

Epigenetik ve Epigenomik

Serkan ORCAN

**Hacettepe Üniversitesi
2006**

GİRİŞ

İlk olarak, 1950'lerde Conrad Waddington tarafından önerilen *Epigenetik* terimi günümüzde "DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler" olarak tanımlanmaktadır. Son on yılda yapılan araştırmalar sonucu, epigenetik olayların, özellikle yüksek organizasyonlu canlılarda oldukça önemli etkileri olduğu anlaşılmıştır. Epigenetik fenomen, özellikle canlıların embriyodan yetişkin bireye doğru ilerleyen gelişim sürecinde gözlemlenen, hücre farklılaşmaları sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinde görülen bu değişiklikler, DNA'nın seçici olarak, farklı epigenetik durumlarda bulunan farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Epigenetik fenomenin üzerinde en çok çalışma yapılmış olan iki tipi, *DNA metillenmesi* ve *histon modifikasyonları* olmuştur. Bu iki olayın birbiriyle bağlı ve geri dönüşümlü olduğu düşünülmektedir.

Yapılan araştırmalar sonucunda, gelişim sürecinde çekirdeğin epigenetik özelliklerinde bir dizi değişimin gerçekleştiği ve hücrel potansiyelin kaybı ile geri dönüşümsüz gen (ör: embriyonik) susturulmasının arasında önemli bir ilişkinin varlığı saptanmıştır.

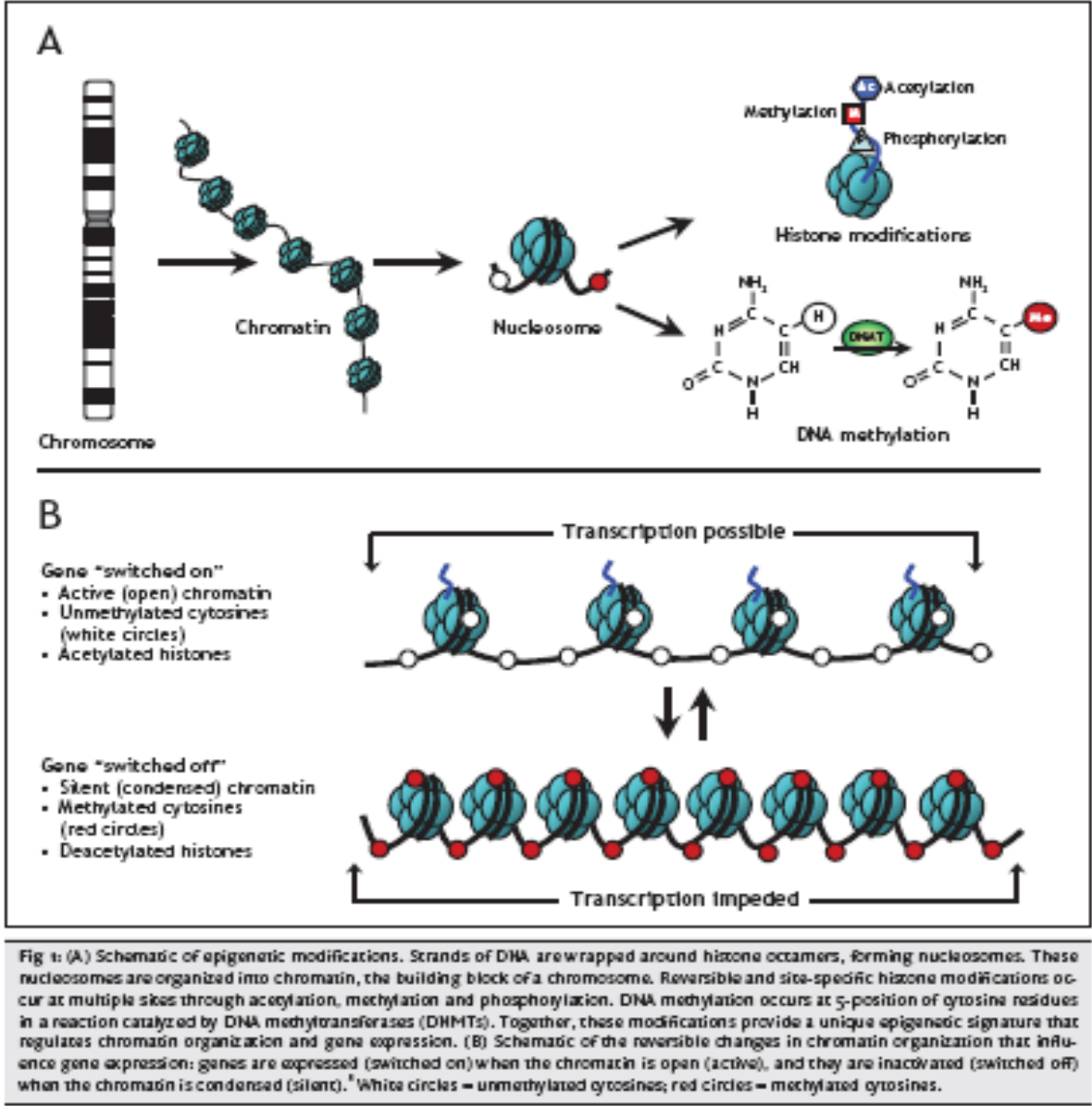
DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları

İnsan genomunda bulunan yaklaşık 23.000 gen, belirli hücrelerde ve belirli zamanlarda ifade edilmelidir. Hücreler gen ifadesindeki bu kontrolü sağlayabilmek için DNA'larını globüler histon protein octomerleri etrafına sararak oluşturdukları nükleozom yapılarını kullanırlar. DNA ve histon proteinlerinden oluşan bu nükleozomlar kromatin olarak organize edilirler. Kromatin yapısındaki değişiklikler gen ifadesini kontrol eder: kromatin yapı sıklaşıp yoğunlaştığında (sessiz) genler inaktive olur, kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında (aktif) ise genler aktive olarak ifade edilir. Kromatin yapısındaki bu dinamik durum ise, geri dönüştürülebilir olan ve DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik paternler ile gerçekleştirilir. Bu işlemlerde görevli alan enzimler arasında, DNA metiltransferazlar (DNMT), histon deasetilazlar (HDAC), histon asetilazlar, histon metiltransferazlar ve methyl-binding protein MECP2 sayılabilir. Normal epigenetik paternlerden bir sapma olduğunda ortaya çıkan gen ifadesindeki anormallikler çeşitli klinik sonuçlara yol açabilir.

DNA Metilasyonu: DNA metillenmesi, genel kural olarak, DNMT(DNA metil transferaz)'ler tarafından CpG adacıklarında ve sitozinin 5 numaralı karbonunda meydana getirilir. Omurgalı DNA'sındaki C-G baz çiftlerinin %70'ten fazlası metillenmiş durumdadır. Bu metillenmenin canlıdan canlıya ve dokudan dokuya göre değiştiği bilinmektedir. Metillenme profillerinin fonksiyonel bir takım sonuçları olabileceği önceden beri düşünülmektedir. Bu konuda ilk yapılan araştırmalarda metillenme ile gen ifadesi arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. Genlerin promotor bölgelerindeki metilasyon seviyesinin düşük olması aktif gen ifadesi ile korelasyon göstermektedir.

DNA'nın de novo metilasyonu ve bu metilasyonun devamlılığının sağlanmasında DNMT'ler görevlidir. Günümüzde bilinen 5 insan DNMT'si vardır. Bunlar, DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olarak adlandırılmıştır. Bunlardan, animo-terminal regülatör domeyni bulunmayan DNMT2 ve katalitik domeyni olmayan DNMT3L dışındakilerin hepsinde enzimatik aktivite görülmektedir. DNMT1, "maintenance methyltransferase" olarak da bilinir ve yarı-metillenmiş DNA bölgelerine bağlanırken, DNMT3a ve DNMT3b, de novo metiltransferazlar olarak adlandırılır ve yarı-metillenmiş ve

hiç metillenmemiş bölgelere bağlanarak metilasyonu gerçekleştirirler. DNMT2'nin diğer metiltransferazlar gibi, korunmuş olan metiltransferaz motifini taşıdığı gösterilmiştir ancak aktivitesi görülmemiştir.



DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi: CpG adacıklarında görülen DNA metillenmesi, gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde, özellikle genlerin promotor bölgelerindeki metillenme, transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerinde değişiklikler meydana getirerek bu faktörlerin bağlanmasını engellemekte ve bu şekilde gen ifadesinin baskılanmasında rol oynamaktadır. Hücre farklılaşmasıyla beraber farklı dokularda farklı genlerin ifade olmasının temelinde bu düzenleme yatmaktadır.

DNA metillenmesi, DNA'nın yapısında bazı değişikliklere yol açarak bir grup metil-CpG bağlanma proteininin (MeCPs) tanıma bölgesini oluşturur. Bu bölgelere metil-CpG bağlanma domaini (MBD) ile bağlanan birçok transkripsiyon repressörü vardır. Bu proteinlerden biri olan MeCP2, Sin3a/HDAC (histon deasetilaz) olarak tanımlanan bir histon modifiye edici kompleksin bileşeri arasındadır. MeCP2, tek bir metillenmiş CpG çiftine bağlanabilen bir MBD'ye ve transkripsiyon baskılayan bir TRD domainine sahiptir. DNA

metillenmesinin, dolaysız olarak gen ifadesini etkilediği modelde, metillenme sonucu oluşan tanıma bölgelerindeki histonların deasetilasyonunun, gen ifadesini baskılayan bir kromatin yapısına yol açtığını önerilir.

Histon Modifikasyonları: DNA'nın paketlenmesinde görevli olan histon proteinlerinin bazik amino-terminal uçları nükleozomdan çıkıntılar yapar ve bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Bu modifikasyonlar arasında; HAT(histone asetil transferaz)'lar tarafından asetillenme ve HMT(histon metil transferaz)'lar tarafından metillenme yer almaktadır. Histonlar üzerinde yapılan bu değişiklikler, kromatinin yapısının gevşek ya da sıkı olma durumunu etkileyerek gen ifadesinde regülatör rol oynar.(Örneğin, asetil grupları histonlardaki (+) yükü nötralize ederek histonlar ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşimleri zayıflatır.)

Belirli bazı histon modifikasyonları öökromatinin ve heterokromatinin aktif ya da inaktif markırları olarak kullanılabilirler. H3 ve H4 histonlarının lizin rezidularından asetillenmesinin aktif kromatinle korelasyon gösterdiği, deasetilasyonun ise kromatinin daha sıkı bir şekilde paketlenerek genlerin inaktif duruma geçmesiyle sonuçlandığı bilinmektedir. Histon lizin metilasyonu ise, asetilasyonun tersine, hangi rezidude olduğuna göre aktivasyon ya da inaktivasyonla sonuçlanabilir. Bu yolla, histonlardaki spesifik modifikasyonlar, transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromatinin belirlenmesinde bir çeşit “*marker*” olarak kullanılabilir.

Histonlardaki modifikasyonların ve DNA metilasyonunun birlikte çalışarak gen ifadesinin durumunu belirlediği ve bu şekilde hücrenin yazgısının belirlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir.

Epigenetik Paternlere Çevresel Etki: DNA metilasyon paternleri beslenmedeki değişiklikler, genetik polimorfizmler ve karşılaşılan kimyasallara bağlı olarak dalgalanma gösterebilir. Metil grupları diyetle alınarak, folate ve metiyonin yollarıyla DNA'ya aktarılır. Düşük folate, metiyonin ya da selenyum alımı sonucunda DNA metilasyonunda değişiklikler oluşabilir. Diyetteki bu dengesizlikler hipometilasyona yol açarak, gen ifadesinde bozukluğa ya da kromozomal düzensizliklere (kromozomların yeniden düzenlenmesi) yol açabilir. Metaller ya da aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel ajanlar da genomu destabilize ederek ya da hücre metabolizmasını etkileyerek epigenetik paternlerde değişikliklere neden olabilir.

Epigenetik Bozuklukların Klinik Sonuçları

Epigenetik modifikasyonlar, uzun dönem gen ifadesinin susturulmasında kullanılan bir mekanizmadır ve dokuya ya da gelişim evresine özgül farklı gen ifadesi paternlerinin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Epigenetik patern gelişim sürecinde oluşturulur ve normalde bireyin tüm yaşamı boyunca korunur. Döllenmenin hemen ardından, paternal genomda hızlı bir demetilasyon ve histon modifikasyonları görülür. Maternal genomda ise kademeli bir demetilasyon görülür ve sonuçta yeni bir embriyonik metillenme paterni oluşturulur. Sonuç olarak, embriyodaki her hücre kendine özgü bir epigenetik paterne kavuşur ve bu sayede de hücreye özgü gen ifadesi sağlanmış olur. Çok dikkatli bir şekilde düzenlenmiş olan bu epigenetik paternlerde meydana gelebilecek dalgalanmalar konjenital bozukluklara, multisistem pediyatrik sendromlara ya da sonradan ortaya çıkabilecek kanser ve nörodejenerasyonlara yatkınlık sağlayabilir.

Kanser ve Epigenetik Terapi: Kanser, genetik ve epigenetik hataların birikimiyle ortaya çıkan ve normal hücrenin metastazik tümör hücresine dönüşmesiyle sonuçlanan çok basamaklı bir olaydır. DNA metilasyonundaki değişiklikler kanserle ilişkili genlerin ifadesinde değişikliklere neden olur. DNA hipometilasyonu onkogenleri aktive eder ve kromozom yapısının kararlılığını yitirmesine neden olurken, DNA hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açar. Histolojik olarak normal kabul edilen hücrelerde gözlemlenen promotör hipermetilasyonu ve farelerde kanser oluşumuna karşı DNMT1

inhibitörlerinin başarıyla uygulanmış olması gibi veriler, DNA metilasyonunun karsinogenez için uygun koşulların sağlanmasında çok önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir.

Table 1: Associations between epigenetic modifications and human diseases and conditions					
Disease/condition	Gene	Biological process	Disease/condition	Gene	Biological process
Cancer			Neurologic		
Bladder	Multiple genes	Hypermethylation ²⁰	Schizophrenia	RELN	Hypermethylation ^{44,47}
Brain (glioma)	RASSF1A	Hypermethylation ^{21,28}	Bipolar disorder	11p?	Unknown ⁴⁸
Brain (glioblast)	MGMT	Hypermethylation ²⁰	Memory formation	Multiple genes	Hypo-, hypermethylation ⁴⁹
Breast	BRCA1	Hypermethylation ²¹	Lupus	Reoviral DNA	Hypermethylation ²²
Breast	Multiple genes	Hypermethylation ^{21,22}	Cardiovascular		
Cervix	p16	Hypermethylation ²⁴	Atherosclerosis	Multiple genes	Hypo-, hypermethylation ^{19,21}
Colon	Multiple genes	Hypermethylation ²⁰	Hemochromatosis	Multiple genes	Hypermethylation ²²
Colorectal	L1 repeats	Hypomethylation ²⁴	Vascular endothelium	eNOS	Hypermethylation ²²
Esophagus	CDH1	Hypermethylation ²⁰	Imprinting and pediatric syndromes		
Head/neck	p16, MGMT	Hypermethylation ²⁰	PWS or AS	15q11-q13	Imprinting ¹⁴
Kidney	TDM3	Hypermethylation ²⁰	BWS	11p15	Imprinting ¹⁴
Leukemia	p15	Hypermethylation ²⁰	SRS	Chromosome 7	Imprinting ¹⁴
Liver	Multiple genes	Hypermethylation ²⁴	UPD14	14q23-q32	Imprinting ¹⁴
Lung	p16, p73	Hypermethylation ²⁰	PHP, AHO, MAS	20q13.2	Imprinting ¹⁴
Lymphoma	DAR1	Hypermethylation ²⁰	Ret. syndrome	MECP2	Mutation ⁴¹
Myeloma	DAR1	Hypermethylation ²⁰	ICF syndrome	DNMT3B	Mutation ⁴²
Ovary	BRCA1	Hypermethylation ²⁴	ATRX	47X	Chromatin structure ⁴¹
Ovary	Sac2	Hypomethylation ¹⁹	Frx1	Triplet repeat	Silencing ⁴¹
Pancreas	APC	Hypermethylation ²⁰	F5HD	3.3 kb repeat	Chromatin structure ⁴¹
Pancreas	Multiple genes	Hypomethylation ⁴⁰	Reproductive		
Prostate	BRCA2	Hypermethylation ^{20,41}	Ovarian teratoma	No paternal genome	Imprinting ¹⁴
Rhabdomyosarcoma	RAK3	Hypermethylation ²²	CHM	No maternal genome	Imprinting ¹⁴
Stomach	Cyclin D2	Hypomethylation ⁴²	BICM	Maternal genome	Imprinting ¹⁴
Thymus	POW1	Hypomethylation ⁴²	Agng	Chromatin	Hypo-, hypermethylation ⁴⁴
Urothelial	Sacillite DNA	Hypomethylation ⁴²			
Uterus	hMLH1	Hypermethylation ²⁰			

Note: PWS = Prader-Willi syndrome; AS = Angelman syndrome; BWS = Beckwith-Wiedemann syndrome; SRS = Silver-Russell syndrome; UPD14 = uniparental disomy 14; PHP = pseudohypoparathyroidism; AHO = Albright hereditary osteodystrophy; MAS = McCune-Albright syndrome; ICF = immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies; ATRX = α -thalassaemia/mental retardation syndrome, X-linked; Frx1 = Fragile X syndrome; F5HD = facioscapular humeral muscular dystrophy; CHM = complete hydatidiform mole; BICM = familial biparental CHM.

Kanser hücrelerinde, histonlardaki lizinlerin asetilasyonunda ve metilasyonunda artış ve azalmalar olmaktadır. Kanser hücrelerinde H4-K16 asetilasyonunun ve H4-K20'deki trimetilasyonun ortadan kaybolduğu ve heterokromatin yapısında bozulmaya yol açtığı saptanmıştır. Farklı kanser tiplerinde, hatta aynı kanser tipinin değişik evrelerindeki histon modifikasyon paternleri özdeş değildir. Tümör tiplerini farklı epigenetik paternlere göre sınıflandırmak, farklı tipleri birbirinden ayırmada yardımcı olabilir, hatta gelecekte histon modifikasyon paternlerini incelemek kanserin erken tanısına yardımcı olabilir.

Genomun epigenetik durumundaki değişikliklerin ters çevrilebilir olması kanser tedavisinde yeni bir umut ışığı yakmaktadır. DNA metiltransferazlar ile histon deasetilazlar gibi enzimleri inhibe ederek, tümör-supresör genlerinin epigenetik olarak susturulmasını engelleyebilecek ya da bu genlerin yeniden aktivasyonunu sağlayabilecek yeni kanser ilaçlarının geliştirilmesi üzerine yoğun çalışmalar başlamıştır. Günümüzde, epigenetik inhibisyon için geliştirilmekte olan ilaçların ana hedefleri DNA metil transferazlar ve histon deasetilazlardır.

Epigenetik gen susturulmasında rol alan karmaşık etkileşimler ağı, klinik olarak etkin bir tedavi için çeşitli ilaçların beraber kullanılmasının daha doğru olacağını göstermektedir. Gerçekten de, DNA metiltransferazlar ile histon deasetilazların inhibitörlerinin birlikte

kullanımının epigenetik olarak susturulmuş genlerin yeniden aktivasyonunda başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu yaklaşım klinik olarak test edilmeye başlamak üzeredir.

Table 1. Epigenetic inhibitors

Inhibitor	Alternate name	Comments
DNA methyltransferase inhibitors		
5-Azacytidine	Vidaza	FDA approved for MDS
5-Aza-2'-deoxycytidine	Decitabine, dacogen	Phase I/II
Arabinosyl-5-azacytidine	Fazarabine	Phase I/II
5-6-Dihydro-5-azacytidine	DHAC	Phase I/II
5-Fluoro-2'-deoxycytidine	Gemcitabine	Phase I/II
EGX30P	Oligonucleotide	Allosteric inhibitor
Epigallocatechin-3-gallate	EGCG	Green tea polyphenol
Hydralazine		Cardiovascular drug
MG98	DNMT1 antisense	Phase II
Procainamide		Cardiovascular drug
Procaine		Anesthetic
RNAi		
Zebularine		
Histone deacetylase inhibitors		
Apicidin		
Butyrates		Phenylbutyrate, phase II
m-Carboxycinnamic acid	CBHA	
bishydroxamide (CBHA)		
Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 1	CHAP1	TSA-Trapoxin Hybrid
Depudecin	Epoxide	
FK228	Depsipeptide, FR901228	Phase I/II
MS-275	Benzamidine	Phase I
LAQ824		Phase I
Oxamflatin		
MGCD0103		Phase I
PXD101		Phase I
Pyroxamide		Phase I
RNAi		
Suberic Bishydroxamic Acid	SBHA	
Suberoylanilide Hydroxamic Acid	SAHA	Phase I/II
Trichostatin A	TSA	High toxicity
Trapoxin A		Irreversible inhibitor
Valproic acid		

Epigenetik, sadece kanser terapisinde değil, tanısında da yeni yaklaşımların gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Bir gen lokusunun epigenetik durumunun belirlenmesinde (1) gen ifadesinin ölçümü, (2) histon modifikasyonlarının ve histon bileşiminin belirlenmesi, (3) promotor DNA metilasyonunun incelenmesi, olmak üzere üç temel yaklaşım uygulanmaktadır. Bu yöntemler arasında en güvenilir olarak görüleni CpG adacıklarındaki hipermetilasyonun ölçülmesidir.

DNA metilasyon markerları kanserin sınıflandırılması ve saptanmasında kullanılabilir. Genlerin promotorundaki metilasyon durumu genel prognoz ya da belirli bir terapiye cevabı öngörmek için incelenebilir. Bir çok kanser tipinde, belirli genlerdeki hipermetilasyon ile prognoz arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Özellikle, metastaz için E-cadherin (CDH1) geninin promotorunda hipermetilasyonun ön koşul olduğu düşünülmektedir.

Çalışmalar ilerledikçe, tümör-supresör genlerin susturulması gibi bir takım epigenetik değişiklikler malignansi gelişiminin erken evrelerinde, hatta malignant olmayan ya da henüz kanserleşmemiş hücrelerde de saptanmaktadır. Henüz kanserleşmemiş hücrelerde saptanan epigenetik anomaliler, DNA metilasyonunun hastalığın risk değerlendirmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Epigenetik ilaçlar, bozulmuş heterokromatik bölgeleri hedefleyerek, tümör-supresör genlerin ve/veya hücrenin normal fonksiyonu için gerekli olan diğer genlerin yeniden aktivasyonunu sağlarlar. Bu ilaçlar tek başlarına ya da diğer terapik yöntemler veya ilaçlarla birlikte kullanılabilir. Örneğin, tümör-supresör genlerin ve DNA onarım mekanizmalarının yeniden aktivasyonu ile hücreler kimyasallara duyarlı hale gelebilir ve bundan sonra başka bir yöntemle tedaviye iyi cevap alınabilir.

Epigenetik terapi, özellikle epigenetik anomali saptanmış fakat henüz neoplastik lezyonların oluşmadığı bireylerde, kemopreventif yaklaşımlarda da yararlı olabilir. Eğer bu "epimutasyon"lar düzeltilebilirse, bireyde tümör oluşumu geciktirilebilir hatta tamamen engellenebilir.

Yaşlanmada Epigenetik Değişiklikler: DNA metilasyonundaki azalma ve artmaların yaşlanma süreciyle ilişkili olduğu görülmektedir ve bu yaşlanmaya bağlı epigenetik değişikliklerin yaşlı bireylerde görülen kanser, nörodejenerasyonlar ve otoimmün bozukluklarda rol oynadığı düşünülmektedir. Yaşlı bireylerde görülen bu metilasyon paternlerindeki sapmaların gen ifadesinin kontrolünde aksamalara yol açtığı ve genomun kararsızlığının artmasına neden olduğu ve bu sayede yaşa bağlı hastalıkların, özellikle kanser ve nörodejenerasyonlar gibi, oluşumuna zemin hazırladığı düşünülmektedir.

Nöropsikiyatrik Bozukluklar: Son zamanlarda, kompleks psikiyatrik, otistik ve nörodejenaratif bozukluklarda epigenetik değişikliklerin rolü üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Şizofreni ve davranış bozukluğu hastalıklarında, aralarında DNMT genlerinin de bulunduğu, DNA yeniden düzenlenmelerinin rolü olduğu yolunda birçok çalışma yapılmıştır.

EPIGENOMİK

Epigenomik, epigenetik ve genom bilimlerinin heyecan verici yeni bir dalıdır ve tek bir genden çok daha büyük bir alanda, yani tüm genom çapında, meydana gelen epigenetik modifikasyonları inceler. Henüz çok yeni olduğu için, epigenom konusunda günümüzde yeterli bilgiye sahip olmamakla birlikte, bu konuda çalışmalar yoğunluk kazanmaktadır.

Epigenomik veriler, genomik bilimlerine birçok yeni katkıda bulunmaya adaydır. Öncelikle, epigenetik bilgi, tek bir gende yüzlerce metilenmiş sitozin ve düzinelerce histon modifikasyonu taşıyabildiği için, doğası gereği multiplektir. İkinci olarak, epigenetik bilgi, kesikli olan dizi bilgisinin tersine, kantitatifdir. Dokulara özgü olarak belirli lokuslarda kısmi metilasyon görülebilir ve görülen metilasyonun yoğunluğunda farklılıklar olabilir. Ayrıca, memeli genomundaki regülatör dizilerin fonksiyonunun anlaşılmasında katkı sağlayabilir. Gerçekten de, birçok kompleks organizmanın genomunda non-coding diziler coding dizilerden çok daha büyük yer tutmaktadır ve bunların regülasyonda rol oynadığı düşünülmektedir. Son olarak, DNA'nın nükleus içindeki topolojik konformasyonunun epigenetik olarak kontrol edildiği düşünülmektedir ve son yıllarda yapılan çalışmalar bu düzenlemenin gen regülasyonunda çok önemli rolü olduğunu göstermektedir.

Geçmişte, büyük ölçekli epigenomik yaklaşımlar teknolojik yetersizliklerden dolayı gerçekleştirilememiştir ancak günümüzdeki microarray teknolojisi bunun için gerekli deneylerin yapılmasına zemin hazırlamıştır.

DNA Metilasyon Çalışmaları: DNA metilasyonun saptanması DNA dizisindeki sitozin ile 5-metilsitozinin ayırtedilmesine dayanır. Metilasyonun saptanması için 3 temel strateji kullanılmaktadır: (1) DNA'nın metilasyona duyarlı bir restriksiyon endonükleaz ile kesilmesi; (2) DNA'nın sodyum bisülfat ya da metabisülfat ile kimyasal olarak modifikasyonu; (3) 5-metilsitozinin imünopresipitasyonu ile genomun metilenmiş ve metillenmemiş bölgelerinin birbirinden ayrılması.

Restriksiyon enzimlerinin kullanımına dayalı tekniklerden biri "restriction landmark genome scanning" (RLGS) tekniğidir. 2 boyutlu bir yaklaşımla uygulanan RLGS, restriksiyon enzim polimorfizmleri ve DNA metilasyon duyarlı bölgelerini kullanır. Ancak duyarlılığı düşük ve oldukça zaman alan bir yöntem olduğundan günümüzde pek tercih edilmemektedir.

Daha başarılı bir yöntem olarak, metilasyona duyarlı NotI enzim kesiminden elde edilen fragmentlerin biyotininle işaretlenmesinden sonra BAC arraylerinde hibridizasyonu kullanılmıştır. Bu sayede farklı tip hücrelerle (astrocyte ve periferel kan lenfositleri) yapılan çalışmalar sonucu insan, rat ve farelerde korunmuş olan bir metilasyon farklılığı saptanmıştır.

Restriksiyon enzim kesimi ile microarrayleri birlikte kullanan diğer bir yöntem ise HELP (HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR) olarak bilinir. Bu yöntemde, metile olmayan DNA ve genomik DNA'nın farklı hibridize olmasından yararlanılır

ve HpaII kesim fragmentleriyle, metilasyona duyarlı olmayan MspI fragmentlerinin birlikte hibridizasyonu ile gerçekleştirilir.

DNA'nın bisülfitle muamele edilmesi, sitozinin urasile dönüşmesine neden olur. Bu reaksiyondan yararlanılarak geliştirilen yöntemde, PCR'dan sonra yapılan DNA sekans analizinde metillenmemiş sitozinler timin olarak okunur, metilenmiş olanlar ise sitozin olarak kalırlar, böylece metillenmiş ve metillenmemiş DNA saptanabilir.

Üçüncü epigenomik yaklaşım ise ChIP (chromatin immunoprecipitation) yönteminden yola çıkılarak geliştirilmiştir. Anti-metilsitozin antبادileri kullanılarak metilenmiş DNA'nın genomdan izole edilmesi sağlanır, ve MeDIP (methlyated DNA immunoprecipitation) olarak adlandırılır.

ChIP Çalışmaları: ChIP, hücrenin kromatin durumunun saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA ve ilişkili olduğu proteinlerin kimyasal muamele ile çapraz bağlanmaları sağlanarak, DNA-protein kompleksleri aranan histon modifikasyonuna uygun bir antبادi ile immunopresipite edilir. Bu yöntem microarray çipleriyle uygulandığında hızlı ve sağlıklı analizler yapılabilmektedir ve "ChIP on chip" olarak adlandırılmaktadır. Yöntem, uygulayıcısına esneklik sağlamak ve spesifik ya da daha genel antبادiler kullanılarak istenilen bölgelerdeki histon modifikasyonları incelenebilmektedir.

Table 2. Emerging new technologies in epigenomic science

Epigenomic modification	Technique	
DNA methylation	BAC arrays coupled to <i>NotI</i> digestion	Biotin-labeled DNA is generated from end-filling of genomic DNA samples digested with the rare-cutting methylation-sensitive restriction endonuclease <i>NotI</i> . The samples are then hybridized onto a microarray of BAC clones
	HELP	The HELP assay co-hybridizes <i>HpaII</i> digestion products (unmethylated DNA enrichment) with digestion fragments from a methylation-insensitive isoschizomer (<i>MspI</i>) onto a customized array
	MSDK	MSDK uses methylcytosine-sensitive restriction endonucleases to discriminate methylated from unmethylated DNA and maps their position in the genome using SAGE
	Bisulfite treatment	Bisulfite treatment of DNA converts cytosine to uracil unless the base is methylated, allowing one to discriminate methylated from unmethylated DNA. The converted product can be read using high-throughput sequencing or MALDI-TOF mass spectrometry
	MethyLight	Fluorescence-based real-time PCR technique that quantifies methylated DNA by using primers that anneal differently to bisulfite-treated DNA
	MeDIP	Immunoprecipitation of methylated DNA by an antibody specific for 5-methylcytidine. Enriched fraction is hybridized to a CGH array in order to simultaneously investigate methylation changes and DNA mutation
	GMAT	Following ChIP, DNA is ligated to biotinylated linkers and bound to streptavidin beads. Digestion with <i>NlaIII</i> cleaves the ChIP DNA, a linker with <i>MmeII</i> restriction site is added, concatemerized and then cleaved with <i>MmeII</i> to form 21 and 22 bp fragments for sequencing
	Chromatin modifications	ChIP on chip
SACO		ChIP product is ligated to PCR adapters. Following digestion with <i>NlaII</i> , the material is divided into two pools and ligated to distinct <i>MmeI</i> adaptors. The adaptors are bound by streptavidin and released by digestion to produce tags. Tags are concatemerized and sequenced
ChIP-PET		Immunoprecipitated DNA is cloned into a DNA library and then converted into paired-end ditags (PETs). The PETs are concatenated and cloned into a ChIP-PET library for sequencing
DNase I	QCP	Isolate intact nuclei, half are treated with DNaseI. Primers are designed to amplify ~250 bp fragments across candidate gene loci. The relative number of intact amplicons is calculated and treated sample versus control. A plot of ratios according to genomic position is performed and a regional baseline of sensitivity is determined. Outliers are identified as hypersensitive sites and likely regulatory elements

İnsan Epigenom Projesi: Son iki yıl içinde, organize bir insan epigenom projesinin gerekliliği üzerinde epigenetikçiler fikir birliğine vardılar. Avrupa’da bu yolda bir adım atıldı ve Sanger Center, Epigenomics AG ve The Centre National de Génotypage birlikte Human Epigenome Consortium’u kurdular ve kromozom 6 üzerindeki MHC bölgesinde bulunan 150 lokusu incelediler ve araştırma 4 kromozomu kapsayacak şekilde genişletildi.

İkinci bir grup ise, 37 araştırma grubunu kapsayan Epigenome Network of Excellence adıyla kuruldu, ayrıca son olarak da AB tarafından finanse edilen ve 11 akademik merkez ile 2 şirketi kapsayan “HEROIC” (High Throughput Epigenetic Regulatory Organisation in Chromatin” kuruldu.

Ayrıca ABD’de başlatılan ve dünya çapında katılımı gerçekleştirilen bazı workshop çalışmalarında uzun dönemde 1bç çözünürlüğünde metilasyon paternlerinin ortaya çıkarılması konusunda fikir birliğine varıldı.

Epigenomik, epigenetik ve genomik bilimlerinin birleştiği yeni bir disiplin olarak ortaya çıkmıştır. Epigenomik araştırmanın amacı, genetik regülasyonu anlamak ve bunun hücreSEL büyüme ve farklılaşmaya etki ile yaşlanma ve hastalıklardaki rolünü aydınlatmak olarak özetlenebilir.

KAYNAKÇA

- 1- Adele Murell, Vardhman K. Rakyan, Stephan Beck, From genome to epigenome, *Human Mol. Gen.*, 2005, vol 14, review issue 1, R3-R10.
- 2- David Rodenhiser, Mellissa Mann, Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications., *CMAJ*, january 31, 2006, 174(3) 341-348.
- 3- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P.A., Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, (429) 2004,457–463
- 4- Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* (293) 2001, 1074–1080
- 5- Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* (293) 2001, 1074–1080
- 6- Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* (16) 2002, 6–21.
- 7- Pauline A. Callinan and Andrew P. Feinberg, The emerging science of epigenomics., *Human Mol. Gen.* 2006, vol 15, review issue 1 R95-R101