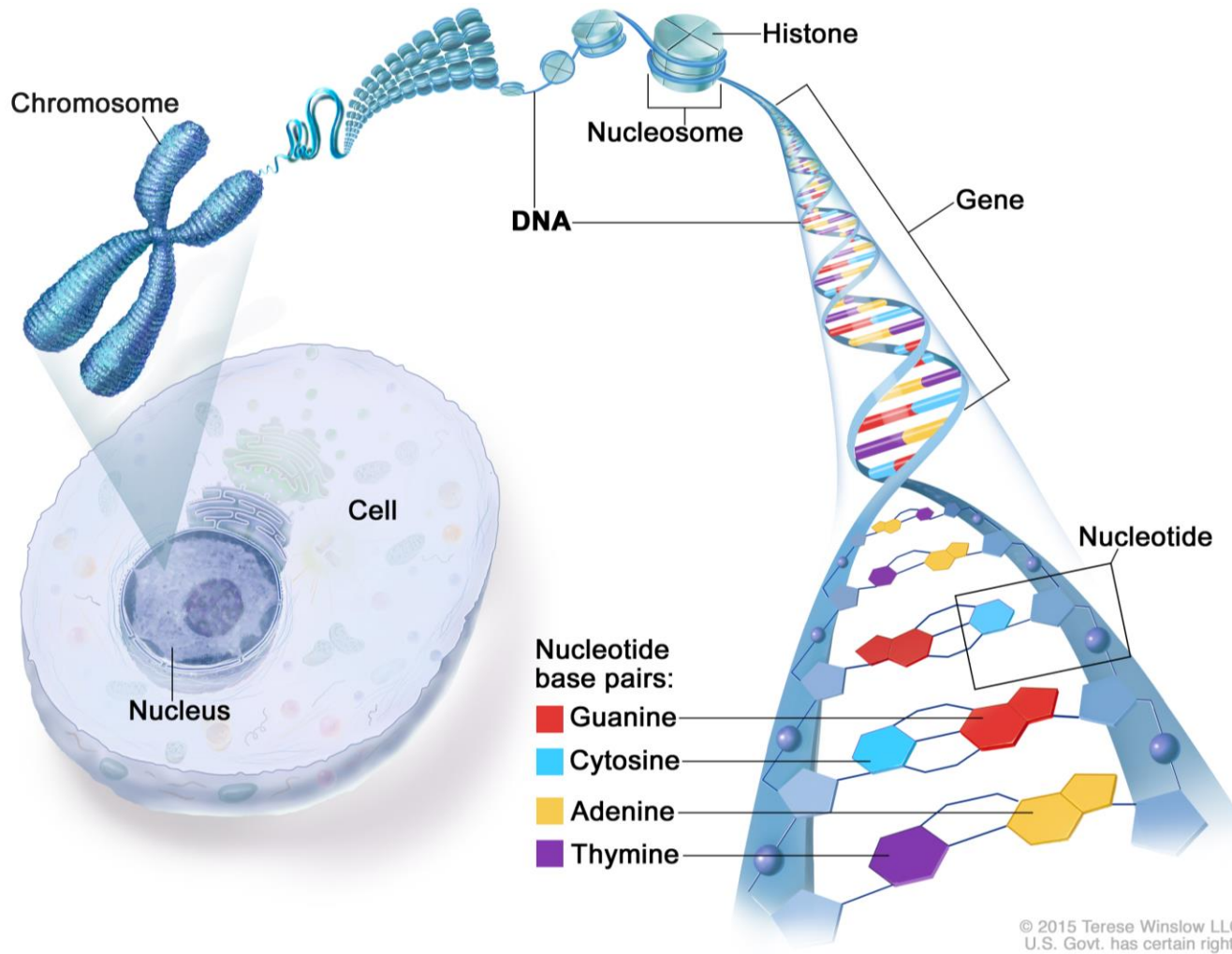




DNA REPLİKASYONU

Doç.Dr.TUĞBA YILMAZ ÖZDEN

- Canlılarda DNA ve RNA olmak üzere kimyasal yapıları bakımından farklı iki nükleik asit vardır.
- DNA, genetik bilginin depolanmasında
- RNA, DNA'da depolanmış genetik bilginin protein sentezine dönüşmesinde kullanılmaktadır.
- DNA,
 - ökaryotik hücrelerin kromozomlarında, mitokondrilerinde ve bitkilerin kloroplastlarında
 - prokaryotik hücrelerin kromozomlarında bulunur. (Ayrıca prokaryotik hücrelerin sitozolünde kromozom yapısında olmayan **plazmid** olarak adlandırılan DNA vardır.)



- Ökaryotta, proteinlere bağlı olarak bulunan DNA, bu proteinlerle birlikte kromatini oluşturur.

DNA sentezi (replikasyon)

Replikasyon; DNA molekülünün kendi kopyasını yaparak miktarını iki katına çıkarmasına denilir.

DNA çift heliksini oluşturan iki zincir birbirinden ayrıldığında, bu zincirlerden her biri sentezlenecek yeni zincir için kalıp olarak kullanılır.

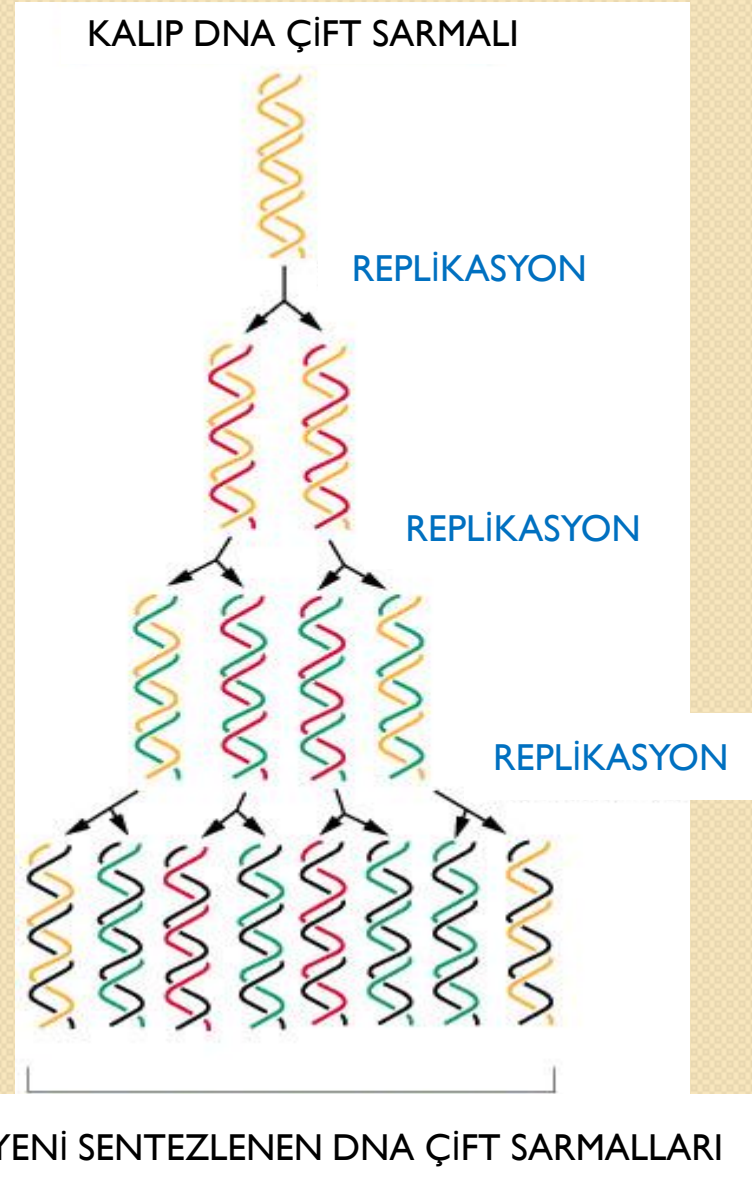
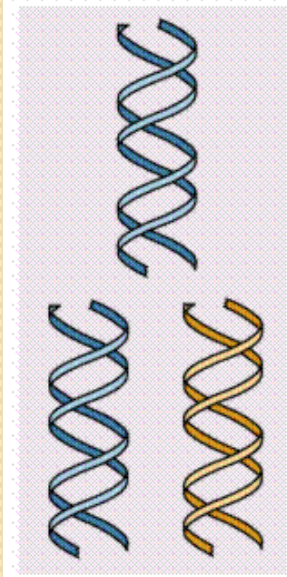
Yeni zincirler, kalıp zincirin tamamlayıcısı (komplementer) olarak sentezlenir ve bu işlem **semikonservatif replikasyon** (yarı tutucu) olarak tanımlanır.



SEMİKONSERVATİF REPLİKASYON

Yeni sentezlenen çift sarmallarda biri eski (kalıp DNA'dan gelen), bir de yeni sentezlenmiş sarmal bulunur.

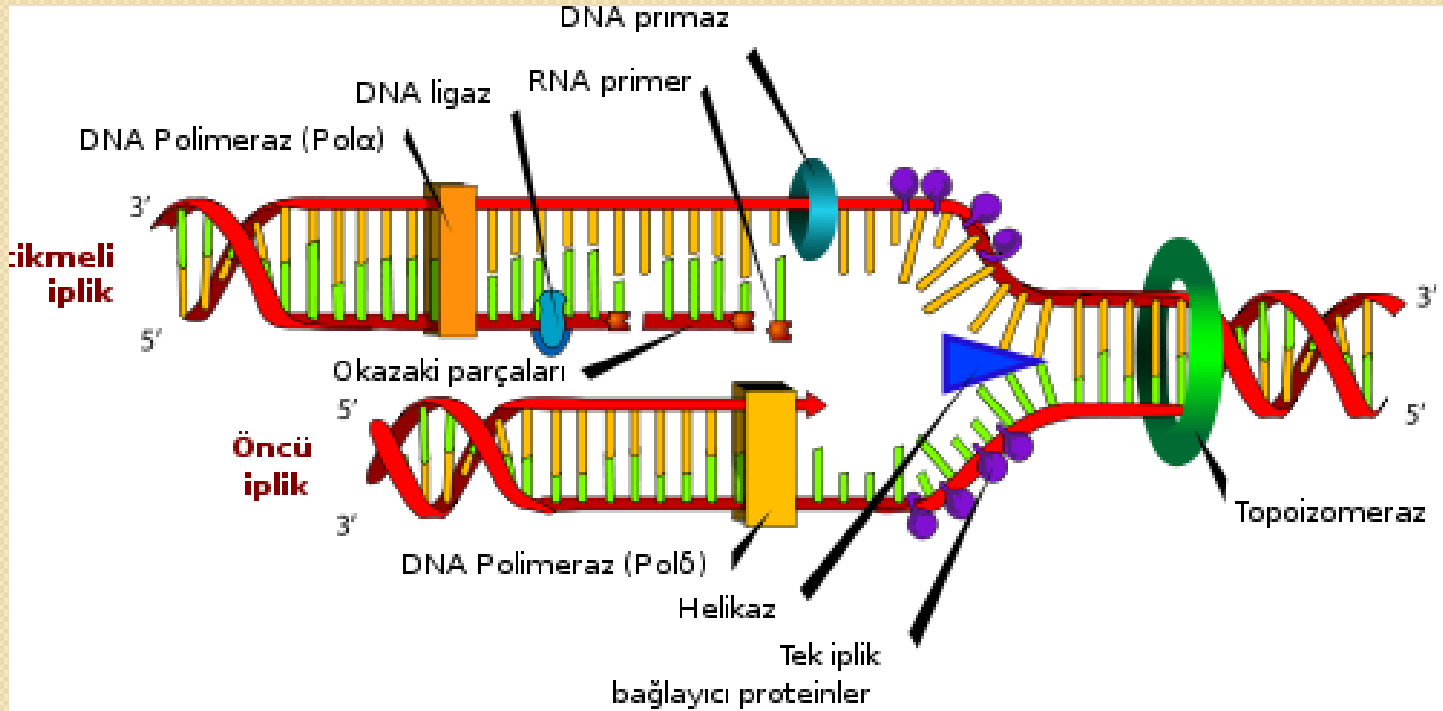
KONSERVATİF REPLİKASYON



Ökaryotlarda, prokaryotlara oranla DNA replikasyonu daha karmaşık olmasına rağmen, temelde aynı mekanizmalarla gerçekleşmektedir.

Replizom; DNA replikasyonunda görev alan enzim ve proteinlerin tümü replizom olarak adlandırılır.

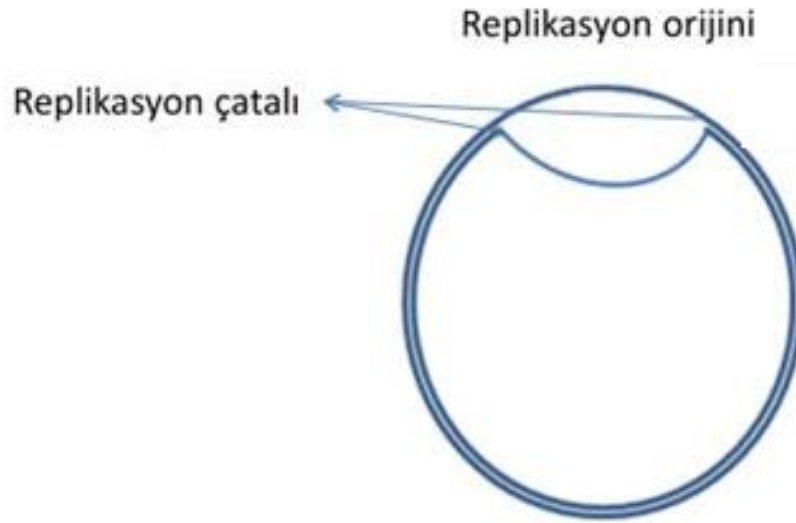
Bir prokaryot olan *E. coli* replikasyonunda 20'den fazla enzim ve protein görev almaktadır.



PROKARYOTİK DNA REPLİKASYONU

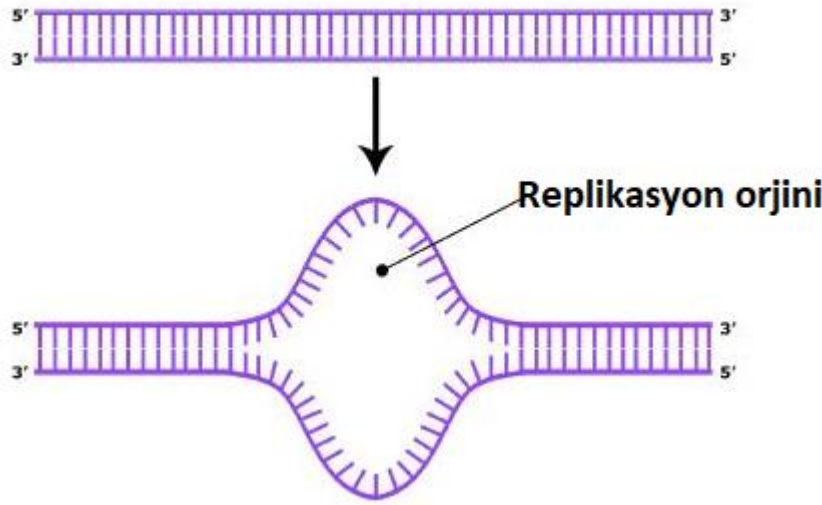
I. BASLAMA

Komplementer DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması



Çift heliks yapısındaki DNA'nın replikasyona uğraması için önce birbirine sarılmış zincirlerin ayrılması gerekmektedir.

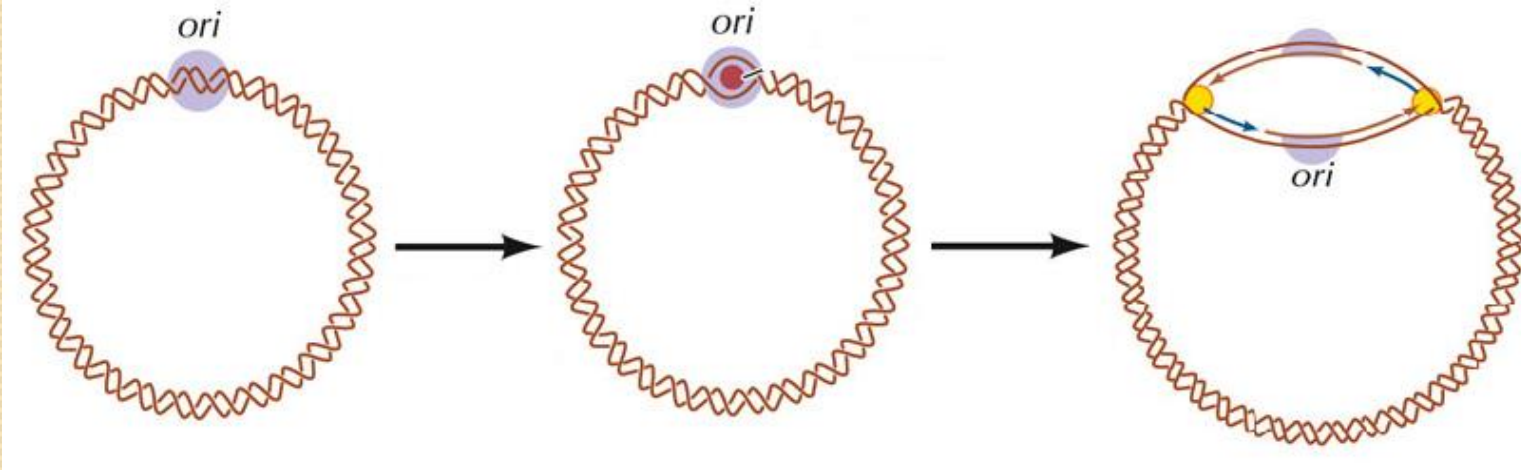
DNA polimerazlar sadece tek zincirli DNA'yı kalıp olarak kabul eder.



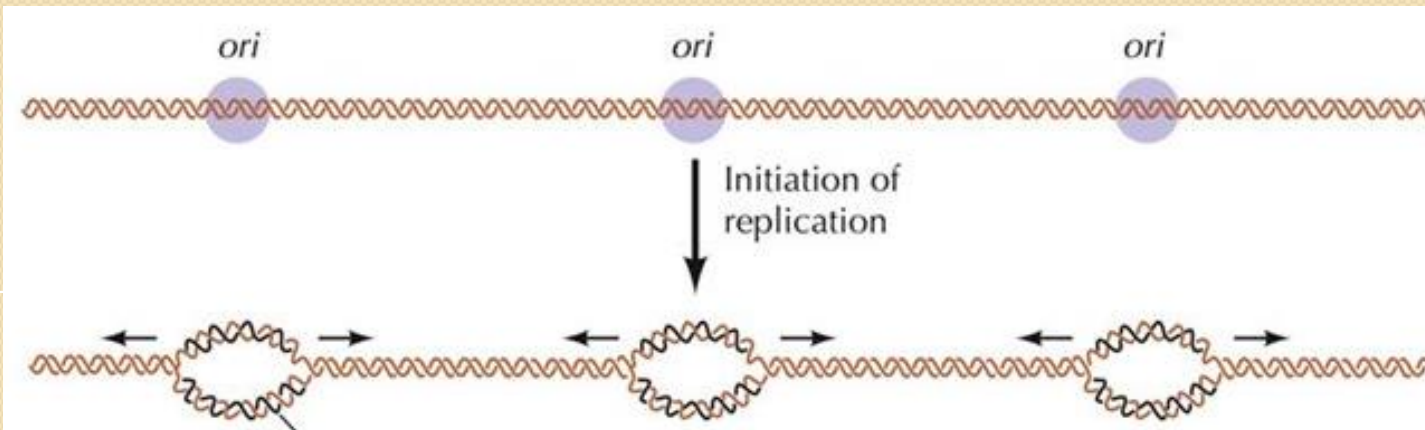
Prokaryotlarda DNA replikasyonu tek bir bölgede ve belirli bir nukleotid dizisinde başlar, bu bölgeye **replikasyon orjini** denilir. İki zincir ters yönde dönerek ayrıldıkları zaman **replikasyon çatalı** denilen 'V' şekilli bir yapı ortaya çıkar. Sentez bu bölgede başlar.

Replikasyon ilerledikçe DNA molekülü boyunca replikasyon çatalı da ilerler.

- **Prokaryotlarda replikasyon, dairesel DNA'da tek ve belirli bir nukleotid dizisinde başlar.**



- **Ökaryotlarda replikasyon, DNA heliksi boyunca birçok orjinde birden başlar.**

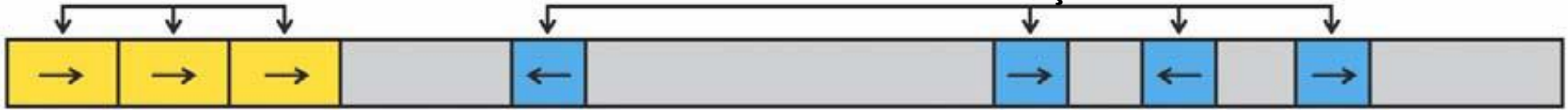


Prokaryotlarda DNA replikasyonunun başladığı yer 245 baz çifti içeren **oriC** (origin of chromosomal replication) bölgesidir.

Üç tane 13 baz çifti tekrarı

DnaA proteinleri için bağlanma bölgesi

Dört tane 9 baz çifti tekrarı



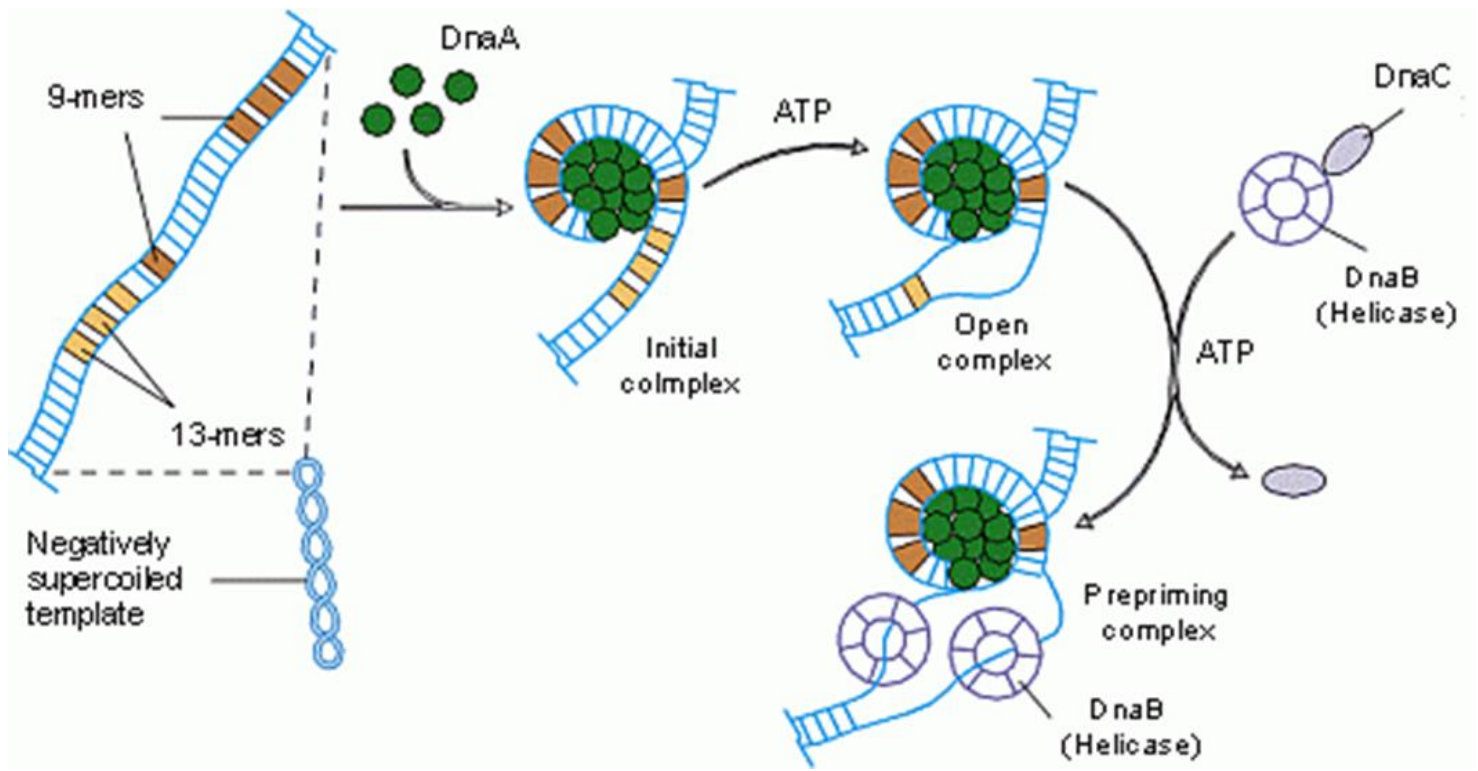
Konsensus dizileri
GATCTNTTNTTT

Konsensus dizileri
TTATCCACA

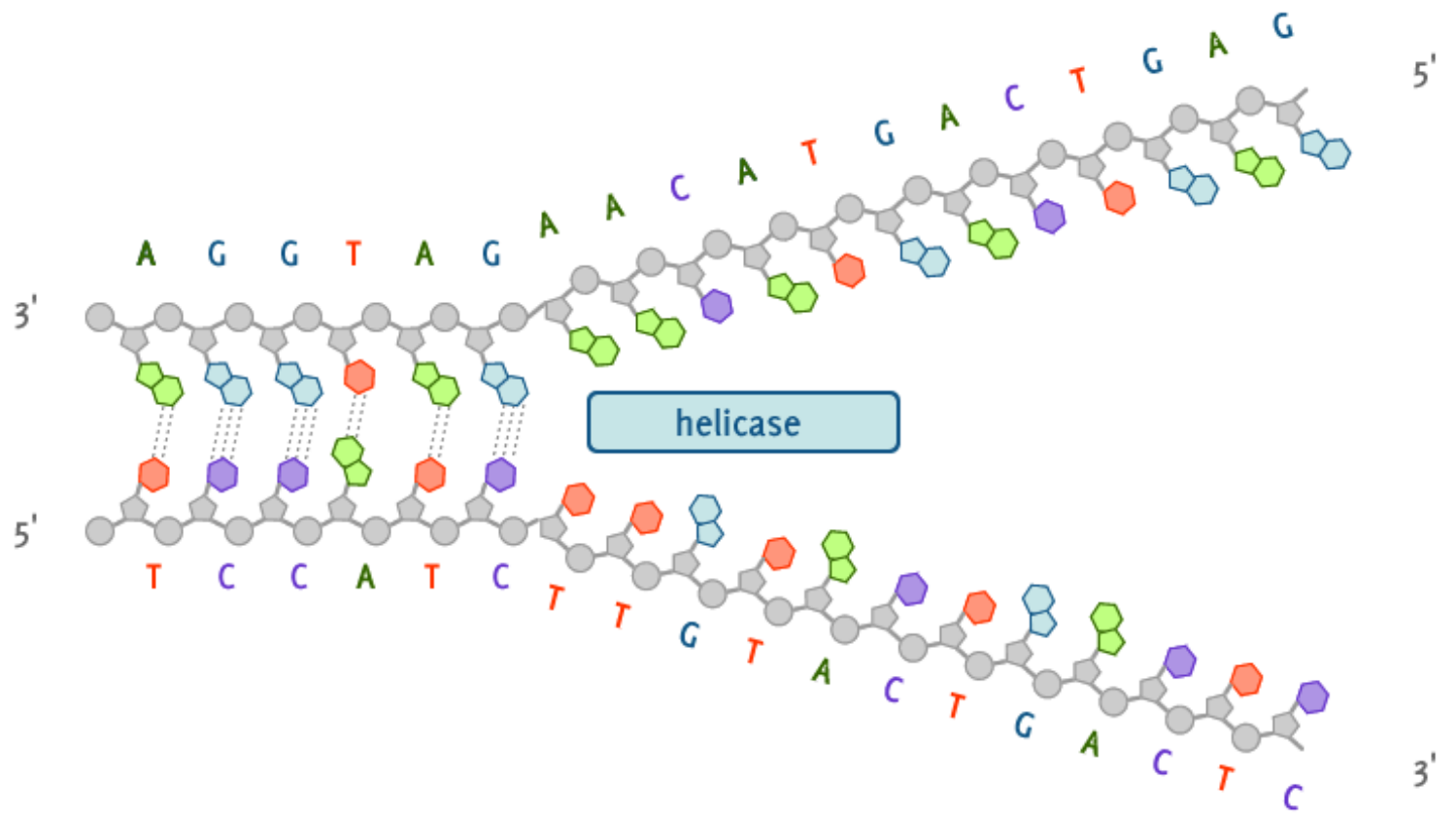
DNA sarmallarının ayrılması için proteinlere gereksinim vardır.

OriC bölgesindeki 9 baz çiftinin 4 kez tekrarlandığı bölgeye 20 **DnaA protein**inin bağlanmasıyla replikasyon başlar.

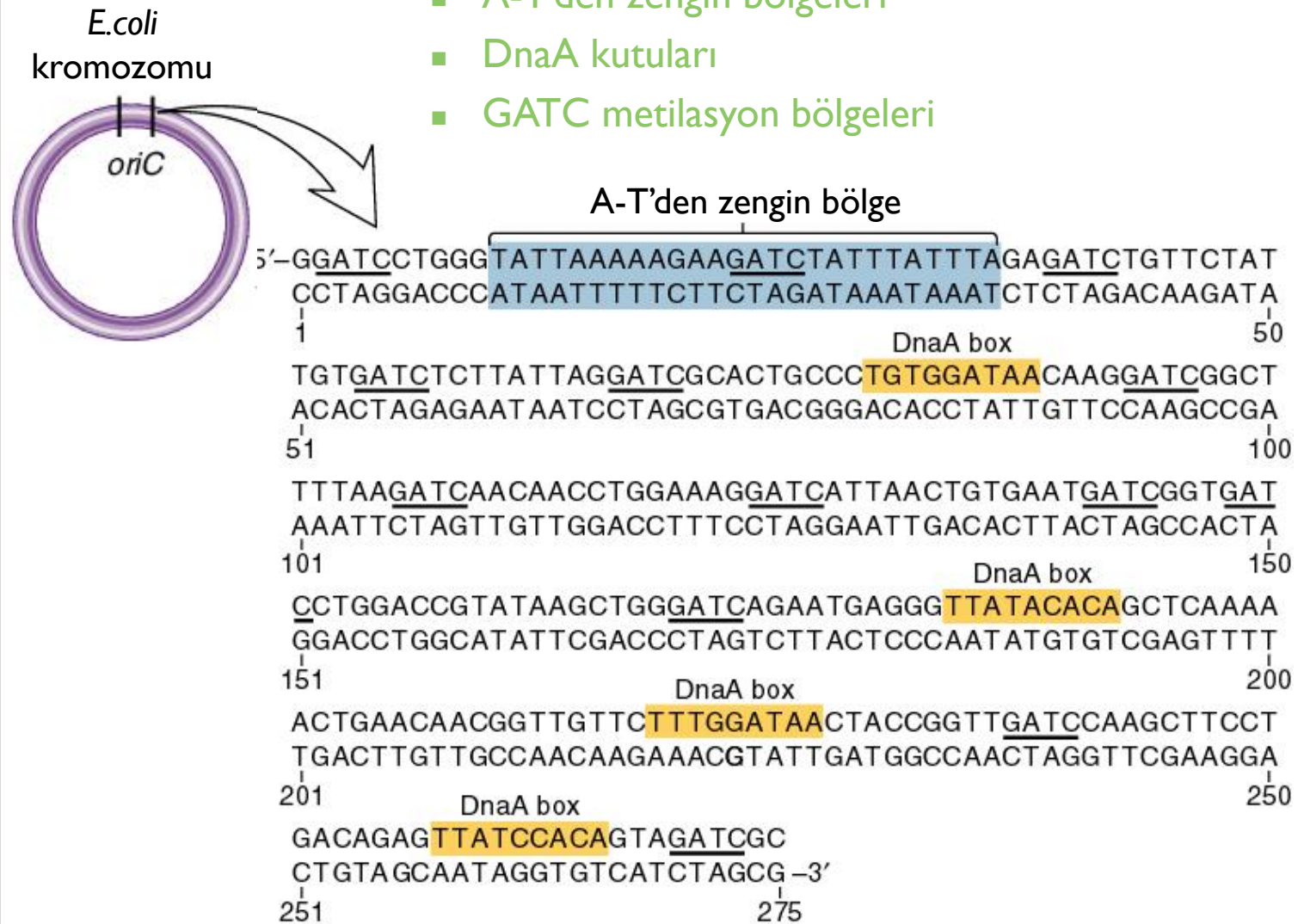
Bu bağlanma **histon benzeri protein** ve **ATP** varlığında gerçekleşir. DnaA proteini etrafında katlanan DNA denatürasyona uğrar.



- OriC'deki 13 baz çiftinin 3 kez tekrarlandığı A=T'den zengin bölgeye bir helikaz olan **DnaB proteininin (DNA helikaz)** bağlanması DNA çift sarmalının açılmasını sağlar.
- DnaB proteininin bağlanması için **ATP** ve **DnaC proteini** gereklidir.



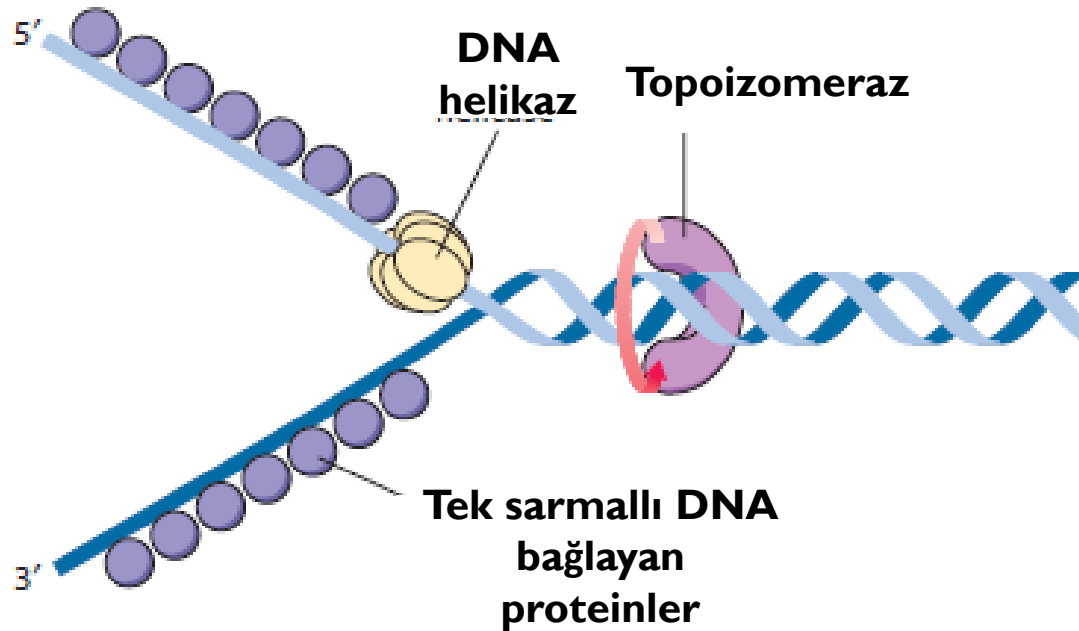
- oriC'de üç fonksiyonel DNA dizisi önem taşımaktadır
 - A-T'den zengin bölgeleri
 - DnaA kutuları
 - GATC metilasyon bölgeleri



Tek sarmallı DNA bağlayan (TSB) proteinler; Çift heliks yapısındaki DNA'nın tek zincirine bağlanır. DNA zincirlerini birbirinden ayrı tutarak tekrar bir araya gelmelerini önler.

TSB proteinlerinin bağlanmaları kooperatiftir. Yani bir molekül TSB proteini bağlandıktan sonra diğer TSB proteinlerinin bağlanmaları kolaylaşmaktadır.

Bu proteinler ayrıca DNA'nın tek zincirini parçalayan nükleazların etkisini önler.





Çift heliksi oluşturan sarmalların birbirinden ayrılması replikasyon çatalının önünde pozitif kıvrılmalar (süperkoiller) oluşmasına yol açar. Bu kıvrımların birikmesi çift heliksin açılımını zorlaştırır.

DNA topoizomerazlar (DNA giraz) oluşan süperkoillerin uzaklaştırılmasını sağlar.

Tip I ve Tip II DNA topoizomerazlar bulunur.

Kinonlar, bakteriyel tip II topoizomeraz'a karşı kullanılan antimikrobiyal bir ajandır.

Topotecan, kanser tedavisinde kullanılan topoizomeraz I inhibitörü olan bir kemoterapötik ajandır.

II. UZAMA

• DNA polimerazlar;

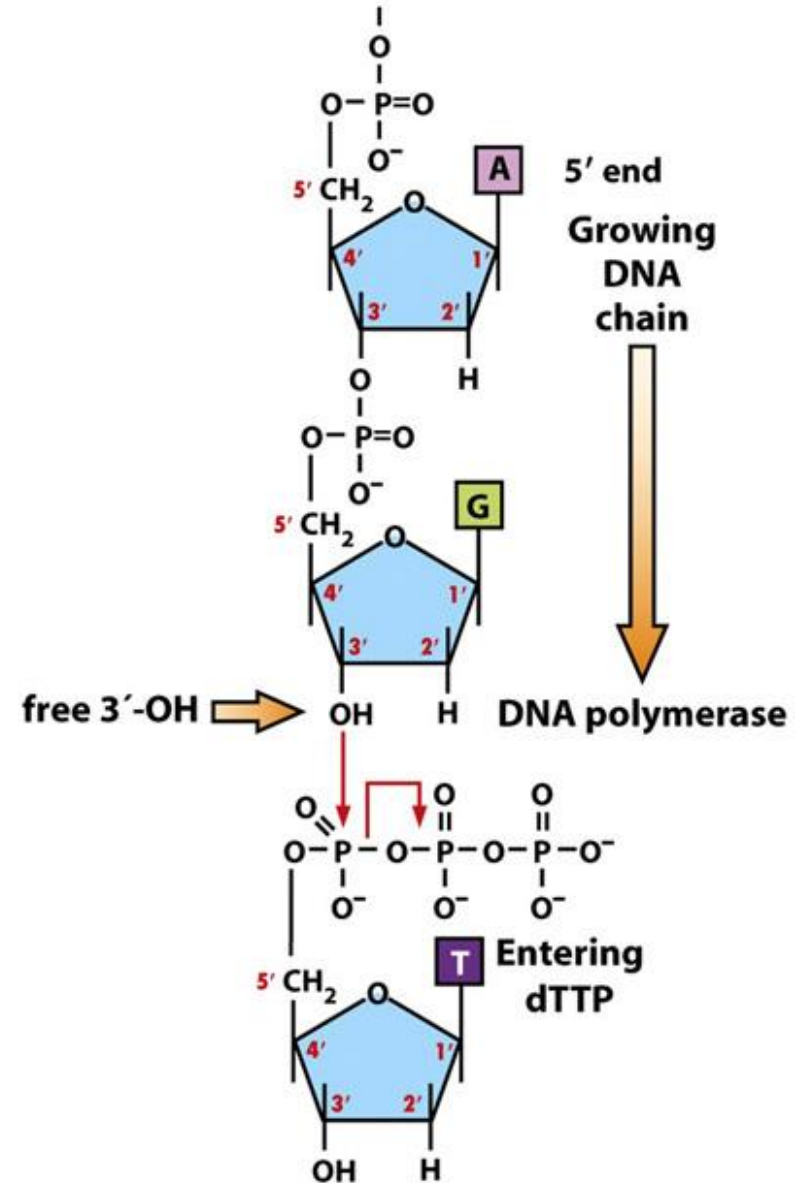
DNA zincirinin uzamasından sorumlu olan enzimlerdir.

Farklı DNA polimerazlar bulunmaktadır. (DNA polimeraz I-V)

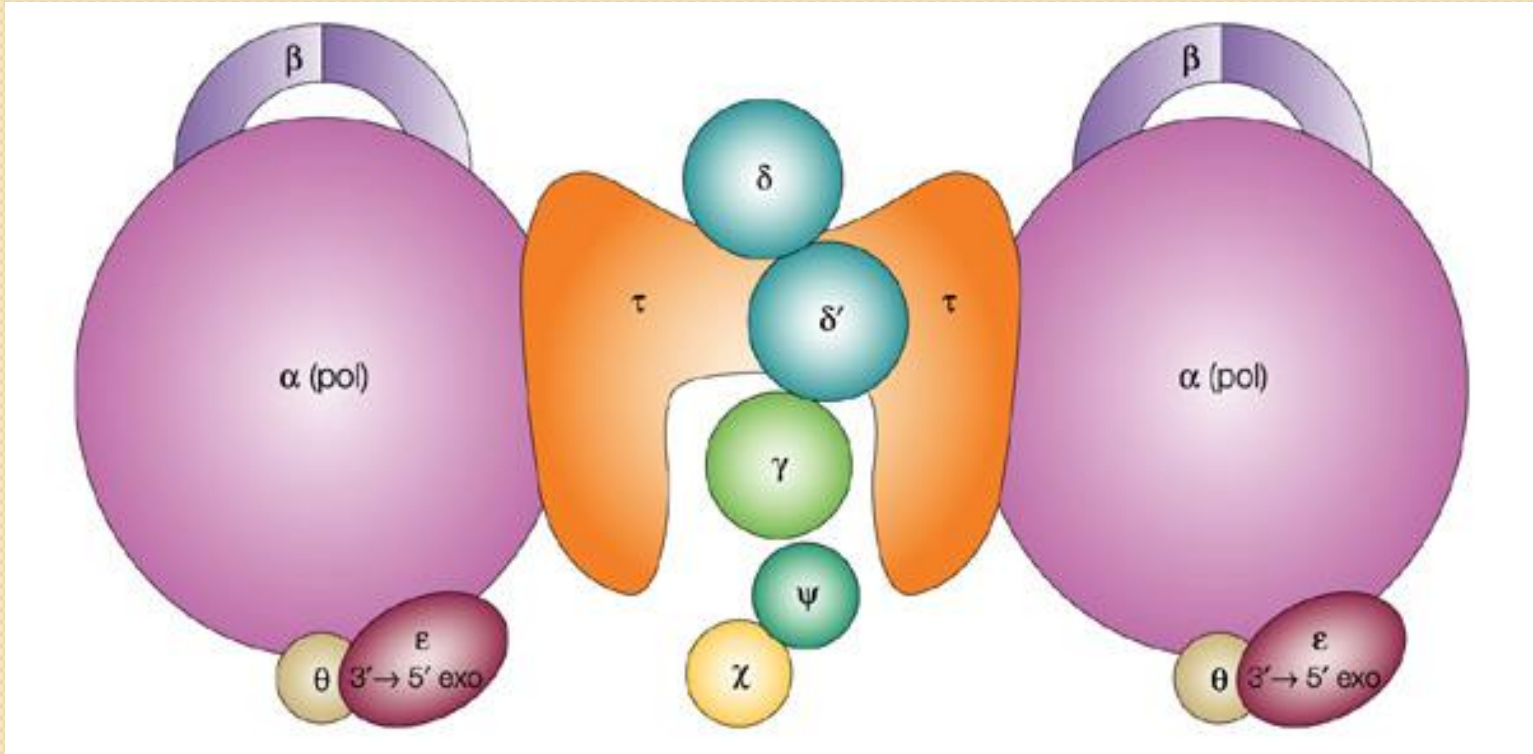
Prokaryotik ve ökaryotik

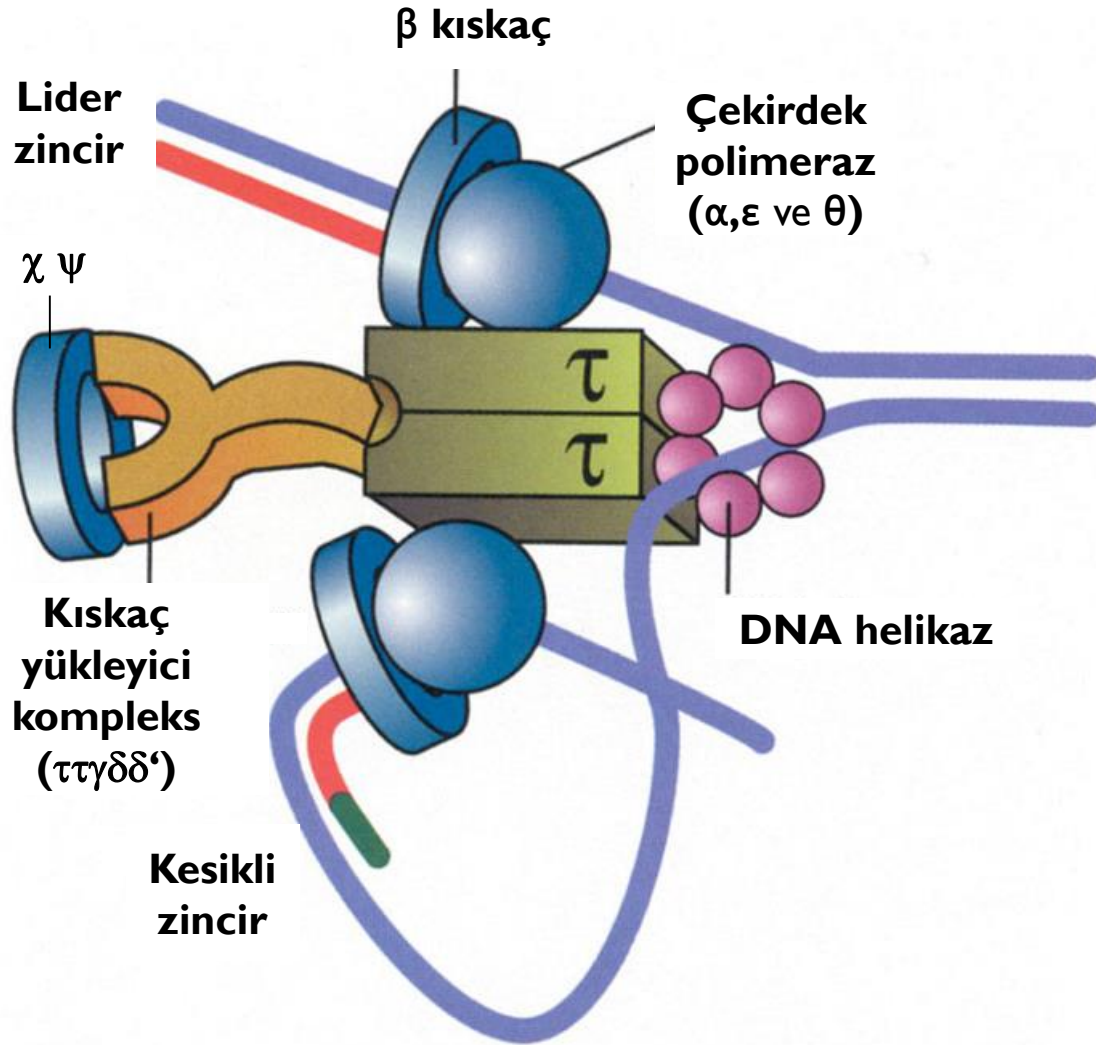
DNA polimerazlar

uzamakta olan yeni zincirin 3' ucuna her seferinde bir tane olmak üzere deoksiribonukleotidleri ekleyen enzimlerdir.



- **DNA polimeraz III**, DNA sentezinde rol oynayan en önemli enzimdir. Asimetrik dimer yapısındadır. Bu yapısı, her iki kalıp DNA zincirinin aynı anda ve aynı yerde replike olmasını sağlamaktadır.



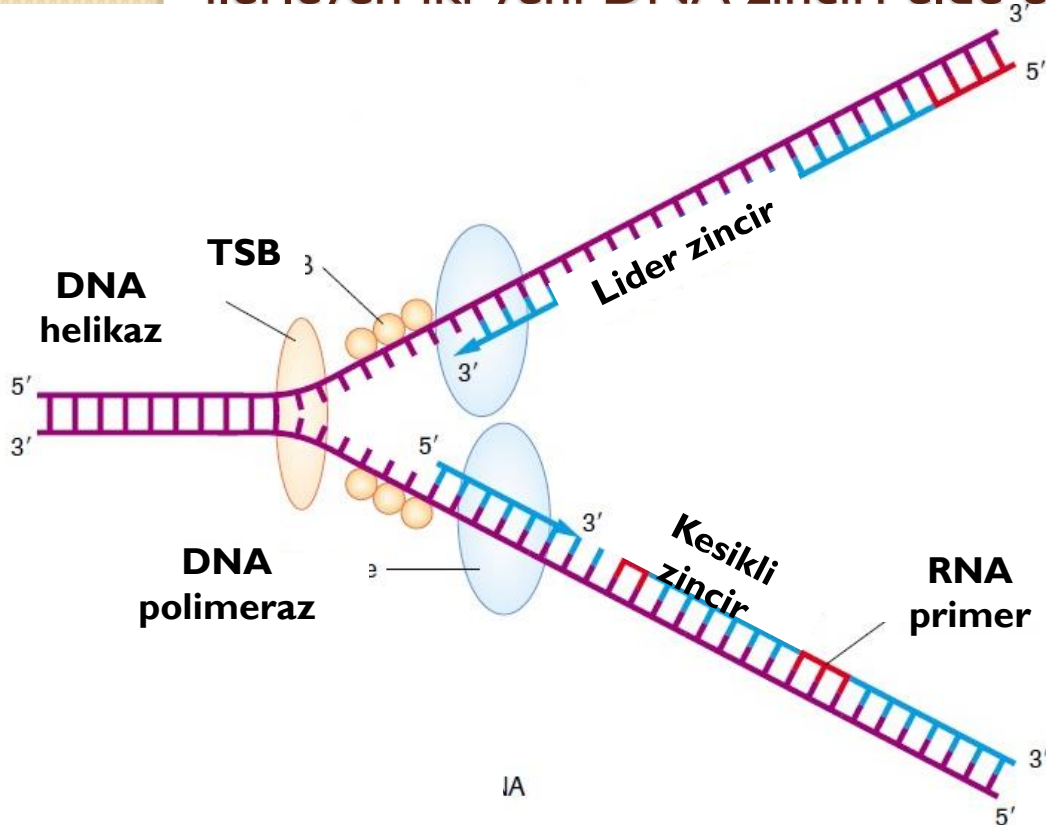


- α, ϵ ve θ alt birimleri enzimin çekirdek kısmını oluşturur (**çekirdek polimeraz**).
- α alt birimi, **polimeraz** aktivitesinden sorumludur.
- ϵ alt birimi, sağlamalı okuma (**proofreading**) aktivitesinden ($3' \rightarrow 5'$ ekzonükleaz) sorumludur.
- Kıskaç yükleyici kompleks ($\tau\gamma\delta\delta'$), çekirdek polimerazları birbirine bağlar.
- χ (chi) ψ (psi) alt birimleri de kıskaç yükleyici komplekse bağlanır.
- β dimeri, bir kıskaç gibi davranarak DNA polimeraz III'ün DNA'dan ayrılmasını önler ve böylece enzimin verimliliğini artırır.

DNA replikasyonunun yönü

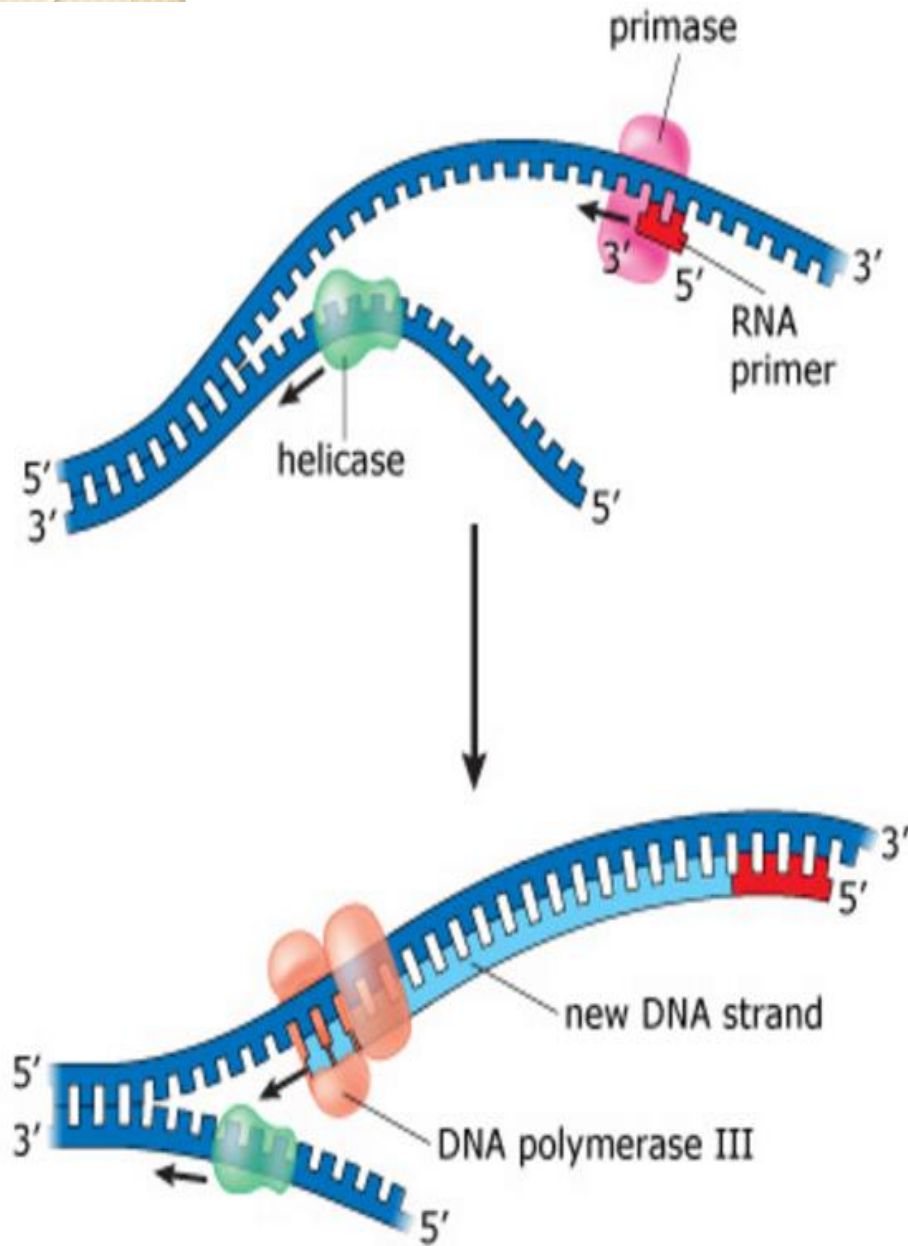
Replikasyon kromozom boyunca her iki yönde meydana gelir ve zincirlerin her ikisi aynı zamanda replike olurlar.

DNA polimeraz, kalıp zincirdeki nukleotid dizilerini sadece **3'→5'** **yönünde** okuyabildiğinden buna komplementer yeni DNA zincirini **5'→3'** **yönünde** sentezlemektedir. Böylece kalıp DNA'dan biri replikasyon çatalına, diğeri replikasyon çatalından uzağa doğru ilerleyen iki yeni DNA zinciri elde edilir.



1- Lider zincir); ilerleyen replikasyon çatalı ile aynı yönde, kesintisiz olarak 5' →3' yönünde sentezlenir.

2- Kesikli zincir; replikasyon çatalının ters yönünde, aralıklı olarak küçük DNA parçaları halinde sentezlenir. Bu küçük DNA parçalarına **okazaki parçaları** adı verilir.



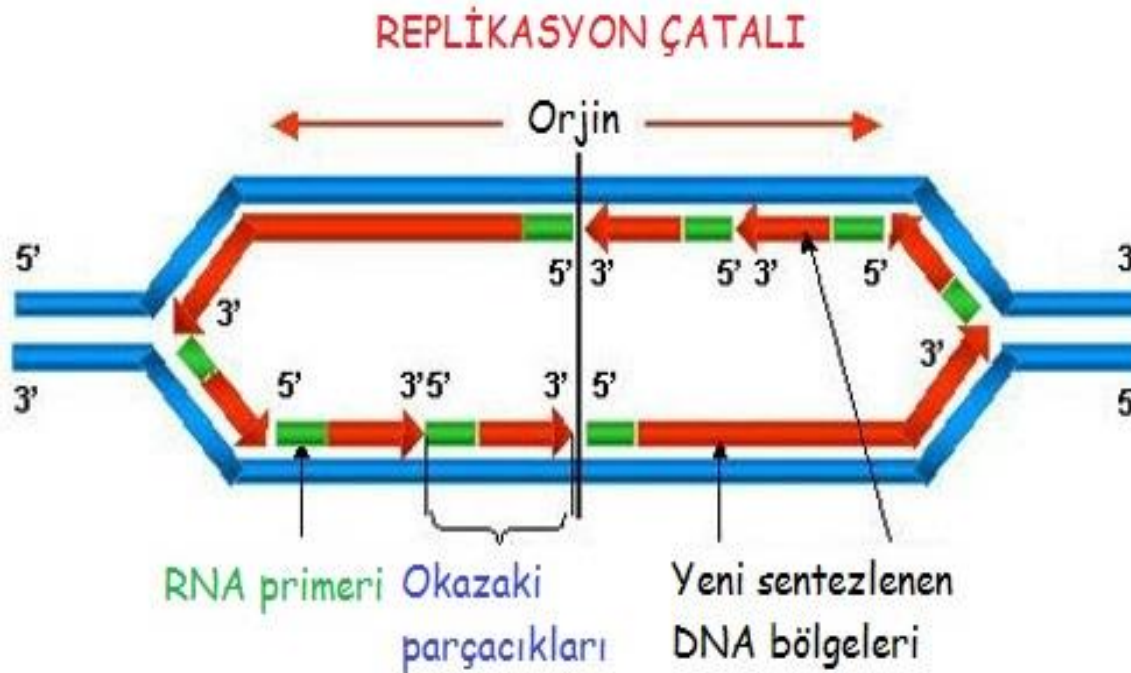
RNA Primeri sentezi

DNA polimerazın, kalıp DNA'ya komplementer yeni DNA sentezini başlatabilmesi için bir '**RNA primer**' e gereksinimi vardır.

Primer,

- Kalıp DNA'ya komplementer ve antiparalel RNA parçasıdır. U, A ile G ise C ile eşleşmiştir.
- Özgün bir RNA polimeraz olan **primaz** (Dna G proteini) tarafından sentezlenir.
- Yaklaşık 10 nukleotidden oluşur.

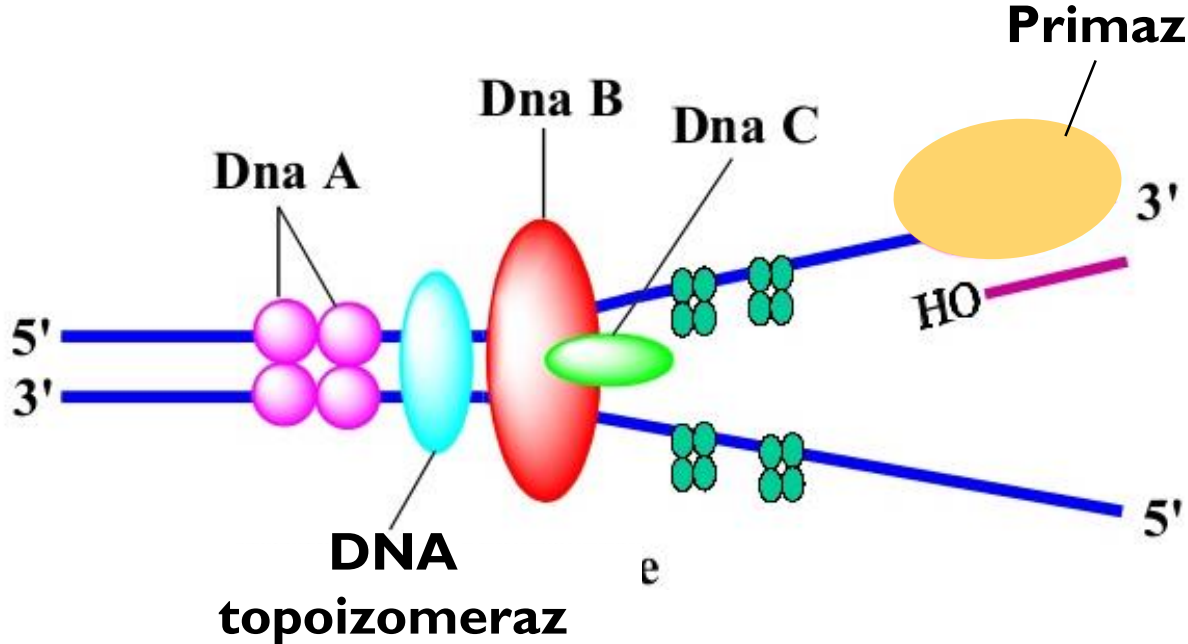
- Lider zincirde; genellikle sentezin başında **tek bir primer**,
- Kesikli zincirde; belli aralıklarla (her okazaki parçasının başında) RNA primeri kullanılır.



DNA replikasyonu, primerin 3'-hidroksil grubuna DNA polimeraz tarafından bir nükleotidin bağlanması ile başlar.

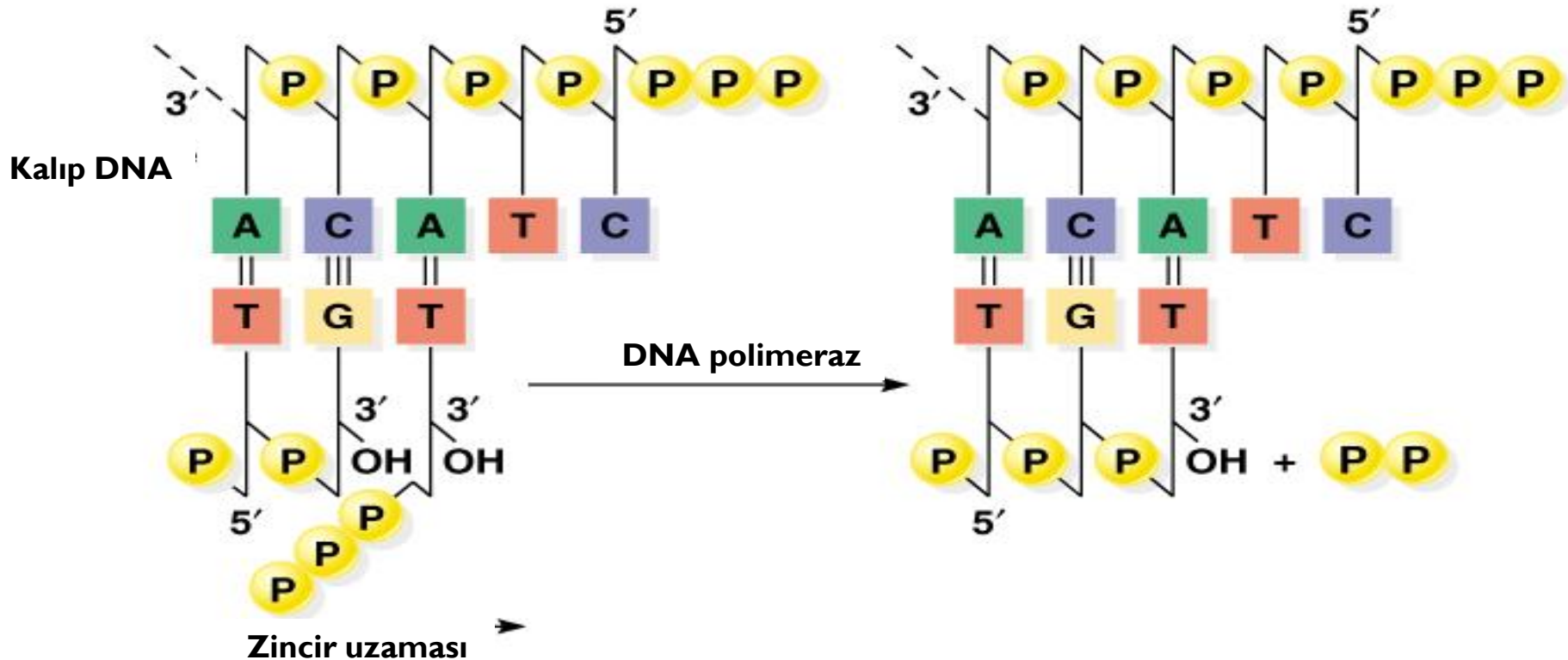
Primozom

RNA primeri sentezi başlamadan önce bir araya gelen çeşitli proteinler (DnaB, DnaC gibi) DNA zincirine bağlanarak **primaz** ile birlikte **primozom** denilen protein kompleksini meydana getirir. Kalıp DNA üzerinde belli aralıklarla yerleşmiş özgün nükleotid dizileri **primozom** tarafından tanınarak, bu bölgelerde bir sonraki **okazaki parçası** için **primer** sentezi gerçekleştirilir.



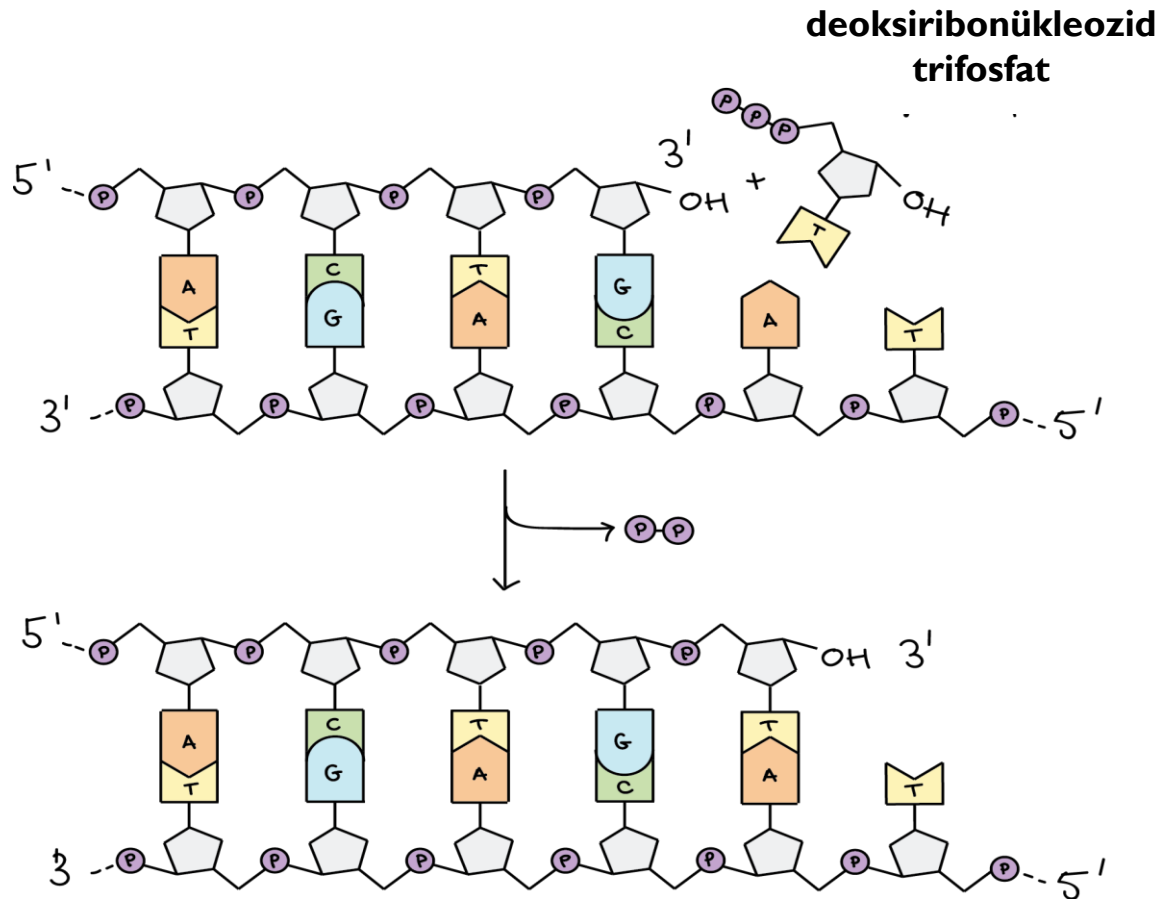
DNA zincirinin uzaması

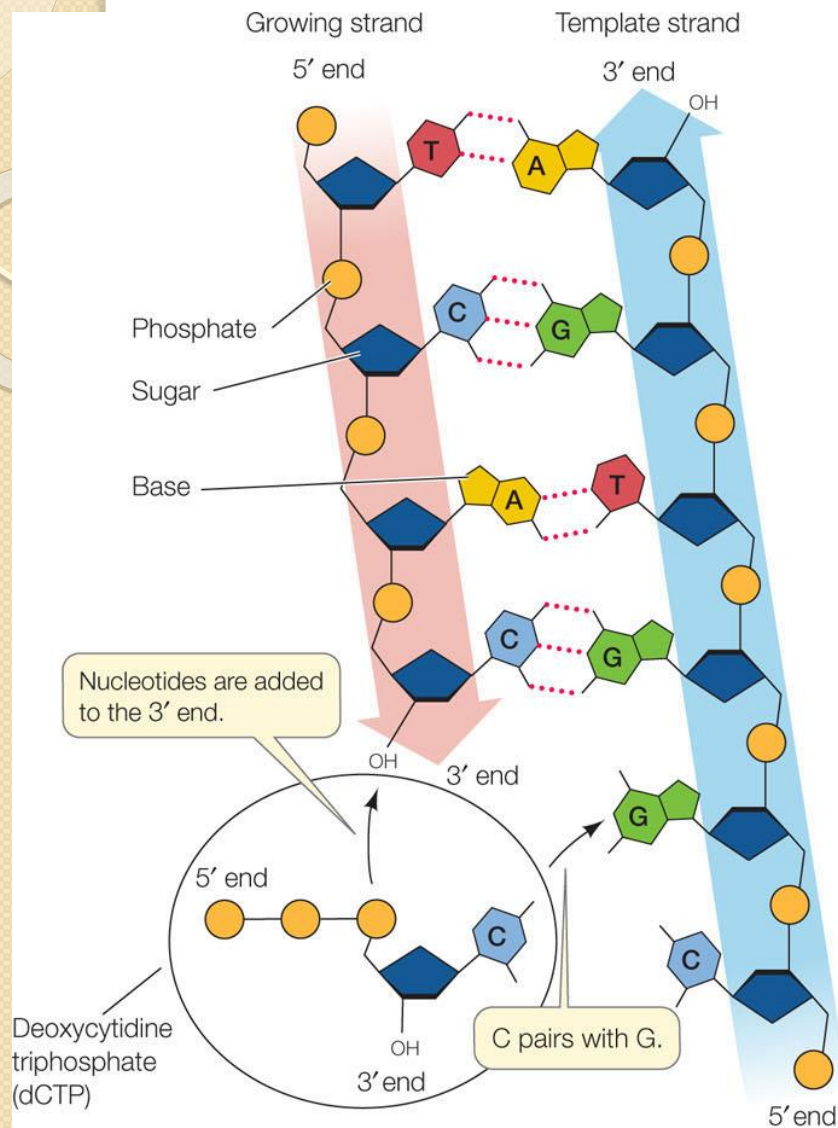
- DNA polimeraz III, RNA primerin serbest olan 3'-OH grubuna kalıp zincirdeki nükleotide komplementer ilk deoksiribonükleotidi ekler.
- Daha sonra DNA polimeraz III, kalıp zincire komplementer olan deoksiribonükleotidleri **fosfodiester bağları** ile bağlayarak yeni zincirin 5' → 3' yönünde uzamasını sağlar (5'→3' polimeraz aktivitesi).



DNA polimeraz, yapı taşları olarak deoksiribonükleozid trifosfatlar (**dATP, dTTP, dCTP, dGTP**) kullanılır.

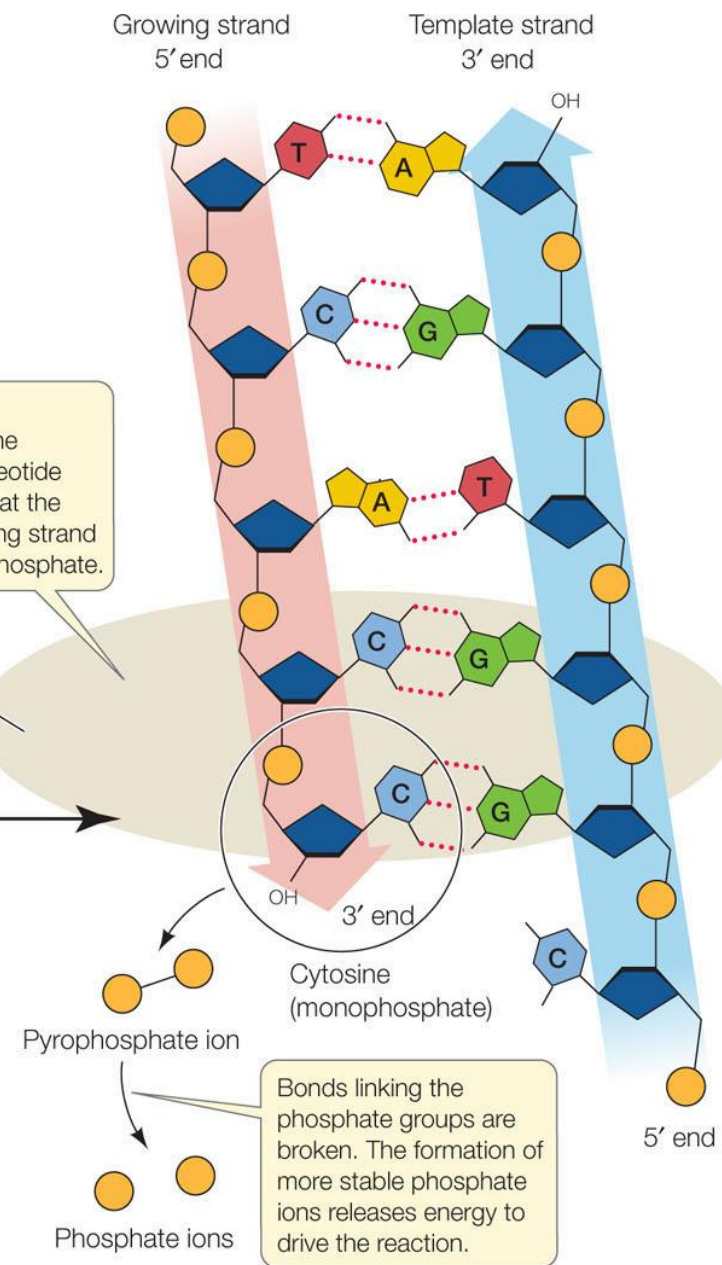
Uzayan zincire her yeni nükleotid eklendiğinde bir pirofosfat (PPi) açığa çıkar.

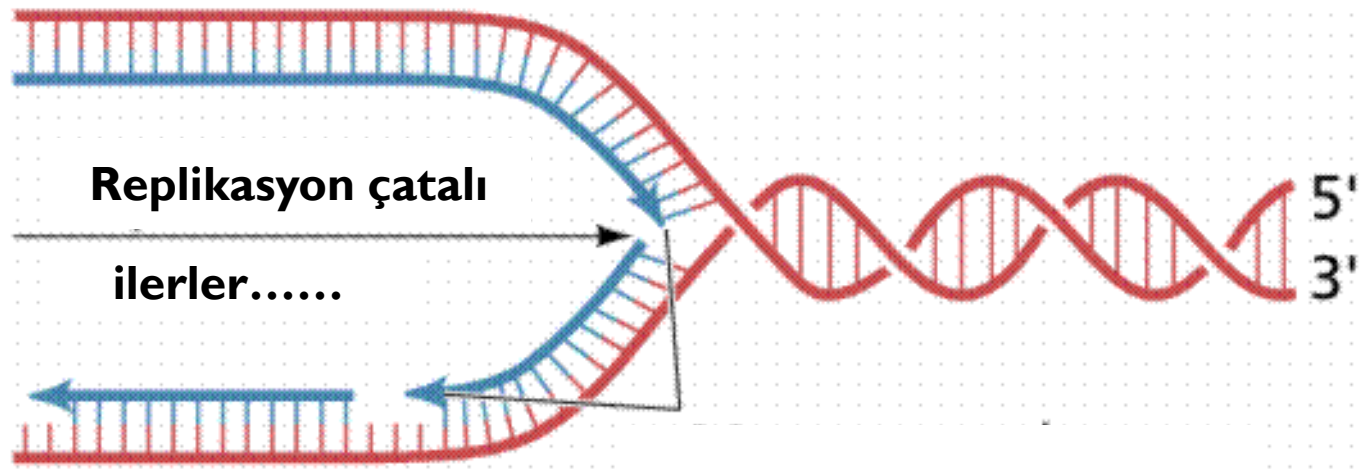




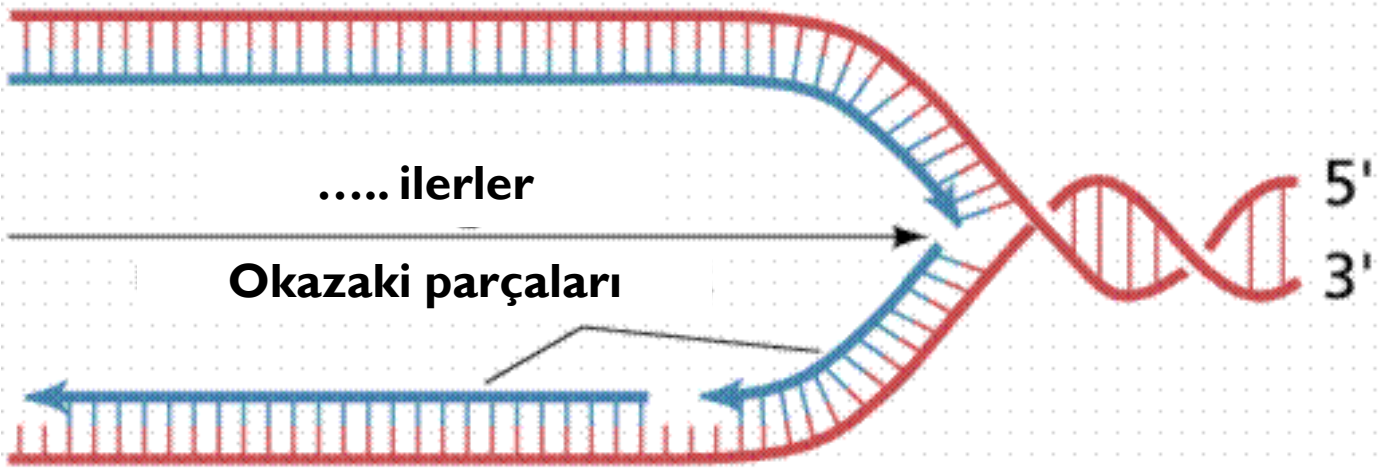
The enzyme DNA polymerase adds the next deoxyribonucleotide to the —OH group at the 3' end of the growing strand and releases pyrophosphate.

DNA polymerase



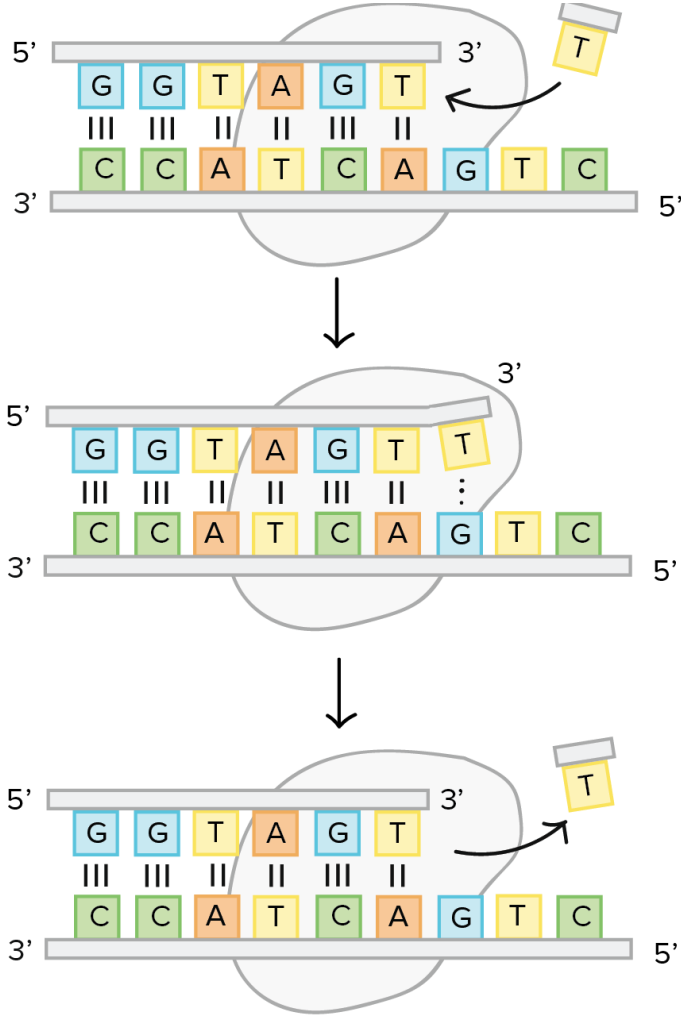


Yeni sentezlenen DNA



Yeni sentezlenen DNA zincirinin doğruluğunun kontrolü

DNA polimeraz III, $5' \rightarrow 3'$ polimeraz aktivitesine ek olarak $3' \rightarrow 5'$ **ekzonükleaz** aktivitesine de sahiptir. Bu sayede yapıya yanlışlıkla katılan nükleotidi hidrolizle uzaklaştırarak yerine doğru nükleotidi yerleştirir (sağlamalı okuma / proofreading) .

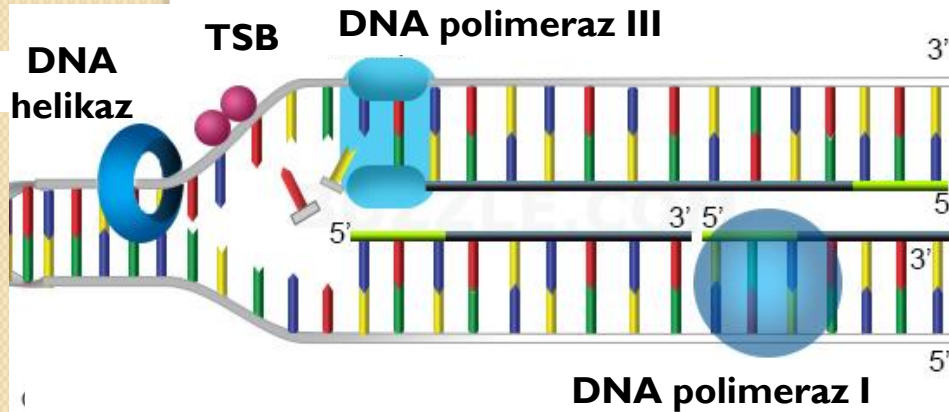


DNA polimeraz III yanlış bir nükleotidi yeni DNA zincirine ekler.

DNA polimeraz III bazın yanlış eşleştiğini tespit eder.

Yanlış nükleotidi çıkarmak için $3' \rightarrow 5'$ **ekzonükleaz** aktivitesini kullanır.

- DNA polimeraz III, **5'→3' polimeraz** aktivitesi ile DNA sentezine bir RNA primer dizisine gelinceye kadar devam eder.
- RNA primerine gelindiğinde DNA polimeraz III ayrılır ve yapıya katılan **DNA polimeraz I**, primeri **5'→3' ekzonükleaz** aktivitesi ile hidroliz ederek uzaklaştırır ve boşluğu doldurur.



DNA polimeraz I'in,

- RNA primerini hidroliz eden 5'→3' ekzonükleaz,
- DNA sentezini sağlayan 5'→3' polimeraz
- Yeni zincirin doğru okunmasını sağlayan 3'→5' ekzonükleaz aktiviteleri bulunmaktadır.

- **DNA polimeraz I**

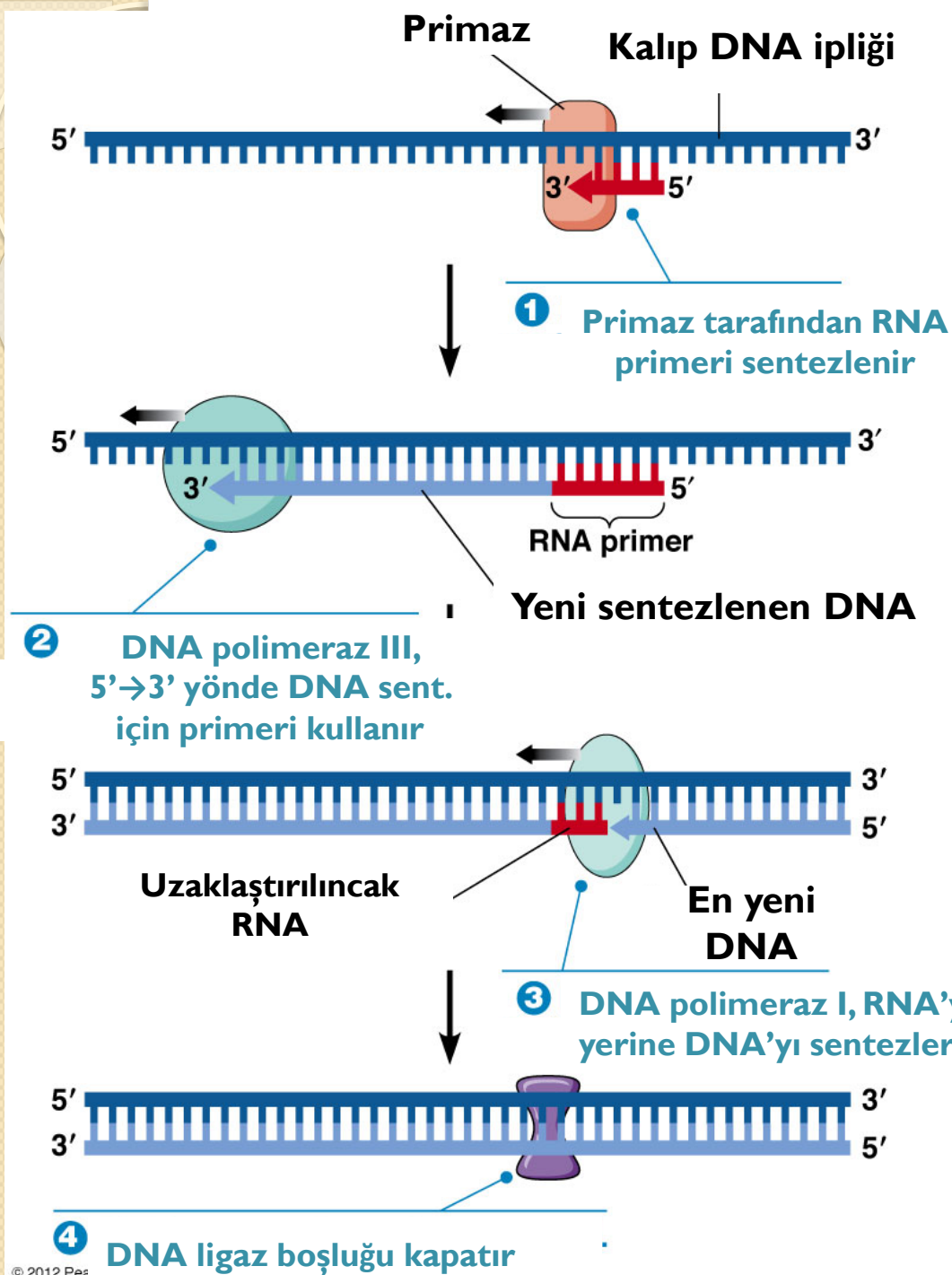
DNA polimeraz III'ün aktivitelerine ek olarak 5' → 3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir.

- **DNA polimeraz II**

Daha çok DNA onarımında görevlidir.

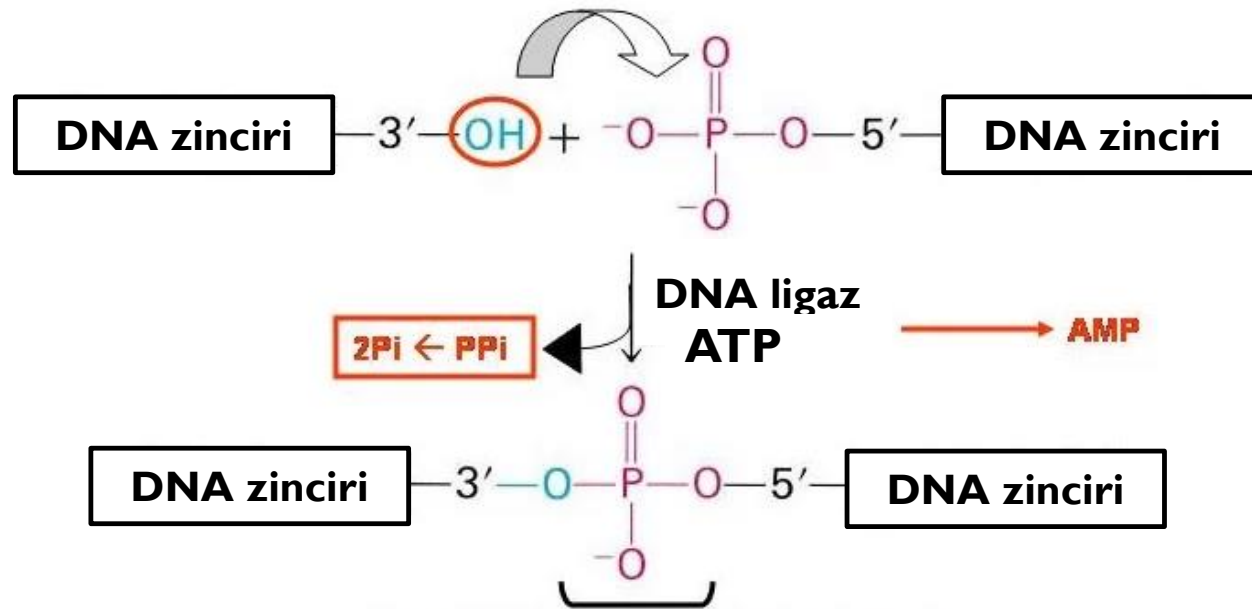
E. coli'de DNA polimeraz I, II ve III'ün karşılaştırılması.

DNA polimerazlar	I	II	III
Alt birim sayısı	1	7	10
3' → 5' ekzonükleaz	var	var	var
5' → 3' ekzonükleaz	var	yok	yok
Polimerizasyon oranı (nükleotid/saniye)	16-20	40	250-1000

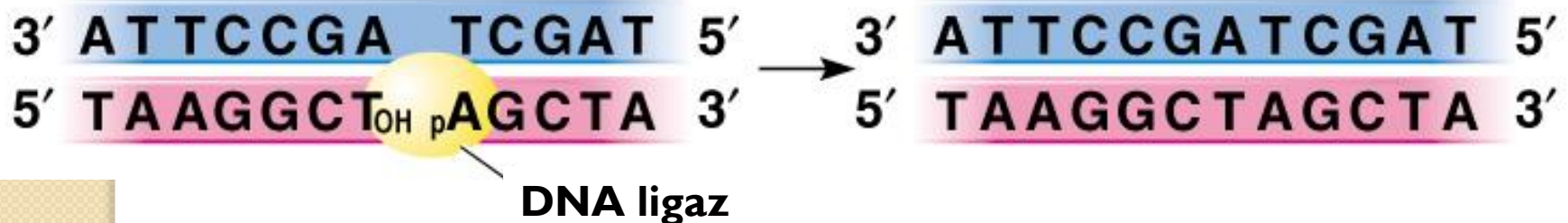


DNA ligaz, birbirlerini takip eden okazaki parçalarını fosfodiester bağı ile birleştirerek kesikli kolu tamamlar.

DNA ligaz'ın bir okazaki parçasının 5'-fosfat grubu ile yanındaki okazaki parçasının 3'-hidroksil grubu arasında oluşturduğu fosfodiester bağı için gerekli enerji ATP hidrolizinden sağlanır.



Yeni 3'--5' fosfodiester bağı



Kalıp DNA



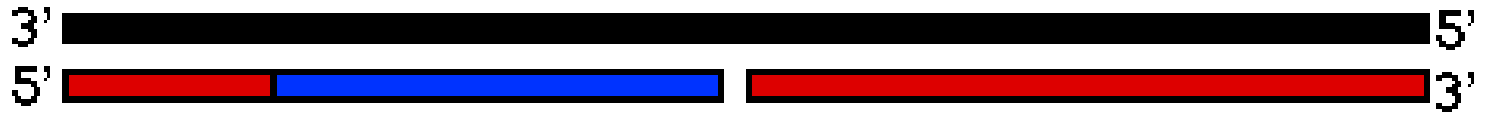
RNA primer

Yeni sentezlenen DNA



DNA polimeraz I

5' → 3' polimeraz ve ekzonükleaz aktivitesi



DNA ligaz

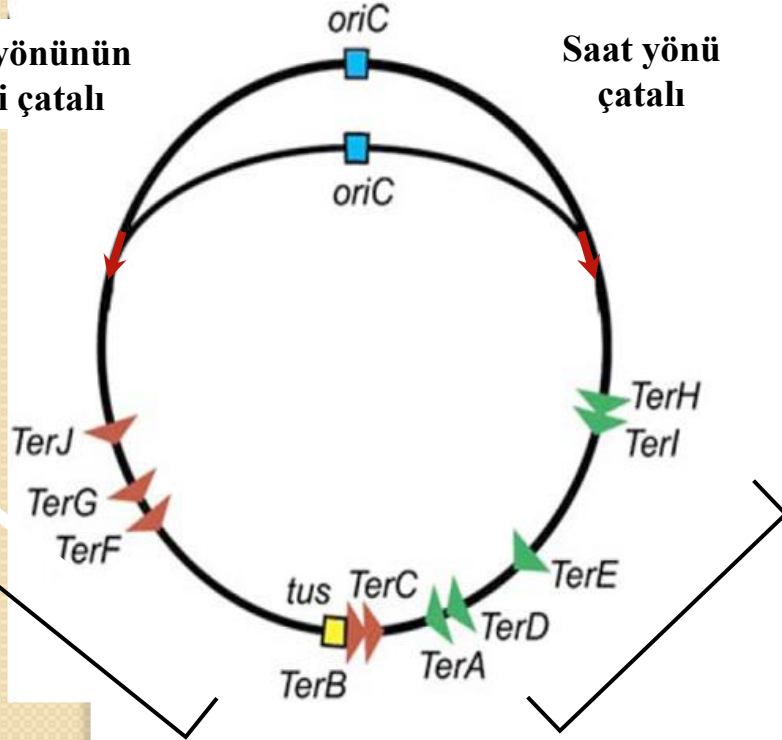


Sentezi tamamlanmış komplementer (tamamlayıcı) DNA zinciri

III. SONLANMA

Saat yönünün
tersi çatalı

Saat yönü
çatalı

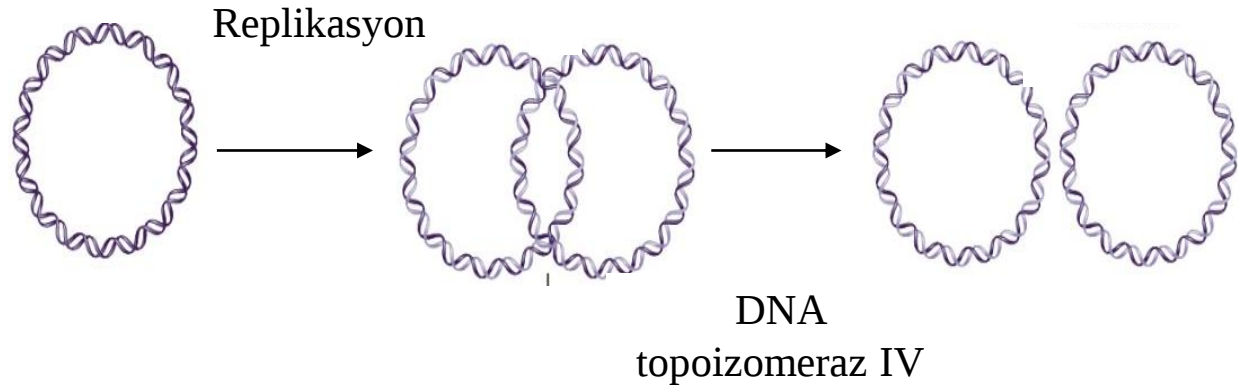


Saat yönü
çatal tuzağı

Saat yönünün tersi
çatal tuzağı

E.coli'nin çevrimsel kromozomunun iki replikasyon çatalı en sonunda **Ter (terminus)** adını alan ve 20 baz çiftlik dizilerin birçok kopyasını içeren bir sonlanma bölgesinde buluşur. Ter dizileri kromozomda bir çeşit tuzak oluşturacak şekilde yerleşmiştir. Ter dizileri, **Tus** proteinlerinin özel olarak bağlanabileceği bölgeleri oluşturur. **Tus** (*terminus utilization substance, sonlanmada kullanılan madde*)

Replikasyon atallarından biri işlevsel ***Tus-Ter*** kompleksine geldiğinde duraklar. Tuzığa yakalanmış olan çatalla karşılaşan diğerk atal da duraklar. Sonuçta, iki tane topolojik olarak birbirine bağılı kromozom oluşur. Bu şekilde birbirine bağılı DNA halkalarına **zincir halkaları (*katenanlar*)** denir. *E.coli*'de zincir halkalarını birbirinden **topoizomeraz IV** enzimi ayırır.



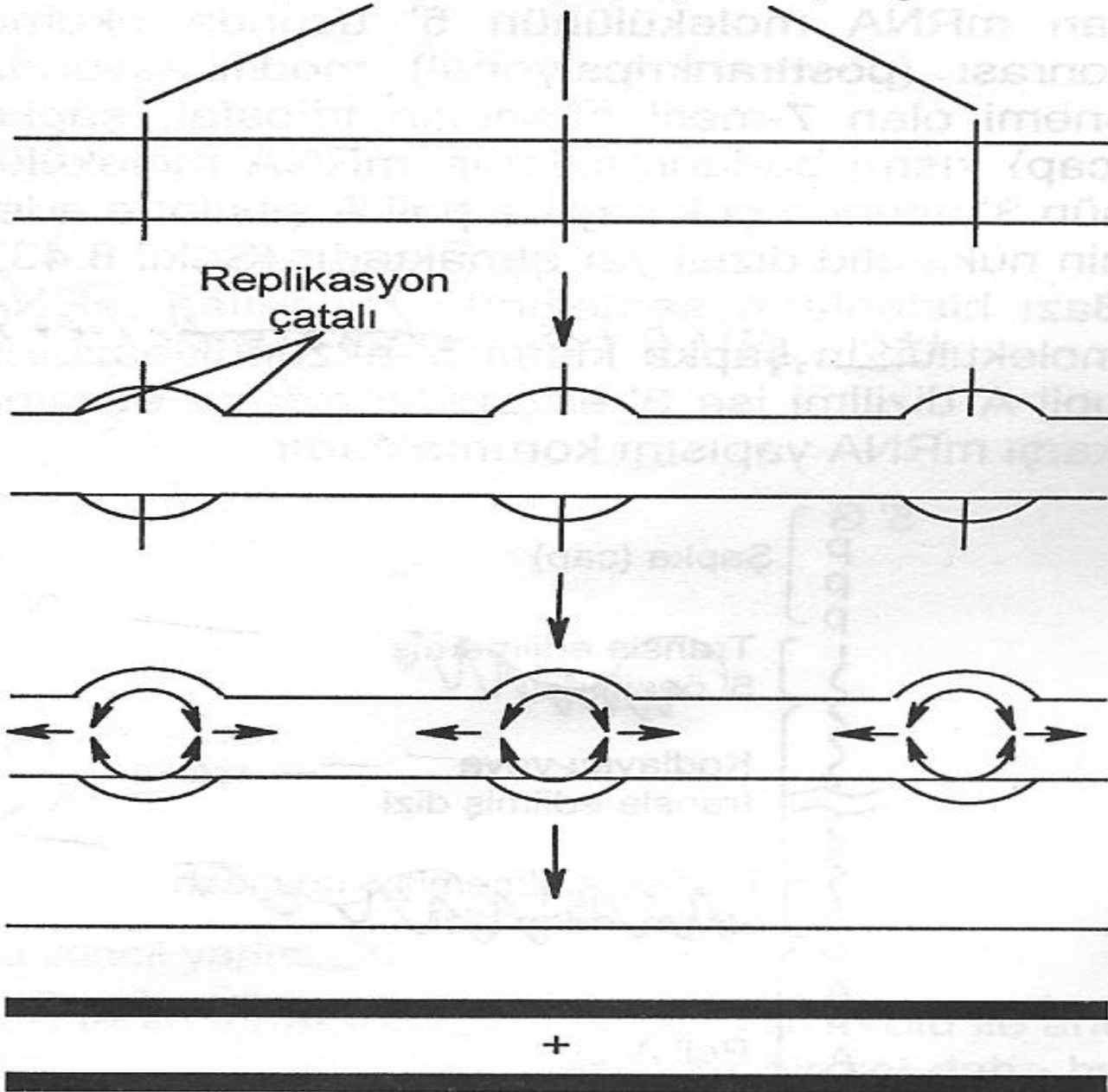
ÖKARYOTİK DNA REPLİKASYONU

- DNA replikasyonu
 - Prokaryotlarda tek bir orjinde başlar.
 - Ökaryotlarda bir çok orjinde birden başlar (maya 250-400, memelilerde 25,000'den fazla) .

Ökaryotik DNA polimeraz'ın saniyede 50 nukleotid olan sentez hızı bakteriyal polimerazlardan 20 kat daha yavaştır.

Ökaryotik DNA molekülleri çok uzun olduğundan replikasyonun birçok bölgede birden başlaması, DNA'nın kısa zamanda replikasyonunu sağlar.

Çok sayıda replikasyon başlangıcı



- 
- Ökaryotlarda da tek sarmallı DNA bağlayan proteinler (replikasyon protein A) ve helikaz enziminin işlevi prokaryotlarla aynıdır.
 - Ökaryotlarda da bakteriler gibi bir çok DNA polimeraz bulunmaktadır.
 - DNA polimeraz α
 - DNA polimeraz δ
 - DNA polimeraz ϵ
 - DNA polimeraz γ

DNA polimeraz α - kromozom replikasyonundan sorumludur.

- **5'→3' polimeraz** ve RNA primerinin sentezini sağlayan **primaz** aktivitesine sahiptir.
- 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi yoktur.

DNA polimeraz δ - kromozom replikasyonundan sorumludur.

- DNA polimeraz α tarafından sentezlenen primeri uzatır. (**5'→3' polimeraz**)
- 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir,.
- Bakteriyel DNA polimeraz III'e benzer etki gösterir.
- Nukleusta DNA polimeraz δ 'ya bağlı bulunan, çoğalan hücre nükleer antijeni (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) denen protein, prokaryotik DNA polimeraz III'ün β altbirimine benzer fonksiyon göstererek enzimin verimliliğini artırır.

DNA polimeraz ε - DNA tamirinde rol oynar.

- Kesikli zincirde okazaki parçalarının primerlerinin çıkarılmasında görevlidir. (5'→3' ekzonükleaz)
- Bakteriyel DNA polimeraz I'e benzer etki gösterir.

DNA polimeraz γ - mitokondriyal DNA sentezinden sorumludur.