

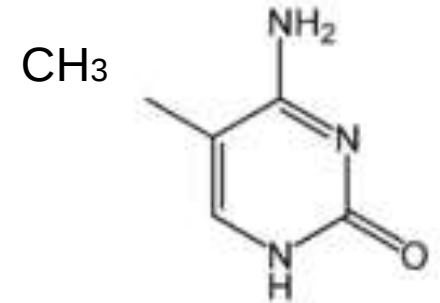
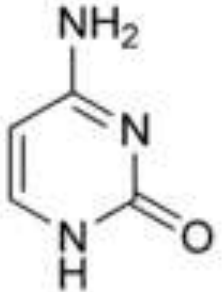
XXXIV.

TÜRK MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ



Mikroorganizmalarda Epigenetik

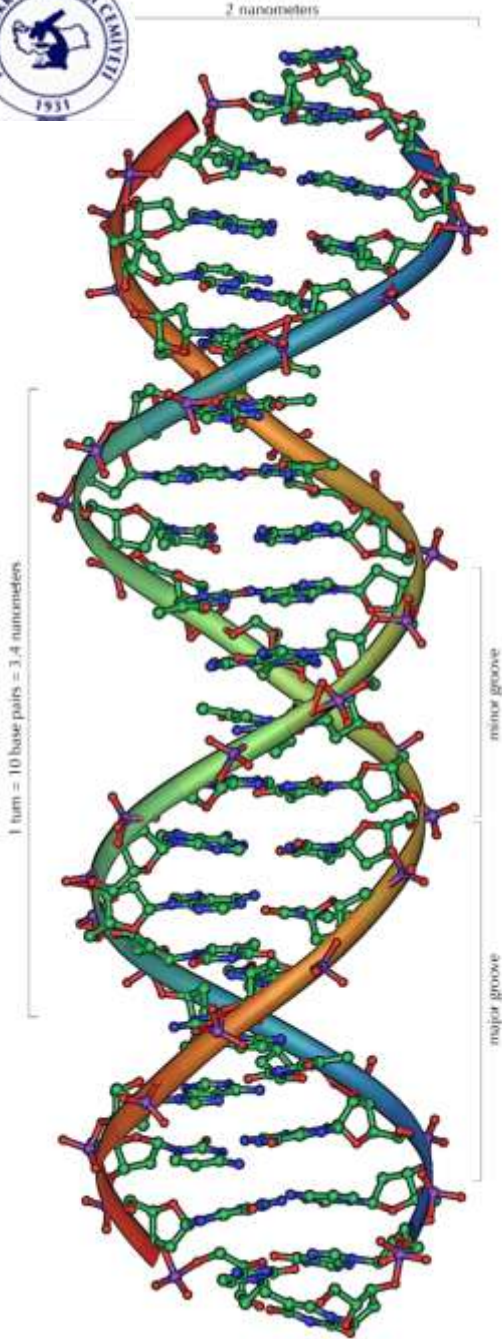
Doç. Dr. Aynur EREN TOPKAYA
Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi





Sunum Planı

- Epigenetik nedir?
- Epigenetik mekanizmalar nelerdir?
- Epigenetik mekanizmaların bakterilere sağladığı avantajlar nelerdir?
- Mikroorganizmaların epigenetik mekanizmalarla makroorganizmada oluşturdukları etkiler nelerdir?



1990 ortalarında Holliday, metillenmiş sitozine (Me-C) atıfta bulunup, “DNA’da sadece 4 değil, en azından 5 farklı baz vardır” diyerek, epigenetik bilginin ne kadar ihmal edildiğini vurgulamıştır

Epigenetik Nedir?

“Genetik ile epigenetik arasındaki farkı anlayabilmek için bunları kitap yazmak ve kitap okumaya benzeterек karşılaştırabiliriz. Kitap bir kez yazıldığında bunun her kopyası orijinalinin aynısıdır. Oysaki her okuyucu kitabı okurken çevresel etkileşimlere göre onu farklı yorumlayabilir ve farklı şekilde hatırlayabilir. Kitap yazılımını genetik, okunuşunu ise epigenetik olarak düşünebiliriz”.

Thomas Jenuwein (Avustralya)

- Epigenetik sözcüğü, Yunancadaki ek anlamına gelen “epi” (önünde, üstünde) kelimesi ve “genetik” kelimesinden oluşmuştur.
- Aristoteles
- Conrad Waddington
- R. Holliday

- “Epigenetik”, geçmişte tek tip hücrelerin çok hücreli organizmalardaki hücre ve dokulara farklılaşmasını ifade etmek için kullanılmıştır.
- Fenotipte, DNA nükleotid sıralamasındaki bir değişiklikten kaynaklanmayan ancak kalıtılabilen düzenlemelere epigenetik değişiklikler adı verilmektedir.
- Epigenetik değişikliklerin en önemli özelliği, DNA dizinini (nükleotid sekansı; ACTG) değiştirmemesidir.

Epigenetik Fenomen

- Prionları,
- Genomik imprinting,
- Histon modifikasyonunu,
- DNA metilasyonunu, içerir



Sunum Planı

- Epigenetik nedir?
- **Epigenetik mekanizmalar nelerdir?**
- Epigenetik mekanizmaların bakterilere sağladığı avantajlar nelerdir?
- Mikroorganizmaların epigenetik mekanizmalarla makroorganizmada oluşturdukları etkiler nelerdir?



Epigenetik Mekanizmalar

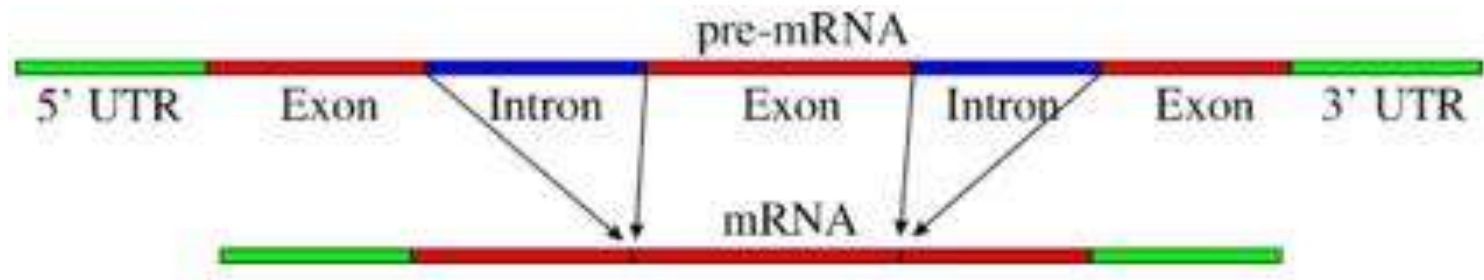
- DNA metilasyonu
- Histon modifikasyonu.
- Kromatinin yeniden düzenlenmesinden oluşmaktadır.

Tümü birlikte gen ifadesinin düzenlenmesini sağlarlar

Gen İfadesinin düzenlenmesi

- DNA dizisinin kapsamlı tanımı organizmayı oluşturmak için yeterli mi?
- Hangi genin ürünü hangi koşullarda yapılır?
- Lenfosit ve hepatositin DNA dizileri farklı mı?
- Kalıtımın kuralları tüm canlılarda aynı mı?

Genomun İfadelemesi



•Kalıtımın kuralları tüm canlılarda aynı mı?



Ortak Genom- Farklı Proteinler?

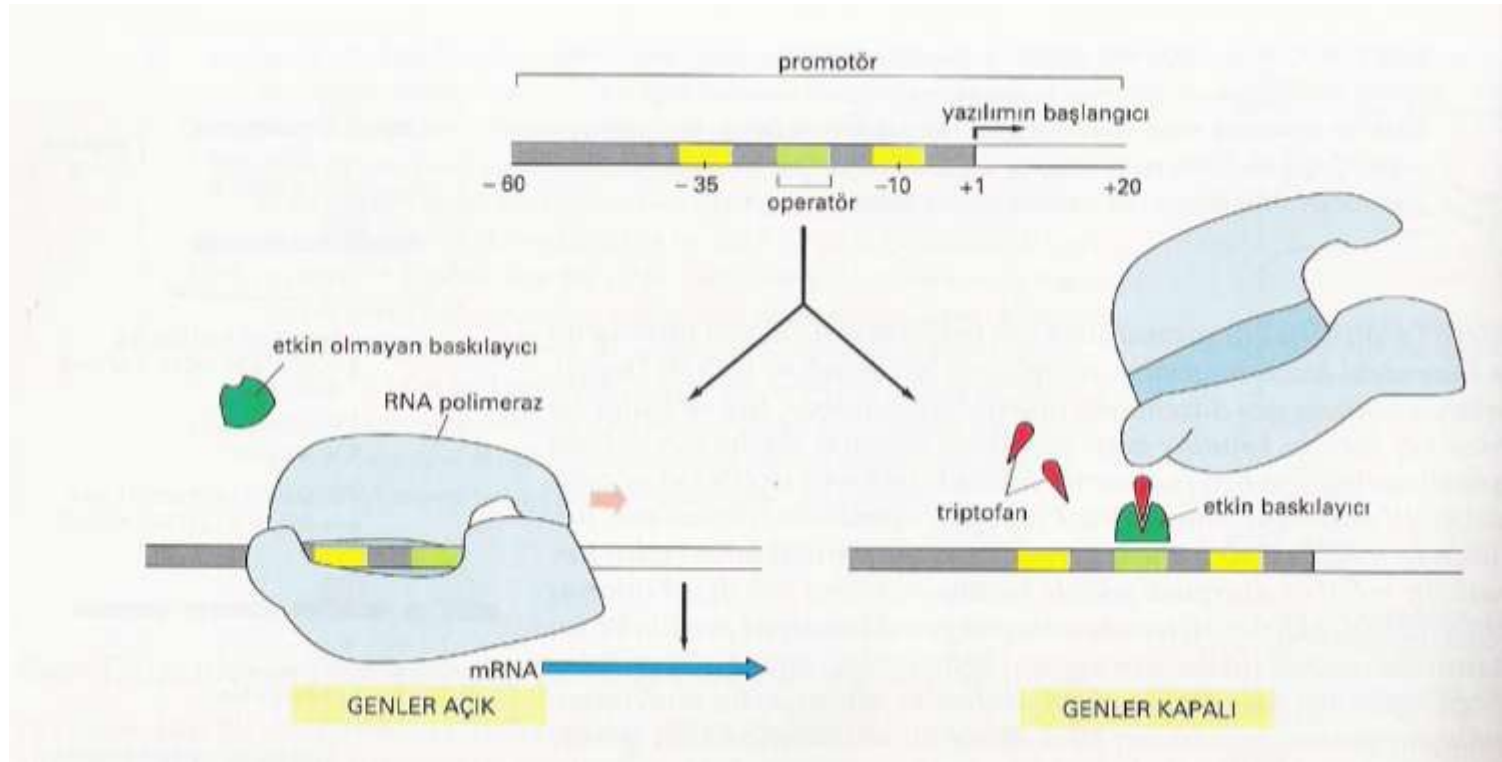
- Yapısal kromozom proteinleri, RNA polimeraz, DNA onarım proteinleri, ribozomal proteinler, metabolizmanın temel enzimleri ortak
- Yalnız özelleşmiş hücrelerde bulunanlar (Hb)
- mRNA paternleri hücreye özgüdür
- Gen ifadesindeki farklar, yalnızca genomun ifade denetiminden değil çevrim (translasyon) sonrası değişikliklerden de kaynaklanır

DNA-RNA-Protein yolunda Gen İfadesinin Düzenlenmesi

- Yazılımın (transkripsiyon) denetimi
- mRNA işlenmesinin denetimi
- mRNA taşınma ve yerleşiminin denetimi
- Çevrimin (translasyon) denetimi
- mRNA yıkımının denetimi
- Protein etkinliğinin denetimi (fosforilleme, proteoliz)

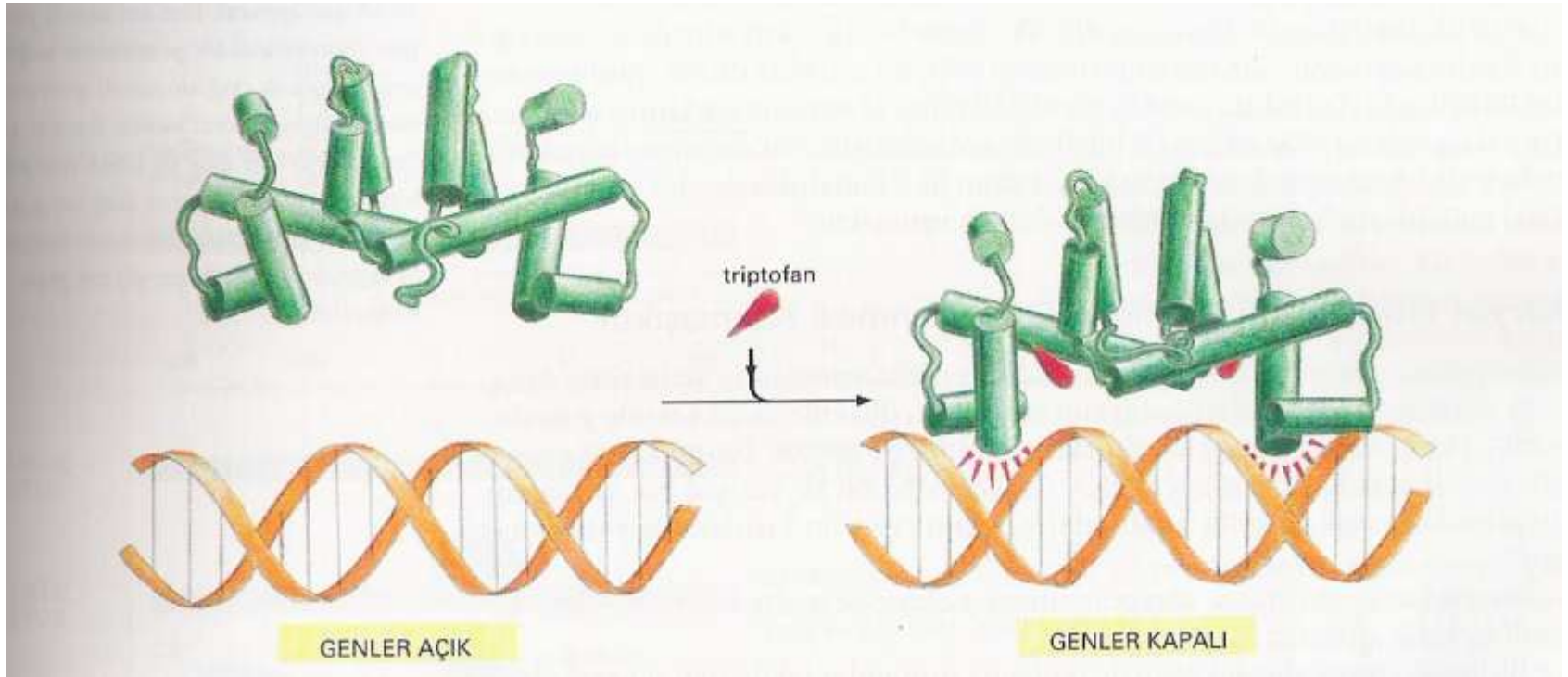
- Bir hücre dış sinyallere bağlı olarak genlerin ifadesini değiştirebilir
- Gen yazılımı düzenleyici DNA bölgesince kontrol edilir
- Anahtar sistemi iki temel bölümden oluşur
 - DNA üzerindeki tanımlanmış kısa diziler
 - Bu dizileri tanıyan ve onlara bağlayan gen düzenleyici proteinler (ilk gen düzenleyici proteinler bakterilerde tanımlanmış lambda, lac baskılayıcı proteinler)

Genetik Anahtarlar Nasıl Çalışır?



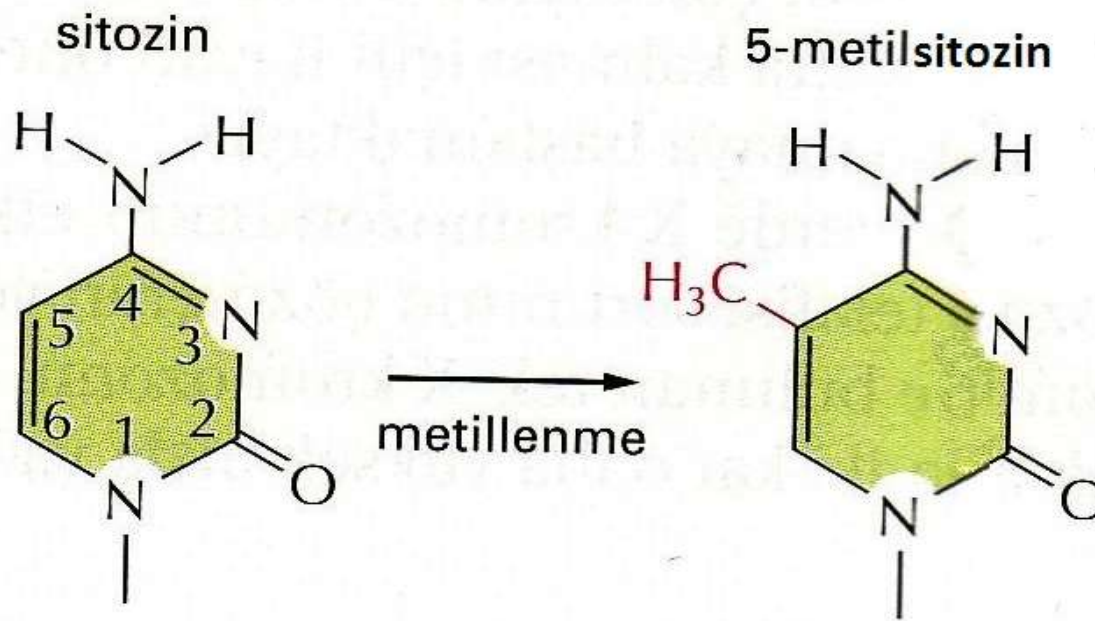
Gen Düzenleyici Proteinler

- Genlerin yazılımı gen düzenleyici proteinlerle başlatılır veya durdurulur
- Proteinler RNA polimerazın başlangıç noktasına yakın bir özgül DNA bölgesine bağlanır
- Düzenleyici proteinin yapısı ve bağlanma yerinin başlangıç noktasına göre konumuna göre gen yazılımı etkinleşir veya baskılanır



Gen ifadesinin denetiminin bir başka yolu: DNA Metilasyonu

- DNA metilasyonu iki tür metiltransferazca sağlanır.
 - De novo metiltransferazlar (başlangıç)
 - Maintenance metiltransferazlar (sürdürme)



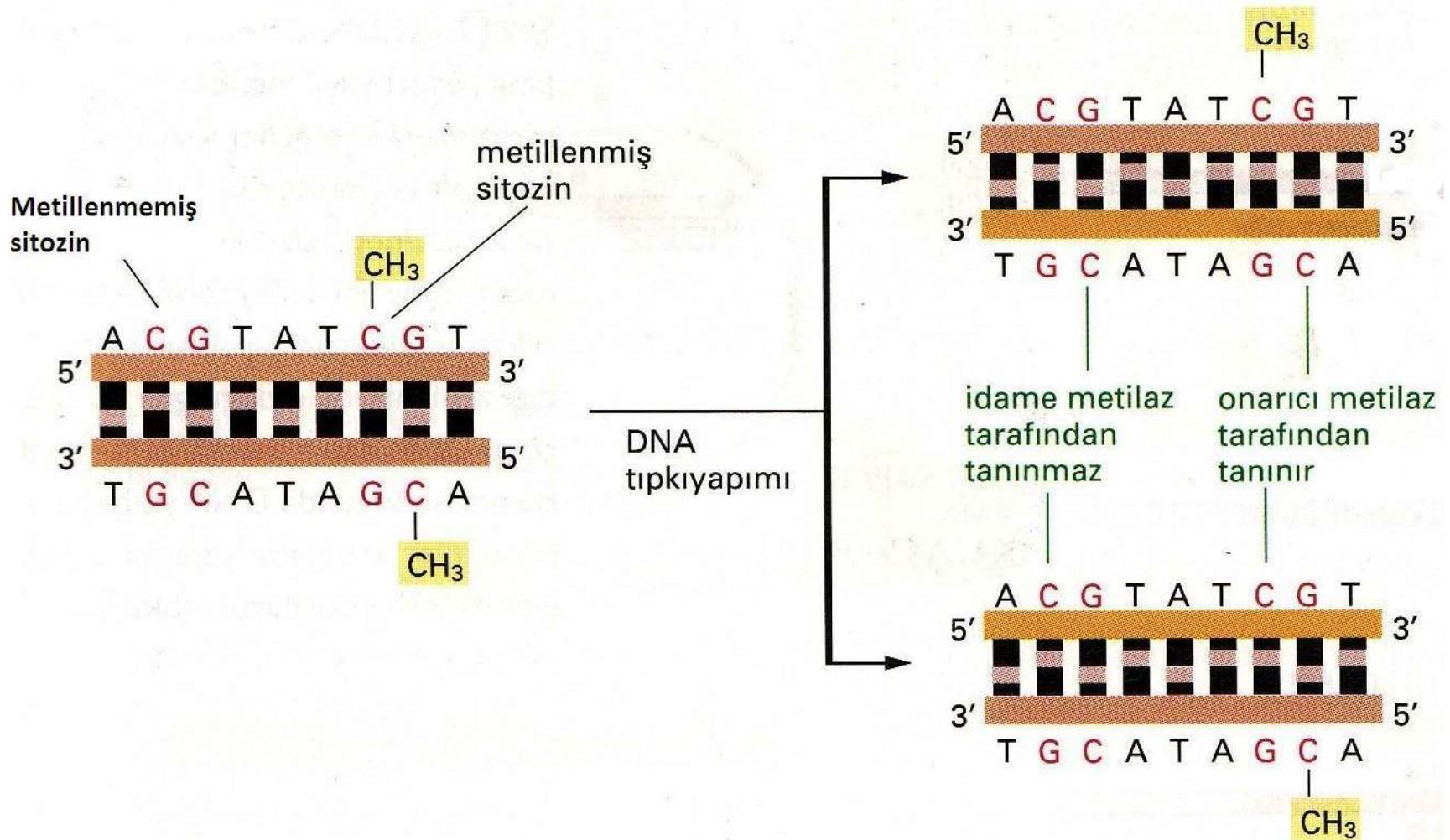
DNA Metilasyonu

- DNA metilasyonu prokaryot ve ökaryotlarda en iyi tanımlanmış epigenetik mekanizmadır.
- Bu mekanizma bir DNA metil transferaz enziminin replikasyon sonrası bir baza metil grubu ilave etmesini kapsar.
- Sitozinin C halkasının 5. atomu ve adeninin N halkasının 6 atomu metillenmesi prokaryot ve ökaryotlarda gerçekleşir.
- Sitozinin N halkasının 4. atomuna metil bağlanması ise sadece bakterilerde vardır.

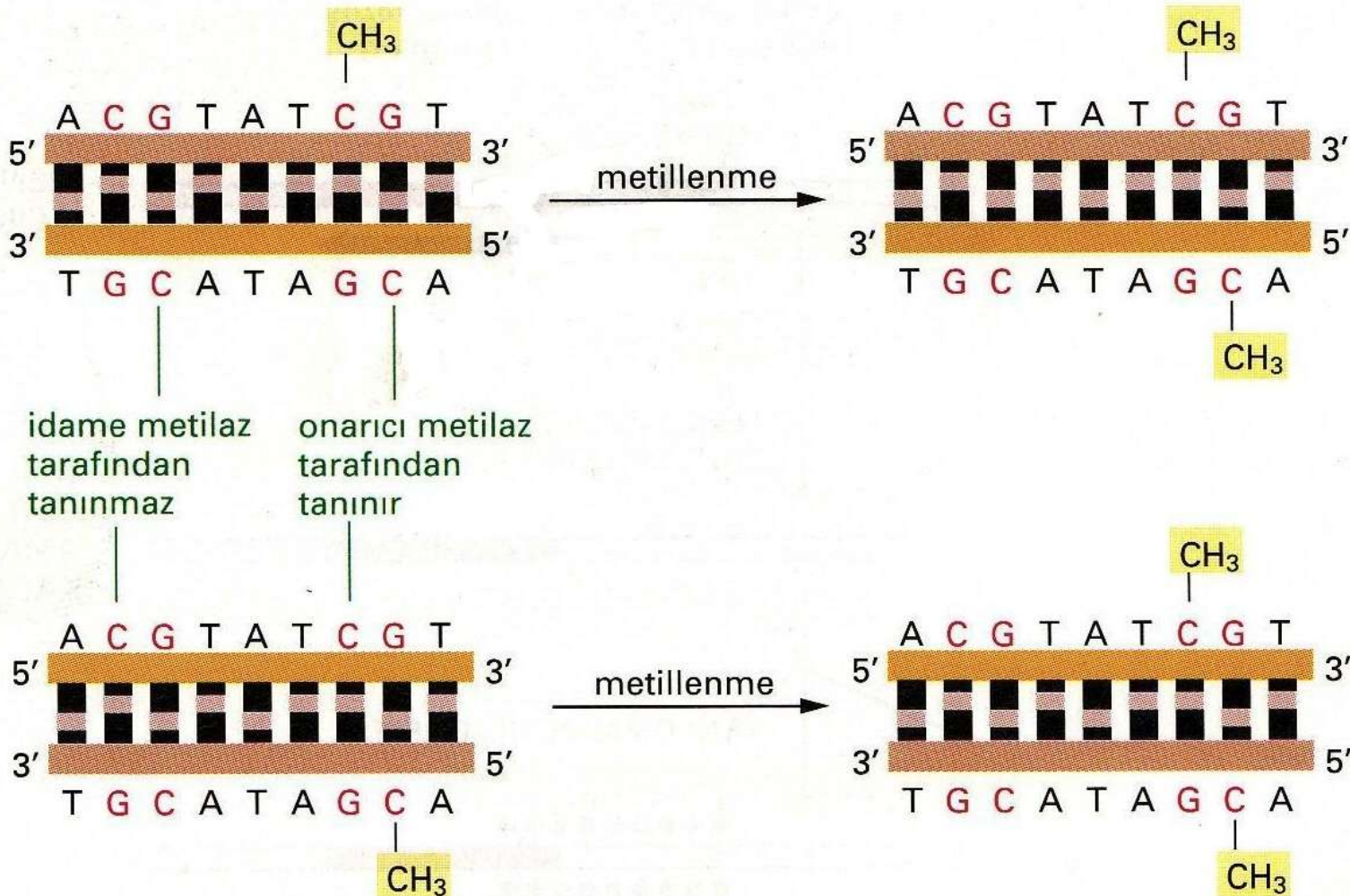
DNA adenin metilasyonu

- γ proteobakteride Dam (DNA adenin metiltransferaz) tarafından ve α proteobakteride Ccr M tarafından yapılır.
- Aralarındaki temel fark Ccr M'nin hücre siklusu ile regüle edilirken, Dam'ın hücre siklusu süresince aktif olmasıdır.

DNA metilasyon paterninin kalıtılması



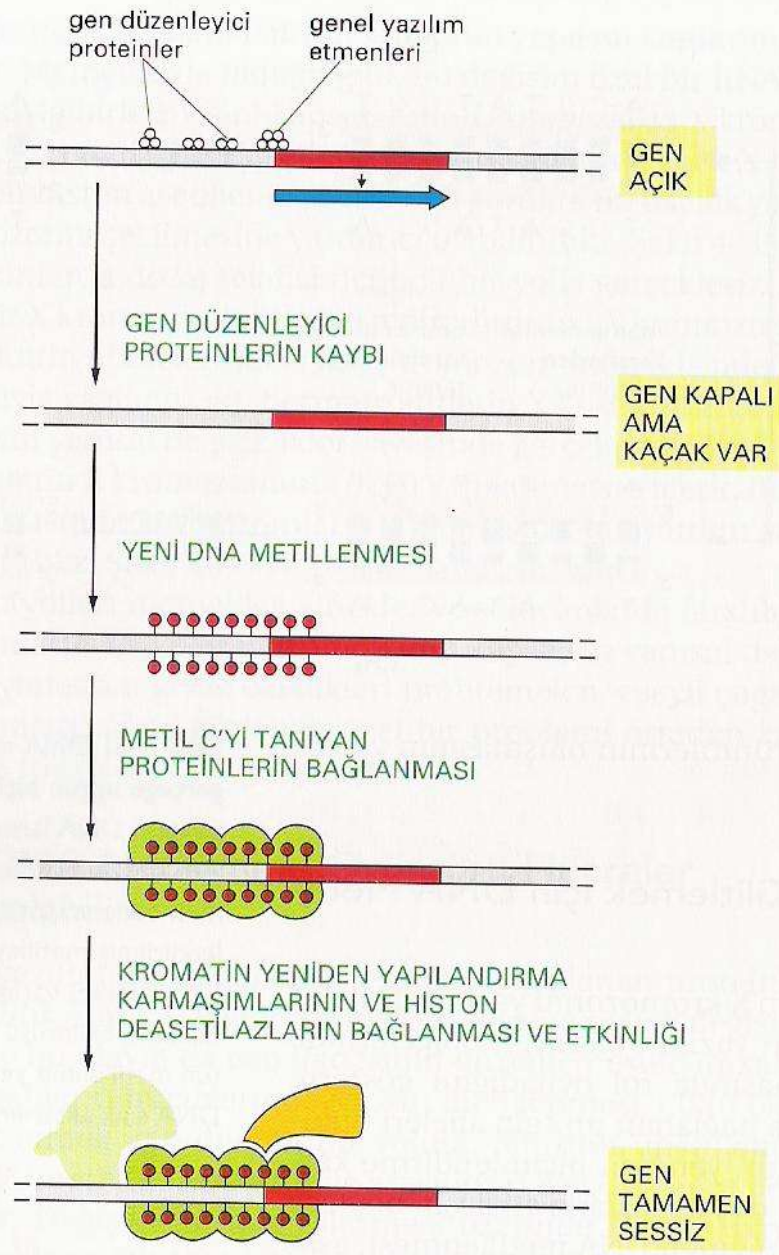
DNA metilasyon paterninin kalıtılması-2





DNA Metilasyonunun Fonksiyonları

- Genleri sessiz konumda kilitlemek (Onkogeneze)
(tm baskılayıcı genlerin susturulması)
- Genom damgalanması (plesentalı memelilerde)





DNA yalnızca bilgi taşıyan bir kasettir.
Kasetçalar olmadan bir işe yaramaz.
Epigenetik ise kasetçalardır.

Bryan Turner (İngiltere)

Sunum Planı

- Epigenetik nedir?
- Epigenetik mekanizmalar nelerdir?
- Epigenetik mekanizmaların bakterilere sağladığı avantajlar nelerdir?
- Mikroorganizmaların epigenetik mekanizmalarla makroorganizmada oluşturdukları etkiler nelerdir?



Epigenetik Mekanizmalar ve Bakteriler

- DNA metilasyonunun bakteri biyolojisindeki önemi;
 - DNA replikasyon zamanlaması ve kromozomların yavru hücrelere bölünmesi
 - Plazmidlerin transpozisyonu ve konjugal transferinin zamanlaması



Epigenetik Mekanizmalar ve Bakteriler

- Faz çeşitliliği ve virülans faktörleri
- Bakteriyofajlardan korunma
- DNA tamir mekanizması
- Antibiyotik direnci

ÜPEC' de Faz Varyasyonu

- Üropatojen *E. coli*' nin piyelonefrit ilişkili pilus (pap) operonunun düzenleyici bölgesindeki metilasyonu ?
- pap ekspresyonu aktif hücreler ON ve inaktif hücreler OFF fazında
- ON fazındaki hücrelerde pap promotörün proksimalindeki GATC' ler metillenmiş distaldekiler metillenmemişken OF da tersi
- Pap DNA sekansı bulunmayan *E. Coli K-12* lerin genomunda çok sayıdaki GATC sekansı metillenmemiştir

Pap faz varyasyonunun biyolojik rolü

- İmmun sistemden kaçmak
- Bakteri jenerasyonlarının bağlan-çözül-bağlan olaylar serisini kolaylaştırmak
- Yeni tanımlanan bir bakteriyel fenomen olarak temas-bağımlı üreme inhibisyonu üzerinden ÜPEC nin üremesini kontrol etmek
- ÜPEC' deki adezin genlerinin çoğu DNA metilasyon paternlerini içeren epigenetik mekanizmalarla düzenlenir.

Faz-değişken Dış Membran Proteini: Ag⁴³

- Ag⁴³ bakterinin agregasyon özelliğini belirler
- Agn⁴³ geninin ekspresyonu da pap gibi DNA metilasyonuyla kontrol edilir
- Bir hipoteze göre, **Agn⁴³ ekspresyonunun düzenlenmesi** oksidatif strese yanıt ve biyofilm oluşumu arasında kilit role sahiptir.



Salmonella enteritica serotip typhymirium

- Dam post-transkripsiyonel düzenlemelerden sorumlu
- RNA stabilitesi, mRNA translasyonu ve protein sentezinde önemlidir

Bakteriyofajdan Korunma

Adenin ve sitozin metilasyonu çoğu bakteride restriksiyon - modifikasyon sisteminin parçasıdır: Bu sistemde çalışan bir metilaz belli bir DNA dizisini tanır ve bu dizi içinde veya yakınındaki bir bazı metiller. Bu şekilde metillenmemiş olan yabancı DNA'lar hücre içine girdiklerinde diziye spesifik restriksiyon enzimleri tarafından parçalanır.

Kendi DNA'sının metilasyonu ilkel bir bağışıklık sistemi olarak çalışır, onun sayesinde bakteriler bakteriyofaj enfeksiyonundan kendilerini korurlar.

- Enterik bakterilerin virölans fajlarının genomlarında GATC göreceli az
- E. Coli DNA sı her 232 bp'de bir GATC bölgesi içerir, genomda tahmini GATC bölgesi 256 bp
- Bakteriyofaj T7 de ise tahmini sayı 141 iken 6 GATC bölgesi var.
- E.coli lambda ve Salmonella P22 ılımlı faj genomlarında, GATC beklenenden daha azdır fakat fark T7'deki kadar abartılı değil
- Diğer faj genomları konak genomuna benzer

DNA Tamirine örnek; Dam

E. coli Dam'ın hedef dizisi GATC' dir.

- Replikasyondan önce GATC konumlarındaki iki ipliğin her birinde adenin bazı metillenmişken, sonrasında metil grubu sadece birinde kalır.
- DNA ipliklerinden birinin metillenmemiş olması, hücrenin tamir sisteminin o ipliği yeni sentezlenmiş iplik olarak tanımasını sağlar.
- Tekrar metillenme için 2-4 sn. gerekir, bu arada replikasyon sırasında oluşan hatalar onarılır.
- Bakterilerde Dam sisteminin bozulması, spontan mutasyon oranının artmasına neden olur.

Replikasyonun Kontrolü

- Bakteri kromozomundaki replikasyon orijininde genomun diğer bölgelerine göre daha çok sayıda GATC olduğundan yarı-metillenmiş durum daha uzun sürer.
- Replikasyonun zamanlamasında bu önemlidir.
- *SeqA* proteini orijine bağlanarak metillenmesini engeller.
- Yarı metillenmiş orijinler inaktiftir ve bu mekanizma hücre döngüsü sırasında DNA replikasyonunun tek bir kere olmasını sağlar.

Antibiyotik Direnci

- Mutasyonlarla dirençli bakteri ortaya çıkması milyonda bir dir. Oysa ki düşük dozda antibiyotiğe maruz kalan bakterilerin kısa dönemde sağ kalma oranı 1/5 daha uzun sürede $\frac{1}{2}$ dir. Bunun ancak epigenetik mekanizmalarla olabileceği tahmin edilmektedir.
- Ancak bunun mekanizmasını saptamak nasıl olabilir?

Çekirdekteki bilgi yönetimine bakınca genetik bilgilerin bir kısmının genomda çok sıkı paketlenildiği görülür. Bunu evdeki eşyaların kullanımına benzetirsek, epigenetik her zaman ihtiyaç duyulanlardır ve hep göz önündedir oysa genetik eski okul defterlerimize benzer onu tavan arasındaki kutularda tutarız.

Peter Becker (Almanya)



Sunum Planı

- Epigenetik nedir?
- Epigenetik mekanizmalar nelerdir?
- Epigenetik mekanizmaların bakterilere sağladığı avantajlar nelerdir?
- Mikroorganizmaların epigenetik mekanizmalarla makroorganizmada oluşturdukları etkiler nelerdir?

Virüsler ve Epigenetik

- 1898 Tütün Mozaik Virüsü Martinus Beijerinck
- 1911 Kuşlarda tm. Virüsü Peyton Rous
- 1964 İnsanda kanserle ilgili M.A. Epstein- Y. Barr
- Virüsler insanlarda tümörlerin % 15-20' sinden
- HBV ve HCV – Hepatosellüler Ca'nın % 80'inden
- EBV Hodgkin lenfomanın % 30'undan sorumlu
- HPV ise serviks kanserlilerde % 95 pozitif

<i>Virüs</i>	<i>Genom</i>	<i>Viral onkoprotein</i>	<i>Kanser</i>	<i>DNA metilasyon</i>
EBV	dsDNA	LMP1, BZLF1, EBNA2, EBNA3, BRLF1	BL, NPC, HD, GC	Kısmen
KSHV	dsDNA	LANA, vIRFs	KS, PEL, MCD	Kısmen
HPV	dsDNA	E2, E6, E7	serviks, orofarenks, anogenital, deri	Tümü
HBV	dsDNA (kısmen)	HBx	HCC	Tümü
HCV	ssRNA	NS4B?	HCC	yok
HTLV-I	ssRNA4dsDNA	Tax	ATL	Kısmen
HIV	ssRNA4dsDNA	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Kısmen
CMV	dsDNA	IE1-72?, IE2-86?	CRC, glioma, prostat	Kısmen

Virüsler ve Tümör Oluşumu

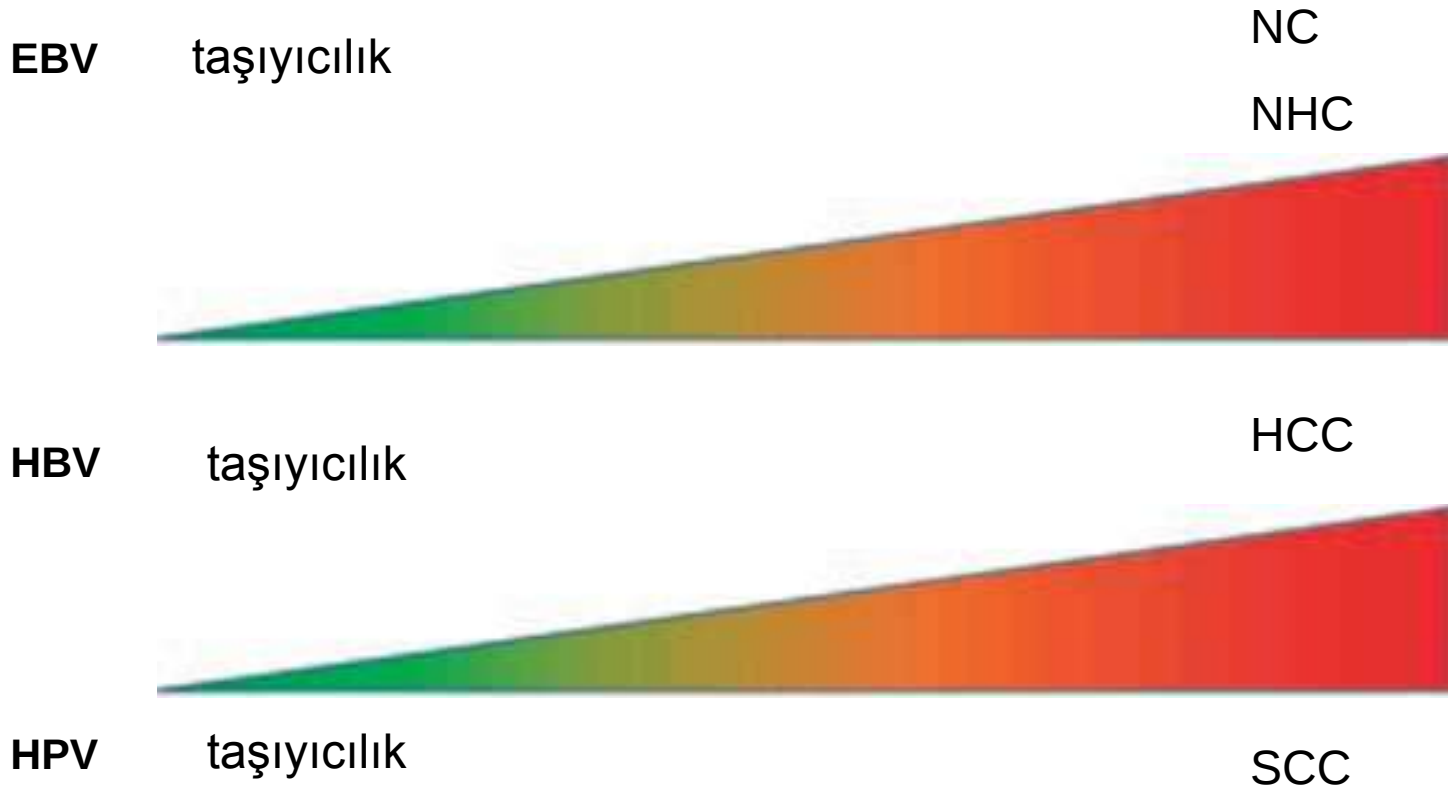
- Virüsler konak epigenetik mekanizmaları ile etkileşerek konak hücre genomunda metilasyona neden olur ve hücresel genlerin suskunluğu devam eder.
- Virüsler aynı zamanda belirli histon modifikasyonu, kromatin yeniden yapılanmasıyla ilgili kompleksler ve miRNA işleme ile ilişkili proteinlerin aktivitesini değiştirebilirler.
- Virüs genomu mutasyonlar ve kromozomal düzenlenmelerle konak genomunu bozar ve infekte hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmeye yatkınlığı artar.

EBV

- EBV genomu konak hücrede litik ve latent olarak iki farklı durumda olabilir
- Litik çevrim çeşitli viral proteinlerin sentezi ve sonunda infeksiyöz virion partikülleri üretilir.
- Latent genler, EBV nükleer antijen EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C ve LP, latent membran proteinleri (LMP) 1, 2A ve 2B, Barf-1 protein ve EBER 1, EBER 2 ve BART RNA transkriptlerini kodlar.
- Latent enfekte hücrelerde, EBV en az 20 miRNA geni kodlar.

EBNA1 gen promotorunun metilasyon profili

- EBNA1 viral DNA replikasyonu ve latentliğin sürdürülmesinde vazgeçilmezdir.
- EBNA1 ifadelenmesini düzenleyen dört promotör (Cp, Wp, Qp ve Fp) tanımlanmıştır
- DNA metilasyonu bu gen ifadesini düzenleyerek latentlik durumunu belirler.



Promotör genlerin metilasyon profilleri, bisüfit sekanslama, pyrosequencing ve metilasyon-spesifik PCR ile analiz edilmiştir

- Bakterilerden tümörle ilişkili olduğu bilinen *H. pylori* DNA metilasyon ve histon modifikasyonu gibi epigenetik mekanizmalarla onkojenik transformasyona neden olur mu?
- *S. Bovis*



Mayalarda Epigenetik

Maya prionu PSI+ daha sonra yavru hücreler tarafından da kalıtılan Sup35p translasyon terminasyon faktörünün metilasyon ile değişikliğe uğraması ile oluşur.

Sup35p'nin PSI+ formu mayanın bitki öldürücü ilaç veya kafein varlığında hayatta kalma avantajı sağlar



Epigenetik bakterilerin yan profil resmidir.

Prof. Dr. Faruk AYDIN



Zihni-sinir Projeleri !!!

- 1- *Dam* inhibitörleri antibiyotik olarak çalışabilir mi?
- 2- *Dam* inhibitörleri antitümör olarak çalışabilir mi?



TEŞEKKÜR EDERİM