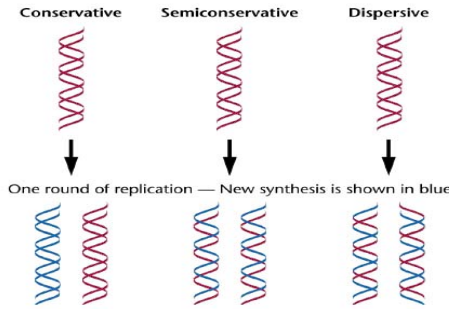


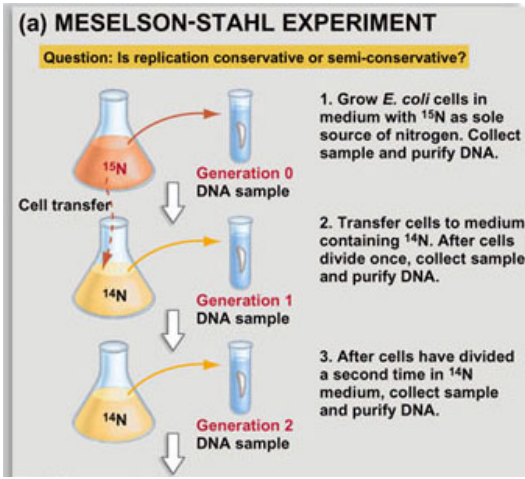
DNA Replikasyonu... (Arthur Kornberg - 1959 Nobel)

DNA'a kopyasının oluşturulması???

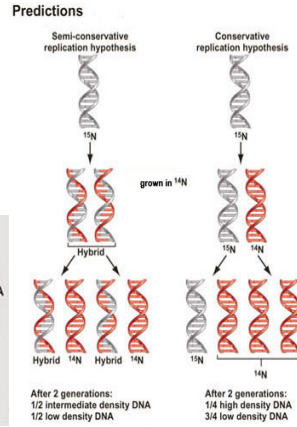
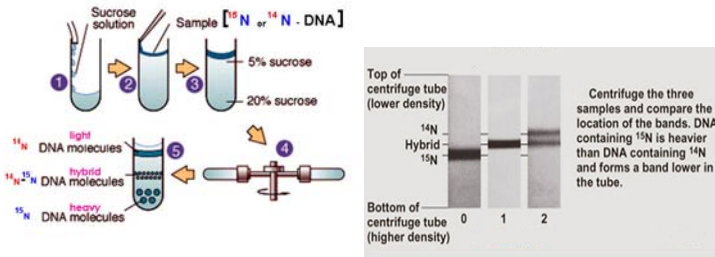
Replikasyon modeli* = conservative, semi-conservative, & dispersive



Matt Meselson & Frank Stahl 1958 - deneysel yöntem*



^{15}N -DNA'yı ^{14}N -DNA'dan ayırabilir miyiz - (ESKİ DNA'dan YENİ DNA'yı)? **EYET**
DNA sedimentasyonu ile (sükroz, CsCl gradienti ile)



1955: Arthur Kornberg *E. Colide* DNA polimeraz I ve DNA sentez mekanizmasını keşfetti

DNA polimeraz: DNA sentezleyen enzim... prokaryotik Pol I-IV eukaryotik α & δ

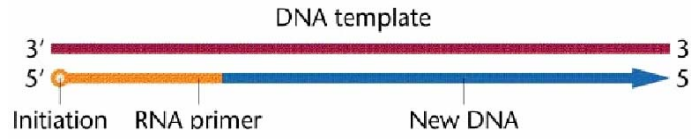
Pol I ilk bulunan tipi. Ancak ana sentez enzimi DEĞİL

Pol III (Asıl polimerizasyon enzimi) : 4-deoksi-NTP & ssDNA kalıbı kalıp okuma and komplementer nt ekleme*

3' -> 5' yönünde okuma ve 5' -> 3' yönde sentez... (her zaman unutmayın) proofreading (hata-okuma)* & iki yönlü sentez*... özellikleri

ÖNEMLİ KURAL: Tüm DNA polimerazlar DNA sentezinin başlatmak için RNA primerine gereksinim duyar

Kalıp DNA üzerinde DNA'ya komplementer olan RNA parçası (5-15 nt) PRİMAZ enzimi (RNA pol) tarafından sentezlenir. RNA primeri DNA pol I tarafından uzaklaştırılır ve zincir tamamlanır. evrensel (virusler->prok->euks)



Prokaryotik- Ökaryotik DNA polimeraz enzimler

Prokaryotik polimerazlar

Properties	DNA Pol I	DNA Pol II	DNA Pol III
Initiation of chain synthesis	-	-	-
5'-3' polymerization	+	+	+
3'-5' exonuclease activity	+	+	+
5'-3' exonuclease activity	+	-	-
Molecules of polymerase/cell	400	?	15

Pol I → primeri uzaklaştırır ve oluşan boşlukları doldurur. mutasyonların tamirinde

Pol II -> U.V hasarı nedeniyle oluşan

Pol III -> polimerizasyondan asıl sorumlu olan enzimdir. **DNA Pol III'ün holoenzim** olarak adlandırılan aktif formu, iki takım, 10 farklı polipeptit zincirinden meydana gelmiş bir dimerdir. **Core (çekirdek) enzim holoenzimin polimerizasyon aktivitesi gösteren kısmıdır.** **γ kompleks** olarak adlandırılan ikinci bölgede 5 alt birim bulunur ve replikasyon çatalında enzimin kalıba oturtulmasında görev alır. **β alt birimi**, polimerizasyon sırasında enzimin kalıptan kopmamasını sağlar. **P (pi)**, iki çekirdek polimerazın replikasyon çatalında bir arada tutunmasını sağlar.

Ökaryotik polimerazlar

TABLE 12.5 Properties of Eukaryotic DNA Polymerases

	Polymerase α	Polymerase β	Polymerase δ	Polymerase ε	Polymerase γ	Polymerase ζ
Location	Nucleus	Nucleus	Nucleus	Nucleus	Mitochondria	Nucleus
Mass of subunits (kDa)	180, 70, 58, 48	39	125, 53, 50	250, 55	125, 35	173, 29
3'-5' Exonuclease Activity	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Essential to replication?	Yes	No	Yes	Yes	No	No

DNA polimeraz α, δ (delta) ve ε ökaryotik çekirdek DNA'sı replikasyonu için gereklidir.

DNA polimeraz b ve ζ (zeta) DNA tamirinde rol aldığı düşünülüyor.

DNA polimeraz g (gama) mtDNA sentezinde rol alır.

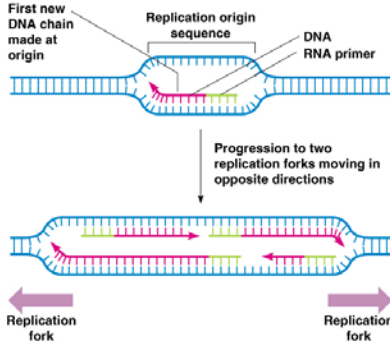
3'→5' ekzonükleaz aktivitesi: enzimin polimerizasyonu tek yönde gerçekleştirme, bir an duraksayıp, geri dönerek ilave edilen nt'leri çıkarabilme özelliğidir.

5'→3' ekzonükleaz aktivitesi: DNA pol I'in özelliğidir. Enzim, sentezin başladığı uçtan itibaren nükleotitleri kesebilir ve sonra sentez yönünde işlemine devam edebilir. Bu nedenle DNA pol I RNA primerini de uzaklaştırabilir. Ortamda pol III den daha fazla bulunur.

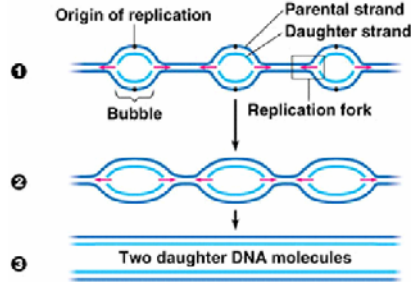
Replikasyon çatalı - leading (kesintisiz) & lagging (kesintili) zincir yapıları

Replikasyon orijini replikasyonun başlangıç noktasıdır. **Replikasyon çatalı** ise kromozom üzerinde replikasyonun olduğu noktada sarmala ait zincirlerin açılmasıyla ortaya çıkan bölgedir. Önce sentezin orijin noktasında meydana gelir ve replikasyon devam ettikçe ilerler. Replikasyon çift yönlü ise, orijinden itibaren zıt yöne doğru ilerleyen iki replikasyon çatalı oluşur.

Prokaryotik replikasyon orijini



Ökaryotik replikasyon orijini



(a) In eukaryotes, DNA replication begins at many sites along the giant DNA molecule of each chromosome.

Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

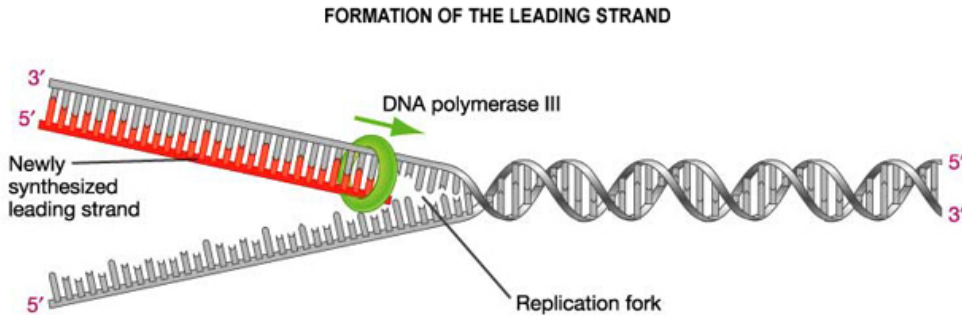
- E. coli'de replikasyon 245 bç uzunluğunda olan ve *oriC* olarak adlandırılan tek bir orijinden başlamaktadır. Bakteri ve bakteriyofajlarda replikasyon tek bir noktadan başladığından kromozomun tümü replikondur.

⇒

- Ökaryotlarda birden çok replikasyon orijini (yeast 250-400, memelilerde 25,000'den fazla replikon) bulunur.....**Çünkü**
 - Daha fazla DNA içerirler ve ökaryotik DNA pol hızı 50 nt /sn old. (sentez hızı bakteriyal pol. III den 20 kat daha yavaştır)

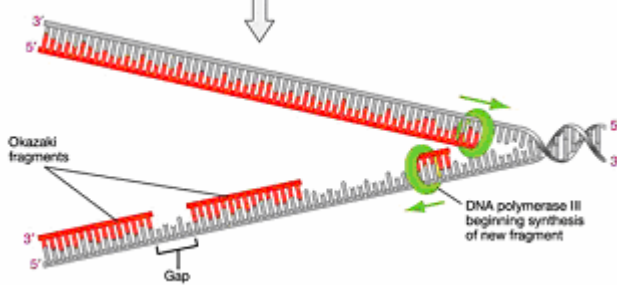
ÖNEMLİ KURAL: DNA Sentezi Her İki Zincirde 5' → 3' Yönünde ve Aynı Anda İlerler

Bu nedenle **Kesintisiz (leading) zincirde sentez 5' → 3' Yönünde** ve **duraksamadan yapılabilir.**



Eğer zincir her zaman 5' → 3' yönünde ilerlerse diğer zincirde sentez aynı anda nasıl olabilir?

- Bu soru 1960'larda Reiji Okazaki ve ark. tarafından çözüldü. Leading strand (kesintisiz öncül zincir): 5' → 3' yönünde sürekli sentezin yapılırken karşı zincirde 5' → 3' yönündeki sentez kesintili olarak yapılır. Oluşan fragmentlere **okazaki fragmentleri** (100-2000 nt) denir. DNA pol I RNA primerinin uzaklaştırılması ve nt tatmamlanmasını yapar. DNA ligaz fragmentleri birleştirir.



DNA polymerase III ile Bakteri Replikasyon Modeli

İhtiyaç duyulan 4 ana bileşen

dNTP'ler: dATP, dTTP, dGTP, dCTP(deoxyribonucleoside 5'-triphosphates)

DNA kalıbı

DNA polimeraz III

Mg²⁺ (DNA polimeraz aktivitesi için gerekli) ve

Replikasyon Kompleksi (Replizom) da yer alan enzimler:

helikaz - DNA çift zincirindeki H bağlarını çözeri.

topoizomeraz [DNA gyrase] - supercoil yapıyı ortadan kaldırır.

single strand binding proteinler (SSBP) - replikasyon çatalını stabilize eder,

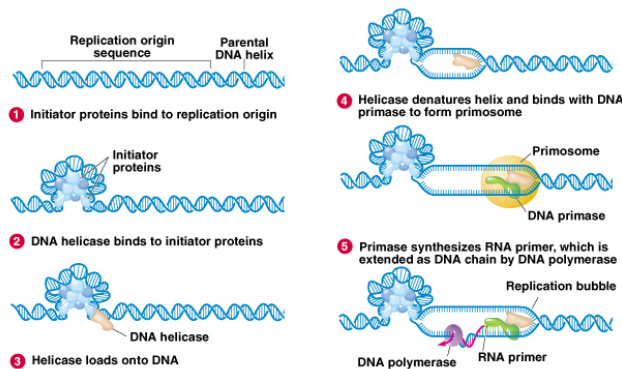
Primaz - RNA primeri sentezler

POL III - yeni DNA zincirlerini sentezler

DNA polymerase I - RNA primerini uzaklaştırıp, yerine DNA sentezler

DNA ligaz - **Okazaki fragmentlerini birleştirir**

Tanım: *E. coli* replikasyonunda, DNA polimeraz dışında 20'den fazla sayıda farklı enzim ve protein rol alır. Bu kompleksin tümünü **DNA replikaz sistemi** veya **replizom** denir.



DNA sentezinin 3 ana basamağı:

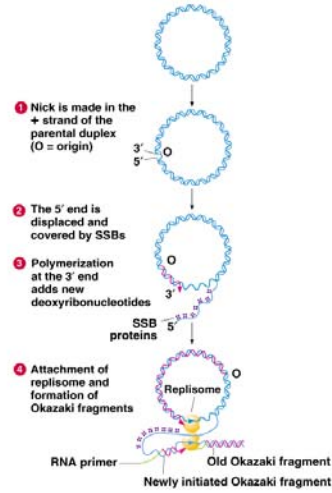
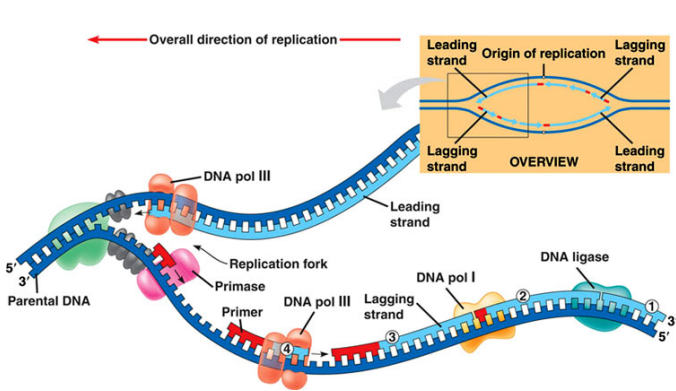
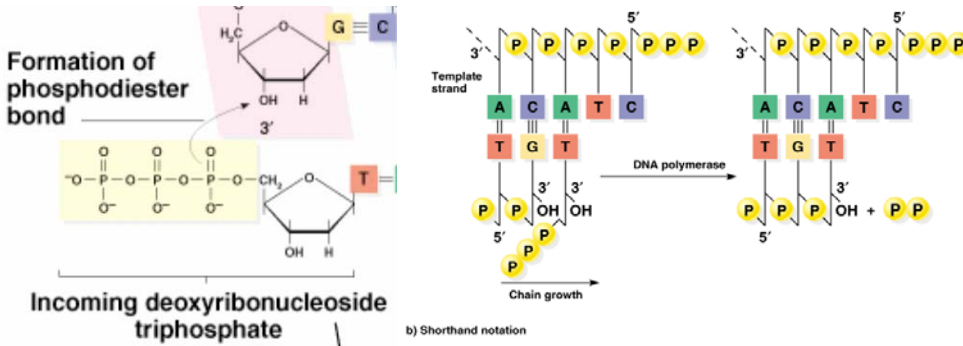
1. DNA polimeraz I, deoksiribozun 3'-OH grubu ile dNTP'nin 5'-fosfat grubu arasındaki fosfodiester bağının oluşumunu katalizler. Bu reaksiyon için gerekli olan enerji

$NTP + (NMP)_n \rightarrow (NMP)_{n+1} + P \sim P$ reaksiyonu ile karşılanır.

2. Zincir uzaması DNA polimeraz I'in komplementer dNTP'ları yapıya eklemesi ile sürer.

rate \leq 800 dNTPs/second ve Düşük hata oranı

3. Sentez yönü 5' \rightarrow 3'



Dönen Çember Mekanizması

Ökaryotlarda Replikasyon

Ökaryotik DNA sentezi prokaryotik DNA sentezine benzer ancak daha karmaşıktır. **Farklar:** Çoklu replikasyon orijini (yeast 250-400, memelilerde 25,000'den fazla replikon) ve DNA polimeraz enzimleri

LİNEER DNA'LARDA REPLİKASYON UÇ PROBLEMİ

- Kesintili zincirde RNA primeri uzaklaştırıldığında kromozomun ucunda serbest 3'-OH grubunu sağlayacak kalıp zincir olmadığı için sentez yapılamaz. Kromozom telomer bölgelerinden her replikasyonda RNA primeri boyu kadar kısılır.
- **ÇÖZÜM**-----→ *Telomeraz enzimi*

Telomerlerin çoğu 5'-TTGGG-3' dizisi ile sonlanmaktadır. Telomeraz her replikasyonda telomerin kışalmasını önlemek için TTGGGG tekrar dizilerini kromozomun ucuna eklemektedir. İlave edilen diziler "saç tokası" gibi kıvrılır ve karşı karşıya gelen G'ler arasında H bağı kurulur ve serbest 3'-OH grubu elde edilir. DNA pol I boşluğu doldurur. Daha sonra saç tokası kırılır ve DNA kaybı engellenir.

