

Genetik materyal: DNA replikasyonu

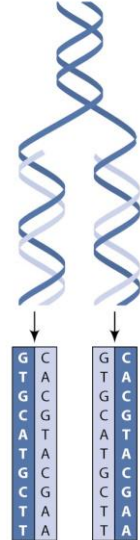
Umut Fahrioglu, PhD MSc

DNA Replikasyonu

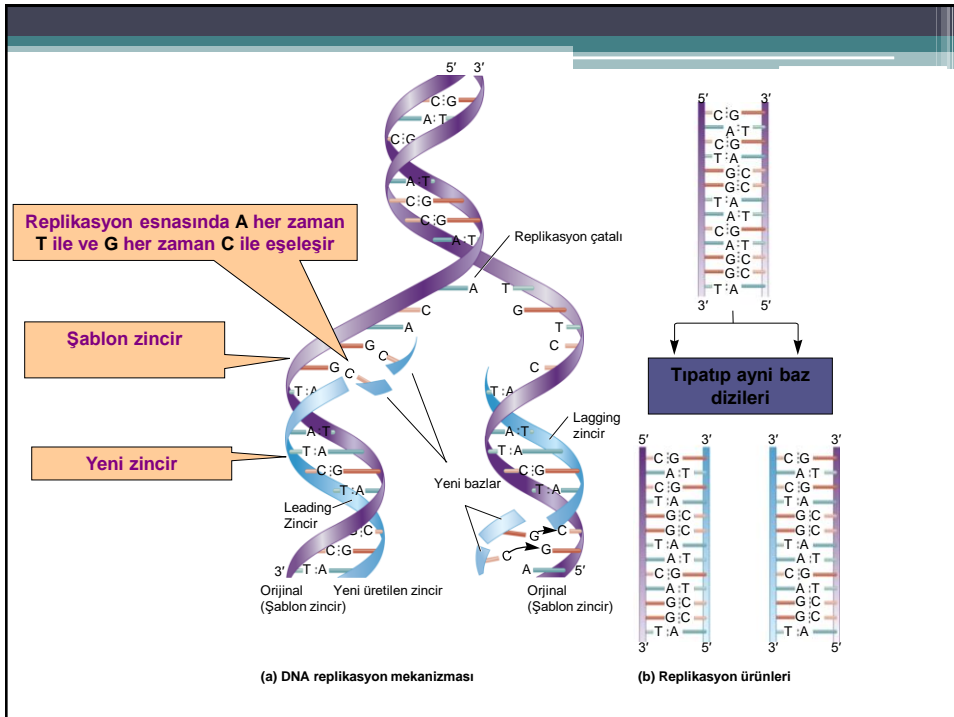
- DNA replikasyonu genomların ve içerdikleri genlerin nesilden nesile aktarılmasında çok önemli bir rol oynar.
- Hücreden hücreye genetik devamlılık olmasını istiyorsak bu işlemin eksiksik bir şekilde yapılması gerekir.
- Replikasyon işlemi çok büyük bir işlemdir çünkü replike edilmesi gereken çok şey vardır.
- 10^{-6} lık bir hata payı bile replikasyon esnasında 3000 hataya neden olacaktır.
- Tabii ki hiç hatasız olamaz ama çok güvenilir bir sisteme ihtiyacımız vardır.

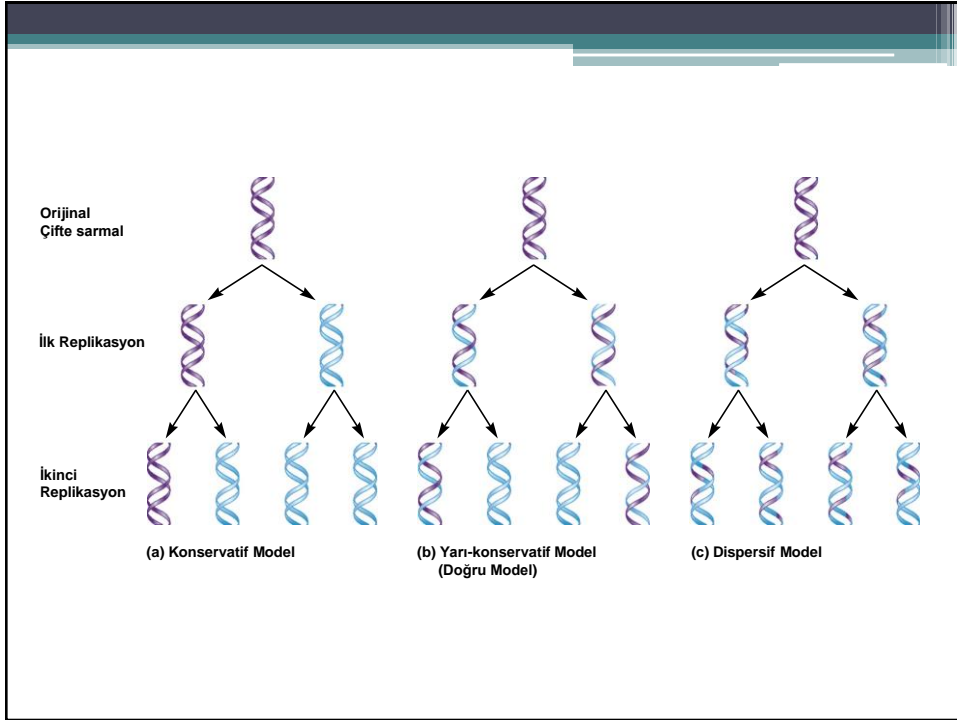
Yarı konservatif DNA replikasyonu Watson ve Crick tarafından ortaya atıldı

- Watson ve Crick'e göre DNA'nın kimyasal yapısı ve düzenlemesinden dolayı sarmallardan her biri karşısındaki zincirin sentezlenmesi için bir şablon görevi görebilir.
- Sarmal çözülürse ana zincir üzerindeki her nükleotidin kendi komplementini olan nükleotide karşı bir zayıf olur. Bu zayıf ve tamamlayıcılık hidrojen bağlarından dolayı olur.
- Nükleotidler bunu takiben şablon boyunca polinükleotid zincirlerine dönüşür.
- Her replike olmuş DNA molekülü **bir yeni** zincir **bir de eski zincirden** oluşur ve işte bundan dolayı **yarı konservatif replikasyon** denir.

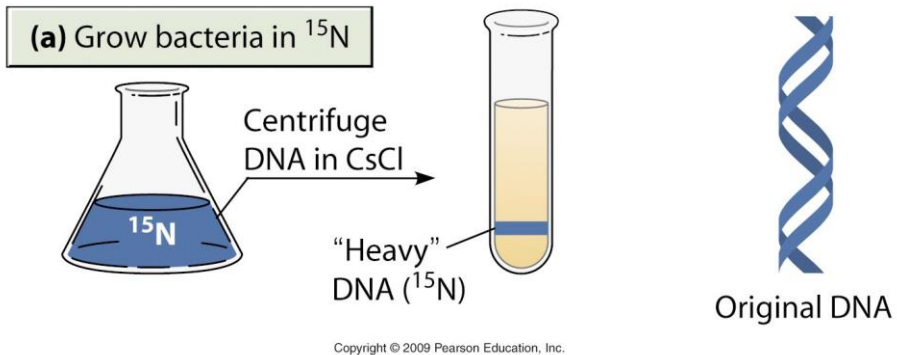


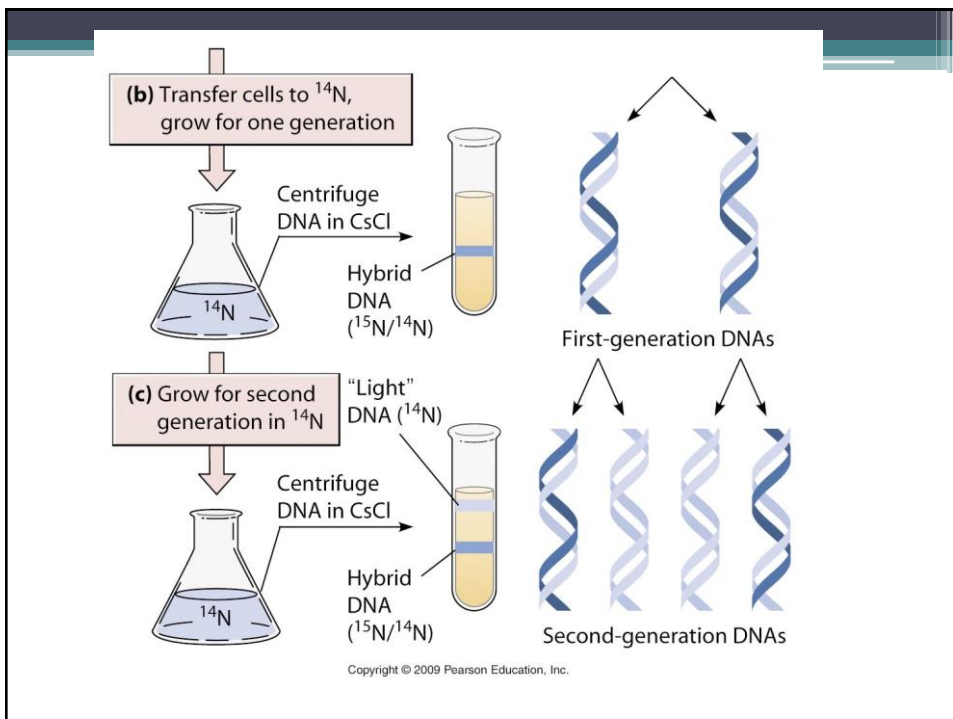
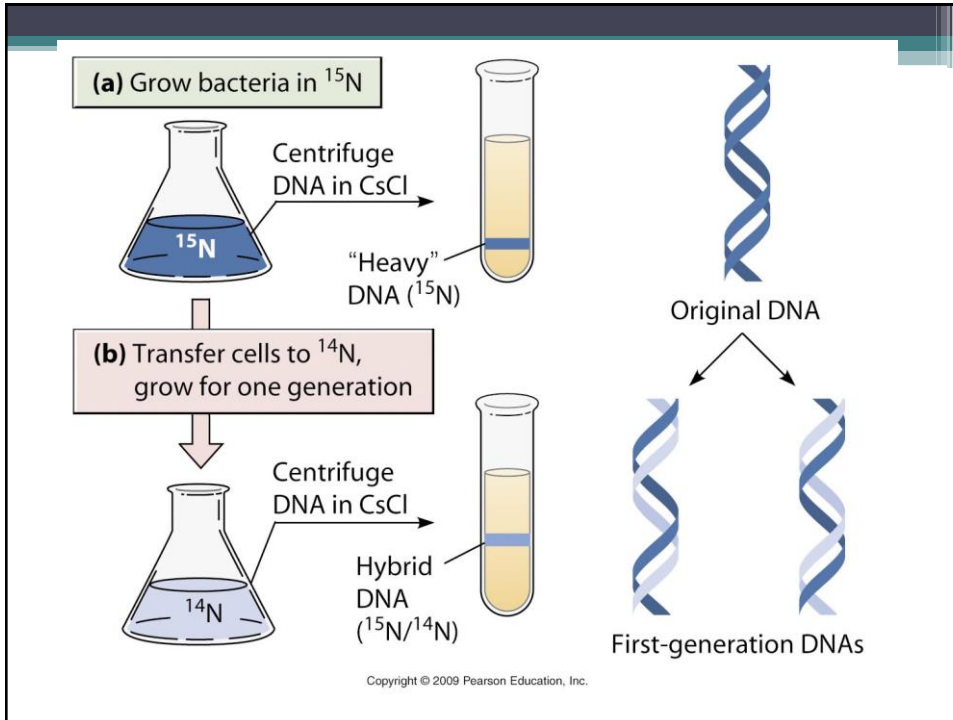
right © 2009 Pearson Education.





Meselson-Stahl deneyi yarı konservatif replikasyon için kanıt sunmaktadır.





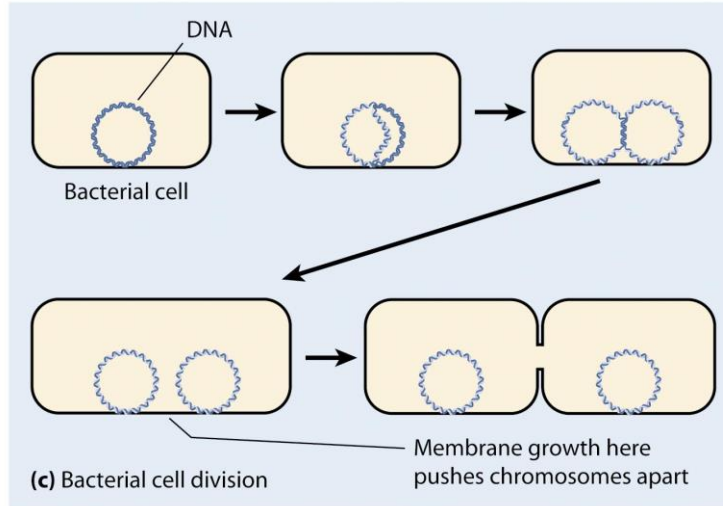
DNA replikasyonunun karakterizasyonu

- 1955'de, Arthur Kornberg ve melektaşları bakteri DNA replikasyonunu nitelendirdiler çünkü bakteri replikasyon mekanizmasının ökaryotlardan daha az kompleks olduğunu düşündüler.
- Bakterilerde 3 farklı polimeraz vardır, DNA polimeraz (pol) I, II, and III.
- *E. coli* genomunun replikasyonu pol III'ün görevidir. DNA pol I ilk keşfedilendir.
- DNA polimerazın bir grup aksesuar proteine ihtiyacı vardır.

DNA replikasyonu deyince akla gelen sorular.

- Replikasyon kromozomun hangi bölgesinde başlar? Bu bölge rastgele mi yoksa özel bir bölge mi?
- Replikasyon orijini tek bir tane mi yoksa birden fazla mı?
- Replikasyon başladıktan sonra, replikasyon tek yönlü mü çift yönlü mü?
- Ökaryotlarda, DNA replikasyonu, **semikonservatif, çift yönlü** ve kromozom boyunca **birden çok orijini olan** bir replikasyondur.

Bakterilerde DNA replikasyonu



İlk deneyler

- Kornberg ve meslektaşları *in vitro* DNA sentezini yapabilen bir enzim izole ederler. Bu enzime DNA polimeraz I dediler (Kornberg enzimi).
- DNA'nın sentezlenmesi için 5 öğeye ihtiyaç olduğunu gördüler:
 - 4 farklı dNTP'ye (bir tanesi bile eksik olduğunda veya türevleri kullanıldığında, ölçülebilir bir sentez gerçekleşmedi).
 - DNA pol I (enzim).
 - DNA (şablon görevi görür).
 - Primer (Kesilmiş DNA kullandılar ana normalde primer RNA'dır).
 - Magnezyum iyonları (optimal DNA pol aktivitesi için).

DNA replikasyonu

Düşünülmesi gereken ana noktalar

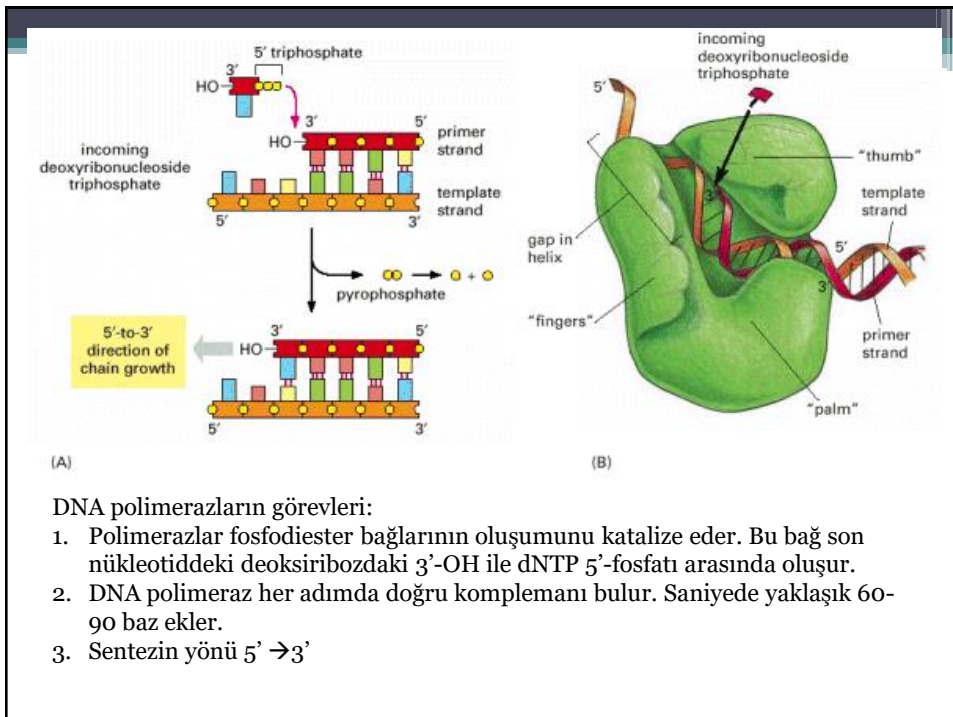
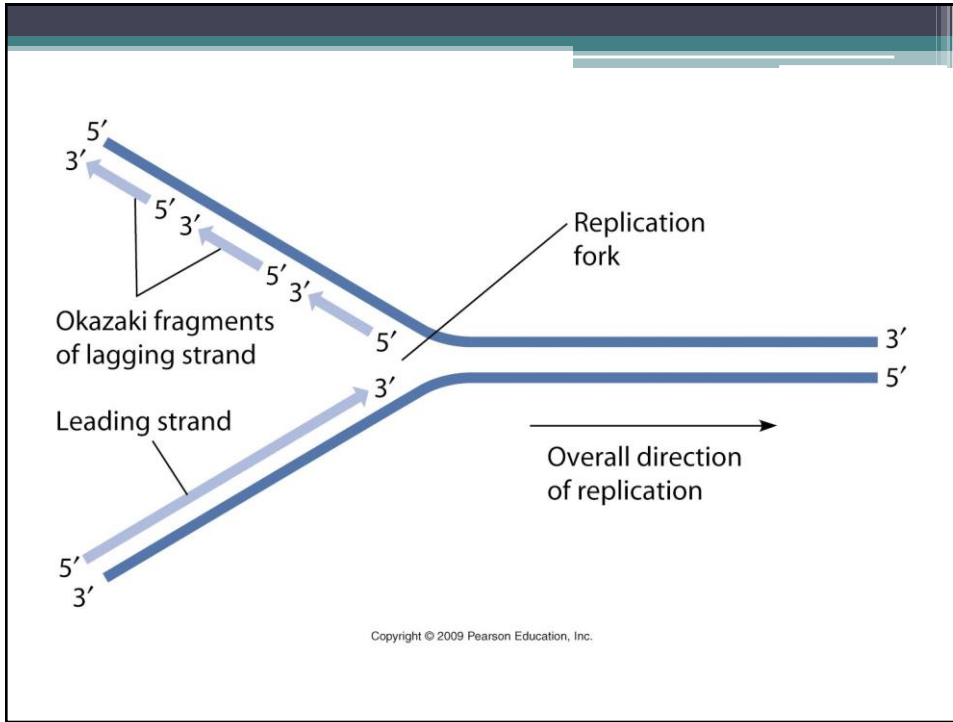
- Semiconservatif (Yarı konservatif)
- Bidireksiyonel (Çift yönlü)
- Sentezin yönü; 5' den 3' e
- İki zincir, leading zincir (öncü zincir) ve lagging zincir (artçı zincir)
- Primerler
- Replikasyon orijini (başlama noktası)

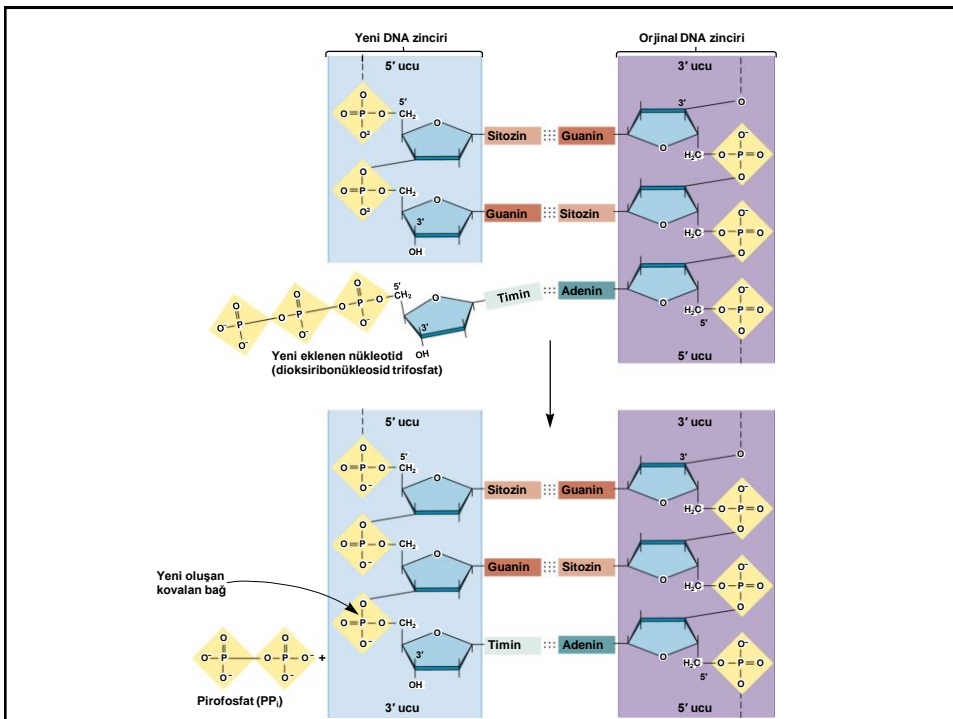
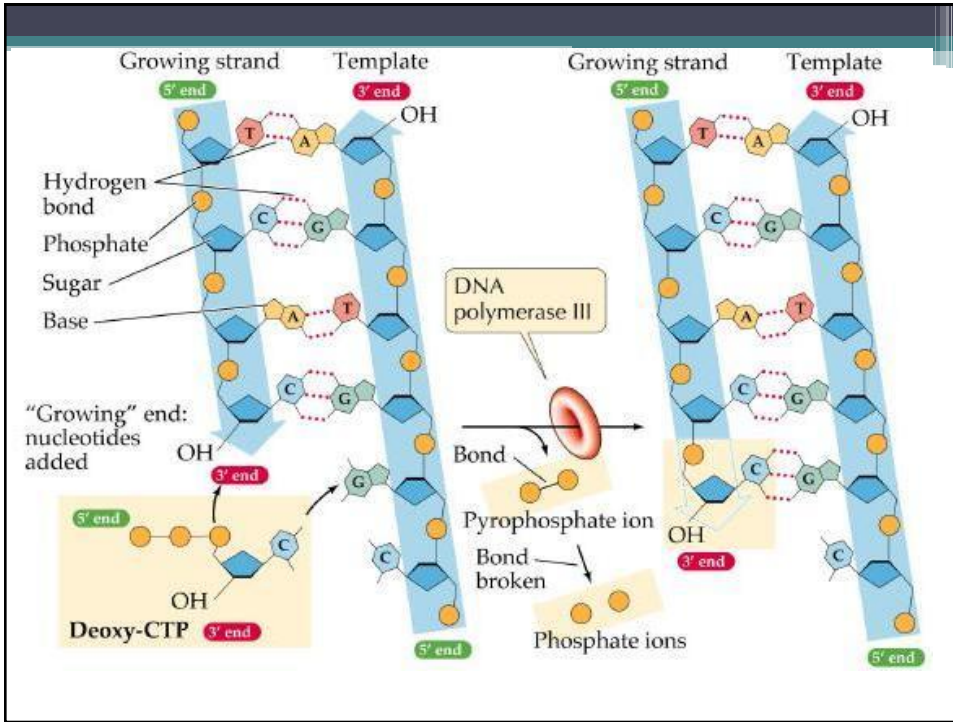
DNA replikasyonunun 3 evresi

- Başlangıç
- Uzama
- Terminasyon

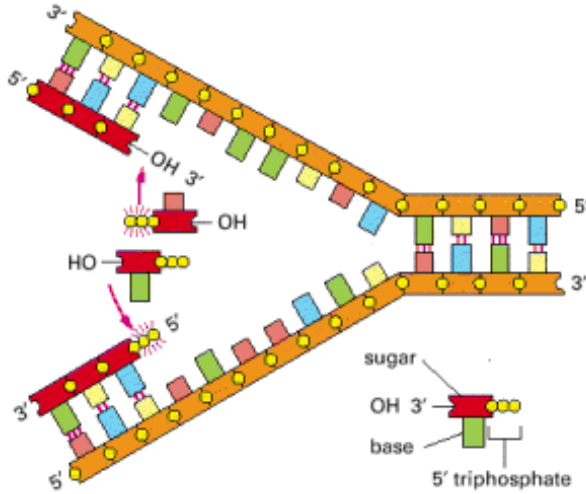
Replikasyon esnasında olacaklar

- Sarmalda yerel çözülme olmalıdır. Çözülünce açığıdaki DNA'nın stabilize edilmesi gerekmektedir.
- Çözülme ve DNA sentezi sarmal boyunca çözülmesi gereken bir gerginlik yaratır.
- DNA polimerazın başlayabilmesi için bir tür primer üretilmesi gerekir. Bu primer RNA'dır DNA değil.
- Primerler üretilince sentez başlayabilir. İki zincir farklı metodlar ile replike olur.
- Replikasyon tamamlanmadan önce RNA primerlerinin yok edilmesi gerekmektedir. Geriye kalacak boşlukların da DNA ile doldurulması gerekmektedir.
- Gözden geçirme mekanizması doğru bazların eklenmesini sağlar





Yanlış replikasyon modeli



DNA polimerazın sıra dışı işleyişi

DNA polimeraz DNA sentezini başlatamaz

İki tane nükleotidi birbirine bağlayamaz

Bu problem Primaz tarafından üretilen RNA primer ile aşılr

Bunları kovalan bir şekilde bağlayabilir

Bu problem yeni zinciri hem replikasyon çatallına doğru hem de çataldan uzaklaşır şekilde üretmek aşıldı.

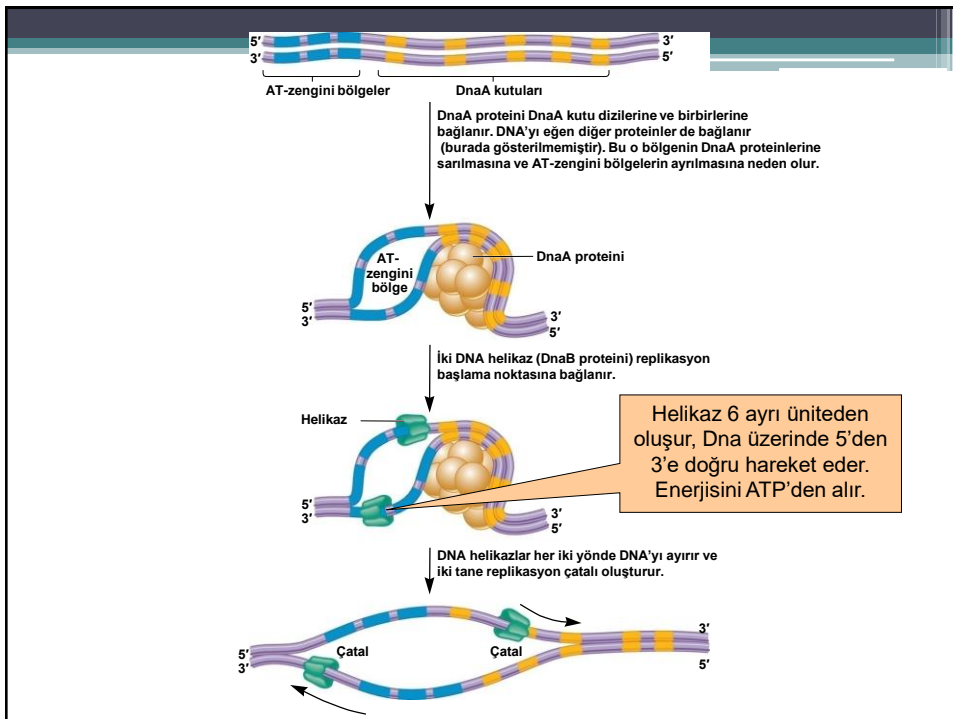
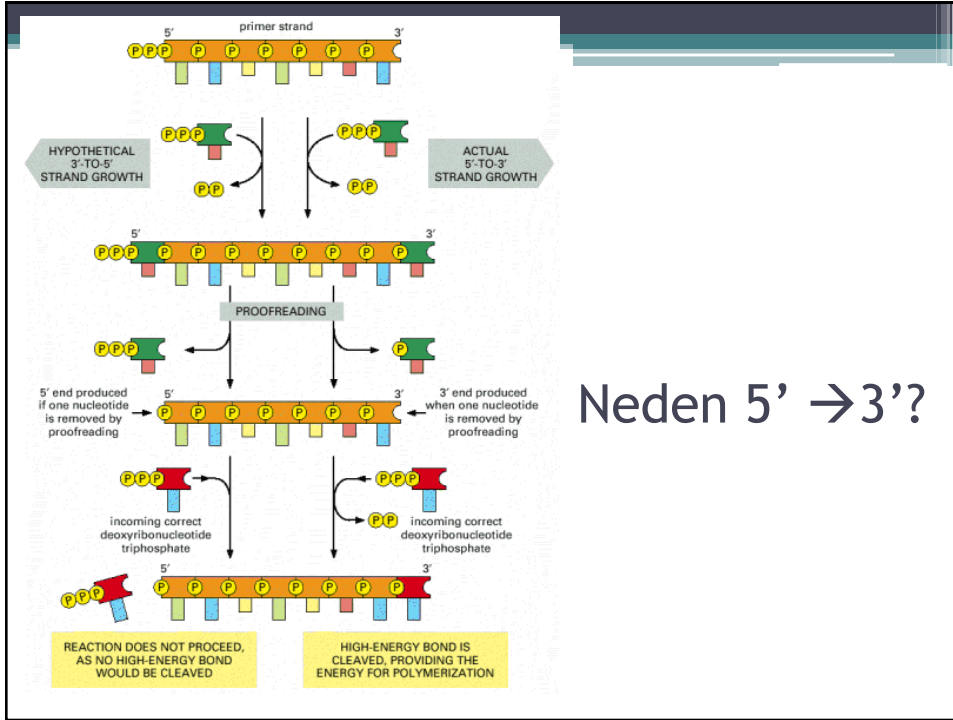
DNA polimeraz nükleotidleri sadece 5' den 3' e ekleyebilir

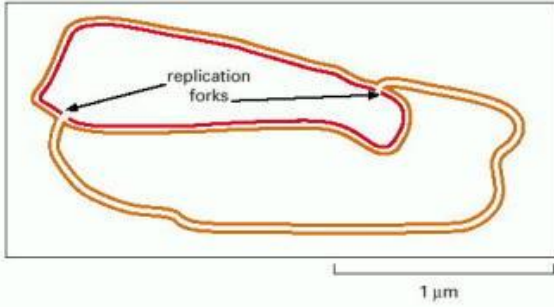
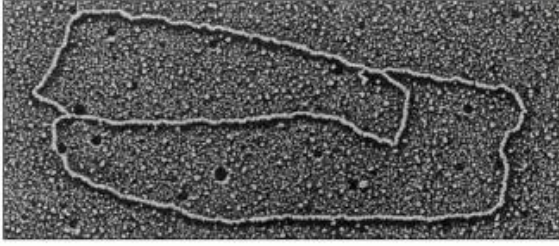
Ama iki zincir bir birine anti-paraleldir ve zıt yönlerde giderler

(a) Bu yönde nükleotidleri bağlayamaz

(b) Nükleotidleri bu yönde bağlar

The diagram illustrates the unique action of DNA polymerase. It shows a DNA double helix being unwound. The leading strand is synthesized continuously in the 5' to 3' direction. The lagging strand is synthesized discontinuously as Okazaki fragments. A red RNA primer is shown being added to the 3' end of the lagging strand. The diagram labels 'Primer', '5'', '3'', and 'Nükleotidleri bu yönde bağlar'.

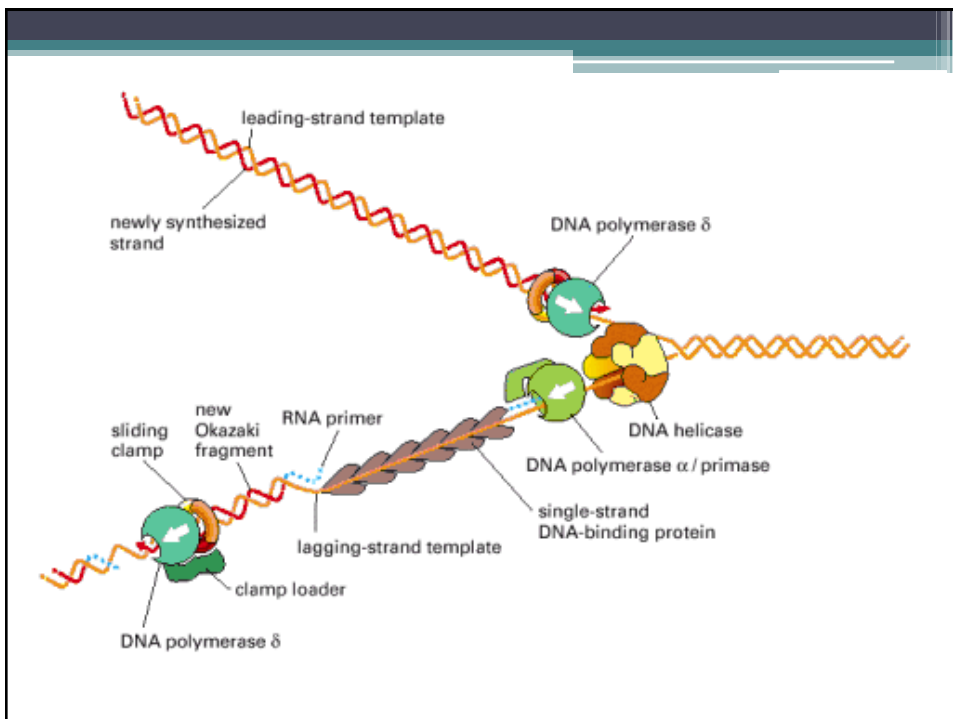
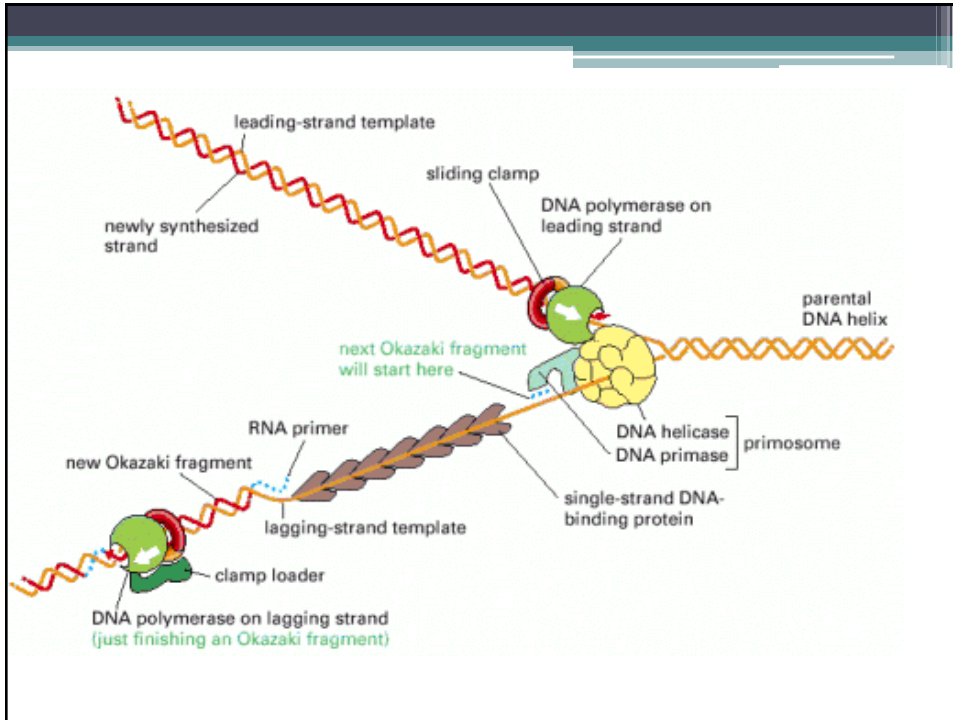


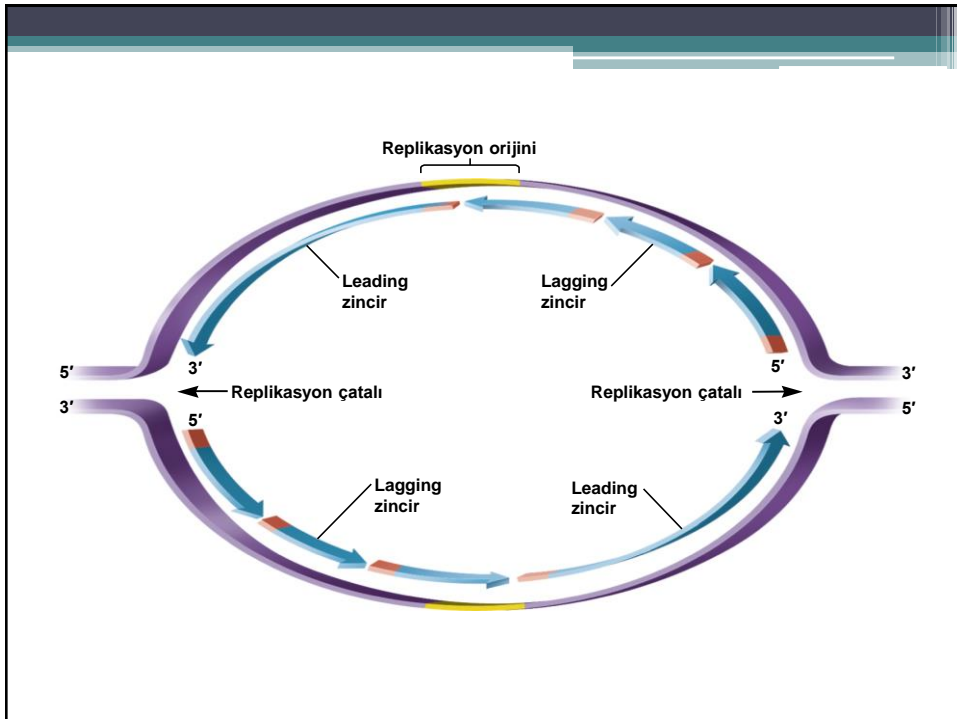
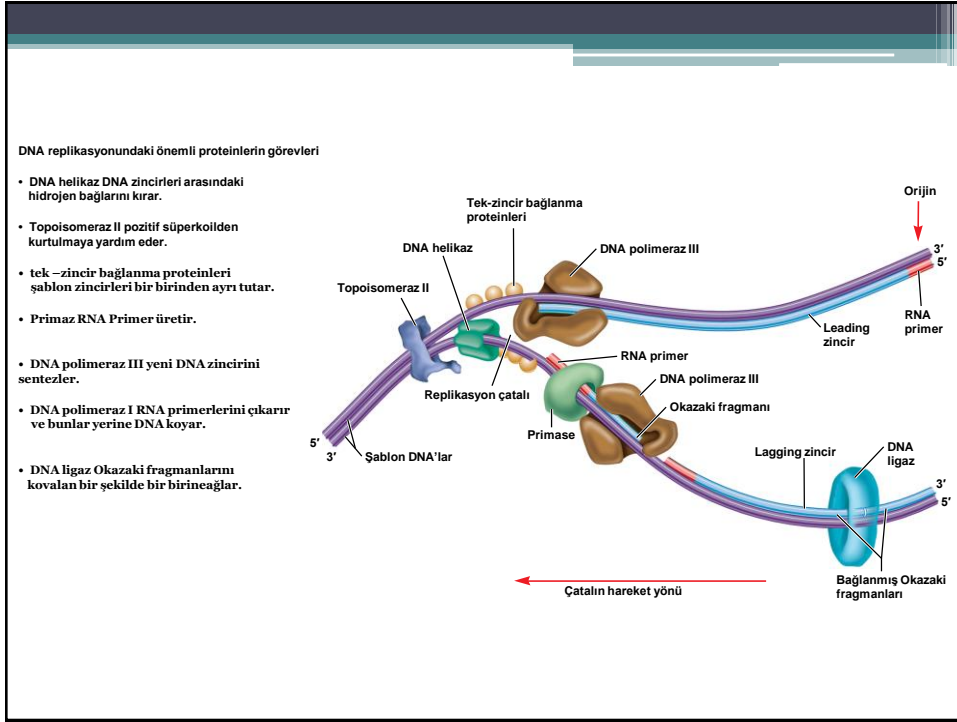


Replikasyon çatalı

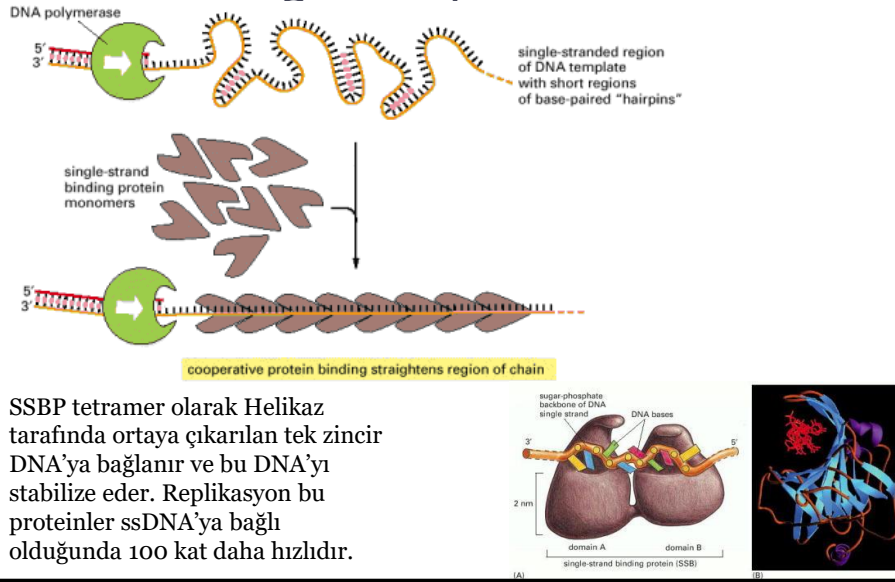
DNA replikasyonu için önemli enzimler

- DNA Helikaz
- DNA SSBD (tek zincir bağlanma proteinleri)
- DNA Topoizomeraz
- DNA Polimeraz
- Primaz
- DNA Ligaz



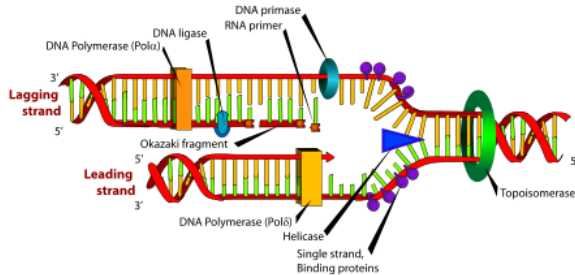


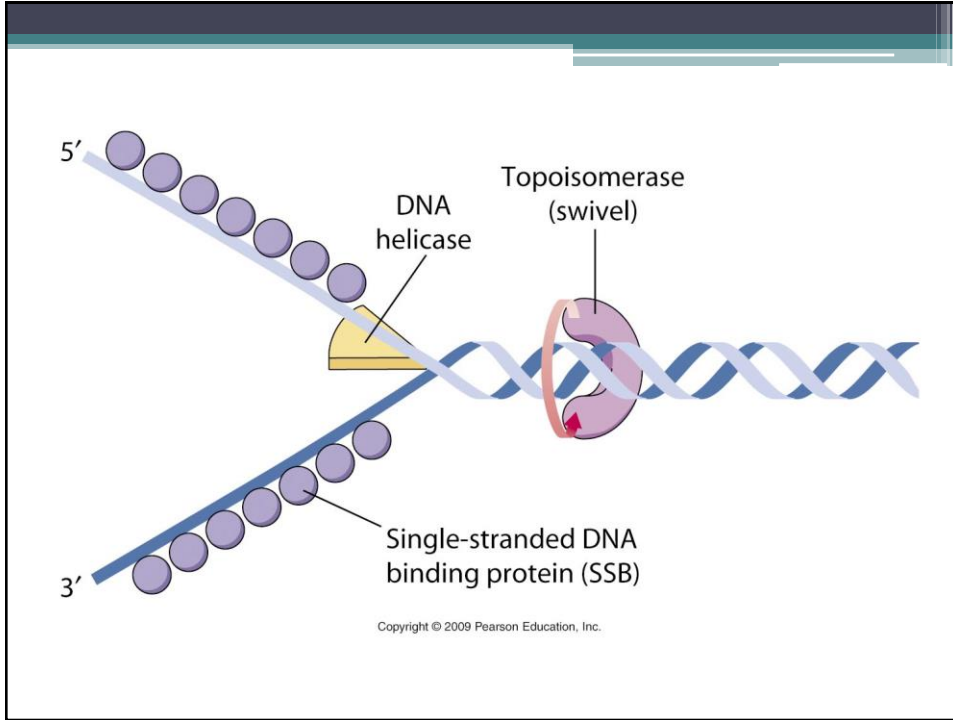
Single-strand binding proteins (SSBs) Tek zincir bağlanma proteinleri



DNA topoizomeraaz

- Bu enzim negatif gevşemelerin (süperkoiller) oluşumunu katalize eder. Bu işlemin çözülme işlemine yardımcı olduğu düşünülmektedir.
- DNA replikasyonu esnasında bu protein ailesinin farklı üyeleri görev alır. Bunlar içinde DNA topoizomeraaz I ve II ve DNA giraz vardır.

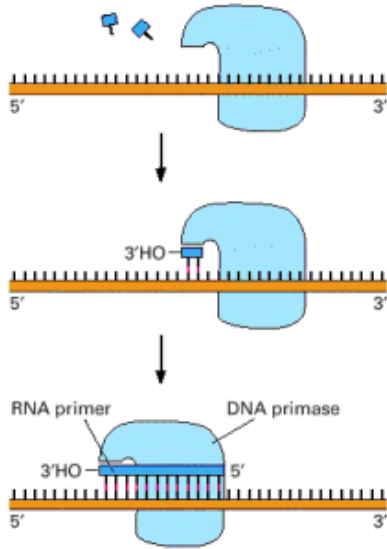




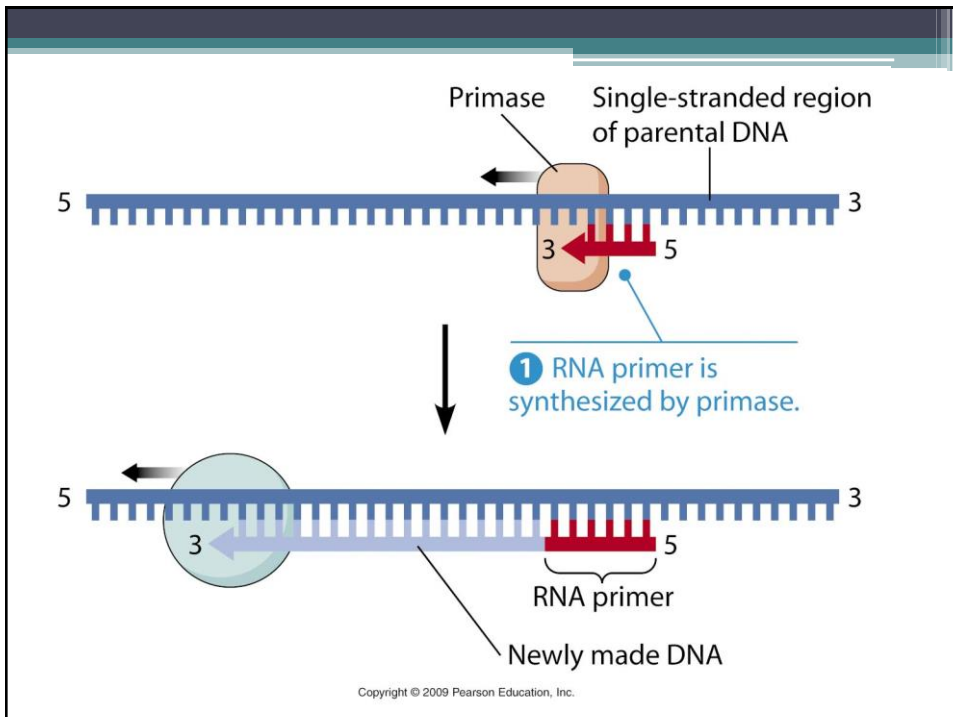
DNA Pol'un üç ana aktivitesi

- 5' ten 3' e elongasyon (polimeraz aktivitesi)
- 3' ten 5' eksonükleaz (kontrol aktivitesi) hata oranı 10^8 'de 1'den azdır
- 5' ten 3' e eksonükleaz (tamir aktivitesi)
- DNA Pol I'in diğer iki aktivitesi replikasyon için önemlidir fakat 5' → 3' polimeraz görevini yapan DNA Polymerase III'tür.

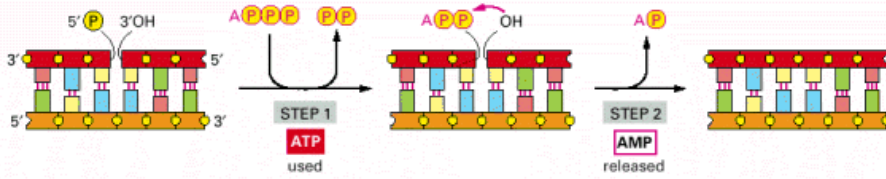
DNA Primaz



3' hidroksil grubu gereksinimi DNA primaz denen bu enzimin başlangış noktasında ürettiği RNA primerler tarafından gidereilmektedir.

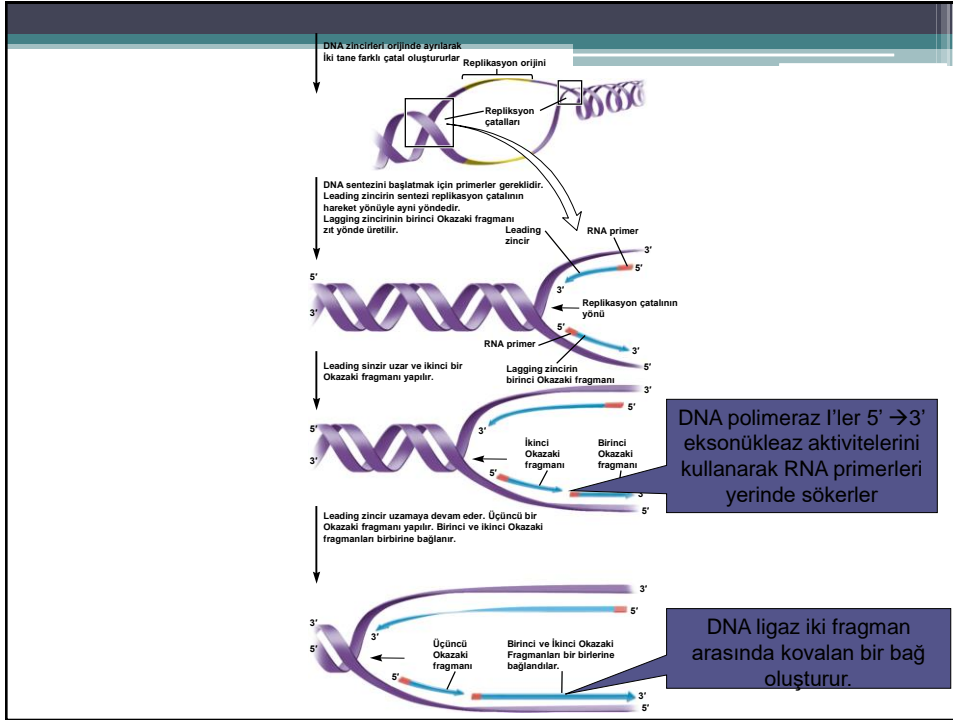


DNA ligaz

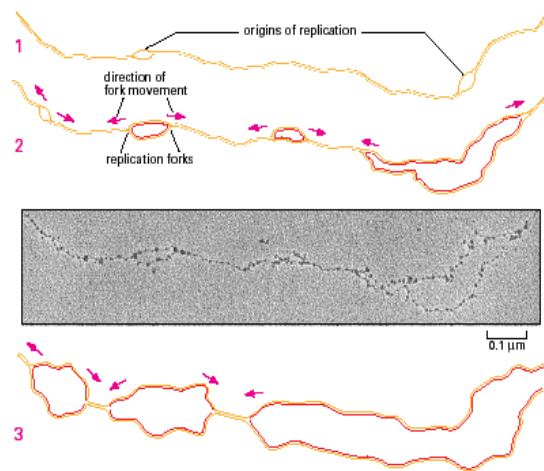


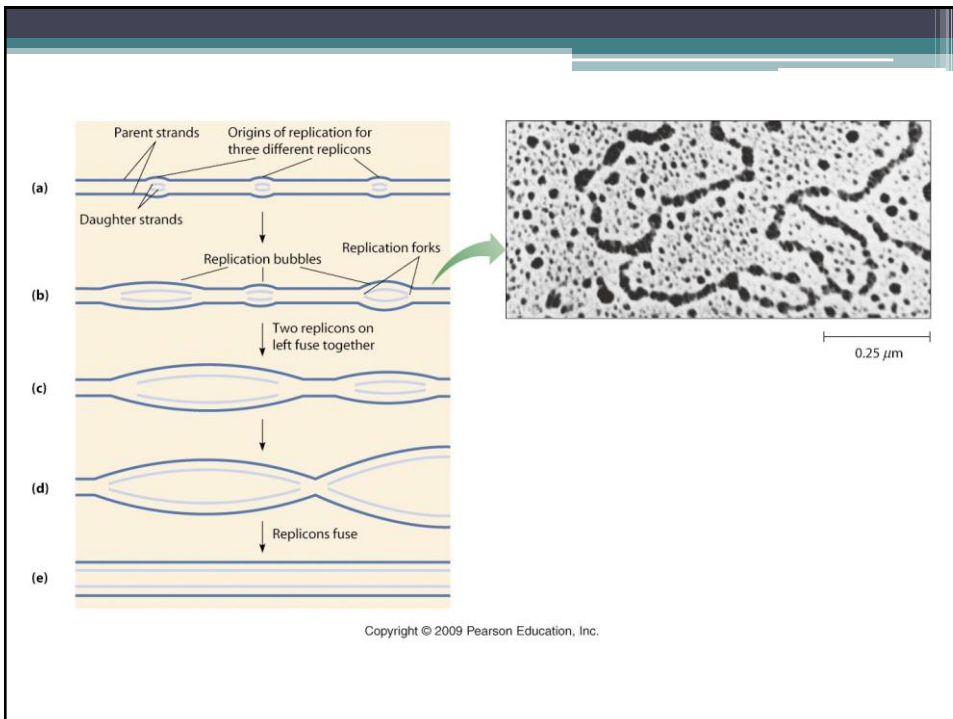
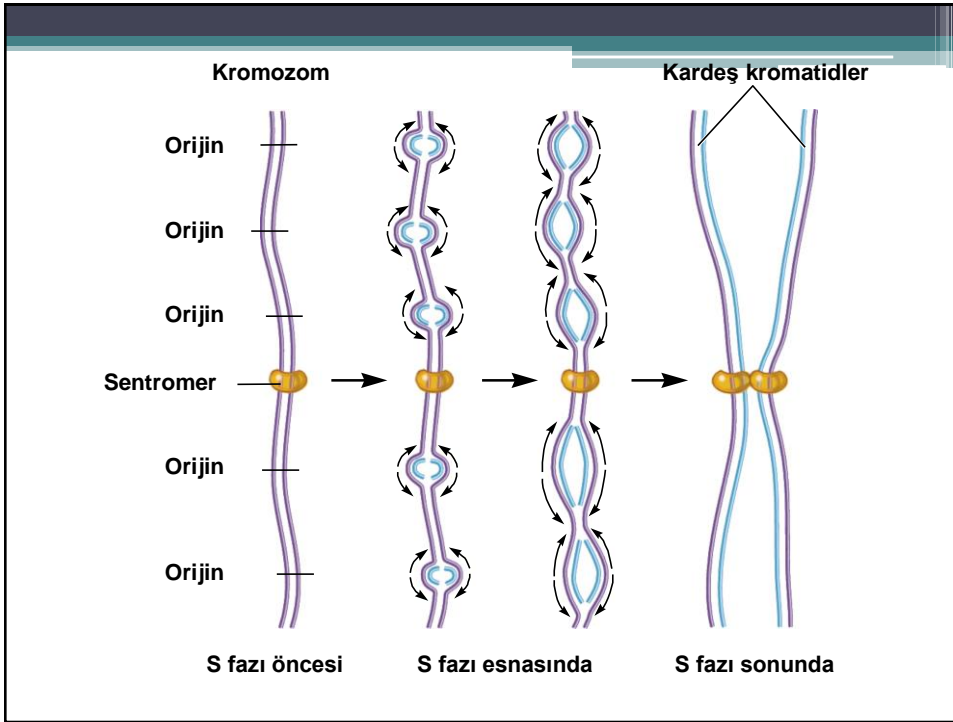
Replikasyonda yapılması gerekenler

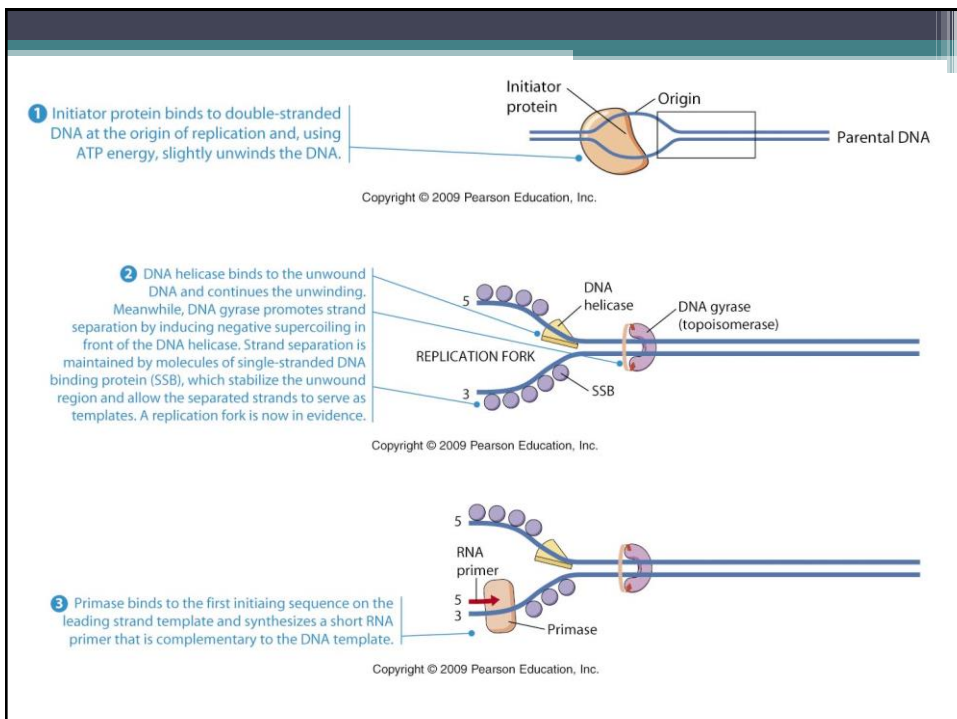
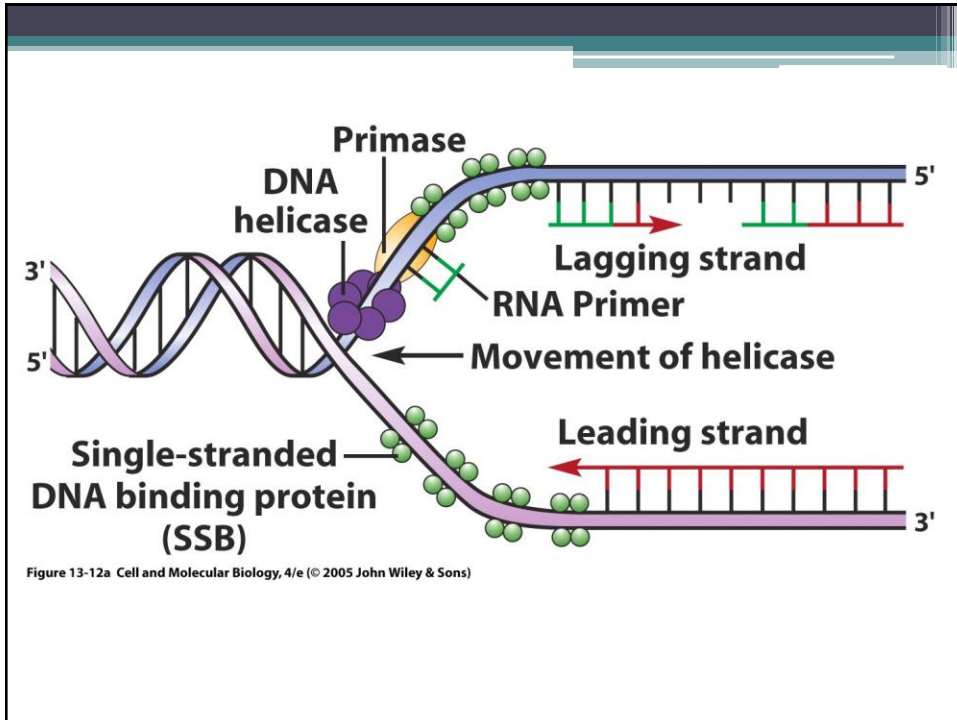
- Sarmalın yerel olarak gevşemesi gerek. Geveşedikten sonra orataya çıkan DNA'nın stabil hale getirilmesi gerekmektedir. (DNA giraz, DNA helikaz ve DNA SSBP).
- DNA'nın gevşemesi ve DNA sentezi sarmalın geriyekalan gölgelerinde gerilime neden olur ve bu gerilimin çözümlenmesi gerekmektedir. (topoizomeraz)
- Bir tür primerin üretilmesi gerekir ki DNA polimeraz göreve başlayabilsin. Bu primer RNA'dır DNA değil. (RNA primerler üretilir, ve primerin serbest 3'OH grubu polimer tarafından kullanılabilir).
- Primerler üretilince DNA sentezi başlayabilir. Her iplik farklı bir replikasyon yöntemi uygular. (Replikasyon çatalı bir yönde gider fakat DNA replikasyonu sadece 5'den 3'e doğru olur. Bu paradoks Okazaki fragmanlarını kullanarak çözümlenir. Bu fragmanlar kısa birbiri ile devamsız artçı zincirden üretilen replikasyon ürünlerdir. Buna karşı öncü zincirden üretilen devamlılığı olan bir zincir vardır.)
- Replikasyon tamamlanmadan önce RNA primerinin çıkarılması lazım. (Son ürünlerin içerisinde RNA parçaları yoktur. Bunlar Polimeraz I'in 5'den 3' işlev yapan eksonükleaz aktivitesi ile çıkarılırlar). Geriye kalan boşluğun DNA ile doldurulması gerekmektedir. (Son ürünlerde RNAların çıkarılması ile boşluklar oluşur fakat son ürünlerde boşluk yoktur bu boşluklar DNA polimeraz I'in 5'den 3'e olan polimeraz işlevi ile doldurulur)
- DNA polimerazın son bağı oluşturma kabiliyeti yoktur. Bu bağı DNA ligaz tarafında oluşturulur.
- Bir düzeltme mekanizması doğru bazların eklendiğinden emin olur. (DNA polimeraz III)



Ökaryotik DNA replikasyonu esnasında birçok replikasyon balonu mevcuttur







4 DNA polymerase III (polymerase α followed by polymerase δ or ϵ in eukaryotes) uses the primer to initiate DNA synthesis by adding deoxyribonucleotides to its 3' end. The leading strand requires only one priming event because DNA synthesis is continuous in the 5' \rightarrow 3' direction.

Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

5 An RNA primer is made for the lagging strand and DNA polymerase then extends the strand. In *E. coli*, the primase is part of the primosome, a protein complex that includes the DNA helicase.

Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

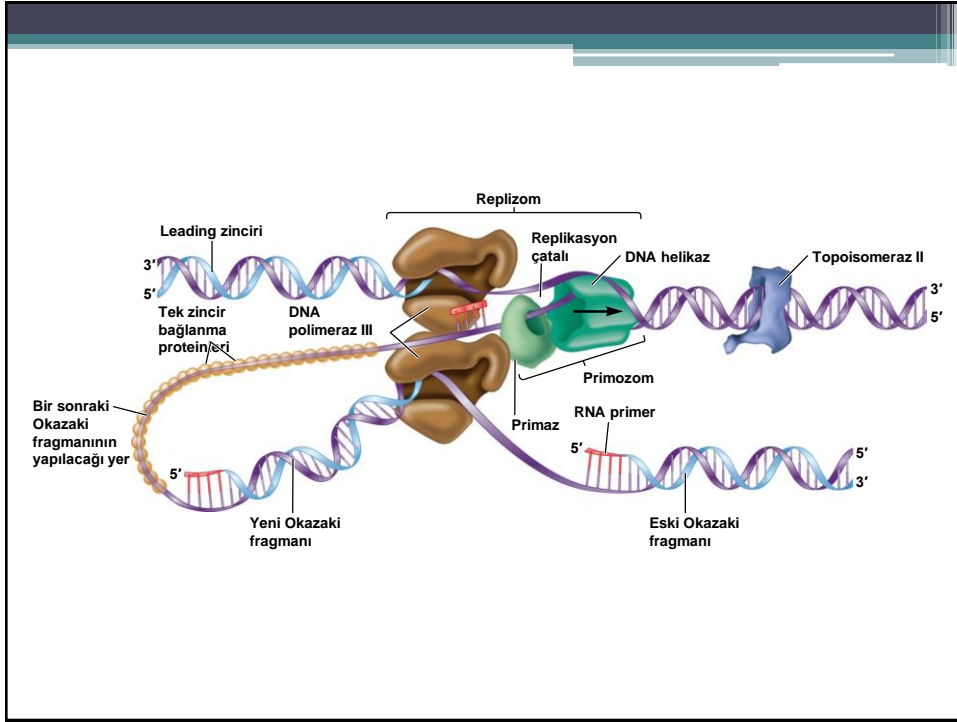
6 For the lagging strand, DNA synthesis is discontinuous and requires a series of RNA primers (shown in red). DNA is synthesized at the 3' end of each primer, generating an Okazaki fragment that grows until it meets the adjacent fragment. The RNA primer is then removed by the 5' \rightarrow 3' exonuclease activity of DNA polymerase I and replaced with DNA by the polymerase activity of the same enzyme.

Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

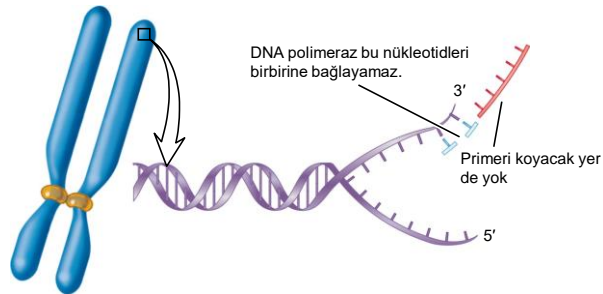
7 DNA ligase links together adjacent Okazaki fragments. Hereafter, DNA ligase, polymerase I, polymerase III, primase, DNA helicase, and DNA gyrase will be working simultaneously in the vicinity of the replication fork.

Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.



- DNA polimerazın iki sıra dışı özelliği vardır
 - 1. DNA sentezin sadece 5' → 3' yönünde yapar
 - 2. DNA sentezini başlatamaz
- Bu iki özellik linear kromozomların 3' uçlarında problem yaratır; zincirin ucu replike edilemez.



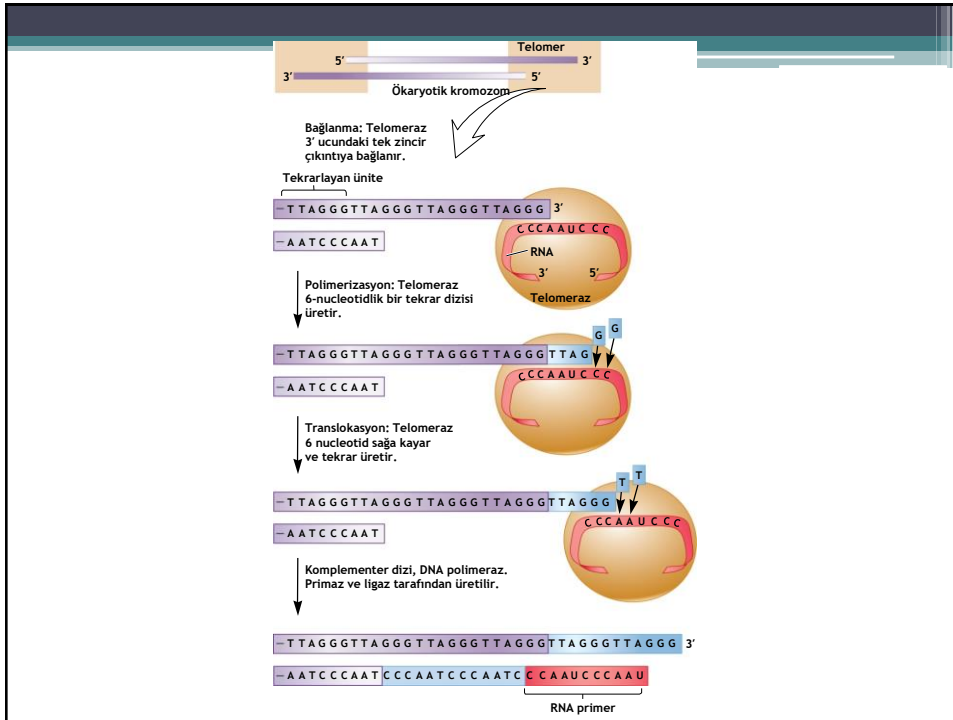


Table 19-1 Some Important DNA Replication Proteins in Bacteria and Eukaryotes

Protein	Cell Type	Main Activities and/or Functions
DNA polymerase I	Bacteria	DNA synthesis; 3' → 5' exonuclease (for proofreading); 5' → 3' exonuclease; removes and replaces RNA primers used in DNA replication (also functions in excision repair of damaged DNA)
DNA polymerase III	Bacteria	DNA synthesis; 3' → 5' exonuclease (for proofreading); used in synthesis of both DNA strands
DNA polymerase α (alpha)	Eukaryotes	Nuclear DNA synthesis; forms complex with primase and begins DNA synthesis at the 3' end of RNA primers for both leading and lagging strands (also functions in DNA repair)
DNA polymerase γ (gamma)	Eukaryotes	Mitochondrial DNA synthesis
DNA polymerase δ (delta)	Eukaryotes	Nuclear DNA synthesis; 3' → 5' exonuclease (for proofreading); involved in lagging and leading strand synthesis (also functions in DNA repair)
DNA polymerase ε (epsilon)	Eukaryotes	Nuclear DNA synthesis; 3' → 5' exonuclease (for proofreading); thought to be involved in leading and lagging strand synthesis (also functions in DNA repair)
Primase	Both	RNA synthesis; makes RNA oligonucleotides that are used as primers for DNA synthesis
DNA helicase	Both	Unwinds double-stranded DNA
Single-stranded DNA binding protein (SSB)	Both	Binds to single-stranded DNA; stabilizes strands of unwound DNA in an extended configuration that facilitates access by other proteins
DNA topoisomerase (type I and type II)	Both	Makes single-strand cuts (type I) or double-strand cuts (type II) in DNA; induces and/or relaxes DNA supercoiling; can serve as swivel to prevent overwinding ahead of the DNA replication fork; can separate linked DNA circles at the end of DNA replication
DNA gyrase	Bacteria	Type II DNA topoisomerase that serves as a swivel to relax supercoiling ahead of the DNA replication fork in <i>E. coli</i>
DNA ligase	Both	Makes covalent bonds to join together adjacent DNA strands, including the Okazaki fragments in lagging strand DNA synthesis and the new and old DNA segments in excision repair of DNA
Initiator proteins	Both	Bind to origin of replication and initiate unwinding of DNA double helix
Telomerase	Eukaryotes	Using an integral RNA molecule as template, synthesizes DNA for extension of telomeres (sequences at ends of chromosomal DNA)

Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.