

# *Moleküler Hücre Biyolojisi I*

## *Hafta 5: DNA Tıpkıyapımı, Onarımı ve Rekombinasyonu*

*Dr Arzu ATALAY*

**DNA dizilerinin idamesi hücre bölünmesi ve germ hücreleri tarafından sağlanır**

**DNA tıpkıyapım mekanizmaları:**

**DNA çift sarmalı kendi çoğalması için kalıp işlevi görür**

**DNA sentezinin kimyası:**

Bir polinükleotid zincirinin (primer iplik) 3' ucuna bir deoksiribonükleotid eklenmesi DNA sentezindeki temel tepkimedir

**DNA polimeraz DNA sentezini katalizler**

**DNA tıpkıyapımı yarı korumalı doğadadır**

**Halkasal bir kromozomda iki tıpkıyapım çatalı birbirine ters yönde hareket eder**

## **DNA tıpkıyapım çatalı asimetriktir:**

Sentez 5'→3' yönünde gerçekleşir. Kesintisiz sentezlenen yavru DNA molekülü ipliği **öncü iplik** sentezi kesintili olarak seyreden **artçı iplik** sentezinden biraz daha hızlıdır.

## **DNA tıpkıyapımının aslına sadık kalması birçok gözden geçirme mekanizması gerektirir:**

- 1) Tamamlayıcı baz eşlemesi (DNA polimerazın düzeltme yapısı)
- 2) Eksonükleazla gözden geçirme ile nadir formlardan biri bağlansa dahi eksonükleaz hatayı mükemmel bağlanmış uc durumuna göre düzeltir, yanlış eşleşmiş bazı kopartır.

## **DNA polimerazın polimerleşme ve düzeltme özellikleri vardır**

**Tıpkıyapım sırasında DNA sentezinin aslına sadık kalmasını sağlayan 3 aşama:**

**5'-3' polimerizasyon, 3'-5' eksonükloelitik proofreading,  
mismatch tamiri**

**Yalnızca 5' -> 3' yönündeki DNA tıpkıyapımı verimli olarak hata düzeltmeye olanak verir**

**Nükleotid polimerleştiren özel bir enzim artçı iplikte kısa RNA primer molekülleri sentezler:**

DNA polimerazın aksine iki nükleosid trifosfatı birbirine ekleyerek yeni bir polinükleotid zincirini başlatabilir. Primaz kısa bir zincir sentezledikten sonra durur ve 3' uç DNA polimerazın erişimine açık olur

**Artçı iplikte pek çok DNA parçası birlikte sentezlenir:**

Ökaryotlarda RNA primerleri yaklaşık 200 nükleotid aralarla sentezlenir ve her primer yaklaşık 10 nt uzunluğundadır. Bu primer RNAz H tarafından silinir.

**DNA ligaz tarafından katalizlenen tepkime:**

Kırılmış fosfodiester bağı mühürlenir

**Özel proteinler tıpkıyapım çatalının önündeki DNA çift sarmalını açmaya yarar:**

DNA helikaz saniyede 1000 nt çiftine varan hızla ATP hidrolizi ile çalışır

## **Özel proteinler tıpkı yapım çatalının önündeki DNA çift sarmalını açmaya yarar:**

Tek iplik DNA bağlayan (SSB) protein (sarmal kararsızlaştıran protein) açıkta kalmış tek iplik DNAya bazlarını örtmeksizin sıkı ve yardımlaşmalı şekilde bağlanarak kullanılmaya uygun hale getirir

## **Hareket eden bir DNA polimeraz molekülü kayan bir halka aracılığı ile DNA'ya bağlı kalır:**

E.coli'de kısaç proteinin yapısı

## **Hareket eden bir DNA polimeraz molekülü kayan bir halka aracılığı ile DNA'ya bağlı kalır:**

Kısaç yapısı temsili şekli, kısaç yükleyici proteinin alt üniteleri DNA oluklarına oturacak şekildedir.

Hareket eden bir DNA polimeraz molekülünü DNA üzerinde tutmak üzere kısaçın yapılanmasını gösteren çizim. Gerçek tıpkı yapım çatalında kısaç yükleyici artçı iplik polimerazına yakın durarak, yani her Okazaki parçası başlatıldığında, yeni bir kısaç yapılandırmak için hazır bekler

# **T4 bakteriyofajının tıpkıyapım makinesi ardında DNA sentezleyerek kalıp boyunca hareket eder**

## **İplik güdümlü yanlış eşleşme onarım sistemi tıpkıyapım makinesinin gözünden kaçmış tıpkıyapım hatalarını çıkarıp atar:**

MutS yanlış eşleşmiş bölgeye bağlanır, MutL ise yakınındaki bir bölgeyi çentik için tarar, yeni sentezlenmiş iplikte çentikler bulunabilir. Bakterilerde MutH metillenmemiş GATC dizisinde çentik oluşturarak mekanizmayı başlatır

## **DNA topoizomerazlar tıpkıyapım sırasında DNA dolaşmasını önlerler:**

Saniyede 500 nt hızla hareket eden bir bakteri tıpkıyapım çatalında, çatalın önündeki ata DNA sarmal saniyede 50 kez kendi etrafında dönmelidir DNA topoizomeraz DNA'nın omurgasındaki bir fosfata kendini kovalan olarak bağlayarak DNA ipliğinde bir fosfodiester bağı kıran tersinir bir nükleaz olarak görülebilir. Bu tepkime tersinirdir ve protein ayrılırken fosfodiester bağı yeniden oluşur. Topoizomeraz I olarak adlandırılan bir topoizomeraz geçici bir tek iplik kırığı (ya da çentik) oluşturur. Fosfodiester omurgadaki bu kırık DNA sarmalının çentiğinin iki yanındaki kısımlarının birbirlerine göre serbestçe dönmesine izin verir, dönerken de çentiğinin karşısına gelen fosfodiester bağı eksen olarak kullanır. DNA sarmalındaki gerilim bu dönüşü, gerilimi giderecek yöne yönlendirir, bu kısım da tıpkıyapım çatalının hemen önündedir.

# Topoizomeraz II'nin etki mekanizması farklıdır:

DNA sarmalının iki ipliğine birden kovalan bağlanarak sarmalda geçici bir çift iplik kırığı meydana getirir. Bu enzimler kromozom üzerinde iki çift sarmalın birbiri üzerinden geçtiği yerlerde etkinleşir. Bir topoizomeraz II molekülü ATP hidrolizi ile

- 1) Bir DNA kapısı yaratmak için çift sarmalı tersinir bir şekilde kırar
- 2) Yakınındaki ikinci çift sarmalın bu kırıktan geçmesini sağlar
- 3) Daha sonra kırığı yağıştırır ve DNAdan ayrılır

## Kromozomlarda DNA tıpkıyapımının başlatılması ve tamamlanması

DNA sentezi tıpkıyapım başlangıç noktalarında başlar, bu bölgelerde tıpkıyapım kabarcığı oluşturur

## Bakteri kromozomunda tek DNA tıpkıyapım noktası bulunur

Esas başlatıcı protein dnaA proteindir. Primozom dnaB (helikaz) ve dnaG (DNA primaz) proteinlerinden meydana gelir. Primozom başlangıç noktasından uzaklaşarak ilk DNA zincirini başlatan RNA primerini yapar

## ***E.coli* tıpkıyapım başlangıç noktasının metillenmesi DNA başlangıcı için tepkisiz bir dönem yaratır**

Başlangıç proteininin tıpkıyapım başlangıç noktası ile etkileşimi titizlikle düzenlenir. Yeterli besin yoksa tıpkıyapım başlamaz, ayrıca başlangıç noktasının tamamen metillenmesi gerekmektedir. *dam* metilaz *E.coli* GATC dizilerinin metillenmesinden sorumludur

**Ökaryot kromozomlarda pek çok tıpkıyapım başlangıç noktası bulunur, radyoaktif işaretleme deneyleri tıpkıyapımın iki yönde ilerlediğini göstermiştir**

**Genomun kromatini en az yoğunlaşmış ve dolayısı ile tıpkıyapım makinesinin ulaşımına en açık bölgeler önce kopyalanır. İncelemeler zorunlu yaşam genlerinin en önce kopyalandığını göstermiştir.**



Ortalama insan kromozomu 150 milyon nükleotid içerir. Saniyede 50 nt hızla replike etmek için tek tıpkıyapım çatalları ile 800 saat gerekir.

Tıpkıyapım başlangıç noktaları muhtemelen 20-80 başlangıç noktalı, tıpkıyapım birimleri denilen kümeler halinde etkinleştirir.

Yeni tıpkıyapım birimleri, DNA'nın tamamı kopyalanıncaya kadar, hücre döngüsünde farklı zamanlarda etkinleşiyormuş gibi gözükmemektedir.

Bir tıpkıyapım biriminde başlangıç noktaları birbirlerinden 30000-300000 nükleotid çifti aralıklarla bulunur.

Bakterilerde olduğu gibi tıpkıyapım çatalları da çift olarak oluşur ve ortak bir başlangıç noktasından ters yönlere hareket ederken, bir tıpkıyapım çatallarıyla çarpıştıklarında ya da kromozomun ucuna ulaştıklarında dururlar.

**Tomurcuklanan mayada her kromozomdaki her tıpkıyapım başlangıç noktasının yeri belirlenebilmektedir, başlangıç noktaları ortalama 30000 nt arayla yer alır, maya kromozomu 8 dakikada replike olur.**

Mayanın 3. kromozomu bilinen ne küçük ökaryot kromozomlarından biridir, 180 gen taşır, dokuz adet tıpkıyapım başlangıç noktası içermektedir.

**Tomurcuklanan mayada tıpkıyapım başlangıç noktasını (origin of replication) diğer protein bağlanma/tanım bölgesi takip eder**

**Memeli DNA dizilerinde tıpkıyapım başlangıç noktaları hakkında daha az bilgi vardır**

İnsanda tıpkıyapım başlangıç noktasını etkisizleştiren delesyonlar tanımlanmıştır.

## **Ökaryotlarda DNA tıpkıyapım başlangıç mekanizması**

Bu mekanizma her tıpkıyapım başlangıç noktasının her hücre siklusunda bir kez aktive edilmesini sağlar. G1 fazında prereplikatif kompleks oluştuğu takdirde replikasyon orjini kullanılabilir. S fazı başlangıcında siklin-bağımlı kinazlar(Cdk), pek çok tıpkıyapım proteinini fosforile ederek prereplikatif kompleksinin dağılmasına ve DNA tıpkıyapım başlangıcının inhibisyonuna neden olur. Yeni bir prereplikatif kompleks tıpkıyapım başlangıç noktası, hücre bir sonraki G1 fazına geçinceye dek oluşamaz.

Mcm: 6 alt birimli helikaz

Cdc6: helikaz yükleme etmeni

Cdks: G1-S geçişini aktive ederler, G1de düşük, S fazında yüksektirler

## **Yeni nükleozomlar tıpkıyapım çatalının arkasında yapılırlar:**

H3-H4 tetramerleri rastgele şekilde DNAYA bağlı kalır ve yavru DNA da kalıtılırlar.

H2A-H2B dimeri ise replikasyon çatalından salınır.

**Histon şaperonları (NAP1 ve CAF-1) yavru DNA moleküllerine tüm histonları ekler, bazı yavru nükleozomlar hem yeni hem de parental histon hibridlerini içerirken, bazıları sadece yeni histonları içerir.**

# Histon modifikasyonları okuyucu-yazıcı kompleksler tarafından aynı şekilde kalıtlanır

## Kromozomların uçlarını telomeraz kopyalar:

Artçı iplikte doğrusal DNA molekülünün en ucunda son Okazaki parçasını başlatmak için gerekli olan RNA primerinin bağlanacağı yer olmaması sorunu bu sayede çözülmüştür. Telomeraz tekrarlanan ve G bakımından zengin telomer DNAsı sentezi için RNA kalıbı taşıyan bir protein RNA karışımıdır. Yeşil kısım ters transkriptaza benzer. Telomeraz kendi kalıbını her an yanında taşıma açısından benzersizdir.

## Telomer tıpkıyapımı:

Telomer tekrarları Tetrahymena'da GGGTTG, insanda GGGTTA, mayada  $G_{1-3}A'$ 'dır

## Kromozom ucunda 3'uç her zaman 5' uçtan uzundur:

Bu tek iplikli çıkıntılı uç özel proteinler sayesinde telomer tekrarlarının içine sokularak bir t-ilmek oluşturulur ve bu ilmek sayesinde yıkım yapan enzimlerden korunur ve hücrenin hızla onardığı kırık DNA moleküllerinden ayırt edilmesi sağlanır.

Aşağıda görülen ilmek 15000 nt uzunluğundadır

# **Telomer uzunluđu hücreler ve organizmalar tarafından denetlenir:**

Mayada normalden az ya da çok telomer tekrarı eklenmiş ve hücre iyileştikten sonra telomer sayısını dengelediği görölmüştür. Somatik insan hücrelerinde her hücre bölünmesinde telomerlerden 50-100 nt kaybedilir. Fibroblastlar 60 kez bölündükten sonra **tıpkıyapımsal hücre yaşlanmasına** girerler

## **DNA onarımı olmasaydı kendiliğinden olan DNA hasarı DNA dizilerini hızla değiştirirdi:**

### **Pürinsizleşme ve aminsizleşme**

Pürinsizleşme sonucu DNAdan hem G hem A çıkarabilir. Aminsizleşme sonucu hergün bir insan hücresinden 5000 pürin(G,A) yitirilir. Sitozin amin yoluyla urasile dönüşmesinin hızı her hücrede yaklaşık 100 bazdır

### **Timin dimeri**

Güneşten gelen mor ötesi radyasyon DNAda yanyana olan iki pirimidin arasında kovalan bağ oluşturabilir

### **Başlıca iki DNA onarım yolağı:**

Baz kesip çıkarma onarımı ve nükleotid kesip çıkarma onarımı

# **DNA bazlarının kimyası hasar saptamayı olanaklı kılar**

## **DNA nükleotidlerinin aminsizleşmesi**

Aminsizleşmiş, metillenmiş C nükleotidlerinin onarımına yardım etmek için özel bir DNA glikozilaz T-G dizisindeki yanlış eşleşmiş baz çiftini tanır ve T'i çıkarır. Verimsiz bir onarım mekanizmasıdır. İnsan DNAsındaki C nükleotidlerinin %3ü metillenmiştir ve bu noktalardaki mutasyonlar kalıtsal hastalıklarda gözlenmiş tek baz mutasyonlarının üçte birine karşılık gelmektedirler

## **Çift iplik kırıkları verimli bir şekilde onarılır**

Benzeşmeyen uçların eklenmesi ve benzeşen uç ekleme

**Genel rekombinasyon iki benzeşen DNA molekülü arasındaki baz eşleşme etkileşimleri ile yönlendirilir**

**RecA proteini ve onun benzeşikleri DNA'nın tek ipliğinin DNA çift sarmalının benzeşik bir bölgesi ile eşleşmesini sağlar**

**RecA proteini tarafından katalizlenmiş DNA sinaps oluşumu**

# **Ökaryotlarda her biri belli bir işlev için oluşmuş birkaç RecA protein benzeşigi bulunur:**

Rad 51 mayada farede ve insanda RecA benzeşigidir ve sinaps oluşumunu sağlar. Rad52 ise daha özelleşmiştir, Rad51 bağlanabilmesi için tek zincir bağlama proteinlerini uzaklaştırır ve ek olarak komplementer tek zincirlerin yapışmasını sağlar

## **Dal göçü (branch migration) sinaps bölgelerindeki heterodupleks alanları genişletebilir veya yeni sentezlenen tek zincirli DNAyı serbest bırakabilir:**

Dal göçü aynı diziye sahip iki DNA ipliğinin aynı tamamlayıcı iplikle eşleşmeye çalıştığı bir noktada gerçekleşebilir, dal noktası hareket eder. RecA DNA bağımlı bir ATPazdır.

## **Genel rekombinasyonda Holliday kavşağı (çapraz iplik değiş tokuşu) sık oluşur**

**Mayotik rekombinasyon programlanmış bir çift zincir kırığı ile başlar**

## **Mayozda apraz atlamış kromozomlar oluşur**

Mayoz spesifik protein Spo11 ve Mre 11 kompleksi çift zincirli DNAyı kırdıktan sonra homolog rekombinasyon Holliday kavşığı vasıtası ile olur. DNA onarımının aksine mayozda bu işlem diğer mayotik proteinler ile de sıkıca ilişkilidir ve Spo11 sadece germ hücrelerinde ifade olur

## **Mayoz sırasında oluşan heteroduplex tipleri**

Gen dönüşümü ve çapraz atlama

**DNAya sınırlı transpozonlar DNA kırılma ve eklenme mekanizmaları ile sınırlıdır:**

**Kes yapıştır biçiminde konum değişimi**

**Bazı virüsler kendilerini konakçı hücre kromozomlarının içine taşımak için konum değiştirici yere özgü rekombinasyonu kullanır: Retrovirüs 8500 ntlik RNA molekülünden oluşur**



# **Ters transkriptaz RNAz H (hibrid) RNA ipliği DNA ipliğine dönüşür**

**Bir retrovirus ya da retrovirus benzeri retrotranspozon tarafından konum değiştirici yere özđü rekombinasyon gerçekleştirilebilir**

**İnsan genomunun büyük bir kısmı retrovirüs olmayan retrotranspozonlardır:**

Retrovirüs olmayan bir retrotranspozon tarafından konum deđiřtirici yere özđü rekombinasyon

**Korumalı yere özđü rekombinasyon DNAyı tersinir biçimde yeniden düzenler**

**Korumalı yere özđü rekombinasyon genleri açıp kapamak için kullanılabilir (Cre-LoxP)**