

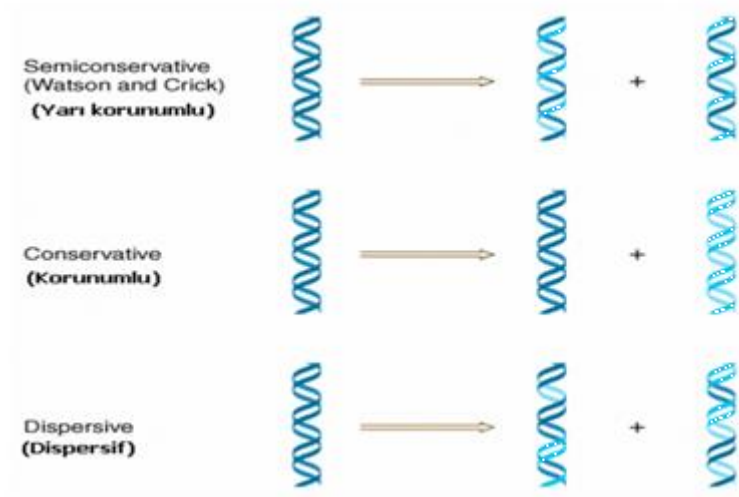
B Ö L Ü M Ö N

DNA MOLEKÜLÜNÜN REPLİKASYONU

Kalıtım materyali olan DNA molekülleri kendilerindeki bilgiyi, her yeni hücre generasyonuna aktarır. Bunun için hücre bölünmesinden önce kendini kopya ederek iki katına çıkması gerekir. Demeli, her hücre bölünmesinden iki yavru hücre ortaya çıktığına göre, kalıtım materyalinin de ikiye katlanması, DNA molekülünün kendi kopyasını sentezlemesi gerekir ki her iki yavru hücrede de özdeş DNA bulunsun. DNA molekülünün kendi kopyasını yaparak miktarını iki katına çıkarmasına **replikasyon** denir. Bu bölümde DNA'nın replikasyonunu, bunun için gerekli biyokimyasal reaksiyonlarda görev alan enzimleri ve mekanizmanın genel işleyişini ele alacağız.

X.1- Semikonservatif Replikasyonu Kanıtlayan Denemeler

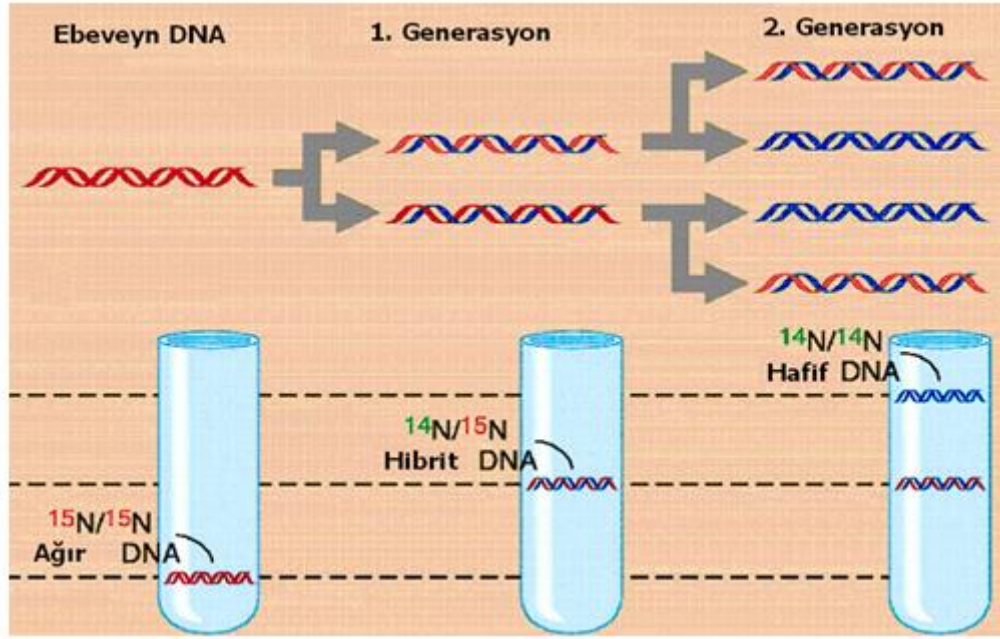
Watson ve Crick modeliyle ve hemen sonraki çalışmalarla, DNA'nın kendini kopyalayarak yavru hücrelere genetik materyalin eşit şekilde dağılmasını sağlayan replikasyon mekanizmasının nasıl çalıştığına ilişkin üç ayrı teklif ortaya atıldı. Ebeveyn molekül ile yavru molekül arasındaki bu muhtemel ilişki biçimleri 1957'de, Konservatif, Semi-Konservatif ve Dispersif replikasyon olarak ifade edilmiştir (Griffith ve ark. 2000). Bu modeller Şekil: X.1'de gösterilmiştir. Özetlemek gerekirse konservatif replikasyon modelinde ebeveyn çift sarmal olduğu gibi kalmakta yeni bir yavru çift sarmal sentezlenmektedir (Şekil: X.1b). 1953'te Watson ve Crick tarafından da önerilen semi konservatif modelde ise, ebeveyn çift sarmal ayrılır ve her eksen kendine yeni bir komplementer eksen sentezler; böylece yavru moleküllerin her birisi bir eski bir de yeni eksenle meydana gelmiş olur (Şekil: X.1a). Dispersif modelde ise, yeni yavru sarmallar yine eski ve yeni moleküllerden oluşmakta ancak her iki sarmalda da eski eksenin bir segmentinin karşısında yine eski eksenle bir komplementer, sonra yeni sentezlenen bir segmentin karşısındaki eksenle yine yeni sentezlenen bir komplementer segment bulunmaktadır (Şekil: X.1c).



Şekil: X.1- Mümkün Olan Üç Replikasyon Modeli (Griffith ve ark. 2000, sh. 250, Şekil:8-11'den uyarlanmıştır).

X.1.1- Meselson Stahl Denemesi

Meselson ve Stahl 1958'de, *E. coli*'de yaptıkları deneme sonuçlarına göre, bu üç modelden semi konservatif olanın geçerli model olduğunu buldular (Griffith ve ark. 2000). Araştırmacılar önce, *E. coli* hücrelerini, radyo izotop azot (^{15}N) bulunan ortamda yetiştirdiler. Böylece, radyoizotop azot, organik bazlarda, oradan da yeni sentezlenen DNA eksenlerinde yer aldı ve birçok generasyondan sonra hücrelerdeki DNA, ^{15}N ile etiketlenmiş oldu. Daha sonra bu *E. coli* hücreleri ^{15}N ortamından çıkarılarak, ^{14}N ortamına konuldu. Birkaç hücre bölünmesine yetecek kadar süre geçtikten sonra alınan örneklerden DNA izole edildi. Araştırmacılar bu şekilde elde ettikleri DNA'ları, her generasyon, cesium gradient centrifugation denilen bir usulle birbirinden ayırdılar. Cesium chloride (CsCl) dakikada 50 bin devir hızla uzun bir süre çevrilirse cesium ve chloride iyonları tüpün dibine doğru itilirler. Sonuçta tüpün içinde iyonlar, en ağır olan dipte en hafifler yukarıda olacak şekilde yoğunluklarına uygun şekilde bantlar oluşturur. Cesium chloride ile santrifüje edilen DNA, bu yığın içinde ağırlığına en uygun yerde bir bant oluşturur (Şekil: X.2). İzotop ^{15}N 'de büyüyen hücreler yüksek yoğunluklu DNA'ya sahip olurlar. Bu DNA Şekil: X.2'de sol tarafta tüpün dibinde görülmektedir. Araştırmacılar bu hücreleri normal ^{14}N ortamında bir generasyon yetiştirip sonra santrifüje ettiklerinde Şekil: X.2'nin ortasındaki gibi tüpün ortasında bir bant oluştuğunu gördüler. Çünkü DNA'nın yeni kopya olan yarısı ^{14}N etiketliydi! İkinci generasyon sonuçları da, semi konservatif replikasyonu destekler şekilde Şekil: X.2'nin sağ başındaki gibi, bir ortada bir de en yukarıda iki DNA bandı şeklindeydi. Kırmızı (^{15}N) ve mavi (^{14}N) renkler, DNA eksenlerinin yoğunluğunu da ifade etmektedir. (Griffith ve ark. 2000)



Şekil: X.2- Semi konservatif DNA Replikasyonu (Meselson Stahl 1958 Deneyi).
(Griffith ve ark. 2000, sh. 250, Şekil:8-12'den uyarlanmıştır)

Konservatif model doğru olsaydı ilk generasyonda da ikinci generasyonda da bir yukarıda bir de altta iki bant oluşacaktı. Dispersif modele göre ise, her iki generasyonda da ortada bir bant oluşacaktı. Meselson ve Stahl'ın deneme sonuçları, bu modelleri değil, kesinlikle semi konservatif modele göre olması beklenen sonuçları destekliyordu; ilk generasyonda ortada bir bant, ikinci generasyonda ise, Watson ve Crick tarafından öngörülen semi konservatif modele göre olması beklendiği gibi, hem orta hem de düşük yoğunlukta iki bant müşahade edildi. Bu deneme sonucuna göre, replikasyonun nasıl cereyan ettiğini şöyle ifade etmek mümkündür:

DNA replikasyonu, ikili sarmalın iki ekseninin birbirinden ayrılması ve her eksenin kendisine yeni bir tamamlayıcı eksen yapması şeklinde cereyan eder ve yavru DNA'lar biri eski biri yeni iki eksenden oluşur. Bu replikasyona **semi konservatif replikasyon** denilir.

X.1.2- Replikasyon Çatalı

Watson ve Crick modelinin DNA replikasyonu ile ilgili diğer bir tahmini, DNA molekülünde replikasyon esnasında bir replikasyon fermuarı, ya da çatalı olması gerektiği yönündeydi. Bu çatal, DNA'nın kopyalama için her biri bir kalıp olacak olan iki ekseninin birbirinden ayrıldığı, sarmalın açıldığı yerdir.

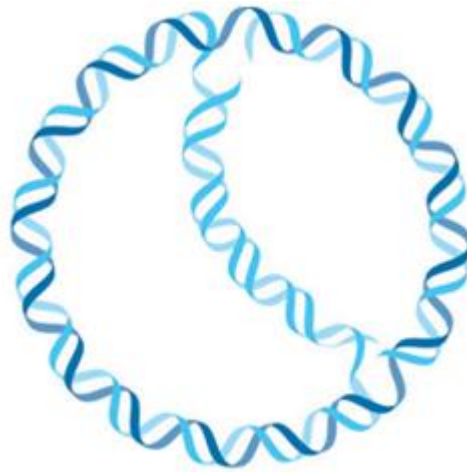
1963'te John Cairns bu tahmini, bakteri hücrelerindeki DNA'yı ^3H hidrojenli timinle (Radyoizotop hidrojenle etiketlenmiş timin nükleotidine trityum denilir.) etiketleyerek test etti. Beklentiye göre, yeni sentezlenmiş her yavru molekül, bir radyoaktif (sıcak) eksen, bir de

radyoaktif olmayan (soğuk) eksenden oluşmalıdır. Sıcak ortamda değişik aralıklarda ve dolayısıyla değişik sayıda replikasyondan sonra Cairns bakterileri çözdü ve hücre muhtevasını mikroskop altına koyduğu bir filtre kâğıdı üzerine yaydı. Araştırmacı bu filtreyi fotoğraf şerbetiyle kapladı ve 2 ay karanlık odada muhafaza etti. Otoradyografi denilen bu uygulamada ^3H çürürken beta partikülleri neşreder. Bu partiküller fotoğraf şerbetinde siyah noktalar şeklinde kimyasal bir iz bırakır ve böylece şerbet bir fotoğraf çıktısı gibi olur.

Sıcak ortamdaki bir replikasyon periyodundan sonra otoradyografya bu noktalardan bir yüzük oluştu. Cairns bunun, çember şeklindeki yavru DNA molekülünün yeni oluşmuş radyoaktif ekseni olduğunu düşündü. Çalışmanın bir sonucu, bakteri kromozomunun çember şeklinde olduğunun fiziki olarak da gösterilmiş olmasıydı. İkinci replikasyon periyodunda, modelin öngördüğü çatal gerçekten görüldü (Şekil: X.3a); çatalın üç eksenindeki tanelerin yoğunluğu, Şekil: X.3b'de görüldüğü gibi yorumlanabilirdi: DNA çemberinin ortasında bulunan kalın eğri, bu defa iki radyoaktif eksenden oluşan yeni sentezlenen yavru eksen olmalıydı. Cairns bu orak (hilal) şekilli otoradyografik hallerin, sıcak ortamda farklı sürelerde tuttuğu numunelerde, replikasyon çatalının yüzük boyunca ilerleyen hareketlerine karşılık gelen bütün genişliklerini gördü. Şekil: X.3b'de görülen tipten yapılara **teta (θ) yapısı** denir (Griffith ve ark 2000).



a)Otoradyografi



b)Bakteri kromozomunun şematik gösterimi

Şekil: X.3- Bakterilerde Replikasyon Çatalı (Cairns, 1963'den Griffith ve ark 2000, sh. 253, Şekil: 8-18'den uyarlanmıştır).

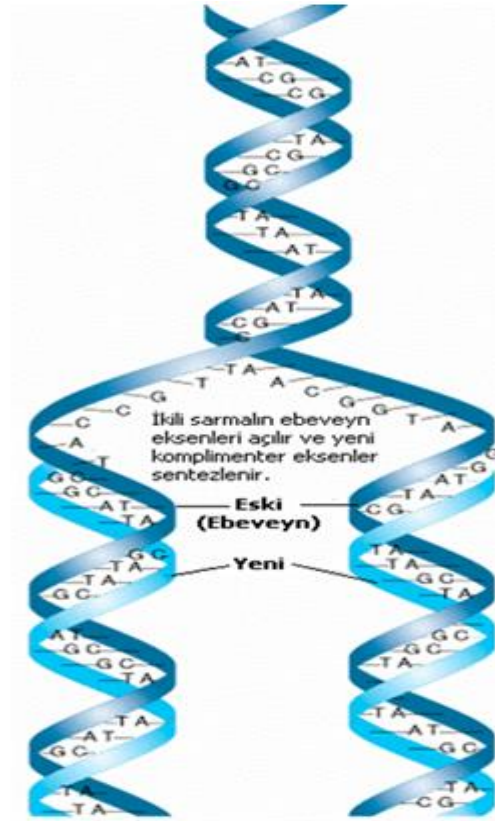
X.2- Semi Konservatif Replikasyon

Kanıtlarını bu şekilde gördüğümüz semi konservatif replikasyon şematik olarak Şekil: X.4'te gösterilmiştir. Şekilde şeker-fosfat omurgası kalın şeritler şeklinde olup bunlar arasındaki baz çiftlerinin dizilişleri rastgeledir. İkili sarmalı, şekildeki gibi, bir ucundan açılmanın başladığı bir fermuar analoğu gibi düşünebiliriz. Buna göre, iki eksenin ayrılmasıyla her eksende tek bazlar ortaya çıkacaktır. Tek kalan her baz, ortamdaki serbest nükleotidlerle eşleşme

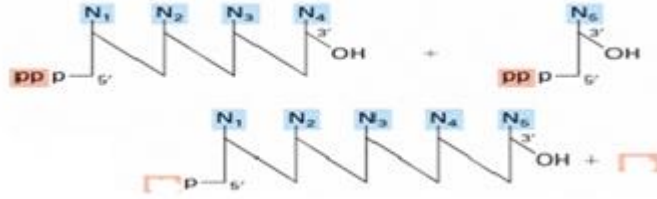
potansiyeline sahiptir. Ancak DNA yapısı, katı eşleşme ilkelerine sahip olduğu için, her ayrılmış baz sadece kendi **komplementer bazıyla** eşleşebilir: A ile T ve G ile C. Böylece birbirinden ayrılmış iki eksenden her biri, orijinaliyle özdeş bir yeni ikili sarmal yapmak üzere, komplementer bazların yeni diziyeye eklenmesini sağlayan bir kalıp olarak hareket eder. Yeni eklenen nükleotidlerin hücre ortamında mevcut olan serbest nükleotidler havuzundan geldiği varsayılır.

Semi konservatif replikasyon kanıtlandıktan sonra, araştırmalar serbest nükleotidlerin açılan ikili sarmal kalıba nasıl getirildiği ve sarmalın eksenlerinin yeni sentezlenecek eksenlere kalıp olacak şekilde nasıl ayrıldığı sorularını cevaplamaya yöneldi. (Griffith ve ark 2008):

Araştırmacılar, enzimlerin bu fonksiyonların gerçekleşmesinde rol oynadığını düşünüyorlardı ama Kornberg'in 1959'da yaptığı çalışmaya kadar enzimlerin nükleotid taşıma rolü ispat edilemedi. Araştırmacı, bu çalışmada, DNA - polimeraz isimli enzimi *E. coli*'den izole etti ve onun nükleotid taşıma eylemini in vitro gösterdi. Gerçekten bu enzim, deoksiribonükleotidleri, DNA'nın ikili sarmalının mevzi olarak açılmasıyla serbest kalmış olan tek bir eksenini kalıp yerine kullanarak, büyümekte olan bir nükleotid zincirinin 3' ucuna ekler (Şekil: X.5). DNA - polimeraz için materyal deoksiribozların trifosfat formlarıdır: dATP, dGTP, dCTP, dTTP.



Şekil: X.4- Semikonservatif DNA Replikasyonu. Ebeveyn eksenler (koyu mavi), yeni sentezlenen eksenlerin (Açık mavi) polimerizasyonu için kalıp vazifesi görür. Yeni sentezlenen eksenlerin baz dizilişleri, kalıp eksenlere komplementer olacak şekildedir. (Griffith ve ark. 2000, sh. 249, Şekil:8-10'dan uyarlanmıştır.)



Şekil: X.5- Nükleotidlerin polipeptid bağlarıyla birbirine bağlanması.(Russel, 2006, sh. 287, Şekil: 11.4b'den uyarlanmıştır)

Bugün *E. coli*'de beş çeşit polimeraz enzimi olduğu bilinmektedir. Kornberg'in bulduğu ilk enzim polimeraz-I veya kısaca, Pol-I olarak isimlendirilmiştir. Bazı bilim adamları, pol I enziminin DNA sentezi için gerekenden çok yavaş hareket ettiğini (yaklaşık 20 nükleotid/saniye) ve oldukça fazla olduğunu (400 molekül/hücre) ve 20-50 nükleotidi birleştirdikten sonra DNA'dan uzaklaştığından kuşkulandıkları için, replikasyon çatalında sentezleme işini başka bir enzimin yaptığını düşünmekteydiler. Nitekim 1969 yılında John Cairns ve Paula De Lucia, bir *E. coli* hattında pol I enzimi kodlayan gende bir mutasyona rağmen, hücrelerin hala normal çoğaldığını ve dolayısıyla DNA replikasyonunun devam ettiğini gösterdiklerinde olay netleşti. Replikasyon çatalındaki sentezi, Pol-III denilen başka bir DNA polimeraz katalize ediyordu.

E. coli'de yapılan çalışmalar DNA replikasyonunun çok hızlı ve hatasız gerçekleştiğini gösteriyordu. Replikasyon çatalında her iki yöne doğru devam eden sentezleme işi 40 dakika gibi bir sürede tamamlanıyor, ama hatasız bir kopyalama oluyordu. Toplam 5 milyon kadar nükleotid demek ki, her bir yönde 1000 nükleotidden, 2000 nükleotid/saniye gibi bir hızla sentezleniyordu. Ne hızdan ne de mükemmellikten taviz verilmiyordu. Hücre içinde bu kadar düzgün bir işleyiş bu kadar hızlı bir şekilde nasıl gerçekleşmektedir? Aslında DNA polimeraz, büyük bir hücre makinesinin, bir "nükleoprotein" kompleksinin parçasıdır. Griffith ve arkadaşları (2008), bu komplekse replizom adını veriyor. Hücrede, replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gibi, enzimlerle katalize edilen her biyokimyasal sentez için böyle bir makineden bahsetmek mümkündür.

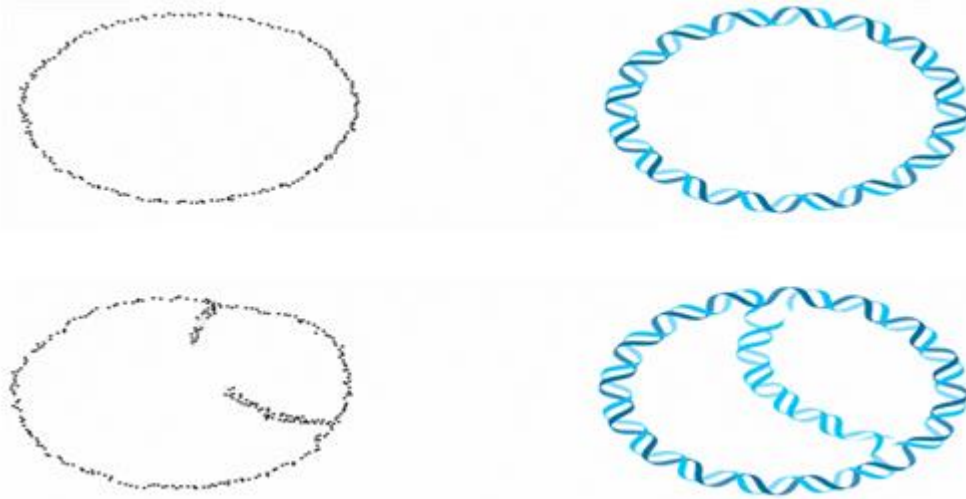
E. coli'de sonraki çalışmalar replizomun işleyişiyle ikili sarmalın bir fermuar gibi nasıl açıldığını, iki eksende birden ve iki yöne doğru replikasyonun nasıl gerçekleştiğini ve bütün bu süreçte görev alan enzimleri ayrıntılı bir biçimde ortaya koydu.

X.2.1- Replikasyonun Başlatılması:

E. coli replikasyonu, *oriC* denilen sabit bir yerden başlar ve oluşan çatal iki yöne doğru açılırken replikasyon da iki yöne doğru çatal birleşinceye kadar devam eder.(Şekil: X.6)

Replizom denilen aygıtın işe başlaması için ilk adım, *oriC*'de, DnaA denilen bir proteinin 13 bç (baz çifti)'den oluşan ve “*DnaA kutusu*” denilen ve beş kere tekrarlanan spesifik bir diziyeye bağlanmasıdır. DnaA'nın bağlanmasıyla, orijinde A ve T nükleotidlerce zengin bir bölgede iki eksenin ayrılması başlar. Bu noktada AT baz çiftlerinin arasında sadece iki hidrojen bağı olduğunu, hâlbuki GC baz çiftleri arasında üç hidrojen bulunduğunu hatırlamak gerekir. İkili sarmalın, DNA'nın A ve T bazlarınca zengin yerlerinden ayrılması daha kolaydır.

Açılma başladıktan sonra, ilave DnaA proteinleri yeni açılmış tek eksenli bölgelere bağlanır. DnaA'ların orijini kaplamasından sonra, iki helikaz enzimi (DnaB proteini), replikasyon çatalında, iki yöne doğru da sarmalı açmaya başlamak üzere 5'→3' istikametinde kayar. Bundan sonra da, primaz ve DNA pol III holoenzim, protein – protein interaksiyonlarıyla, replikasyon çatalına eklenir ve DNA sentezi başlar. DnaA, replikasyonun başlaması için gerekli olmakla birlikte, replizom denilen replikasyon makinesinin elemanı sayılmaz. Onların görevi, replikasyonun başlatılması için replizomu, çember şeklindeki kromozomda doğru yere getirmektir.



Şekil: X.6- *E. coli*'de replikasyon çatalı (solda otordiyografik görüntü, sağda şematik gösterim). (Griffith ve ark. 2000, sh. 253, Şekil:8-17 ve Şekil:8-18'den uyarlanmıştır.)

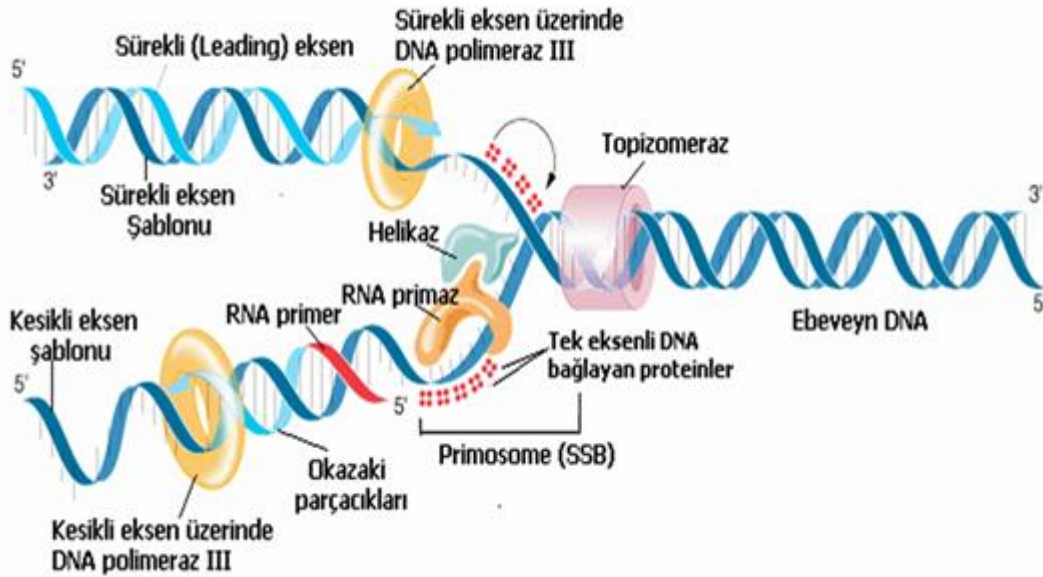
X.2.2- Eksenlerin Replikasyona Uygun Şekilde Tutulması:

DNA'nın ikili sarmalı nasıl bu kadar hızlı açılmakta ve açılan yerlerde tek eksenli DNA kendi üzerine kıvrılmamaktadır? Bugün artık bilinmektedir ki, replizom, sarmalı açan ve kıvrılmasını engelleyen iki protein sınıfına sahiptir: sırasıyla helikazlar ve topoizomerazlar. Helikazlar, ikili sarmalın iki eksenini bir arada tutan hidrojen bağlarını tahrip eden enzimlerdir. Helikaz DNA tek eksenini, bir kelepçe gibi sarar; bu pozisyonun başlanarak DNA sentezi yönünde ikili sarmalı süratle çözer. Çözölmüş DNA, tek eksen DNA'ya bağlanan ve yeniden sarmal oluşmasını engelleyen tek-eksen tutucu (SSB) proteinler tarafından sabit tutulur.

Çember şeklinde DNA, lastik bir bantta olabilen ekstra katlanmalar gibi, ikiye katlanabilir ve sarılabilir. Replikasyon çatalının helikaz tarafından açılarak iki eksenin birbirinden düz biçimde ayrılması, diğer bölgelerde ekstra katlanmalara ve süper sargı denilen sargılara sebep olur. Replikasyonun devamını sağlamak için bu katlanmalar ve süper sargılar atılmalıdır. Bu süper sargılar, meselâ DNA giraz gibi topoizomer denilen enzimler tarafından oluşturulup gevşetilebilir. Topoizomerler, süper sarılmış DNA'yı, ya tek DNA eksenini veya her ikisini keserek, uzaklaştırır, böylece DNA'nın rahatça açılabilen gevşek bir moleküle dönüşmesini sağlar, sonra da gevşemiş DNA eksenlerini kesik uçlarından birleştirir. Topoizomeraz enziminin hemen önünde, tek eksenli DNA'yı bağlayan proteinler (SSB), eksenin DNA Pol III tarafından kolayca okunmasını sağlayacak şekilde sabit durmasını sağlar.

X.2.3- Replikasyonun İlerlemesi:

DNA pol III ilerlerken, ikili sarmal, kalıp olarak rol oynayacak tek eksenin yeni bir uzunlukta kopyalanmasını sağlamak üzere enzimin önünde sürekli açılır (Şekil: X.7). DNA pol III, ikili sarmalın açılma alanı olan replikasyon çatalında çalışır. Ancak, DNA polimeraz, nükleotidleri daima büyüyen 3' ucuna eklediği için, sadece antiparalel iki eksenden birisi, replikasyon çatalı yönünde kalıp olarak iş görür. Bu eksen için, sentez replikasyon çatalının açılma yönünde düz bir süreklilik şeklinde cereyan edebilir; bu eksenin kalıp olduğu yeni sentezlenen eksene **rehber** (veya **sürekli**) eksen denir.



Şekil: X.7- Replikom işleyişi ve elemanları. (Griffith ve ark. 2000, sh. 254, Şekil:8-20'den uyarlanmıştır.)

Diğer kalıptaki sentez de 3' büyüyen ucunda cereyan eder, fakat bu sentez ters istikamettir, çünkü bu eksen için 5'→3' sentez istikameti, replikasyon çatalına doğru değil çataldan uzağa doğrudur (bakınız Şekil: X.7). Daha sonra göreceğimiz gibi, replikasyon makinesinin tabiatı, her iki eksendeki sentezin replikasyon çatalı bölgesinde cereyan etmesini gerektirir. Bu sebepten açılan çataldan uzağa doğru sentez uzun süre devam edemez. Kısa

segmentler halinde olmalıdır: polimeraz bir segmenti sentezler, sonra segmentin, çatalın yeni kalıbı serbest bıraktığı 5' ucuna geri döner ve işlem tekrar başlar. Yeni sentezlenen bu kısa DNA kırık çizgilerine (1000–2000 nükleotid) **Okazaki parçacıkları** adı verilir.

DNA replikasyonunda diğer bir problem, DNA polimeraz enziminin bir zinciri uzatabilir fakat başlatamaz olmasından dolayı ortaya çıkar. Bu sebepten, hem rehber eksenin hem de her bir Okazaki parçacığının sentezi, iki eksenli bir nükleik asit teşkil etmek üzere kalıp eksene bağlanan bir primer denilen kısa bir nükleotid zinciriyle başlatılmalıdır. DNA replikasyonunda rol alan primer Şekil: X.7'de görülmektedir. Primerler, merkez elemanı primaz (bir çeşit RNA polimeraz) isimli enzim olan ve primozom denilen bir protein seti tarafından sentezlenir. Primaz, kromozomun belirli bir bölgesine komplementer olan kısa (8–12 nükleotid) bir RNA parçacığı, yani primer sentezler. Rehber ekseninde sadece bir başlangıç primeri gereklidir çünkü başlangıç fitilinden sonra sürekli büyüyen DNA eksenine sonraki ilaveler için bu ilk ve tek primer yeterlidir. Fakat diğer ekseninde, her Okazaki parçacığının kendi primerine ihtiyacı vardır. Primeri oluşturan RNA zinciri sonra DNA pol III enzimi tarafından bir DNA zinciri olarak uzatılır.

Diğer bir DNA polimeraz, pol I, RNA primeri uzaklaştırır ve ortaya çıkan boşlukları DNA ile doldurur. Daha önce bahsedildiği gibi, pol I, özgün olarak Kornberg tarafından damıtılan ilk polimeraz enzimidir. Diğer bir enzim DNA ligaz, boşluğu dolduran DNA'nın 3' ucunu, akıntı yönündeki Okazaki parçacığının 5' ucuna bağlar. Böylece oluşan yeni eksene **geciken** (veya **kesikli**) **eksen** denilir. DNA ligaz kırık DNA parçalarını, bir parçacığın 5' fosfat ucu ile diğer parçacığın 3' OH grubu arasında bir fosfodiester bağı oluşturma işini katalize ederek birleştirir.

X.2.4- Hataların Kontrolü (Griffith ve ark. 2008'den özetlenmiştir):

DNA replikasyonunun ayırt edici özelliği, güvenilirliği, yanlışlığın yok denecek kadar az olmasıdır; ortalama olarak 10^{10} nükleotidde birden daha az hatalı giriş olur. Bunun bir sebebi, gerek pol I ve gerekse pol III enzimlerinin, $3' \rightarrow 5'$ eksonükleaz aktivitesi yüklenmiş olmalarıdır. Bu enzim aktivitesi, yanlışlıkla eklenmiş yanlış bazları kesip atarak bir çeşit "musahhahlik" hizmeti yapar. $3' \rightarrow 5'$ eksonükleaz fonksiyonu eksik olan hatlar daha yüksek mutasyon oranlarına sahiptir. İlaveten, primaz musahhahlik fonksiyonuna sahip olmadığı için RNA primer, DNA'ya nazaran daha fazla hata ihtiva eder. Replikasyonun yüksek güvenilirliğini korumak için, Okazaki fragmentlerinin sonundaki RNA primerleri atılmalı ve yerine DNA ikame edilmelidir. Bu atma ve ikame işlemleri DNA pol I tarafından yapılır. DNA pol I, Okazaki fragmentinin 3' ucuna bağlanır ve DNA sentezini, sonraki Okazaki fragmentinin RNA primerini değiştirmek üzere katalize eder. Sentezden önce, RNA primer, pol I'in $5' \rightarrow 3'$ eksonükleaz aktivitesiyle düşürülür (Şekil: X.7).

Özet olarak, DNA replikasyonu, ikili sarmalın açıldığı ve iki eksenin ayrıldığı replikasyon çatalında vuku bulur. DNA replikasyonu, rehber ekseninde replikasyon çatalının açıldığı istikamette cereyan eder. Geciken ekseninde ise, DNA, replikasyon çatalından uzağa doğru Okazaki parçacıkları denilen kısa parçalar halinde sentezlenir. DNA polimeraz, sentezi başlatmak için, zaten ortamda bulunan ve primer denilen kısa bir RNA nükleotid zincirine ihtiyaç duyar.

E. coli'deki replizomun birlikte çalışan bazı elemanları şekil X.7'de gösterilmiştir. Replikasyon çatalında katalitik DNA pol III koru, iki katalitik kor ve birçok protein aksesuarlarından oluşan ve pol III holoenzim denilen çok daha büyük bir kompleksin parçasıdır. Katalitik korlardan biri rehber eksenin sentezini yaparken diğeri geciken eksenin sentezini yapar. Aksesuar proteinlerden bazıları (Şekil: X.7'de görülmemektedir), iki katalitik koru birleştiren, böylece rehber ve geciken eksenlerdeki sentezin koordinasyonunu sağlayan bir bağ oluşturur. Geciken eksen, replizom her iki eksendeki sentezi koordine edecek ve replikasyon çatalı istikametinde ilerleyecek şekilde diğereksendeki pol III ile bir hizada olabilmek için bir lup yapar. DNA'yı bir kelepçe gibi saran ve pol III'ü DNA molekülüne bağlı tutan ve β kelepçesi denilen önemli bir aksesuar protein de görülmektedir. Böylece pol III, kalıbı terk etmeden önce sadece 10 nükleotid ekleyebilen bir enzimden (dağıtıcı enzim terimi kullanılır), ilerleyen çatalda duran ve on binlerce nükleotidi ekleyen bir enzime (ilerleyen enzim) dönüşür. Toplamda, aksesuar proteinlerin eylemleriyle, rehber ve geciken eksenlerin sentezi, hızlı ve oldukça yüksek derecede koordineli olur. RNA primerini sentezleyen enzim, primaz, kelepçe proteine temas etmez. Bu yüzden primaz, dağıtan bir enzim gibi hareket eder –kalıptan ayrılmadan önce sadece birkaç ribonükleotidi ekler.(Griffith ve ark. 2008)

X.3- Ökaryotlarda Replikasyon

DNA replikasyonu hem prokaryotlarda hem ökaryotlarda semi konservatif mekanizmayla olur ve biraz önce ele alınan rehber eksen - geciken eksen sistemi ökaryotlarda da geçerlidir. Dolayısıyla, prokaryotlarla ökaryotların replizom unsurlarının çok benzer olması sürpriz olmamalıdır. Ancak, organizma kompleksleştikçe, replizom unsurlarının sayısı da artar.

X.3.1- Ökaryotik Replizom

Şimdilerde, *E. Coli* replizomunda 13, maya ve insanda hiç olmazsa 27 unsur olduğu bilinmektedir (Griffith ve ark. 2008). Ökaryotik replizomun bu fazla unsurları için bir sebep, ökaryotik şablonun daha yüksek karmaşıklığıdır. Bakteri kromozomunun çıplak DNA olmasının aksine, ökaryotik kromozomlar, çekirdekte kromatin olarak paketlenmiştir. Bölüm 3'de tanımlandığı üzere, kromatinlerin ana ünitesi, histon proteinleri etrafında sarılı DNA'dan ibaret olan nükleozomdur. Bu sebeple replizom, sadece ebeveyn eksenleri kopya etmekle değil, aynı zamanda nükleozomun ebeveyn eksenlerini histon proteininden ayırmakla ve yavru moleküllerde bunları tekrar bağlamakla yükümlüdür. Bu manevra, eski histonları (mevcut nükleozomlarda) yavru moleküllere rastgele dağıtarak ve yeni histonları kromatin birleştirme faktörü - 1 (CAF-1) denilen bir proteinle birlikte replizoma taşıyarak yapılır. CAF-1 histonlara bağlanır ve onları, yeni sentezlenen DNA'yla birleşebilecekleri replikasyon çatalına yöneltir. CAF-1 ve taşıdığı histon kargo, çoğalan hücre çekirdek antijeni (PCNA) denilen β kelepçesinin ökaryotik versiyonuna bağlanarak replikasyon çatalına ulaşır.

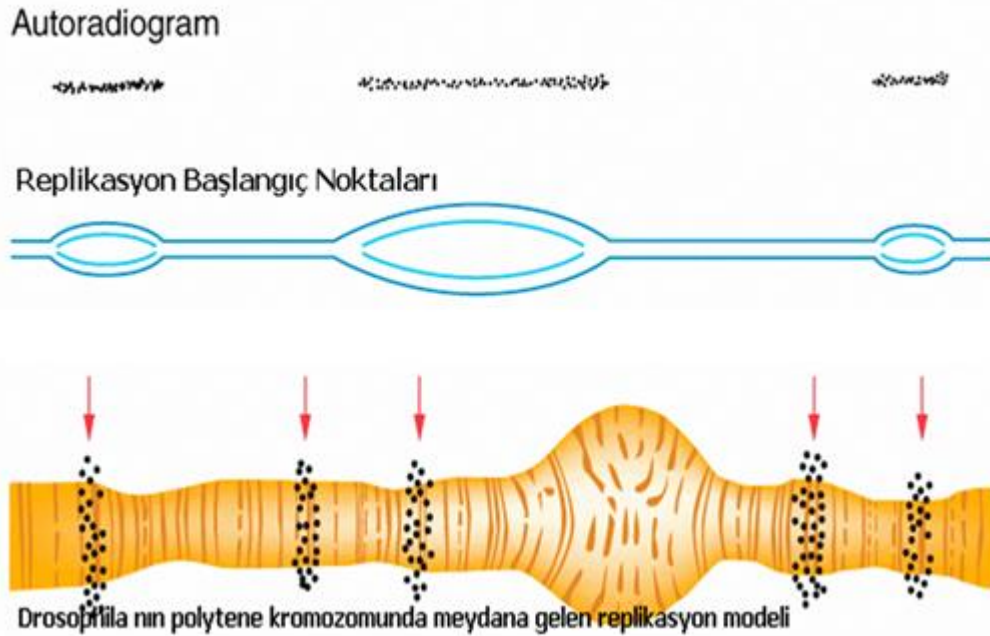
Özet olarak ökaryotik replikasyonda prokaryotik replikasyondaki bütün işlemler cereyan eder, ilaveten nükleozom denilen protein – DNA kompleksleri önce çözülüp sonra tekrar bağlanmalıdır.

X.3.2- Replikasyonun Ökaryotik Orijinleri

E. coli (coli) gibi bakteriler bir replikasyon – bölünme devrini çoğunlukla 20 ile 40 dakikada tamamlar fakat ökaryotlarda devir, mayalarda 1.4 saatten kültür hayvanları hücrelerinde 24 saate kadar

değişebilir ve bazı hücrelerde 100–200 saat kadar sürebilir. Çünkü ökaryotlar, kromozomun kendi karmaşık yapısını replike etmek yanında, birden fazla kromozom replikasyonunu koordine etmek durumundadır.

Ökaryotik replikasyon orijinlerini anlamak için önce basit ökaryotik canlılar olan mayalarda çalışıldı. Mayadaki replikasyon orijinleri, *E. coli*'deki oriC'ye çok benzer. 100-200bç uzunluğundaki orijinler olup, bir başlangıç proteini ardıl bağlanma sitelerine bağlandığı vakit açılan AT'ce zengin bölgeler içeren korunmuş bir DNA bölgesine sahiptir. Prokaryotik kromozomların tersine her bir ökaryotik kromozom, çok daha büyük ökaryotik genomun çabucak kopyalanması için, birçok replikasyon orijinine sahiptir. Yaklaşık olarak 400 replikasyon orijini ekmek küfünün 16 kromozomu boyunca dağılmıştır ve insanın 23 kromozomunda binlerce açılan çatal var olduğu tahmin edilmektedir. Buna göre, ökaryotlarda replikasyon birçok başlangıç noktasından her iki yöne doğru devam eder (şekil:X.8). Replikasyonun her bir çatallında üretilen ikili sarmallar uzayarak sonunda biri diğerine bağlanır. İki eksenin replikasyonu tamamlandığı zaman DNA'nın iki özdeş kardeş molekülü ortaya çıkar.



Şekil: X.8- Drosophila polyten kromozomunda çoklu replikasyon çatalları ve başlangıç noktaları (Griffith ve ark. 2000, sh. 256, Şekil: 8-25 ve Şekil 8-26'dan uyarlanmıştır)

DNA sentezi ökaryotik hücre çoğalma döngüsünde S (sentez) döneminde cereyan etmektedir. Ekmek küf hücrelerinde yapılan araştırmalar, replikasyonu başlatmak için gerekli proteinlerin geç mitoz ve G1 fazında sentezlenip, sentez başladıktan sonra hemen parçalanarak tahrip edildiğini göstermiştir. Bu şekilde replikasyon mekanizması S fazından hemen önce kurulmaktadır.

Ekmek küfünde 400 replikasyon başlangıç noktasının çoğunda 100–200 bç vardır. Daha yüksek ökaryotik organizmalarda ise DNA üzerinde replikasyon başlangıç dizileri on binlerle ifade edilecek kadar çok sayıda bç ihtiva etmektedir. Dolayısıyla yüksek ökaryotlarda replikasyon mekanizmasını başlatan proteinlerin özgün bir DNA dizisini tanımaktan daha farklı

bir faaliyet gösterdikleri düşünülmektedir. Ancak bugün için böyle organizmalardan başlangıç noktaları izole ederek çalışmak, prokaryotlardaki ve ekmek küfündeki kadar kolay değildir. S döneminde replikasyonun, gen bakımından zengin ökromatin bölgelerinde daha önce başladığı bilinmektedir. Başlangıç noktalarını tanıma proteinleri başlangıç dizilerini tanıma işi yapsalar böyle bir zamanlama farkı ortaya çıkmaması gerekir. Bu proteinlerin önce gence zengin bölgelerde başlangıç dizilerinde replikasyonu tamamlayıp, sonra kromatinin gence fakir yoğun bölgelerinde başlangıç dizilerine bağlanmaları, izah edilmesi gereken bir bulgudur.

Özet olarak, replikasyonun nerde ve ne zaman olacağı, hücredeki replikasyon mekanizması (replizom) tarafından dikkatle kontrol edilir. Çember şeklindeki prokaryotik kromozomda replikasyon bir başlangıçtan, düz ökaryotik kromozomların her birinde ise yüzlerce hatta binlerce başlangıçtan her iki yöne doğru devam eder. (Griffith ve ark 2008)

Prokaryotlarda replikasyonun sonlanması çatal, çember şeklindeki DNA'nın tamamını kat ettiği zaman sonlanmaktadır. Ökaryotlarda ise birçok replikasyon başlangıç noktasından başlayan replikasyonlar her iki yöne devam ederek birbirleriyle birleşir, sonunda lineer DNA molekülünün telomerler denilen iki ucuna ulaşır. Rehber eksen devamlı sentezlenerek kromatinin sonuna ulaşır, geciken eksen ise sürecin önünde giden bir primere gerek olduğu için yeni DNA moleküllerinin birinde tek eksenli bir uç kalacaktır. İkinci replikasyon generasyonunda bu uçtaki kayıp dizi replike olmayacak ve eğer tedbir alınmazsa DNA kısılacaktır. Bu tedbir işlemi yüzünden telomerlerin replikasyonu ve dolayısıyla replikasyonun sonlanması, ökaryotlarda daha karmaşık bir işlemdir.

Özet olarak, Telomerler, kromozom uçlarında, telomeraz enzimi tarafından 3' uçlarına eklenmiş olan kısa bir DNA dizisinin tandem tekrarlarını içeren özellikli yapılardır. Telomerler, her bir DNA replikasyon raundundan sonra olası genomik enformasyon kaybını engelleyerek ve kromozom uçlarını hücre DNA tamir makinesinden "saklayan" bir şapka oluşturmak üzere proteinlerle birleşerek kromozomları sabit yapar.

Telomerler somatik hücrelerde yaşla birlikte kısalmır çünkü bu hücrelerde telomeraz yapılmaz. Oysa cinsiyet hücrelerinde çokça telomeraz vardır. Kusurlu telomerlere sahip olan bireyler erken yaşlanma olgusu yaşarlar.

X.4- Özet: DNA Replikasyonunda Rol Alan Enzimler ve Roller

- Çatalı helikaz enzimi açar.
- Topoizomeraz enzimleri açılan DNA çatalında helikaz enziminin rahat ilerlemesi için çatalın önünde kıvrılmaları önler.
- Ayrılan eksenlerin tekrar kıvrılmaması için single strand binding proteinler eksenin arkasına destek olur.
- Çatal açılırken DNA Polimerase III enzimi bir eksen boyunca hemen nükleotidleri birbirine bağlar. (Leading Eksen)
- Diğer eksen (Lagging Eksen) tarafında ise primosome denilen, etkili maddesi Primase enzimi olan proteinler yoluyla 5-8 nükleotidlik bir RNA başlangıç molekülü oluşturulur.

Polimerase III enzimi hemen çatalın olduğu yerden 1000-2000 nükleotidlik bir fragment oluşturur; (Okazaki Fragment). Sonra hemen 5' ucuna, çatala döner. Çünkü çatal açıldığından orada primosome yeni bir primer oluşturmuştur. Leading ekseninde ise primosome, sadece bir defa başlangıç RNA'sı oluşturur. Orada yeni zincir 3' - 5' istikametinde sürekli uzar.

- RNA primeri Okazaki fragmentinden pol I enzimi yoluyla uzaklaştırılır. Ve Pol I RNA'dan kalan boşluğu DNA ile doldurur.
- Ligaz iki parçayı birleştirir.

X.5- Çalışma Problemleri

V.1. Bir DNA molekülünü 3'→5' yönünden okuyarak komplementer eksen sentezleyen enzim aşağıdakilerden hangisidir?

- a)DNA polimeraz b)Nükleaz c)Helikaz d)Ligaz e)Transferaz

V.2. Ökaryotik canlılarda replikasyon nasıl gerçekleşir?

- a)Tek bir noktadan başlar, her iki yöne devam eder, semikonservatiftir.
b)Tek bir noktadan başlar, tek yöne devam eder, semikonservatiftir.
c)Birden fazla noktadan başlar, her iki yöne devam eder, semikonservatiftir.
d)Birden fazla noktadan başlar, tek yöne devam eder, semikonservatiftir.
e)Tek bir noktadan başlar, her iki yöne devam eder, konservatiftir.

V.3. DNA replikasyonu ile ilgili aşağıdaki bilgilerden hangisi yanlıştır?

- a)Prokaryotik canlılarda replikasyon her iki yöne devam eder.
b)DNA replikasyonu semikonservatif şekilde meydana gelir.
c)Ökaryotik canlılarda replikasyon tek bir noktadan başlar.
d)Helikaz, çift sarmal DNA eksenlerini birbirinden ayıran enzimdir.
e)SSBP, DNA tek eksenlerine bağlanıp eksenlerin ayrı halde kalmasını sağlayan proteinlerdir.

V.4. I.Topoizomeraz enzimi okazaki fragmentlerini birleştiren enzimdir.

II.DNA polimeraz III, replikasyonda uzayan DNA zincirine nükleotidleri ekler.

III.DNA replikasyonunun gerçekleşmesi için primere gereksinim vardır.

IV.DNA replikasyonunda kesikli zincirin sentezinde primerin bir kere sentezlenmesi yeterlidir. Yukarıdaki bilgilerden hangisi/hangileri yanlıştır?

- a)I-II b)II-III c)II d)I-IV e)III

V.5. DNA replikasyonunda primer sentezleyen enzim aşağıdakilerden hangisidir?

- a)Helikaz b)Topoizomeraz c)DNA pol I d)DNA pol III e)RNA pol primaz

V.6. DNA molekülünün replikasyonu ile ilgili olarak aşağıdaki seçeneklerden hangisi yanlıştır?

- a)Helikaz enzimi sarmal yapıyı açan enzimdir.
b)Topoizomeraz enzimi kalıp eksenin 5' ucuna 8-10 bazlık bir primer sentezler.
c)Replikasyonun ana enzimi DNA polimeraz III olup nükleotid sentezini yapan enzimdir.
d)Okazaki fragmentleri arasındaki boşlukları kapatan enzim ligaz enzimidir.

e)5'→3' kalıp ekseninde daima kesikli sentez yapılır ve okazaki fragmentleri oluşur.

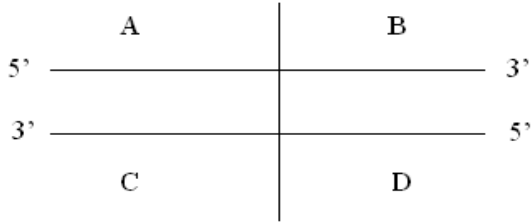
V.7. Prokaryotik canlılarda replikasyon nasıl gerçekleşir?

- a)Tek bir noktadan başlar, her iki yöne devam eder, semikonservatiftir.
- b)Tek bir noktadan başlar, tek yöne devam eder, semikonservatiftir.
- c)Birden fazla noktadan başlar, her iki yöne devam eder, semikonservatiftir.
- d)Birden fazla noktadan başlar, tek yöne devam eder, semikonservatiftir.
- e)Tek bir noktadan başlar, her iki yöne devam eder, konservatiftir.

V.8. DNA replikasyonu sırasında okazaki fragmentlerinin arasını birleştiren enzime ne ad verilir?

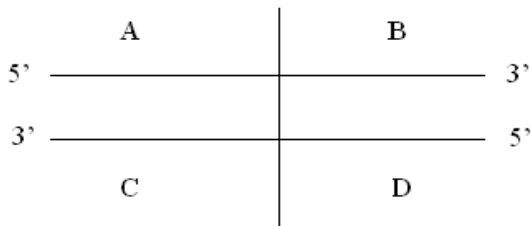
- a)Topoizomeraz
- b)Peptidaz
- c)Primaz
- d)Ligaz
- e)SSBP

V.9. Aşağıda verilen replikasyon şemasında "C" segmentinde nasıl bir replikasyon gerçekleşir?



- a)Sağa doğru ilerleyen kesikli sentez
- b)Sağa doğru ilerleyen sürekli sentez
- c)Sola doğru ilerleyen kesikli sentez
- d)Sola doğru ilerleyen sürekli sentez

V.10. Aşağıda verilen replikasyon şemasında hangi segmentte "sola doğru ilerleyen kesikli sentez" gerçekleşir?



- a)A
- b)B
- c)C
- d)D

Kaynaklar

Düzgüneş O. Ve H.R. Ekingen, 1983, Genetik, İkinci Baskı, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayını, Ders Kitabı, Ankara.

Griffiths A.J.F, J.F. Miller, D. T. Suzuki, R.C. Lewontin, W.M. Gelbart, 2000, Introduction to Genetic Analysis, 7th edition, Freeman and Company, USA

Griffiths A.J.F, S.R. Wessler, R.C. Lewontin, S.B. Carroll, 2008, Introduction to Genetic Analysis, 9th edition, Freeman and Company, USA

Klug W.S and M.R. Cummings, 1997, Concepts of Genetics, 5th edition, Prentice Hall, USA

Russell P.J., 2006, iGenetics A Mendelian Approach, Pearson - Benjamin Cummings,, USA.

Yıldız, M.A., 2010, Basılmamış Genetik Ders Notları, Ankara.