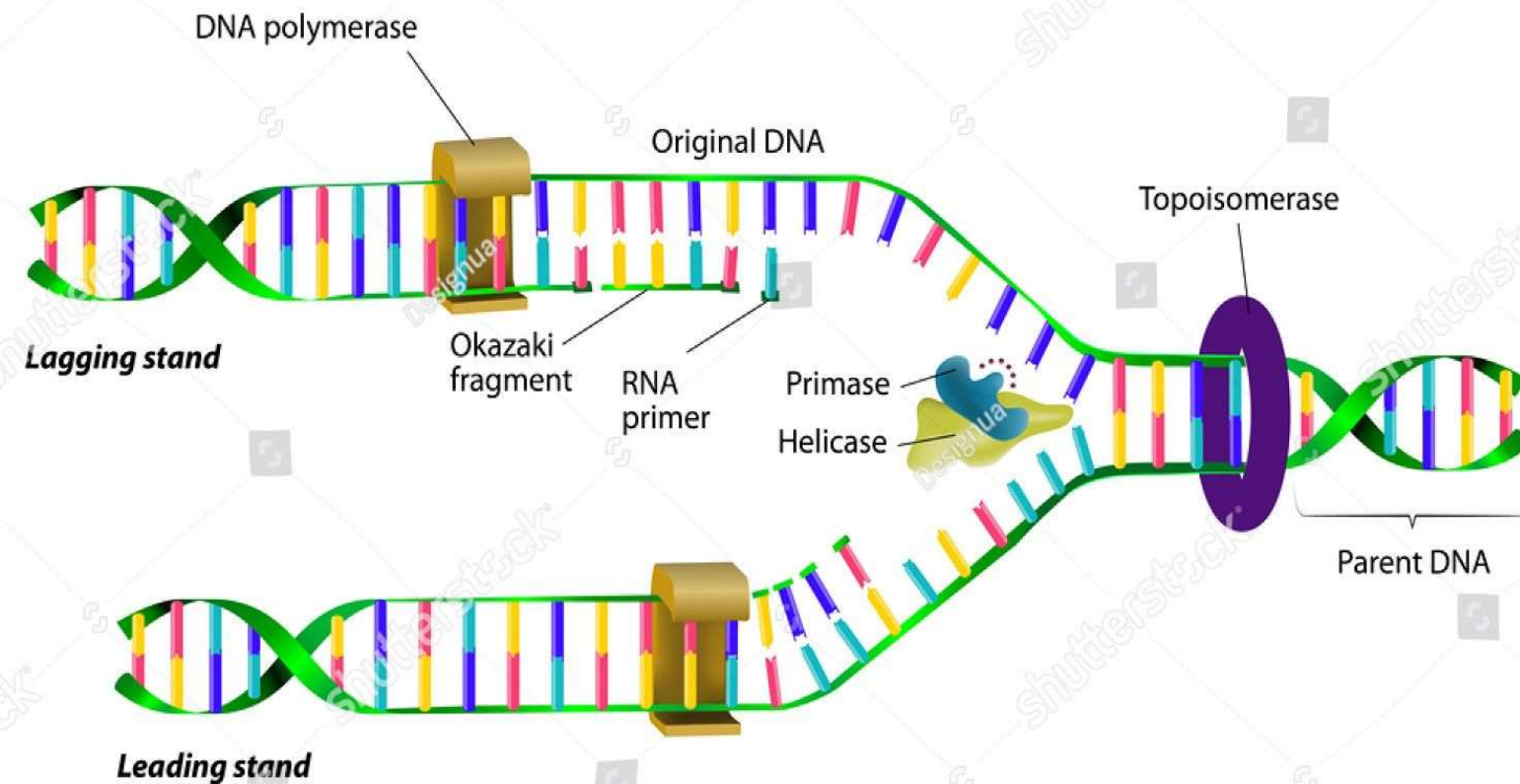


DNA replication



REPLIKASYON

DNA Replikasyonu ve Rekombinasyonu

İnsan genomunu oluşturan 23 kromozomda 3×10^9 (3 milyar) baz çiftinin yer aldığı bilinmektedir.

Bu kromozomların DNA'larının hatasız olarak iki katına çıkartılması için son derece doğru bir mekanizma işlemelidir.

Milyonda bir (10^{-6}) hata oranı bile her bir replikasyon döngüsünde 3000 hata demektir ve bu da çok büyük bir rakamdır.

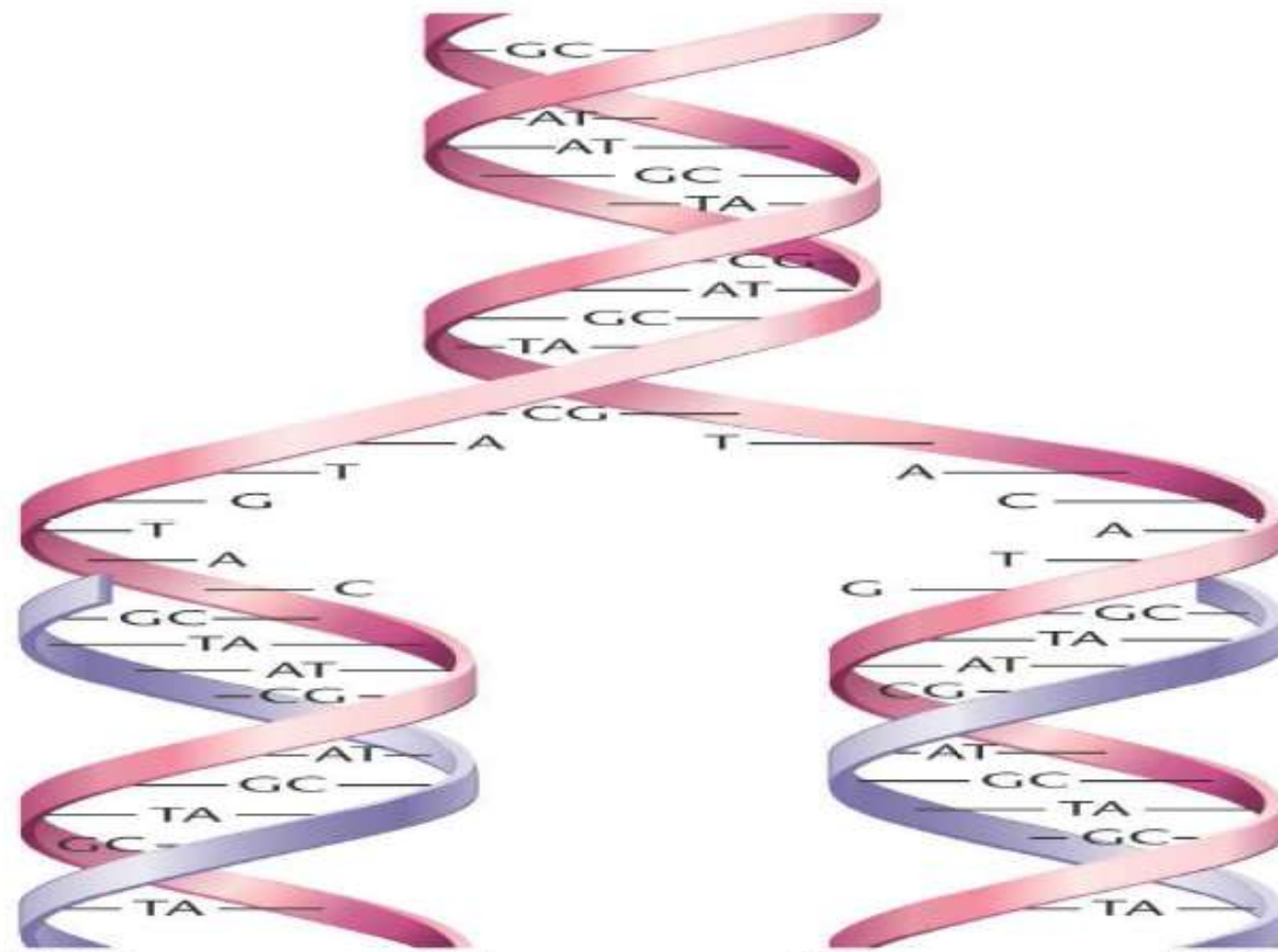
Yarı-saklı (semikonservatif) replikasyon olarak bilinen Watson-Crick modeli virüslerde, prokaryotlarda ve ökaryotlarda yapılan çalışmalarla deneysel olarak da desteklenmiştir.

DNA, yarı-saklı (semikonservatif) replikasyon modeli ile kendini işler

Azotlu bazların yerleşiminden dolayı DNA ikili sarmalının her bir zincirinin tamamlayıcı zincir sentezi için kalıp oluşturabileceğini Watson ve Crick açık olarak kanıtlamışlardır.

Eğer T varsa karşısına A çekecektir. G varsa karşısına C çekecektir.

Her iki kalıp boyunca bu nukleotidler kovalent bağlarla polinukleotit oluşturduğu takdirde sonuçta birbirine özdeş iki DNA zinciri oluşturacaktır.



New Old Old New
Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Kopyalanan her bir DNA molekülünde bir “yeni” bir “eski” zincir bulunacağından bu tip bir çoğalma yarı-saklı (semikonservatif) replikasyon olarak tanımlanır.

DNA kopyalanması için, atasal zincirlerin kalıp olarak görev görmesine dayanan iki yol daha düşünülmektedir.

Saklı (konservatif) replikasyon tamamlayıcı polinukleotit zincirleri daha önce anlatıldığı gibi sentezlenir, ancak burada iki yeni zincir bir araya gelir ve atasal zincirler tekrar birleşir.

Parçalı (dispersif) replikasyon atasal zincirler kopyalama esnasında kırılır ve kırılan DNA parçaları iki yeni çift sarmal içinde dağılır.

Böylece her bir zincirde hem eski, hem de yeni DNA bulunur.

Conservative



Semiconservative



Dispersive



One round of replication — new synthesis is shown in green

Meselson-Stahl Deneyi

1958'de Marthaw Meselson ve Franklin Stahl, bakteri hücrelerinin yeni DNA moleküllerini yarı-saklı replikasyon ile sentezlediklerine dair kuvvetli kanıtlar ortaya koyan deney sonuçlarını yayınlamışlardır.

Azot kaynağı olarak sadece $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (amonyum klorür) içeren ortamda *E. coli* hücrelerini birçok nesil boyunca üretmişlerdir.

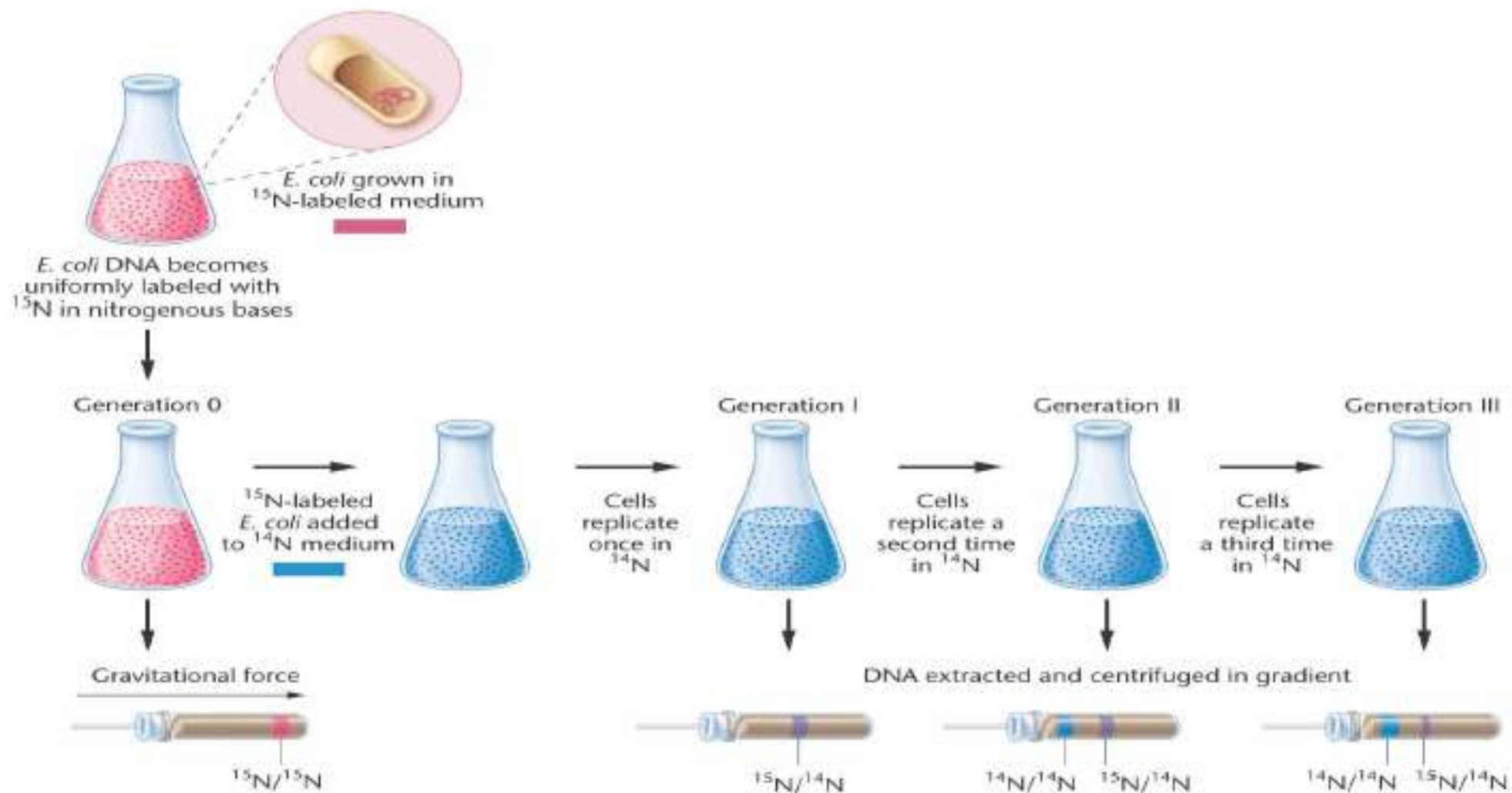
Doğal izotopu olan ^{14}N 'e göre bir fazla nötron içerir.

^{15}N daha dayanıklıdır.

^{15}N içeren daha yoğun DNA yoğunluk gradient santrifüstasyonunda daha alt kısımlarda yer alır.

Meselson ve Stahl deneyinde, bir çok nesil sonra *E. coli* hücrelerinde DNA'daki azotlu bazlar da dahil olmak üzere tüm azot taşıyan moleküller ^{15}N içermiş olur.

Daha sonra hücreler yalnız $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ içeren ortama aktarılır. Bu ortamda replikasyon sonucu sentezlenen DNA'lar azotun "hafif" izotopunu taşır.



Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Daha sonra hücreler yalnız $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ içeren ortama aktarılır.

Bu ortamda replikasyon sonucu sentezlenen DNA'lar azotun "hafif" izotopunu taşır.

Ökaryotlarda Yarı-Saklı (Semikonservatif) Replikasyon
J. Herbert Taylor , Philip Woods ve Walter Hughes 1957'de
Meselson ve Stahl'ın çalışmasının yayınlanmasından bir yıl önce
ökaryotlarda da replikasyonun yarı-saklı mekanizma ile olduğunu
gösteren kanıtı sunmuşlardır.

Vicia faba (bakla) bitkisinin kök uçlarını deneylerinde kullanmışlar ve DNA'yı, DNA'nın radyoaktif öncülerinden olan ^3H -timidin ile işaretleyerek ve otoradyografisini alarak replikasyonu izlemeyi başarmışlardır.

İşaretli izotop ortamında birinci replikasyon döngüsü sonucu kardeş kromatidlerin ikisi de rayoaktivite taşımaktadır, yani her bir kromatitde bir “yeni” sentezlenen radyoaktif işaretli DNA zinciri ve bir de işaretsiz “eski” zincir bulunmaktadır.

Replikasyon Orijinleri, Çatalları ve Birimleri

Yarı-saklı replikasyon DNA'nın kopyalandığı genel replikasyon modelidir.

Kromozom üzerinde DNA'nın replikasyonu nereden 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 orijinden başlayarak her iki yönde mi ilerler?

Başka bir deyişle replikasyon tek yönlü müdür yoksa çift yönlü müdür?

Kromozom üzerinde replikasyonun olduğu noktada sarmala ait zincirlerin açılmasıyla ortaya çıkan yapıya replikasyon çatalları adı verilir.

Bu çatalları önce sentezin orijin noktasında meydana gelir ve replikasyon devam ettikçe ilerler.

Replikasyon çift yönlü ise orijinden itibaren zıt yöne doğru ilerleyen iki replikasyon çatalı oluşacaktır.

Bir orijinden bir replikasyon başladıktan sonra replike olan DNA'nın uzunluğunun bir birim olduğunu belirtmek için kullanılan terim **replikon** terimidir.

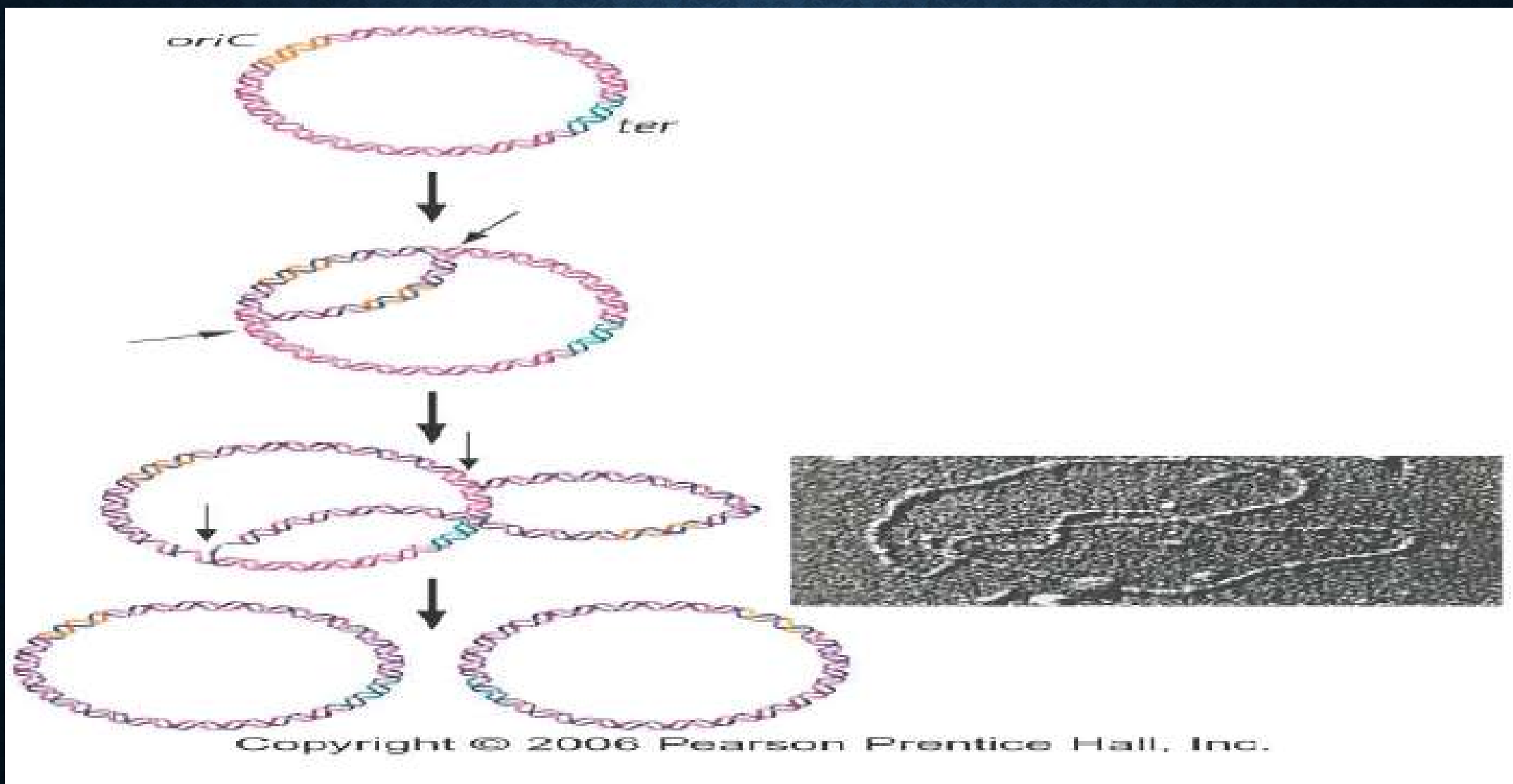
John Cairns, *E. coli*'de replikasyonun bir orijinden başladığını göstermiştir.

oriC olarak adlandırılan bu özgül bölgenin konumu *E. coli* kromozomu üzerinde haritalanmıştır.

Bakteriyofaj ve bakterilerde DNA sentezi bir noktadan başladığı için, kromozomun tümü bir replikondur.

Tek bir halkasal kromozoma sahip olan bakterilerde bir orijinin bulunması karakteristiktir.

Başka araştırmacılar tarafından ortaya konan çalışmaların sonucuna göre, replikasyon iki yönlüdür ve *oriC*'nin her iki yönünde hareket eder.



Bakterilerdeki DNA sentezinde diğer enzimlerin yanı sıra 3 polimeraz görev alır.

DNA Polimeraz I: 1957'de Arthur Kornberg ve arkadaşları *E. coli*'den *in vitro* sistemde DNA sentezini yönlendiren bir enzim ayıştırmışlardır.

Bu enzim DNA polimeraz I olarak bilinmektedir.

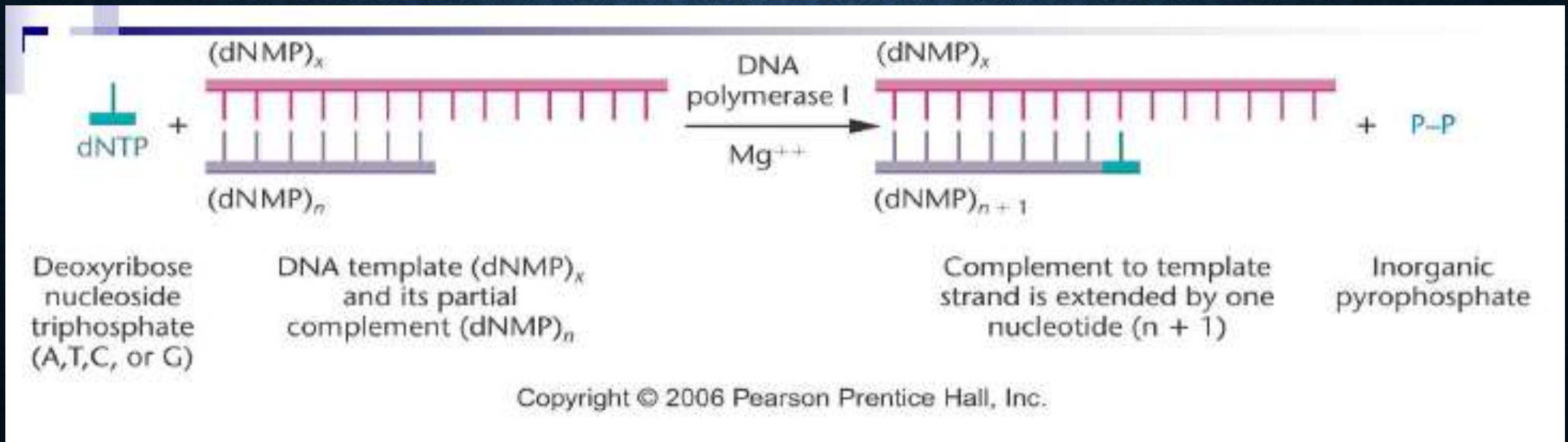
Kornberg DNA polimeraz I'in varlığında *in vitro* DNA sentezi için başlıca iki gereksinim olduğunu saptamıştır:

1. Dört tip deoksiribonukleozit trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP=dNTP)

2. DNA kalıbı

Reaksiyonda 4 dNTP'den herhangi birinin bulunmaması durumunda ölçülebilir bir sentez meydana gelmemiştir.

Kalıp DNA ilave edilmezse DNA sentezi gerçekleşmekte ancak büyük oranda azalmaktadır.



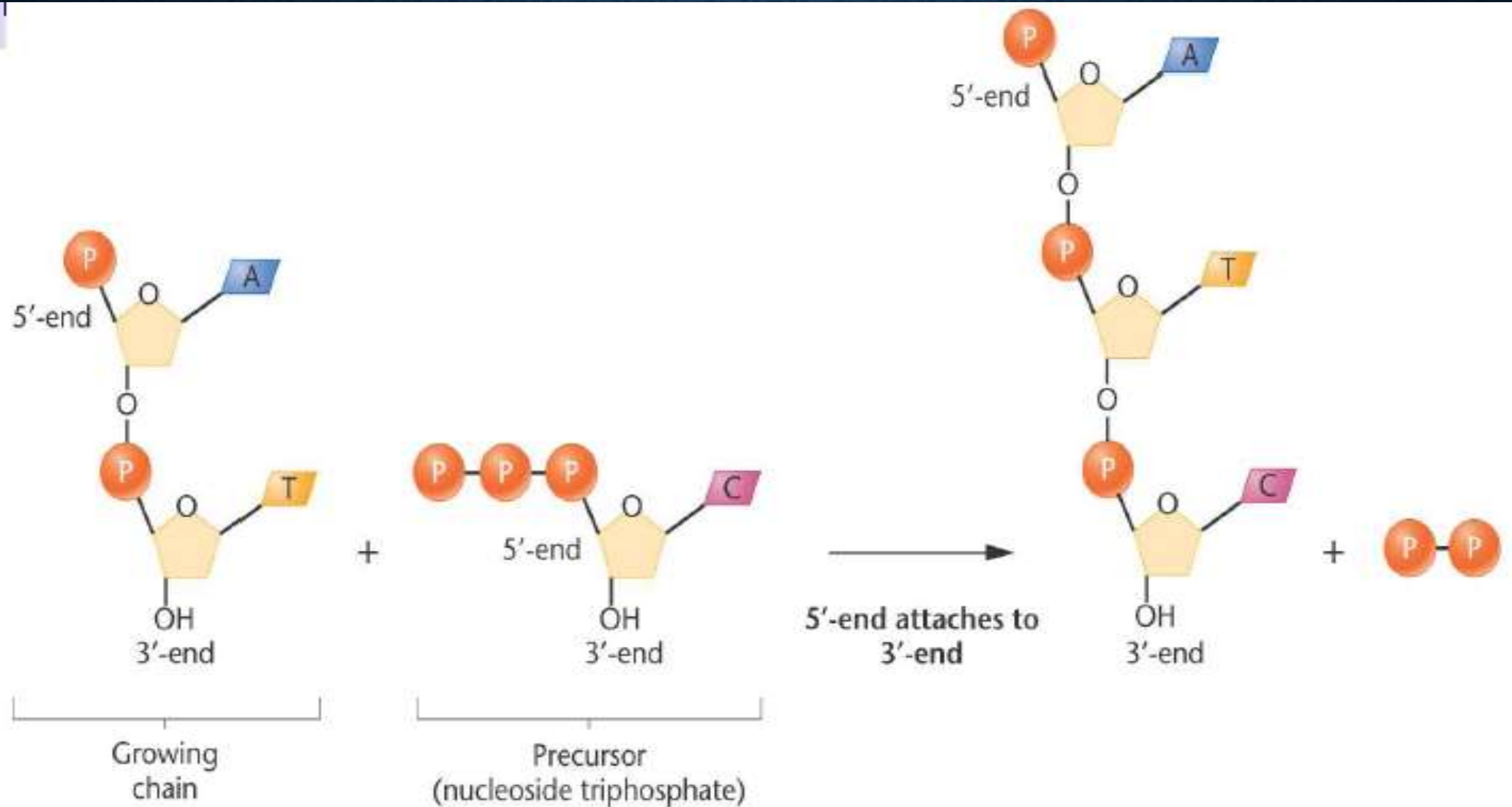
Uzayan DNA zincirine her bir nukleotitin katılım şekli DNA polimeraz I'in özgüllüğüne bağlıdır.

Öncü dNTP'de, d-ribozun 5'-C'una üç adet fosfat grubu bağlıdır.

Sentez esnasında uçtaki iki fosfat grubu koparken 5'-C'a bağlı olan fosfat grubu ilave edileceği d-ribozun 3'-OH'ına kovalent bağla bağlanır.

Böylece zincir uzaması, uzayan zincirin 3' ucuna her seferinde bir nukleotit ilavesi ile 5'-3' yönünde devam eder.

DNA sentezi devam ettikçe her basamakta açığa çıkan yeni 3'-OH grubu, DNA sentezi ilerlerken sonraki nukleotitin zincire eklenmesini sağlar.



Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

DNA Polimeraz II ve III

Peter DeLucia ve John Cairns, DNA polimeraz I aktivitesine sahip olmayan bir mutant *E. coli* suşu bulmuştur.

İşlevsel enzime sahip olmayan bu mutant suş DNA'sını kopyalayıp üremeyi başarmış ancak hücreler DNA "onarım" yeteneği bakımından oldukça yetersiz kalmıştır.

1. *E. coli*'de, *in vivo* DNA replikasyonu yapabilen başka bir enzim bulunmalıdır.

2. DNA polimeraz I'in *in vivo* koşullarda ikincil bir işlevi olabilir.

DNA polimeraz I'in DNA sentezinin doğru yapılmasından sorumlu olduğu, ancak tamamlayıcı zinciri sentezleyen gerçek enzim olmayabileceği düşünülmüştür.

TABLE 11.2

**PROPERTIES OF BACTERIAL
DNA POLYMERASES I, II,
AND III**

Properties	I	II	III
Initiation of chain synthesis	—	—	—
5'–3' polymerization	+	+	+
3'–5' exonuclease activity	+	+	+
5'–3' exonuclease activity	+	—	—
Molecules of polymerase/cell	400	?	15

Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Bu üç enzimin hiçbirisi bir kalıptan DNA sentezini başlatamaz, ancak üçü de **primer** adı verilen (RNA), var olan bir DNA zincirini kalıp boyunca uzatabilir.

DNA polimeraz enzimlerinin hepsi molekül ağırlığı 100.000 dalton olan büyük protein kompleksleridir.

Her üçünün de 3'-5' **eksonukleaz** aktivitesi bulunur.

Bu özellik, enzimlerin polimerizasyonu tek yönde gerçekleştirme, bir an duraksayıp geri dönerek ilave edilen nukleotidleri çıkarabilme kapasitelerini ifade etmektedir.

DNA polimeraz I, 5'-3' eksonukleaz aktivitesi de gösterir. Bu sayede enzim, sentezin başladığı uçtan itibaren nukleotidleri kesebilir ve sonra sentez yönünde işlemine devam edebilir.

Bu nedenle DNA polimeraz I, RNA primerini de ortamdan uzaklaştırabilir.

Hücrede DNA polimeraz I, DNA polimeraz III'e göre daha fazla miktarda bulunur ve daha dayanıklıdır.

Polimeraz I, primeri uzaklaştırır ve primerler uzaklaştıkça doğal olarak oluşan boşluklarda DNA sentezleyerek bu bölgeleri doldurur.

Eksonukleaz aktivitesi ile, bu işlem esnasında oluşabilecek hataları da onarabilir.

Polimeraz II, UV gibi dış etmenler sonucu hasar gören DNA'nın onarımında rol alır.

Enzim replikasyon çatalındaki DNA sentezi bozulduğunda aktive olan bir gen tarafından şifrelenmektedir.

Replikasyonda gerekli olan ve polimerizasyondan sorumlu asıl enzim olarak Polimeraz III görülmektedir.

Enzimin 3'-5' eksonukleaz aktivitesi, sentez sırasında hata onarımı işlevini görmesini sağlamaktadır.

DNA polimeraz III'ün **holoenzim** olarak adlandırılan aktif formu, 10 farklı polipeptit zincirinden meydana gelmiş bir dimerdir.

TABLE 11.3**SUBUNITS OF THE DNA
POLYMERASE III HOLOENZYME**

Subunit	Function	Groupings
α ϵ θ	5'–3' polymerization 3'–5' exonuclease core assembly	Core enzyme: Elongates polynucleotide chain and proofreads
γ δ δ' χ ψ	Loads enzyme on template (Serves as clamp loader)	
β	Sliding clamp structure (processivity factor)	γ complex
τ	Dimerizes core complex	

Copyright © 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Molekül ağırlığı 600.000 daltondan fazladır.

Molekül ağırlığı 140.000 dalton olan en büyük alt birim olan α , ε , θ (alfa, epsilon ve teta) alt birimleri ile beraber holoenzimin polimerizasyon aktivitesi gösteren “çekirdek” (core) enzim kısmını oluşturur.

Kalıp zincirin nukleotit polimerizasyonundan α alt birimi sorumludur.

Çekirdek enzimin ε alt birimi, 3' - 5' eksonukleaz aktivitesi gösterir.

Beş alt birimin (γ , δ , δ' , χ , ψ) oluşturduğu ikinci grup, γ (gama) kompleks olarak adlandırılan bölgeyi oluşturur.

Bu γ kompleksi, replikasyon çatallında enzimin kalıba "oturtulmasında" rol alır.

Enzimin işlev görmesi için ATP enerjisi gereklidir.

β alt birimi, polimerizasyon sırasında çekirdek enzimin kalıptan kopmasını sağlar.

Son olarak, π (pi) alt birimi, iki çekirdek polimerazın replikasyon çatallında bir arada tutunmasını sağlar.

Holoenzim ve diğer çeşitli proteinler, replikasyon çatallında neredeyse ribozom kadar büyük olan replizom olarak bilinen bir kompleks oluşturur.

DNA replikasyonu sırasında birçok karmaşık olayın çözülmesi gerekir.

Bakteri ve virüslerde replikasyon yarı-saklı ve bir replikonda çift yönlü hareket eder.

Sentezin, DNA polimeraz III'ün denetimi altında 5' den 3' üne doğru iki replikasyon çatallı oluşturarak gerçekleştiği bilinmektedir.

Bu replikasyon çatalları sentezin başladığı noktadan iki zıt yöne doğru hareket etmektedir.

1. Sarmalın yer yer açılması ve her iki zincirde sentezin devam etmesi için bu “açık” konfigürasyonun dayanıklı olmasını sağlayan bir mekanizmanın olması gerekir.

2. Sarmalın açılması ve zincirin daha aşağı kısımlarda tekrar sarılması sonucu ortaya çıkan gerilimi azaltmak için de bir mekanizma bulunmalıdır.

3. DNA polimeraz III'ün polimerizasyonu yönlendirebilmesi için bir çeşit primer sentezlenmelidir.

Gerçekten bir primer vardır, ancak primerin DNA değil RNA olması şaşırtıcıdır.

4. RNA primeri sentezlendikten sonra DNA polimeraz III, atasal molekülün her iki zincirinin tamamlayıcısı olan DNA zincirini sentezlemeye başlar.

Replikasyon çatalının ilerleme yönünde olan kesintisiz sentez, iki zincirin birbirine antiparalel olduğu için ancak zincirlerden birinde gerçekleşebilir.

Diğer zincirdeki sentez zıt yönde ve kesintilidir.

5. Replikasyonun tamamlanmasından önce RNA primerlerinin uzaklaştırılması gerekir.

Oluşan geçici boşlukların bulunduğu yerler, kalıp DNA eşlenikliği ile doldurulmalıdır.

6. Boşlukları doldurmak için yeni sentezlenen DNA, yanındaki DNA zinciri ile birleştirilmelidir.

7. Kopyalama sırasında DNA polimerazlar eşlenik bazları doğru biçimde yerleştirmektedir, ancak hata olma olasılığı da vardır.

Bazen sentezlenen zincire yanlış bazlar ilave edilebilir.

Sentez işleminin bir parçası olan bir hata okuma mekanizması (proofreading) DNA sentezi sırasında oluşan hataları düzeltir.

DNA sarmalı açılmalıdır

Bakteri ve virüslerin halkasal kromozomlarında, DNA sentezinin başladığı bir orijin noktası bulunur.

Bu bölge *E. coli* kromozomunda çok iyi çalışılmıştır.

Replikasyon orijini olan *oriC*, 9 ve 13 bazdan oluşan (9mer ve 13mer olarak adlandırılır) tekrar dizilerinin bulunduğu 245 baz çifti içerir.

DnaA denen özgül bir protein ilk basamakta sarmalın açılmasından sorumludur.

DnaA proteininin bazı alt birimleri birçok 9mer dizisine bağlanır.

Bu bağlanma, sarmalın daha fazla açılmasında ve kararlılığında rol alan **DnaB** ve **DnaC** proteinlerinin bağlanmasını kolaylaştırır.

H bağlarını kırıp ikili sarmalı denatüre etmek için normalde ATP hidrolizi ile sağlanan enerjiye gereksinim duyan bu tip proteinler **helikazlar** olarak adlandırılır.

Tek zincire bağlanan proteinler (single-stranded binding proteins, SSBP) olarak bilinen diğer bazı proteinler bu konformasyonu daha da kararlı kılarlar.

Sarmalın açılması devam ettikçe, replikasyon çatallının önünde oluşan sarılma gerilimi çoğu kez **üstün kıvrılma (super coiling)** meydana getirir.

Halkasal moleküllerde üstün kıvrılmalar, DNA'daki ek bükülmeler ve dönüşler sonucu oluşturulur.

Bu durum aynen bir lastiğin uzatılıp, bir ucundan büküldüğünde ortaya çıkan sarmal yapıya benzer.

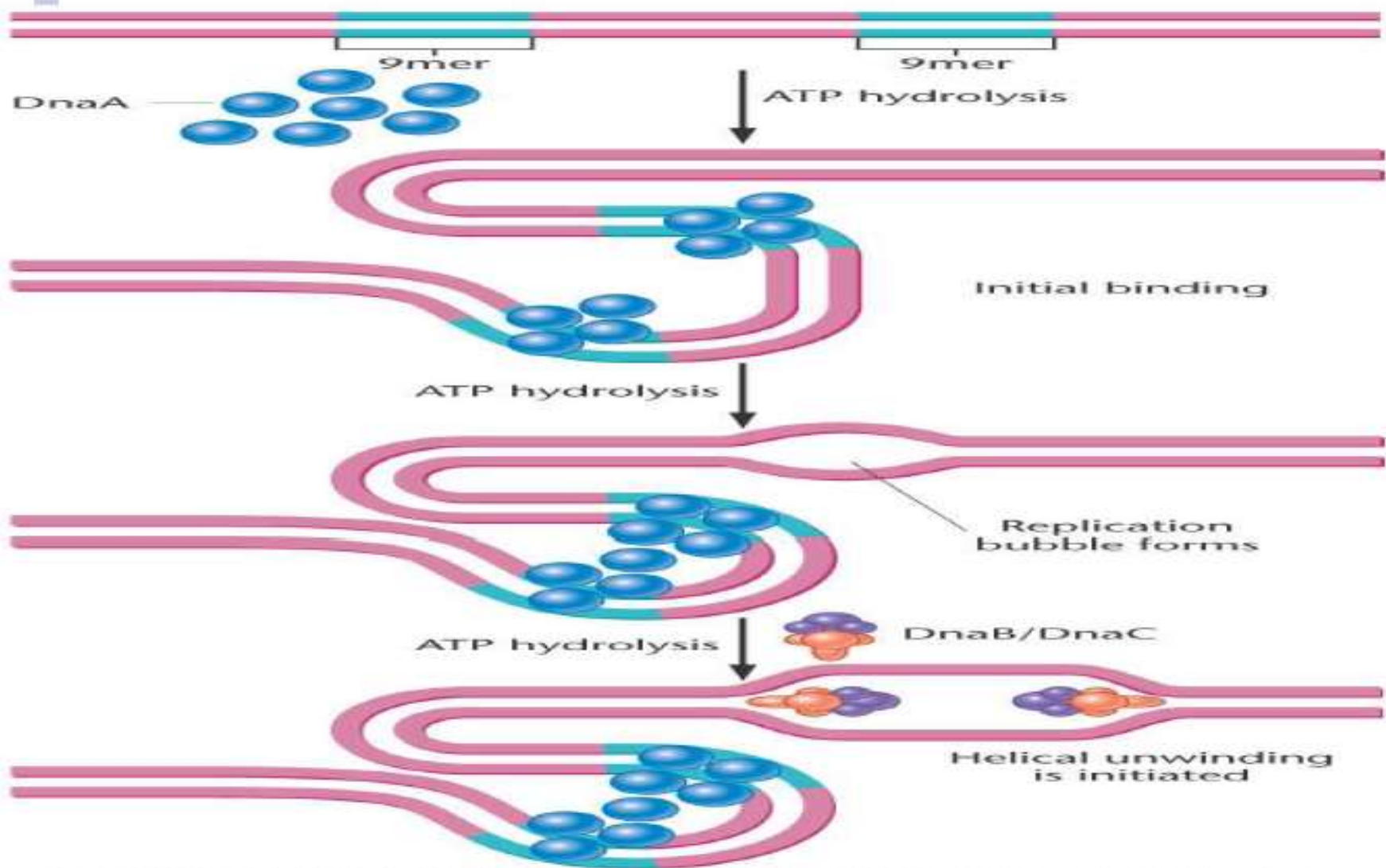
DNA topoizomerazlar olarak adlandırılan geniş bir enzim ailesinin üyesi olan DNA giraz enzimi, bu tip üstün kıvrılmaları gevşetir.

Giraz enzimi tek zincirde ya da her iki zincirde "kırıklar" oluşturur, aynı zamanda üstün kıvrılma oluşumu sırasında meydana gelen bükülmeleri ve düğümleri "açma" hareketleri de katalizler.

Oluşan kırıklar sonra tekrar birleştirilir.

Bu çeşit replikasyonlarda ATP hidrolizinden açığa çıkan enerji kullanılır.

DNA polimeraz kompleksi ve diğer ilgili enzimler hep birlikte, molekülü DNA sentezine katılacak şekilde düzenlerler ve hepsi replizomun bir parçasını oluştururlar.



Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

DNA sentezinin başlaması için RNA primerine gereksinim vardır.

Sarmalın küçük bir bölümü açıldıktan sonra sentez başlayabilir.

DNA polimeraz III'ün polinukleotit zincirini uzatması için, serbest 3'-OH gurubu olan bir primer gereklidir.

Önce, kalıp DNA üzerinden DNA'ya eşlenik olan kısa bir RNA parçası sentezlenir. RNA sentezi, **primaz** denilen RNA polimerazın bir çeşidi tarafından sentezlenir.

Primazın sentezi başlatması için serbest 3' ucu gerekmemektedir.

DNA polimeraz III işte bu kısa RNA parçasına 5'-deoksiribonukleotitleri eklemeye başlayarak DNA sentezini başlatır.

Daha sonraki bir aşamada, RNA primeri uzaklaştırılmalı ve yerini DNA'ya bırakmalıdır. Bu reaksiyon DNA polimeraz I tarafından katalizlenir.

RNA primerinin oluşumu, virüsler bakteriler ve çeşitli ökaryotik organizmalarda tanımlanan, evrensel bir işlemdir.

DNA template

3' 5'



5' 3'



Initiation

RNA primer

New DNA

Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Antiparalel zincirde DNA sentezi kesintili ve kesintisiz olarak gerçekleşir.

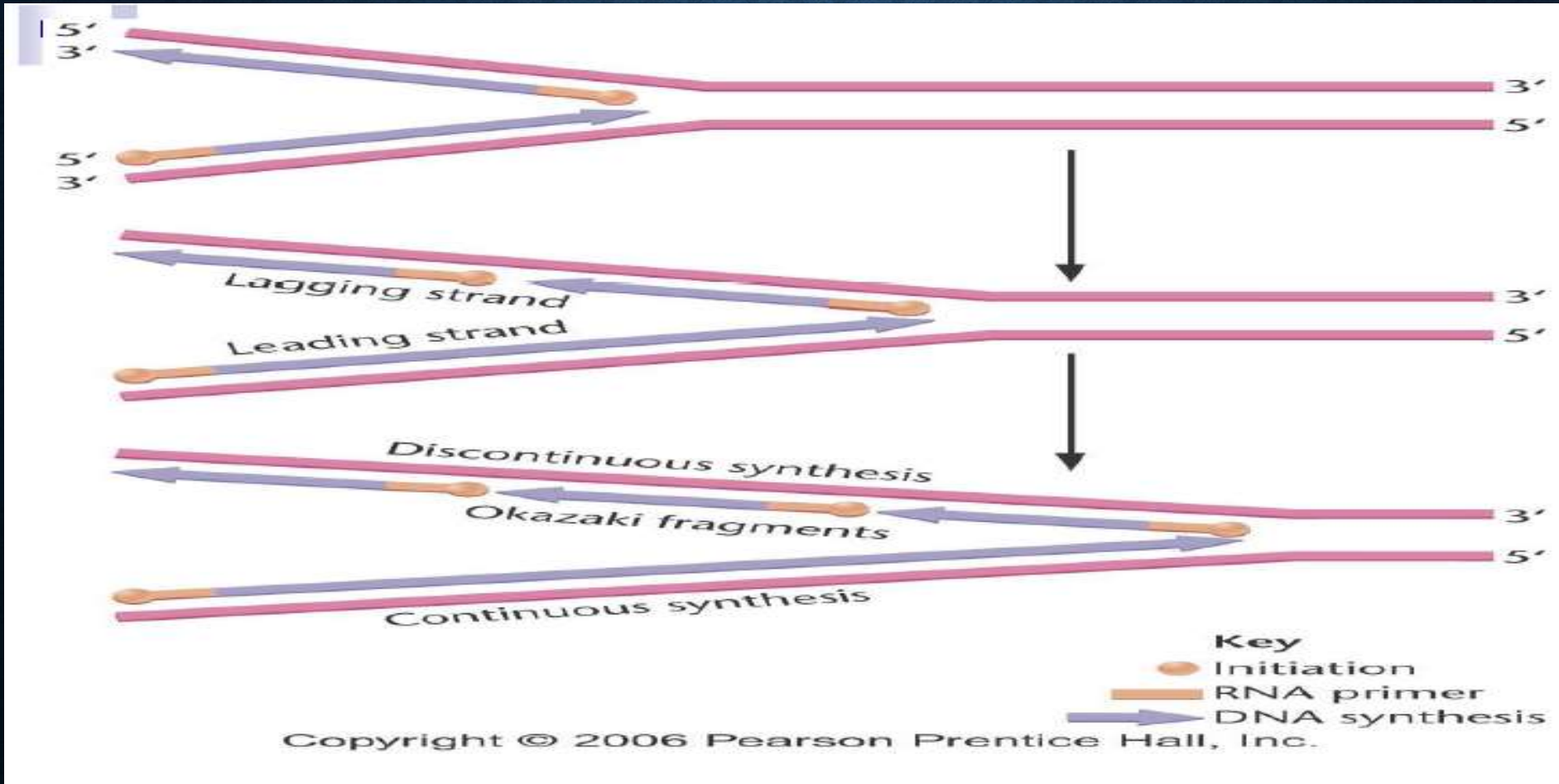
DNA polimeraz III, DNA sentezini yalnız 5'-3' yönünde gerçekleştirebilir.

Sentez, replikasyon çatalı boyunca ve çatalı açarak zincirin birinde bir yönde, diğerinde zıt yönde aynı anda gerçekleşir.

Replikasyon çatalı açıldıkça ve aşağı doğru hareket ettikçe, sadece bir zincir **sürekli DNA sentezi** için kalıp olarak kullanılabilir.

Bu zincire **kesintisiz DNA zinciri (leading DNA strand)** denir.

Kesintili DNA zinciri (lagging DNA strand) olarak adlandırılan diğer zincirde, sentez için birçok başlangıç noktası gereklidir ve sonuç olarak bu zincirde **kesintili DNA sentezi** yapılır.



Kesintili DNA sentezini destekleyen kanıtlar, Reiji Okazaki, Tuneko Okazaki ve ark. tarafından elde edilmiştir.

E. coli'de bakteriyofaj DNA'sının replikasyonu sırasında yeni sentezlenen DNA'nın bir kısmının, kalıp zincire H bağlarıyla tutunan 1000-2000 nukleotitlik küçük parçalar halinde bulunduğunu göstermişlerdir.

RNA primeri bu şekildeki her bir parçanın bir kısmını oluşturmaktadır.

Okazaki parçaları (fragmanlar) olarak adlandırılan bu parçacıklar, sentez devam ettikçe, molekül ağırlığı gittikçe artan daha uzun DNA zincirlerine dönüşmektedir.

Kesintili DNA sentezinde, RNA primerini uzaklaştıracak ve Okazaki fragmanlarını birleştirecek enzimlere gereksinim vardır.

Bilindiği gibi, primerin uzaklaştırılması ve eksik nukleotitlerin yerine konulmasında DNA polimeraz I enzimi sorumludur.

Fragmanları birleştirme işi ise **DNA Ligaz** enzimine aittir.

DNA ligaz, fosfodiester bağının oluşumunu katalizleyerek kesintili sentezlenen zincirler arasındaki boşluğu kapatır.

Sentez kesintili ve kesintisiz zincirlerde aynı anda yapılır.

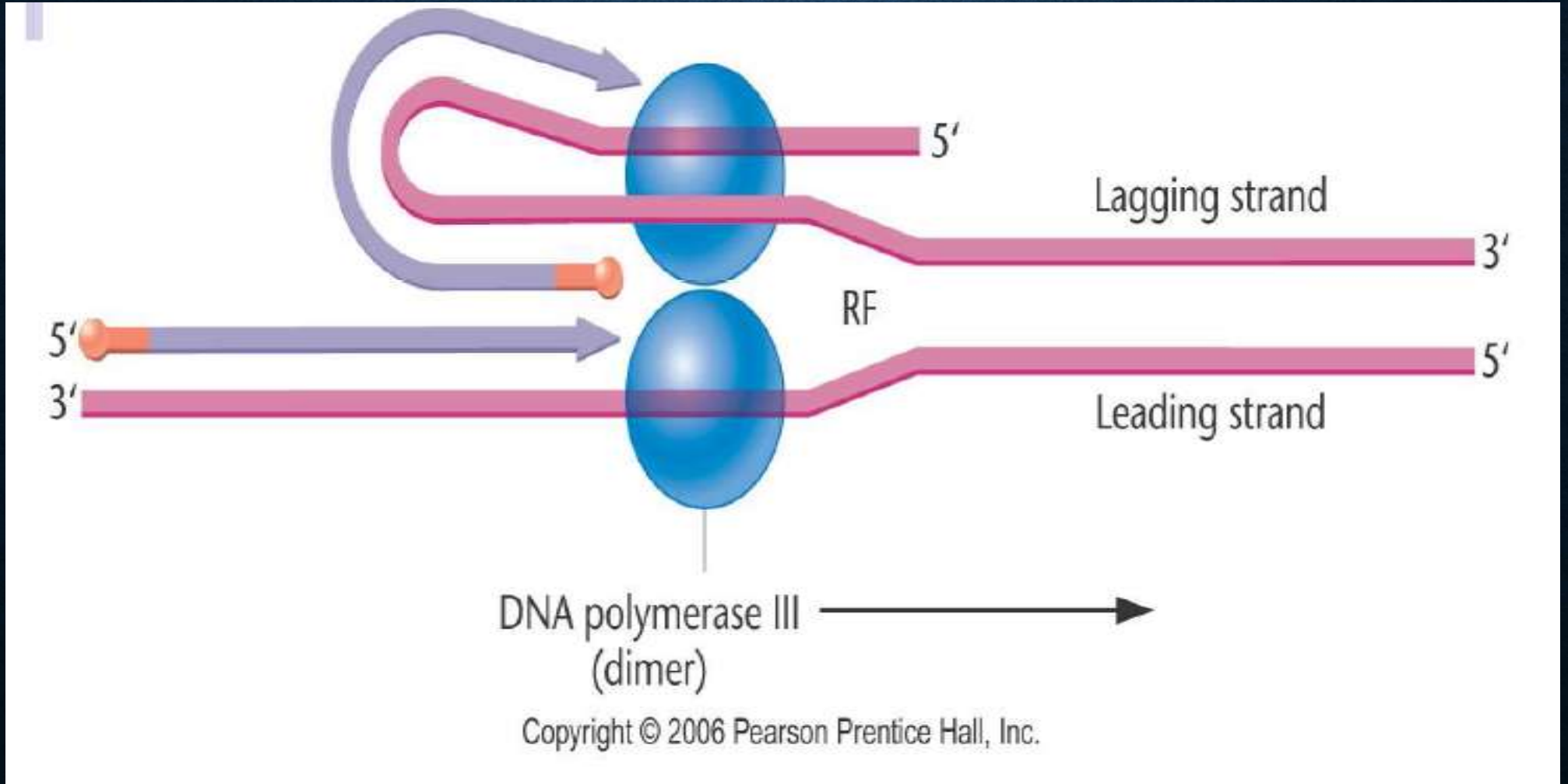
Bu iki zincir aynı replikasyon çatasında aynı anda mı kopyalanır, yoksa bu işlemler enzimin iki ayrı kopyasını içeren farklı olaylar mıdır?

Kesintili zincir bir ilmek oluşturduğu taktirde, her iki zincirde birden dimetrik enzimin yönlendirdiği nukleotit polimerizasyonu gerçekleşir.

100-200 baz çiftinin sentezinden sonra enzimin kesintili kol üzerindeki monomeri sentezi tamamlamış bir Okazaki fragmanına rastlar ve o noktada zinciri terk eder.

Hemen arkasından kesintili kalıp zincirde yeni bir ilmek oluşur ve işlem tekrarlanır.

İşlem oluşumu kalıbın yönünü değiştirir ancak, kesintili zincirde sentezin 5'-3' olan gerçek yönünü etkilemez.



Holoenzimin replikasyon çatasında sentezi kolaylaştıran diğerk bir önemli özelliğide, enzimin β alt biriminin yeni oluşan DNA sarmalını saran kısıkaç-benzeri dimer yapısıdır.

Bu β alt birim kısıkacı, çekirdek enzimin (nukleotitlerin ilavesini katalizleyen α , ϵ ve θ alt birimleri) polimerizasyon süresince kalıptan ayrılmasını engeller.

Replikasyon çatalı açılırken, holoenzimin tümü ana sarmal boyunca hareket ettiğı için b alt birim dimerine kaygan kısıkaç denir.

Hata okuma (proofreading) ve düzeltme DNA replikasyonunun ayrılmaz parçasıdır.

DNA replikasyonunun temeli, her nukleotiti tamamen kalıp zincirin eşleniği olan yeni bir zincirin sentezlenmesidir.

DNA polimeraz, sentezi çok doğru yaptığı halde kusursuz değildir ve zaman zaman eşlenik olmayan bir nukleotit hatalı olarak zincire girebilir.

Bu tip hataları gidermek için polimeraz I ve III, **3' - 5'eksonukleaz aktivitesi** göstererek yanlış eşleşen nukleotiti saptar ve yapıdan çıkarır (3'-5' yönünde).

Yanlış eşleşmiş nukleotit çıkartıldıktan sonra sentez 3'-5' yönünde yeniden devam eder.

Eksonukleaz hata okuması (exonuclease proofreading) denen bu işlem sentezin doğruluğunu arttırır.

Holoenzim yapısındaki DNA polimeraz III'ün ϵ alt birimi, hata onarım basamağına doğrudan katılır.

DNA replikasyonu uygun bir model ile açıklanabilir.

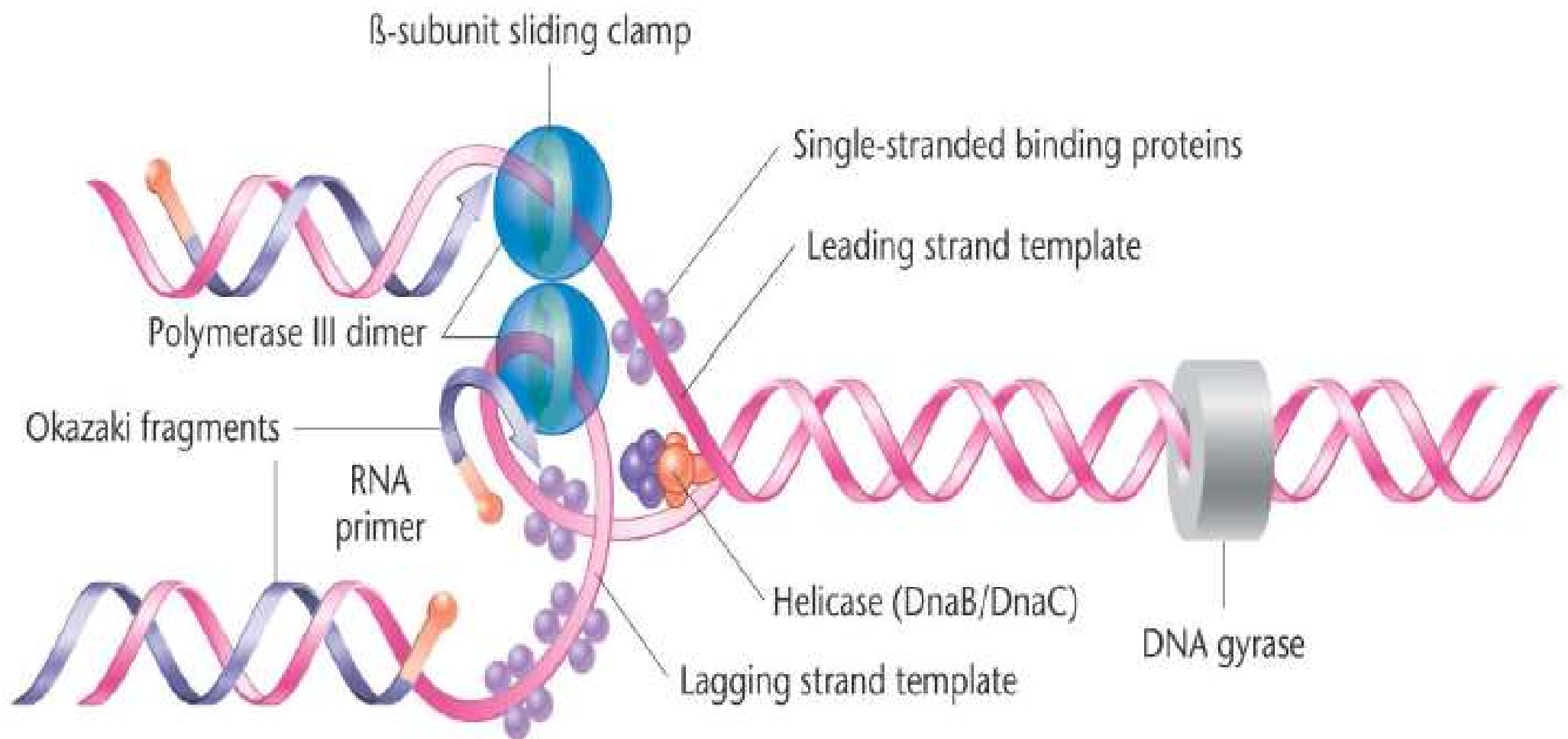
İlerleyen çatalda helikaz enzimi ikili sarmalı açar. Sarmal açılınca, tekrar sarmal oluşmasını engellemek için, açılan zincire tek zincir yapılarına özgül olarak bağlanan proteinler bağlanır.

İlerleyen replikasyon çatallında, DNA giraz oluşan üstün kıvrılmaların yarattığı gerilimi azaltma işlevi görür.

Polimeraz dimerinin çekirdeğini oluşturan her bir monomer, kalıp zincirlerden birine b-alt birimlerinin oluşturduğu kaygan kıskaç yardımıyla bağlanır.

Sentez, kesintisiz zincirde sürekli olarak gerçekleştirilirken, kesintili zincir sentezin her iki zincirde de aynı anda devam etmesini sağlamak için "ilmek" oluşturmalıdır.

Kesintili zincirdeki replikasyonda, RNA primerinin yerini DNA'nın alması için DNA polimeraz I ve Okazaki parçalarının birleşmesi için de DNA ligaz işlevi gereklidir.



Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Replikasyon çeşitli genler tarafından kontrol edilir.

Ligaz eksikliği ya da hata okuma-eksikliği gibi pekçok mutasyon, kopyalamanın bazı safhalarını engeller ya da ciddi ölçüde bozar.

Genetik analizlerde, genellikle bir koşulda kendini gösteren ancak başka bir şekilde gözlenmeyen **koşullu mutasyonlar (kondisyonel mutasyonlar)** kullanılır.

TABLE 11.4

SOME OF THE VARIOUS *E. COLI* MUTANT GENES AND THEIR PRODUCTS OR ROLE IN REPLICATION

Mutant Gene	Enzyme or Role
<i>polA</i>	DNA polymerase I
<i>polB</i>	DNA polymerase II
<i>dnaE, N, Q, X, Z</i>	DNA polymerase III subunits
<i>dnaG</i>	Primase
<i>dnaA, I, P</i>	Initiation
<i>dnaB, C</i>	Helicase at <i>oriC</i>
<i>oriC</i>	Origin of replication
<i>gyrA, B</i>	Gyrase subunits
<i>lig</i>	Ligase
<i>rep</i>	Helicase
<i>ssb</i>	Single-stranded binding proteins
<i>rpoB</i>	RNA polymerase subunit

Ökaryotik DNA sentezi prokaryotik DNA sentezine benzer ancak daha karmaşıktır.

Bakteri ve ökaryotlarda DNA ikili sarmalı replikasyon orijininde açılarak iki replikasyon çatalı meydana gelir ve DNA polimerazın yönlendirdiği sentez, kesintisiz zincirde ve kesintili zincirde çift yönlü olarak devam eder.

Ökaryotik polimerazların DNA sentezi için bakteriyel sistemlerde olduğu gibi;

4 tip deoksiribonuklezit trifosfat

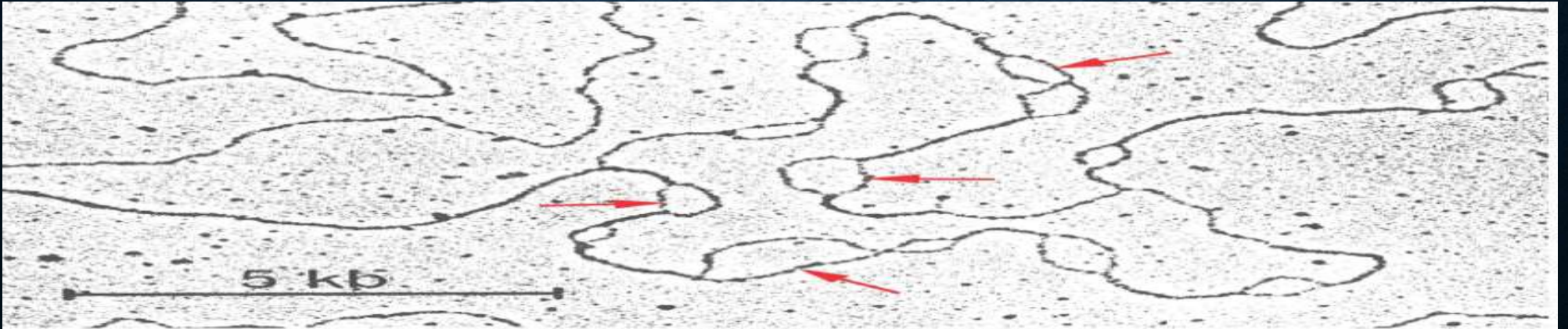
Bir kalıp

Bir primer'e ihtiyacı vardır.

Ancak ökaryotik hücrelerde, hücre başına düşen DNA miktarı daha fazla olduğu için ve bu DNA proteinlerle kompleks yapmış durumda bulunduğu için, bakterilerin karşılaşmadığı sorunlarla yüz yüze gelir.

Çoklu Replikasyon Orijini

Prokaryotik ve ökaryotik DNA replikasyonu arasındaki en belirgin fark, *E. coli* kromozomunda bir replikasyon orijini bulunurken, ökaryotik kromozomda birçok replikasyon orijini bulunmasıdır.



Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Birden fazla replikasyon orijininin bulunması;

1. Ökaryotlarda, bakterilere göre daha fazla DNA vardır.
2. Ökaryotik DNA polimerazın saniyede 50 nukleotit olan sentez hızı, bakteriyel polimeraza göre 20 kat daha yavaştır.

Bu koşullarda, tek bir orijinden başlayan tipik bir ökaryotik replikasyonu ancak bir ayda tamamlanabilecektir.

Mayadan elde edilen replikasyon orijinlerine, **özerk replike olan diziler (Autonomously replicating sequences, ARS)** denir.

ARS'ler sentezin etkin olarak başlamasına katkı sağlayan diğer kısa dizilerin yanında yerleşim gösteren 11 bç'lik birimlerden oluşmuştur.

Polimerazın bu kadar büyük DNA arasından ARS dizilerini nasıl bulduğu ilişkin açıklama; S fazından önce başlayan bir mekanizmanın bulunmasıdır.

Hücre döngüsünün G1 fazı sırasında bütün ARS dizilerine bazı protein grupları bağlanır ve **orijin tanıma kompleksi (origin recognition complex, ORC)** meydana gelir.

ARS dizilerinde yada ORC proteinlerini şifreleyen genlerde herhangi bir mutasyon olursa, DNA sentezinin başlaması gerçekleşmez.

Bu tanıma kompleksleri G1 fazında olduğu ve S fazından önce sentez başlamadığı için, sentezin gerçek başlama sinyalinde yer alan daha başka proteinler de bulunmalıdır.

Bu proteinlerin en önemlileri, **özel kinazlardır**.

Kinazlar, hücre döngüsünün ayrılmaz bir parçası olan fosforilasyonun kilit enzimleridir.

ORC'ye bağlandıklarında, DNA polimerazın bağlanmasına açık olan bir **ön replikasyon kompleksi (pre-RC)** oluşur.

Kinazlar aktive olduklarında, sadece başlama kompleksini tamamlamış olmazlar, aynı zamanda DNA sentezinin tetiğininide çekerler ve her replikasyonda DNA sentezi tamamlana kadar tekrar ön-RC oluşmasını engellerler.

Bu mekanizma önemlidir, çünkü kopyalanması tamamlanan DNA parçasını, kopyalanmamış DNA'dan ayırt eder. Böylece kopyala işlemi düzenli ve etkin biçimde sürdürülür.

Ökaryotik DNA polimerazlar

Enzimin toplam olarak 6 formu saflaştırılıp çalışılmıştır.

Polimerazın DNA'ya bağlanabilmesi için, önce sarmalın topolojisinin değişmesi gerekir.

Orijin bölgesinde sentezin başlaması tetiklenince, ikili sarmal A=T zengin bir bölgeden açılarak helikaz enziminin girişini sağlar.

Helikaz, DNA sarmalını daha da açarak ilerler.

Polimerazın sentezi başlatmasından önce, DNA ile kompleks yapmış olan histon proteinlerinin uzaklaştırılması yada modifikasyonu gerekir.



Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Ökaryotlarda, hücre döngüsünün S fazında yeni histon proteinlerinin sentezi, DNA sentezi ile birlikte gerçekleştirilir.

DNA polimerazlardan üçü (α , δ ve ε) ökaryotik hücrelerde çekirdek DNA'sının replikasyonu için gereklidir.

Diğer ikisinin (β ve ς) (beta ve zeta) DNA tamirinde rol aldığı düşünülmektedir.

Altıncısı ise (γ) mitokondri DNA'sının sentezinde yer alır.

Polimeraz γ , her ne kadar çekirdek genleri tarafından sentezlense de replikasyon işlevi bu organelle sınırlıdır.

TABLE 11.5**PROPERTIES OF EUKARYOTIC DNA POLYMERASES**

	Polymerase α	Polymerase β	Polymerase δ	Polymerase ϵ	Polymerase γ	Polymerase ζ
Location	Nucleus	Nucleus	Nucleus	Nucleus	Mitochondria	Nucleus
3'–5' Exonuclease Activity	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Essential to Nuclear Replication?	Yes	No	Yes	Yes	No	No

Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Çekirdek DNA'sının sentezinin başlatılmasında, polimeraz α ana enzim olarak görülmektedir.

Enzimin 4 alt biriminden ikisi, kesintili ve kesintisiz zincir üzerinde RNA primerinin sentezlenmesinden sorumlu olan primaz olarak işlev görür.

Diğer bir alt birim, eşlenik deoksiribonukleotitleri RNA primerine takarak primeri uzatır.

Böylece, DNA sentezinin ilk evresi başlamıştır.

RNA primerine kısa bir DNA dizisi eklendikten sonra, **polimeraz değişimi** olarak bilinen işlem gerçekleşir.

Polimeraz α kalıptan ayrılır, onun yerini pol. δ alır.

Bu form, “yüksek işlevselliğe” ve hata düzeltme işlevini yapabilmesini sağlayan 3'-5' eksonukleaz aktivitesine sahiptir.

Ayrıca pol. α 'ya göre sentez hızını 100 kez arttırır.

Pol. δ 'nın yönlendirdiği DNA sentezi devam ederken, zincir uzar ve hata onarımı yapılır.

Üçüncü enzim formu olan pol. ε , pol. δ ile aynı özellikleri taşır, ancak değişik hücre koşullarda çalıştığı var sayılmaktadır.

Mayada, pol. ϵ aktivitesini engelleyen mutasyonların ölümcül olması, enzim işlevinin kopyalama sırasında gerekli olduğuna işaret etmektedir.

Ökaryotlarda çok fazla replikon olduğu için bakterilere göre çok daha fazla DNA polimeraz molekülü bulunur.

Ökaryotlarda, bakteriye göre daha fazla sayıda daha küçük replikon bulunması, ökaryotlardaki daha yavaş sentez hızının yaratabileceği sorunları ortadan kaldırır.

Doğrusal kromozomların uçlarının replikasyonu sorunludur.

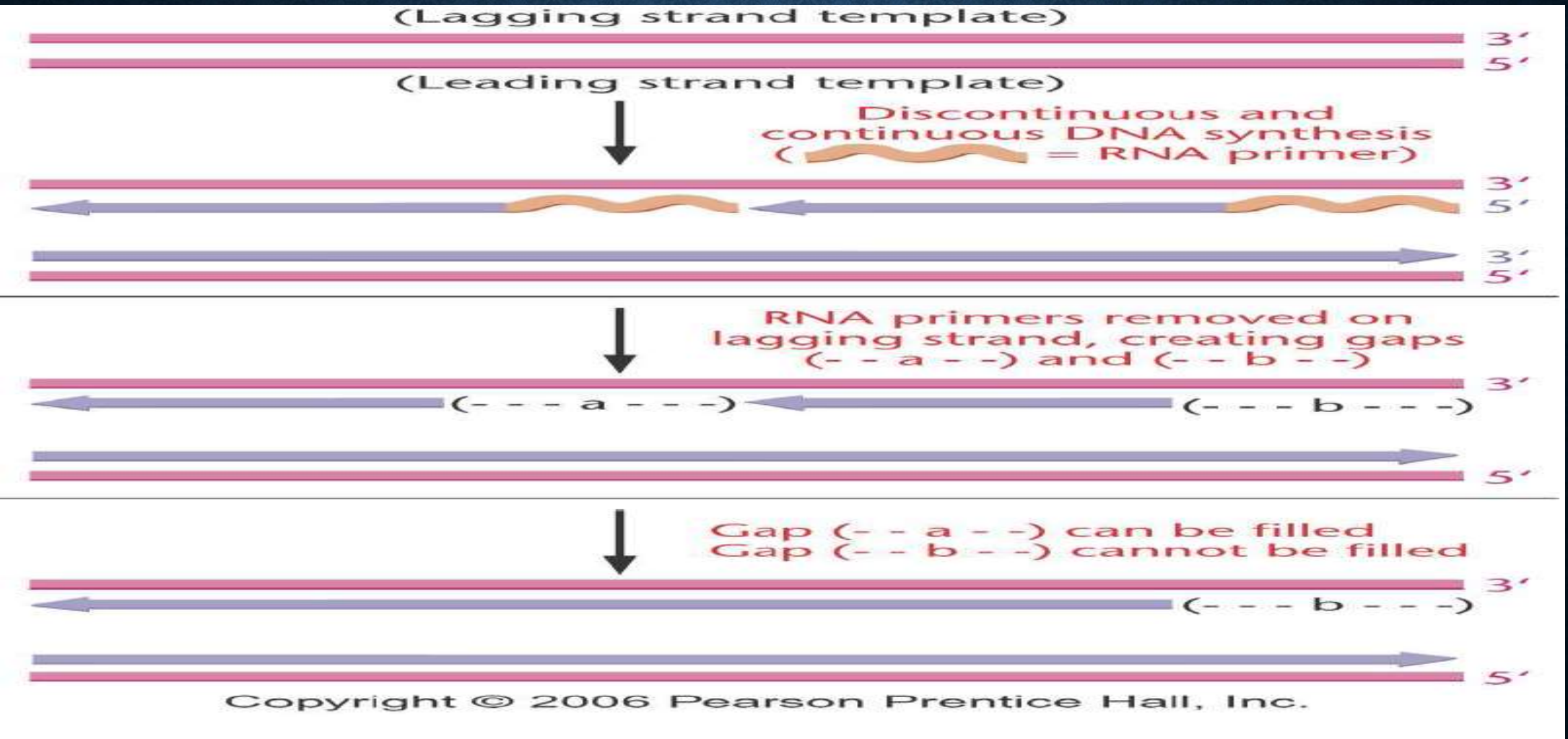
Prokaryotik ve ökaryotik DNA sentezi arasındaki fark, kromozomların yapısı ile ilgilidir.

Bakteri ve fajların çoğunda bulunan kapalı halkasal kromozomların tersine, ökaryotlardaki kromozomlar doğrusaldır.

Replikasyon sırasında kromozomun telomerik bölgesinin bir parçası olan doğrusal kromozom "uçlarında" özel bir sorunla karşılaşır.

Kesintisiz zincirdeki sentez normal olarak kromozom ucuna kadar devam ederken, kesintili zincirde, RNA primeri uzaklaştığında sorun ortaya çıkar.

Kesintili sentez sırasında oluşan 3'-OH grubuna nukleotit ilavesi yapılarak yeni oluşan boşluklar doldurulmalıdır.



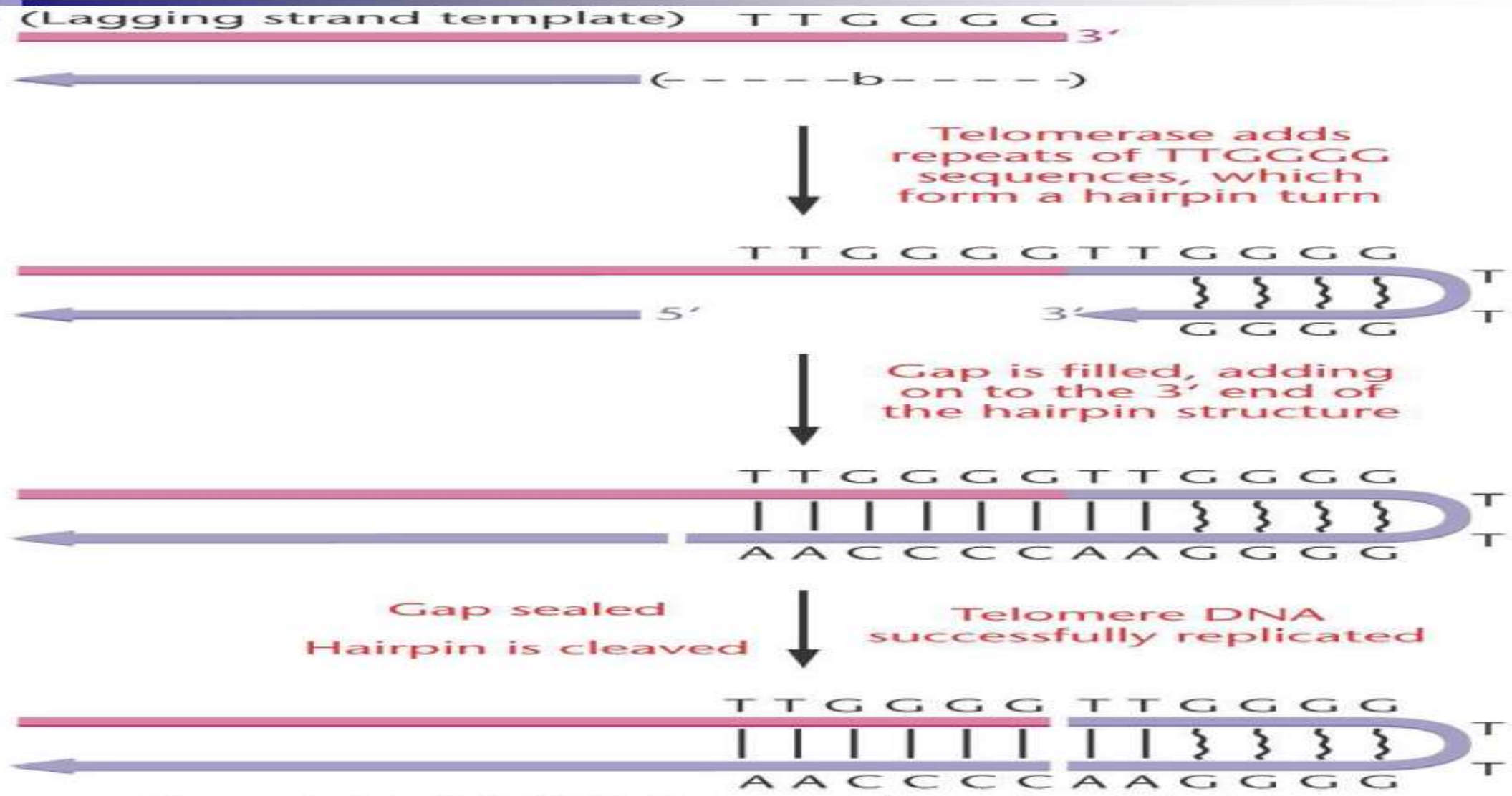
Ancak burası kromozomun ucu olduğu için, 3'-OH grubunu sağlayacak kalıp zincir yoktur.

Dolayısıyla, her sentezin sonunda kromozom, teorik olarak, RNA primerinin boyu kadar kısalacaktır.

Telomeraz olarak adlandırılan enzimin bulunması, daha karmaşık yapıdaki organizmaların bu problemi nasıl çözdüğünün anlaşılmasına olanak sağlamıştır.

Tetrahymena'da telomerlerin çoğu 5'-TTGGGG-3' dizisi ile sonlanır.

Telomeraz, her replikasyon sonrası telomerin kısalmasını önlemek için, TTGGGG tekrar dizilerini yine aynı diziyi içeren kromozom ucuna ilave etmektedir.



DNA'nın ucunda TTGGGG dizisi bulunmasa da enzim yine de bu diziyi kromozomun ucuna eklemektedir.

O halde, TTGGGG, ne bir sinyal nede telomerazın işlev görmesi için gereklidir.

Enzim, yapısında katalitik aktivitesi için gerekli olan kısa bir RNA parçası bulunduran çok özgün yapıda ribonukleoproteindir.

Telomerik DNA dizilerinin evrim sürecinde çok sıkı korunmuş diziler olması, telomerlerin işlevlerinin oldukça kritik olduğunu gösterir.

Telomerin boyunun kısılmasıyla hücre yaşlanmasının moleküler mekanizması arasında bir bağlantı olduğu bilinmektedir.

Ökaryotlarda, somatik hücrelerin çoğunda telomeraz aslında aktif değildir ve bu nedenle, her hücre bölünmesi sonucu kromozomların telomerleri kısalır.

Birçok bölünmeden sonra telomerde ciddi aşınmalar olur ve hücre daha fazla bölünme kapasitesini yitirir.

Diğer yandan kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesi korunmuştur, bu hücreler ölümsüzdür.

DNA rekombinasyonu, replikasyonda olduğu gibi özgül enzimler tarafından gerçekleştirilir.

Önemli oranda DNA dizi homolojisi içeren iki kromozom boyunca eşdeğer pozisyonlardaki genetik değiş-tokuşa, **genel** yada **homolog rekombinasyon** denir.

Homolog rekombinasyon, belirli ortak özelliklere sahip çeşitli modellerle açıklanmaya çalışılmıştır.

Robin Holliday ve Harold L.K. Whitehouse'un 1964'de, bağımsız olarak ortaya koyduğu modellere dayanmaktadır.

Değiş-tokuşun kusursuz olması DNA zincirleri arasındaki eşleniğe bağlıdır.

Süreç, iki eşleşmiş DNA dubleksı yada homologları ile başlar.

Her bir çiftte, aynı pozisyonda endonukleaz aracılığı tek zincirde kırık oluşur (a).

Zincirlerin kesim sonucu ortaya çıkan uçları yer değiştirir ve arkasından diğer dubleksin tamamlayıcı ipliği ile eşleşir (b).

Boşta kalan uçlar ligaz ile birleştirilerek **heterodubleks DNA molekülüleri** adı verilen hibrit çiftler oluşturulur (c).

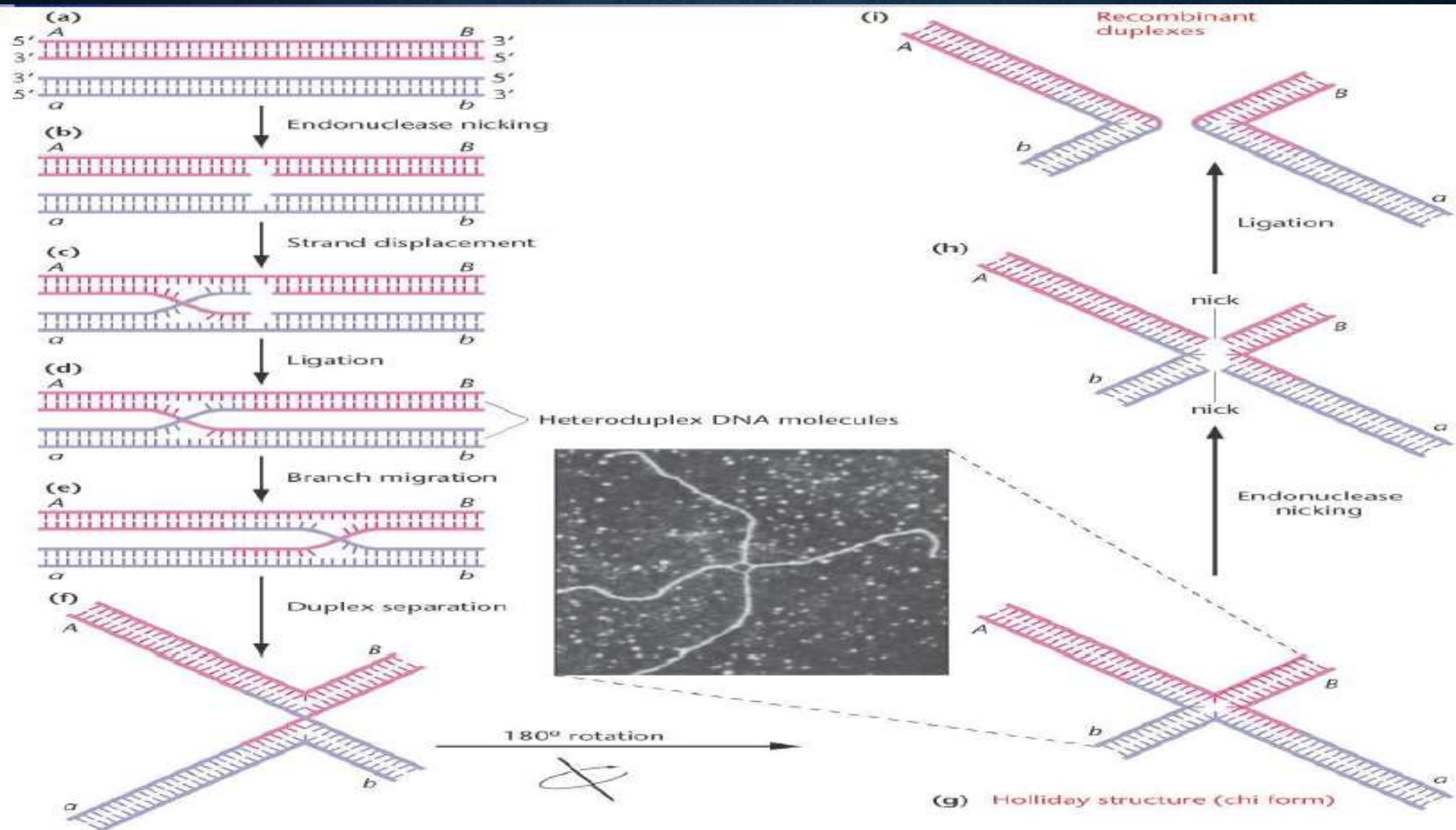
Değiş-tokuş sonucu çapraz köprü yapısı ortaya çıkar.

Çapraz köprünün pozisyonu, dallanma (branch) göçü olarak adlandırılan işlemle kromozom boyunca hareket eder (d).

Bu hareket sonucu her iki homolog üzerindeki heterodubleks DNA'nın uzunluğu artar.

Dubleksler ayrıldığında (f), ve alttaki kısım 180° döndüğünde (g), *ki formu* (chi form) denilen düzlemsel bir ara yapı oluşur ve karakteristik **Holliday yapısı** ortaya çıkar.

Daha önce değiş-tokuşta yer almamış karşı homologlardaki iki zincir endonukleazla kırılırsa (h), ve tekrar birleşme olursa (i), rekombinant dubleksler meydana gelir.



Gen konversiyonu (dönüşümü), DNA'nın rekombinasyonu sonucu ortaya çıkar.

Başlangıçta, Carl Lindegren'in mayada ve Mary Mitchell'in *Neurospora*'da saptadığı **gen dönüşümü** iki yakın bağlantılı gen arasındaki **karşılıklı olmayan (nonresiprokal)** genetik değiş-tokuş olarak adlandırılır.

Örneğin, her biri değişik mutasyon taşıyan iki *Neurospora* suşunu çaprazlarsak ($a+ \times +b$), genler arasındaki karşılıklı (resiprokal) rekombinasyonla $++$ ve ab genotipleri taşıyan spor çiftleri oluşur.

Bunun aksine, tek taraflı değiş-tokuşta bu çiftlerden yalnız biri meydana gelir.

Bu olayların sıklığı öngörülen mutasyon hızına göre daha yüksektir ve dolayısıyla mutasyondan kaynaklandığı söylenemez.

Bunlar, *gen konversiyonu* olarak isimlendirilir, çünkü, genetik değiş tokuşun olduğu yerde bir allel bir şekilde başka bir allele "dönüşmüştür".

Two homologs

