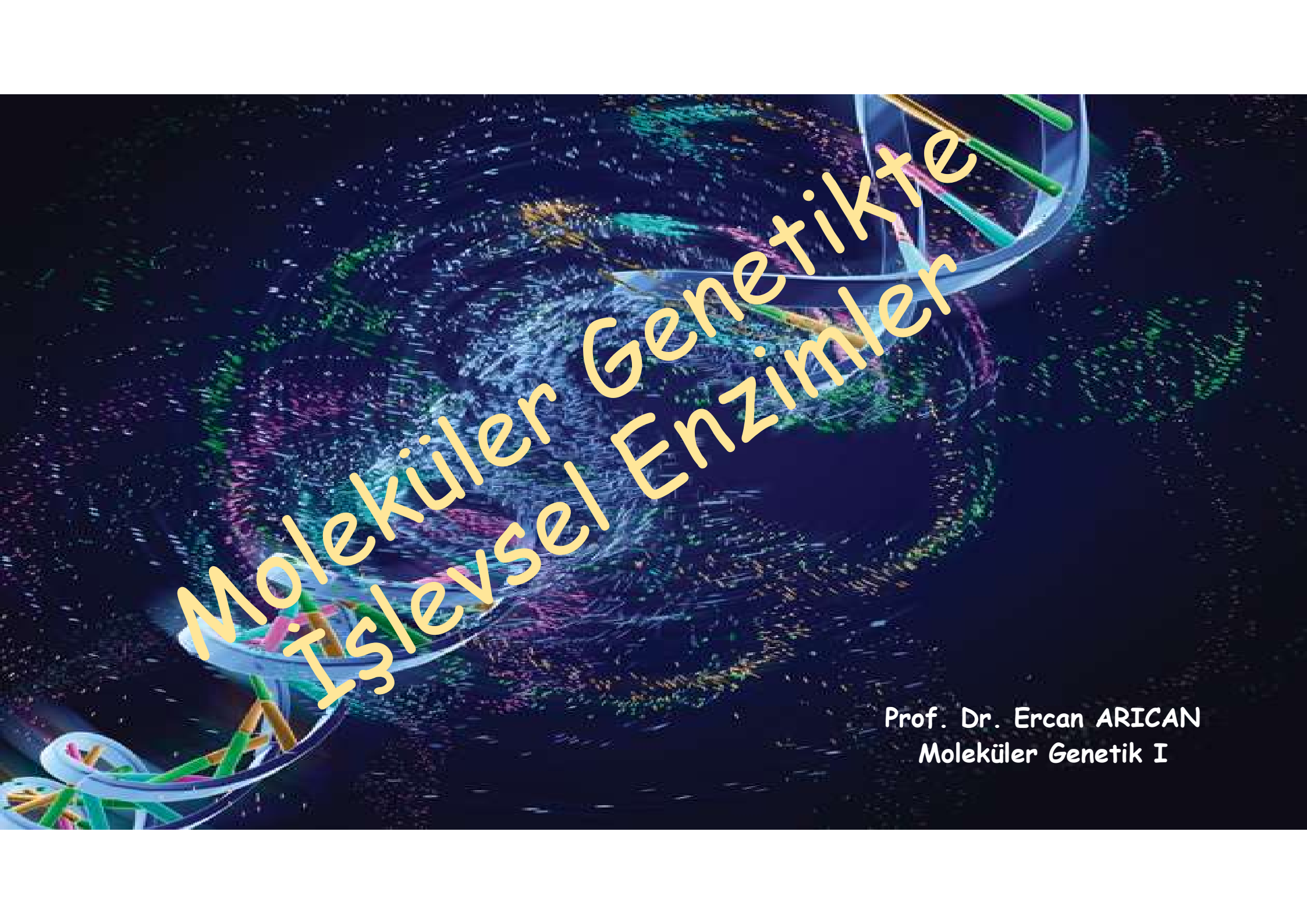




Moleküler Genetikte İşlevsel Enzimler

Prof. Dr. Ercan ARICAN
Moleküler Genetik I

1. POLİMERAZLAR

Nukleik asitlerin sentezinde iş gören enzimler arasında sentez reaksiyonundan esas sorumlu olanlar polimerazlardır.

Nukleik asit sentezinde iş gören polimerazların diğer polimerazlardan önemli farkı, bir kalıp molekülden aldıkları emre göre kataliz işlemini yapmalarıdır.

1.1 DNA'ya Bağımlı DNA Polimeraz

Bir DNA molekülünden yeni DNA moleküllerinin meydana gelmesinde DNA ipliklerinin sentezini katalizleyen enzime **DNA'ya bağımlı (DNA'dan emir alan) DNA polimeraz** yada kısaca **DNA polimeraz** adı verilir.

Bu enzim, deoksiribonukleotitlerin aşamalı olarak bir DNA ipliğine eklenmesini kataliz eder.

Bu katalizi yapması için aşağıdaki yapıtaşları gereklidir;

1. 4 çeşit deoksiribonukleozit 5'-trifosfat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
2. Serbest 3' OH grubuna sahip bir polinukleotit iplik (primer)
3. Bir DNA kalıbı

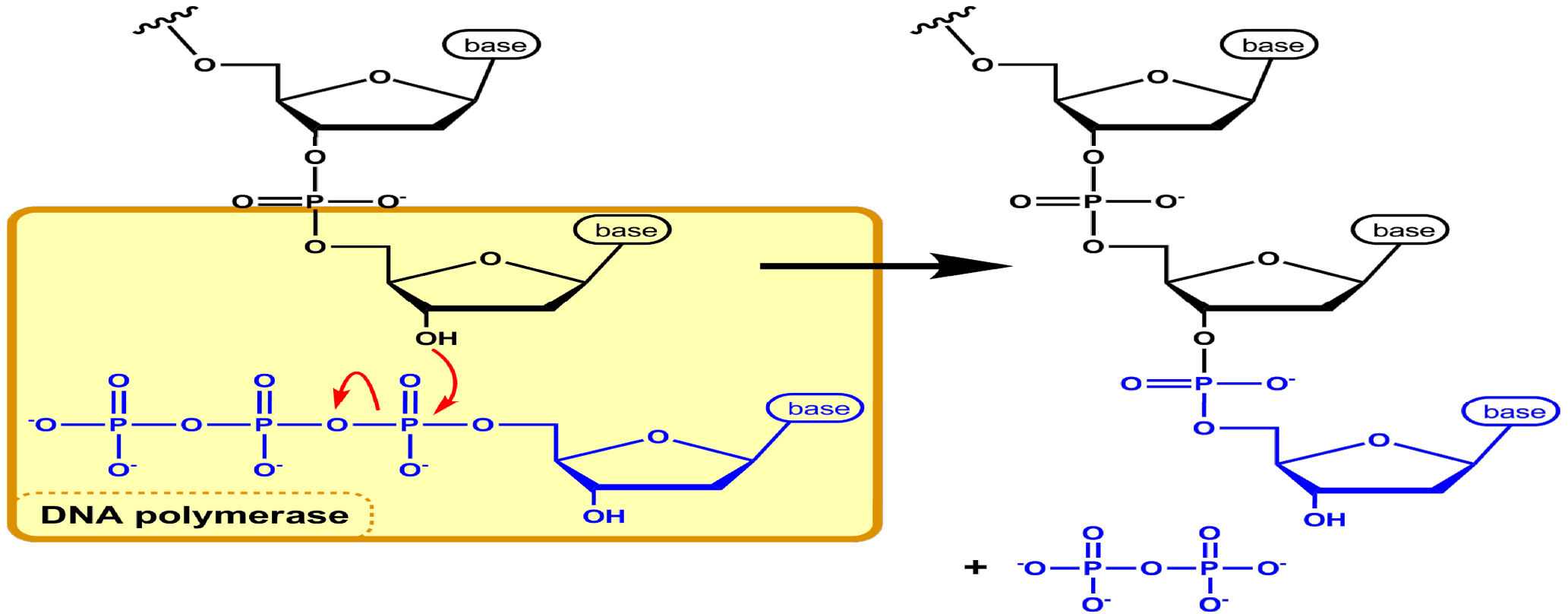
Enzimin katalizlediği toplam reaksiyon aşağıdaki gibi gösterilir:



Bu formülden de anlaşılacağı gibi, DNA polimeraz kalıp olarak kullandığı DNA ipliğindeki bazlara uygun (tamamlayıcı) bazı taşıyan deoksiribonukleotitleri seçer ve aralarında kovalent bağ oluşumunu sağlayarak yeni bir DNA ipliği sentezinin katalizini yapar.

Reaksiyon, primerin ucundaki nükleotidin 3'-OH grubunun ipliğin yapısına katılacak olan dNTP'nin en içteki α -fosfor atomu üzerine nukleofilik etkisiyle başlatılır; bu şekilde trifosfatın pirofosfat gurubu ayrılır ve nükleotidler arasında fosfodiester bağı oluşur.

Pirofosfatın hidrolizi polimerizasyonu yürütücü etkendir ve reaksiyonun geriye dönüşünü engeller.



DNA polimeraz önce kalıp ve primerle birleşerek bir kompleks oluşturur;

Sonra bu yapıya dNTP'lerden biri bağlanır.

dNTP enzime kalıptaki tamamlayıcı nükleotidle baz çifti oluşturabilecek bir konumda yerleşir.

Primerin ucundaki nükleotidle yeni katılan nükleotid arasında fosfodiester bağı oluşumu sırasında primerin serbest 3'-OH grubu kaybolduğu için enzimin bir nükleotidlik hareketiyle eski ucun yerini yeni eklenen ve 3'-OH grubuna sahip nükleotit alır.

1.2. RNA'ya Bağımlı DNA Polimeraz (Ters Transkriptaz)

Kalıp olarak bir RNA zincirini kullanıp yeni bir DNA molekülünün sentezini sağlayan enzime denir.

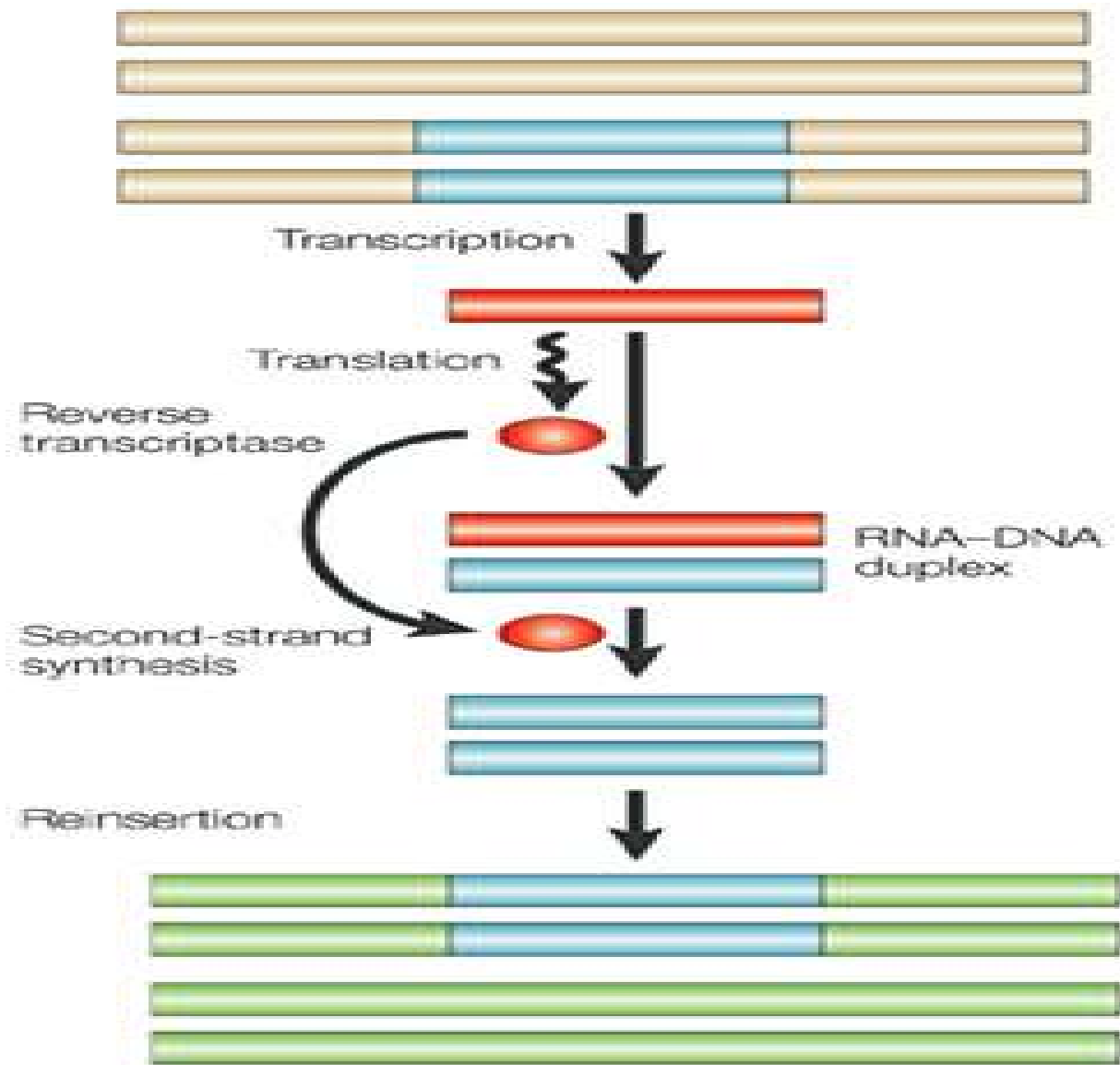
Bu enzim, ana kurala zıt yönde bir sentezi (transkripsiyon) kataliz ettiği için, **ters transkriptaz** olarak da adlandırılır.

Bu polimerazın varlığı ilk kez, 1970 yılında birbirlerinden bağımsız olarak Temin ve Baltimon tarafından, RNA tümör virüsleri olan, retrovirüslerde ortaya çıkartılmıştır.

Ters transkriptaz, retrovirüslerin bulaştığı hücrede virüsün genomunu kalıp olarak kullanarak önce tamamlayıcı bir DNA ipliği sentezler.

Meydana gelen RNA/DNA melezinin RNA kısmı bu enzimin $RnaseH^1$ aktivitesi ile ortadan kaldırılır.

Daha sonra ters transkriptaz geriye kalan DNA ipliğini kullanarak çift iplikli bir DNA molekülünü oluşturur.



Viral ters transkriptazlar polimerizasyon aktiviteleri bakımından sentezin 5' → 3' yönünde olması, bir kalıba, 3'-OH ucuna ve 4 çeşit dNTP ile Mg^{+2} gereksinimleri nedeniyle, bilinen DNA polimerazlara benzerler.

Diğer DNA polimerazlarda bulunmayan 2 özelliği, viral RNA'yı kalıp kullanarak bir RNA/DNA melezi oluşumunu sağlamaları ve bu melezdeki RNA'yı özgül bir biçimde ve her iki yönde parçalayabilen bir eksonukleaz (Rnaz H) aktivitesine sahip olmalarıdır.

Önceleri ters transkriptaz aktivitesinin sadece retrovirüslere özgü olduğu sanılmakla birlikte daha sonraları bakterilerde ve ökaryotlarda (*S. cerevisiae*, *Drosophila* ve memelilerde) bazı DNA parçalarının genomdaki hareketlerinin ters transkripsiyonla ilişkili şekilde meydana geldiği anlaşılmıştır.

Ayrıca, ökaryotik kromozomların uçlarında replikasyonun tamamlanmasında rol oynayan enzim de ters transkripsiyonunkine benzeyen aktiviteye sahiptir.

DNA sentezini kataliz edebilen bir başka enzim **terminal deoksinukleotidil transferaz**dır.

Bu enzim, 5'-deoksinukleozid trifosfatların 5' $\longrightarrow$ 3' yönünde polimerizasyonunu yaparak DNA ipliğini sentezlemesi bakımından bir DNA polimeraz gibi davranır.

Bununla beraber, diğer DNA polimerazlardan farklı olarak bir kalıba gereksinimi yoktur.

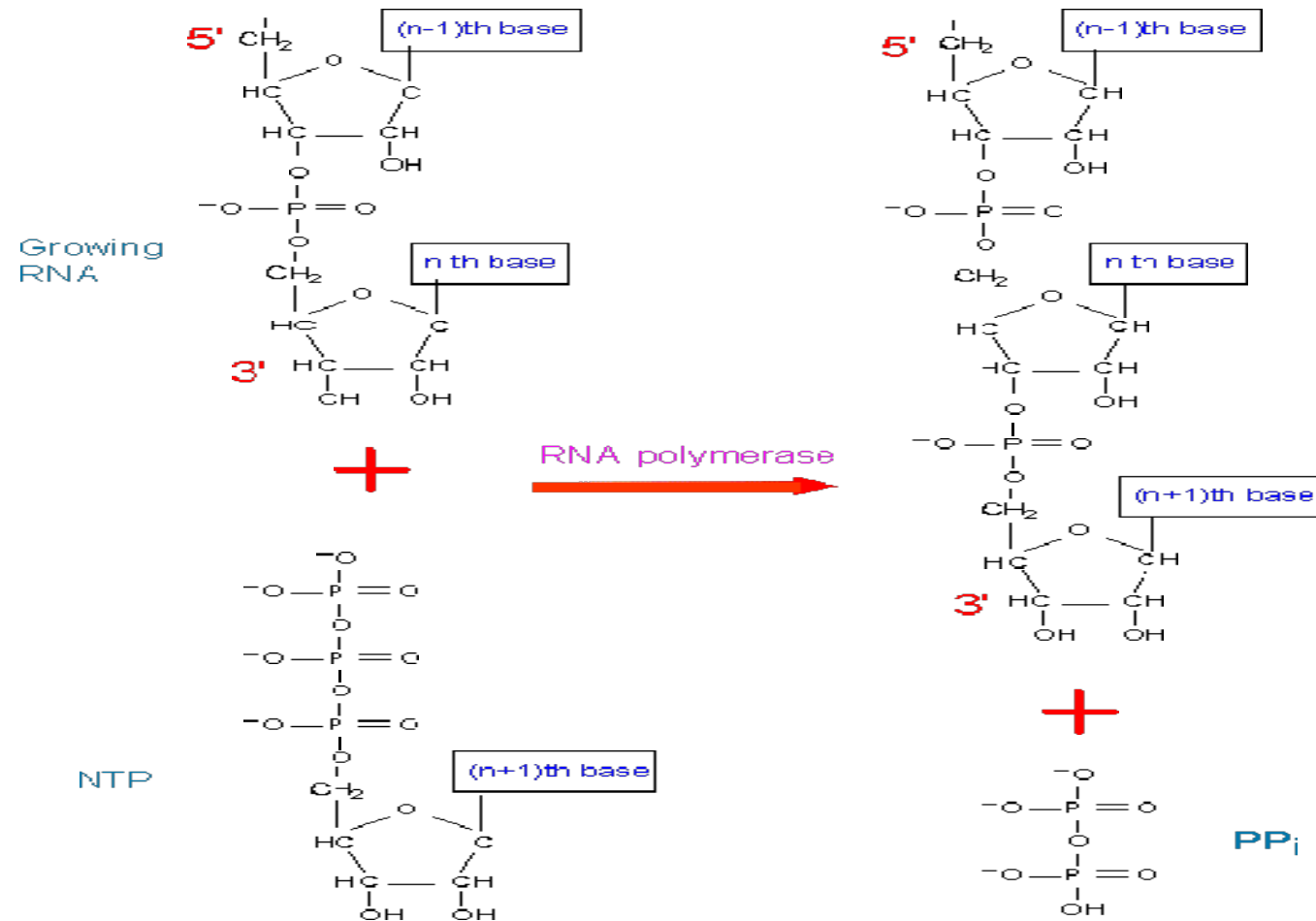
1.3. DNA'ya Bağımlı RNA Polimeraz

Bir DNA molekülünün bir RNA ipliği halinde kopyasının çıkarılmasını (transkripsiyonunu) kataliz eden enzime denir ve kısaca **RNA polimeraz** denir.

RNA polimerazlar, polinukleotid zincirlerinin uzama reaksiyonu açısından temelde DNA polimerazlarla aynı katalitik özelliklere sahiptirler.

Bir DNA kalıbı ile tamamlayıcı baz çifti oluşturmak için 4 çeşit ribonukleozit trifosfata (NTP) gereksinimleri vardır.

Uzayan ipliğin 3'-OH ucunun NTP'nin α -fosforu üzerine nukleofilik etkisiyle zincir 5' $\longrightarrow$ 3' yönünde uzar.



RNA polimerazın, DNA polimerazdan belirgin farklılığı, çift iplikli bir kalıpta zincir sentezini başlatma ve bitirme yeteneğidir.

Buna göre, RNA polimeraz DNA molekülünde reaksiyonu nereden başlatacağını özel nukleotit dizilerini tanıyarak belirler ve aynı şekilde belli bir noktada, yine özel dizileri tanıyarak, sentezi sona erdirir.

Bu özellik, enzimin genomdaki çok sayıda gen arasından transkripsiyonu yapılacak gen(ler) seçmesi açısından önemlidir.

RNA polimeraz için etkin kalıp, geçici ve bölgesel olarak çözünmüş bir DNA çift sarmalıdır.

Prokaryotlarda tüm RNA'ların (mRNA, tRNA, rRNA) sentezinden tek çeşir RNA polimeraz sorumludur.

Ökaryotlarda ise, 3' nukleustaki genlerle ve 1'i de organellerdeki genlerle ilişkili olmak üzere en az 4 çeşit RNA polimeraz bulunur.

DNA primaz: Replikasyon sırasında DNA polimerazın DNA sentezini başlatabilmesi için kullandığı RNA primerler DNA primaz adı verilen özel RNA polimerazlar tarafından sentezlenir.

Virus tarafından tetiklenen Polimerazlar: DNA viruslarının bazıları kendi genlerinin transkripsiyonu için hücredeki RNA polimerazları kullanır ve özel dizileri tanıyabilmeleri için onlarda bazı değişiklikler yapar.

Diğer bazıları ise, önce hücrenin RNA polimerazını kullanıp bazı genlerinin transkripsiyonunu yapar.

Bu genlerden biri virusa özgü bir RNA polimerazı şifreler ve bu enzim daha sonra virusun diğer genlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir.

RNA viruslarında ise, virusun kendi genleri tarafından şifrelenen, **RNA'ya** bağımlı (RNA'dan emir alan) RNA polimerazlar iş görür.

3' uca Nukleotit ekleyen Enzimler: Transkripsiyondan sonra, RNA'nın 3'-OH ucuna ribonukleotit ekleyen bazı enzimler bulunur.

tRNA nukleotidil transferaz, tRNA'ların 3' uçlarına CCA dizisini ekler.

Poli-A polimeraz, ökaryotlardaki mRNA'ların çoğunun 3' ucuna 200 kadar A nükleotidlerinden ibaret bir dizi ekler.

Polinukleotit fosforilaz, *in vitro* koşullarda uzun polinukleotit zincirleri sentezleyebildiği saptanan ilk enzimdir.

Diğer RNA polimerazlarda farkı RNA sentezinde substrat olarak ribonukleozit difosfatları kullanmasıdır.

2. DNA LİGAZ

Replikasyon, onarım ve rekombinasyon sırasında DNA ipliklerini birbirine bağlayan enzimlerdir.

Bilinen tüm DNA ligazlar, DNA'da bulunan bir kırıkta komşu deoksiribonukleotidlerin 5'-PO₄ ve 3'-OH grupları arasında fosfodiester bağı oluşturabilirler.

DNA ligaz serbest durumdaki tek iplikli 2 DNA molekülünü birbirine bağlayamaz;

DNA ipliklerinin çift sarmal yapıda bir DNA molekülünün parçası olmaları gerekir.

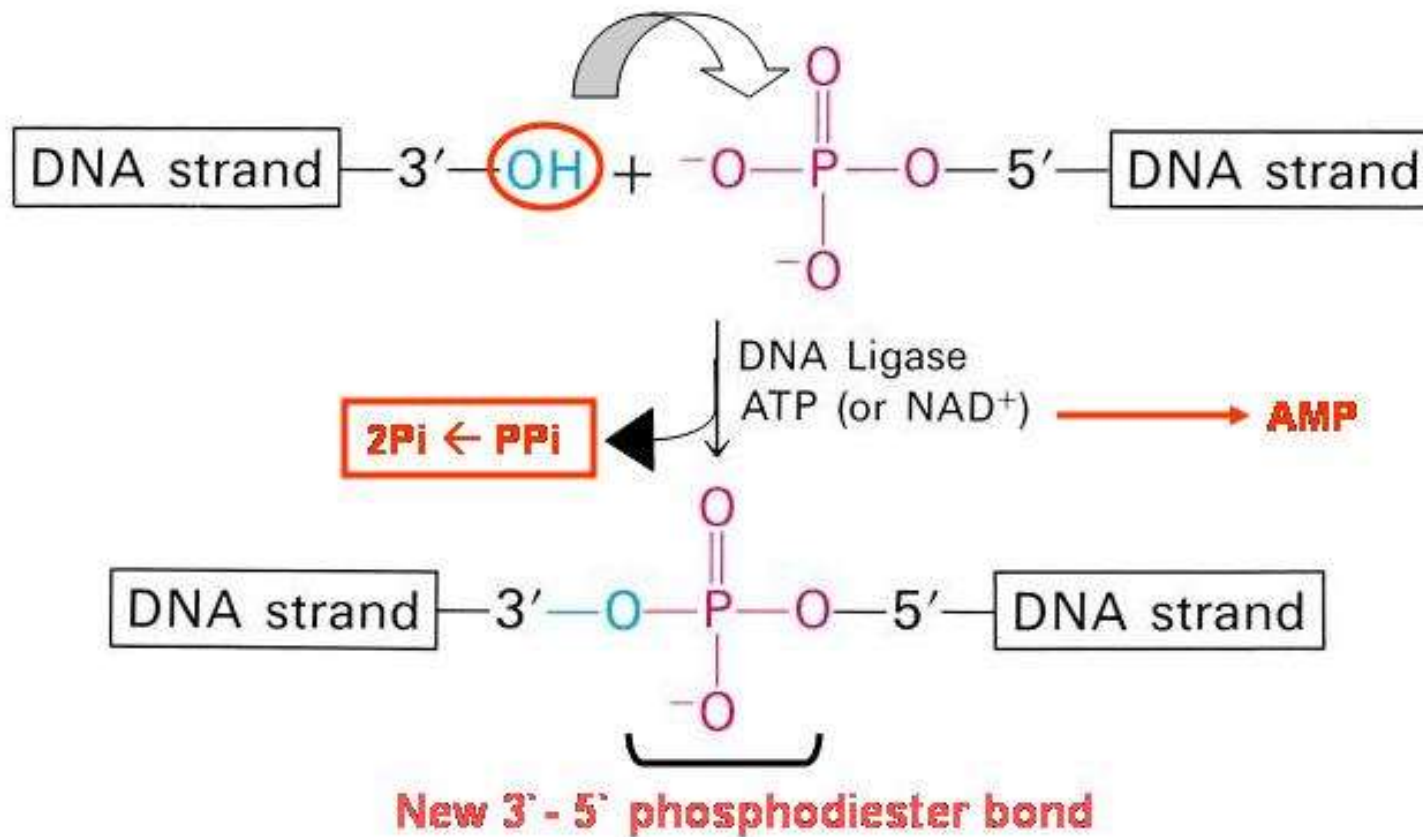
Fosfodiester bağı oluşumu enerji gerektiren bir reaksiyondur.

Bakterilerdeki DNA ligazlar enerji kaynağı olarak NAD'yi;

Hayvan, bitki ve bakteriyofajlardaki ise ATP'yi kullanırlar.

Reaksiyon 3 aşamada meydana gelir.

DNA LIGASE Reaction



İlk önce ATP (veya NAD) DNA ligaz ile reaksiyona girerek kovalent bir enzim-AMP kompleksi oluşturur.

Bu komplekste AMP bir fosfamid bağı ile enzimdeki bir lizinin NH_4 grubuna bağlanır ve PPi açığa çıkar.

Daha sonra, AMP DNA'nın $5'\text{-PO}_4$ grubunu aktif hale geçirir.

En sonra, DNA'nın $3'\text{-OH}$ grubu aktif durumda fosfor atomu üzerinde nukleofilik atak yapar ve bir fosfodiester bağı oluşur, AMP de kompleksten ayrılır.

3. DNA TOPOİZOMERAZLAR

DNA'nın üçüncül yapısında değişiklikler meydana getiren özel enzimlerdir.

DNA'daki süper dönümlerin tipini ve derecesini değiştirerek bu işlemi gerçekleştirirler.

DNA'nın bir ya da iki ipliğinde kırılmalar yaparak, bağlanma sayısını değiştiren enzimlere verilen isimdir.

3.1. I. Tip Topoizomerazlar

DNA çift sarmalının tek ipliğinde kırıklar meydana getirirler ve kataliz ettikleri her reaksiyon çevrimi sonunda DNA'daki bir süper dönüşümü yok ederler.

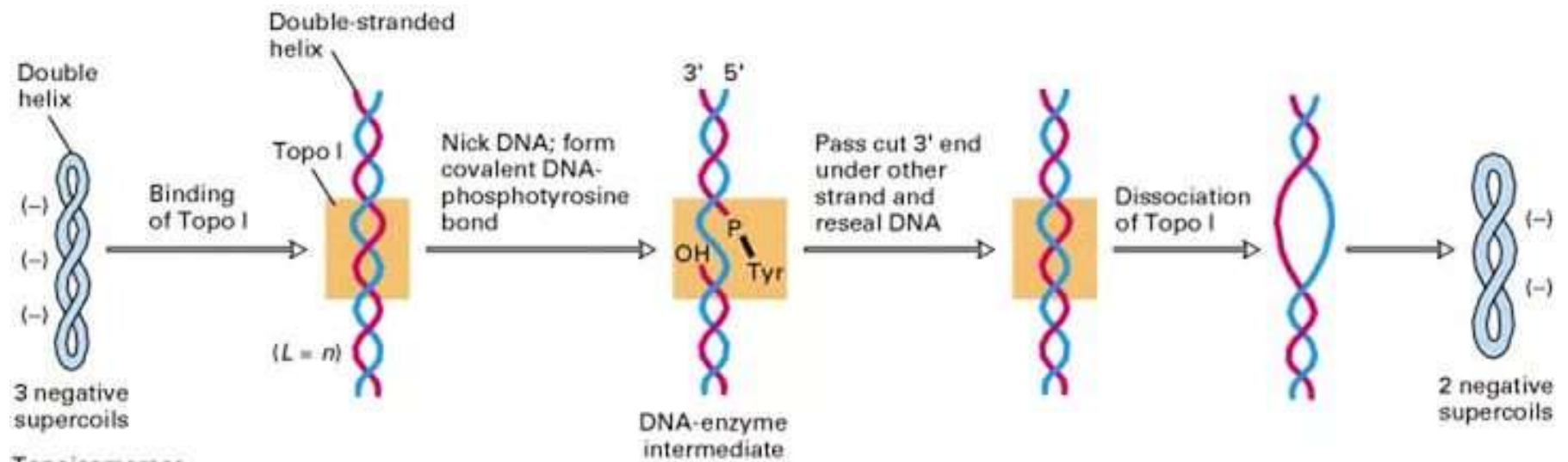
Enzimin, DNA'nın üçüncül yapısındaki dönümleri açma hızı moleküldeki bağlanma sayısı azaldıkça yavaşlar.

Enzim DNA sarmalında gevşemenin olacağı bölgeye bağlanır ve ipliklerden birinde kırılma meydana getirir.

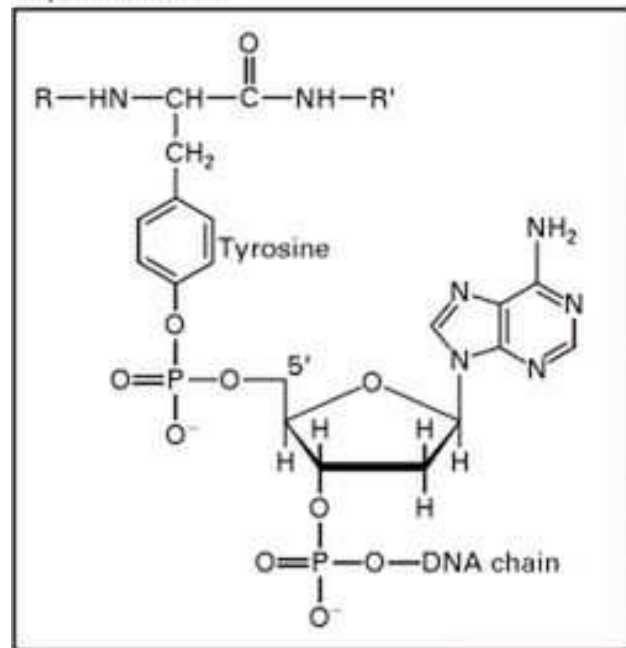
Kırığın 5'-PO₄ ucu enzimdeki bir tirozine kovalent şekilde bağlanır.

Enzim kırık olmayan ipliği kırık olan arasından geçirir,

Daha sonra kırığı yeniden kapatır ve DNA'dan ayrılır.



Topoisomerase



I. tip topoizomeraaz, bağlanma sayısını 1'lik basamaklar halinde değiştirir ve işlevini herhangi bir enerjiye gereksinim duymadan yapar.

DNA'daki fosfodiester bağı kendisine aktararak bu bağdaki enerjiyi korur ve böylece reaksiyonu yürütür.

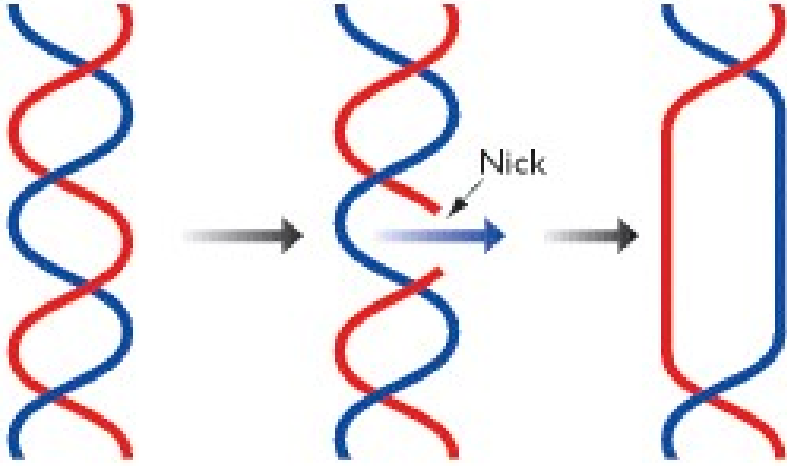
3.2 II. tip Topoizomeraazlar

Bu tip topoizomeraazlar etkilerini DNA çift sarmalının iki ipliğinde birden kırıklar meydana getirerek gösterirler.

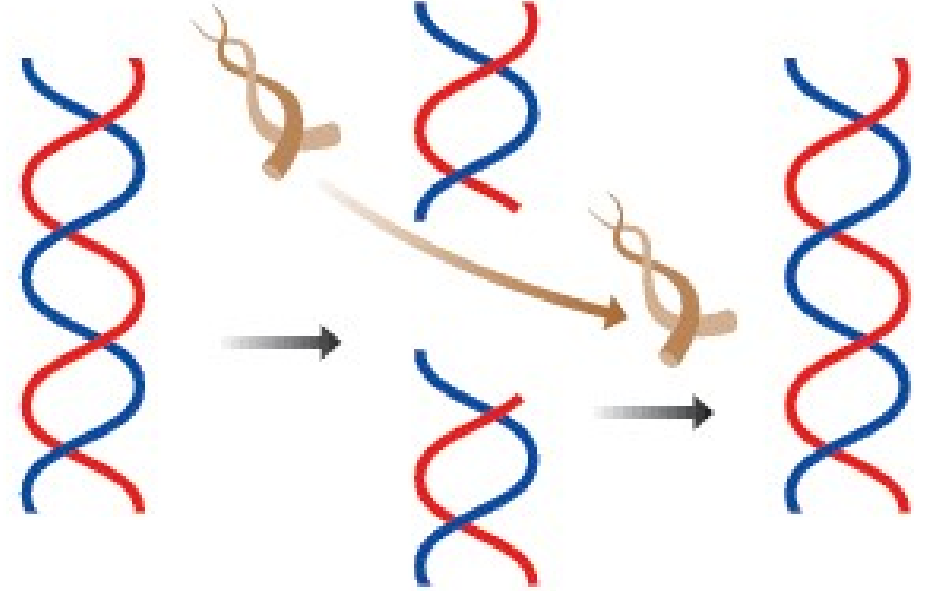
Prokaryot ve ökaryotlardaki II. tip topoizomeraazların çoğu hem negatif hem de pozitif süper dönümleri açarlar.

Enzim bir DNA çift sarmalının iki ipliğinde kırık oluşturur, moleküldeki başka bir çift sarmallı bölgeyi bu kırık uçlar arasından geçirir, kırıkları kapatır ve DNA'dan ayrılır.

(A) Type I



(B) Type II



Reaksiyon oluşumu ATP'nin hidrolizini gerektirir.

Her reaksiyon çevriminde bağlanma sayısında 2'lik değişme olur ve böylece negatif ve pozitif üst dönüm sayısında 2 değerinde azalma meydana gelir.

DNA Giraz: Halkasal DNA'daki sadece süper dönümleri yok edebilen, I. tip ve II. tip topoizomerazlardan farklı olarak, gevşek bir halkasal molekülde negatif süper dönümler meydana getirebilen bir II. tip topoizomerazdır.

DNA girazın genelde bakterilere özgü bir enzim olduğu bilinmekle birlikte bazı ökaryotlarda da (örn bitkide) benzer aktivite gösteren enzimler ortaya çıkarılmıştır.

4. NUKLEAZLAR

Nukleazlar fosfodiester bağlarını yok eden yani fosfodiesteraz cinsi enzimlerdir.

Bu enzimlerin bir kısmı hidroliz reaksiyonu için bir serbest uca gerek duyar (**eksonukleazlar**), diğerlerinin ise böyle bir gereksinimi yoktur (**endonukleazlar**).

4.1. Deoksiribonukleazlar

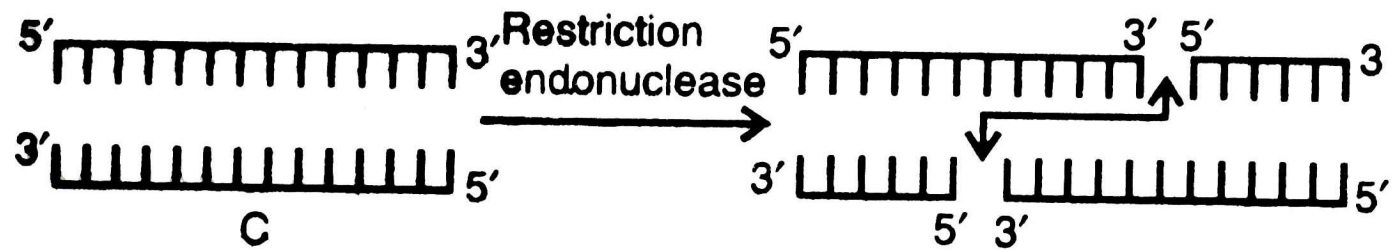
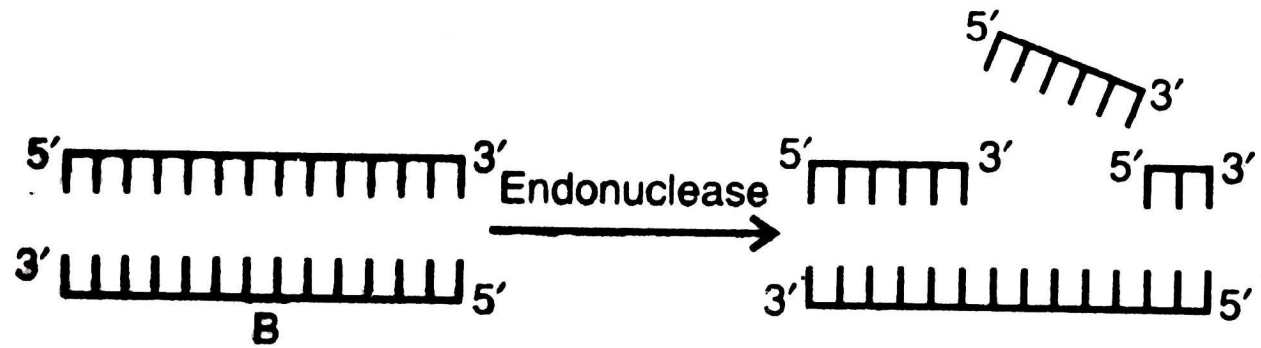
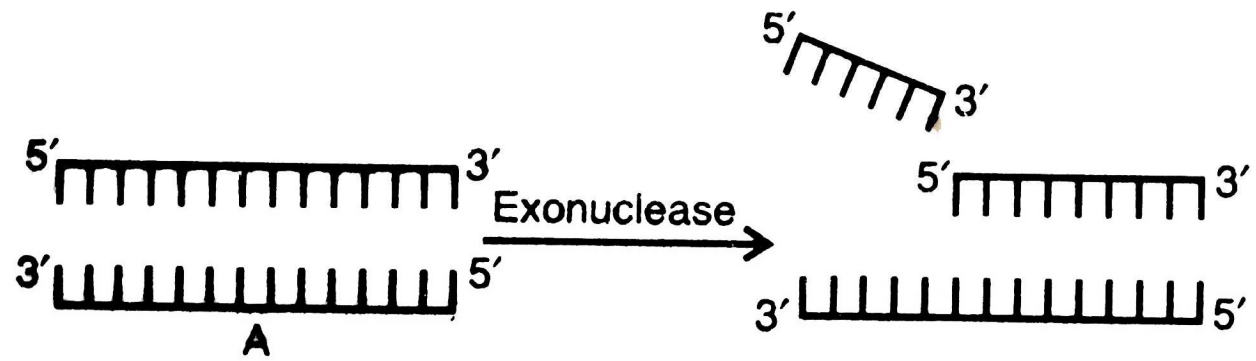
DNA ipliklerinde nükleotidler arasındaki fosfodiester bağlarını kopararak DNA'nın hidrolizine yol açarlar.

Etkilerini gösterme biçimlerine göre değişik deoksiribonukleaz (Dnaz) tipleri vardır.

Eksonukleazlar: Etkilerini göstermeleri için bir zincir ucuna gereksinime duyan eksonukleazlar, tek ya da çift iplikli halkasal DNA'larda etkili değildirler.

Hidroliz yönüne göre 2 tip eksonukleaz vardır. $3' \longrightarrow 5'$ ve $5' \longrightarrow 3'$ eksonukleaz.

Fakat bazıları hem $3'$ hem de $5'$ uçta etkili olabilirler.



Prokaryotlardaki DNA polimeraz I, II ve III'ün 3' —————> 5' eksonukleaz aktivitesine sahip oldukları bilinmektedir.

E. coli'de bulunan eksonukleaz I substrat olarak tek iplikli DNA'yı kullanır ve 3' uçtan başlayarak en sondaki dinukleotide kadar 5'-mononukleotidler halinde hidroliz yapar.

Yine aynı organizmada bulunan eksonukleaz III'ün 3 farklı katalitik özelliği vardır.

Çift iplikli DNA'yı kullanan bir 3' —————> 5' eksonukleazdır.

Ayrıca, 3'-PO₄ uçlu zincirde fosfotaz etkisi yaparak aktif bir primer ucun oluşumunu sağlar.

Ek olarak, DNA'da oluşan purinsiz veya pirimidinsiz yerlerde eksonukleaz aktivitesi de gösterebilir.

Endonukleazlar: Serbest bir uca gereksinme duymayan bu enzimlerin bazıları tek iplikli bazıları da çift iplikli DNA'yı hidroliz ederler.

Restiriksiyon endonukleazları (Restriksiyon enzimleri): Çift sarmal yapıdaki DNA'da özel nükleotid (baz) dizilerini tanıyan ve DNA'nın her iki ipliğini kesen endonukleazlardır.

Bu enzimlerin canlı hücrelerdeki işlevi o organizma için yabancı DNA moleküllerini kesip parçalamaktır.

Restriksiyon (sınırlama, kısıtlama) - Modifikasyon (değiştirme) Sistemi:

Restriksiyon endonukleazları, DNA'da kendilerine özel kısa nukleotit dizilerini bağlanma yeri olarak tanırlar.

Kesmeyi ise bazıları tanıma yerinde bazıları da başka bir bölgede yapar.

Bir bakteri irkında restriksiyon aktivitesine ek olarak, aynı dizi özgüllüğüne sahip, DNA metilaz aktiviteside bulunur.

Metilaz, restriksiyon enziminin bağlandığı hedef diziye metil grupları sokar.

Böylece, hedef yerini enzime karşı dirençli duruma getirir.

Metillenme biçimindeki baz değişimleri endonukleazın aktivitesini engellediği için hücrenin kendi DNA'sı kesilmeye karşı korunur.

Fakat hücreye giren yabancı DNA'nın hedef dizilerinde bu değişim bulunmadığı için restriksiyon enzimleri tarafından kesilir.

Şimdiye kadar tanımlanan restriksiyon enzimleri 3 grup içinde sınıflandırılmıştır.

I, II ve III tip restriksiyon enzimleri.

I. Tip Restriksiyon Endonukleazları: Hem endonukleaz hem de metilaz işlevlerine sahip multimerik enzimlerdir.

Bu enzimlerde genellikle 2 alt birim bulunur;

M alt birimi, modifikasyon metilazı olarak iş görür,

S alt birimi, DNA'daki hedef yeri tanımaktan sorumludur.

Enzim hedef yeri tanıyıp DNA'ya bağlandığında ya restriksiyon ya da modifikasyon yapar.

I. tip enzimlerde, kesme yeri tanıma yerinden 1000'den fazla baz çifti uzaktadır.

Kesilme özel bir dizide olmaz ama bazı bölgeler tercih edilir.

II. Tip Restriksiyon Endonukleazları: Bu tip enzimler sadece restriksiyon etkisinden sorumludur.

Aynı hedef dizinin metillenmesini ise başka bir enzim yapar.

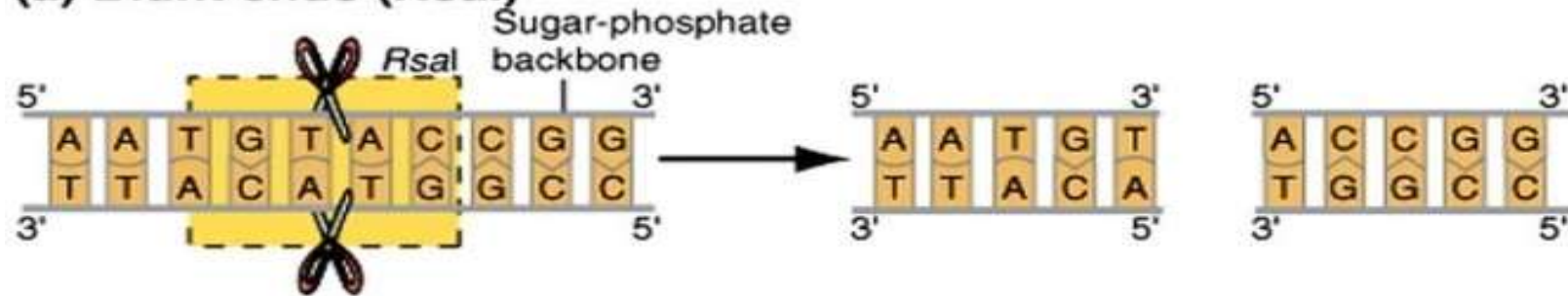
II. tip enzimler için tanıma yerleri çoğunlukla 4-6 baz çiftlik palindromik dizilerdir.

Bu enzimlerin çoğu için kesme çok özgüdür ve kesilme genellikle tanıma dizisinde meydana gelir.

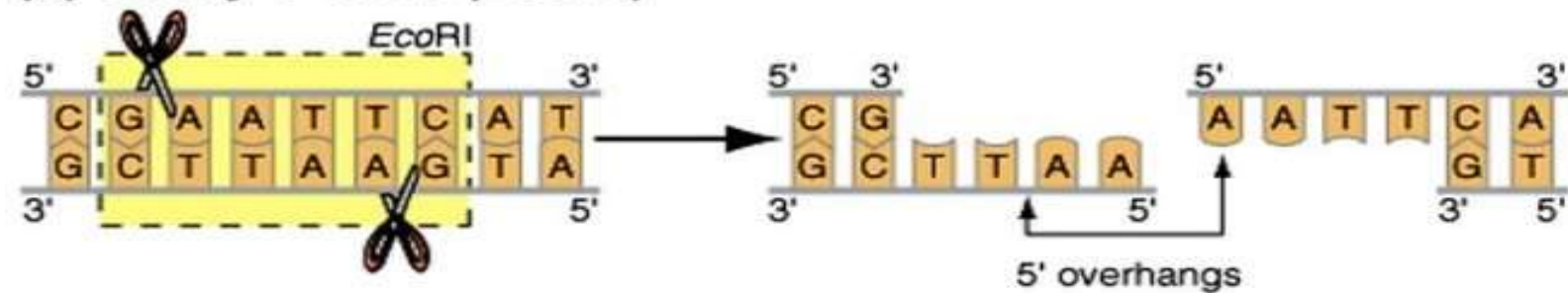
Bazı enzimler kesmeyi iki iplikte karşılıklı noktada yapar ve küt uçlu parçalar oluşturur.

Diğerleri ise karşı karşıya gelmeyen noktalarda kesme yaparak yapışkan uçlu parçaların oluşumuna yol açarlar.

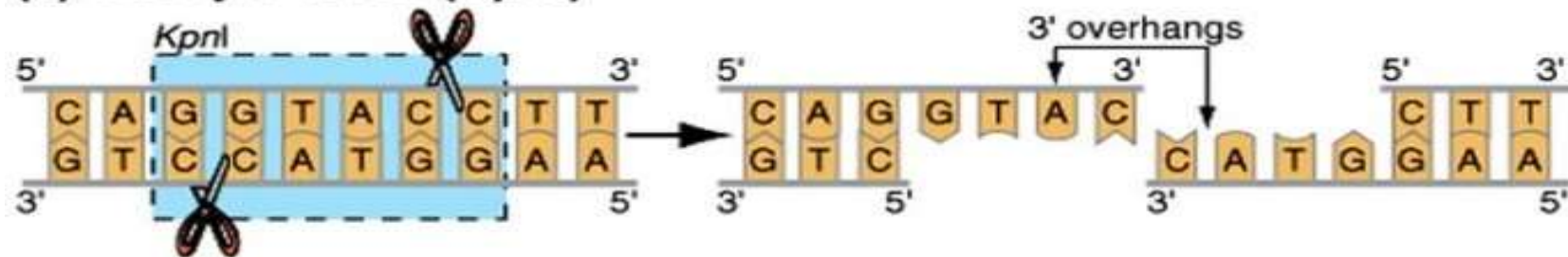
(a) Blunt ends (*RsaI*)



(b) Sticky 5' ends (*EcoRI*)



(c) Sticky 3' ends (*KpnI*)



III. Tip Restriksiyon Endonukleazları: Bu enzimler de , I. tip gibi, hem modifikasyon hem de restriksiyon aktivitelerine sahiptirler.

Multimerik yapı bu enzimler restriksiyondan sorumlu R alt birimi ve modifikasyon ve tanımadan sorumlu MS alt biriminden oluşurlar.

III. tip enzimin DNA'ya bağlanması için ATP'ye gereksinimi vardır.

Metillenme bağlanma yerinde olur

Restriksiyon aktivitesi ise tanıma yerinden yaklaşık 24-26 bç ileride olur.

4.2. Ribonukleazlar

RNA polimerazlar tarafından sentezlenen RNA molekülleri işlevsel durumlarını kazanmak üzere çeşitli işlemlerden geçerler.

Bu işlemler arasında, birincil kopyaların boylarının kısalması için uçlardaki kesilmelerle ve intronların çıkarılmasıyla ilgili nukleolitik reaksiyonlar,

RNA'daki fosfodiester bağlarının hidrolizini kapsayan ve ribonukleazlar (**Rnaz**'lar) tarafından katalizlenen özgül reaksiyonlardır.

Endoribonukleazlar, ise her seferinde RNA'nın ucundan 1 mononukleotit ayırırlar.

Ribonukleazlar, RNA'ların olgunlaşmasıyla ilgili reaksiyonlara katıldıkları gibi, gereksiz RNA'ların parçalanmasını da gerçekleştirir.

Gereksiz moleküller, işlevlerini tamamlamış ya da hatalı RNA türlerini ve birincil kopyaların işlenmesi sırasında atılan fazla RNA parçalarını kapsar.

RNA'ların yıkılması ile ilgili RNaz'ların, işlemlerle ilgili olanlardan daha az özgül oldukları sanılmaktadır.

Çünkü bunların rolleri özgül uçlar yaratmak değil, sadece RNA'nın tamamen yıkımını yapmaktır.

Kaynaklar

