

EPIGENETİK

Hafta 5: Epigenetik çalışmalarda kullanılan model organizmalar I

Ökaryot mikroorganizmaların epigenetiği, Drosophila
epigenetiği

Dr Öğr Üyesi Arzu ATALAY

- *Ökaryotik mo.lar* ökaryotik çeşitliliğin büyük kısmını oluşturur
- Bazıları yıllardan beri laboratuvarlarda kullanılsa da biyolojileri ile ilgili bilinenler hayvan ve bitkilerden daha azdır
- Bu bölümde ökaryotik mo.ların epigenetiği değil bu model organizmaların özellikle filamentöz fungusların (*Schizosaccharomyces pombe* ve *Neurospora crassa*) epigenetik mekanizmalarının anlaşılmasında ne gibi katkılar sağladığı tartışılmıştır

- Susturma fenomeni:
 - transkripsiyonel gene susturma (TGS:hedef gen transkriptinin oluşmadığı),
 - posttranskripsiyonel gen susturma (PTGS:transkriptin oluştuğu ancak translasyon öncesi spesifik olarak parçalandığı),
- PTGS, hayvanlarda “RNA interference” bitkilerde “co-suppression” olarak bilinir
- PTGS ve TGS fungus ve tek hücreli canlılarda da (protista) görülür

Post-transkripsiyonel gen susturma

- Filogenetik çalışmalar PTGS'nin tüm ökaryotlarda olduğunu göstermiştir
- PTGS nin bulunmadığı bazı organizmalar bu mekanizmanın hayati olmadığını göstermiştir
- İlk ökaryotik canlılarda PTGS hem siRNA ve ilişkili moleküllerle mRNA yı parçalar hem de histonları modifiye ederek TGS'ye sebep olabilir . Ökaryotlarda bu iki mekanizma günümüze kadar çok iyi korunmuştur
- RNAi, PTGS ve TGS mekanizmalarının anlaşılmasında *Caenorhabditis elegans* *N. crassa*, *N. crassa* önemli rolleri olmuştur

Quelling in *N. crassa*

- Baskılama “quelling” funguslarda keşfedilen reversibl homoloji bağımlı gen susturma işlemidir.
- *N. crassa* karotenoid biyosentezinde rol alan *al-1* geninin homolog *al-1* gen transformasyonuyla susturulabildiğini göstermişlerdir
- DNA-DNA eşleşme mekanizmasından ziyade transferde rol alan “Diffüzible” moleküllere bağlıdır
- Bu susturma “wild-type” turuncudan açık sarı hatta beyaza kadar tüm transjenik serilerde kolayca saptanabilir ki beyaz olanı *al-1 null* mutant serilerdir.

Quelling in *N. crassa*

- “RNA-dependent RNA polymerase” (RdRP) gibi RNA komponentlerinin PTGS ve RNAi için gerekli olduğu ve susturma mekanizmalarının evrimsel olarak korunduğu gösterilmiştir.

***N. crassa* 'da mayotik susturma**

- *N. crassa* baskılama “quelling” yanı sıra mayozda aktif şekilde ikinci PTGS mekanizmasını gerçekleştirir
- “*mayotik transvection*” (*allellerin eşleşmesine bağlı düzenleme*) tüm homolog genleri susturmak için eşleşmemiş DNA'yı oluşturur.

Diğer filamentöz funguslarda PTGS

- Filamentöz fungusların çoğu Dicer gibi homoloji temelli susturma mekanizmaları olan tipik RNA susturma proteinlerini içerir.

Silencing *S. pombe*, when PTGS meets TGS

- *S. pombe* geniş heterokromatin bölge (perisentrik, subtelomerik bölge, rDNA, sessiz eşleşen-tip loküsleri) heterokromatin model çalışmak için en uygun mayadır.
- Ökromatin yapı aksine bu bölgeler Swi6 (*S. pombe* HP1 homolog), Clr4 (the *S. Pombe* homolog of Su(var)39 histone methyltransferase), ve hipoasetillenmiş H3K9me den zengindir.
- Heterokromatin yapıdaki RNAi yolları iyi anlaşılmış olsa da metilasyon, deasetilasyon gibi histon düzenleyici aktivitelerin ilk basamakta nasıl rol aldığı anlaşılamamıştır bu konunun aydınlatılması tüm genomun heterokromatin ökromatin olarak bölünmesini anlamamıza yarayacaktır.

Protistlerde PTGS

- PTGS yolakları silli hücrelerde çok çalışılmıştır
- Tek hücreli canlılardaki gen susturulması kazanımı
 - dsRNA (23–24-nt siRNA) üretimine yol açan ve sonrasında homolog mRNA parçalanmasına sebep olan 3' UTRsiz transgenlerin somatik çekirdek transformasyonu
 - dsRNA'nın direk enjeksiyonu
 - Hatta ciliate homologous dsRNA eksprese eden bakterinin oral alımı

Transkripsiyonel gen susturulması

- Kromatin ve kromatin bazlı gen düzenlenmesi pek çok ökaryotta mevcuttur
- TGS antijen değişkenliği, eşleşme tipi dönüşümü, transpozonlara karşı korunma ve belki gelişim gibi gen ekspresyonunu düzenler
- PTGS mekanizmalarının aydınlatılmasında olduğu gibi TGS de de mantarların katkısı olmuştur.

- *S. cerevisiae*'daki TGS
 - eşleşme tipi kasetler, telomerin bulunduğu genlerin ifade çeşitliliği ve rDNA tekrarlarındaki rekombinasyonu düzenler
- *S. cerevisiae* diğer ökaryotlarda bulunan ve heterokromatin paketlenmesinde rol alan HP1 proteini içermez

Metilasyonla düzenleme

- DNA methylation sitozin rezidülerine sınırlıdır ve gen ekspresyonunda çok etkilidir
- Gen transkripsiyonunda anahtar gibi on-off geri dönüşümü bulunur
- Gen ekspresyon düzenleyicisi olarak metilasyon özellikle *A. Immersus'ta çok çalışılmıştır*
- *A. Immersus'da, promotor bölgenin metilasyonu transkripsiyonun başlamasını önlemez ancak duplike gendeki metilasyon her iki kopyanın da transkripsiyonunu önler.*
- Henüz bu farkın nedeni açıklanamadı.
- MIP genomik hedefin kromatin yapısını değiştirebilir

- Metilasyon dağınık DNA tekrarlarının rekombinasyonunu önleyerek genomik bütünlüğü sağladığı düşünölmektedir.
- Masc1 protein MIP işlevinde gerekli olduğu gibi cinsiyet gelişiminde de önemli rol oynar

***N. crassa* 'da tekrar dizi ile indüklenen nokta mutasyon**

- *N. crassa*, baskılama ve mayotik susturma yanı sıra TGS ilişkili mekanizma RIP'e de sahiptir.
- Premayotik susturma işlevi MIP gibi bölünmenin dikaryotik fazında yer alır
- *N. crassa* genomu unmetiledir, RIP tekrarları çoğunlukla metiledir hatta bu AT'den zengin bölgeler DNA metilasyonunu pozitif yönde uyarır.
- DNA metilasyonu transkripsiyon bloğu için tek başına yeterli değildir kromatin remodelingle ilişkili diğer faktörler RIPed bölgesini sessiz heterokromatine dönüştürebilir

***N. crassa* 'da tekrar dizi ile indüklenen nokta mutasyon**

- *N. crassa genomunda RIP mayoz öncesi mutasyona uğrar ve bu irreversibldır Reversibilite MIPın da yer aldığı epigenetik mekanizmaların çoğunda görülür.*
- *Vejetatif hayatta 2 önemli epigenetik modifikasyon DNA ve H3K9 metilasyonu RIPed allellerinin susturma işlevini sürdürür.*

Sonuç

- Halen tam netleşmese de gen susturma sürecinde elde edilen veriler çoğu ökaryot organizmaların hayvan ve bitkilerdeki gibi PTGS ve TGS yollarını kullandığını göstermektedir. *S. cerevisiae* da HP1, dinoflagellatelerde gerçek kromatin yokluğu gibi farklılıklar görülebilmektedir. Gen susturma gen ekspresyonunun klonal düzenlenmesi, genom savunması (RIP-MIP), genom yapılandırması gibi birbirinden bağımsız fizyolojik görevleri mevcuttur. Bu modellerin ve mekanizmaların daha ayrıntılı ortaya konulması beklenmektedir.

Drosophila Epigenetiği

- Heterokromatinin özellikleri
 - Heterokromatin hücre siklusunun interfaz süresince yüksekçe kondanse kromatin fraksiyonudur gen aktivitesi respresedir.
 - Y kromozomu somatik dokularda heterokromatin
 - Heterokromatin geç S fazında replike olur mayotik rekombinasyona izin vermez
 - **Constitutive heterokromatin** -Yoğun tekrarlayan DNA dizileri, satellit diziler, telomer, pericentric noktalar, sentromerler
Kromatinin kondanse asla eksprese edilmeyen bölgelerini tanımlamada kullanılır
Drophosillada sentromerlerde...
 - **Facultative hetrochromatin** -Gelişimsel olarak regüle edilen bölgeler, rRNA genleri, alınan sinyale göre ifade değişim gösterir.
Allelic exclusion, genomik imprinting, X-inactivation

Heterokromatin oluşumu

- Normalde bu genler heterokromatin çevreden kesip çıkarıldığında veya bir ökromatik bölgeye cross over ile tekrar relokale edildiğinde wild tip ekspresyonu korunur.
- Kısacası bu genler değişmez.
- Bir variegation rearrangement taşıyan Dişilere bir Y kromozomu şeklinde heterokromatin ilavesi veya erkeklere ekstra Y kromozom ilavesi mutant sektörlerin boyut ve varlığını azaltmış veya suprese etmiştir.
- Heterokromatinin delesyonu örneğin;erkeklerin genomundan Y kromozomunun çıkarılmasıyla karşıt bir etki meydana gelir.
- **Supresor of Variegation (Su-V) locusu** variegationun oluşumuna katkıda bulunan gen
- **Dosaj bağımlı cevap:** modifier locusların(ör:Su(var)mutant alleli için heterozigot) wild tip allelinin bir dozu variegationu azaltırken 3 dozu variegationu artırır.
- Bunun tersi fonksiyon kayıp mutasyonları tarafından identifiye edilmiş genler için doğrudur.
- **Position effect modifierleri** Heterokromatin formasyonun başlaması için gerekli olan nucleosomal histonların covalent modifikasyonlarını sağlamak için fonksiyon görür veya heterokromatinin yapısal protein öğelerini kodlar.

Histon modifying enzimes=Su (var) genlerinin ürünleridir

Su (var)3-9—bir histon H3 metiltransferazı kodlar (H3K9me2 and H3K9me3),Dimetile form constitive heterokromatinde majör olarak bulunmaktadır.

Su (var)3-9 protein Su (var)3-26 tarafından kodlanan histon deasetilaz HDAC1/Rpd3 ile ilişkilidir

Suv4-20-- Bir diğer histon metiltransferazı kodlar (H4K20me2) (H3K20me3) HP1'in (heterokromatinde yoğun olarak bulunur) varlığına bağımlıdır

Pr-Set7 bir histone methyl transferase kodlar (H4K20me).

PR-Set7 mutantları variegationu suprese eder.

Su(var)3-3 bir amin oksidazı kodlar (H3K4me and H3K4me2)

Heterokromatin oluşumu

Heterochromatin formasyonu HDAC1/RPD3 tarafından H3K9 un deasetilasyonu ile takip edilen SU(VAR)3-3 LSD1 demethylase tarafından **H3K4me2 un demetilasyonu** ile başlatılır.

Bu modifikasyonlar SU(VAR)3-9 methyl transferase tarafından H3K9 un di ve tri metilasyon için temeldir

HP1a sinek proteomunun 2 hibrit temelli protein etkileşim haritasındaki birkaç proteinle etkileşimdedir. Bu proteinlerin 4 ü HP1 ile aynı genomik bölgeye bağlanır. HP4, 5, ve 6 mutant alleleleri variegationun dominant supresorleri olarak hareket eder.

HP1a ayrıca histon H4K20 yi di- and trimethylate etmek için Suv4-20 histone methyl transferase zenginleştirir. Oda DDP1 proteini ile etkileşebilir. HP1a daki bir ikinci domain kromoshadowdur.

HP2; Nucleosome Remodeling Factor **NURF** ve the histone chaperone **Nap-1** ile birlikte immunopresitipite olur bu kromatin remodelling faktörler heterokromatin formasyonunda bulunmaktadır.

Telomeric Heterochromatin

- Drosophila telomerleri bir protein kompleks tarafından başlıklanmış spesifik retrotranspozonların bir dizisi tarafından takip edilen tekrarlanan bir sekans bir bölgesi içerir.
- HP1 bu başlığın integral parçasıdır ve onu direkt olarak DNA'ya bağlar
- Telomerler onların domainine sokulmuş ökaryotik genlerin position effect variegationunu üretebilir.

Intercalary Heterochromatin

- Intercalary heterochromatin kromozomun ökromatik kollarına serpiştirilmiş belirgin bölgelerdir.
- Sentromerik heterochromatinle veya herbiri diğeri ile ilişkili bölgeler olarak tanımlanmış intra veya interkromozomal etkileşimle şekillenen bu bölgeler sentromerik heterochromatinle özelliklerinin bir kısmını paylaşır (geç replikasyon, politenik kromozomlardaki under replikasyon, radyasyonun uyardığı kromozom kırılması ve bazı histon modifikasyon ve faktörleri.

HP1a and SU(VAR)3-9 repetitive sequences are found in heterochromatic regions

HP1a is found in polycomb target sites

DNA replication, chromosome segregation and cell cycle components are regulated by genes in the larval HP1 target sites positively and negatively.

HP1c shows a distribution pattern in heterochromatic regions as a functional relationship with a few transcription factors and as "co-localization spots" as named for the majority of genomic regions where co-activators or co-repressors are found together.

These spots are found in active transcription regions and are enriched by RNAPII and histone variant H3.3.

Regulation of gene expression developmental regulation by polycomb and trithorax proteins

- Spesifik HOX genlerinin embriyonun belirli bölgelerinde aktive edilmiş olmalı ve aktive kalmalıyken diğerleri sürekli olarak repress durumda olmalıdır.
- Bundan ise antagonist fonksiyonlara sahip 2 grup protein sorumludur
- Gruplar
- 1-Polycomb grup (PcG)
- 2-Trithorax grup (trxG)
- PcG ve trxG genleri gelişim süresince diğer birçok genin ekspresyonunu regüle eder.

- PcG gen ürünleri multi-protein komplekslerin 3 farklı tipini oluşturur.
- **1-The Polycomb Represif Complex 2 (PRC2):** histon metil transferaz EZ, ESC, SUZ12, ve nucleosome remodelling factor p55 (Nurf-55), polycomb like(PLC) protein
- **2-PCR 1 kompleks:** PC,PH, PSC, ve SCE/dRing, ve dahi TBP associated factor
- **3-PHORC kompleks:** bir DNA bağlayan sekansa sahip SFMBT ve PHO adlı 2 protein

trxG Regulatuar Proteinler

- TRX GENLERİ PcG genlerine göre daha az volüme sahiptir. HOX genlerinin tamamı erken embriyo döneminde aktive olmuştur segment diferansiyonu süresince aktive kalmalıdır işte bu HOX GENLERİ trx grup üyelerinin gen ürünleri tarafından hedeflenmiştir ki PcG kompleksleri tarafından HOX genlerinin hatalı susturulmasını engeller. PREs in non coding bölgesi yoluyla olan transkripsiyon PcG aracılıklı susturmanın bir başarısızlığı ile de koreledir.
- Trx proteinlerinin ikisi histon metil transferazlardır:trx (H3K4 spesifik, küçük) veya homeotic discs (ash 1) dir. larval politen kromozomlar üzerinde H3K4'ün dramatik metilasyon kaybına yol açan ASH 1 in kaybı onun temel H3K4 Metil transferaz olduğunu göstermiştir.
- Trx proteini TAC 1 kompleksinde bulunmaktadır ve bu histon asetil transferaz CBP VE SBF1 içermektedir. TAC 1 HOX gene Ubx's ekspresyonunu düzenlemektedir.
- trxG proteinleri ve onların kompleksleri TREs olarak adlandırılan spesifik DNA sekanslarını bağlar. PREs ve TREs bazen MEs olarak da adlandırılır.

Trx HOX genlerinin aktif durumunu devam ettirebilmesi için Hsp90 a ihtiyaç duyar.

Şaperonlar bilindiği üzere proteinlerin katlanmasında görev almaktadır. Enzimler gibi katıldıkları reaksiyondan değişmeden çıkarlar hatalı katlanan proteinler işlevlerini yitirmelerinin yanında ayrıca bu proteinler tehlikeli de olabilirler hücre ölümüne ve hastalıklara neden olabilirler. Örn.Alzheimer hastalığı...

Hsp90 birçok regülatuar yolda görev almaktadır. Bu proteinin kısmi fonksiyon kaybı morfolojik anormalliklere yol açar

TrxG proteinleri cohesin kompleks üyeleri ile de etkileşimdedirler. Cohesinler kardeş kromotidlerin birbiriyle sıkı olan ilişkisinin sürdürülmesini sağlar

THE MSL COMPLEX IS RESPONSIBLE FOR DOSAGE COMPENSATION

- Tek bir X kromozomuna ve tek doz X linked gene sahip erkekler arasındaki X linked gen ürünlerinin eşitlenmesine Dosage compensation denir. MSL Kompleks dosage compensationa aracılık eder
- MSL KOMPLEKS AŞAĞIDAKİ GENLERİN KODLADIĞI 5 PROTEİN SUBÜNİTİNİN BİR CORE'UNDAN MEYDANA GELMEKTEDİR.
- **MSL KOMPLEKS**
- 1-male-specific lethal 1, 2, and 3 (msl1, msl2, msl3),
- 2-males absent on the first(mof),
- 3-maleless(mle),
- 4-one of two non-coding RNAs [RNA on the X1 and 2(roX1and roX2)] Fig. 14.3B).
- bu kompleks erkek somatik hücrelerindeki çok sayıda bölge ile ilişkilidir. (dişilerde yok) (Fig. 14.3A).
- MSL kompleks erkeklerde 2 roXgene lokusunda bulunmaktadır sonrasında X kromozomu boyunca çok sayıdaki bölgeye dağılmaktadır.

- MSL kompleks mevcudiyeti [H4K16ac) in anlamlı bir artışı ile ilişkilidir.
- MSL Kompleksin fonksiyonu gen aktivitesinden ziyade dosage compensationa yol açan gen ekspresyon seviyelerindeki artış
- MSL kompleksi ATP-dependent DEXH-box RNA/DNA helicase (MLE) ihtiva eder
- Bu enzim çift zincirli RNA yı veya RNA/DNA hybrid substratları tercih eder.

HISTONE REPLACEMENT
HISTONE VARIANTS AND TRANSCRIPTION
H3.3 REPLACES H3 IN THE DOMAIN OF ACTIVELY TRANSCRIBED GENES

- H3.3 hücre siklusunun bütün fazlarında, H3 ise S fazı boyunca sentez edilir.
- H3.3 hücre siklusu süresince transkripsiyonel olarak aktif lokuslarda olan replication- independent (RI) nucleosome assembly processi kullanmaktadır.
- Dişilerde erkeklere göre hipertranskribe X kromozomu üzerinde daha çok bulunur.
- H4K16ac ün dağılımının aksine H3.3 transcribe genlerin 5' ucunda yoğunudur.
- ANT-C and BX-C complexleri histon düşük H3.3/H3 oranına sahiptir
- H3.3 belirgin pikleri regulatuar domainlerde, PREs ve promoterlarda... bulunmakta
- Regulatuar bölgelerin çoğu hypersensitive alanlar içerir ve H3.3 den yoğun olan bu alanlar nukleosom yıkım ve yenilenmesinin devamlı bir sürecine işaret eder. (Fig. 14.4).

CHROMATIN INSULATORS

İnsülatörler özgül proteinleri bağlayan kısa DNA dizileridir. Yeniden şekillenmenin komşu genlere yayılmasını önlemek için barikat görevi görür.

- BEAF insulator proteininin tükenmesi H3K9me3 ün dağılım ve düzeyinde önemli bir artışa neden olur ve onun bağlandığı alanlara komşu genlerin eşlik eden represyonuna yol açar
- BEAF H3K9 metilasyonunu bloklar böylece komşu genlerin transkripsiyonu korunur.

- Su(Hw) and Mod(mdg4) gibi İnsulator proteinler larva tükürük bezi politen kromozomlarında yüzlerce alanda bulunmaktadır. İnterfaz nukleusunda lokalizasyonları çok sınırlandırılmış sayıdadır. Nuklear yapının bu supriz boyutunu için açıklama sağlayan bu insulator özellik yığınlar oluşturma eğilimindeydi. (Fig. 14.5). Multiple gypsylike insulatorler nukleusta rozet benzeri yapılar oluşturmak için etkileşir
- İnsulator proteinler ve insulator sekanslar insulator boydler olarak adlandırılır nukleer matrixle ilişkilidir. The Topoisomerase I-interacting protein dTopors; hem a ubiquitin ligase, Su(Hw) ve Mod(mdg4) ile hemde nuklear matrixi güçlendiren takviye eden Lamin Dm0 ile etkileşir.
- İnsulator body hubları ile matrikse tutturulmuş DNA looplarının rosetlerindeki genomun çoğunun mimari organizasyonu gen regulasyonu için gerekli olabilir. (Fig. 14.6).
-

- DNA metilasyonunun drosophila'da olmadığı düşünülüyordu. İnsanlarda bulunan DNA metiltransferaz DNMT2'nin drosophila'da olduğu görülmüştür.
- İnsan DNMT2 DNA'yı metilemez drosophilla enzimi çok erken embriyonun DNA'sında sitozin nukleotidlerini metiler.
- dDNMT2 aktivitesinin kaybı subtelemorik DNA tekrarlarının kaybına yol açar