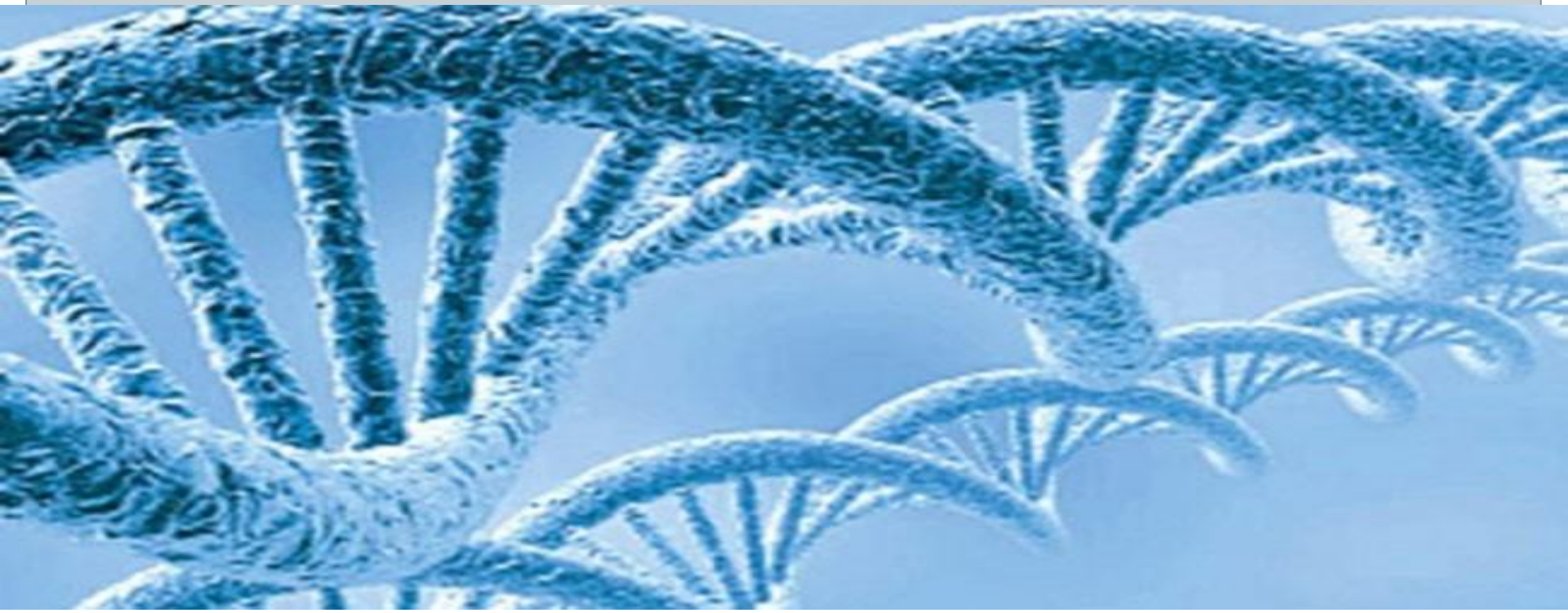
DNA Hasarı ve Onarımı

Doç.Dr. Tuğba YILMAZ ÖZDEN



- DNA sentezi sırasında sağlamalı okuma ile yanlış nükleotidlerin çıkarılmasına rağmen bazen yanlış eşleşmiş baz içeren nükleotidler kalabilir.
- Ayrıca çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler de DNA'da hasara neden olabilir..
- DNA molekülünün yapısında meydana gelen bir değişiklik şifrelerinde değişikliğe yol açacağından, hatalı protein üretilmesine, çeşitli mutasyonların, farklı fenotiplerin veya hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur.

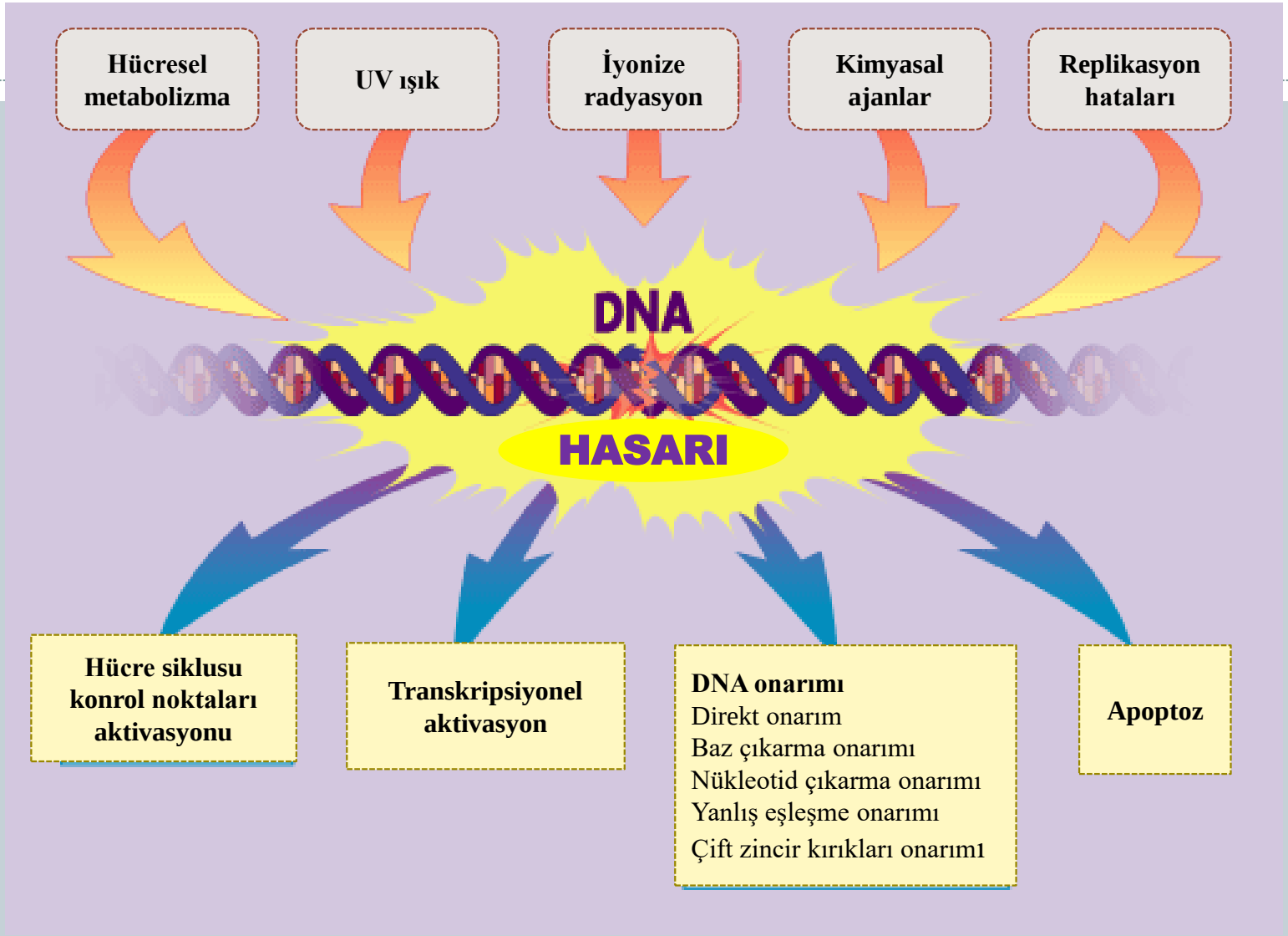
DNA hasarına neden olan etkenler

A. Endojen etkenler

- Yanlış eşleşmeler
- Kimyasal değişiklikler; DNA bazlarında deaminasyon veya metilasyon
- Baz kayıpları; depürinasyon, depirimidinasyon
- Oksidatif hasar

B. Eksojen etkenler

- Kimyasal ajanlar: aflatoksinler, alkilleyici ajanlar, benzopiren (sigara dumanı), kemoterapi ajanları, vinil klorür, vb.
- Fiziksel ajanlar: güneş ışığı (UV radyasyon), iyonize radyasyon (X ışınları)


Hücresel metabolizma
UV ışık
İyonize radyasyon
Kimyasal ajanlar
Replikasyon hataları
DNA
HASARI
Hücre siklusu konrol noktaları aktivasyonu
Transkripsiyonel aktivasyon
DNA onarımı
Direkt onarım
Baz çıkarma onarımı
Nükleotid çıkarma onarımı
Yanlış eşleşme onarımı
Çift zincir kırıkları onarımı
Apoptoz

- DNA onarımı yaşamın devamı için mutlaka gereken bir işlevdir.
- Onarım mekanizması, prokaryot ve ökaryotlarda benzerlik gösteren başlıca üç basamakta gerçekleşir.
  - Hasarın tanınması
  - Hasarlı kısmın uzaklaştırılması
  - Boşluğun doldurulması

DNA üzerindeki hasarlı bölgeler çeşitli mekanizmalar ile düzeltilir

1) **Kesip çıkarma (ekzisyon) onarım mekanizmaları**
   - Baz kesip çıkarma onarımı
   - Nükleotid kesip çıkarma onarımı
2) **Yanlış eşleşme onarımı**
3) **Direkt onarım mekanizmaları**
   - Fotoreaktivasyon
   - DNA alkilasyonun onarımı (O^6-Metilguanin onarımı)
   - Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

1-Kesip-Çıkarma (Ekzisyon) Onarım Mekanizmaları

Tüm prokaryot ve ökaryot organizmalarda bulunan bu onarım sistemi 3 temel basamak içerir:

1. Hasar veya hata tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesip çıkarılır.

2. DNA polimeraz oluşan boşlukları doldurur.

3. DNA ligaz son bağı kurar ve boşluk tamamen kapanır.

Baz Kesip Çıkarma (Eksizyon) Onarımı-BER (Yanlış Baz Onarımı)

DNA bazlarının doğal hidrolizi veya çeşitli kimyasal ajanlar nedeni ile oluşan uygun olmayan bazların tamiri ile ilgilidir.

Anormal bazlar spesifik **DNA glikozilaz** ile **N-glikozid** bağı kırılarak uzaklaştırılır.

Baz kesip çıkarma ile onarılan baz hasarları

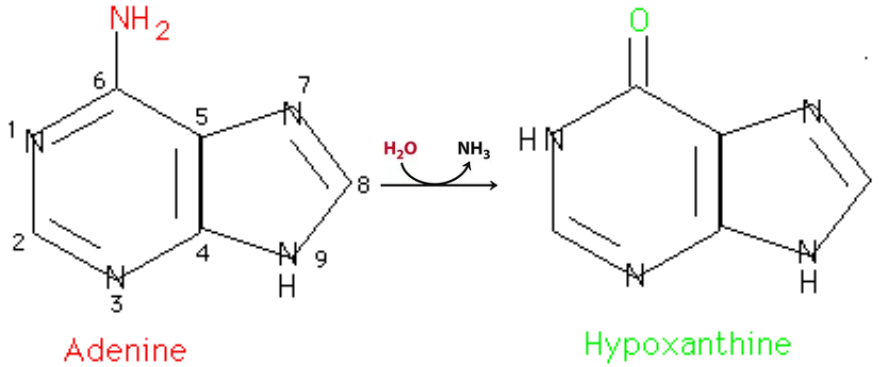
- **Okside bazlar:** 8-okzoguanin,
- **Alkillenmiş bazlar**: 3-metil adenin, 7-metil guanin

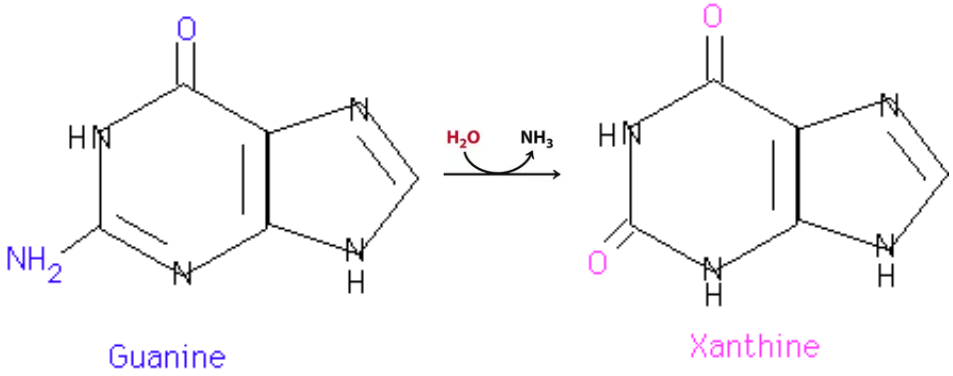
- **Deaminasyona uğramış bazlar**:

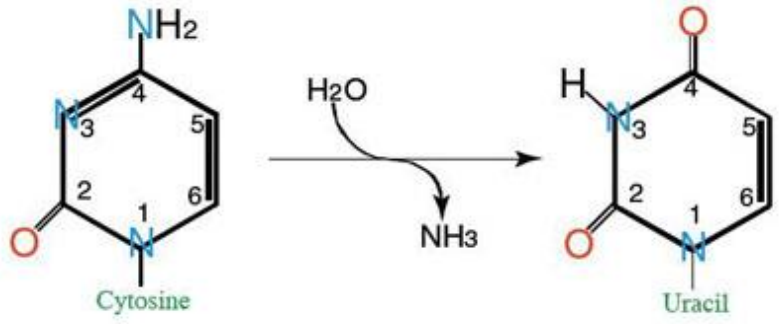
Organizmada nitrözamin, nitrit ve nitrat gibi ön maddelerden oluşan **nitröz asit**, adenin,guanin ve sitozinden amin grubunu uzaklaştıran kimyasal bir mutajendir.

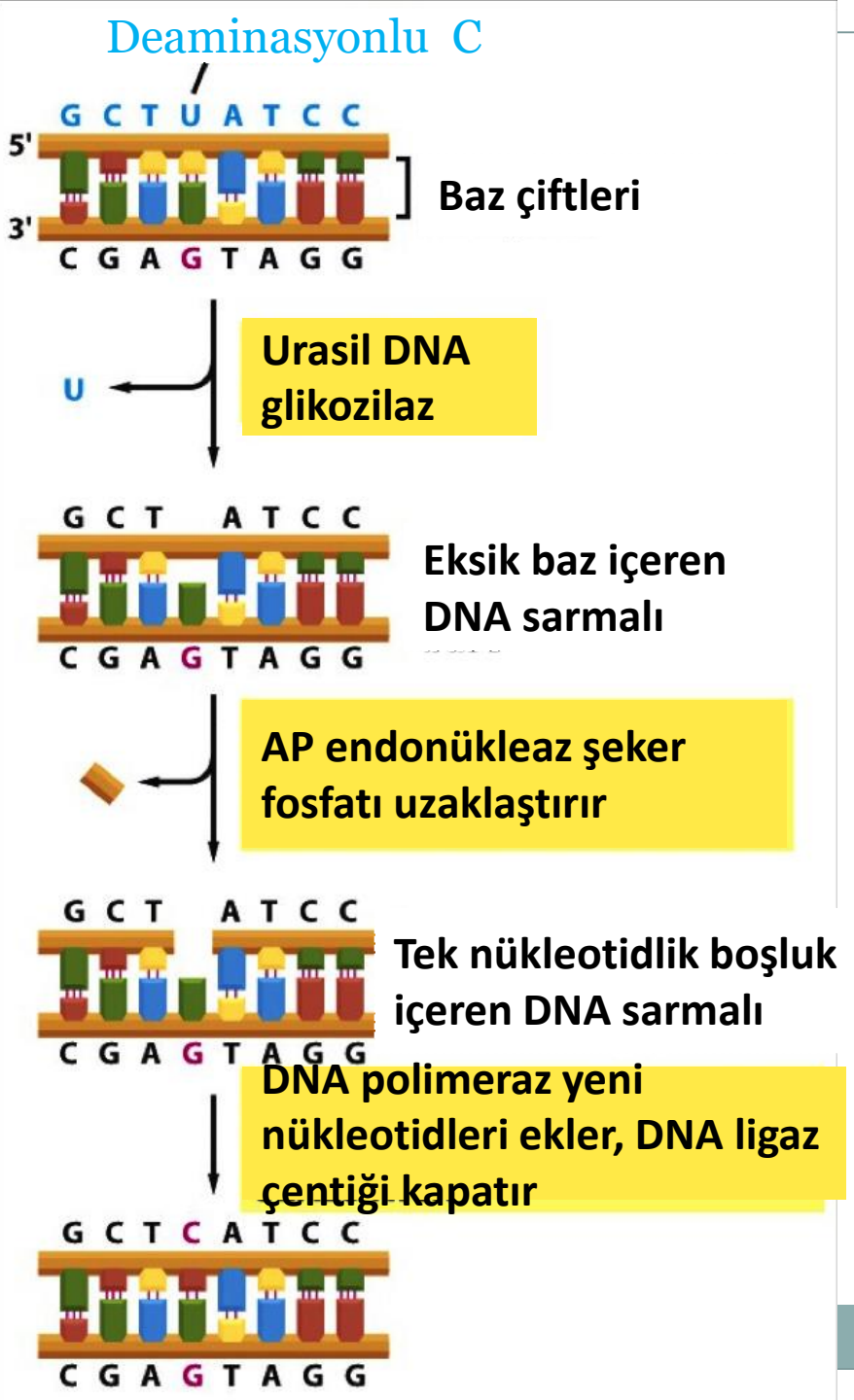
Bu maddenin etkisi ile

- adeninin deaminasyonu ile oluşan, hipoksantin
- guaninin deaminasyonu ile oluşan, ksantin.
- sitozinin deaminasyonu ile oluşan urasil veya DNA'ya yanlışlıkla bağlanan urasil BER mekanizması ile uzaklaştırılır.









Anormal bazlar, spesifik **DNA glikozilazlar** ile nukleotidin şeker komponenti ile arasındaki N-glikozid bağı kırılarak uzaklaştırılır. Geriye sadece deoksiriboz fosfat iskeleti kalır.

Bu şekilde pürin veya pirimidin bazı çıkarılmış **apürinik** veya **apirimidinik** AP bölgeleri (bazsız alanlar) oluşur. **AP endonükleaz** enzimi, AP bölgesindeki fosfodiester bağını keser ve zincirde GAP=boşluk oluşur.

Tek nukleotidlik boşluk **DNA polimeraz** tarafından doldurulur.

Eklenen nükleotid daha sonra **DNA ligaz** tarafından fosfodiester bağı ile bağlanır.

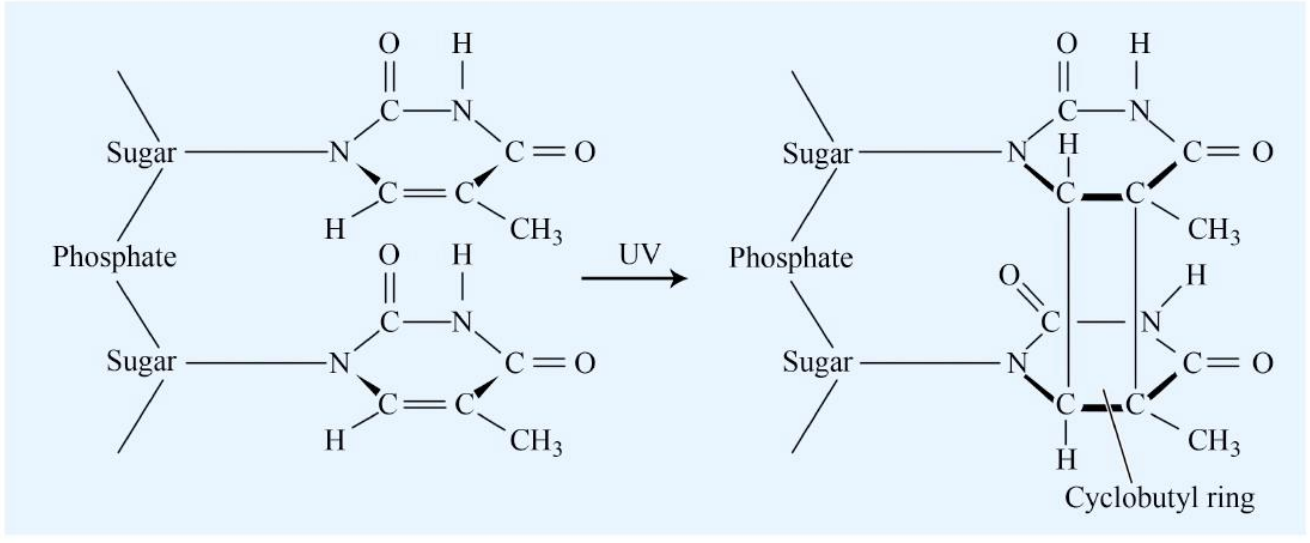
Nükleotid Kesip Çıkarma (Eksizyon) Onarımı-NER (Yanlış Nükleotid Onarımı)

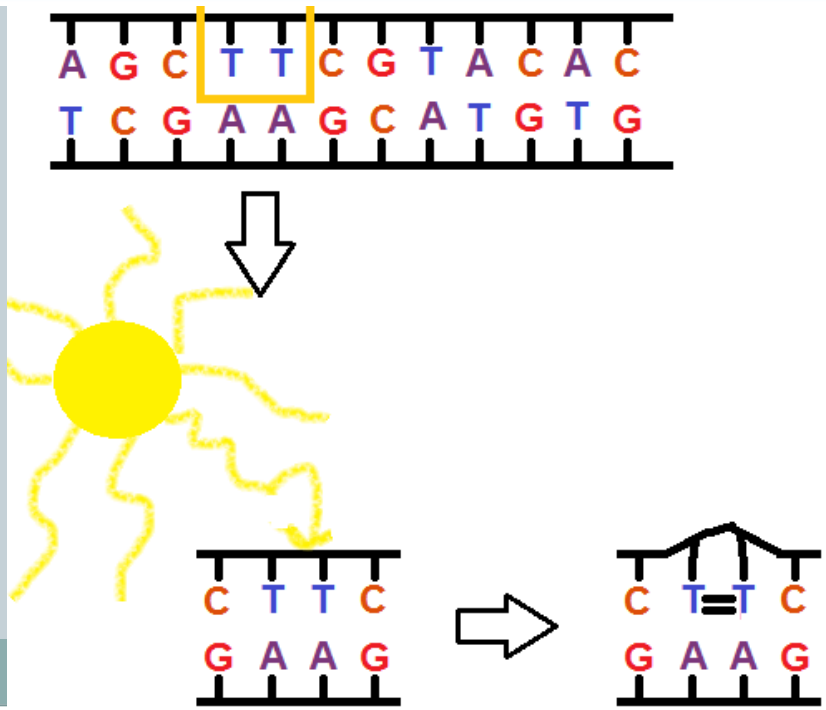
- DNA'nın sarmal yapısında geniş bozulmalara neden olan DNA lezyonları bu sistem ile onarılır. Hasara spesifiktir. Daha uzun nükleotid hasarı tamir edilir.
- **BER**'de bazlar tek olarak kesip çıkarılırken,
  NER'de hasarlı bazlar oligonükleotid parçaları olarak kesip çıkarılır.

Örneğin;

- Güneş ışınlarının etkisi ile oluşan **timin dimerleri**nin,
- Sigara dumanı etkisi ile oluşan **benzopiren-guanin** gibi baz değişimlerinin,
- Kemoterapötik ilaçlarla oluşan baz değişimlerinin tamir edilmesinde NER mekanizması görev alır.

Timin dimerleri





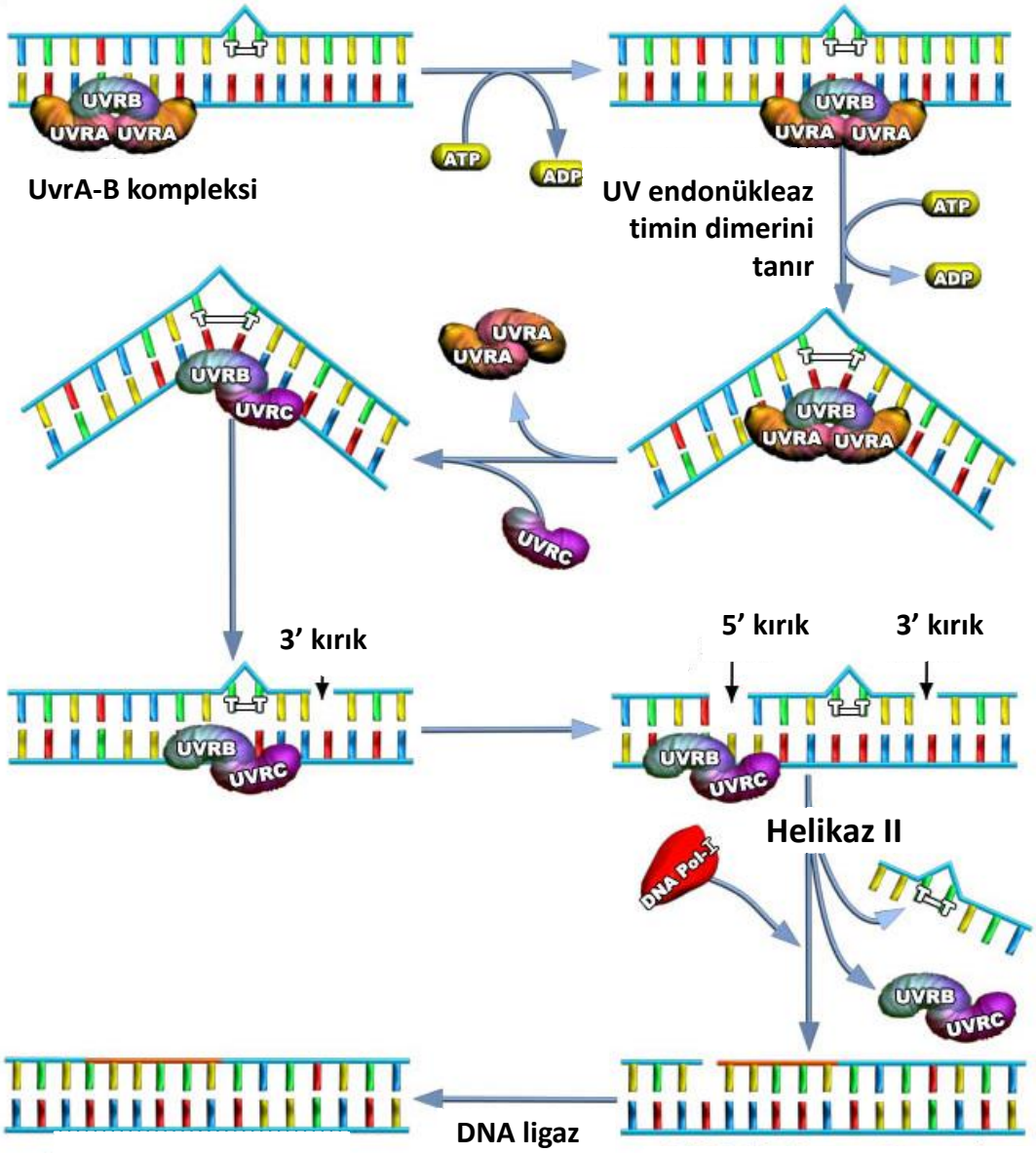
UV ışığa maruz kalan komşu iki pirimidin (genellikle timinler) arasında kovalent bağlanma olabilir. Bu şekilde oluşan timin dimerleri replikasyonu bloke eder.

Nükleotid kesip çıkarma işlemi **ABC eksinükleaz** (endonükleaz) enzimi tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimin 3 altünitesi vardır.

- **UvrA,** hasarın algılanması
- **UvrB,** çift zincirlerin ayrılması
- **UvrC,** endonükleaz aktivitesi

- Onarımın ilk aşamasında, enzimin **UvrA** ve **UvrB** alt birimlerinden oluşan kompleks **$(UvrA)_2$ -(UvrB)** DNA'da lezyonun olduğu bölgeye bağlanır.
- Hasarlı bazların bulunduğu bölgede UvrA proteini kompleksten ayrılırken **UvrC** proteini UvrB proteinine bağlanır.
- UvrC proteininin bağlanması ile hasarlı bazların 3' ve 5' yönlerinde kırıklar oluşur. (Prokaryotlarda, bu enzim hasarın 3' ucundan 4.-5. fosfodiester bağını, 5' ucundan ise 8. fosfodiester bağını ayırır.)
- Sonraki aşamada **DNA helikaz** bu 12–13 nükleotidlik parçayı uzaklaştırır.
- Oluşan boşluk, **DNA polimeraz I** ile doldurulur ve **DNA ligaz** tarafından zincirin bağlanması ile onarım tamamlanmış olur.

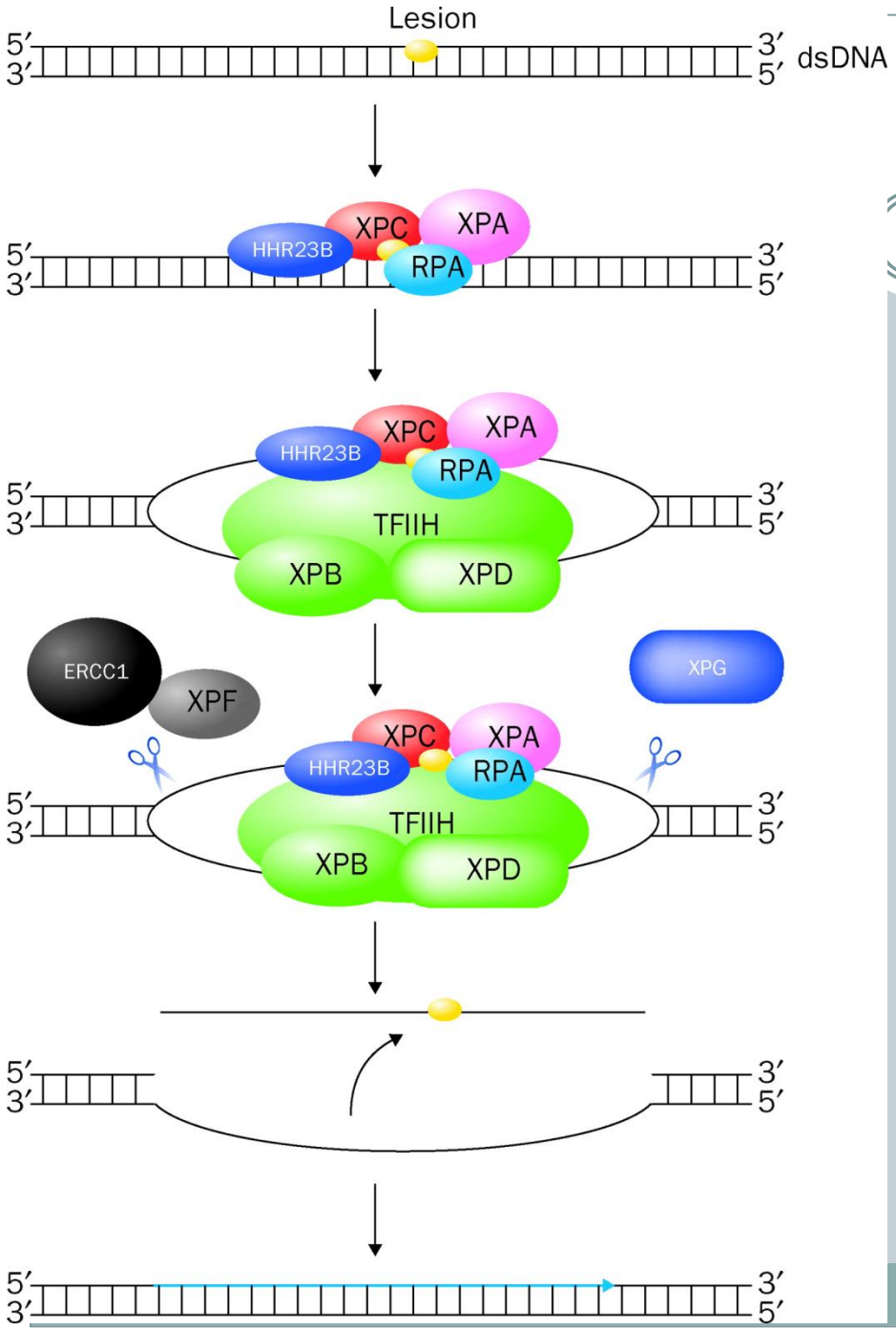
E. coli'de timin dimerlerinin onarımı



Ökaryotlarda;

- İnsanda nükleotid kesip çıkarma onarım mekanizması çok daha karmaşıktır.
- Bu sisteme 9 ana protein katılır.

XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG ve **CSA ve CSB** proteinlerinin yanı sıra **ERCC1, RPA, RAD23A, RAD23B** proteinleri de bu sistemede görev alır.



A. Hasarın tanınması

XPC, XPA ve RPA (replikasyon protein A) hasarın tanınmasında rol oynayan proteinlerdir.

B. DNA çift sarmalının açılması

XPD ve XPB, helikaz aktivitesiyle DNA çift zincirinin açılmasını sağlar. Bu iki protein aynı zamanda TFIIH'ın altünitelerinden ikisidir.

C. Hasarlı bölgenin çıkartılması

ERCC1-XPF hasarlanmış bölgeyi 5' ucundan, XPG hasarlanmış bölgeyi 3' ucundan keser.

D. Boşluk doldurulması ve ligasyon

Boşluğun doldurulmasında RPA, RFC, PCNA, DNA polimeraz delta (δ) ve epsilon (ε) rol oynar.

DNA ligaz ile ligasyon gerçekleşir.

NER mekanizmasında rol alan proteinleri kodlayan genlerdeki defektler sonucu bazı nadir görülen hastalıklar ortaya çıkar.

- Xeroderma pigmentosum (XP proteinleri)
- Cockayne sendromu (CSA-CSB proteinleri)
- Trikotiyodistrofi (XP proteinleri)

Xeroderma pigmentosum

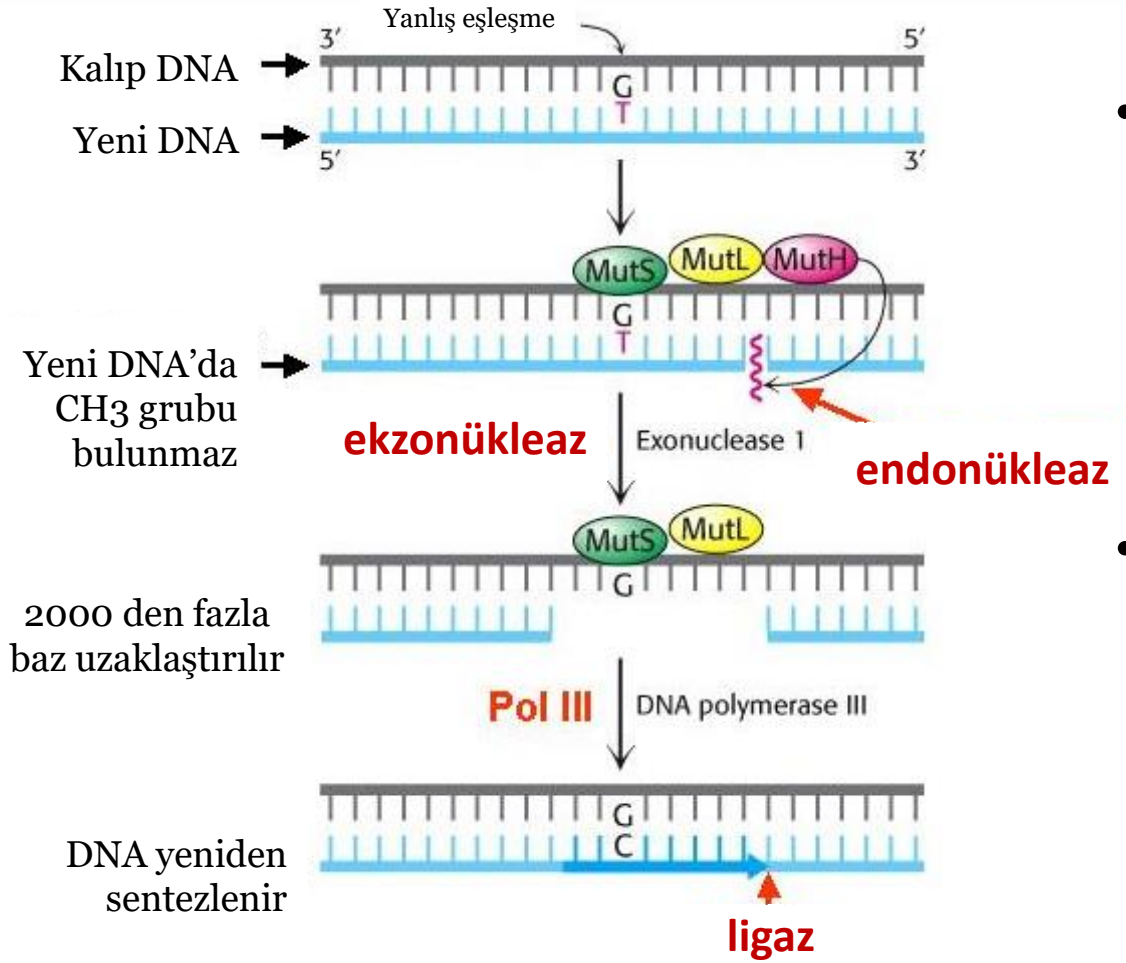
- DNA yapısında meydana gelen timin dimerlerinin tamir edilmemesi ve mutasyonların birikmesine bağlı olarak gelişen otozomal resesif kalıtsal bir hastalıktır.
- Bu hastalığın en sık rastlanan şeklinde UV özgün endonükleazlar eksiktir.
- Hastalarda UV ışınlarına aşırı duyarlılık ile birlikte daha sonra deri kanseri görülebilmektedir.



2-Yanlış Eşleşme (Mismatch) Onarımı

- DNA polimeraz, replikasyon sırasında hata okuma (proofreading) yeteneğine sahiptir. Yanlış eşleşme tamiri, hata okuma sonrası bile kalan yanlış eşleşmeleri tamir eden mekanizmadır.
- Direk onarım ve kesip çıkarma onarımı normalde DNA yapısında olmaması gereken bazların çıkarılmasına yönelik işlemlerdir.
- Yanlış eşleşme onarımı ise DNA molekülünde normalde bulunan bazların değiştirilmesi ile gerçekleşir.
- Bu onarım, kalıp zincir ile yeni sentezlenen zincirin ayırt edilmesi esasına dayanmaktadır.
- Kalıp zincir üzerinde bulunduğu halde yeni sentezlenmiş zincirde bulunmayan **metil** grupları bu ayırımın yapılmasını sağlar.

- Kalıp zincir replikasyondan hemen sonra metillendiği halde yeni sentezlenen zincir aynı anda metillenmez.
- Kalıp zincirdeki **5'GATC** dizinlerindeki adeninlerin N^6 pozisyonundan metillenmesi ***Dam metilaz*** tarafından gerçekleştirilir.
- *E. coli*'de bu onarım sisteminde **MutS, MutH** ve **MutL** proteinleri etkilidir.



- Önce **MutL** proteini **MutS** proteini ile kompleks oluşturarak yanlış eşleşmiş baz çiftlerine bağlanır. Daha sonra **MutH** proteinleri de bu komplekse bağlanır.
- Bu bölgede MutH proteininin **endonükleaz** aktivitesi, metillenmemiş zincirde GATC dizisinin 5' ucundan kırılmayı gerçekleştirir.

- Metillenmemiş DNA üzerinde DNA helikaz II, tek sarmallı DNA bağlayıcı protein (TSB), DNA zincirini 3'→5' yönünde ayıran ekzonükleaz I veya ekzonükleaz X enzimleri, kırılma noktasından yanlış eşleşmiş baz çiftine kadar olan parçayı ayırırlar.
- Onarımın son aşamasında geriye kalan boşluk DNA polimeraz III ile doldurulur ve DNA ligaz ile bağlanır.

Ökaryotlarda MutS ve MutL'nin homologları rol oynar MutH'nin homoloğu yoktur.

- MutS
  - hMSH2
  - hMSH3
  - hMSH6
- MutL
  - hMLH1
  - hMLH3
  - hPMS1
  - hPMS2

- Bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile **herediter non-polipozis kolon kanseri** (HNPCC) arasında ilişki bulunmuştur.

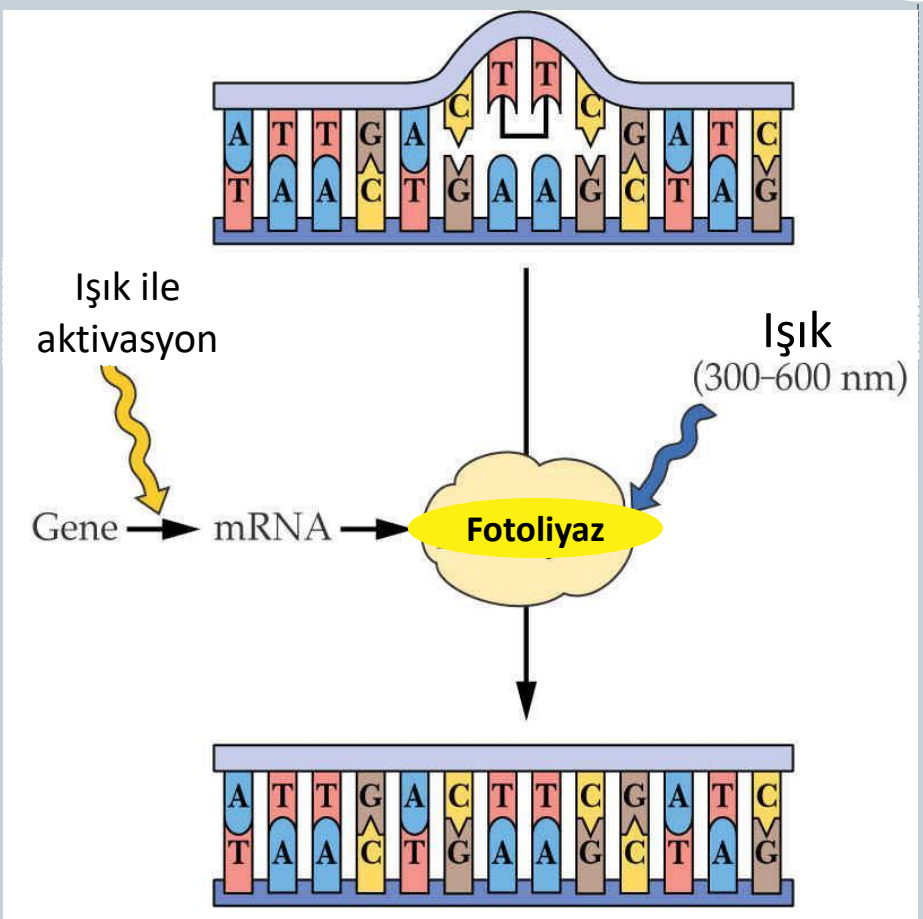
Onarım sistemlerinde görevli enzim ve proteinler

Onarım sistemi (Prokaryot)		
Baz kesip çıkarma	**Nükleotid kesip çıkarma**	**Yanlış eşleşme**
DNA glikozilaz	UvrA, UvrB	Dam metilaz
AP endonükleaz	UvrC (endonükleaz)	MutS, MutL
DNA polimeraz I	DNA helikaz II	MutH(endonükleaz)
DNA ligaz	DNA polimeraz I	Ekzonükleaz I veya X
	DNA ligaz	DNA helikaz II
		TSB protein
		DNA polimeraz III
		DNA ligaz

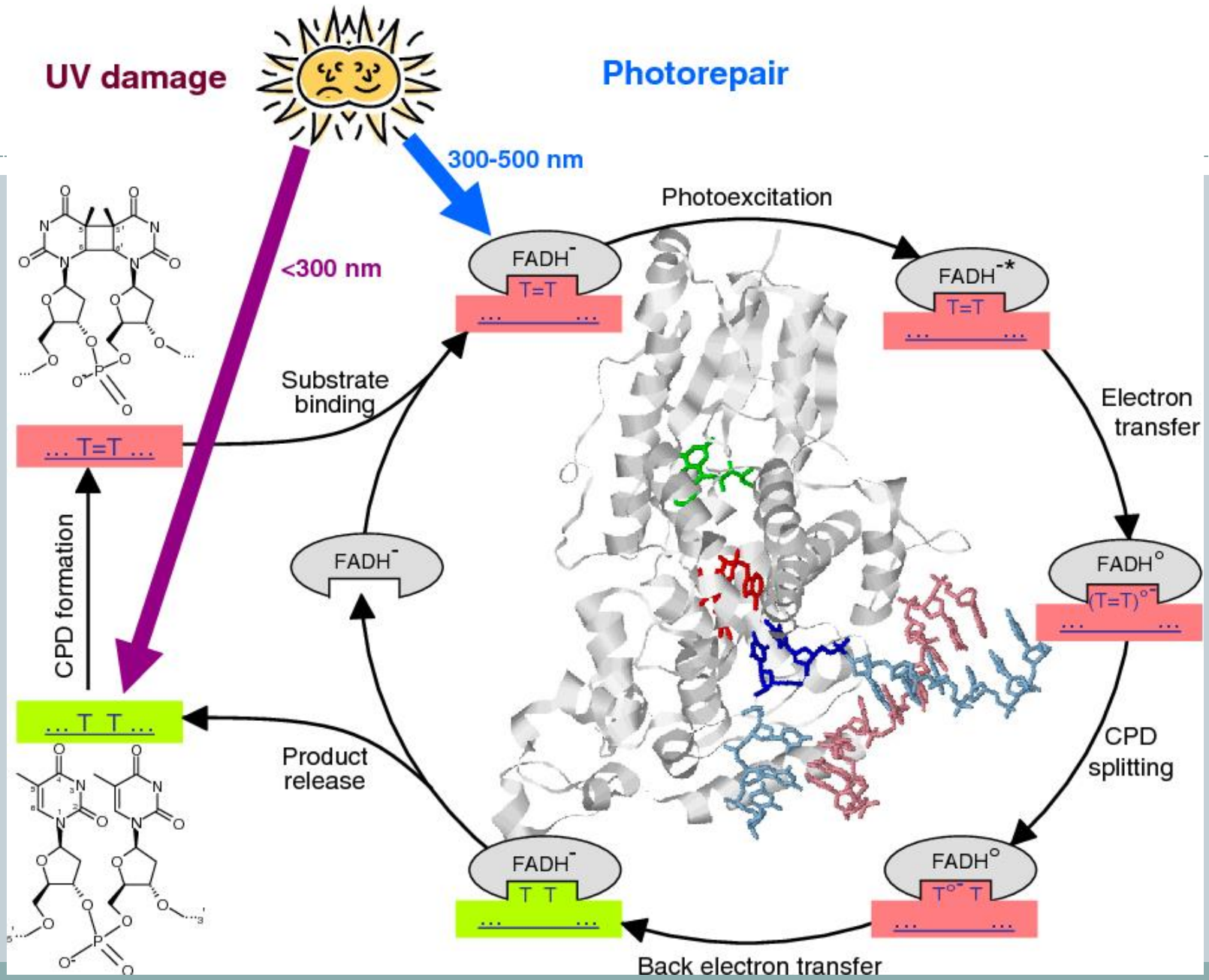
Direkt Onarım Mekanizmaları

- Bu onarım yolu timin dimerleri ve alkillenmiş bazlar için geçerlidir.
- Zincir kırılmadan hasar onarılır.
  - Fotoreaktivasyon
  - DNA alkilasyonun onarımı
  - Basit tek zincir kırıklarının onarımı

Fotoreaktivasyon

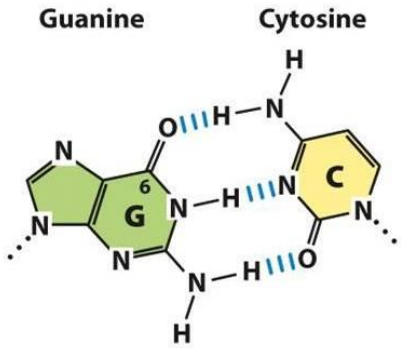


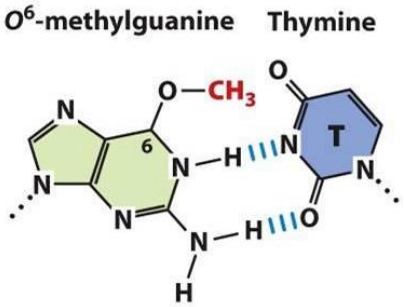
- DNA üzerinde hasara uğramış baz, çıkarılmadan eski haline getirilir.
- Timin dimerleri, prokaryot ve ökaryotlarda (insan haricinde) bulunan **fotoliyaz** enzimi katalizi ile monomerlerine çevrilir.
- UV ışığın(100-400 nm) etkisi ile meydana gelen mutasyonları içeren hücreler, mavi spektrum (300–600 nm) içeren görünür ışığa maruz bırakıldıklarında, geriye dönüşüm yapıp düzelir. Bu olaya **fotoreaktivasyon** denir.

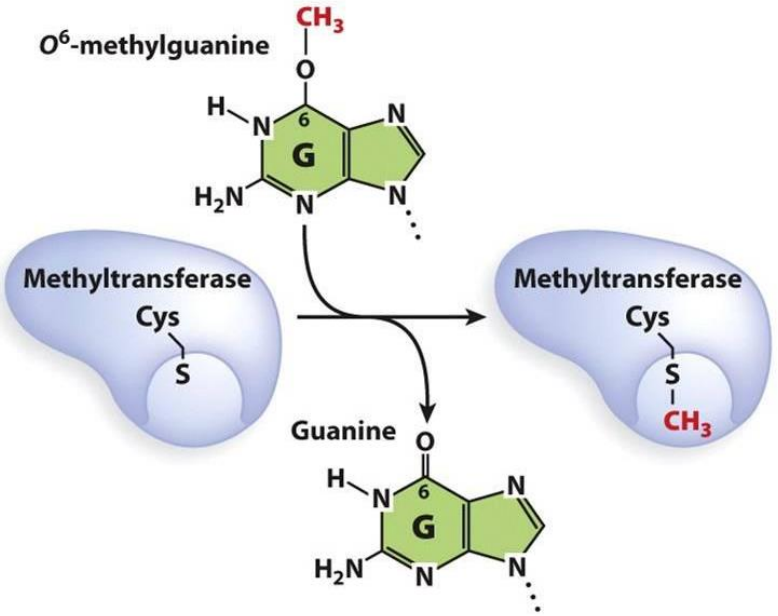

UV damage
Photorepair
300-500 nm
<300 nm
Photoexcitation
FADH⁻
T=T
FADH⁻*
T=T
Electron transfer
FADH°
(T=T)°⁻
CPD splitting
FADH°
T°⁻ T
Back electron transfer
FADH⁻
T T
Product release
FADH⁻
Substrate binding
… T=T …
CPD formation
… T T …

DNA alkilasyonu onarımı

- Alkilleyici ajanlar varlığında oluşan O^6-metil guanin, yüksek oranda mutajeniktir.
- Sitozin yerine timin ile eşleşen bu hasarlı baz, G-C baz çiftinin A-T baz çiftine dönüşmesine yol açar.
- O^6-metil guaninin direkt onarımı **DNA metiltransferaz** enzimi tarafından yapılır.







Bu enzim guanine bağlı metil grubunu kendi yapısındaki sistein kalıntısına transfer ederek normal guanin oluşumunu sağlar. Enzim inaktif hale geçer. Transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapar. Bazı tamir enzimlerinin gen ekspresyonunu arttırır.

Basit Tek Zincir Kırıklarının Onarımı

- X-ışını ya da peroksitlerin neden olduğu basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen tamir edilmektedir.
- DNA ligaz; enerji gerektiren bir reaksiyon ile fosfodiester bağının kırıldığı durumlarda oluşan ‘Nick’ bölgelerini onarır, 5' fosfat grubu ile 3'OH grubu arasındaki fosfodiester bağını oluşturur.

Mutasyonlar

- Fiziksel veya kimyasal faktörlerin etkisi ile DNA'da oluşan hasar, onarım mekanizmaları ile onarılmadan önce DNA replikasyonu gerçekleşirse hasar kalıcı olmakta, yani mutasyona yol açmaktadır.
- Mutasyon, DNA dizilerinde meydana gelen kalıtsal değişikliklerdir.
- Gen ürünü proteinin yapısında değişikliğe, o proteinin hiç yapılmamasına ya da hücre veya organizmada kısmi bozukluğa neden olabilir.
- Mutasyona uğramış organizma veya hücreye **mutant**, normal hücreye ise **yabani tip** (wild type) denilir.

Mutasyonlar oluşum şekillerine göre; 2 tiptir

1- Spontan mutasyonlar

- DNA replikasyonu sırasında düşük oranlarda pürin veya pirimidin bazlarında meydana gelen değişikliklerden kaynaklanır.
- Çoğu DNA tamir mekanizmaları ile onarılır.
- DNA tamir mekanizmasındaki yetmezlikten dolayı tamir edilemeyenler mutasyon olarak kalır.

2- İndüklenebilir mutasyonlar

- Hücre ve ya organizmanın çevresel koşullardan etkilenmesi sonucu DNA'da meydana gelen yapısal değişikliklerdir.
- Fiziksel veya kimyasal mutajenler ile gerçekleşir.

Mutasyon çeşitleri

1- Nokta mutasyonu

- Belirtisiz (slient) mutasyon
- Anlamsız (nonsense) mutasyon
- Yanlış anlamlı (missense) mutasyon
  - Geçiş (transizyon)
  - Çapraz (transversiyon)

2- Çerçeve kayması (frame shift) mutasyonu

- Baz girmesi (insersiyon)
- Baz çıkması (delesyon)

1- Nokta mutasyonu

DNA yapısında tek bir baz çiftinde oluşan değişiklik, mRNA molekülü üzerinde tek bir kodonun değişimine ve sentezlenen polipeptit zincirinde tek bir amino asitin değişikliğe uğramasına yol açabilir.

DNA'daki baz değişikliği etkilerine göre **belirtisiz**, **anlamsız** ve **yanlış anlamlı** olarak üçe ayrılır.

Belirtisiz mutasyonda, DNA'daki bir nokta mutasyonuna rağmen kodondan sentezlenen amino asit ve proteinin primer yapısı değişmez.

TTA →TTG (DNA)

lösin lösin

Anlamsız mutasyonda, herhangi bir kodon **UAA, UGA, UAG** sonlanma kodonlarından birine dönüşmektedir. Anlamsız mutasyonlar protein sentezinin erken sonlanmasına ve fonksiyonel olmayan polipeptit oluşması neden olmaktadır.

<u>Yanlış anlamlı mutasyonlar</u>, Bir amino asiti kodlayan kodunun, başka bir aminoasiti kodlayan kodona dönüşmesidir. 2 tipi vardır.

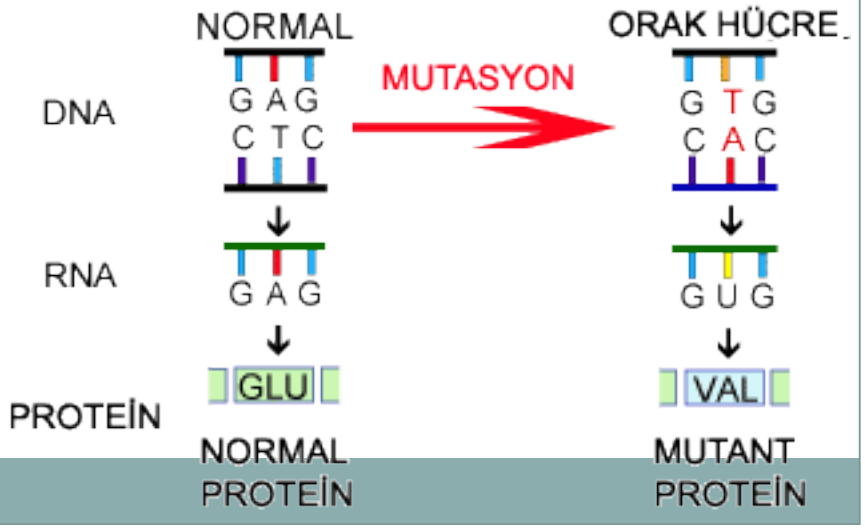
1- ***Geçiş (transizyon)*;** bir pürin mutasyona uğradığında yine bir pürinin, bir pirimidin mutasyona uğradığında ise yine bir pirimidinin yapıya katılmasıdır.

***2- Çapraz (transversiyon)*;** pürin yerine pirimidin, pirimidin yerine pürinin yapıya katılmasıdır.

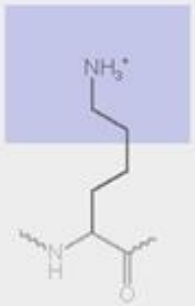
Örnek olarak; Orak hücre anemisinde hemoglobinin β zincirindeki 6. a.asit olan glutamik asit yerine valin gelmesi gösterilebilir. Bu değişikliğin sebebi, DNA'da adenin yerine timin gelmesidir.

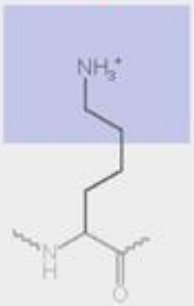
- GAG ------ Glutamik asid
- GUG ------ Valin

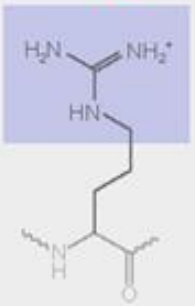




	Mutasyon yok	Nokta Mutasyonlar		
		Sessiz	Anlamsız	Yanlış anlamlı
DNA level	TTC	TTT	ATC	TCC
mRNA level	AAG	AAA	UAG	AGG
protein level	Lys	Lys	STOP	Arg







2- Çerçeve kayması (frame shift) mutasyonu

- DNA yapısına bir **bazın girmesi (insersiyon)** veya **çıkması (delesyon)** mRNA yapısında değişikliğe yol açar.
- Nükleotid katılması veya çıkarılmasının olduğu noktadan sonra gelen kodonların anlamı değişir. Bunun sonucunda sentezlenen proteinin yapısındaki a.asitler farklı olur.
- Bu mutasyon bazen sonlanma kodonu oluşturabildiğinden, normalden kısa polipeptid zincirinin sentezlenmesiyle sonuçlanır.

