

EPIGENETİK

Hafta 4: Epigenetik teknoloji

Dr Öğr Üyesi Arzu ATALAY

DNA metilasyon analizi yöntemleri

(A) Bisüfit ile çevrilen DNA PCR ile çoğaltılır, klonlanır ve sekanslanır. Primerler metilasyon olmayan bölgelere spesifiktir

(B) COBRA. Combined bisülphide restriction analysis. Bisüfid çevrilmiş PCR ürünü restriksiyon endonükleaz ile kesilir

Bisüfit aracılı DNA çevriminde unmetile C hızlı bir şekilde U'e çevrilirken metile C daha yavaş çevrilmektedir

DNA metilasyon analizi yöntemleri

(C) MSP. Methylation Specific PCR. Primer metilasyon bölgelerine spesifiktir, optimizasyon önemli bir basamaktır

(D) Real-time MSP. Metile ve metile olmayan bölgeler eş zamanlı PCR ile kantite edilebilir

(E) Bisülfid muamele edilmiş PCR ürününün pirosekanslanması. Örnekteki C/T polimorfizmleri her bölgedeki serbest bırakılan fosfatın ölçümü ile belirlenir

(F) Mass array. Bisülfid çevrilmiş PCR ürününe eklenen T7 bölgesi ile PCR ürünü in vitro transcribe edilir ve sonrasında MALDI-TOF analizi yapılır

Büyük ölçekte DNA metilasyon profillerinin analizi için kullanılan yöntemler

GENOM BOYUNCA DNA METİLASYONU PROFİLLEME YAKLAŞIMLARI

METİLASYONA HASSAS ENDONÜKLEAZ TEMELLİ YÖNTEMLER	SODYUM BİSÜLFİT MUAMELESİ TEMELLİ YÖNTEMLER	BİYOLOJİK AFİNİTE TEMELLİ YÖNTEMLER
RLGS (Restriction landmark genomic scanning)	MALDI-TOF MS	MEDIP (Methylated DNA immunoprecipitation)
MRSF (Methylation sensitive fingerprinting)	Bisulfite sequencing (targeted and genomewide)	MAC (MBD-affinity column)
MS-RDA (Methylation sensitive representational difference analysis)	Golden gate and Infinium assays	MIRA (Methylated-CpG island recovery assay)
MCAM (Methylated CpG island amplification coupled to microarray)	Pyrosequencing	
HELP assay		
MSDK (Methylation specific digital karyotyping)		
McrBC-based methods		

RLGS ilk olarak imprinting genlerinin tanımlanması için kullanılmıştır. Genomic DNA önce unmetile CG tanıyan NotI ile kesilir, ardından EcoRV ile kesilir ve 1D jel yapılır. İn-gel olarak HinfI ile kesilir ve 2D elektroforez gerçekleştirilir. Çok güvenilir sonuçlar vermekle birlikte, zor bir tekniktir.

MSRF tekniğinde DNA önce CpG adacıklarını tanıyan bir “rare cutter” RE ile kesilir. Bu örnek ikiye ayrılır, metillenmiş dizilerin dirençli olduğu bir enzim ile bir aliquot kesilir. Radioaktif dNTP kullanılarak PCR yapılır ve hedef gen belirlenir.

Metilasyona hassas RE temelli metillenmemiş genomik bölge tanımlanması için MCAM kullanılır. Normal ve hastalıklı dokular karşılaştırılabilir. Öncemetilasyon spesifik enzimle kesilir, ardından sticky end oluşturacak enzimle kesilir ve adaptörler yapıştırılır

SAGE temelli olan MSDK tekniğinde önce metilasyona hassas AscI enzimi ile kesim yapılır. Güvenilir ancak zaman alan bir tekniktir

Orta-büyük ölçekli metilasyon analizleri için “sequenom” tekniği kullanılabilir. T7 bölgesi eklenir. CT-CA arasında 16 Da mass farklılığı olmasına dayanır. Illumina golden gate teknolojisi ile 14000 gendeki 25000 CpG bölgesi analiz edilebilmektedir

MeDIP : Metil sitozin spesifik antikor kullanılır. İzole edilen DNA fragmentleri deproteinize edilir. Antikorum kalitesi teknikteki önemli bir noktadır.

MAC= Metil CpG binding domain affinity column. MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MecP2, ortak MBD (metil CpG binding domain) taşıyan nükleer proteinlerdir, herbiri metillenmiş DNAYA bağlanabilir.

MIRA: MBD2b/MBD3L1 metillenmiş DNA için en yüksek afiniteye sahiptir

Histone H3 lizin 9 Metilasyonu: Heterokromatin düzenlenmesinde ve tümörigenezdeki rolü

- Nükleozom: 146-147 bp DNA+ histon octamer (H2A, H2B, H3, H4)
H3-H4'ün N-terminal uçları son derece dinamiktir ve epigenetik değişimlere (HİSTON KOD) maruz kalırlar.
- Heterokromatin sıkı, transkripsiyon sessiz, hücre siklusu fazları boyunca stabil
- Eukromatin gevşek
- Heterokromatin H3K9me3 kodu ile başlatılır ve idame ettirilir

Heterokromatin çeşitleri

- Konstitütif heterokromatin:

Yoğun tekrarlayan DNA dizileri, satellit diziler, telomer, pericentric noktalar, sentromerler

-Fakültatif heterokromatin:

Gelişimsel olarak regüle edilen bölgeler, rRNA genleri, alınan sinyale göre ifade değişim gösterir. Allelic exclusion, genomik imprinting, X-inactivation

-Ara veya geçici heterokromatin

H3 Lysine 9 and/or trimetilasyonu heterokromatin oluşumunu sağlar, gen ifadesi baskılanır ve genom stabilitesi idame eder.

H3 Lysine 4, 36 ve 79 trimetillenmesi ökromatin oluşumunu indükler ve genler aktif olur.

- Histon H3 üzerindeki posttranslasyonel modifikasyonlar değişik kromatin yapıları oluşumu için kritiktir. N terminal lizinleri 4, 9, 27, 36, 79 metiltransferaz ve demetilazlarla modifiye edilir, mono, di, tri formlar oluşur. Metilasyonla beraber asetilasyonlar da yer alır.

-H3K9 metilaz ve demetilazlar için önemli rezidulardan birisidir. SUV39h1/h2, SETDB, RIZ1, Ash1 gibi metilazlar ve JMJD1a/b, JMJD2a/b/c/d, Mdig gibi demetilazların hedefidir. LSD1 yeni tanımlanan bir H3K4 demetilazıdır, ancak son veriler androjen reseptör ile kompleks oluşturduğunda H3K9me2/me3 üzerinde demtilaz olarak çalışarak gen ifadesini aktive eder.

-Rb ve E2F hedef genleri düzenleyerek hücre siklusunu geciktirir.

-Transkripsiyonel repressörleri değişik dokularda spesifik aktif genlere yönlendirir. Repressor Element 1 Silencing Transcription Factor (REST) ve CoREST; HDAC, demtilazlar, LSD1, Rbp+ gibi proteinler içeren komplekslerdir. H3K9me3 aynı zamanda Ago proteini ile etkileşime girerek RNAi düzenliğini aktive ederek miRNA ile indüklenen kromatin sessizleşmesi gerçekleşir.

Antiapoptotik genlerin regülasyonu (survivin, CDC2, CDC25c)

Bazı kanserlerde H3K9me3'un azaldığı gözlenmektedir. H3K9 metiltransferaz azlığı veya demetilaz ekspresyonunun artışı sonucu gerçekleşir.

Hison metilasyonu DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve DNA tamiri için kritiktir.

Akciğer kanserinde Mdig demetilazın artışı gözlenmiştir.

Kromatin modifikasyonları çekirdeğin fiziksel organizasyonu ve genomik özelliklerinin belirlenmesini sağlar

ChIP

**Chromosome Immune
Precipitation**

ChIP-Chip
ChIP-SAGE
ChIP-Seq

3C

**Chromosome conformation
Capture**

3 boyutlu katlanma ve
ilmeklenme yapıları analiz
edilir.

DİFERENSİASYON SÜRECİNDE EPİGENOM:

ES hücrelerinde H3K4 ve H3K27 trimetilasyonu anlaşılmaya çalışılmaktadır.

CpG adacıklarının metilasyon statüleri de önemlidir. Yüksek ve düşük CpG yoğunluklu genler tanımlanmıştır.

Kök hücre farklılaşmasındaki rolüne ek olarak histon modifikasyonları hematopoietik hücrelerin farklılaşmasında da önemlidir.

KANSER SÜRECİNDE EPİGENOM:

Somatik hücrelerin neoplastik hücrelere değişimini incelemek için ChIP tekniği kullanılmaktadır. ALL ile AML arasında 190 genin farklı H3K9 asetilasyonu ve 1300 genin farklı ifadesi gözlenmiştir.

GENOMUN FİZİKSEL ORGANİZASYONU:

Kromozomlar çok sıkı paketlenmiş ve nükleus içinde yerleşmişlerdir. Bu yerleşim gen regülasyonu, kromozom segregasyonu ve genom sabitliği ve diğer kromozom davranışlarında önemlidir. Heterokromatin genelde nükleus periferinde yer alırken, eukromatin iç tarafta yer alır ve kromatin hubları ve transkripsiyon düzenekleri ile ilişkili olur.

Epigenomik alanı için FISH, Immuno-FISH ve 3C gibi tekniklerle kromozomların yerleşim ve etkileşimleri anlaşılmasına çalışılmaktadır. 3 boyutlu topolojinin genom üzerine etkileri bu sayede anlaşılacaktır

EPİGENETİK DATA ELDESİ VE ANALİZİ:

- ChIP-on-Chip tekniği
- ChIP-on-Chip data işlenmesi:
ENCODE projesi, BioConductor
- ChIP-Seq metodolojisi
Illumina genom analizi
- ChIP-Seq analizi (küçük fragment, illumina okuması) için kullanılan algoritmalara örnekler (Bowtie, BWA, Maq, Mosaic, Novoalign, SOAP2, ZOOM...)

CpG adacıkları:

Memeli genomunda CpG adacıkları 300-3000 bç uzunluktadır. Promotorların %40'ında bulunurlar. %80'inin metillendiği tahmin edilmektedir. Pek çok algoritma ile metilasyon profileri tanımlanmaya çalışılmaktadır (Tahmini ve gözlenen metilasyon oranları, GC çifti uzunluğu vb..)