

BiY448

Farklılaşmanın Moleküler Biyolojisi

Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

Nükleer totipotens

- Nükleer totipotensinin yanlış giden bir örneği **teratokarsinoma** denilen bir insan tümöründe görüldü.
- Burada, farklılaşmış bir hücre “dedifferentiates = yanlış kontrolsüz bir şekilde yeniden farklılaşır” ve bölünür, bir çok kanserde olduğu gibi bir tümör oluşur.
- Fakat tümördeki bazı hücreler, özelleşmiş doku düzeni oluşturmak için yeniden farklılaşır.
- Böyle bir tümör abdomen içinde tek bir hücre kitlesi oluşturabilir, bunların bazıları böbrek tüpleri, diğerleri saçları ve hatta başkaları da dişleri oluşturabilir!
- Bunun nasıl olduğu açık değildir.
- Farklılaşmış hücrelerde genlerin kaybolmadığını göstermek için, şimdi gelişen böceklerde gözlenen bir fenomeni inceleyeceğiz.

Transdeterminasyon, gelişen böceklerin genlerini muhafaza ettiklerini gösterir

- Kelebekler, güveler ve diğer birçok böceklerin gelişimini muhtemelen biliyorsunuzdur.
- Döllenenmiş bir yumurtadan, oburca beslenen, sürünen bir larva gelişir, bir dizi güvenin içinde büyür, onun dış kabuğu vücudun büyümesine izin vermek için atılır.
- Bazı özelleşmiş hücreler **imajinal (imge) diskler** adı verilen gruplar şeklinde düzenlenmiştir, bu diskler larval büyüme boyunca farklılaşmadan kalır, fakat sonra kanatlar, antenler, bacaklar gibi ergin dokularını oluşturur.
- Larva sonunda beslenmeyi durdurur ve sonra kendini bir kozayla çevreler ve pupa'ya transforme olur.
- Pupada çok büyük değişiklikler meydana gelir. Bazı larval hücreler ölür, diğerleri ergine özgü başka ürünleri yapmak için yeniden programlanır ve imajinal diskler yeni ergin yapılara farklılaşır.
- Larva ve ergin arasındaki böyle büyük bir transformasyona **tam metamorfoz** adı verilir.

Transdeterminasyon

- Böceklerin imajinal disklerinin kaderi, metamorfozdan çok önce belirlenir. Bir imajinal disk, bir larvadaki diğerine parçalanmadan transplante edilirse yine aynı tip organa gelişir (örneğin, bir kanada veya bir antene).
- Ayrıca imajinal diskin konak vücudunda bulunduğu yerdeki organ gelişir.
- Bir imajinal disk, ergin bir böceğe transplante edilirse farklılaşmadan kalır (onun gelişimi için hormonal sinyalden yoksun olduğu için), fakat diskin hücreleri yeni konak içinde bölünmeye devam eder.
- Sonra bu transplante edilen disk hücreleri, başka ergin böceklere veya larvalara transplante edilebilir.
- Eğer bir larvaya geri dönerse (yeniden aşılırsa), disk hücreleri hemen hemen daima orijinal olarak belirlenmiş oldukları ergin organa gelişirler.
- Bununla beraber, bazen bir imajinal disk, transplant serileri sırasında “transdetermine” olabilir; yani o normal olarak beklenenden başka bir organa gelişebilir. Buna **transdeterminasyon** adı verilir.

- Transdeterminasyon, imajinal disklerin normalde ifade etmedikleri genleri kaybetmemiş olduklarını gösterir,
- Bu yüzden bir disk, doğru şartlar altında bu genleri ifade edebilir ve farklı bir organ üretebilir.

Birçok bitki hücresi totipotent kalır

- Bir havuç kökündeki besin depolayan bir hücre, karanlık bir gelecekle yüz yüzedir. Normalde bu hücre, fotosentez yapmaya veya yeni bir havuç bitkisi vermeye yönelemez.
- Eğer biz kökteki hücreyi izole edersek, onu uygun bir besin ortamında yetiştirirsek ve onu uygun bir kimyasal işaretle uyarırsak, hücrenin davranışını değiştirmeye kandırabiliriz.
- Aslında hücre, döllenmiş bir yumurta olduğunu “zanneder”. O, bölünür ve tipik bir havuç embriyosu ve sonunda tam bir bitki oluşturur.
- Farklılaşmış bir kök hücresinden tam bir havuç bitkisi klonlama yeteneği gösterir ki, bu hücre havuç genetik kütüphanesinin tamamını içermektedir ve uygun genleri doğru bir sırada ifade edebilir.
- Başka bitki türlerindeki birçok hücre de, laboratuarda benzer davranışı gösterir ve tek bir hücreden tam bir bitki oluşturma yeteneği, biyoteknolojide genetik olarak değiştirilmiş bitkiler üretmek için çok değerli olmuştur.

Genler, hücre farklılaşmasında differansiyel olarak eksprese edilir

- – Kurbağalar ve koyunlardaki çekirdek transplantları, meyve sineklerinde imajinal disk manipulasyonları ve bitki hücre klonlamaları – gibi denemelerin tümü, bir organizmanın tüm somatik hücrelerinde genetik değişmezliğin olduğunu gösterir.
- Moleküler biyoloji denemelerinden daha fazla ikna edici kanıtlar sağlanmıştır.
- Örneğin, hemoglobinin protein komponentlerinden biri olan β -globin geni, kırmızı kan hücrelerinde bulunur ve hücreler memelilerin kemik iliğinde oluşurken eksprese edilir.
- Aynı gen, bu proteini yapmayan beyindeki sinir hücrelerinde de var mıdır?
- Vardır da ifade mi edilmez?

Diferansiyel gen ekspresyonu

- Nükleik asit hibridizasyonu buna bir cevap sağlayabilir.
- β -globin geni için hazırlanmış olan bir prob, hem olgunlaşmamış kırmızı kan hücrelerindeki (olgunlaşmış kırmızı kan hücrelerinin nukleuslarını kaybettiklerini hatırlayın) hem de beyin hücrelerindeki DNA'ya uygulanmıştır.
- Her iki durumda da, prob kendi tamamlayıcısını (komplement) bulur, bu da, β -globin geninin hücrelerin her iki tipinde de bulunduğunu gösterir.
- Diğer taraftan, eğer prob, hücresel DNA yerine mRNA'lara uygulanırsa, o sadece kırmızı kan hücrelerindeki mRNA'yı bulur, beyin hücrelerindeki bulamaz.
- Bu sonuç, genin iki dokudan sadece birinde eksprese olduğunu gösterir. Birçok benzer denemeler farklılaşan hücrelerin, döllenmiş yumurtada mevcut olan genlerin hiç birini kaybetmediğini ikna edici bir şekilde göstermiştir.

Diferansiyel gen ekspresyonu

- Moleküler programı, bu diferansiyel gen ekspresyonuna götüren şey nedir?
- İyi çalışılmış sistemlerden biri, farklılaşmamış kas öncü hücrelerinin iskelet kas fibrillerini oluşturan büyük, çok nukleuslu hücrelere dönüşümüdür.
- Bu dönüşümü başlatan anahtar olay **MyoD1 (Myoblast Determining Gene 1)**'in ekspresyonudur.
- Bu genin protein ürünü, heliks-ilmek-heliks bölgesi bir transkripsiyon faktörüdür, bu protein sadece transkripsiyonlarını uyarmak için kas-belirleyici genlerin promotorlarına bağlanmaz, ayrıca hücrelerde ve hücre bölünmesiyle oluşan yavrularında, onu yüksek seviyede tutmak için MyoD1'in gen promotorunda da etki gösterir.

Diferansiyel gen ekspresyonu selektör (seçici) genler

- MyoD1'in kontrol edici rolü için güçlü kanıt, MyoD1 mRNA'sının başka hücre tiplerinin öncülerine enjekte edildiği denemelerden gelir.
- Örneğin, eğer MyoD1 mRNA'sı, yağ öncü hücrelerine konursa, bunlar kas hücreleri olmak üzere yeniden programlanırlar.
- Gelişimde temel kararları idare eden proteinler için kodlama yapan ve genellikle başka kromozomlar üzerindeki genleri düzenleyen MyoD1 gibi genlere **selektör (seçici) genler** adı verilir.
- Bu genler genellikle transkripsiyon faktörleri için kodlama yapar.

Hücre Belirlenmesinde Sitoplazmik Ayrımın Rolü

- Transkripsiyonun başlaması için MyoD1 promotorunu başlangıçta neyin uyardığı belli değildir, fakat açıkça bir kimyasal sinyal işe karışır.
- Genelde, hedef hücreleri uyarmak için böyle sinyallere sebep olan ayrıntılı iki mekanizma bulunmuştur.
- Birinci mekanizmada – **sitoplazmik ayırım**-da yumurtalar, zigotlar veya öncü hücreler içindeki bir faktör, bazı hücrelerde hücrenin bir ucuna veya çeşitli hücre bölgelerine, eşit olmayan bir şekilde dağıtılır veya diğerlerine dağıtılmaz.
- İkinci mekanizmada –**indüksiyon**-da ise, bir faktör hedef hücreyi farklılaşmaya uyarmak için aktif olarak üretilir ve salgılanır.

Yumurtalar, Zigotlar ve Embriyolar Kutuplu Gelişir

- **Polarite (kutupluluk)** –bir ucun diğerinden farklı olması–, gelişimde belirgindir.
- Başlarımız ayaklarımızdan farklıdır ve kollarımızın distal uçları (bilekler ve parmaklar) proksimal uçlardan (omuzlar) farklıdır.
- Bir hayvanın polaritesi çok erken, o daha yumurtayken gelişir.
- Yolk, yumurtada ve embriyoda asimetric olarak dağıtılabilir, ve diğer kimyasal maddeler hücrenin spesifik kısımlarında toplanabilir veya bir kutupta diğerinden daha konsantre (yoğun) olabilir.

Polarite (kutupluluk)

- Bazı hayvanlarda, yumurtanın sitoplazmasındaki materyallerin orijinal polar dağılımı, döllenenin bir sonucu olarak değişir.
- Bölünme devam ederken, oluşan hücreler, zigotta aynı şekilde dağılmamış olan materyallerin, eşit olmayan miktarlarını içerirler.
- Briggs ve King, Gurdon ve Wilmot'un klonlama çalışmalarından öğrendiğimiz gibi, hücre nükleusları erken gelişim sırasında her zaman irreversibl değişiklikler geçirmezler; bu yüzden biz hücrelerdeki *sitoplazmik* farklılıkların temelindeki bazı embriyolojik olayları açıklayabiliriz.

Sitoplazmik Ayrım

- Deniz kestanesi yumurtası gibi, oldukça basit bir yapı bile polariteye sahiptir.
- Hücreler arasında göze çarpan bir farklılık, çok erken embriyonik gelişimde gösterilebilir. İsveçli biyolog Sven Hörstadius 1930'larda sekiz hücreli evrede ikiye bölünmüş olan deniz kestanesi embriyolarının gelişiminin, onların nasıl ayrıldığına bağlı olduğunu göstermiştir.
- Eğer embriyo "sol" ve "sağ" yarılarına ayrılırsa, her biri hem üst hem alt yarıdaki hücrelerin yarısını içerir, normal şekilli fakat cüce larvalar gelişir.
- Buna karşın, eğer üstteki dört hücre alttaki dört hücreden kesilip ayrılırsa, sonuç değişir.
- Üstteki dört hücre bir larva oluşturmayan, bir ucunda büyük silleri olan anormal bir erken embriyoya gelişir. Altteki dört hücre küçük, biraz biçimsiz ve çok büyük bağırsaklı bir larvaya gelişir.

Sitoplazmik determinantlar

- Tam olarak normal gelişim için, embriyonun hem alt hem de üst parçalarındaki faktörler gereklidir. Yumurtalar üzerindeki benzer denemelerde, Hörstadius, yeni döllenmiş yumurtadaki materyalin, alt ve üst parçalar arasında eşit olarak dağıtılmadığını göstermiştir.
- Bu ve başka denemeler, yumurta sitoplazmasındaki materyallerin eşit olmayan dağılımının embriyonik gelişimi yönetmede bir rol oynadığı üzerine yapılan birçok çalışmalardan biridir.
- Böyle materyallere **sitoplazmik determinantlar** adı verilir.

***Caenorhabditis*'de P Granüllerini Mikrofilamentler Dağıtır**

- Küçük nematod (yuvarlak kurt) *Caenorhabditis elegans* toprakta yaşar, bakterilerle beslenir.
- Bildiğiniz gibi, bakteriler agar içeren ortamda petri kaplarında laboratuarda yetiştirilebilir.
- *C. elegans* yuvarlak kurtları, böyle bakteri kültürlerinde yetiştirilir.
- Yumurtadan larvaya tam gelişim işlemi 25°C'de yaklaşık 12 saat alır ve vücut örtüsü transparan olduğu için az büyötmeli bir diseksiyon mikroskobu kullanılarak kolayca gözlenir.

***C. elegans*'ın gelişimi**

- *C. elegans* nematodunda tek bir hücrenin, tam olarak gelişmiş erginde bulunan 959 hücreye tüm bölünmelerini izlemek mümkün olmuştur.
- *Caenorhabditis elegans* 1mm uzunluğunda bir nematod veya yuvarlak kurttur.
- Onun iç yapıları görülebildiği için ve anatomisi nispeten basit, şeffaf ve renksiz olduğu için, bu kurt, hücresel gelişimin izlenmesi için yararlı bir organizmadır.
- Hermafrodittir, hem erkek hem de dişi üreme yapılarına sahiptir, ergin evresine yumurtanın döllenmesinden 3-5 gün sonra ulaşır.
- Ağaçtaki her çatal, bir hücrenin mitotik bölünmesini gösterir.
- 8 hücreli embriyonik evrede, tek bir hücre, gelecekteki tüm bağırsak hücrelerinin kaynağı olarak teşhis edilebilir.

***C. elegans*'ın gelişimi**

- *C. elegans*'ın kültürünün kolay olması, hızlı gelişmesi ve kolayca gözlenmesi yüzünden, gelişim biyologlarının bu kurdu favori organizma yapması şaşırtıcı değildir.
- Gerçekten, onun tam genomunun dizi analizi yapılmıştır.
- *C. elegans*'ın gelişimi değişik olduğu için, ergin formun 959 somatik hücresinin her birinin orijinini tanımlayan bir hücresel “ağaç” yapmak mümkün olmuştur.
- Bunu yapmak için, bir embriyonik hücre içine marker boya enjekte edilir: Böylece bu hücre ve onun nesillerinin tümü işaretlenmiş olacaktır.
- Fakat bazı durumlarda, kurdun kendisi belirli bir yolda farklılaşacak olan hücreleri “işaretler”.

***C. elegans*'ın gelişiminde sitoplazmik ayırım**

- İşaretlenmiş olan hücrelerdeki bir yol da, gametleri oluşturacak olan hücrelerden oluşan **germ hattı**dır.
- **P granülleri** denilen partiküllerin, bu farklılaşma hattı için **sitoplazmik determinantlar** olduğu açıktır.
- Zigot ve embriyodaki P granüllerinin pozisyonları, mikroflamentlerin etkisiyle belirlenir.
- Zigot bölünmeden önce, P granülleri hücrenin posterior ucunda toplanır (bu yüzden P “pole/kutup” denir).
- Bu yüzden tüm granüller, ilk iki oğul hücrenin sadece birinde görülür. P granülleri erken hücre bölünmeleri sırasında tam olarak dağılmaya devam eder, sadece sonunda, yumurta ve spermi verecek olan germ hücrelerinde sonlanır.
- P granüllerinin kendilerinin sitoplazmik determinantlar olup olmadığı belli değildir; onlar basitçe “gerçek” sitoplazmik determinantlar olan başka bir şeyle birlikte dağıtılmış olabilir. Bunların kompozisyonu açık bir ipucu vermez, çünkü bunlar birçok protein ve RNA’dan yapılmıştır.