

EPIGENETİK

Hafta 5: Epigenetik çalışmalarda kullanılan model organizmalar II

Epigenetik kalıtımda fare modelleri,
Bitkilerde yer alan epigenetik düzenleyici mekanizmalar,
paramutasyon

Dr Öğr yesi Arzu ATALAY

İlk Maruziyetler Ve Yetişkin Hastalıkları

2.Dünya Savaşı sırasında,

Ağır savaşlar,

Demir yolları ve köprülerin tahribi

Almanların uyguladığı yiyecek ambargosu

Hollandalıların günde 1000 kaloriden daha az beslenmelerine sebep olmuştur.

Bu dönemdeki gebeliklerden sonra dünyaya gelen bebeklerde ve onların çocuklarında,

KKH, MEME CA, OBEZİTE, OBSTRİKTİF AKCİĞER HASTALIĞI, MICROALBÜMİNÜRİ görülme sıklığı artmış ve bu durum birkaç kuşak devam etmiştir.

1990'larda, David J.P. Barker 'ın "Hastalığın Gelişimsel Kökenleri" hipotezine örnek olarak bu durum verilir.

Bu hipotez; ilk gelişimsel maruziyetlerin, hayatın ilerleyen döneminde hastalıklara sebep olabileceğini savunur.

60 yıl boyunca kıtlığa maruz kalan Hollandalılarda adaptasyon mekanizması devreye girmiş ,birtakım epigenetik değişiklikler görülmüştür. DNA metilasyon seviyeleri, IGF2 lokusunun damgalanmasına ve bu hormon seviyesinin düşmesine sebep olmuştur.

Ne yazık ki, KKH ve obezite gibi patolojilere sebep olabilir.

- Hollanda Kıtılık Çalışması, erken çevresel maruziyetlerin, hayatın ilerleyen yıllarında kronik hastalıklara sebep olduğu
- Epigenetik noktaların kalıtımını etkilediği,
- Epigenetik profilin yapısını bozduğu teorisini desteklemektedir.
- İnsanda bu tür maruziyetleri deneysel olarak ele alma yetersizliği, memeli modellerine ihtiyacı ortaya çıkarmıştır.

- Memeli modelleri, araştırmacılara gebelik öncesinde-esnasında-sonrasında
- Annelik
- Kimyasal
- Beslenme
- Psikolojik durumu değiştirerek anne rahmindeki maruziyetleri taklit etme becerisi sunar.

- Gen bazlı İMPRİNTİNG,
- Epigenetik Regülasyon,
- Kalıtımın mekanik analizi, içinde memeli modellerini incelemek fayda sağlamıştır.

- Bitkilerde bu tür düzenlemeler olmasına rağmen gelişen embriyoda inceleme becerisi sınırlıdır.

Bu memeli modellerinde,

- Yarı kararlı epialleller,

A^{VY} , $Axin^{FU}$ ve $Cabp^{IAP}$

- CpG metilasyonu

bu maruziyetlerin etkileri için değerli biyoreseptörlerdir.

Genetik Imprinting Regülasyonları

Histon Modifikasyonları

Küçük RNA'lar gibi diğer epigenetik markerların metilasyon kurulumuna katkıda bulunurlar.

Yarı Kararlı Epialleller

Gelişimin erken safhalarında oluşturulan epigenetik modifikasyonlardan dolayı genetik olarak birbirine özdeş bireylerde, çeşitli yollarla ifade edilen özdeş allellerdir.

Epigenotip oluşumu randomizedir.

Geniş çaplı, değişken fenotiplerle ilişkilidir.

Bu allellere sahip fareler, yetişkin hastalıklarının gelişimsel kökenleri ve epigenetik markerların kalıtımı üzerine çalışmak için oldukça faydalıdır.

Randomize epigenotip kurulum mekanizmaları

1. Gametogenez esnasında, gen çapında yarı kararlı epiallellerde epigenetik markerlar, tam anlamıyla sıfırlanmaz.

-Tamamlanmamış sıfırlanma ve yeniden kurma somatik dokulardaki rezidüel epigenetik markerların mitotik kalıtımına, nesiller boyu epigenetik kalıtım yoluyla bir sonraki nesle aktarımına sebep olur.

2. Yarı kararlı epialleller; gelişim esnasında ve yaşamın ilerleyen safhalarında çevresel değişkenlere maruz kalabilirler.

Yarı kararlı epialleller, geri dönüştürülebilir elementlerin varlığıyla (Intrasisternal A parçacığı- IAP) yakından ilişkilidir.

IAP retropozonları;

- fare geninde oldukça yaygın,

- uzunluğu 7kb,

- fare geninin %3'ünü oluşturan Class II endojen retrovirüs içerirler.

- Uzun terminal tekrarlar (LTR) metilasyon durumu IAP ifadesini etkiler.

- LTRler, komşu IAP'lerin promotorlerini taşırlar.

- Birçok fare tümöründe, 5 LTR' deki, IAP hipometilasyonu görülmüştür.

DNA metyltransferaz1; metilasyondan sorumludur. İnaktivasyonunda preimplantoik embriyoda IAP LTR' lerin demetilasyonu görülür.

DNA metyhtransferaz 3b; hafif demetilasyona ve embriyonik ölüme sebep olur.

Birçok fare dokusunda, IAP RNA transkripsiyonları tanımlanmıştır. Bu RNA lar; DNA metiltransferazı etkilenmiş farelerde oldukça fazladır.

IAP Retrotranspozonların gen ifadesine etkileri

Retrotranspozon: DNA'da bulunan, protein kodlamayan, retrovirüsler tarafından oluşturulduğu düşünülen ve gendeki farklı lokasyonlara taşınabilen tuhaf yapılardır.

Araştırmacılar, retrotranspozonları epigenomun vahşi tarafı olarak adlandırmışlardır.

İnsanlarda 10 kat daha az IAP retropozon vardır.

Etkilerini daha iyi anlamak için Entegrasyon bölümlerini incelemek için global haritalama teknikleri kullanılır.

- ***The Agouti Viable Yellow (A^{VY}) Fare Modeli***

Agouti geni, farelerde sarı phaeomelanin pigmenti üretimini sağlar. Foliküler melanositleri üreten paracrin molekülünü kodlayan promotörü etkiler.

Transkripsiyon, Agouti (A) allellinin exon 2 deki döngü spesifik kıl promotöründen başlatılır. Bu olay yalnızca deride olur.

Faredeki kıl gelişimi esnasında, gende bulunan Transient A ifadesi, her bir siyah kılda subapikal sarı bant oluşumu ile sonuçlanır. Bu da vahşi fare türlerinin kahverengi (agouti) tüylere sahip olmasına sebep olur.

A^{vy} ilk olarak 1960'ların başında tanımlanmıştır, Agouti (A) geninin transkripsiyon başlangıç bölgesine IAP retropozonun insersiyonu ve upstream ilerlemesiyle oluşur.

A^{vy} IAP'nin proximal ucundaki kriptik promotör, yapısal ektopik agouti transkripsiyonunu oluşturur. Bu da farelerde, sarı tüylere, obeziteye ve karsinogeneze sebep olur. A^{vy} IAP'deli CpG metilasyonunu ektopik agouti ifadesiyle bağdaştır. Metilasyon seviyeleri, bireysel izogenik A^{vy} A farelerinde farklılıklar gösterir. Ten renginin sarıdan (anmetile) pseudoagouti'ye (metile) dönmesine sebep olur.

Ten rengine ilave olarak, A^{vy} A farelerinin hipotalamus da dahil tüm dokulardaki agouti bağlantısı melanokortin reseptörlerine kadar geniş sinyaller onları obeziteye ve kansere meyilli hale getirir.

A^{VY} Fare modeli, fenotiplerin tekrarı, epigenetik markerların nesiller boyu kalıtımı izah etmesi sebebiyle eşsiz bir biyoreseptör haline gelmiştir.

The Axin Fused (Axin^{Fu}) Fare Modeli

2002'de, monozigotik insan ikizi, kaudal duplikasyon sendromu için diskordans olduğu saptandı. İkizlerden biri sağlıklı iken, diğerinin distal omurga duplikasyonu ve bir tümörü vardı. Bu durumdan, insan Axin1 gen mutasyonu sorumlu tutuldu, yapılan araştırmalarda, mutasyon izine rastlanmadı.

2006 yılında, Oates ve arkadaşları, Axin1 promotör bölgesindeki metilasyonun, etkilenmiş ikizde fazla olduğunu keşfettiler. Bu da, aynı genetik yapıya sahip insanların fenotip değişikliğini sağlayan epigenetik mekanizmaların etkinliğini gösterdi.

Farelerdeki, Axin geninin vahşi tipi Axin proteini kodlar. Axin proteini Wnt sinyalini inhibe eder.

Axin geni, hem embriyolojik hem de yetişkin dönemde ifade edilir. Bu genin intron6 içinde bir IAP bulunur. IAP'nin intron6 insersiyonu sonucu tepesi kesik fakat biyolojik olarak aktif Axin transkripsiyonuna sebep olur. Bu da gelişim esnasında oluşan aksiyel dublikasyona ve kuyruğun kıvrık olmasına yol açar. Axin^{Fu} promotörünün 6 CpG bölgesinin metilasyonu, Axin^{Fu} ekspresyonu ve kuyruk kıvrım miktarıyla ters orantılıdır.

Axin^{Fu}, A^{vy} gibi gen metilasyonu ve fenotipi etkileyen gelişimsel faktörleri analiz etmek için güçlü bir araçtır.

Fare cdk5 aktivatör proteini (Cabp^{IAP}) YARI KARARLI EPİALLELİ

2004 yılında Druker ve ark. Farenin IAP, LTR lerinin homolog sekanslar için C57BL/6J c DNA database lerini araştırırken Cabp^{IAP} yi tanımladılar. Farenin intron 6 bölgesinde yeni bir sekans keşfettiler. Bu gen CDK5 kinaz inhibisyonu için sorumlu tutulan CDK5 aktivatör bağlantı proteinine (Cabp) sekans benzerliği gösterir.

Cabp 2. kromozomda bulunur, 14 Exon u vardır, 2kb lık transkript üretir.

Agouti, Axin genleri gibi karşıt yönlü IAP retrotranspozonuna sahiptir.

Cabp^{IAP} 5'LTR deki kriptik promotordan başlatılan 1.3 kb lık anormal transkrip ile ilgilidir.

- Bu ilişki aynı zamanda dünyaya gelen yavrularda farklı ifade edilir.
- A^{VY} , $Axin^{FU}$ gibi ifade çeşitliliği IAP nin 5' LTR sinde bulunan Citozin metilasyonu ile ters orantılıdır.
- A^{VY} , $Axin^{FU}$ nun tersine 5' LTR de hipometile fareler normal 5' promotörde başlayan birçok kısa Cabp transkrip üretirler fakat aniden sonlanırlar.
- IAP insersiyonu sonucu oluşan extra kısa bir transkript intron 6 da meydana gelir.
- Bu nedenle Cabp^{IAP} gen transkripsiyonunun hem upstream hem de downstream etkilerinin gösterildiği ilk yarı kararlı epialleldir.

- Konjenik A^{VY} , $Axin^{FU}$ fareleri içinde bulunan ikinci bir yarı kararlı epiallelin varlığı çevresel faktörlerin etkilerini ve epigenetik kalıtımın incelenmesine olanak sağlar.
- Gelecek araştırmalar $Cabp^{IAP}$ yarı kararlı epiallelin analizini hedeflemelidir.

- Cabp^{IAP} yarı kararlı epialleli, intron 6 daki karşıt downstream IAP 'na sahiptir. IAP nin 5' ucundaki promotore insersiyonu sonucu tepesi kesik Cabp transkripsiyonuna neden olur.
- IAP deki CG bölgeleri hipometile edildiğinde IAP insersiyonu sonucunda EXON 1 bölgesinden de tepesi kesik transkript üretimine neden olur.
- Kriptik promotorün IAP'sinin downstream ilerlemesiyle ve CpG bölgesinin metilasyonu sonucunda normal Cabp transkripsiyonu meydana gelir.

Yarıkararlı epiallellerde epigenetik belirteçlerin kalıtımı

- 1970 lerin sonlarında A^{VY} (TEN RENGİ) $Axin^{FU}$ (KUYRUK KIVRIMI) kalıtımını açıkladı. Bu gözlemler epigenetik modifikasyonların gametogenezis esnasında metilasyon izlerinin azalmasıyla kalıtsal olabileceği görüşünün ortaya koymaktadır.
- Fakat yapılan incelemeler epigenetik kalıtım için ekstra düzenleyici mekanizmaların varlığını göstermektedir.

- **A^{VY} FARELERİNDE EPİGENETİK KALITIM**
- Whitelaw ve ark.; akraba farelerin üremesi sonucu doğan farelerde embiryo transfer deneyleri yaparak, A^{VY} allelinin kalıtım örneklerinin İNKOMPLET epigenetik programlamaya bağlı olduğunu düşünmüşlerdir.
- Anne-babadan geçen markerlar arasında kalıtım açısından farklılıklar gözlemler;
 - A^{VY} Anneden geçiyorsa yavruların ardışık olarak sarı-pseudoagouti olması muhtemeldir.
 - Babadan geçiyorsa fenotipik kalıtımla sonuçlanmaz.
 - Bu durumun sebebi; erkekteki germline epigenetik izlerin tamamen, annedeki izlerinse kısmen silinmesiyle²⁴ oluştuğu varsayılmıştır.

- Blewitt bu durumu şöyle açıklamıştır;
- A^{VY} alleli babadan geliyorsa fertilizasyondan hemen sonra hızlı demetilasyona uğradığından fenotipik değişiklik oluşturmaz,
- Gen anneden geliyorsa; gen fertilizasyondan sonra ama implantasyondan (blastokist aşamasında) önce demetile olur, buda fenotipe yansır.
- Zigotla matür sperm karşılaştırıldığında zigotun daha demetile olduğu, bunun sebebinde babadan gelen gene karşı 'AKTİF DEMETİLASYON' sürecine bağlı olduğu düşünülmüştür

- Anneden gelen A^{VY} genindeki metilasyonun blastokist aşamasına ulaşana dek tamamen unmetile olması yukarıdaki kalıtım mekanizmasının sorgulanmasına neden oldu.
- A^{VY} allelinde metilasyonun kalıtsal bir marker olmayabilir mi??
- Whitelaw grubu memeli bir policomproteni kodlayan Mel 18 nakavt dan faydalandılar.
- Mel 18 verilen yavrularda da A^{VY} allelinin epigenetik kalıtımının oluştuğunu keşfettiler.
- Babadan gelen anormal epigenetik kalıtım, DNA metilasyonundan oluşan markerin heterozigot nakavt yavrusunda tam olarak silinmediği, fenotipik değişikliğe sebep olduğu gösterildi.

- Ayrıca olaylar zigotik gen aktivasyonundan ve babadan gelen DNA 'nın tam demetilasyonundan sonra oluşur. Buda A^{VY} allelinin kalıtımında –histon modifikasyonu – gibi başka bir kalıtsal marker rolünü desteklemektedir.

- **Axin^{FU} FARELERİNDE EPİGENETİK KALITIM**

- A^{VY} farelerinin aksine Axin^{FU} fareleri, epiallelleri hem anneden hem babadan geçişini ve fenotipin kalımını örneklemektedir.
- Axin^{FU} yetişkin sperminin metilasyon durumu, hayvanın somatik dokularıyla tutarlıdır. Bu tutarlılık, epigenetiğin yeniden programlanmasının gametogenezis esnasında bu lokusta oluşmadığını gösterir.
- Allelin gametogenezis esnasında demetilasyona karşı dirençli olduğu tahmin edilmektedir. Postferilizasyon döneminde epigenetik izlerin tam olarak silinmemiş olduğu düşünülmektedir.
- Metilasyon markerlerinin rastgele yeniden kurulması sonucunda bazı markerler sabit kalır, ebeveyn allel hafızası yavrudaki ebeveyn fenotipinin kalıtımını etkiler.

- **EPIGENETİK ÇALIŞMALARIN GELECEĞİ**
- Ortaya konan bulgular ; anneden gelen A^{VY} allelin epigenetik kalıtımda histon modifikasyonları gibi ilave markerlerin daha fazla araştırılması
- Aynı şekilde Axin^{FU} da daha geniş incelenmelidir.
- Bu modeller protein nakavtlarının etkilerinin ortaya koymak için mükemmel biyosensörlerdir.

- **ARAŐTIRMA ARAÇLARI OLARAK FARE MODELLERİ**

- Cabp, A^{VY}, Axin^{FU} fare modelleri epigenetik programlamada beslenmenin etkileri ve kimyasal faktörler üzerinde çalışmak için değerli araçlardır. Annenin beslenmesi aynı batındaki yavruların kuyruk kıvrım şiddetini, ten rengini, metilasyon değişikliklerini etkiler. Persistant epigenetik adaptasyonlar daha somut bir şekilde ele alınabilmektedir ve gelişimsel plastisite hastalık yatkınlığında önemli rol oynayabilir.

- **A^{VY} , Axin^{FU} MODELLERİ VE METİL DONÖRLER**
- Maternal epigenetik ve metil ilavesi A^{VY} , Axin^{FU} farelerinde agouti ve axin gen ifadesi etkiler.
- DNA metilasyonu için gerekli olan metil gruplarını temin eden S Adenozin Metionin(SAM) sentezi için metil verici üretilmiş diyet ve kofaktörler gerekir.
- İlk beslenme veya SAM sentezini değiştiren çevresel faktörler gendeki epigenetik olarak labil bölgelerde bulunan CpG metilasyonundaki değişimler yoluyla yetişkin fenotipini potansiyel olarak etkileyebilir.

- A^{VY} fare modelini kullanarak Cooney ve Waterland şunu göstermişlerdir; maternal beslenmeye Folik Asit, B12, Colin, ve Betain eklenerek oluşturulan metil ilavesi pseudo agouti fenotipine doğru yavrunun ten rengindeki dağılımı değiştirir. (tablo 15.3)
- Renk dağılımındaki değişim 7 tane A^{VY} CpG bölgesindeki artan metilasyon sonucunda olduğu ortaya konuldu.
- 7CpG bölgesindeki metilasyon profilleri, ektodermal(beyin-kuyruk), endodermal (karaciğer), mezodermal(böbrek) kökenlerinden alınan dokularda tutarlılık gösterir.
- Bu tutarlılık A^{VY} lokusundaki metilasyon profillerinin embriyogenezis totipotent stensell aşamasında oluştuğunu gösterir.

- Buna ek olarak post natal 21-100. günde incelenen dokulardaki metilasyon, korelasyon göstermiştir. Bu DNA metilasyonun zaman içerisinde muhafaza edildiğini göstermektedir.
- AXİN fareleri; annenin aldığı metil donör takviyelerinin etkilerini analiz için kullanılırlar.
- Gebelik öncesinde ve esnasında alınan metil donör takviyelerinin metilasyonu arttırdığını ve yavrudaki KUYRUK KIVRIMINI AZALTTIĞI bulunmuştur.
- Metilasyondaki artış kuyruk bölgesine özgüdür. Bu etkinin gebeliğin ortalarına doğru oluştuğunu kanıt olarak gösterilmektedir.

- Metil takviye markerlerinin nesiller boyu aktarılıp aktarılmadığını analiz etmek amacıyla Cropley ve ark. tarafından A^{VY} pseudoaguiti F0 annelerine metil verici ve kontrol diyeti uygulanmıştır. F2 neslini incelediklerinde intrauterin metil vericilerine maruz bırakılan pseudoaguiti annelerinin daha koyu yavrulara sahip oldukları görülmüştür.
- Metil takviyelerinin
 - A^{VY} allelindeki germline epigenetik modifikasyonu tetiklediği sonucuna varılmıştır.
 - Obezitenin artmasını engellediğini göstermişlerdir.
 - İnsanda da obeziteyi azaltmada rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir.
- Çevresel faktörler yeni germline epigenetik bilgiyi sağlamaz.

- **A^{VY} MODELİ VE İZOFLAVONLAR**

- İZOFLAVON; çoklu biyolojik sistemlerde aktif olan, soya ve ürünlerinde bulunan, fitoöstrojen sınıfını temsil eder. Östrojen ve nonöstrojenik reseptör sinyal yollarını içerir. Soyadaki majör izoflavin Genistein'dir.
- Genistein;
 - Östrojen agonist-antagonist maddeleri bulundurur.
 - Trozin kinaz aktivitesini inhibe eder.
 - Serbest radikalleri zamana, doza, doku türüne göre temizler.
 - Histon asetilasyonunu arttırabilir

- Dolinoy ve ark. tarafından Anneden gelen genisteinin inutero epigonumu değiştirerek yavru üzerindeki etkisini görmek için heterozigot yaşayan yellow aguiti fareleri incelemişlerdir;
 - A^{VY} deki histon 6 CpG bölgesini hipermetile ettiğini,
 - Ten rengini pseudoaguitiye dönüştürdüğünü,
 - Yavrunun yetişkinlikteki obezite riskini azalttığı
 - Kronik hastalık riskini azalttığı şeklinde belirtmişlerdir.
 - Farklı zamanlarda(21.-150. gün) farklı dokulardan alınan örneklerde metilasyon seviyeleri korele bulunmuştur. A^{VY} deki epigenetik kurulumun embriyolojik gelişimin totipotent kök hücre safhasında olduğunu göstermiştir.
 - Yaşlılığa daha dirençli olduğunu ortaya koymuştur.

- Dolinoy ve ark.CpG, A^{VY} 9 bölgesindeki metilasyon seviyelerini de değerlendirmişlerdir böylece;
 - Bölge spesifik metilasyona ışık tutmuştur.
 - Fenotipik değişikliklerde anlamı büyüktür
 - Genisteinli – genisteinsiz diyet arasındaki fark ortaya konmuştur. CpG nin 4. bölge metilasyonu 5-9 bölgesinin metilasyonuna oranla daha fazladır. 4. bölgedeki baz çifti kriptik A bölgesine daha yakın olduğundan metilasyon dağılımında daha önemlidir.

METİL DONÖRLER, BİSPHENOL A (BPA) VE A^{VY} FARESİ

BPA: biberonlarda, yiyecek kaplarında, plastiklerin bazılarında bulunan bir bileşimdir. Hipometile edici etkisi vardır.

Metil donörler BPA'nın bu etkisini yok ederler.

Aynı farelerdeki Cabp^{IAP} allelinin analizi A^{VY} lokusundaki değişimlerle coinsidans görülmüştür.

Bu A^{VY} faresinin toksikolojik bir biyoreseptör olduğunu

Negatif epigenetik modifikasyonlara karşı tedavi yöntemlerini araştırmak için kullanılabileceğini göstermiştir.

- **İNVİTRO FERTİLİZASYONDA (IVF) A^{VY} FARE MODELİ**
- A^{VY} IVF esnasında bozulan mekanizmaları analiz etmek için kullanılabilir.
 - İnsan embriyo kültürünün yer aldığı IVF le doğan çocukların İMPRİNTİNG kaybı yaşadığı
 - Beckwith- wiedeman sendromu, bazı kanser türlerine yatkınlık olduğu saptanmıştır.
 - Morgan ve ark. Blastokist aşamasındaki zigot kültürünün epigenetik olarak labil A^{VY} allelinin postnatal ifadesini değiştirdiğini gösterdiler.

- Bu çalışmada;
 - A^{VY} /a erkek fareleri ovulasyonu olan dişilerle çiftleştirildi. Zigotlar toplandı ve zigotların bir kısmı insan preimplantasyon embriyo için kullanılan ticari IVF medyasında büyütülerek daha sonra pseudo-pregnant alıcı dişilere transplante edildi, bir kısmı ise (blastokistler) embriyo kültürü olmadan transfer edildi ve hamileliğin doğal bir şekilde gerçekleşmesine izin verildi.
 - **Sonuç olarak;** invitro kültüre maruz kalan yavruların, diğer yavrulara oranla daha sarı olduklarını buldular.
 - Preimplantasyon çevresi A^{VY} allelinin regülasyonu için önemlidir,
 - Preimplantasyon çevresi insan geninin epigenetik regülasyonundaki değişimleri etkileme potansiyeli olduğu fikrini destekler.

• **A^{VY} MODELİ VE BABADAN GELEN GENİN ETKİLERİ**

- Chang ve ark. A^{VY} modelinin çok yönlü oluşumunu göstermek amacıyla;
 - Babadan gelen A^{VY} farelerini kullandılar,
 - Babadan gelen heterozigot mutasyonların, mutasyona uğramış allelinin aktarılmadığı yavru farelerde fenotipik değişiklikler gözlemlediler,
 - A^{VY} fare germ hücreesindeki epigenetik bozulmanın -mutasyon kalıtımı göz ardı edilerek- gelecek neslin epigenetik durumunu etkileyebileceğini yabancı erkek farelerin inceleyerek göstermişlerdir,
 - Anneden gelen A^{VY} alleli üzerindeki etkiyi oluşturan, babadan gelen SNF2H kromatin remodülatörü kodlayan 'SMARCA5' genini buldular.
 - Yapılan çalışma; yavrunun fenotipinde gametlerde orijinal olarak oluşan epigenetik değişimler yoluyla babanın değiştirilmemiş genotipinden etkilendiğini göstermiş oldu.

- **GENOMİK İMPRİNTİNG**

- İmprinting; genetik materyalin anneden veya babadan kalıtılmış olmasına bağlı olarak, farklı ekspresyonudur.
 - İlk olarak 1991 yılında tanımlanmıştır, farede ve insanda toplam 80 (29'u ortak) gen tanımlanmıştır,
 - Hem maternal hemde paternal allel var olduğunda oluşur,
 - Bir allel ekspresyona olurken diğeri inaktif kalır,
 - Prader willi (MR, kısa boy, hipotoni, küçük el ayak, hipogonadizm) ve Angelman (MR, ataksik yürüyüş, nöbet, anlamsız gülme MUTLU KUKLA) sendromları örnek hastalıklardır,

- DNA metilasyonu, genetik olarak özdeş olan anne babadan alınan allelleri birbirinden ayıran kalıtsal epigenetik imprint markerdir.
- Allelerin metilasyon durumları farklıdır, bu bölgelere farklı şekilde metile edilmiş bölgeler(DMRS) denir,
- İmprinte gen ifadesini düzenlediği düşünülen diğer mekanizmalar; histon modifikasyonları ve kromatin paketlenmesi dir,
- Waterland ve ark. Gelişimsel faktörlerin, İmprinting gen DMRlerinin metilasyon seviyelerini değiştirerek etkileyebildiklerini göstermişlerdir.
- Bu mekanizmanın daha iyi anlaşılması için ilerde yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

- FARE MODELLERİ, HİSTON MODİFİKASYONLARI VE KÜÇÜK DÜZENLEYİCİ RNA' LAR
 - DNA metilasyon markerlarının oluşumuna ve muhafaza edilmesine katkıda bulunurlar,
 - Metil transferazın ve histon etkileşimlerinin metilasyon oluşumundaki birlikteliği araştırılmaktadır.
 - Enzimsel olarak aktif olmayan kofaktörlerin ve metil CpG bağ proteinlerinin CpG metilasyonunu yönlendirmek için histonlarla olan bağı ve etkileşimi düzenlediği düşünülmektedir.
 - Spermin uzun kısmının arasına serpiştirilmiş nükleotit elementinin (LINE1) ve intrasisternal A parçacığı retrotranspozonlarının metilasyonu için metil transferaz mekanizmasının upstream ilerlemesini sağlayan küçük RNA lar bulunmuştur.

- EPIGENETİK ÇALIŞMALARDAKİ FARE MODELLERİNİN GELECEĞİ
 - Araştırmacılar obezite, kanser, diyabet, ve metabolik sendrom gibi hastalıkların gelişimsel kökenleri arasındaki mekanizmaları çözmeye çalışırken epigenetik çalışmalar öncelikli olacaktır.
 - A^{VY} , $Axin^{FU}$, fare modelleri epigenetik markerlerin nesiller arası kalıtımı incelemek için ve epigenetik planlamayı bozan kimyasalları ve beslenme takviyelerinin etkilerinin incelemek için güçlü araçlardır.
 - Yarı kararlı epiallellerin, imprinting genlerinin epigenetik markerlar hakkındaki bilgi birikimimiz genişleyecektir.

BİTKİ EPİGENOMU

- Bitkilerde epigenetik mekanizmalar,
 - gelişimsel programları,
 - strese karşı cevapları,
 - adaptasyonları,
 - olgunlaşma/yaşlanmayı,
 - hastalıkları,
 - ve çeşitli Mendel dışı kalıtım paternlerini regüle eder.
- Biyotik, abiyotik faktörler ve genom stresine dayanabilmek için kromozom sayısını arttırmaları ve transposable element içeriklerinin yüksekliği (bitki genom plastisitesi), bitkileri epigenetik fenomenlerin çalışılması için uygun sistemler haline getirmektedir.

Transkripsiyonel Gen Susturma (TGS)'da Kromatin Bazlı Epigenetik Mekanizmalar

- Küçük RNA'lar, bitkilerde gen susturmanın epigenetik regülasyonunda yer alırlar. İleride belirtilecek komponentler ve aktiviteler, hep birlikte endojen 24-nt siRNA birikimini kontrol ederler.
- **DICER;** Arabidopsis'te 4 tip DiCER-LIKE gen (DCL1-DCL4) belirlenmiştir. DCL1 endojen dsRNA'lardan siRNA ve miRNA üretir, DCL2 ve DCL4 dsRNA'ları 21 ve 22 nt siRNA'lara dönüştürür, Ago proteini ile kaynaşıp PTGS'teki homolog RNA degregasyonuna rehberlik eder. DCL3 bilinen tüm kromatin bağımlı TGS işlemlerinde mevcuttur. 24nt siRNA (heterocromatik siRNA) üretimi ve AGO4'e bağlanımdan sorumludur.
- **AGO;** Argonaute proteini tüm küçük RNA güdümlü regülasyon yolaklarının önemli bir bileşenidir. Ago ailesinden Grup 1 (AGO proteinleri) üyeleri miRNA ve siRNA'lara bağlanırlar, Grup 2 (PIWI proteinleri) üyeleri piRNA'larla etkileşime girerler, Grup 3 üyeleri sekonder siRNA'lara bağlanırlar. Bitkilerde sadece Grup 1 bulunmaktadır.

- **RNA bağımlı RNA polimeraz (RDRs);** bu enzim DCL'ların substrat olarak kullandığı dsRNA'ları üretir. Bitkilerde birçok endojen fonksiyona (heterokromatin yapısı, gen ekspresyonu, transposable element susturulması vb.) katılır.
- **RNA güdümlü DNA metilasyonu (RdDM);** bu yolak bitkide 3 sıralı bölgedeki (CG, CHG ve CHH) DNA metilasyonunu kontrol eder. DNA metilasyon profilinde 3 DNA metiltransferaz rol oynar. Bunlardan; CHROMOMETHYLASE3 (CMT3) ve DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM2) de novo sitozin metilasyonu ve metilasyonun korunmasını sağlarken, MET1 ise her iki DNA iplikçisindeki simetrik CG metilasyonunu kontrol eder.
- **Pol IV ve Pol V;** Arabidopsis'te RdDM sistemleri bu iki tip, bitki spesifik RNA polimeraza sahiptir. Bu iki enzimin en büyük alt birimleri (NRPD1 ve NRPE1) Pol II'nin en büyük alt birimiyle akrabadır fakat Pol IV ve Pol V özellikle RNA'ya dayalı susturma yollarında yer almaktadırlar.

TRANSPOSABLE ELEMENTLER (TE) VE HETEROKROMATİN

- Arabidopsis'te heterokromatinler, genellikle sentromer bölgesinde yerleşmiş, satellit tekrar dizilerinin arasına dağılmış retrotranspozonlardan, genellikle DNA transpozonlarca oluşturulmuş perisentromerik bölgelerden, karışık TE adalarınca oluşturulmuş tepeciklerden oluşmaktadır.
- Bunlar RNAi aracılı susturmayı tetiklerler.
- Otlarda transkribe olmuş tekrarlar transpozonları, transkribe olmuş retrotranspozonlarında tekrarların susturulmasında siRNA'lar için öne sürülen rollerde yardımcı olduğu, sentromer evrimi açısından ileri sürülmüştür.
- Yine Arabidopsis'te oluşturulmuş heterokromatinlerin histon modifikasyonlarını (özellikle H3K9me2 ve H3K27me) baskılayıcı olduğu belirlenmiştir.

POZİSYON ETKİLİ ÇEŞİTLİLİK (PEV)

- Heterokromatinlere yakın bölgelerde bulunan genlerin değişken ekspresyon gösterdikleri *Drosophila*'larda beyaz gen yardımıyla gösterilmiştir.
- Bitkilerde ise *Oenothera lundiniana* türünde X-ray aracılığıyla korozomal bozunma ve translokasyon sonrası değişken gen ekspresyonları görülmüştür.
- TE'ler fakültatif heterokromatin oluşumu için çekirdeklenme merkezi gibi davranabildikleri gibi insulator de olabilirler.

EPIGENETİK VARYASYON VE BİTKİ EVİRİMİ

- TE'ler özellikleri nedeniyle epialleller oluşturarak fenotipik çeşitlilik oluşturabilirler.
- Epialleller genin TE'ye uzaklığın bağlı oluşup, TE tarafından sağlanan epigenetik mekanizmalarca regüle edilirler.
- Doğal epigenetik çeşitliliğinin, transpozon insersiyon ve tekrarlarındaki polimorfizmden kaynaklandığı farklı Arabidopsis türlerince siRNA üreten bölgeler ve DNA metilasyonu aracılığıyla gösterilmiştir.
- Yapılan çalışmalar, epiallel ve epigenetik mutasyonların, bitki gelişim prosesi, doğal varyasyonların oluşumu ve bitki evrimi konularında daha önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir.
- Polyploidlerdeki homolog genlerin farklı ekspresyonlarının poliploid bitkilerin adaptif evrimini kolaylaştırabileceği de tahmin edilmektedir.

Paramutasyon

- Mayotik kalıtlı gen susturmaya neden olan, allelik etkileşimden doğan, Mendel kalıtımına uymayan, epigenetik bir fenomendir.
- Mısırdaki bulunan, antosiyanin sentez yolağı ile ilişkili 4 loci üzerine yapılan çalışma en iyi örnektir. B' ve P1' paramutasyona karşı dayanıklı iken, r1 ve b1 değışkendir. Kodlu tüm transkripsiyon faktörleri bitkide pigmentasyonu arttırırken buralarda görülen bir paramutasyon renklenmeyi azaltmaktadır.
- Homolog lokustaki ekspresyonu susturulan allel paramutajenik, artan ise paramutant(paramutable) olarak adlandırılır.
- Paramutasyon kusuru olan mutant mısırlarda, RdDM faktörünün gen kodlamasında bozukluk olduğı belirlenmiştir.
- Pol IV'in en büyük alt biriminin paramutasyon ve normal mısır gelişimi için gerekli olduğı da bilinmektedir.

TANIMLAMA / DAMGALAMA, GENOM RESETLEME VE YENİDEN PROGRAMLAMA

Tanımlama/Damgalama; Bitkilerdeki endosperm gibi besleyici dokularda görülür. Bitki tanımlama genlerindeki mutasyonlar, kusurlu üreme ve ölümlere neden olur.

- Arabidopsis'te 10 adet bitki tanımlama geni belirlenmiştir. Bunların 2'si Polycomp grup proteinlerini, 1'i RNA bağlanma proteini, 2'si transkripsiyonel faktörleri ve 4'ü 4.sınıf homeodomain transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır.
- Arabidopsis'te transkripsiyon faktörleri ve kromatin ilişkili fonksiyonları kodlayan yaklaşık 50 tanımlama geni olduğu tahmin edilmektedir.
- Endospermdeki merkez hücre allellerinde histon ve DNA metilasyonundaki farklılıklar tanımlamayı şekillendirmektedir.

- RNAi' nin tohum metilasyon kontrolünde önemli rekonfigürasyonlar sağlıyor olması, embriyoda transpozon susturmayı destekleme amacıyla TE hedefli metilasyonun evrilmiş olabileceği ileri sürülmüştür.

Erkek Gametofit'inde Gamet Resetleme ve Yeniden Programlama

- Arabidopsis'te polen vejetatif hücrelerinde TE'ler etkin iken, reproduktif sperm hücrelerinde susturulmuştur.
- Gametlerde de bir sonraki jenerasyona geçmemesi amacıyla, TE'lerin mutajenik aktivitesi siRNA'lar aracılığıyla epigenetik olarak baskılanmıştır.
- Susturulmuş TE'lerin polen hücrelerinde aktive oluşu, bitki yaprak dokusunda da TE'lerin etkin olmayışı, hücre tipine özgü epigenetik bir yeniden programlamanın varlığına işaret etmektedir.

Çiçeklenme Sırasında Yeniden Programlama

- Arabidopsis'te vernalizasyon etkisi ile FLOWERING LOCUS C (FLC)'nin epigenetik olarak baskılanması bitkini kışın çiçeklenmesini engeller.
- Fotoperiyod ve sıcaklık artışı ile stimüle olan FLOWERING LOCUS T (FT)'yi FCL baskılayarak çiçeklenmeyi engellemeye devam eder.
- Histon modifikasyonu içeren kromatin bazlı mekanizmalarca FLC kromatini değişikliğe uğrar.

Heterokromatindeki Kayıp Metilasyonu Geri Yükleme

- Heterokromatinlerde CG metilasyonunun kaza ile kabını düzenlediği düşünülen mekanizma yakın zamanda bulunmuştur.
- Gametofit jenerasyonu sırasında kaybedilen DNA metilasyonu RNAi sistemi tarafından özgül CG-re-metilasyon ile yenilenmiştir.

BİTKİLERDE POLYCOMB GRUP (PcG) VE TRITHORAX GRUP (TrxG) KOMPLEKSLERİ

- Bitkilerde yanlış yerde yanlış organ oluşumu, bir homeotik gende mutasyon göstergesi olarak kabul edilmektedir.
- Arabidopsis'te PcG kompleksi EZ (Enhancer of zeste) ilişkin proteinlerin biyokimyasal aktivitesi aracılığıyla H3K27me3' e bağlanırken TrxG kompleksi H3K4me3' e bağlanır. Bu iki modifikasyon sırasıyla transkripsiyonel susturma ve gen aktivasyonu ile ilişkilidir.
- Arabidopsis'te PRC2 kompleksi gelişim, çiçeklenme ve tanımlama ile ilişkilidir.
- PRC1 kompleksinin homoloğu daha tanımlanamamıştır. Fakat benzer fonksiyona sahip LIKE-HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 mevcuttur.
- Arabidopsis'te TrxG'nin homoloğu ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1, ATX1 dir.

Arabidopsis'te Antagonistik PcG/TrxG Fonksiyonları

- Çiçek homeotik geni *AGAMUS*, *AG* genç fidelerde ve vejetatif dokularda sessizdir.
- Bu genin çiçeklenme sırasında doğru eksprese olması çiçek organlarının gelişimi ve tanımı için oldukça önemlidir.
- *AG* ekspresyonu EZ homoloğu olan *CLF* (CURLY LEAVES) ve *ATX1* ile baskılanmaktadır.
- *CLF* ve *ATX1* fonksiyonuna sahip olmayan mutantlarla yapılan çalışmalar bu iki homoloğun paylaşılan lokusta birbirlerini dengelediklerini göstermiştir.
- Mutantlarda *H3K4me3* ve *H3K27me3* 'ün silineceği beklenirken *AG* nükleosomunda kısmi restorasyon gözlemlenmiştir.
- *CLF* ve *ATX1* yokluğunda görevlerini yerine getiren farklı dönüştürücüler olduğu tahmin edilmektedir.

Bivalent Kromatin işaretleri

- Embriyonik kök hücrelerde H3K4me3 ve H3K27me3' e rastlanması, nükleosomal modifikasyonlarda birlikte görülen aktivasyon ve susturmanın, gelişim sonrası transkripsiyonun dengeli olması için loci de bulunan bir bivalent kromatin durumu olduğu fikrini ortaya çıkarmıştır.
- Bitkinin çiçeklenmeye geçişinde de aynı duruma rastlanması, bivalent kromatin durumlarının gelişimsel gen regülasyonlarında genel bir karakteristik olabileceğini akla getirmiştir.

KROMATİN YENİDEN BİÇİMLEME

- Yeniden biçimlendirme sistemi ökaryotlarda korunmuştur.
- Arabidopsis'te her bir komponentin homoloğu (nükleozom şaperon kompleksleri CAF-1, NAP1, ve HIRA, CHD-tipi proteinler PICKLE (PKL) ve MOM1 ve ATP-bağımlı SWI/SNF biçimlendiriciler) belirlenmiş, bitki gelişimi ve gen ekspresyonu üzerine etkileri gösterilmiştir.
- Bitkiye özgü ATPase aktivitelerinin (DDM1, CLSY ve DRD1) genom çapında DNA metilasyonu, transpozon susturma ve Pol IV-Pol V fonksiyonları ile oldukça ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak;

- ✓ Bitki epigenetik regülasyon mekanizmalarında kodlanmayan RNA'ların oldukça büyük bir rolü olduğu,
- ✓ Bitkilerde epigenetik mekanizmaların TE'lerin aktivitelerinin düzenlenmesi ile büyük ölçüde ilişkili olduğu,
- ✓ Epigenetik kromatin işaretlerinin küçük heterokromatik 24nt-siRNA'larca yönlendirildiği,
- ✓ Biyotik, abiyotik ve genom stresıyla başa çıkmada çeşitli RNA susturma yollarının varlığının evrimsel açıdan pozitif etkide bulunmuş olabileceği söylenebilir.