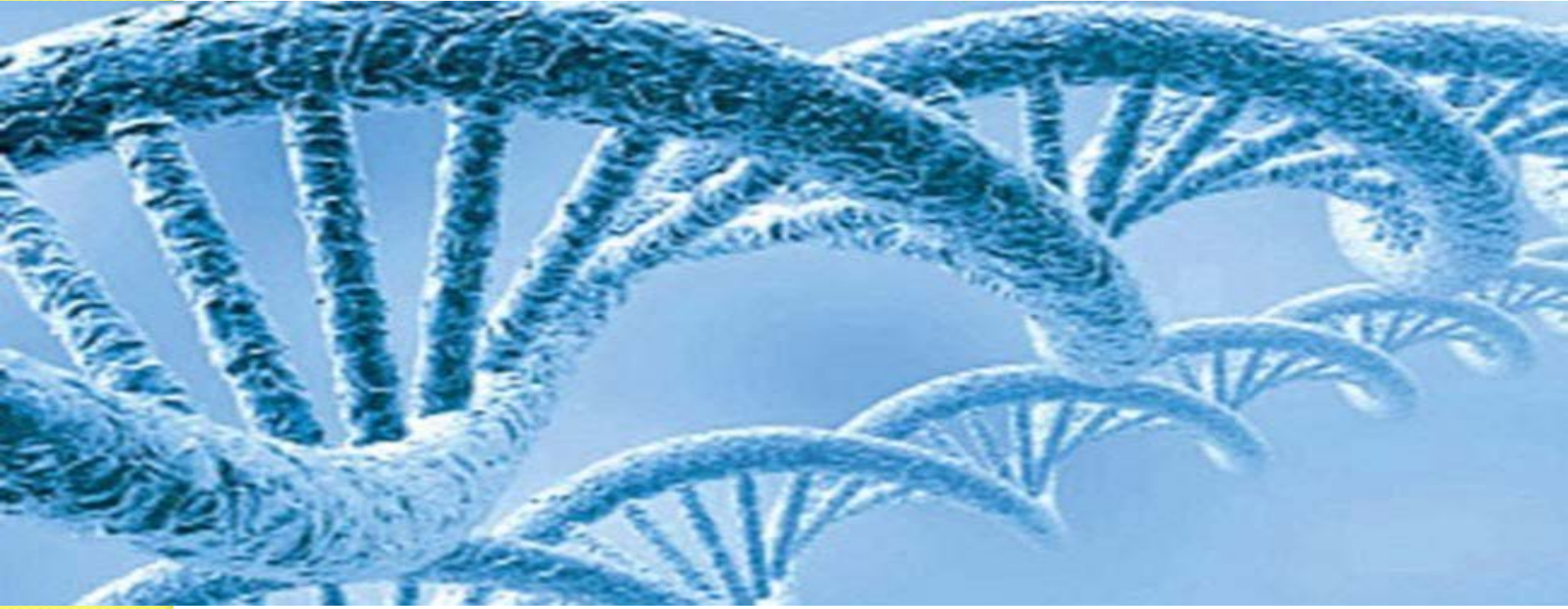
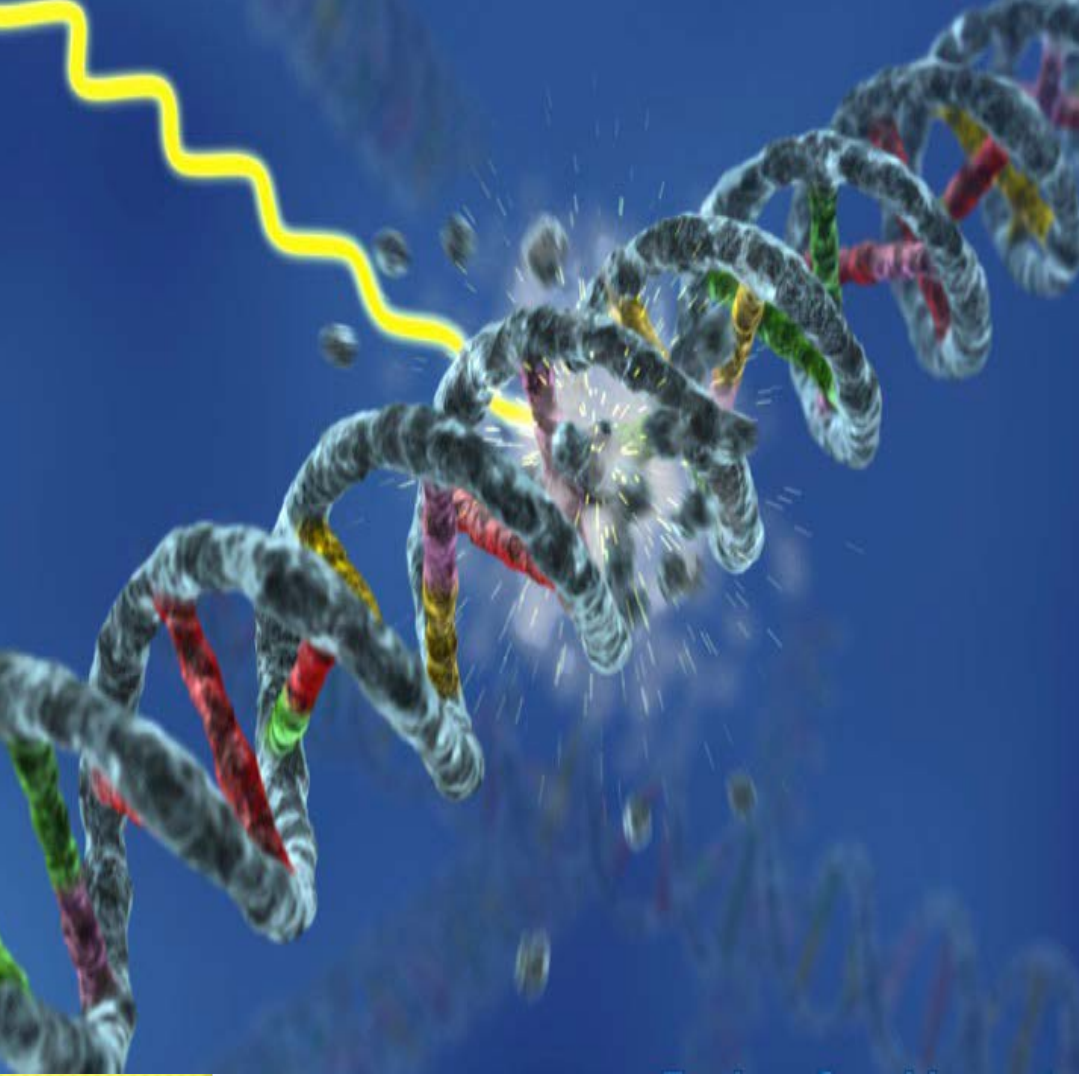


DNA Hasarı ve Onarımı

Doç.Dr.Pınar AKSOY SAĐIRLI



DNA Hasarı



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 insersiyon/delesyonlar
- Kimyasal değişiklikler: deaminasyon, metilasyon
- Baz kayıpları: depurinasyon, depirimidasyon
- Oksidatif hasar
- Replikasyon hataları

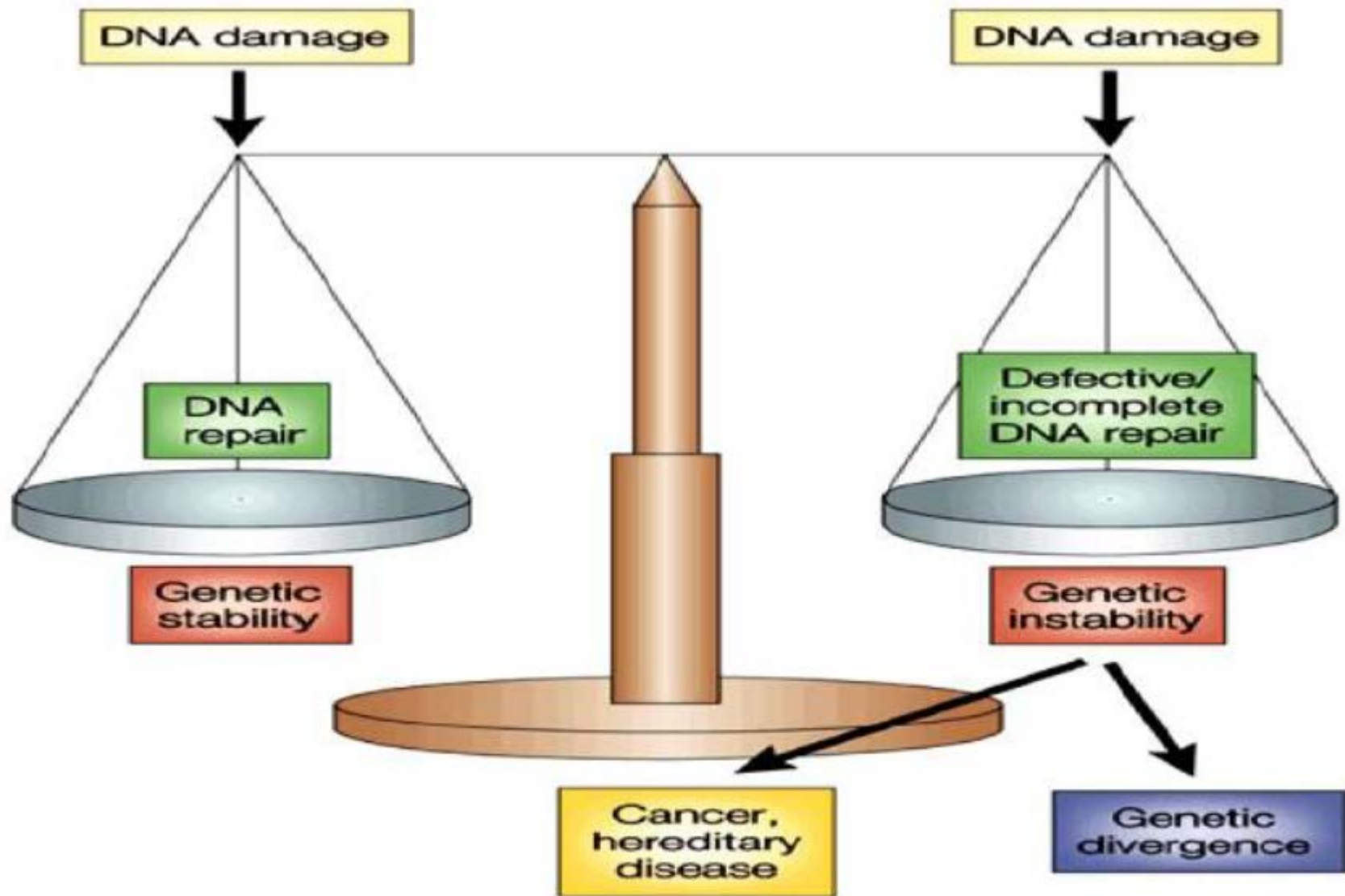
B. Eksojen etkenler

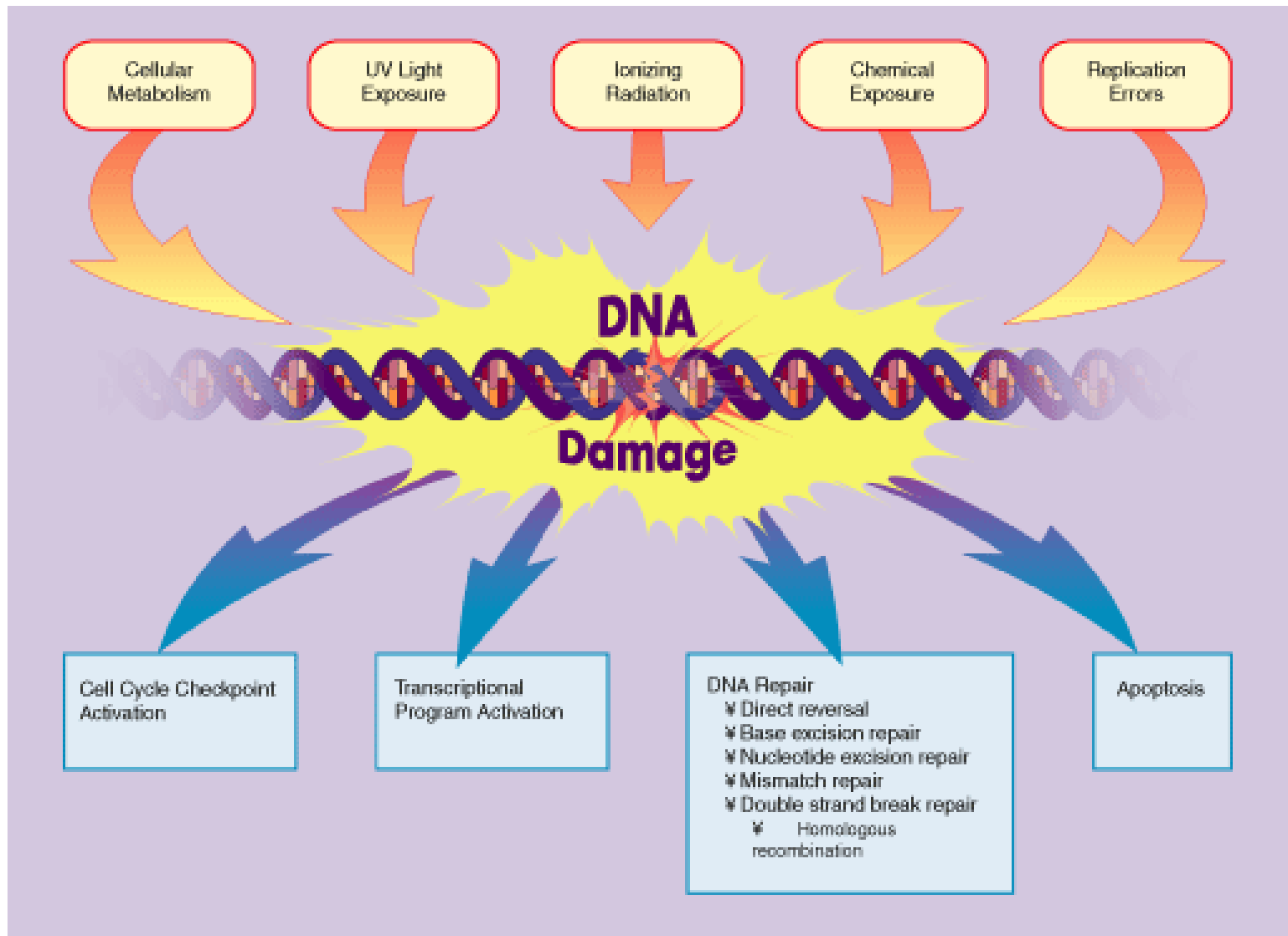
-Kimyasal ajanlar: aflatoksinler, alkilleyici ajanlar, benzopiren, kemoterapi ajanları, vinil klorür, vb.

-Fiziksel ajanlar: UV radyasyon, iyonize radyasyon

DNA hasar çeşitleri

- Tek baz değişimleri
 - Depurinasyon
 - Deaminasyon (sitozinin urasile, adeninin hipoksantine dönüşümü)
 - Nükleotid kaybı ya da kazanımı
 - Baz analogları ile yer değişimi
- İki baz değişimi
 - Timin-timin dimerleri
- Replikasyon hataları
- Zincir kırıkları
 - Tek dal kırıkları
 - Çift dal kırıkları
- Zıt (çapraz)bağlantılar kurulması
 - Aynı veya zıt ipliklerdeki bazlar arasında
 - DNA ve protein molekülleri arasında (örn. Histonlar)





Mutasyonlar

- Mutasyon DNA dizilerinde meydana gelen kalıtsal değişikliklerdir
- Gen ürünü proteinin yapısında değişikliğe yada o proteinin hiç yapılmamasına yada hücre veya organizmada kısmi bozukluğa neden olabilir.

Mutasyon nedir?

- Mutasyona uğramış oranimza yada hücreye mutant denir.
- Normal hücreye ise “wild type” veya “yabani tip” denir.

Mutasyonlar nasıl oluşur

1. Spontan (kendiliğinden)
2. İndüklenebilir (yapay-yönlendirilmiş)

Spontan mutasyonlar

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

İndüklenebilir mutasyonlar

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

Mutasyon Tipleri

1. Gen mutasyonları

a. Tek baz değişimleri

Yanlış eşleşme (Missense mutation)

Anlamsız mutasyon (Nonsense mutation)

Sessiz mutasyon (silent mutation)

b. Kırpılma yeri mutasyonu

2. Kromozom Yapı-Sayı değişikliği mutasyonları

a. Nukleotid katılım veya çıkarım mutasyonları

b. Duplikasyonlar

c. Translokasyonlar

Tek baz değişimleri

- Bir bazın bir diğeri ile yer değiştirmesi

Transisyon: purin, purin bazı ile pirimidin bir diğeri pirimidin bazı ile yer değiştirmesi

Transversiyon: bir purinin pirimidin bazı veya tam tersi şekilde yer değiştirmesi durumudur

Yanlış eşleşme (mismatch) mutasyonları

Orak hücre anemisinde 17. nukleotidte A yerine T geldiğinde glutamik asid valine dönüşür.

- GAG-----Glutamik asid
- GTG-----Valin

Anlamsız (Nonsense) mutasyon

- Bazı nukleotid değişimleri anlamsız kodon(sonlandırıcı=stop kodonları) ortaya çıkmasına neden olur
- TAA, TAG veya TGA
- Kısa disfonksiyonel proteinler oluşur
- Örn. Kistik fibrozda

CAG -----TAG

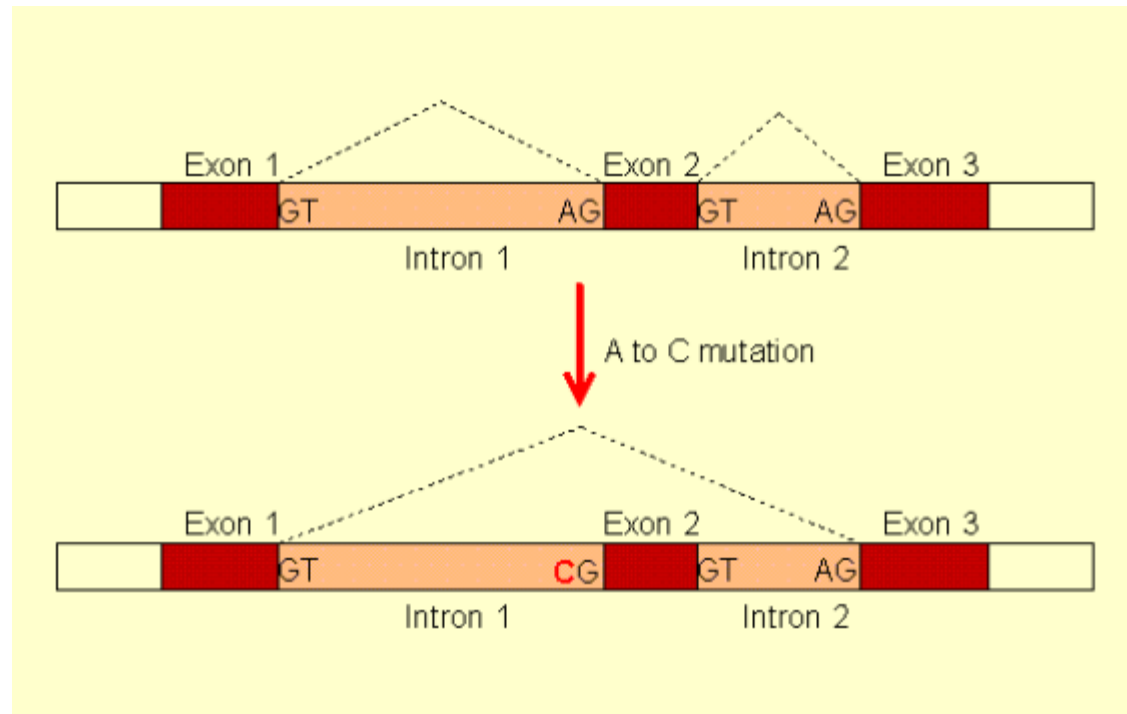
Glutamin -----Sonlandırıcı kodon

1480aa yerine 493aa lik fonksiyonsuz protein oluşur.

Sessiz-sinonim (silent-synonymous) mutasyon

- Bazı aa.'ler birden fazla kodona sahiptir.
- Serin TCT, TCA, TCC, TCG

B. Kırılma yeri mutasyonları



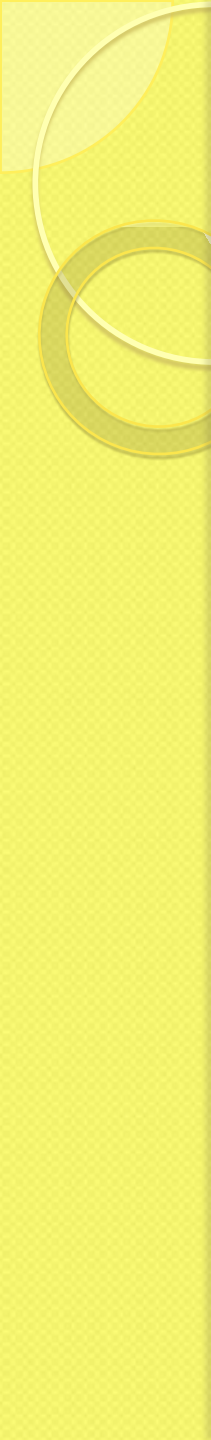
İnversiyon-delesyon

- Ekstra bir baz çiftinin veya nukleotid dizisinin eklenmesi inversiyon, çıkarılması ise delesyon adını alır.
- Sayı değişikliği bir ile binlerde nukleotid arasına değişir

Çerçeve kayması (Frameshift)

- İnsersiyon ve delesyonlar translasyon sırasında kodon kaymasına ve farklı okumaya neden olan çerçeve kaymasına neden olur.



- 
- Çerçeve kayması bazen yeni bir sonlandırıcı kodon oluşmasına neden olarak yeni bir anlamsız mutasyon oluşur ve fonksiyonel olmayan kısa proteinler oluşur.

Frajl X Sendromu

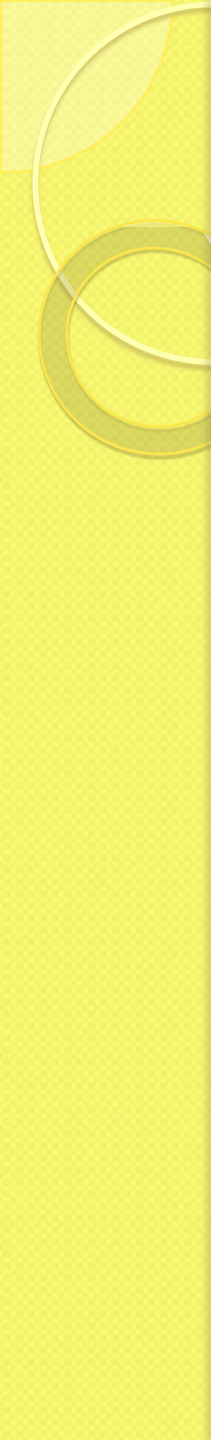
- İnsanda X kromozomunun bir lokusunda CGG tripleti çok sayılarda tekrarlanır. Yaklaşık olarak 4000'den fazla.
- Bu olay X kromozomunu kırılğan yapar ve mental gerilik ile seyreden ciddi bir genetik hastalık tablosu oluşur.

Kromozomal tranlokasyonlarr

- Burkitt Lenfoması
- Kromozom 8 ve kromozom 4 arasında translokasyon gerçekleşir.
Philadelphia kromozomu oluşur.

Somatik-Germ hücre mutasyonları

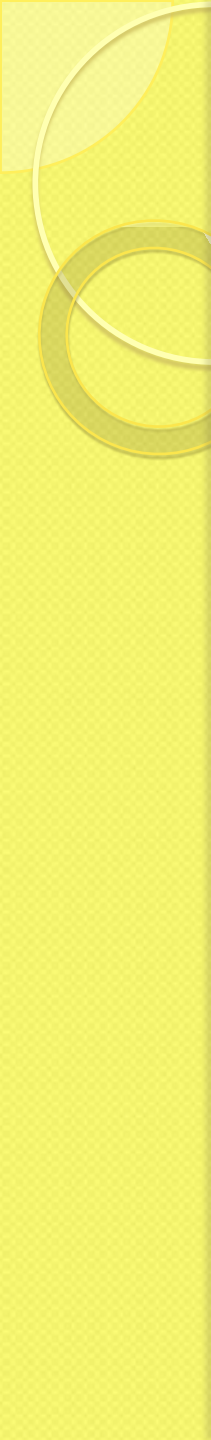
- **Somatik mutasyonlar** hücre hasarına, kanser hücresi oluşumuna ve hücre ölümüne neden olabilir.
- Oluştuğu hücre ile sınırlıdır
- **Germ hücre mutasyonları**
- Dölden döle geçer



DNA Tamiri ve mekanizmaları

DNA üzerindeki hasarlı bölgeler 3 genel mekanizma ile düzeltilir

- 1. Hatalı eşleşmenin tamiri ile
- 2. Baz çıkarımı ile
- 3. Nukleotid çıkarılması ile



İlgili mekanizma	Problem
Hatalı eşleşmenin tamiri	Kopyalama hatası (1,2 veya 5 bazlık hatalı eşleşmeden dolayı DNA'daki hasar
Baz çıkarımı	Spontan, kimyasal veya radyasyon etkisi ile tek bazdaki hasar
Nukleotid çıkarımı	Spontan, kimyasal veya radyasyon etkisi ile bir DNA segmentindeki hasar

DNA tamir sendromları

- Tamir mekanizmasına katılan enzim veya proteinlerin gen defektlerine bağlı olarak insanda otozomal ressesif kalıtım gösteren DNA tamir sendromaları vardır.
- Xeroderma pigmentosum (XP)
- Ataxia telangiectasia
- Fanconi anemia

Xeroderma pigmentosum (XP)

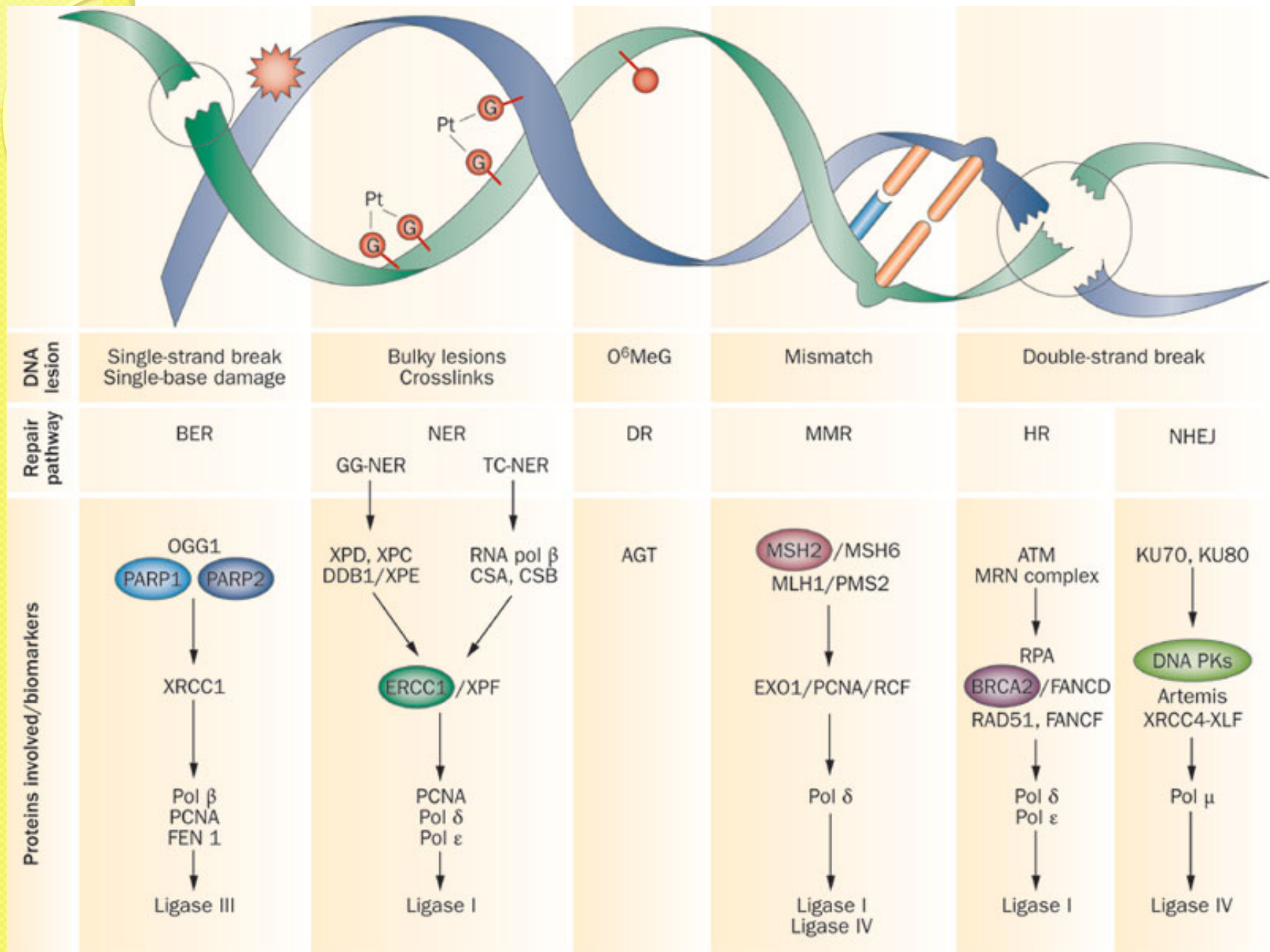
- UV ışık hassasiyetine bağlı olarak oluşan ve hasarlanan DNA'nın onarılamaması, bozuk eksizyon enzimi ve bozuk helikaz enzimi. Bu sendroma yok açan DNA tamir genlerinden bazıları aşağıdaki gibidir.
- XPA Hasarı tanıma enzimi
- XPB Helikaz
- XPC DNA'ya bağlanan proteinler
- XPD Helikaz
- XPF 5' nukleaz
- XPG 3' nukleaz

Ataxia telangiectasia

- İyonizan radyasyon (X-ışını) sonucu oluşan mutasyonun onarılamaması
- Kas kontrol kaybı
- İmmun sistem bozuklukları
- Kansere yatkınlık

Fanconi anemia

- UV ve bazı kimyasallar nedeniyle DNA hasarının meydana gelmesi ve eksizyon enzim eksikliği nedeniyle onarılamaması
- Azalmış kan hücre sayısı
- Kalp ve böbrek malformasyonları
- Kansere ve kromozom anomalilikleri



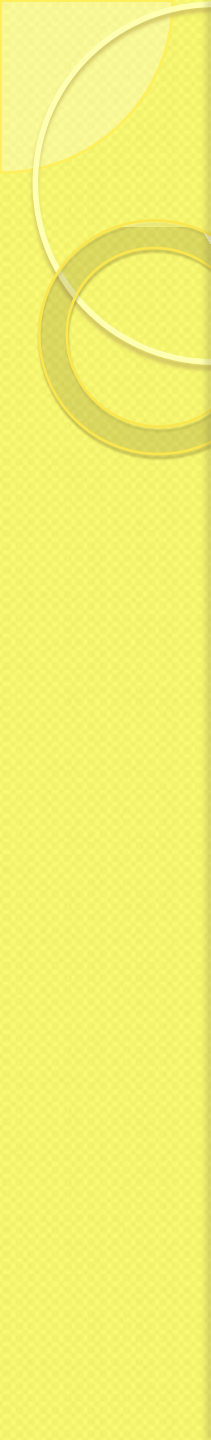
DNA Tamir mekanizmaları

1. Tek zincir kırıklarının tamiri

- 1 Direkt tamir mekanizmaları
 - 1.1 Fotoreaktivasyon
 - 1.2 O⁶-Metilguanin Tamiri
 - 1.3 Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu
- 2 Kesip-Çıkarma Tamirleri(Ekzisyon)
 - 2.1 Baz eksizyon tamiri (BER)
 - 2.2 Nükleotid Eksizyon Tamiri (NER)
 - 2.2.1 Nükleotid eksizyon tamir genleri
 - 2.2.2 Nükleotid eksizyon tamir mekanizması
 - 2.2.3 Transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizması
 - 2.3 Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)
- 3 Rekombinasyon tamir
- 4 SOS tamiri

2.Çift zincir kırıklarının tamiri

- Homolog rekombinasyon
- Homolog olmayan rekombinasyon – NHEJ-Serbest uçların homolog olmayan bağlanması (Non-Homologous End-Joining)

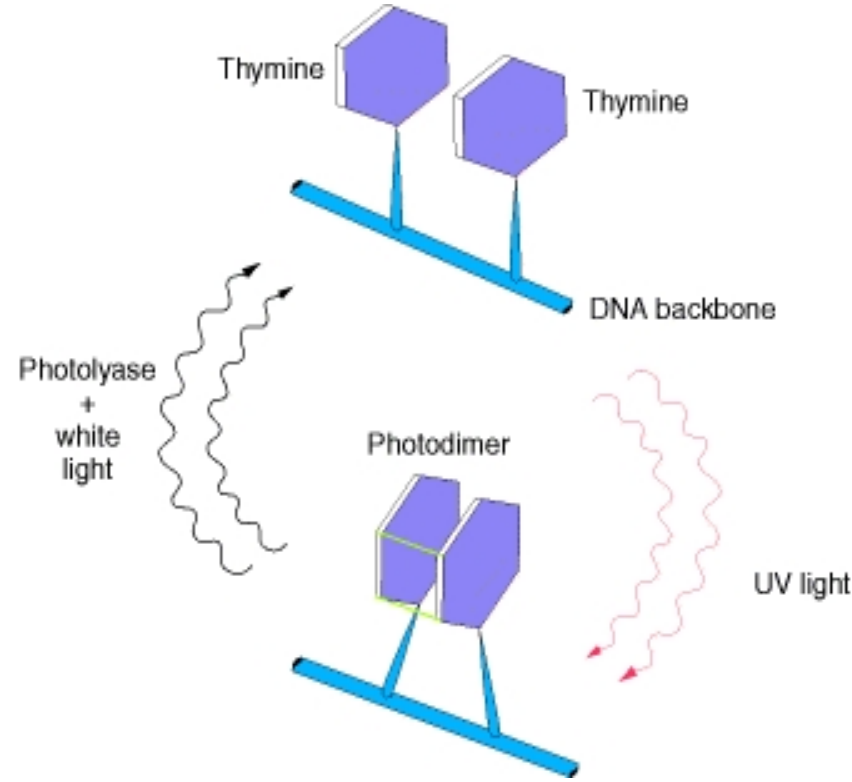


1.Tek zincir kırıklarının tamiri

Doğrudan tamir mekanizmaları

Fotoreaktivasyon

- UV ile meydana gelen mutasyonları içeren hücreler, mavi spektrum (300–500 nm) içeren görünür ışığa maruz bırakıldıklarında, geriye dönüşüm yapıp düzelir. Bu olaya *fotoreaktivasyon* denir.
- Işık (300–500 nm) ve 'DNA Fotoliaz' enzimi aktive olarak bu dönüşümü gerçekleştirir. Ökaryotik canlılarda bu enzim bulunmamaktadır.



O⁶-Metilguanin Tamiri

- O⁶-Metilguanin (mG) alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir.
- O⁶-Metilguanin-DNA, metil guanin-DNA metiltransferaz (MGMT) enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein kalıntılarına transfer ederek normal Guanin oluşumunu sağlar.
- Örn. Ecoli'de Ada enzimi

Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu

- 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

Kesip-Çıkarma Tamirleri (Ekzisyon)

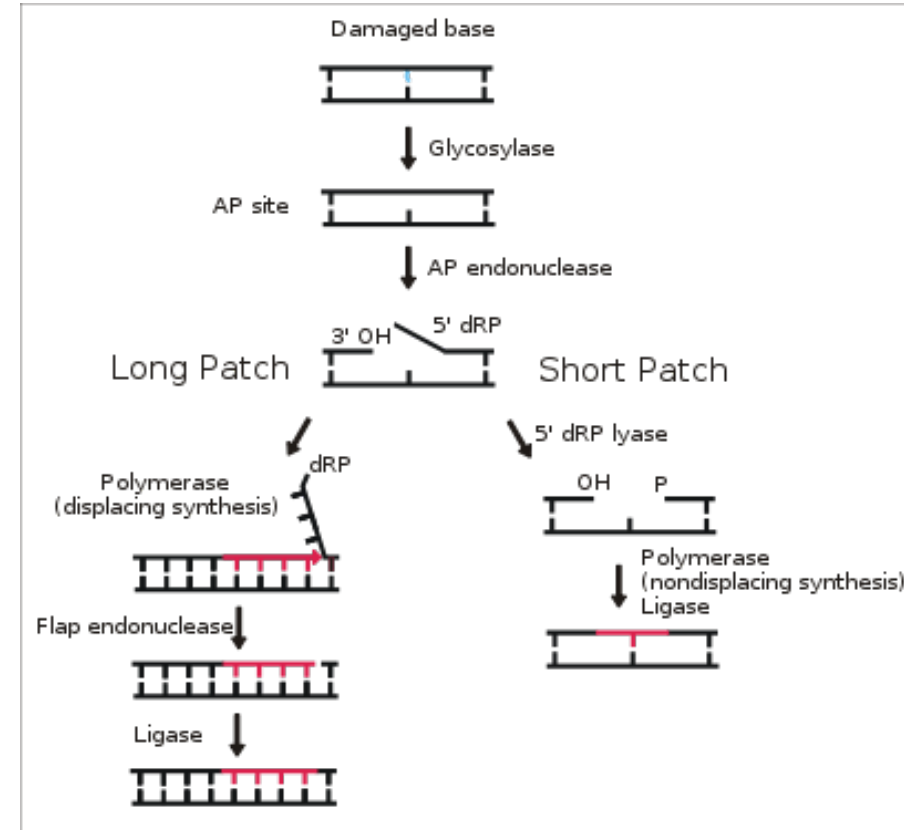
- Tüm prokaryot ve ökaryot organizmalarda bulunan bu tip tamir sistemi 3 temel basamak içerir:
 1. Hasar veya hata tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesip çıkarılır.
 2. DNA polimeraz oluşan boşlukları doldurur.
 3. DNA Ligaz son bağı kurar ve boşluk tamamen kapanır.

Baz Eksizyon Tamiri (BER)

DNA bazlarının doğal hidrolizi veya kimyasal ajanlar nedeni ile oluşan uygun olmayan bazların tamiri ile ilgilidir. 1-5 bazlık hasarlı bölgenin çıkarılması.

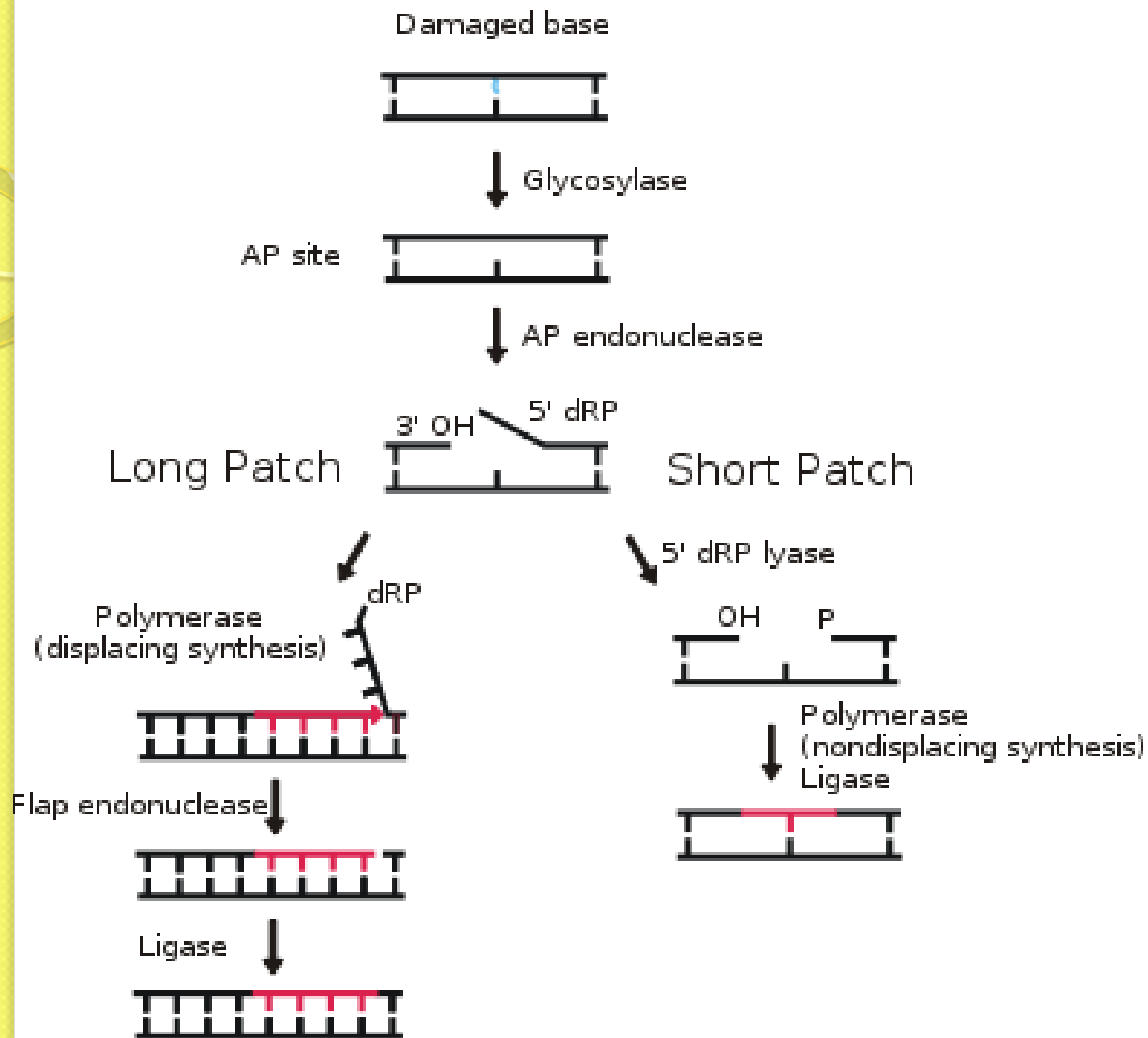
BER'de görev alan enzim

DNA glikozilazdır.



BER

- Spontan veya kimyasallarla olan deaminasyonun neden olduğu hasarlar
- iyonize radyasyon
- oksidatif hasar sonucu oluşan baz değişikliklerine spesifiktir (urasil, hipoksantin, 3-metiladenin vb.).



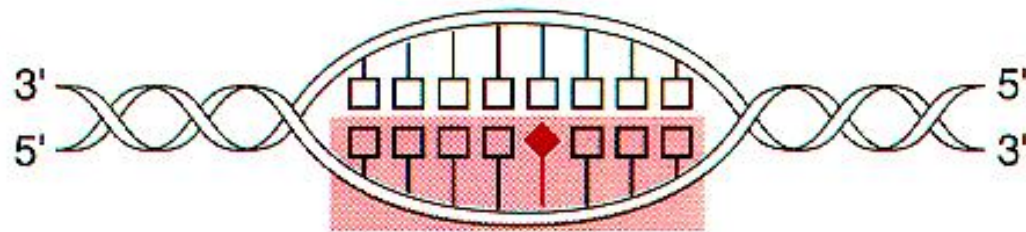
BER basamakları

1. DNA glikozilaz hasarlı baz ile nukleotidin şeker komponenti arasındaki beta-N-glikozidik bağı kırar ve bazı, polinukleotitten ayırır.
2. DNA glikozilaz bazı ayırdıktan sonra oluşan bölgeye AP bölgesi (bazsız alan) denir. AP endonukleaz enzimi, AP bölgesinin 5' yönündeki fosfodiester bağı keser ve zincirde GAP=boşluk oluşur.
3. Tek nukleotidlik boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulur.
4. Boşluk doldurulduktan sonra DNA ligaz tarafından fosfodiester bağı yapılır.

BER tarafından onarılan baz hasarları

- **Okside bazlar:** 8-oxoguanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG, FapyA)
- **Alkillenmiş bazlar:** 3-methyladenine, 7-methylguanine
- **Deaminasyona uğramış bazlar:**
 - adeninin deaminasyonu ile oluşan **hypoxanthine**.
 - Guaninin deaminasyonu ile oluşan **Xanthine**. (metil sitazinin deaminasyonu ile oluşan timin ürünlerini tanımak çok zor olduğundan bunlar mismatch-spesifik glikozilazlar ile onarılabilir.
 - DNA'ya yanlışlık ile bağlanan veya sitozinin deaminasyonu ile oluşan **Urasil**

BASE EXCISION REPAIR

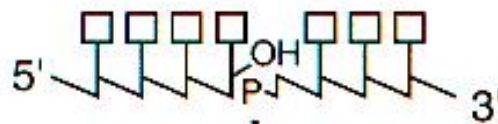


DNA glycosylase ↓ ①

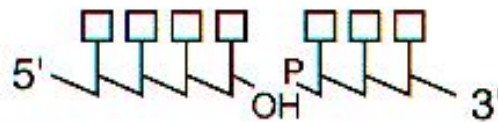


Free base excised

5' AP endonuclease ↓ ②

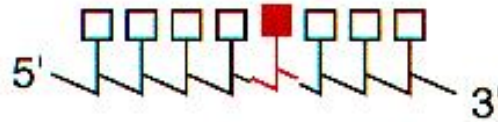


dRpase ↓ ③



+ P-OH

DNA polymerase + DNA ligase ↓ ④



Nukleotid Eksizyon Tamiri (NER)

DNA'nın sarmal yapısında geniş bozulmalara neden olan DNA lezyonları NER sistemi ile onarılır. Hasara spesifiktir. Daha uzun nukleotid hasarı tamir edilir (30 bazlık dizinin çıkarılması)

Örneğin;

UV kaynaklı pirimidin dimerleri, sigara nedenli benzopiren-guanin gibi baz değişimleri, kemoterapötik ilaçlarla oluşan baz değişimleri.

BER'de bazlar tek olarak kesip çıkarılırken,

NER'de hasarlı bazlar oligonükleotid parçaları olarak kesip çıkarılır.

Prokaryotlarda anahtar enzimatik kompleks ABC ekzonükleazdır. 3 altünitesi vardır.:

- uvr A,
- uvr B,
- uvr C

Nukleotid Eksizyon Tamiri (NER)

Sistem prokaryotlarda şu şekilde işler;

uvr A - uvr B kompleksi hasarı tanır

uvr A ayrılır, uvr C - uvr B kompleksi oluşur

uvr C; hasarın 3' ucuna 4–5 nükleotid, 5' ucuna 8 nükleotid uzaktan çentikler açar.

DNA helikaz (uvr D) bu 12–13 nükleotidlik parçasını uzaklaştırır. İnsanda NER mekanizması çok daha karmaşıktır.

Nukleotid Eksizyon Tamiri (NER)

Ökaryotlarda;

İnsanda NER mekanizması çok daha karmaşıktır.

Bu sisteme 9 ana protein katılır. Bu proteinlerin eksikliği ciddi hastalıklara neden olur.

Örneğin,

XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, and XPG proteinlerin eksikliği xeroderma pigmentosum sendromuna

CSA ve CSB proteinleri ise Cockayne sendromu ile ilişkilidir.

Bu majör proteinlerin yanı sıra ERCC1, RPA, RAD23A, RAD23B, proteinlerde bu sisteme katılır.

Nukleotid Eksizyon Tamiri (NER)

- **A. Hasarın tanınması**

XPC, XPA, XPE 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.

Nukleotid Eksizyon Tamiri (NER)

- **C. Hasarlı bölgenin çıkartılması**

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

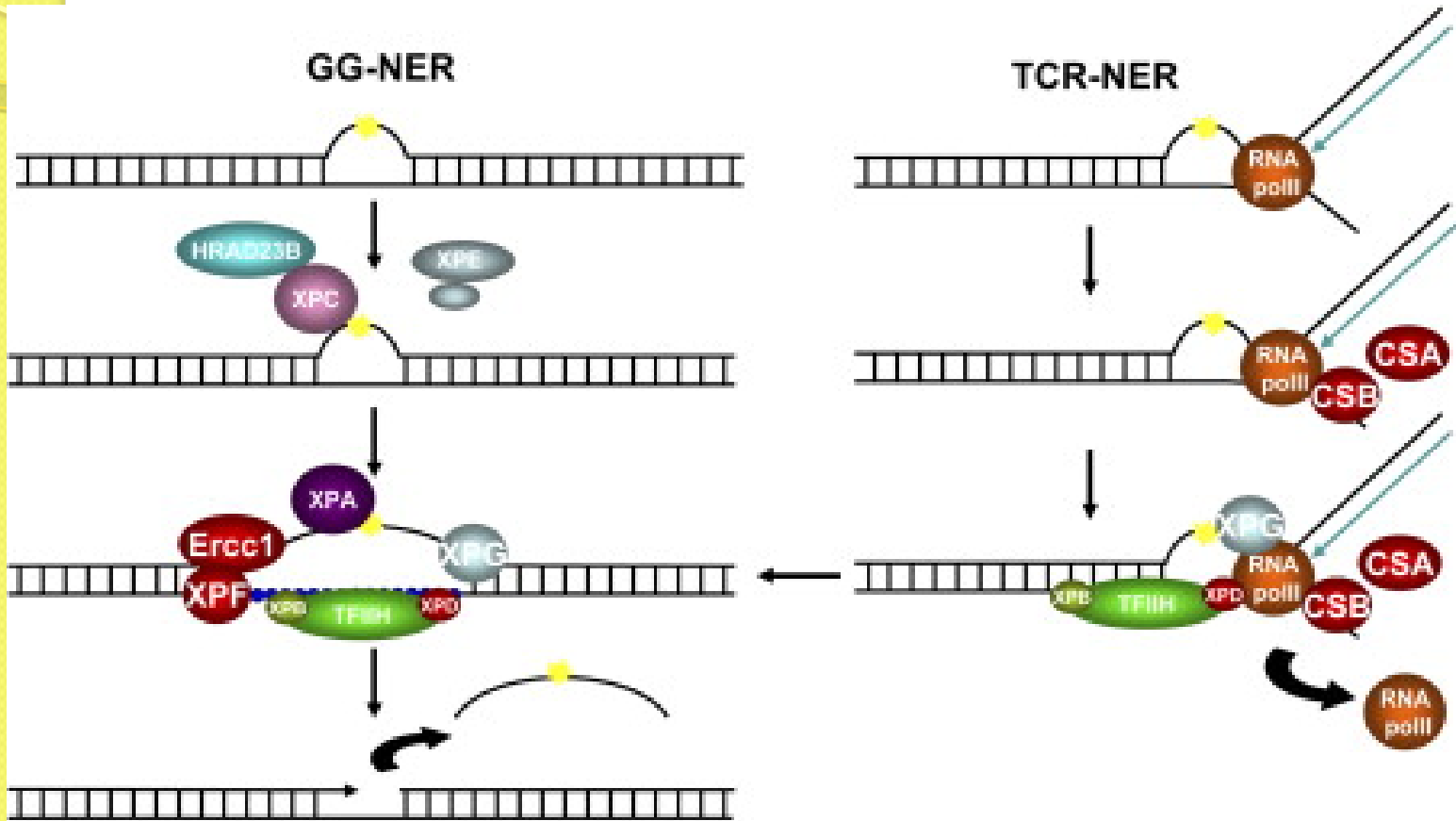
- **D. Boşluk doldurulması ve ligasyon**

Boşluğun doldurulmasında RPA, RFC, PCNA, DNA polimeraz delta ve epsilon rol oynar.

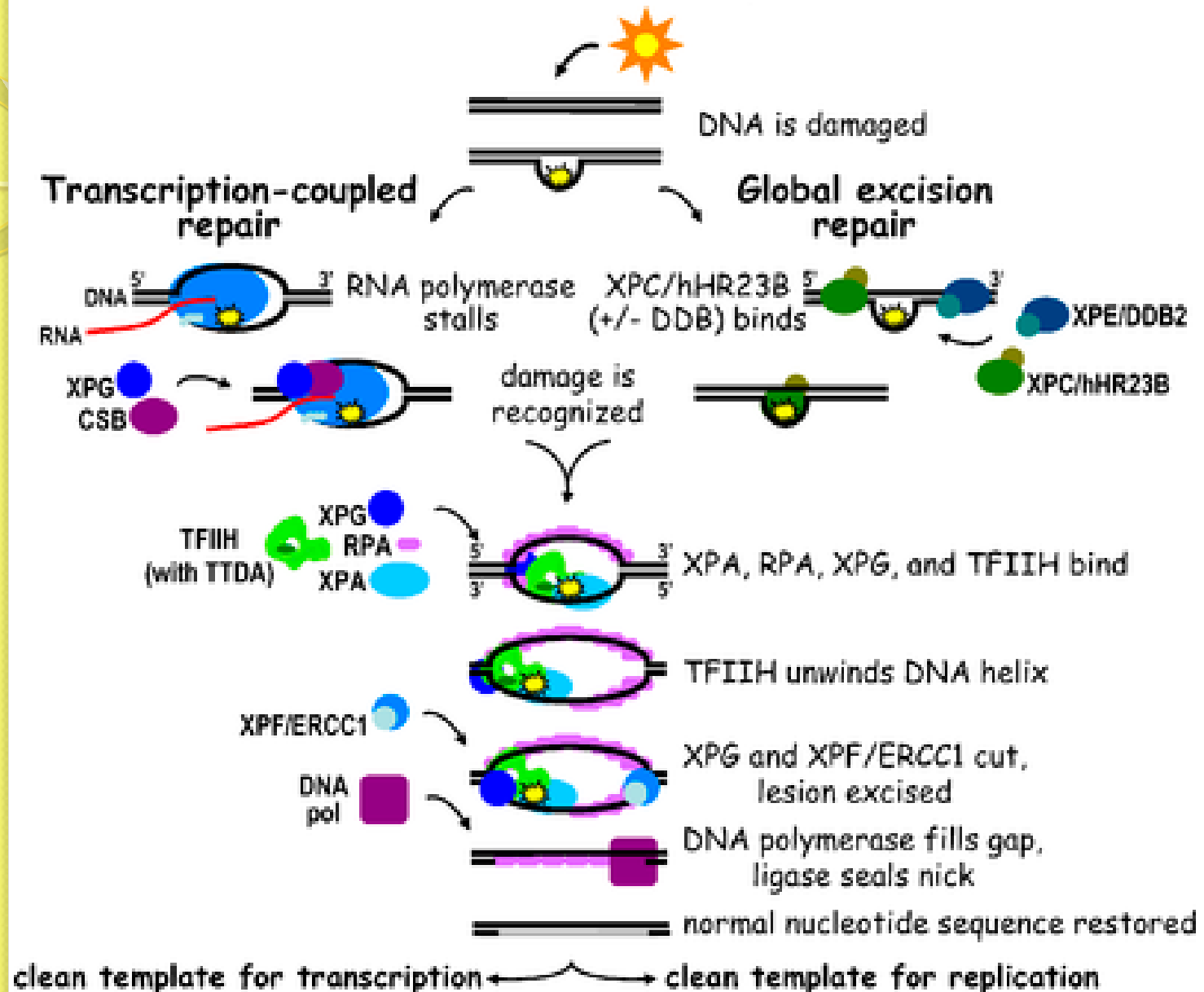
DNA ligaz ile ligasyon gerçekleşir.

NER iki yola ayrılır:

1. Global genom NER (GG-NER)
2. Transcription-coupled NER (TC-NER), Lezyonları açısından diğerinden farklıdır.



Nucleotide Excision Repair



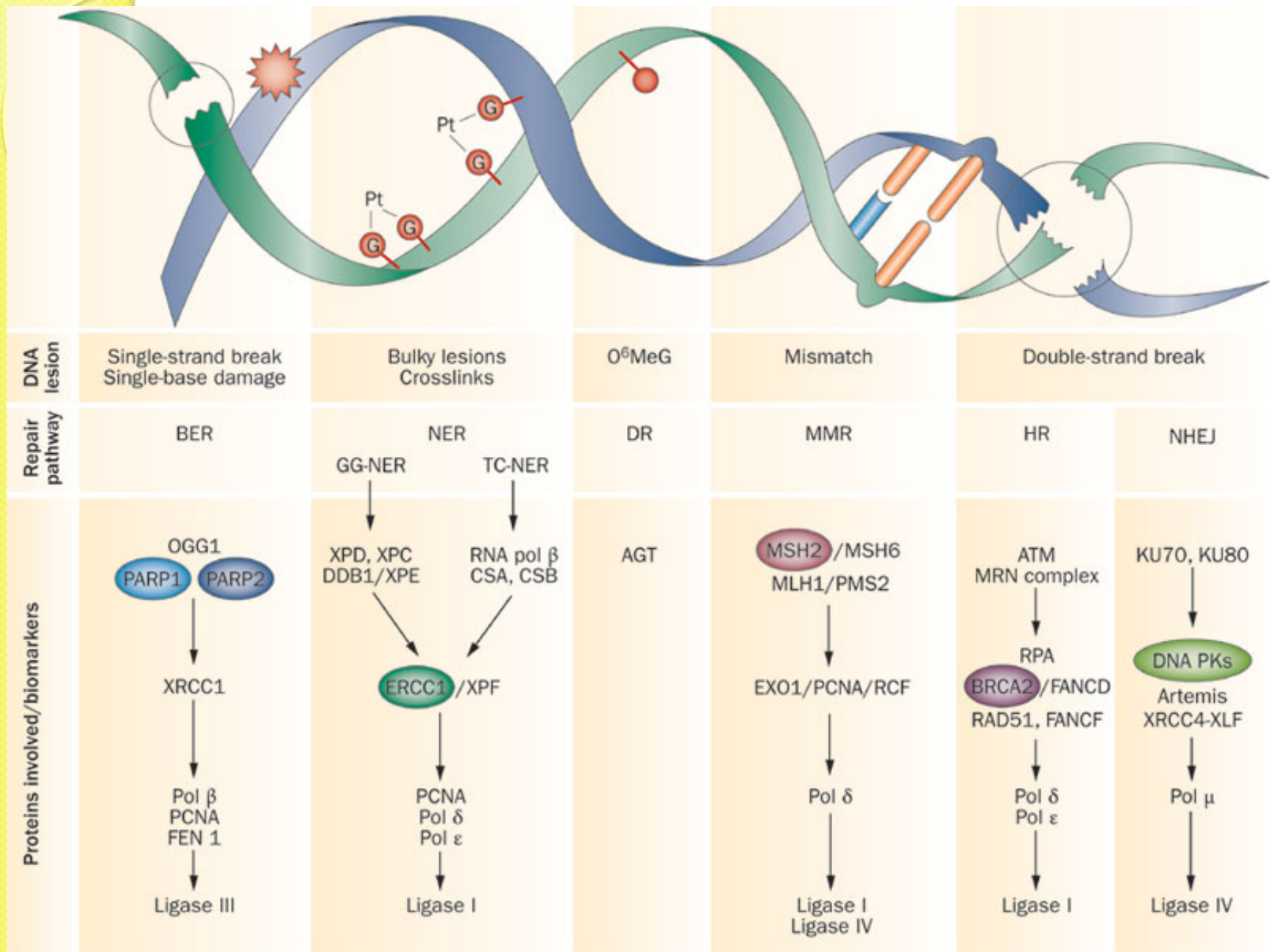
Global Genom Onarımı

Global genomik NER, hem transkribe hem untranskribe DNA zincirlerin aktif ve inaktif genlerindeki hasarları onarırlar. Bu işlem transkripsiyona bağlı değildir.

Bu yol genomu sürekli tarayan ve hasarı tanıyan DNA-damage binding (DDB) and XPC-Rad23B komplekslerini içeren hasar bulma proteinleri görev yapar.

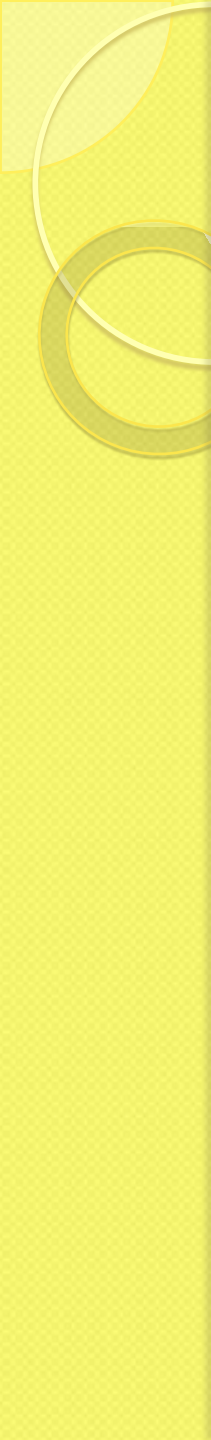
XPC-Rad23B kompleksi bozukluğu tanımadan sorumludur, DDB1 ve DDB2 (XPE) UV ışık tarafından oluşturulan bazı hasarların tanınmasında etkilidirler.

Hasarın tanınmasının ardından onarım proteinleri gelir lezyonun etrafını sararak hasarlı bölgeyi çıkarır ve tekrardan doldurur.



Transkripsiyonla Birleştirilmiş (TCR) Tamir

- Transkripsiyon sırasında RNA polimeraz II, DNA zincirinde hasarla karşılaştığında RNA sentezi durur ve TCR yolu bu hasarın tamirinde rol oynar.
- TCR mekanizmasında, GGR yolundan farklı olarak hasarın tanınma basamağında CSB proteini rol oynar.
- CSB proteini, RNA polimeraz II'yi ubiquitin ile birleştirerek parçalanmasını ve böylece TFIIH, XPA ve RPA proteinlerinin hasarlı bölgeye ulaşmasını sağlar.
- TCR yolundaki diğer basamaklar GGR yolundaki basamaklar ile aynıdır.

- 
- NER mekanizmasında rol alan proteinlerdeki bozukluklar sonucunda bazı nadir görülen hastalıklar tanımlanmıştır;
 - Xeroderma pigmentosum (XP proteinleri)
 - Cockayne sendromu (CSA-CSB)
 - Trikotiyodistrofi (XP proteinleri)

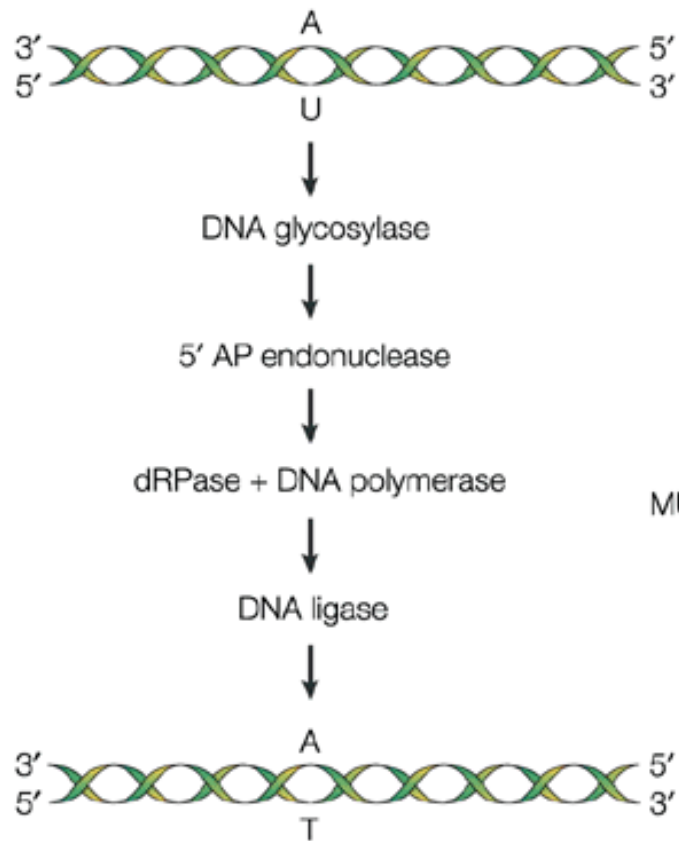
Mismatch (Yanlış eşleşme) tamiri

- Bu tamirde hatalı baz eşleşmesinin tanınması önemlidir.
- E.coli bu sorunu metilasyon modifikasyonu ile çözmüştür.
- Replikasyon için kalıp zincir metilasyon modifikasyonu taşır, yeni sentezlenen ve hatalı baz taşıyan zincirde bu yoktur.
- GATC-3' dizilerindeki adenin 6-metiladenine dönüşür.

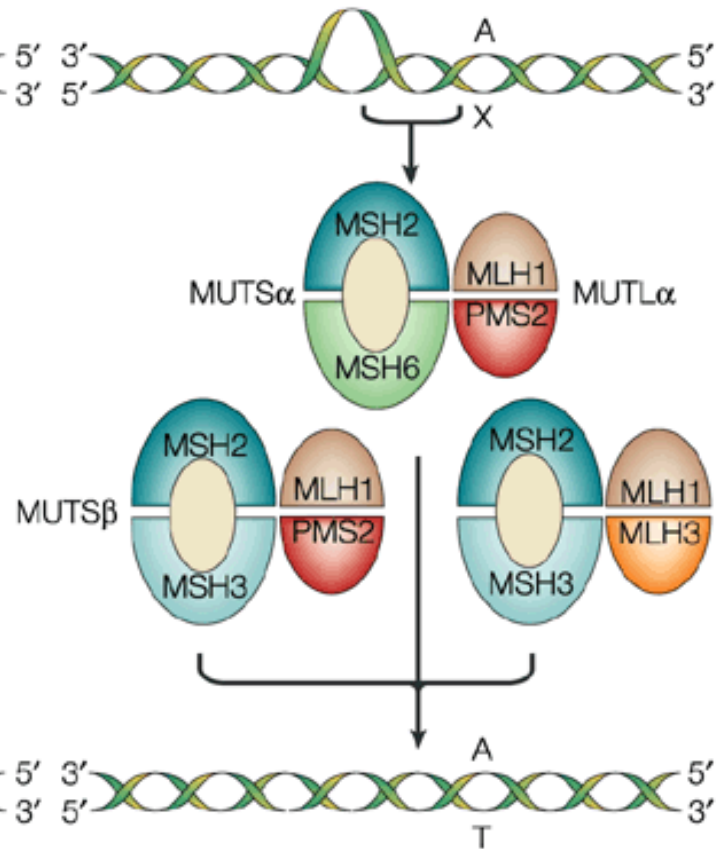
Mismatch (Yanlış eşleşme) tamiri

- DNA polimeraz, replikasyon sırasında hata okuma (proofreading) yeteneğine sahiptir. Mismatch eksizyon tamiri, hata okuma sonrası bile kalan yanlış eşleşmeleri tamir eden mekanizmadır.
- Prokaryotlarda **MutS** yanlış eşleşmeyi algılar
- MutL nin bağlanması ile kompleks kararlılık kazanır ve loop oluşur. MutS-MutL kompleksi MutH yi aktive eder.
- MutH yakın bölgedeki metile olmamış GATC polindrom dizisine metil grubu ekler ve karşı zincirde kesik oluşturur.
- UvrD (Helicase II) proteini kesip-çıkarma işlemine yardımcı olur.
- DNA pol boşluğu doldurur ve DNA ligaz yapıştırır.

a Base excision repair



b Mismatch repair

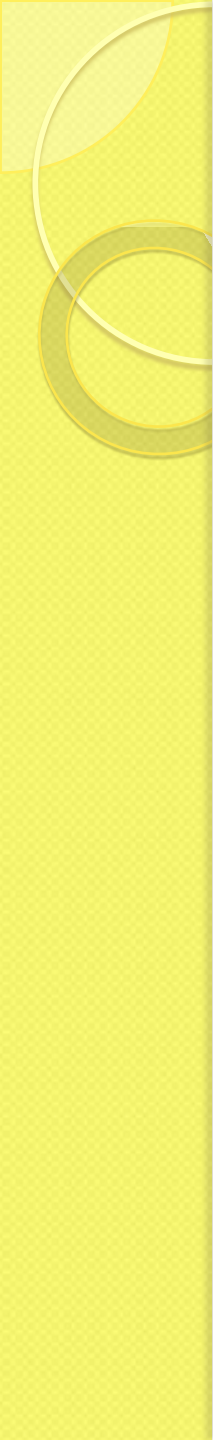


Mismatch (Yanlış eşleşme) tamiri

- Ökaryotlarda MutS ve MutL'nin homologları rol oynar
- MutH'nin homologu yoktur.
- MutS
 - hMSH2
 - hMSH3
 - hMSH6
- MutL
 - hMLH1
 - hMLH3
 - hPMS1
 - hPMS2

Mismatch (Yanlış eşleşme) tamiri

- HNPCC (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer)
- Otozomal dominant
- Mismatch tamir mekanizması bozuktur.



2. Çift zincir Kırıklarının Onarımı

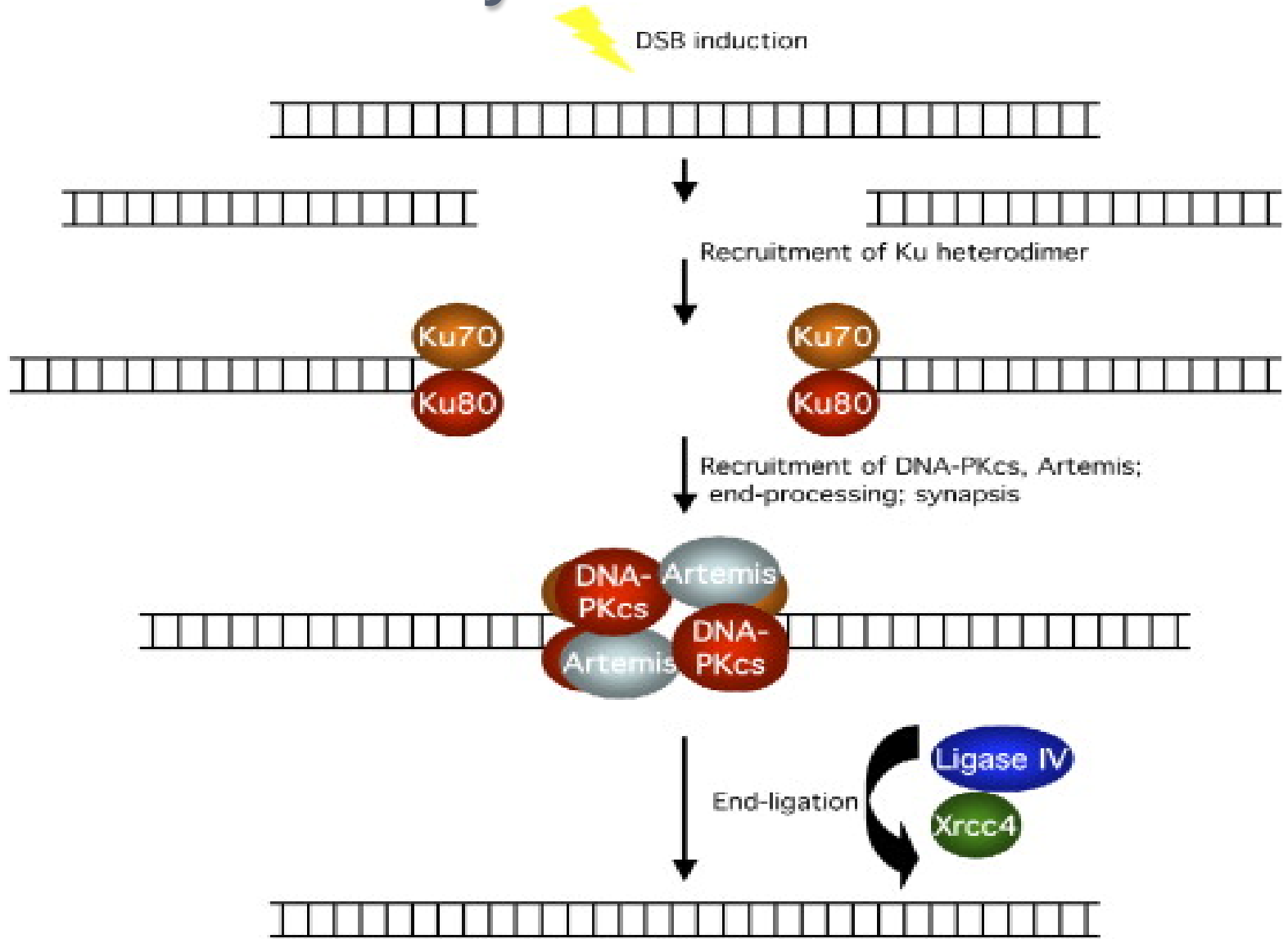
Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

- İyonize radyasyon, oksidatif hasar sonucu veya doğal oluşan DNA çift zincir kırıkları iki şekilde tamir edilir;
 1. Non-homolog uç birleştirme (non-homolog end joining) (NHEJ)
 2. Homolog rekombinasyon
- - Kromatin yapısında değişimler - Dna-Protein etkileşimleri - Protein-Protein etkileşimleri

Homolog olmayan rekombinasyon-NHEJ

- Hızlı ve hataya meyilli bir sistemdir.
- Ku 70-Ku 80 kompleksleri DNA kırık uçlarına bağlanırlar.
- DNA bağımlı-protein kinaz aktive olarak diğer proteinlerin hasar bölgesine gelmelerini sağlar.
- Bu protein komplekslerinin formasyonu DNA ligaz IV-XRCC4 kompleksinin kırık uçları bağlamasını sağlar.

Homolog olmayan rekombinasyon-NHEJ



NHEJ'lerin görevleri

1. Alan spesifik çift zincir kırıklarının onarımı
2. Telomer bakımı
3. Genomik stabilite bakımı

- NHEJ tamir yolundaki hataların çeşitli kanserler ile ilişkili translokasyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Burkitt lenfoma KML – Philadelphia kromozomu. Homolog rekombinasyonda görev alan BRCA1 ve BRCA2 genlerinde olan mutasyonlar ile meme ve rahim kanserleri arasında ilişki bulunmuştur.

Homolog Rekombinasyon

- RAD ve BRCA genleri tarafından yönlendirilir.
- MRE11-RAD50-NBS1 kompleksinin nükleaz aktivitesi ile kırık uçlar degradasyona uğrar.
- RAD 52 proteini 3' uçlara bağlanır.
- RAD 51- BRCA 2 kompleksi, homolog kromozom ile rekombinasyon oluşturmak üzere kardeş kromatid zincirinin hasar bölgesine invazyonunu sağlar.
- Bu zincir kalıp olarak kullanılarak sentez yapılır ve hasar onarılır (DNA polimeraz – DNA ligaz).

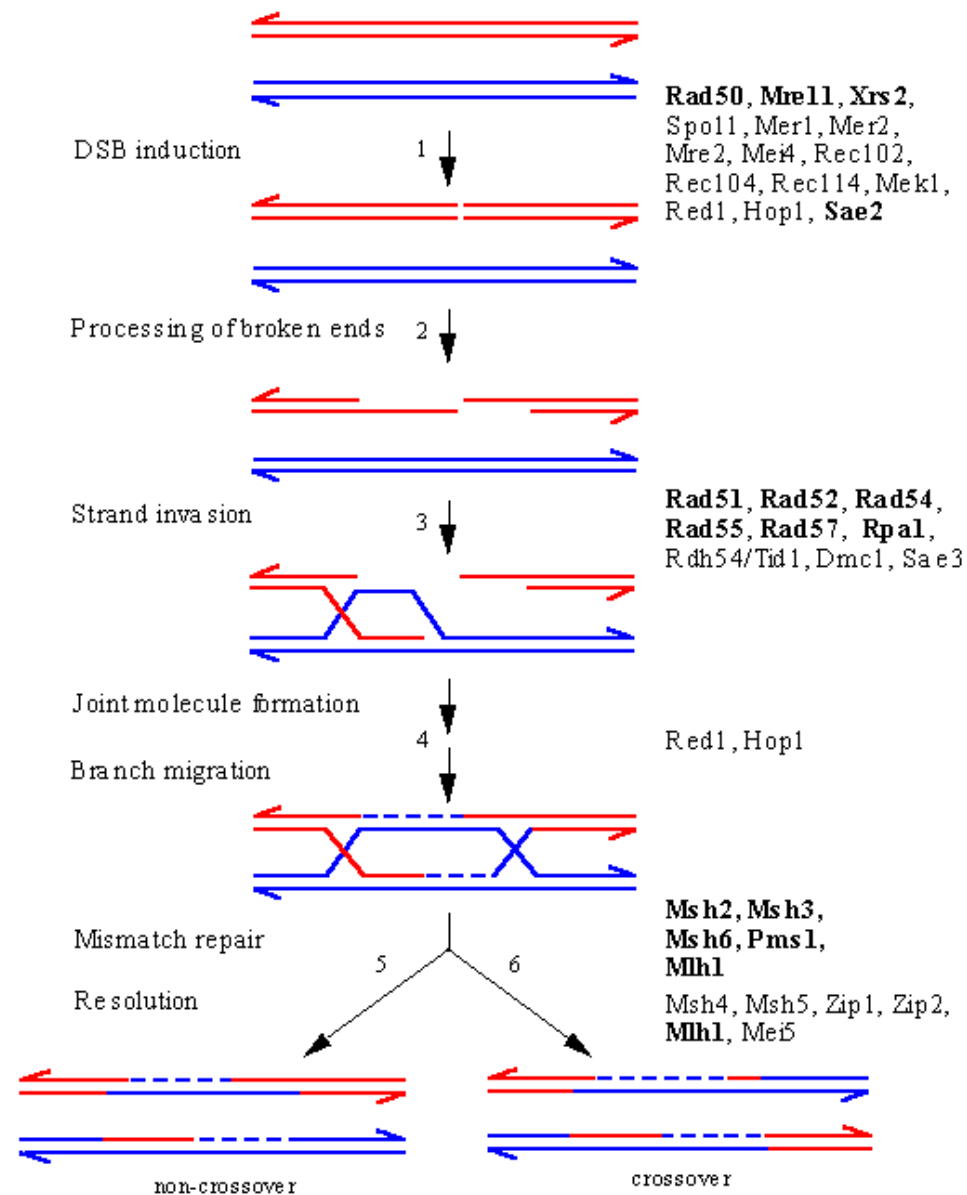
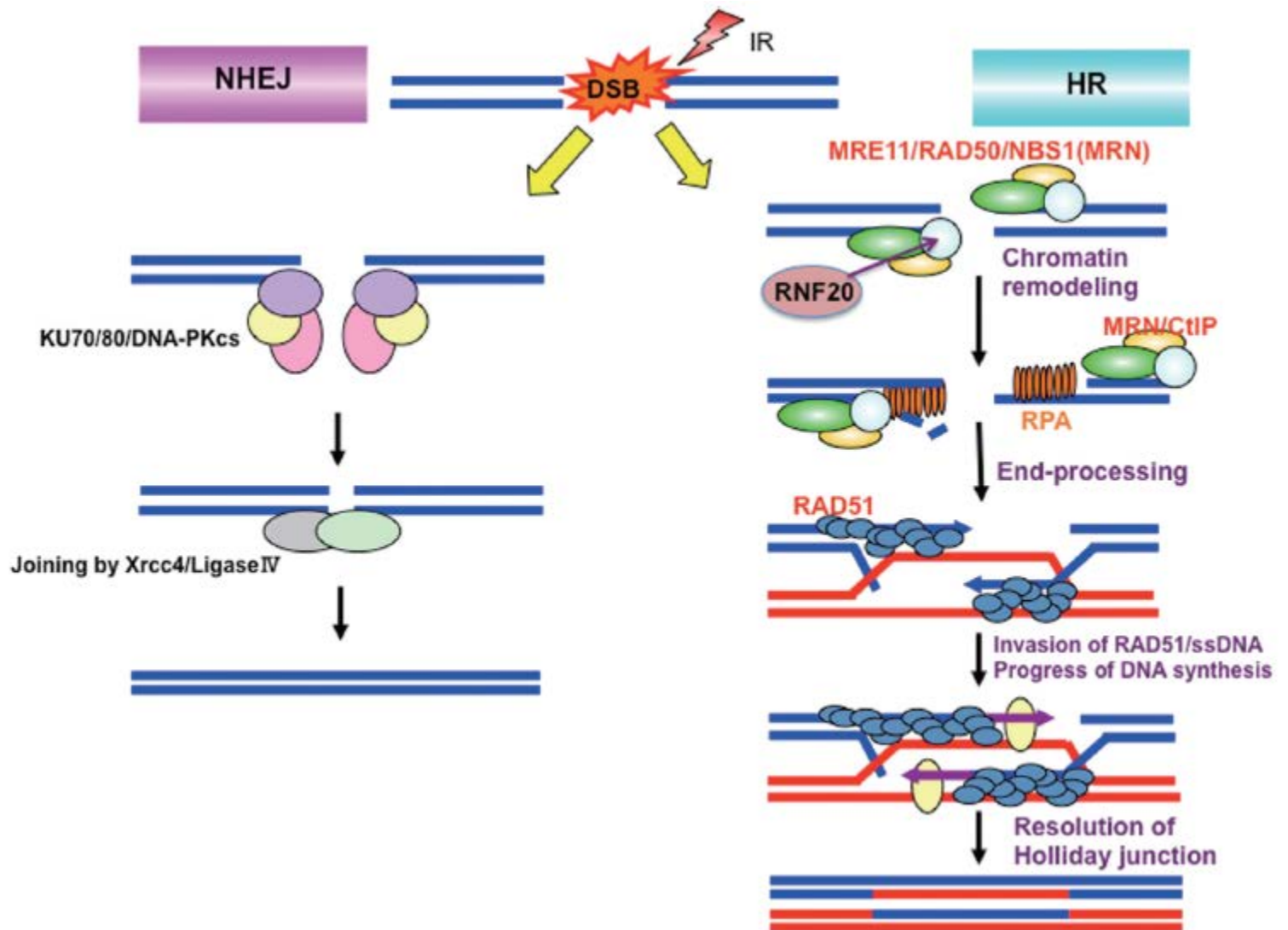


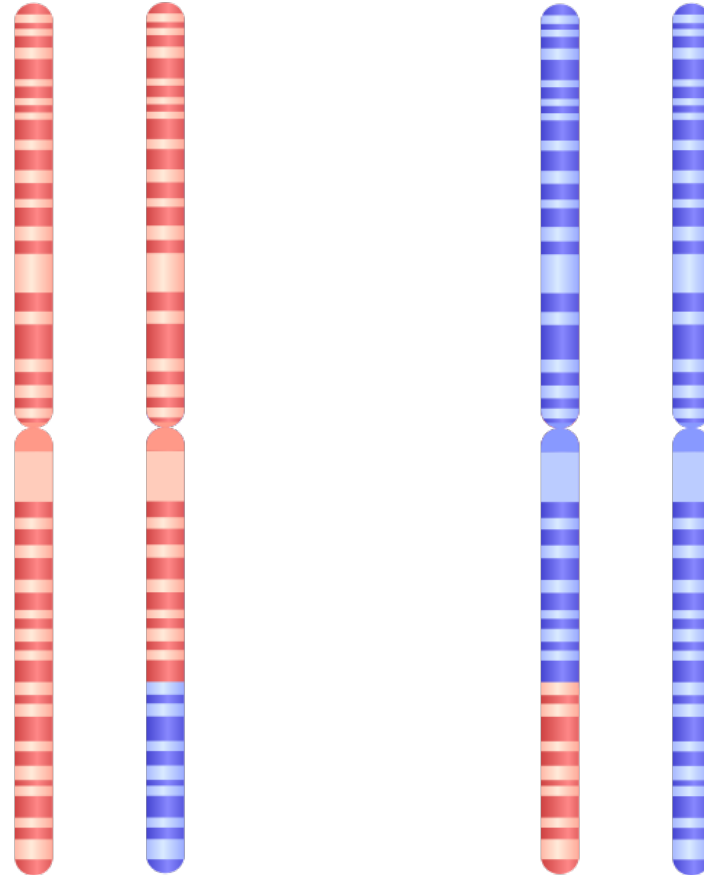
Figure 2



homolog kromozomlar

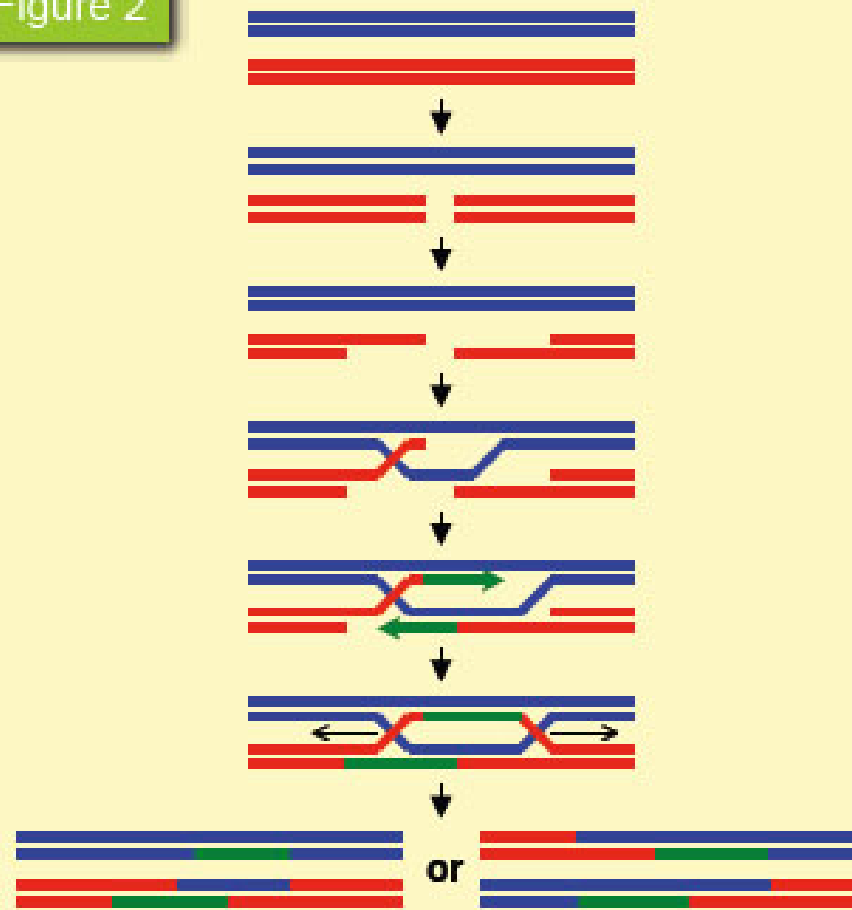
kardeş
kromatitler

kardeş
kromatitler



Rekombinasyonla yer değişme

Figure 2



**Homologous Recombination
(HR)**

HR ve NHEJ seçimi

Çift iplikli kırıklar homolog rekombinasyon veya homolog olmayan (non-homolog) uç birleştirme (NHEJ) ile tamir edilebilir.

NHEJ, homolog rekombinasyondan farklı olarak, onarıma kılavuzluk yapmak için uzun homolog bir diziye gerek göstermez. çift iplik kırıklarının tamiri için homolog rekombinasyon mu, NHEJ mi kullanılacağı hücre döngüsünün evresine bağlıdır.

*Kardeş kromatidlere kolayca erişilebildiği hücre döngüsünün S ve G2 evrelerinde homolog rekombinasyon aktif. Kardeş kromatidler birbirlerinin tam bir kopyası olduklarından homolog rekombinasyon için ideal birer substrattır, buna karşın homolog kromozomlar birbirlerine benzer olmakla beraber tıpatıp aynı değildirler.

*NHEJ ise G1 evresinde hakimdir, ondan sonra aşağıya ayarlanır ama tüm hücre döngüsü boyunca bir miktar etkinliğini sürdürür.