

# MOLEKÜLER BİYOLOJİ II B208

Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

- DNA replikasyonunu yöneten temel kuralları anlamak
- Replikasyonun genelinde tipik olarak yer alan proteinleri tanımak

## DNA REPLİKASYONU

- ↳ Varsaydığımız spesifik eşleşmenin genetik materyal için olası bir kopyalama mekanizmasını öneriyor olması dikkatimizden kaçmadı ?



**Watson & Crick**  
*Nature (1953)*

Original drawing by Francis Crick

## DNA molekülünün genetik materyal olarak olabilmesi için dört gereksinim

- **Bilgi taşınmalıdır**  
Genetik şifrenin çözülmesi
- **Replike olmalıdır**  
DNA replikasyonu
- **Bilginin değişimine izin vermelidir**  
Mutasyon
- **Fenotip ekspresyonunu yönetmelidir**  
Gen fonksiyonu

## DNA REPLİKASYONU

### "Hücre bölünmeden önce genomun çoğaltılması süreci"

- Bölünmeden sonra hücrelerde genetik devamlılığın sağlanması için genetik materyalin replikasyonunun tamamen doğru bir biçimde gerçekleştirilmesi gerekir.
- DNA replikasyonunun hatasız gerçekleşmesi, sonraki kuşaklarda genomun bütünlüğünü korumak için gereklidir
- Bu olay müthiş karmaşıktır.
- İnsan genomunu oluşturan 23 kromozomda  $3 \times 10^9$  (3 milyar) baz çiftinin yer aldığı düşünün.
- Bunların iki katına çıkarılması için son derece doğru bir mekanizma işlemelidir.
- Bütün organizmalarda, hatasız olmasa da yüksek doğrulukta bir DNA kopyalama sistemi gelişmiştir.

## DNA bilgiyi kendi baz sekansında taşır

- DNA'nın sekansa-spesifik bilgilerinin çoğuna yalnızca çift sarmal çözülmüş olduğunda erişilebilir
- DNA sarmalı açılmaya başladıkça, proteinler nükleotidlerin DNA sekansını okur
- Proteinler ya DNA sekansına bağlanabilir ya da DNA'yı kopyalamayı başlatabilir.
  - Bazı genetik bilgiye, el değmemiş, çift sarmallı DNA moleküllerinde bile erişilebilir
  - Bazı proteinler, DNA'nın açılmasına gerek olmadan baz dizisini tanırlar (Örneğin restriksiyon enzimi).

## DNA REPLİKASYONU

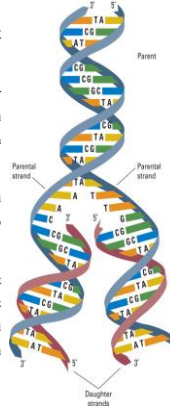
### "Hücre bölünmeden önce genomun çoğaltılması süreci"

- DNA replikasyonu, ökaryotlarda hücre döngüsünün S fazında (sentez) meydana gelir
- Replikasyon hızının ökaryotlarda daha yavaş olması ökaryotlarda replikasyonun daha yüksek bir doğrulukta gerçekleşmesine neden olur

## DNA REPLİKASYONU

WATSON-CRICK MODELİNE  
GÖRE DNA REPLİKASYONU:

- İki DNA zincirindeki bazlar arasında yer alan hidrojen bağları kırılır ve iki zincir birbirinden ayrılır
- Her bir DNA zinciri yeni sentezlenecek olan zincir için kalıp görevi görür
- Kalıp (parental) zincirdeki nükleotit sekansı tamamlayıcı baz eşleşmesini temel alarak yeni zincirdeki (daughter) baz sekansını belirler

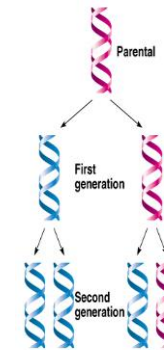


DNA REPLİKASYONU İÇİN OLASI  
3 MODEL ÖNERİLMİŞTİR

## DNA REPLİKASYONUNUN TEMEL KURALLARI

1. DNA replikasyonu **yarı-korunumludur** (semi-conservative)
2. DNA replikasyonu **orijin** noktasından başlar
3. Sentez her zaman **5-3' yönünde** gerçekleşir
4. DNA replikasyonu **uni-** veya **bi-directional** olabilir
5. Kalıp DNA molekülünün varlığına ihtiyaç duyar
6. RNA primerleri gereklidir
7. DNA polimeraz enziminin varlığına ihtiyaç duyar
8. Yeni nükleotit zincirine dahil olacak serbest nükleotitlere ihtiyaç duyar
9. Semi-discontinuous (Tek zincir kesintili/Tek zincir kesintisiz)

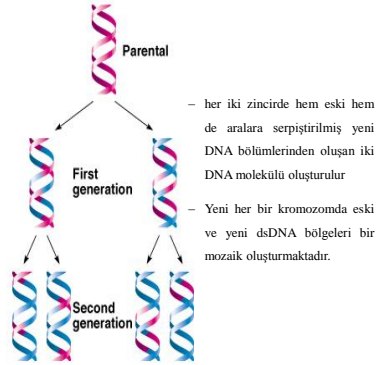
## DNA REPLİKASYONU Conservative replikasyon



- Conservative modele göre bir DNA kopyasının her iki zinciri tamamen eski DNA iken diğer kopya yeni DNA molekülünün iki zincirine sahiptir.
- Bozulmamış orijinal DNA molekülü ve tamamen yeni bir kopya DNA molekülü oluşur.

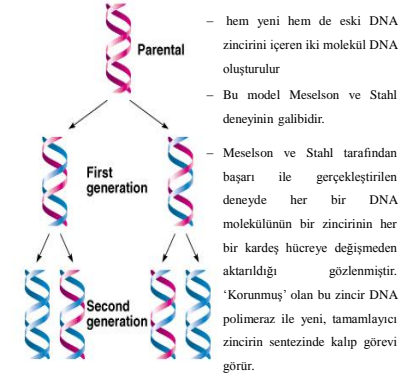
## DNA REPLİKASYONU

### Dispersive replikasyon



## DNA REPLİKASYONU

### Semi-conservative replikasyon



## MESELSON-ST AHL deneyleri

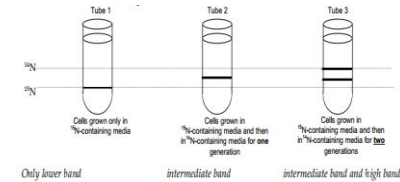
### DNA molekülünün semiconservative replikasyonunu onaylamaktadır

Elde edilen sonuç önerilen modeller ile karşılaştırıldı:

- Conservative model*'e uymamaktadır çünkü bir jenerasyon sonrasında, daha çok tamamen  $^{15}\text{N}$  DNA ve tamamen  $^{14}\text{N}$  DNA dan oluşan bantlardan ziyade tek bir ara bant bulunmaktadır.
- Dispersive model* ara yoğunluğa sahip DNA molekülünün tek bir bantının her bir jenerasyonda mevcut olduğunu ve her bir replikasyon döngüsünde artan miktarlarda  $^{14}\text{N}$  eklendiğçe giderek daha az yoğun hale geldiği tahmin etmektedir. Bunun yerine, Meselson ve Stahl, zamanla azalan ara forma sahip iki DNA bantı gözlemlemiştir
- Semiconservative model* elde edilen verilere oldukça iyi uyum sergilemektedir- yani çift zincir DNA molekülünün bir zinciri parent DNA diğeri ise buna tamamlayıcı olarak sentezlenen yeni zincirdir

- Meselson-Stahl tarafından yapılan deney DNA molekülünün semi-conservatif olarak replike olduğunu önermiştir. *E.coli* hücreleri birkaç jenerasyon  $^{15}\text{N}$ 'li besiyerinde geliştirilmiştir. Pek çok jenerasyondan sonra, *E.coli* hücreleri içinde  $^{14}\text{N}$  olan besiyerine aktarılmış ve DNA moleküllerini replike etmelerine olanak sağlanmıştır. DNA molekülü daha sonra  $^{14}\text{N}$  içeren besiyerindeki bu hücrelerden ekstrakte edilmiş ve CsCl santrifüjleme yapılmıştır

- Aşağıdaki 1 numaralı tüpte  $^{15}\text{N}$  içeren besiyerinde gelişen hücrelerden izole edilen DNA tarafından oluşan bant görülmektedir, Tüp 2 ve 3 de, çift zincir DNA molekülü semiconservative model ile replike olduğunda görmemiz gereken bantları çiziniz.



1. Meselson-Stahl tarafından yapılan deney DNA molekülünün semi-conservatif olarak replike olduğunu göstermiştir. *E.coli* hücreleri birkaç jenerasyon  $^{15}\text{N}$ 'li besiyerinde geliştirilmiştir. Pek çok jenerasyondan sonra, *E.coli* hücreleri içinde  $^{14}\text{N}$  olan besiyerine aktarılmış ve DNA moleküllerini replike etmelerine olanak sağlanmıştır. DNA molekülü daha sonra  $^{14}\text{N}$  içeren besiyerindeki bu hücrelerden ekstrakte edilmiş ve CsCl santrifüjleme yapılmıştır

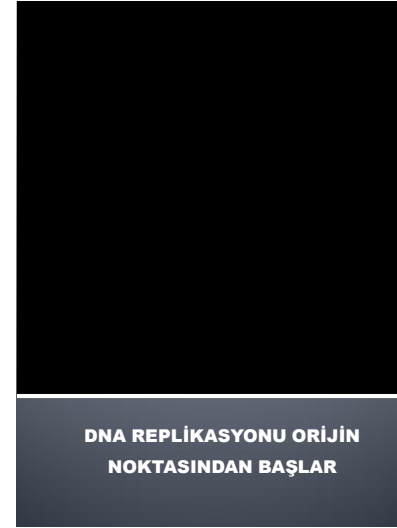
b. Bakteriyal hücreler çift zincir halkasal DNA molekülü içermektedir. Topoizomeraz enzimleri DNA üzerindeki süpersarmasal yapıyı rahatlatan bir enzimdir. Eğer DNA replikasyonu topoizomeraz enziminin eksikliğinde gerçekleşiyorsa, tüp 2 ve 3 de görülen bantlar nasıl farklılık gösterir

Tüp 2 aynı görüntü verecektir çünkü birbirlerinden ayrılmayı beceremeyen iki hibrit ( $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ) DNA molekülüne sahip olacaktır.

Tüp 3 de birlikte olan iki  $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$  ve iki  $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$  DNA olacaktır, dolayısıyla bant tüp 2 dekinden biraz daha yukarda görülecektir



- Kromozom üzerinde DNA'nın replikasyonu nereden başlar?
- Tek bir orijin mi vardır yoksa sentez birden fazla orijinden mi başlar?
- Başlangıç noktası rastgele bir yerde mi bulunur yoksa kromozomda özgül bir bölgede mi yer alır.
- İkincisi replikasyon başladıktan sonra tek bir yönde mi yoksa orijinden başlayarak her iki yönde mi ilerler? Yani replikasyon tek yönlü müdür yoksa çift yönlü müdür?



- **Başlatıcı (Initiator) proteinler**, DNA üzerinde **ORİJİN** olarak isimlendirilen spesifik baz sekanslarını tanırlar
- Prokaryotik ve ökaryotik orijinler ortak özelliklere sahiptirler
  - Çoklu benzersiz kısa tekrar sekansları içerirler.
  - Bu sekanslar çoklu altüniteye sahip replikasyonu başlatan faktörler için tanıma ve bağlanma bölgeleridir
  - Bu sekanslar AT bakımından zengin sekanslardır

## REPLİKASYON ORİJİNİ

- *E. coli*'de radyoizotoplar kullanılarak yapılan deneylerde replikasyonun **oriC** (origin of Chromosomal replication) (**REPLİKASYON ORİJİNİ**) olarak isimlendirilen ve spesifik DNA sekansı içeren tek bir replikasyon orijininden başladığını göstermişlerdir.
- Yaklaşık 275 baz çifti içeren **oriC** üç tip DNA sekansı içermektedir
  - 1- AT-bakımından zengin bölge
  - 2- DnaA box sekansları (9bp uzunluğunda)
  - 3- GATC metilasyon bölgeleri

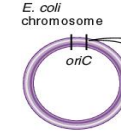
## REPLİKASYON ORİJİNİ

### Ökaryotik DNA Replikasyonunda birçok replikon var

- Tek bir halkasal kromozoma sahip olan bakterilerde tek bir replikasyon orijininin bulunması karakteristiktir.

## REPLİKASYON ORİJİNİ

- **ori C** olarak adlandırılan bu özgül bölgenin konumu, *E. coli* kromozomu üzerinde haritalanmıştır.



## REPLİKASYON ORİJİNİ

### Ökaryotik DNA Replikasyonunda birçok replikon var

DNA replikasyonunun tek bir orijinden başladığı halkasal bakteriyal kromozomların aksine, ökaryotik kromozomlardaki lineer DNA molekülünün replikasyonu birçok noktadan başlayarak **REPLİKON** adı verilen replikasyon ünitelerini meydana getirir

## REPLİKASYON ORIJİNİ

### Ökaryotik DNA Replikasyonunda birçok replikon var

- Bakteriyofaj ve bakterilerde DNA sentezi bir noktadan başladığı için, kromozomun tümü **REPLİKON** olarak ifade edilir.
- Tipik büyüklükteki bir ökaryot kromozomundaki DNA, her biri yaklaşık 50,000-300,000 bp uzunluğunda olan binlerce **REPLİKON** içerebilmektedir
- Her bir **REPLİKONUN** tam ortası (merkezi) DNA sentezinin başladığı replikasyon orijini

## REPLİKASYON ORIJİNİ

### Ökaryotik DNA Replikasyonunda birçok replikon var

REPLİKON – Tek bir orijinden replike olan DNA

Organism	# of replicons	Average length of replicon	Velocity of fork movement
<i>Escherichia coli</i> (bacteria)	1	~200 kb	50,000 bp/min
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)	500	40 kb	3,600 bp/min
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	3,500	40 kb	2,600 bp/min
<i>Xenopus laevis</i> (frog)	15,000	200 kb	500 bp/min
<i>Mus musculus</i> (mouse)	25,000	150 kb	2,200 bp/min
<i>Homo sapiens</i>	10,000 to 100,000	~300 kb	

## REPLİKASYON ORIJİNİ

### Ökaryotik DNA Replikasyonunda birçok replikon var

- Bir replikon'dan büyüyen **REPLİKASYON BALONU** kendisine bitişik olan replikondan büyüyen replikasyon balonu ile karşılaştığında, iki replikon tarafından sentezlenmiş olan DNA molekülleri birbirleri ile birleşirler
- Bu şekilde, sayısız replikasyon bölgelerinden sentezlenmiş olan DNA molekülü en sonunda birbirleri ile birleşerek her biri bir parental ve bir yeni zincirden oluşan iki tane çift sarmal DNA molekülü meydana getirirler

## Neden?

1. Bakteriyal kromozomlara kıyasla, **ökaryotik kromozomlar çok fazla DNA içermektedir...**

dolayısıyla, eğer tek bir replikasyon orijini DNA sentezi başlamış olsaydı ökaryotların kromozomlarını replike etmeleri çok uzun sürerdi

2. Bununla beraber, her bir replikasyon çatalının DNA sentezleme hızı bakterilere kıyasla, **ökaryotlarda çok düşüktür** (muhtemelen nükleozomların varlığı replikasyon işlemini yavaşlatmaktadır)

Ökaryotik replikasyon çatalı dakikada yaklaşık 2000 bp DNA sentezlerken bakteriyal replikasyon çatalının DNA sentezleme hızı 50,000 bp/dakika'dır.

Ortalama büyüklükteki bir insan kromozomunun  $10^8$  bp DNA içerdiği düşünülürse, eğer tek bir replikasyon orijini olsaydı kromozomun duplikasyonu bir aydan uzun sürerdi

## REPLİKASYON ÇATALI

- Kromozom üzerinde replikasyonun olduğu noktada sarmala ait zincirlerin açılmasıyla ortaya **REPLİKASYON ÇATALI** çıkmaktadır.
- Bu çatal önce sentezin orijin noktasında meydana gelir ve replikasyon devam ettikçe ilerler.
- Replikasyon çift yönlü ise orijinden itibaren zıt yöne doğru ilerleyen **İKİ REPLİKASYON ÇATALI** oluşacaktır.

## REPLİKASYONUN YÖNÜ

**Sentez her zaman 5'-3' yönündedir**

**DNA REPLİKASYONU HANGİ YÖNDE İLERLER?**

## REPLİKASYONUN YÖNÜ

**Sentez her zaman 5'-3' yönündedir**

- *DNA sentezi her zaman için büyümekte olan zincirin 3'-OH ucuna nükleotit eklenmesi ile gerçekleşir.*
- *Sentez her zaman için 5'-3' yönündedir.*



**REPLİKASYONUN YÖNÜ**  
**Sentez her zaman 5'-3' yönündedir**

- Yanlış nükleotid eklenirse ne olur?

**REPLİKASYONUN YÖNÜ**  
**Uni ya da bi-directional?**

Replikasyon çatalı bir (uni) veya aksi (bi-) yönlerde hareket eder

**DNA REPLİKASYONU**  
**UNI ya da BI-DIRECTIONAL?**

**REPLİKASYONUN YÖNÜ**  
**DNA Replikasyonu genelde bi-directional'dır**

- *Bacillus subtilis*'te DNA replikasyonunun bi-directional olduğunun gösterimi (Gyurasits and Wake, J. Mol. Biology, 1973)
  - Bakteriyal sporlar düşük seviyede radyoaktif (3H) thymidine içeren besi yerinde geliştirildi
  - Üremenin 120. dakkasında, yüksek seviyede radyoaktif (3H) thymidine ilave edildi
  - İlave 20 dakika sonrasında DNA replikasyonu durduruldu ve DNA X-ray film ile muamele edildi

## DNA REPLİKASYONU SEMI-DISCONTINUOUS

### REPLİKASYONUN YÖNÜ Leading (kesintisiz) ve lagging (kesintili) zincirler

- Okazaki fragmanları Reiji & Tuneko Okazaki tarafından keşfedilmiştir
- Büyüklüğü prokaryotik hücrelerde 1000-2000 nükleotit uzunluğundadır. Ökaryotik hücrelerde ise bu uzunluğun 1/10'u kadardır (100-200 bp)

### REPLİKASYONUN YÖNÜ

#### Leading (kesintisiz) ve lagging (kesintili) zincirler

- İki zincir birbirine **anti-paraleldir** ve anti-paralel zincirler aynı anda replike olurlar
- DNA polimeraz III enziminin DNA sentezini sadece 5'→3' yönünde gerçekleştirebildiği düşünülürse, her bir replikasyon çatalındaki DNA sentezi çatalın hareket yönündeki zincirde kesintisiz (**leading**) iken diğer zincirde aksi istikamette kesintili fragmanlar (**okazaki fragmant**) şeklinde sentezlenecektir (**lagging**)

### REPLİKASYON MODU

### REPLİKASYONUN MODLARI (LİNEAR ÖKARYOTİK REPLİKASYON)

- Ökaryotik kromozomlardaki çift sarmal lineer DNA molekülünde replikasyon **çoklu replikasyon orijinlerinden (Ori)** başlayarak **bi-directional** olarak replike olur

### REPLİKASYONUN MODLARI HALKASAL DNA REPLİKASYONU (THETA REPLİKASYON)

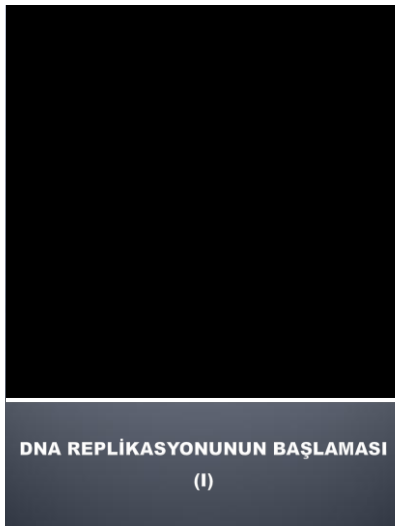
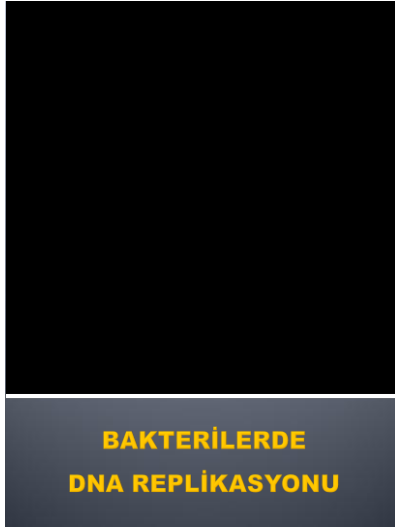
- Theta replikasyonu sadece *E.coli* gibi bakteri genomlarında değil, aynı zamanda plazmid, mitokondri, kloroplast ve bazı virüslerdeki halkasal DNA molekülünde de gözlemlenir

### REPLİKASYONUN MODLARI HALKASAL DNA REPLİKASYONU (ROLLING CIRCLE REPLİKASYON)

Virus, *E. coli* de F faktör; tek bir replikasyon orijini

### REPLİKASYON HIZI

- Prokaryotlarda **replikasyon hızı** 1000 nükleotit/saniye hızında gerçekleşmektedir, dolayısıyla 40 dakikadan fazla sürmemektedir
- Ökaryotlarda **replikasyon hızı** 50 nükleotit/saniye hızında gerçekleşmektedir, dolayısıyla 60 dakikada tamamlanmaktadır



## DNA REPLİKASYONU ÜÇ BASAMAKTAN OLUŞMAKTADIR

### 1. Initiation (Başlangıç):

- Replikasyon orijininde gerçekleşir (*E.coli* = OriC)
- 275 baz çiftinde oluşmuş oldukça korunumlu bir bölge
- Çift zincir DNA'nın ayrılması, primer sentezi

### 2. Elongasyon (Polimerizasyon):

- Kalıp zincire tamamlayıcı olan yeni nükleotitler ilave edilir
- Fosfodiester bağlarının oluşumu ile zincir 5'-3' yönünde uzar
- Yanlış eklenen bazlar düzeltilir

### 3. Terminasyon:

- Terminasyon bölgesi olarak bilinen spesifik bir bölgede ("ter sekansı" yaklaşık ~ 350 kbp, OriC sekansının 180° karşısında) DNA replikasyonu son bulur

## DNA REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASI (I)

1. *E. coli* DNA replikasyonu **oriC** (275 nükleotit uzunluğunda AT bakımından zengin bölge) bölgesinde **replikasyon kompleks** oluşumu ile başlar

**DNA REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASI**

(I)

DNA Replikasyonu esnasında, çift sarmal DNA molekülünün iki zincirinin de, birbirinden ayrılması ve böylece kendilerini kopyalayacak olan enzimlerin tek zincire ulaşmasına imkan tanınması gerekmektedir

**DNA REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASI**

(I)

- Başlangıç evresindeki en can alıcı bileşen **DnaA** proteini'dir (ATPaz protein familyasına ait bir protein; molekülün ATP-bağlı formu aktif, ADP bağlı formu inaktiftir).
- Her biri ATP molekülüne bağlı yaklaşık 20-40 tane **DnaA** proteini oriC bölgesinde yer alan **DnaA box sekanslarına** bağlanarak DnaA proteininin etrafına sarılı negatif süperhalkasal DNA yapısının oluşumunu sağlar

**DNA REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASI**

(I)

2. Replikasyon işlemine başlamak için, **başlangıç proteinleri** (initiator proteins) olarak isimlendirilen bir grup protein oriC bölgesine bağlanırlar
  - ATP'den elde etmiş olduğu enerjiyi kullanarak çift sarmal DNA'yı açar ve
  - Replikasyon için gerekli olan diğer replikasyon birimlerinin tek zincir DNA'ya ulaşmasına olanak sağlar
  - Böylece **prepriming kompleks (preprimosome)** oluşumunu gerçekleştirirler

**DNA REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASI**

(I)

- **HU** ve **IHF** (integration host factor) proteinleri de aynı zamanda bağlanarak o bölgenin **DnaA** proteinlerinin üzerinde katlanmasına olanak sağlar
- Bu durum 13bp'lik AT bakımından zengin segment tekrarlarını açar ve **DnaB (helikaz)/DnaC** kompleksinin bağlanmasını sağlar



## DNA REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASI

(I)

2. **DnaB (Helikaz)** proteininin DNA-DnaA kompleksine katılmasına **DnaC** yardım eder ancak daha sonra ayrılır
3. İki adet **DnaB proteini (helikaz)** orijine bağlanır ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak oriC bölgesinden DNA zincirlerini açmaya başlar



## DNA REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASI

(I)

- oriC içerisinde GATC sekansından 11 kopya bulunmaktadır ve DNA replikasyonu esnasında oriC sekansı da replike olur
- **DAM METİLAZ** enzimi GATC sekansını tanıır ve bu sekandaki adenin nükleotidine metil grubu takar. *Sadece full metile olmuş oriC sekansı replikasyonu başlatabilir*
- GATC palindrom bir sekanstır  
5'GATC3'  
3'CTAG5'
- *Parental zincir metile edilirken yeni sentezlenen zincir metile edilmez*
- Yeni sentezlenen zincirde yer alan GATC sekansı da metile olmak için hedef olsa da bu durum gerçekleşmesinden önce yaklaşık 10 dakika bir zaman geçer

## DNA REPLİKASYONUNUN BAŞLAMASI

(I)

- **SSBP** tek zincir DNA molekülüne bağlanır.
- **GYRASE** (TipII topoizomeraz) replikasyon çatalının önünde dsDNA molekülüne negative supersarmal yapı kazandırır
- **PREPRIMING KOMPLEKS** böylece oluşur.



- DNA polimeraz enzimi 'ori' bölgesine bağlanır, kalıp DNA sekansına tamamlayıcı olan nükleotitleri eklemek suretiyle RNA primerin 3'OH ucunu uzatmaya başlar.
- Her bir replikasyon döngüsü kromozomal uçların kısalmasıyla sonuçlanacaktır.
  - 'Ori' bölgesinin neden adenin (A) ve timin (T) bazlarıncı zengin olduğunu açıklayınız
  - Halkasal DNA molekülünü kopyalamak için gerekli olan minimum replikasyon orijin sayısı kaç olmalıdır?



- Aşağıda bahsi geçen durumların kromozomun replikasyonun başlama hızına etkileri nedir?
  - Hücreye oriC kopyası taşıyan pilazmid DNA molekülünün eklenmesi?
  - Hücreye sürekli bir şekilde (yapısal olarak) eksprese edilen dnaC kopyasını taşıyan pilazmid DNA molekülünün eklenmesi?
- Kromozomun replikasyon başlama hızı DnaA:OriC oranına bağlıdır
- Pilazmid üzerinde ekstra OriC kopyasına sahipseniz bu oran azalacak dolayısıyla replikasyonun hızı da azalacaktır
- Extra ilave edilen DnaC; bu oranı yani DnaA:OriC oranını etkilemeyecek dolayısıyla başlama hızı etkilenmeyecektir

## DNA REPLİKASYONUNDA GÖREVLİ ENZİM/PROTEİNLER

DNA polimeraz III enzimi sadece var olan nükleotit zincirinin 3' ucuna yeni nükleotitler ekleyebildiğinden, ve sıfırdan yeni bir DNA zincir sentezini başlatamadıklarından çift zincir DNA molekülünün replikasyonu nasıl başlamaktadır?



## DNA REPLİKASYONUNDA GÖREVLİ ENZİM/PROTEİNLER

### PRİMAZ (DnaG)

- Hücre içerisinde bulunan **DnaG (primaz)** DNA replikasyonunda görev yapan özel bir RNA polimeraz'dır
- Kalıp moleküle bağlanır ve DnaB tarafından aktive edilir.
- Aktive edilen primaz 15 nükleotit uzunluğunda RNA primerlerini sentezler ve bu RNA primerleri *DNA replikasyonunu başlatmak* için kullanılmaktadır.

**PRİMAZ (DnaG)**

**PRİMAZ (DnaG)**

**HELİKAZ (DnaB)**

**SSBP**  
**(Tek Zincir Bağlanma Proteinleri)**

- **HELİKAZ** enzimi, ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanarak replikasyon çatalının önünde DNA'yı açar ve hidrojen bağlarını kırarak ipler (Y-şeklindeki replikasyon çatalarını) oluşturmak için replikasyon orijininden başlayarak iki zinciri birbirinden ayırır

- DNA molekülünün zincirleri birbirlerinden ayrılmaya başladığında, **SSBP (tek zincir DNA bağlanma proteinleri)** tek zincir DNA molekülüne bağlanarak zincirleri birbirinden ayrı tutar ve DNA replikasyonundan sorumlu olan diğer ekipmanların zincire ulaşmasına olanak sağlar



## TOPOİZOMERAZ

- Replikasyon çatalında DNA molekülünün çift zincirinin açılmaya başlaması (helikaz etkisi ile) replikasyon çatalının ilerisinde dsDNA üzerinde **stress** oluşumuna ve molekülün **superhalkasal** (pozitif) formu kazanmasına sebep olur çünkü sarmalın iki ucu birbirine göre serbestçe dönemez

## TOPOİZOMERAZ

- DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrılması neticesinde oluşan bu superhalkasal yapı **TOPOİZOMERAZ I** ve **II** enzimi tarafından tanınır ve düzeltilir
- DNA zinciri üzerinde kırma ve tekrar bir araya getirme işlemini katalize eden bu enzim replikasyon ve transkripsiyonda önemli rol oynamaktadır

## TOPOİZOMERAZ I

- Tek zincir kırılır, zincirdeki stres ortadan kaldırılır ve kırık zincir tekrar bir araya getirilir
- *Enerji harcanmasına gerek yoktur*

## TOPOİZOMERAZ II

- Çift zincir DNAnın her iki zinciri üzerinden kesim yapılır
- *Enerjiyi ihtiyaç vardır*
- Bir topozimeraz tip II enzimi olan DNA giraz ATP nin hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak DNA molekülüne negatif süpersarmal yapı kazandırır ve bu süperhalkasal oluşumu ortadan kaldırır

## DNA POLİMERAZ

*E. coli*'de en az beş çeşit DNA polimeraz (Pol) enzimi vardır, bunlardan üçü kapsamlı olarak incelenmiştir

## DNA POLİMERAZ

- Tüm DNA polimeraz enzimlerinin temel özellikleri:
  - DNA polimeraz enzimi var olan ve büyümekte olan DNA zincirinin sadece serbest 3' ucuna yeni nükleotitlerin eklenmesini katalize edebilmektedir. *Dolayısıyla, DNA polimeraz enzimleri DNA sentezini 5'→3' yönünde gerçekleştirebilmektedir*
  - *Primer (RNA) varlığı olmadan DNA sentezini başlatamazlar (RNA polimeraz enzimleri bunu yapabilir)*

## DNA POLİMERAZ I

- Keşfedilen ilk DNA polimeraz enzimi
- **DNA polimeraz I** tek bir polipeptit zincirine sahiptir (*E. coli*'den elde edilen Polimeraz I enzimi 928 aa (109 kD) uzunluğunda bir monomer)
- Proteoliziz (sübttilisin ya da tripsin) çalışmaları sonucu iki zincir elde edilmiştir
- Büyük Zincir (Klenow Fragment) 68 kd
  - 5'→3' polimerizasyon aktivitesi (C terminal)
  - 3'→5' exonuclease proofreading aktivitesi (N terminal)
- Küçük zincir
  - 5'→3' exonuclease aktivitesi

## DNA POLİMERAZ I

### Klenow fragmanı

### 5'→3' polimerizasyon aktivitesi

- **Prosesivite**, DNA polimeraz enzimi tarafından kalıp DNA ile birleşip/ayrılma başına eklenen nükleotitlerin ortalama sayısının bir ölçüsüdür
- DNA polimeraz I enzimi **orta seviyede prosesiviteye** sahip bir enzimdir
- Yaklaşık 20-50 nükleotitin zincire eklenmesini katalizledikten sonra ayrılır
- Enzim **DNA TAMİR** işlemlinden sorumludur

## DNA POLİMERAZ I

### 5'→3' ekzonükleaz

- DNA polimeraz I enzimi çift zincir DNA'dan ayrıldığında bir boşluk kalır ve bu boşluk **DNA LİGAZ** tarafından kapatılır (Birbirine komşu olan iki nükleotit arasındaki fosfodiester bağının oluşumunu katalize eder)
- DNA polimeraz I enziminin 5'→3' aktivitesi
  - ortamdaki primerin uzaklaştırılmasında,
  - DNA tamir işleminde ve
  - DNA molekülünün radyoaktif dNTP'ler ile işaretlenmesinde kullanılır

DNA POLİMERAZ I ENZİMİ  
REPLİKASYON İŞLEMİNDEN SORUMLU  
POLİMERAZ ENZİMİ DEĞİLDİR  
ÇÜNKÜ.....

### 2. Enzim bol miktarda bulunmaktadır

- Bir *E. coli* hücresinde 400 molekül bulunmaktadır.
- Her bir hücrede 2 replikasyon çatalı olduğundan molekül sayısı oldukça fazladır.

DNA POLİMERAZ I ENZİMİ  
REPLİKASYON İŞLEMİNDEN SORUMLU  
POLİMERAZ ENZİMİ DEĞİLDİR  
ÇÜNKÜ.....

### 1. Enzim çok yavaştır!

- dNTP'leri ekleme hızı 20 nükleotit/saniye'dir.
- Bu durumda, *E.coli* kromozomunun replike edilmesi 460,000 saniye (= 7667 dak = 128 sa = 5.3 gün) sürmektedir!
- 20 dakikada bir bölünebilen bir organizma için oldukça yavaş.

DNA POLİMERAZ I ENZİMİ  
REPLİKASYON İŞLEMİNDEN SORUMLU  
POLİMERAZ ENZİMİ DEĞİLDİR  
ÇÜNKÜ.....

### 3. Enzim yeterince prosesif değildir

- Prosesivite, DNA polimeraz enzimi tarafından kalıp DNA ile birleşip/ayırılma başına eklenen nükleotitlerin ortalama sayısının bir ölçüsüdür
- DNA polimeraz I enzimi yaklaşık 20-50 nükleotitin zincire eklenmesini katalizledikten sonra ayrılır (**orta seviyede prosesivite**)

## DNA POLİMERAZ II

- Hakkında halen çalışmalar devam etmektedir ancak UV ışığı gibi dış etmenler sonucu hasar gören DNA'nın tamirinde görev alıyor gibi görünmektedir.
- 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir ve bu işlev sentez sırasında hata onarımı işlevini görmesini sağlamaktadır.

## DNA POLİMERAZ II ENZİMİ REPLİKASYON İŞLEMİNDEN SORUMLU POLİMERAZ ENZİMİ DEĞİLDİR ÇÜNKÜ.....

- Polimeraz II enzimi kodlayan gene sahip olmayan suşlar büyüme ya da replikasyon işleminde sorun yaşamamışlardır.
- Polimeraz II sentezi hücre büyümesinin büyümenin ve DNA sentezinin çok az olduğu sabit (stationary) fazında indüklenir
- Polimeraz II enzimi düşük hata oranına sahiptir ancak normal DNA replikasyonundaki herhangi bir kullanım için oldukça yavaştır

## DNA POLİMERAZ III

### DNA POLİMERAZ III REPLİKASYON İŞLEMİNDEN SORUMLU TEMEL POLİMERAZ ENZİMİDİR

- Zincire saniyede yaklaşık 1000 dNTP ekleyebilmektedir
- Oldukça prosesifdir: zincirden ayrılmadan önce >500,000 dNTP'ler
- Doğruluk oranı:
  - Eklenen  $10^7$  dNTP'de 1 hata
  - Proofreading aktivitesi ile son hata oranı  $10^{10}$  da 1 hata

## DNA POLİMERAZ III

- DNA polimeraz III kompleks bir yapıya sahiptir ve en az 10 farklı altüniteye sahiptir.
- İşlev görmesi için *ATP hidroliz enerjisi* gereklidir. Enzimin iki formu bulunmaktadır: **Core enzim** ve **Holoenzim**

	Subunit	Function
Core polymerase	$\alpha$	5' → 3' polymerase
	$\epsilon$	3' → 5' exonuclease
	$\theta$	Assists $\epsilon$
Holoenzyme	$\tau$	ATPase, $\alpha$ -binding
	$\gamma$	ATPase, non- $\alpha$ -binding
	$\delta$ and $\delta'$	ATPases
	$\chi$ and $\psi$	Stabilize the clamp loader complex
	$\beta$	Sliding clamp as $\beta_2$

## DNA POLİMERAZ III

**DNA POLİMERAZ III enziminin işlev gösterebilmesi için üç gereksinimi bulunmaktadır.**

**1. Kalıp DNA**

**2. Primer**

- DNA Polimeraz III enzimi DNA replikasyonunu kendi başına başlatamaz
- Sentezin başlayabilmesi için serbest 3'OH gruba ihtiyaç duymaktadır

**3. Dört tip deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP)**

- Dört dNTP den birinin olmadığı durumda ölçülebilir bir sentez meydana gelmemiştir.
- Türevleri kullanılsada yine sentez olmamaktadır.

## DNA REPLİKASYONUNUN İLERLEMESİ (II)

DNA molekülünü kalıp olarak kullanarak yaklaşık 15 nükleotit uzunluğunda RNA primer sentezleyen **primaz** enzimi yerini daha sonra **DNA polimeraz III** enzimine bırakır

## DNA REPLİKASYONUNUN İLERLEMESİ POLİMERİZASYON (II)

• **Supersarmal DNA'nın relakse olması.**

- Topoizomeraz aktivitesi tarafından katalizlenir, replikasyon çatalının hareketi, ilerlemesi için gereklidir
- Topoizomeraz I – Dönme eksenini sağlamak için tek zincir kırılır
- Topoizomeraz II (DNA gyrase) – süpersarmal yapıyı ortadan kaldırmak için iki zincir birden kırılır



• **Denatürasyon ve çift sarmalın açılması.**

- DNA helikaz tarafından katalize edilir. Tekrarlanan ATP hidrolizi ile tek zincir DNA (ssDNA) üzerinde ilerler ve karşılaştığı çift zincir DNA'yı çözer.
- Replikasyon çatalında 2 tane DNA helikaz vardır. Kesintili (lagging) ve kesintisiz (leading) zincir üzerinde birbirlerinden farklı istikametlerde hareket ederler



• **Yeni DNA zincirinin sentezlenmeye başlaması**

- RNA primerleri kalıp olarak yerleştirilir (primaz tarafından)
- Kesintisiz zincir replikasyon çatalının hareketi ile aynı yönde sentezlenir
- Kesintili zincir zıt yönde sentezlenir ve Okazaki fragmanlarının oluşması için çoklu RNA primerleri gerekir
- Primaz + helikaz = primosome



• **Replikasyon çatalında tek zincir DNA molekülünün stabilizasyonu**

- Tek zincir DNA bağlanma proteinleri (SSB proteinleri) tek zincir DNA'ya bağlanarak stabilize eder (ssb geni); kendi üzerinde katlanma yapmasın ya da çift zinciri tekrar oluşturmasın diye
- Bağlanma kooperatifdir – birinin bağlanması diğer SSB'nin bağlanmasını stimüle eder
- Her bir replikasyon çatalına 200 den fazla SSPP bağlanır



• **Yeni DNA zincirinin elongasyonu**

- DNA polimeraz III tarafından RNA primerin serbest 3'OH grubuna yeni DNA eklenir
- Kesintisiz zincirde sentez 5'→3' yönünde kesintisizdir
- DNA polimeraz III enzimi sentez yönünde RNA primer (okazaki fragmanı oluşturan) ile karşılaşıncı kesintili zincirden ayrılır



• **Kesintili zincir üzerinde yer alan Okazaki fragmanlarının birleştirilmesi**

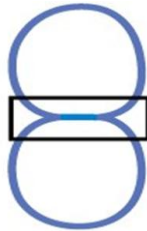
- DNA Polimeraz I enziminin 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi RNA primerini ortadan kaldırırken aynı enzimin 5'→3' polimerizasyon aktivitesi oluşan boşluğu doldurur
- DNA ligaz enzimi boşluğun iki tarafında kalan 3'OH ve 5'fosfat arasındaki fosfodiester bağımlı katalize ederek boşluğu kapatır



**DNA REPLİKASYONUNUN SONLANMASI  
TERMİNASYON  
(III)**

**DNA REPLİKASYONUNUN SONLANMASI  
(III)**

- DNA replikasyonu tamamlandığında halkasal iki kardeş DNA molekülü birbirine bağlıdır
- Bu şekilde bağlı bulunan DNA yapısı **catenane (katenan)** olarak bilinmektedir.
- *E coli* **topoisomerase IV** bu yapıyı çözer



**DNA REPLİKASYONUNUN  
DOĞRULUĞU**

## DNA REPLİKASYONUNUN DOĞRULUĞU

### *Charchoff kuralı*

1. Hareket halindeki polimeraz enziminin doğru nükleotide afinitesi yanlış nükleotide oranla daha fazladır...

DNA replikasyonu esnasında Charchoff kuralına göre AT ve GC aralarında eşleşmeler sonucu hata 3/100,000 nükleotittir, yani kalıp DNA zincirindeki baz ile yanlış baz eşleşmesi...

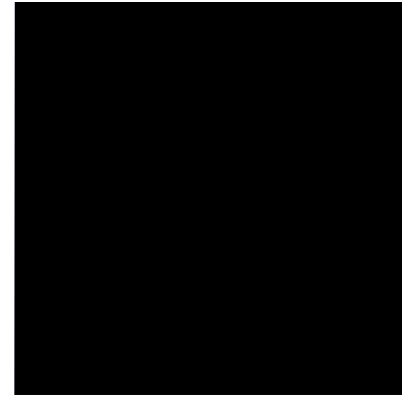


- *Eğer hücreler DNA sentezini 3'→5' yönünde gerçekleştirebilen bir enzime sahip olmuş olsalardı, 3'→5' yönünde büyümekte olan DNA zincirinin 5' ucunda nucleotide triphosphate olacağından proofreading aktivitesi çalışmazdı çünkü*
- eğer 5' uçtaki nükleotide yanlış bir eşleşme varsa, yanlış bazın alınması 5' fosfat grubunun ortadan kalmasına sebep olacaktır ki bu da DNA polimeraz enziminin büyümekte olan zincire nükleotit eklemesini sağlayan enerjiji sağladığından, 5' fosfatın ortadan kalması zincirin uzamaması anlamına gelmektedir

## DNA REPLİKASYONUNUN DOĞRULUĞU

### *DNA Tamir mekanizmaları*

3. DNA polimeraz enziminin 3'-5' proofreading aktivitesi tarafından gözden kaçırılan yanlış bir eşleşme **MISMATCH TAMİR MEKANİZMASI** tarafından düzeltilmektedir



## DNA REPLİKASYONUNUN İNHİBİSYONU



## DNA REPLİKASYON İNHİBİTÖRLERİ

- Nalidixic acid
- Novobiocin
- Ciprofloxacın
- Adriyamycin
- Etoposide
- Doxorubicin

## ÖKARYOTİK DNA REPLİKASYONU

- Ökaryotlarda DNA replikasyonunun genel özellikleri, prokaryotlarda olduğu gibidir ancak daha kompleksdir
- Ökaryotik replikasyon hakkında bildiklerimizin çoğu, maya ve SV-40 DNA replikasyonunun incelenmesinden elde edilmiştir.
  - Her ikisinde de işlem **bi-directional**
  - DNA polimeraz enzimleri 5' → 3' yönünde çalışır
  - Primerler gereklidir ve Okazaki fragmanları oluşur
  - Leading (kesintisiz) ve lagging (kesintili) zincirler

## ÖKARYOTİK DNA REPLİKASYONU

## ÖKARYOTİK KROMOZOM REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ

### ÖKARYOTİK KROMOZOM REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ

DNA replikasyonunun temel özellikleri her ne kadar bütün organizmalarda aynı olsa da, bazı işlemler yalnızca **ökaryotlarda** gerçekleşir.

### ÖKARYOTİK KROMOZOM REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ (Çok fazla genetik materyal)

- Tipik bir hayvan hücresi, ortalama bir bakterinin sahip olduğundan 50 kat daha fazla DNA'ya sahiptir (*E. coli* 4,6 milyon baz çiftine, insanlar 3 000 milyon baz çiftine veya 650 kat fazlasına sahiptir!!)

### ÖKARYOTİK KROMOZOM REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ

- DNA replikasyonu hücre döngüsünün yalnızca **S FAZI** boyunca gerçekleşir (Bakteriler DNA'yı yalnızca zengin besi ortamda kopyalarlar)
- Uçları olan **LİNEER KROMOZOMLAR**
- **ÇOK DAHA FAZLA GENETİK MATERYAL**
- **ÇOKLU REPLİKASYON ORJİNLERİ** (Bakterilerde sadece tek bir replikasyon orijini bulunur)
- Ökaryotlarda en az 15 farklı **DNA POLİMERAZ** enzimi mevcuttur
- **NÜKLEOZOMLAR** (DNA histonlar etrafında dolanır) (Nükleozomlar bakterilerde mevcut değildir)
- **TELOMERLER** (Telomerler bakterilerde mevcut değildir)

### ÖKARYOTİK KROMOZOM REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ (Ökaryot Replikasyonunda Kullanılan Enzimler Farklıdır)

- Ökaryotlarda en az 15 farklı **DNA polimeraz** enzimi mevcuttur (Bunlardan 5'i üzerinde oldukça kapsamlı çalışmalar yapılmıştır):  
**pol  $\alpha$ , pol  $\gamma$ , pol  $\delta$ , pol  $\epsilon$  ve pol  $\beta$ .**
  - Bu enzimlerin her birinin karşılığı prokaryotik hücrelerde mevcuttur
- Diğerleri arasında DNA hasarının bypass işleminde görevli olan  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ , Rev1 ve Pol  $\zeta$  yer almaktadır.
- Bununla beraber  $\theta$ ,  $\lambda$ ,  $\phi$ ,  $\sigma$ , ve  $\mu$  iyi karakterize edilmemişlerdir
- Başka polimerazlarda mevcuttur ancak adlandırma oldukça karışık hale gelmektedir

**ÖKARYOTİK KROMOZOM**  
**REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ**  
(Ökaryot Replikasyonunda Kullanılan Enzimler Farklıdır)

**DNA POLİMERAZ  $\alpha$  (ALFA)**

- Nucleus'da bulunur,
- Kromozomal replikasyonda polimerizasyon işleminden sorumludur (DNA zincirini 5' ile 3' yönünde uzatır; sekans, tek zincirli kalıp DNA tarafından yönlendirilir.)
- **Primaz** enzimi olarak işlev gösterebilmek için bir kompleks oluşturur (RNA primeri sentezler) ve daha sonra bu primeri DNA nükleotitleri ile 15 nt kadar daha uzatır
- Pol  $\alpha$  enzimi tarafından gerçekleştirilen yaklaşık 20 nükleotidlik elongasyon işleminden sonra bu görev kesintisiz (leading) zincirde pol $\alpha$ , kesintili (lagging) zincirde ise pol $\delta$  tarafından devralınır.

**ÖKARYOTİK KROMOZOM**  
**REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ**  
(Ökaryot Replikasyonunda Kullanılan Enzimler Farklıdır)

**DNA POLİMERAZ  $\delta$  (DELTA)**

- Nucleus'da bulunur,
- 3'-5' eksonükleaz proofreading enzim aktivitesine sahiptir ve böylece kesintili (lagging) zincirin replikasyon işleminden sorumludur (5'-3' polimeraz aktivitesi)
- Primaz enzim aktivitesine sahip değildir
- DNA pol  $\alpha$  ile kıyaslandığında oldukça prosesiviteye sahiptir ve doğruluk oranı yüksektir
- DNA pol  $\alpha$  ~ 100 nükleotidlik bir prosesiviteye sahiptir, oysa pol  $\delta$ , PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ile bağlantılı olmak koşuluyla, tüm kalıbı çoğaltır
- DNA pol  $\delta$  ve PCNA'dan oluşan kompleks hem **leading** hem de **lagging** zincir sentezi için gereklidir.
- Öyle görünüyor ki, pol $\alpha$ /primaz, 7-10 nt uzunluğunda RNA primerlerini sentezliyor ve daha sonra bu işi bitirmesi için PCNA ve pol  $\delta$ 'e görevi vermeden önce DNA ile bu nükleotitleri 15 nt kadar daha uzatıyor

**ÖKARYOTİK KROMOZOM**  
**REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ**  
(Ökaryot Replikasyonunda Kullanılan Enzimler Farklıdır)

**DNA POLİMERAZ  $\alpha$  (ALFA)**

- Bu enzim, prokaryotik eşdeğerinden farklı olarak, 3'-5' eksonükleaz enzim aktivitesine sahip değildir!!! dolayısıyla primerin ortadan kaldırılması için başka enzimler kullanılmaktadır
- Bu enzimin tamir işlevi bulunmaz
- Prosesivitesi (kalıp moleküle bağlanıp kopyalamayı sürdürme kabiliyeti) oldukça düşük olup doğruluk oranı yüksektir (DNA pol  $\alpha$  ~ 100 nükleotidlik bir prosesiviteye sahiptir)

**ÖKARYOTİK KROMOZOM**  
**REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ**  
(Ökaryot Replikasyonunda Kullanılan Enzimler Farklıdır)

**DNA POLİMERAZ  $\epsilon$  (EPSİLON)**

- Nucleus'da bulunur
- Primaz enzim aktivitesine sahip değildir
- Oldukça prosesif bir enzimdir ve doğruluk oranı yüksektir
- 3'-5' exonuclease proofreading enzim aktivitesine sahiptir,
- leading (kesintisiz) zincirin replikasyonundan sorumludur
- Tamir işleminde de görev yapar

**ÖKARYOTİK KROMOZOM  
REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ**  
(Ökaryot Replikasyonunda Kullanılan Enzimler Farklıdır)

**DNA POLİMERAZ β (BETA)**

- Nucleus'da bulunur
- Primaz enzim aktivitesine sahip değildir
- 3'-5' exonuclease proofreading enzim aktivitesine sahip değildir
- Enzimin prosesivite ve doğruluk oranı düşüktür
- Replikasyon işleminden ziyade **DNA TAMİR**inden sorumludur (excision tamir mekanizması ve gap-filling)

**ÖKARYOTİK KROMOZOM  
REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ**  
(Ökaryot Replikasyonunda Kullanılan Enzimler Farklıdır)

Bu DNA polimeraz enzimlerinden farklı olarak ökaryotlarda **tamir mekanizmalarından** sorumlu olan pek çok polimeraz enzimi bulunmaktadır: polimeraz β, η, ι, κ, ζ ve Rev1

**ÖKARYOTİK KROMOZOM  
REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ**  
(Ökaryot Replikasyonunda Kullanılan Enzimler Farklıdır)

**DNA POLİMERAZ γ (GAMA)**

- Mitokondri ile sınırlıdır ve bu nedenle mitokondri genomunun replikasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir.
- Kloroplastta'da DNA pol γ da vardır.
- Primaz enzim aktivitesine sahip değildir
- 3'-5' exonuclease proofreading enzim aktivitesine sahiptir
- Enzimin prosesivite ve doğruluk oranı yüksektir
- Tamir işleminde de görev yapmaz

**ÖKARYOTİK KROMOZOM  
REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ**  
(Ökaryot Replikasyonunda Kullanılan Enzimler Farklıdır)

- Ökaryotik hücreler de sadece farklı enzimlere sahip değiliz, aynı zamanda prokaryotlarla kıyaslandığında, bu enzimlerden **çok fazla kopyaya** sahiplerdir
  - Tipik bir hayvan hücresi 20.000-60.000 pol α molekülüne sahiptir, oysa model bir bakteri olan E. coli hücresinde 10-20 molekül DNA pol III vardır.
- DNA ökaryotlarda replike olduktan sonra **paketlenmelidir**.
  - Bu olay replikasyondan hemen sonra hızlı bir şekilde gerçekleşir. Replikasyon ilerledikçe hücre gerekli histonları sentezlemek durumundadır (Paketleme yapmak için yeterli miktarda depolanmış histonu yok)

**ÖKARYOTİK KROMOZOM  
REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ  
(Nükleozomların varlığı Replikasyon hızını etkiler)**

**NUKLEOZOMLAR**

(DNA yoğunlaşmasının temel birimleri)

- Kromozomların materyali, hem Protein hem de DNA, genellikle **KROMATİN** olarak adlandırılır. Protein bileşeni, kütle bakımından DNA bileşenine eşittir.
- Kromatinin en büyük protein bileşenini **HİSTON**lar oluşturur, ökaryotik hücrelerde yüksek oranda korunmuş, her biri dört farklı histone altbiriminden ikişer tane içeren oktametik kompleksler halinde bir araya getirilen bazı proteinlerdir.
- Yoğunlaşmış **NÜKLEOZOMLAR** oluşturmak için DNA, histonların etrafını sarar.

**ÖKARYOTİK KROMOZOM  
REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ  
(End Replikasyon Problemi/TELOMER)**

- Bununla beraber, **LİNEER DNA molekülleri için**, DNA polimeraz III enziminin var olan DNA zincirinin sadece 3' OH ucuna nükleotit ekleyebilmesi ciddi bir problem yaratmaktadır !!!!!

**ÖKARYOTİK KROMOZOM  
REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ  
(Nükleozomların varlığı Replikasyon hızını etkiler)**

- Her bir replikasyon çatalının DNA sentezleme hızı bakterilere kıyasla, ökaryotlarda çok düşüktür (muhtemelen nükleozomların varlığı replikasyon işlemini yavaşlatmaktadır)
- Ökaryotik replikasyon çatalı dakikada yaklaşık 2000 bp DNA sentezlerken bakteriyal replikasyon çatalının DNA sentezleme hızı 50,000 bp/dakika'dır.

**ÖKARYOTİK KROMOZOM  
REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ  
(End Replikasyon Problemi/TELOMER)**

Her bir kromozomun sonunda bulunan ve herhangi bir kodlama yapmayan bu sekanslar her replikasyonda DNA kısaldığı için, hücrenin önemli bir genetik bilgiyi kaybetmemesini sağlamaktadır

## ÖKARYOTİK KROMOZOM REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ (End Replikasyon Problemi/TELOMER/TELOMERAZ)

### TELOMERLER TELOMERAZENZİMİ İLE UZATILIR

- **TELOMERAZ** enzim aktivitesi tüm hücrelerde bulunmadığı için, bu hücrelerdeki kromozomlar DNA molekülünün her replikasyonu neticesinde gittikçe kısalmaktadır
- **TELOMERAZ** enzim aktivitesi;
  - sperm veya yumurta gibi gamet üreten hücrelerde,
  - embriyonik kök hücrelerinde,
  - kanser hücrelerinde ve
  - antibodi üreten immune hücrelerinde bulunmaktadır

## TELOMERLERİN YAŞLANMA İLE İLİŞKİSİNİ DESTEKLEYEN DİĞER BULGULAR

### PROGERIA

- Halk dilinde erken yaşlanma olarak da bilinen bu hastalığa ait iki form bulunmaktadır. **Werners sendrom**, ortalama yaşam ömrü 47 yıl olan yetişkin başlangıçlı form ve **Hutchinson-Gilford progeria**, ortalama yaşam ömrü 13 yıl olan genç başlangıç formudur.
- Telomer konu başlığında özel ilgi duyduğumuz **Hutchinson-Gilford progeria**'dır.
  - Sadece belirli hücreler yaşlanır; özellikle deri, kemik ve kardiyovasküler sistem hücreleri.
  - Bu hücreler doğumda etkilenmemiş hücrelerin kalanından çok daha kısa telomerlere sahiptirler.
  - Doğduğunda, progeria hastalarının deri fibroblastları 85 yaşındaki birinin telomer uzunluğuna sahiptir

## ÖKARYOTİK KROMOZOM REPLİKASYONUNUN BENZERSİZ YÖNLERİ (End Replikasyon Problemi/TELOMER/TELOMERAZ)

### TELOMERLER TELOMERAZENZİMİ İLE UZATILIR

- Telomer uzunluğu, dolayısıyla, bir hücrenin ne kadar bölündüğünün göstergesidir
- Eğer hücre yeteri kadar bölünmüş ise, telomerler tamamen yok olma, hücre ise kodlama yapan DNA'sını yitirme tehlikesi ile karşı karşıya kalır.
- Potansiyel olarak tehlikeli olan bu senaryo kromozomların ucunda bulunan telomerik DNA'nın bir **HALKA (LARIENT)** oluşmasını gerekli kılan mekanizma ile hücreleri yok eder.
- Telomerik DNA bu halkayı oluşturamayacak kadar kısalduğunda, çift zincir DNA'nın uçlarını açığa çıkartarak **APOPTOSİS**e sebep olan bir sinyal sistemi tarafından tanınmasına olanak sağlar

## TELOMERLERİN YAŞLANMA İLE İLİŞKİSİNİ DESTEKLEYEN DİĞER BULGULAR

### DOLLY : 1996'da klonlanan ilk koyun

- Dolly, yumurtadan genomun çıkartılması ve yerine başka bir koyunun meme hücrelerinden (somatik hücreler) elde edilen genin yerleştirilmesi ile klonlanmıştır.
- Dolly, normal olarak gelişti,
  - Bonnie adında bir kuzu meydana getirdi, ancak yaşlı koyunlara özgü bir akciğer enfeksiyonu nedeniyle erkenden öldü.
  - Yapılan analizlerde yaşlı bir koyunun sahip olduğu tüm belirtileri gösterdi.
  - Açıklama: DNA'sı eskiydi, kısalmış telomerlere sahipti

## ÖKARYOTLARDA DNA REPLİKASYON EVRELERİ

### INITIATION (BAŞLANGIÇ)

- Prokaryotlarda olduğu gibi, işlem, her bir replikasyon orijinine geniş çeşitlilikteki protein kompleksinin bağlanması ile başlar; Ökaryotlarda replikasyon orijini *E.coli*'nin sahip olduğundan **daha kısadır**
- Ökaryotlarda ori-bölgeleri **ARS** (Autonomously Replicating Sequences) ya da **Replikator** olarak isimlendirilir
- **DNA polimeraz  $\alpha$**  (primaz aktivitesi) ve **DNA polimeraz  $\delta$**  (polimeraz aktivitesi ve helikaz aktivitesi) gereklidir
- DNA polimeraz  $\delta$ , aktivite gösterebilmek için **PCNA** (proliferating cell nuclear antigen) proteininin varlığına ihtiyaç duyar
- **Topoizomeraz** ve **RF** (replikasyon faktörleri)'ye gereksinim duyar

## ÖKARYOTLARDA DNA REPLİKASYON EVRELERİ

### ELONGASYON (POLİMERİZASYON)

- DNA Replikasyonu ve nükleozom oluşumu aynı anda gerçekleşir
- Elongasyon işleminden sorumlu polimeraz enzimleri **Pol  $\alpha$** , **Pol  $\epsilon$** , **Pol  $\delta$** .