

BiY448

Farklılaşmanın Moleküler Biyolojisi

Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

GELİŞME: DİFERANSİYEL GEN EKSPRESYONU

- **Gelişme**, bir organizmanın onun yaşam devrini karakterize eden birbirini izleyen şekiller alması sırasındaki ilerleyen değişiklikler sürecidir.
- Bir bitki veya hayvanın gelişiminin ilk evrelerine **embriyo** adı verilir.
- Embriyo, bazen bir tohum kapsülü, bir yumurta kabuğu veya bir uterus gibi koruyucu bir yapı içerisinde dir.
- Gelişme organizmanın yaşamı boyunca devam eder, sadece organizma öldüğü zaman sona erer.

Gelişim süreci

- **Büyüme** (boyuttaki artış) gelişimin önemli bir parçasıdır, bazı türlerde bireyin yaşamı boyunca devam eder fakat diğerlerinde az ya da çok sabit bir son noktaya ulaşır.
- Çok hücreli bir vücut, **hücre bölünmesi** olmaksızın büyüyemez-yani o tek bir hücreden ortaya çıkamaz.
- Tekrarlayan mitotik bölünmeler çok hücreli vücudu oluşturur. Bitkilerde, oğul hücreler oluştuktan sonra daha fazla uzamadıkça, embriyo büyümmez; bu yüzden bitkilerdeki gelişimde, hücre büyümesi ilk hücre bölünmeleri ile başlar.
- Diğer yandan, hayvan gelişiminde, **hücre büyümesi** başlangıçta genellikle yavaştır: Hayvan embriyosu döllenmiş yumurtadan daha büyük olmadan önce binlerce hücreden meydana gelebilir.

Gelişim süreci

- Gelişme,
- hücre büyümesi ve hücre bölünmesi yanında iki temel komponente sahiptir:
- farklılaşma ve morfogenez.

Farklılaşma

- **Farklılaşma** hücresel spesifikliğin oluşumudur, yani farklılaşma bir hücrenin spesifik yapı ve fonksiyonunu belirler.
- Bildiğimiz gibi, mitoz onları oluşturmak için bölünen nukleusa kromozomal olarak ve genetik olarak aynı olan oğul nukleusları meydana getirir.
- Bununla beraber, bir hayvan veya bir bitki vücudunun hücrelerinin hepsi yapı ve fonksiyon bakımından aynı değildir. İnsan vücudu yaklaşık olarak 100 trilyon (10^{14}) hücreden oluşur ve yaklaşık 200 fonksiyonel olarak farklı hücre tipine sahiptir-örneğin kas hücreleri, kan hücreleri ve sinir hücreleri gibi.
- Embriyo sadece bir kaç hücreden oluştuğu zaman, her bir hücre bir çok farklı yolda gelişme potansiyeline sahiptir. Gelişme ilerlerken, her bir hücrenin kaderi tam olarak belirleninceye ve hücre farklılaşmaya kadar hücrelerin elde edeceği ihtimaller dereceli olarak sınırlanır.

Farklılaşma

- Farklılaşma farklı tipte hücreleri verirken, **morfogenez** “şeklin oluşumu” çok hücreli vücudun ve onun organlarının şeklini verir.
- Morfogenez, farklılaşmış dokuların spesifik yapılara organizasyonu olan **biçim formasyonundan** meydana gelir.
- Hareketsiz hücrelerin, **organize olmuş bölünmesi** ve **büyümesi** bitki vücut şeklinin oluşumu için mevcut başlıca araçlardır.
- Hayvanlarda, bazı hücrelerin programlanmış ölümü (**apoptoz**) yanında, **hücre hareketleri** de morfogenezde çok önemlidir,
- Farklılaşma ve morfogenez bitkilerde ve hayvanlarda benzerdir, sonuçta genlerin ve onların ürünlerinin düzenlenmiş aktivitelerinden meydana gelir.

Hücreler gelişme ilerlerken gittikçe daha az seçim hakkına sahip olurlar

- Erken embriyoların spesifik hücrelerini boyalarla işaretleme ve daha yaşlı embriyolarda, boya içeren bu hücreleri gözleme tekniği, biyologların, erken embriyonun hangi kısımlarından hangi ergin yapıların geliştiğini belirlemesini sağlar.

Erken kurbağa embriyolarında gelişme potansiyeli

- Örneğin, Şekilde gösterilen kurbağa embriyosunun koyu renkli bölgesi eğer solda yerleşmişse tetari (iribaş) larvanın deri kısmının oluşum kaderidir (yani oluşumunu tayin eder).
- Eğer biz bu bölgeden bir parça kesip çıkarırsak ve onu bir erken embriyonun bir başka yerine transplante edersek, onun oluşturacağı doku tipi onun yeni yeri (lokasyonu) tarafından belirlenir.
- Böyle hücrelerin **gelişme potansiyeli** –yani onların olası gelişim derecesi– bu yüzden onların kaderinden daha büyüktür, kader normal olarak geliştiğiyle sınırlıdır.

Belirleme

- Gelişen embriyonik doku onun geniş gelişme potansiyelini elinde bulundurur mu?
- Genel olarak söylersek, hayır.
- Oluşan hücrelerin gelişme potansiyeli, normal gelişimde oldukça erken sınırlanır.
- Örneğin, daha geç evredeki kurbağa embriyosunun dokusu, eğer beyine gelişmesi belirlenmiş bir bölgeden alınır, erken evre embriyonun başka yapılar oluşturması tayin edilen parçasına transplante edilse bile beyin dokusu oluşturur.
- Bu yüzden geç evre embriyonun dokusunun **belirlenmiş** olduğu söylenir: Onun çevresi ne olursa olsun, onun yazgısı tayin edilmiştir.
- Bunun tersine, Şekil 2'deki daha genç transplant doku henüz belirlenmemiştir.

Belirleme, Farklılaşmadan Önce Olur

- **Belirleme** (bir hücrenin belirli (özel) bir kadere teslim olması), **hücreSEL çevre** tarafından ve hücrenin genomu üzerinde etki gösteren **hücreSEL içerikler** tarafından etkilenen bir işlemdir.
- Belirlemeyi **farklılaşma** izler, farklılaşma, farklı tipte hücrelerle sonuçlanan biyokimyasal yapı ve fonksiyondaki asıl değişikliklerdir.
- **Belirleme** mikroskop altında gözlenebilecek bir şey değildir- hücreler belirlendikleri sırada görünümelerini değiştirmezler.
- Farklılaşma ise genellikle fonksiyonda olduğu kadar görünümde de bir değişiklik gösterir.
- Belirleme farklılaşmadan önce olur. Belirleme bir kesin karardır, bu kesin kararın sonunda gerçekleşmesi farklılaşmadır.

Belirleme ve Farklılaşma Modeli

- Eğer bir organizmanın bütün hücrelerinin aynı genetik potansiyele sahip olduğu söylenirse, diğer faktörlerin de hangi potansiyellerin ortada kalacağını belirlediği söylenebilir.
- Bir embriyonik hücrenin potansiyeli üzerindeki ilk sınırlamalar, erken yarıklanmada kalitatif veya kantitatif farkların oluşmasıyla meydana gelir. Böylece, farklı sitoplazmik ortamlı farklı hücre nükleusları meydana gelir. Bu sitoplazmik farklılık, farklı genlerin aktifleşmesini sağlar.
- Gelişme ilerlediği zaman hücrelerin dış ortamının uniformluğu bozulur, örneğin, bazı hücreler daha içte yer alırlar. Bu durumda daha az ışık, daha çok basınç alırlar. Sahip oldukları pH değerleri değişir.
- Ayrıca hücreler, hücre sel komşuları bakımından da farklıdırlar. Bu komşuların oluşturdukları kontakt ve kimyasal etkiler de farklıdır. Çeşitli hücrelerin ortamlarında oluşan böyle farklar, daha sonra onların gelişme yönlerindeki farklılıkları şekillendirir.

Epigenetik Landscape, Waddington modeli

- Edinburg Üniversitesi'nden C.H. Waddington kullanışlı bir farklılaşma modeli ileri sürmüştür. Bu model, **Epigenetik Landscape, Waddington modeli** olarak bilinir.
- Bu model, bir yamaçta bir seri kanallar boyunca aşağı doğru uzanan sayısız farklı yollardan ibarettir.
- Bu yollardan her biri yamacın eteğinde izole edilmiş bir yerde sonuçlanır.
- Bu sonuçlanma noktası, farklılaşmış durumu gösterir. Yamacın tepesinde yer alan bir küre (teoride hücrenin sitoplazmik durumunu gösterir) alternatif olukların birine girer.

- Her bir ana bölmeye girdiğinde, alternatif yolların sayısı azalır.
- Top yokuş yukarı yuvarlanamayacağından, normal olarak geriye dönemez ve aşağı doğru farklı bir yol izler.
- Sonunda yamacın kaidesinde dallanan her bir noktada, girdiği özel yollarla belirlenmiş bir noktaya erişir.
- Yamaçtan aşağı doğru inerken, tek bir farklılaşma noktasına götüren, olasılıkların sınırlandırılmasına **determination= belirleme**, son farklılaşma yolundaki hücreye de, **determined=belirlenmiş** denir.

- Erken embriyo safhasında bir hücre, çok sayıdaki farklı gelişme yollarının herhangi birini izleyebilir,
- örneğin, bir kere ektoderm olarak farklılaşırsa, artık geriye dönemez, mezodermal ve endodermal yapıları şekillendiremez.
- Farklılaşmanın ilk dallanma noktasında, ektoderm olarak belirlendiğini farzedelim. Bundan sonra, herhangi bir ektodermal yapıyı şekillendirir.
- Daha sonra ikinci önemli dallanma noktasına gelir. Ya nöral oluşu meydana getirmek için sinir dokusuna farklılaşır veya yüzeyde kalır, epidermis olarak farklılaşır.
- İlk yolu izlediğini farzedelim, hala birçok alternatif yollar vardır. Beyin veya spinal kordonu şekillendirebilir; multipolar, bipolar veya unipolar nöronlar şeklinde farklılaşabilir.
- Fakat her bir dallanma noktası geçildiğinde, total alternatiflerin sayısı ileriye doğru azalır, sonuçta tamamen farklılaşmış hücrelerden biri haline gelir. Böylece farklılaşma; gittikçe ilerleyen belirleme olayı olarak görülür. Gelişmenin başlangıçtaki muhtemel yollardan birisi içine sınırlandırılmasıdır.

- Landscape'in topografyası organizmanın total genetik programını gösterir.
- Farklılaşmanın herhangi bir noktasında hangi yola girileceği hücrenin mikro çevresiyle belirlenir.
- Komşu hücrelerle uyarıcı ilişki, hücre dışı matriks, bir morfogen veya bir hormon konsantrasyon farkı oluşması gibi faktörler etkilidir.
- Birçok durumlarda yol seçimi iki alternatiften biri için yapılır, örneğin, ektodermden nöral boru veya epidermis seçimi veya fare blastulasında trofoblast veya embriyonik hücre kümesinin seçimi gibi.

- Tamamen farklılaşmış durumdaki bir hücre, diğer hücrelerden, onun özel fenotipini yansıtan belirgin histolojik görünüşüyle ayırt edilir.
- Bu durumdaki bir hücre ya aktif olarak iş görür veya iş görmek üzere hazırdır.
- Bazı hücreler, farklılaşmanın belli bir noktasına eriştiklerinde histolojik olarak belirlenebilirler. Fakat son değişimler çok daha geç meydana gelir, örneğin, meme bezleri epitelinde durum böyledir. Bu epiteller, hamilelikte hormonal olarak uyarılınca kadar son farklılaşmayı geçirmezler.

Farklılaşmada

Differansiyel Gen Ekspresyonunun Rolü

- Farklılaşmış hücreler birbirinden tanınabilecek kadar farklıdır, bazen dramatik olarak böyledir.
- Saç foliküllerimizdeki bazı hücreler devamlı olarak keratin üretirler, **keratin**: saç, tırnaklar, kuş tüyleri ve oklu kirpinin dikenindeki proteindir. Kan hücreleri keratin üretmezler, vücudumuzdaki diğer hücre tipleri de üretmezler. Saç folikül hücrelerinde, keratin kodlayan gen kopyalanır; vücudumuzdaki bir çok diğer hücrelerde bu gen kopyalanmaz.
- Bitki gelişimi sırasında bazı hücreler **suberin** oluşumunu katalizleyen bir enzimi kodlayan bir geni aktive eder, suberin mantar oluşturan, muma benzer karakteristik yapılı bir maddedir. Bu genin aktivasyonu bu hücrelerin farklılaşmasındaki anahtar basamaktır.
- Bu gözlemleri genelleştirirsek, farklılaşmanın differansiyel gen ekspresyonundan yani transkripsiyonun differansiyel düzenlenmesinden, mRNA splicing ve translasyon gibi posttranskripsiyonal olaylardan meydana geldiğini söyleyebiliriz.

- Çok hücreli bir organizmanın hücreleri tek hücreli döllenen bir yumurtanın veya zigotun mitotik bölünmeleriyle ortaya çıktığı için, bunların çoğu genetik olarak aynıdır (identik). Mutasyon olmazsa, bir organizmadaki tüm hücreler aynı kalıtsal yapıya sahiptir; fakat ergin organizma bir çok farklı hücre tipinden oluşur. Ortadaki bu aykırılık (çelişki) genomun çeşitli kısımlarının ekspresyonunun düzenlenmesinden meydana gelir.
- Zigot ergin vücuttaki her bir hücre tipini verme yeteneğine sahip olduğu için, onun **totipotent** olduğunu söyleriz. Onun genetik “kütüphanesi” tamdır, yaşam devri boyunca ortaya çıkacak olan tüm yapı ve fonksiyonlar için gerekli bilgileri içerir. Hayvanların gelişiminde daha sonra (ve muhtemelen daha az derecede bitkilerde) zigotun hücresel nesilleri totipotensilerini kaybeder ve belirlenmiş olurlar-yani, embriyonun sadece belirli kısımlarını oluşturması tayin edilir. Belirlenmiş hücreler sinir sistemindeki nöronlar veya kas hücreleri gibi spesifik hücre tiplerine farklılaşır. Bir hücre belirlenmiş olan yazgısını yerine getirdiği zaman, onun farklılaşmış olduğu söylenir.

Farklılaşma Genellikle Genomda Kalıcı Bir Değişiklik Oluşturmaz

- Farklılaşma mekanizmalarının ilk açıklamaları hücre nukleusunun gelişim sırasında irreverzibl değişiklikler geçirdiğini belirtmiştir. Kromozom materyalinin kaybolduğu veya bunun bazısının irreverzibl olarak inaktive edildiği bildirilmiştir.
- Farklılaşma bazı hücre tiplerinde irreverzibldir. Gelişim sırasında nukleuslarını kaybeden memeli kırmızı kan hücreleri ve damarlı bitkilerde su ileten hücreler olan trakeidler buna örnek verilebilir. Trakeid gelişimi hücrenin ölümüyle sonlanır, sadece hücre canlıyken oluşmuş olan çukur hücre duvarlarında kalır.
- Bu iki ekstrem durumda, farklılaşmanın irreverzibllığı nukleusun yokluğuyla açıklanabilir.

- Fonksiyonel nukleusları bulunduran olgun hücreler hakkında genelleştirme yapmak daha zordur.
- Biz bitki farklılaşmasını reverzibl olarak ve hayvan farklılaşmasını irreverzibl olarak düşünme eğilimindeyiz, fakat bu değişmez bir kural değildir.
- Bir istakoz kopan tırnağını (pençe) yenileyebilir,fakat bir kedi kopan pençesini yenileyemez.
- Farklılaşma niçin bazı hücrelerde reverzibl iken bazılarında değildir?
- Gelişimin bazı evrelerinde nukleus içindeki değişiklikler bir hücrenin özelleşmesini kalıcı olarak mı tayin eder?

- Briggs ve King'in denemeleri göstermiştir ki, erken kurbağa embriyosundaki her bir hücre ergin bir kurbağa oluşturmak için gerekli genlerin tümüne sahiptir.
- Aynı şey muhtemelen insanlar için de geçerlidir, insan genetik testlerinde pratik uygulamalara yol gösterir.
- Sekiz hücreli bir insan embriyosu laboratuvarında izole edilebilmiş ve tek bir hücre zararlı bir allelin homozigot formda bulunup bulunmadığını belirlemek için uzaklaştırılmıştır. Geri kalan ve totipotent olan her bir hücre bir zigot olarak iş görmesi ve bölünmesi için uyarılabilmiştir.

- Briggs ve King'in çalışmasının daha ilerisi Oxford niversitesinde John B.Gurdon tarafından yapılmıştır, Gurdon, daha ileri embriyolardaki ve hatta tetarilerdeki nukleusları kullanarak farklı kurbağa türlerinde benzer transplantlar yapmıştır.
- Nukleusu inaktive edilmiş olan bir yumurtaya transplante edilen bu nukleuslar embriyoda, tetaride ve bazı durumlarda ergin kurbağalarda bulunan tüm hücre tiplerini oluşturabilmiştir.
- Gurdon'un sonuçları, farklılaşmış bir hücrenin nukleusunun totipotent olduğunu teyit etmiştir. Açıkça, nukleuslar farklılaşma sırasında aktivitelerini değiştirir, fakat değişiklikler irreverzibl olmak zorunda değildir.

- Nukleusun etrafındaki çevre –sitoplazma- bu nükleer genlerin ifade bulmasında büyük bir etki gösterir. Bu yüzden tetarinin bağırsağındaki bir hücrenin içindeki nukleus “intestinal” sinyalleriyle çevrelenmiştir, fakat bu eğer döllenmiş bir yumurtanın sitoplazması içine yerleştirilirse döllenmiş bir yumurta nukleusu olarak etki gösterme yeteneğini elinde bulundurur.
- Totipotensinin dramatik bir örneği 1997’de rapor edilmiştir, İskoçya’daki biyoteknoloji şirketindeki Ian Wilmut ve arkadaşları Gurdon’un nükleer transplant prosedürünün bir modifikasyonunu koyun klonlamak için kullanmışlardır

- Bu metodla memelileri üretmek için daha önceki denemeler sadece eğer verici nukleus tam bir hücrenin parçası olduğunda ve verici hücre erken embriyodan olduğunda çalışılmıştı.
- Gurdon'un kurbağalarla yaptığı gibi, ergin verici hücreler kullanıldığında kromozomal anormallikler ve embriyonik ölümle sonuçlanmıştır.
- Açıkça, memeli verici hücreleri hücre devrinin G2 fazında olduğu zaman ve yine G2'deki yumurta sitoplazmasıyla birleştirildiği zaman, bazı ekstra DNA replikasyonunun hücre bölünmeye teşebbüs ettiği zaman yumurtadaki hücre devrinde hasar yarattığı bulunmuştur.

- Wilmur dişi koyunun memesinden farklılaşmış hücreleri aldı ve onları bir hafta için aç bıraktı, böylece hücreler G1'de durduruldu.
- Sonra bu hücrelerden biri farklı bir koyundaki çekirdeksiz yumurta ile birleştirilmiştir (verici hücre ve çekirdeksiz yumurtanın birleşmesi elektriksel uyarıyla yapılmıştır), yumurta sitoplazmasındaki mitotik uyarıcılar verici nükleusunun S fazına girmesini uyarabilmiştir ve duraklamış olan hücre devri normal olarak ilerlemiştir.
- Bir kaç hücre bölünmesinden sonra erken embriyo vekil annenin rahmine transplante edilmiştir.
- Çekirdeksiz yumurtalar ve ergin hücrelerin birleşmesi için 272 başarılı deneme içinde bir kuzu, Dolly doğmayı başardı. Dolly memesinden verici nükleusun alındığı koyunla genetik olarak aynıdır (identik).

- Wilmur'un deneyinin amacı sütlerinde ilaçlar (farmasötikler) gibi ürünleri üretmek için genetik olarak programlanmış olan koyunu klonlamaktı.
- Klonlama prosedürü, kistik fibrozisli hastaları tedavi etmek için kullanılan **alfa-1 antitripsin** gibi bir ilacın güvenilir üreticileri olan koyunların çok sayıda identik kopyalarını yapabilmiştir.
- Dolly klonlamayla doğan ilk memeli olduğu için Wilmur'un çalışmasının münakaşa fırtınasını patlatması şaşırtıcı değildir.