

KAZANILMIŞ EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN KALITIMI VE HASTALIKLARA YATKINLIKTAKİ ROLÜ

INHERITANCE OF ACQUIRED EPIGENETIC MODIFICATIONS AND ITS ROLE IN DISEASE SUSCEPTIBILITY

Gülsüm Kayman KÜREKÇİ*, Merve BUNSUZ*, Gizem ÖNAL*, Pervin DİNÇER*

ÖZET

DNA dizisinden bağımsız olarak hücrede gen ifadesini değiştiren epigenetik düzenlemeler, toksik maddeler, beslenme ve stres gibi çevresel faktörlerin etkisiyle fenotipte kalıcı değişikliklere neden olabilmektedir. Embriyonik dönemde epigenetik yeniden programlamadan kaçan bazı epigenetik işaretler, sonraki jenerasyonlara aktararak obezite, kanser ve kardiyovasküler hastalıklara yatkınlığın oluşmasında rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, epigenetiğin etyopatolojisi tam olarak açıklanamayan kompleks hastalıklar ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Bu derlemede, çevresel faktörlerin epigenom üzerindeki etkileri, bu etkilerin jenerasyonlar boyu aktarım mekanizmaları ve ilişkili olduğu patolojiler özetlenecektir.

Anahtar Kelimeler: Epigenetik; çevresel etkenler; hastalıklara yatkınlık.

ABSTRACT

Epigenetic mechanisms affect cellular gene expression levels independently from DNA sequence. Epigenetic modifications can cause heritable phenotypic changes by the influence of environmental factors such as toxicants, nutrition and stress. Specific epigenetic marks that escape embryonic epigenetic reprogramming may have a role in obesity, cancer and cardiovascular disease susceptibility through subsequent generations. Recent studies point out that epigenetic may be related with complex diseases with unknown etiopathology. In this review, we summarized the effects of environmental factors on epigenome, epigenetic inheritance mechanisms across generations and related pathologies.

Keywords: Epigenetic; environmental factors; disease susceptibility.

GİRİŞ

Evrimsel açıdan bakıldığında, kalıtımın çevresel koşullardan etkilendiği ve ataların çevresel koşulların etkisiyle kazandığı özellikleri sonraki nesillere aktarabileceği düşüncesi ilk olarak doğabilimci Jean-Baptiste Lamarck tarafından ortaya atılmıştır. Lamarck'ın öne sürdüğü kazanılmış karakterlerin aktarımı teorisi, basitçe çevresel faktörlerin kalıtım üzerindeki etkilerini açıklamaktadır (1). Ek olarak, Darwin'in Pangenesis teorisine göre, çevresel faktörlerin etkisiyle somatik hücrelerde oluşan pangenlerin kan dolaşımı ile gametlere ulaşması,

çevresel faktörlerin etkisinin yeni nesillere kalıtımını sağlayan bir mekanizma olarak ileri sürülmüştür (2). Fakat, Mendel kalıtımının anlaşılmasına başlanması ile birlikte klasik genetiğin keşfedilmesi sonucu, doğal seçilimin çevresel faktörlerden bağımsız olarak yalnızca DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklandığı düşüncesi kabul görmeye başlamıştır. Bu görüşle paralel olarak August Weismann, öne sürdüğü germlasm teorisinde, somatik hücrelerin germ hücrelerinden bağımsız olduğunu ve kalıtsal bilginin, çevresel faktörlerden etkilenmeksizin yalnızca germ hücreleri aracılığıyla aktarabileceğini ileri sürmüştür (3). Son

Date received/Dergiye geldiği tarih: 13.07.2016 – Date accepted/Dergiye kabul edildiği tarih: 12.03.2017

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
(Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: pdincer@hacettepe.edu.tr)

yıllarda ise, 'epigenetik' kavramının ve ilişkili olduğu mekanizmaların gündeme gelmesi, bu görüşlere yeni bir boyut kazandırmıştır ve epigenetik varyasyonların jenerasyonlar boyunca aktarımı fikri ortaya atılmıştır.

Epigenetik kavramı ilk olarak Waddington tarafından gelişimsel süreçte genotip ve fenotip arasında kurulan bir köprü olarak tanımlanmıştır (4). Kelime anlamıyla 'gen üstü' anlamına gelen epigenetik kavramı günümüzde; hücrede gen ifadesinde kalıcı veya geçici değişikliklere neden olarak hücre kimliğinin belirlenmesinde rol oynayan, DNA dizisinden bağımsız değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik işaretler olarak adlandırılan bu değişiklikler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi ve kodlanmayan RNA'lar ile ilişkili mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Epigenetik işaretler; gen ifade düzeyleri, DNA-protein etkileşimleri, hücresel farklılaşma, embriyogenez ve genomik imprinting gibi hücresel süreçlerin kontrolünde anahtar rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda epigenetik düzenlemelerden sorumlu olan mekanizmalardaki hataların kanser, nörolojik hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve çeşitli gelişim bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir (2).

Genomdaki epigenetik işaretler kararlı veya dinamik yapıda olup, epigenetik durumun çevresel faktörlerin etkisiyle değişebileceği gösterilmiştir (5). Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, beslenme, toksik maddeler, stres ve radyasyon gibi çevresel faktörlerin, epigenetik değişikliklere neden olarak hastalık riskini arttırabileceği gösterilmiştir (6). Ayrıca, çevresel etkiler sonucu oluşan bu epigenetik değişikliklerin sonraki jenerasyonlara da aktarılabilirliği gösterilmiştir (2).

Epigenetik değişikliklerin sonraki nesillere aktarılabilmesi, epigenetik yeniden programlama mekanizmaları ile doğrudan ilişkilidir. Bu derlemede, yeniden programlama mekanizmalarından kaçan epigenetik değişikliklerin jenerasyonlar boyunca aktarım mekanizmaları ve epigenetik aktarımda oluşturulan epigenetik hafıza süreçleri açıklanacaktır. Ayrıca, epigenetik değişikliklere neden olan çevresel

faktörler, fenotip üzerindeki etkileri ve bunların jenerasyonlar boyunca aktarımı hayvan deneyleri ve epidemiyolojik çalışmalar üzerinden özetlenecektir.

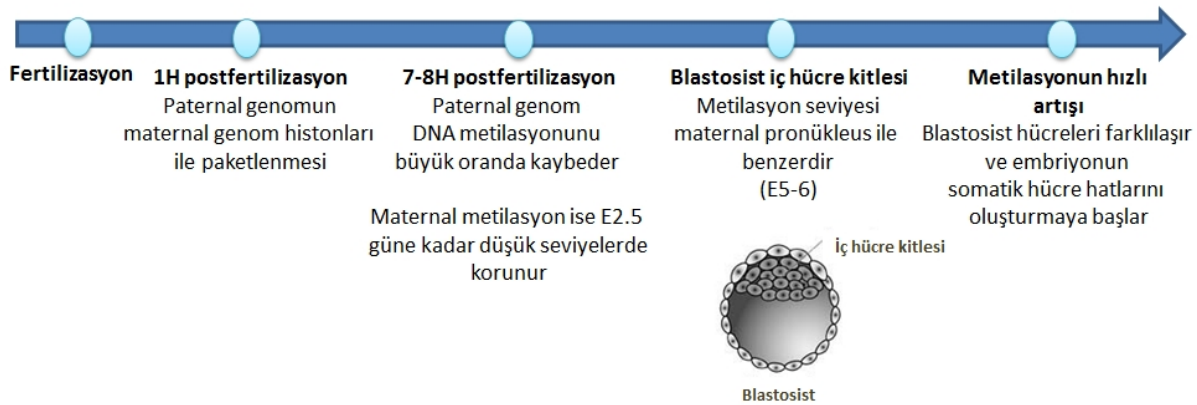
Epigenetik Yeniden Programlama

Embriyonik dönemde epigenetik işaretler, korunmuş bölgeler dışında, tüm genomda silinerek yeniden oluşturulmaktadır. Bu süreç, ebeveynlerden aktarılan epigenetik işaretlerin embriyoda yeniden programlanması olarak tanımlanmaktadır (7). Embriyonik gelişim sırasında epigenetik yeniden programlama, germ hattı yeniden programlama ve preimplantasyon yeniden programlama olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir.

i. Preimplantasyon Yeniden Programlama

Preimplantasyon yeniden programlama fertilizasyonu takiben blastosist evresine kadar epigenomun silinmesi ve hücre farklılaşması döneminde DNA metilasyon profillerinin yeniden kurulması esasına dayanır. Ancak, bu mekanizma ile embriyonik gelişimde önemli olan bazı bölgelerin metilasyon profillerinin tamamen silinmediği ve programlama sürecinde korunarak kalıtılabildiği bilinmektedir.

Spermatogenez sırasında paternal genomda histonların, korunmuş bölgeler dışında protaminler ile yer değiştirmesi ile daha sıkı paketlenme sağlanmaktadır. Fertilizasyon sonrası ilk olarak; protamin ile paketlenmiş olan bölgeler, maternal histonlar ile yeniden paketlenmektedir (8). Bu süreçte, korunmuş bölgeler dışında paternal histon modifikasyonları kaybedilmektedir. Bunu takiben, fertilizasyon sonrası 7-8. saatlerde paternal genom önemli oranda demetilasyona uğrarken, maternal genomdaki düşük metilasyon seviyesi embriyonik (E) 2.5 güne kadar korunmaktadır (8). Demetilasyon süreci hücrede TET (Ten-eleven Translocation) enzimleri ile yürütülmektedir. TET enzimleri, 5-metilsitozinlerin, 5-hidroksimetilsitozine dönüşümünü katalizleyerek takip eden DNA replikasyonu sırasında metilasyonun kaybedilmesine neden olmaktadır (9). Blastosist evresinde metilasyon oranı en düşük seviyede iken, implantasyon sonrası aynı bölgelerin tekrar metilasyonunun gerçekleştirilmesi ile somatik hatlara farklılaşma sağlanmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1: Preimplantasyon yeniden programlama süreci.

ii. Germ Hattı Yeniden Programlama

Primordiyal germ hücreleri (PGH), embriyonik dönemde olgun oosit ve spermatozite farklılaşan öncül hücrelerdir. Bu hücrelerde epigenetik yeniden programlama temel olarak, genom-boyu metilasyon profilinin silinmesini ve cinsiyete özgül şekilde yeniden oluşturulmasını kapsamaktadır. Farede, PGH'ler E6-7'de germ hücrelerini oluşturmak ve cinsiyeti belirlemek amacıyla özelleşmekte ve E10.5'ta ise allantoisten gonadlara doğru göç etmektedir (7). Germ hattında cinsiyete özgül epigenetik düzenleme için en önemli evre göç evresidir. Bu süreçte genomda DNA metilasyon kaybı ve histon modifikasyonlarının değiştirilmesi ile epigenetik yeniden programlama başlatılmaktadır (10). E13.5 güne gelindiğinde erkek germ hücrelerinde metilasyon oranı %14'e, dişi germ hücrelerinde ise %7'ye kadar düşmektedir (11). E14.5'te, erkek germ hücrelerinde DNA metiltransferaz DNMT3A ve DNMT3B, ve kofaktör DNMT3L (DNA methyltransferase 3-like) aktivasyonu ile global *de novo* DNA metilasyon oranı yaklaşık %10'dan %50'ye kadar hızla yükselmektedir (11). Dişilerde ise oogenez süresince global DNA metilasyon oranı düşük seviyelerde kalmaktadır (11).

Yeniden Programlamadan Kaçış Mekanizmaları

Genomda bazı bölgelerin epigenetik işaretleri, yeniden programlama mekanizmalarından kaçarak sonraki jenerasyonlara olduğu gibi aktarılmaktadır. Bu gen bölgelerine en önemli örnek, anneden ya da babadan kalıtılmasına bağlı olarak tek allelin ifade edildiği imprint genlerdir. Ayrıca, imprint genler dışında bazı lokuslarda çevresel etkilerin meydana getirdiği epigenetik değişiklikler benzer kaçış mekanizmaları ile korunarak kalıtılmaktadır.

Yeniden programlamadan kaçış özellikle preimplantasyon döneminde gerçekleşmekte ve protein düzeyinde özgül maternal faktörlerin etkisi ve DNA üzerinde bulunan tekrar dizileri aracılığı ile gerçekleşmektedir.

Süreçte görevli maternal faktörler; STELLA (Developmental pluripotency associated 3) ve TRIM28 (Tripartite motif containing 28) kompleksi bileşenleridir (12). Erken embriyonik dönemde yüksek oranda ifade olan STELLA imprint bölgelerin histon H3 lizin 9 dimetile (H3K9me2) bölgelerine bağlanmaktadır. Bu sayede TET enziminin bağlanmasını engelleyerek bu bölgeleri demetilasyondan korumaktadır (12). Bir iskelet proteini olan TRIM28 ise, DNA dizisi üzerindeki KRAB domainlerine bağlanan ZFP57 (Zinc-finger protein 57) proteini aracılığıyla korunmuş bölgelere yönlendirilmektedir. KRAB domainleri çoğunlukla, imprint genlerin diferansiyel metilasyon bölgelerinde (DMR) bulunmaktadır (13). SETDB1 (SET domain, bifurcated 1) ve UHRF1 (Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1) gibi gen susturulmasında görevli proteinlerin komplekse katılması ile aktive olan DNMT1 ve DNMT1o H3K9me3 işaretinin devamlılığını sağlamaktadır. Böylece, imprint DMR bölgelerinin metilasyon profilini korunmaktadır (14). Farede *Trim28* ve *Zfp57* delesyonu, bazı imprinted DMR bölgelerinde metilasyon kaybına neden olmakta, ancak yeniden programlamadan kaçış mekanizmalarının

tamamen baskılanmaması, başka faktörlerin de süreçte görevli olabileceğini düşündürmektedir (13).

Genom üzerinde bulunan "İntrasisternal A partikülleri (IAP)" adı verilen tekrar dizilerinin de epigenetik yeniden programlamadan kaçışta önemli olduğu gösterilmiştir. IAP dizileri demetilasyona dirençlidir ve buldukları bölgenin metilasyon profilinin korunmasını sağlamaktadır (15). Yapılan çalışmalarda IAP'lara yakın yerleşim gösteren CpG bölgelerinin de yeniden programlama mekanizmalarından kaçtığı ve bu mekanizmanın transjenerasyonel kalıtımda rol oynayabileceği öne sürülmektedir (9).

Epigenetik Hafıza

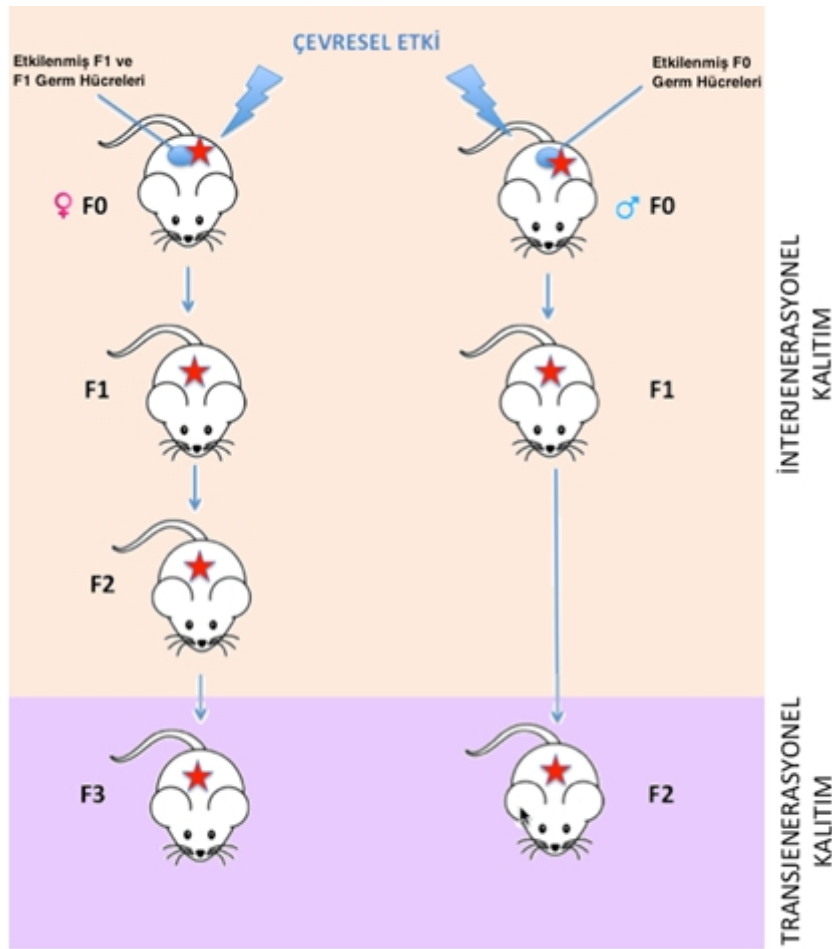
Epigenetik işaretler kararlı veya dinamik olarak ikiye ayrılabilir (16). Kararlı epigenetik işaretler X kromozomu inaktivasyonu, genetik imprinting, tekrar dizilerinin susturulması gibi canlının yaşamı boyunca nispeten değişkenlik göstermeyen epigenetik değişiklikleri kapsamaktadır. Diğer yandan gelişim, farklılaşma ve çevresel etkilere cevaben oluşan gen ifadesindeki düzenlemeler dinamik epigenetik süreçleri yansıtmaktadır. Dinamik epigenetik değişikliklerin olması, epigenetik hafızanın oluşması ile ilişkilendirilmektedir. Epigenetik hafıza, daha önceden maruz kalınan bir gelişimsel veya çevresel uyarın tarafından tetiklenen ve gen ifadesini etkileyen kalıtsal değişiklikleri kapsamaktadır (16). Epigenetik hafızanın, DNA metilasyonuna göre daha dinamik olan histon modifikasyonları ve kromatinin yapısal değişiklikleri ile kontrol edildiği düşünülmektedir (17). Epigenetik hafıza; hücrel hafıza, transkripsiyonel hafıza ve jenerasyonlar arası hafıza olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Hücrel hafıza, gelişim esnasında çeşitli uyarınlar sonucunda oluşan farklılaşma ile ilişkili gen ifade değişikliklerinin mitoz yolu ile aktarılmasıdır. Transkripsiyonel hafıza, canlının önceden maruz kaldığı çevresel uyarılara cevaben meydana gelen ve mitoz boyunca aktarılan değişikliklerdir. Son olarak jenerasyonlar arası hafıza canlının önceki jenerasyonların deneyimleri sonucunda fizyolojisinde ve gen ifadesinde meydana gelen değişikliklerin mayoz yolu ile kalıtılmasıdır. Çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan epigenetik işaretlerin jenerasyonlar boyunca aktarılması, epigenetik hafıza mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (16).

İnterjenerasyonel ve Transjenerasyonel Kalıtım

Genetik bilginin DNA aracılığıyla ebeveynlerden yavruya aktarılması yanında, epigenetik işaretlerin de kalıtılabildiği bilinmektedir. Epigenetik değişiklikler, sporadik olarak veya stres, toksik maddeler ve beslenme gibi çevresel etkenlere maruz kalınması sonucu meydana gelebilmektedir. Çevresel etkilerin yarattığı epigenetik değişiklikler, hem embriyonik dönemde preimplantasyon yeniden programlamadan kaçabilmekte hem de yetişkin dönemde devamlılığını koruyarak aktarılabilmektedir. Ebeveynlerden (F0), yavruya epigenetik bilginin kalıtıldığına dair en önemli kanıt imprint genlerdir. Bu genlerde korunmuş epigenetik modifikasyonlar, preimplantasyon programlamadan kaçarak bir sonraki jenerasyona (F1) aktarılmakta ve F1'in somatik hattında da korunmaktadır. Ancak, F1 jenerasyonunda

implantasyon sonrası germ hattı yeniden programlama gerçekleşerek cinsiyete özgül yeni metilasyon profili kurulmaktadır. Bu sebeple F1 jenerasyonundan oluşacak yavrularda (F2) aynı epigenetik modifikasyonlar aktarılmamaktadır. Bu kalıtım modeli “İnterjenerasyonel kalıtım” olarak tanımlanmaktadır (2). Çevresel etkiler sonucu oluşan epigenetik modifikasyonların, yeniden programlama mekanizmalarından kaçıp, çevresel etki ortadan kalktığında bile jenerasyonlar boyunca aktarılması “Transjenerasyonel kalıtım” olarak adlandırılmaktadır (2). Hamilelik döneminde maruz kalınan çevresel faktörler anne (F0) ile birlikte uterus çevresi ve plasenta aracılığı ile direkt olarak fetüsü (F1) de etkilemekte ve epigenetik modifikasyonlara neden olmaktadır. Embriyonik dönemdeki yeniden programlama sürecinde çevresel etkenlere maruz kalan F1 fetusundaki epigenetik değişiklikler germ hattı aracılığıyla F2

jenerasyonuna da aktarılmaktadır. F2 jenerasyonundaki bireyin çevresel etkiye direkt olarak maruz kalmamasına rağmen, kalıtılan epigenetik bilgiyi F3 jenerasyonuna aktarılması durumunda transjenerasyonel epigenetik kalıttan bahsedilmektedir. Paternal epigenetik modifikasyonlar ise sadece spermler aracılığı ile kalıtılmaktadır. Çevresel etkilere maruz kalan erkek (F0), etkilenmiş olan spermler aracılığı ile epigenetik değişikliği F1 jenerasyonuna interjenerasyonel olarak aktarmaktadır. Çevresel etki devam etmediği halde, F1 jenerasyonu bu değişikliği F2 yavrularına aktarırsa bu durum paternal transjenerasyonel kalıtımı göstermektedir. Transjenerasyonel epigenetik kalıttımda değişiklikler jenerasyonlar boyunca stabil olarak fenotipte etki gösterebilir veya çevresel etkinin devam etmemesi nedeniyle zamanla fenotipteki etkisi azalabilir (2) (Şekil 2).



Şekil 2. İnterjenerasyonel ve transjenerasyonel kalıtım mekanizmaları.

Somadan Germ Hattına Epigenetik Bilginin Aktarımı

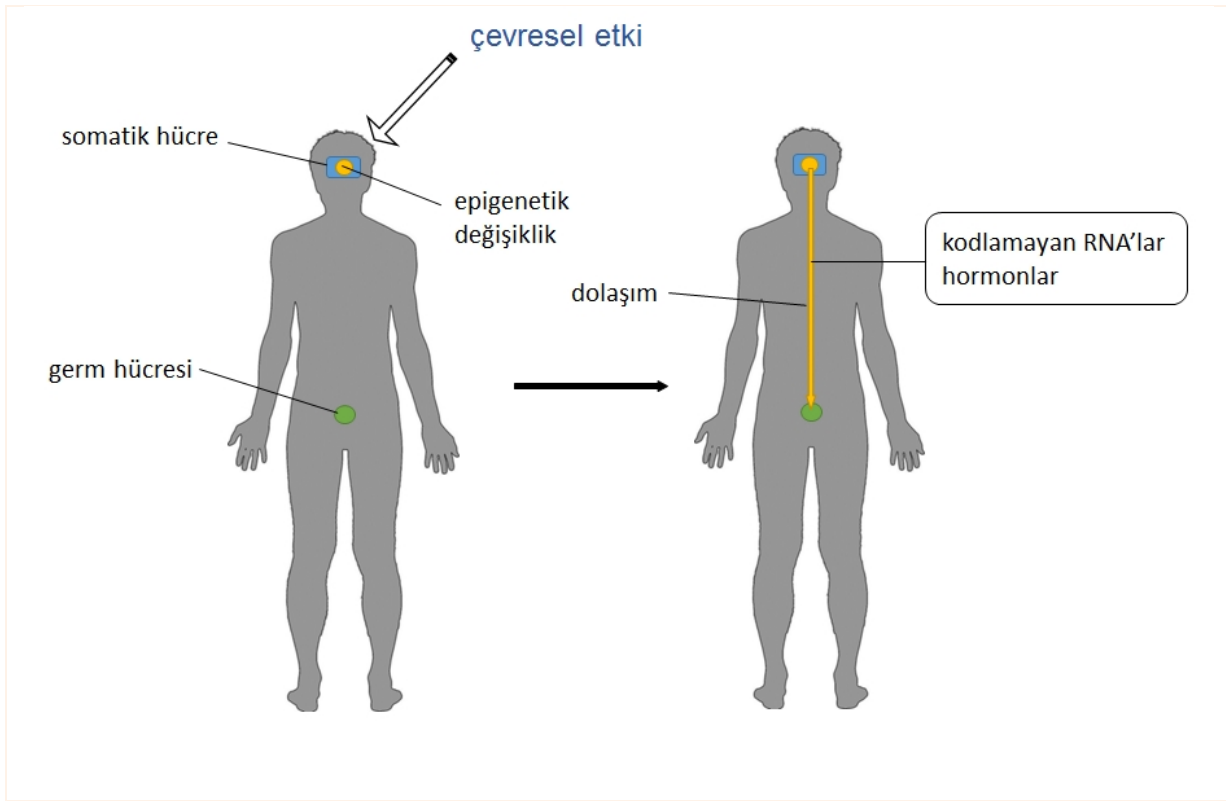
Santral dogma hipotezine göre kalıtım bilgisi tek taraflı olarak germ hattından somaya aktarılmaktadır. Çevresel etkenlerin doğrudan germ hattında epigenetik değişikliklere neden olması durumunda, bu değişikliklerin sonraki jenerasyonlara kalıtımını anlamak mümkündür. Ancak son yıllarda, çevresel uyaranlara cevaben kazanılan fenotipik özelliklerin

transjenerasyonel olarak kalıtıldığını kanıtlayan çalışmalar, somadan germ hattına bilgi transferinin mümkün olabileceğini göstermektedir. Genetik olmayan bilginin hangi faktörler aracılığı ile somadan germ hattına aktarıldığı henüz bilinmemekle birlikte, deneysel bulgular kodlamayan RNA'ları (ncRNA) ve hormonları güçlü adaylar olarak öne çıkarmaktadır (Şekil 3) (18). Kısa ncRNA'ların transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen ifadesi regülasyonunun önemli

Epigenetic inheritance and disease susceptibility

düzenleyicileri olduğu bilinmektedir. Kısa ncRNA'ların önemli kısmını siRNA'lar (small interfering RNA), mikroRNA'lar ve piRNA'lar (piwi-interacting RNA) oluşturmaktadır. Bu moleküller tüm ökaryotlarda korunmuş olan RNA interferans (RNAi) yolları ile mRNA yıkımı, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar aracılığı ile gen susturumunda görevlidir. Bitkilerde RNAi yoluyla sistemik ve kısa ncRNA'lar floem aracılığı ile bitkinin çeşitli bölgelerine yayılabilmektedir. Bitkilerde germ hattı gelişiminin geç evrelerinde somadan farklılaşmaktadır. Bu nedenle kazanılan somatik özelliklerin, germ hücrelerinde korunup aktarılmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir (19). *Arabidopsis* bitkisinde otobur direnç kazanımının transjenerasyonel olarak aktarımında siRNA'ların rol aldığı gösterilmiştir. *C. elegans*'ta RNAi yolunun sistemik olması, somatik dokuya enjekte edilen kısa RNA'ların germ hattında

etki göstermesini sağlamaktadır. *C. elegans* germ hücrelerinde ifade olan genlerin RNAi ile susturumunun birkaç jenerasyon boyunca aktarıldığı gösterilmiştir ancak somatik hücrelerde ifade olan genlerin susturumunun yalnızca bir sonraki kuşağa kalıtıldığı bulunmuştur (20). Strese maruz kalan F1 erkek farelerin spermelerinden F2'ye aktarılan miRNA'ların F2 jenerasyonu yavrularının davranışlarını etkilediği gösterilmiştir (21). Benzer bir şekilde, yüksek yağlı diyetin erkek farelerin spermide parçalanmış taşıyıcı RNA (tRNA) miktarını artırdığını ve aktarılan tRNA'ların sonraki nesillerde metabolik hastalığa neden olduğu gösterilmiştir (22). İnsan plazma, serum, tükürük, idrar ve sütünde işlevselliğini kaybetmeden dolaşan miRNA'lar olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların hücreler arası iletişimde hormonlar gibi görev aldıkları düşünülmektedir.



Şekil 3. Somadan germ hattına epigenetik bilginin aktarımı.

Hormonlar hücreler arası sinyal iletiminin ana molekülleri olmaları sebebi ile somadan germ hattına bilgi transferini sağlayabilecek önemli adaylardır. Bitkilerde transjenerasyonel otobur direncini sağlayan jasmonik asit uygulaması, genom boyu metilasyon değişikliklerine neden olmaktadır. Hormonların epigenetik mekanizmalarda rol aldıkları bilinmektedir. Hormon reseptörlerinin oositlerdeki ifadeleri, gelişim esnasında epigenetik yeniden programlama ile korelasyon göstermektedir (23). Ancak günümüze kadar hayvanlarda bulunan hormonların, transjenerasyonel kalıtımda rol aldığına dair herhangi bir bulgu elde edilmemiştir.

Transjenerasyonel Epigenetik Kalıtım ve Çevresel Etkiler

i. Toksik Maddeler

Endokrin sistem işlevini bozan kimyasallar (endokrin bozucular), inorganik kontamine edici ajanlar, ilaçlar, fitoöstrojenler, fungusit ve pestisit gibi toksik kimyasalların epigenetik değişiklikler yaratarak endokrin ve metabolik bazı bozukluklara neden oldukları bilinmektedir. Transjenerasyonel yolla epigenom üzerindeki etkisi gösterilen bazı çevresel toksik maddeler, hastalık fenotipine neden olmakta veya yatkınlığı arttırmaktadır.

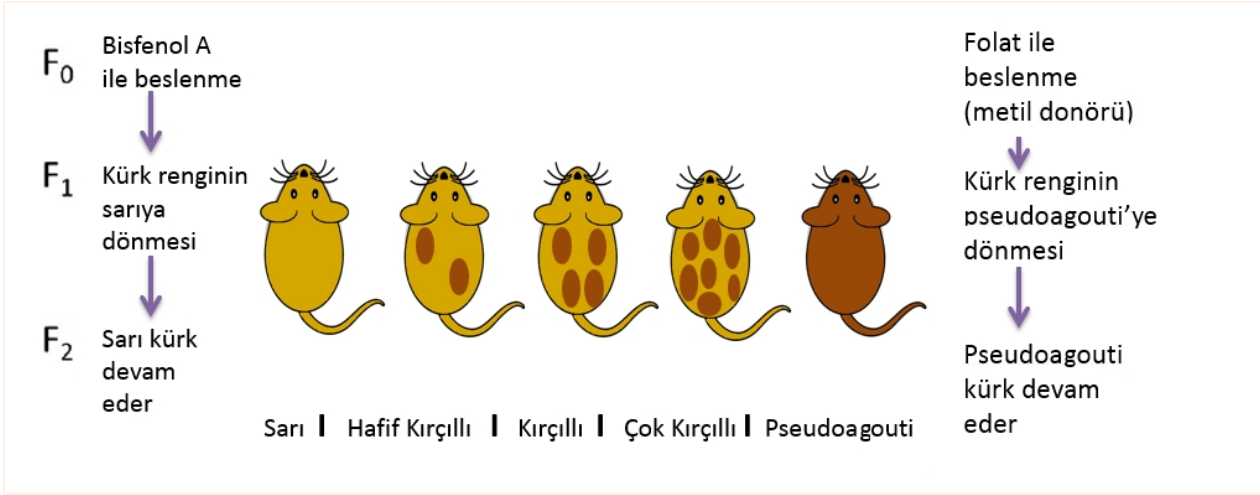
Endokrin bozucular, hormonları mimik veya bloke ederek hormon sinyalini değiştiren ve hormon üretimini

engelleyerek endokrin sistem işlevini bozan çevresel kimyasallardır. Gonadal cinsiyet belirlenmesi sırasında endokrin disruptorlara maruz kalan hamile sıçanlardan (F0) doğan F1 ve F3 jenerasyonlarında, yumurtalık hastalıklarının geliştiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada endokrin bozuculara maruz kalmayan F3 jenerasyonunun granüloza hücrelerinde, transkriptom ve epigenom yönünden transjenerasyonel kalıtım olduğu kanıtlanmıştır (24).

Vinclozolin bir endokrin bozucudur ve fungusit özelliği nedeniyle tarımda yaygın olarak kullanılır. Vinclozolinin anti-androjenik aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Gelişim döneminde vinclozoline maruziyet erkek germ hattında kalıtılabilen DNA metilasyon değişikliklerine neden olarak ilgili dokuları etkilemekte; testiküler, prostat, renal anomaliler ve tümör insidansının artmasına yol açmaktadır (25). Gonadal cinsiyet belirlenmesi sırasında maternal olarak vinclozoline maruz kalan sıçan embriyolarında meydana gelen epigenetik değişiklikler sonucunda oluşan infertilitenin F4 jenerasyonuna kadar aktarıldığı gösterilmiştir (26). Ayrıca, vinclozolinin imprint

genlerde metilasyon değişiklikleri yarattığı ve değişen gen metilasyonunun F3 jenerasyonuna kalıtıldığı gösterilmiştir (27).

Farede *agouti* lokusunda bulunan IAP dizilerinin metilasyon düzeyi kürk rengini belirleyen A^{vy} (*agouti* viable yellow) allelinin ifadesini etkilemektedir. Lokusun hipometilasyonu fenotipte sarı kürk renginin görülmesine neden olurken, metilasyon düzeyi arttıkça A^{vy} alleli baskılanarak fenotipte koyu kürk rengi (*pseudoagouti*) görülmektedir. Hamilelik döneminde farelerin Bisfenol-A (BPA) endokrin bozucusuna maruz kalması, A^{vy} allelinde hipometilasyona neden olarak farenin kürk rengini değiştirdiği gösterilmiştir. Folik asit gibi metil donörlerinin beslenme yoluyla alınması sonucu, sarı-*agouti* yavrunun kürk renginin *pseudoagouti* kürk rengine döndüğü saptanmıştır (Şekil 4) (28). Ayrıca perinatal dönemde BPA'ya maruz kalan sıçanlarda, testiküler steroid reseptör koregülatörlerinin ifadesi değiştiği ve testis anomalilerine neden olan bu etkinin BPA'ya maruz kalmayan F3 jenerasyonuna da yansıdığı gösterilmiştir.



Şekil 4. Farede *agouti* lokusunun metilasyon değişikliklerinin kürk rengi üzerindeki etkileri.

Bazı tropikal meyvelerde bulunan bir toksin olan dioksinin, uterus anomalilerine neden olduğu ve doğrudan maruziyet olmadığı halde F3 jenerasyonunda etkisinin görüldüğü kanıtlanmıştır. F0 sıçanların hamileliğin 8-14. günleri arasında, pestisit metoksikloro maruz kalması ile yavruların sperm genomunda oluşan epimutasyonların böbrek, yumurtalık hastalıkları ve obezite gibi geç başlangıçlı hastalıkları F3 jenerasyonuna kadar taşıdığı ortaya koyulmuştur (29).

ii. Beslenme

Epigenetik değişikliklere yol açan çevresel faktörlerden biri de beslenmedir. Yapılan hayvan deneylerinde paternal/maternal beslenme alışkanlıklarının epigenetik değişikliklere yol açtığı ve bu değişikliklerin jenerasyonlar boyunca aktarılabilirdiği gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, paternal yüksek yağlı diyet ile beslenme sonucunda, dişi yavrularda insulin düzenlenmesi ve glukoz metabolizması ile ilişkili genlerin ifadelerinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (30). Düşük protein diyeti ile beslenen erkek farelerin hem dişi hem de erkek

yavrularının karaciğerlerinde lipit ve kolesterol metabolizması ile ilişkili bazı genlerin ifadesinin belirgin şekilde değiştiği saptanmıştır (30). Prediyabetik fare modelinde, yüksek yağlı diyetle beslenen erkek farelerin spermalarında oluşan metilasyon değişikliklerinin transjenerasyonel olarak F2 yavrularına aktarıldığı ve yavrularda glukoz intoleransı ve insulin direnci oluştuğu gösterilmiştir (31).

A^{vy} farelerle yapılan çalışmada, hamilelik döneminde folat gibi metil donörlerinin eksikliğinde *agouti* lokusunun hipometile olduğu ve yavrularda obezite prevalansının ve kanser riskinin arttığı gösterilmiştir (32). *Inbred axin fused* ($Axin^{fu}$) dişi farelere doğum öncesinde metil donör gruplarınca zengin diyet uygulandığında ise, $Axin^{fu}$ allellerinde meydana gelen DNA metilasyon artışının interjenerasyonel olarak yavrulara aktarıldığı gösterilmiştir (33). Hamile dişi farelerde yüksek yağlı diyet uygulamasının, sonraki iki jenerasyonda boy artışı ve insulin direncine neden olduğu gösterilmiştir (34). Hamilelik döneminde yetersiz beslenmeye maruz kalan farelerin F1 ve F2

yavrularında, düşük doğum ağırlığı, glukoz intoleransı ve obezite gelişimi rapor edilmiştir (30). Düşük protein diyeti uygulanan dişi sıçanların F1 ve F2 yavrularında yüksek kan basıncı, endotel bozukluklar (35), insülin direncinde artış ve organ ağırlıklarında belirgin azalma saptanmıştır. Ayrıca başka bir çalışmada, maternal düşük protein diyetinin glukoz/insülin metabolizmasında bozukluklarına neden olduğu ve bu durumun F3 jenerasyonuna kadar aktarıldığı tespit edilmiştir (30).

iii. Stres

Çevresel faktör olarak stresin epigenetik düzenlemelere neden olarak etkisinin jenerasyonlar boyunca aktarıldığı bilinmektedir. Hayvan modellerinde özellikle maternal davranış ve yavru bakımı sürecinde oluşabilecek stres faktörlerinin yavrularda korku ve stres hafızası oluşturabileceği gösterilmiştir (36). Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda yavru bakımı esnasında annelerin strese maruz kalması, yavrularda hipokampus bölgesinde glukokortikoid reseptörünün (GR) baskılanmasına neden olduğu tespit edilmiştir. DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonu artışı ile baskılanan GR ifadesinin, GR tarafından kontrol edilen strese duyarlı genlerin baskılanmasına yol açtığı ve bu düzenlemenin sonraki jenerasyonlara kalıtıldığı gösterilmiştir (37). Bir başka çalışmada, maternal bakımın yavruların beyinde kalıcı epigenetik değişikliklere yol açtığı ve kazanılan stres ve kaygı fenotiplerinin üç kuşağa kadar aktarıldığı tespit edilmiştir (38). Yao ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, dişi fareye gebeliğin 12-18. günleri arasında kronik stres uygulanmasının F1, F2 ve F3 farelerde gebelik süresinde azalma, gebelik döneminde kilo alımı ve kan glukoz düzeyinde artış gözlenmiştir (21). Stres uygulaması ayrıca yavrularda büyüme geriliğine ve davranış bozukluklarına yol açarken, F2 annelerde beyin ve uterusu miR-200 ailesine ait miRNA'ların ifadelerinde değişiklikler saptanmıştır (21).

Yapılan çalışmalarda, paternal stres sonucu sperm hücrelerinde oluşan epigenetik düzenlemelerin de sonraki jenerasyonlara aktarılarak yavrularda stres ile ilişkili fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olduğu saptanmıştır (39). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, ergenlik veya yetişkinlik döneminde kronik strese maruz bırakılan erkek farelerin spermelerinde 9 miRNA'nın ifade düzeylerinin değiştiği ve bu miRNA'ların yavruların beyinlerinde stres ile ilişkili genlerin ifadesini düzenlediği ve yavrularda stres fenotipine neden olduğu rapor edilmiştir (40). Aynı çalışmada, ifadesi değişen miRNA'ların kontrol grubuna verildiğinde yine beyinde stres ile ilişkili genlerin ifadesinin değiştiği ve kontrol grubunda da stres fenotipi olduğu gözlenmiştir. Bir başka çalışmada kronik stres uygulanan erkek farelerin sperm miRNA ifade seviyelerindeki değişikliğe bağlı olarak yavrularda hiperglisememin arttığı ve stres faktörleri ile oluşan epigenetik düzenlemelerin glikoz metabolizmasını düzenlediği tespit edilmiştir (41).

Transjenerasyonel Epigenetik Kalıtımın İnsan Sağlığı Üzerinde Etkileri

İnsanlarda transjenerasyonel epigenetik kalıtım ile ilgili yapılan çalışmalar kısıtlı olmakla birlikte, ebeveynlerin

maruz kaldığı stres, beslenme ve toksik maddeler gibi çevresel faktörlerin sonraki nesillerde hastalık riski oluşturabileceğine dair çalışmalar rapor edilmiştir (42). II. Dünya Savaşı döneminde Hollanda'da yaşanan kıtlık sırasında, kıtlığa maruz kalan hamile kadınların çocukları incelendiğinde, bu çocukların prematüre doğdukları ve yetişkin dönemlerinde yüksek glukoz intoleransı riski taşıdıkları saptanmıştır (43). In utero açlığa maruz kalınması sonucu F2 jenerasyonunda da prematüre doğum oranının arttığı tespit edilmiştir (44). Beslenme şekillerinin neden olduğu epigenetik değişikliklerin sonraki nesillere aktarıldığını gösteren bir başka çalışmada, kırsal Gambiya bölgesinde yaşayan hamile kadınların, hamileliğin erken dönemlerinin kuru veya ıslak sezona denk gelmesine bağlı olarak beslenme şekillerinin değişmesi sonucunda plazma metil-donör proteinleri düzeyinde farklılıklar olduğu gösterilmiştir (45). Maternal olarak artan/azalan biyobelirteç düzeylerinin, yavrularda metastable epiallellerin metillenme profilleri ile korelasyon gösterdiği ve böylece hamilelik döneminde beslenmenin insanlarda metastable epiallellerin metillenmesi üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (45). İnsanlarda transjenerasyonel epigenetik kalıtım ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, hamilelik döneminde düşük tehlikesini engellemek için dietilstilbestron içeren ilaçların kullanımının, F1 jenerasyonunda üreme bozukluklarına ve kansere neden olduğu gösterilmiştir (46). Yapılan çalışmalar, dietilstilbestronun etkisinin ilaca direkt olarak maruz kalmayan F3 jenerasyonuna da yansıdığı ve bu geçişin anne tarafından kalıtıldığı gösterilmiştir (47). Son yıllarda yapılan çalışmalar insanlarda sigara kullanımı gibi toksik çevresel faktörlerin de interjenerasyonel veya transjenerasyonel olarak sonraki nesillere aktarımı üzerine yoğunlaşmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalarda, maternal ve paternal sigara kullanımının bir sonraki jenerasyonlarda diyabet, obezite ve kardiyovasküler riskleri arttırdığı bildirilmiştir (48).

SONUÇ-YORUM

Hücrede epigenetik mekanizmalar uygun gen ifade profillerinin oluşturulmasından sorumludur ve hücre bölünmeleri boyunca korunabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çevresel etkenlerin meydana getirdiği epigenetik değişikliklerin sonraki jenerasyonlara korunarak aktarıldığı gösterilmiştir. Bu değişikliklerin çevresel uyarlara direkt olarak maruz kalmamış olan jenerasyonların fenotipine yansması epigenetik hafızanın oluşturulduğuna işaret etmektedir. Oluşan bu epigenetik hafızanın, çevresel değişikliklere adaptasyonu kolaylaştırabileceği ve evrimsel seçim mekanizmalarına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Çevresel faktörlerin somada oluşturduğu epigenetik değişikliklerin germ hücrelerine aktarılması veya kodlamayan RNA'lar aracılığıyla aktarılabilenliğini gösteren bulgular, Lamarck'ın öne sürmüştüğü kazanılmış karakterlerin kalıtımı hipotezini açıklar niteliktedir (49). Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, epigenetik kalıtım mekanizmalarının varlığının deneysel olarak ispatlanması, genetik olan ve genetik olmayan kalıtım mekanizmalarını bütün halinde değerlendirerek çoğulcu bir kalıtım modelinin

düşünüldüğünü gerektirmektedir. Kalıtılan epigenetik değişiklikler organizmaların çevreye adaptasyonuna katkı sağlamakla birlikte, bazı durumlarda hastalık yatkınlığına da sebep olabilmektedir (6). Özellikle beslenme, toksik maddeler ve stres gibi çevresel faktörlerin bireyde oluşturduğu epigenetik değişiklikler, sonraki jenerasyonlarda metabolizma ve fizyolojiyi etkileyerek psikolojik rahatsızlıklar, obezite, kanser ve kalp rahatsızlıkları gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır.

Şimdiye kadar transjenerasyonel epigenetik kalıtım ile ilgili yapılan hayvan çalışmaları, bu mekanizmaların çevresel koşullar ile tetiklendiğini ve jenerasyonlar boyunca kalıtıldığını göstermektedir. Tüm bu epigenetik mekanizmaların açıklanması ve gen-çevre etkileşimlerinin fizyolojik etkilerinin araştırılması için hem yüksek ölçekli genom boyu analizler hem de tek hücre düzeyinde uygulanabilecek hassas tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmaların sabit laboratuvar koşulları altında gerçekleştirilmesi ve hayvanların benzer genetik alt yapıya sahip olması epigenetik kalıtımın etkisini izlemeyi kolaylaştıracağından deney gruplarının dikkatli seçilmesi önemlidir (50). Benzer bir şekilde, insanlar üzerinde yapılacak çalışmalarda izole toplumların seçilmesi farklı genetik alt yapıyı ve çevrenin meydana getirebileceği heterojeniteyi azaltması açısından oldukça önemlidir.

Son olarak, epigenetik kalıtım mekanizmalarının aydınlatılmasında DNA metilasyonunun yanı sıra histon modifikasyonları ve kromatin yapısı gibi diğer düzenlemelerin de etkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Tüm bu mekanizmaların anlaşılması, multifaktöriyel hastalıkların patogenezinin ve hastalığa yatkınlığı sağlayan epigenetik faktörlerin aydınlatılmasına ve olası yeni tedavi moleküllerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Wang Y, Liu H, Sun Z. Lamarck rises from his grave: Parental environment-induced epigenetic inheritance in model organisms and humans. *Biological Reviews* 2017.
2. Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms. *Cell* 2014; 157(1): 95-109.
3. Weismann A. The germ plasm: A theory of heredity. 1893.
4. Waddington C. Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA* 1939; 25(7): 299-307.
5. Peaston AE, Whitelaw E. Epigenetics and phenotypic variation in mammals. *Mamm Genome* 2006; 17(5): 365-74.
6. Nilsson EE, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease susceptibility. *Transl Res* 2015; 165(1): 12-7.
7. von Meyenn F, Reik W. Forget the parents: Epigenetic reprogramming in human germ cells. *Cell* 2015; 161(6): 1248-51.

8. van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AA, Muller S, Berden JH, Braat DD, et al. Asymmetry in histone h3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev* 2005; 122(9): 1008-22.
9. Hackett JA, Sengupta R, Zyllicz JJ, Murakami K, Lee C, Down TA, et al. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* 2013; 339(6118): 448-52.
10. Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, et al. Histone methyltransferases g9a and glp form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at h3-k9. *Genes Dev* 2005; 19(7): 815-26.
11. Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, et al. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell* 2012; 48(6): 849-62.
12. Nakamura T, Liu Y-J, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, et al. Pgc7 binds histone h3k9me2 to protect against conversion of 5mc to 5hmc in early embryos. *Nature* 2012; 486(7403): 415-9.
13. Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P, et al. A maternal-zygotic effect gene, zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell* 2008; 15(4): 547-57.
14. Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, et al. Dynamics of dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol* 2002; 245(2): 304-14.
15. Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, et al. Resistance of iaps to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 2003; 35(2): 88-93.
16. D'Urso A, Brickner JH. Mechanisms of epigenetic memory. *Trends Genet* 2014; 30(6): 230-6.
17. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. *Science* 2010; 330(6004): 612-6.
18. Sharma A. Transgenerational epigenetic inheritance: Focus on soma to germline information transfer. *Prog Biophys Mol Biol* 2013; 113(3): 439-46.
19. Molinier J, Ries G, Zipfel C, Hohn B. Transgenerational memory of stress in plants. *Nature* 2006; 442(7106): 1046-9.
20. Burton NO, Burkhart KB, Kennedy S. Nuclear rna1 maintains heritable gene silencing in caenorhabditis elegans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(49): 19683-8.
21. Yao Y, Robinson AM, Zucchi FC, Robbins JC, Babenko O, Kovalchuk O, et al. Ancestral exposure to stress epigenetically programs preterm birth risk and adverse maternal and newborn outcomes. *BMC Med* 2014; 12(1): 121.
22. Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, et al. Sperm tsrnas contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* 2016; 351(6271): 397-400.

23. Čikoš Š, Veselá J, Il'ková G, Reháč P, Czikková S, Koppel J. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2005; 71(2): 145-53.
24. Nilsson E, Larsen G, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C, Savenkova MI, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian disease. *PLoS One* 2012; 7(5): e36129.
25. Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 2006; 147(6): s43-s9.
26. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005; 308(5727): 1466-9.
27. Stouder C, Paoloni-Giacobino A. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. *Reproduction* 2010; 139(2): 373-9.
28. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol a-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(32): 13056-61.
29. Manikkam M, Haque MM, Guerrero-Bosagna C, Nilsson EE, Skinner MK. Pesticide methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germline. *PLoS One* 2014; 9(7): e102091.
30. Jimenez-Chillaron JC, Ramon-Krauel M, Ribo S, Diaz R. Transgenerational epigenetic inheritance of diabetes risk as a consequence of early nutritional imbalances. *Proc Nutr Soc* 2016; 75(01): 78-89.
31. Wei Y, Yang C-R, Wei Y-P, Zhao Z-A, Hou Y, Schatten H, et al. Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(5): 1873-8.
32. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004; 20(1): 63-8.
33. Waterland RA, Dolinoy DC, Lin JR, Smith CA, Shi X, Tahiliani KG. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at axin fused. *Genesis* 2006; 44(9): 401-6.
34. Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology* 2009; 150(11): 4999-5009.
35. Torrens C, Brawley L, Dance CS, Itoh S, Poston L, Hanson MA. First evidence for transgenerational vascular programming in the rat protein restriction model. *The Journal of Physiology* 2002; 543:41-2.
36. Nestler EJ. Transgenerational epigenetic contributions to stress responses: Fact or fiction? *PLoS Biol* 2016; 14(3): e1002426.
37. Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 1999; 286(5442): 1155-8.
38. Franklin TB, Linder N, Russig H, Thöny B, Mansuy IM. Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. *PLoS One* 2011; 6(7): e21842.
39. Yuan T-F, Li A, Sun X, Ouyang H, Campos C, Rocha NB, et al. Transgenerational inheritance of paternal neurobehavioral phenotypes: Stress, addiction, ageing and metabolism. *Mol Neurobiol* 2016; 53(9): 6367-76.
40. Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA, Bale TL. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(44): 13699-704.
41. Wu L, Lu Y, Jiao Y, Liu B, Li S, Li Y, et al. Paternal psychological stress reprograms hepatic gluconeogenesis in offspring. *Cell Metab* 2016; 23(4): 735-43.
42. van Otterdijk SD, Michels KB. Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: How good is the evidence? *FASEB J* 2016; 30(7): 2457-65.
43. Lumey L, Stein AD, Kahn HS, Romijn J. Lipid profiles in middle-aged men and women after famine exposure during gestation: The dutch hunger winter families study. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(6): 1737-43.
44. Stein AD, Lumey LH. The relationship between maternal and offspring birth weights after maternal prenatal famine exposure: The dutch famine birth cohort study. *Hum Biol* 2000; 641-54.
45. Dominguez-Salas P, Moore SE, Baker MS, Bergen AW, Cox SE, Dyer RA, et al. Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. *Nat Commun* 2014; 5: 3746.
46. Veurink M, Koster M. The history of des, lessons to be learned. *Pharm World Sci* 2005; 27(3): 139-43.
47. Blatt J, Van Le L, Weiner T, Sailer S. Ovarian carcinoma in an adolescent with transgenerational exposure to diethylstilbestrol. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25(8): 635-6.
48. Han T, Hart C, Haig C, Logue J, Upton M, Watt G, et al. Contributions of maternal and paternal adiposity and smoking to adult offspring adiposity and cardiovascular risk: The midspan family study. *BMJ open* 2015; 5(11): e007682.
49. Whitelaw E. Disputing lamarckian epigenetic inheritance in mammals. *Genome Biol* 2015; 16(1): 60.
50. Bohacek J, Mansuy IM. A guide to designing germline-dependent epigenetic inheritance experiments in mammals. *Nat. Methods* 2017; 14(3): 243-9.