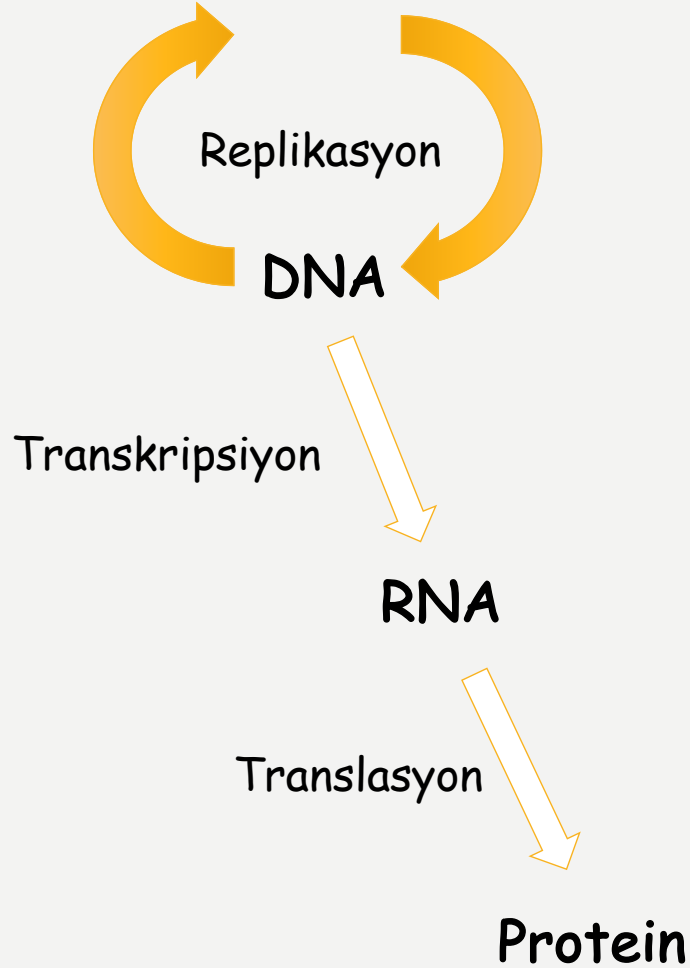


PROTEİN BİYOSENTEZİ

DOÇ.DR.FILİZ BAKAR ATEŞ

SANTRAL DOGMA



Bilginin, DNA...RNA...Protein şeklinde aktarılmasıdır.

Genetik bilgi deposu olarak RNA'yı kullanan tüm organizmalarda (bazı virüsler hariç) tanımlanmıştır.

DNA

- Ökaryotik hücre çekirdeklerinin kromozomlarında,
- Mitokondrilerde
- Bitkilerin kloroplastlarında bulunur.

DNA

Prokaryot hücrelerde (çekirdek -)

- ✓ Tek bir kromozom bulunur
- ✓ Plazmidler (kromozom yapısında olmayan sitoplazmik DNA'lar)

DÖLLENMİŞ BİR YUMURTADAKİ DNA !!!



- Organizmanın gelişimini yönlendirecek bilgiyi kodlar
- Milyonlarca özelleşmiş hücre sentezi

DNA

- Organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için;
- Hücreler kendilerine düşen görevleri gerçekleştirir.
- Her hücre bölünüşünde DNA tam olarak replike olmalı ve bölünen hücre özelliğine göre, seçici olarak belirli bilginin ifade edilmesi sağlanmalıdır.

DNA'NIN YAPISI

DNA'NIN YAPISI

- Polideoksiribonükleotit
- 3'-5'-fosfodiester bağı ile kovalan bağı monodeoksirübonüklotitler
- Çift sarmal yapıda (Tek sarmal içeren birkaç virüs hariç)
- Çift heliks

- Ökaryotiklerde DNA, çeşitli proteinlerle ilişkili olarak çekirdekte bulunur (nükleoproteinler)
- Prokaryotlarda; nükleoid

1. 3'-5' FOSFODIESTER BAĞLARI

- Fosfodiester bağı, bir nükleotidin deoksipentozuna ait 5'-hidroksil grubunu, diğer nükleotidin deoksipentozuna ait 3'-hidroksil grubuna bir fosfat grubu aracılığı ile bağlar.

Dallanmış bir zincir oluşturur

- Zincirin uçlarındaki nükleotitler, zincirin 5' ve 3' uçlarını oluştururlar.
- DNA'nın omurgası: Deoksiriboz-fosfat iskeleti

FOSFODIESTER BAĞLARININ HIDROLIZI

- a) Kimyasal hidroliz
- b) Enzimler ile : Nükleazlar
 - Ribonükleaz
 - Deoksiribonükleaz

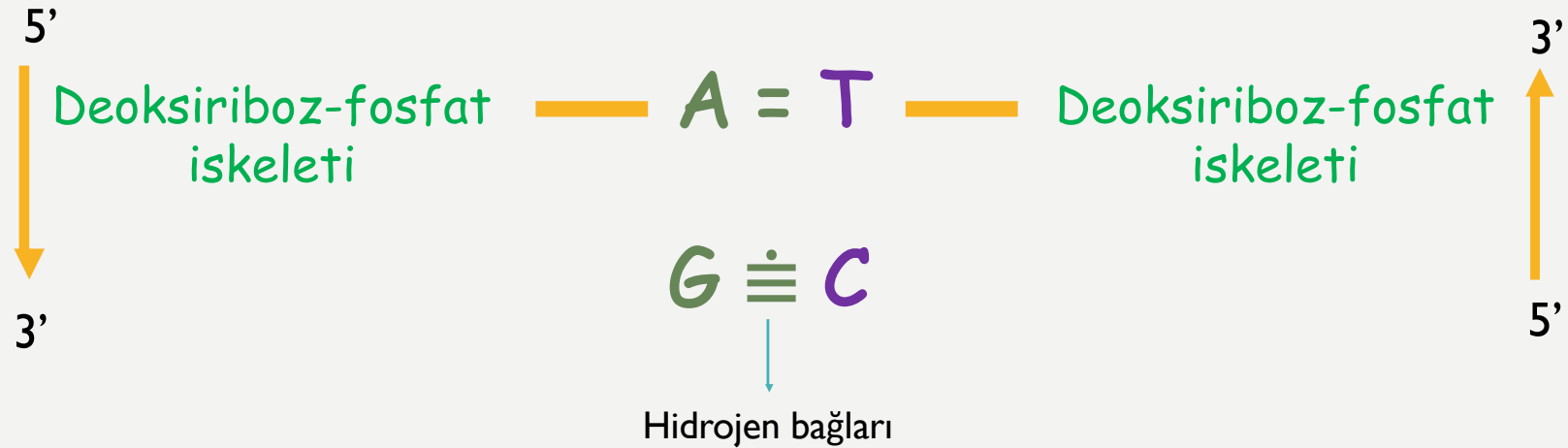
Endonükleazlar (zincirin iç ve orta kısımlarındaki nükleotitleri ayırır)

Eksonükleazlar (zincirin baş ve sonundaki nükleotitleri ayırır)

2. ÇİFT HELİKS

- Zincirler antiparalel
- **Hidrofilik** deoksiriboz-fosfat ana iskeleti dış kısımda, hidrofobik bazlar iç kısımda, heliks eksenine dik (B formu)
- İki sarmalın oluşumu sırasında geniş ve dar oluklar
- Aktinomisin D (antikanser), DNA heliksinin minör oluşuna yerleşerek sitotoksik etkili, DNA-RNA sentezi inhibisyonu

BAZLARIN EŞLEŞMESİ



- DNA çift heliksindeki bir nükleotit zinciri, daima diğer zincirin karşıtı ve komplementeridir !!!!

- Hidrojen bağları ve bazlar arasındaki hidrofobik etkileşimler çift heliks yapının dayanıklılığını sağlar.

➤ HELİKS YAPIDA DNA SARMALININ BİRBİRİNDEN AYRILMASI

- Bazlar arasındaki H bağlarının bozulması ile DNA sarmalı ayrılır
- ✓ DNA çözeltisinin pH'sı değiştirilirse (bazların iyonizasyonu)
- ✓ Isının artırılması
- Fosfodiester bağları, pH ve ısı değişikliklerine dayanıklıdır.

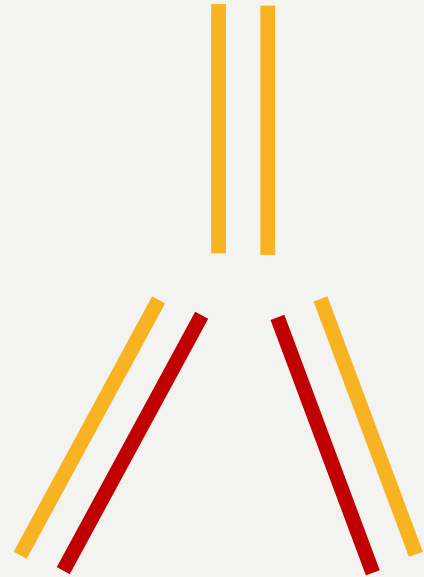
➤ LINEER VE SİRKÜLER DNA MOLEKÜLLERİ

- Bir ökaryot nükleusundaki her kromozom, histon ve non-histon proteinler ile kompleks oluşturmuş, uzun, lineer bir dsDNA molekülü içerir.
- Ökaryotlar, mitokondrilerinde ve bitkiler kloroplastlarında kapalı, sirküler DNA içerirler.

DNA SENTEZİ

- DNA çift heliksini oluşturan sarmallar birbirinden ayrıldıklarında, her biri yeni sentezlenecek DNA için kalıp vazifesi görür.
- Sarmallar komplementerdir.
- DNA'nın iki sarmalının karşısına komplementer sarmalların oluşmasına "semikonservatif replikasyon" denir.

SEMIKONSERVATIF DNA REPLIKASYONU



DNA SENTEZİ

- E.coli, tek hücreli bir prokaryottur.
- DNA sentezi ilk kez bu bakteri üzerinde tanımlanmıştır.
- Polimeraz enzimleri !!!!

1. KOMPLEMENTER DNA SARMALLARININ BIRBIRINDEN AYRILMASI

- DNA'nın replike olabilmesi için önce çift zincirin, en azından sarmalın küçük bir bölümünün açılması gerekir.
- Neden??
- Polimerazlar tek zincirli DNA'yı kalıp olarak kabul ederler.

1. KOMPLEMENTER DNA SARMALLARININ BIRBIRINDEN AYRILMASI

- Prokaryotik organizmalarda DNA replikasyonu, tek ve belirli bir nükleotid dizisinde başlar
- Replikasyon orijini
- Ökaryotlarda, replikasyon, DNA heliksi boyunca birçok orijinden başlar...
- Neden ???
- Ökaryotik DNA mol. leri uzun... replikasyon hızı !!!
- Genellikle AT baz çifti gibi kısa nükleotid dizilerinden oluşan bölgeler
- Orijinler genelde AT baz dizisi içerdiklerinden, bunlara "Konsensus dizisi" denir.

2. REPLİKASYON ÇATALI OLUŞUMU

- 2 sarmal ters yönde dönerek açılırken, V şeklinde bir yapı oluşur.
- Replikasyon çatalı
- Aktif sentez replikasyon çatalında olur
- Replikasyon ilerledikçe, replikasyon çatalı da ilerler
- Çift sarmallı DNA'nın replikasyonu da çift yönlüdür.

DNA SARMALININ AYRILMASI İÇİN GEREKLİ PROTEİNLER

Replikasyonun başlaması için, orijin/replikasyon çatalının belirli bir grup protein tarafından tanınması gerekir. Bu proteinler, orijin/replikasyon çatalına oturarak "öncül kompleks (prepriming complex)" oluştururlar.

- ✓ DnaA protein
- ✓ DNA helikazlar
- ✓ Tek sarmallı DNA bağlayan proteinler (TSB)
(Single stranded DNA binding protein SSB)

DNAa PROTEİNİ

- AT baz çiftlerince zengin replikasyon orijini bölgesine 20-50 DnaA proteini bağlanır.
- **ATP gerekli !!**
- Çift sarmallı DNA sarmalları birbirinden ayrılarak tek sarmallı bölgeler meydana gelir.

DNA HELIKAZ ENZİMLERİ

- Tek sarmallı DNA'ya replikasyon çatalının yakınında bir yerden bağlanır ve komşu çift sarmallı bölgeye doğru hareket ederler.
- Sarmalları birbirinden ayrılması için zorlar ve heliks ters yönde açılmaya başlar.
- Helikaz aktivitesi **ATP gerektirir !!**
- Sarmallar bir kez ayrılınca, hemen TSB proteinleri bağlanır ve heliksin tekrar oluşmasını önler.
- E.coli'nin temel helikazı DnaB'dir. DNA'ya bağlanması için DnaC gereklidir.

TEK SARMALLI DNA BAĞLAYAN PROTEİNLER (TSB)

- Heliks oluşumunu önleyen proteinler
- Sadece tek sarmallı DNA'ya bağlanır
- Bağlanmaları **kooperatiftir** !!!
- TSB proteinleri enzim değildir, tek sarmallı yapının sürdürülmesini sağlar, çift sarmal oluşumunu önlerler.
- Replikasyon bölgesinde, 2 DNA zincirini ayrı tutarken, aynı zamanda tek zincirin kalıp olarak kullanılmasını sağlarlar
- Tek zincirli DNA'yı nükleazların etkisinden korurlar.

3. "SUPERCOILING" SORUNU !!!

- Çift heliksi oluşturan sarmal birbirinden ayrıldıkça, pozitif süperkoiller (kıvrılmalar) üst üste birikir.
- Pozitif süperkoiller, DNA heliksinin orjinal heliksle aynı yönde dönmesi sonucu oluşur.
- Bunların birikmesi, çift heliksin geri dönerek açılmasını zorlaştırır.

Süperkoil birikimini önleyen ve çift heliks üzerinde destek noktaları oluşturan enzimler



DNA Topoizomerazlar

DNA TIP I TOPOİZOMERAZLAR

- Çift heliksi oluşturan sarmallardan birini geri dönüşümlü olarak koparırlar
- Hem **nükleaz** (zincir koparan) hem de **ligaz** (zincir bağlayan) aktiviteleri vardır.
- Aktiviteleri için enerjiye ihtiyaçları yok...
- Kopardıkları fosfodiester bağlarından çıkan enerjiyi kullanırlar.
- Zincirin bağlanmasında da bu enerjiyi kullanırlar.

DNA TIP I TOPOİZOMERAZLAR

- E.coli de negatif superkoilleri açarlar (gevşemiş DNA heliks kıvrımlarına kıyasla daha az kıvrım içeren DNA)
- Ökaryotik hücrelerde, hem negatif, hem de pozitif süperkoilleri (gevşemiş DNA heliks kıvrımlarına kıyasla daha çok kıvrım içeren) açarlar.

DNA TIP II TOPOİZOMERAZLAR

- DNA helikse sıkıca bağlanır ve her iki sarmalı geçici olarak koparırlar.
- Hem (-) hem (+) süperkoiller açılarak DNA heliksi rahatlar.

DNA TIP II TOPOIZOMERAZLAR

- Prokaryot ve ökaryotlar için gereklidir !!!!!
- Kromozomal replikasyonu takiben birbirine kitlenen ve karışan DNA moleküllerinin ayrılmasını sağlarlar.

DNA TIP II TOPOIZOMERAZLAR

- Süperkoilleri açan DNA Tip II topoizomerazlar ATP'ye ihtiyaç duymazlar...
- Fakat; prokaryotik DNA giraz'ın aktivitesi için enerjiye ihtiyacı vardır.

4. DNA REPLİKASYONUNUN YÖNÜ

DNA Polimeraz enzimleri....

- DNA polimerazlar, kalıp DNA daki nükleotit dizilerini 3'-5' yönünde okur.
- Buna komplementer yeni DNA zincirini 5'-3' yönünde sentezler.
- ✓ Çift sarmallı DNA heliksinde bir sarmala karşı sentezlenecek yeni zincir 5'-3' yönünde olacakken, diğeri 3'-5' yönünde olacaktır.
- ✓ **DNA polimerazlar 3'-5' yönünde sentez yapamaz !!!!**

4. DNA REPLİKASYONUNUN YÖNÜ



1. **Lider Zincir:** İlerleyen replikasyon çatlı ile birlikte 5'-3' yönünde sentezlenen zincirdir. Kesiksiz olarak sentezlenir.
2. **Kesikli Zincir:** Replikasyon çatalının tersi yönünde sentezlenen zincirdir. Sentezi, kesikli olarak kısa DNA parçaları halinde gerçekleşir.

"Okazaki parçaları"

- ✓ Bu parçalar, sonuçta birleştirilir ve kesiksiz zincir oluşturulur.

RNA PRIMERI

- DNA polimerazların, kalıp DNA zincirinden replikasyonu başlatabilmeleri için bir **PRIMER** gereklidir.
- Primer, kalıp DNA'nın başındaki nükleotid dizisine komplementer olarak, ribonükleotidlerden oluşmuş RNA parçasıdır.
- Kısa olan primer zincir, kalıp DNA ile sarmal oluşturur
- Primerin ' ucundaki OH serbesttir
- DNA polimeraz, bu serbest OH grubuna, kalıp DNA daki nükleotide komplementer olan deoksiribonükleotidi takar.

5. ZINCİR UZAMASI

- Ökaryotik ve prokaryotik DNA Polimeraz enzimleri
- Zincirin 3' ucuna her defasında kalıp zincirdekine komplementer bir deoksiribonükleotid takarlar...

DNA POLIMERAZ III

- DNA zincirinin uzamasından esas sorumlu olan enzimdir.
- Primerin 3' OH ucunu başlangıç kabul eder ve kalıp zincire göre dNTP leri zincire ekler.
- Bu sırada PPI molekülleri oluşur.
- Yeni zincir 5'-3' yönünde sentezlenir.

DNA POLIMERAZ III

- Bu rx ların yapıtaşları dNTP'lerdir.
- DNA zincirinin sentezlenebilmesi için 4 dNTP'nin de bulunması gerekli !!!!
- dATP, dGTP, dTTP, dCTP

YENI SENTEZLENEN DNA'NIN KONTROLÜ (PROOFREADING)

- DNA replikasyonu en az hata ile gerçekleşmelidir !!!
- Replikasyon hataları ölümcül mutasyonlara neden olabilir...
- Kontrol mekanizmaları...
- DNA polimeraz III'ün 5'-3' aktivitesi (zincir uzaması) ek olarak, 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi vardır.
- Replikasyonun doğruluğunu sağlar.

RNA PRIMERİN EKSIZYONU VE DNA'NIN YERLEŐTİRİLMESİ

- DNA polimeraz III, bir RNA primer dizisine gelinceye kadar DNA sentezine devam eder.
- Sonrasında, RNA primer buradan çıkarılır ve oluşan boşluk **DNA polimeraz I** ile kapatılır.

5'-3' EKZONÜKLEAZ AKTİVİTESİ

- DNA polimeraz III
 - a) 5'-3' polimeraz aktivitesi
 - b) 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi

DNA Polimeraz I (bunlara ek olarak)

5'-3' ekzonükleaz aktivitesi: Böylece RNA primer uzaklaştırılabilir.

DNA POLİMERAZ I

- ✓ DNA polimeraz III tarafından sentezlenen yeni DNA'nın 3' ucu ile buna komşu olan primerin 5' ucu arasındaki boşluğu belirler.
- ✓ 5'-3' yönünde RNA nükleotitlerini hidroliz ile ayırmaya başlar
- ✓ RNA'dan uzaklaşan nükleotitlerin yerine uygun nükleotitleri takar. (5'-3' polimeraz aktivitesi ile)
- ✓ Ayrıca, DNA sentezlendikçe, yeni zincirdeki nükleotitlerin doğruluğunu 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi ile kontrol eder.

- DNA polimeraz I
 - 5'-3' ve 3'-5' yönünde ekzonükleaz aktivitesi var

- DNA polimeraz III
 - Sadece 3'-5' yönünde ekzonükleaz aktivitesi var

DNA LIGAZ

- DNA polimeraz III tarafından sentezlenen DNA zincirindeki 5' fosfat grubu ile, DNA polimeraz I tarafından oluşturulan 3' OH grubu arasındaki son fosfodiester bağı, DNA ligaz enziminin katalizi ile oluşur.
- DNA'nın bu iki parçasının birleşmesi için ATP gereklidir...
- İnsanlarda, ATP'nin AMP+PPi parçalanmasından elde edilir.

ÖKARYOTİK DNA REPLİKASYONU

- Prokaryotlara çok benzerdir.
- Farkları:
 - Prokaryotlarda tek bir replikasyon orijini varken, ökaryotlarda multipl
 - Ökaryotik “single stranded DNA binding proteins” (TTB)
 - Ökaryotik ATP-bağımlı Dna helikazlar
 - RNA primerleri, DNA polimeraz yerine, RNaz H ve FEN I tarafından ayrılır.

ÖKARYOTİK DNA POLİMERAZLAR

- Moleküler ağırlık, hücresel lokasyon, inhibitörlere, ve etki ettikleri substratlara duyarlılıklarına göre en az 5 çeşit ökaryotik DNA polimeraz tanımlanmıştır.

ÖKARYOTİK DNA POLİMERAZLAR

➤ Pol α

-Çok altüniteli bir enzim

Primaz aktivitesi var (hem kesiksiz, hem de okazaki fragmentleri üzerinde)

Primaz alt ünitesi pol α 5'-3' polimeraz aktivitesi ile uzatılan kısa RNA primerleri sentezler.

➤ Pol ϵ ve pol δ

-Pol ϵ 'nin kesintisiz (leading) DNA ipliğini, pol δ 'nin ise okazaki fragmentini sentezler, 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi ile proofreading

➤ Pol β

-DNA onarımında "gap filling" (primerleri çıkarıp bu bölgelerin onarımını yapar)

➤ Pol γ

-Mitokondriyal DNA replikasyonunu gerçekleştirir

ÖKARYOTİK DNA'NIN ORGANİZASYONU

- Normal insan hücrelerinde 46 kromozom
- Total DNA uzunluğu 1 m
- DNA, özgün işlevleri olan çok sayıda protein ile ilişkili
- Histon adlı bazik proteinler ile sıkıca bağlanarak "nükleozomlar" oluşturulur

HISTONLAR VE NÜKLEOZOMLARIN OLUŞUMU

- 5 çeşit histon proteini: H1, H2A, H2B, H3, H4

HISTONLAR VE NÜKLEOZOMLARIN OLUŞUMU

- Histonlar;

- Arginin ve Lizin içeriği zengin, bu nedenle fizyolojik pH'da (+) yüklüdür.

- (+) yüklü olduklarından, (-) yüklü DNA ile **iyonik bağ** kurarlar

- Mg⁺² gibi (+) yüklü iyonlarla beraber DNA'nın fosfat gruplarından gelen (-) yükü nötralize etmeye çalışırlar.

NÜKLEOZOMLAR

- Her nükleozomun orta kısmında, H2A, H2B, H3, H4 (2'şer adet) bulunur.
- Bu proteinlerin etrafına DNA çift heliksi yaklaşık 2 kez sarılmıştır.

POLİNÜKLEOZOMLARIN OLUŞUMU

- 2 nükleozom arasında yaklaşık 50 nükleotid içeren "bağlayıcı DNA" parçası
- Bu parçalarla birbirine bağlanan nükleozomlar "**polinükleozom (nükleoflaman)**" yapısı oluşturur.
- Bu yapı bir kıvrım gibi gözükür ve "30 nm fiber" denir.
- Bu ipliksi yapılar, başka nükleer proteinlerle de birleşir ve klasik kromozom yapısı oluşur.

KAYNAKLAR

- Lippincott's Biochemistry, 5th Edition
- Harper's Illustrated Biochemistry, 28th Edition