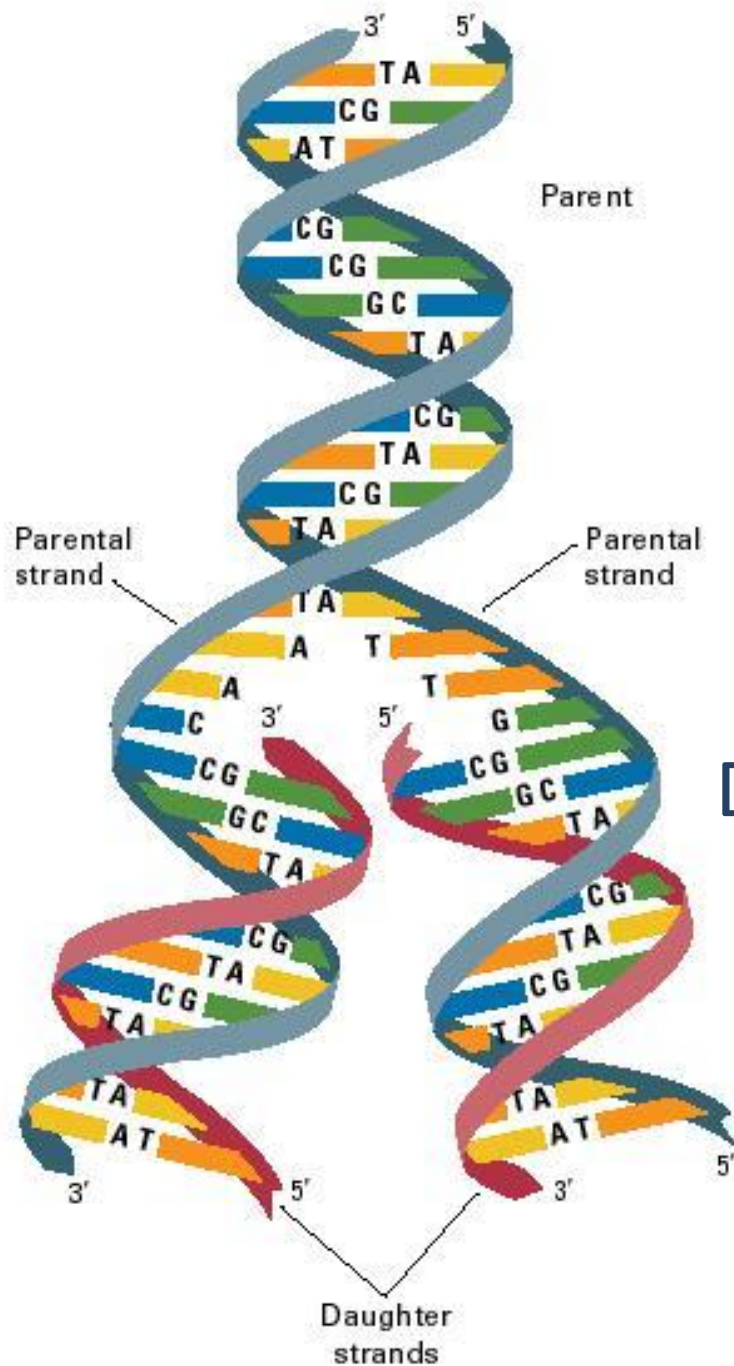
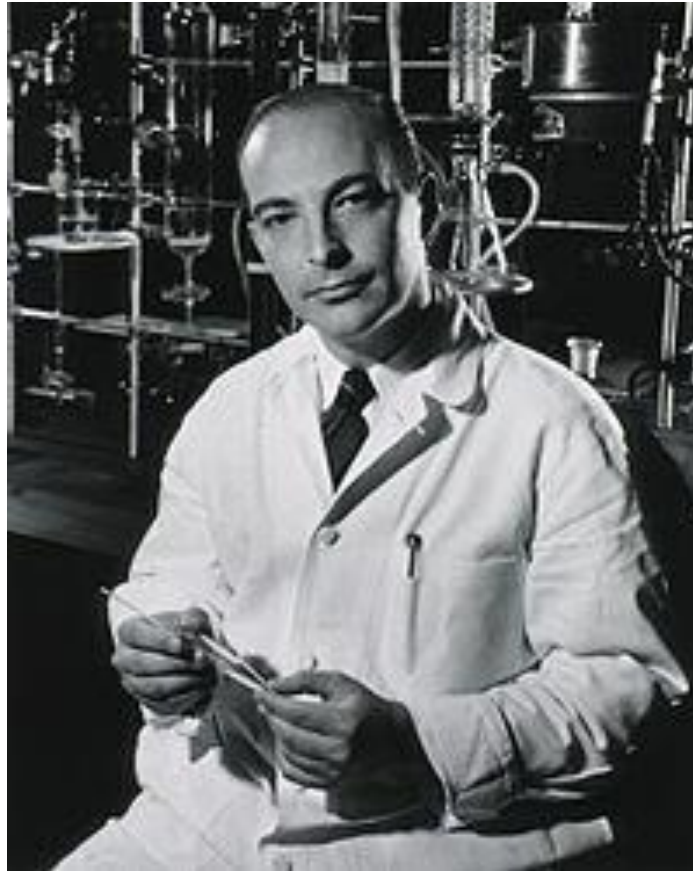




DNA REPLİKASYONU

Dr. Mahmut Cerkez Ergoren

Arthur Kornberg – 1959 Nobel Ödülü

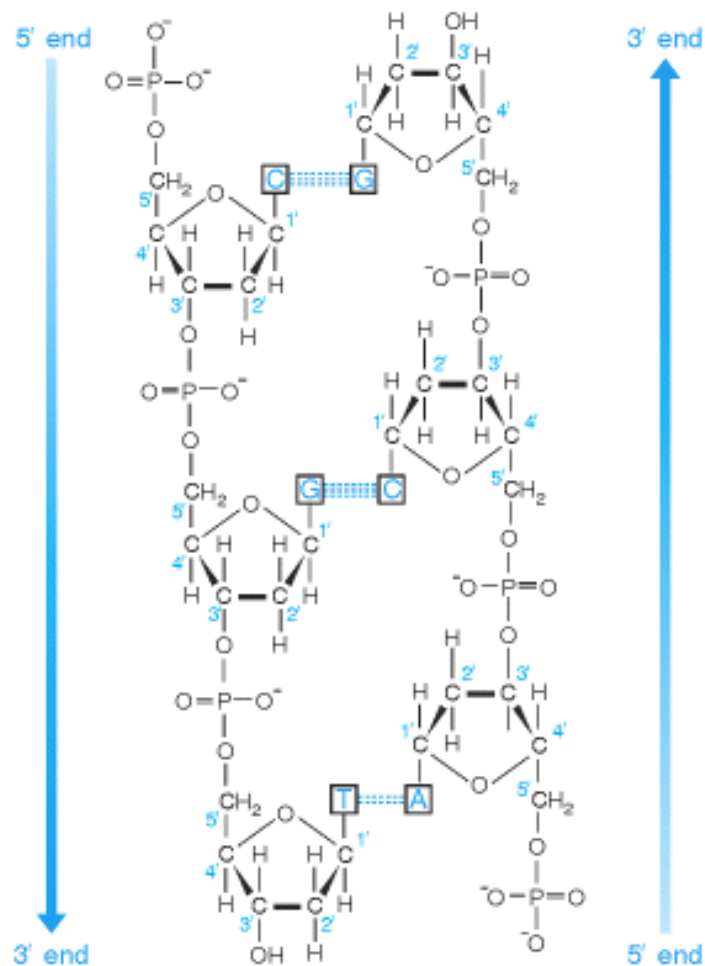


"the mechanisms in the biological synthesis of DNA"

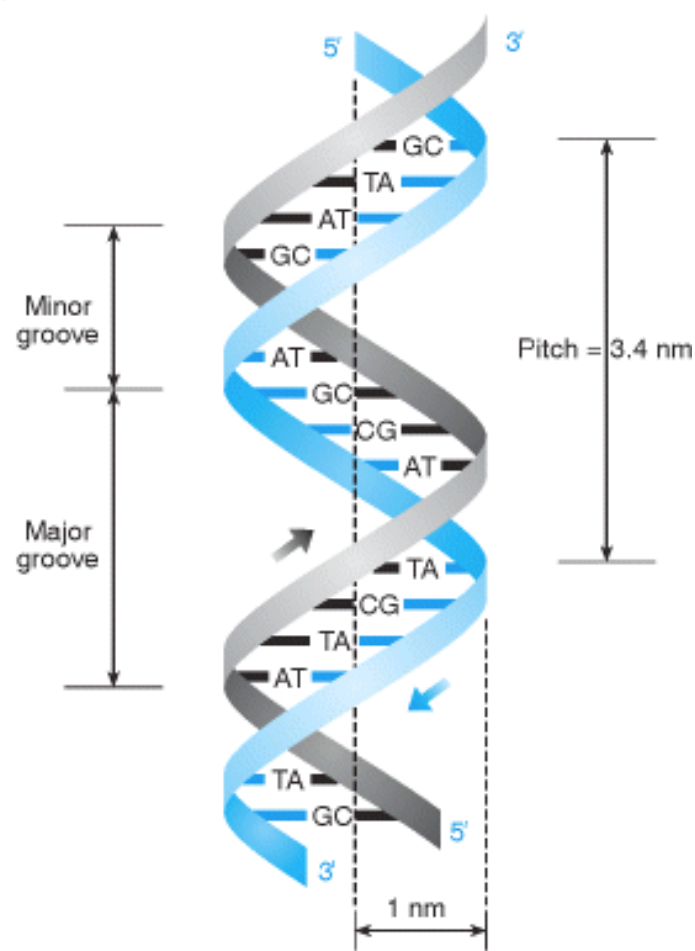
DNA Replikasyonu

- Replikasyon genetik materyalin tamamen kendi benzeri yeni bir molekül oluşturma işlemidir.
- DNA kendini eşleyebilen tek biyomoleküldür.
- Replikasyon sonrası ana DNA molekülü ile tüm nükleotid dizisi tamamen aynı olan DNA molekülü ortaya çıkar.
- Böylece DNA'da taşınan genetik bilgi her replikasyon olayı ile dölden döle aktarılır.

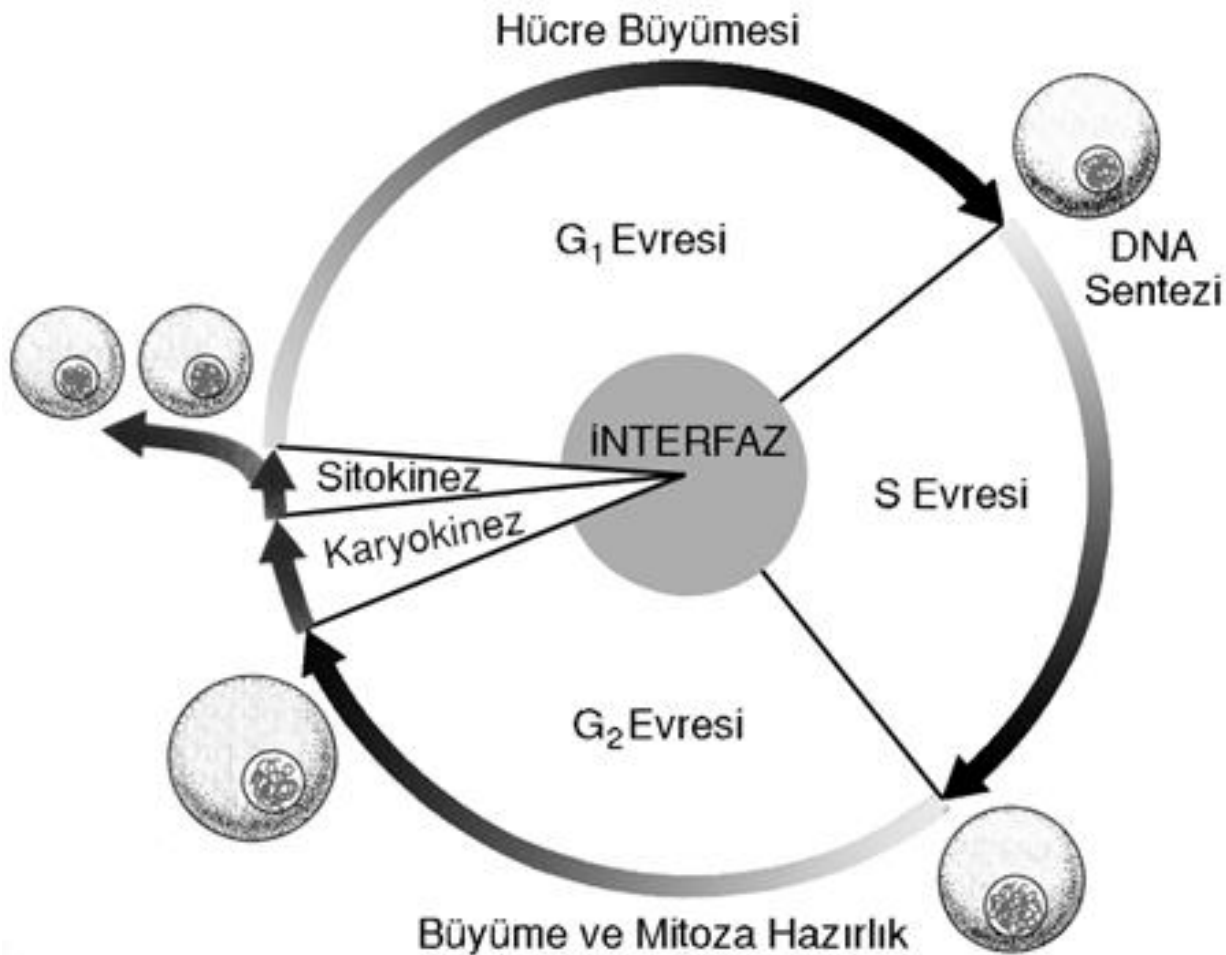
(A)



(B)

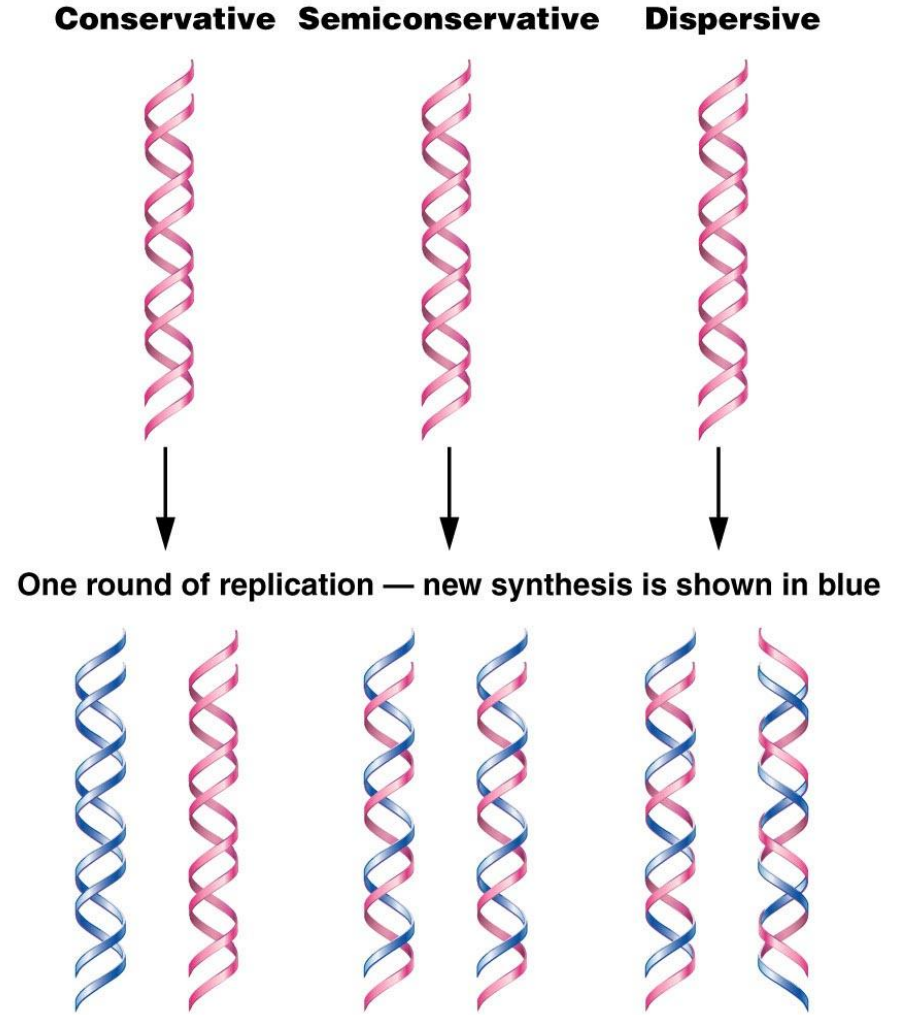


Ökaryotik hücrelerde DNA replikasyonu mitoz veya mayoz bölünmeye hazırlanan hücrelerin hücre döngüsünün **sentez (S)** fazında gerçekleşir.



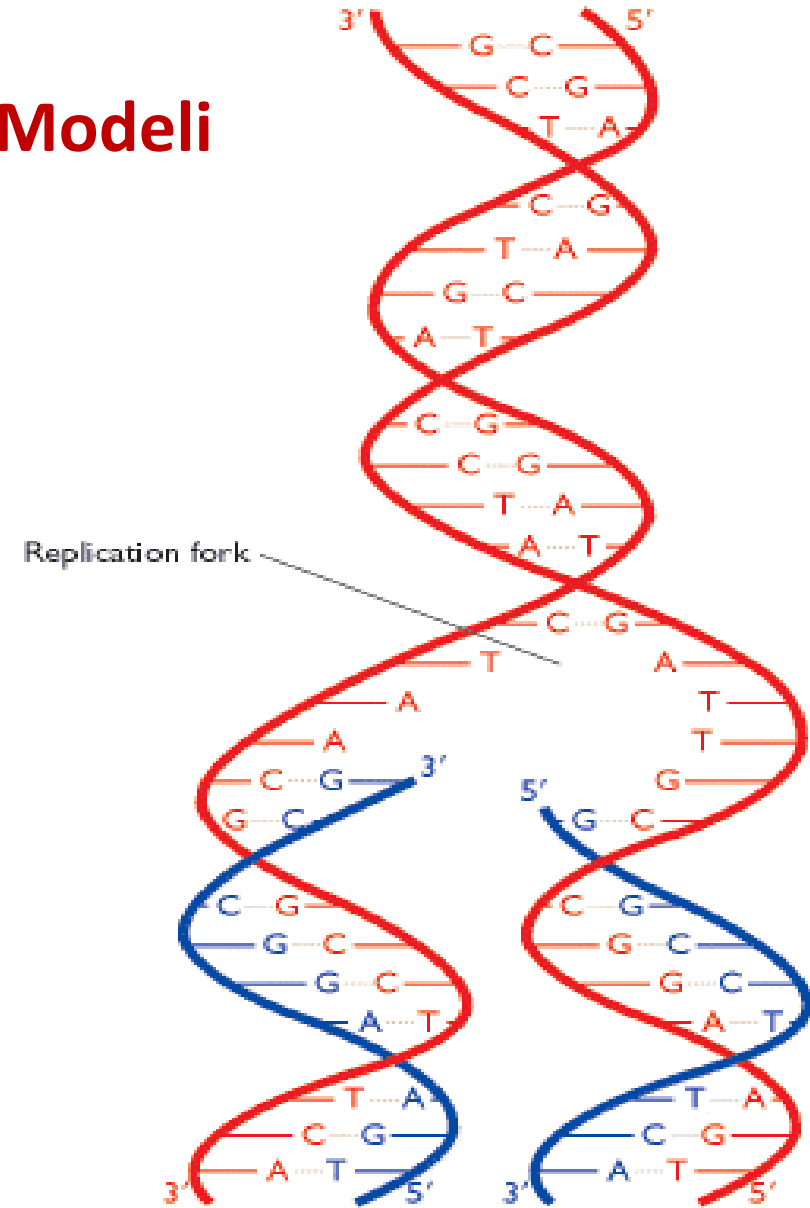
DNA replikasyonu için 3 teori ortaya atılmıştır:

- **Koruyucu (konservatif) replikasyon:** DNA orijinal eş modelinin oluşturulması
- **Yarı koruyucu (Semikonservatif):** DNA sarmalının ikiye ayrılması ve her bir zincirinin bir eşi sentezlenerek iki eşit sarmal DNA meydana gelmesi.
- **Dağıtım (Dispersif):** DNA'nın değişik yerlerinden parçalanarak kopyasının oluşturulması

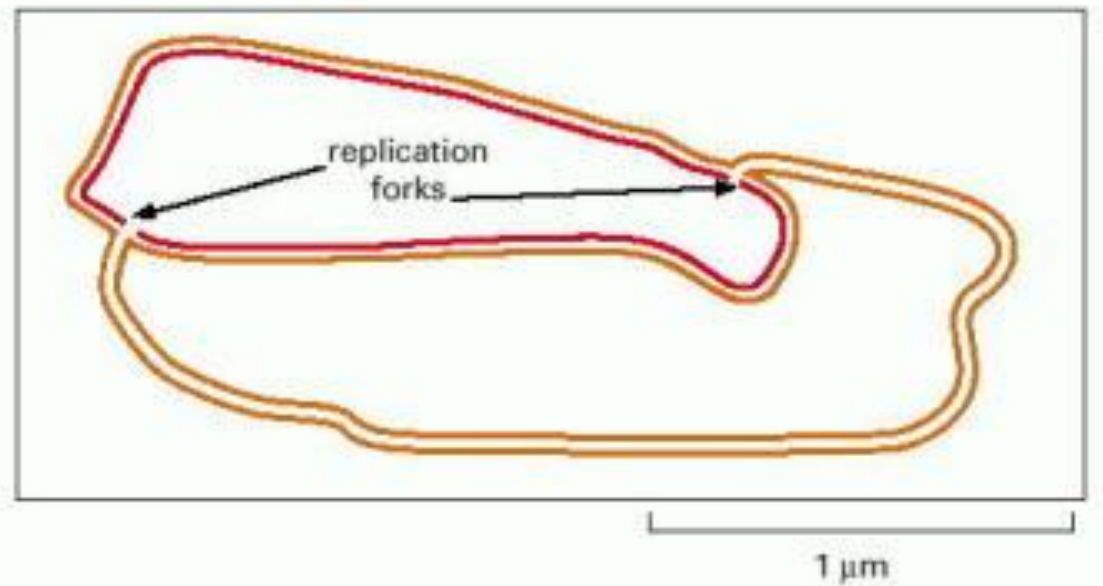
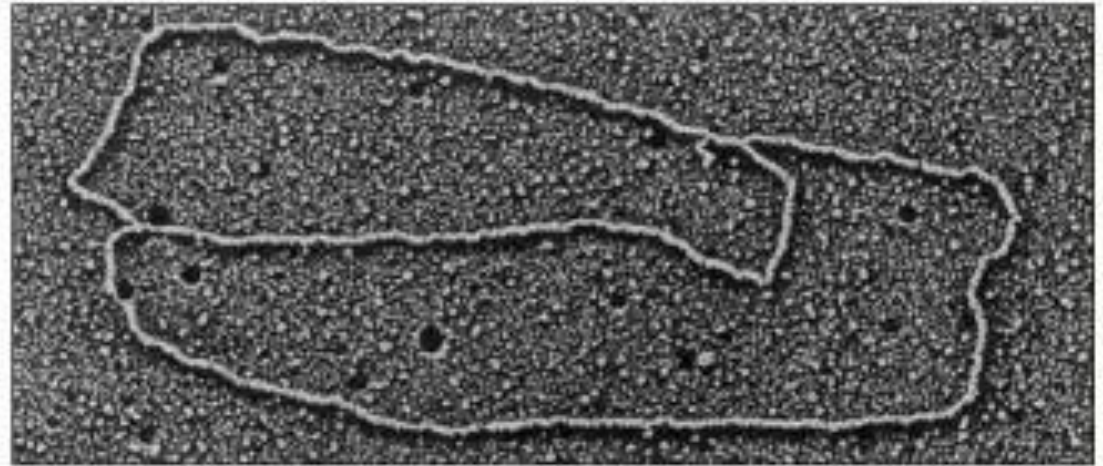
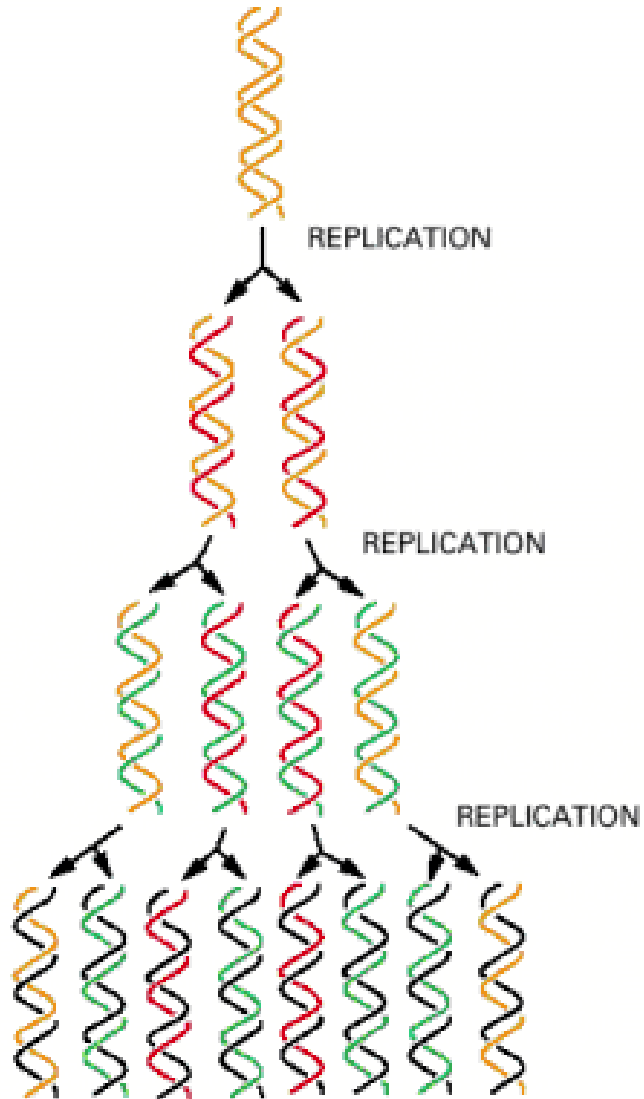


Yarı koruyucu DNA Replikasyon Modeli

- Bu model iki zincirli sarmal DNA'nın her bir ipliğinin kalıp görevi yaparak kendine yeni bir eş DNA ipliği oluşturmaları işlemidir.
- Böylece bir ana molekülden yeni oluşan her bir yavru molekül, ana DNA'nın bir zincirini taşıyacaktır

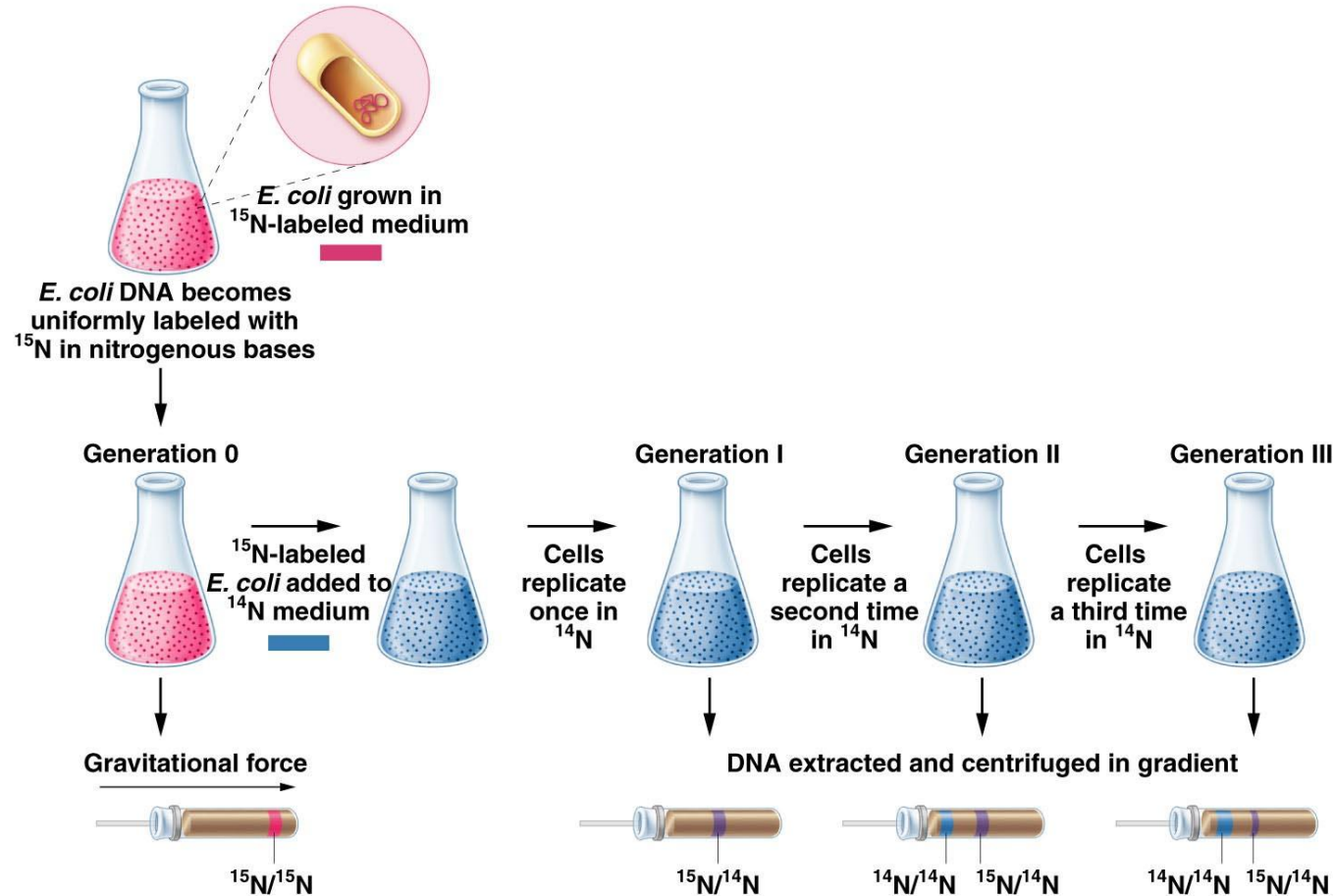


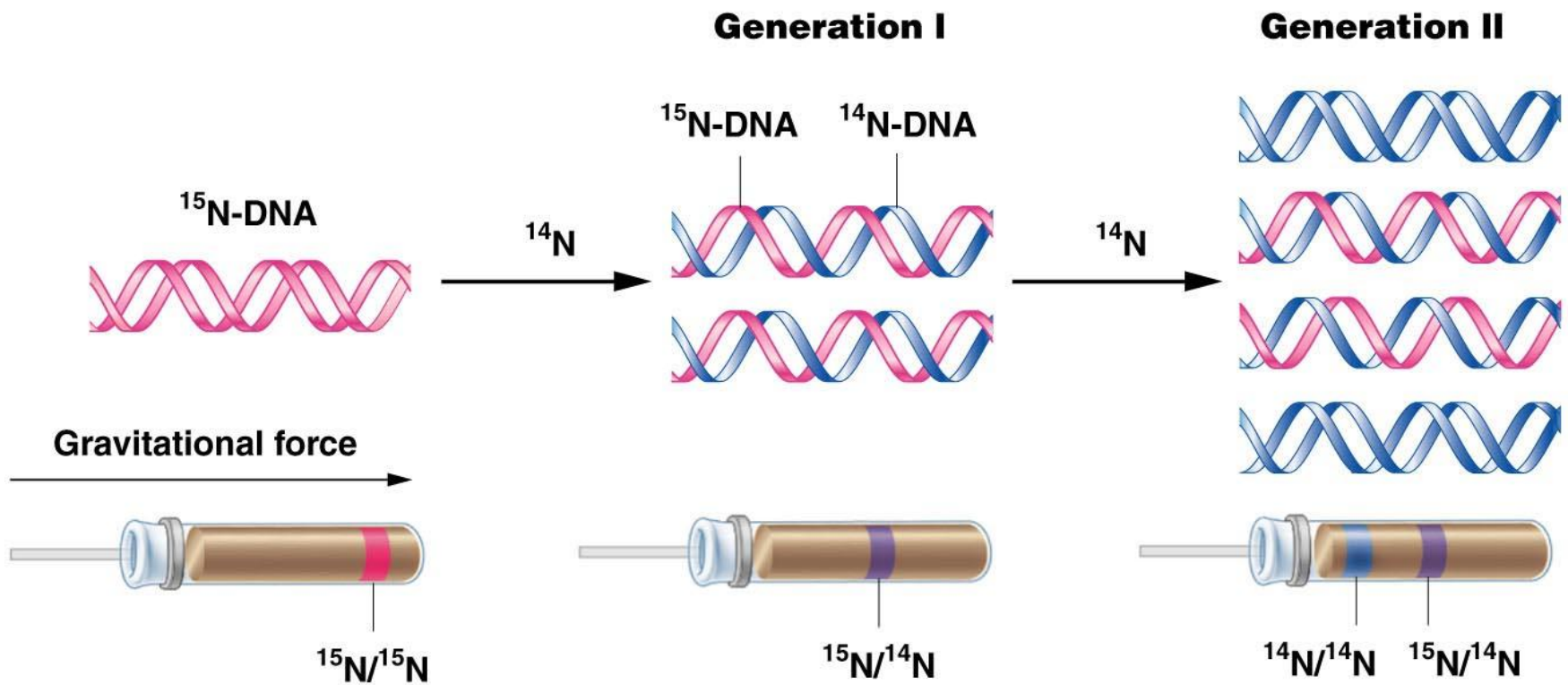
Yarı koruyucu DNA oluşumu



DNA'nın yarı koruyucu tipte bir replikasyon gerçekleştirdiğinin kanıtlanması

Meselson ve Stahl (1958) deneyleri





DNA Replikasyonunun Temel Mekanizmaları:

Hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde replikasyonun temel mekanizmaları aynıdır:

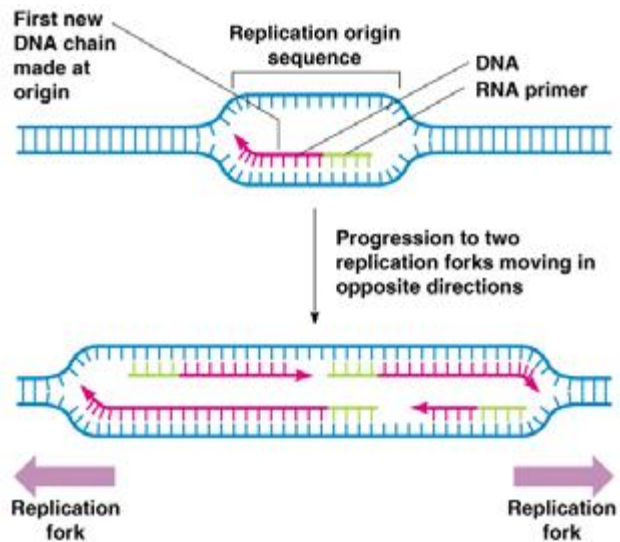
- a) Replikasyon başlangıç noktalarının (replikasyon orijini) tayini
- b) DNA çift ipliğinin çözülmesi
- c) Replikasyon çatalının oluşması

a) Replikasyon başlangıç noktalarının tayini

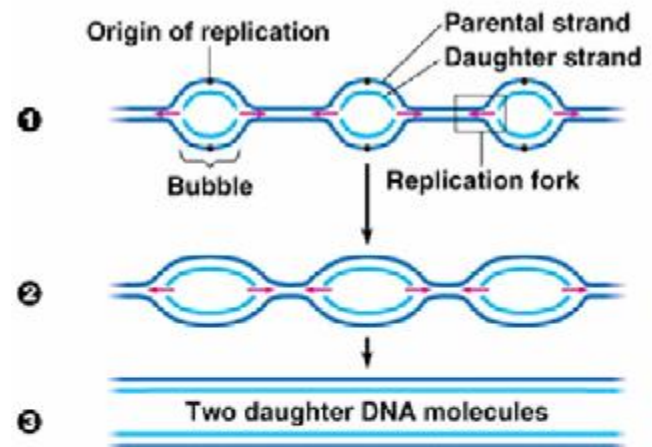
- Replikasyonun gerçekleştiği genom birimine **replikon** denir.
- Her replikonda bir başlangıç ve bir bitiş noktası vardır.
- Prokaryotlarda dairesel DNA da **bir** başlangıç ve bir bitiş noktası,
- Ökaryotik hücrede ise **çok** sayıda başlangıç ve bitiş noktaları vardır.

- E. coli'de replikasyon 245 bç uzunluğunda olan ve **oriC** olarak adlandırılan tek bir orijinden başlamaktadır. Bakteri ve bakteriyofajlarda replikasyon tek bir noktadan başladığından kromozomun **tümü** replikondur.
- Ökaryotlarda birden çok replikasyon orijini (maya 250-400, memelilerde 25.000'den fazla replikon) bulunur.

Çünkü, daha fazla DNA içerirler ve DNA polimerazların sentez hızı bakterilerdekinden daha düşüktür.

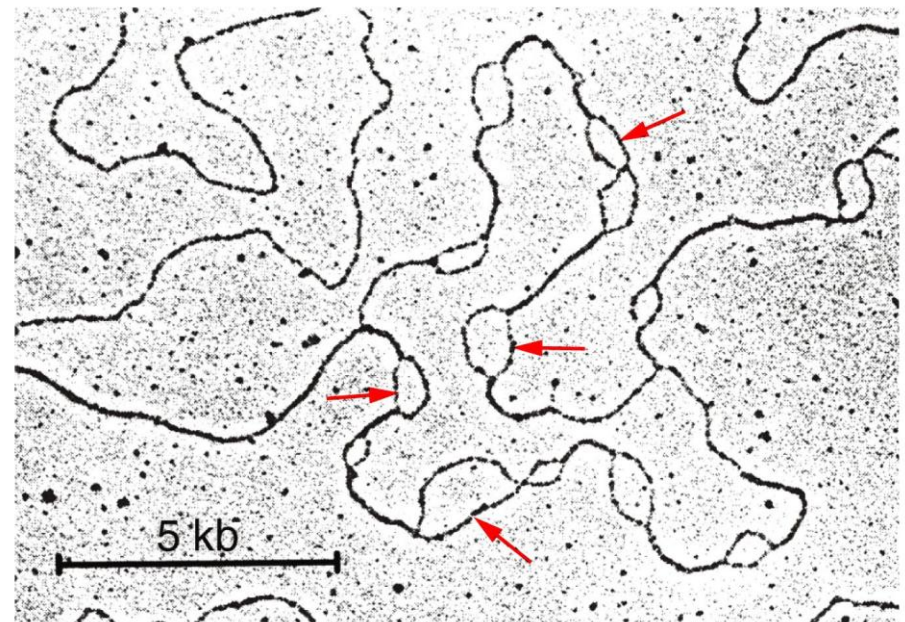
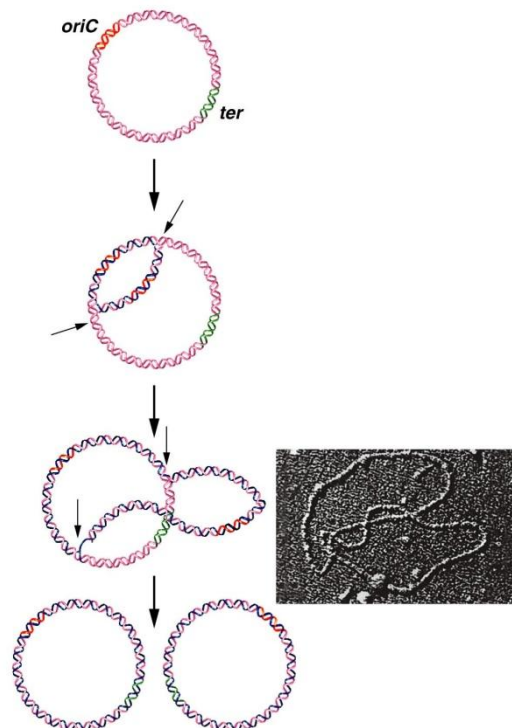


IL Genetics: Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

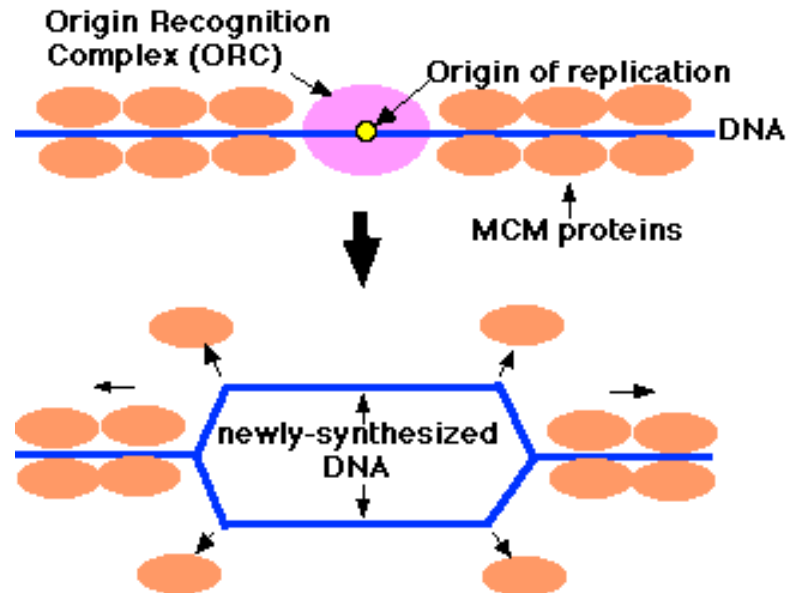


(a) In eukaryotes, DNA replication begins at many sites along the giant DNA molecule of each chromosome.

Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

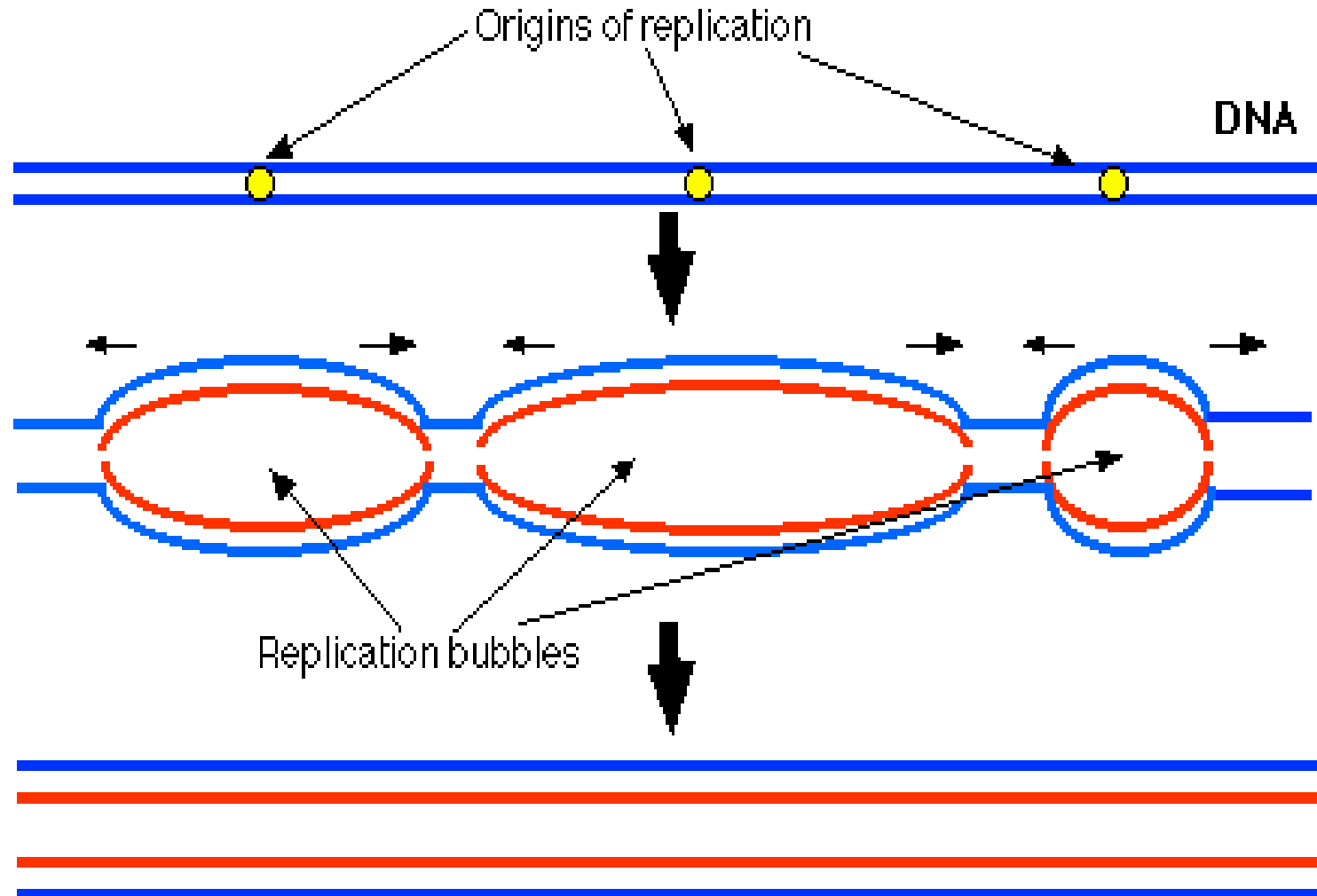


- Başlangıç noktaları özel nükleotid dizilerinden oluşur (A ve T'den zengin tekrarlayan nükleotid dizileri)
- ve “diziye özel olan DNA ya bağlanan proteinler = **başlatıcı proteinler**” tarafından tanınır.
- Bu proteinlerin başlangıç noktalarına bağlanması ile replikasyonun ilk adımı atılır.



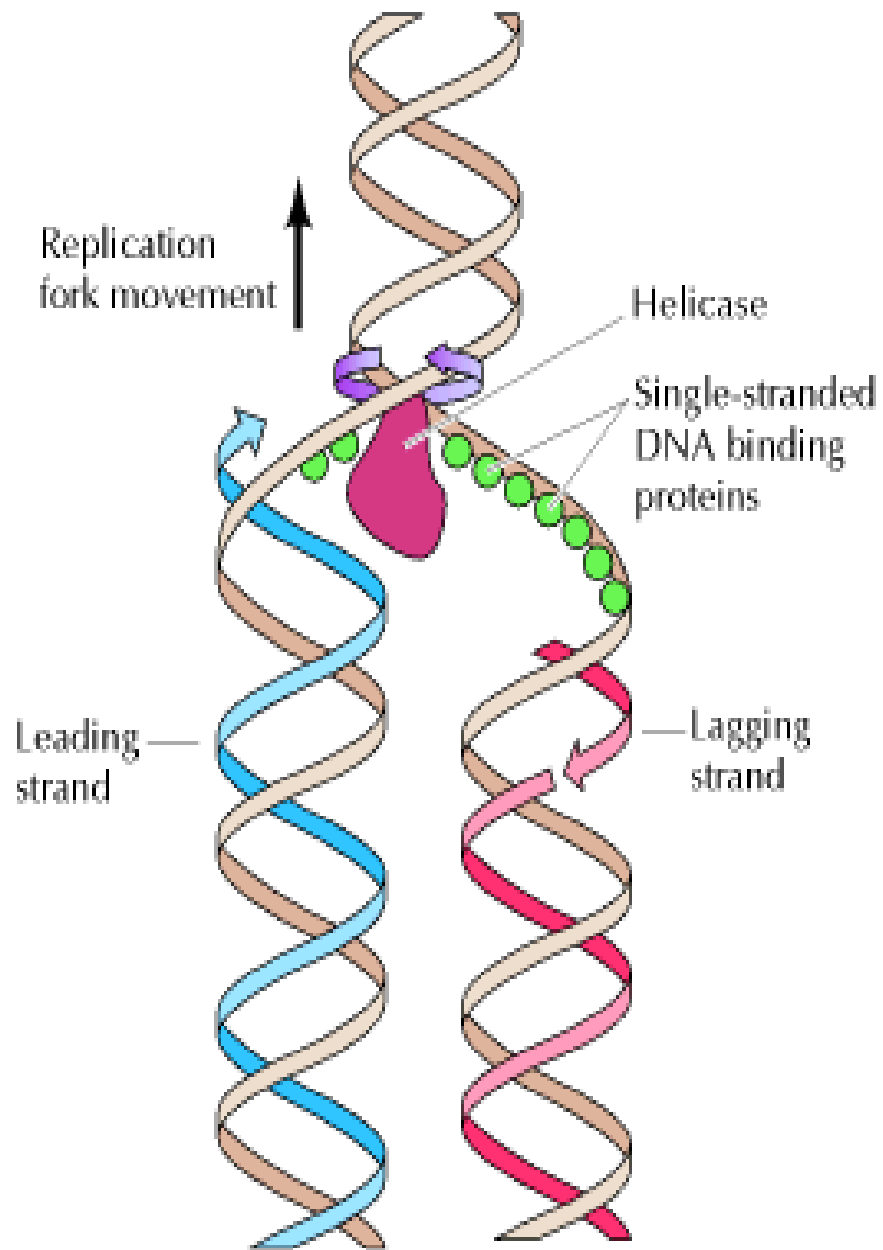
Ökaryotlarda her bir başlangıç noktası arasında 30-300 kilobazlık bir mesafe bulunur.

(1 kilobaz=1000 baz).



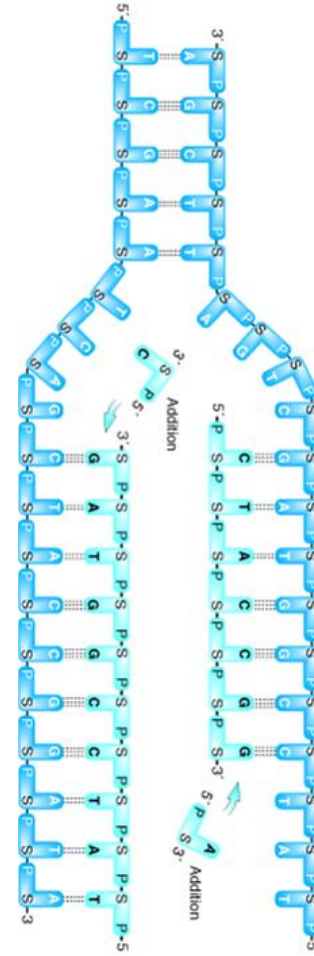
b) DNA çift ipliğinin çözülmesi

- Replikasyonun başlayabilmesi için DNA çift zincirinin sarmal yapısının çözülmesi gereklidir
- Çözülme işlemi, başlatıcı protein kompleksinde yer alan **DNA helikazlar** ile gerçekleştirilir.



c) Replikasyon çatallının oluşması

- Helikaz aktivitesi ile açılan çift zincirde replikasyonun olduğu bölgeye **replikasyon çatalı** denir.
- Replikasyon olayı “replikasyon çatalı”nın ana DNA molekülü boyunca ilerlemesi ile gerçekleşir.



Replikasyon çatalında ve replikasyonda görevli moleküller:

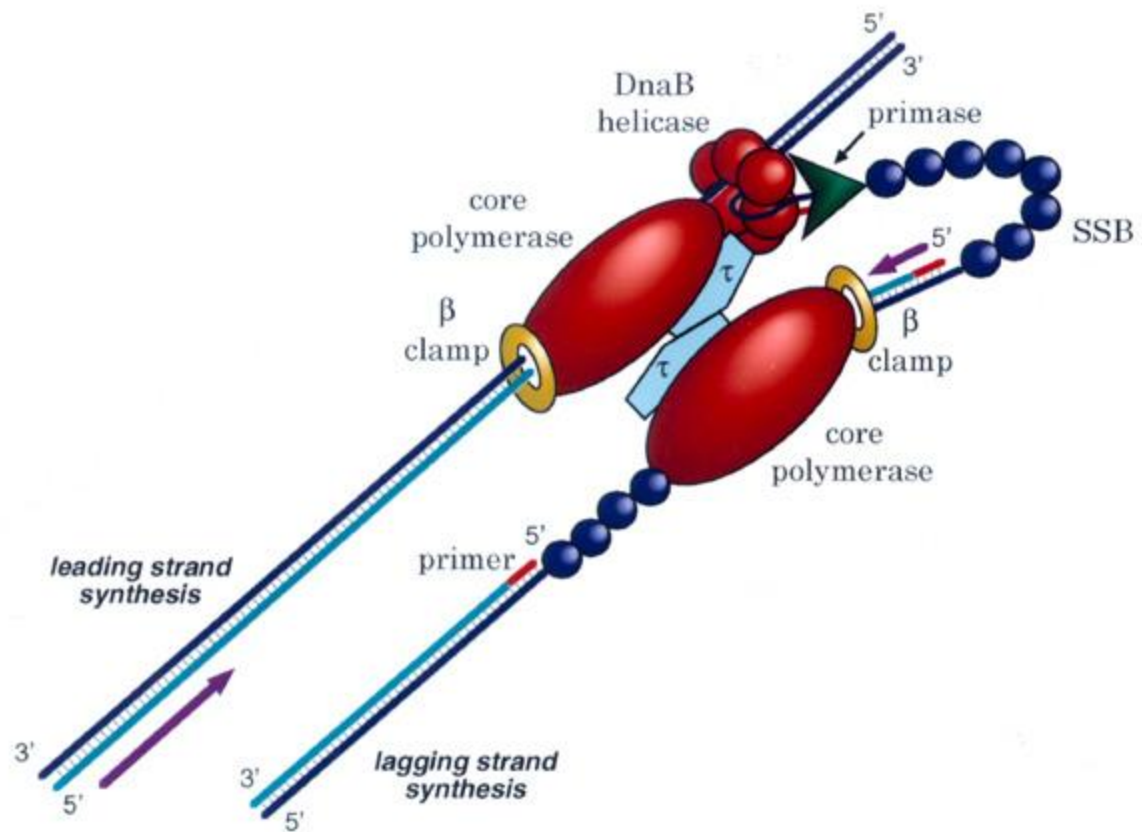
- **DNA helikaz,**
 - DNA sarmalını çözen enzim
- **Primaz,**
 - DNA sentezinin başlayabilmesi için gerekli olan **RNA primerlerini** (RNA öncül molekül) sentezleyen enzim
- **DNA Polimerazlar,**
 - Kalıp zincire komplementer yeni DNA zincirini sentezleyen enzim
- **Tek zincir bağlayıcı (SSB) proteinler,**
 - Replikasyon çatalının sürekliliğini sağlayan, tek DNA ipliğine bağlanarak katlanmayı önleyen proteinler

DNA Polimerazlar

- 1955: Arthur Kornberg E.Coli'de DNA polimeraz I ve DNA sentez mekanizmasını keşfetti.
- DNA polimeraz: DNA sentezleyen enzim
 - Prokaryotik Pol I-IV
 - Ökaryotik α , β , δ , γ , ϵ ve ζ
- Pol I ilk bulunan tip.
 - Esas sentez enzimi değil.
 - RNA primeri uzaklaştırır ve oluşan boşlukları doldurur.
 - 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi
 - Yeni sentezlenen DNA zincirinde, bazların doğru eşleşip eşleşmediğini kontrol eder ve hataları keserek düzeltir. (Hata okuma: Proof reading)
 - 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi

DNA Polimerazlar

- Pol II, IV ve V hata onarıcı enzimler.
- Pol III replikasyonun esas enzimidir.
 - Holoenzim olarak adlandırılan aktif formu, iki takım, 10 farklı polipeptit zincirinden meydana gelmiş bir dimerdir.
 - Core (çekirdek) enzim holoenzimin sentez yapan kısmıdır.
 - γ kompleks olarak adlandırılan ikinci bölgede 5 alt birim bulunur ve replikasyon çatalında enzimin kalıba oturtulmasında görev alır.
 - β alt birimi, polimerizasyon sırasında enzimin kalıptan kopmamasını sağlar.
 - Π (pi), iki çekirdek polimerazın, replikasyon çatalında bir arada tutunmasını sağlar.



DNA polymerase III

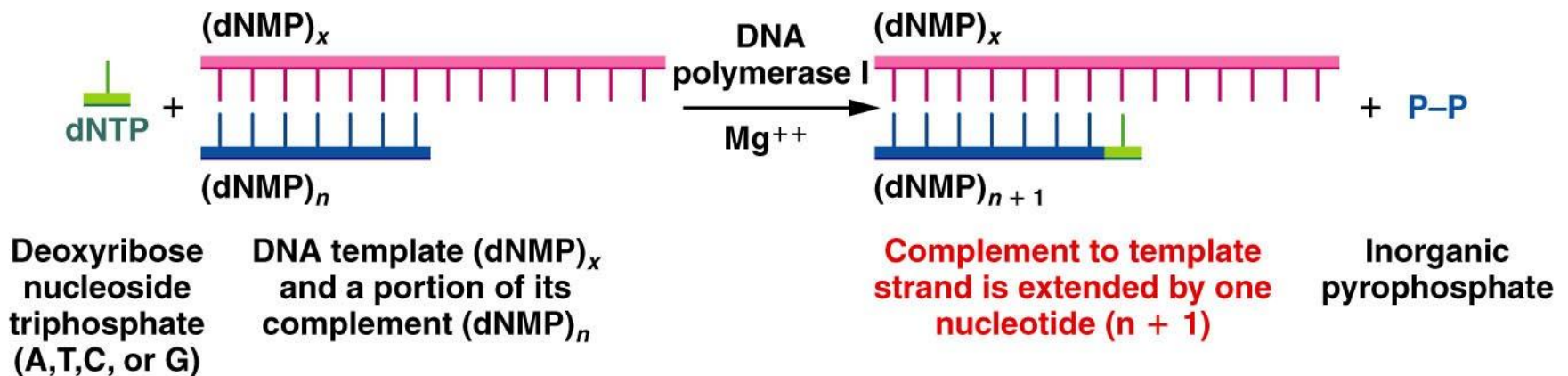
TABLE 11.3

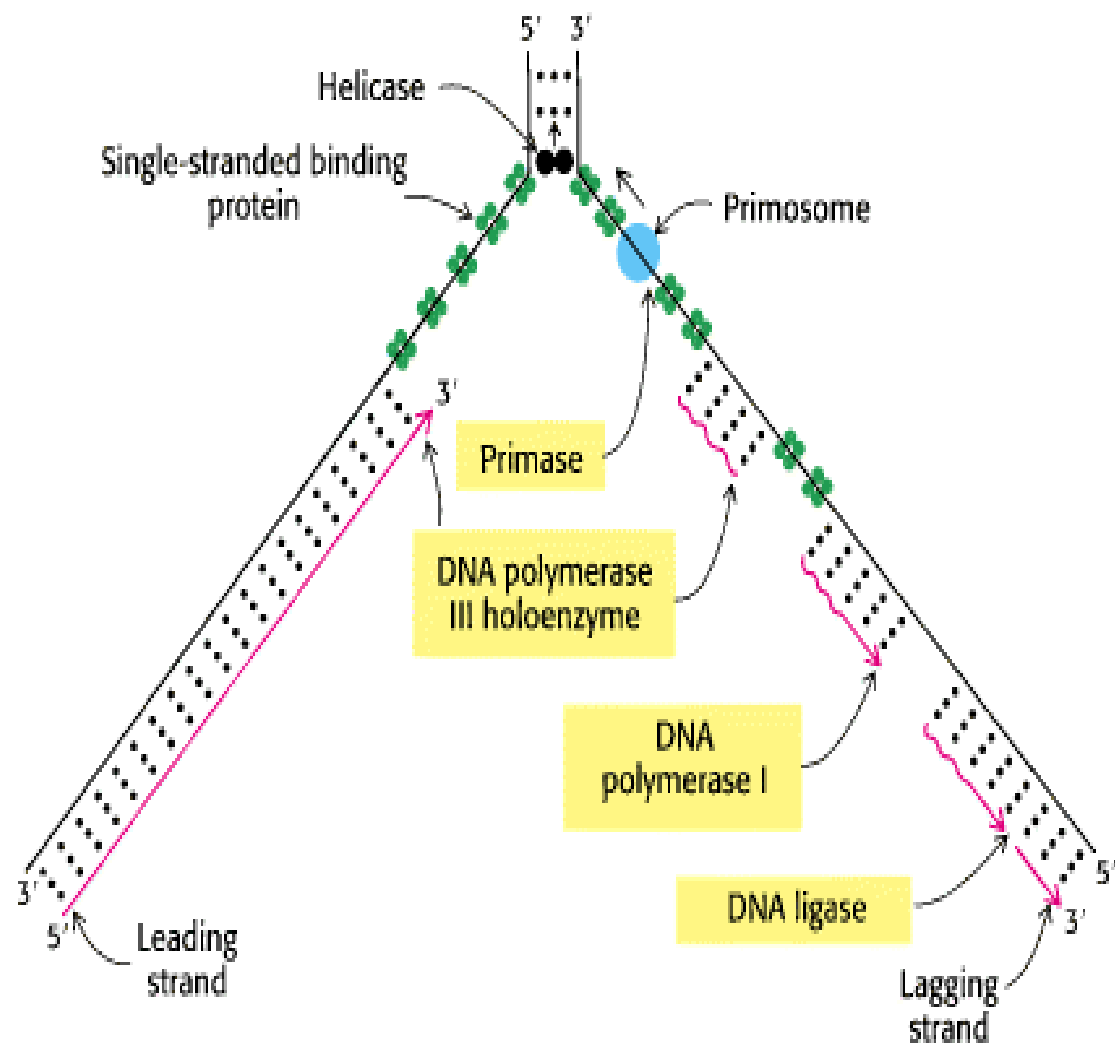
Subunits of the DNA Polymerase III Holoenzyme

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

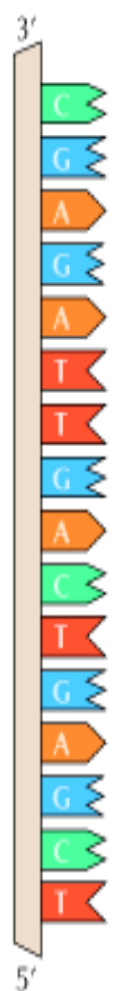
DNA polimerazların sentez yapabilmesi için;

- Zincirin 5'-3' yönde ilerleyebilmesi için DNA molekülünün 3'OH ucu boş olmalı
- Kalıp bir DNA olmalı
- Ortamda 3'OH'a ilave olacak dNTP'ler olmalı
 - (dATP, dCTP, dGTP, dTTP= dNTP)

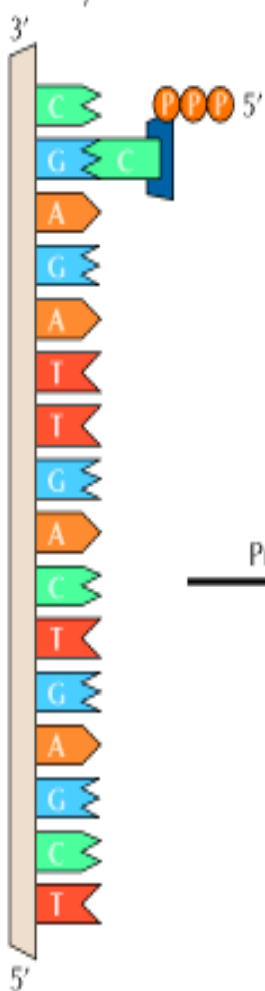




Template
DNA



Initiation of
RNA synthesis



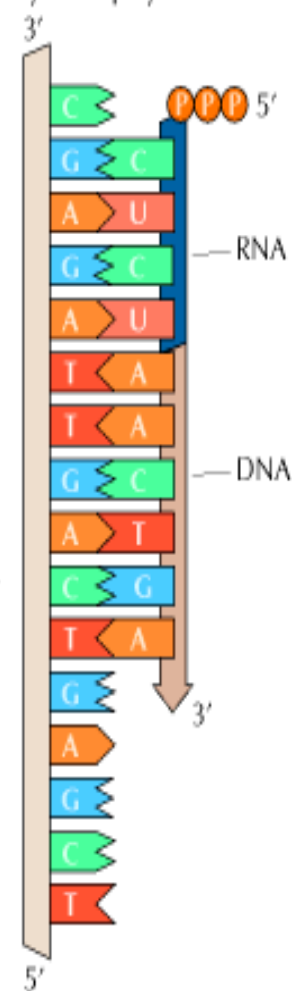
Primase

Synthesis of
RNA primer



DNA polymerase

Extension of RNA primer
by DNA polymerase



DNA replikasyon yönü (yeni sentezlenen zincirin yönü) $5' \rightarrow 3'$ ucuna doğrudur.

DNA sentezi her iki zincirde $5' \rightarrow 3'$ yönünde ve eş zamanlı ilerler.

Bunun için replikasyon çatalında iki farklı sentez tipi ortaya çıkar.

1- Kesintisiz iplik (DNA) sentezi (leading strand)

($3' \rightarrow 5'$ kalıbına uygun sentez)

Zincir $3' \rightarrow 5'$ yönünde okunur, $5' \rightarrow 3'$ yönünde sentezlenir.

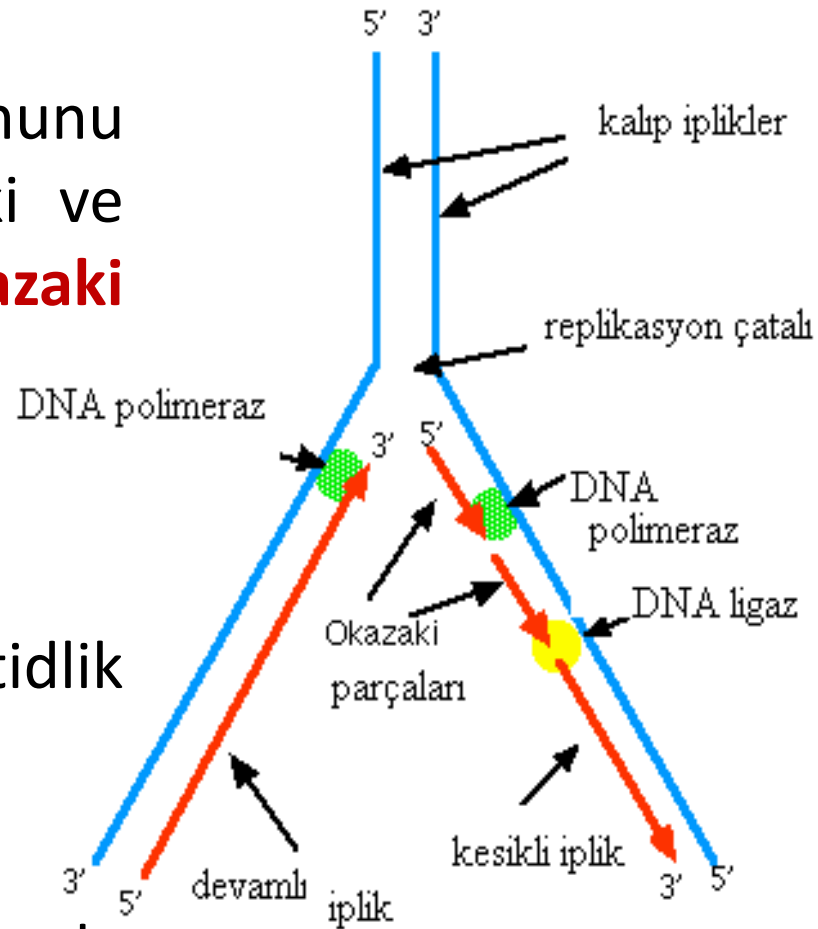
2- Kesintili iplik (DNA) sentezi (lagging strand)

($5' \rightarrow 3'$ kalıbına göre yapılan sentez)

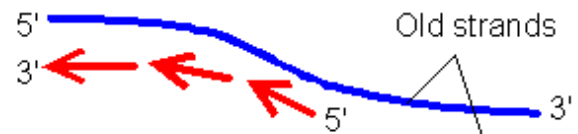
- Kesintili DNA zincirlerinin oluşumunu deneysel olarak gösteren Okazaki ve ark.(1968) dan dolayı bunlara **Okazaki Parçaları** adı verilmiştir.

(ökaryotlarda 100-200 nukleotidlik parçalar)

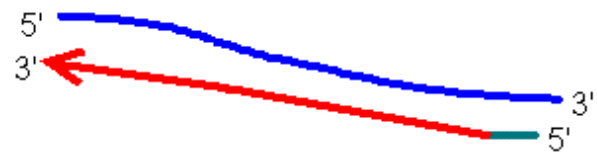
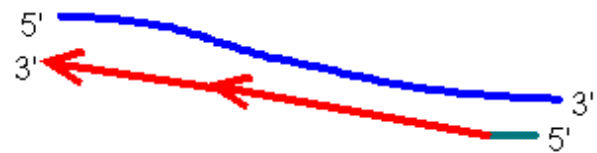
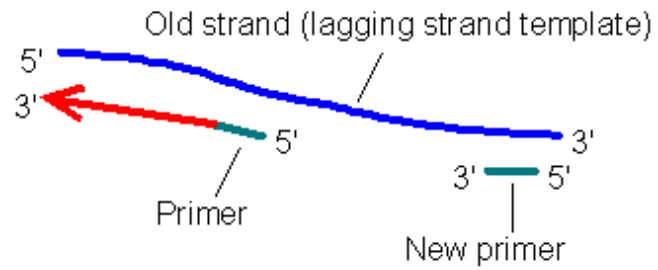
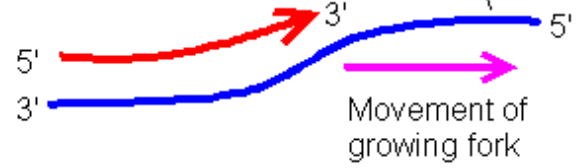
- Her bir Okazaki parçasında başlangıcında **RNA primerleri** bulunmaktadır.

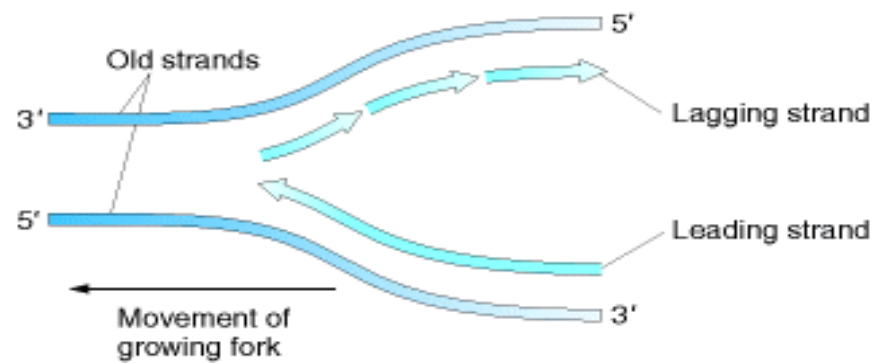
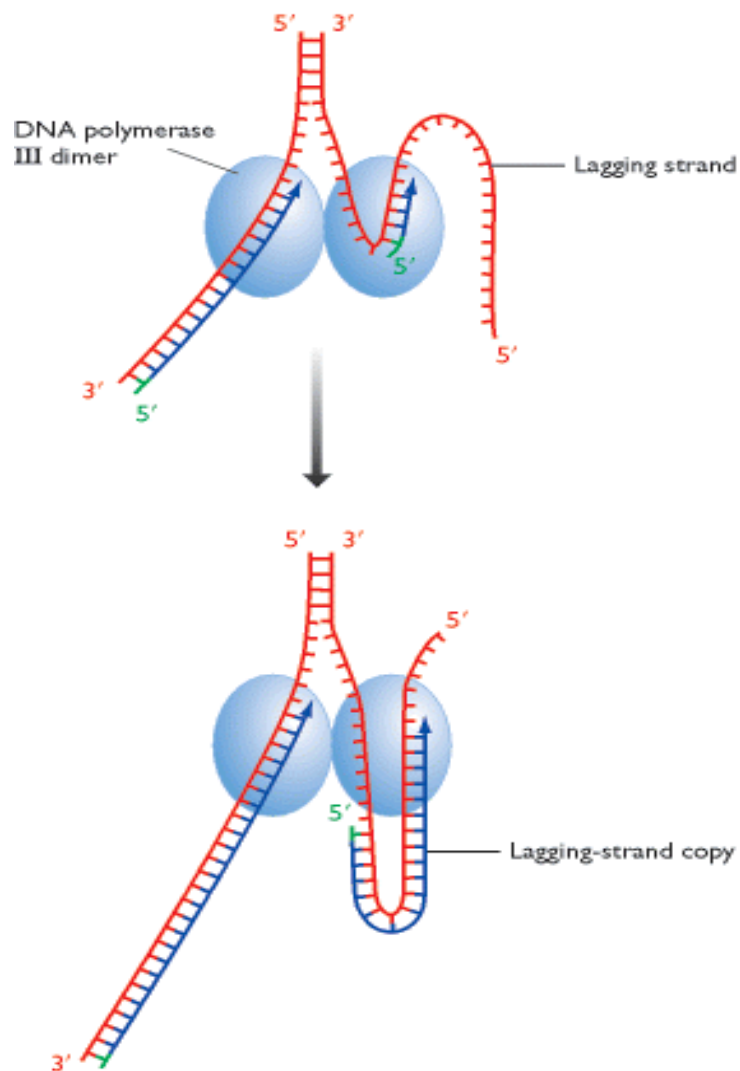


Kesintili zincir

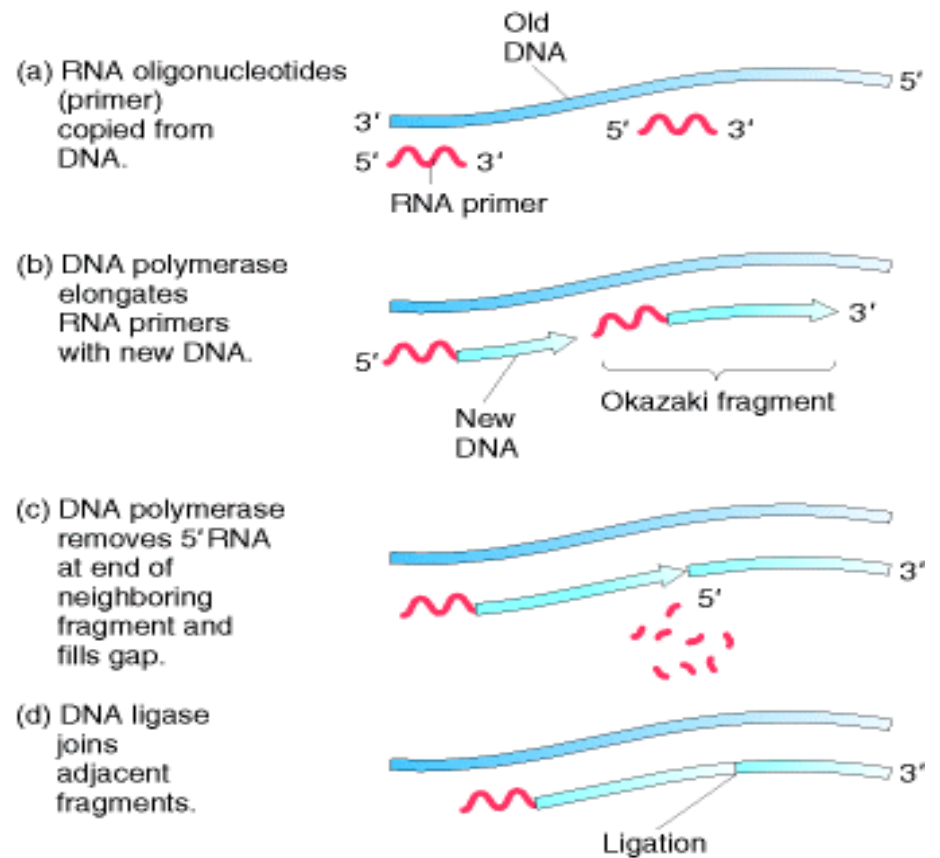


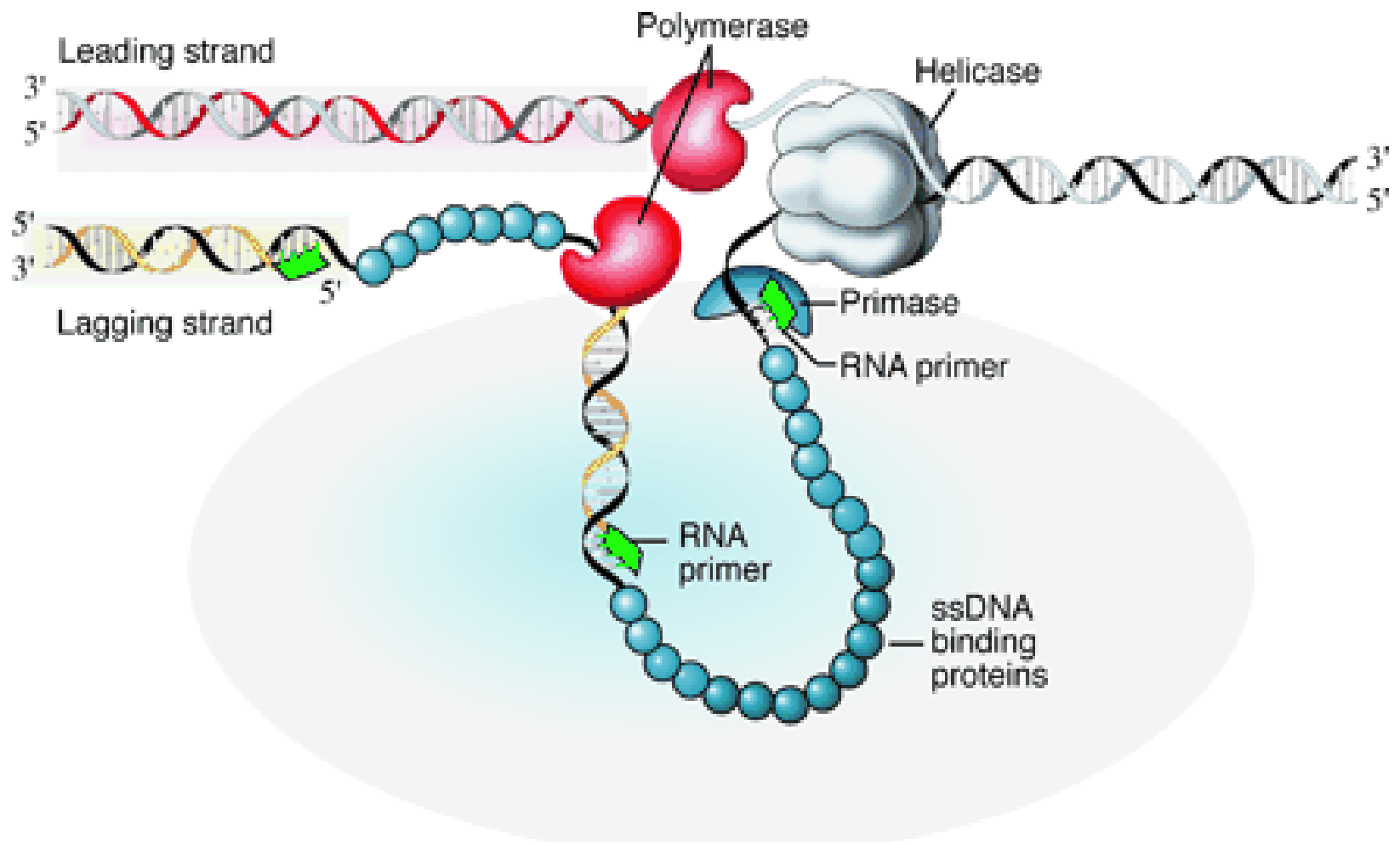
Kesintisiz zincir





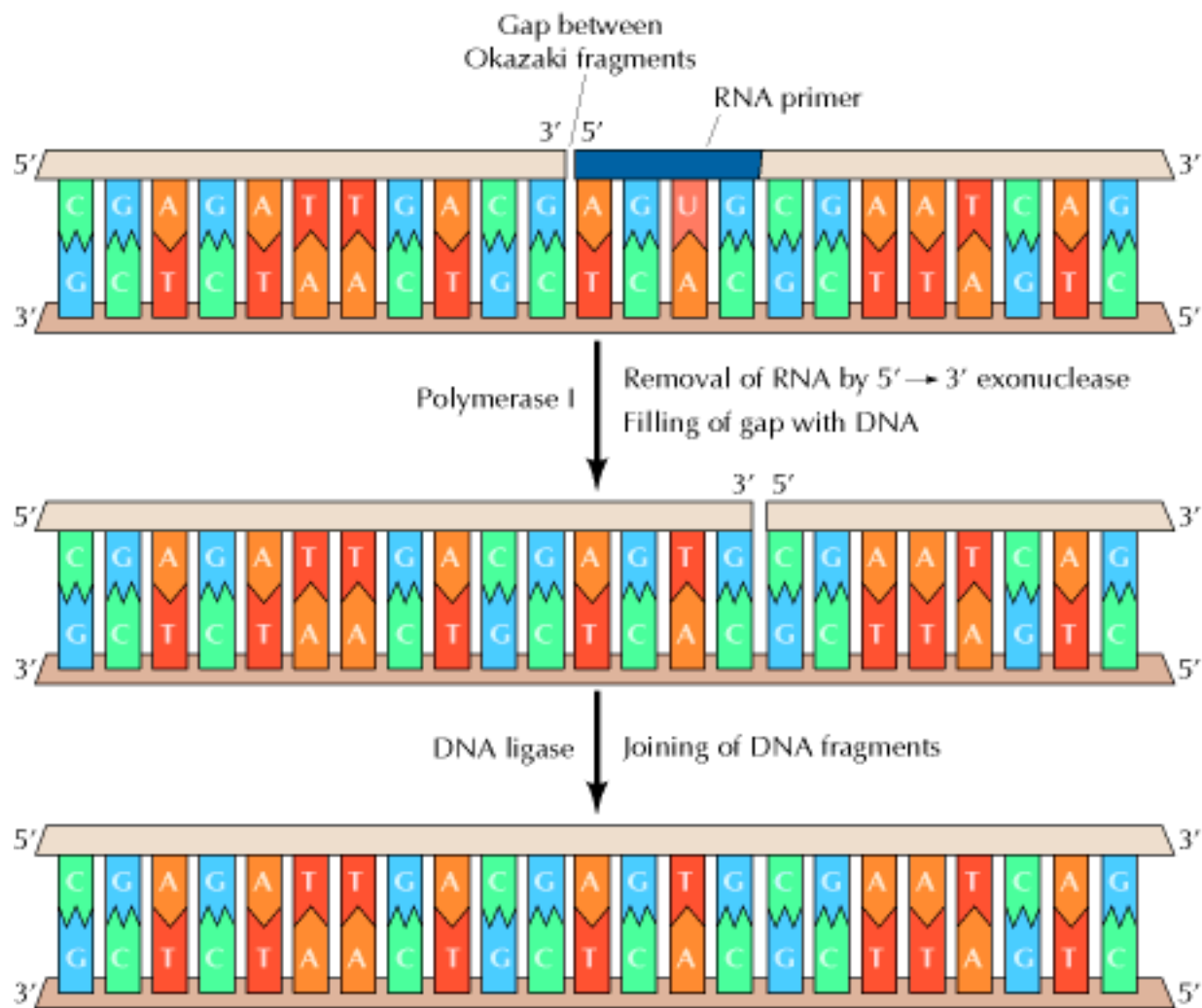
Lagging-strand synthesis





DNA replikasyonu

- Replikasyon ilerledikçe **DNA Polimeraz I** tarafından RNA primerleri kesilip çıkarılarak ortaya çıkan boş alanlar kalıp DNA ya uygun olarak sentezlenir.
- İki DNA ucu **ligaz** enzimi ile birleştirilerek bir bütün DNA ipliği oluşur.



Ökaryotlardaki DNA polimerazlar

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	Mitochondrion	Nucleus
3'–5' Exonuclease Activity	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Essential to Nuclear Replication	Yes	No	Yes	Yes	No	No

DNA polimeraz α , δ ve ϵ ökaryotik çekirdek DNA'sı replikasyonu için gereklidir.

DNA polimeraz β ve ζ DNA tamirinde rol aldığı düşünülmektedir.

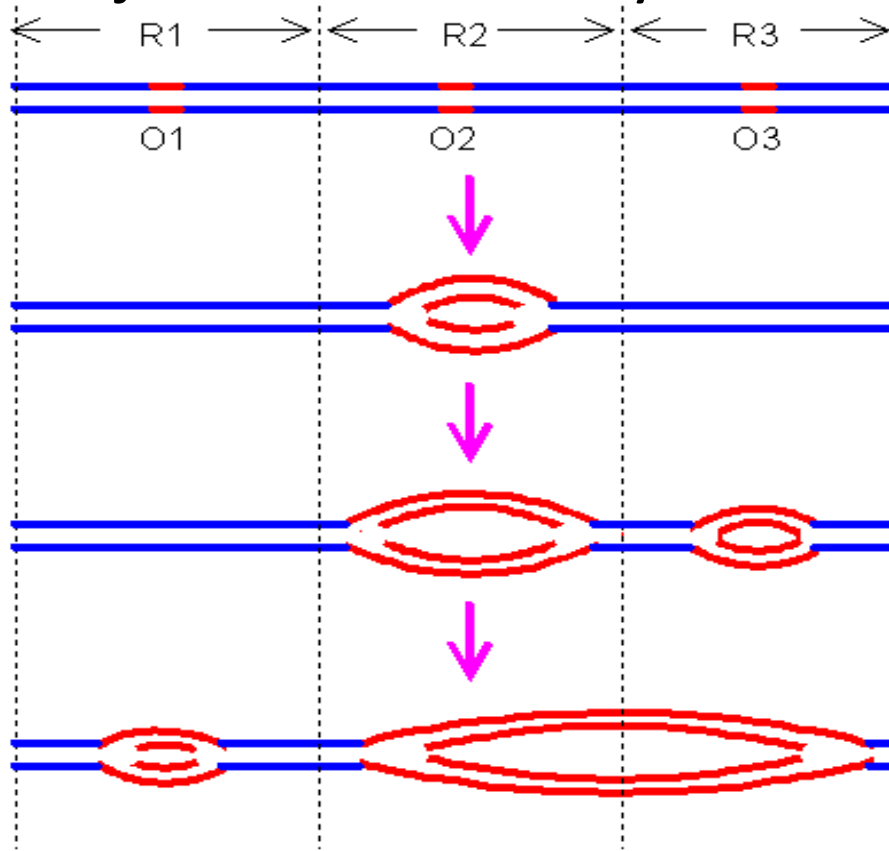
DNA polimeraz γ mtDNA sentezinde rol alır.

Ökaryotlarda DNA molekülünün prokaryotlardan daha büyük olması ve **histon** proteinleri ile kromatin yapı oluşturmaları nedeniyle farklı sentez aşamaları gözlenir.

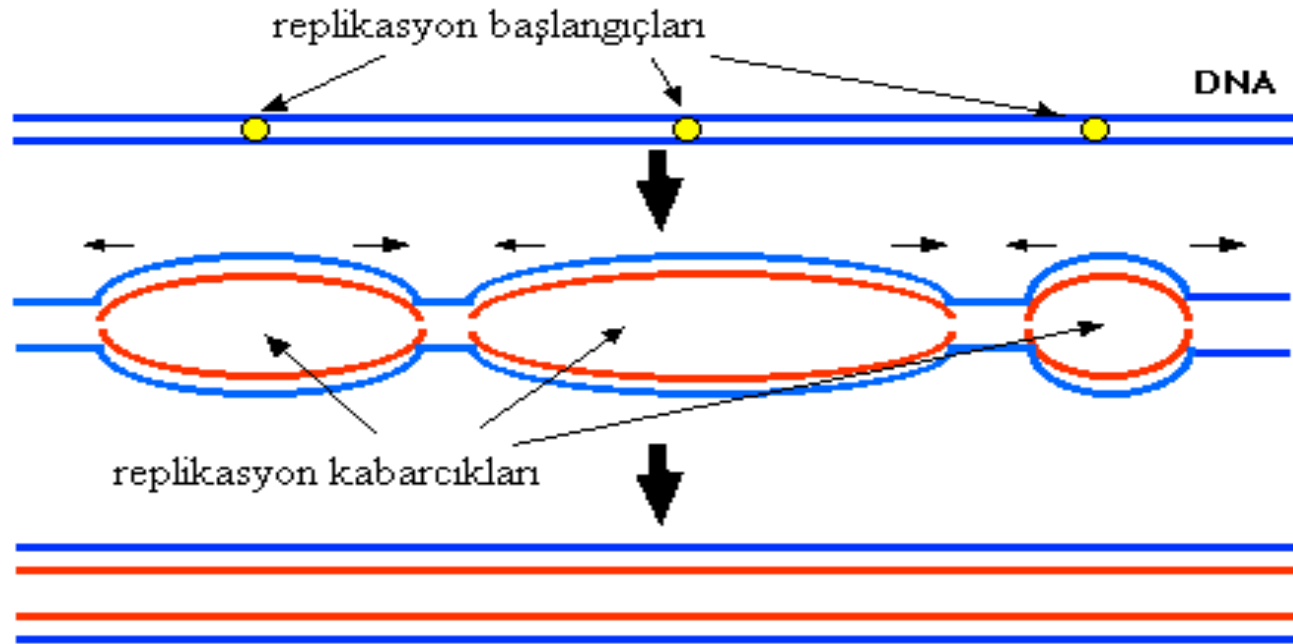
Ökaryot hücrelerde replikasyon adımları:

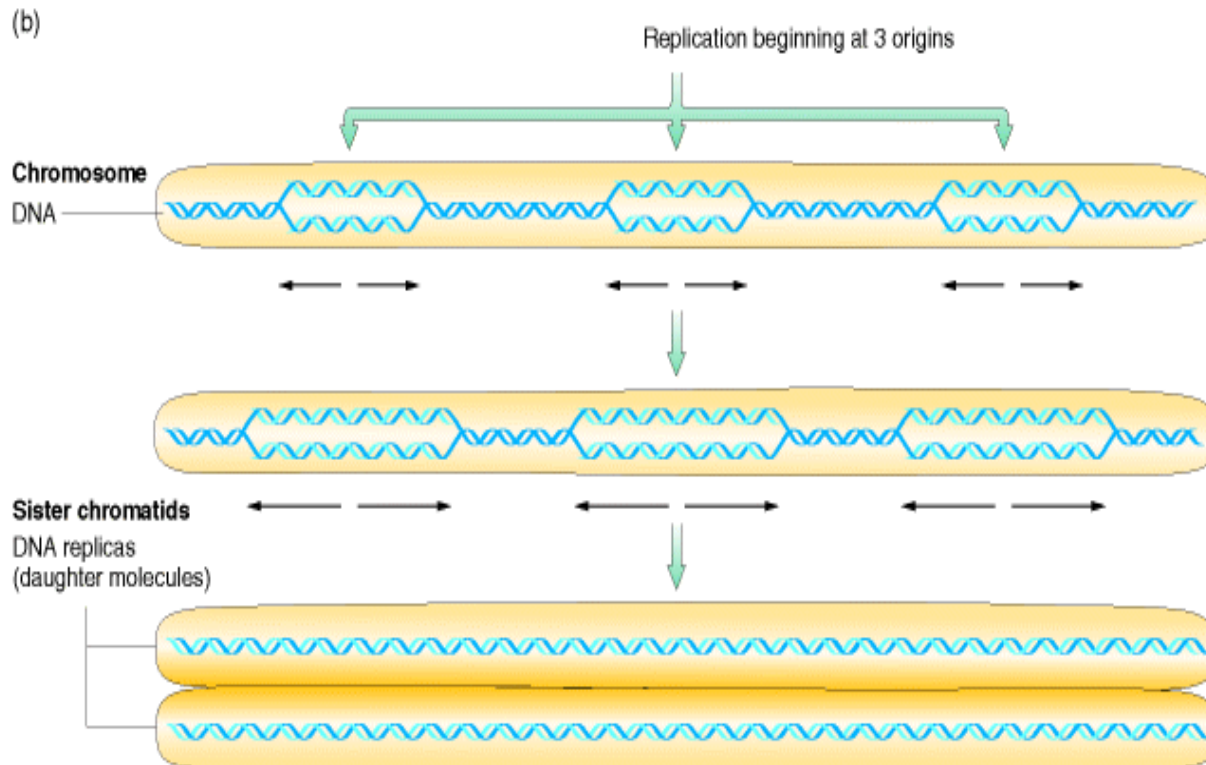
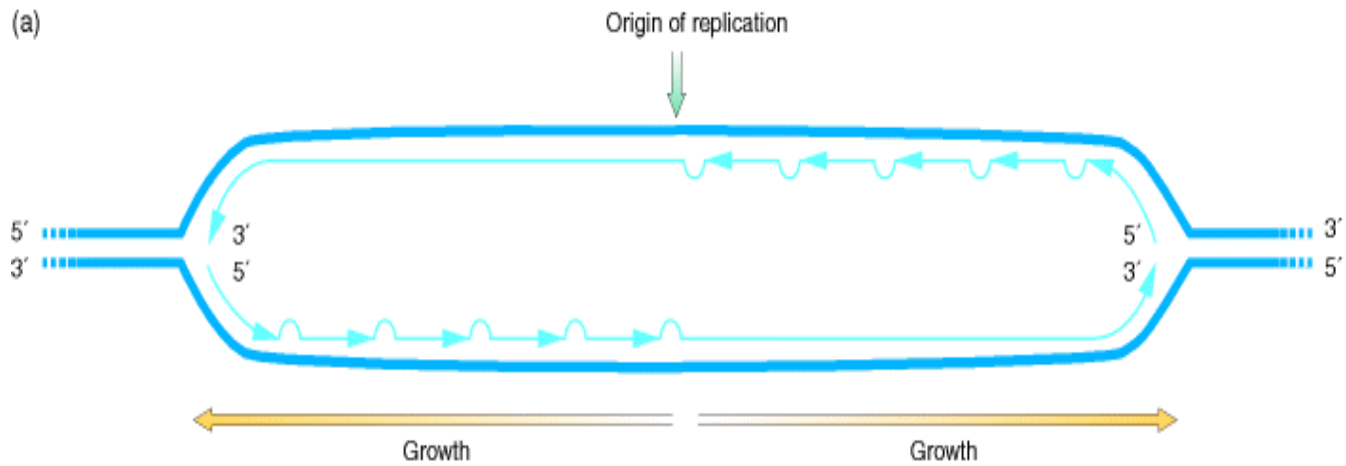
- 1) Replikasyon orijin noktalarının tayini
- 2) DNA çift ipliğinin çözünmesi
- 3) Replikasyon çatalının oluşması
- 4) DNA polimeraz aktivitesi, sentez ve uzama
- 5) Replikasyon kabarcıklarının oluşması
- 6) Yeni sentezlenen DNA parçalarının birleştirilmesi
- 7) Kromatin yapısının yeniden oluşumu

- ✓ Ökaryotik DNA da replikasyon orijinleri, 20 ila 80 orijinlik gruplar şeklinde (bir replikon=replikasyon ünitesi) aktiflenirler.
- ✓ Tüm DNA replike oluncaya kadar S fazı boyunca yeni replikasyon orijinleri aktiflenmeye devam eder.



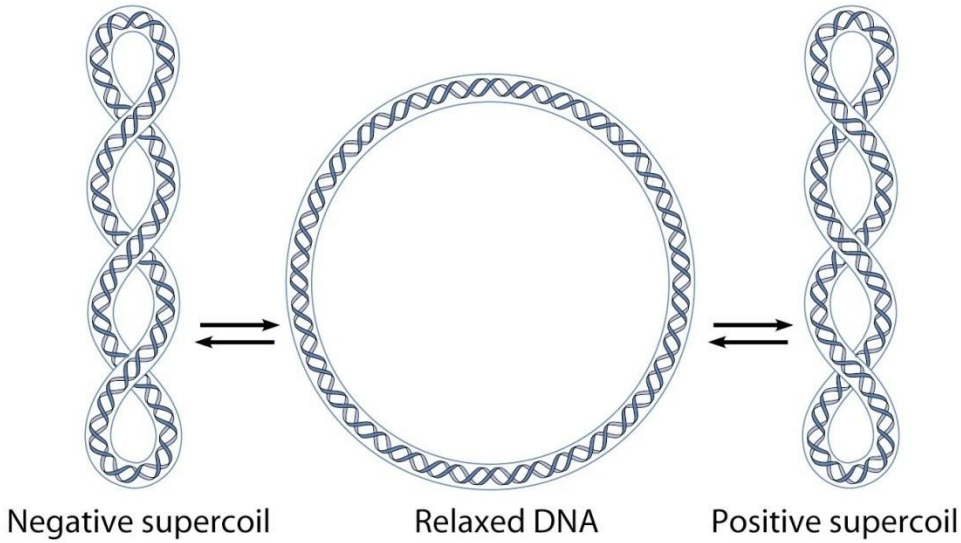
- ✓ Bir replikasyon ünitesi içinde, her bir başlangıç noktası birbirinden yaklaşık 30.000 – 300.000 nükleotidlik aralıklarla bulunur.
- ✓ Replikasyon orijin noktasından başlayan ve zıt yönde ilerleyen replikasyon çatalları replikasyon kabarcıkları oluşturur.



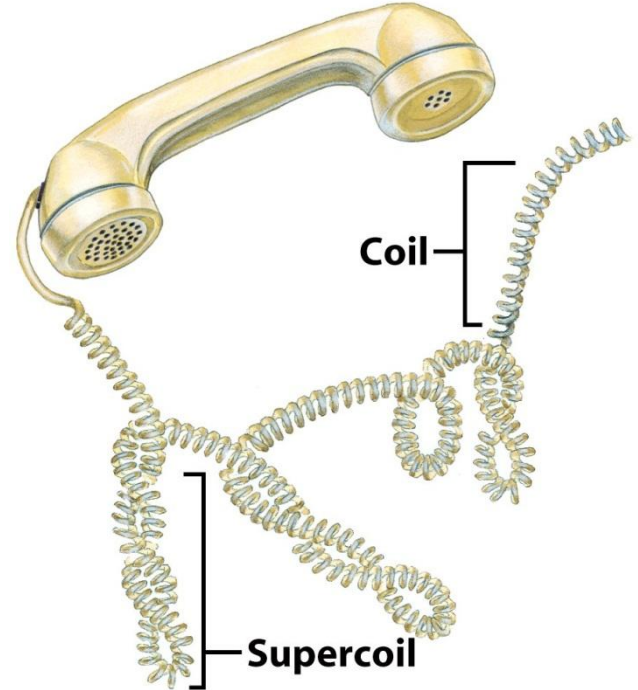


DNA Replikasyonunda Topoizomerazlar

Replikasyon çatallındaki süperkıvrımların (super coil) açılması-çözülmesinde görev yaparlar.



Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.



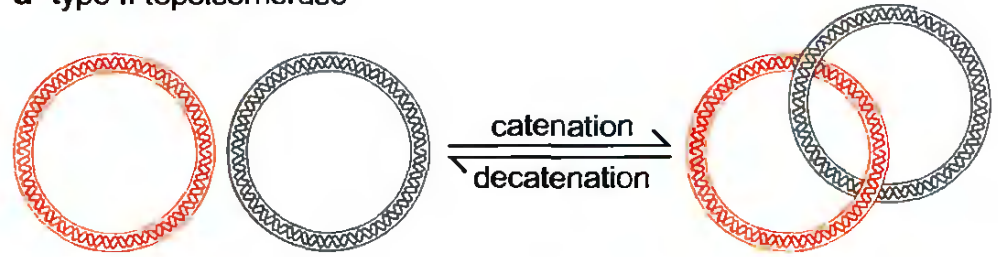
Topoizomerez I

Tek iplikli DNA'yı keser

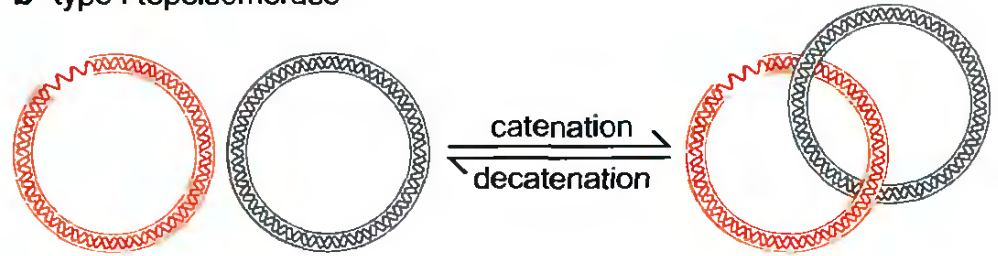
Topoizomerez II

Çift iplikli DNA'yı keser

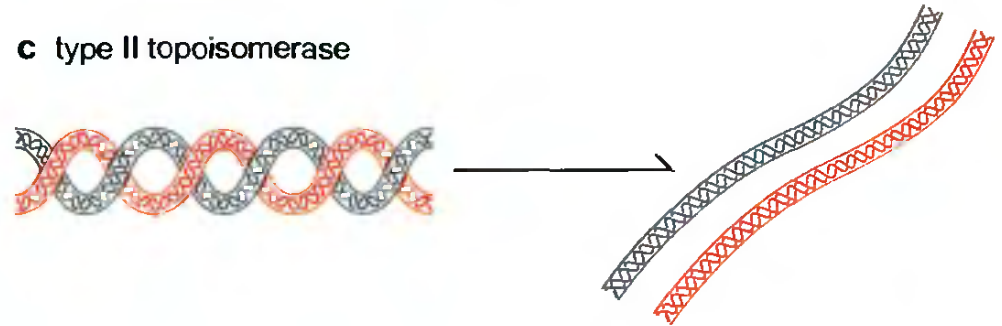
a type II topoisomerase



b type I topoisomerase



c type II topoisomerase

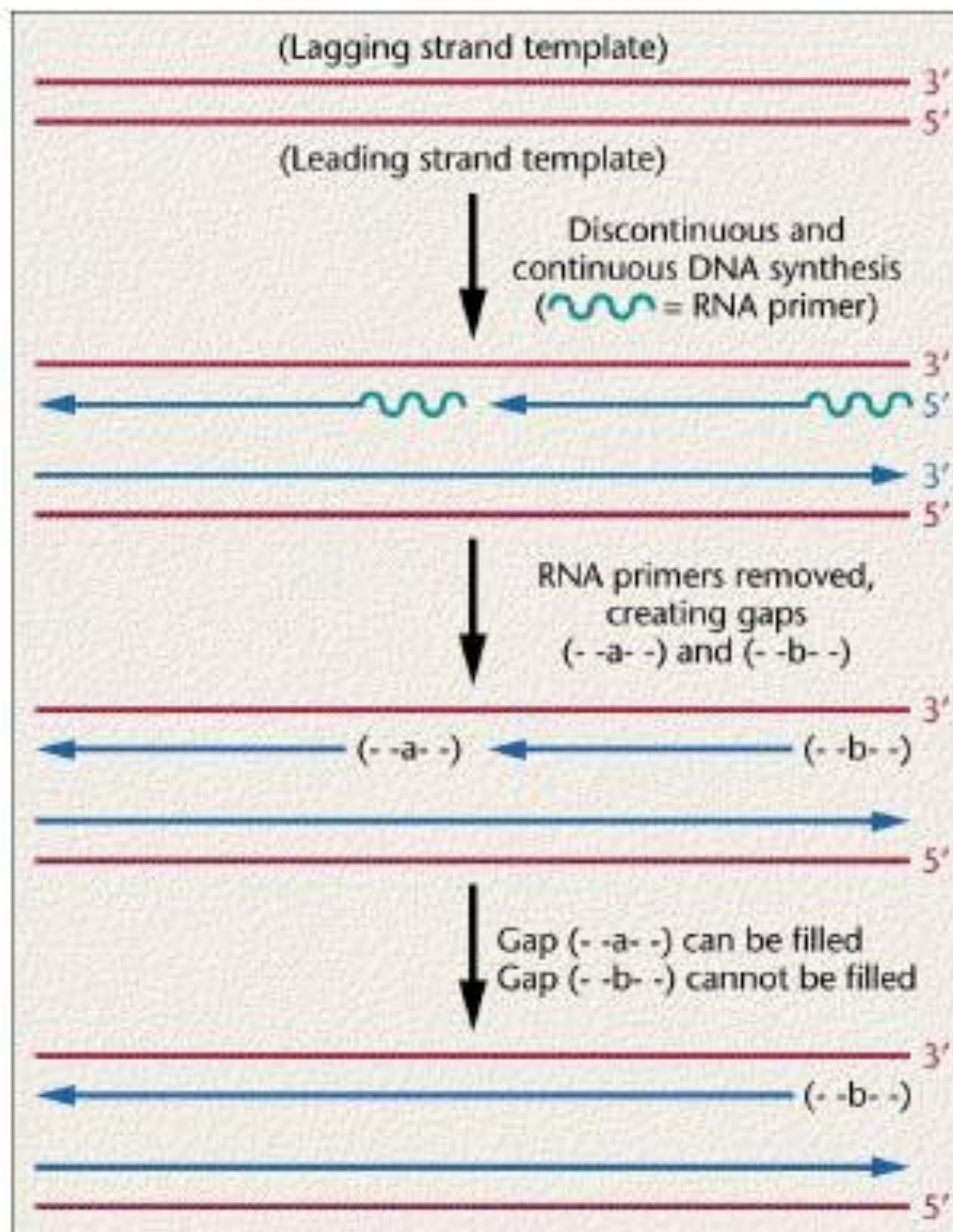


d type II topoisomerase



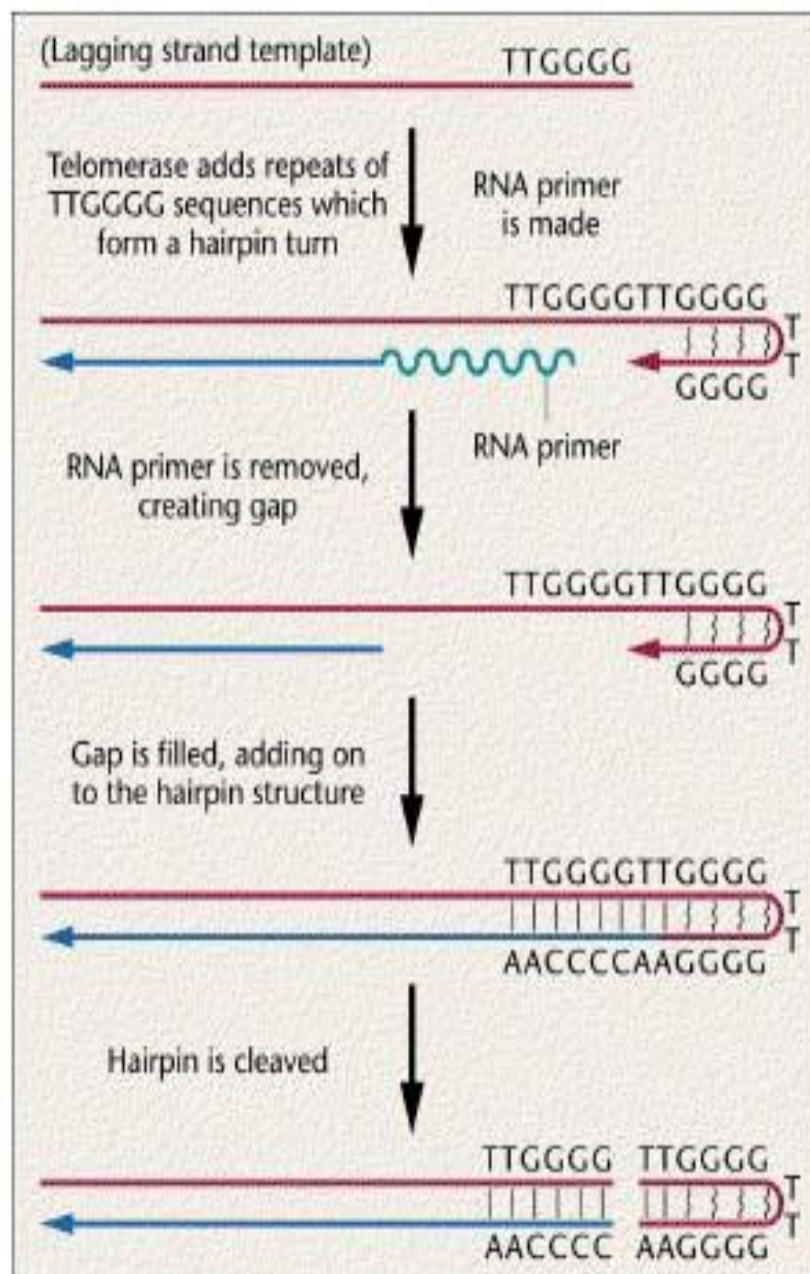
Replikasyon üç problemi!!!

- Doğrusal kromozomların uçlarının replikasyonu sorunludur.
- Kesintili zincirde RNA primeri uzaklaştırıldığında kromozomun ucunda serbest 3'-OH grubunu sağlayacak kalıp zincir olmadığı için sentez yapılamaz.
- Kromozom RNA primerinin boyu kadar kısalır.



Çözüm=Telomer-telomeraz

- Telomeraz her replikasyonda telomerin ksalmasını önlemek için TTGGGG tekrar dizilerini kromozomun ucuna eklemektedir.
- İlave edilen diziler “saç tokası” gibi kıvrılır ve karşı karşıya gelen G’ler arasında H bağı kurulur ve serbest 3’-OH grubu elde edilir.
- DNA Pol I boşluğu doldurur. Daha sonra saç tokası kırılır ve DNA kaybı engellenir.



- DNA replike oldukça yeni sentezlenen histonlar ile kromatin şeklinde yeniden düzenlenir.
- Histonlar da hücre siklusunun S fazında sentezlenir.
- S fazı boyunca aynı kromozomun farklı bölgeleri farklı zamanlarda replike olur.
- Yoğun olan kromatin (heterokromatin) S fazının geç evrelerinde replike olur.
- Aktif kromatin (ökromatin) S fazının erken evrelerinde replike olur.