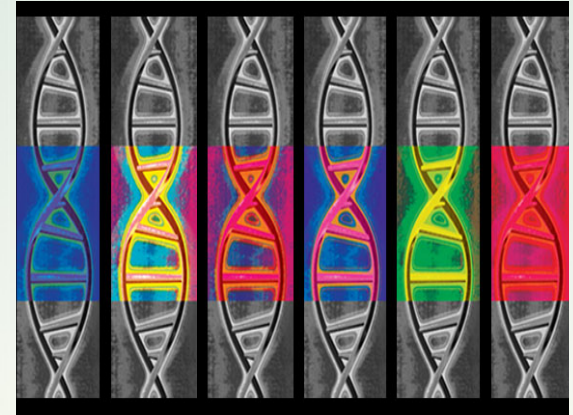


EPIGENETİK MEKANİZMALAR

ÖZGE ÖZALP YÜREĞİR

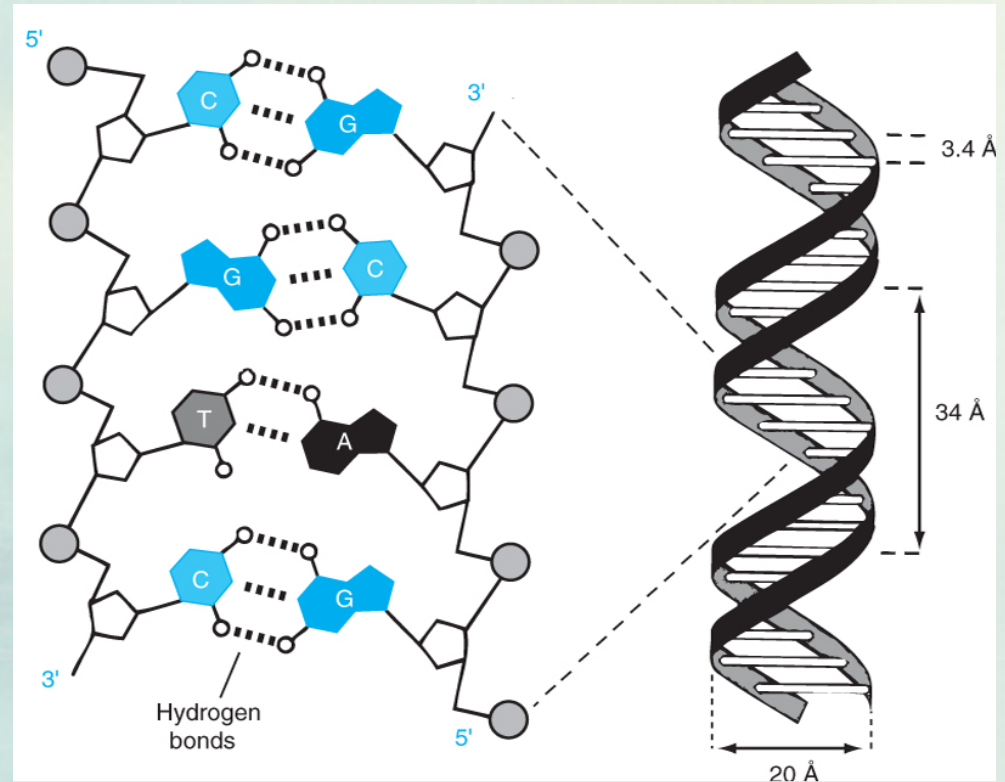
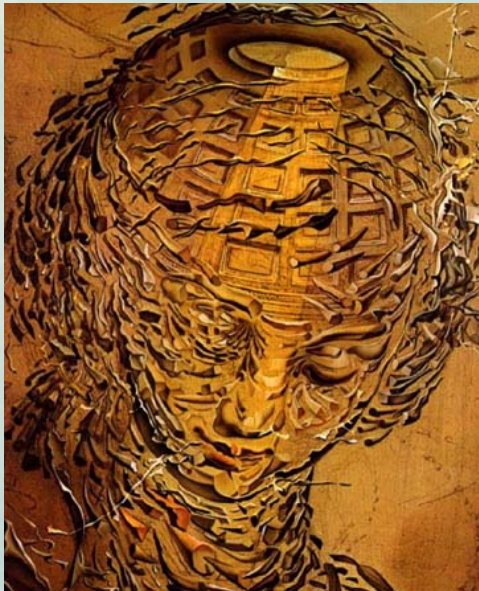
22.03.2016



DNA

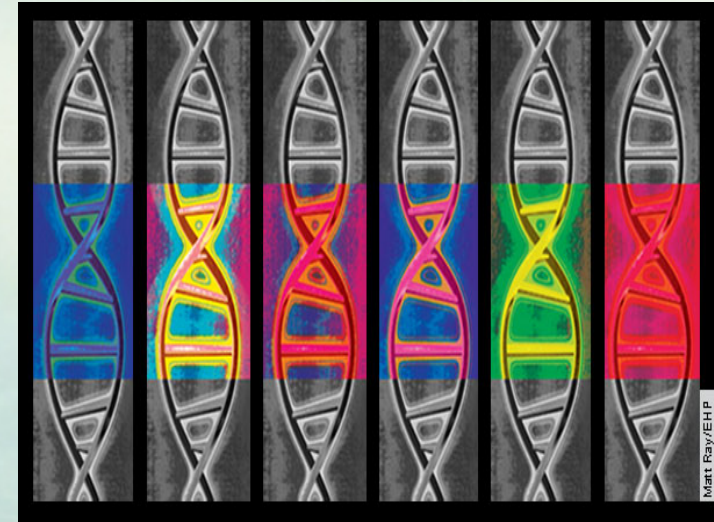
- *Nothing is more monarchical than a molecule of DNA*

Salvador Dali



EPIGENETİK

- Epi; Yunanca ‘üstünde, -den sonra, ek olarak’
- DNA dizisine bağlı olmayan kalıtsal değişiklikler
- Genin ifadenmesi ya da gen ürününün özellikleri



■ Kalıtsal

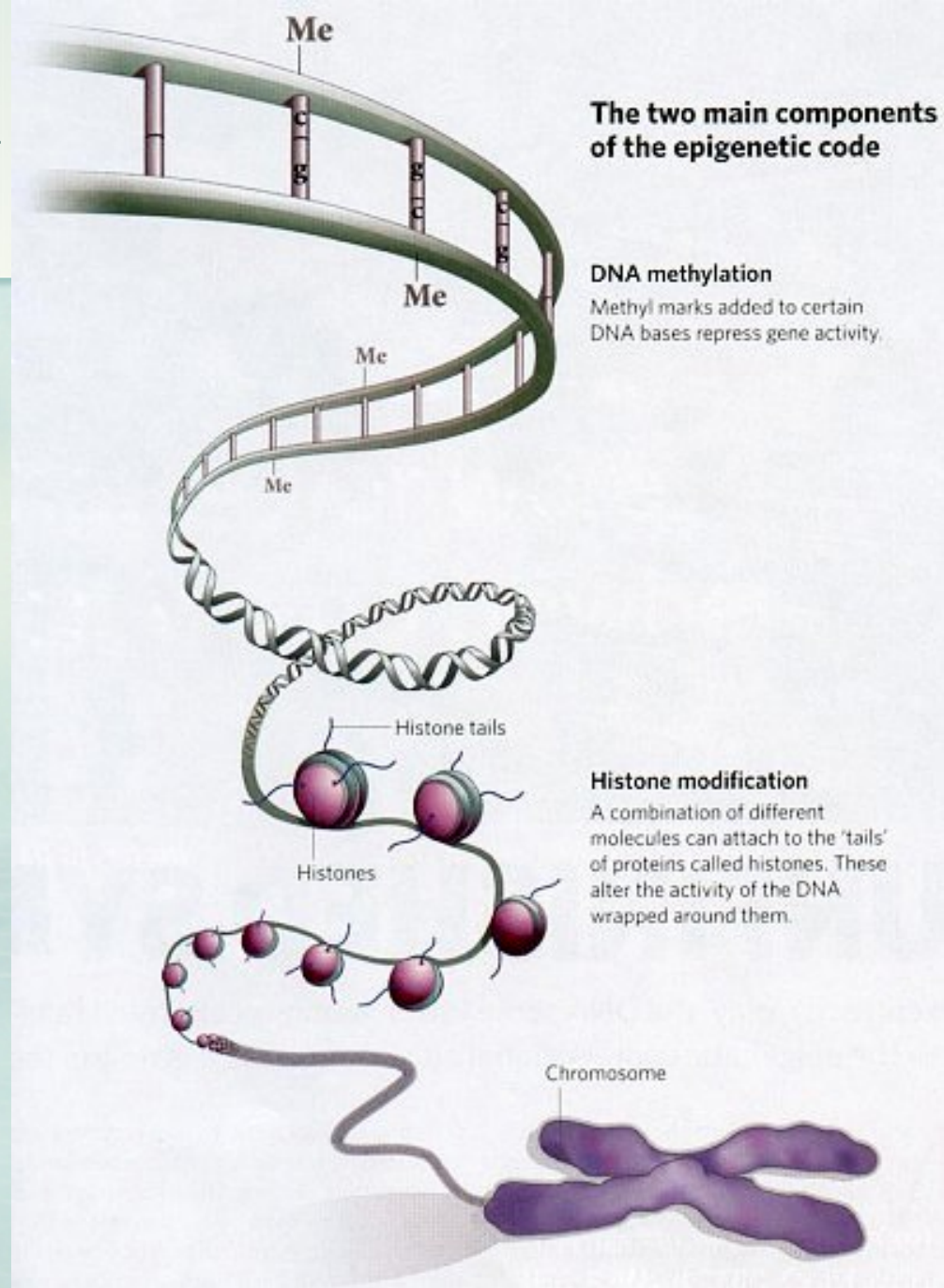
■ Geri dönüşümlü

■ Dinamik



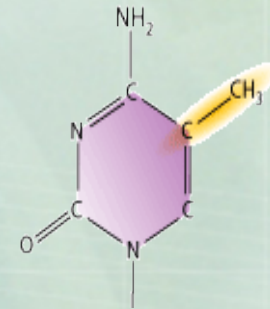
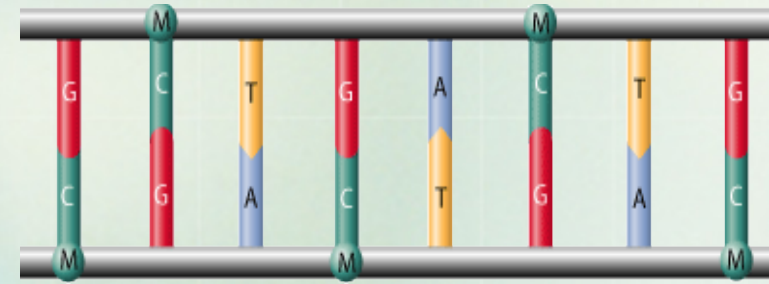
ÖNEMLİ EPIGENETİK MEKANİZMALAR

- DNA Metilasyonu
- Kromatin konfigürasyonundaki değişiklikler
- İmprinting
- RNA ilişkili sessizleştirme



DNA METİLYASYONU

- CpG dinükleotidindeki sitozinin C⁵ pozisyonunun metillenmesi gen sessizleştirmede önemli bir epigenetik mekanizmadır

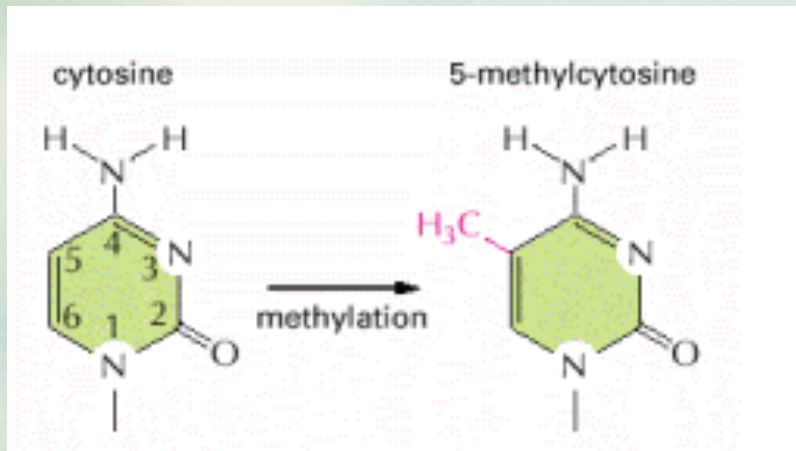


DNA methylation is the addition of a methyl group (M) to the DNA base cytosine (C).

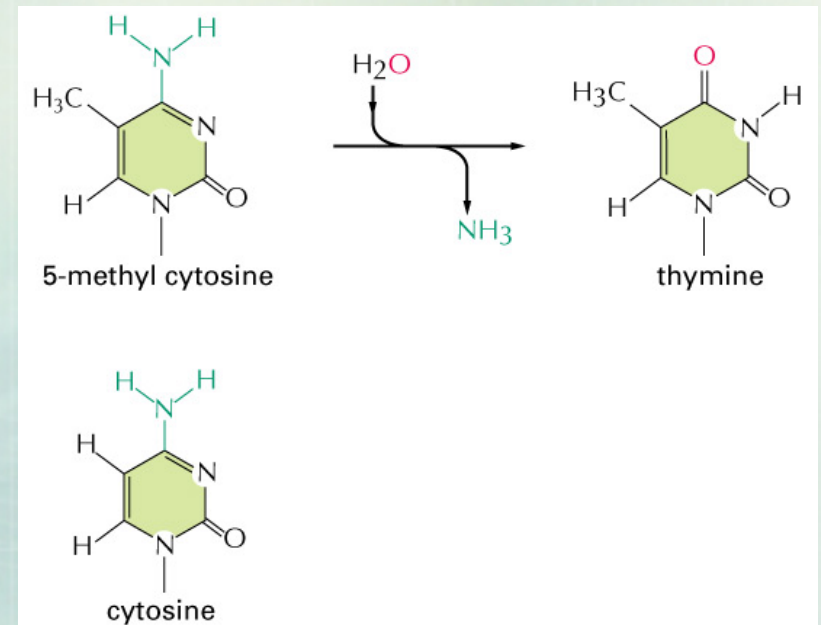
- AA, AT, AC, AG, TT, TA, TC, TG, CC, CA, CT, CG, GG, GA, GT, GC
- Herbiri için 1/16 ($\sim 6\%$) olasılık
- CpG sıklığı çok daha azdır- CG supresyonu??
- Metile sitozinlerin hipermutabilitesi?
- 300-3000 bp uzunluğunda CpG den zengin ($> 50\%$) DNA dizilerine CpG adası denir
- Genomda 20000 CpG adacığı olduğu tahmin edilmektedir
- CpG adacığı memeli genlerinin $50-60\%$ nın promotör bölgesinde bulunur



Sitozin Metilasyonu

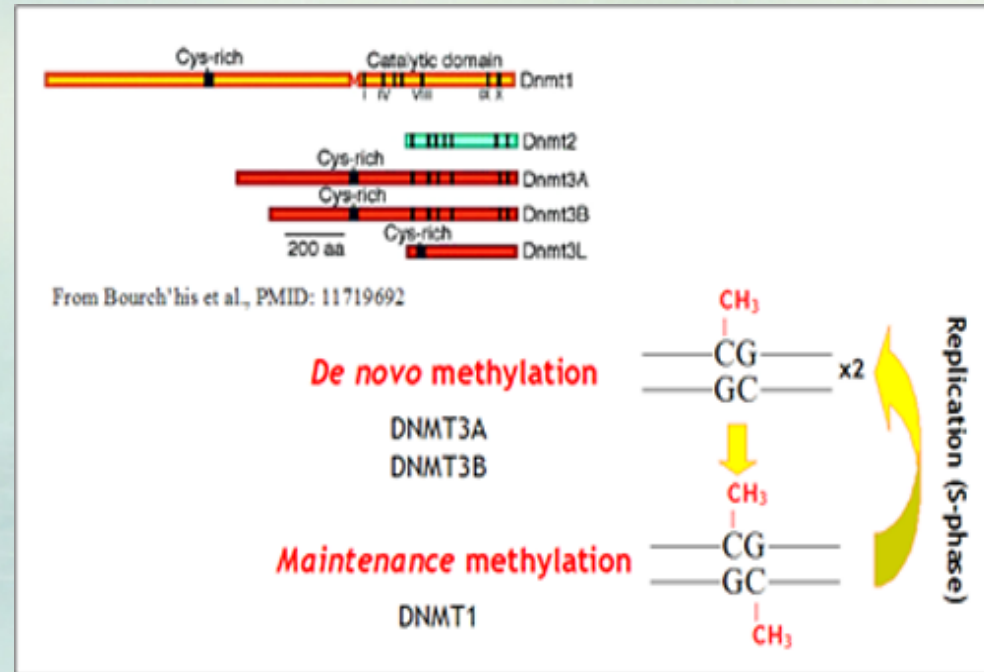


Metile Sitozinin Deaminasyonu

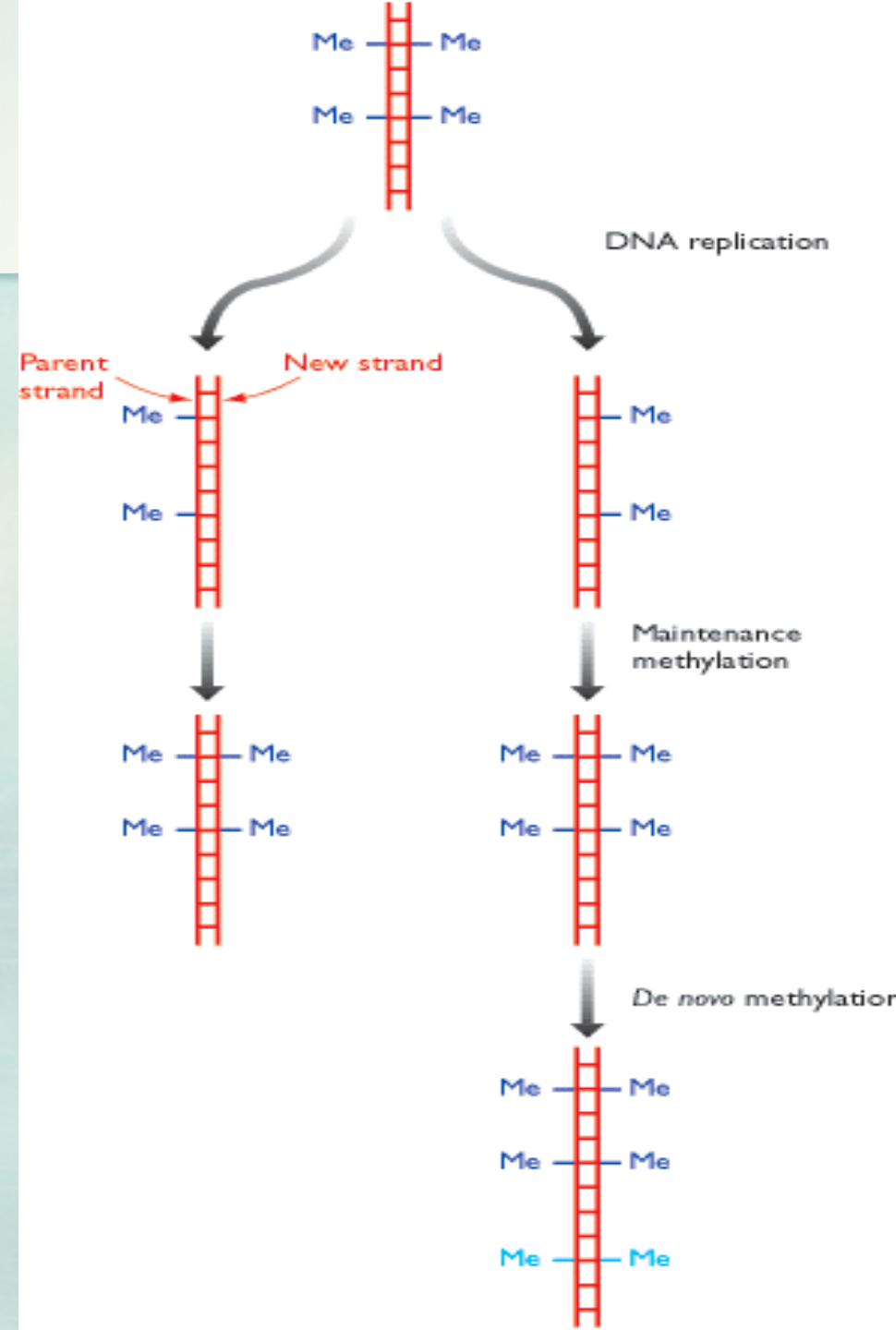


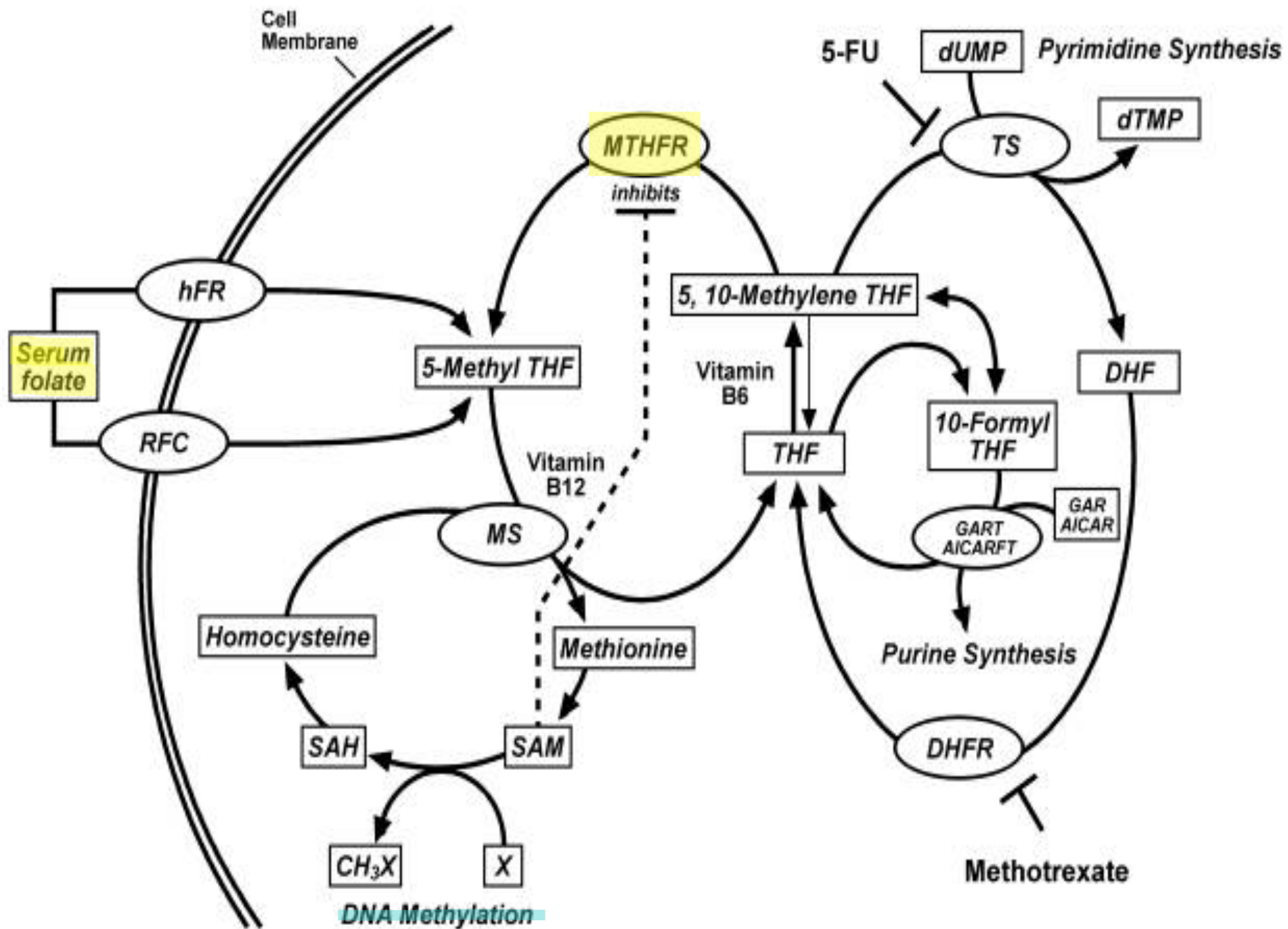
DNA METİLTRANSFERAZLAR

- **Dnmt1**; yarı metillenmiş DNA ları tam metiller, deasetile kromatine ihtiyaç duyar
- **Dnmt2**; zayıf DNA metiltransferaz aktivitesi vardır ve tRNA metiltransferaz gibi davranır
- **Dnmt3a ve Dnmt3b**; embriyonik hücrelerde yoğun olarak eksprese olurlar, *de novo* metilasyon yaparlar
- **Dnmt3L**; Dnmt3a ve Dnmt3b ile ilişki kurar ve hücre kültüründe ve *in vitro* koşullarda onların katalitik aktivitesini stimüle eder. Germ hücrelerinin matürasyonu sırasındaki DNA metilasyonunda anahtar rolü vardır



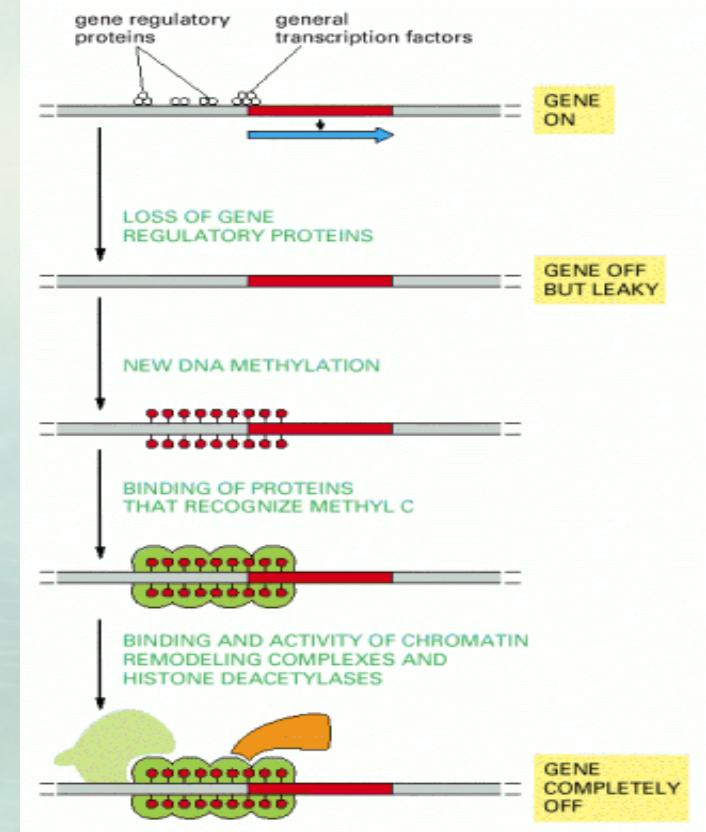
- Metillenmiş DNA metillenmemişten daha geç replike olur
- Oluşturulan metilasyon paterni sonraki nesillere aktarılır

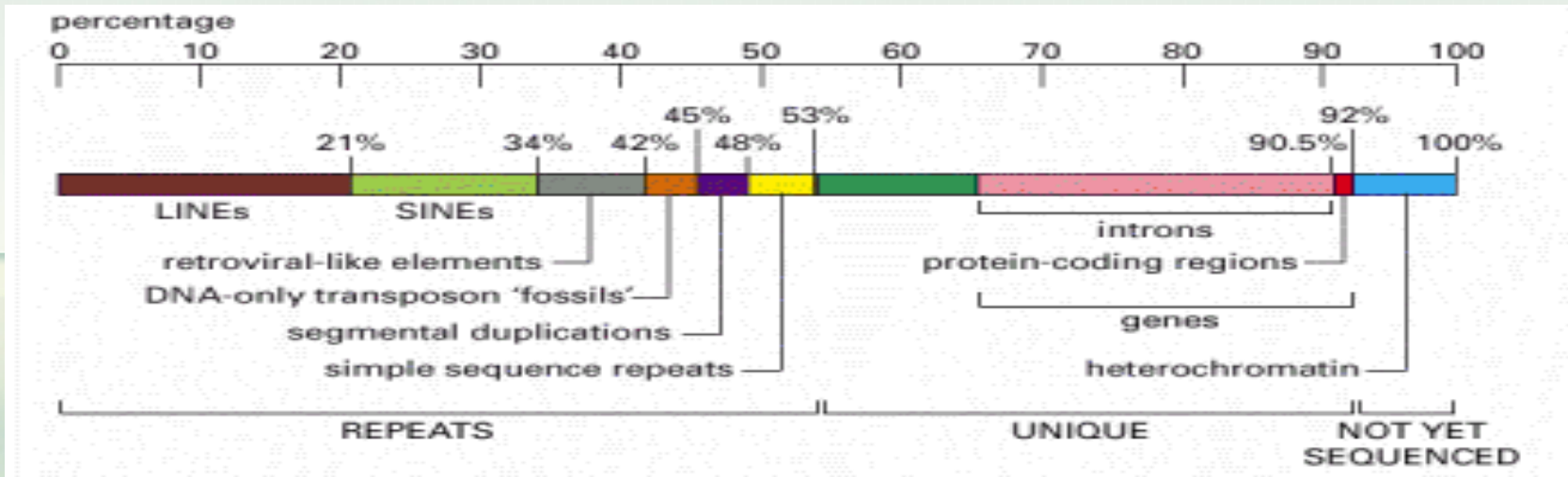




DNA METİLAYONU GENLERİ NASIL SESSİZLEŞTİRİR?

- Methylated DNA binding proteinler-(MeCP2) transkripsiyon başlatıcı proteinlerin DNA'ya bağlanmasını önlerler
- Aktif promotör bölgeye gen düzenleyici proteinler ve genel transkripsiyon faktörlerinin bağlanması metilasyonu önler
- Metilasyon fizyolojik bir olaydır



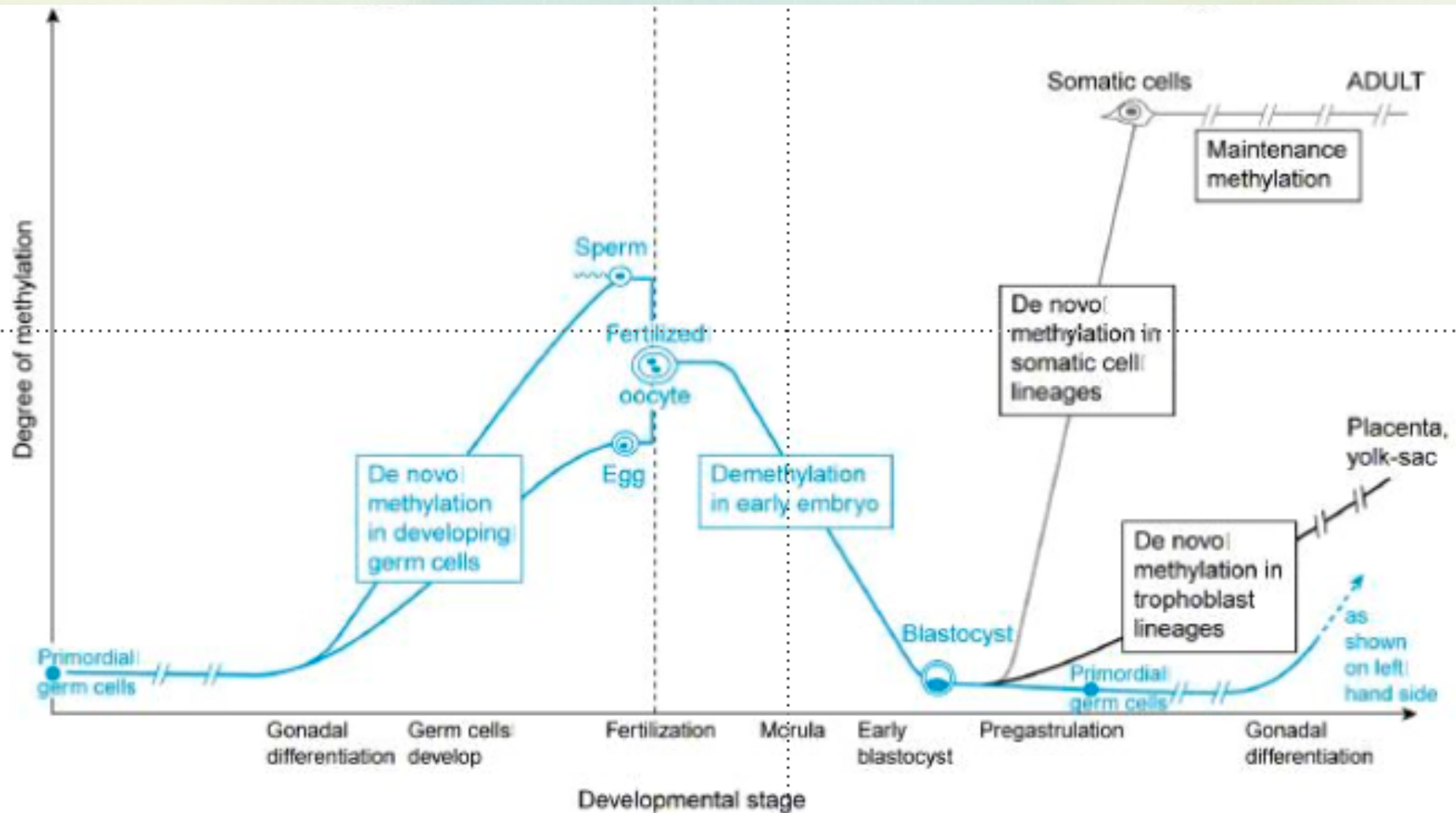


- Genomdaki DNA metilasyonunun çoğu tekrar bölgelerindedir (tekrar bölgeleri, inserted viral sekanslar, transpozonlar)
- Bu 'junk' DNA yı transkripsiyonel olarak sessizleştirmek kritik öneme sahiptir
- Epigenetiğin evrimsel açıdan temel fonksiyonunun bu tekrar bölgelerinin sessizleştirilmesi olduğu kabul edilmektedir

METİLASYONUN ÖNEMLİ OLDUĞU HÜCRESEL OLAYLAR

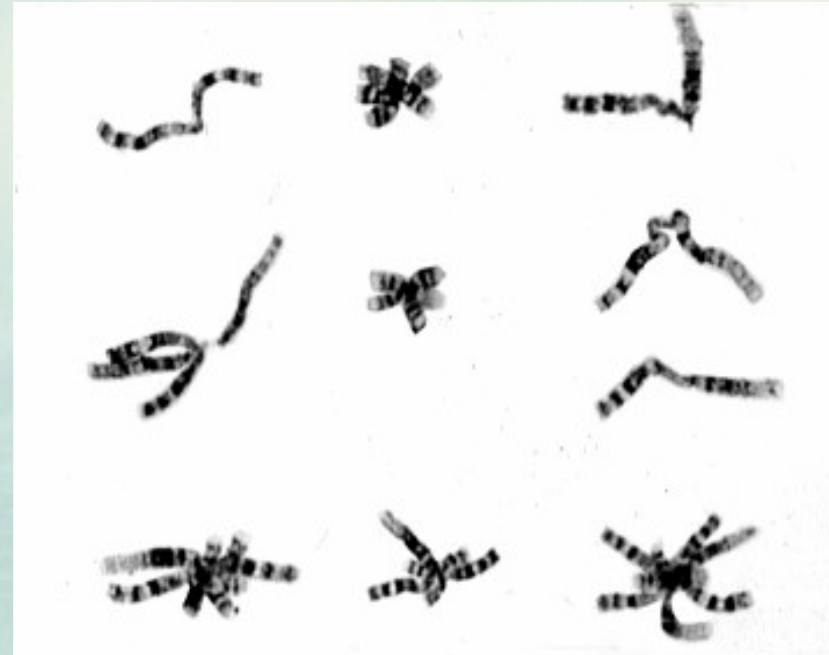
- Gelişim
- Uygun sentromerik segregasyon
- T hücre fonksiyonu
- X kromozom inaktivasyonu
- Parental İmprinting
- Kanser

GELİŞİM EVRELERİNDE METİLASYON



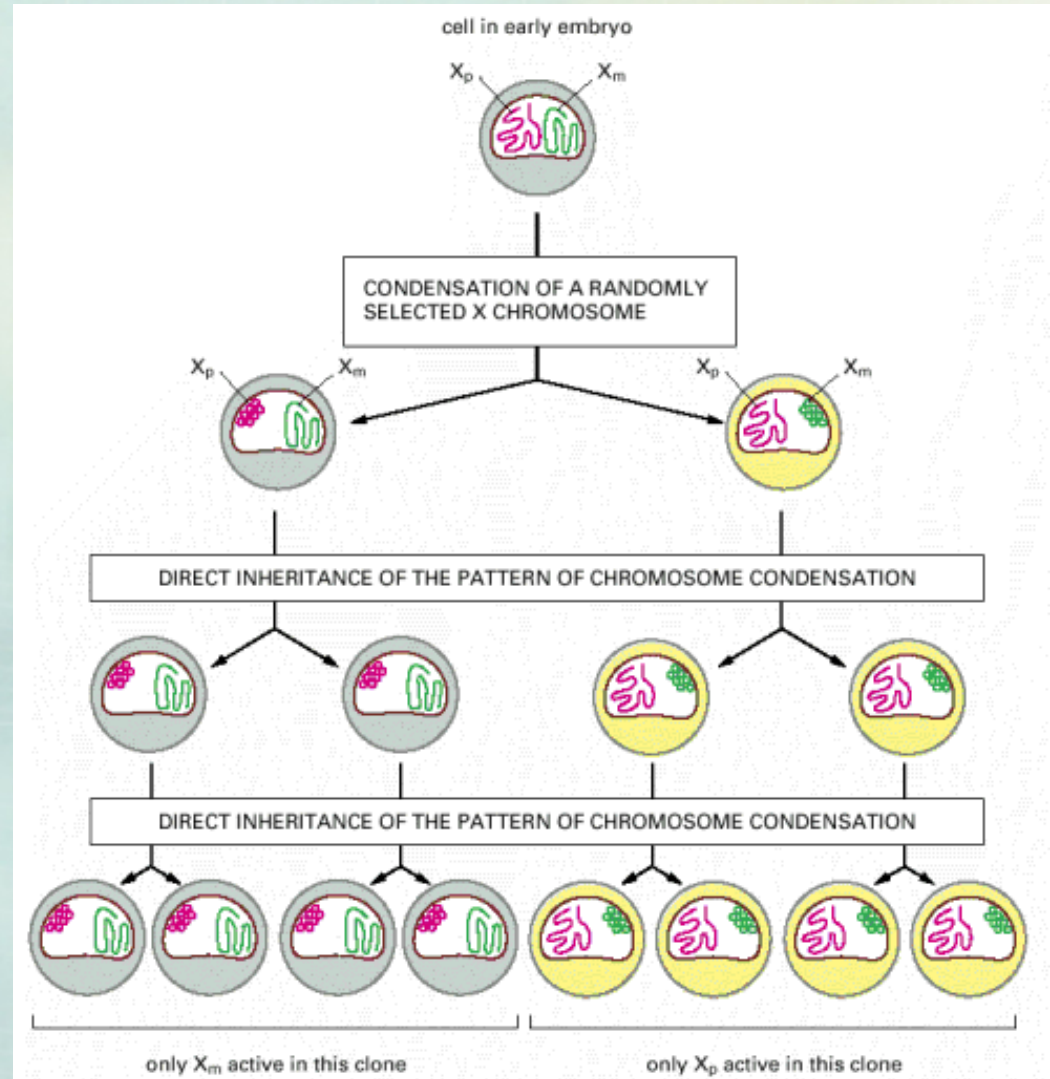
UYGUN SENTROMERİK SEGREGASYON VE METİLASYON

- Kromozomların perisentromerik heterokromatin bölgeleri kondanse olurken DNA metilasyonu kritik öneme sahiptir
- DNMT3b ifadelenme bozuklukları ICF sendromu (immuodeficiency-centromeric instability-facial dysmorphism syndrome)

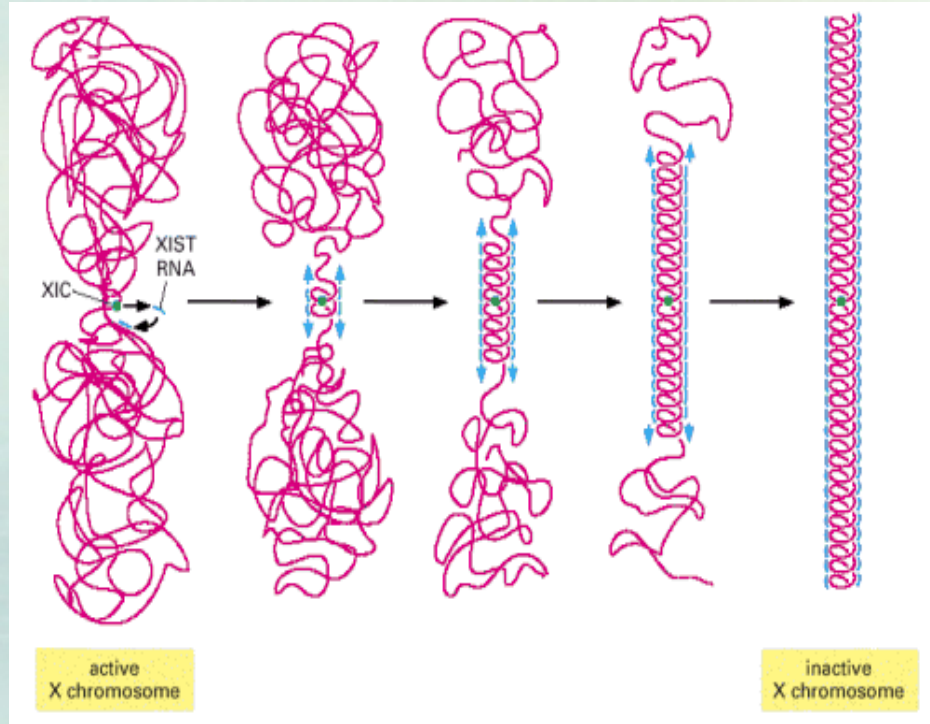


X İNAKTİVASYONU

- Dozaj kompensasyonu sağlamak üzere kondansasyon
- Transkripsiyonel inaktivasyon

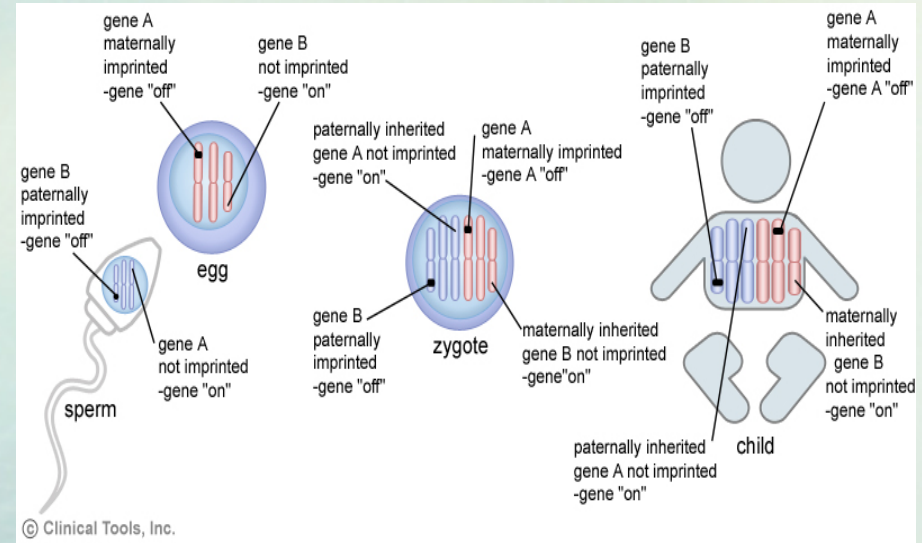


- X inaktivasyon merkezi (XIC) 10^6 nükleotid çifti içeren regülatör DNA dizisidir
- XIST RNA inaktif X'i sarmalar
- X kromozomu özel pozisyonundaki histon H3 ün metilasyonu, histon H3 ve H4 ün hipoasetilasyonu ile inaktif olur

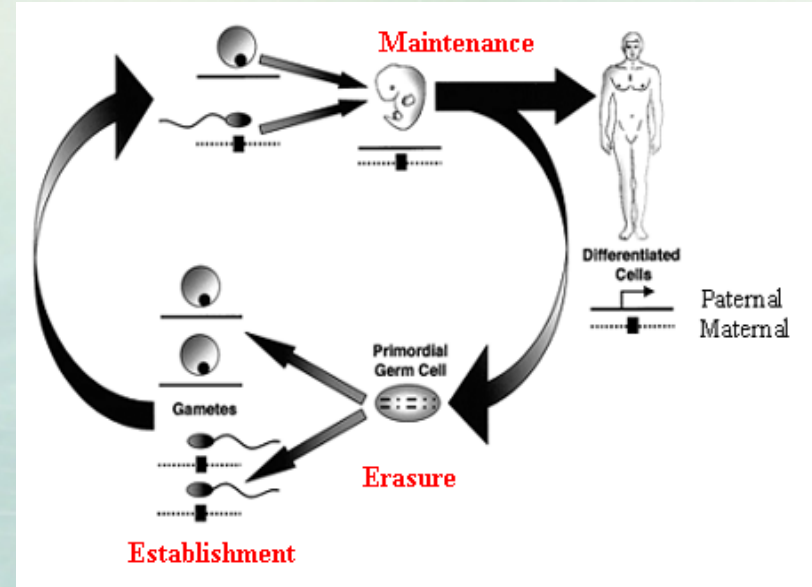


IMPRINTING

- Genetik materyalin anneden veya babadan kalıtılmış olmasına bağlı olarak farklı ifadelenmesi
- Partenogenezi önleyen bir mekanizma olduğu düşünülmektedir
- Bir allel ifadelenirken diğeri inaktif kalır

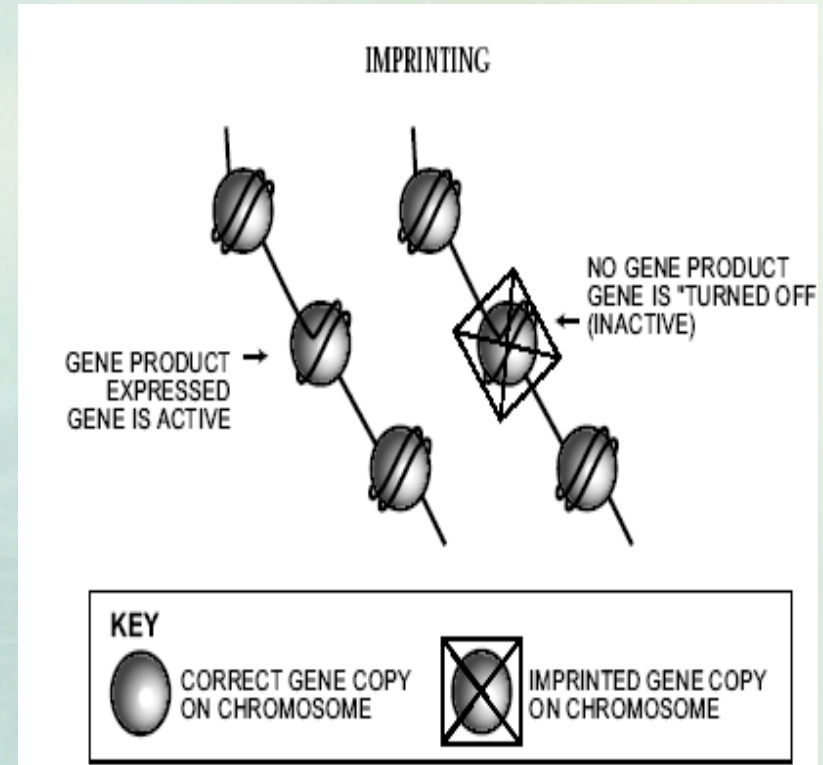


- İnsan genomunda 100' e yakın imprintlenmiş gen
- Dinamik bir proses
- Germline hücrelerinde imprint silinir ve gelişim sırasında cinsiyete göre yeniden oluşturulur
- Farklı DNA metilasyonu paternleri
- Histon proteini ve nükleozom modifikasyonları



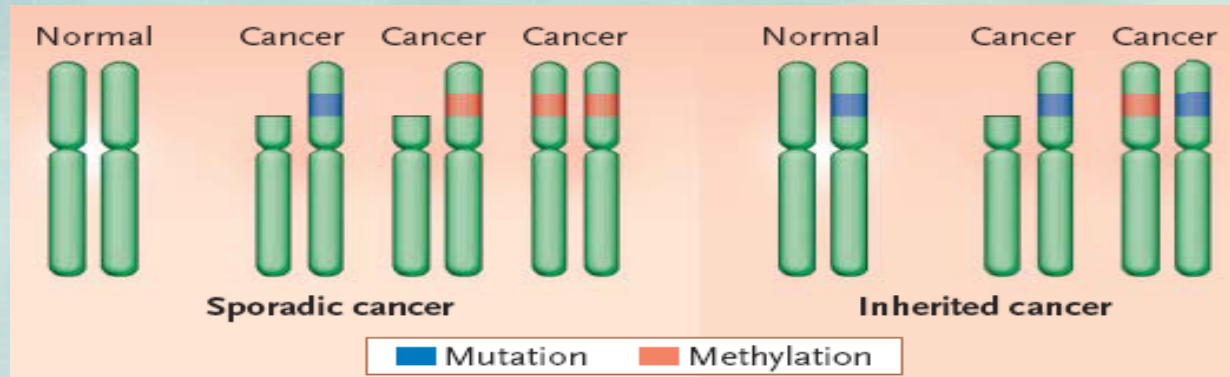
IMPRINTING DÜZENLENMESİ

- İmprintlenmiş genler nc-RNA ve DMR (Differentially methylated region) gibi ortak düzenleyici elemanlara sahiptir. Bu düzenleyici elemanlar birçok geni ICR (imprinting control region) lerle kontrol ederler
- DMR ler sitozin ve guaninden zengin DNA segmentleridir, allellerdeki sitozin nükleotidinin bir kopyası metile diğeri metile değildir



DNA METİLAYSYONU VE KANSER

- Tüm kanserlerin % 65' inde metilasyon anormallikleri
- DNA Metilasyonu kaybı
- Promotör bölgelerdeki DNA Hipermetilasyonu



ABERAN METİLAYON

DNA Hipermetilasyonu

↓
CpG Adaları
TSG

DNA Hipometilasyonu

Yüksek tekrar dizileri

↓
Heterokromatin
tekrarlar
Genomik
instabilite

↓
Dağınık
tekrarlar
LINE

Orta tekrar dizileri

↓
Viral inserted
diziler

Tek diziler

↓
Onkogenler

YANITSIZ SORULAR



- Bir tümör oluşurken kaç genin epigenetik değişikliğe uğraması gereklidir?/ yeterlidir?
- Farklı kanser türleri için bu değişiklikler farklı mıdır?
- Epigenetik değişikliklerin altında yatan moleküler ve genetik mekanizmalar nelerdir?
- Kanser hücrelerinin epigenetik karakterleriyle ilgili global bilgiler tedaviyi yönlendirebilir mi?

PARADOKS

- Kanserde genomun global hipometilasyonu ama CpG adacıklarının hipermetilasyonu paradoksu??
- Kanser hücrelerinde DNMT1 mRNA (metilasyonun idamesi): AZALIR
- DNMT3b mRNA (CpG adalarında de novo metilasyon): ARTAR

METİLASYON



DNA Metilasyonu

DNA Metiltransferazlar
(DNMT)

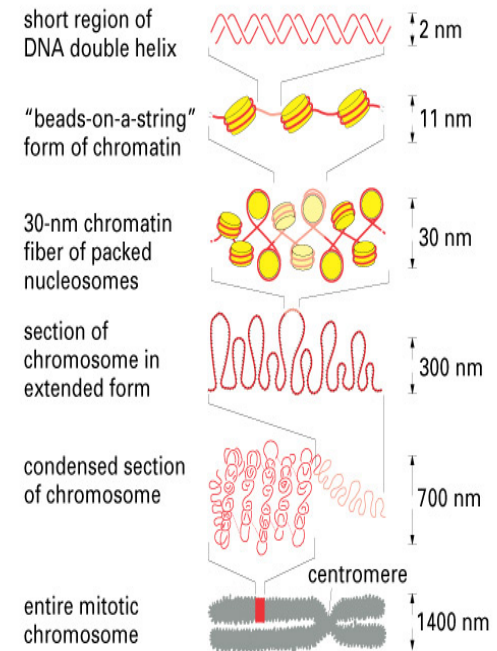


Histon Metilasyonu

Polycomb Grup
Histonmetiltransferazlar
(EZH2, EED)

KROMATİN KONFIGÜRASYONU

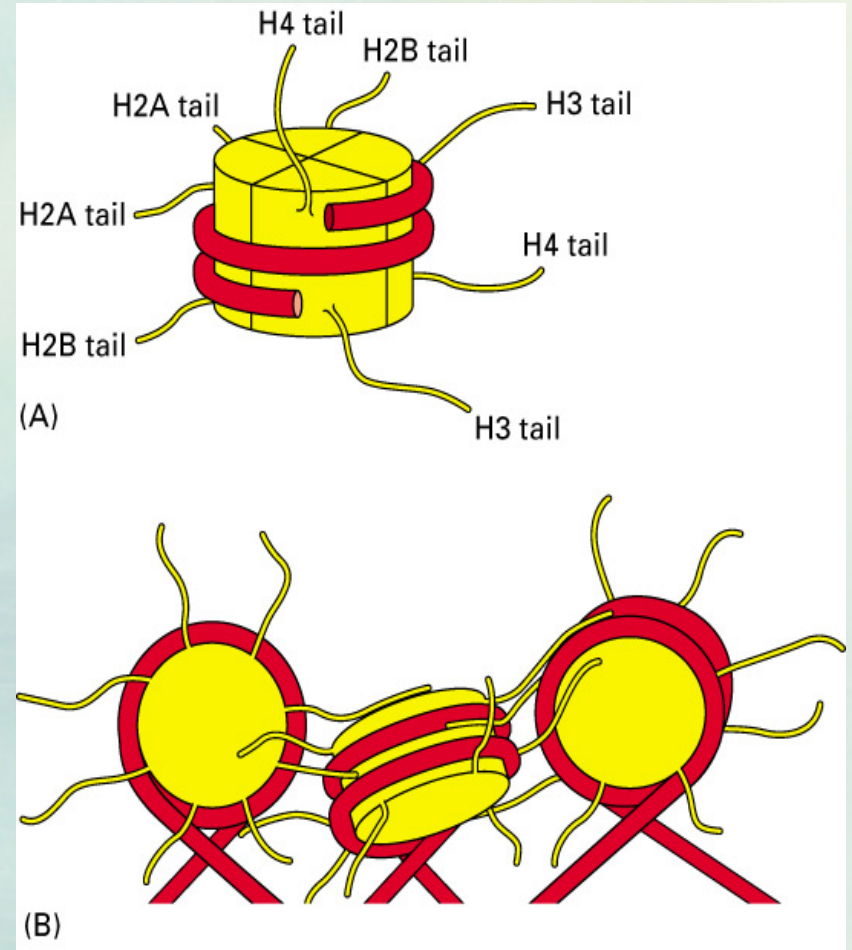
- DNA+ protein kompleksi= kromatin
- DNA+ kor histon proteinleri= nükleozom
- Sekonder helikal kromatin yapısı= solenoid
- Solenoidler 100 kb aralıklarla nonhiston proteinlere bağlanırlar

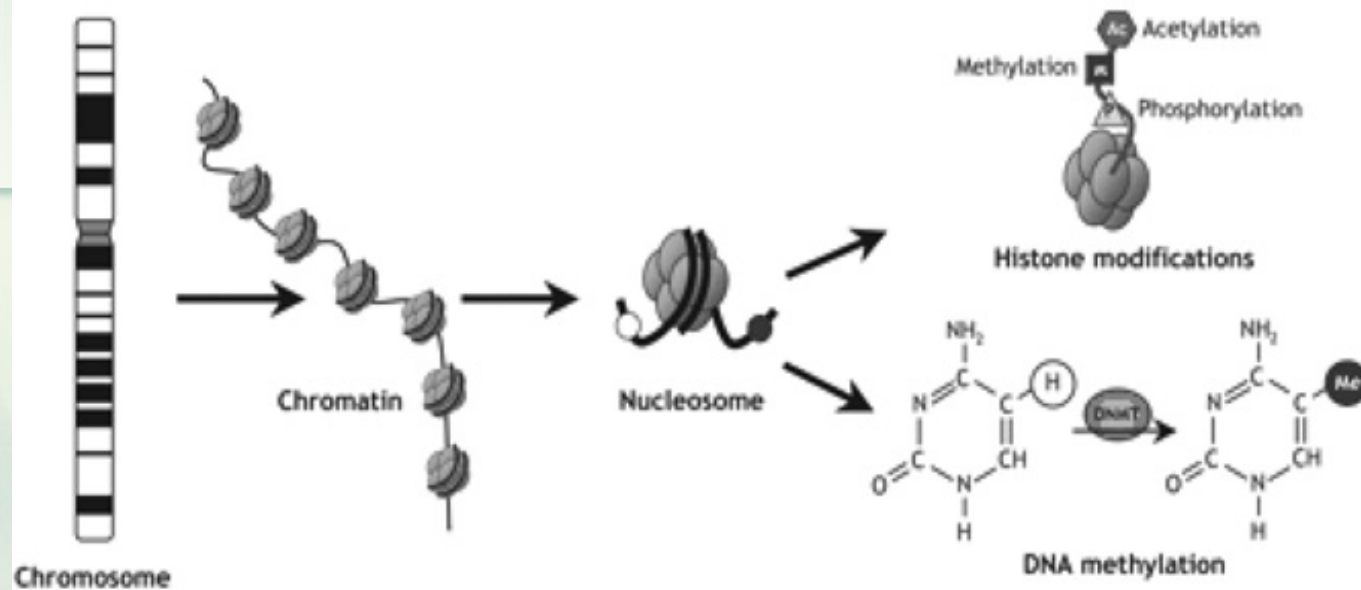
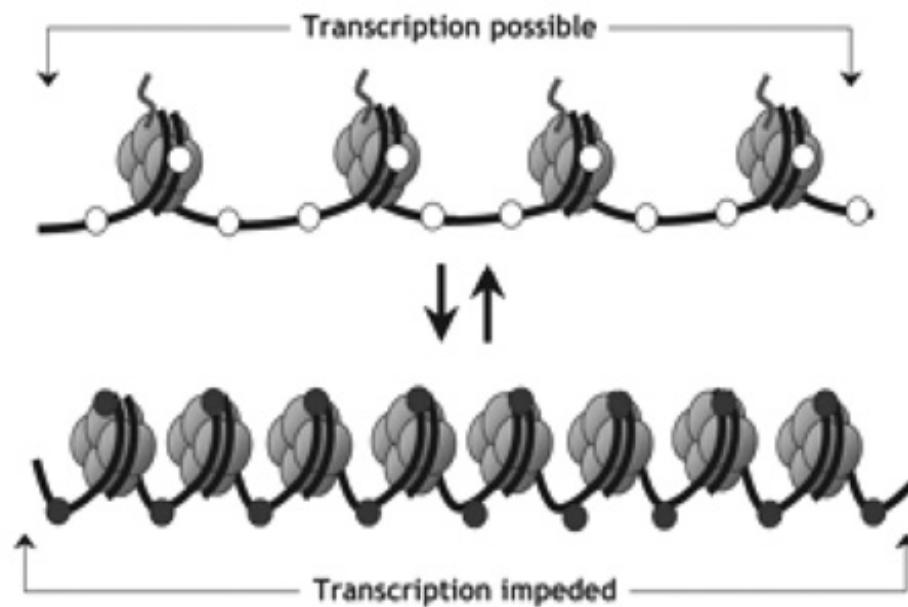


NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 10,000-FOLD SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH

EPİGENETİK MEKANİZMALAR / DNA - HİSTON ETKİLEŞİMİ

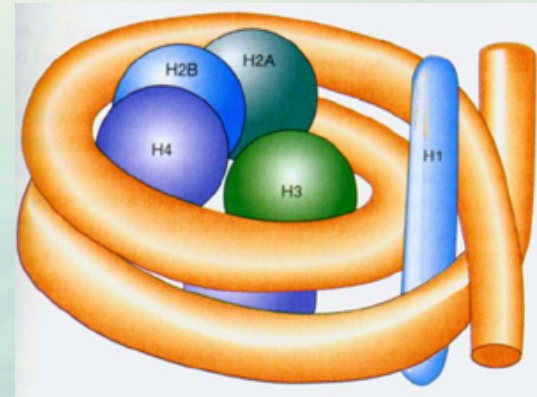
- Histonlar basit 'DNA paketleyen' proteinler değildir
- Gen aktivitesinin dinamik düzenleyicisidirler
- DNA histon etkileşimi histonların kovalen modifikasyonu ve nonhiston proteinlerin hareketlerinden etkilenir



A**B**

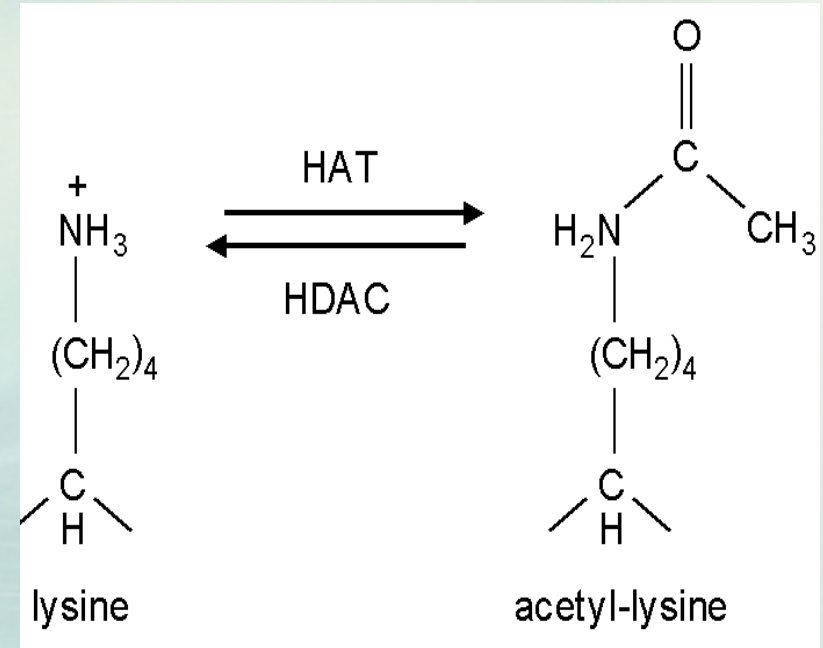
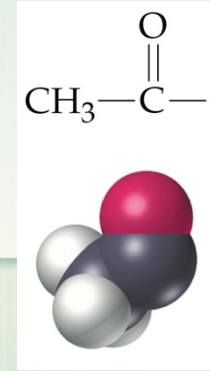
HİSTON MODİFİKASYONLARI

- Histon asetilasyonu
- Metilasyon
- Fosforilasyon
- Ubiquitinasyon
- Poli-ADP ribozilasyonu

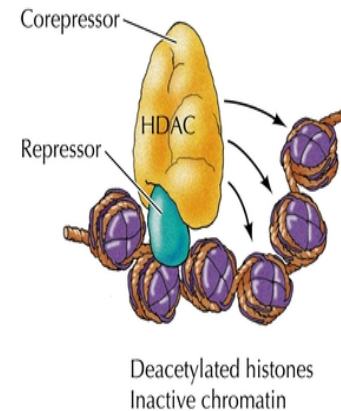
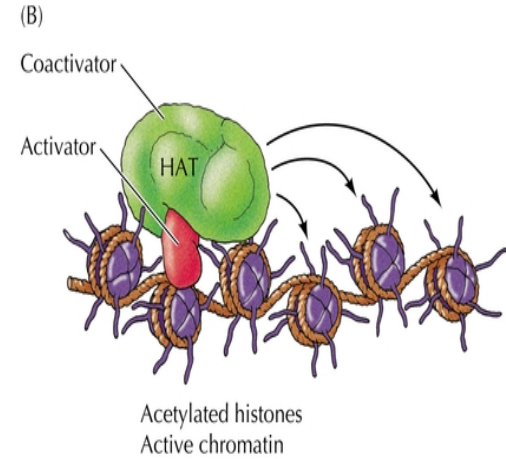


HİSTON ASETİLASYONU

- HAT; histon proteinlerinin N terminal ucundaki lizin rezidülerine asetil grubu ekler
- Pozitif yükü nötralize ederler
- Asetile olan N terminal nükleozom core dan çıkan kuyruk oluşturur
- Histon uçları ile yapısal proteinler arasındaki bağlantıları destabilize eder

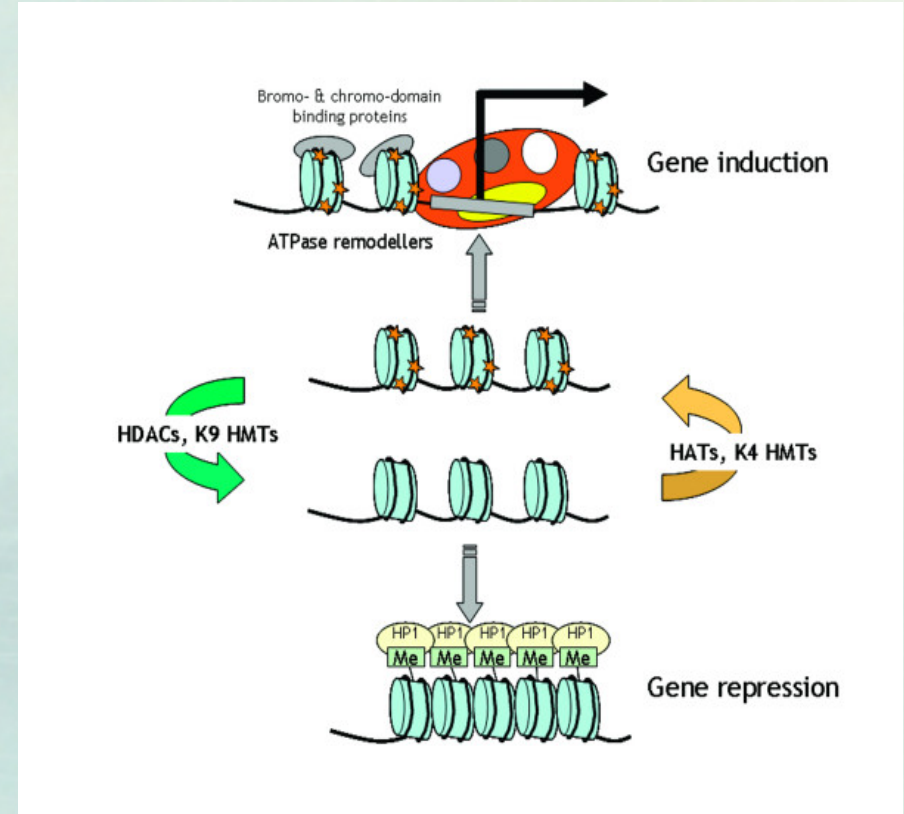


- Asetile olmuş histonların DNA ya affinitesi azalır
- Bu sayede kromatin transkripsiyon için elverişli açık strüktüre sahip olur



HİSTON DEASETİLYASYONU

- HDACs; histonların deasetilasyonunu sağlar ve gen ifadelenmesinin baskılanmasına yol açar
- Kromatin yapı daha kondansedir
- HAT ve HDAC arasındaki denge ile meydana gelen kromatin yapısındaki değişiklikler transkripsiyonun regülasyonunda önemlidir



HİSTON METİLAYONU

- Histon metilasyonu; kromatinin aktif ve inaktif bölgeleri için marker olabilir
- Histon H3' ün lysin 4 metilasyonu aktif genlerin promotor bölgesinde rastlanır
- Metilasyon geridönüşümlü değildir



- Histon H3' ün N terminal ucundaki lysin 9 metilasyonu sessiz DNA göstergesidir
- Metile lizin 9 un Mammalian heterochromatin protein 1(HP1) ile spesifik olarak bağlanması bu zıt etkiden sorumludur
- Gen sessizleşmesi metilasyonun derecesiyle ilişkilidir
- Örneğin trimetilasyon konstitutif heterokromatin ile birlikteyken mono- veya di- metilasyon fakültatif heterokromatinle ilişkilidir

KROMATİN REMODELING KOMPLEKSLERİ

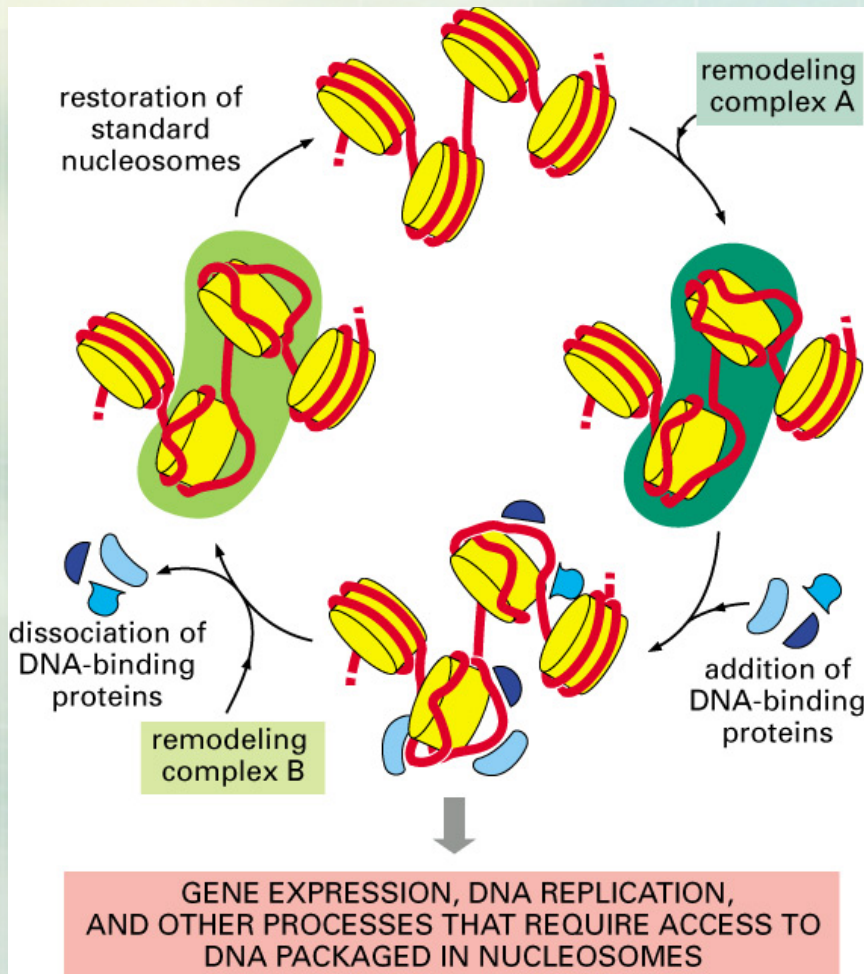


Figure 4-34. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

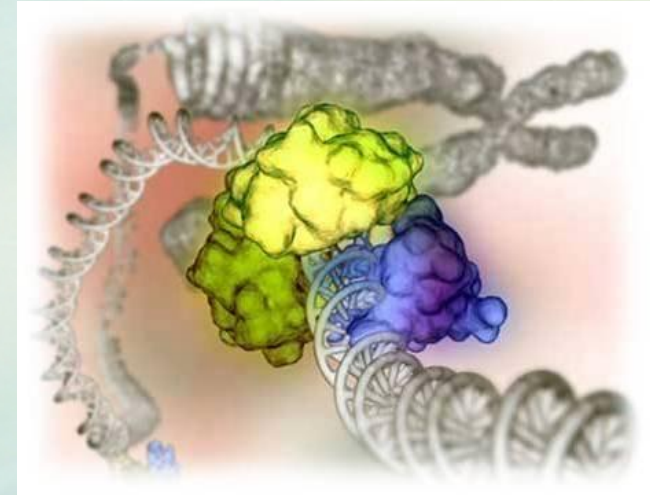
- ATP bağımlı fonksiyon gösteren protein grubu
- Nükleozoma sarılı DNA segmentlerinin ifadelenmesini sağlar
- Nükleozomu kaydırarak transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için yer açar
- ATP domain, bromodomain (asetile lizinlere bağlanır), kromodomain (metile lizinlere bağlanır)

KROMATİN REMODELING VE HİSTON MODİFİKASYONU HASTALIKLARI

- Lösemi
- Epitelial kanserler
- Rubinstein-Taybi Sendrom (RSTS)
- Coffin- Lowry Sendrom (CLS)
- α - talasemi/ mental retardasyon sendromu (ATR-X)

Polycomb Grup (PcG)- Trithorax Grup (TrxG)

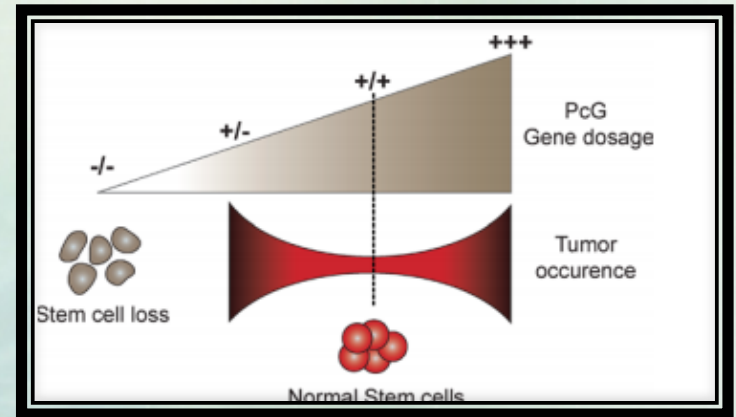
- Polycomb grup (PcG) ve trithorax (TrxG) grup proteinler embriyonik yaşam sırasında transkripsiyonu düzenleyen birbirine zıt etkili kromatin modifiye edici proteinlerdir



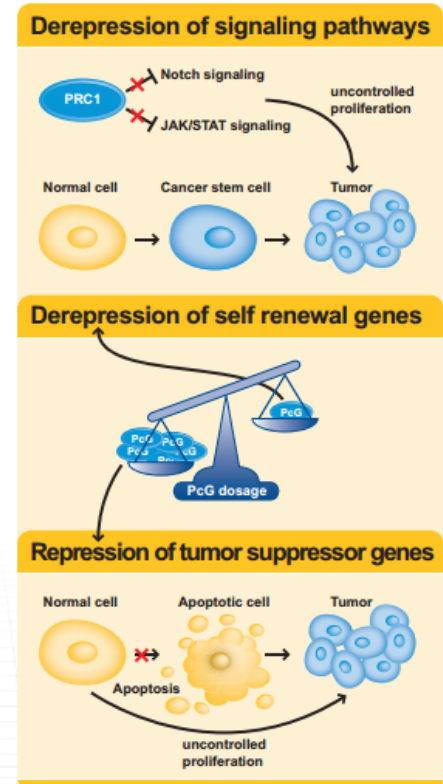
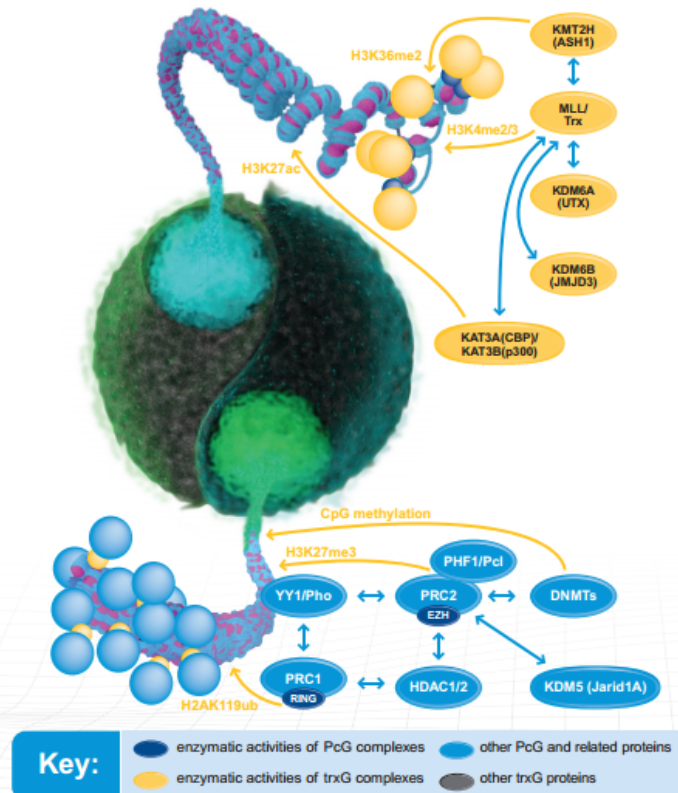
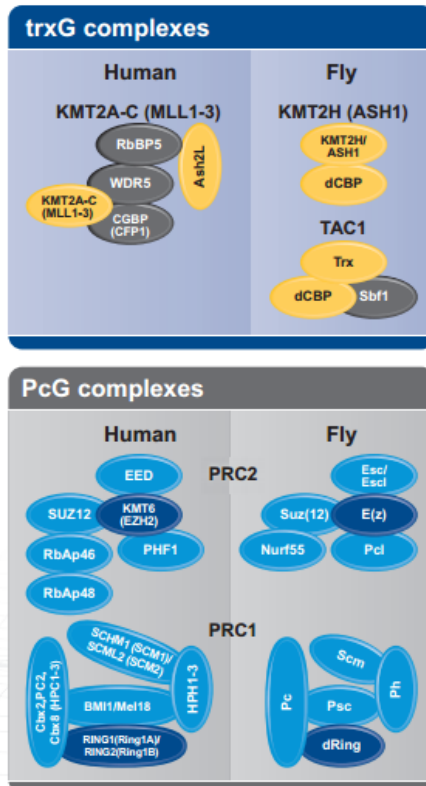
- PcG proteinleri represör TrxG proteinleri gen aktivitesini artırıcı etki gösterirler

POLYCOMB GRUP PROTEİNLER

- Drosophila Melanogaster
- Hox genleri sessizleştirilmesi
- PcG proteinleri; X kromozomu inaktivasyonu, prostat ve meme kanseri gibi pekçok kanserin patogenezinde rol oynamaktadır



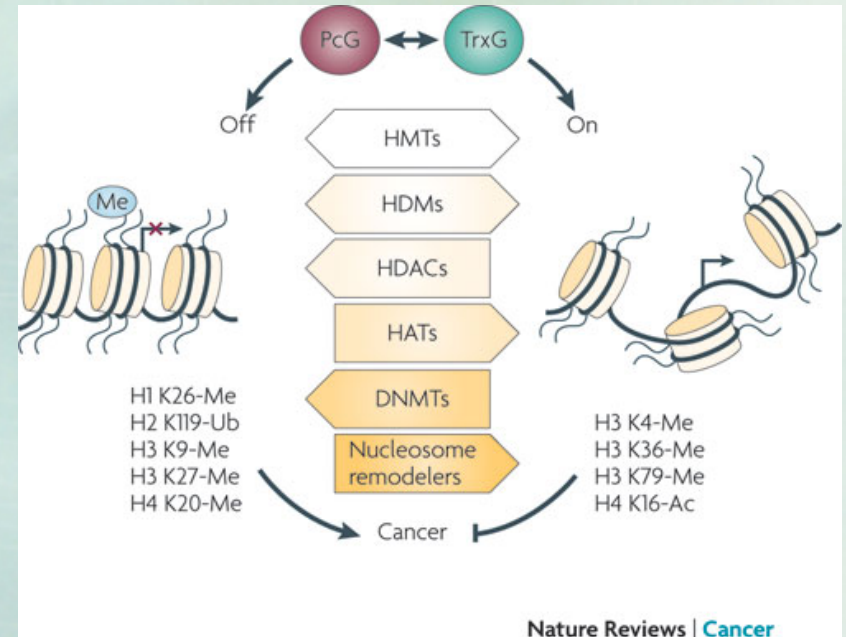
Polycomb group proteins (PcG) and cancer



TRITHORAX GRUP PROTEİNLER

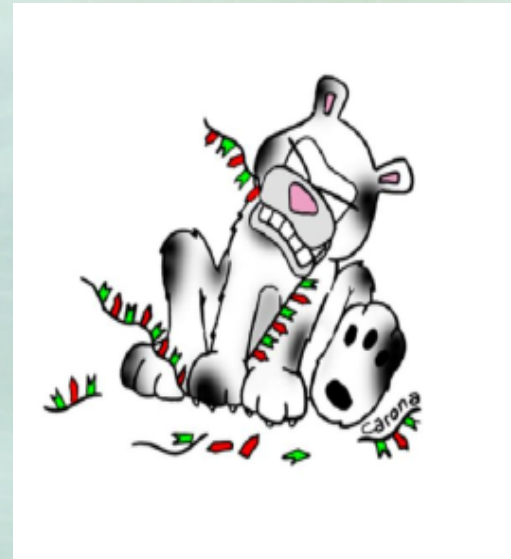
- Histon modifiye edici kompleksler
- Histon H3' ün 4. lizinin trimetilasyonu (H3K4Me3)

- ATP bağımlı kromatin remodelling Kompleksleri

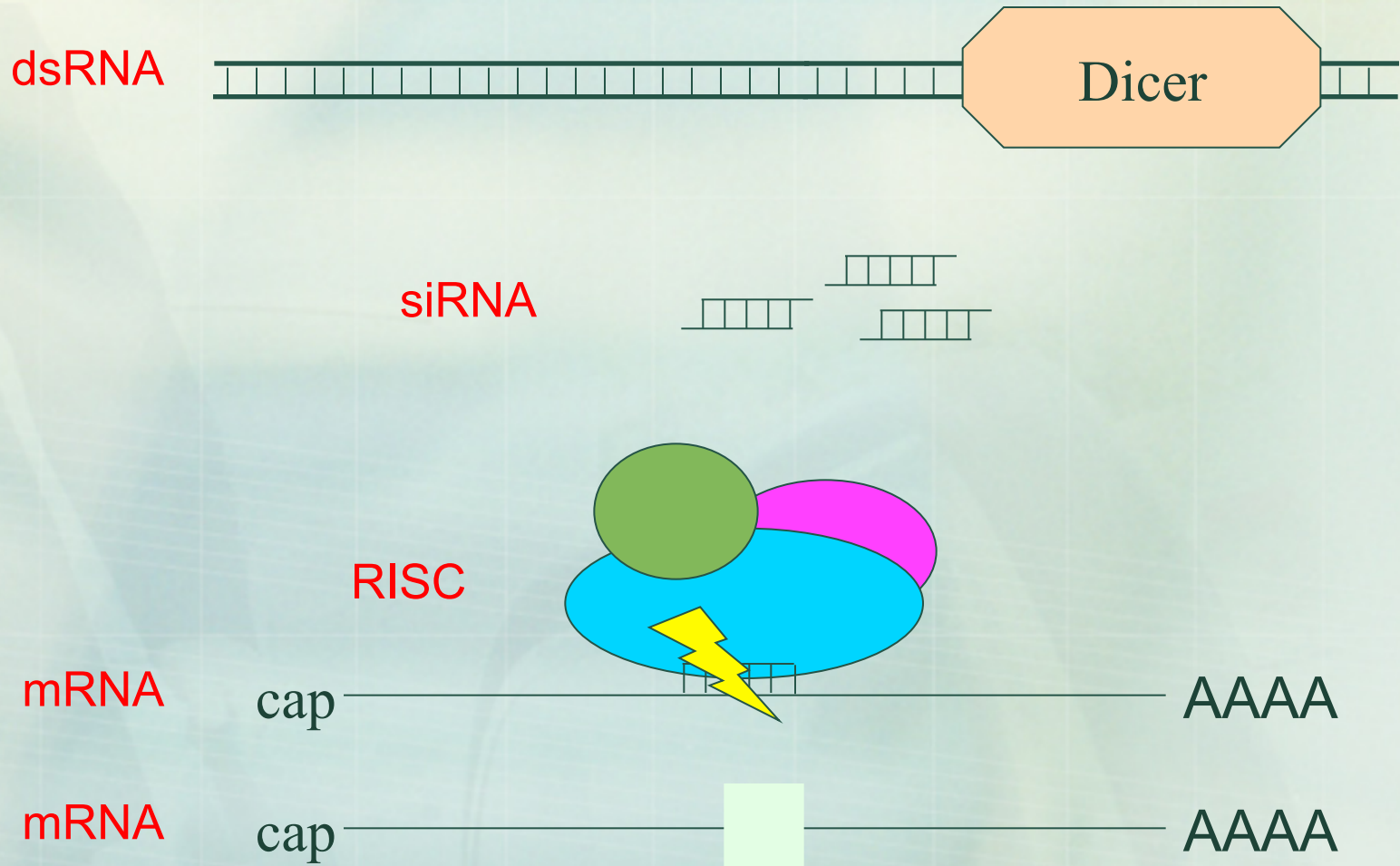


RNA İLİŞKİLİ SESSİZLEŞTİRME

- Kodlamayan RNA (nc RNA); transkripsiyon, mRNA turnoverı, translasyon veya kromatin remodelingini etkileyerek gen ifadelenmesini düzenlerler
- posttranskripsiyonel gen sessizleştirme



RNA INTERFERENCE (RNAi)



**miRNA genlerinin %50'den fazlası kanserle ilişkili
genomik alanlarda veya frajil bölgelerde lokalize**

RNA
interference
of gene
expression

start
movie

- **miR-15 ve miR-16** insan kanserlerinde TS gibi
- Hipofiz tümörlerinde normal hipofiz dokularına kıyasla daha düşük seviyelerde, ekspresyonu tümör büyüklüğü ile ters ilişkili
- **miR-195** meme kanseri (%88 sensitivite, %91 spesivite)
- **miR-375** ve **miR-141** prostat kanseri
- Onkogen gibi davranan miRNA **miR155** (B hücre lenfomalarında, Hodgkin's lenfomada, Burkitt lenfomada ve insan meme kanseri)
miR21 (Meme kanseri , malign beyin tümörleri ve glioblastomada aşırı miktarda ekspresyon)

EPİGENETİK TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

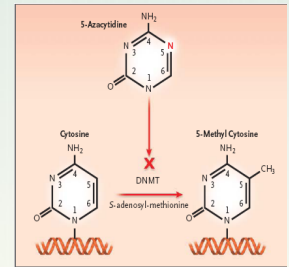
- Mutasyon ve epigenetik gen sessizleştirilmesi arasındaki en büyük fark epigenetik değişikliklerin geri dönüşümlü olabilmesidir
- Bu geri dönüşümlülük, umut vaadeden tedavi seçeneklerini gündeme getirmiştir

DNA METİLASYONU İLE İLİŞKİLİ TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

FOLAT DESTEĞİ

- Folat eksikliği DNA hipometilasyonuna yol açar; eksikliğin derecesi ve süresi önemlidir
- (400µgr/ gün) folat desteği DNA hipometilasyonunu geri çevirebilir
- Yaşlanma ile metyoinin sentaz aktivitesi azalacağı için yüksek dozda folat desteği yapılmalı

DNA METİLASYONU İNHİBİSYONU



- NÜKLEOZİD ANALOĞU İNHİBİTÖRLERİ
- DNMT ile DNA arasında kovalen bağ oluşturarak enzimi geri dönüşümsüz olarak baskırlar
- 5-azasitidin (MDS)
- 5-aza-2 deoksisitidin (AML, ALL, MDS, KML, solid tümörler, hemoglobinopatiler, orak hücreli anemi)
- zebularin

NON-NÜKLEOZİD ANALOG DNA METİLASYONU İNHİBİTÖRLERİ

- Nükleozid analogları kadar etkili değiller ama klinik olarak yararlılar
- **EGCG** (doz bağımlı olarak DNMT aktivitesini önler, yeşil çay)
- **Prokain** (anestezik, global DNA hipometilasyonu yapar, MCF-7 meme kanseri hücre serisi)
- **Prokainamid** (antiaritmik, DNMT1' i yarışmalı inhibisyonla baskılar)
- **Hidralazin** (antihipertansif, DNMT1 ve DNMT3a mRNA ifadenmesini baskılar)

DNMT1 ANTİSENSE OLİGONÜKLEOTİDLER

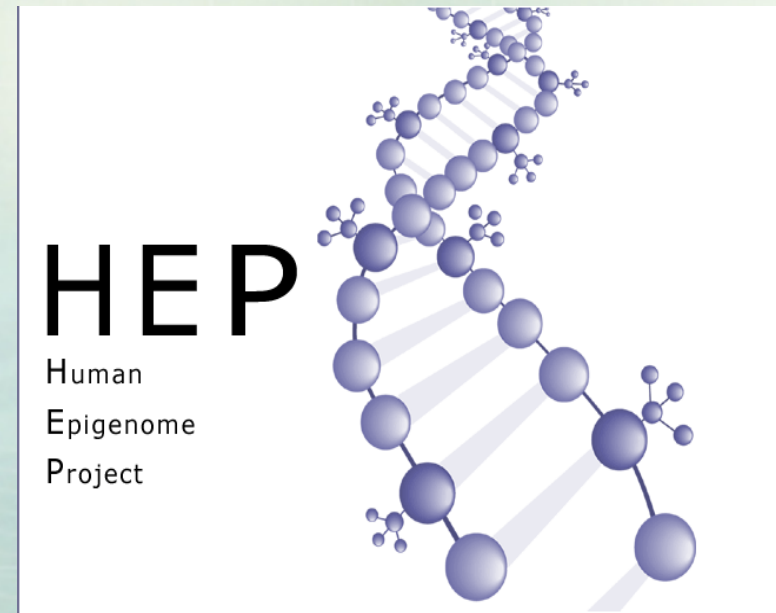
- Hedef bir mRNA transkriptinde seçilmiş bir bölgeyi hibridize etmek için dizayn edilmiş sentetik nükleik asit polimerleridir
- Örn MG98 selektif DNMT1 inhibitör
- DNA metilasyonu inhibitörlerinin sitotoksik etkileri için alternatif bir tedavi yöntemi olabilir
- Etkinlik?, Tolerans?

ÖZETLE;

- Epigenetik mekanizmaları anlamak fenotipik varyasyonları ve kompleks genetik fenotipleri değerlendirmek için önemlidir
- Otoimmün hastalıklar, kanser gibi pekçok hastalık epigenetik düzensizlikler sonucu oluşur
- Epigenetik tedavi seçeneklerinin nonspesifik gen aktivasyonu, potansiyel mutagenез ve karsinogeneز oluşturma gibi kısıtlılıkları vardır
- Epigenetik mekanizmaları anlamak; yeni tedavi modaliteleri geliştirmeyi sağlayacaktır

HUMAN EPIGENOME PROJECT

- HEP; DNA epigenetik değişikliklerini tanımlamak, sınıflamak ve yorumlamak amacı ile Human Epigenom Konsorsiyumu tarafından yürütölen bir projedir
- The Wellcome Trust Sanger Institute- UK
- Epigenomics AG-Germany-USA
- The Centre National de Génotypage -Fransa



EPİGENETİK MEKANİZMALAR

ÖZGE ÖZALP YÜREĞİR

22.03.2016