NUKLEAZ ENZİMLERİ

Nukleik asitlerde fosfodiester bağlarını hidrolize eden enzimler nukleazlar olarak bilinmektedir. Tüm hücre tiplerinde belirlenen bu enzimler memelilerde pankreasta üretilmekte ve ince bağırsağa salgılanmaktadır. Burada rolleri, besinlerle alınan nukleik asitleri sindirmektedir. Ökaryot hücrelerde nukleazlar lizozomlarda bulunur. Nukleazlar birçok özellik esas alınarak sınıflandırılmaktadır. En temel farklılık DNA ya da RNA’ya karşı etkili olmalarıdır. DNA’ya etkili nukleazlar deoksiribonukleazlar ya da DNaz’lar, RNA’ya etkili nukleazlar ise ribonukleazlar ya da RNaz’lar, olarak adlandırılmaktadır. Bir çok nukleaz ise hem DNA ve hem de RNA’nın fosfodiester bağlarını hidrolize etme yeteneğindedir. Nukleazlar ayrıca polinukleotit zincirindeki etki bölgesine göre de sınıflandırılmaktadır. Bu etkiyi, polimerin ya 3′ ya da 5′ bölgesinden nukleotitlerin dizisel olarak ya da küçük oligonukleotitler halinde ayrılması biçiminde gösteren enzimler ekzonukleazlar, zincir içinde göteren enzimler ise endonukleazlar olarak adlandırılır. Nukleazlar, nukleik asitlerin 5′-3′ fosfodiester bağlarını kırarak 5′ nukleotidil ya da 3′ nukleotidil ürünlerini oluşturur. Nukleazların nukleozit 5′ monofosfatları oluşturduğu reaksiyon a-tipi kesim, nukleozit 3′ monofosfatları oluşturduğu reaksiyon ise b-tipi kesim olarak tanımlanır. Nukleazların spesifiteleri de değişiklik gösterir. Bazısı 5′🡪3′ fosfodiester bağlarını tüm nukleotitler arasından kırarken, bazıları ya purin ya da primidin bazlarını tercih eder. Deoksiribonukleazlar DNA’ya etkili fosfodiesterazlardır. Endo ya da ekzonukleofilik aktivite gösterirler. Ekzonukleazlar 3′ ya da 5′ uç aktivitesine göre 3′→5′ ya da 5′→3′ ekzonukleazlar olarak tanımlanır. Endonukleazlar katalitik aktiviteleri için ne 5′ ne de 3′ uç bölgeye ihtiyaç gösterirler. Çift zinciri iç bölgelerden rastgele kesen endonukleazlar yanında, belirli uzunluktaki baz serilerini tanıyan ve kesen endonukleazlar da (restriksiyon endonukleazlar) tanımlanmıştır. Restriksiyon endonukleaz terimi, bu enzimlerin izole edildiği bakteri hücresi içine giren faj DNA’ inin parçalanması olayına atfen kullanılmıştır. Bu tip konakçı bakteri hücrelerine de “restricting” (parçalayıcı) adı verilmiştir.

**REPLİKASYON**

Genetik bilginin bir jenerasyondan diğerine transferi, Aristo’ dan, söz konusu mekanizmanın keşfine değin bilim adamlarının bulmacası olagelmiştir. DNA genetik bilginin deposudur. Dolayısı ile atasal hücreden oluşacak iki yavru hücreye transferi için, hücre bölünmesinden önce kendi eşini meydana getirme zorunluluğu vardır. DNA’nın yapısının keşfi ile eş zamanlı olarak, replikasyonu üzerinde de ilk teori ileri sürülmüştür. J. D. Watson ve F. H. Crick 1953 yılında DNA’nın yapısını açıkladıkları ünlü makalelerinde; spesifik baz eşleşmesinden dolayı bir zincirin, doğrudan diğer DNA zincirinin baz kompozisyonunu belirlediğini ve dolayısı ile DNA çift zincirlerinin her birinin yeni zincir sentezinde şablon görevi göreceğini ileri sürmüşlerdir. Bu tip replikasyon modeline “semikonservatif replikasyon” adı verilmiştir. DNA’nın olası replikasyon mekanizması 1953 yılında formüle edilmiş ise de, semikonservatif mekanizmanın detaylarının saptanması 35 yıl daha almıştır. DNA’nın replikasyonunu katalizleyen enzimlerin, bu enzimleri kodlayan genlerin izolasyonu ve tanımlanması üzerinde çalışmalar ise, halen sürdürülmektedir. Bu karmaşık mekanizmanın çözümünde DNA replikasyonuna katılan genlerin mutasyonel analizi çok önemli bir rol üstlenmektedir.

Söz edilen çalışmalardan elde edilen veriler; hücrede herhangi bir görevin yerine getirilmesinde, çok sayıda polipeptidin nasıl organize olduğuna ışık tutmuştur. Zira replikasyon bir protein makinesi gibi fonksiyon görmektedir. Bazı proteinler izole edildiklerinde kısmi aktivite gösterebilmektedir. Bazıları ise ancak hücresel koşullarda oluşturdukları kompleksler halinde iken aktiftir. Bu protein makinesinin her bir bileşeni bir kromozomdaki DNA molekülünün in-vivo (hücre içi) koşullara doğru ve belirli bir hızda replikasyonuna yardımcı olmaktadır. Sistemin (makinenin) her bir polipeptit bileşeni organizmadan organizmaya detayda farklılık gösterir. Ancak genel hatları tüm organizmalar için aynıdır.

Watson ve Crick tarafından öngörülen semikonservatif replikasyon mekanizması, Mathew Meselson ve Franklin Stahl’in mükemmel deneyleri ile ispatlanmıştır (1958). Araştırıcılar deneylerinde; *E. coli* hücrelerini radyoaktif olmayan, 15NH4+ formunda ağır bir azot (15N) izotopu içeren ortamda uzun süre geliştirdiklerinde, sentezlenen tüm DNA zincirlerinin 15N içerdiğini belirlediler(15N+ 15N DNA). Çünkü santrifüje tabi tutulduklarında atasal DNA’ya oranla tuz solusyonunun daha yoğun bölgesinde bant vermişlerdir. 15N içeren ortamda geliştirilen hücreler, II. aşamada daha düşük ağırlıkta (14N) azot izotopu içeren (14NH4+ formunda) büyüme ortamına alınmıştır. Burada, bir jenerasyon süresince sentezlenen nukleotitlerin 14N içermesinden dolayı, oluşan yeni DNA molekülleri 15N içeren atasal DNA molekülüne oranla daha düşük yoğunluktaki solusyon bölgesinde bant vermişlerdir. DNA’nın replikasyonu gerçekten semikonservatif ise, bu jenerasyondaki hücrelerin; %50 oranında 15N ve %50 oranında da 14N içeren DNA (15N+14N DNA) yapısına sahip olmaları gerekmekteydi. Bu populasyonun 14N azot izotopu içeren büyüme ortamında geliştirilen bir sonraki generasyonunun DNA’larından sağlanan yoğunluk bantlarının; 14N ve 14N+15N yoğunluk bölgelerinde yer alması, semikonservatif replikasyon teorisini ispat etmiştir. Araştırıcılar söz konusu deneyin tüm aşamalarında “dengelenmiş yoğunluk düzeyi ultrasantrifüj” tekniğinden yararlanmıştır. Sezyum klorür gibi bir tuz solusyonu belirli bir hızda ultrasantrifüj işlemine tabi tutulur ise, en yoğun materyal an altta kalacak şekilde değişik yoğunluk düzeyleri meydana gelir. Bu tip solusyonlara herhangi bir molekül ilave edilip işlem tekrarlandığında da molekül kendi eş değeri yoğunluk bölgesinde bant verir. Semikonservatif replikasyon mekanizmasının ispatı, replikasyonun moleküler düzeydeki tüm detaylarının çözümü anlamını taşımamaktadır. Genel hatları ile tüm biyolojik sistemlerde benzerlik gösteren bu mekanizmanın genetik ve biyokimyasal düzeyde halen bilinmeyen ve aktif araştırma konusu olan bir çok aşaması bulunmaktadır.

*E. coli* hücrelerinde DNA replikasyonu üzerinde yürütülen bir çalışmada; bu bakteri hücreleri (3H) timidin içeren ortamda geliştirildiklerinde, 1. jenerasyonda oluşan hücrelerde DNA’nın bir radyoaktif (3H) timidin ve bir de radyoaktif olmayan zincir içerdiği belirlenmiştir. II. jenerasyonda ise replikasyon yarılanma aşamasında durdurulmuş ve kısmi replikasyon meydana gelmiş DNA’lar izole edilmiştir. Otoradyografisi ve elektron mikroskop görünüşü belirlenen örneklerde; radyoaktivitenin yeni sentezlenen DNA bölgesinde daha yoğun olduğu saptanmış ve kromozomda büyük bir ilmeğin oluştuğu (θ) gözlenmiştir. Yeni sentezlenen DNA bölgesi ile henüz sentezi yapılmamış DNA molekülünün çakışma bölgeleri “replikasyon çatalı” olarak adlandırılmıştır (Şekil 8). Bu yapı DNA replikasyonunun tek ya da çift yönlü olduğuna dair bir bilgi vermemekteydi. Yukarıda söz edilen deneyin bir varyasyonu ile de replikasyon yönü belirlenmiştir. *E. coli* hücreleri az miktarda radyoaktif, ancak çoğu radyoaktif olmayan timidin ile desteklenmiş bir ortamda geliştirildiğinde, söz konusu ortamın zayıf bir radyokativite gösterdiği saptanmıştır. Bu işaretli hücreler yüksek oranda (3H) timidin içeren ortamda transfer edildiğinde ise, yüksek oranda radyoaktivite belirlenmiştir. Hücre lizatlarının otoradyografileri alındığında; radyoaktivitenin büyük oranda replikasyon çatallarında lokalize olduğu saptanmıştır. Yüksek radyoaktivite, şablon DNA molekülleri karşısında son sentezlenen nukleotitlerin işareti olduğundan, bu deney replikasyonun her iki çatalda da oluştuğunu ya da diğer bir deyişle iki yönlü olduğunu ispat etmiştir.

Yine *E.coli*‘de yürütülen çalışmalarda, şablon DNA zincirleri tarafından yönlendirilen DNA sentezine katılan 3 enzim belirlenmiştir. Bu 3 enzim; DNA polimeraz I, DNA polimeraz II ve DNA polimeraz III olarak adlandırılmıştır. Her üç enzim fizyolojik fonksiyonları ile birbirinden ayrılmaktadır. DNA polimeraz III şablon zincir karşısında nukleotitlerin sentezinden, yani zincir uzamasından sorumludur. DNA polimeraz I, replikasyonda DNA üzerinde oluşan bozulmalar ya da hataların tamiri işlevi görür. DNA polimeraz II enziminin ise DNA tamir sistemlerinde rol aldığı yakın geçmişte tanımlanmıştır. Bunların yanında, hata eğilimli sentez aktivitesi gösteren DNA polimeraz IV ve SOS (yüksek mutajen etkisine karşı son çare tamiri) tamir mekanizmalarında rol alan DNA polimeraz V enzimleri de *E.coli*‘de tanımlanmıştır. DNA polimeraz IV, DNA polimeraz II tarafından aktivitesi tamamlanan bir enzimdir ve bakteri gelişiminin durma fazına ulaşması ile üretimi teşvik edilmektedir. Bu bakteride durma fazında meydana gelen adaptif mutasyonların büyük çoğunluğundan DNA polimeraz IV sorumludur.

DNA polimeraz III, en karmaşık polimeraz enzimidir. Minimal aktivite gösterdiği formu α, ε ve θ alt ünitelerinden oluşan çekirdek formudur. En aktif formu ise 13 oligomer alt ünitenin meydana getirdiği haloenzimdir. Dokuz alt ünitenin enzim aktivitesindeki rolü büyük ölçüde tanımlanmıştır. Diğer dört alt ünitenin rölü henüz anlaşılamamıştır. Bazı alt üniteler kendi başına aktivite göstermemekte, ancak haloenzim kompleksine dahil olduklarında aktivite artışına yol açmaktadır (Çizelge 1).

**Çizelge 1. 1DNA polimeraz III haloenziminin temel alt üniteleri**

Alt Ünite Moleküler Ağırlık Aktivite

α (Alfa) (çekirdek)132.000 Polimeraz

ε (Epsilon) (çekirdek) 27.000 Hatalı polimerizasyonu saptama ve düzeltme

θ (Teta) (çekirdek) 10.000 ? (enzim işlevselliği)

β (Beta) 37.000 Enzim işlevselliği

τ (Tau) 71.000 Aktive artışı

δ (Delta) 35.000 Aktive artışı

δ‘(Delta’ ) 33.000 Aktive artışı

χ (Kipa) 15.000 Aktive artışı

ψ (Psi) 12.000 Aktive artışı

γ (Gamma) 52.000 Aktive artışı

DNA polimeraz III enziminin α alt ünitesi önemli oranda polimeraz aktivitesi gösterir. Haloenzim kompleksi, sentezlenen zincirin 3′ bölgesine 5′ deoksiribonukleozit fosfatları ilave eder. DNA polimeraz enzimleri çift zincir formlarda aktivite gösterir. Diğer bir deyişle, daima primere ihtiyaç duyarlar. Replikasyon esnasında primerler; 3′-5′ sentez yönünde primaz enzimi tarafından sentezlenirken, 5′-3′ sentez yönünde serbest bazların tek zincir bölgelerde yaptığı hidrojen bağları, çift zincirde bir fosfat bağının kırılması(çentik) ya da tek zincir karşısına kısa bir fragmentin bağlanması sonucu meydana gelebilmektedir. Şablon zincir karşısına nukleotitlerin ilavesi Watson-Crick baz eşleşmesi modeline göre gerçekleşir. Yani daima dA, dT ile dG ise dC ile eşlenir. DNA polimeraz III haloenzimi, aktivite için Mg+2 iyonlarına ve substrat olarak da deoksiribonukleotit trifosfatlara (dNTP) ihtiyaç duyar. Enzim şablon zincir karşısına dNTP’leri 5′-3′ fosfodiester bağları oluşturarak dizer ve zincir uzamasını sağlar. Fosfodiester bağlarının oluşumu, yeni sentezlenen zincirdeki serbest 3′ OH gruplarının, dNTP’lerin α fosfatlarıyla nukleofilik etkileşimi sonucu meydana gelir. Bir fosfodiester bağı oluştuğunda, pirofosfat yer değiştirir ve pirofosfataz vasıtası ile hidrolize edilir. Pirofosfatın hidrolizi, polimerizasyonun termodinamik itici gücünü oluşturur. Pirofosfat serbest kaldıktan sonra, haloenzim bir amino asidi ile bir başka nukleotide bağlanacak duruma gelir ve sentez süreklilik kazanır.

DNA polimeraz III, 37° C’ de yaklaşık 1000 nukleotidi şablon DNA karşısına polimerize etme yeteneğindedir. Bu oran hücre içi koşullarda bilinen en hızlı polimerizasyon oranıdır. Bununla beraber in-vitro koşullarda enzim aktivitesi, bazı ünitelerin in-vivo (hücre içi) koşullardaki aktivitesinin in-vitro da (hücre dışı) düşmesi nedeni ile, azalmaktadır. Yalnız diğer bir çok proteinin de ortamda olması durumunda in-vivo koşullardaki polimerizasyon hızı, in-vitro koşullarda da sağlanabilir. DNA polimeraz III enzimi yeni sentezlenen zincire dNTP’ ları iki yolla ilave edebilir:

1. Yeni bir dNTP şablon zincir karşısına polimerize edildiğinde enzim ayrılır ve diğer kısmi sentezi yapılan zincire rastgele bağlanır. Bu katalitik süreçte enzim havuzu kısmi olarak sentezlenmiş zincirler arasında taksim edilir. Bu tip sentetik süreç, bölüşülmüş süreç olarak tanımlanır.

2. Bir polimeraz enzimi şablon üzerinde DNA sentezine başladığında, bir zincirin replikasyonu tamamlanıncaya değin şablon zincire bağlı kalır. Enzimin yeni sentezlenen zincirde polimerizasyon boyunca bağlı kalması “işlevsel” olarak tanımlanmaktadır. Bir hücrede yalnız 20 DNA polimeraz III haloenzim kompleksinin bulunduğu göz önüne alınır ise, DNA polimeraz III enziminin büyük bir olasılıkla işlevsel olduğu sonucu çıkmaktadır.

Bölüşülmüş ve işlevsel mekanizmalar, enzimin bir zincirde devam edip etmeme yeteneğinin, diğer bir ifadeyle bir zincirden ayrılıp diğer zincirde sentez yapabilme özelliğinin belirlenmesi ile saptanabilir. Bu doğrultuda yapılan deneyde; polimeraz III enziminin şablon zincire bağlanması ve sentezi yürütmesi sağlandıktan kısa bir süre sonra, ortama bir başka şablon DNA zinciri ilave edilmiştir. Belirli bir süre polimerizasyon optimum koşullarda sürdürüldükten sonra durdurulmuş ve yeni sentezlenen DNA örneklenmiştir. Eğer DNA polimeraz III enziminin mekanizması bölüşülmüş ise, polimeraz III enziminin, yeni şablon DNA ortama ilave edildiğinde, birinci şablon zincirden ayrılıp, II. şablon zincirde polimerizasyona devam etmesi gerekiyordu. Yani her iki şablon zincir karşısına da DNA sentezinin yapıldığı belirlenecekti. Eğer enzim işlevsel ise; ikinci zincirde polimerizasyonun başlayabilmesi için, birinci zincirdeki polimerizasyonun tamamlanması zorunludur. Sonuçlar alındığında DNA polimeraz III haloenzim kompleksinin çok yüksek düzeyde işlevsel olduğu saptanmıştır.

DNA polimeraz III enziminin işlevselliği üzerinde etkili değişik unsurlar vardır. Bunların biri β alt ünitesidir. Tek başına herhangi bir aktiviteye sahip olmayan bu alt ünite,

haloenzime bağlandığında bir kelepçe gibi davranarak α alt ünitesinin işlevselliğini sağlar. Bu görevi üstlenirken, büyük bir olasılıkla, diğer üniteler de β alt ünitesi ile kümülatif bir etkileşim içerisindedir. DNA polimeraz III enziminin işlevselliği, “sarmalı destabilize eden protein” olarak da adlandırılan “tek zincir bağlanma proteinin” aktivitesine de bağlıdır. Tek zincir bağlanma (SSB) proteini DNA’nın tek zincirine spesifik bir şekilde bağlanarak açılan çift zincir bölgesinin yeniden kendi üstüne kapanmasını önler. SSB proteinin ortamda olmaması halinde çift zincir ya kendi üstüne kapanarak eski haline döner ya da saç tokası kıvrımları gibi bir hal alır. SSB proteini 18.000 Dalton moleküler ağırlıkta bir tertamerdir. Bağlanma, alt ünitelerin beraber işlev görmesi ile meydana gelir. SSB protein moleküllerinin varlığında oluşan açık DNA formasyonu, DNA polimeraz III için ideal bir substrattır ve polimerizasyon maksimum orana ulaşır. Çift zincirde bu açılma yapısının oluşabilmesi için sarmalların çözülmesi gerekmektedir. Çift zincir sarmallarını çözen enzimler helikazlar olarak adlandırılmaktadır. Her bir replikasyon çatalına iki helikaz bağlanır. Birincisi 65.000 Dalton moleküler ağırlıktaki rep proteini, ikincisi ise 50.000 Dalton moleküler ağırlıktaki dnaB proteinidir. dnaB proteini helikaz aktivitesi gösterebilmek için 6 dnaC proteini ve bir primozom bölgesine ihtiyaç duyar. Rep ve dnaB proteinleri, DNA zincirlerinin sarmallarını birlikte çözerek, iki ziciri ayırır. Rep proteini DNA üzerinde DNA polimeraz III enzimi aktivite oranına çok yakın bir hıza sahiptir. Bu nedenle haloenzim maksimum etkinlikte çalıştığında polimerizasyon ile ikili sarmalların çözülme oranı aynıdır.

DNA polimeraz III enziminin ε alt ünitesi 3′-5′ yönünde ekzonukleaz aktivitesi gösterir. Bu aktivite son nukleotidi, fosfodiester bağını kırarak, zincirden ayırır. DNA polimeraz III enziminin eş zamanlı bir şekilde ekzonukleaz aktivitesi göstermesi bir ikilem olarak görülebilir. Ancak bu durum bir ikilem değil, söz konusu enzimin hata düzeltme aktivitesidir. ε alt ünitesi, DNA polimeraz III enziminin yeni sentezlenen zincirde hatalı nukleotidi tanıması ve polimeraz aktivitesi ile zincir uzaması meydana gelmeden, düzeltmesine olanak sağlamaktadır. DNA polimeraz III enzimi ortalama 104 bazda bir hatalı baz eşleşmesi yapar. Yani hata oranı 10-4’dür. Genellikle bu hatalar haloenzimin 3′-5′ ekzonukleaz aktivitesi ile düzeltilir. Ekzonukleaz aktivitesinin hata oranı da 10-3’tür. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda; DNA polimeraz III enziminde hatalı polimerizasyon oranının 10-7 olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu, bugüne dek bilinen en düşük enzim hata oranıdır. DNA sentezi esnasında hatalı baz eşleşmesinin giderilmesi için büyük bir olasılıkla enerjiye ihtiyaç duyulur. 3′-5′ yönündeki ekzonukleaz aktivitesi için gerekli enerji nukleozit trifosfatlardan sağlanır. Polimerizasyon yapılan zincirdeki 3′ ucu, aktive edilmiş fosfoanhidrit değil, serbest OH grubu içerir. Dolayısı ile hatalı eşleşmenin düzeltilmesi esnasında son nukleotidin hidrolizi ile zincir uzaması durdurulur. Reaktivasyon ile de zincir uzaması yeniden başlar. İlk aşamada 3′ terminal nukleotit bir önceki nukleotitden 3′ serbest OH grubu ile ayrılır. II. aşamada doğru nukleotit bu bölgeye ilave edilir. Dolayısı ile replikasyon otomatik olarak kendini kontrol eder.

Şimdiye dek DNA sentezinin sadece 5′-3′ yönünden söz edildi, zira DNA polimeraz III enzimi bu yönde aktivite gösterir. 5′-3′ yönünde polimerizasyon süreklidir. Sentez, replikasyon çatalı yönünde sürer. Bu yönde sentezlenen zincire **“sürekli zincir”** ya da **“öncü zincir”** adı verilir. 5′-3′ yönündeki şablon zincirin karşısında 3′-5′ yönünde gelişen zincirde DNA polimeraz III enziminin sentez yönü yine 5′-3′ doğrultusundadır. Ancak burada sentez replikasyon çatalından uzaklaşarak sürer. 5′-3′ yönünün sağlanabilmesi için, 3′ bölgede 5′ uçları olan küçük fragmentlerin (primer) oluşturulması gerekmektedir. Ancak bu yolla, primerin sonunda yer alan OH grubu ile gelen nukleotidin α-fosfat grubunun nukleofilik etkileşimi gerçekleşir ve DNA polimeraz III enziminin posfodiester bağını katalize ederek polimerizasyonu sürdürmesi mümkün hale gelir. Replikasyonun bu tipine **kesintilili DNA sentezi,** bu şekilde sentezlenen zincire ise **gecikmiş zincir** ya da **kesintilili sentezlenen zincir** adı verilmektedir(Şekil 9).

Sürekli olmayan DNA sentezinin ispatı, yeni sentezlenen DNA’nın (3H) timidin ile işaretlenmesi ve replikasyon ortamındaki yapıların örneklenmesinden sağlanmıştır. Deneyde; (3H) timidin, replike olan *E. coli* ortamına kısa aralıklarla ilave edilmiş, değişik aşamalarda replikasyon kesilerek DNA molekülleri örneklenmiştir. Bu deney sonucunda iki tip DNA molekülü elde edilmiştir. I. tip DNA molekülleri çok büyük yapılardı ve yaklaşık %50 oranında radyoaktivite içermekteydi. II. tip moleküller ise yaklaşık 1000-2000 nukleotit uzunluğunda ve kısmi olarak replike olmuş durumdaydı. Bu küçük fragmentler kesintili DNA sentezine, uzun DNA molekülleri ise sürekli senteze -yani öncü zincire- işaret etmekteydi. Kesintili zincirdeki bu fragmente, bulucusuna atfen (Reiji Okazaki) **Okazaki fragmentleri** denmektedir. Kesintili sentez, gecikmiş zincir için söz konusudur. Burada DNA polimerazın 5′-3′ yönünde aktivite gösterebilmesi için, RNA primerleri 3′-OH grupları meydana getirir. RNA primerleri primaz ya da “dnaG” olarak adlandırılan enzim tarafından üretilir. Enzim moleküler ağırlığı 60.000 Dalton’ dur. Primaz, replikasyondaki işlev gören protein makinesinin bir parçası olan primozomun bileşenidir. Primozom bilinen 16 polipeptit içermektedir. 12 polipeptit, dnaB ve dnaC yapısında belirlenmiştir. Diğer 4 polipeptit n, n′ ve n′′ ve i olarak adlandırılmaktadır. Primozom replikasyon çatalını takip eder ve her saniye için 1-3 nukleotit uzunlukta bir RNA primeri sentezler. Replikasyon çatalının saniyede 1000 nukleotit ilerlediği göz önünde bulundurulursa, primazın her 1000 nukleotit için bir primer yaptığı ortaya çıkmaktadır. Daha sonra DNA polimeraz III, 5′-3′ yönünde DNA’nın polimerizasyonunu katalizler. Replike edilen DNA molekülünde, helikaz aktivitesi ile, yeni tek zincir bölgeler oluştukça primaz okazaki fragmentleri için yeni primerler sentezler. Sonuçta kesintili zincir, çok sayıda RNA primeri ve bunlara bağlı okazaki fragmentleri halinde tamamlanır. Bu noktada RNA primerleri 5′-3′ ekzonukleaz aktivitesi ile hidrolize edilir. Bu aşama ya RNaz H ya da DNA polimeraz I enzim aktiviteleri ile katalizlenir. RNA primerleri ortadan kaldırıldıktan sonra, kesintili zincir çok sayıda birbirine bağlı olamayan okazaki fragmentleri içerir. Okazaki fragmentleri arasındaki boşluklar bir kaç nukleotit uzunluktadır.

Arthur Kornberg tarafından keşfedilen DNA polimeraz I enzimi, şablon zincir üzerinde DNA sentezi yeteneği belirlenen ilk enzimdir. Bu tek zincir polipeptit; 5′-3′ ekzonukleaz, 3′-5′ ekzonukleaz ve 5′-3′ polimeraz aktivitelerine sahiptir. 5′-3′ ekzonukleaz aktivitesi ile RNA primerlerini okazaki fragmentlerinden ayırır. 3′-5′ ekzonukleaz aktivitesi ise, hatalı baz eşleşmelerinden kontrolü olarak çalışır ve polimeraz aktivitesi ile de RNA primerlerinin hidrolizinden sonra okazaki fragmentleri arasında meydana gelen boşlukları doldurur. DNA polimeraz I, proteaz enzimleri ile iki farklı uzunlukta fragmente kırılabilmektedir. Büyük fragment (76.000 Dalton) Klenow adını alır ve hem 5′-3′ polimeraz, hem de 3′-5′ ekzonukleaz aktivitesine sahiptir. 36.000 Daltonluk küçük fragment ise sadece 5′-3′ ekzonukleaz aktivitesi içermektedir. Deoksitimin 5′-monofosfat ile Klenow fragmentinin oluşturduğu kompleks X-ray kristalografi yöntemi ile incelendiğinde, enzimin yaklaşık 2 nm çapında bir yarık içerdiği ve bu bölgede B-DNA’nın bağlanmasına olanak sağlayan pozitif yüklü zincir yapısının bulunduğu saptanmıştır. Enzim şablon zincirin tümünü saracak düzeyde elastiki yapıdadır. Böylece zincir uzamasının, enzimin DNA’dan ayrılmaksızın devam etmesi sağlanır. Bu özellikleri DNA polimeraz I enziminin işlevsel etkisini doğurmaktadır. Aynı şekilde enzimin kristal yapısı, replikasyonun kontrolünde oynadığı rolü açıklamaktadır. Eğer DNA’ya polimeraz aktivitesi ile hatalı bir baz ilave edilmiş ise; DNA Klenow fragmentinin yarığından kayarken, hatalı baz yapısal olarak saptanır ve bu bölgede kayma durdurulur. Hatalı bazın ileriye doğru kaymayı sterik engellemesi, 3’-5’ yönünde kaymayı başlatır ve bu aşamada hatalı baz ekzonukleaz aktivitesi ile DNA yapısından çıkarılır.