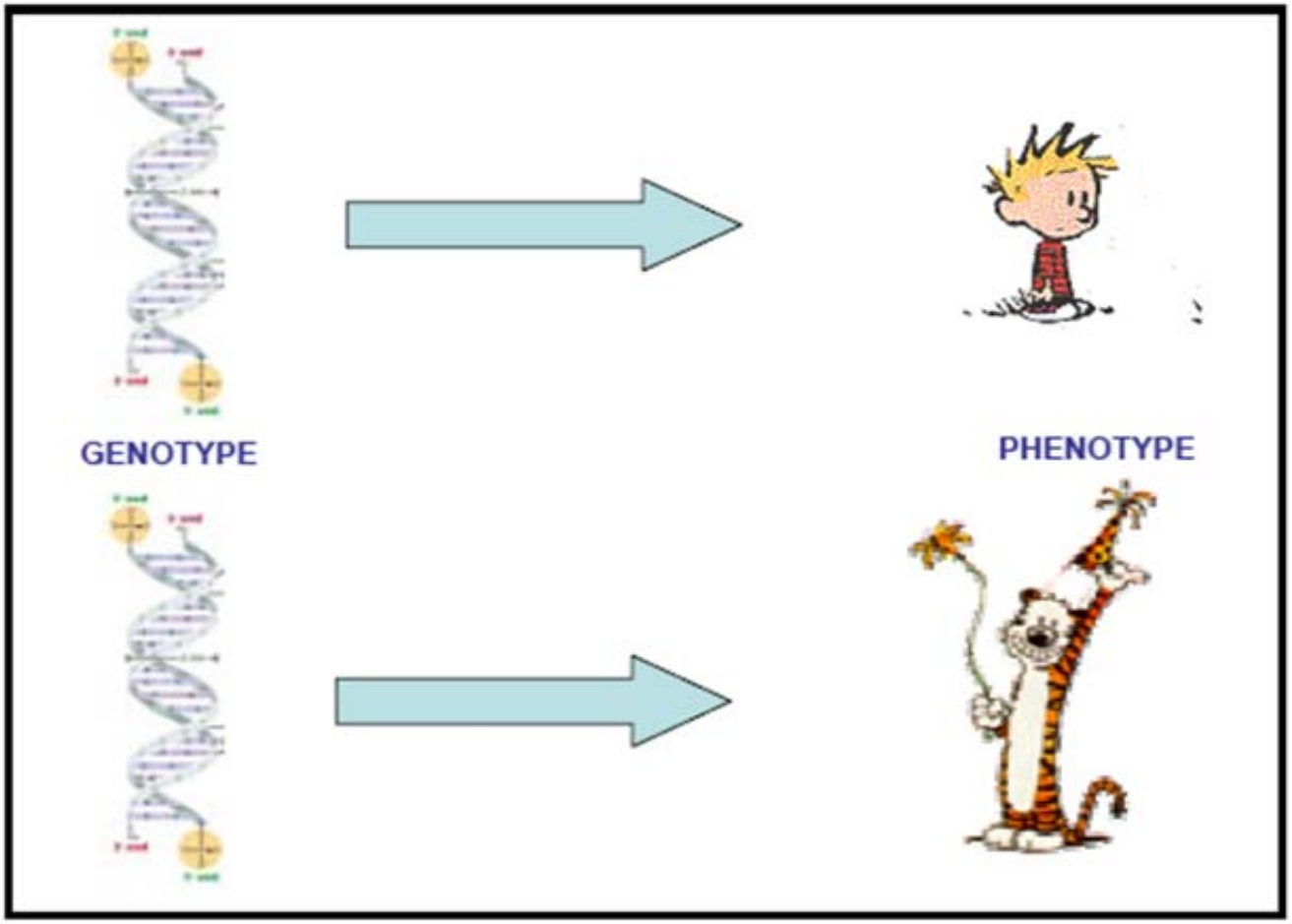
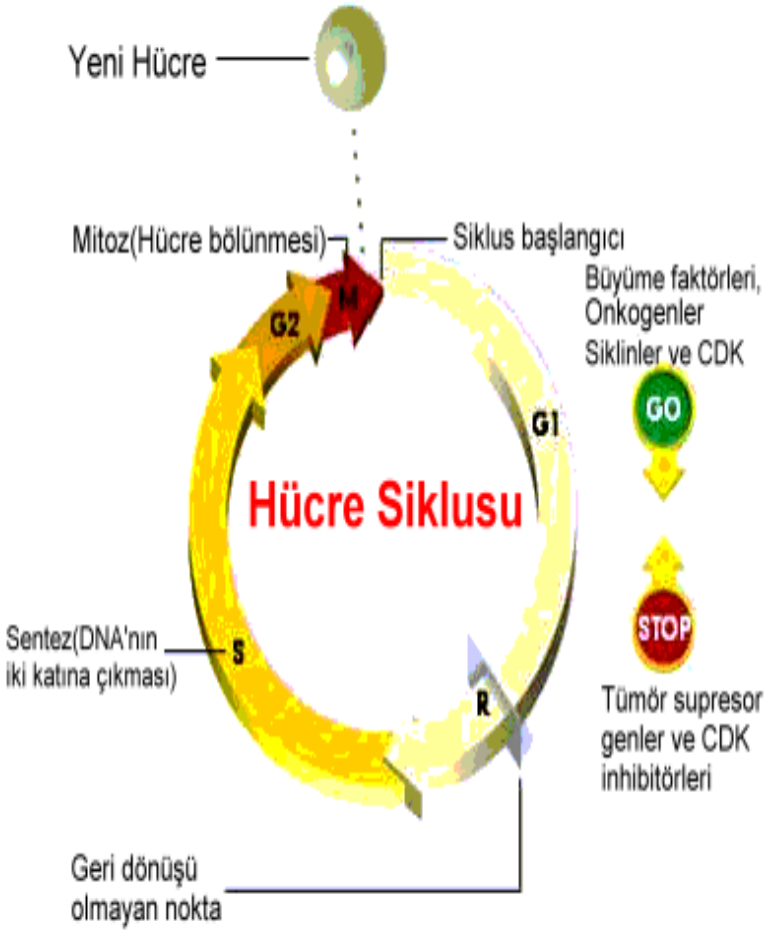
DNA REPLİKASYONU

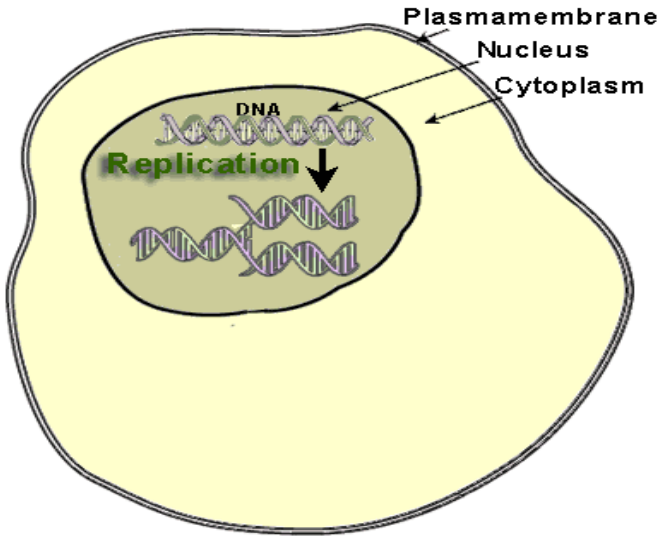

GENOTYPE
PHENOTYPE

Hücre Neden DNA sını Replike Eder?
ÇÜNKİ
Mitoz Bölünmenin Gerçekleşmesi İçin S Evresinde DNA nın 2 Katına Çıkması Gerekmektedir

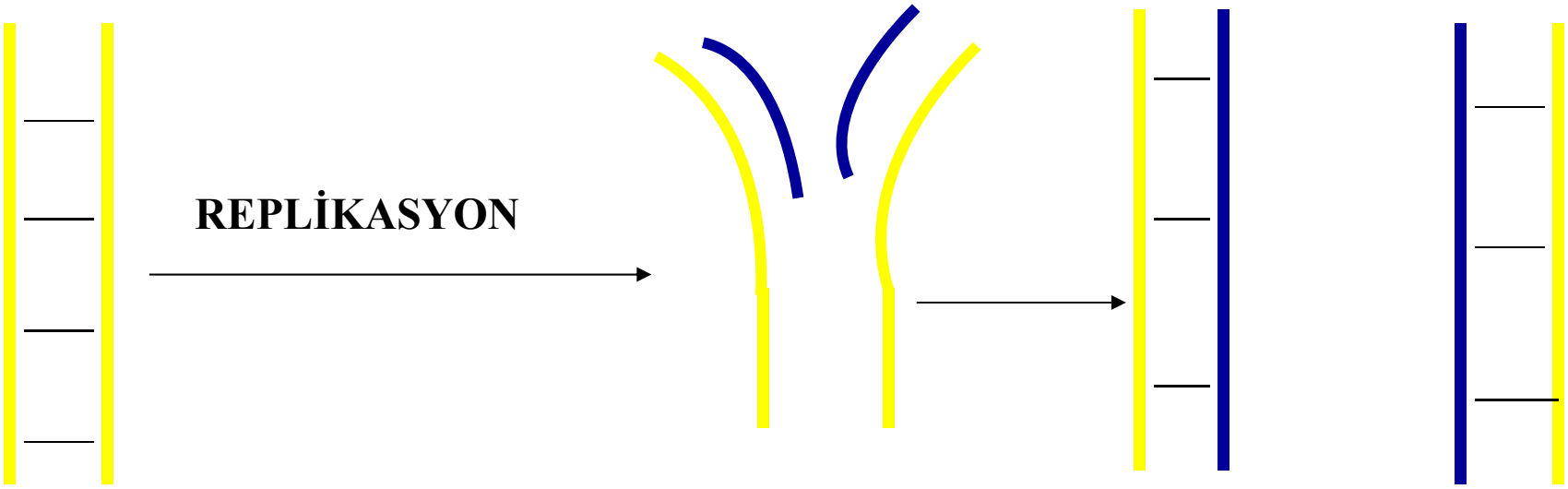


- ***Hücre yaşam döngüsü G_1, S, G_2 , Mitoz,evreleri ile tamamlar.***
- ***G_1*** *(2n)* replikasyonun yapılmasına hazırlık oluşturan metabolik olaylar.,RNA ve protein sentezi
- ***S*** *(2n→4n)* DNA replikasyonu
- ***G_2*** *(4n)* mitoz bölünmeye hazırlık oluşturan metabolik olaylar
- ***M*** *(4n→2n)* mitoz bölünme
- **G_0** farklılaşmasını tamamlamış hücrelerin dinlenme evresi
- ***Her hücre bölünmesinde DNA replikasyonu olur.***

DNA'nın Kendini Eşlemesi- Replikasyon

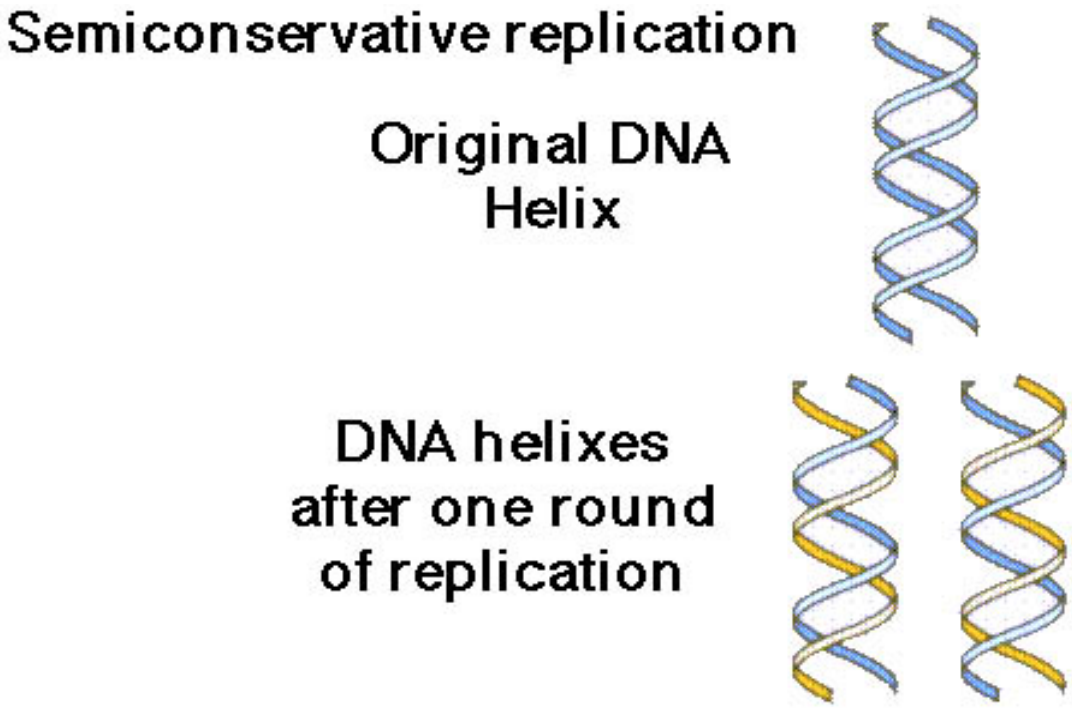


- DNA kendini eşlerken fermuar şeklinde açılır ve stoplazmadan alınan nükleotidler kalıp DNA ya bağlanarak YENİ ipliği oluştururlar.
- Böylece genetik şifrenin değişmediği iki DNA oluşur
-



➢DNA'nın replikasyonu ***semikonservatifdir***

➢ Yani bir DNA molekülünün iki kolundan her biri yeni bir DNA sentezi için kalıp olarak görev alır ve sonuçta meydana gelen ***iki yeni DNA molekülü yeni ve eski kollar içerirler***



- 3 milyar bazın hata olmadan 2 katına çıkarılması son derece doğru bir mekanizma ile olmalıdır.
- Milyonda bir hata oranı bile her bir replikasyon döngüsünde 3 bin hata demektir ve buda çok büyük bir rakamdır
- Hatalar ***DNA Tamir Mekanizmaları*** ile onarılır, onarılmazsa **mutasyonlar** meydana gelir.

Replikasyonun Gerçekleşebilmesi İçin;

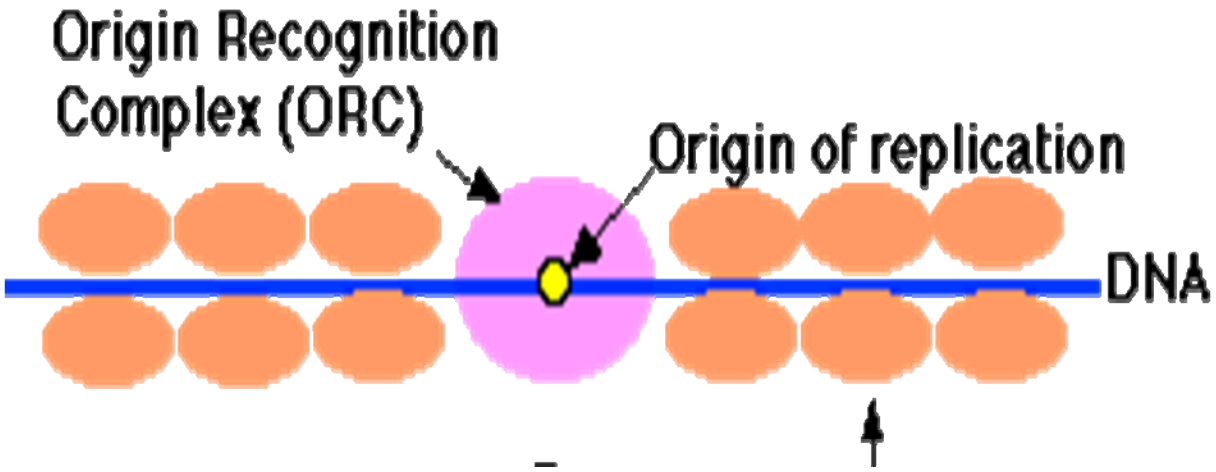
- *Kalıp DNA*
- *Deoksinükleosittrifosfatlar (dNTP)*
- *Replikasyon enzimlerine ihtiyaç vardır*

DNA Replikasyon Mekanizması

Hem prokaryotik hemde ökaryotik hücrelerde replikasyonun temel mekanizmaları aynıdır.

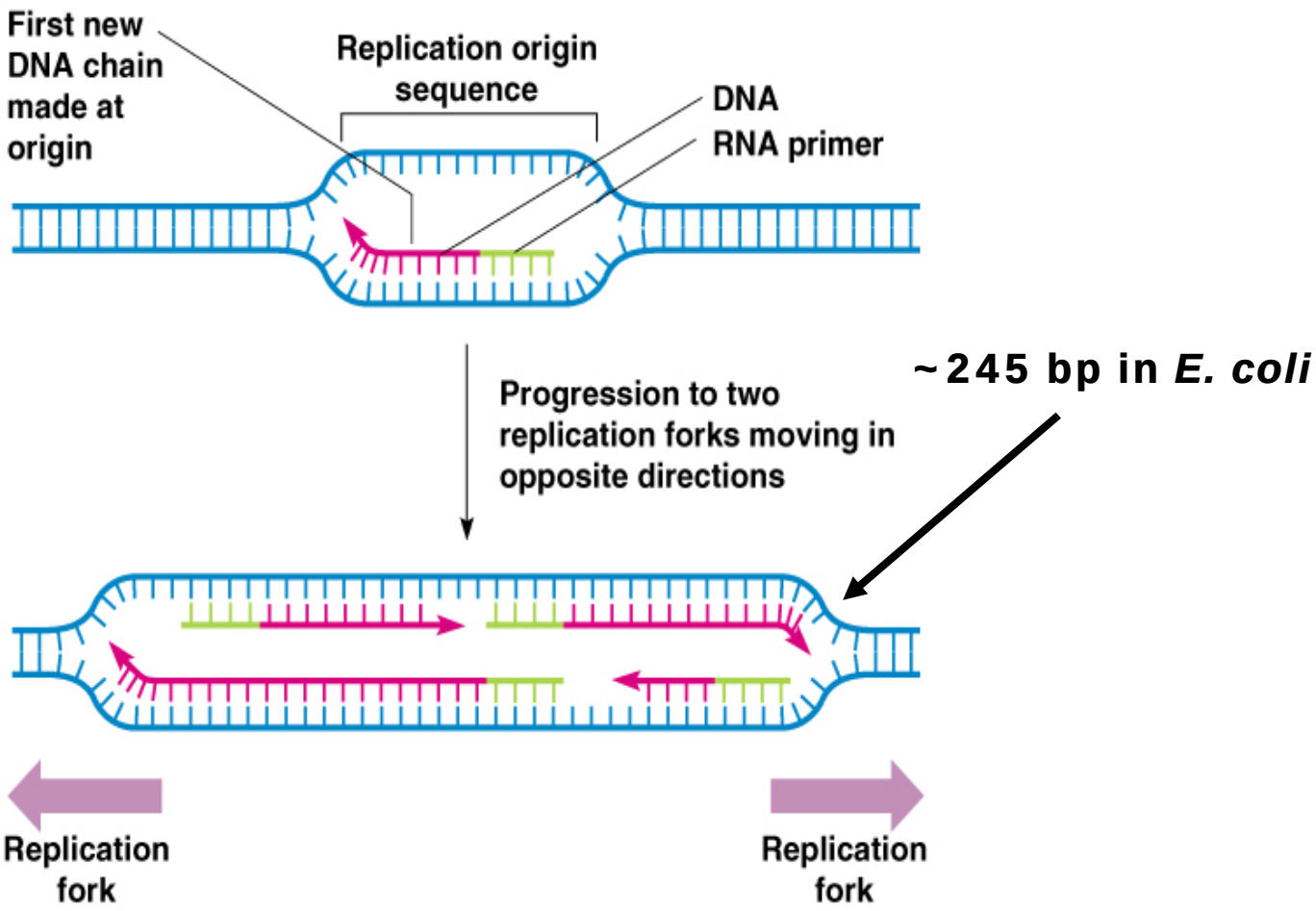
1. Replikasyon başlangıç noktalarının tayini
2. DNA çift ipliğinin çözünmesi
3. Replikasyon çatalının oluşması

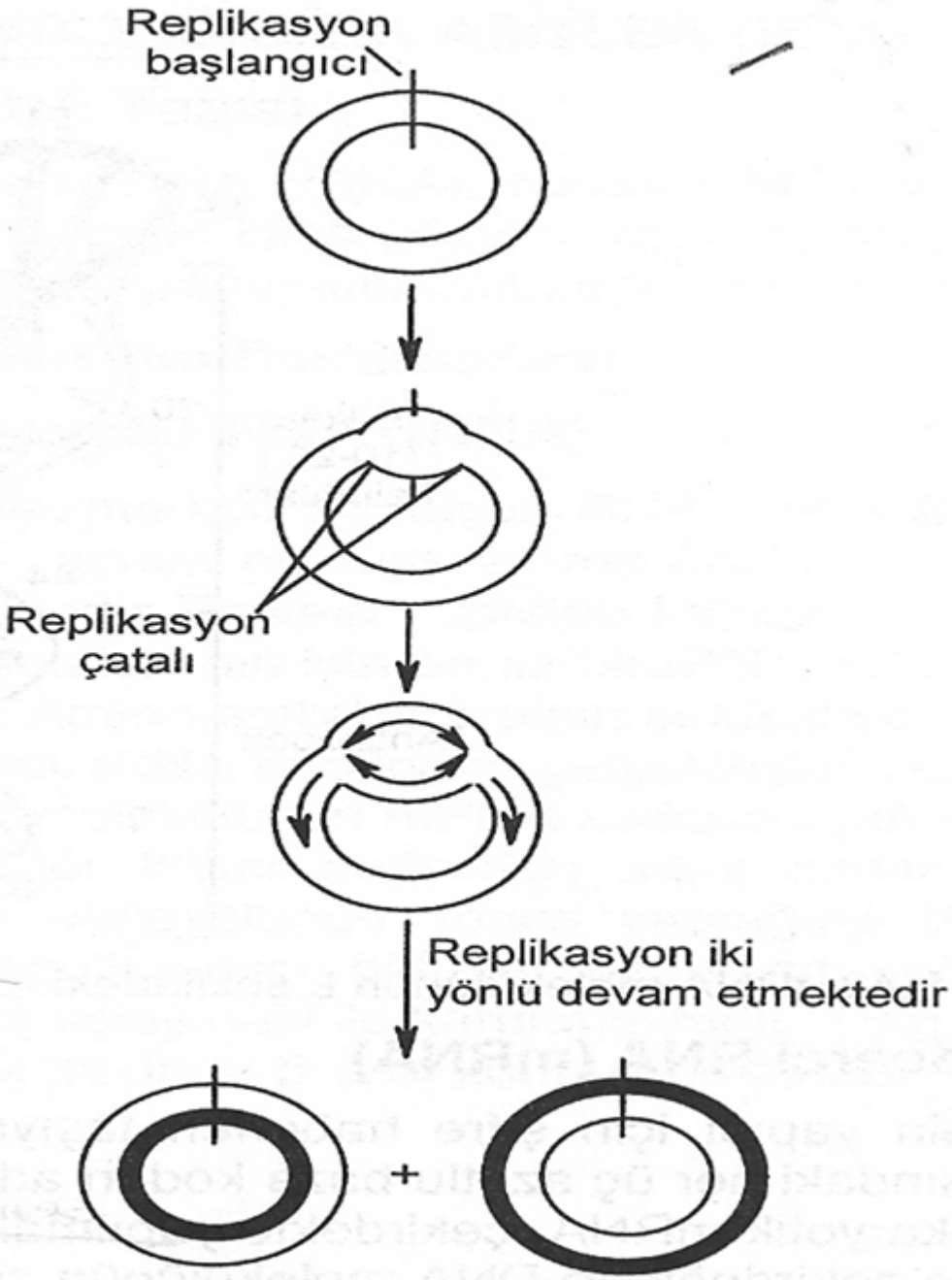
- Replikasyonun gerçekleştiği genom birimine **replikon** denir.
- Her replikonda bir başlangıç ve bir bitiş noktası vardır.
- Prokaryotlarda çembersel DNA da bir başlangıç ve bir bitiş noktası,
- Ökaryotik hücrede ise çok sayıda başlangıç ve bitiş noktaları vardır.
- **Başlangıç noktaları** özel nukleotid dizilerinden oluşur (A ve T den zengin tekrarlayan nukleotid dizileri) ve "**diziye özel olan DNA ya bağlanan proteinler = başlatıcı proteinler"** tarafından tanınır.
- Bu proteinlerin başlangıç noktalarına bağlanması ile replikasyonun ilk adımı atılır.



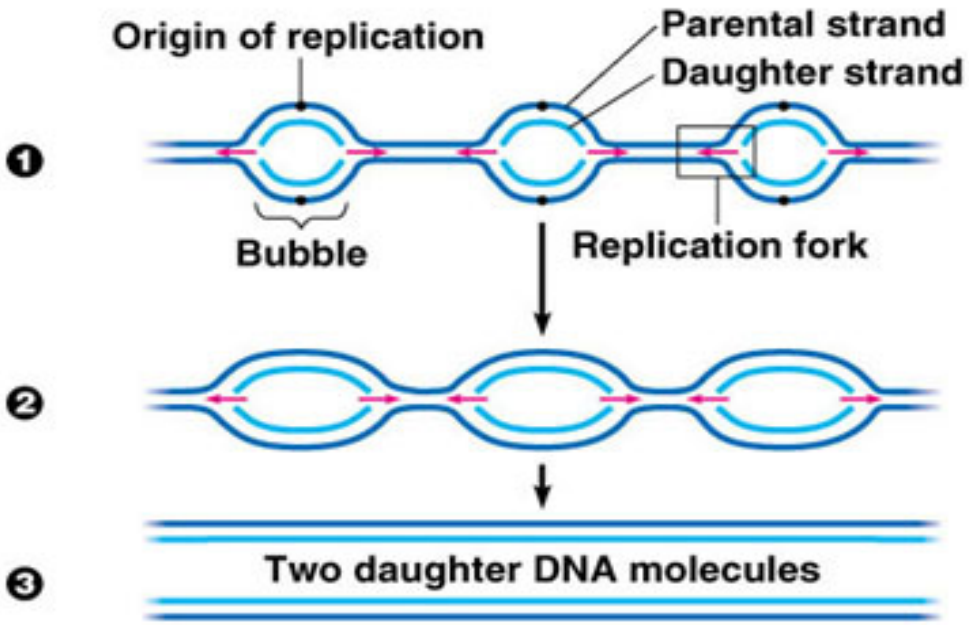
Replikasyon orijini (prokaryotik):

- ✓ **Replikasyon iki yönlü olarak devam eder.**

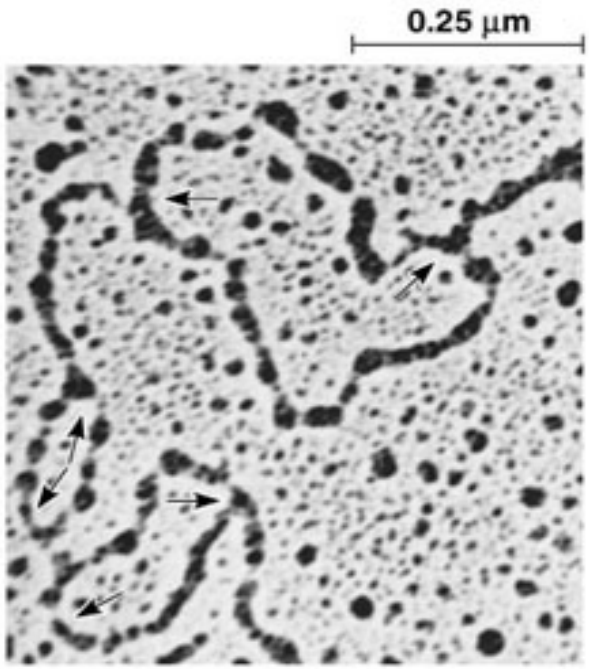



Replikasyon
başlangıcı
Replikasyon
çatalı
Replikasyon iki
yönlü devam etmektedir
+

Replikasyon orijini (ökaryotik):



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

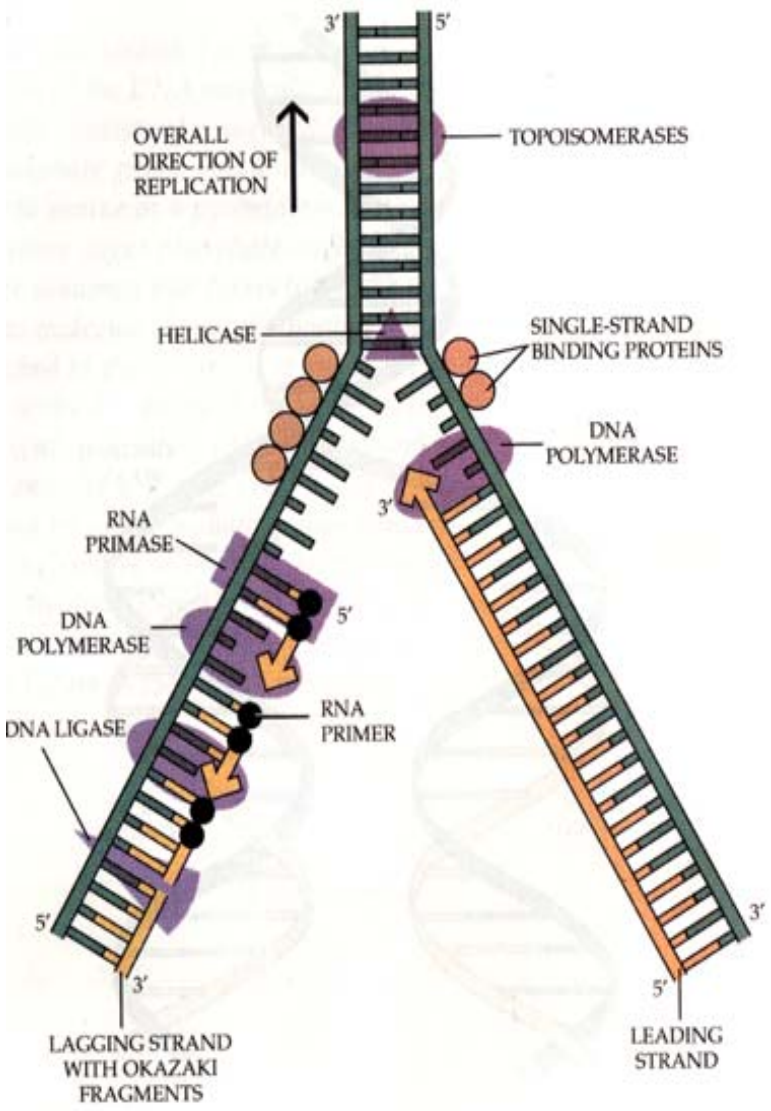


(b) In this micrograph, three replication bubbles are visible along the DNA of cultured Chinese hamster cells. The arrows indicate the direction of DNA replication at the two ends of each bubble (TEM).

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

- ***<u>Ökaryotik hücrede;</u>***

- DNA replikasyonu, kromatin üzerinde binlerce yerde birden (replikasyon çatalı) başlayan sentez daima ***5′ → 3′ yönünde*** ilerler; kalıp olarak görev gören kol ***3′ → 5′ yönünde*** okunur

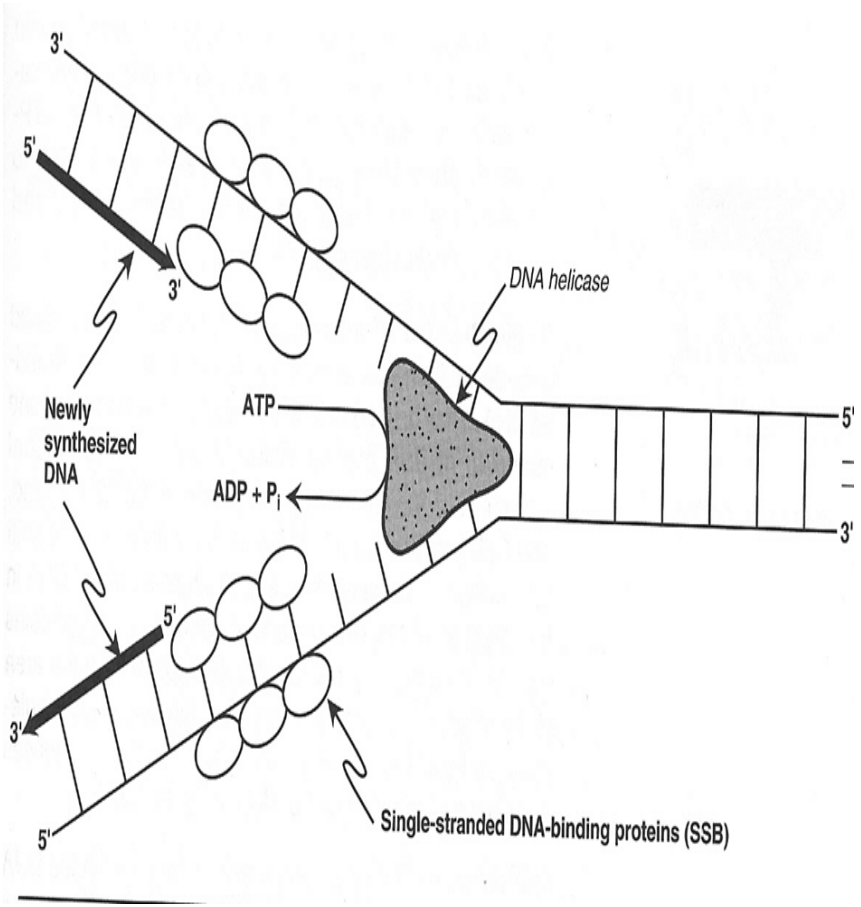


Sentezin başladığı Replikasyon çatalında replikasyonda iş gören 4 temel yapı vardır;

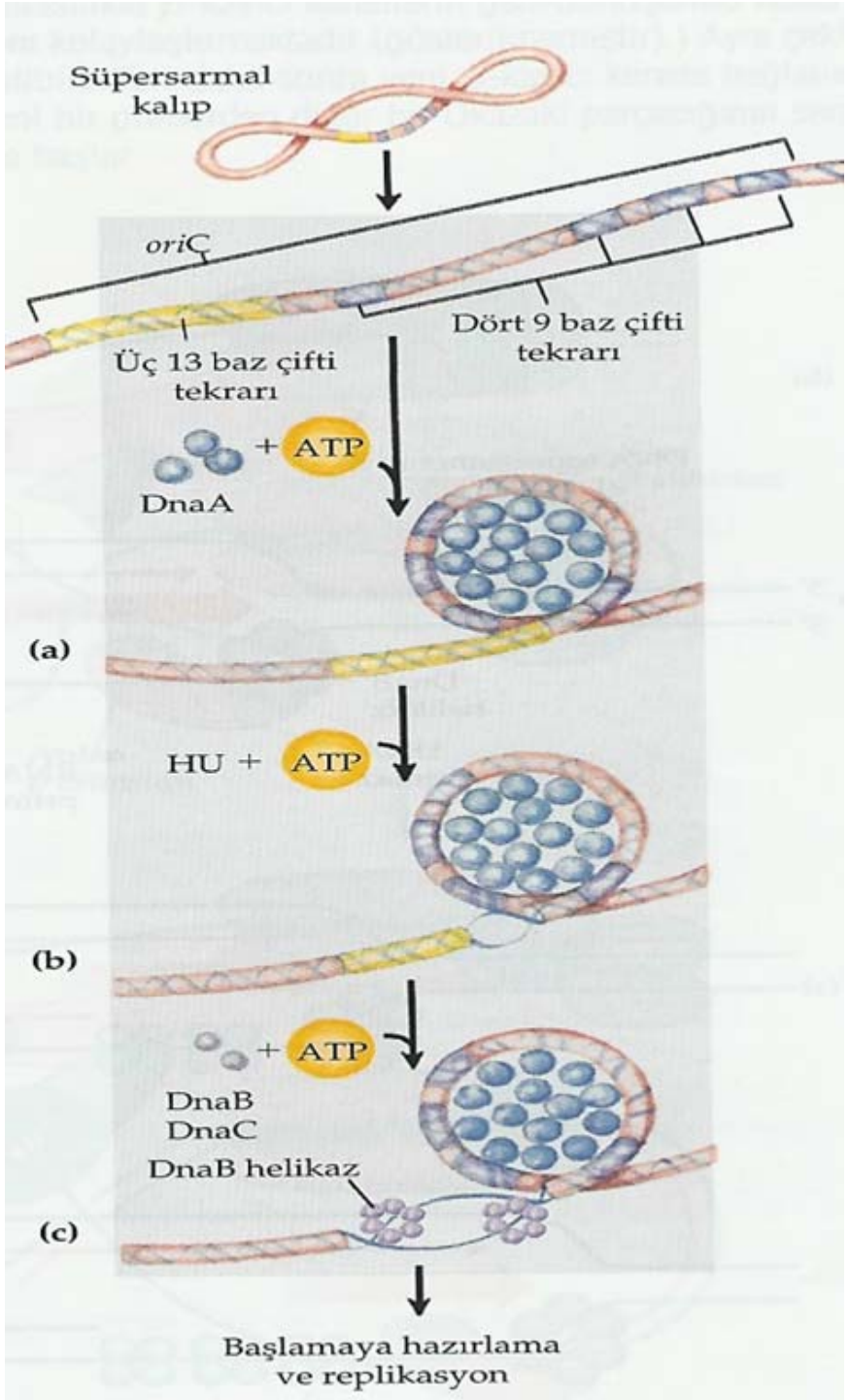
- **DNA helikaz**, DNA sarmalını çözen enzim
- **Primaz,** DNA sentezinin başlıyabilmesi için gerekli olan RNA primerlerini (RNA öncül molekül) sentezleyen enzim
- **DNA Polimerazlar,** kalıp zincire komplamenter yeni DNA zincirini sentezleyen enzim
- **Tek zincire bağlanan (SSB) proteinler,** replikasyon çatalının sürekliliğini saglayan ,tek DNA ipliğine bağlanarak katlanmayı önleyen proteinler

Replikasyonun başlaması

- Sentezin başladığı bölgede iki zincir, birbirinden ayrılarak, **replikasyon çatalı**'nı oluşturur.
- **DNA helikaz,çift sarmal DNA zincirlerini birbirinden ATP harcıyarak ayırır.**

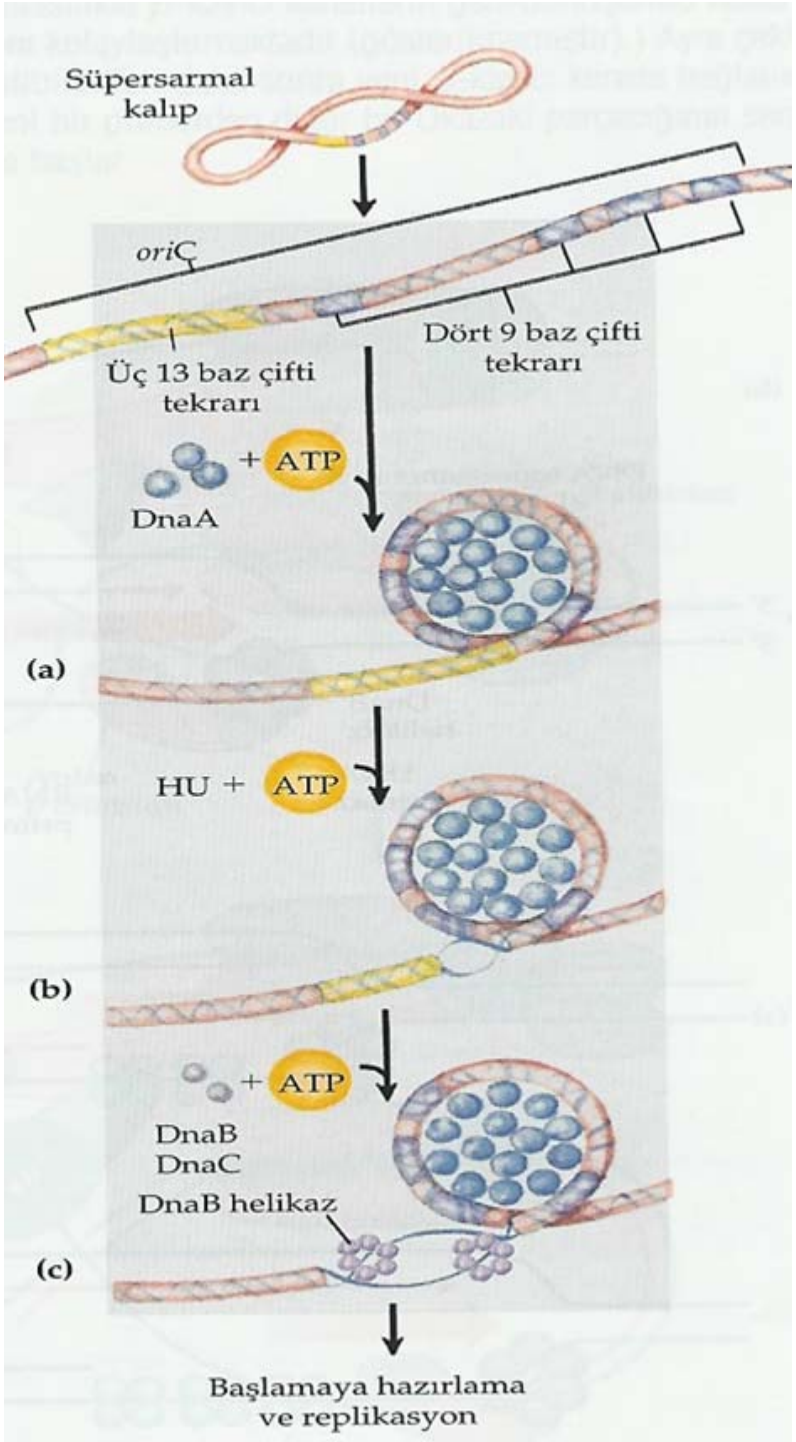


- Replikasyon merkezindeki, ori C olarak tanımlanan kısmındaki 9 baz çiftinin dört kez tekrarlanan bölgesine 20 tane **DNA-A proteini**,histon benzeri protein(HU) varlığında ve ATP tüketilerek bağlanmaktadır.
- **DNA-A proteini etrafında katlanan DNA, denatüre olur.**
-



- **DNA-C proteini** ve ATP gerektiren bir tepkime ile 13 baz çiftinin üç kez tekrarlandığı A=T çiftince zengin bölgeye bağlanır.

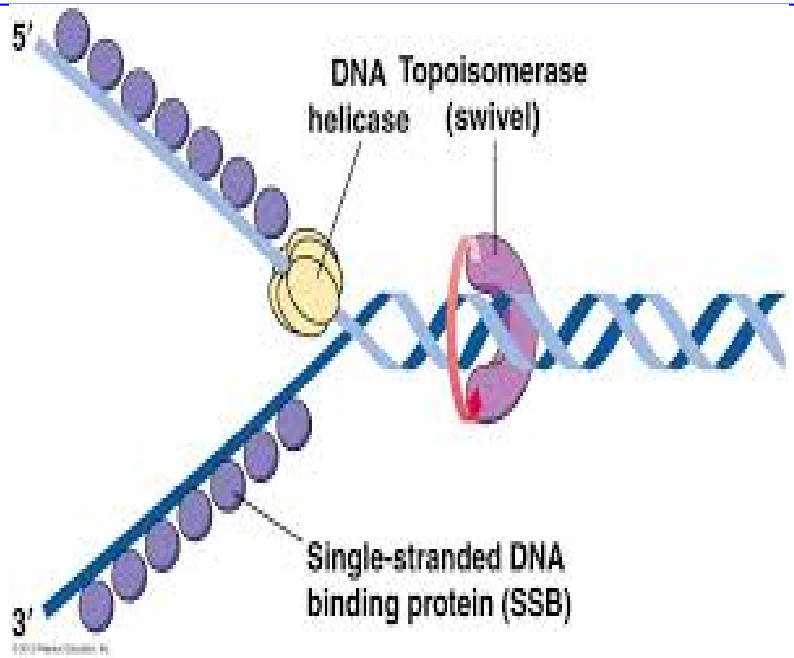
- **DNA-B proteini**, DNA çift zincirini iki tane replikasyon çatalı olacak şekilde açar.



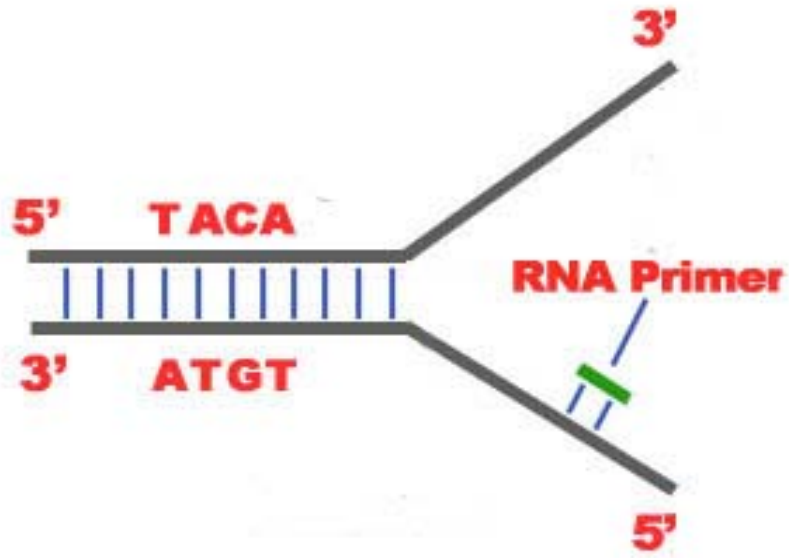
➢Açılan DNA zincirlerinin tekrar birleşmesini engelleyen ***tek zincir ((SSB) Single Stranded DNA Binding Protein) bağlayıcı proteinleri*** bağlanır. Böylece tek zincirin kopyalanmaya hazırlanır.

➢SSB ler DNA molekülünü, tek zinciri parçalayan nükleaz enziminin etkisinden de korururlar.

➢Zincirler açılırken oluşan süper sarmallar ***DNA topoizomerazlar enzimi ile*** *çentiklenir ve yeniden kapatılır*

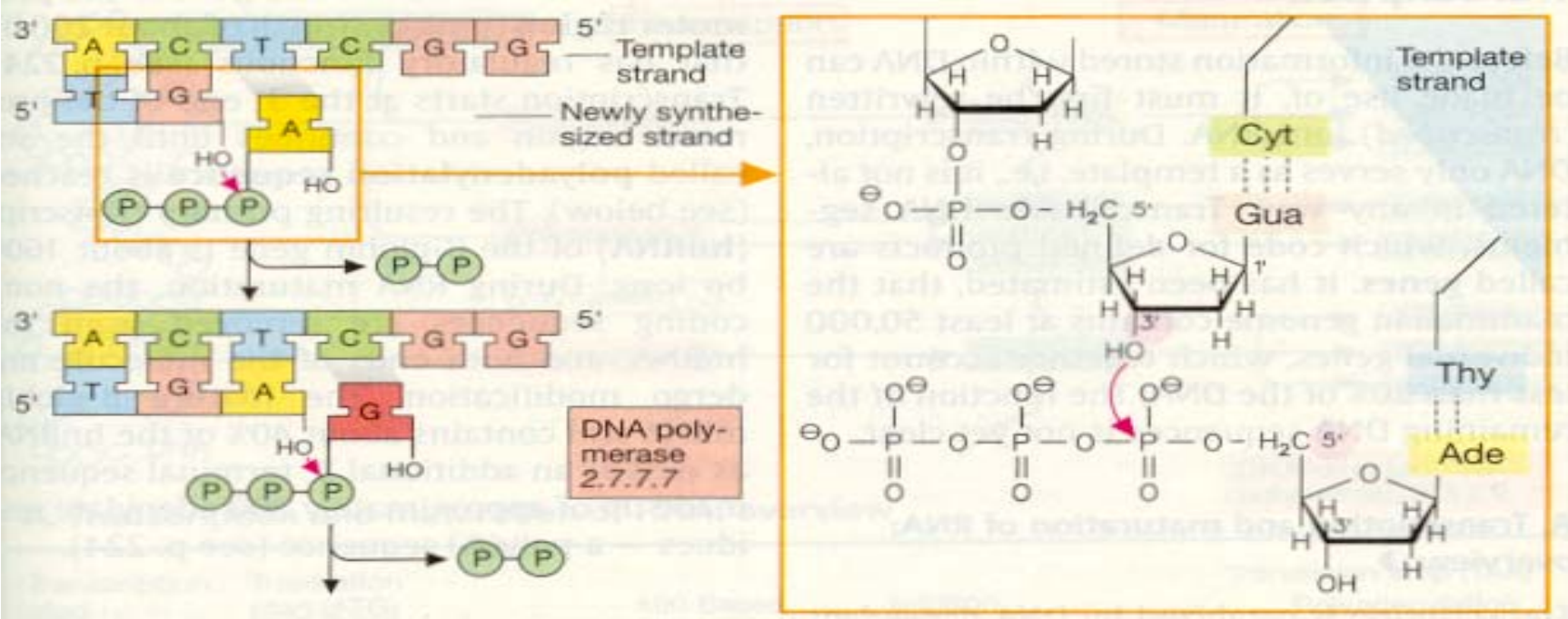


- Daha sonra **primaz enzimi** ((DNA G proteini): RNA polimeraz), kalıp DNA'da özel bir bölgeye komplementer olan **primer RNA veya öncü RNA** denen kısa bir RNA dizisini sentezler

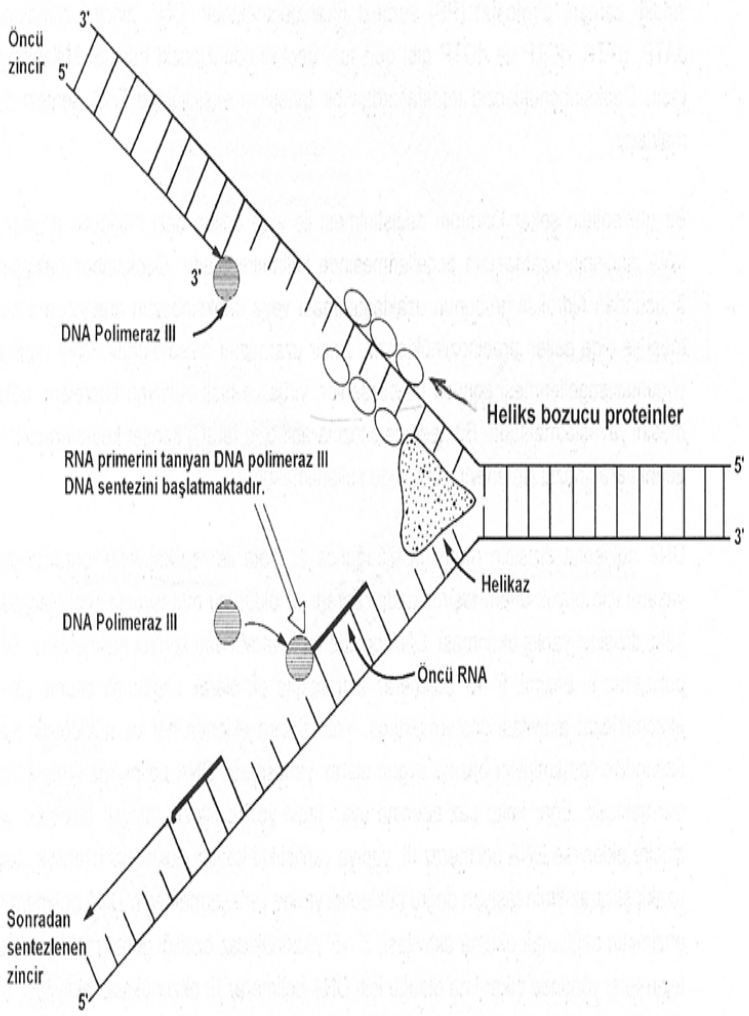


ZİNCİRİN UZAMASI

- **DNA polimeraz ana zincir nükleotid dizisini, sadece 3’ 5’ yönünde okuyabilir yeni DNA zincirini,5’ 3’ yönünde sentezler**
- Primerin bağlanmasından sonra ***DNA polimeraz III enzimi kalıp DNA boyunca*** dNTP’de d-ribozun 5’ karbonuna bağlı fosfat grubunu diğer d-ribozun 3’-OH grubuna kovalent bağla bağlarlar.
- Böylece zincir uzaması 5’-----3’ yönünde devam eder.

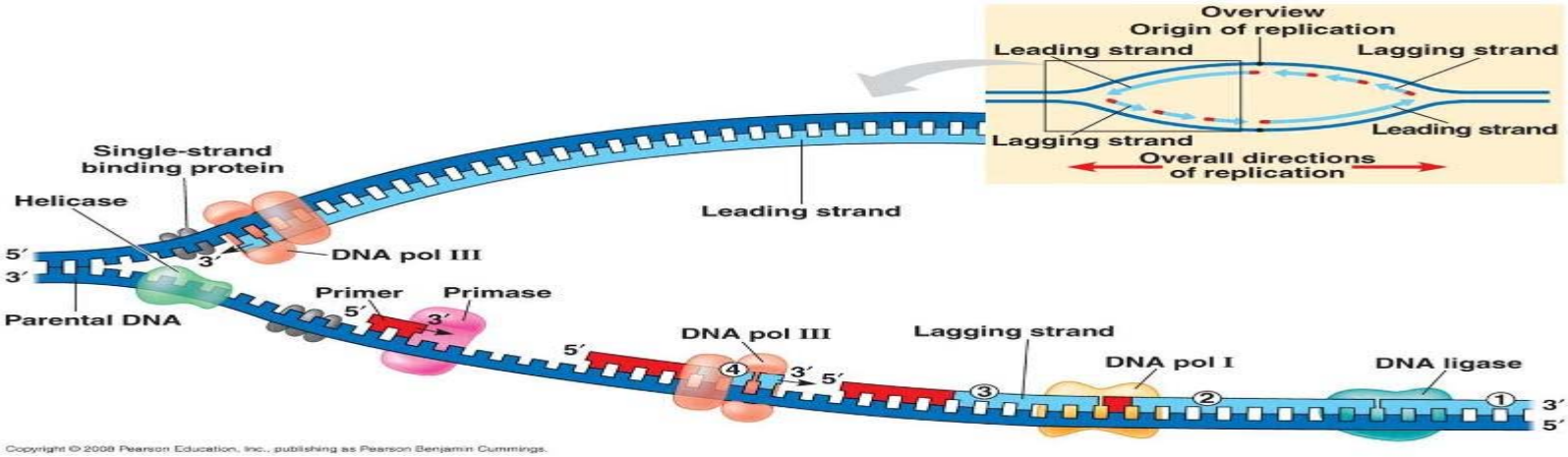


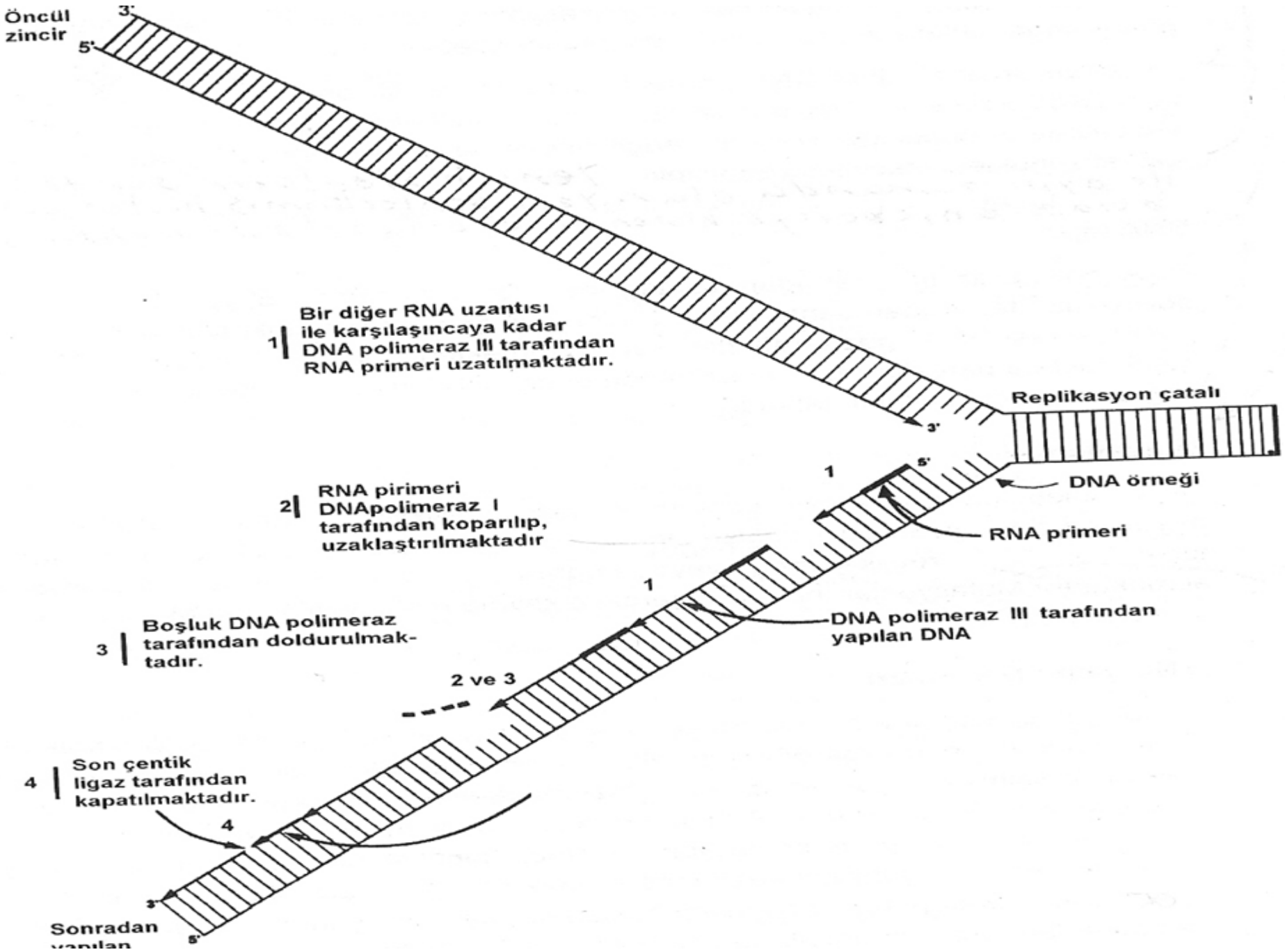
- DNA molekülü birbirize zıt yönde paralel iki zincir içerdiginden (biri 5’ ⟶ 3’ diğeri 3’ ⟶ 5’) her 2 zincirde sentezin aynı anda ve devamlı olarak ilerlemesi mümkün değildir. O yüzden **iki farklı sentez tipi** ortaya çıkar.
- Biri ***kesintisiz zincir (leading strand - 3’ ⟶ 5´ kalıbına uygun sentez)***
- devamlı kesintisiz olarak sentezlenirken diğeri ***kesintili zincir (lagging strand -5´ ⟶ 3´ kalıbına göre yapılan sentez)*** 1000-2000 nt uzunluğundaki fragmentler halinde *sentezlenir*.
- Bu küçük polinükleotid parçalarına ***okazaki fragmentleri-parçaları*** denir; bunlar, DNA replikasyonunda ara ürünlerdir



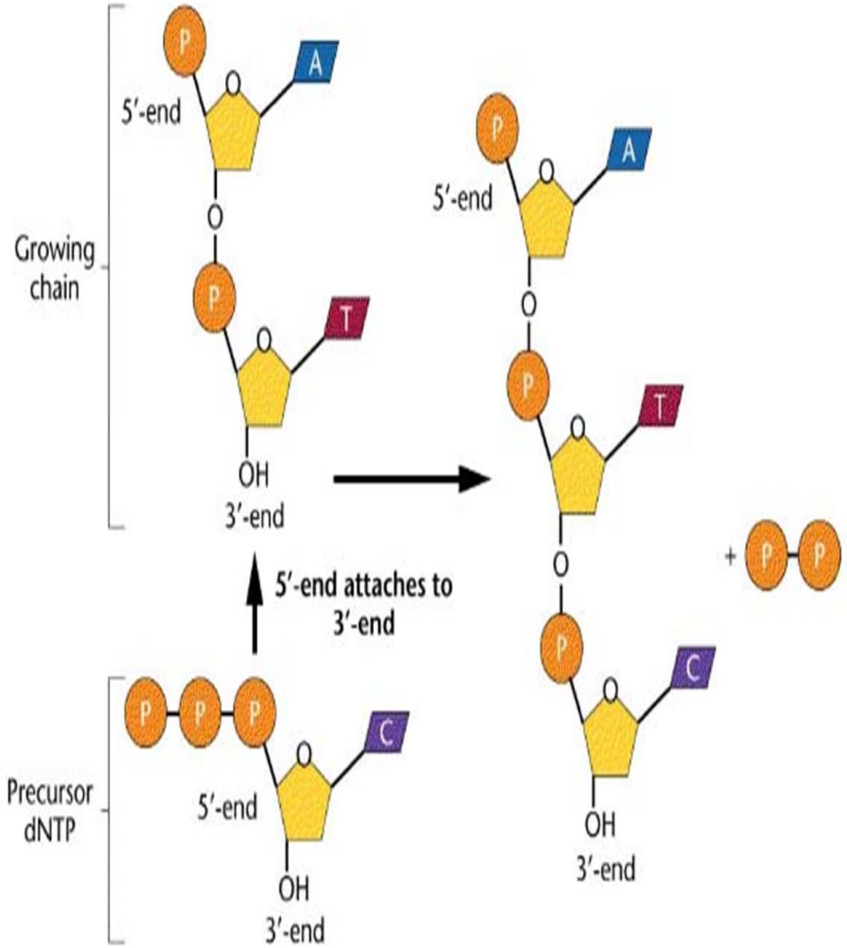
Şekil 8.47. DNA polimerazların artçıl zincir sentez edebilmeleri için 3' ucu serbest kısa bir zincir ola primer gereklidir.

- **DNA polimeraz III sentezi**, yeni bir öncü RNA ile karşılaşıncaya kadar devam eder.
- Öncü RNA molekülüne gelindiğinde, DNA polimeraz I ile RNA çıkarılarak DNA polimeraz I ile boşluk doldurulur
- DNA polimeraz III tarafından sentezlenen DNA zincirinde, 5’ fosfat grubu ile DNA polimeraz I tarafından sentezlenen DNA’ nın 3’ hidroksil grubu arasındaki son fosfodiester bağının oluşması, **DNA ligaz** tarafından katalizlenmektedir.



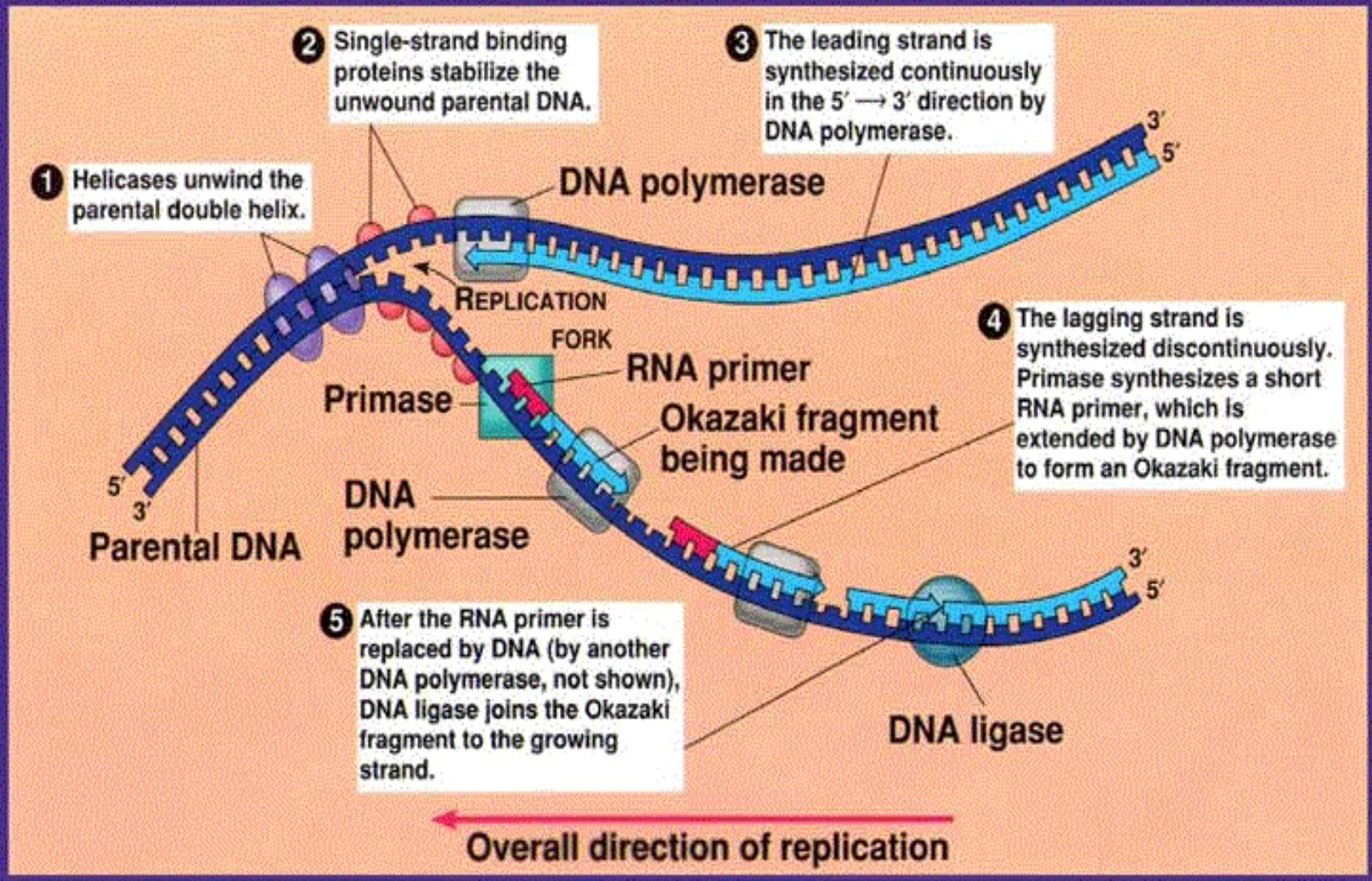

Öncül zincir
3'
5'
1
Bir diğer RNA uzantısı ile karşılaşıncaya kadar DNA polimeraz III tarafından RNA primeri uzatılmaktadır.
Replikasyon çatalı
3'
5'
1
DNA örneği
2
RNA pirimeri DNApolimeraz I tarafından koparılıp, uzaklaştırılmaktadır
RNA primeri
1
DNA polimeraz III tarafından yapılan DNA
3
Boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulmaktadır.
2 ve 3
4
Son çentik ligaz tarafından kapatılmaktadır.
4
3'
5'
Sonradan yapılan

- ***DNA polimeraz III*** , her bir nükleotidin kalıp üzerindeki tamalayıcı bazına uygun olarak, yeni zincire eklenmesini kontrol eder.
- Eğer kalıp bazdaki örn. A karşısına T gelmesi gerekirken C geldiyse DNA polimeraz III, yapıya yanlışlıkla katılan nükleotidi **hidrolitik** olarak uzaklaştırarak, T taşıyan doğru nükleotidi yerine yerleştirir.



- DNA replike oldukça yeni sentezlenen histonlar ile kromatin şeklinde yeniden düzenlenir.
- S fazı boyunca aynı kromozomun farklı bölgeleri farklı zamanlarda replike olur.
- Heterokromatin geç S fazında replikasyona uğrar
- Ökromatin erken S fazında replikasyona uğrar

A SUMMARY OF DNA REPLICATION



In vitro DNA AMPLİFİKASYONU

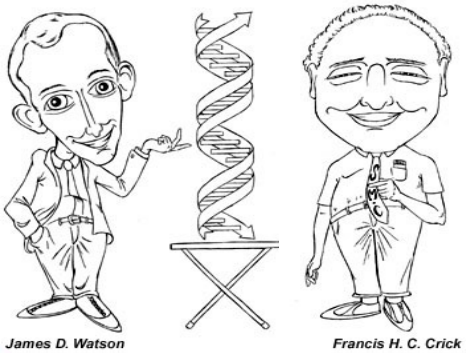
PCR

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gregor Mendel

1866

.Bitkilerde kalıtımın esasları



James D. Watson

Francis H. C. Crick

1953

DNA nın kimyasal yapısı

1957

Kornberg: test tüpünde DNA.

1963 *Sanger :sekans prosüdürü.*

1972 *Berg:ilk recombinat DNA molekülü.*

1966

Genetik kod

	U	C	A	G
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys
	UUA Leu	UCA Ser	UAA End	UGA End
	UUG Leu	UCG Ser	UAG End	UGG Trp
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

Genetic Code

ilk konvansiyonel DNA bazlı deneyler

1980s

PCR

1990s

İlk gen tedavileri

Genetik gıda mühendisliği

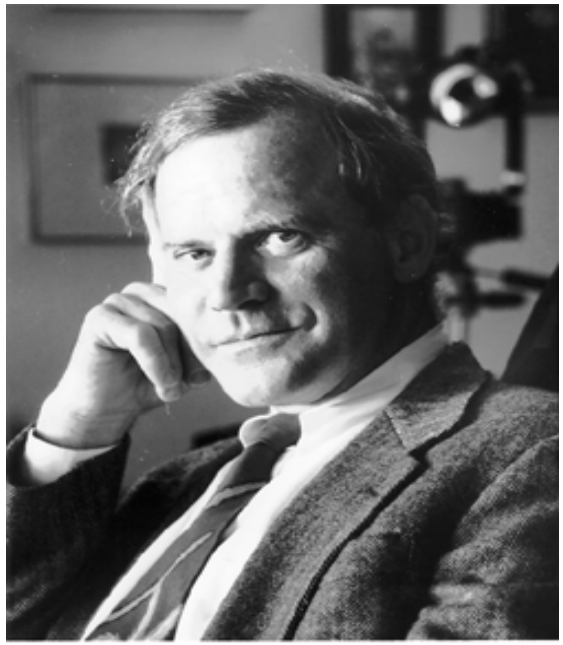
'Dolly'

Dolly the Sheep

2000

insan genomunun sekanslanması

- ABD'de Cetus şirketin'de çalisan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiş ve K.Mullis' a, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü verilmiş.
-



Kary Mullis c1983

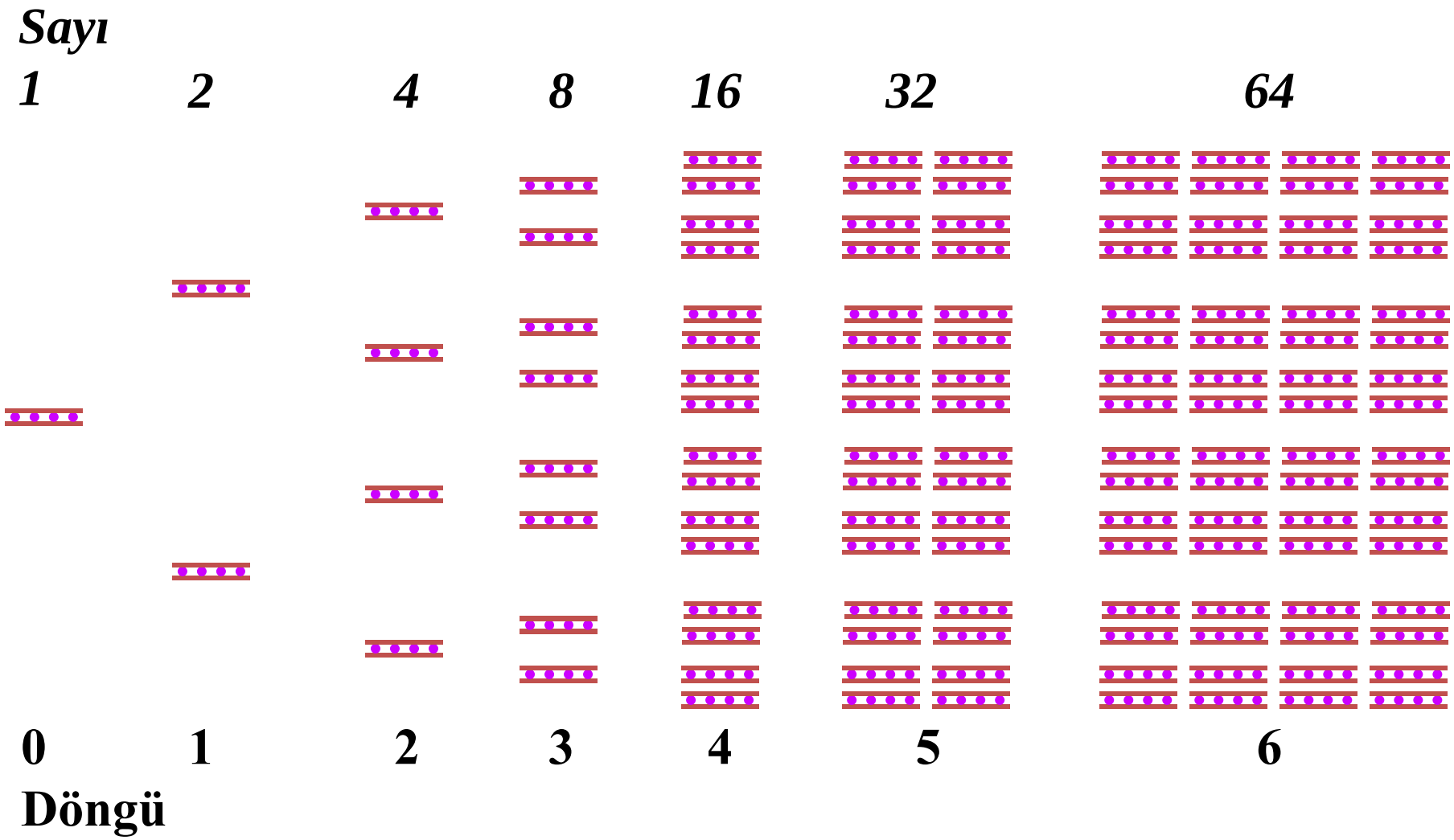
http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1993/mullis-autobio.html

PCR

- PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi in vitro koşullarda amplifiye etmek için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isim.

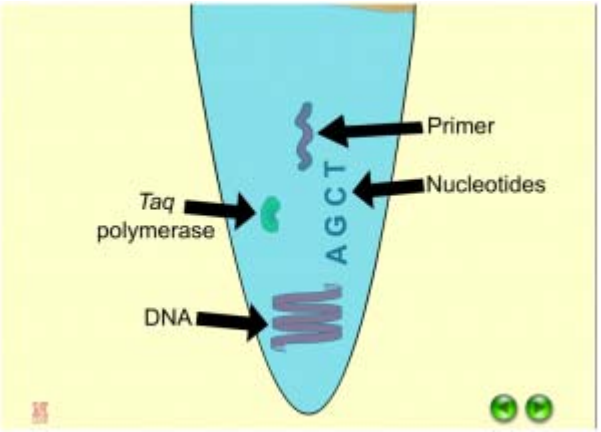
- Yöntem basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır.

Her Bir Isı Döngüsünde Oluşan Kopya Sayısı



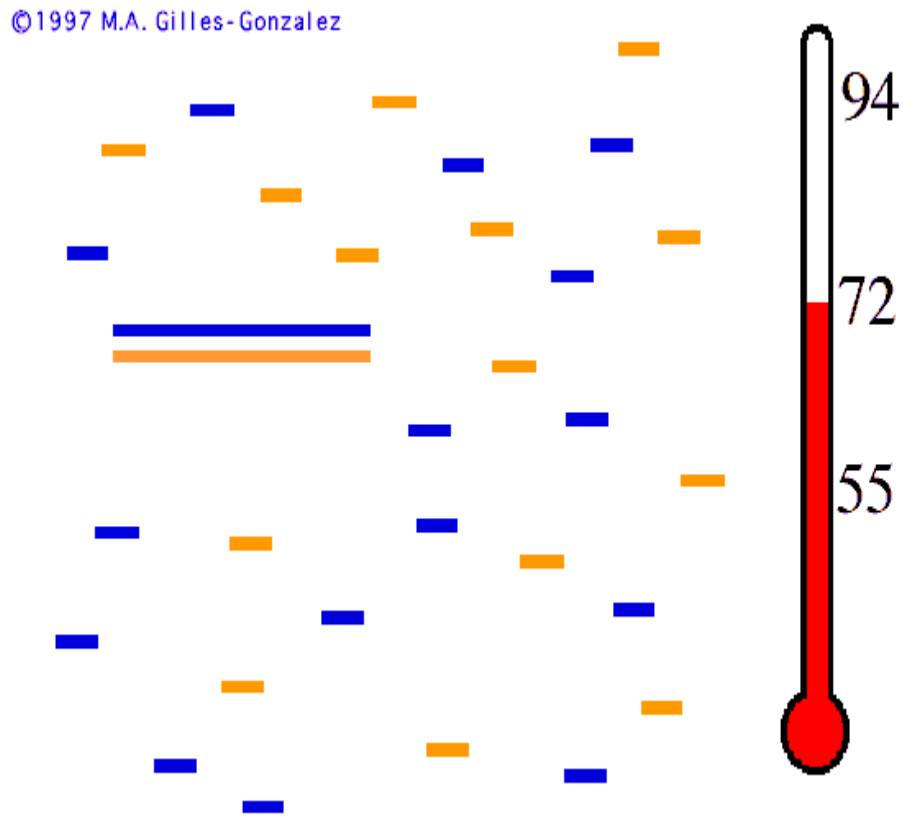
PCR için

1) DNA örneği, genelde **genomik DNA,**
2) Çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen **bir çift sentetik primer,**
3) **dNTP'ler (A,T,C,G),**
4) Isıya dayanıklı **DNA-Polimeraz enzimi**,
5) Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg+2) sağlayan **tampon** karışımı gereklidir.



PCR'da her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir

- Denatürasyon: 94-98 C
- Hibridizasyon: 37-65 C
- Polimerizasyon: 72 C

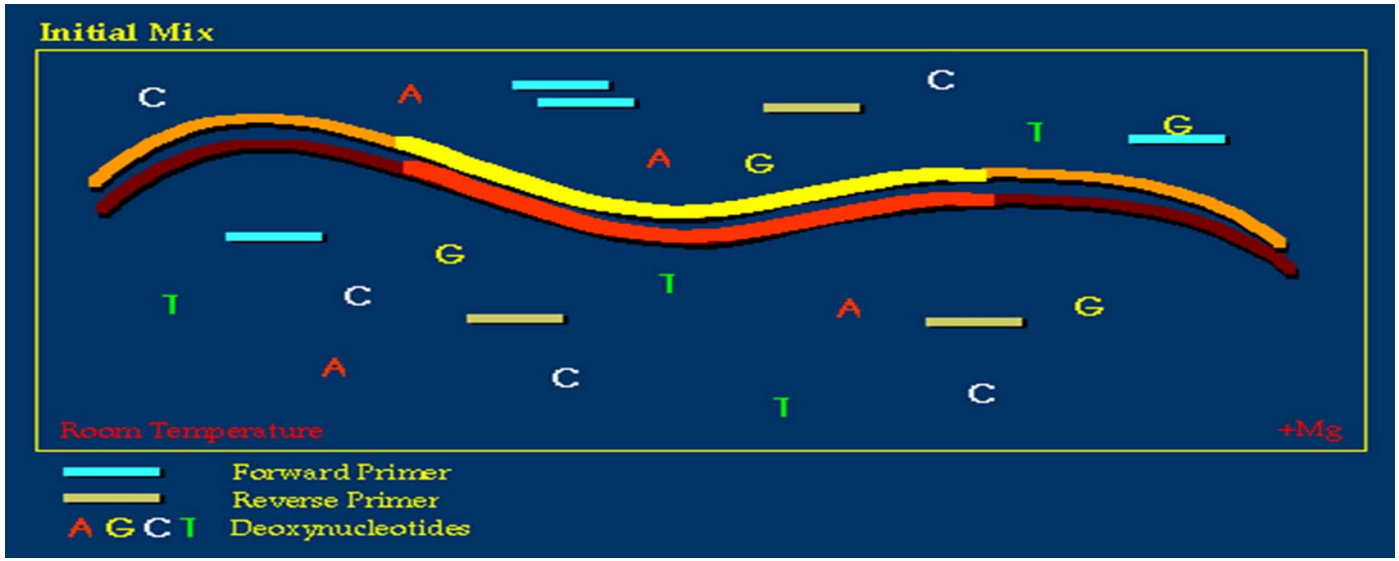


PCR

- PCR adımları

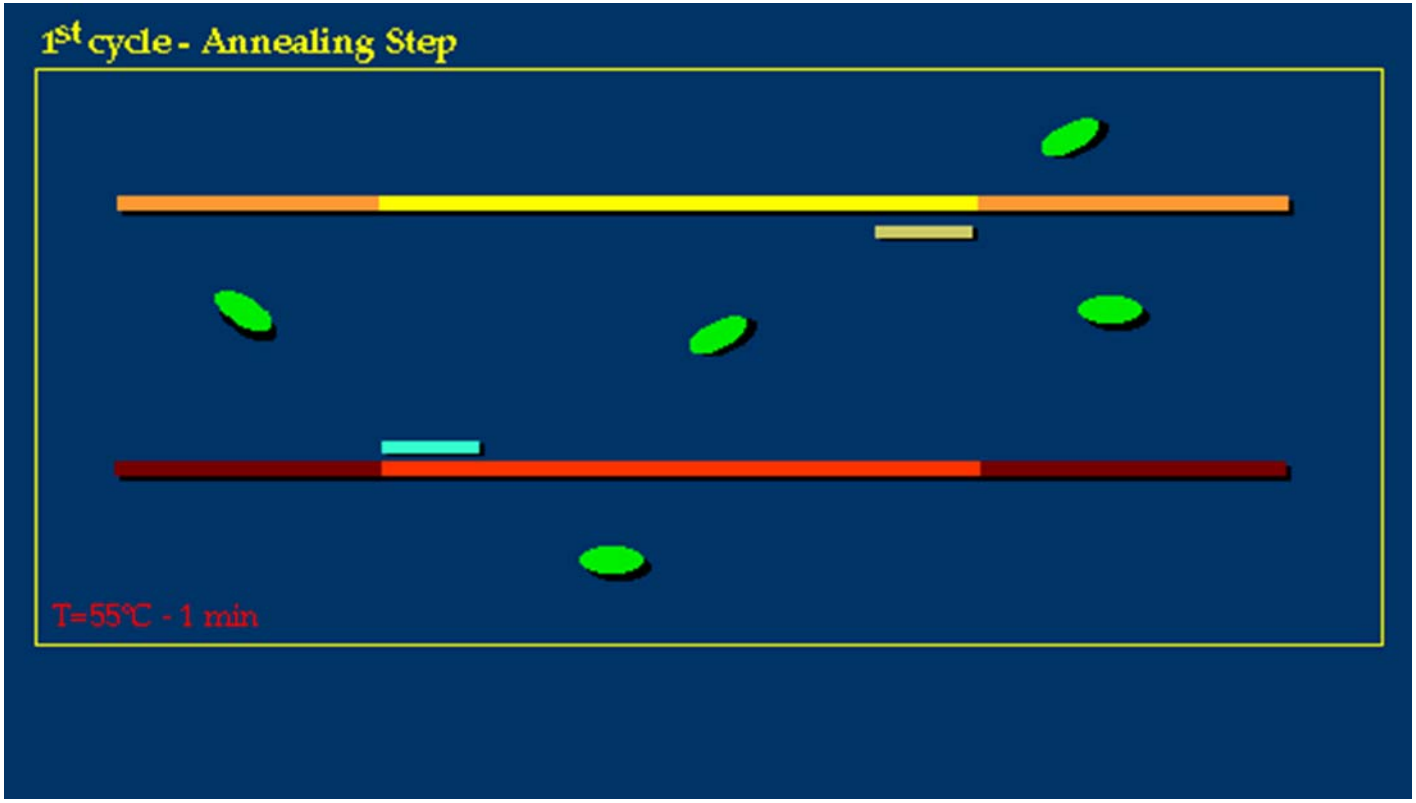
  – ***Denatürasyon***

    - DNA yeni zincir sentezine hazırlanmak için ayrılır (94-95^{0}C)



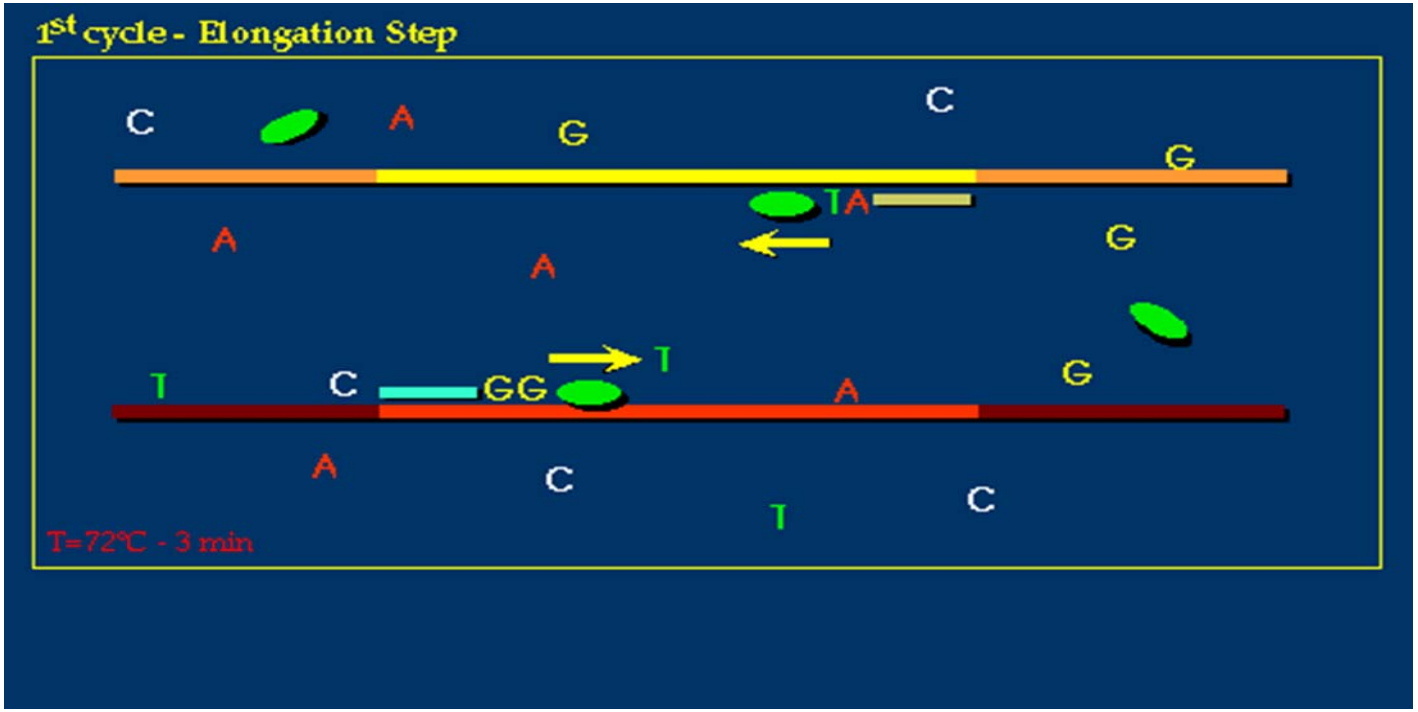
– ***Annealing-Hibridizasyon***

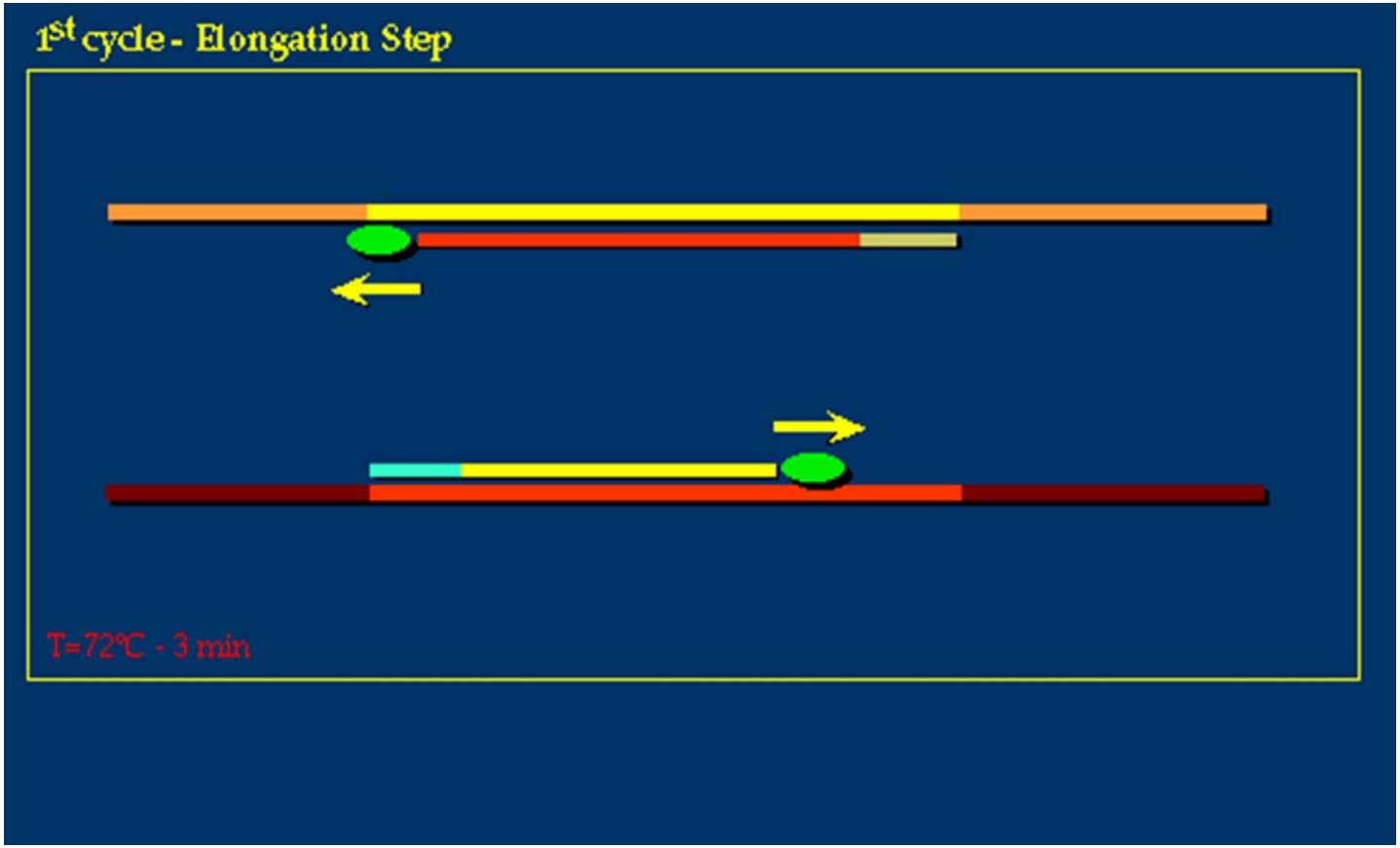
- Uygun sıcaklıklarda primerler hedef bölgelerle birleşir

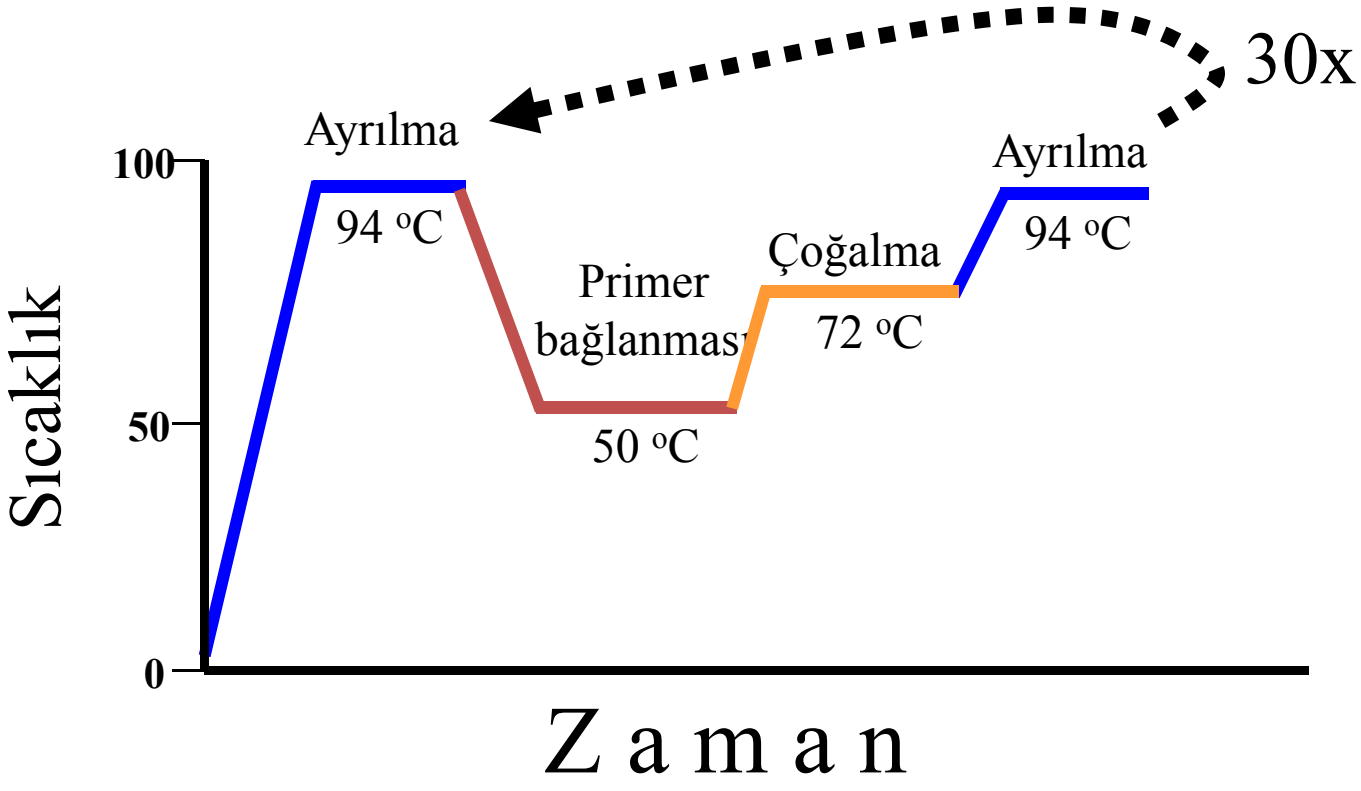


–*Extension-Polimerizasyon*

- Polimeraz enzimi aracılığıyla primerlerin ssDNA kalıplarına bağlanarak zincirin **5’ den 3’ ne** uzamasıdır
- Taq polimeraz **72-78^0** C 2000 nukleotid/dakika hızla uzatır
- Siklus azaldıkça hız azalır
- Multiplex PCR da enzim tutunması ve nükleotidleri bularak bağlanması zaman alır o yüzden süre 2 dk kadar uzatılır



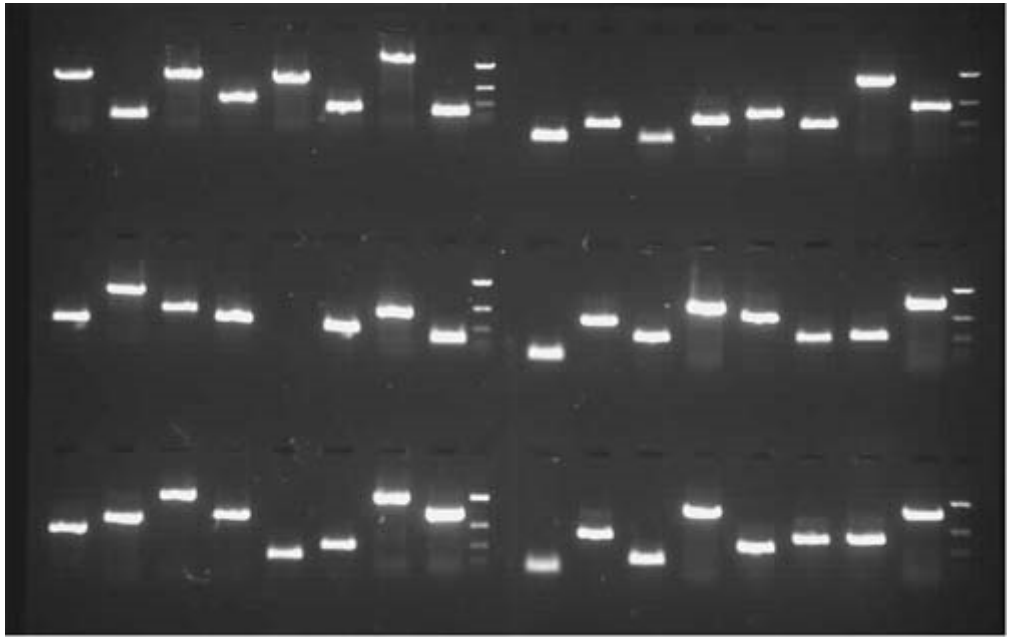

1st cycle - Elongation Step
T=72°C - 3 min


30x
Ayrılma
94 °C
Primer
bağlanması
50 °C
Çoğalma
72 °C
Ayrılma
94 °C
100
50
0
Sıcaklık
Z a m a n

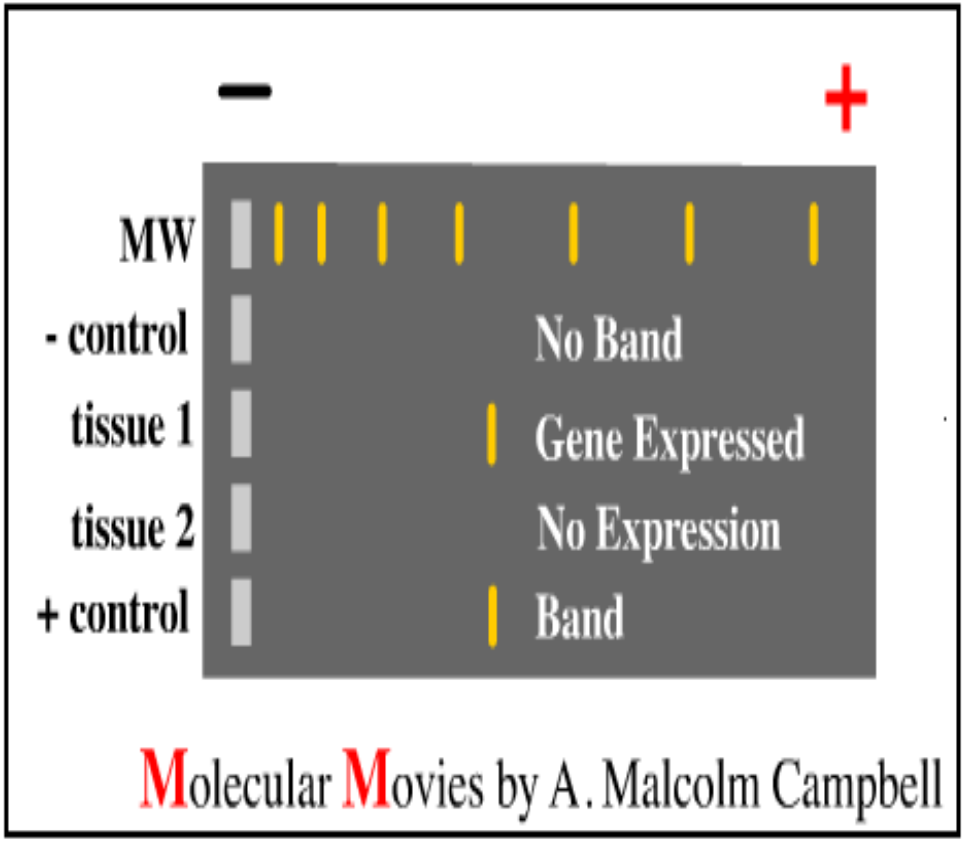
eppendorf
Mastercycler gradient
12 5:08PM

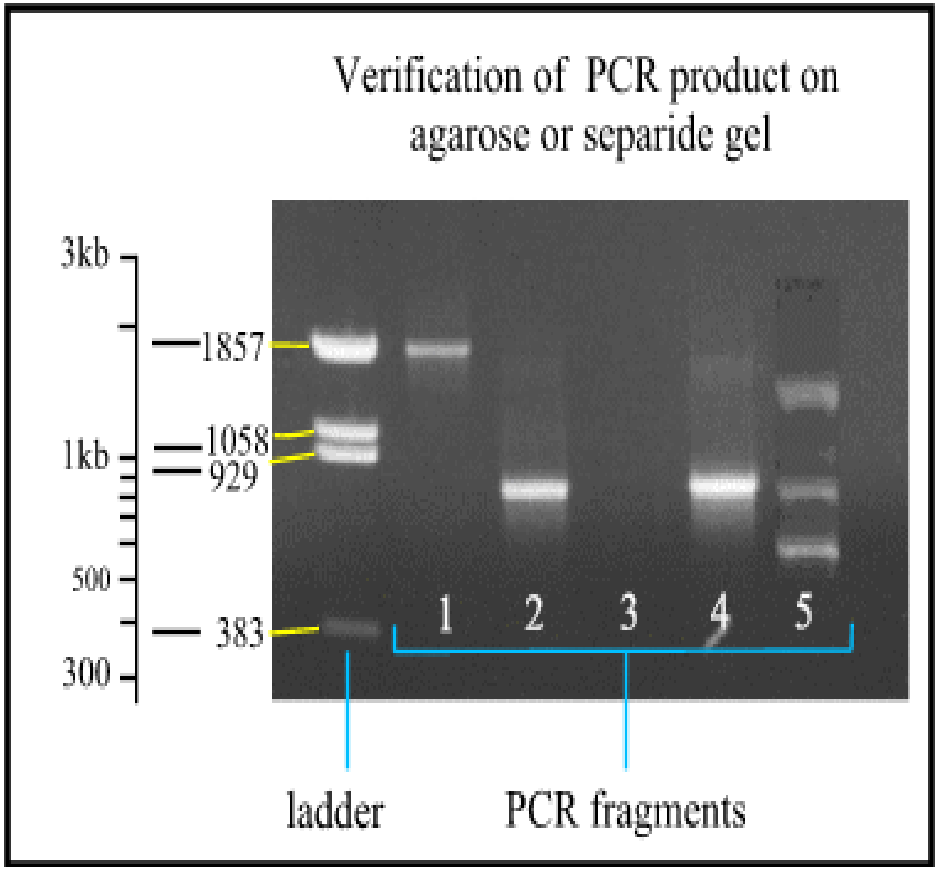
Pcr Sonuçlarının Değerlendirilmesi

- PCR ürünleri uygun moleküler ağırlıkta bir marker ile birlikte Ethidium bromide ile boyanarak **agarose gel de elektroforez** işlemine tabi tutulur.
- UV transimulatör ile bantlar gözlenir.
- Ayrıca **Poliakrilamide gel elektroforez (PAGE)** metodu da kullanılabilir.



Pcr Sonuçlarının Değerlendirilmesi

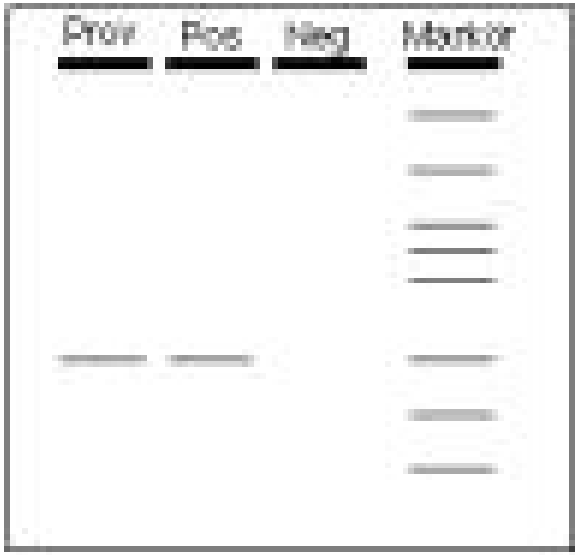




Thermal Cycler

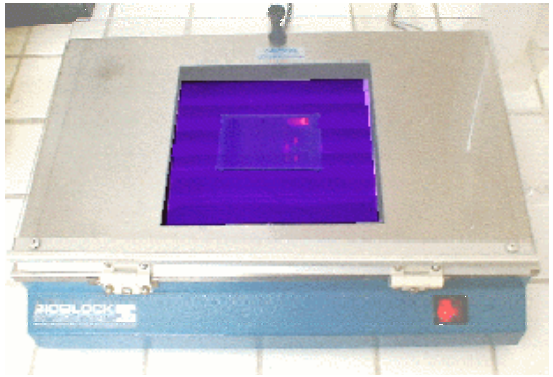
Elektroforez

3-4 hours



Ürinlerin değerlendirilmesi

(Agaroz jel)



UV translüminatör

Pcr Kullanım Alanları

1. Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcı ve hastanın tanısı,
2. Prenatal tanıda,
3. Patojen organizmaların saptanması,
4. Adli tıpta,
5. Onkogenesis de,
6. Klonlama, gen expresyon araştırmalarında,
7. DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
8. Bilinmeyen dizilerin tayininde,
9. Geçmis DNA'nin incelenmesi ve evrimin aydınlanmasında,
10. RFLP Analizinde,
11. Invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılmasında,
12. DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında .