Kompleks mi İlerler DNA mı İlerletilir?

- Replikasyon kompleksi DNA boyunca ilerlemek zorunda olmayabilir, bunun yerine DNA kompleksin içinden geçirilebilir.
- Ökaryot hücrelerde, kompleksin çoklu kopyaları çekirdek matriksine bağlanmış “fabrikalar” halinde gruplanabilir.
- Bazı hücre tiplerinde, iki DNA polimerazın ebeveyn DNA’yı “içeri sarıp” yeni iplikleri dışarı verdiği modele dair deneysel kanıtlar vardır.
- Bu bakış, replikasyonun mekaniğini tek bir hareketli enzim yerine sabit bir iş istasyonu gibi ele alır.

“Trombon” Modeli ve Açık Sorular

- Trombon modelinde geciken iplik, kompleksin içinden tekrar geçirilerek bir döngü oluşturur.
- Bu düzen, kesintili sentezin organizasyonunu ve eşzamanlılığı açıklar.
- Kompleksin mi hareket ettiği yoksa DNA'nın mı kompleksin içinden aktığı sorusu kesin değildir ve aktif olarak araştırılmaktadır.
- Sürecin türler arasında değişkenlik gösterebilmesi de olasıdır.



Doğrulama (proofreading) ile Hata Oranının Düşmesi

- Baz eşleşmesinin özgüllüğü tek başına yeterli değildir ve başlangıçta her $\sim 10^5$ nükleotitte 1 hata oluşabilir.
- Pek çok DNA polimeraz, yeni bağlanan nükleotidi anında kalıba karşı kontrol eder ve yanlışsa çıkarıp senteze geri döner.
- Bu sayede tamamlanmış DNA'daki hata oranı $\sim 10^{10}$ 'da 1'e düşer.

Eşleşme Hatası Onarımı (mismatch repair)

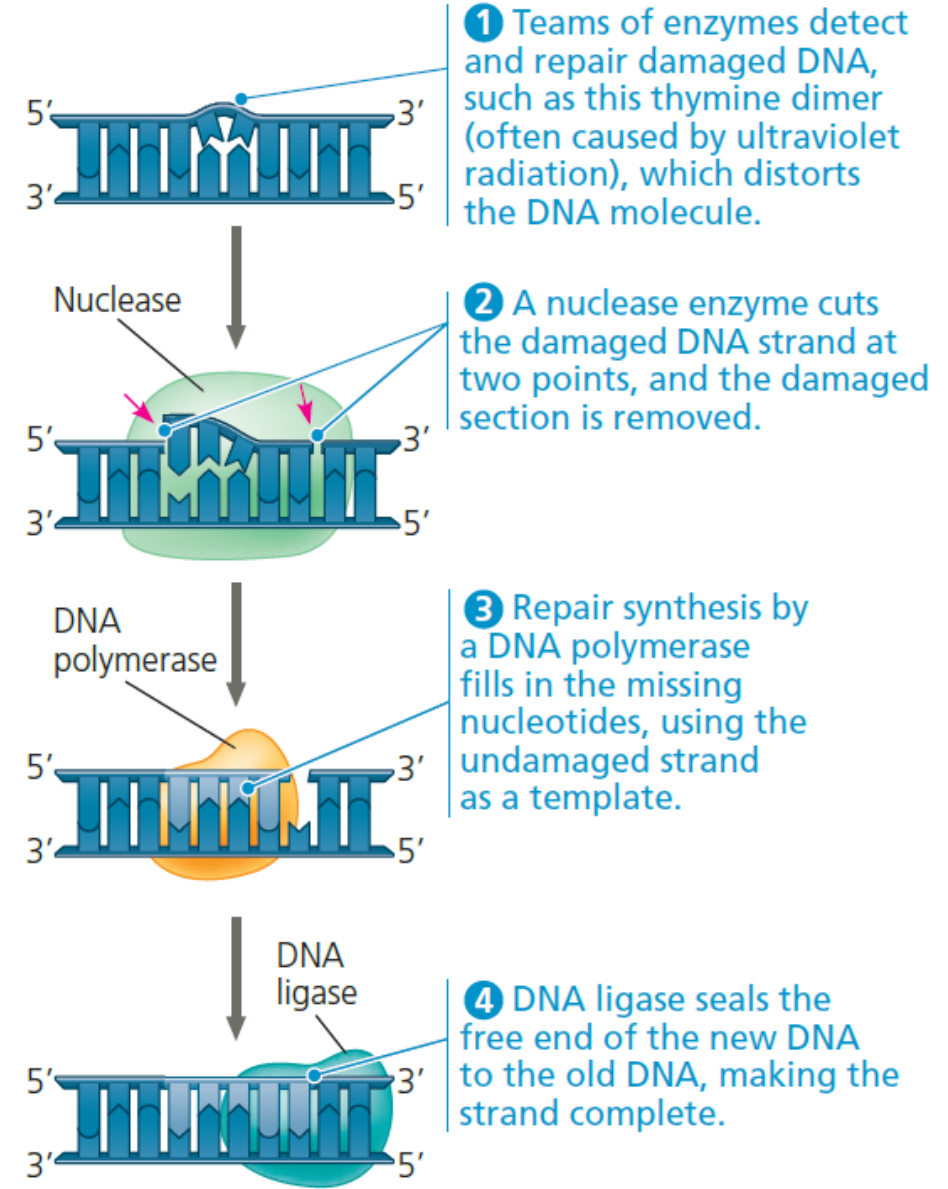
- Bazen yanlış eşleşmeler proofreading'i atlatır ve başka enzimlerce tanınıp çıkarılır.
- Bu sistemler, replikasyon hatalarından kaynaklanan yanlış nükleotidleri kesip doğru nükleotidlerle değiştirir.
- Bir onarım enzimindeki kalıtsal kusurun bir kolon kanseri formu ile ilişkili bulunması, bu sistemlerin önemini vurgular.

DNA Hasarı ve Genel Onarım Mantığı

- Replikasyon dışında da kimyasal ve fiziksel etmenler DNA'da hatalara yol açabilir.
- Hücreler, hasarlı bölgeyi nükleaz ile kesip çıkarır ve boşluğu sağlam ipliği kalıp alarak doldurur.
- Bu doldurma aşamasında DNA polimeraz ve DNA ligaz birlikte görev yapar.

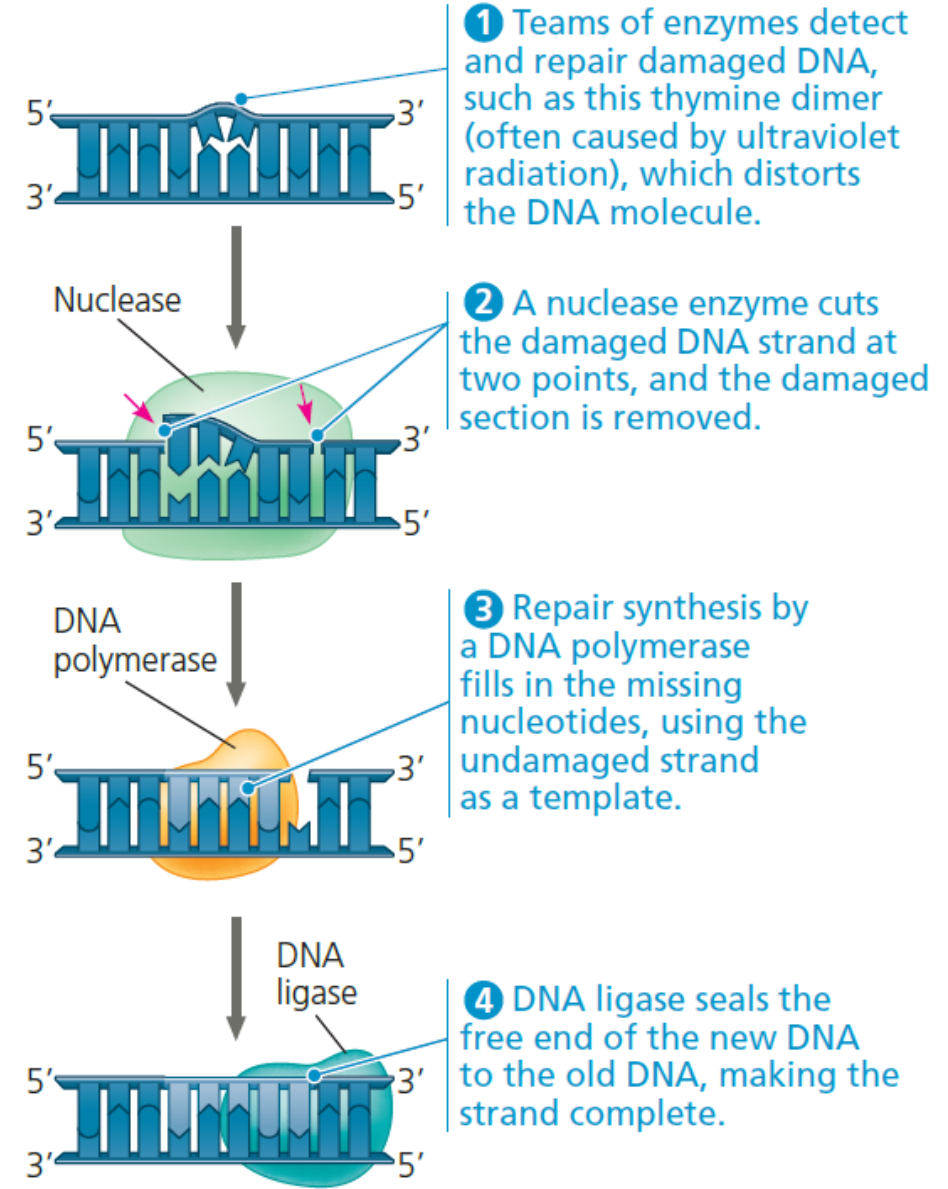
Nükleotid Eksizyon Onarımı

- Nükleotid eksizyon onarımı, hasarlı segmentin çıkarılıp doğru nükleotidlerle tamamlanmasını sağlayan iyi tanımlı bir sistemdir.
- Bu süreç, baz eşleşmesinin çift iplikli doğasından yararlanarak doğru bilgiyi sağlam iplikten okur.



UV Kaynaklı Timin Dimerleri

- Güneşten gelen UV ışınları, aynı iplikte yandaki timinlerin kovalent bağlanmasına neden olabilir.
- Timin dimerleri DNA'yı bükerek replikasyonu aksatır ve onarılmaları gerekir.
- Bir nükleaz enzimi hasarlı DNA zincirini iki noktadan keser ve hasarlı kısım çıkarılır.
- Hasarsız ipliği kalıp olarak kullanarak, eksik nükleotidleri DNA polimeraz ile onarır.
- DNA ligaz, yeni DNA'nın serbest ucunu eski DNA'ya bağlayarak ipliği tamamlar.



Xeroderma pigmentosum ve Onarımın Biyolojik Önemi

- Xeroderma pigmentosum (XP) çoğu olguda nükleotid eksizyon onarımındaki kalıtsal bir kusurdan kaynaklanır.
- XP'li bireyler güneş ışığına aşırı duyarlıdır ve onarılamayan UV kaynaklı mutasyonlar cilt kanserine yol açabilir.
- Korunma olmadığında çocuklarda 10 yaşına kadar cilt kanseri gelişebilecek kadar tablo ağır seyredebilir.



Onarım Enzimlerinin Çeşitliliği ve Hücresel Gözetim

- DNA onarımı, genomun sürekliliği için o kadar kritiktir ki çok sayıda enzim bu işe adanmıştır.
- *E. coli*'de neredeyse 100, insanlarda ise şimdiye dek yaklaşık 170 onarım enzimi tanımlanmıştır.
- Her hücre, genetik materyalini sürekli izler ve kalıcı mutasyon oluşmadan hataları düzeltmeye çalışır.

DNA'daki Kalıcı Değişiklikler

- Organizmanın sağlıklı işleyişi için DNA'nın doğru kopyalanması ve hasarın onarılması kritik önemdedir.
- Düzeltme ve onarım sonrası hata oranı çok düşüktür fakat nadiren hatalar kaçabilir.
- Yanlış eşleşmiş bir nükleotit kopyalandığında, hatayı içeren DNA zincirinde kalıcı bir dizi değişikliği oluşur.
- DNA dizisindeki kalıcı değişiklik mutasyon olarak adlandırılır.

Mutasyon ve Fenotip

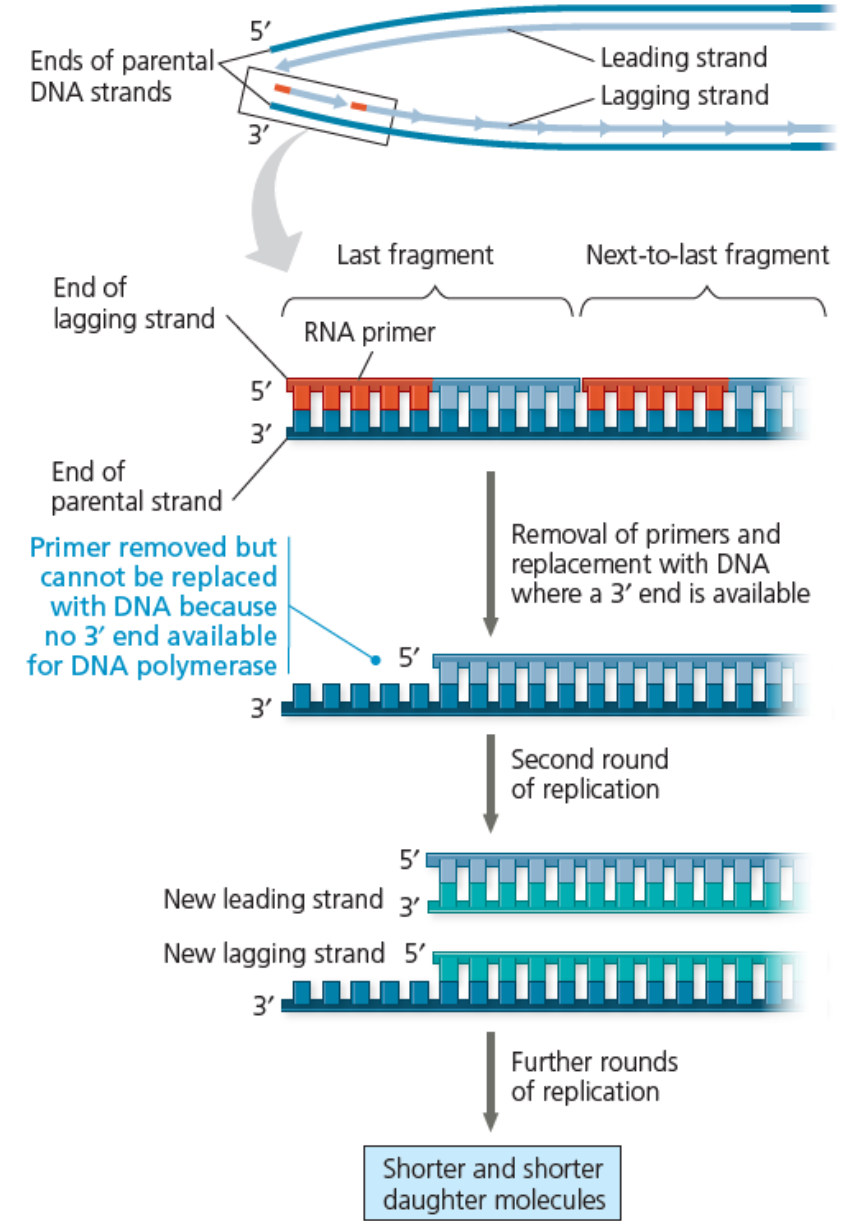
- Mutasyonlar bir organizmanın fenotipini değiştirebilir.
- Mutasyonlar eşey hücrelerinde oluşursa nesiller boyunca aktarılabilir.
- Bu değişimlerin büyük çoğunluğu ya etkisizdir ya da zararlıdır.
- Çok küçük bir kısmı faydalı olabilir ve bu durum evrimsel süreçte önem kazanır.

Varyasyonun Kaynağı ve Doğal Seçilim

- Mutasyonlar doğal seçilimin üzerinde işlediği varyasyonun özgün kaynağıdır.
- Düşük ama var olan mutasyon hızı ile yüksek kopyalama doğruluğu arasındaki denge yeni proteinlerin ortaya çıkmasına katkı verir.
- Uzun zaman ölçeklerinde bu süreç yeni türlerin oluşumuna zemin hazırlar.
- Yeryüzündeki biyolojik çeşitliliğin zenginliği bu birikimli sürecin sonucudur.

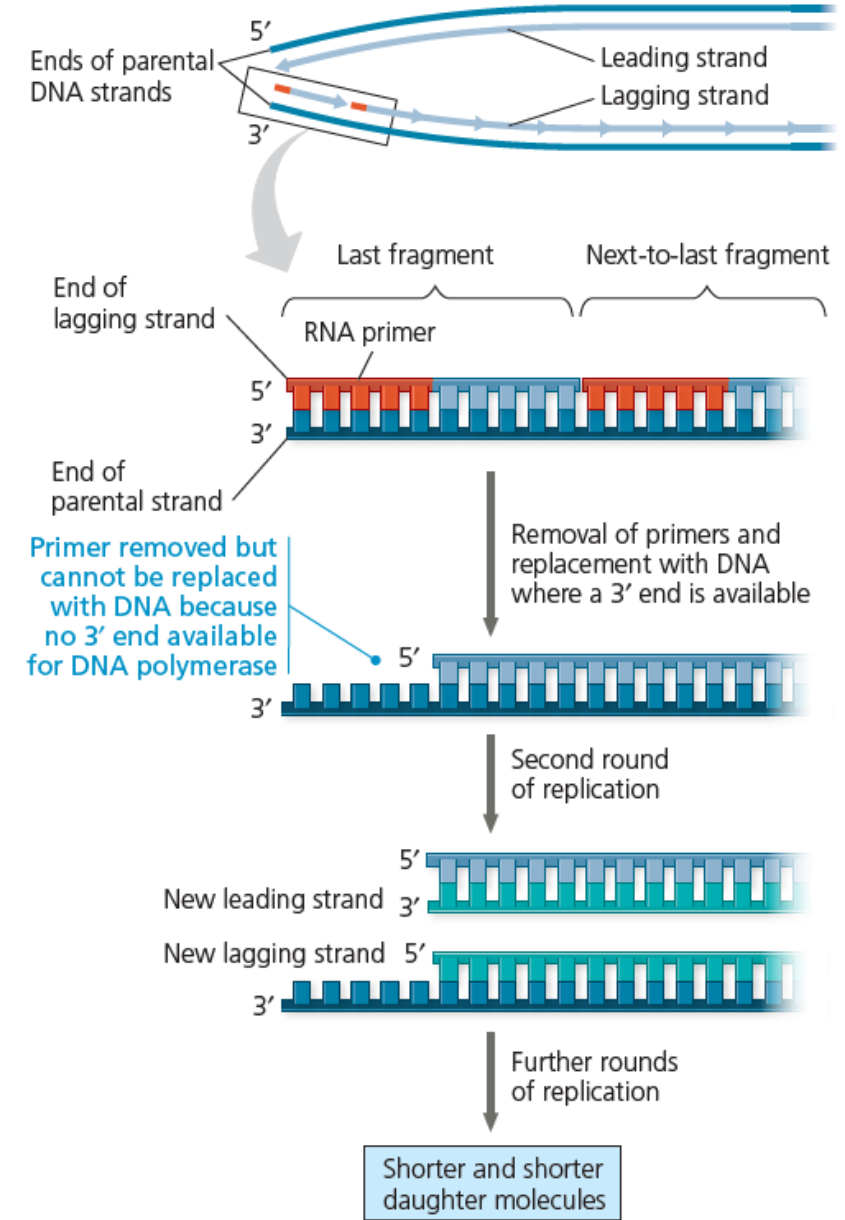
Doğrusal DNA'nın Uçlarının Kopyalanması

- Ökaryotik kromozomlar gibi doğrusal DNA'larda, olağan replikasyon mekanizması 5' uçların tam kopyalanmasını tamamlayamaz.
- DNA polimeraz yalnızca var olan bir polinükleotitin 3' ucuna nükleotit ekleyebilir.
- Kalıbın en ucuna yerleşen RNA primeri çıkarıldığında, ekleme için uygun bir 3' uç kalmaz.



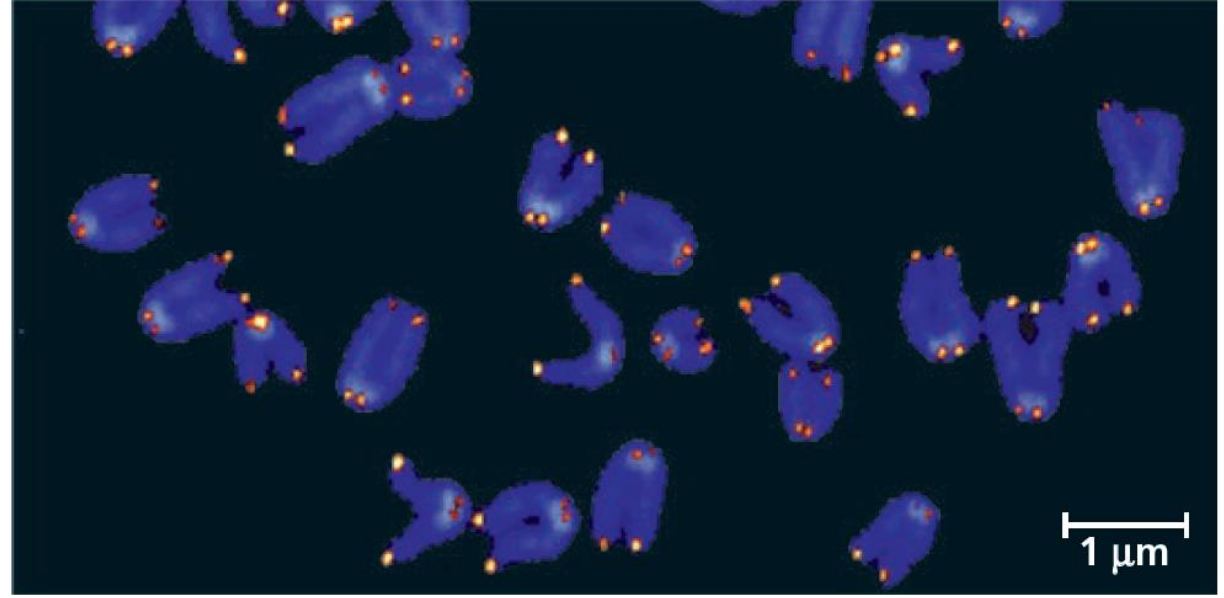
Kısalan Uçların Sonucu

- Her replikasyon turunda DNA molekülleri kademeli olarak kısalır.
- Uçlarda düzensiz ve basamaklı görünümlü bölgeler birikir.
- Prokaryotlarda çoğu kromozom halkasaldır ve uç bulunmadığı için bu kısalma gerçekleşmez.
- Bu durum ökaryotik doğrusal kromozomlarda özel bir koruma gerektirir.



Telomerlerin Varlığı

- Ökaryotik kromozom uçlarında telomer adı verilen özel nükleotit dizileri bulunur.
- Telomerler gen taşımaz ve kısa bir dizinin birçok tekrarından oluşur.
- İnsanda telomer DNA'sında TTAGGG dizisi 100 ile 1.000 kez tekrarlanır.
- Telomerlerin konumu yandaki figürde gösterilmektedir.

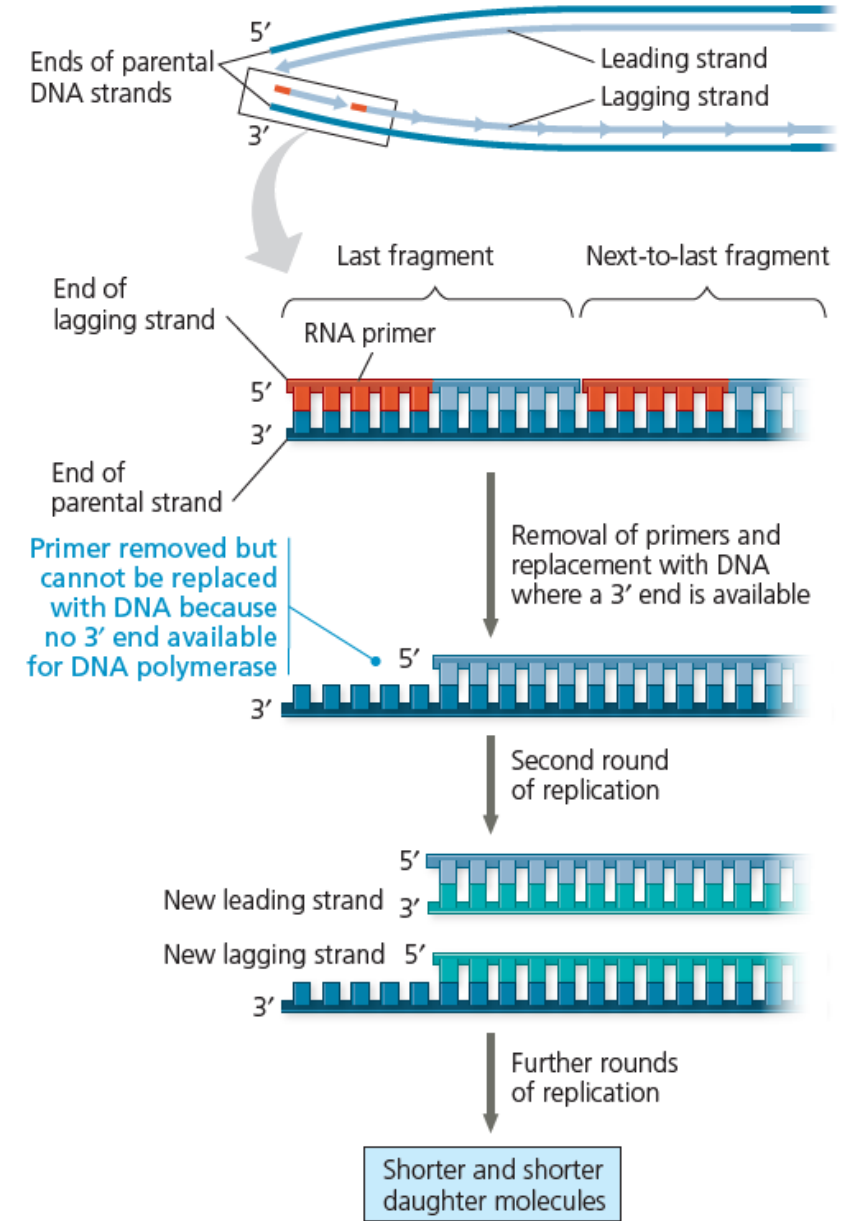


Telomerlerin İki Koruyucu İşlevi

- Telomer DNA'sına bağlanan özgül proteinler basamaklı uçların DNA hasar yanıtını tetiklemesini engeller.
- Telomer DNA'sı, kromozom uçlarında gen kaybını geciktiren bir tampon bölge gibi davranır.
- Telomerler gen erozyonunu tamamen önlemez ancak geciktirir.
- Bu tamponlama, peşi sıra gelen kopyalamalarda genlerin korunmasına katkı sağlar.

Telomer Kısalması ve Yaşlanma Bağlantısı

- Telomerler her replikasyon turunda kısalır.
- Çok kez bölünmüş kültür hücrelerinde ve yaşlı bireylerin somatik hücrelerinde telomerler daha kısadır.
- Bazı dokuların yaşlanma süreciyle telomer kısalması arasında bir bağlantı önerilmiştir.
- Bu ilişki, organizma düzeyinde yaşlanma ile olası bağlantılar bakımından araştırılmaktadır.



Germ Hücrelerinde Telomeraz Etkinliği

- Germ hücrelerinde telomerlerin her döngüde kısalması gametlerde gen kaybına yol açmaz.
- Telomeraz enzimi telomerleri uzatarak replikasyonla oluşan kısalmayı telafi eder.
- Enzim kendi RNA kalıbını taşıyarak ön zinciri uzatır ve art zincirin uzunluğunu korumasına imkân verir.
- Germ hücrelerindeki telomeraz etkinliği zigotta telomerlerin en uzun düzeyde olmasını sağlar.

Telomerazın Dokuya Göre Değişen Etkinliği

- Telomeraz çoğu insan somatik hücresinde aktif değildir.
- Enzimin etkinliği dokular arasında değişkenlik gösterebilir.
- Bu farklılık doku tiplerine göre hücresel bölünme potansiyeliyle ilişkilidir.
- Germ hattındaki yüksek etkinlik kalıtsal bütünlüğü destekler.

Telomer Kısalması ve Kanser Arasındaki İlişki

- Telomerlerin normal kısalması somatik hücre bölünmelerine doğal bir sınır getirerek kansere karşı koruyucu olabilir.
- Büyük tümörlerden alınan hücrelerde telomerler çok kısadır ve bu durum yoğun bölünme öyküsüyle uyumludur.
- Daha fazla kısalma tümör hücrelerinin kendi kendini yok etmesine yol açabilir.
- Bu gözlemler, telomer uzunluğu ile tümör biyolojisi arasında bağlantı olduğunu düşündürür.

Kanserde Telomeraz ve Tedavi Araştırmaları

- Kanserli somatik hücrelerde telomeraz etkinliği anormal derecede yüksektir ve telomer uzunluğunu kararlı tutarak kalıcılığı destekleyebilir.
- Pek çok kanser hücresi sınırsız bölünebilme kapasitesi sergiler ve bu durum kültürde “ölümsüz” hatlarda da görülür.
- Telomerazın baskılanması üzerine yapılan deneysel çalışmalar tümör hücrelerinin ölmesine yol açabilmiştir.
- Ancak bazı hücreler telomer uzunluğunu alternatif bir yolla geri kazanmıştır ve araştırmalar bu alanda sürmektedir.

Kromozom ve DNA Paketlenmesine Giriş

- DNA'nın yapısı ve eşlenmesini gördükten sonra, genetik bilgiyi taşıyan yapılar olan kromozomlarda DNA'nın nasıl paketlendiğini ele alıyoruz.
- Bakterilerde genomun ana bileşeni, nispeten az proteinle ilişkili, çift iplikli dairesel tek bir DNA molekülüdür.
- Bu yapı “bakteriyel kromozom” olarak adlandırılrsa da, çok miktarda proteinle ilişkili doğrusal DNA'dan oluşan ökaryotik kromozomdan belirgin biçimde farklıdır.

Bakteriyel Kromozomun Kapsamı

- *E. coli*'de kromozomal DNA yaklaşık 4,6 milyon nükleotit çifti içerir ve yaklaşık 4.400 gen barındırır.
- Bu miktar, tipik bir virüste bulunan DNA'nın yaklaşık 100 katıdır.
- Buna karşın, bu büyüklük, bir insan somatik hücreesindeki DNA'nın yaklaşık binde biri kadardır.

DNA'nın Sığdırılması ve Nükleoid

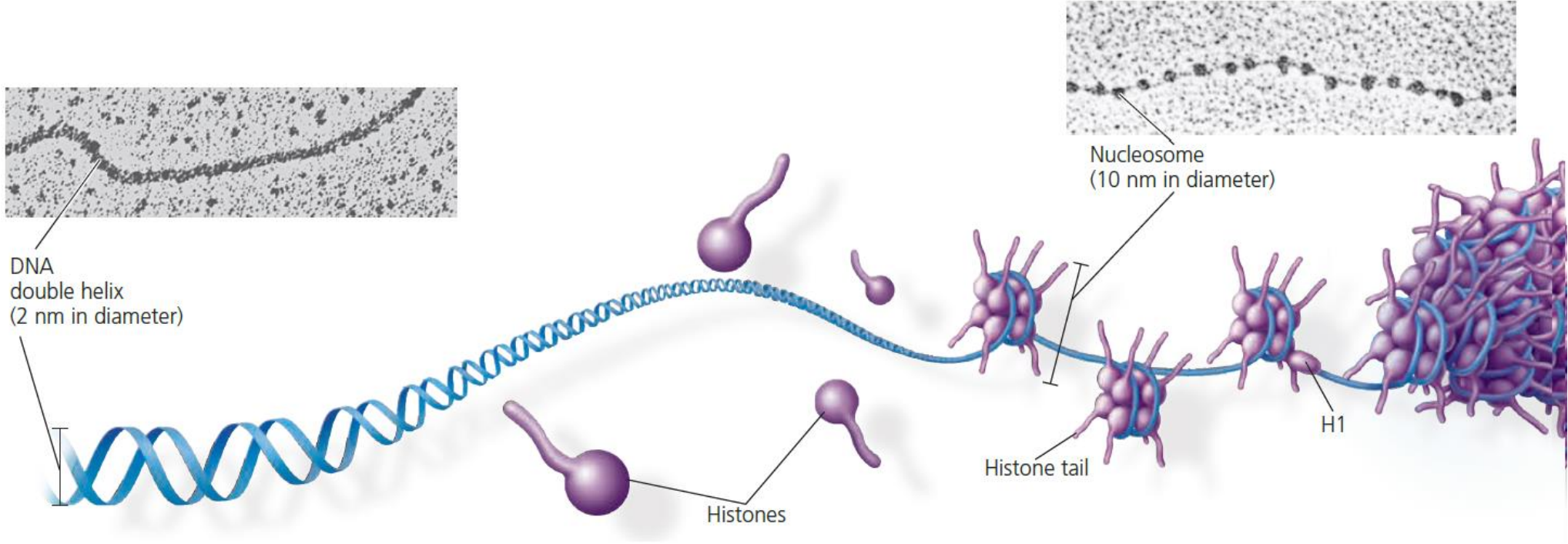
- Uzatıldığında bir *E. coli* hücresinin DNA'sı yaklaşık 1 milimetre olur ve bu, hücrenin uzunluğunun yaklaşık 500 katıdır.
- Hücre içinde belirli proteinler DNA'yı kıvrır ve “süpersarmal” hâle getirerek çok yoğun biçimde paketler.
- Bu yoğun DNA bölgesi zarla çevrili değildir ve “nükleoid” olarak adlandırılır.

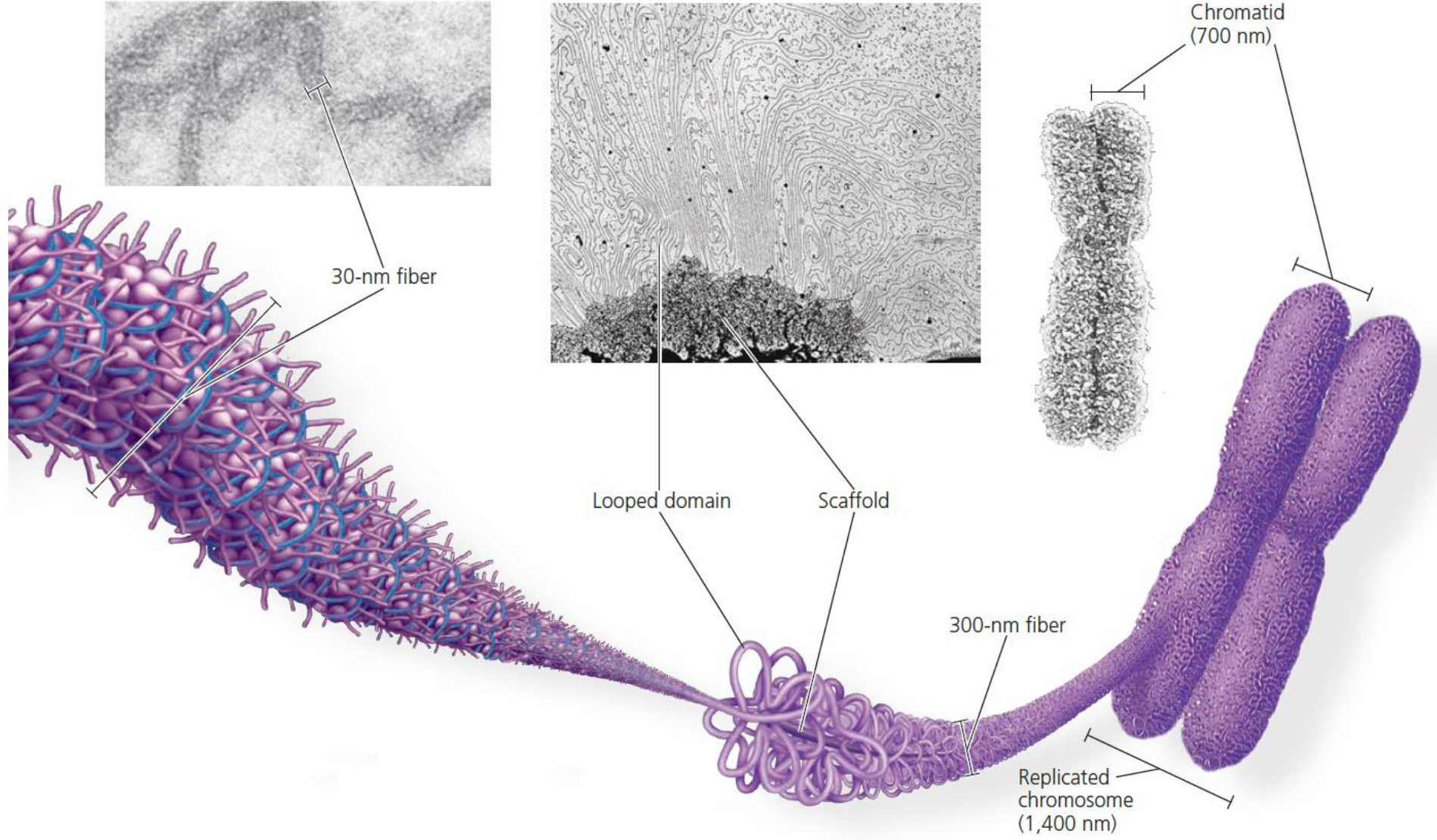
Ökaryotik Kromozomun Ölçeği

- Her bir ökaryotik kromozom, tek bir doğrusal çift sarmal DNA molekülü içerir.
- İnsanlarda bu molekül ortalama yaklaşık $1,5 \times 10^8$ nükleotit çifti uzunluğundadır.
- Tamamen uzatıldığında yaklaşık 4 cm'ye ulaşır ve bu uzunluk, çekirdek çapının binlerce katıdır.

Kromatin ve Çok Kademeli Paketleme

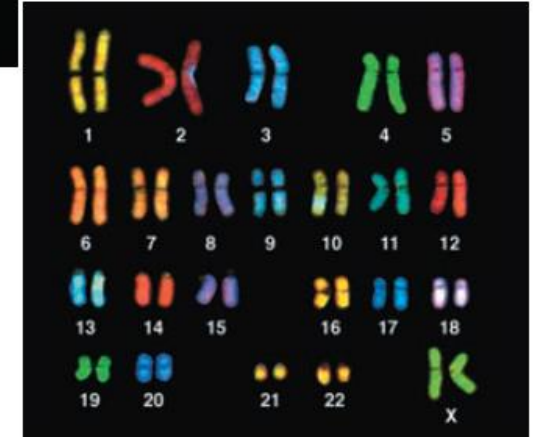
- Ökaryotik DNA, çok miktarda proteinle hassas biçimde birleşerek “kromatin” adı verilen kompleksi oluşturur.
- Kromatin, çekirdeğe sığmayı sağlayan ayrıntılı ve çok kademeli bir paketleme sistemiyle düzenlenir.





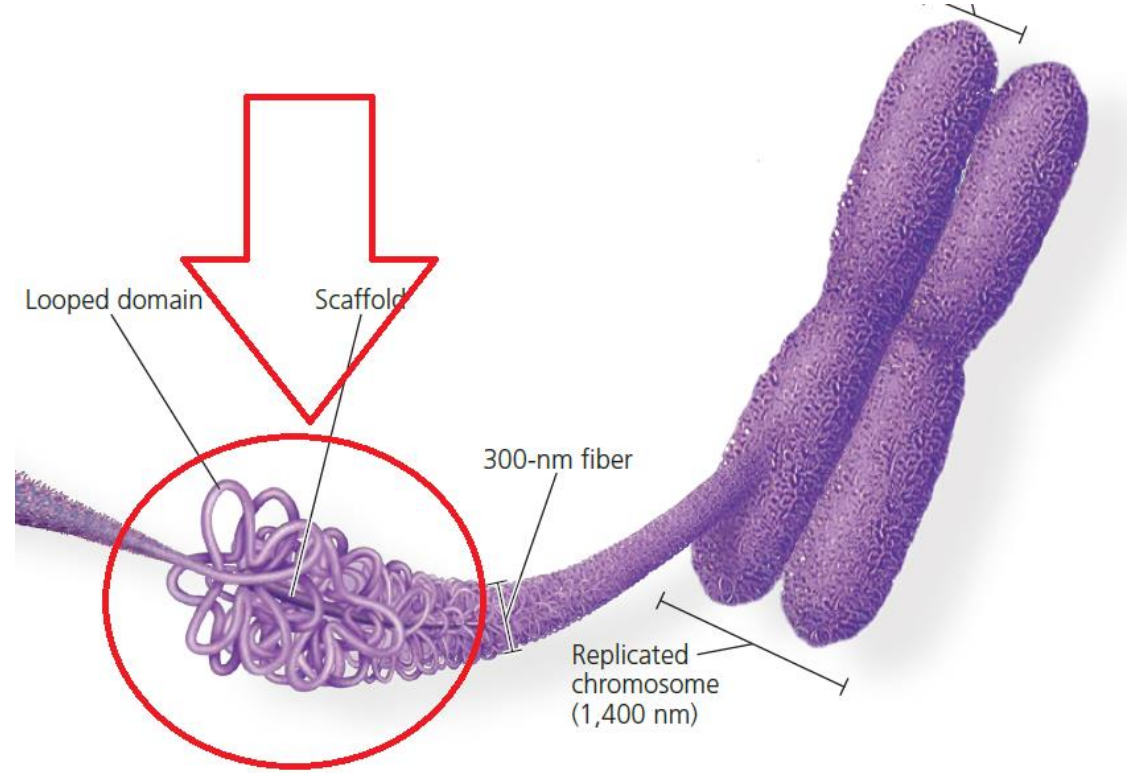
Hücre Döngüsünde Yoğunluk Değişimleri

- Kromatin, hücre döngüsü boyunca paketlenme derecesinde belirgin değişimler gösterir.
- İnterfazda, ışık mikroskopunda genellikle çekirdek içinde yaygın ve dağınık bir kitle gibi görünür.
- Mitoza hazırlanırken kromatin kıvrılıp katlanır ve kısa, kalın metafaz kromozomlarına yoğunlaşır; bu kromozomlar ışık mikroskopunda ayırt edilebilir.



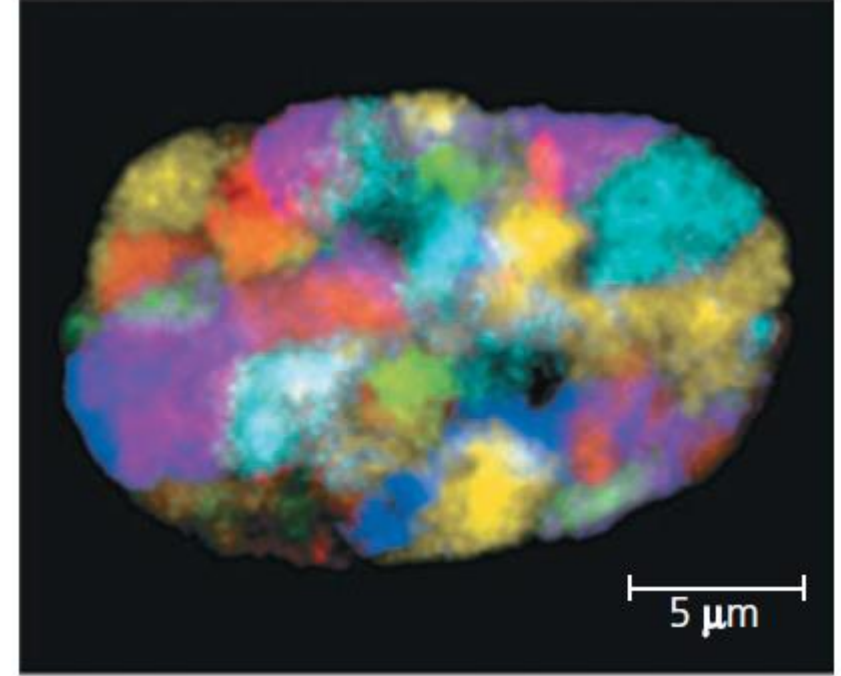
İnterfaz Kromatininde Daha Yüksek Düzen

- İnterfaz kromatini, mitotik kromozomlara göre daha gevşek olsa da, daha üst düzey paketleme basamaklarının çoğunu taşır.
- Kromatinin bir kısmı 10 nm çapında bir lif hâlindeyken, büyük bölümü 30 nm'lik liflere sıkıştırılır ve bazı bölgelerde bu yapılar “ilmekli alanlar” şeklinde katlanır.
- İnterfaz kromozomu belirgin bir iskele göstermese de, ilmekli alanların nükleer zarfın iç yüzündeki nükleer laminaya ve olasılıkla nükleer matriks liflerine tutunduğu düşünülür.



Çekirdek İçi Yerleşim ve Karışmayan Alanlar

- Bu bağlantılar, genlerin etkin olduğu kromatin bölgelerinin düzenlenmesine yardımcı olabilir.
- Her kromozoma ait kromatin, interfaz çekirdeğinde kendine özgü ve sınırlı bir alan kaplar.
- Farklı kromozomların kromatin lifleri birbirine dolaşmış gibi görünmez.



Heterokromatin ve Ökromatin

- İnterfaz sırasında kromozomların sentromer ve telomerleri ile bazı diğer bölgeler, metafaz benzeri yüksek yoğunlaşmış bir durumda bulunabilir ve bu tipe “heterokromatin” denir.
- Daha gevşek ve dağınık görünen kromatin ise “ökromatin”dir ve genlerin ifadesinden sorumlu hücresel mekanizmaya erişebilir durumdadır.
- Heterokromatindeki sıkı paketlenme, DNA’yı bu mekanizmaya büyük ölçüde ulaşılamaz kılar; buna karşılık ökromatin, genlerin transkribe edilmesine olanak tanır.

Dinamik Kromozom ve Histon Değişimleri

- Kromozom, mitoz, mayoz ve gen etkinliği gibi süreçler boyunca gerektiğinde yoğunlaştırılan, gevşetilen, değiştirilip yeniden düzenlenen dinamik bir yapıdır.
- Histonların kimyasal modifikasyonları, kromatin yoğunluğunu etkiler ve gen etkinliği üzerinde birden çok sonuç doğurur.

Teşekkür ederim

Prof. Dr. Bektaş TEPE

