

MOLEKÜLER BİYOLOJİ II B208

Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

DNA HASAR TIPLERİ

- DNA molekülü, tıpkı diğer moleküller gibi, değişik kimyasal reaksiyonlara uğramaktadır
- Bununla beraber, DNA molekülü, hücre genomuna ait daimi kopyaya sahip olduğu için yapısında meydana gelecek bir değişiklik RNA'lar veya proteinlerin yapısında meydana gelecek değişiklikten çok daha önemli sonuçlar yaratmaktadır
- Mutasyon, DNA replikasyonu esnasında yanlış bazın zincire katılması sonucunda meydana gelebilir
- Bununla beraber, ya spontan bir şekilde ya da kimyasallarla, virüslerle veya radyasyon ile muamele neticesinde DNA molekülünde çeşitli kimyasal değişimler meydana gelebilir
- DNA'da oluşan bu tür hasarlar replikasyon veya transkripsiyonu bloke eder ve yüksek oranda mutasyona sebebiyet verebilir

DNA TAMİR MEKANİZMALARI

TAMİR EDİLMESİ GEREKEN DNA LEZYONLARI

Eksik baz	Pürinlerin asit veya ısıyla kaldırılması; değişikliğe uğramış bazların (uracil) DNA glycosylase ile kaldırılması
Değişikliğe uğramış baz	İyonize radyasyon (X-ray, cosmic veya gamma ışınları), alkilasyona sebep olan maddeler (ethylmethanesulfonate)
Yanlış baz	Yanlış yerleşen bazın 3'→5' exonuclease proofreading aktivitesini etkileyen mutasyonlar
Nükleotit eklenmesi veya çıkarılması sonucu oluşan şekil bozuklukları	Intercalating maddeler (acridine) rekombinasyon veya replikasyon esnasında nükleotitlerin eklenmesine veya çıkarılmasına sebep olurlar

TAMİR EDİLMESİ GEREKEN DNA LEZYONLARI

Bağlanmış pirimidinler	UV irradiation neticesinde cyclobutyl dimerleri (genellikle timin dimerleri) meydana gelir
Zincir kırılması	iyonize radyasyon veya kimyasal maddelerle fosfodiester bağlarının kırılması
Zincirlerin çapraz bağlanması	Alkilasyona sebep olan maddeler (mitomycin) iki zincirin kovalent bağlarla bağlanmasına sebep olur
3' deoksiriboz fragmanları	Zincir kırılıma neden olan serbest radikallerle deoksiriboz yapısının bozulması

**(1)
DNA hasarına sebep olan kimyasal reaksiyonun enzimatik geri dönüşümü****a) Photoreactivation (ışık varlığında tamir mekanizması)**

DNA **phytylase** enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir

b) -CH₃ veya -CH₂-CH₃ gruplarının açığa çıkarılması

O⁶-methylguanine methyl transferase enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir

DNA TAMİR MEKANİZMALARI**(1) DNA hasarına sebep olan kimyasal reaksiyonun direk geri dönüşümü**

- DNA polimeraz (3'-5' proofreading exonuclease aktivite)
- Photoreactivation
- CH₃ veya -CH₂-CH₃ gruplarının alınması

2) Hasarlı bazın alınarak yerine yeni sentezlenmiş DNA molekülünün konulması

- Excision Repair
 - Base excision repair (BER)
 - Nucleotide excision repair (NER)
- Mismatch repair
- Recombination repair
- Error prone repair (SOS TAMİR)

1a Fotoreaktivasyon

DNA molekülünün UV ışığı ile muamelesi neticesinde Ultraviyole (UV) ışığının rastgele fotonları, DNA omurgasında yer alan zincirde birbirine komşu **pirimidinler** (timin ve sitozin) arasında anormal bağlanma olarak kabul edilen kovalent dimerizasyonun (timin dimerleri, cyclobutane halkasını) meydana gelmesine neden olur

Bu lezyon DNA molekülün kendini kopyalamasına engel olacaktır ve hücre ölür!!!!

1a Fotoreaktivasyon

- **T-T dimerleri** replikasyona engel olur ve hücre bölünmesini durdurur
- *Hücre için ortaya çıkabilecek sonuçlar:*
 - Hücre oluşan hasarı onarıırken hücre bölünmesi durabilir ve hasar düzeltildikten sonra tekrar başlar (bakteriostatik etki)
 - Hücre canlılığı kaybeder ve artık çoğalamaz (bakterisidal etki)
 - Hücre onarımında bir hata yapar ve gende mutasyon taşır

1a Fotoreaktivasyon

Bu işlemden, gün ışığından (>300 nm) aldığı enerjiyi kullanan **DNA PHOTOLYASE** komşu iki timin arasındaki cyclobutane halkasını (T-T dimerleri) kırarak onları tekrar monomere dönüştürür

Bu enzimler mavi ışığı absorbe eden ve enerjiyi daha sonra parçalanacak olan cyclo-butane halkasına transfer eden **prostetik** gruplara sahiptir

1a Fotoreaktivasyon

Bu tip bir hasar, **FOTOREAKTİVASYON** olarak adlandırılan bir işlemle kolayca tersine çevrilebilir.

FOTOREAKTİVASYON, PİRİMİDİN DİMERLERİ için spesifik ve işlem **IŞIK-BAĞIMLIDIR** (UV-A → mavi ışık (360-420 nm))

Lezyonu doğrudan tersine çevirir ve hataya açık değildir

FOTOREAKTİVASYON işlemi **DNA PHOTOLYASE** (foto-reaktive edici enzim) tarafından katalize edilmektedir

1a Fotoreaktivasyon

Mechanism of Photoreactivation (Steps):

1. **Phytolase** binds to thymine dimer
2. FADH – absorb light
3. FADH – get excited
4. Release an electron (e⁻)
5. Electron interact with dimer
6. Charged radical pair is produced
 $FADH^+ + Thy \leftrightarrow Thy^-$
7. Ring splits by **cycloreversion**
8. Connecting bonds breaks
9. Electron returns to the FADH
10. **Phytolase** leaves the DNA

1b Metile olmuş bazların dimetilasyonu (methyl gruplarının alınması)

- **O₆-methylguanine methyl transferase** enzimi 'intihar enzimi' dir, aktivite gösterdikten sonra geri dönüşümü olmayan bir şekilde etkisiz hale getirilir.
- Enzim, guanine bazının O₆ pozisyonundaki -CH₃ grubunu açığa çıkararak bu grubu enzimin amino asidine transfer eder
- *E. coli*'de *ada* geni tarafından kodlanmaktadır

2a Excision Tamir Mekanizması

Hücrelerin hasar görmüş DNA'larını tamir etmek amacıyla en yaygın olarak kullandığı yöntem **EXCISION TAMİR MEKANİZMALARIDIR**. İki tip excision tamir mekanizması vardır:

- Base Excision Repair (BER)
- Nucleotide Excision Repair (NER).

(2) Hasarlı nükleotidin alınarak yerine yeni sentezlenmiş DNA'nın konulması

a) Excision tamir mekanizmaları

Base excision repair (BER)

Nucleotide excision repair (NER)

b) Mismatch repair

c) Recombinational (post-replication) repair

d) Error prone repair (SOS Repair)

2a Excision Tamir Mekanizması

• Base excision repair (BER)

- *tek bir hasarlı nükleotid* seviyesinde işlev görür.
- Ayrıca, birleşebilir noktalara sahip olmayan dolayısıyla da ligasyon için 3 'veya 5' terminusun "temizlenmesi" gerektiği *tek zincir DNA kırılmalarının* onarımı için kullanılan temel mekanizmadır.

• Nucleotide excision repair (NER)

- DNA nın çift zincir yapısını bozan büyük lezyonları hedef alır ve lezyonun her iki tarafındaki DNA'yı çıkarır.
- BER mekanizmasının aksine, NER hasarlı bir nükleotidin spesifik olarak tanımlanmasını gerektirmez ve böylece DNA lezyonlarını ortadan kaldırabilir (DNA üzerinde lezyonu tanıyan ve kesip çıkaran uvr genlerinden oluşmuş grubun varlığına ihtiyaç duyar).
- Tamir işlemi DNA polimeraz I ve DNA ligaz enzi aktivitelele ile tamamlanır

2a Excision Tamir Mekanizması

Excision Tamir Mekanizması (basamaklar)

- **DNA endonükleaz** veya endonükleaz içeren kompleks hasar gören baz veya bazları tanır, onlara bağlanır ve hasar görmüş bu baz/bazları çıkarır.
- **DNA Polimeraz**, DNA'nın hasar görmeyen tamamlayıcı zincirini kalıp olarak kullanarak boşluğu doldurur.
- **DNA ligaz**, DNA polimerazdan geriye kalan boşluğu kapatır

2a Excision Tamir Mekanizması Base Excision Repair (BER)

Urasil bazının DNA molekülünden alınmasına ilaveten (Uracil-N-glikosilaz enzimi ile) BER tamir sistemi aynı zamanda kimyasal olarak modifiye olmuş çeşitli bazları da DNA molekülünden alır

Bu şekilde değişikliğe uğramış bazların DNA molekülünden alınması için her biri farklı bir hasar tipini tanıyan farklı N-glikosilaz enzimleri mevcuttur

2a Excision Tamir Mekanizması Base Excision Repair (BER)

- BER sistemlerinde **DNA GLİKOSİLAZ** enzimlerinin varlığına gereksinim vardır
- **DNA GLİKOSİLAZ** enzimi modifiye baz ve DNA molekülünün şeker-fosfat omurgası arasında yer alan **N-glikosidik bağının hidrolizini katalize eden bir enzimdir**

2a Excision Tamir Mekanizması Base Excision Repair (BER)

DNA GLİKOSİLAZ tarafından başlatılan tamir şekli **BASE EXCISION REPAIR (BER)** olarak bilinmektedir çünkü

tamir neticesinde modifiye baz artık serbest bir baz halini alır



2a Excision Tamir Mekanizması Nükleotid Excision Repair (NER)

- Bu mekanizma DNA üzerinde 30 nükleotit uzunluğa kadar hasar görmüş bölgelerin yerini yenisini (hasarsız) koymak amacıyla kullanılır
- Bu tür DNA hasarının yaygın nedenleri arasında, siklobütan pirimidin-pirimidin dimerlerinin oluşumunu indükleyen UV ışığı ile birlikte sigara içimi bulunmaktadır
- İyonize radyasyon, kanser kemoterapik ajanlar ve çevrede bulunan çeşitli kimyasallar baz modifikasyonuna, yanlış baz eşleşmelerine, zincirde kırılmalara, farklı zincirlerdeki bazlar ya da DNA ve protein arasında çapraz bağlanmalara, T-T dimer oluşumuna ve çeşitli farklı hasarlara neden olurlar. Çift sarmal yapıda bozulmalara sebep olan bu hasarlar **NER mekanizması** ile tamir edilir

2a Excision Tamir Mekanizması Nükleotid Excision Repair (NER)

NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR (NER)

pek çok hasar şeklini tanımakta ve her bir hasar tipine spesifik olan farklı bir enzime ihtiyaç duymamaktadır



2a Excision Tamir Mekanizması Nükleotid Excision Repair (NER)

UvrABC endonükleaz (exinuclease) enzimlerinin kullanımını ile prokaryotlarda NER tamir mekanizması

UvrABC endonükleaz enzimleri hasarlı bazın her iki tarafından kesim yapar (~12 nükleotit)

Helikaz (UvrD) kesim yapılan boşluklar arasında kalan DNA molekülünü açığa çıkarır

DNA Polimeraz I enzimi o bölgedeki boşluğu doldurmak için kalıp zincire tamamlayıcı olan yeni DNA molekülünü sentezler

DNA Ligaz enzimi ise uhu görevi yaparak arada kalan açıklığı tamamen kapatır

2b Mismatch repair

DNA Polimeraz enziminin replikasyon esnasında yanlış nükleotid eklediği ve proofreading aktivitesinin bunu düzeltilmediği durumlarda

MISMATCH tamir mekanizması

devreye girmektedir.

2b Mismatch repair

- **MISMATCH** tamir mekanizması bakterilerden insanlara kadar tüm hücre tiplerinde korunmuştur
 - DNA polimeraz III enzim aktivitesi (sahip olmuş olduğu proofreading exonuclease aktivitesi de dahil olmak üzere) sentezlenen her 10^8 bazda bir zincire yanlış baz dahil etmektedir
 - Mismatch repair mekanizması bu oranı her 10^{10} veya 10^{11} bazda 1'e düşürmektedir
- UV ile hasar almış DNA'da bir tamir mekanizması olmaktan çok replikasyonun doğru ilerlemesini sağlayan bir mekanizmadır
- Bu sistemin insanlarda zarar görmesi kalıtsal kolon kanseri ile bağlantılıdır.

2b Mismatch repair

MISMATCH tamir mekanizması

metilasyona uğramamış yeni sentezlenen zinciri onarır

Yeni sentezlenen DNA zinciri ise
GATC sekansında metil grubu olmadığı için tanınır



2b Mismatch repair

- **MISMATCH** tamir, ideal olarak, doğru zincirde, yani, **yeni sentezlenen zincirde** gerçekleşmelidir
- *E. coli* GATC sekansında A nükleotidini metile eder (DNA replikasyonundan sonra)
- Yeni replike olmuş DNA molekülünde, parental zincir metillenir ancak yeni zincir metillenmez. Bu farklılık mismatch tamir mekanizmasının yeni sentezlenen zinciri eski zincirden ayırmasına olanak sağlar (Yeni sentezlenen zincir metile edilmeden önce bir zaman aralığı vardır. Bu zaman aralığında metilasyona uğramamış zincirde (yeni sentezlenen) tamir işlemi gerçekleşir)
- Yanlış eşleşme yapan nükleotid yeni zincirden kesilir ve metile edilmiş parental zincir kalıp olarak kullanılarak doğru nükleotid ile değiştirilir.

2b Mismatch repair

- **MutS** yanlış eşleşme yapmış nükleotidleri tanır, o bölgeye bağlanır ve tamir sürecini başlatmak için DNA üzerinde GATC sekansını arar.
- **MutH** ve **MutL** komplekse dahil olurlar.
- **MutH** (endonükleaz) yanlış eşleşmenin her iki tarafında metile olmamış zinciri metile olmamış GATC sekansından keser
- Kesip çıkarma işlemi için **MutS**, **MutL**, **MutU** (DNA helikaz II), ve **ekzonükleaz** gerekmektedir
- **DNA polimeraz III** (SSBP yardımıyla) arada kalan boşluğu doldurur ve **DNA ligaz** uhu görevi görür.

Dam metilaz (metil transferaz) enzimi yaklaşık 10 dakika gecikir, sonra yeni zinciri metiller

2c Mismatch repair

Mismatch tamir mekanizması metilasyona uğramamış zinciri onarır
Yeni sentezlenen DNA zinciri GATC sekansında methyl grubu
olmadığı için tanınır



2c Mismatch repair

- Ökaryotlarda da MISMATCH tamir mekanizması vardır.
- Prokaryotlar ile kıyaslandığında bu mekanizma ökaryotlarda daha az anlaşmıştır.
- MutS ve mutL genlerinin homologları mevcut olduğundan, ökaryotlardaki mismatch tamiri prokaryotik enzimlere benzeyebilir.
- ANCAK, MutH'nin (metilleştirilmemiş yeni sentezlenmiş zinciri tanıyan protein) homologu yok, bu yüzden yeni sentezlenmiş zincirin tanımlanması metilasyon sinyali aracılığıyla meydana gelmiş gibi görünmektedir

2d Recombinational Repair (postreplication repair)

- *E.coli*'de kalıp zincir üzerindeki timin dimeri replikasyonu bloklar çünkü DNA polimeraz III enzimi timin dimerlerini tanımaz.
- DNA Polimeraz III, yeni sentezlenen zincirde dimerin karşısındaki alanı **boş bırakarak** dimerden sonra DNA sentezini tekrardan başlatır.
- **RecA** boşlukta DNA'nın tek zincirine bağlanır ve boşluğu doldurmak için kardeş çift sarmalının homolog segmenti ile baz eşleşmesine aracılık eder.

2d Recombinational Repair (postreplication repair)

DNA polimeraz, kardeş çift sarmaldaki boşluğu doldurur ve DNA ligaz uhu görevi görür



2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

- DNA, mutajenik maddelerle aşırı şekilde hasar gördüğünde, pekçok DNA rekombinasyonu, DNA tamiri ve DNA replikasyon proteinlerini içeren **SOS YANIT** aktive edilir. Bu durum mutajenez pahasına da olsa, hücrenin aksi halde ölümcül olan durumlarda sağ kalmasına izin verir....
- SOS yanıtı, yalnızca diğer tamir mekanizmaları hücredeki hasarlar ile mücadele ettiğinde tetiklenir, çünkü aksi durumda tamir edilmemiş DNA molekülleri hücrede birikir



2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

- Yoğun genetik hasarlara tepki olarak bakteriyel hücre yanıtını koordine eden düzenleyici bir sistem vardır. Bu sistem, DNA tamirinde gerekli olan 30 dan fazla genin ekspresyonunu artırır

2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

- **DNA Polimeraz V**, hasar görmüş bölgelerdeki DNA'yı replike eder; ancak hasarlı bölgelerdeki sekanlar doğru bir şekilde kopulamaz.
- Bu hataya eğilimli sistem boşlukları ortadan kaldırır, ancak replikasyon hatalarının sıklığını artırır (Pol II, IV ve V, düşük güvenilirliğe sahip polimerazlardır)

2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

- Bu hataya-açık DNA tamir mekanizması için **DNA polimeraz III** enzimi ve *umuCG* tarafından kodlanan **DNA polimeraz V** gereklidir
- UmuCD proteinleri korkunç acil durumlarda üretilir ve timin dimerlerinin karşısına rastgele, herhangi bir baz eklemek için DNA polimeraz III'e talimat verilir, çünkü DNA hasarı aksi halde ölümcül olabilecektir
- Fonksiyon kaybı ile yaşama sebebiyet veren pekçok mutasyonun ortaya çıkma riski, ölüm tehdidi karşısında alınabilecek bir risktir
- *Peki bu SOS tamir mekanizması nasıl aktive edilmektedir?*

2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

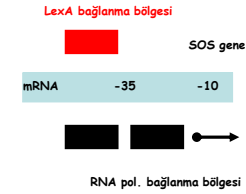
- a. *E.coli*'de SOS tamir mekanizması iki gen tarafından regüle edilmektedir; *lexA* ve *recA* (Bu genlerden herhangi birinde meydana gelen mutasyon, bu genlerde mutasyon taşıyan mutantların SOS yanıtlarını kalıcı olarak açık hale getirir, yani indükler)
- b. SOS tamir mekanizması **hataya-açık** bir sentez sistemidir. İşte bu yüzden UV bir mutajendir. Belki lezyonun olduğu bölgede RecA tek zincir DNA'ya bağlandığı içindir çünkü ssDNA ya bağlanan RecA daha sonra DNA'nın bu alanından geçen DNA polimeraz III kompleksine bağlanıp 3'-5' ekzonükleaz proofreading yeteneğini inhibe edebilir. Bu, replikasyonu daha hızlandırır, ancak daha fazla mutasyona neden olur
- i. T-T dimeri gibi bazı lezyonlar yeni DNA zincirinde AA oluşturacak şekilde kolayca kopyalanır
- ii. C-C dimerleri gibi diğerleri, SOS tamir mekanizmasını durdurur. C'nin U'ya deamine edilebileceği bir gecikme yaratarak transition mutasyonu yaratırlar

2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

- II. *Yoğun DNA hasarında*, *recA* gen ürünü olan **RecA proteini (proteaz)** aktive edilir. RecA proteini tek-zincir DNA'ya bağlanıp **LexA repressor proteininin** kendi kendini inaktive etmesini (autocleavage) tetikleyerek SOS YANITINI başlatır.

2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

- I. *DNA hasarının olmaması durumunda*, *lexA* gen ürünü olan **LexA repressor proteini**, ürünleri, çeşitli tipteki DNA tamir mekanizmalarında görev yapan yaklaşık 17 genin transkripsiyonunu baskılar (SOS yanıt genlerinin transkripsiyonunu düzenleyen DNA bölgelerine bağlanıp bu genlerin ekspresyon seviyelerini düşük tutarak)



Lex A repressor RNA polimeraz enziminin bağlandığı bölgeye bağlanır, dolayısıyla SOS genlerinin transkripsiyonunu engeller

2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

- II. LexA devre dışı kaldığında, DNA tamir mekanizmasında gerekli olan SOS genlerin üzerindeki baskı kalkar, SOS yanıt genleri ekspres edilir, SOS gen ürünleri oluşur. Hasarlı DNA excision-tamir ve rekombinasyonel-tamir mekanizmaları kullanılarak onarılır

2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

Ekstrem koşullar altında, DNA sentezi dimer boyunca devam eder ve herhangi bir nükleotit bu bölgeye yerleştirilebilir:
HATAVA AÇIK, netice MUTASYON

TİMİN DİMERLERİNİN TAMİRİ

- Işık-bağımlı tamir (Fotoreaktivasyon)
- Işık-bağımsız tamir (karanlıkta tamir)
 - excision tamir
 - rekombinasyonel tamir
 - SOS tamir

2e Error Prone Repair (SOS YANIT)

III. Hasar tamir edildikten sonra, RecA inaktive edilir ve yeni sentezlenen LexA yine DNA tamir mekanizmasından sorumlu olan genleri baskılar

Evrin mutasyonlar üzerinde etki yapar

- Mutasyona uğramazsak o zaman hepimiz aynı oluruz!
- Çevredeki herhangi bir değişiklik, nüfusun tüm üyelerine eşit derecede zarar verebilir
- = O zaman evrim olmaz!!!!
- Ancak mutasyon mevcuttur ve birbiri ile ilişkide olan organizmaların karşılaştırılması ile de desteklenmektedir.

Evrin mutasyonlar
üzerinde etki yapar