

1 DNA REPLİKASYONU

Yavru hücrelere ata hücrelerdeki kadar DNA sağlayabilmek için hücre bölünmesinden önce DNA'nın replike olması ve dolayısıyla kromozomların iki katına çıkması gerekir. Bu gün için DNA replikasyonu mekanizması oldukça açık bir şekilde aydınlatılmıştır. 1958 yılında M. Meselson ve F. Stahl *Escherichia coli*'de DNA replikasyonunun yarıkorumalı (semikonsevatif) olarak gerçekleştiğini gösteren deneyler yapmışlardır. Daha sonra bütün organizmalarda DNA replikasyonunun yarıkorumalı bir şekilde gerçekleştiği anlaşılmıştır. Yarıkorumalı replikasyon sırasında genetik bilgi bir hücreden diğerine aktarılır. Eşeyli üreyen organizmalarda, eğer bölünen hücre eşey hücresi ise bu durumda genetik bilgi yeni nesillere aktarılır. Her durumda (mitoz veya mayoz) eski zincir kalıp olarak kullanılarak yeni bir zincir sentezlenir. Bu sentezin esası kalıp olarak kullanılan zincir üzerindeki bazların komplementelerinin yeni zincire eklenmesidir. Bu işlem tam bir doğrulukta yapıldığında genetik bilgi eksiksiz bir şekilde (daha doğru ifade hemen hemen eksiksiz!) aktarılmış olur.

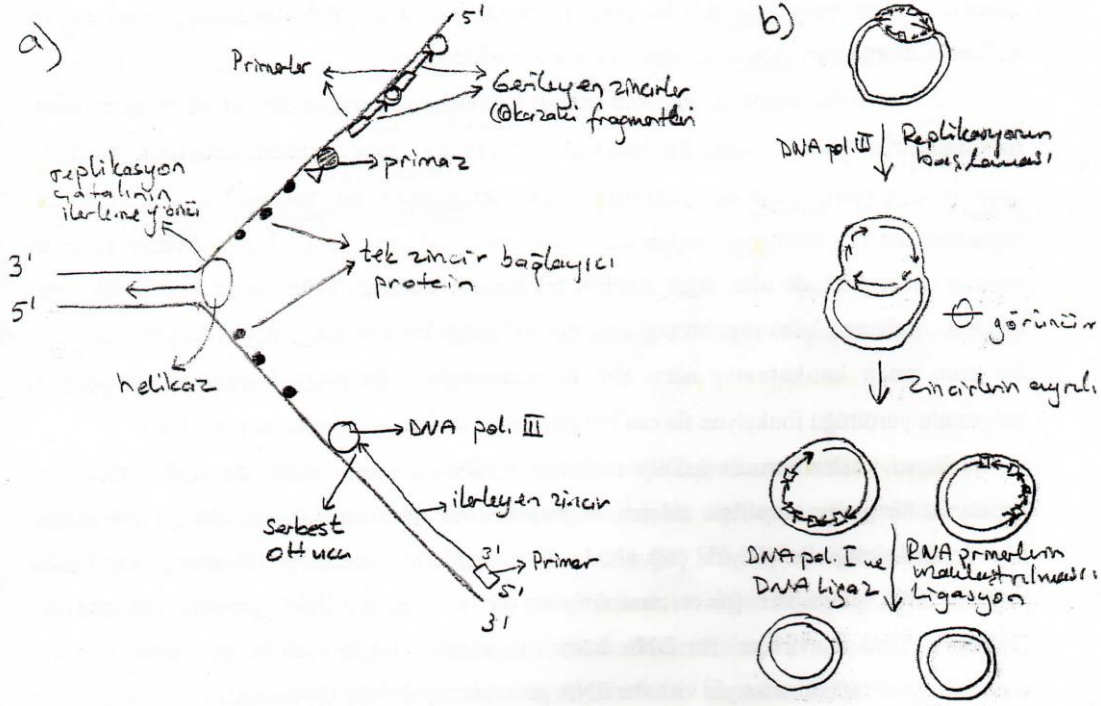
1.1 Prokaryotlarda DNA Replikasyonu

Prokaryotların hemen tamamı halkasal genoma sahiptirler. Halkasal prokaryotik genomlar teta (θ) modeli denilen bir replikasyon mekanizmasına sahiptirler. Bir model sistem olarak *E. coli*'nin replikasyon mekanizması incelenebilir. Bu bakteride replikasyonun başlayabilmesi için **başlatıcı protein** denilen bir proteinin bağlanabileceği yaklaşık 245 bp uzunluğunda bir **replikasyon orijinine** ihtiyaç vardır. Başlatıcı proteinle beraber **DNA helikaz** da bu bölgeye bağlanarak iki zincirin birbirinden her iki yönde ayrılmasını sağlar (çift yönlü replikasyon). Birbirine ters yöndeki bu iki ayrılma bölgesine **replikasyon çatalı** denir. **Tek zincir bağlayıcı proteinler** bir replikasyon çatalındaki ayrılmış zincirleri tek olarak tutar, yani tekrar eşleşmeyi engeller. Her bir zincir yeni sentezlenecek zincir için kalıp görevi görür. Kalıp zincirleri kullanarak onların komplementelerini sentezleyen enzim **DNA polimeraz III** enzimidir. Ancak DNA polimeraz yeni bir DNA zincirinin sentezini başlatamaz; dNTP'ları 5'P uçlarından uzamakta olan bir zincirin 3'OH uçlarına **tek tek** bağlayabilir.

Zincirler açıldıktan sonra **RNA primaz** açılan DNA bölgesine komplementer olan, yaklaşık 10 baz uzunluğunda bir **RNA primer** sentezler. RNA yapısında olan bu primerin ucunda sağlanan 3'OH uçlarına dNTP'lar tek tek DNA polimeraz III tarafından bağlanır. Kalıp zincirlerin yönü, yeni zincirin kesintili veya kesintisiz sentezini gerektirir (Şekil 4.1a). Bir replikasyon çatalında 3'-5' kalıp zinciri üzerinden sürekli bir DNA zinciri sentezlenir ve bu kalıp zincire **ilerleyen zincir** denir. Ancak **gerileyen zincir** adı verilen 5'-3' kalıbından kesintili bir sentez gerçekleştirilmek durumundadır. Replikasyon çatalı ilerledikçe yeni primerler sentezlenerek ilerleme yönünün tersine doğru parçalar halinde sentez gerçekleştirilir. Bu parçalar bazen **Okazaki fragmentleri** olarak adlandırılır.

Halkasal kromozomda **replikasyon terminasyon bölgesi** vardır. Her iki replikasyon çatalı bu replikasyon terminasyon bölgesinde birleşir. Ancak bu arada diğer

bazı enzimatik olayların da gerçekleşmesi gerekir. Bunlardan biri yeni sentezlenen zincirde doğruluk kontrolüdür (Şekil 4.1b). Yanlış düzeltme fonksiyonu sentezin hemen arkasından **DNA polimeraz III** tarafından gerçekleştirilir. Bir diğer enzim **DNA polimeraz I** yeni zincir üzerindeki RNA primerleri uzaklaştırarak yerine DNA nükleotitlerini ekler. Parçalar halindeki yeni zincirin birleştirilmesi **DNA ligaz** tarafından gerçekleştirilir.



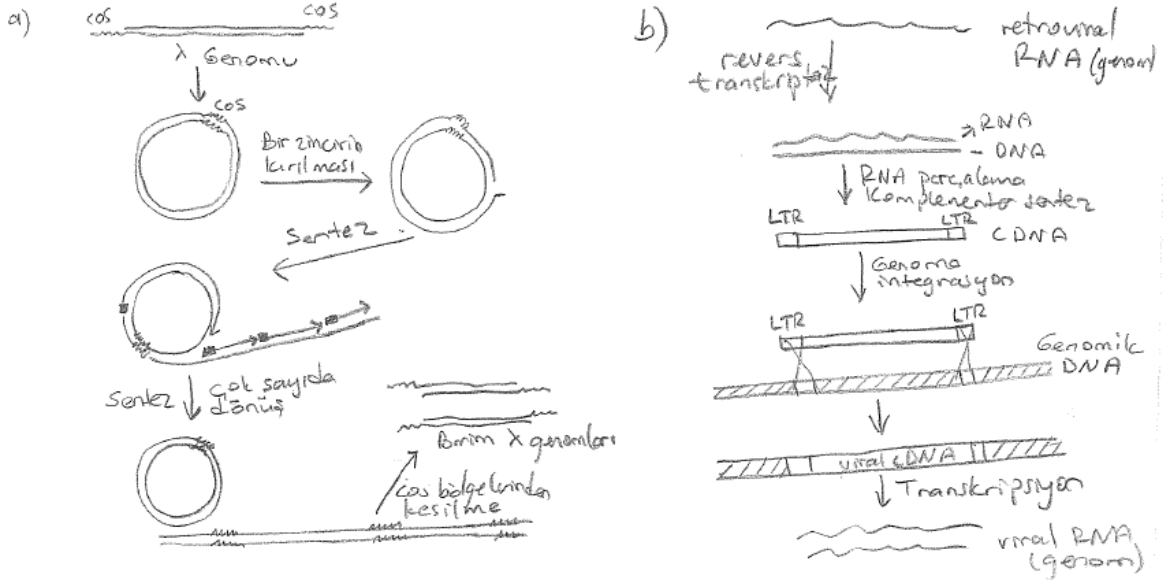
Şekil 4.1: a) Bir replikasyon çatalında meydana gelen olaylar. b) θ modeli ile replikasyonun genel akışı.

Burada vurgulanması gereken diğer bir konu DNA replikasyonunun hızıdır. *E. coli* kromozomu yaklaşık 40 dakikada replike edilir. Genom büyüklüğünü yaklaşık 4.1 milyon baz çifti olarak kabul edersek saniyede 2000 bp bir bölgenin replikasyonunun yapılması gerekir. Replikasyonun iki çatalda yürütüldüğünü düşündüğümüzde her bir çatalın hızının 1000 bp/sn olması gerekir. Bu hızlı ve yanlışsız gerçekleştirilmesi gereken sürecin yürütülebilmesi için replikasyon sırasında gerçekleştirilen işlemlerin çok yüksek bir eşgüdüm içinde yürütülmesi gerekir. Gerçekte DNA polimeraz replikasyon çatalındaki olayları koordine eden büyük bir nükleoprotein kompleksinin bir parçasıdır. Bu kompleks **replizom** olarak adlandırılır ve "moleküler makina"ya tipik bir örnektir. Replizomlar replikasyonda görev alan enzim ve yardımcı proteinleri kapsar ve replikasyon çatalında meydana gelen bütün olayların istenen hızda ve doğrulukta yürütmesini sağlar.

1.1.1 Virüslerde replikasyon

Virüslerde farklı tip nükleik asitler genom olarak kullanılır (DNA, RNA, tek zincirli, çift zincirli, halkasal veya doğrusal). Bu genomların replikasyonu için de çok farklı mekanizmalar kullanılır. Bunlardan sadece ikisinden kısaca söz edilecektir.

Bakteriyofaj lamda (λ) genomu bakteri hücresine girince *cos* denilen uç bölgelerinden halkasallaşırlar (Şekil 4.2a). Bu halkasal çift zincirli DNA θ mekanizmasıyla hücresel enzimlerle replike edilerek çoğaltılır. Yeni sentezlenen bu halkasal λ genomlarının zincirlerinden biri kesilir ve kesilen zincirin 5' ucu yapıdan ayrılmaya başlar. Ayrılan zincirin ve hala halka şeklinde olan diğer zincirin tek zincirli kısımları kalıp olarak kullanarak yeni zincir sentezlenir. Halka yapı bir çok defa dönerek uzun bir doğrusal çift zincirli DNA üretilir. Bu uzun zincir **konkatamer** adını alır. Konkatamerler daha sonra λ genomunun *ter* gen bölgesinin yürüttüğü fonksiyon ile *cos* bölgelerinden birim λ genomlarına parçalanır.



Şekil: a) Dönen halka modeliyle λ DNA replikasyonu, b) retrovirüslerde aracı DNA üzerinden RNA genomunun replikasyonu.

Retrovirüsler insanda AIDS'e neden olan HIV'i (insan immün yetmezlik virüsü) de kapsayan bir grup olup tek zincirli doğrusal RNA genomuna sahiptirler. Virüs insan hücrelerine girdiğinde (büyük çoğunlukla T lenfositlere) kendilerinin kodladığı bir RNA bağımlı DNA polimeraz (revers transkriptaz) ile tek zincirli RNA genomu çift zincirli DNA'ya (cDNA) çevirirler. Bu DNA hücresel genoma integre olur ve genomdan normal transkripsiyon mekanizmasıyla virüsün RNA genomları çoğaltılır (Şekil 4.2b).

1.2 Ökaryotlarda DNA Replikasyonu

DNA replikasyonunun biyokimyası ve moleküler biyolojisi prokaryot ve ökaryotlarda benzerdir. Ancak ökaryotlarda genom birden fazla kromozom içindedir ve histon proteinleriyle kompleks oluşturmuş durumdadır. Replikasyon sırasında bu kompleks açılmalı ve sadece DNA'nın replikasyonu değil aynı zamanda histon sentezi de her hücre döngüsünde gerçekleştirilmelidir. DNA replikasyonu ve kromozom duplikasyonu hücre döngüsünün sentez safhasında gerçekleştirilir.

Eğer her bir insan kromozomunun, tek bir replikasyon orijininin başlanarak replikasyonu gerçekleştirilseydi, 2 kb/sn hızla gerçekleşen bir replikasyon ile yaklaşık

880 saate ihtiyaç duyulurdu (haploit genom büyüklüğü 3 164 000 kb). Halbuki insanda bir çok hücre bundan çok daha hızlı bölünür. Kültüre alınmış insan ve diğer hayvansal hücreler 24 saatte bölünebilirler. *Drosophila*'da replikasyon 3 dakikada tamamlanır (Tablo 4.1). O halde ökaryotlarda replikasyon bir şekilde hızlandırılıyor olmalıdır. Gerçekte ökaryotlarda DNA replikasyonu prokaryotların aksine çok sayıda bölgede başlayabilmektedir (Şekil 4.3). Bu bölgelerde replikasyon orijininin sentez başlar ve çift yönlü olarak devam eder. Yani bir kromozom üzerinde çok sayıda replikasyon orijini vardır. Ökaryotlarda bir replikasyon orijini ile bu orijinin her iki tarafında yer alan terminasyon bölgeleri arasında kalan DNA bölgesi **replikon** veya **replikasyon birimi** olarak adlandırılır. Çok sayıdaki nispeten küçük (kısa) replikonlar replikasyon hızını oldukça artırmaktadır. Prokaryotik genomlar tek bir replikondur.

Tablo 4.1: Ökaryotik ve prokaryotik replikonların sayısı, büyüklük ve hızlarının karşılaştırması (Not: replikon sayısı ve büyüklükleri nisbi olarak verilmiştir. Genomunların gerçek büyüklükleriyle uyumlu olmayabilir).

Organizma	Replikon sayısı	Ortalama büyüklük	Çatal hızı	Gerçek genom büyüklüğü
Bakteri (<i>E. coli</i>)	1	4600 kb	50000 bp/dak	4 600 kb
Maya (<i>S. cerevisiae</i>)	500	40 kb	3600 bp/dak	12 000 kb
<i>D. melanogaster</i>	3500	40 kb	2600 bp/dak	180 000 kb
Kara kurbağası	15000	2000 kb	500 bp/dak	Bitmedi
Fare	25000	150 kb	2200 bp/dak	2 500 000 kb

Şekil 4.3: Ökaryotik kromozomların replikonlarında replikasyonun başlaması ve zamana bağlı olarak ilerlemesi.

Prokaryotlarda olduğu gibi topoizomerazların zincirlerin açılmasında rol aldığı bilinmektedir. Ökaryotlarda beş tip DNA polimeraz vardır: α , β , δ , ϵ ve γ DNA polimeraz. **α ve γ DNA polimerazlar** çekirdekte replikasyondan sorumludurlar (prokaryotik DNA polimeraz III'e benzer). **β DNA polimeraz** DNA tamirinde görev yapar. **γ DNA polimeraz** mitokondrial DNA replikasyonunu gerçekleştirir. α DNA polimeraz aynı zamanda primaz aktivitesine sahiptir. Yanlış düzelme fonksiyonu ise α , δ ve γ DNA polimerazlar tarafından gerçekleştirilir.

1.2.1 Ökaryotlarda kromozomların uçlarının replikasyonu

Doğrusal DNA molekülünün replikasyonu tamamlandığında eğer özel önlem alınmazsa telomer bölgelerinden her yeni molekülün kalıp zincirinin 3' ucundan bir primer kadar (insanda 50-200 bp) DNA kaybolur, kromozom kısalır. Bunun nedeni bu bölgede (uçta) 3'OH ucu sağlanamamasından dolayıdır. Hücrelerde bu kısalmanın önüne geçmek için geçici önlemler alınmıştır. Kromozomların uçlarında yani telomerlerde peşpeşe tekrarlayan diziler vardır. Bu diziler **telomeraz enzim sistemi** tarafından telomerlere eklenir. Telomeraz aktivitesi doğrudan replikasyonla ilişkili değildir.

İnsanda telomeraz normal doku hücrelerinde aktif değildir. Embriyonik safhada farklılaşmaya paralel olarak telomeraz aktivitesi de azalır. Telomeraz aktivitesi sonlanana kadar geçen süre içinde, yani erken embriyonik safhalarda telomer bölgelerine tekrarlayan diziler eklenir. Bu tekrarlayan diziler gelişme ve erginlik safhasında kromozomların kısalmasının telomer bölgelerindeki tekrarlayan diziler içinde kalmasını sağlar. Telomer bölgeleri belli bir sınıra kadar kısalduğunda o hücre artık bölünmez, gen ekspresyonu değişir, bu değişim çevre dokuları etkiler ve dokunun yaşlanmasına neden olur. Kanser hücrelerinde telomeraz aktiviteleriyle telomer bölgelerine tekrarlayan dizilerin eklendiği ve kanser hücrelerinin ölümsüzlük özelliğinin sağlandığına yönelik veriler mevcuttur.