

MUTASYON , DNA HASARI ,ONARIM MEKANİZMALARI VE KANSERLE İLİŞKİSİ

MUTATION, DNA DAMAGE, REPAIR MECHANISMS AND THE RELATION OF CANCER

Bilge DEBELEÇ-BÜTÜNER , Gülten KANTARCI

Ege Üniversitesi , Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı,

35100 Bornova – İzmir, TURKEY

ÖZET

Genom, DNA hasarına neden olan eksojen veya endojen sayısız farklı etkene maruz kalır. Tüm organizmalar genetik materyallerini bu çevresel etkenlerin oluşturduğu hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler. DNA onarımı, hücrede tek bir mutasyonla başlayan, hasarlı DNA oluşumu ve kanser tablosuyla son bulabilen yolda, hücreyi koruyan önemli bir mekanizmadır. Farklı biyokimyasal stratejileri kullanan birçok mekanizma DNA hasarının birçok şeklini onarır. Genetik değişiklikler ve kanser arasındaki nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile desteklenmektedir. Genetik kararsızlık kanserin karakteristik özelliğidir. Mutajenite kanser gelişiminin hem başlangıç hem de gelişme evresinde rol oynar. DNA onarımındaki hatalar da genetik kararsızlığa neden olurlar ve kanserlerin çoğunluğu tamir edilmemiş DNA hasarından kaynaklanır.

ABSTRACT

Genome is under attack of multiple endogenous and exogenous factors which lead to DNA damage. All organisms have DNA repair mechanisms to protect their genetic material from damages caused by environmental factors. DNA repair is an important protective mechanism of cell in the pathway which begins with a single mutation and ends with being formed of damaged DNA and cancer. Many repairing mechanisms which use different biochemical strategies repair a lot of forms of DNA damage. The causal association between genetic alterations and cancer is supported by many experimental and epidemiological data. Genetic instability is the characteristic property of cancer. Mutagenity plays a role either initiation

or progression of cancer. DNA repair defects also causes genetic instability and many of cancer types are result of DNA damages which are not repaired.

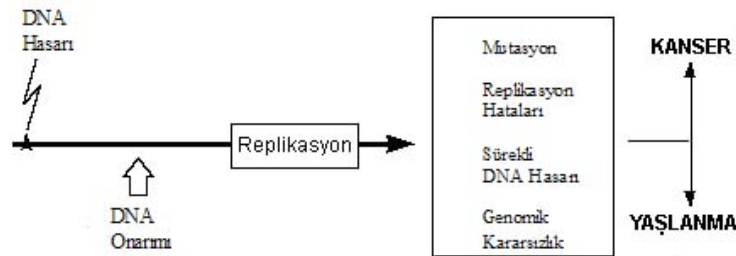
Anahtar Kelimeler: Mutasyon, DNA hasarı, DNA onarım mekanizmaları, kanser.

1. GİRİŞ

Tüm organizmalar (bakteri, maya, drosophila, balıklar ve insanlar dahil), hücreleri çevresel hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler. DNA onarımı, hücre ölümünü, mutasyonu, replikasyon hatalarını, DNA hasarının devamlılığını ve genomik kararsızlığı azaltan bütün işlemlerde kullanılır. Bu işlemlerdeki bir anormallik kansere ve yaşlanmaya (şekil 1) yol açar (1).

Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. Hasar kaynakları eksojen veya endojen olabilir. Eksojen kaynaklar içerisinde, güneşten gelen ultraviyole radyasyon, radon bozunumundan kaynaklanan iyonize radyasyon, mantar kaynaklı aflatoksin, yanmış tütün ve birçok kemoterapötüğü sayabiliriz. Endojen kaynaklara örnek olarak, oksidatif metabolizma, DNA'nın spontan değişimleri, immünojenik çeşitliliği oluşturan V(D)J rekombinasyon mekanizmasını (antijen tanıma bölgelerini kodlayan ekson V,D ve J şeklinde üç segmentten oluşur ve bu segmentlerin birçoğu farklı kombinasyonlarla bir araya gelebilir) verebiliriz (2).

Farklı biyokimyasal stratejileri kullanan birçok mekanizma DNA hasarının birçok şeklini onarır. DNA onarım genleri, genomun önemli bir bölümünden sorumludur (1,2).



Şekil 1: DNA Onarım Fonksiyonları (1).

2. MUTASYON

Mutasyon genetik materyaldeki kalıtsal değişikliklerdir. Bu değişiklik gamet hücrelerinde ya da somatik hücrelerde olabilir. Gamet hücrelerindeki, sonraki nesillere aktarıldığı için, somatik hücrelerdeki, kansere neden olabileceği için önemlidir.

Normal bir insan hücresinde replikasyon esnasında meydana gelen hata (DNA polimerazın yanlış nükleotid yerleştirmesi) oranı 10^{-10} , hata okuma (proofreading) mekanizmasına rağmen ortaya çıkan hata oranı 10^{-8} 'dir (3).

2.a. Mutasyon Tipleri

Mutasyonlar kromozom seviyesinde ya da nokta mutasyonları şeklinde olabilir.

2.a.1. Baz Çifti (nükleotid Çifti) Değişikliği Mutasyonları (Substitution Mutations)

İki tipi vardır. **Transisyonel (Transition)**/pürin-pürin veya pirimidin-pirimidin) ve **transversiyonel (transversion)**/pürin-pirimidin veya pirimidin-pürin).

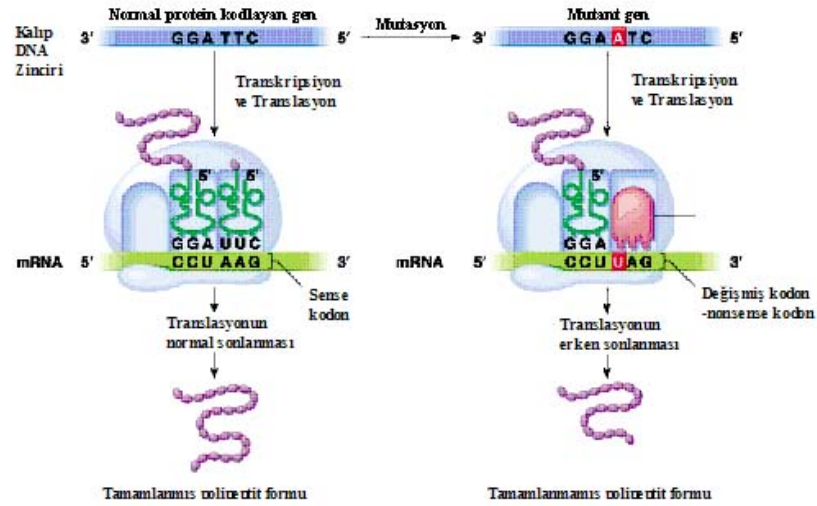
Bir genin protein kodlayan bölgelerindeki baz değişikliği mutasyonunun sonuçları, genin yerine ve yeni gelen baza göre değişir. Yeni gelen baz, protein dizisine yeni bir aminoasit girişine neden olmayacak şekilde “sessiz” kalabilir. Örneğin; GCA ve GCG kodonlarının ikisi de mRNA’da arjinini kodlar. Bu nedenle üçüncü bazda A yerine G geçmesi değişikliğe neden olmaz. Buna sessiz/silent mutasyon (şekil 2) denir. Bir baz yer değişikliği aminoasit değişikliği ile de sonuçlanabilir. Yeni gelen aminoasit öncekiyle aynı kimyasal özelliklere sahipse buna nötral mutasyon (şekil 2) denir. Aminoasit değişimi sonucu olması gerekenden farklı bir protein meydana geliyorsa buna yanlış anlamlı (missense) mutasyon (şekil 2) denir. Örneğin; DNA zincirindeki CTC (RNA zincirinde GAG) kodu, proteindeki glutamat kalıntısını ifade eder. Eğer DNA zincirinde CAC (RNA zincirinde GUG) şeklinde bir değişiklik meydana gelirse bu kod, beta-globulin proteininde valin kalıntısını ifade eder ve orak hücre anemisine sebep olur. Protein kodlayan bir bölgede meydana gelen baz yer değiştirmesi, bir aminoasit kodonunu sonlanma kodonuna ya da başka bir şeye dönüştürebilir. Zincirin erken sonlanmasıyla olması gerekenden daha kısa bir protein oluşturan bu tipe anlamsız (nonsense) mutasyon (şekil 3) denir. Anlamsız (nonsense) mutasyonun etkileri, proteinin ne kadar kısaltılmış olduğuna ve fonksiyon için ne kadar proteine gerek olduğuna göre değişir.

Baz değişikliği mutasyonları, promotorlarda, genlerin 5’ düzenleyici bölgelerinde veya intronlarda meydana gelebilir ve böylece bu genlerin ekspresyonunu etkileyebilir. Beta-talasemilerin çoğundan, globin genlerinin ekspresyonunu etkileyen, yapısal olmayan mutasyon tipleri sorumludur.

Bu mutasyon tiplerinin tamamı insan globin genlerinde görülür. Sonuçları gen ürününün ekspresyonu seviyesinde ne yaptıklarına ve/veya hangi aminoasit yer değiştirmesinin olduğuna ve bunun proteinin neresinde olduğuna bağlıdır.

Normal gen dizisi	Mutant gen dizisi
a) Transisyonel Mutasyon (AT GC) 5' TCTCAAAATTTACG 3' 3' AGAGTTT TAAATGC 5'	5' TCTCAAGAATTTACG 3' 3' AGAGTTC TAAATGC 5'
b) Transversiyonel Mutasyon (CG GC) 5' TCTCAAAATTTACG 3' 3' AGAGTTT TAAATGC 5'	5' TCTGAAAATTTACG 3' 3' AGAGTTT TAAATGC 5'
c) Missense Mutasyon 5' TCTCAA AATTTACG 3' 3' AGAGTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Lys Phe Thr ...	5' TCTCAA AATTTACG 3' 3' AGAGTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Glu Phe Thr ...
d) Nonsense Mutasyon 5' TCTCAA AATTTACG 3' 3' AGAGTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Lys Phe Thr ...	5' TCTCAA AATTTACG 3' 3' AGAGTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Stop ...
e) Nötral Mutasyon 5' TCTCAAAATTTACG 3' 3' AGAGTTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Lys Phe Thr ...	5' TCTCAAAATTTACG 3' 3' AGAGTTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Arg Phe Thr ...
f) Sessiz Mutasyon 5' TCTCAAAATTTACG 3' 3' AGAGTTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Lys Phe Thr ...	5' TCTCAAAATTTACG 3' 3' AGAGTTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Lys Phe Thr ...
g) Çerçeve Kayması Mutasyonu 5' TCTCAAAATTTACG 3' 3' AGAGTTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Lys Phe Thr ...	5' TCTCAA AATTTACG 3' 3' AGAGTT TAAATGC 5' ... Ser Gln Glu Thr Tyr ...

Şekil 2: Mutasyon tipleri (3).



Şekil 3: Anlamsız (nonsense) mutasyon (3).

2.a.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları

Bu mutasyonlar, genin kodlamaya katılan bölgesine, bir ya da daha fazla sayıda nükleotid girişi veya çıkışı sonucu meydana gelir. Bu değişiklik, okuma esnasında üçlü kodonların kaymasıyla sonuçlanır (şekil 2).

Örneğin; mRNA dizisi AUG CAG AUA AAC GCU GCA UAA olsun.

Aminoasit dizisi: met gln ile asn ala ala stop

Kayma sonucu oluşan aminoasit dizisi: cys arg stop

Bu tip mutasyon bütün aminoasit dizisini aşağı doğru kaydırır ve normal proteinden çok farklı yapıda fonksiyonsuz bir protein oluşturur. Doğru olanın dışındaki tüm okuma çerçeveleri bir bitirme kodonu içerebilir ve bu da mutant proteinin kısaltılmasına neden olur (3,4).

2.b. Spontan Mutasyon Orjinleri

Spontan mutasyon hücredeki normal işlemlerin bir sonucu olarak meydana gelen mutasyondur. Bunlar DNA'nın bir eksojen etkenle ya da mutajenle etkileşmesi sonucu oluşurlar. Ayrıca, DNA replikasyonundaki hatalardan da kaynaklanabilirler.

2.b.1. DNA replikasyon hataları

DNA replikasyonunda yanlış nükleotidin eklenmesiyle oluşan hata, replikasyonun bir sonraki döngüsünde hatalı nükleotidin kopyalanmasına ve mutasyona sebep olur. DNA polimerazın hata yapma (yanlış bazı ekleme) sıklığı spontan mutasyon oluşumunu etkiler. Polimerazların doğru çalışma oranının tipe göre değiştiği gözlenmiştir. Polimerazın doğruluk oranını etkileyen en önemli faktör, hata okuma (proofreading) 3'-5' ekzonükleaz aktivitesidir. Bu aktivite, polimeraz tarafından yanlış eklenen bazların çıkarılmasına, böylece replikasyon esnasında mutasyon oluşumunu engellemeye yarar.

2.b.2. Baz değişiklikleri ve baz hasarı

2.b.2.a. DNA bazları, tautomerizasyon sonucu spontan, yapısal değişikliklere maruz kalırlar. Örneğin; guanin, keto ve enol olarak iki şekilde bulunabilir. Bu iki tautomer form farklı eşleşme özelliklerine sahiptir. DNA replikasyonu esnasında, keto formda olması gereken G, enol formda olursa, polimeraz, G'nin karşısına C yerine T ekler çünkü baz eşleşme kuralları değişmiştir ve bu bir polimeraz hatası değildir. Sonuçta G:C→A:T değişikliği olmuştur. Yani tautomerizasyon, transisyonel mutasyona neden olur. Timin de enol formda, adenin ve sitozin ise amino veya imino formda bulunabilirler.

2.b.2.b. Hücrelerde meydana gelen diğer bir mutajenik olay, baz degradasyonudur. Sitozinin deaminasyon sonucu urasile dönüşümü, hücrelerde gerçekleşme oranı yüksek bir diğer mutajenik işlemdir. Deaminasyon, DNA'da normalde bulunmaması gereken urasilin fark edilmesiyle onarılır. Yoksa replikasyon sırasında U karşısına A gelmesi sonucu C:G→T:A değişimi ve transisyonel mutasyon gerçekleşir.

2.b.2.c. Üçüncü spontan DNA hasarı tipi, serbest oksijen radikallerinin bazıları hasara uğratması sonucu gerçekleşir. Bunlar, hücrede normal oksidatif metabolizma sonucu ya da radyasyon gibi fiziksel etkenler nedeniyle oluşurlar. Örneğin; oksidasyon ürünü 8-oksoguaninin adeninle yanlış eşleşmesi sonucu G:C→T:A değişimi ve transversiyonel mutasyon gerçekleşir.

2.b.2.d. Alkil gruplarının bazlara ya da DNA omurgasına eklenmesi sonucu da hatalı eşleşme gerçekleşebilir. Örneğin; S-adenosil metiyoninin DNA ile reaksiyonu sonucu alkilasyon gerçekleşir.

2.b.3. Spontan çerçeve kayması mutasyonları: İnsan dahil olmak üzere çeşitli organizmalarla yapılan çalışmalarda, tekrar eden nükleotid bölgelerinin çerçeve kayması mutasyonu için sıcak bölgeler (hotspots) olduğu belirlenmiştir.

Örneğin; 5' AGTCAATCCATGAAAAAATCAG 3'

3' TCAGTTAGGTACTTTTTTAGTC 5'

Bu dizideki 6 A:T baz çifti çerçeve kayması mutasyonu için sıcak bölgedir (3,5).

3. DNA HASARI

3.a. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

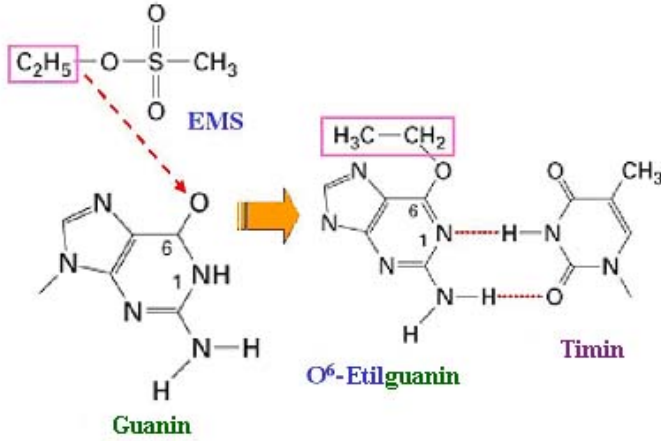
Mutajen, DNA yapısını veya dizisini değiştirebilen, doğal veya insan yapımı (fiziksel ya da kimyasal) bir etkidir. DNA onarımındaki hatalar da DNA'ya hasar veren etkenlere karşı duyarlılığı artırır.

3.a.1. Kimyasal Mutajenler

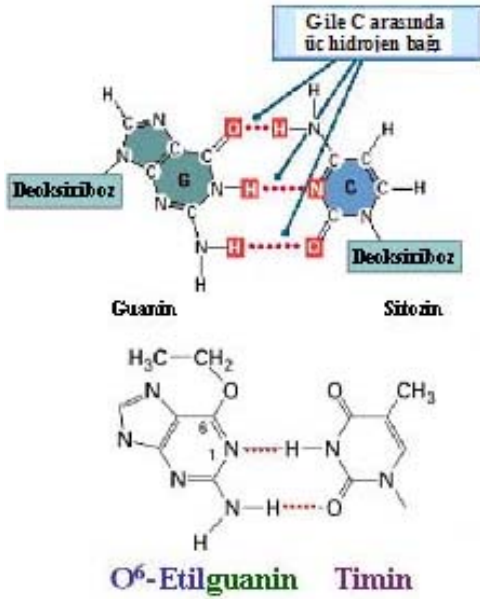
3.a.1.a. Baz Analogları: Yapısal olarak pürin veya pirimidinlere benzeyen ve replikasyon esnasında normal bazların yerine geçerek DNA yapısına katılan kimyasallardır. (Bromourasil, aminopürin) Transisyonel mutasyona ve spontan tautomerizasyona neden olurlar.

3.a.1.b. Bazların yapısını ve eşleşme özelliklerini değiştiren kimyasallar: Nitröz asit, deaminasyon ile C→U, meC→T, A→hipoksantin dönüşümüne ve transisyonel mutasyona neden olur. Nitrozoguanidin, metil metansülfonat, etil metansülfonat, bazlarla reaksiyona girerek,

bazlara metil ya da etil grupları eklerler. Alkilenen baz, degradasyona uğrayarak DNA'da baz içermeyen bir bölge oluşturur, DNA replikasyonu esnasında rekombinasyona ya da hatalı eşleşmeye neden olur (şekil 4).

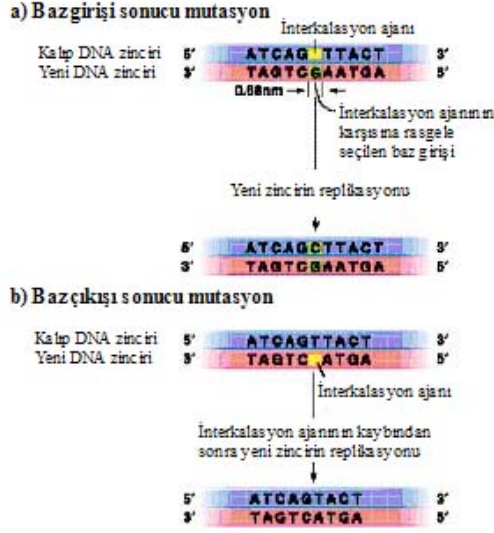


a) Etil metansülfonatın guanine etil grubu eklemesi



b) DNA replikasyonu esnasında hatalı baz eşleşmesi (3).

3.a.1.c. İnterkalasyon etkenleri: DNA bazlarının arasına girerek sarmalın gerilmesine ve DNA polimerazın hata yaparak fazladan nükleotid eklemesine neden olan moleküllerdir. Örneğin; akrinin oranj, proflavin, etidyum bromür. Sonuçta çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu olur (şekil 5).



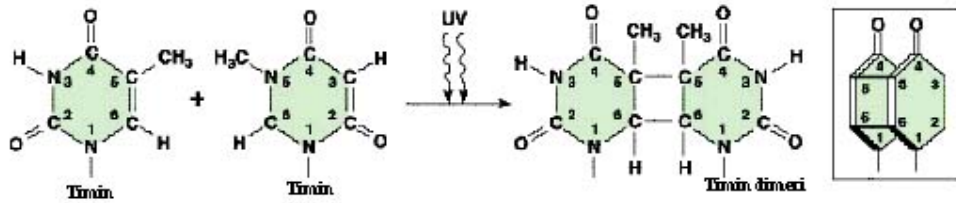
Şekil 5: İnterkalasyon etkeni sonucu çerçeve kayması mutasyonu (3)

3.a.1.d. DNA yapısını değiştiren etkenler: Bunlar, bazlara bağlanan büyük moleküller (NAAAF), DNA zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturan etkenler (psoralenler), DNA çift zincir kırıklarına neden olan kimyasallar (peroksitler) dır. Bu etkenler doğrudan mutasyona neden olmazlar, mutajenik onarım işlemlerini indüklerler.

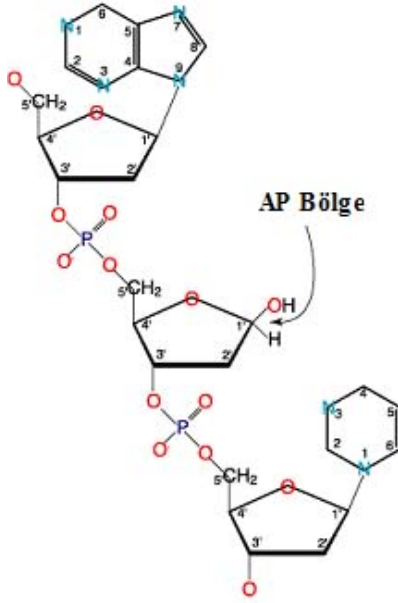
3.a.2. Radyasyon

3.a.2.a. İyonize radyasyon: Gamma ışınları ve X ışınları, biyolojik moleküllerle reaksiyona girdiklerinde reaktif iyonlar oluştururlar. Baz hasarına ve kaybına, tek veya çift zincir kırıklarına (rekombinasyonu uyarır, baz delesyonu, kromozom kayıpları görölür), DNA'nın kendisiyle ya da proteinlerle çapraz bağlar oluşturmasına neden olurlar.

3.a.2.b. UV ışınları: Özellikle, DNA tarafından kuvvetlice absorblanan UV-C (~260nm.) ve UV-B ışınları, DNA ve diğer biyolojik moleküllerle reaksiyona girerler. Pirimidin dimerleri (T-T, T-C) oluştururlar, bu dimerler replikasyonu ve transkripsiyonu bloke ederler (Şekil 6) (3,4,6,7,8).



Şekil 6: UV ışını etkisi sonucu timin dimerlerinin oluşumu (3).

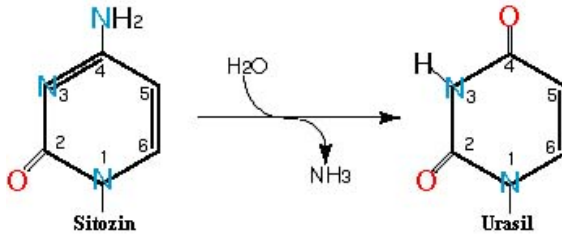


Şekil 7: Pürin/Pirimidin bazının kaybı sonucu AP (Apürinik / Apirimidinik) Bölgelerin oluşumu (4).

3.c.2. Baz Modifikasyonu

3.c.2.a. Deaminasyon

Nükleik asitlerin primer amino grupları stabil değildir. Bir memeli hücresinde, günde, haploid genom başına 100 urasil oluşur (şekil 8). Diğer deaminasyon reaksiyonları: adenin → hipoksantin, guanin → ksantin, 5-metil sitozin → timin

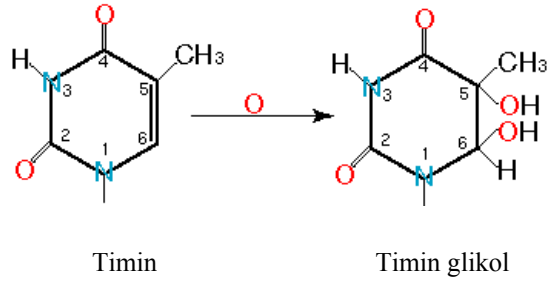


Şekil 8: Deaminasyon reaksiyonu sonucu sitozinden urasil oluşumu (4).

3.c.2.b. Kimyasal Modifikasyon

Nükleik asitler kimyasal etkenler tarafından meydana getirilen birçok modifikasyona karşı duyarlıdır. Örneğin, normal oksidatif metabolizma sırasında oluşan hiper-reaktif oksijen sonucunda, timin oksidasyonu ile oluşan timin glikol tipik bir örnektir (şekil 9).

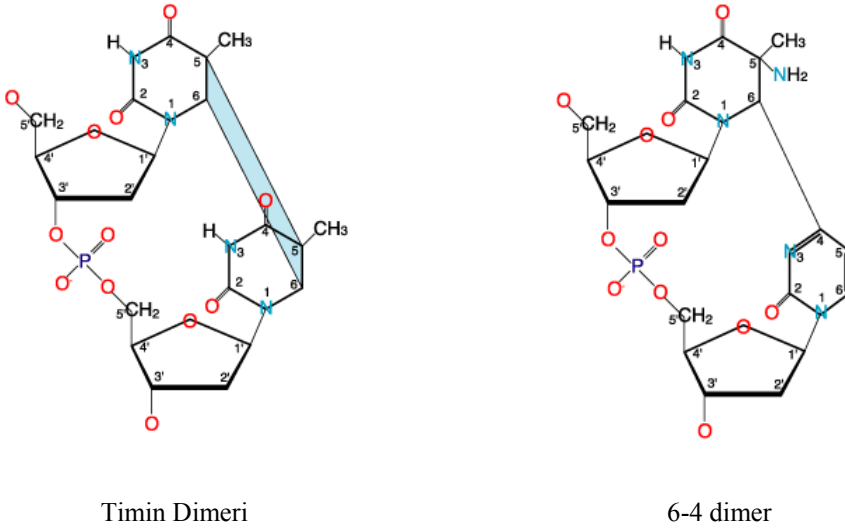
Kimyasallar alkilasyon ile de DNA bazlarını modifiye edebilirler.



Şekil 9: Oksidatif metabolizma sırasında oluşan hiper-reaktif oksijenin, timini okside ederek timin glikol oluşturması (4).

3.c.2.c. UV Hasarı

Nükleik asit bazlarının UV ışığı absorblaması sonucu kimyasal değişiklikler meydana gelebilir. Sıklıkla yakın pirimidin bazlarının birer zincirleri arasındaki bağ oluşumu sonucu dimerler oluşur (siklobütan pirimidin dimerleri). Dimerler aynı zamanda yakın iki pirimidinin 6 ve 4 pozisyonları arasında kovalent bağ oluşumu sonucu da meydana gelebilir (şekil 10).



Şekil 10: UV ışığı etkisi sonucu dimer oluşumu (4).

3.c.3. Replikasyon Hataları

DNA replikasyonu esnasında, hatalı eşleşme, küçük baz girişleri veya çıkışları olabilir. DNA polimerazın doğru çalışma oranının yüksek olmasına rağmen, ayrıca oluşan hataları düzelten bir hata okuma (proofreading) mekanizması varlığına karşın, replikasyon işlemi mükemmel değildir. Replikasyon işleminde oluşan hataları tamir mekanizmaları düzeltir.

3.c.4. Zincirler Arası Çapraz Bağlar

İyonize radyasyon, UV, psoralen gibi alkilleyici etkenler ve kansere karşı kullanılan kemoterapötikler, her iki zincirdeki bazlara bağlanarak, zincirler arasında çapraz bağlar oluştururlar.

3.c.5. DNA-Protein Arası Çapraz Bağlar

DNA topoizomerazlar, enzimatik aktiviteleri esnasında, kendileri ve substratları olan DNA arasında geçici kovalent bağlar oluştururlar. Bu bağlar bazen alkilleyici etkenler ve radyasyon gibi etkenler sonucu stabil hale gelir.

3.c.6. Zincir Kırıkları

Tek veya çift zincir kırıkları, topoizomerazlar, nükleazlar, replikasyon çatalı, onarım işlemleri gibi normal DNA metabolizması esnasında düşük sıklıkta oluşurlar. İyonize radyasyon ve bazı kimyasalların etkisiyle normal durumun dışında da zincir kırıkları oluşur (4,6,12).

4. DNA ONARIM MEKANİZMALARI

DNA onarım hatalarının, genomik kararsızlıkla karakterize sendromlara ve kanser insidensinde artışa varan sonuçlar doğurduğu düşünüldüğünde, DNA onarımının önemi anlaşılmaktadır. İnsanda DNA onarımı ile bağlantılı 130 genin klonlanması ve dizi analizi tamamlanmıştır. DNA onarım genleri iki altgruba ayrılabilir: 1) DNA onarımında sinyal iletimi ve onarımın düzenlenmesi ile ilgili genler, 2) Hatalı eşleşme onarımı, baz çıkarma onarımı, nükleotid çıkarma onarımı gibi ayrı onarım mekanizmaları ile ilgili genler (7,12,13,14,15).

4.a. DNA Çift-Zincir Kırığı Onarımı

DNA çift zincir kırığının kaynakları:

- İyonize radyasyon,
- topoizomeraz inhibitörleri (etoposide, adriamycin),
- V(D)J rekombinasyonu.

DNA çift zincir kırıkları (DSBs), DNA hasarının en yıkıcı şeklidir. Onarılmazsa kromozomların kırılmasına ve hücre ölümüne varan sonuçlar doğurabilir. Yanlış onarılsa kromozom translokasyonuna ve kansere sebep olur. DSBs'ye neden olan en önemli eksojen ajan iyonize radyasyondur. Ayrıca radon bozunumu ve antikanser ilaçlar da etkilidir. Oksidatif serbest radikaller oluşturan Bleomisin, Adriyamisin, Etoposid topoizomeraz II yi inhibe ederek protein köprülü DSBs'ler meydana getirirler. DSBs oluşturan endojen ajanlar ise serbest radikaller

oluşturan oksidatif metabolizma ve V(D)J rekombinasyonudur. V(D)J rekombinasyonu B ve T lenfositlerini kodlayan genlerin düzenlenmesi esnasında DSBs oluşturur. DSBs 'in onarımı için 2 yolak vardır (2,4,6,7,16,17).

4.a.1. Homolog Rekombinasyon

DNA çift zincir kırıkları, genetik bilgi korunarak, homolog DNA ile rekombinasyon aracılığıyla tamir edilir. Mayada bu yol çift zincir kırığı onarımında baskın olarak kullanılır. İnsanda homolog olmayan uç bağlanması ile eşit önemlidir (2,4,6,7,17,18).

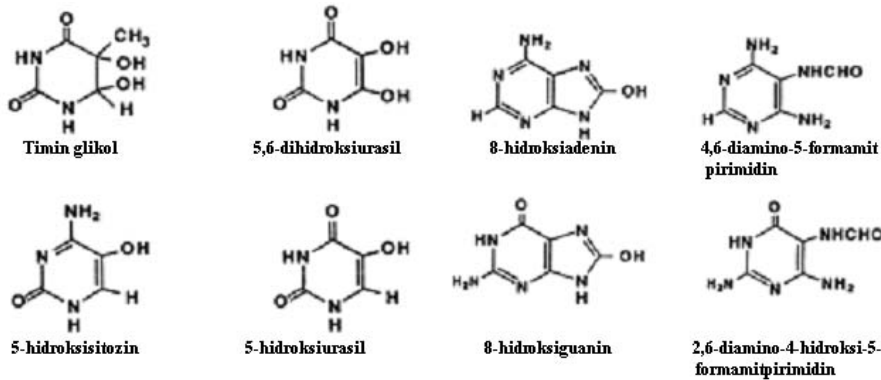
4.a.2. Homolog olmayan uçların bağlanması

Homolog bir kromozomdan faydalanmaksızın DNA uçlarının bağlanmasının biyokimyasal bir yoludur. Çünkü kırık DNA uçları bağlanabilir durumda (ligatable) olmayabilir ve bu yol bazen genetik bilgide kayıba da neden olur. Homolog olmayan uç bağlanmasındaki hatalar iyonize radyasyon duyarlılığına ve immün yetersizliğe (severe combined immunodeficiency) neden olur.

X ışınları ve peroksitler gibi bazı kimyasallar DNA omurgasında kırıklara neden olurlar. Tek zincirdeki basit kırıklar DNA ligaz tarafından onarılır. Ancak, DNA ligaz, sadece, 5'-fosfat ve 3'-hidroksil gruplarına sahip uçları birleştirebilir (2,4,6,7,17,18).

4.a.3. Oksidatif Hasarın Onarımı

Elektron taşıma sisteminin mitokondride yer alması ve mRNA sentezi esnasında RNA polimerazın bir hata okuma (proofreading) mekanizmasına sahip olmaması nedeniyle, oksidatif hasar, mitokondride kromozomal DNA'ya göre daha sıklıkla meydana gelir. Mitokondriyal solunum sonucu oluşan serbest radikaller ($-O_2$ / Süperoksit, H_2O_2 / Hidrojen peroksit, $-OH$ / Hidroksil), tek zincir kırıklarına ve 8-oksoguanin ve timin glikol gibi hasarlı bazların oluşmasına sebep olur (şekil 11), hücreler bu tip hasarlı bazların onarımı için özel glikozilazlar içerir (2,19).

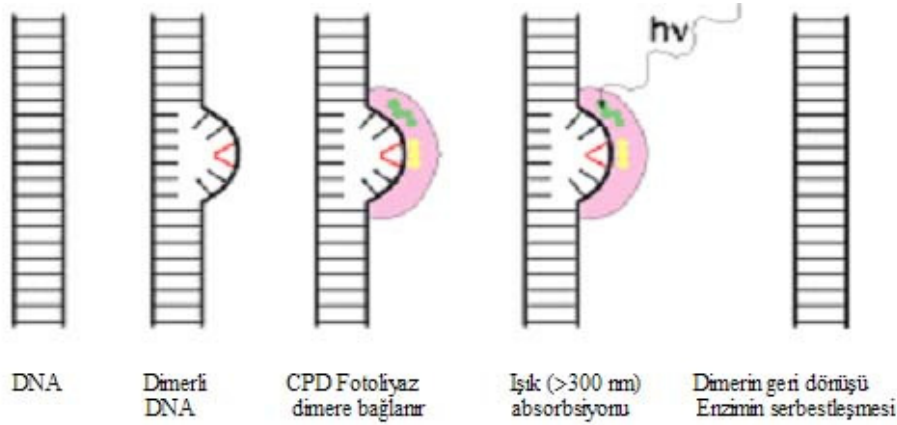


Şekil 11: Oksidatif metabolizma sonucu meydana gelen bazı hasarlı bazlar (4).

4.b. Baz Hasarı Onarım Mekanizmaları

4.b.1. Hasarın Doğrudan Geri Döndürülmesi (Direct Reversal)

Hasarın geri döndürülmesi onarım için en kolay yol gibi görünmesine karşın çoğu durumda termodinamik ve kinetik nedenlerden dolayı reaksiyonun geri dönmesi mümkün değildir. Bazı durumlarda ise enzim aracılığı (Fotoliyaz ve O-6-Metil-DNA-alkiltransferaz) ile gerçekleşen tek adımlı reaksiyonlar ile hasar onarılır. Siklobütan pirimidin dimerleri (CPDs), fotoliyaz enzimi tarafından ayrılarak hasar giderilir. Reaksiyona **fotoreaktivasyon** denir (şekil 12).



Şekil 12: Fotoreaktivasyon (4).

CPD fotoliyazlar bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve çoğu omurgalıda bulunur ancak plasentalı memelilerde bulunmaz (1,2,3,4,6).

4.b.2. Baz Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair/BER)

DNA hasarının doğrudan geri döndürülmesinde, bazlardaki her kimyasal değişiklik kendine özgü bir onarım mekanizması gerektirir. Ancak, hücreler birçok kimyasal hasar tipini düzeltebilecek genel bir onarım mekanizmasına ihtiyaç duyarlar. Bu da **eksizyon onarımı** (excision repair). Yanlış yerleştirilen ve hasarlı bazları uzaklaştırmak için kullanılan onarım mekanizmasıdır. Her yanlış baz tipine özgün birçok yolak vardır. Bu yollar 2. ve 3. basamaklar ortak olmak üzere 3 adımdan oluşur.

1. Yanlış bazın uygun bir DNA N-glikozilaz tarafından uzaklaştırılması ve bir AP (Apürinik / Apirimidinik) bölge oluşması. AP bölgeleri spontan olarak kaybolan ya da glikozilaz etkisiyle uzaklaştırılan DNA bölgeleridir. Bir memeli hücresi günde 10000 pürin ve 500 pirimidin kaybeder.

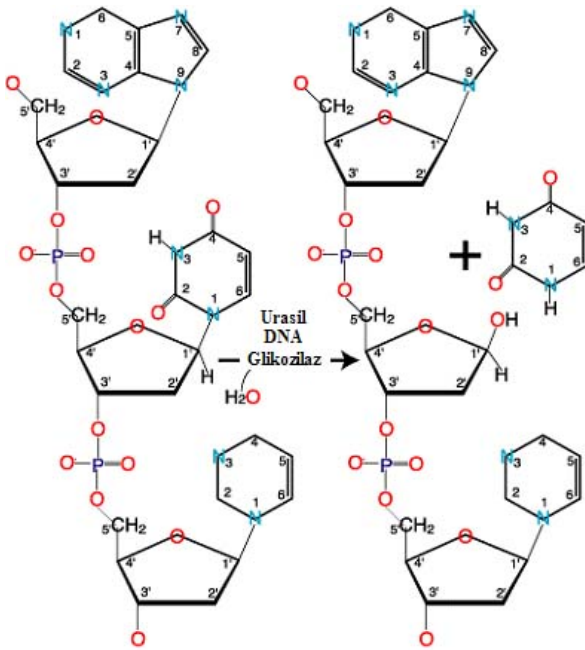
2. Hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılması ve AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu oluşturulması.

3. AP bölgesinin kesilip çıkarılarak (excision) uzaklaştırılması ve DNA polimeraz tarafından 3'-OH ucunun uzatılması.

İnsan hücrelerinde çok sayıda DNA N-glikozilaz tanımlanmıştır. Diğer ökaryotik organizmalarda ve prokaryotlarda da benzer yapıda glikozilaz enzimi bulunmaktadır.

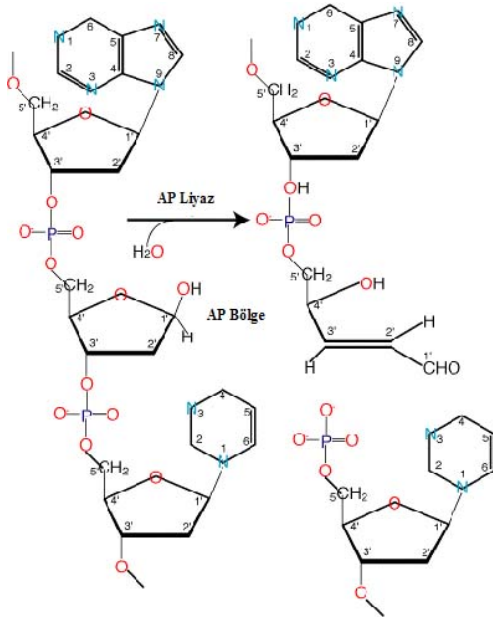
DNA N-glikozilaz, DNA sarmalı üzerinde hatalı eşleşmeden kaynaklanan bükülmüş yapıyı tanır, baz ve deoksiriboz arasındaki N-glikozidik bağı hidroliz ederler. Ayrıca glikozilazlar bazların yüksek afinite gösterdiği bağlanma bölgelerine sahiptirler. Bu iki etken birleşince yanlış eşleşen bazın DNA çift sarmalından çıkarılması kolaylaşır.

Şekil 13'de Urasil DNA N-glikozilazın aktivitesi görülmektedir.



Şekil 13: Spontan deaminasyon hatalı baz eşleşmesine ve böylece DNA replikasyonu esnasında kalıcı hale gelen mutasyonlara sebep olur. Örneğin; deaminasyon sitozini urasile çevirir ve sonrasında, urasil replikasyon esnasında adenin ile eşleşir. Urasil N-glikozilaz hatayı tanır ve urasili çıkarır (4).

DNA N-glikozilazlar ayrıca AP liyaz aktivitesine sahiptirler (şekil 14). Bu şekilde AP bölgedeki 3'-OH ucunda DNA omurgasını keserler. Bir sonraki adımda AP endonükleazları 5' fosfodiester bağına hidroliz ederler ve uygun nükleotidin yer alması için abazik deoksiribozu uzaklaştırırlar. Son olarak, DNA polimeraz (polimeraz-β) tarafından doğru nükleotidin yerleştirilmesi ve zincirin ligasyonu ile onarım tamamlanır (1,2,3,4,6,7,20,21).



Şekil 14: DNA N-gikozilazların AP liyaz aktivitesi (4).

4.b.3. Nükleotid Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair / NER)

DNA bazları üzerinde büyük eklentiler oluşturan birçok çeşit hasarı tanıyabilen bir onarım mekanizmasıdır. Mikoplazmadan memelilere kadar geniş bir yelpazedeki organizmalar tarafından kullanıldığı belirlenmiştir. Birçok DNA hasarının özellikle de heliks distorsiyonuna neden olanların onarımında etkindir. İnsanlarda güneşten gelen UV ışığının karsinojenik etkilerine(dimerler) ve cisplatin, 4-nitrokuinolin oksit gibi etkenlerle reaksiyon sonucu oluşan büyük eklentili hasarlara karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. NER mekanizmasının anahtarı;

1. Hasarın tanınması
2. Protein kompleksinin hasarlı bölgeye bağlanması
3. ~24-32 nükleotid uzunluğunda bir fragment içinde bırakacak şekilde lezyonun her iki tarafından hasarlı zincirin kesilmesi (incision)
4. Degradasyon (hasarı içeren oligonükleotidin uzaklaştırılması)
5. DNA sarmalı üzerinde meydana gelen boşluğun DNA polimeraz tarafından doldurulması (polimerizasyon)
6. Ligasyon

Kalıtıl sendromları (Xeroderma pigmentosum/XP, Cockayne syndrome/CS, Trichothiodystrophy/TTD) olan bireylerde NER mekanizmasında bozukluklar saptanmıştır. Bu bireylerde güneşe duyarlılık, bazı dokularda erken yaşlanma, nörolojik bozukluklar ve genellikle UV kaynaklı cilt kanseri insidensinde artış gözlenir (1,2,3,4,6,7,20,22,23,24,25,26).

Transkripsiyona Bağlı Onarım (Transcription Coupled Repair/TCR): Genomun her bölgesi eşit etkinlikte onarılmaz, genin transkripsiyona uğrayan zinciri aynı genin transkripsiyona uğramayan zincirine göre daha etkin olarak onarılır. Transkripsiyona bağlı onarım, RNA polimeraz II (mRNA'yı sentezleyen enzim) bir DNA lezyonu ile karşılaştığında aktive olan DNA onarımıdır. Global genomik onarım (global genomic repair), transkripsiyondan bağımsız olan DNA onarımıdır.

Transkripsiyona uğrayan gen bölgelerindeki timin glikollerinin, genomun herhangi bir yerindeki timin glikollerinden daha hızlı tamir edildikleri gösterilmiştir. Transkripsiyona bağımlı bu özellik, baz çıkarma onarımında (TC-BER) ve hatalı eşleşme onarımında da görülür (2,4,6,23,27,28).

4.b.4. Hatalı Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair)

Bu onarım mekanizması, DNA replikasyonu esnasında meydana gelen ve çift sarmalda anormal boyutlara neden olan, **normal bazların hatalı eşleşmesi** şeklindeki hataları düzeltir. Örneğin, *E. coli*'de hatalı eşleşme 7 proteinden oluşan bir sistem tarafından belirlenir. Bu proteinler, mutS, mutL, mutH, uvrD, ekzonükleaz I, SSB ve DNA polimeraz III tür. *E. coli* DNA'sında, (5')GATC dizisindeki adeninler özel bir metilaz olan "Dam Metilaz" tarafından metillenmiştir. Replikasyon esnasında kalıp zincir metillenmiş durumdadır. Ancak, yeni sentezlenen zincir birkaç dakikalık bir gecikme ile metillenir. Bu zaman sürecinde yeni zincirdeki hatalı eşleşen bazlar mutS tarafından tanınır. Sırayla mutL ve mutH bir kompleks oluşturmak üzere sisteme katılırlar ve DNA boyunca çift yönlü olarak metilenmemiş bir GATC buluncaya kadar hareket ederler. MutH'deki endonükleaz fonksiyonu metil grubunun karşısında metillenmemiş zincire bir çentik atmak üzere aktive olur. Metillenmemiş zincir, ekzonükleaz I, SSB ve uvrD helikaz'ın birlikte hareketi ile uzaklaştırılır. DNA polimeraz III doğru DNA zincirini tekrar oluşturur ve ligasyon ile onarım sona erer.

GATC bölgesi ile hatalı eşleşme arasındaki uzaklık en çok 1000 bç olabilir. Bu nedenle hatalı eşleşme onarımı etkili bir onarım mekanizması değildir.

İnsan hatalı eşleşme onarım proteinleri:

<u><i>E. coli</i></u>	<u>İnsan</u>
MutS	MSH2 – MSH6
MutS	MSH2 – MSH3
MutS	MSH4 – MSH5
MutL	MLH1 – PMS2, PMS1, MLH3

Ökaryotlar da *E.coli*'deki mut proteinlerine homolog proteinlere sahiptir. Ancak yeni sentezlenen zinciri ayırmak için *E. coli*'ye özgü metilasyon işleminin yerine kullanılan mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Hatalı eşleşme onarım mekanizması genlerinde mutasyon olan bireylerin kalıtsal non-polipozal kolon kanserine (HPNCC) yatkın oldukları tespit edilmiştir (1,2,3,4,6,7,20,29,30,31,32,33).

5. DNA ONARIMI VE KANSER

Genetik değişiklikler ve kanser arasındaki nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile desteklenmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin mutasyonel inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu, birçok kanser türünün gelişimi ile bağlantılıdır. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişki, hem karakteristik mutasyonlara neden olan kimyasal maddelere maruz kalma sonucu gelişen kanserlerle, hem de DNA onarım hataları sonucu artan kanser riski ile anlaşılabilir. Mutajenite kanser gelişiminin hem başlangıç, hem de gelişme evresinde rol oynar (2,3,4,34). Örneğin, Dianzani ve ark. tarafından , yüksek oranda asbeste maruz kalınan ortamda yapılan bir çalışmada, DNA onarımındaki 7 genetik polimorfizm ve malign mezoteliyoma (MM) gelişimi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada, DNA onarım genlerindeki genetik polimorfizm ile asbest bağlantılı MM arasındaki ilişkinin varlığı ilk olarak bildirilmiştir (Dianzani). Ayrıca, Neri ve ark. tarafından, Çekoslovakya'da yapılan bir diğer çalışmada, hava kirliliğine ve prefabrik okullarda formaldehide maruz kalan okul çocuklarında kromozomal aberasyon (kromozomal sapma) varlığı saptanmıştır. (Monica Neri, 2006).

Genetik kararsızlık kanserin karakteristik özelliğidir ve kanserler, genetik kararsızlığa neden olan bir mutasyon oluştuktan sonra, bu mutasyonların çoğalmasıyla oluşur. Normal hücreden kanserli bir hücreye geçişte, hücre siklusünün düzenlenmesi, apoptozis, hücre farklılaşması ve diğer birçok hücre fonksiyonunu etkileyen birçok spesifik mutasyon gereklidir. Kanser, yalnızca bir hücrede birçok farklı gende mutasyon olursa ortaya çıkar (kolon kanserinde 6 veya 7). Bu mutasyonlar genomun bütünlüğünü sağlayan genlerde veya tümör gelişimi süresince somatik hücrelerde meydana gelebilir. Bu değişiklikler, tek bir nükleotide, küçük DNA bölümlerinde (mikrosatelitler), genin tümünde, kromozomun yapısal bileşenlerinde ya da kromozomun tümünde gerçekleşebilir (2,3,4,34,35). Tümör gelişiminde kararsız genomun rolünün en iyi göstergelerinden biri, sporadik kolon ve endometrium kanserlerinin %10 -15 inin patojenezinde DNA hatalı eşleşme onarımının somatik inaktivasyonunun gözlenmesidir. Hatalı eşleşme onarımının eksik olduğu

kanserlerin çoğunlukla diploid olması, çok fazla genomik kararsızlığın hücre için bir dezavantaj olduğunu düşündürmektedir (Sieber, 1996).

DNA onarımındaki hatalar da genetik kararsızlığa neden olurlar. Kanserlerin çoğunluğu tamir edilmemiş DNA hasarından kaynaklanır, onarım sistemindeki bozukluklar da - bu işlemlerde yer alan enzimlerdeki mutasyonlar gibi - kanserin kalıtsal türleriyle ilişkilidir. Örneğin, kalıtsal non-polipozal kolorektal kanser, hatalı eşleşmenin onarımındaki bozukluktan, kolorektal kanser ise baz çıkarma onarımındaki bir bozukluktan kaynaklanır. NER mekanizmasındaki bozukluklar, güneşe duyarlılığa ve UV kaynaklı cilt kanseri riskinde artışa neden olur. Meme kanseri, iyonize radyasyona maruz kalma ile ilişkilidir. Malign prostat kanserli hücrelerde, DNA onarım genlerinin ekspresyonuyla fonksiyonu arasındaki farklılığın varlığı, prostat tümörü gelişiminde, hatalı DNA onarımının rolü olduğunu düşündürmektedir. DNA metilasyonu, prostat kanseri başlangıcında genetik bir faktör olarak kritik rol oynar (30,31,36,37,38,39,40,41,42,43).

Belzile ve ark.'nın çalışmasında belirtildiği gibi, birçok kanser hücresinde, artırılmış DNA onarımı, kanser tedavisine gelişen dirençle ilişkilendirilebilir ve böylece zayıf prognoza neden olur. İyonize radyasyon ve birçok anti-kanser ilaç, DNA hasarının en toksik şekli olarak düşünülen DNA çift zincir kırıklarını indükler. Bu kırıkların onarımı hücrenin genomik kararlılığı sürdürmesinde ve hayatta kalmasında kritik rol oynar. Birçok araştırmacı, kanser hücrelerinin hayatta kalma oranını düşürmek için çift zincir kırıklarının onarımında görev alan proteinlerin inaktivasyonu veya ekspresyonlarının azaltılması yönündeki tedavi şeklini kullanmaktadır (Jean Philippe Belzile, 2006).

6. SONUÇLAR

- Hücreler DNA hasarının onarımı için birçok mekanizmaya sahiptir.
- Birçok DNA onarım geni, DNA metabolizmasında başka görevler de üstlenir. Örneğin, TFIIH, hem transkripsiyonun başlangıcında, hem de nükleotid çıkarma onarımında görev alır. Çift zincir kırığı onarım genleri de ayrıca immün sistemin oluşumunda görev alır.
- DNA onarımındaki bozukluklar, meme, kolon ve cilt kanseri gibi birçok kanser türüne neden olduğu gibi, ayrıca, büyüme ve beyin anomalilerine de sebep olur (2).
- Birçok kanser hücresinde, artırılmış DNA onarımı, kanser tedavisine gelişen dirençle ilişkilendirilebilir, bu nedenle, tedavi şekli olarak, DNA onarımında görev alan proteinlerin inaktivasyonu veya ekspresyonlarının azaltılması yönüne gidilebilir (Jean Philippe Belzile, 2006).

KAYNAKLAR

1. What is DNA repair?, <http://www.nih.gov/sigs/dna-rep/whatis.html>
2. **Chu G.**, Biochemistry 201: DNA repair, <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf>
3. Mutation, Mutagens, and DNA Repair Outline, <http://www-personal.ksu.edu/~bethmont/mutdes.html>
4. DNA Damage, http://saturn.roswellpark.org/cmb/huberman/DNA_Repair/damage_types.Html
5. **Beranek DT.**, Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat Res.* 1990 Jul;231(1):11-30, Review.
6. DNA Repair, <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DNArepair.html>
7. **Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B.**, Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology*, 2003 Nov 15;193(1-2):3-34, Review.
8. **Evans MK, Bohr VA.**, Gene-specific DNA repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in some cancer-prone and premature-aging human syndromes, *Mutat Res.* 1994 May;314(3):221-31.
9. Ames Test, <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BioloyPages/A/AmesTest.html>
10. Ames Test, <http://www.nelsonlabs.com/amestest.jsp>
11. *Salmonella*/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds, Hakura A., Shimada H., Nakajima M., Sui H., KitMOTOs., Suzuki S., Satoh T., *Mutagenesis*, 2005, May;20(3):217-28. Epub 2005 Apr 20.
12. **Friedberg EC.**, DNA damage and repair, *Nature.* 2003 Jan 23;421(6921):436-40, Review.
13. **Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S.**, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39-85, Review.
14. **Ronen A, Glickman BW.**, Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen*, 2001;37(3):241-83. Review.
15. **Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T.**, Human DNA repair genes, *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1284-9.

16. **Chu G.**, Double Strand Break Repair, *J. Biol. Chem.* 272: 24097-24100.
17. **Haber JE.**, Partners and pathways repairing a double-strand break, *Trends Genet.* 2000 Jun;16(6):259-64, Review.
18. **Haber, JE**, DNA Recombination: the replication connection, *TIBS*, 1999 July; 24: 271-5.
19. **Croteau D. L. and Bohr V. A.**, Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 1997;272: 25409-25412.
20. DNA Repair Mechanisms, <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7G.htm>
21. **Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A, Dogliotti E.**, Two pathways for base excision repair in mammalian cells, *J Biol Chem.* 1996 Apr 19;271(16):9573-8.
22. **Wood R.D.**, Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells, *J. Biol. Chem.* 272: 23465-23468.
23. **Van Hoffen A, Balajee AS, van Zeeland AA, Mullenders LH.**, Nucleotide excision repair and its interplay with transcription, *Toxicology*, 2003 Nov 15;193(1-2):79-90, Review.
24. **Amundson SA, Patterson A, Do KT, Fornace AJ Jr.**, A nucleotide excision repair master-switch: p53 regulated coordinate induction of global genomic repair genes, *Cancer Biol Ther.* 2002 Mar-Apr;1(2):145-9.
25. **Balajee AS, Bohr VA.**, Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair, *Gene.* 2000 May 30;250(1-2):15-30, Review.
26. **Friedberg EC.**, How nucleotide excision repair protects against cancer, *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct;1(1):22-33, Review.
27. **Brumer Y, Shakhnovich EI.**, Importance of DNA repair in tumor suppression, *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2004 Dec;70(6 Pt 1):061912. Epub 2004 Dec 22.
28. **Bootsma D, Hoeijmakers JH.**, DNA repair, Engagement with transcription, *Nature*, 1993 May 13;363(6425):114-5.
29. **Modrich P.**, Strand-specific Mismatch Repair in Mammalian Cells, *J. Biol. Chem.* 272: 24727-24730.
30. **Stojic L, Brun R, Jiricny J.**, Mismatch repair and DNA damage signaling, *DNA Repair (Amst)*, 2004 Aug-Sep;3(8-9):1091-101, Review.

31. **Chung D. C., Rustgi A. K.**, DNA mismatch repair and cancer, *Gastroenterology*, 1995;109: 1685-1699.
32. **Schofield M. J., Hsieh P.**, DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function, *Annu. Rev. Microbiol.* 2003; 57: 579-608.
33. **Harfe B. D., Jinks-Robertson S.**, DNA mismatch repair and genetic instability, *Annu. Rev. Genet.* 2000; 34:359-399.
34. **Lehman I. R.**, Eukaryotic DNA Repair Minireview Series, *J. Biol. Chem.* 272: 23463.
35. **Dianzani I, Gibello L, Biava A, Giordano M, Bertolotti M, Betti M, Ferrante D, Guarrera S, Betta GP, Mirabelli D, Matullo G, Magnani C.**, Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study, *Mutat Res.* 2006 Mar 27.
36. **Neri M, Taioli E, Filiberti R, Paolo Ivaldi G, Aldo Canessa P, Verna A, Marroni P, Puntoni R, Hirvonen A, Garte S.**, Metabolic genotypes as modulators of asbestos-related pleural malignant mesothelioma risk: A comparison of Finnish and Italian populations, *Int J Hyg Environ Health.* 2006 May 10.
37. **Dixon K., Kopras E.**, Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis, *Seminars in Cancer Biology* 2004; 14: 441-48.
38. **Sieber O, Heinimann K, Tomlinson I.**, Genomic stability and tumorigenesis, *Semin Cancer Biol.* 2005 Feb;15(1):61-6. Review.
39. **Fan R, Kumaravel TS, Jalali F, Marrano P, Squire JA, Bristow RG.**, Defective DNA strand break repair after DNA damage in prostate cancer cells: implications for genetic instability and prostate cancer progression, *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8526-33.
40. **Li LC, Okino ST, Dahiya R.**, DNA methylation in prostate cancer, *Biochim Biophys Acta.* 2004 Sep 20;1704(2):87-102, Review.
41. **Digweed M.**, Response to environmental carcinogens in DNA-repair-deficient disorders, *Toxicology*, 2003 Nov 15;193(1-2):111-24, Review.
42. **Baglioni S, Genuardi M.**, Simple and complex genetics of colorectal cancer susceptibility, *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004 Aug 15;129(1):35-43, Review.
43. **Chow E, Thirlwell C, Macrae F, Lipton L.**, Colorectal cancer and inherited mutations in base-excision repair, *Lancet Oncol.* 2004 Oct;5(10):600-6, Review.

44. **Melnikova VO, Ananthaswamy HN.**, Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer, *Mutat Res.* 2005 Apr 1;571(1-2):91-106, Review.
45. **Balmain A, Gray J, Ponder B.**, The genetics and genomics of cancer, *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:238-44, Review.
46. **Becker K, Gregel CM, Kaina B.**, The DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase protects against skin tumor formation induced by antineoplastic chloroethylnitrosourea, *Cancer Res.* 1997 Aug 15;57(16):3335-8.

Received: 16.05.2006

Accepted: 01.09.2006