

DNA Metilasyonu ve Hastalıklarla İlişkisi

Cansın Güler¹, Banu Balcı Peynircioğlu¹

¹Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Cansın Güler, Uzm. Biol
Banu Balcı Peynircioğlu, Doç. Dr.

ÖZET

DNA metilasyonu, yeni gelişmelerle birlikte araştırmacılara merak uyandıran en temel epigenetik mekanizmalardan biridir. Teknolojinin gelişmesiyle hızlı ilerlemeler kaydeden analiz yöntemleri sayesinde metilasyonun farklı rollerinin ortaya çıkması, özellikle hastalıklar üzerindeki etkilerinin keşfedilmesini kolaylaştırmıştır. DNA'nın kimyasal değişimiyle genlerde ifadesel farklılıklar sağlayan bu mekanizmada meydana gelebilecek bir hata ya da düzensizlik, birçok hastalığın temelinde yatan sorunları oluşturabilir. DNA metilasyonunun bilinmeyen yönlerinin ortaya çıkarılması, hastalıkların patogenezinin aydınlatılmasına büyük katkılar sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: DNA metilasyonu, epigenetik

DNA METHYLATION AND ITS RELATION WITH DISEASES

ABSTRACT

DNA methylation is one of the most investigated epigenetic mechanisms in recent years. With advances in technology, analysis related to this mechanism has shown that methylation has different effects on specific diseases. DNA methylation is a biochemical process that results in differences in expression of many genes, errors in which may be linked to a variety of human diseases. Understanding the unknown etiology of DNA methylation may contribute to explaining the pathophysiology of related diseases.

Key words: DNA methylation, epigenetics

İlk kez 1940'lı yıllarda kullanılan *epigenetik* terimi, DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (1,2). Son yıllarda, gelişen teknolojiyle birlikte epigenetik alanında yapılan çalışmalar büyük ölçüde hız kazanmıştır. Epigenetik olayların özellikle insanlar üzerindeki önemli etkilerinin keşfedilmesi, hastalıklarla ilişkisinin kurulmasını da sağlamıştır. Birçok hastalık, epigenetik mekanizmaların düzenlenmesindeki hatalardan dolayı ortaya çıkmaktadır (3). Epigenetik mekanizmaların birbiriyle uyum içinde etkileşmesi ve düzenlenmesi, organizmanın normal bir embriyonik gelişim geçirilebilmesi için çok kritiktir. Bu süreçte, aynı genetik diziye sahip hücreler, farklı ifade profilleri sergileyerek değişik fenotipler gösterirler. Bir organizmada tek bir atasal hücreden çok farklı hücre tipinin oluşması, genlerin farklı yer ve zamanlarda ifade olmalarından kaynaklanmaktadır. Epigenetik mekanizmalar, yer-zaman parametresine bağlı olarak, belirli genlerin ifade olmasını sağlarken belirli genlerin ifadesini de baskılamaktadır (4). Bunu sağlayan mekanizmaların herhangi birindeki bir hata ya da düzensizlik, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik kaynaklı hastalıkları meydana getirmektedir (5).

İletişim:

Doç. Dr. Banu Balcı Peynircioğlu
Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
Tel: +90 312 305 25 41
E-Posta: banupeynir@yahoo.com

Gönderilme Tarihi : 17 Nisan 2015
Revizyon Tarihi : 25 Mayıs 2015
Kabul Tarihi : 28 Mayıs 2015

DNA metilasyonu ve gen ifadesindeki rolü

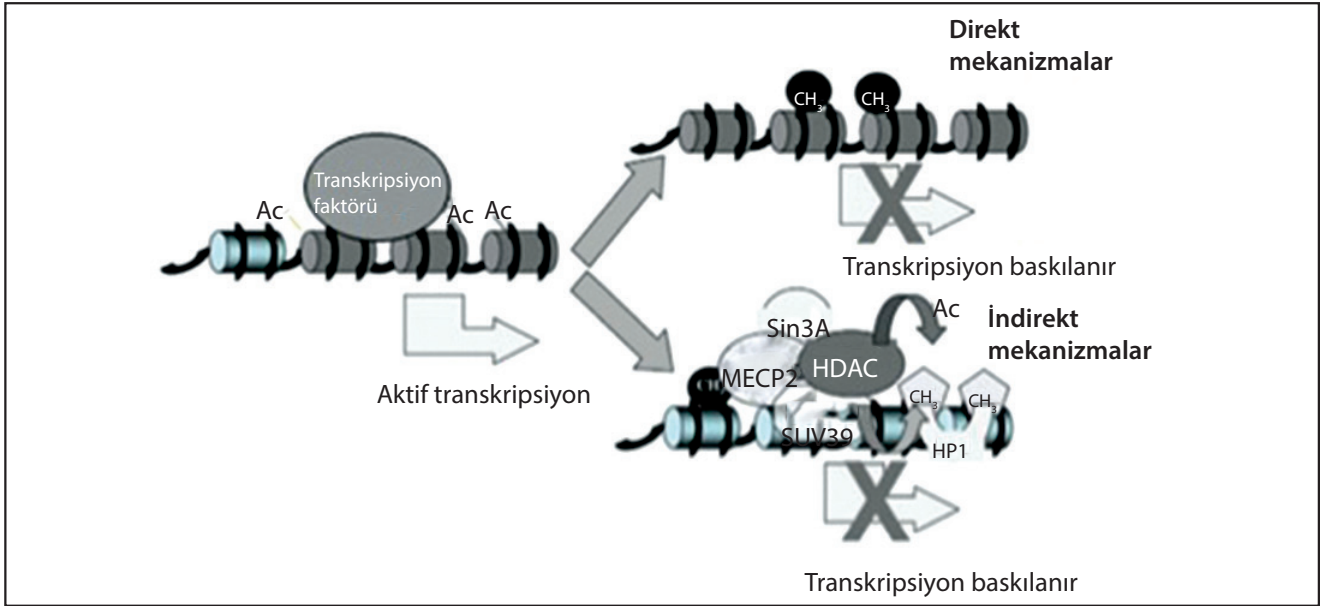
Ökaryotik hücreler gen ifadesi kontrolünü sağlayabilmek için çekirdekte yüksek derecede kontrol edilen, dinamik ve karmaşık bir yapı olan kromatini kullanırlar. Kromatin yapısı, yapısal ve kimyasal birtakım değişimlere uğrayarak gen ifadelerini etkilemektedir. DNA'nın çok sıkı paketlenmiş formu olan kromatin yapının DNA replikasyonu sırasında açılmasıyla, kalıp zincirde var olan yapısal ve kimyasal modifikasyonlar, diğer bir deyişle "epigenetik işaretler" yeni sentezlenen zincirlere aktarılır ve bu şekilde her bir replikasyon sırasında hücreden hücreye korunur (3). Kromatin yapı üzerinde meydana gelen epigenetik modifikasyonların genlerin ifadelerini etkilemesi, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi temel epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (6).

Son dönemlerde üzerinde çok çalışılan ve hakkında en çok bilgi sahibi olunan epigenetik mekanizma DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, kovalent bir modifikasyondur ve sitozin (C) bazının 5. karbonuna bir metil grubu (-CH₃) takılmasıyla 5-metil sitozin (5m-C) yapısının oluşmasıyla karakterize edilir (7). Bu kimyasal tepkime, DNA metil transferazlar (DNMT) tarafından katalizlenmektedir. Bu enzimler, metil grubu donörü olan S-adenozil-L-metiyonin (SAM)'den metil grubu alarak sitozinin 5. karbonuna transfer ederler. Memelilerde bilinen beş DNA metil transferaz enzimi vardır; DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L ve DNMT2. En önemli katalitik aktivitelere sahip olan enzimler DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'dir. DNMT1, DNA zincirinde kurulu olan metilasyon paternlerinin yeni zincirlere aktarılmasından sorumludur. DNMT3A ve DNMT3B'de novo metil transferazlar olarak adlandırılırlar ve gelişimin erken evrelerinde kurulan ilk metilasyon paternlerinin oluşturulmasından sorumlulardır (8).

DNA metilasyonu, genomdaki sitozin (C) ve guanin (G) çiftlerinin ardarda sıralanmasıyla oluşan ve CpG dizilerinin yoğunlaştığı bölgelerde gerçekleşmektedir. İnsan genomunda yaklaşık olarak 28 milyon CpG dizisi bulunmaktadır. Bu dizilerin %10'dan azı, CpG adacıkları olarak adlandırılan 500 baz çiftinden büyük ve GC içeriğinin %55'den fazla olduğu bölgelerde bulunmaktadır. Evrimsel süreçte korunmuş olan CpG adacıkları, genellikle genlerin promotor bölgelerinde yerleşim göstermektedir. Yaygın olarak, organizmanın gelişimi ve sağ kalımı için sürekli olarak ifade edilmesi gereken *housekeeping* ve düzenleyici genlerdeki CpG adacıkları, DNA metilasyonuna karşı dirençli bölgelerdir. Bunun yanında, tekrar dizileri ve transpozonlar gibi heterokromatin bölgelerdeki CpG dizilerinde ise, DNA metilasyon oranı yüksektir. Bu bölgelerin metillenmiş durumda olması ile transkripsiyon baskılanmakta ve bu elementlerin genom içi hareketi engellenerek

kromozomun kararlı yapıda kalması sağlanmaktadır (9,10). Buna ek olarak; uzun dönem baskılanması gereken inaktif X kromozomundaki genler, *imprinted* genler, gametlerde ifade olması gereken genler ve bazı dokuya özgül genler de, yer ve zaman durumuna bağlı olarak metilasyona uğramaktadır (5). Sitozine metil grubunun takılmasıyla DNA'da oluşan "epigenetik işaret" genlerin hangi hücrede ifade olup hangi hücrede ifade olmayacağını belirlemektedir. Genel bir algı olarak DNA metilasyonu, promotor bölgedeki CpG adacıklarının metillenmesini sağlayarak o genin susturulmasını sağlamaktadır. Bu durumun gerçekleşmesi için iki mekanizma öne sürülmüştür; direk ve indirek mekanizmalar (Şekil 1). Direk mekanizmalarda, genin promotor bölgesine transkripsiyon faktörlerinin bağlanması fiziksel olarak engellenmesi söz konusudur. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesindeki metillenmiş CpG'ler, transkripsiyon faktörlerinin buraya bağlanmasını yapısal olarak engeller ve bu şekilde gen ifadesi baskılanır. Bu mekanizmaya alternatif olan ve günümüzde daha çok kabul gören diğer bir mekanizma da indirek mekanizmalardır. Burada, genin promotor bölgesindeki metillenmiş CpG'ler, metil-CpG bağlanma proteinleri (MeCPs) olarak adlandırılan birtakım faktörlerin bu bölgeye bağlanmasını tetiklemektedir. Bu proteinlerin bağlanması, histon deasetilaz ve histon metiltransferaz gibi birçok korepresör proteinin de bölgeye gelmesini sağlamaktadır. Histon deasetilazlar (HDACs), bu bölgedeki histonları deasetile eder ve böylece kromatin yapısı inaktif konfigürasyon kazanır. Histon metiltransferazlar (SUV39) ise, H3 histonunu 9. lizin pozisyonundan (H3K9) metiller ve inaktif kromatin yapısını daha da sağlamlaştırır. H3K9 metilasyonu aynı zamanda bölgeye heterokromatin proteinini (HP1) ve kromatin *remodelling* proteinlerini (BRM, SIN3A) de bu bölgeye çeker. Sonuçta, genin promotor bölgesinde oluşan bu kompleks yapı genin transkribe olmasını engeller ve gen ifadesi baskılanır (11).

Bugüne kadar DNA metilasyonu ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu, promotor bölgedeki metilasyona odaklanmıştır. Aslında, promotor bölge metilasyonu ile gen sessizleşmesi arasındaki ilişki 1970'lerde tanımlanmıştır. Promotor bölgedeki CpG adacıklarının metillenmesi ve bunun gen ifadesini baskıladığının keşfi, DNA metilasyonunun işlevi hakkında genel algının şekillenmesini sağlamıştır. Şimdilerde ise, DNA metilasyonu ve gen sessizleşmesi arasındaki ilişkinin belirsiz olduğu gündemdedir. DNA metilasyonu, gelişen genom-boyu metilasyon haritalamaları sayesinde; transkripsiyon başlama bölgelerinde, ekzon ve intron bölgelerinde, düzenleyici bölgelerde ve tekrar dizilerinde de analiz edilebilmektedir (12). X kromozomu üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, gen içinde gerçekleşen metilasyon ile aktif transkripsiyon arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur (13). Gen içindeki metilasyonun transkripsiyonu



Şekil 1. DNA metilasyonu ile gen ifadesinin baskılanmasını sağlayan iki mekanizma. DNA'sı metillenmemiş ve histonları asetile halde olan bir gen bölgesine transkripsiyon faktörleri kolayca bağlanır ve bu şekilde gen ifade edilir. Direkt mekanizmalar ile gerçekleşen metilasyonda, metillenmiş DNA'ya transkripsiyon faktörleri bağlanamaz ve transkripsiyon baskılanır. İndirekt mekanizmalarda ise, metillenmiş DNA metil-CpG bağlanma proteinlerini (MecP2), korepresörü SIN3A'yı, histon metil transferazları (SUV39), histon deasetilazları (HDAC) ve heterokromatin proteinlerini (HP1) bölgeye doğru çeker. Bu şekilde metillenmiş DNA üzerinde oluşan kompleks protein yapısı gen ifadesini baskılar (11).

engellemediği hatta transkripsiyonun uzamasını tetiklediği önerilmiştir. Promotor bölgedeki metilasyon gen ifadesi ile negatif korelasyona sahipken, gen içindeki metilasyonunun gen ifadesi ile pozitif korelasyona sahip olmasının açıkça bir paradoks olduğu da vurgulanmıştır (12). Bu açıdan bakıldığında, DNA metilasyonunun gen ifadesi üzerine etkilerinin hem baskılama hem de ifadeyi artıma yönünde olabileceği göz ardı edilmemelidir.

DNA metilasyonu analiz yöntemleri

Bugüne kadar geliştirilen DNA metilasyonu analiz yöntemleri, DNA dizisindeki sitozinlerle 5-metil sitozinlerin ayırt edilmesi esasına dayanmaktadır (14). DNA metilasyonu analizleri için, çalışma alanının amacına uygun bir yöntem seçilmesi önemlidir. Buna göre, analiz yöntemleri iki genel başlık altında toplanabilir. Bunlar, global metilasyon analizleri ve gene-ölgül metilasyon analizleridir (Şekil 2) (15).

Global metilasyon analizleri

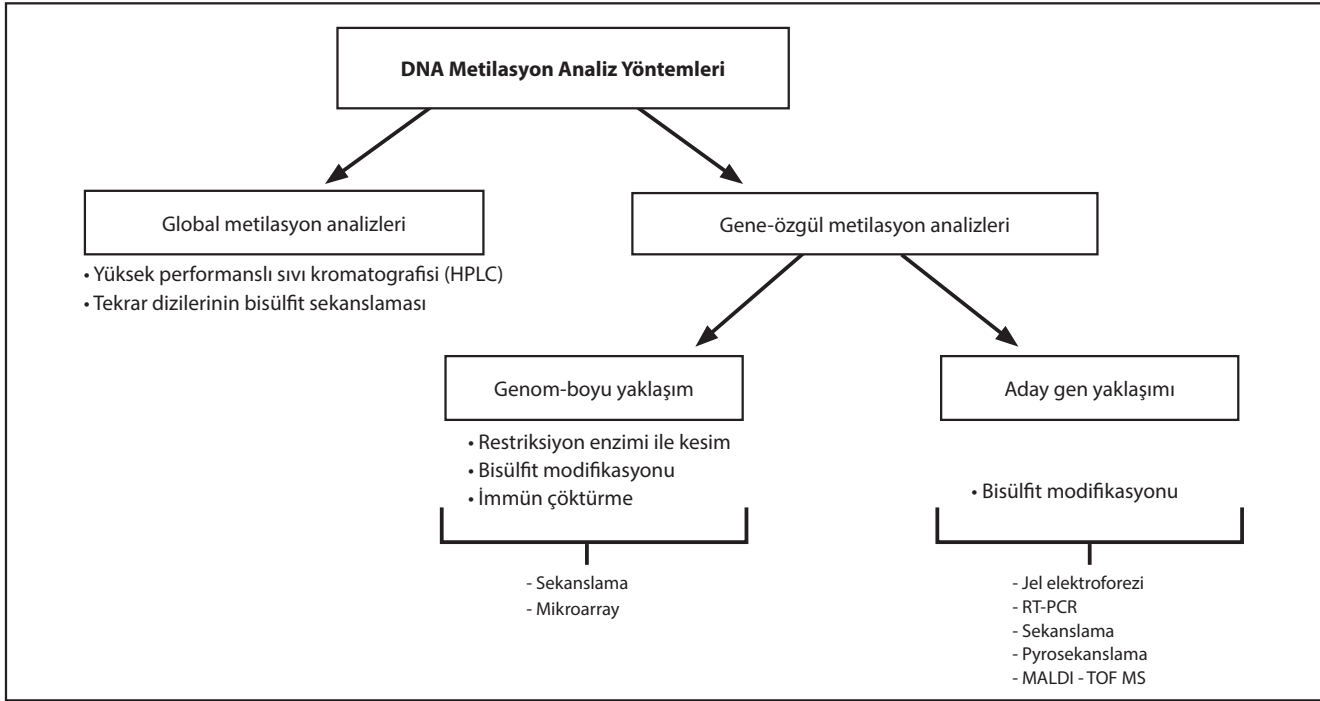
Global metilasyon analizleri, bir organizmanın genomunda bulunan tüm 5m-C'lerin yoğunluğunu analiz etmeye yarayan yöntemleri içermektedir. Global DNA metilasyonunun ölçülmesinde kullanılan en tipik yöntem Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)'dir (16). Kantitatif bir yöntem olmasına karşın, analizler çok miktarda ve yüksek kalitede genomik DNA gerektirmektedir. Ayrıca bu yöntem yüksek-ölçekli analizler için uygun değildir. HPLC

yöntemine alternatif olarak, daha az miktarda DNA gerektiren bisülfid-bazlı PCR yöntemleri de mevcuttur. Bu yöntemlerde; LINE, SINE gibi tekrar bölgelerindeki metilasyon oranları ölçülmektedir (17). Memeli genomundaki metillenmiş CpG'ler, %70-80 oranında tekrar bölgelerinde bulunmaktadır. Bundan dolayı, metillenmiş CpG yoğunluğu ölçülmesinde tekrar bölgelerinin analiz edilmesi global yoğunluk hakkında doğru bilgi vermektedir. Bu yöntemlerde, DNA'ya bisülfid modifikasyonu uygulanır ve ardından PCR ile amplifiye edilir. Daha sonra elde edilen tüm genoma ait PCR ürünleri, yeni nesil sekanslama gibi yüksek-ölçekli yöntemlerle analiz edilerek genomdaki 5m-C yoğunluğu belirlenir.

Gene-ölgül metilasyon analizleri

Gene-ölgül metilasyon analizleri, genom-boyu ve aday gen yaklaşımları olarak iki kategoride incelenebilmektedir (Şekil 2) (15). Genom-boyu metilasyon analizi yaklaşımı, genomdaki bütün gen bölgelerinin yüksek-ölçekli teknolojiler kullanılarak metilasyon açısından taranmasını kapsayan yöntemleri içermektedir. Bu yaklaşımda; üç temel yöntem olan restriksiyon enzimleriyle kesim, bisülfid modifikasyonu veya immün çöktürme işlemlerinin ardından mikroçip ya da yeni nesil sekanslama yöntemleri ile yüksek-ölçekli analizler yapılır (14).

Restriksiyon enzimleri ile kesim yönteminde, enzimler metillenmiş ya da metillenmemiş DNA'yı tanıyıp kesim yapacak şekilde adapte edilebilmektedir. Enzim kesiminden sonra oluşan fragmentlere adaptör ligasyonu yapılır.



Şekil 2. Çalışma alanının amacına göre global ve gene-özümlü olarak iki büyük sınıfa ayrılan DNA metilasyon analiz yöntemleri.

Fragmentler PCR ile amplifiye edilir ve mikroarray ile hibridizasyon gerçekleştirilir. Restriksiyon temelli yöntemlerin dezavantajı, metilasyon analizinin sadece enzimin tanıdığı bölgelerle kısıtlı olmasıdır (14,15).

DNA metilasyon analizlerinin gelişmesine en büyük katkıyı sağlayan yöntem şüphesiz bisülfid modifikasyonudur. Sodyum bisülfid modifikasyonu, DNA'daki metillenmemiş sitozinlerin urasile dönüşmesi ve metillenmiş sitozinlerin değişmeden kalması temeline dayanmaktadır (18). Modifikasyon işleminden sonra PCR ile amplifikasyon ve ardından sekanslama ile DNA'daki metillenmiş ve metillenmemiş bölgeler ayırt edilebilir. Bisülfid modifikasyonu, metilasyon analizleri için altın bir standart olmuştur ve bu yöntemeye dayalı birçok metodoloji geliştirilmiştir. Bisülfid-bazlı yöntemlerin gelişmesiyle birlikte hem gene-özümlü hem de genom-boyu çalışmalarında tek nükleotit rezolüsyonunda analizler mümkün olmuştur (15).

Metillenmiş bölgeleri analiz etmek amacıyla, 5m-C'lere bağlanan metil-spesifik proteinlere özgü antikorlar üretilmiştir. Bu antikorların kullanımıyla immün çöktürmeye dayalı metodlar geliştirilmiştir (19). DNA önce sonikasyona uğratarak denatüre edilir. Metillenmiş bölgelere bağlanan proteinlere özgü antikorlar kullanılarak immün-çöktürme işlemi yapılır. Daha sonra bu bölgeler amplifiye edilir ve oluşan fragmentler mikroarray ya da yeni nesil sekanslama yöntemleri ile analiz edilir.

Aday gen yaklaşımları, daha özgül olarak tek bir gen bölgesinin metilasyon durumunu yüksek-ölçekli teknolojilere nazaran daha basit moleküler teknikler ile incelenmesini mümkün kılan yöntemleri içermektedir. Aday gen yaklaşımlarında, bisülfid-bazlı yöntemler, yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA'ya bisülfid modifikasyonu ve ilgili gen bölgesine özgül polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamalarının ardından jel elektroforezi, (gerçek zamanlı) GZ-PZR, Sanger sekanslama ve pyrosekanslama gibi yöntemlerle devam edilir (15).

DNA'nın bisülfid modifikasyonundan sonra, sadece metillenmiş CpG dizilerine özgül olarak tasarlanan metil-spesifik primerler kullanılarak DNA amplifiye edilir ve oluşan fragmentler jel elektroforezinde yürütülür. Bu şekilde metile olmuş ve olmamış bölgelerin ayırt edilebildiği yöntemeye Metilasyon-Spesifik PZR (MSP) denir (20). MSP, hızlı ve yüksek hassasiyete sahiptir ancak kantitatif değildir. Bu yöntemin kantitatif sonuçlar veren alternatifi *MethylLight* yöntemidir (21). Bu yöntemde metil-spesifik primerlere ek olarak metil-spesifik floresan işaretler kullanılır ve amplifikasyon GZ-PZR cihazı ile gerçekleştirilir.

Aday gen yaklaşımlarında en çok tercih edilen yöntemlerden biri de, bisülfid sekanslamadır. Bisülfid işleminden sonra PCR ile çoğaltılan DNA'lar Sanger sekanslama ile analiz edilir. Bu şekilde tek nükleotit bazındaki değişiklikler saptanabilmektedir (22). Kısa ve orta uzunluktaki DNA

dizilerinin analizi için geliştirilen ve bir primer uzama yöntemi olan pyrosekanslama da, metilasyon analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Sanger sekanslamasından farklı olarak, burada dNTP'lerin kalıp zincire eklenmesiyle salınan pirofosfat (PPI) grubunun saptanması söz konusudur. Salınan pirofosfat miktarına bağlı olarak oluşan sinyaller pyrogram ile analiz edilir. Bu şekilde, her bir CpG bölgesindeki metillenmiş ve metillenmemiş sitozinlerin yüzdesi saptanabilir ve miktarı ölçülebilir. Pyrosekanslama, aynı reaksiyonda birden çok CpG bölgesinin metilasyon miktarının kesin olarak belirlenebilmesi yönünden avantajlıdır. Tek dezavantajı, her bir reaksiyonda sadece 25-30 bazlık bölgelerin sekanslanabilmesi ve bunun da analiz edilecek CpG bölgelerini sınırlandırıyor olmasıdır (23).

DNA metilasyonu ve hastalıklar

DNA metilasyonu; embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısının düzenlenmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik "imprinting" ve kromozom stabilitesinin sağlanması gibi birçok hücrel süreçte rol oynayan önemli bir epigenetik mekanizmadır. Metilasyonun bu tip kritik süreçlerde rol alması, onun çok iyi bir şekilde kontrol edilmesini gerektirmektedir. Birçok hastalığın temelinde, epigenetik kontrol sisteminin düzgün bir şekilde çalışmaması yatmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar düzgün bir şekilde kurulamaz ya da devam ettirilemezse, bu süreçle ilgili patolojik sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (5,6). Bu bölümde, anormal DNA metilasyon modelleri ile ilişkili olan beş grup hastalıktan bahsedilecektir. Bunlar; "imprinting" hastalıklar, üçlü tekrar hastalıkları, mekanizma ile direk ilişkili hastalıklar, kanser ve inflamatuvar hastalıklardır (Tablo 1) (5).

İmprinting hastalıklar

Genetik materyalin anneden ya da babadan kalıtılmasına bağlı olarak farklı ve monoallelik ifade oluşumuna genomik imprinting denir. Yoğun CpG adacıklarına sahip "imprinted" genlerin en önemli özelliği, farklı allellere özgü olarak metilasyon paterni göstermeleridir. Bu genlerin ifadesi imprinting kontrol bölgeleri (IKB) tarafından düzenlenmektedir (24,25). Bu hastalık grubunun en karakteristik örnekleri Prader-Willi ve Angelman sendromlarıdır. 15. kromozomda paternal ve maternal olarak monoallelik ifadeye sahip bir seri gen bulunmaktadır. Bu genlerin ifadesini düzenleyen IKB, iki parçalı yapısıyla paternal ve maternal kromozomda bulunan farklı genlerin "imprinting" mekanizmasını kontrol etmektedir. Paternal kromozomdaki *Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N* (SNRPN) geninin promotörü ve IKB delesyonu Prader-Willi sendromuna yol açmaktadır. Delesyon sonucu imprinting mekanizması kontrol edilemez ve farklı metilasyon

durumları ortaya çıkar. Monoallelik paternal ifade göstermesi gereken bir seri gen metillenir ve baskılanır (26-28).

15. kromozomun maternal alelinde dokuya özgül monoallelik ifade göstermesi gereken *Ubiquitin-protein ligase E3A* (UBE3A) geni bulunur. Aynı şekilde, IKB'de bir delesyon sonucu imprinting mekanizması kontrol edilemez ve UBE3A geni baskılanır. Bu genin diğer imprinted genlerden farkı, dokuya özgü olarak imprinting e uğramasıdır; sadece beyin hücrelerinde maternal alel ifade olur. Bu genin imprinting mekanizmasının bozulması sonucu, beyin hücrelerinde her iki alelde de ifade edilmez ve Angelman sendromu meydana gelir (26,29).

Üçlü tekrar hastalıkları

DNA metilasyon mekanizmasındaki hatalar, birtakım tekrar hastalıklarıyla da ilişkilidir. Genomda bulunan tekrar dizileri belli bir sayıda bulunmalıdır. Bu sayının normalden fazla tekrar ederek artması birçok patolojik durumu beraberinde getirmektedir (30). Bazı tekrar dizilerinin CG içeriğinin fazla olması, bu dizilerin metillenme potansiyelini arttırmaktadır. Normalde belli bir oranda bulunan tekrarların bir şekilde artmasıyla bu bölgeler metilasyon için hedef oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu dizilerde saptanan yüksek metilasyon oranlarının hastalıklarla ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (5). Frajl X sendromu (FRAXA), kalıtsal zeka geriliği ile ilişkili X kromozomuna bağlı bir hastalıktır (31). Bu hastalık, mRNA transportunda görevli olan *fragile X mental retardation 1* (FMR1) geninin 5'UTR bölgesindeki CGG tekrarlarının 200 kopyadan fazla olması sonucu oluşmaktadır. CGG tekrarlarının normalden fazla sayıya ulaşması, anormal metilasyon durumlarını ortaya çıkarabileceği düşünülmüştür. Yapılan araştırmalar sonucunda, hastaların 5'UTR bölgesindeki uzamış CGG tekrarlarında *de novo* metilasyon ve promotör bölge metilasyonu gözlenmiştir (32).

Mekanizma ile ilişkili hastalıklar

Bu grup hastalıklar, DNA metilasyon mekanizmasında rol oynayan genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşan hastalıklardır. Bir otoimmün hastalığı olan sistemik lupus eritematozus (SLE)'de, immün sistemi tarafından üretilen ve kişinin kendi proteinlerini hedef alan oto-antikör üretimi söz konusudur. T hücreleri tarafından sentezlenen oto-antikörler; DNA, kromatin faktörleri, küçük ribonükleer proteinler gibi nükleer komponentleri hedef alır (33,34). T hücrelerinde oluşan DNA metilasyonu ile ilişkili hataların oto-antikör üretimi cevabını oluşturduğu düşünülmektedir. Normalde T hücrelerinde SLE ile ilişkili genler metile durumdadır. SLE'li T hücrelerinde ise tüm genomun global olarak hipometilasyonu ve düşük DNMT1 seviyeleri söz konusudur. Ayrıca, SLE ile ilişkili CD11a

Tablo 1. DNA metilasyon mekanizması ile ilişkili hastalıklar.

	<i>Hastalık tipi</i>	<i>Kromozomal bölge</i>	<i>Etkilenen gen/ gen bölgeleri</i>	<i>DNA metilasyonu ile ilişkisi</i>
“Imprinting” Hastalıklar	Prader-Willi sendromu (PWS)	15q11.2	MKRN3, MAGEL2, NDN, SNURF1, SNRPN, IPW	Paternal alelde de novo metilasyon, IKB'de delesyon, paternal genlerde ifade kaybı
	Angelman sendromu (AS)	15q12	UBE3A, ATPC10C	Maternal metilasyon kaybı, IKB'de delesyon, beyindeki maternal genlerde ifade kaybı
	Beckwith-Wiedemann sendromu (BWS)	11p15.5	IGF2, CDKN1C, H19, ASCL2, KCNQ1, KCNQ10T1	Maternal metilasyon kaybı, maternal alelde de novo metilasyon, IKB'yi bozan translokasyonlar
Üçlü Tekrar Hastalıkları	Frajil X sendromu (FRAXA)	Xq27.3	FMR1	FMR1 5'UTR bölgesinde artan CGG tekrarları, promotorda de novo metilasyon
	Myotonik distrofi (DM1)	19q13.2-q13.3	DMPK, SIX5, diğerleri	DMPK 5' UTR bölgesinde artan CTG tekrarları
	Fasiyoskapulohumeral distrofi (FSHD)	4q35	FRG2, FRG1, SLC25A4 (ANT1)	D4Z4 tekrarlarında hipometilasyon
Mekanizma ile Direk ilişkili Hastalıklar	Sistemik lupus eritematozus (SLE)	Birçok	CD11a, CD70 ve birçok gen	T hücrelerinde global hipometilasyon ve azalan DNMT aktivitesi
	ICF sendromu	20q11.2	DNMT3B	DNMT3B mutasyonu
Kanser	Kolon kanseri	1q21.3	S100A4	Gene-özümlü hipometilasyon ve artan gen ifadesi
	Bütün kanser tipleri	3p22.2, 10q26.3, 9p21.3, 9q21.33, 16q22.1, 16q23.3, 11q13.2	MLH1, MGMT, CDKN2A, CDKN2B, DAPK1, CDH1, CDH13, GSTP1	Gene-özümlü hipermetilasyon ve azalan gen ifadeleri
İnflamatuvar Hastalıklar	Römatoid artrit (RA)	Birçok	Birçok	İnflamatuvar genlerde hipometilasyon ve hipermetilasyon
	Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)	16p13	MEFV	MEFV geni 2. ekzonunda metilasyon ve azalan gen ifadesi

ve CD70 genlerinin promotörlerinde gerçekleşen demetilasyon ile bu genlerin ifadeleri artmaktadır (34,35).

İmmün yetmezliği, sentromerik kararsızlık ve yüz anomalilikleri (ICF) sendromu, çok nadir görülen otozomal resesif kalıtıma sahip bir immün yetmezliği hastalığıdır ve en az iki immunoglobulin izotipinin eksik olması veya önemli oranda azalması sonucu ortaya çıkmaktadır (36). Yapılan araştırmalar sonucu, ICF hastalarının %70'inde DNMT3B geni mutasyonlarının hatalı metilasyonlara yol açtığı görülmüştür. DNMT3B enziminin işlev bozukluğundan dolayı B hücrelerinde kromozom 1, 16 ve 9'daki uydu bölgeleri, inaktif X kromozomundaki genlerin ve genomdaki diğer tekrar bölgeleri hipometile olmaktadır. Bu anormal hipometilasyondan sonucu da gen ifadesi paternleri bozulmaktadır (37-39).

Kanser

DNA metilasyonu ve kanser ilişkisi ilk kez 1983 yılında yapılan bir çalışmada kanser hücre genomlarının normal hücrelere göre hipometile olduğunun bulunması ile ortaya konmuştur (40). Hipometilasyon ya da genomik metilasyon kaybı, kanserin erken evrelerinde sıkça gerçekleşen, hastalık ciddiyetini etkileyen ve birçok tümör tipinde

metastatik potansiyel oluşturan bir durumdur. Normal hücrelerde hipermetile olması gereken, tekrar bölgeleince zengin perisentrik heterokromatin bölgeler, kanser hücrelerinde hipometilasyona uğrayarak onkogenlerin ve metastaz ile ilişkili genlerin ifadesinin artmasına neden olmaktadır. Bu durum, mitotik rekombinasyon artışı ve genomik kararsızlık gibi tümör hücrelerini diğer hücrelerden ayıran karakteristik özelliklerin ortaya çıkmasını tetiklemektedir (41). Kanserli hücrelerde genlerin global olarak hipometile olmasının yanı sıra, gene özgül hipometilasyon da söz konusudur. Tümörögenезin geç evrelerinde gerçekleştiği düşünülen gene özgü demetilasyon, kanser hücrelerinin lokal çevresine adapte olmasını sağlayan ve metastazı tetikleyen bir durumdur (5).

Kanser hücreleri üzerinde yapılan genom boyu demetilasyon çalışmaları, gene özgül hipermetilasyonun da genellikle hipometilasyon olayları ile birlikte gerçekleştiğini göstermiştir (42). Kanser hücrelerindeki anormal hipermetilasyonlar, normalde metillenmemiş halde bulunması gereken CpG adacıklarında gerçekleşmektedir. Normal hücrelerde tümör-baskılayıcı genlerin promotör bölgesindeki CpG'ler metillenmemiş durumda olması nedeniyle transkripsiyon

olayı gerçekleşir. Ancak kanser hücrelerinde, bu tip genlerin CpG adacıklarında nedeni bilinmeyen bir şekilde oluşan *de novo* metilasyon ya da hipermetilasyon durumları transkripsiyonel sessizleşmeye neden olmaktadır. Hücre döngüsü, DNA tamiri, kromatin *remodelling*, hücre sinyalizasyonu, transkripsiyon ve apoptozis gibi süreçlerde rol oynayan genler, hemen hemen tüm tümör tiplerinde anormal bir şekilde hipermetile olarak sessizleşmektedir. Bu durum, tümör hücrelerine büyüme avantajı sağlayarak genomik kararsızlıkta artışa neden olmaktadır (5). Costello ve arkadaşlarının tümör örnekleri üzerinde yaptığı çalışmada, kanser hücrelerinde CpG adacıklarının büyük oranda *de novo* metilasyon veya anormal hipermetilasyona uğradığı, metilasyon durumunun ve miktarının da tümör tiplerine göre değişim gösterdiği belirtilmiştir (43).

İnflamatuvar hastalıklar

Son yıllarda, özellikle hastalık mekanizması ve patogenezi tam olarak anlaşılamayan birtakım otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıkların epigenetik incelemeleri hız kazanmıştır.

2012 yılında Kazuhisa ve arkadaşları tarafından romatoid artritli hastaların DNA metilasyon durumları araştırılmıştır (44). Romatoid artrit, oyna eklemlerdeki inflamasyon ve hücre dışı matris tahribi ile tanımlanan otoimmün hastalıdır. Multifaktöryel bir mekanizmayla ortaya çıktığı düşünülse de kesin nedeni ortaya konamamıştır (45). Romatoid artrit hastalığında rol oynayan sinoviyal hücrelerin, hastalık durumundaki fenotipinin nasıl değişim gösterdiği bilinmemektedir. Farklı DNA metilasyon durumlarının sinoviyal hücrelerin gen ifadelerini ve dolayısıyla işlevini değiştirebileceği düşünülmüştür. Buradan yola çıkılarak, romatoid artritli hastalardan izole edilen sinoviyal hücrelerin DNA metilasyon durumları genom-boyu analizlerle incelenmiştir. Çalışmada bisülfid modifikasyonu, pyrosequanslama ve mikroarray yöntemleri kullanılmıştır. Hastalar ve kontrollerin global metilasyon durumları arasında belirgin bir fark bulunamamasına rağmen daha sonra yapılan genom-boyu analizlerde, 1206 genin farklı metilasyon durumları gösterdiği bulunmuştur. Bu genlerin çoğu inflamatuvar hastalıklarda kritik rollere sahip olan genlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, romatoid artritli sinoviyal hücreler ile kontrol sinoviyal hücreler DNA metilasyonu seviyesinde birbirlerinden ayrılabilmiştir. Ek olarak, hastalık durumunda sinoviyal hücrelerin nasıl değişime uğradığı ve bunun hastalık patogeneziye nasıl katkı sağladığını anlamaya katkı sağlayabilecek bir çalışma olmuştur (44).

2011 yılında Kireçtepe ve arkadaşları tarafından Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastalığına neden olan MEFV geninin 2. ekzonunun DNA metilasyon durumları incelenmiştir

(46). AAA, doğal bağışıklık sisteminin belli aralıklarla ve nedeni bilinmeyen bir şekilde kontrolsüz inflamatuvar cevap oluşturması sonucu ortaya çıkan otoinflamatuvar bir hastalıktır (47). Bu çalışmada düşük MEFV ifade seviyelerinin AAA hastalığı ile ilişkili olduğu ve bu düşük ifadelerin metilasyondan kaynaklandığı hipotezi kurulmuştur. Sağlıklı kontroller ve hasta bireylerde MEFV geninin 2. ekzonunun metilasyon durumları ve MEFV geni ifadesine bakılmıştır. Metilasyon için bisülfid sekanslama yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca, hem gen ifadesi hem de metilasyon deneyleri için hasta ve kontrollerden total periferik kan alınmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, AAA hastalarında yüksek metilasyon oranları ve düşük MEFV ifadesi, sağlıklı kontrollerde ise düşük metilasyon oranları ve yüksek MEFV ifade seviyeleri elde edilmiştir (46). Kan dokusu, fonksiyonel ve gelişimsel olarak farklı hücre popülasyonları barındırmaktadır. Kan hücreleri, farklılaşma süreçlerinin en başında myeloid ve lenfoid kökenli hücreler olmak üzere birbirlerinden fizyolojik ve morfolojik olarak ayrılmaktadırlar (48). Yapılan çalışmalara göre, mononükleer hücrelerde ve granülositlerde 343 gen için %22 oranında farklı metilasyon durumları gözlenmiştir. Özellikle düzenleyici bölgelerdeki metilasyon durumları kan hücreleri arasında büyük farklar göstermektedir (49). AAA hastalığında yapılan bu metilasyon-ifade ilişkisi çalışmasında total periferik kan kullanılmıştır. Lökosit tipleri arasında MEFV ifadesi açısından büyük farklılıkların söz konusu olmasının yanında farklı hücre tiplerinde de farklı metilasyon durumları oluşmaktadır.

Sonuç

Gen ifadesi kontrolünde çok kritik bir mekanizma olan DNA metilasyonunun, hızlı ilerlemeler kaydeden teknoloji ile birlikte farklı işlevlerinin ortaya çıkması, birçok hastalığın patogenezinin anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Bu zamana kadar, hastalıklar ile promotör metilasyonunun ötesindeki potansiyel ilişki büyük oranda görmezden gelinmiştir. Ancak genomdaki farklı bölgelerin metilasyon durumlarının yüksek-ölçekli teknolojilerle açığa çıkarılması, mekanizması tam olarak bilinmeyen hastalıkların anlaşılması için umut verici olmuştur. Metilasyonun özellikle inflamatuvar hastalıklar gibi kompleks düzeneklere sahip hastalıklardaki rolünün tam olarak bilinmemesi, yeni araştırmaların önünü büyük ölçüde açacaktır. Epigenetik alanında gün geçtikçe artan heyecan verici gelişmeler, birçok hastalığın patogenezinin anlaşılmasının yanı sıra kanser gibi çağımızın önemli hastalıkları için de erken tanı, ilaç geliştirme ve tedavi olanaklarına büyük katkılar sağlayacaktır.

Kaynaklar

- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447: 396-8.
- Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942; 1: 18-20.
- Jiang Y, Bressler J, Beaudet LA. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genet* 2004; 5: 479-510.
- Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007; 447 (7143): 425-32.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 597-610
- Rodenheiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; 174 (3): 341-8.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- Denis H, Ndlovu MN, Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports* 2011; 12: 647-56.
- Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 204-20.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (6): 3740-5.
- McGowen PO, Szyf M. The epigenetics of social adversity in early life: Implications for mental health outcomes. *Neurobiol Dis* 2010; 39 (1): 66-72.
- Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 484-92.
- Helmann A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 2007; 315: 1141-43.
- Gupta R, Nagarajan A, Wajapeyee N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *BioTechniques* 2010; 49: 3-13.
- Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 576-81.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucl Acids Res* 1982; 10: 2709-21.
- Yang AS, Estecio MR, Doshi K, et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucl Acids Res* 2004; 32 (3): e38.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl Acids Res* 1994; 22: 2990-7.
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005; 37: 853-62.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K. MethyLight: a highthroughput assay to measure DNA methylation. *Nucl Acids Res* 2000; 28: E32.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1827-31.
- Colella S, Shen L, Baggerly KA, et al. Sensitive and quantitative universal pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 2003; 35: 146-50.
- Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. DNA Methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Sem Canc Biol* 2002; 12: 389-98.
- Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 21-32.
- Nicholls RD, Knepper JL. Genome organization, function and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 153-75.
- Goldstone AP. Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 12-20.
- Sutcliffe J, Nakao M, Christian S, et al. Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* 1994; 8: 52-8.
- Dan B. Angelman syndrome: Current understanding and research prospects. *Epilepsia* 2009; 50 (11): 2331-9.
- Everett CM, Wood NW. Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* 2004; 127: 2385-405.
- Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 2001; 3: 359-71.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550-base pair segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-102.
- Klippel JH. Systemic lupus erythematosus: demographics, prognosis and outcome. *J Rheumatol* 1997; 24: 67-71.
- Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, et al. DNA methylation and autoimmune disease. *Clin Immunol* 2003; 109: 72-79.
- Richardson B, et al. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1665-73.
- Smeets DF, Mooq U, Weemaes CM, et al. ICF syndrome: a new case and review of the literature. *Hum Genet* 1994; 94: 240-46.
- Ehrlich M. The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin Immunol* 2003; 109: 17-28.
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999; 402: 187-91.
- Hansen RS, Wijimenga C, Luo P, et al. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 14412-7.
- Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 1-11.
- Widschwendter M, Jiang G, Woods C, et al. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res* 2004; 64: 4472-80.
- Strichman-Almashanu LZ, Lee RS, Onyango PO, et al. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Gen Res* 2002; 12: 543-54.
- Costello JF, Frühwald MC, Smiraqlia DJ, et al. Aberrant CpG island methylation has a non-random and tumor type specific patterns. *Nat Genet* 2000; 25: 132-8.
- Kazuhiisa N, Whitaker JW, Boyle DL, et al. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012; 0: 1-8.
- Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med* 2007; 120 (11): 936-9.
- Kirectepe AK, Kasapcopur O, Arisoy N, et al. Analysis of MEFV exon methylation and expression patterns in familial Mediterranean fever. *BMC Med Genet* 2011; 12(105): 1-6.
- Schaner PE, Gumucio DL. Familial Mediterranean Fever in the Post-Genomic Era: How an Ancient Disease is Providing New Insights into Inflammatory Pathways. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 2005; 4 (1): 67-76.
- Suarez-Alvarez B, Rodriguez RM, Fraga MF, et al. DNA Methylation: a promising landscape for immune system-related diseases. *Cell* 2012; 28 (10): 506-14.
- Reinius LE, Acevedo N, Joerink M, et al. Differential DNA Methylation in Purified Human Blood Cells: Implications for Cell Lineage and Studies on Disease Susceptibility. *Plos One* 2012; 7 (7): 1-13.