DNA polimeraz I enziminin 5′-3′ yönündeki ekzonukleaz aktivitesi, çentik (nick) translasyonu mekanizması ile enzimin okazaki fragmentlerine bağlı RNA primerlerinde yer değiştirmesini sağlar. Enzim yeni sentezlenen DNA zincirinin 3′ ucu ile bir sonraki primerin 5′ ucu arasındaki boşluğu (nick) tanır ve buraya bağlanır. Bu aşamada enzimin 5′-3′ ekzonukleaz aktivitesi ile ilk RNA nukleotidi hidrolize edilirken, 5′-3′ polimeraz aktivitesi ile de uygun dNTP DNA zincirinin 3′ ucuna bağlanır. Bu şekilde enzim, iki zincir arasındaki boşluklarda (nick) 5′-3′ yönünde ilerler. DNA polimeraz I enziminin işlevselliği çok yüksek olmadığı için 10-12 hidroliz ya da polimerizasyon döngüsünde bir, geride kalan bağlanma bölgesinde (RNA primeri ile sentezlenen DNA arasında) boşluk (nick, fosfodiester bağı olmayan bölge) bırakarak DNA zincirinden ayrılır. Yeni DNA polimeraz I enzimi ayrılma bölgesine bağlanır ve zincir sonuna kadar bu süreç devam eder (Şekil 10).

 DNA replikasyonunda kesintili zincir sentezinin son aşaması okazaki fragmentleri arasındaki fosfodiester bağlarının oluşturulmasıdır. Okazaki fragmentleri arasındaki fosfodiester bağlarını DNA ligaz enzimi meydana getirir. Ligaz enzimi, bir okazaki fragmentinin 3′ OH ucu ile ardışık fragmentin 5′ fosfat ucu arasında fosfodiester köprüleri kurar. *E.coli*’ de bu reaksiyon için, kosubstrat NAD+ e (nikotinamit dinukleotit) ihtiyaç duyulur.

 DNA(boşluklu) + NAD+ DNA ligaz> DNA(boşluksuz) + NMN + AMP

 Hücrede öncü (sürekli) ve gecikmiş DNA zinciri (kesintili) sentez hızı, sıkı bir şekilde ilişkilidir. İn-vitro koşullarda öncü DNA zinciri sentezi daha hızlı ise de, in-vivo koşullarda böyle önemli bir farklılaşma görülmez. Bu bulgu iki zincirin sentezinin birbirine fiziksel olarak bağlı olduğuna işaret etmektedir. Çift zincirin sentezine katılan proteinlerin kombinasyonu ile meydana gelen protein kompleksi (replizom) bu fiziksel bağlantıyı sağlamaktadır. Bir replizom daha önce de belirtildiği gibi bir primozom ve iki DNA polimeraz III haloenzim kompleksinden oluşmaktadır. Bir DNA polimeraz III öncü zinciri sentezlerken, primozom ve II. DNA polimeraz III gecikmiş zincir sentezini yürütür. Replizom ayrıca DNA ikili sarmalını açan helikaz enzimlerini (dnaB ve rep proteinleri) içerir. Daha önce de belirtildiği gibi dnaB primozomun bir bileşenidir. Primozom replikasyon çatalını, 5′ -3′ yönünde ve kesintili (gecikmiş) zincir şablonu boyunca takip eder. dnaB burada kesintili (gecikmiş) zincir sentez yönünde, rep proteini ise öncü zincir sentez yönünde lökalize olmuştur. Her iki helikazın aktivitesi de, tek zincirlere SSB proteininin bağlanması ile süreklilik kazanır. İkili sarmalların açılması topolojik farklılıklar yarattığından, replizom yapısına DNA topoizomeraz I ve II enzimleri de dahil olur.

 Replizom modelinde (Şekil 11); replikasyon çatalına rep proteini ve primozom yerleştikten sonra, bunu her iki zincire birer DNA polimeraz III enziminin bağlanması takip eder. Replizom yapısında bulunan iki DNA polimeraz, tau (τ) alt ünitesi tarafından ilişkilendirilir. Helikaz enzimleri ikili sarmalı açtıkça, primaz enzimi kesintili zincir şablonu karşısına bir RNA primeri sentezler. Diğer zincirde DNA polimeraz III enzimi sürekli sentez yapar (5’ -3’ yönünde). Kesintili sentez yapılan zincirde DNA polimeraz III enzimi, oluşturulan primerlere dNTP’ları (deoksinukleotit trifosfat) bağlayarak okazaki fragmentlerini oluşturur. Kesintili zincir sentezinin devamı için, replikasyonda rol oynayan proteinlerin replikasyon çatalında bulunması zorunludur. Bu nedenle kesintili zincirde DNA polimeraz III enziminin aktivitesi, geriden replikasyon çatalına doğru ilerler. Yani her iki zincirin de sentez yönü aynıdır. Kesintili zincirde aktivite gösteren DNA polimeraz III enzimi, RNA primeri üzerinde yaklaşık 1000 nukleotidin sentezini yaptıktan sonra, diğer RNA primerine geçerek senteze devam eder. DNA polimeraz III enzimlerinin iki zincirde fonksiyonelliği bazı farklılıklar gösterir. Sürekli sentezlenen zincirde DNA polimeraz III enzimi zincirden asla ayrılmaz. Ancak, kesintili zincirde aktivite; bir primerde tamamlanan sentezden ayrılıp, bir başka primere bağlanma şeklinde gerçekleşir. Bu farklılık muhtemelen enzimlerin yapılarındaki farklılıktan ileri gelmektedir. Gerçekten de değişik haloenzimlerde çekirdek polimeraz alt üniteleri arasında küçük farklılıklar belirlenmiştir. Eğer replizom modeli doğru ise, sürekli ve kesikli zincirlerin nasıl sentezlendiğini açıklama yeteneğinde olmalıdır. Ayrıca hücrenin DNA sentezini nasıl yönettiğine de açıklık getirmelidir. Çok büyük oranda enerji harcanan bu sürecin yanlış zamanda başlaması söz konusu olamaz. Ayrıca bir kez başladığında da tamamlanmalıdır. Diğer yandan replizom kompleksi replikasyon için zorunlu elemanları içermeli ve bu elemanların doğru yerde ve zamanda bulunmalarını sağlamalı, yani diğer tüm biyolojik süreçlerde olduğu gibi, aktif kompleks çok fonksiyonlu olmalıdır.

 Replikasyonun gelişme aşamasından başlangıç aşamasına dönecek olursak; *E. coli* bakterisi ile yapılan genetik analizler, replikasyonun “replikasyon orjini” (*OriC*) olarak adlandırılan tek bir bölgeden başladığını göstermiştir. *OriC* bölgesi adı verilen bu bölge, asparajin sentetaz ve ATP sentetaz genleri arasında yer almaktadır. DNA replikasyonu burada başlar ve iki replikasyon çatalı tamamen birbirine kavuşuncaya kadar, iki zincirde de devam eder. *E. coli*’ de triptofan operonuna yakın bir yerde saptanan replikasyon orjini 245 nukleotit içermektedir. Bu nukleotitlerin yaklaşık üçte ikisi, çalışılan diğer bakterilerin “*OriC*” dizilerinde de aynı pozisyonda bulunmuştur. Değişik organizmalara ait DNA moleküllerinde, böyle korunmuş serilerin proteinler ile interaksiyonu sağladığı bilinmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi, DNA zincir sentezi ancak ilgili proteinlerin kompleks reaksiyonlarla replizoma entegrasyonu sonucu meydana gelir. Replizomun entegrasyonu ise, bileşenlerin doğru zamanda ve doğru konsantrasyonda bulunması ile mümkündür. Entegrasyonun koordinasyonu, replikasyon orijini ve orijin spesifik proteinlerin bir fonksiyonudur. “*OriC”* nukleotit dizilerinin karakteristiği, replikasyon esnasında belirli proteinlerin bu seriler ile spesifik reaksiyon verdiğine işaret etmektedir. Bu reaksiyon silsilesinde öncelikle, orijin bölgesindeki 4 özgül bölgeye dnaA proteini bağlanır. dnaA proteini, alt ünite ağırlığı 50.000 Dalton olan bir tertramerdir. dnaA *E. coli* kromozomu replikasyonu için kesinlikle zorunlu bir proteindir. Ancak, fajlar gibi diğer replike olan kromozomlarda değişik ori-protein çiftleri oluşabilmektedir. λ DNA orijin bölgesi replikasyonun başlangıcında replikasyon proteini ile spesifik interaksiyon verir. λ *“o”* geni tarafından kodlanan bu protein, *E. coli* *ori* bölgesi ile interaksiyon vermemektedir.

 dnaA proteininin *ori* bölgesine bağlanması, replizom oluşumunun ilk aşamasıdır. İlk 4 dnaA proteini hedef bölgeye bağlandıktan sonra, diğer dnaA proteinlerinin de kooperatif bir süreçle bağlanması tamamlanır. 20-30 dnaA molekülünün, ilk bağlanan 4 dnaA molekülünün arasındaki boşlukları tamamlamasından sonra replikasyon orjini (245 baz çifti) dnaA proteinleri tarafından doldurulmuş olur. Daha sonra proteinler içerde ve DNA dışarda olacak şekilde (nukleozom gibi) söz konusu bölge katlanır. Bu dnaA-DNA kompleksi, DNA replikasyonunu başlatmak için gerekli diğer proteinlerin tanıdığı tek yapıdır. Bu aşamadan sonra katlanan DNA bölgesine dnaB ve dnaC proteinleri bağlanır. Hatırlayacak olursak, hekzamer yapıdaki dnaB proteini replikasyon çatalında lokalize olan iki helikaz enziminden biridir. 6 dnaC proteinine bağlanarak 12 polipeptitlik kompleksi oluşturur. İkili sarmalın açılmasından sonra, dnaA proteinleri bağlanma bölgesinden ayrılarak eşleşecek bazların ve replikasyon sisteminin diğer elemanlarının bu bölge ile interaksiyon vermesine olanak sağlar (Şekil 12). DNA ikili sarmalın açılması için enerjiye ihtiyaç vardır. Bu enerji değişik kaynaklardan sağlanır. İlk kaynak, DNA topoizomeraz II enziminin katalize ettiği ATP hidrolizidir. Daha önce de söz edildiği gibi, DNA topoizomeraz II, ATP’ın hidrolizi sonucu DNA’ya süper halkasal dönüşler ilave eder. Negatif süper halkasal dönüşler DNA’nın tek zincir bölgeleri ile topolojik açıdan eşdeğer olduğundan, negatif süper dönüş oluşumu dnaB proteinin aktivitesini kolaylaştırır. İkinci enerji kaynağı ise, dnaB proteinin kendisinin katalize ettiği ATP hidrolizidir. Ancak ATP hidrolizinden sağlanan enerjinin, iki zincirin ayrılmasında nasıl kullanıldığı bilinmemektedir. İkili sarmalın açılması SSB (tek zincir

bağlanma proteini) proteinlerinin de devreye girdiği bir süreçtir. Bu proteinler helikazlara bağlanarak, kısmi organizasyonu tamamlanmış replizomu oluşturur.

 dnaA, dnaB, dnaC, topoizomeraz II ve SSB proteinlerinin kombine etkileri sonucu, orijin bölgesi DNA sentezinin başlayabilmesi için hazır hale gelir. Ancak, orijin bölgesinde DNA sentezi için ayrıca RNA primerlerine ihtiyaç vardır. Bu primerler primaz enzimi tarafından oluşturulurlar ve okazaki fragmentlerinin sentezine olanak sağlarlar. Bu nedenle, replikasyonun başlayabilmesi için bir sonraki aşama primozom kompleksinin oluşumudur. Dört ayrı polipeptit (n, n’ , n’ ‘ ve i) dnaB ve dnaC kompleksine bağlanarak, “ön primer oluşturma kompleksini” meydana getirir. “Önprimer oluşturma kompleksi” primazsız bir primozomdur. Bu komplekse primaz enzimi bağlanarak, primozomu oluşturur. Primozom toplam 70.000 Dalton moleküler ağırlıktadır. Primozom bileşenlerinin sayısı, kompozisyonu ve moleküler ağırlıkları Çizelge 2’ de verilmiştir.

**Çizelge 2. Primozomun elemanları**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Bileşen | Primozomdaki sayısı | Alt Ünite Ü kompozisyonu  | Alt ünite moleküler büyüklüğü | Aktivite |
| dnaB | 1 | Hekzamer | 50000 | Helikaz |
| dnaC | 6 | Monomer | 29000 | dnaB aktivitesine yardım eder |
| Primaz (dnaG) | 1 | Monomer | 60000 | RNA primer sentezi |
| n | 1 | Dimer | 28000 | Primozomun oluşumu ve fonksiyonu |
| n′ | 1 | Monomer | 76000 | Primozomun oluşumu ve fonksiyonu |
| n′′ | 1 | Monomer | 17000 | >> |
| i | 1 | Trimer | 66000 | >> |

 Primozom, bir replikasyon çatalında gecikmiş zincir şablonu ile interaksiyon vererek RNA primerlerinin sentezini yürütür. Ters bölgedeki replikasyon çatalında ise, aynı zincirin DNA polimeraz III enzimi ile sürekli sentezi söz konusudur. Sonuç olarak, iki polimeraz III enzimi primozom ve rep proteinlerine bağlanarak replizom kompleksini oluşturur (Şekil 13). Replikasyon tamamlandığında replizom ve dolayısı ile DNA polimeraz III şablondan ayrılmalıdır. Ancak DNA replikasyonunun başlangıcının aksine sonlandırılması halen gizini sürdürmektedir. Henüz hiç bir terminasyon geni izole edilmemiştir. Ayrıca herhangi bir spesifik terminasyon serisi de belirlenememiştir. DNA replikasyonunun iki zincirde de sonlanması; replikasyon çatallarının, replikasyon orjininin yarıçap olarak zıt bölgesine ulaşması ile meydana gelir. Bir kromozomun replikasyonun bitiminden sonra oluşan iki çevrimsel DNA molekülü, ortalama 20-30 baz çifti uzunlukta molekül arası dönüş yaparlar. Bu dönüşler DNA topoizomeraz I enzimi aktivitesi ile birbirinden ayrılarak tamamen bağımsız iki ikili sarmal DNA molekülü meydana gelir.

 DNA replikasyonu, prokaryot ve ökaryot canlılarda temel olarak aynı süreçlerde meydana gelir. Prokaryotik ve ökaryotik canlılarda DNA replikasyonundaki ana farklılıklar; ökaryotik hücre DNA’sının çok daha büyük ve kromatin içinde paketlenmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Ökaryotlarda da, prokaryotlarda olduğu gibi, öncü zincir sentezi sürekli ve gecikmiş zincir sentezi kesintilidir. Ökaryotik primaz, prokaryotik primaz enzimi gibi, kesintili zincir şablonu karşısına saniyede bir primerin sentezini gerçekleştirir. Söz konusu RNA primerleri 9-10 nukleotit uzunlukta olmakla birlikte, bunların üzerinden sentezlenen okazaki fragmentleri daha küçüktür. Zira ökaryotlarda replikasyon çatalı daha yavaş ilerler. Ökaryotlarda okazaki fragmentleri tipik olarak 135 nukleotit içerir. Gecikmiş zincir şablonu üzerindeki RNA primerleri 9-10 nukleotit uzunluktadır. Primer sentezi, okazaki fragmentlerinin sentezi, primer hidrolizi ve bu zincirdeki boşlukların doldurulması prokaryotlardaki sürecin aynısıdır. Ancak, ökaryotlarda replikasyonu yöneten enzimler, prokaryotlarda olduğu gibi detaylı bir şekilde karakterize edilememiştir. Çoğu kez ökaryotik enzimlerin tanımlanmamış olanları, prokaryotlarda tanımlananların fonksiyonel analogları olarak aynı kabul edilmektedir.

 Ökaryotlar da α, β, γ, є, δ ve ζ olmak olmak üzere 6 farklı DNA polimeraz enzimi içerirler. Bunlardan, β, γ, ζ çekirdek DNA replikasyonu için zorunlu enzimler değildir. DNA polimeraz α, β, є, δ ve ζ ökaryotik hücre nukleusunda bulunmaktadır. DNA polimeraz α replikasyonda zincir uzaması (DNA sentezi) ve değişik tamir süreçlerinde, sentez rolü üstlenmektedir. DNA polimeraz β nükleer bir tamir enzimidir. Bu tamir fonksiyonu aynı zamanda DNA polimeraz α’ nın ikincil aktivitesidir. DNA polimeraz δ; zincir uzaması ve sentezlenen DNA zincirinde kontrol aktiviteleri içerir. Ökaryotik DNA replikasyonu için zorunlu son DNA polimeraz olan є da, δ ile aynı aktivitelere sahiptir. Ancak є’nun değişik hücresel koşullarda görev yaptığına inanılmaktadır. Özellikle DNA polimeraz α’ nın düşük düzeyde işlervsel olması nedeniyle, kesintili sentezlenen zincirden bu enzim ayrıldığında, daha işlevsel olan δ bağlanmaktadır. DNA polimeraz γ ise mitokondriyel DNA’nın replikasyonuna katılır. DNA polimeraz α ökaryotik DNA replikasyonunda anahtar rol oynamaktadır. DNA polimeraz α, alt ünite moleküler ağırlıkları yaklaşık 180.000, 75.000, 55.000, 50.000 Dalton olan oligomerik bir proteindir. 180.000 Daltonluk alt ünite polimeraz aktivitesi, 55.000 ve 50.000 Daltonluk alt üniteler ise primaz aktivitesine sahiptir. *E. coli* DNA polimeraz III gibi, ökaryotik DNA polimeraz α enzimi de yalnız RNA primerlerinin bulunması halinde gecikmiş (kesintili) zincir sentezi yapmaktadır. Ökaryotik DNA polimeraz γ, є, δ enzimlerinin 3′🡪5′ ekzonukleaz aktivitesi tanımlanmıştır. Ancak 5’🡪3’ ekzonukleaz aktivitesi tanımlanan bir polimeraz enzimi bulunmamaktadır. Ökaryotik replikasyonda hatalı baz eşlenme oranı 10-9-10-11 arasındadır. DNA polimeraz α’nın hata oranının 10-3-10-5 arasında tanımlanması, bu enzimde düzeltme aktivitesi içeren (ekzonukleaz aktivitesi) alt ünitelerin bulunma olasılığını güçlendirmektedir. Bu alt üniteler, muhtemelen polimeraz α’nın izolasyonu aşamasında haloenzim kompleksinden ayrıldığı için, saptanamamaktadır. DNA polimeraz α enziminin primaz alt ünitesi kesintili zincirdeki RNA primerlerinin sentezini yönetir (primer uzunluğu genellikle 9-10 nukleotit olmakla birlikte, 6-15 nukleotit arasında değişme gösterebilir). DNA polimeraz α enziminin diğer alt ünitesi, dNTP’lerin varlığında RNA primeri üzerinde DNA zincir sentezini yapar. Prokaryotların tek replikasyon orjininin aksine, ökaryotlarda replikasyon çok farklı bölgelerde başlayabilir. *Drosophila melanogester* kromozomu üzerinde yapılan çalışmada, 6000 replikasyon çatalı oluşumu saptanmıştır. Ökaryotik replikasyon orijin bölgeleri hakkında çok şey bilinmemektedir. Bu bölgeler, nuklear iskelette, kromatinin proteinlere bağlandığı noktalarda meydana gelmektedir. Ökaryotik replikasyon çatalları, artan çemberler oluşturarak birbirine doğru ilerler. Ökaryotlarda ardışık dizilimden kaynaklanan engellemeden dolayı çatalların hareketi (replikasyon hızı) prokaryotlardan 30 kez daha düşüktür. Yine de çok sayıda replikasyon çatalından dolayı çok büyük genetik materyal de bir saatten kısa sürede replike olabilir.

 Daha önce de belirtildiği gibi, ökaryotik hücrede DNA histon proteinlerle ilişkilenir ve nukleozomlar halinde paketlenir. Ökaryotik DNA replikasyonu ile eş zamanlı olarak, histonların sentezi de yapılır. Bu olay histon duplikasyonu adını almaktadır. Her replikasyonda histonların da sayısı ikiye katlanır. DNA replikasyonu ve histonların duplikasyonu tamamen farklı enzimler tarafından ve hücrenin farklı bölgelerinde katalizlenen reaksiyonlar olmalarına rağmen, eş zamanlı ve aynı oranda yürütülen reaksiyonlardır. Yeni sentezlenen histonlar kesintili sentezlenen zincir ile interaksiyon verirken, eski histonlar sürekli zincirde kalır (Şekil 14).

 DNA tamir edilebilen tek hücresel makromoleküldür. Zira, çevresel bir etki ile herhangi bir proteinde bir bozulma meydana gelmiş ise, yeni bir fonksiyonel protein üretilmesi basit bir işlemdir. Ancak DNA’daki bozukluk organizmada kalıcı bir hal alır. Çünkü fonksiyonel (bozukluk olmayan) molekülün sentezi için şablon, doğrudan kendisidir. Eğer DNA hasarı yaşamsal bir protein geninde meydana gelmiş ise, organizma ölür (mutasyonun letal etkisi). Hasarların DNA’da birikimi hücresel fonksiyonların kaybına ya da hücrelerde regüle edilemeyen bir çoğalmaya yol açar (tümör hücreleri gibi). DNA özellikle ultraviyole ışınlara karşı hassastır. Ultraviyole ışınlar çift zincir DNA’da yığın halinde timin dimerlerinin oluşumuna yol açar. Bu fotodimerizasyon adını alır. Timin dimerlerinin varlığında DNA replikasyonu oluşmaz. Bu nedenle organizmanın yaşayabilmesi için timin dimerlerinin DNA yapısından ayrılması gerekmektedir. Timin dimerleri prokaryot ve ökaryot DNA moleküllerinde benzer süreçlerle tamir edilmektedir. En basit tamir mekanizması fotoreaktivasyondur. Bu mekanizmada bir enzim, bozulmuş ikili sarmal molekülüne timin dimer bölgesinden bağlanır. DNA-enzim kompleksi, ışığı absorbe ederek dimerizasyon reaksiyonunu geri çevirir. Fotoreaktivasyondan sonra enzim, tamir edilen DNA’dan ayrılır ve normal A=T baz çiftleri oluşur (Şekil 15).

 DNA ayrıca, hidroliz reaksiyonları sonucu, sitozin ve iki purin bazının amino gruplarını kaybederek hasar görebilir. Timin amino gurup içermediğinden, bu baz için deaminasyon söz konusu değildir. Bu süreç **hidrolitik deaminasyon** adını almaktadır. Adeninin hidrolitik deaminasyonu ile hipoksantin oluşur. Guanin ve sitozinin hidrolitik deaminasyonu sonucu ise, sırasıyla ksantin ve urasil meydana gelir. DNA yapısında meydana gelen deamine bazları DNA yapısından ayıran enzimler, **DNA glikozilazlar** olarak adlandırılmaktadır. Bu enzimler, deamine olmuş bazları şekerlere bağlayan glikozidik bağları hidrolize eder. Purinde glikozidik bağın hidrolizi ile apurinik bölge, primidin bazlarında glikozidik bağın hidrolizi ile ise aprimidinik bölgeler meydana gelir. Örneğin; sitozinin deaminasyonu ile oluşan urasil; urasil N-glikozilazın, N-glikozidik bağı hidrolizi ile DNA yapısından ayrılır. Oluşan aprimidinik bölgeye bir endonukleaz bağlanarak deoksiriboz fosfatı, DNA’dan ayırır. Şeker fosfatın ayrılması ile DNA yapısında 1 nukleotitlik boşluk oluşur. Bu bölgeye DNA polimeraz uygun nukleotidi yerleştirir ve boşluk DNA ligaz enzimi katalizörlüğünde doldurulur (Şekil 16). Hidrolitik deaminasyonda en yaygın oluşan reaksiyon, sitozinin urasile deaminasyonudur. Eğer DNA’da Timin bulunmasaydı, bu olay çok sayıda mutasyon meydana getirebilirdi. Zira Timin’in DNA’da Urasil ile yer değiştirmesi halinde, Urasil’i Timin’den ayırmak olası değildir. Çünkü Urasil ile Adenin doğru bir şekilde eşlenir. Ancak sitozinin deaminasyonu sonucu deoksiurasil oluşur ise, bu DNA bazı olmadığı için tanınır ve tamir edilir. Bu nedenle DNA’da timin varlığı genetik bilginin stabilitesini artırır. Ultraviyole ışınlara ilave olarak DNA; iyonize radyasyonun değişik formları, asitler, oksidasyon ajanları ve diğer reaktif kimyasalların etkisiyle de hasar görebilir. Bunların bazıları metilasyona, bazıları da diğer modifikasyonlara yol açmaktadır. DNA’da tüm bunların dışında spontan kimyasal modifikasyonlar da meydana gelmektedir. Depurinizasyon ya da deprimidizasyonun örnek verilebileceği bu reaksiyonlar saniyede 10-13 sıklıkta meydana gelir. Bu bozulmuş nukleotitlerin büyük çoğunluğu spesifik tamir enzimleri tarafından tanınır. Söz konusu enzimler DNA’yı tarayarak hataları belirler. Örneğin; hasarlı DNA tüm organizmalarda aynı olan genel “keserek çıkarma (excision)” tamir mekanizması ile tamir edilebilir. Bu mekanizmada ilk aşama, hasarlı bölgenin bir endonukleaz ile tanınması ve hasarın her iki bölgesinin de kesilmesidir. Böylece 12-13 nukleotit uzunlukta bir tek zincir fragment (DNA parçası) kırılarak serbest kalır. *E. coli*’ de bu kesim UvrABC enzimleri ile katalizlenir. DNA fragmentinin ayrılması helikaz ve endonukleazların konsantre etkisi ile meydana gelir. Ekzonukleazlar kesilen tek zinciri ortamdan ayırır. İkinci aşamada boşluk, şablon zincir esas alınarak DNA polimeraz I ya da ökaryotlarda DNA polimeraz α enzimi aktivitesi ile doldurulur. Son aşamada DNA ligaz fosfodiester bağlarını tesis ederek, fragmentin iki ucundaki boşlukları bağlar.

TRANSKRİPSİYON

James Watson ve Francis Crick’in 1953 yılında yayımlanan ve DNA yapısını çözümledikleri makalelerinde, transkripsiyon modelinin de öngörüsü bulunmaktaydı. Genom ya da genetik bilginin organizmalar tarafından kullanımı hangi yolla olmaktadır? Bu soru, mutant organizmalarda meydana gelen değişimlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar ışığında, aşama aşama aydınlatılmıştır. 1940’lı yıllarda Edward Tatum ve George Beadle *Neurospora crassa* küfü üzerinde çalışarak, bir genin (araştırıcıların deyimi ile bir kalıtım ünitesi) bir enzimin üretiminden sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bununla beraber, Vernon Ingram’ın orak hücre hemoglobini ile yürüttüğü çalışmanın 1956 yılında yayınlanmasına dek, gen protein ilişkisinin detayları bilinmemekteydi. Ingram bu çalışmasında; orak hücre anemisi hastalığına yakalanmış insanların hemoglobininin, normal hemoglobinle sadece bir amino asit bakımından farklılık gösterdiğini ve genetik bilgideki değişimin, proteinlerin primer yapısında görülebileceğini ispat etmiştir.

Prokaryot canlılarda proteinleri kodlayan yaklaşık 2000 gen bulunmaktadır. Bu proteinlerin büyük çoğunluğu; DNA, RNA ve proteinler gibi makromoleküllerin biyosentezine, ya da ara metabolizmaya katılan enzimlerdir. Hücrelerin normal aktivitesi için zorunlu ürünleri kodlayan bu genler, yapısal genler olarak adlandırılmaktadır. Mayalar gibi basit ökaryot canlılar, daha karmaşık ökaryotik hücre fonksiyonlarını kontrol eden farklı genleri de içermelerine rağmen, prokaryotik canlılarla hemen hemen aynı sayıda gen taşımaktadır. Böceklerde ortalama 7000, insanda ise 20000-25000 civarında protein kodlayan gen bulunduğu hesap edilmektedir. Doğadaki bütün hücreler için geçerliliği ispat edilen “Central Dogma” genellemesine göre; DNA üzerindeki genetik bilgi, önce mRNA moleküllerine transkribe edilmekte ve daha sonra proteinlere çevrilmektedir. Bir tek ürünü spesifiye eden ve bu ürünün sentezi için transkribe edilen DNA bölgesi, gen olarak tanımlanmaktadır. Genetik bilginin proteinlere transferi değişik RNA moleküllerinin katılımı (tRNA, mRNA, rRNA) ile gerçekleştirilmektedir. *E. Coli’* de 3 farklı rRNA ve bazı tRNA’lar uzun bir öncü RNA molekülü halinde üretilmekte ve son aşamada kesilerek olgun RNA moleküllerine dönüştürülmektedir. Bu şekilde birlikte transkribe edilen bakteriyel genlere “operon” adı verilmiştir.

 Francois Jacob ve Jacques Monod 1960’lı yıllarda ribozomların, stabil olmayan RNA moleküllerinin (mRNA) translasyonu ile protein sentezine katıldığını ve mRNA moleküllerinin daima DNA ikili sarmalındaki bir zincirin tamamlayıcısı olduğunu belirlemiştir.Tüm organizmalarda mRNA molekülleri, tRNA ve rRNA moleküllerinden daha düşük stabilite göstermektedir. mRNA hücrede en düşük oranda bulunurken, en fazla belirlenen RNA türü ise rRNA molekülleridir. Oysa hücresel RNA sentezine bakıldığında; rRNA sentezinin, toplam sentezin 1/3’ ünü teşkil ettiği görülmektedir. Bu durum, RNA moleküllerinin hücrede belirlenme oranlarının, stabiliteleri ile ilgili olduğunu kanıtlamaktadır. Hücrede rRNA ve tRNA molekülleri yüksek düzeyde stabilite göstermektedir. Oysa mRNA protein translasyonu aşaması sonunda hızlı bir şekilde parçalanır. Bakteriyel hücrelerde sentezlenen mRNA moleküllerinin yarılanma süresi 3dk, ökaryotlarda ise ortalama 10 saattir. Tüm hücrelerde mRNA molekülleri nukleazlar tarafından parçalanır.

 mRNA’nın keşfiyle hemen hemen eş zamanlı olarak, J. Hurwitz, A. Stevens ve S. Weiss, bağımsız yürüttükleri araştırmalarında; ATP, UTP, GTP, CTP ve şablon molekül varlığında RNA’nın sentezini katalizleyen, RNA polimeraz enzimini tanımlamışlardır. RNA polimeraz enzimi DNA’yı özel bölgelerden tanır ve bağlanma aktivitesi gösterir. Söz konusu enzim DNA’yı bağlanma bölgesinden kısmi olarak açar ve bu bölgeye, sentezin ilerleyebilmesi için bir RNA primeri ilave eder. Transkripsiyon süresince DNA zinciri açılıp kapanırken, enzim sürekli bir şekilde senteze devam eder. Genin kopyası tamamlandıktan sonra ise transkripsiyonu sonlandırır. RNA polimeraz aktivitesindeki bu kompleks işlev, enziminin dördüncül (kuarterner) yapısından ileri gelmektedir. RNA polimeraz enzimi de, DNA polimeraz enzimi gibi, birçok değişik alt üniteden oluşan bir haloenzim kompleksidir. Yine replizom modelinde söz edildiği şekilde, RNA polimerazın bazı alt ünitelerinin katalitik özellikleri deneysel koşullarda tanımlanabilmiş (Çizelge 3), ancak, diğer alt üniteler izole edilememiştir. Bu alt ünitelerin aktiviteleri, sadece transkripsiyon kompleksinde belirlenmiştir. Değişik organizmalardaki transkripsiyon kompleksleri yapısal olarak önemli değişiklikler içermelerine rağmen, her organizmada aynı tip reaksiyonları katalize ederler. Bu nedenle burada *E. coli’*de transkripsiyonda katalizlenen reaksiyonların tanımı ile transkripsiyon süreçleri anlatılmaya çalışılmıştır. *E. coli* transkripsiyonunu bir model sistem olarak kullanmak suretiyle, yapısal olarak farklı ancak fonksiyonel olarak benzer ökaryotik transkripsiyon sistemlerini de tanımlayabiliriz. Transkripsiyon kompleksinin, protein saflaştırması işlemlerinde çok kolay parçalanmasından dolayı, stokiyometrisinin ve organizasyonun belirlenmesi oldukça güçtür. Ayrıca, RNA polimeraz kompleksleri farklı genlerin transkripsiyonu esnasında değişik alt üniteler halinde organize olabilmektedir. Özetle, in-vitro koşullarda izole edilen RNA polimerazın, in vivo koşullardaki RNA polimeraz’ dan farklı olma olasılığı daima göz önünde bulundurulmalıdır.

Çizelge 3. *E. Coli* RNA polimeraz haloenziminin alt ünite kompozisyonu

|  |  |
| --- | --- |
| Alt Ünite | Moleküler Ağırlık |
| β (beta) | 155613 |
| β1 (beta) | 150618 |
| σ (sigma) | 70263 |
| α(alfa) | 36512 |
| ω(omega) | 10105 |

 *E. coli* hücrelerinden izole edilen serbest RNA polimeraz 5 farklı tipteki altı alt üniteden oluşmaktadır. Alt üniteler α2 β β’ σ stokiyometrik kompleksi halinde kombine olurlar (ω alt ünitesi stokiyometrik miktarın altında bulunduğundan, gerçek bir alt ünite olarak tanımlanmamaktadır). Haloenzim kompleksinin α alt ünitesi enzimin regülatör proteinlerle ilişkilenmesinden, β’ alt ünitesi DNA’ya bağlanmadan, β alt ünitesi enzim aktif bölgesinin oluşturulmasından (polimeraz aktivitesinden) ve σ alt ünitesi de temel işlev olarak transkripsiyonun başlatılmasından sorumlu bulunmuştur. Değişik bakteri gruplarında farklı σ alt üniteleri belirlenmiştir. Ayrıca bazı bakteriyofajların da, enfeksiyon sürecinde kullandıkları bazı σ proteinlerinin yapısal genlerini içerdiği tespit edilmiştir. *E. coli’* nin içerdiği ana haloenzim formunda, σ70 alt ünitesi (MA 70263) bulunmaktadır. Eğer haloenzim daha ileri düzeyde fraksiyonlarına ayrılır ise, σ alt ünitesi uzaklaşarak α2 β β’ çekirdek polimerazı meydana gelebilir. σ alt ünitesinin haloenzim kompleksine zayıf bir şekilde bağlanması, bu alt ünitenin hücresel rolünün bir sonucudur. Zira, transkripsiyon başladıktan sonra bu alt ünite enzimden ayrılmaktadır. Çekirdek polimeraz, 4 alt ünitenin temas ettiği siferik bir yapı içermektedir. Değişik bakterilerden RNA polimeraz enziminin saflaştırılması ve birbiri ile karşılaştırılması sonucu; tümünde enzim aktivitesinin aynı olduğu, ancak, yapısal farklılıklar gösterdikleri saptanmıştır. Bu kompleksler, fonksiyonel olarak aynı özellikleri gösterseler de, birbirlerinin yerine görev yapma yeteneği içermezler. RNA polimeraz enzimleri şablon DNA zinciri karşısına, RNA zincir sentezini katalizlerler. Önce şablon karşısına gelen ribonukleozit trifosfatlar, enzim aktif bölgesi sayesinde, doğru hidrojen bağlanması açısından kontrol edilir. Gelen nukleotit, şablon zincirdeki nukleotid ile doğru hidrojen bağı oluşturmuş ise; RNA polimeraz, RNA zincirinde var olan nukleozit trifosfatının 3′ OH grubu ile, sentez bölgesine gelen nukleozidin α fosfat gurubunun nukleofilik etkileşimini katalize eder. Bu reaksiyon, fosfodiester bağının oluşumu ve fosfat grubunun salınımı ile sonlanır. RNA polimeraz, nukleozit trifosfatları kullanma özelliği ile DNA polimerazdan ayrılır (DNA polimeraz deoksinukleozit trifosfatları kulanır). RNA polimeraz da , DNA polimeraz gibi, sentezlenen zincirden ayrılmaksızın sentezi sürdürür.

 Ribonukleozit trifosfatlar, aktivite edilmiş ribonukleozit monofosfatlardır. Bu nedenle söz konusu reaksiyon bir tür grup transfer reaksiyonudur. Reaksiyonda düşük miktarda standart serbest enerji değişimi vardır. Bu değişim, nukleotidil gurupların bir trifosfattan alkoller üzerine transferinde yapılır. Reaksiyon şöyle özetlenebilir:

 RNA-OH + NM RNA-NMP + H2O (G0 =6.0 kcal mol-1 )

 H2 O + NTP NMP + PPi (G0 =8.6 kcal mol-1 )

-----------------------------------------------------------------------------------

 RNAO + NTP RNA-NMP + PPi (G0 = 2.6 kcal mol-1)

Benzer reaksiyonlarda olduğu gibi, bu reaksiyon da hücre içinde pirofosfatın nihai hidrolizi ile sonlanır. Bu nedenle yeni sentezlenen zincirde, her bir nukleotit ilavesinde iki anhidrit bağı kırılır. Transkripsiyon oranı, DNA sentezi ile karşılaştırıldığında daha yavaştır. *E. Coli’*de 1 sn’de 30-85 nukleotit sentezi yapılır. Bu oran, DNA sentez hızının yaklaşık 1/10’ udur. Görece düşük subsrat konsantrasyonunda ribonukleozit trifosfatların enzim aktif bölgesine akışı saniyede 10000 adetin üzerindedir. Ribonukleozit trifosfatlarla aktif bölge arasında meydana gelen bu yüksek karşılaşma oranı, enzim aktivitesini düşürmektedir. Diğer biyolojik reaksiyonlardaki anoloji gibi, RNA polimeraz da; aktif bölgeye gelen ribonukleozit trifosfatlarla konformasyonel uyumu sağladığında, yeni bir fosfodiester bağı oluşturmaktadır. Bu da sentezin doğru yürümesini etkileyen önemli bir unsurdur. RNA sentezinde hata oranı aşağı yukarı 10-6’dir. DNA sentezinde yapılan hatadan daha yüksek bir hata oranı, RNA sentezinde tamir mekanizmasının bulunmamasından kaynaklanmaktadır

 RNA sentezinin ilerleme reaksiyonu, transkripsiyon kompleksinin oluşturulması ve bir ribonukleozit primerinin sentezlenmesi için gerekli başlangıç aşamalarına gereksinim duyar. DNA replikasyonundaki gibi, transkripsiyonun başlaması da özel serilerin başlatıcı faktör tarafından tanınması ile olur. Transkripsiyonun başlatıcı kompleksinin bağlanarak, transkripsiyon yapılarının oluşturulduğu DNA bölgelerine **“promotor”** adı verilmektedir. Bakteri hücrelerinde yüzlerce, ökaryotlarda ise binlerce promotor bulunmaktadır. Transkripsiyonun başlama etkinliği, promotorun gücü ile doğru orantılıdır. Örneğin; *E. coli’* de ribozomal RNA operonu çok hızlı bir şekilde transkribe edilir. Her iki saniyede bir, değişik RNA polimeraz enzimleri transkripsiyonu başlatır. Diğer yandan, birçok bakteriyel gen her iki generasyonda bir transkribe edilir. Bu promotorlarda yaklaşık her 2000 saniyede bir transkripsiyon başlatılır. 1975 yılında başlatılan haritalama deneyleri, bakteriyel promotorların genlerin 5’ uçlarında bulunduğunu göstermiştir. Ancak DNA dizileri hakkında bilgiler oldukça hızlı bir şekilde gelişirken, promotorların primer yapısı halen gizini korumaktadır. *E. coli* genlerinin ilk dizi analizleri yapıldığında, promotor bölgelerde dikkate değer ortak seriler belirlenememiştir. Ancak çok sayıda genin izolasyonu ile bu genlerin promotorlarında ortak serilerin varlığı tespit edilebilmiştir. Bu seriler çok sayıda örnekte benzerlik gösterdikleri için “konsensus” serileri olarak tanımlanmıştır. Promotorlar dışında, DNA’da saptanan birçok ortak seriye de “konsensüs serileri “ adı verilmektedir. *E. coli’* de ana RNA polimeraz haloenzimi α2 ββ1 σ70 in promotor bölge dizi analizi sonucunda şu veriler elde edilmiştir;

1. İlk transkribe edilen nukleotit genellikle bir purindir ve +1 olarak tanımlanır.
2. Transkripsiyonun başlamasından sorumlu -10 bölgesi, birçok gende TATAAT sekansını ya da benzerlerini içerir.
3. Birçok gen, -35 bölgesinde TTGACA serileri içerir.
4. -10 ve -35 bölgeleri birbirinden 17±1 nukleotit ile ayrılır.

-35 bölgesi genellikle özel bir ad almazken, TATA kutusu olarak adlandırılan -10 bölgesi, bulucusunun adı ile (David Pribnow, Pribnow kutusu) de anılmaktadır. Promotorlardaki konsensüs serileri genelde tamamen birbirini aynısı değildir. Bu bölgelerin her ikisi (-10 ve -35) birlikte *E. coli* RNA polimeraz haloenzim kompleksi için promotor bölgeyi teşkil etmektedir. Birçok durumda TATA kutusunun bazı A ve T bölgeleri, G ve C ile değişebilmektedir. Bu tip promotorları içeren genler, zayıf transkripsiyon oranına sahiptirler (zayıf promotorlar). Ribozomol RNA operonları(rRNA) ve benzeri genlerde bulunan promotor sekansları, konsensüs serileri ile yüksek oranda benzerlik gösterir. Bu tip genlerde transkripsiyon etkinliği çok yüksektir(güçlü promotorlar). Özetle, konsensüs serileri RNA polimeraz haloenzim kompleksinin promotor bölgeye bağlanma etkinliğini belirlemektedir. Promotor bölgelere yönelik mutasyonel analiz çalışmaları da, güçlü promotorlarda konsensüs serilerinin büyük bir benzerlik gösterdiğini kanıtlamıştır. Örneğin; *E. coli’*de *lac*UV5 promotorunun doğal tipinin, mutantlarından çok daha etkili olduğu saptanmıştır. Zira mutasyon, konsensüs serileri ile tamamen aynı olan TATA kutusunda meydana gelmiştir. Benzer mutasyonel çalışmalarla çoğaltılan örneklerin tümünde; güçlü promotorların konsensüs serilerinde meydana gelen mutasyonların, bu promotorların transkripsiyon etkinliğini düşürdüğü belirlenmiştir. Her bir genin promotor serisi, hücrenin gereksinimleri doğrultusunda doğal seçki ile (seleksiyon) optimize edilmiştir. Yani; güçlü bir promotor çok miktarda üretilmesi gereken bir ürün için, zayıf bir promotor ise düşük oranda üretilmesi gereken bir ürün için idealdir ve doğal seçki bu yönde gelişmiştir.

 RNA polimeraz ve promotor içeren bir DNA molekülü, iyonik akışı kontrol edilebilen tampon solusyonda karıştırıldığında, **polimeraz: DNA** kompleksleri oluşur. RNA polimerazın DNA üzerindeki bağlanma bölgeleri “ayak izi” olarak adlandırılan deneysel bir teknikle saptanabilir. Bu teknik aynı zamanda “nukleaz korunması” olarak da adlandırılmaktadır. Ayak izi tekniğinde promotor içeren bir fragment preparatı, önce sadece bir ucundan 32P (radyoaktif) ile işaretlenir. Sonraki aşamada örnek; her bir fragmentte tek zincirde bir ya da iki çentik oluşacak şekilde, sınırlı nukleaz kesimine tabi tutulur. Örnek içindeki her molekülde çentikler farklı bölgelerde meydana gelerek farklı uzunluklarda tek zincir içeren fragmentler oluşur. Bu fragmentler agaroz jel elektrofarez yöntemi ile büyüklüklerine göre tanımlanabilir. Jel örneklerinin otorodyografisi ile de bu fragmentlerin yalnız 32P işaretli uç içerenleri ayrılabilir. RNA polimeraz enziminin yokluğunda her bir nukleotitdeki endonukleaz kesimi, farklı uzunluklarda işaretli fragmentler meydana getirir. Aynı deney RNA polimeraz varlığında yürütülür ise, RNA polimeraz bazı fosfodiester bağlarını nukleaz aktivitesinden korur. Böylece fragmentlerde bir zincirde geçitler (nukleazlar tarafından sindirilmeyen bölgeler) meydana gelir. Bu geçitler RNA polimerazın temas ettiği ve bu yolla koruduğu nukleotitleri içermektedir (Şekil 17). *E. coli’* de yürütülen bu deneyler RNA polimeraz enziminin aynı anda TATA kutusu ve –35 bölgesinin her ikisine de bağlandığını göstermiştir. Bağlanma bölgesi yaklaşık 70 baz çifti uzunluktadır (-50 den +20 ye kadar). Bağlanma bölgesi uzunluğu, yaklaşık 20 nm çapındaki siferik RNA polimeraz haloenziminin boyu ile uyumludur(Şekil 18).

 Korunmuş sekans içinde RNA polimeraz enziminin temas ettiği nukleotitler kimyasal modifikasyon tekniği ile de belirlenebilir. Bu teknikte, DNA belirli bazlarda kimyasal olarak modifiye edilir. Örneğin; dimetilsulfoksit adenin ve guanin’i metiller. Modifiye DNA, daha sonra RNA polimeraz ile karşılaştırılır. RNA polimeraz, modifiye DNA’ya düşük bir ilgi ile bağlanır ya da hiç bağlanma göstermezse; DNA, RNA polimeraz bağlanma bölgesinden modifiye edilmiş demektir. Bu deneylerden elde olunan sonuçlar, RNA polimerazın çoğu kez DNA ikili sarmalının bir yüzeyine bağlandığını ve büyük yivdeki bazı nukleotidlerle temas ettiğini göstermiştir. Promotor bölge dışında da, spesifik olmayan RNA polimeraz-DNA bağlanmaları meydana gelebilir, ancak RNA-DNA interaksiyonlarının çoğunda bağlanma -10 ve -35 bölgelerinde gerçekleşir. RNA polimeraz bağlanma bölgeleri (promotor bölgeler) 17±1 nukleotid ile birbirinden ayrılır. Yani ikili zincirin aynı yüzünde birbirinden iki dönüş uzaklıktadır. Bu durum RNA polimerazın DNA’nın bir yüzeyine bağlanmasını açıklamaktadır. Bu modelde DNA’nın, RNA polimeraza nukleozom oluşumundaki gibi sarıldığı düşünülmektedir. RNA polimeraz ile DNA’nın interaksiyonu; iyonik bağlar, van der Waals güçleri ve hidrojen bağları ile stabilize edilir. RNA polimerazın amino asitleri ile DNA’nın büyük yivindeki promotor nukleotitleri arasında meydana gelen bağların doğası henüz tanımlanamamıştır.

 RNA polimerazın DNA e bağlanması entropi\* ile yürütülür. DNA sıvı solusyonda tamamen hidrate edildiğinde şeker fosfat iskeleti ile büyük ve küçük yivler düzenli su molekülleri içerir. RNA polimeraz bu DNA’nın promotor sekansına bağlandığında, çok miktarda su molekülü ortamdan ayrılır. Bu ayrılma, bağlanmayı entropik açıdan uygun hale getirir (ΔS=235 cal mol-1 deg-1). Düzenli su moleküllerinin dağılması için ısıya ihtiyaç duyulduğundan, bağlanma bir pozitif entalpi değişimi ile meydana gelir (ΔH=57 kcal mol-1 ). RNA polimeraz: DNA interaksiyonunda oluşan entalpi, su moleküllerinin ayrılması için yeterli değildir. Pozitif entalpi değişimine rağmen, reaksiyonun devamı için enerji entropik olarak sağlanır (ΔG0= -16 kcal mol-1).