

# EPİGENETİK

## *Hafta 3: Epigenetik mekanizmalar 2*

**Epigenetik kalıtımda prion ve prion benzeri fenomenler, kromozomal pozisyon etkisi, polikomb mekanizmaları ve gen aktivitesinin epigenetik kontrolü**

**Dr Öğr Üyesi Arzu ATALAY**

# **Anormal katlanan proteinler hastalıklara neden olacak şekilde topaklanabilir:**

PrP proteini proteaza dirençli hale gelerek katlanır (çapraz beta iplikçikleri), normal katlanmış PrP moleküllerine de bulaşarak onları da aynı formata dönüştürür. PrP\* yokluğunda PrP'nin anormal forma döndürülmesi oldukça zordur (Prion, BSE)

## 1) Yapısal kalıtım

- *S.cerevisiae* ve *P.anserina* prionları
- Mitokondri şaperonini Hsp60ın kendi kendine oluşumu
- Sil ve diğer kompleks yapıların sitotaksisi

## 2) Karışık kalıtım: Kovalent oto-aktivasyonla idame olan bir prion

## 3) Regülatör (Düzenleyici) kalıtım

- Laktoz operonu ve pozitif feedback cevabı
- Filamentöz fungusta kendi kendine sürdürülebilir ve mitotik olarak kalıtılanan Crippled büyümesi
- *Candida albicans*'ta beyaz/opak anahtarı: transkripsiyon seviyesindeki epigenetik anahtar

# 1) Yapısal kalıtım

**Proteinaceous infectious particle** : Prion terimi Prusiner tarafından bazı TSE hastalıkları (transmissible spongiform encephalopathies) (koyunda scrapie, insanda Kuru ve Creutzfeldt-Jacob hastalığı) açıklamak için önerildi.

Protein iki farklı konformasyona dönüşebilir ve bu formlardan biri diğerini o hale dönüştürebilir. Prion proteinleri genelde monomerik veya oligomerik durumda olurlar, protein monomerik formdan oligomerik forma kendiliğinden çok nadir dönüşür. Oligomerler monomerlerin oligomer oluşturmasını tetikler ve böylece enfeksiyöz hale geçerler. Bu otokatalitik süreçte monomerler oligomer olarak agregat oluşturur. TSEler PrP<sup>C</sup>'nin enfeksiyöz form olan PrP<sup>Sc</sup> ye katlanması ile oluşmaktadır.

Prion terimi artık sadece TSE ajanlarını tanımlamak için değil, enfeksiyöz konformasyon alan tüm proteinler için kullanılmaktadır. Prion geçişi proteinin fonksiyonunu ve nihai olarak hücrenin fenotipini değiştirmektedir. Agregat halindeki form hem enfeksiyöz hem de nesilden nesile mayoz ve mitozla aktarılmaktadır.

Hücrenel bir proteinin prion davranışı için pek çok genetik kriter vardır:

- 1) Prion tedavi/tamir edilebilir, ancak tekrar edebilir çünkü enfeksiyöz duruma yol açan konformasyon hala mevcut olabilir
- 2) Prion oluşturabilecek bir proteinin fazla ifadesi *de novo* prion oluşması şansını artırabilir
- 3) Prion fenotipi proteinin normal formunun yokolmasından kaynaklı ise genin null mutanlığı da aynı fenotipi oluşturur, bu gen prionun idamesi için gereklidir.

Agregat halindeki prion saflaştırılabilir ve transmisyon deneylerinde kullanılabilir

Prion domain, Q/N zengin bölgeler gibi yapısal özellikler...

# 1) Yapısal kalıtım

- *S.cerevisiae* ve *P.anserina* prionları

Kriterlere uyan ilk prion proteinleri maya eRF3 ve Urep2dir, eRF3ün prionu olan Sup35 translasyon terminasyon verimini etkilemektedir. URE3, Urep2nin prionundur ve nitrojen katabolizmasını etkiler .  
CPEB translasyonel düzenleyicidir.

## 1) Yapısal kalıtım

- Mitokondri şaperonini Hsp60ın kendi kendine oluşumu Prionlar anormal proteinler gibi algılansa da, *S.cerevisiae* Hsp60 chaperonin kendi katlanması ve yapılanmasını katalizleyen net bir örnek olatacak ortaya çıkmaktadır. Monomerlerin doğru yapılanması için önceden varolan doğru katlanmış oligomerlerin varlığının gerekliliği görülmektedir.

Prion ve Hsp60 tek proteinin homopolimerleridir

- Sil ve diğer kompleks yapıların sitotaksisi

Cilia yapısı pek çok protein ve kofaktörden oluşabilir ve bu formların 800 jenerasyon boyunca devam ettiği gösterilmiştir. Paramecium, Tetrahymena ve Chlamydomonas gibi canlılarda pek çok deney yapılmış ve sil sitotaksisi sayesinde önceden oluşmuş bir sil yapısının diğer silin aynı yönde yapılanması için önemli olduğu gösterilmiştir.

**2) Karışık kalıtım:** Kovalent oto-aktivasyonla idame olan bir prion örneği.

Maya proteaz B (PrB) subtilisin/furin sınıfı bir serin proteazdır ve katalitik inaktif formu PRB1den oluşur. Pro-enzim PrBnin olgunlaşmasındaki son aşamalar lizozom benzeri maya vakuollerinde gerçekleşen seri kırılmalardır. Bu işlem proteaz A (PrA) ve PrBnin kendisi tarafından katalizlenir. Olgun PrB diğer vakuol hidrolazlarını aktive eder.

Bu süreç bir proteazın oto-katalitik kırılmasının kalıtlanmasına örnektir.



### 3) Regülatör (Düzenleyici) kalıtım

Bazı durumlarda çevresel ajanlara verilen cevaplar bistabil durumların nesiller boyu idamesini sağlayabilir

- Laktoz operonu ve pozitif feedback cevabı

Besin durumuna göre hücrelerin aktif veya diğer durumlara hemen geçmemesi. Hücreler aynı besin miktarında köken aldıkları (monostable indüklenmiş veya monostabil indüklenmemiş) hücreler gibi davranmaktadır

- Filamentöz fungusta kendi kendine sürdürülebilir ve mitotik olarak kalıtılan Crippled büyümesi

Crippled büyümesi (CG) dejeneratif büyümedir, bazı bölgeler farklı büyümektedir. Normal büyümenin aksine çevresel sinyallerle daha pigmentli, düz ve steril olarak büyüme gözlenir ve kalıtılır.

### 3) Regülatör (Düzenleyici) kalıtım

- *Candida albicans*'ta beyaz/opak anahtarı: transkripsiyon seviyesindeki epigenetik anahtar

Bu diploid fungusta mating tipi homozigot olduğunda bu değişim görülür. Hücreler iki farklı morfoloji geliştirebilir, büyük yuvarlak ve beyaz koloniler ile opak olan daha uzun hücreler. İnsanda mycosis e neden olan *C.albicans*'taki bu genetik anahtar sayesinde farklı ortamlara adapte olduğu bilinmektedir.

WOR1/TOS9 transkripsiyon faktörü sadece opak hücrelerde yer almaktadır (transkriptom,ChIP data), beyaz hücrelerde yoktur. Kendi promotoruna bağlanıp aktive eder. Mekanizma tam olarak anlaşılmamıştır.

# Polikomb mekanizması ve gen aktivitesinin epigenetik kontrolü

- Polycomb group (PcGs) proteinleri makromoleküler kompleks oluştururlar. Bu kompleks, epigenetik gen susturulması ve bir çok gelişim yolağının regülasyonunda kritik fonksiyona sahiptir.
- Polycomb grup (PcG) proteinleri ilk defa *Drosophila*'nın homeotik genlerinde ve bu genlerin düzenlenmesinde tespit edilmiştir.
- *Drosophila*'da PcG fonksiyonunun azalması, sineğin arka bacakların ön bacakların yönüne transforme olması ve bunun sonucu tarağa benzer bir fonksiyonun ortaya çıkmasına neden olur.
- PcG'leri genom boyunda hücre farklılaştırmasında katılan genlerin kontrolünün mekanizmalarının bir kısmıdır.
- PcG komplekslerinin çoğu hücre çekirdeğinde bulunurlar. Ancak bunların hücre döngüsünde mekanizmaları, hedefleri, etkileri, nasıl baskılandıkları gibi sorular araştırılmaktadır.

# Polikomb mekanizması ve gen aktivitesinin epigenetik kontrolü

- PcG'lar iki multiprotein kompleksten oluşmaktadır:
  - 1- Polycomb baskılayıcı kompleks 1 ya **PRC1**
  - 2- Polycomb baskılayıcı kompleks 2 ya **PRC2**
- PRC1 alt üniteleri:
  - Polycomb Protein (PC): methyl-lysine gruplarına bağlanan chromodomain içermektedir. PC trimetil formdadır (H3K27me3)
  - Posterior Sex Combs (PSC)
  - dRING
  - Polyhomeotic (PH) SPM isimli protein-protein etkileşim alanın içerir ve PSC ile etkileşimi var.

# Polikomb mekanizması ve gen aktivitesinin epigenetik kontrolü

- PSC ve dRING halka alanlı proteinlerdir ve birlikte H2A'nın ubiquitinasyonuna aracılık eder.
- Bu bileşenlerin farklı koşullarda birkaç homologları vardır.
- PC homologları (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 ve CBX8) , en az iki PSC homologu (Bmi1 ve Mel18), iki RING homologu (Ring1A ve Ring1B) ve üç PH homologu (Phc1, 2, 3)

# Polikomb mekanizması ve gen aktivitesinin epigenetik kontrolü

- Polycomb baskılayıcı kompleks 2 ya **PRC2** kompleksinin katalitik bileşeni **Zeste enhancerıdır [E(Z)]** . Zayıf H3K27me3 aktivitesine sahiptir. EZH2 H3K27me modifikasyonundan sorumlu SET domaini içerir. Böylece birkaç genin baskılayıcısıdır.
- Enzimatik aktivite için: Zeste-12 supresörü [SU(Z)12], Extra sex combs (ESC) veya ESCL yakın homologu gerektirir. Histon şaperonu RbAp48'dir.
- In vivo, bu kompleks yapının hedefi histon H3K27'dir, ve PRC2 tüm mono, di ve tri metilizasyon pozisyonundan sorumludur.

# Polikomb mekanizması ve gen aktivitesinin epigenetik kontrolü

- PRC1 ve PRC2 pek çok genin düzenlenmesinden sorumludur. Pleiohomeotik (PHO) ve bunun yakın ailesi PHOL(memelilerdeki homoloğu, YY1), DNA'ya bağlanan protein olarak, PcG makinesinin hedef genlerinin düzenlenmesinde önemlidir.
- PHO (Birden fazla MBT metil-lizin bağlama alanı içeren memeli SFMBT'nin bir homologue olan dSFMBT ile bağlantılı), homeotik genlerin baskılamasında PcG mekanizmasını kullanır.
- Diğer genlerin de PcG mekanizmasında homeotik genlerin susturulmasındaki rolleri genetik analizlerle ortaya çıkmıştır.

# Polikomb yanıt ögeleri (PREler)

- PcG mekanizmaları PRE bölgeleri sayesinde tanımlanmıştır.
- PRE bölgeleri birkaç yüz baz çiftinden oluşmaktadır.
- PRC 1 ve 2 komplekslerinin ikisini de toplayabilir. Böylece komşu genlerin PcG'ye bağlı olarak baskılanabilir.
- PREler promotor bölgelerinden onlarca baz (kb) uzaklıktaki, promotorların yanında, intronik bölgelerde veya genlerin downsteam'inde genleri repress edebilirler.
- ChIP veya DamID analizleri bilinen PRE'lerin PcG proteinlerinin bağlanma bölgeleri olduğunu göstermiş ve bu bağlanma bölgeleri de benzer yüzlerce diğer genle ilişkilidir.
- PcG proteinlerinin bağlanma profilleri incelendiğinde dar kromatin bölgelerine bağlanabildikleri görülmüştür.



# Polikomb yanıt ögeleri (PREler)

- PHO DNA bağlayıcı protein olarak görev yapar.
- PHO veya PHO-like (PHOL), dSFMBT ile ilişkilidir ve her ikisi de *Drosophila*'da homeotik genlerin etkili olarak baskılanmasında gereklidir.
- *In vitro* deneylerde, PRE'ye özgü bağlanmada PHO PRC1 ile işbirliği yaptığı gösterilmiştir.
- DNA bağlayıcı proteinlerden en az üç proteininde PRE'ler ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir bunlar: DSP1, GAF/TRL ve Piquequeak.

# Polikomb yanıt ögeleri (PREler)

- Hedef genlerde PcG komplekslerinin toplanmasında protein kümeleri birarada çalışırlar. Çünkü tek bir protein yeterli olmayıp, henüz belirlenemeyen farklı bir takım proteinlerin olduğu da tahmin edilmektedir.
- *Drosophilada* bağlanma profilleri ChIP/chip veya ChIP/seq yöntemleriyle tam olarak konumlandırılmaya çalışılmaktadır.
- Bu bölge PHO/YY1 bağlanma bölgeleri ve GAGAG motifleri içermektedir, bu bölge ve motifler *Drosophila* DNA bağlayıcı proteini olan GAF tarafından tanınmaktadır

# H3K27 metil işareti

- PRC2 kompleksi bütün H3K27 metilasyonundan sorumludur. Memelilerde, monometilasyon, Ezh1 ve Ezh2'nin uzaklaştırılması ile kaldırılmamaktadır; ancak Eed'e bağımlıdır.
- H3K27me3 PcG represyonunun karakteristik bir özelliği iken, PRC2 kompleksinin daha önemli bir özelliği H3K27me2'dir.
- Bu da H3 genomünün %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. H3K27me3 modifikasyonuna uğrayan ve aktif transkribe bölgelerin dışında kalan genomun hemen hemen her yerinde mevcuttur.
- Bu yaygın metilasyonun fonksiyonu tam bilinmemektedir ve PRC2 nin bağlanmasıyla da ilişkilidir ve PRC2 bileşenleri mutasyona uğradığında kaybolur.
- PRC2, Polycomb-benzer PCL(Memelilerdeki homolog, PHF1) bileşenin yardımıyla bir trimetil transferaz olarak H3K27me3 işaretler.

# H3K27me3 fonksiyonu

- PC kromodomainlerinin H3K27me3'e özel bir eğilimi vardır.
- H3K27 trimetilizasyonun PRC1 proteinini bağladığı ispat edilememiştir.
- Buna göre DNA'ya bağlanan PHO proteini PRC2'ni bölgeye çeker ve PRC2 çevreleyen nükleozomları H3K27 metiller. Bunun arkasından PRC1 protein, PC kromoalanının H3K27m3 ilişkisi ile ortaya gelir.
- Genomda PcG'larına bağlanan bölgeler, H3K27'nin trimetilasyonunun dağıtımına ve PRC1 ve PRC2'nin oranına göre bölgeden bölgeye farklıdır.
- Bazı durumlarda PcG kompleksleri belli kodlanmayan RNA'lara da bağlanabilir (Ör. X kromozom inaktivasyonu).

# PcG baskılaması

- PcG transkripsiyon mekanizmasında non-histon elementlerinin metilasyonu ve übikütilasyonla baskılanmasını sağlar.
- PcG tarafından baskılanan genler ortamda transkripsiyon faktörleri olsa da olmasa da «çalışmıyoruz» modundadır ya da RNA polimeraz II tarafından transkribe olamazlar.
- PRC1'e bağlı H2A ubikütilasyonunun transkripsiyonun başlamasıyla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir.

# EPİGENETİK İDAME (HÜCRESEL HAFIZA)

- Herhangi bir hücrede potansiyel PcG hedef bölgeleri, PcG proteinleri ile bağlandığında bunlardan bazıları aktif iken bazıları baskılanabilir.
- Bazı genler embriyo döneminde aktif değilken ileri dönemlerde aktif olabilir.
- Bazı çalışmalarda bazı genlerin, PcG proteinleri ve RNA pol II enzimini bağladığı tespit edilmiş olup hem repress edici H3K27me3 işareti hem de aktive edici H3K4me3 işaretinin promotor sekansında birlikte bulunduğu belirtilmiştir.

# EPIGENETİK İDAME (HÜCRESEL HAFIZA)

- Embryonik kök hücreler (ES) pluripotent hücrelerdir, çoğu yolakları kontrol eden genler ekspresyon gösterme potansiyeline sahiptir.
- Pluripotent hücrelerdeki kritik regülatör genler; oct4, sox2 ve nanog.
- Bu genler PcG ile bağlantılı H3K27me3 ve H3K4me3 belirteçlerine sahiptir. Bu duruma bivalent durum denmektedir.
- Bivalent durumdaki bir gen, tamamen aktif ya da tamamen inaktif duruma geçmek için hazırdır.
- Differentiation (farklılaşma), ise bivalent durumdaki genlerin aktivasyonu ve deaktivasyonu ile gerçekleşmektedir.

# EPİGENETİK İDAME (HÜCRESEL HAFIZA)

- Birçok gen, bir süre için baskı edilmesi ve daha sonra aktive edilmesi gerekir.
- Bu genler PcG proteinlerinin seviyesine bağlı siklus olarak açılır veya kapatılır.
- Bazı genler hem PcG komplekslerine hem de RNA pol II bağlanmasıyla, hem H3K27me3 baskılayıcı işareti hem de promotorda H3K4me3 işaretine sahiptir.
- PcG mekanizması son derece dinamiktir ve kalıcı baskılama oluşturmaz.



# FARKLILAŞMA

- PcG proteinlerinin Embriyonik kök hücrelerde(ES) artışı ve farklılaşma yolaklarını kontrol eden çoklu hedef genlere bağlanması PcG baskılamasının pluripotent durumunun sürdürülmesi için önemli olabileceğini göstermektedir. Şaşırtıcı PRC2 fonksiyonu eksik olan ES hücrelerini çoğaltmak mümkün olmuştur. Bu hücrelerde çoğu PcG hedef genlerinin ifadeleri artmış fakat hücreler daha az stabil olmalarına karşın pluripotensliklerini sürdürmüştür.
- Peki bu hücrelerin doğru bir şekilde farklılaşma yeteneklerindeki kusur nedir? Şayet farklılaşma indüklenirse pluripotency genleri ve diğer farklılaşma yolakları için spesifik olan genler uygun şekilde kapanmaz, uygun farklılaşma genleri de doğru şekilde aktive olmaz ve farklılaşma başarısız olur.
- PcG kompleksleri, siklin bağlı kinazların önemli inhibitörleri olan Ink4A ve B'yi düzenler. Normal epidermal farklılaşmada, henüz tam olarak aydınlatılmamış bir mekanizma boyunca PRC2 elemanlarının ifadesi kademeli şekilde düşmesi, Ink4A/B nin yeniden baskılanmasına ve nihayetinde epidermal farklılaşma programını başlatan hücre döngüsünden çıkmasına neden olur.

## Özetle;

- Genomda PcG bağlanma bölgeleri hepsinde aynı değildir. H3K27 trimetilizasyonun da bağlanmanın derecesi, yapısı, derecesi, dağılımı ve proteinlerin nispi miktarları, özellikle PRC1 ve PRC2 arasındaki ilişki, bir bölgeden diğer bölgeye göre büyük farklılık gösterebilir.
- Bazı durumlarda PcG kompleksleri, bazı non-coding RNA'lar tarafından PRE'ye getirilmektedir.
- Non-coding RNA'ların PcG kompleksinde PRE toplamasının bilinen en iyi örneği memelilerde X inaktivasyonudur.

Farklı tipteki kromatinlerin birbirlerine yakınlığı gen ekspresyon seviyelerini pozitif ya da negatif olarak etkilemektedir. Dahası kromozomların yapısındaki değişiklikler, DNAnın işlenmesini, bazı spesifik kromatin faktörlerinin delokalizasyonu ile değiştirebilir.

- ✓ Position Effect Variegation; PEV
- ✓ Chromosomal Position Effect; CPE
- ✓ Telomeric Position Effect; TPE

# CPE ve TPE, Model Organizmalardan Çıkarılan Dersler

- CPE ilk kez sineklerde keşfedilmiştir. X-ray ile uyarılmış kromozomal değişikliklerle ökromatik genlere heterokromatik bölgeler veya ökromatik bölgeler heterokromatinlere yerleştiği gözlemlenmiştir.
- 1920'lerde; Alfred Sturtevant tarafından **Bar lokusunun duplikasyonu** ile oluşan fenotipik değişiklik keşfedilmiştir.
- Normal dişi sineklerde her X kromozomunda 2 kopya bulunan bu Bar lokusu, Bar mutant dişilerde 4 kopya olarak gözlenmiş ve bu da sineğin göz fenotipine yansımıştır. Bu değişikliklerin Bar geni ekspresyonunu etkilediğinin de gören Sturtevant; bu olayı «**position effect**» olarak isimlendirmiştir.

# CPE ve TPE, Model Organizmalardan Çıkarılan Dersler

- Hemen sonrasında ise Muller; her bir gözde beyaz (mutant) ve kırmızı (yabani) bölgeler olduğunu ve bunların X kromozomunda meydana gelen bir inversiyonla alaca/benekli fenotip ortaya çıktığını keşfetmiştir. Bu olaya ise «**position effect variegation**» adını vermiştir.

# CPE ve TPE, Model Organizmalardan Çıkarılan Dersler

- Telomerlerin çoğu, *Saccharomyces cerevisiae*'dan insana kadar, komşu genleri susturma özelliğine sahiptir. «**Telomeric position effect**» (TPE) ilk kez mayalarda keşfedilmiştir.
- Mayalara telomerik tekrarların sonrasına oksotrofik (mutasyon) bir marker olan URA3 içeren construct verilmiştir. URA3 ekspresyonu urasil içermeyen platelerde hücrelerin büyümesini sağlar. Bu aktarım sonrası hücreler çoğalmamıştır. Bu olay telomerlerin URA3'ü susturduğunu göstermektedir.

# Kromatin Alanlarının Sınırlarının Ayarlanması

- Aktif ve inaktif kromatin bölgeleri sıklıkla yan yanadır fakat bunların kendi özellikleri bazı özellemiş elemanlar tarafından belirlenerek ayrılır.
- Geçen süreçte bir çok izolator eleman tanımlanmış olsa da şu an için bunlar 2 ana başlıkta toplanabilir.
  1. Enhancer-blocking insulators
  2. Barrier insulators

"İzolator elemanları" olarak adlandırılan DNA dizilimleri, spesifik faktörleri hassas bir yere yerleştirir ve kromatin bölgeleri arasındaki sıkı sınırları tanımlar. İki tip izolator elemanı mevcuttur

- boundary elements

Telomerler yakınlarındaki genlerin mekanizmalarını Telomeric Position Effect denilen mekanizma ile susturabilirler. Bu etki heterokromatin ve kromatin modifikasyonlarının telomerden subtelomere yayılması yoluyla olur

ANCAK; **STAR** (Subtelomeric Antisilencing Regions) denilen elemanlar subtelomerlere bazı bağlanma bölgeleri içerirler ve bu yolla TPE'yi engellerler. YİNE DE; X ve Y' subtelomerik tekrarlarındaki bazı elemanlar STAR'ın koruyucu etkisini by-pass ederek TPE'in yayılmasını ve devamını sağlayabilir.



## İnsan Patolojilerinde CPE

CPE; insanda hastalıklara çeşitli mekanizmalar yoluyla sebep olur.

- ❑ Transkripsiyon birimlerinin hassas düzenleyici elemanlardan ayrılması
- ❑ Bir genin başka bir genin enhancer bölgesiyle yakın/yan yana olması
- ❑ Benzer düzenleyici elemanların yarışması
- ❑ Bir genin yeni bir kromatin çevresine hareketindeki klasik PEV

Bu ve benzeri mekanizmalar sebebiyle CPE-ilişkili hastalıklar, insanda kanserden yapısal hastalıklara kadar birçok patolojik durumda görülebilmektedir.