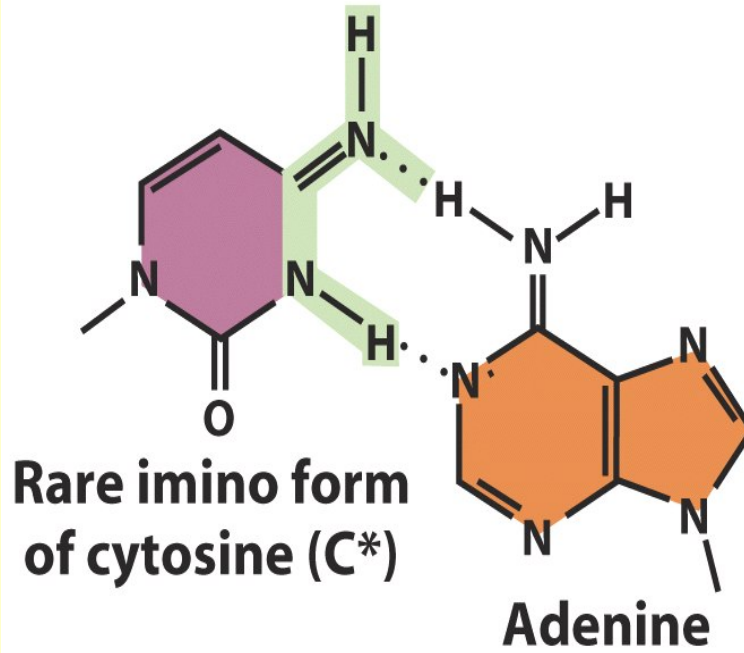
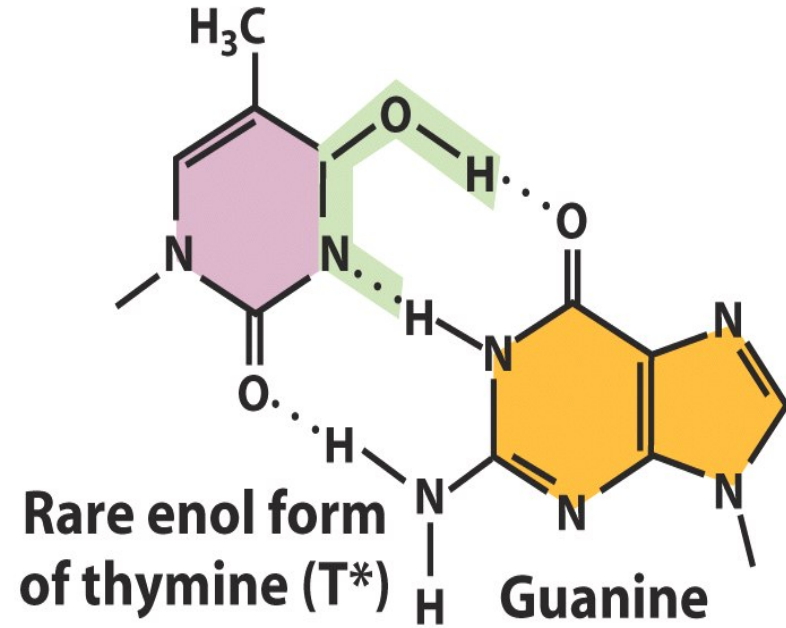


DNA TAMİRİ

- DNA molekülünün yapısında meydana gelen bir değişiklik şifrelerinde değişikliğe yol açacağından hatalı protein üretilmesine çeşitli mutasyonların, farklı fenotiplerin veya hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur.

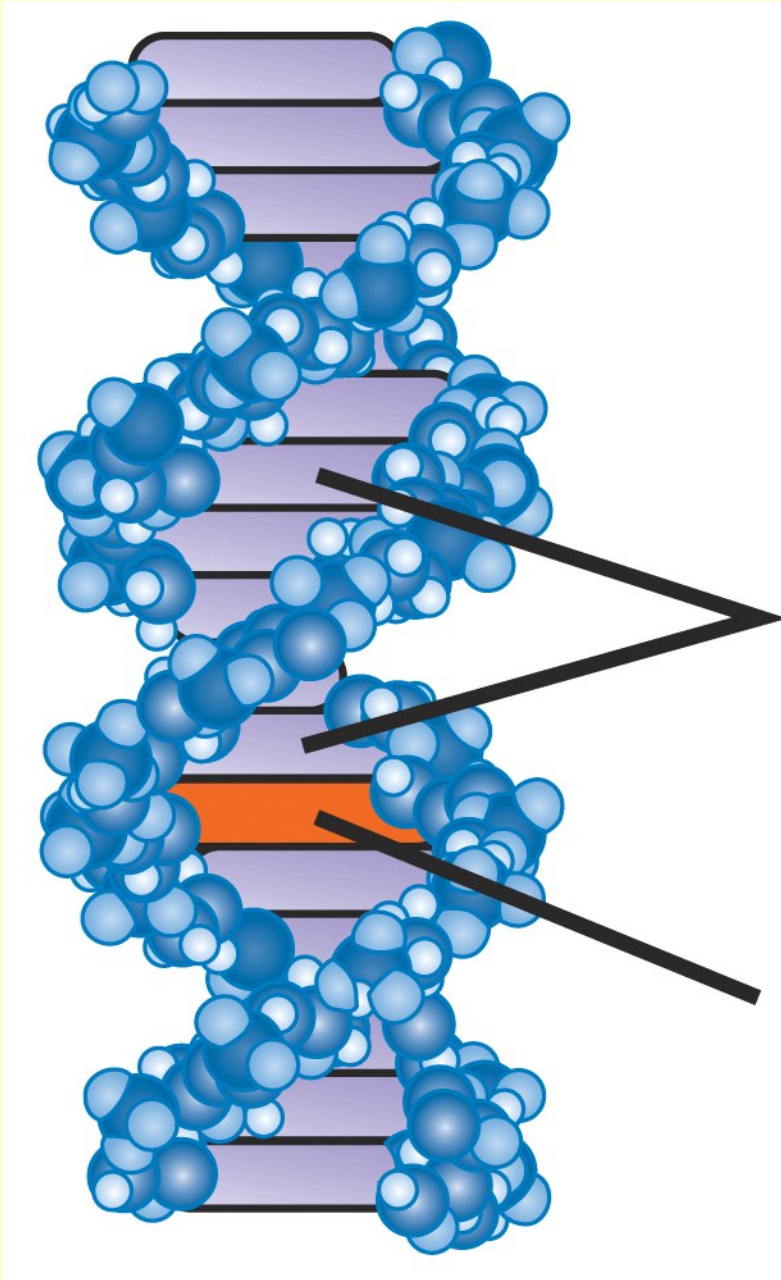


Az rastlanan sitozinin
İmino formu (C*)



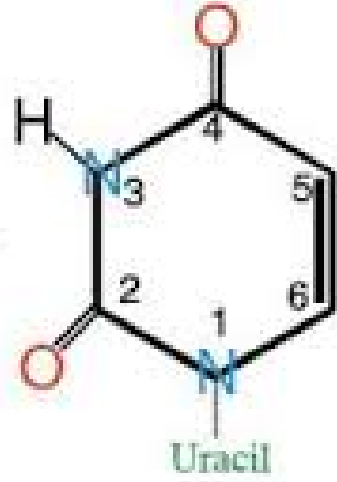
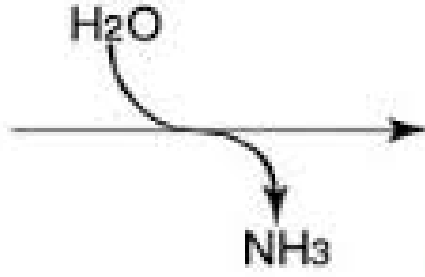
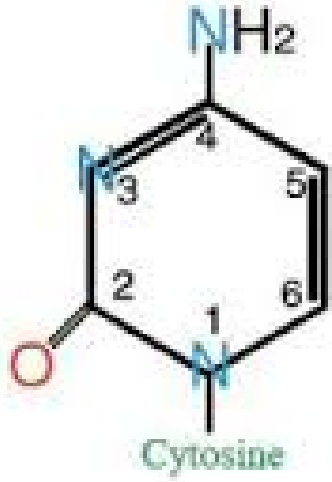
Az rastlanan timin
İmino formu (T*)

Mismatch ile sonuçlanan az rastlanan baz tautomerik formları



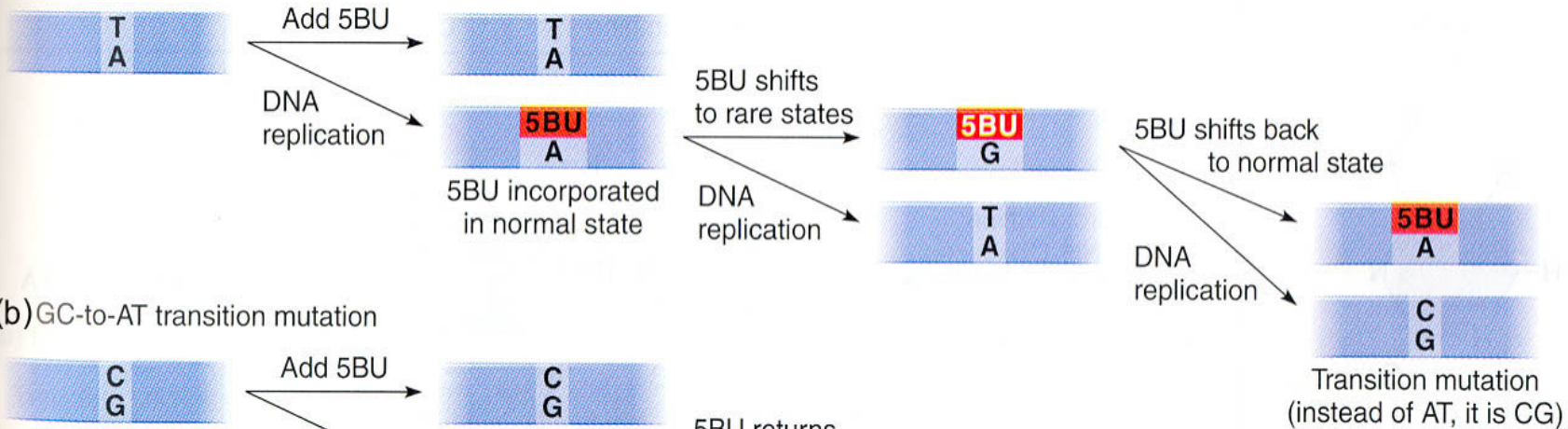
**Nitrogenous
bases**

**Intercalated
molecule**

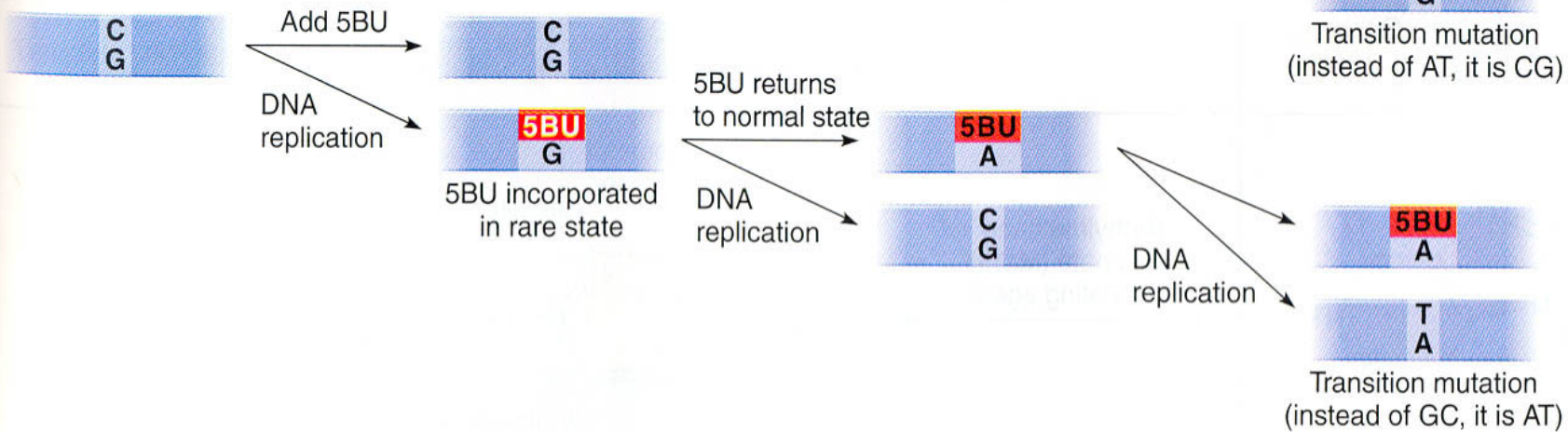


Mutagenic action of 5BU

(a) AT-to-GC transition mutation

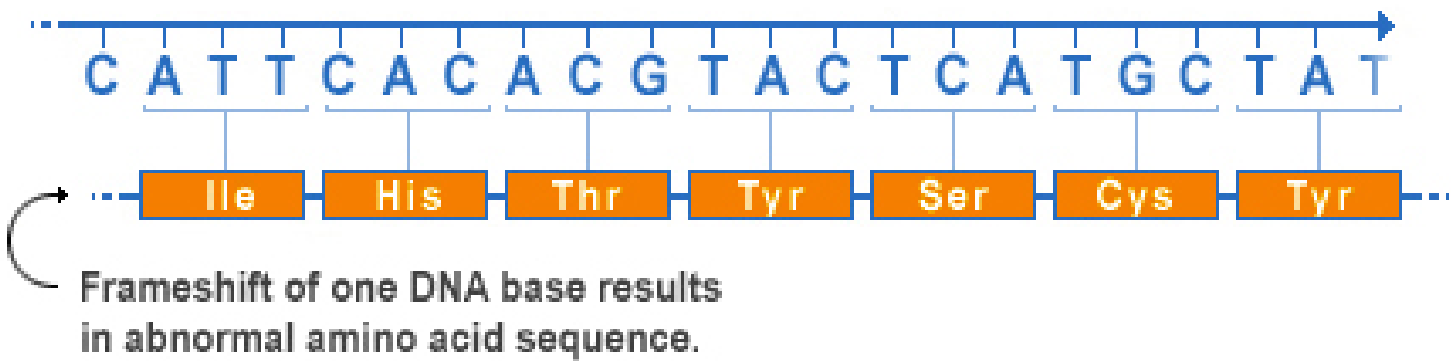
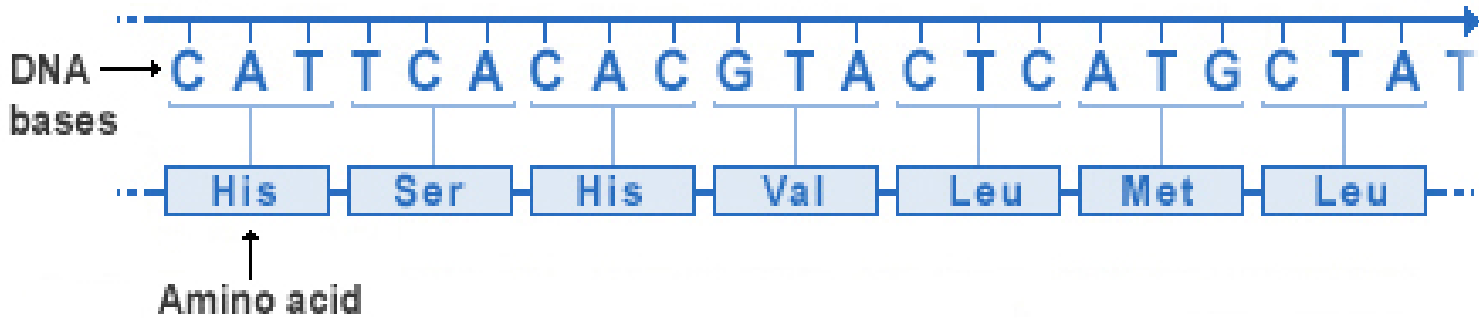


(b) GC-to-AT transition mutation



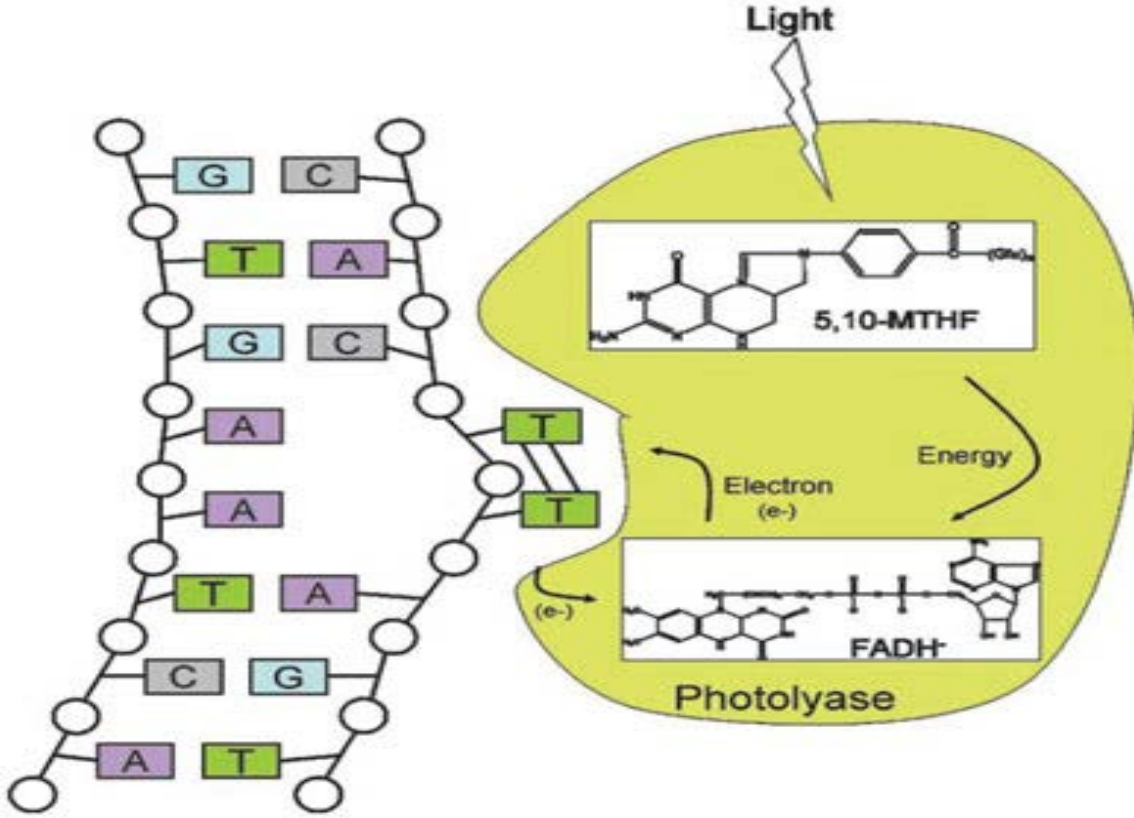
Frameshift mutation

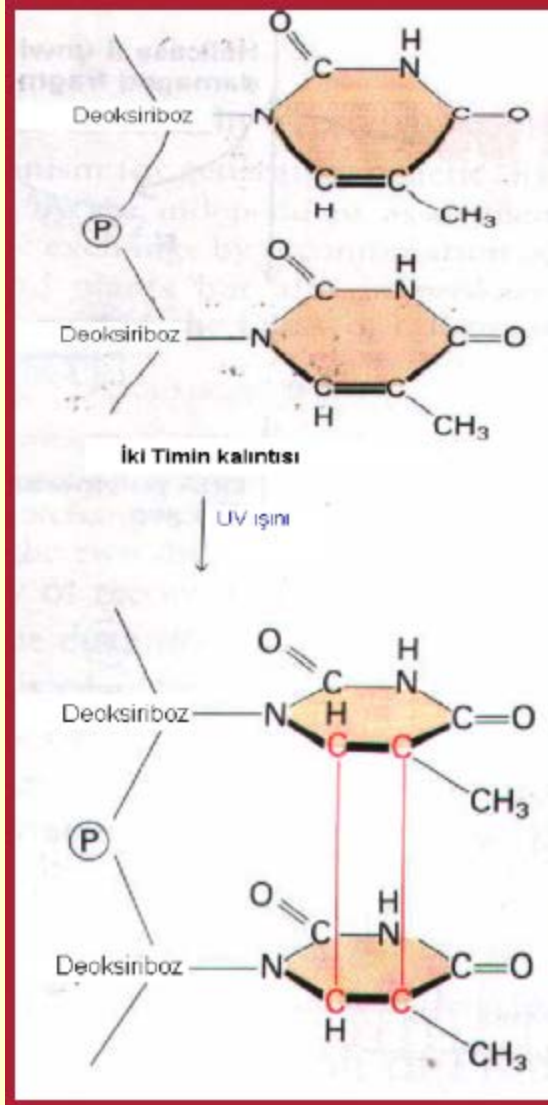
Original DNA code for an amino acid sequence.



U.S. National Library of Medicine







Xeroderma Pigmentosum



- İnsanda 1 saat içerisinde 100.000-150.000 arasında DNA hasarı (mutasyon) meydana geldiği tespit edilmiştir.
- DNA molekülünün içerdiği bilginin değişmeden aktarımı-devamlılığı için, replikasyon sırasında veya çevresel faktörler ile DNA da oluşan hatalar bir seri enzim tarafından düzeltilir. Bu düzeltmelerin DNA'nın tek ipliğinde olduğu zaman gerçekleşebildiği fakat hasar her iki iplikte ise onarımın mümkün olmadığı saptanmıştır. Tek iplikte meydana gelen hasar onarılmaz ise replikasyon sonrasında her iki iplikte oluşmaktadır.

RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZLAR

z RE enzimleri, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır. Günümüzde 300'e yakın farklı DNA dizilimini tanıyan yaklaşık 3000'den fazla RE varlığından söz edilmektedir. RE enzimlerinin çok büyük bir kısmı bakterilerden, çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlardan izole edilmiştir.

z 1965'te Arber; DNA metilasyonunun bakteriyi restriksiyon ajanlarına karşı koruduğunu ortaya çıkarmıştır. Bakteri, kendi DNA'sını kendi endonükleazlarından korumak için metiller, demidir. z 1968'de Meselson ve Yuan; ilk RE'yi E.coli bakterisinden izole etmişlerdir. Fakat bu RE'yi tanıma bölgesi bulunmamaktaydı.

z 1970'de Smith ve Wilcox; H.influenza'dan spesifik DNA sekansını tanıyan ve kesim yapan bir endonükleaz (Hind II) izole ettiler.

- RE'ların doğal biyolojik fonksiyonu, bakteriyel savunma mekanizmasında oynadıkları roldür. Bakteriye giren yabancı DNA'ları da kesebildiklerinden, intraselüler bakteriyel patojenleri inaktive edebilmekte ve bakteriyi virüslerden ve yabancı DNA'lardan korumaktadırlar.
 1. z Aynı zamanda, bakterilerde bulunan spesifik metilaz enzimleri de, restriksiyon bölgelerine metil grupları ekleyerek, RE'ların bakterinin kendi DNA'sını kesmesini engellemektedir.

1970'li yıllardan sonra 1970'li yıllardan sonra restriksiyon restriksiyon endonükleaz kullanımına bağlı olarak rekombinant rekombinant DNA teknolojisi h DNA teknolojisi hızla gelişmiş ve bu gelişme seçilen bir genin ile bir genin çoğaltılmasını, genin kodladığı proteinin üretilmesini, genin diziliminin belirlenmesini vb. m retilmesini, genin diziliminin belirlenmesini vb. mümkün hale getirmiştir. Bu teknolojiye merkezi konumu nedeniyle, RE ezi konumu nedeniyle, RE enzimleri özellikle klonlama çalışmalarını yapan araştırmacıların laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır. RE kullanım alanlarına örnekler: - Rekombinant DNA elde edilmesi - DNA haritası çıkarılması - Polimorfizmlerin belirlenmesi - Probların hazırlanması - DNA modifikasyon durumlarının analizi

İSİMLENDİRME

z İsimlendirmede önce enzimin elde edildiği bakteri cinsinin ilk harfi, daha sonra bakteri türünün ilk iki harfi ve son olarak da soya ait bir harf ile ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamı ile enzimin izolasyon sırası belirtilir. z

EcoR I

E = genus Escherichia

co = species coli

R = strain RY 13

I = first RE to be isolated from this species

Hind III

H = genus Haemophilus

in = species influenzae

d = strain Rd

III = third RE to be isolated from this species

RE'ların SINIFLANDIRILMASI RE'lar; metilaz aktivitelere, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre sınıflandırılmışlardır. Z

Tip I RE'lar: Endonükleaz aktiviteleri için ATP, S-adenozilmetionin ve Mg+2'a ihtiyaç duyarlar. Bilinen tüm tip I RE'lar tanıma sekansındaki adenin rezidülerini metilasyona uğratmaktadır. Bu enzimler tanıma sekanslarına bağlanmalarına rağmen, kesimleri sekans dışında tesadüfi olarak gerçekleştirmektedirler. 3 altüniteden oluşurlar. Birincisi, tanıma sekansını tanır; ikincisi, adenin rezidülerini metiller; üçüncüsü ise kesimden sorumludur.

Tip II RE'lar: RE'lar denildiğinde ilk akla gelen ve en çok çalışılan gruptur. İzole edilen RE'ların çok büyük kısmı bu gruptadır. Çünkü tip II RE'lar, tam hedef nükleotitten veya çok yakınından kesim yapma özellikleri nedeniyle araştırmalar için ideal enzimlerdir. Mg+2 iyonlarının varlığında çift zincir DNA üzerindeki palindromik sekansları tanır ve bu sekans içindeki özel bölgeden kesim yaparlar. Kesimleri ATP'ye bağlı değildir. Restriksiyon fragmanları ve jelde band paternleri oluşturmaları bakımından diğer tip RE'lara göre çok üstündürler ve hemen hemen sadece bu grup RE'larla çalışılmaktadır.

Tip III RE'lar: Tip I RE'lar gibi metilasyon modifikasyon fonksiyonuna sahip olup, Mg²⁺ ve ATP'ye bağımlı kesim gerçekleştirirler. Çok altüniteli enzimlerdir ve tam bir kesim yapma özellikleri zayıftır. DNA'ya tanıma sekanslarından bağlanmalarına rağmen, kesimi tanıma bölgesinden farklı bir yerden gerçekleştirirler.

RE'ların DNA'ya BAĞLANMA ve KESME MEKANİZMALARI z
RE'lar DNA tanıma bölgesi ve katalitik alan olmak üzere iki fonksiyonel alt birimden oluşmaktadır. DNA tanıma bölgesi spesifik bölgeyi tanırlar ve katalitik alanı buraya yerleştirir. Tanıma sekansına yerleşen katalitik alan heliksin fosfodiester bağlarını kırar.

RE'lar sadece bazlar arasında yatay konumda bulunan fosfodiester bağlarını kırarlar. Karşılıklı iki baz arasındaki hidrojen bağlarının kesilmesinden sorumlu değildirler. Hidrojen bağları, fosfodiester bağlarının kırılmasıyla ve çözeltideki termal hareketten doğan enerjinin etkisiyle kendiliğinden kırılırlar.

Bam HI

5'---- G/GATCC----3'

Bst

15' ---- G/GATCC----3'

Az sayıda da olsa bazı RE'ları birden fazla tanıma ve kesme bölgelerine sahiptirler.

Örneğin;

Hind II

5'-----GTC/AAC---3'

5'-----GTT/AAC---3'

5'-----GTT/GAC---3

5'-----GTC/GAC---3

EcoRI



METİLASYON

[Adenin](#) ve [sitozin](#) metilasyonu çoğu bakteride [restriksiyon modifikasyon sisteminin](#) parçasıdır. Bu sistemde çalışan bir [metilaz](#) belli bir DNA dizisini tanır ve bu dizi içinde veya yakınındaki bir [bazı](#) metiller. Bu şekilde metillenmemiş olan yabancı DNA'lar hücre içine girdiklerinde diziye spesifik [restriksiyon enzimleri](#) tarafından parçalanır. Bakterinin kendi DNA'sı metillenmiş olduğu için bu restriksiyon enzimleri tarafından tanınmaz. Kendi DNA'sının metilasyonu ilkel bir bağışıklık sistemi olarak çalışır, onun sayesinde bakteriler [bakteriyofaj](#) enfeksiyonundan kendilerini korurlar. [E. coli](#) DNA adenin metiltransferaz (Dam), yaklaşık 32 [kDa](#) büyüklüğünde bir enzimdir ve bir restriksiyon/modifikasyon sistemine ait değildir. [E. coli](#) Dam'ın hedef dizisi GATC'dir. Bu dizinin iki yanındaki üçer baz çifti de DNA-Dam bağlanmasına etki eder. Dam, çeşitli süreçlerde rol oynar, bunlar arasında [yanlış eşleşme tamiri](#), DNA replikasyonunun zamanlaması ve [gen ifadesi](#) vardır. DNA replikasyondan evvel GATC konumlarındaki iki ipliğin her biri [adenin](#) bazında metillenmişken, replikasyonun ardından bunlardan sadece biri metillenmiş durumda kalır. Bunun nedeni, yeni ipliğe dahil olan [adenin](#) bazının metillenmemiş olmasıdır. Tekrar metillenme, replikasyondan 2-4 saniye sonra olur, bu arada replikasyon sırasında yeni iplikteki meydana gelen dizi hataları onarılır. DNA ipliklerinden birinin metillenmemiş olması, hücrenin tamir sisteminin o ipliği yeni sentezlenmiş iplik olarak tanımasını sağlar. Bakterilerde Dam sisteminin bozulması, kendiliğinden olan (spontan) mutasyon oranının artmasına neden olur. Başka DNA tamir enzimleri de olmayan dam mutantlarında yaşayabilirliğin tehlikeye düşmesi, Dam sisteminin hayatiyetini gösterir.

Bakteri kromozomundaki Replikasyon orijininde çok sayıda GATC konumu olduğu için orası Replikasyon sonrası yarı-metillenmiş durumunu daha uzun süre korur. DNA Replikasyonunun zamanlamasında bunun merkezî bir önemi vardır. *SeqA* proteini [ikilenme orijinine](#) bağlanarak onu tecrit eder ve metillenmesini engeller. Yarı metillenmiş Replikasyon orijinleri inaktif olduklarından bu mekanizma hücre döngüsü sırasında DNA Replikasyonunun tek bir kere olmasını sağlar.

Bazı genlerin ifadesi, örneğin *E. coli* 'de [pilus](#) proteinlerini kodlayanların ifadesi, gen [operonunun](#) promotör bölgesindeki GATC konumlarının metillenmesi ile düzenlenir. DNA Replikasyonunun hemen sonrasındaki çevresel şartlar, bu promotör bölgesinin yakınındaki ve uzağındaki iki bölgeden birinin metilasyonu bloke edebilir. Metilasyon şekli oluşuktan sonra pilus gen transkripsiyonu DNA tekrar Replikasyon olana kadar ya etkin ya da inhibe durumda kitli kalır. *E. coli* 'de pilus operonlarının [idrara yolu enfeksiyonlarındaki virülansı](#) belirlemekte önemli bir rol oynar. Bu yüzden *Dam* inhibitörlerinin [antibiyotik](#) olarak çalışabileceği önerilmiştir. Bakterilerde *Dam* sisteminin haricinde Adenini metilleyen *hds* sistemi ve Sitozini metilleyen *dcm* metilasyon sistemleride bulunmaktadır. Ayrıca Memelilerde bitkilere de mantarlarda işgörev daha farklı metilasyon sistemleri de bulunmaktadır.

DNA da oluşan hasarlar iki şekilde olabilir

- **Replikasyon sırasında**
- **Çevresel etkilerle**
 - **Fiziksel (UV ışınları veya radyasyon)**
 - **Kimyasal ajanlar**
- Her iki etkiylede ortaya çıkabilecek hatalar DNA nın bazyapısında bir değişim veya yapısında ortaya çıkan bir değişim şeklinde olabilir.

Hasar Tipleri:

1-Tek baz deęişimleri;

- Depurinasyon
- Deaminasyon (sitozinin urasile, adeninin hipoksantine dönüşümü)
- Nukleotid kaybı veya kazanımı
- Baz analogları ile yer değişimi

2- İki baz değişimi ;

- Timin-timin dimeri (U.V.etkisi ile)

3 Zincir kırıkları (İyonizan ışınlar , X-ışını, etkisi ile)

4 Zıt bağlantılar kurulması;

- Aynı veya zıt ipliklerdeki bazlar arasında
- DNA ve protein molekülleri arasında (örn:histonlar)

- DNA üzerindeki hasarlı bölgeler 3 mekanizma ile düzeltilir;
 - 1- Hatalı eşleşmenin tamiri ile
 - 2- Baz çıkarımı ile
 - 3- Nukleotid çıkarılması ile

FOTOLİYAZ

Direkt Onarım

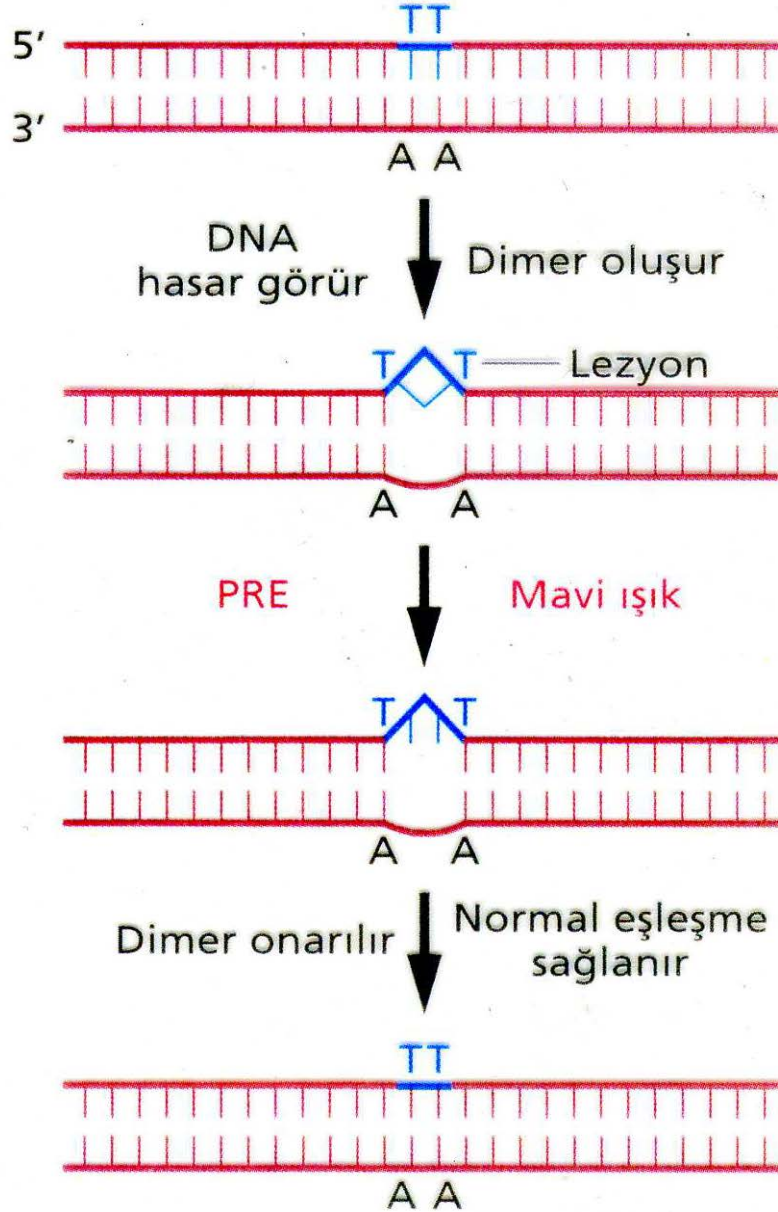
Direkt onarım mekanizmalarında hasar, zinciri kırmadan uzaklaştırılmaktadır. Sadece timin dimerleri ve alkilenmiş bazlar direk olarak onarılabilmektedir.

Fotoreaktivasyon :

Tek ve çift sarmal DNA üzerinde bulunan timin dimerleri 300-600 nm dalga boyundaki ışıkla indüklenen, fotoliyaz tarafından birbirlerinden ayrılır.

Bu enzim hem prokaryotlarda hemde ökaryotlarda bulunur.

Fotoreaktivasyon onarımı



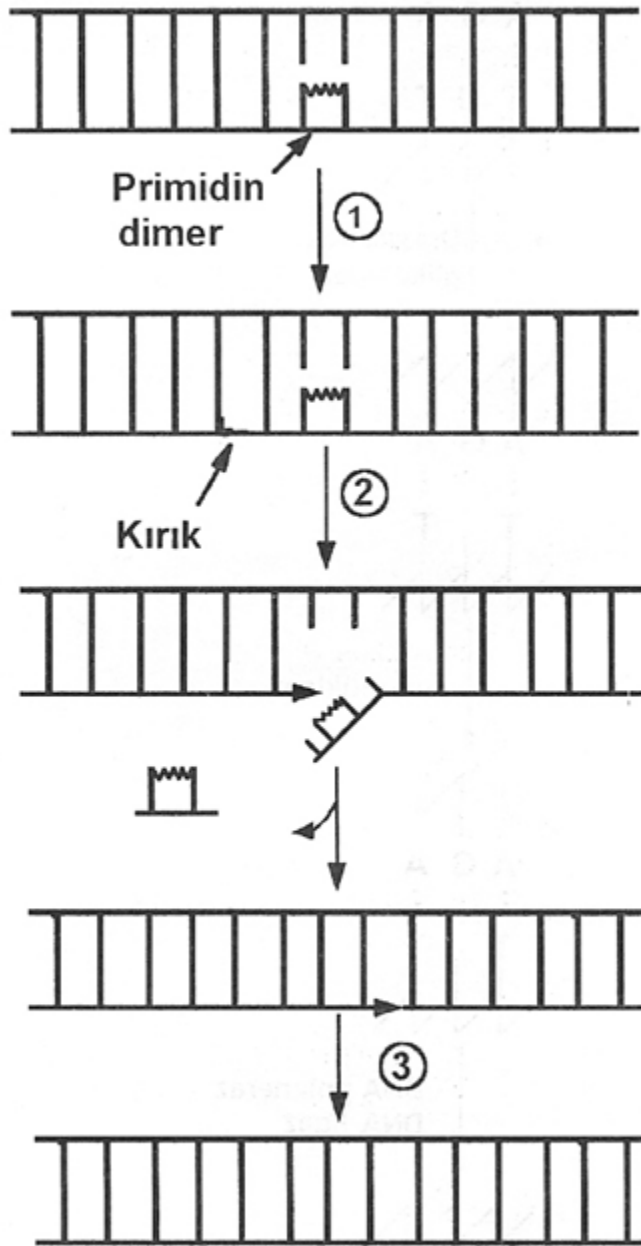
Nükleotid Kesip Çıkarma (Excisyon)Onarımı

DNA onarımı ile ilgili ilk çalışmalar, hasarlı nükleotidlerin onarılması üzerinedir.

Güneş ışınlarının etkisinde kalan bir hücrede komşu primidinlerin, kovalent bağlanmaları ile oluşan timin dimerleri DNA polimerazların çalışmalarını ve DNA zincirinin replikasyonunu önler

DNA heliks yapısında bozulmalara yol açan hasarlar genellikle nükleotid kesip çıkarma sistemleri ile tamir edilir. Bu mekanizmada 1500 nükleotidlik parçalar kesip çıkartılır.

Timin dimerleri önce özel bir endonükleaz taafından tanınır sonra hasarlı kısmın iki tarafından zincir kırılır



① UV-spesifik endonükleaz

② DNA polimeraz I

③ DNA ligaz

Şekil 8.50. Pirimidin dimerlerinin tanınması ve hasara uğrayan zincirin onarılması

Bu mekanizmada yer alan multi-fonksiyonlu enzim Uvr ABC hasar spesifik endonükleaz (veya eksonükleaz) olarak adlandırılır.

Bu enzim UvrA, UvrB ve UvrC proteinlerinden (alt birimlerinden) oluşur UvrA proteini ATPaz aktivitesi olan bir DNA bağlayıcı proteindir.

UvrB proteininin tek başına ATPaz aktivitesi yoktur.

UvrA proteinine bağlanarak aktive olduğunda ya da spesifik proteolizle yıkıldığında ATPaz aktivitesi kazanır

(UvrA)₂-(UvrB)₁ kompleksi

DNA üzerinde hasarlı bölgeye yakın bir yere bağlanır ve helikaz aktivitesi gösterir.

DNA kıvrımını açarak ilerleyen (UvrA)₂-(UvrB)₁ kompleksi hasarlı bazların bulunduğu yere gelince UvrA proteini kompleksten ayrılır.

Ayrılma işlemi, ATP hidrolizini gerektirir.

UvrA proteini ayrılınca UvrC proteini UvrB , hasarlı DNA kompleksine bağlanır.

UvrC proteininin komplekse bağlanmasıyla hasarlı bazların 3' ve 5' yönlerinde birer kırık oluşur.

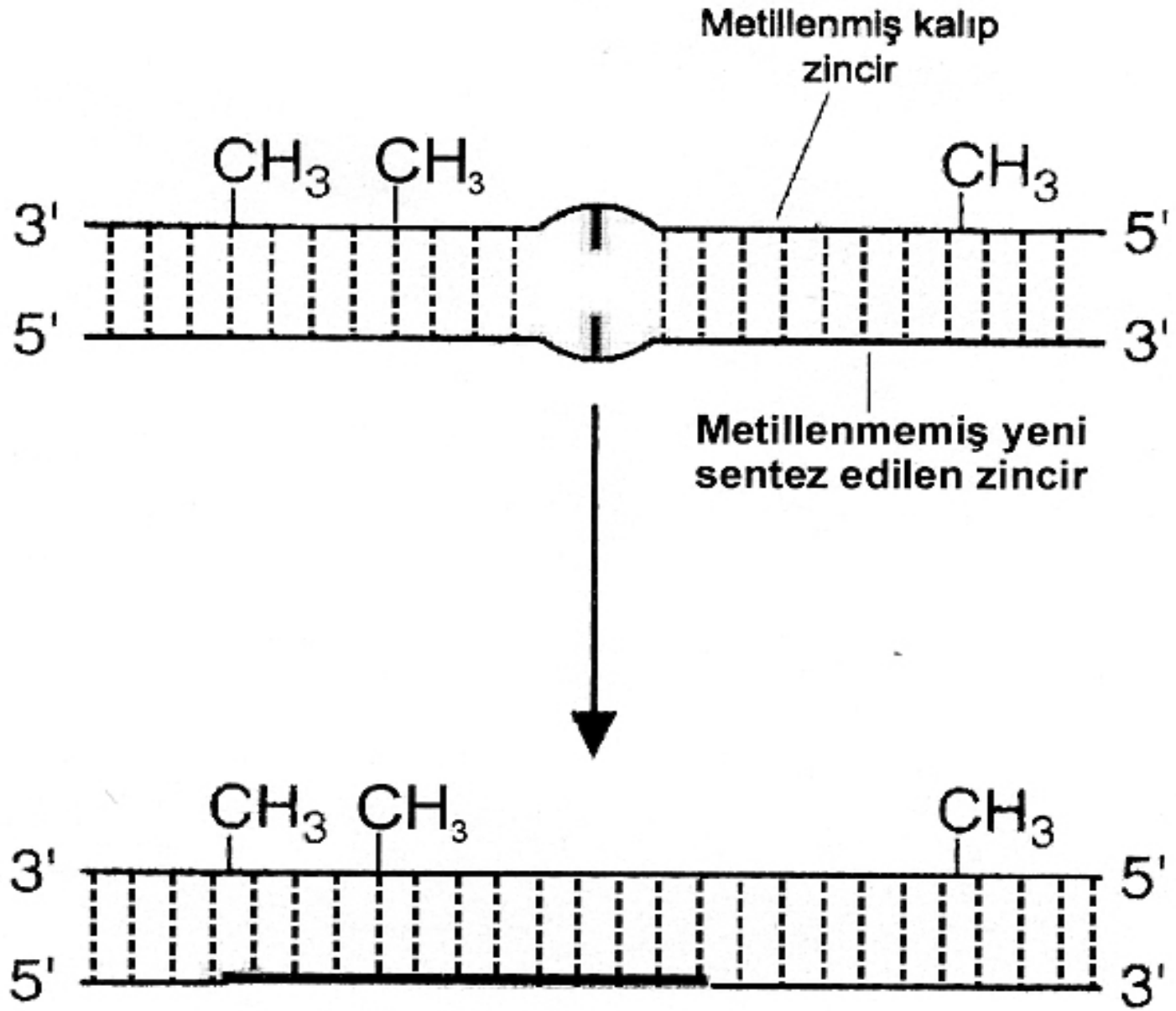
- ❖ Hasarlı kısım helikazla ayrılır.
- ❖ Boşluk DNA polimeraz I tarafından doldurulur ve
- ❖ DNA ligazla zincir bağlanır

Az rastlanan bir genetik hastalık olan,
xeroderma pigmentosumda ,
DNA yapısında meydana gelen
dimerlerin hücreler
tarafından onarılamaması,
mutasyonların birikimine ve
sıklıkla deri kanserine
yol açar.



Şekil 29.28

Kseroderma pigmentozumlu
bir hasta.



Yanlış eşleşme
daima kalıp zincirdeki bilgi
baz alınarak tamir edilir

DNA sentezi esnasında
sentezlenen yeni zincir
kısa bir süre için
metillenmemiş bir yapıya sahiptir.

Tamir sistemine ait proteinler
metillenmeye göre
kalıp zincir ve yeni sentez edilen zinciri
ayırabilir ve
yeni zincirdeki yanlış eşleşmeleri düzeltebilir

Yanlış Eşleşme Onarımı

Direk onarım ve kesip çıkartma onarımında esas, normalde DNA molekülünde bulunmayan bazların tanınmasıdır.

Yanlış eşleşme onarımında ise, değiştirilen normalde DNA molekülünde bulunan bazlardır. Bu nedenle, direk veya kesip çıkarma onarımı ile tanınmazlar.

Yanlış eşleşme en çok replikasyon hatası olarak görülürse de rekombinasyon ve onarım işlemleri sırasında da yanlış eşleşme olabilmektedir.

Yanlış eşleşme her zaman eski zincirdeki bilgiye göre düzeltilir. Onarım sisteminin, eski zincir ile yeni sentezlenen zinciri ayırd edebilmesi gerekir.

Ayırım eski zincir üzerinde bulunan fakat yeni sentezlenmiş zincirde henüz bulunmayan metil grupları aracılığı ile olur.

Dam metilaz, 5' GATC dizisindeki adenini N⁶ pozisyonunda metiller.

Replikasyondan hemen sonra yaklaşık ilk bir dakika içinde eski zincir metillenmiş iken, yeni sentezlenen zincir henüz metillenmemiştir.

Bu kısa geçiş süresi yeni zincirin tanınmasını sağlar.

E.coli yanlış eşleşme onarım sisteminde

MutS, MutH ve MutL proteinleri anahtar role sahiptirler

MutS proteini yanlış eşleşmiş baz çiftinin içinde bulunduğu geniş bir bölgeye bağlanırken,

MutH proteini GATC dizisini içeren bölgeye bağlanır.

MutL proteini ise MutS ve MutH proteinlerini birbirine bağlayarak bir kompleks oluşturur

Sadece bir zincir GATC dizisinde metillenmiş ise ve yanlış eşleşmiş baz çiftine yakınsa (ilk 1000 baz çifti içinde ise)

MutH proteini bir bölgeye özel endonükleaz olarak metillenmiş kolu GATC dizisinin 5' ucundan keser. Böylece onarılacak olan kısım belirlenmiş olur.

Metillenmemiş kolda kıvrım açılır ve
3'→5' yönünde yıkıma uğrar

Oluşan boşluk DNA polimeraz I ile doldurulduktan sonra
zincir bağlanır

Bu işlemler DNA helikaz II, SSB, ekzonükleaz I (DNA
molekülünde sadece tek zincir 3'→5' yönünde yıkıma
uğrar), DNA polimeraz III ve DNA ligaz gerektirir

Replikasyon sonrası onarımı

- ❑ Hasarlı DNA' nın onarımdan kaçmasından ve tam olarak replike edilmede başarısız olmasından sonra aktif hale gelmektedir.
- ❑ Hasarlı DNA replike olurken, DNA pol lezyonda duraklar, yeni sentezlenen zincir boyunca boşluk bırakarak onun üzerinden atlar.
- ❑ Tek zincir boşluklarına yanıt olarak, RecA proteini rekombinasyonel bir değiş-tokuş işlemi ile başlangıçta hasarsız komplementer zincirde bulunan bir segmenti bu boşluğa sokup onu tamamlar. Sonuçta verici zincirde boşluk kalır, replikasyon ilerlerken doldurulur.

SOS tamiri

DNA hasarının yüksek oranda olduğu ve diğer tamir mekanizmalarının başarılı olamadığı durumlarda devreye giren acil cevap sistemidir. DNA sentezi sırasında, bir lezyonun üzerinden atlamak yerine, sistem, DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonu devam ettirmesini sağlar. Fakat replikasyonun doğruluğundan fedakârlık edilir. Bu nedenle hataya meyilli sistem de denir. SOS yanıtında görev alan birçok proteini kodlayan genler normalde Lex A proteini tarafından baskılanmış durumdadır. DNA hasarı ile karşılaşıldığında, Rec A proteini hasarlı tek zincire bağlanır ve Rec A-ssDNA kompleksi oluşur. Rec A, DNA'ya bağlandıktan sonra Lex A proteininin otoproteolitik yıkımını aktive eder. Rec A, DNA polimeraza bağlanır ve lezyonu da geçerek DNA'yı replike etmesini sağlar. umu C-umu D kompleksi etkisiyle ve Rec A'nın, polimerazın 3'→5' [ekzonükleaz](#) (hata okuma ve çıkarma) aktivitesini inhibe etmesiyle translezyon replikasyon gerçekleşir. Hataya meyilli tamir sistemidir.

DNA Onarımı ve Kanser

- DNA onarımındaki hatalar genomda kararsızlığa yol açar.
- Kanserlerin çoğu tamir edilmemiş DNA hasarından kaynaklanır. • Onarım sisteminde bulunan enzimlerdeki mut. Gibi kanserin kalıtsal türleriyle ilişkilidir. • Örneğin, kalıtsal non-polipozal kolorektal kanser, hatalı eşleşmenin onarımındaki bozukluktan, kolorektal kanser ise baz çıkarma onarımında bozukluktan kaynaklanır.
- NER mekanizma bozukluk, güneşe duyarlılık ve UV kaynaklı cilt kanseri riskini arttırır. Meme kanseri, iyonize radyasyona maruz kalma ile ilişkilidir.