مقاله مروری

اپی‌ژنتیک سلول‌های بنیادی

مهدی توتونچی .M.Sc[۲،۱]، مریم شاه حسینی .Ph.D[۱]، مجید مومنی‌مقدم .M.Sc[۱]، حسین بهاروند .Ph.D[۱*]

۱. پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی
۲. پژوهشکده رویان، گروه ژنتیک

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی
پست الکترونیک: Email: Baharvand50@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۱/۱۶

فرایند تمایز سلول‌های بنیادی از حالت پرتوان به سلول‌های متعهد و ویژه، مستلزم بروز تغییرات کلی در الگوی بیان ژن در آنهاست که از شناخته شده‌ترین آنها تغییرات "اپی ژنتیکی" است. مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی شامل متیلاسیون DNA، تغییرات در سطح هیستون‌ها و تنظیمات وابسته به RNAهای غیرکد شونده می‌شود که به عنوان عوامل اصلی کنترل بیان ژن در طی رشد و نمو سلول مطرح هستند. با توجه به اطلاعات مربوط به توالی ژنوم، بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌تواند درک خوبی در خصوص چگونگی امکان بنیادینگی و تمایز هدفمند سلول‌های بنیادی فراهم کند. در این مقاله مروری به بیان مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی موثر در مراحل تکوین جنین و نیز سرنوشت سلول‌های بنیادی پرداخته خواهد شد.

کلیدواژگان: اپی‌ژنتیک، سلول‌های بنیادی، متیلاسیون DNA، تغییرات کروماتین، miRNA

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۸، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۶۶-۵۱

مقدمه

ویژگی یک سلول به طور عمده به الگوی بیان ژنی آن بستگی دارد. در طول نمو موجود چند سلولی، رده‌های سلولی مختلفی از یک سلول تخم تشکیل می‌شود. الگوی بیان ژنی در هر یک از رده‌های سلولی به صورت ویژه و منحصر به فرد است. این الگو در سلول نهایی تمایز یافته به حد اعلای خود می‌رسد و تقریبا به حالت پایدار باقی خواهد ماند. در طی این فرایند، برخی از ژن‌ها برای فعالیت آینده سلول انتخاب می‌شوند، در حالی که برخی دیگر از صلاحیت خارج و برای مدت زمان طولانی خاموش می‌شوند. یک ژن به نسبت عملکرد خود در سلول‌های مختلف جاندار، سطوح بیان متفاوتی را نشان می‌دهد. پس از اینکه سلول به حالت نسبتا پایدار خود یعنی حالت تمایز یافته رسید، الگوی ساختاری ژنوم در این سلول و نیز در سلول‌های حاصل از آن ثابت می‌ماند. مطالعه چنین فرایندهایی تحت عنوان "اپی‌ژنتیک (Epigenetic)" نامیده می‌شود. واژه "اپی (Epi)" از ریشه یونانی و به معنی "فرا" است و علم اپی‌ژنتیک به مطالعه تغییرات ارثی قابل برگشت در عملکرد و بیان ژن‌ها، بدون تغییر در توالی نوکلئوتیدی آنها می‌پردازد (۱). پدیده‌هایی مانند ایمپرینت ژنومی (Genomic Imprinting) و غیرفعال شدن کروموزوم X (X-Inactivation) و نیز تنظیم الگوی بیانی دسته‌های ژنی که در فرایند تکوین مراحل اولیه جنینی بسیار حایز اهمیت‌اند، به طور قابل توجهی با مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی مرتبط است.

به دلیل نقش تعیین کننده‌ای که مکانیسم‌های مختلف اپی‌ژنتیکی در پیشبرد روند کلی بیان ژن به خصوص در مراحل اولیه تکوین به عهده دارند، سلول‌های بنیادی به عنوان مدل مناسبی جهت بررسی این تغییرات در روند تمایز مورد توجه ویژه دانشمندان قرار گرفته‌اند. پایداری الگوی بیان ژنی در یک سلول و همچنین امکان انتقال این ویژگی به نسل بعد، مستلزم وقوع مکانیسم‌های پیچیده اپی‌ژنتیکی است که سلول از آنها بهره می‌گیرد. کنسرت بیان ژنی در موجودات چند سلولی، با نوع عملکرد هر سلول سازگاری دارد و با یک برنامه‌ریزی بسیار دقیق، امکان فعال و غیرفعال کردن ژن‌ها را در روند تمایز آن فراهم می‌کند. بدون یک سیستم حافظه‌ای موثر و کارا، توانایی سلول برای حفظ حالت پایدار و تغییر آن در شرایط بحرانی امکان‌پذیر نخواهد بود. برای هر سیستم اپی‌ژنتیکی دو سوال اساسی مطرح می‌شود:

۱. الگوی نشانه گذاری چگونه ایجاد شده است؟

۲. این نشانه‌ها چگونه توسط سلول ترجمه و به نسل بعد منتقل می‌شوند؟

بررسی اپی‌ژنتیکی سلول‌های بنیادی و سلول‌های تمایز یافته پیش‌ساز نشان می‌دهد که رابطه پایداری بین مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی و ماهیت قابل توارث بودن آنها وجود دارد. این بدان معناست که خاموش ماندن ژن‌های مرتبط با تمایز در این سلول‌ها با حفظ خصوصیت بنیادینگی (Stemness) آنها در ارتباط است. وضعیت رونویسی سلول در شرایط مختلف به ساختار کروماتین آن بستگی دارد. معماری کروماتین سلول‌های بنیادی و فرایندهای حاصل ازآن در رده‌های مختلف سلولی ویژگی متفاوت و منحصر به فردی دارد و این تفاوت در خصوصیت پرتوانی (Pluripotency) و خود نوزایی (Self-Renewal) آنها تاثیر فراوان دارد.

در اینجا تلاش می‌شود تا حد امکان به بیان چگونگی فرایندهای اپی‌ژنتیکی در طی تکوین و سپس در سلول‌های بنیادی پرداخته شود و همچنین نقش مکانیسم‌های مختلف اپی‌ژنتیکی موثر در بنیادینگی و تمایز مورد بررسی قرار گیرد.

نقش اپی‌ژنتیک در مراحل اولیه جنینی

با وجود یکسان بودن توالی ژنومی در سلول اولیه تخم و سلول‌های مختلف حاصل از آن، تنوع الگوی بیان ژنی در این سلول‌ها، پایه و اساس فرایند تکوین است که با تغییر تدریجی الگوی اپی‌ژنتیکی سلول‌ها در طی مراحل جنین‌زایی شکل می‌گیرد. از جمله تغییرات اپی‌ژنتیکی که در سلول‌های تمایز یافته به طور پایداری قابلیت توارث دارد فرایند متیلاسیون DNA (DNA methylation) است که در پیدایش اندام‌ها و بافت‌های مختلف جنین در حال تکوین نقش بسزایی دارد (شکل ۱) (۲).

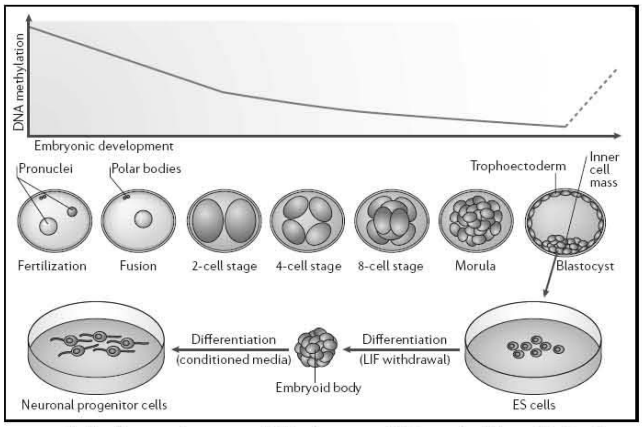
پس از لقاح و قبل از اولین تقسیم سلول تخم، ژنوم پدری به طور فعال دمتیله می‌شود، اما تاکنون آنزیم دمتیلاز موثر در این فرایند شناخته نشده است. بعد از اولین تقسیم سلول تخم، به خاطر عدم بیان آنزیم DNA متیل ترانسفراز (DNA Methyltransferase: DNMT)، دمتیلاسیون گذرا (غیرفعال) در ژنوم پدری و مادری رخ خواهد داد (۳). ژنوم جنین پیش از لانه‌گزینی با حضور آنزیم DNA متیل ترانسفرازها و به صورت *de novo* الگوی جدیدی از متیلاسیون به خود می‌گیرد. این روند طی لانه گزینی نیز ادامه خواهد داشت و الگوهای اپی‌ژنتیکی متفاوتی در رده‌های سلولی مختلف شکل می‌گیرد (۴، ۵). بنابراین در راستای عملکرد پرتوانی سلول‌های بنیادی در ICM، ژنوم این سلول‌ها با الگوی ویژه‌ای برنامه‌ریزی خواهند شد (۶-۸).

ایمپرینت ژنومی

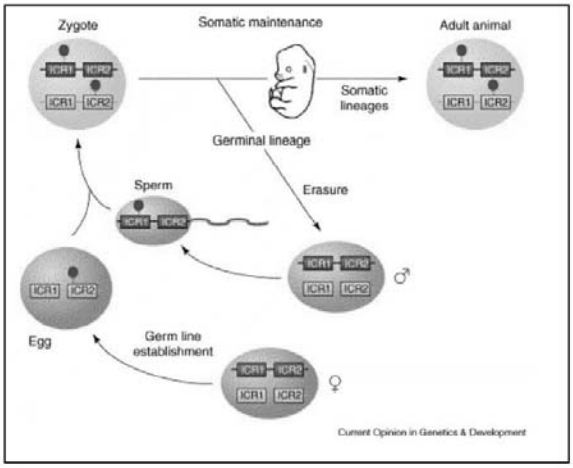
پستانداران از نظر محتوای کروموزومی دیپلوییدند و به طور طبیعی یک سری کامل کروموزومی را از والدین به ارث می‌برند. بنابراین طی تشکیل سلول تخم، برای هر ژن یک کپی یا آلل از مادر و آلل دیگر از پدر دریافت می‌شود.

در مبانی وراثت مندلی، جنسیت والدین در بروز صفات یک ژن بی‌تاثیر است و صرفا رابطه غالب و مغلوبی ژن‌ها در بروز صفات آنها موثرند. اما جالب است بدانیم که برخلاف اصول مندلی، تقریبا ۱۰۰ الی ۲۰۰ ژن در ژنوم پستانداران تحت تاثیر پدیده‌ای به نام ایمپرینت ژنومی قرار می‌گیرند. این پدیده باعث بیان تنها یکی از آلل‌های مربوط به والدین می‌گردد و کپی دیگر ژن خاموش می‌ماند و هیچ گونه رونویسی از آن صورت نمی‌پذیرد (۹).

ایمپرینت ژنی همانند پدیده غیرفعال شدن کروموزوم X است اما تفاوت‌هایی نیز با هم دارند (شکل۲). در ایمپرینت یکی از دو کپی یک ژن غیرفعال و کپی دیگر به صورت فعال رونویسی می‌شود. در این پدیده آلل غیرفعال شده در تمامی سلول‌های جاندار به طور پایدار غیرفعال باقی خواهد ماند (۱۰). این در حالی است که غیرفعال شدن کروموزوم X تصادفی است که در برخی سلول‌ها کروموزوم X پدری و برخی دیگر کروموزوم X مادری آنها غیرفعال می‌شود. در ایمپرینت ژنومی تمامی سلول‌ها دارای کپی غیرفعال مشابهی هستند که این پدیده در تکوین جنین غیرقابل برگشت است. به عنوان مثال در جنین منحصرا کپی پدری ژن فاکتور رشد شبه انسولینی Igf2 فعال و کپی مادری این ژن به علت ایمپرینت غیرفعال است (۱۱). آزمایش‌ها نشان می‌دهد که جنینی با دو کپی مادری از ژن Igf2 به علت فقدان ژن فعال، بقا نخواهد داشت (۱۱). همچنین جنین‌هایی که فاقد عملکرد DNA متیل ترنسفرازی هستند، ایمپرینت ژنومی در آنها رخ نمی‌دهد و محکوم به مرگ می‌شوند. بنابراین متیلاسیون اختصاصی یکی از دو کپی ژن، جهت ایمپرینت ضروری است.



شکل ۱: متیلاسیون DNA در روند جنین‌زایی. بلافاصله پس از لقاح هر دو ماده ژنتیکی پدری و مادری به طور گسترده و سریع تحت تاثیر دمتیلاسیون DNA قرار می‌گیرند. نخستین فاز دمتیلاسیون فعال منحصرا روی ژنوم پدری و قبل از شروع اولین همانندسازی سلولی روی می‌دهد. به دنبال آن فاز گذر (غیرفعال) روی هر دو ژنوم شروع می‌شود. در این فاز به دنبال هر همانندسازی از میزان متیلاسیون گسترده DNA کاسته می‌شود. جنین موش ۳/۵ روزه (مرحله بلاستوسیست) به آستانه دمتیلاسیون می‌رسد و بیشتر نشانگرهای اپی‌ژنتیکی به جز در محدوده ژن‌های ایمپرینت شده از نظر متیلاسیون DNA پاک می‌شود. متیلاسیون DNA پس از لانه‌گزینی جنین از سر گرفته می‌شود. لایه‌های اکتودرم و مزودرم جنین در روند متیلاسیون فعال و *de novo*، هیپر متیله می‌شود در صورتی که آندودرم اولیه و تروفوبلاست به صورت هیپومتیله باقی خواهند ماند. سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی (Inner Cell Mass: ICM) در مرحله بلاستوسیست استخراج می‌شوند که پس از اولین کشت هیپومتیله‌اند، ولی به مرور در پاساژهای بالاتر دارای مارکرهای متیله می‌شوند (۵).

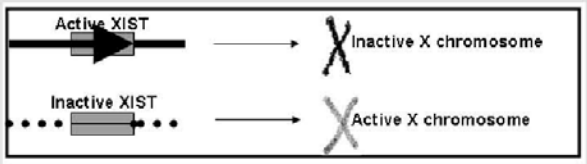


شکل ۲: کپی غیرفعال شده توسط پدیده ایمپرینت با (دایره قرمز) نشان داده شده است (۱۱)

چارچوب ۱: مکانیسم غیرفعال شدن کروموزوم X

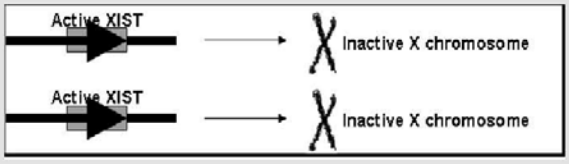
غیر فعال شدن کروموزوم X در جنین، نیازمند منطقه ویژه‌ای از کروموزوم است که مرکز غیرفعال شدن x نامیده می‌شود.بررسی‌ها نشان می‌دهد حذف این ناحیه غیرفعال نشدن کروموزوم X را به همراه دارد. ژن Xist برروی کروموزوم X قرار دارد و مسئول اصلی پدیده غیرفعال شدن کروموزوم X است. این ژن تنها در کروموزوم X غیرفعال، روشن است. آزمایش‌ها نشان داده که اگر یک ژن Xist فعال در یک کروموزوم اتوزومال جایگزین شود، تمامی ژن‌های موجود در این کروموزوم غیرفعال خواهند شد.

مطالعات نشان می‌دهد که نسخه‌برداری ژن Xist از یکی از دو کروموزوم در مراحل ابتدایی تکوین جنین باعث به کارگیری آن در یک کمپلکس پروتئین DNA می‌شود. این کمپلکس، هیستون H3 را در لیزین ۹ و ۲۷ متیله می‌کند. بنابراین یک ساختار فشرده کروماتینی را به وجود می‌آورد که نسخه‌برداری از آن صورت نمی‌پذیرد. نسخه‌برداری از ژن Xist یکی از دو کروموزوم، باعث تغییر در ساختار کروماتین و انتقال آن به مرحله استراحت و خاموش شدن بقیه ژن ها می‌شود (شکل الف).



شکل الف: رونویسی از ژن Xist در یکی از دو کروموزوم باعث غیرفعال شدن همان کروموزوم می‌شود.

غیرفعال شدن یک کپی از ژن Xist در موش‌های جهش یافته منجر به غیرفعال نشدن کروموزوم X در کروموزوم فاقد این ژن می‌شود؛ در حالی که کروموزوم دیگر شروع به غیرفعال شدن می‌کند. بنابراین ژن Xist برای غیرفعال شدن کروموزومی که روی آن قرارگرفته لازم است. به طور شگفت‌آوری ژن Xist تنها بر روی کروموزم غیرفعال نسخه‌برداری شده و الگوی آن برخلاف ژن‌های دیگر است. نقش ویژه این ژن در غیرفعال شدن کروموزوم X با ایجاد موش‌های جهش یافته که بیان Xist را در هر دو کروموزوم نشان می‌دهند مطالعه شده است. در این حالت هر دو کروموزوم X شروع به غیرفعال شدن می‌کنند (شکل ب).



شکل ب: رونویسی از ژن Xist در هر دو کروموزم باعث غیرفعال شدن کروموزوم‌ها می‌شود

ایمپرینت در طی تکوین

سلول‌های پیش‌ساز جنینی (Primordial Germ Cells: PGC) در موش بین روزهای ۱۲/۵-۱۰/۵ پس از لقاح به گنادها مهاجرت می‌کنند. در این فاصله زمانی، ژنوم آنها دمتیله می‌شود و سپس متیلاسیون ویژه‌ای بر اساس جنسیت والدین به خود می‌گیرد. در طول تکوین سلول‌های جنسی، اختلاف متیلاسیون DNA در ژن‌های ایمپرینت شده تحت تاثیر آنزیم‌های دمتیلاز از بین می‌رود و در نتیجه برنامه جدید سلولی آغاز می‌شود. برخلاف پافشاری ژن‌های ایمپرینت شده برای متیله ماندن، در طی تکوین قبل از لانه‌گزینی دمتیلاسیون گسترده ژنومی اتفاق می‌افتد. هدف اصلی بیولوژیکی این موج دمتیلاسیون که به صورت دو مکانیسم گذرا و فعال روی می‌دهد، هنوز کاملا مشخص نشده است. یکی از فرض‌های قوی مطرح شده تئوری ستیز (Conflict) است که بدین صورت بیان می‌شود: متیلاسیون ژنوم پدری یک سلاح ضد ایمپرینت در مقابل القای ایمپرینت از جانب تخمک است. اما اشکال این تئوری در این است که انگیزه دمتیلاسیون گذرا را توضیح نمی‌دهد.

با توجه به اهمیت فرایند ایمپرینت ژنومی در سلول و طی تکوین مراحل اولیه جنینی می‌توان به نقش ارزنده و اساسی آن در سلول‌های بنیادی و روند تمایز آنها در محیط کشت پی برد. شرایط محیط کشت، توانایی ایجاد تغییرات گسترده‌ای در سطح اپی‌ژنتیکی و پدیده ایمپرینت دارد. بنابراین شناخت این عوامل و همچنین شناسایی مکانیسم‌های موثر در ایمپرنت ژنومی در تمایز هدفمند سلول‌های بنیادی و استفاده از آنها در طب سلول درمانی بسیار حایز اهمیت است (۱۲).

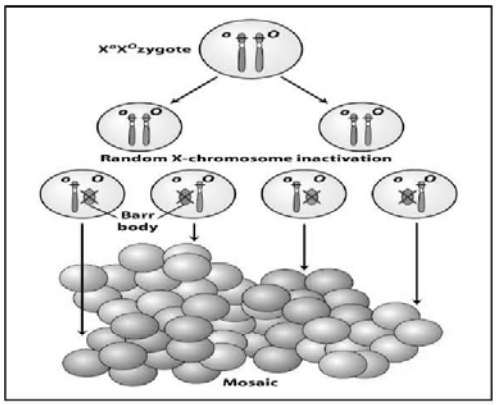
غیرفعال شدن کروموزوم X (X-Inactivation)

در پستانداران، ماده‌ها واجد ۲ کروموزوم X و نرها دارای یک کروموزوم X هستند. بنابراین به نظر می‌رسد در سلول‌های پستانداران ماده، به علت بالا رفتن مقدار بیان ژن‌های مربوط به کروموزوم X مشکلاتی به وجود آید. اما این مشکل توسط پدیده‌ای به نام غیرفعال شدن کروموزوم X برطرف می‌شود. طی این فرایند یکی از دو کروموزوم X غیرفعال و دیگری فعال باقی می‌ماند (چارچوب۱).

در طول تکوین جنین، یکی از دو کروموزوم X در هر سلول جنس ماده و تقریبا در مورد تمامی ژن‌های آن غیرفعال می‌شود. بنابراین در ژنوم این سلول‌ها، بیان ژن‌های مربوطه همانند افراد نر خواهد بود. در شرایط عادی پدیده غیرفعال شدن کروموزوم X به صورت تصادفی است. غیرفعال سازی کروموزومی در مراحل اولیه تکوین جنین‌های ماده رخ می‌دهد. نکته جالب توجه این است که هر کروموزومی که در این مرحله غیرفعال شود، در تمامی سلول‌های حاصل از تقسیم آن نیز همان کروموزوم غیرفعال باقی خواهد ماند (شکل۳).

ساختار DNA در کروموزوم X غیرفعال، بسیار فشرده و از نوع هتروکروماتین است. آزمایش‌ها نشان می‌دهد کروموزوم X غیرفعال نسبت به کروموزوم فعال از حساسیت کمتری نسبت به هضم آنزیمی DNase-I برخوردار است (۹). این کروموزوم‌ها از نظر تغییرات هیستونی، تفاوت‌های زیادی دارند و نوکلئوتیدهای CpG بیشتری از آن متیله‌اند. به عنوان مثال از ۶۱ دی‌نوکلئوتید CpG مربوط به پروموتر ژن PGKI در کروموزوم X غیرفعال، ۶۰ تای آن متیله است. در حالی که تمامی این CpGها در کروموزوم X فعال به صورت غیرمتیله‌اند. آزمایش‌ها نشان می‌دهد که تیمار با ماده ۵-آزا-سیتیدین (5-Aza-cytidine) باعث دمتیلاسیون و در نتیجه فعال شدن مجدد، کروموزوم X غیرفعال خواهد شد.

در موجودات مختلف مکانیسم‌های دیگری نیز جهت جبران مقداری ژن‌های موجود بر روی کروموزوم X وجود دارد. به عنوان مثال در مگس سرکه نوع نر میزان نسخه‌برداری از ژن‌های کروموزوم X به مراتب بیشتر از نوع ماده که هر دو کروموزوم X را دارد صورت می‌پذیرد.



شکل ۳: غیرفعال شدن تصادفی یکی از دو کروموزوم X

مکانیسم‌های مولکولی موثر در اپی‌ژنتیک سلول‌های بنیادی

به گفته محققان شاخص‌های اپی‌ژنتیکی با وجود قابل توارث بودن و پایداری، ماهیت کاملا دینامیک و قابل برگشتی دارند و به واسطه عوامل تغییردهنده ساختار کروماتین تنظیم می‌شوند. کروماتین به مجموعه ترکیبات تشکیل دهنده ژنوم گفته می‌شود که شامل چهار ترکیب اصلی DNA، پروتئین‌های هیستونی (Histone proteins)، پروتئین‌های غیرهیستونی (Non-histone proteins) و RNA است. مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی مختلف با تغییراتی که برروی اجزای تشکیل دهنده کروماتین اعمال می‌کنند منجر به دگرگونی ساختاری آن می‌شوند و این امر به نوبه خود الگوی بیان ژنی را در این ساختار دست‌خوش تغییر می‌کند. از شناخته شده‌ترین مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی که به خصوص نقش آنها در روند تمایز سلول‌های بنیادی به اثبات رسیده است می‌توان به عوامل تغییر آرایش‌دهنده کروماتین، عوامل تغییر دهنده هیستون‌ها و واریته‌های هیستونی، متیلاسیون DNA و نهایتا RNAهای کوچک تنظیمی یا micro-RNAها اشاره کرد.

تغییر آرایش کروماتین

سازماندهی فضایی کروماتین در سطوح بالای ساختاری خود به عنوان یک عامل کلیدی در تنظیم ژنوم محسوب می‌شود.ظ ساختار

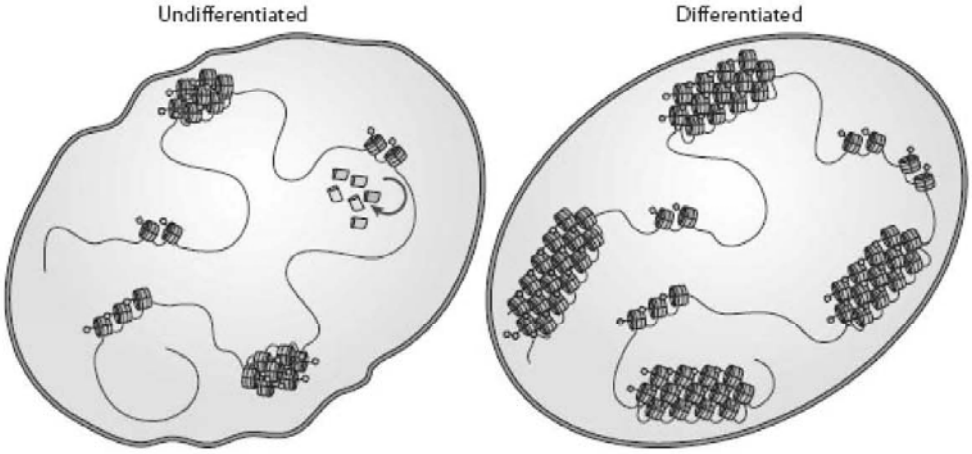
کروماتین با تغییری که در میزان دسترسی پروتئین‌های تنظیمی به جایگاه هدف خود و نیز تمایل اتصال آنها به این نواحی فراهم می‌کند می‌تواند روی عملکرد ژن‌ها تاثیر بگذارد (۱۳). در روند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده‌های تمایز یافته، ساختار کلی کروماتین دستخوش تغییرات معنی‌داری می‌گردد (۱۴، ۱۵). مجموعه مطالعاتی که در این خصوص انجام گرفته است نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی جنینی دارای یوکروماتین بازتری هستند و به تدریج که به سمت تمایز پیش می‌روند نواحی متراکم هتروکروماتینی که از نظر الگوبرداری غیرفعال هستند بیشتر می‌شوند (شکل۴). به عنوان مثال آرایش فضایی هتروکروماتین سلول‌های بنیادی تراتومای جنینی F9 (۱۶) و نیز سلول‌های بنیادی جنینی موشی (۱۷) طی تمایز تغییر می‌کند و بر تعداد کانون‌های هتروکروماتین افزوده می‌شود. مقایسه تصاویر میکروسکوپ الکترونی هسته سلول‌های بنیادی جنینی تمایز نیافته با انواع القا شده با رتینوییک اسید نیز تغییر ساختار کروماتین آنها را از حالت دانه‌دار یکنواخت به شکل ساختار هتروکروماتینی نامنظم نشان می‌دهد (۱۴). همچنین مشاهده مستقیم نواحی هتروکروماتین سانترومری با نشانگر ویژه توالی‌های تکرار شونده این مناطق بیانگر وجود هتروکروماتین به مراتب پراکنده‌تر و بازتری در سلول‌های بنیادی جنینی نسبت به سلول‌های پیش‌ساز عصبی است (۱۶).

از جمله عوامل پروتئینی موجود در کروماتین، فاکتورهای وابسته به ATP تغییردهنده ساختار کروماتین (ATP- dependent chromatin remodeling factors) هستند که نقش آنها در روند تمایز سلول‌های بنیادی به اثبات رسیده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیان چندین فاکتور تغییر آرایش دهنده کروماتین درسلول‌های بنیادی جنینی افزایش می‌یابد (۱۸)، به طوری که یک نقص ژنی در یکی از این فاکتورهای پروتیینی به نام ISWI در دروزوفیلا (Drosophila melanogaster) روند تمایز را در این موجود با مشکل مواجه می‌سازد که در مورد فاکتور پروتئینی DOM نیز مشابه چنین وضعیتی گزارش شده است . همچنین در سلول‌های بنیادی جنینی موشی وجود کمپلکس تغییر آرایش دهنده (Nucleosome Remodeling Domain: NuRD) برای تمایز این سلول‌ها ضروری است (۱۹). این نتایج همگی نقش فعال فاکتورهای تغییردهنده ساختار کروماتین را در حفظ حالت پایه‌ای سلول‌های بنیادی و نیز در مراحل اولیه تمایز آنها نشان می‌دهد.

تغییرات در سطح هیستون‌ها

تغییر شکل هیستون‌ها (Histone modification):

هیستون‌ها به عنوان واحدهای تشکیل دهنده ساختار نوکلئوزوم (چارچوب۲) نقش بسیار مهمی در شکل‌گیری ساختار کروماتین دارند و تغییرات اعمال شده روی آنها می‌تواند باعث برهم خوردن آرایش کروماتین شود. پروتئین‌های هیستونی به ویژه در ناحیه دم خود در معرض تغییر شکل‌های پس از ترجمه (Post translational modifications) قرار می‌گیرند که در مجموع مدیفیکاسیون‌های هیستونی نامیده می‌شوند. این تغییرات شامل استیله (Acetylation) و متیله شدن (Methylation) اسیدآمینه‌های لیزین (K) و آرژینین (R)، فسفریله شدن (Phosphorylation) سرین (S) و تریونین (T) و نهایتا یوبی کویتینه (Ubiquitination) و ساموییله شدن (Sumoylation) لیزین است (چارچوب۳).



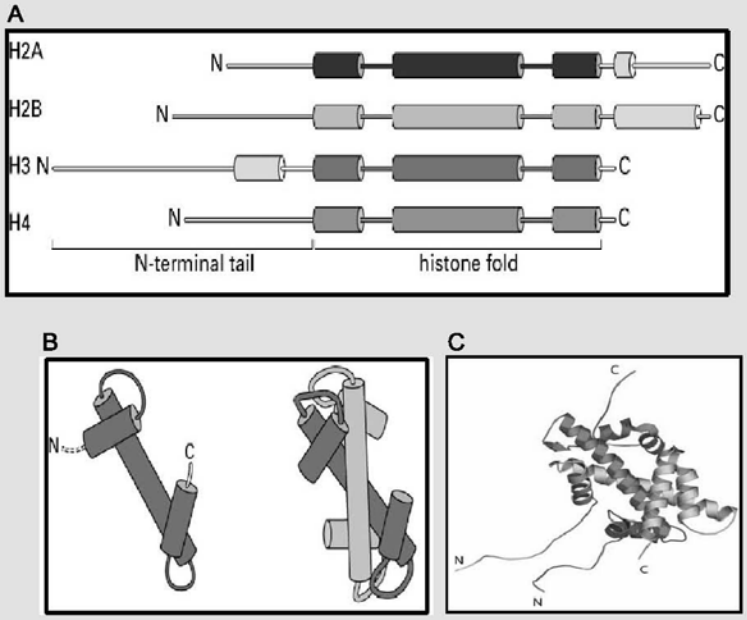
شکل (۴): تغییر ساختار کروماتین طی تمایز سلول‌های بنیادی. در سلول‌های جنینی پرتوان (سمت چپ) کروماتین اساسا حالت غیرمتمرکزی دارد و غنی از شناسه‌های هیستونی فعال (دایره‌های سبزرنگ) است. در طی تمایز (سمت راست) نواحی متراکم هتروکروماتین به تدریج تشکیل شده و شناسه‌های هیستونی خاموش (دایره‌های قرمز رنگ) جایگزین حالت فعال آن می‌شوند (۱۴).

چارچوب ۲: هسیتون‌ها و ساختار نوکلئوزوم

واحد اصلی تشکیل دهنده کروماتین نوکلئوزوم (nucleosome) نام دارد (۲۰) که حاصل برقراری میان‌کنش بین پروتئین‌های هیستونی و مولکول DNA در فواصل نسبتا یکسان حدود ۲۰۰ جفت باز است. پروتئین‌های هیستونی بر مبنای محتوا و توالی آمینواسیدی خود به پنج گروه H4, H3, H2B, H2A, H1 تقسیم‌بندی می‌شوند (۲۱). هیستون‌های H4, H3, H2B, H2A دارای وزن مولکولی ۱۴–۱۰ کیلودالتون‌اند و به دلیل قرارگیری در بخش مرکزی نوکلئوزوم، هیستون‌های مرکزی نامیده می‌شوند. این پروتئین‌ها با ایجاد دایمرهای H2A-H2B, H3-H4، اکتامر هیستونی مرکزی (Core histone octamer) را تشکیل می‌دهند که حدود ۱۴۰جفت‌باز از مولکول دو رشته‌ای DNA به مقدار ۱/۷۵ دور اطراف آن تابیده شده و تکرار این واحدها در طول ژنوم، فیبرهای ۱۰ نانومتری یا همان سطح اول سازماندهی ژنوم را به وجود می‌آورد.

در تمام پروتئین‌های هیستون مرکزی بخشی شامل ۷۰ اسید آمینه وجود دارد که تشکیل سه ساختار مارپیچ آلفای متوالی را می‌دهد و به همراه دو بخش حلقه بینابینی خود، یک دومین مارپیچ–حلقه–مارپیچ–حلقه–مارپیچ ویژه تحت عنوان پیچش هیستونی (Histone fold) را به وجود می‌آورد (شکل الف). این ناحیه که دربین هر چهار گروه هیستون مرکزی تقریبا حفظ شده است، محل اصلی برقراری میان‌کنش بین هیستون‌ها و همچنین هیستون‌ها و مولکول DNA است.

در بخش انتهای آمینی پلی پپتیدهای تشکیل دهنده هیستون مرکزی یک ناحیه ۳۵–۲۰ آمینواسیدی وجود دارد که غنی از اسیدآمینه‌های بازی لیزین و آرژینین است. این قطعه پپتیدی قادر به تشکیل ساختار دوم منظمی نیست و به صورت یک زنجیره نامنظم از سطح پروتئین بیرون می‌زند که اصطلاحا دم هیستونی (Histone tail) نامیده می‌شود (شکل الف). لازم به ذکر است که در پروتئین H2A علاوه بر انتهای آمینی، در انتهای کربوکسیلی پروتئین نیز چنین ناحیه پپتیدی با ساختار نامنظم وجود دارد. این دم‌ها عمدتا در شکل‌گیری ساختار هیستون‌ها در درون یک نوکلئوزوم نقشی ندارند، بلکه در آرایش ساختاری نوکلئوزوم‌ها درسطح بالاتر و در برقراری میانکنش با پروتئین‌های تنظیمی بسیار حایز اهمیت‌اند. برداشتن بخش دم از روی هیستون‌ها باعث ناتوانی آنها در تشکیل آرایش فضایی فراتر از ۱۰ نانومتر می‌شود. اگر چه به دلیل تراکم بالای اسیدآمینه‌های بازی در دم هیستون‌ها، این نواحی عمدتا به عنوان جایگاه‌های اتصال به DNA مطرح می‌شوند، ولیکن نقش اصلی و اساسی آنها را باید در فرایند تنظیم بیان ژن به واسطه بروز مدیفیکاسیون‌های مختلف بر روی آنها دانست (۲۲).



شکل الف: شمایی از توالی پلی‌پپتیدی هیستون‌های مرکزی (A) و تشکیل پیچش هیستونی به صورت مونومر و دایمر (B) و نحوه بیرون زدگی دم‌های هیستونی که محل بروز مدیفیکاسیون‌های مختلفند (C).

چارچوب۳: مدیفیکاسیون هیستون‌ها

پروتئین‌های هیستونی به ویژه در ناحیه دم خود در معرض مدیفیکاسیون‌های پس از ترجمه قرار می‌گیرند که عبارتند از:

استیله شدن: این فرایند که شامل اضافه شدن گروه استیل به گروه ۳ آمینوی زنجیره جانبی اسیدآمینه لیزین است، اولین مدیفیکاسیون شناسایی شده در هیستون‌ها است (۲۳) و تا به امروز نیز بیشترین مطالعه بر روی آن انجام شده است. آنزیم کاتالیزکننده این مدیفیکاسیون هیستون استیل ترانسفراز (Histone acetyltransferase: HAT) نامیده می‌شود و فرایند عکس آن نیز که شامل برداشته شدن گروه استیل از روی هیستون‌های تغییریافته است توسط هیستون داستیلاز (Histone deacetilase: HDAC) انجام می‌شود (۲۴). استیله شدن و داستیله شدن بر روی هر چهار گروه هیستونی H4, H3, H2B, H2A انجام می‌شود و باعث خنثی شدن بار مثبت ناشی از تجمع اسیدآمینه‌های بازی لیزین متمرکز برروی ناحیه دم آنها می‌شود که این امر نیز به نوبه خود منجر به تغییر میان‌کنش‌های هیستون‌ها با DNA و نیز هیستون‌ها با پروتئین‌های غیرهیستونی دیگر و نهایتا بازشدن ساختار کروماتین می‌شود. معمولا فرایند استیلاسیون در ارتباط با نواحی فعال الگوبرداری مطرح می‌شود، حال آنکه داستیله شدن باعث خاموشی و غیرفعال شدن آن ناحیه از کروماتین می‌شود.

متیله شدن: این فرایند شامل اضافه شدن گروه متیل به انتهای زنجیره جانبی اسیدآمینه‌های لیزین و آرژینین است و با حالت‌های مختلف اتصال یک واحد متیل (مونومتیلاسیون)، دو واحد متیل (دی متیلاسیون) و سه واحد متیل (تری متیلاسیون) به گروه آمین انتهای این اسیدهای آمینه انجام می‌شود. در مورد لیزین هر سه نوع متیلاسیون به وفور مشاهده می‌شود ولیکن در مورد آرژینین تنها حالت‌های مونو و دی‌متیله شدن گزارش شده است. فرایند متیله شدن نیز مانند استیله شدن در هر چهار گروه هیستون مرکزی انجام می‌شود و عملکردهای مختلفی به آن نسبت داده می‌شود. تری متیله شدن لیزین شماره ۹ (K9) در هیستون H3 یک متیلاسیون کاملا شناخته شده در ارتباط با هتروکروماتین و نواحی خاموش ژنوم است (۲۵)، درحالی که دی و تری متیله شدن K4 در هیستون H3 مربوط به نواحی فعال یوکروماتین است (۲۶). همچنین در فرایند میتوز نیز تری متیله بودن K9 هیستون‌های H3 موجود در نواحی هتروکروماتینی اطراف سانترومر، نقش مهمی در جدا شدن صحیح کروماتیدهای خواهری در مرحله آنافاز دارد (۲۷).

فسفریله شدن: اضافه شدن گروه فسفات به زنجیره‌های جانبی اسیدآمینه‌های سرین (S) و ترەاونین (T) باعث افزایش بار منفی این نواحی و تغییر الگوی میان‌کنش هیستون–DNA و بر اساس نوع پروتئین یا پروتئین‌هایی که نوکلئوزوم فسفریله شده را شناسایی می‌کند و به آن محل فراخوانده می‌شود، عملکردهای مختلفی را داخل هسته به پیش می‌برد. گزارش‌های زیادی مبنی بر ارتباط فسفریله شدن هیستون H3 با نواحی فعال الگوبرداری وجود دارد (۲۸، ۲۹)، همچنین نقش فسفریله شدن هیستون H2A در فرایند تعمیر DNA کاملا شناخته شده است (۳۰).

یوبی کوییتینه شدن: این فرایند شامل اتصال یک مولکول پروتئینی با طول ۷۶ اسیدآمینه به نام یوبی کوییتین، به زنجیره جانبی اسیدآمینه لیزین است که این اتصال از نوع پپتیدی بوده و بین گروه کربوکسیل اسیدآمینه انتهایی گلیسین در پروتئین یوبی کوییتین و گروه ۳– آمینوی زنجیره جانبی اسیدآمینه لیزین در پروتئین هدف است (۳۱). دو نوع یوبی کوییتینه شدن کاملا شناخته شده در هیستون‌ها مربوط به K119 در H2A و K120 یا K123 در H2B است (۳۲) که نقش بیولوژیکی آنها مشخص شده است. به اعتقاد محققان برخلاف استیله/داستیله شدن که معمولا در فرایند بیان ژن نقش متضادی نسبت به هم دارند، یوبی کوییتینه/دیوبی کوییتینه شدن هیستون‌ها هر دو برای فعال‌سازی الگوبرداری لازمند. مکانیسم اثر این مدیفیکاسیون از طریق فعال کردن مسیرهای میان‌کنش پروتئین–پروتئین و فراخوان پروتئین‌های عملکردی خاص به ناحیه حاوی نوکلئوزوم تغییریافته است.

ساموئیله شدن: این فرایند شبیه یوبی کوئیتینه شدن بوده و شامل اضافه شدن یک مولکول پروتئینی شبیه یوبی کوئیتین به نام سامو (sumo) به پروتئین هدف است (۳۳). سامو مخفف عبارت small ubiquitin–like modifier است و نام پروتئینی با ۱۰۱ اسید آمینه است که دارای یک ناحیه مشابه با پروتئین یوبی کوئیتین است و به همین دلیل به این نام نامیده می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد که ساموئیله شدن هیستون H4 باعث فراخوان آنزیم‌های هیستون داستیلاز و همچنین پروتئین هتروکروماتینی شدن HP1 به ناحیه تغییر یافته کروماتین می‌شود و احتمالا به نوعی با نواحی خاموش وغیرفعال کروماتین در ارتباط است (۳۴).

هر یک از این مدیفیکاسیون‌ها با تغییراتی که روی نوکلئوزوم به وجود می‌آورند منجر به بروز تغییرات ساختاری و عملکرد ویژه‌ای در آن ناحیه از کروماتین می‌شوند. در یک نگاه ساده چنین تصور می‌شود که تغییر شکل هیستون‌ها و افزوده شدن گروه‌های شیمیایی بارداری چون استیل و فسفات، باعث تغییر بار الکتریکی نوکلئوزوم و سست شدن ارتباط آن با DNA می‌شود. اگر چه این توجیه نیز درسطح خود قابل تامل است ولی آنچه امروزه به عنوان مکانیسم اصلی تاثیر انواع مدیفیکاسیون‌های مختلف روی ساختار کروماتین مطرح می‌شود عبارت است از شناسایی این تغییر شکل‌ها توسط پروتئین‌های خاص و برقراری میانکنش‌های پروتئین–پروتئین و فراخوان آنزیم‌ها و پروتئین‌های عملکردی به نواحی تغییر یافته کروماتین. در مبحث تاثیر مدیفیکاسیون‌های مختلف هیستونی روی ساختار و عملکرد کروماتین، اصطلاحی به نام کد هیستونی (Histone code) مطرح می‌شود (۳۵) که به معنی تلفیق چندین مدیفیکاسیون مختلف و وجود ارتباط متقابل بین آنها در بروز یک عملکرد بیولوژیکی خاص است. به عنوان مثال فسفریله شدن سرین شماره ۱۰ در هیستون H3 (H3-S10ph) به همراه استیله شدن این هیستون در لیزین شماره ۱۲ (H3-K12ac) و نیز استیله شدن لیزین ۸ در هیستون H4 (H4-K8ac) باعث فعال شدن الگوبرداری در آن ناحیه از کروماتین می‌شود. در سال‌های اخیر گزارش‌های جالب توجهی در مورد الگوی تغییر شکل هیستونی بخش‌هایی از ژنوم که حاوی خوشه‌های ژنی مطرح در فرایند تمایزند ارایه شده و ماهیت بعضی از مدیفیکاسیون‌های بارز در این نواحی مشخص شده است (۳۶). از شناخته‌شده‌ترین این تغییرات می‌توان به افزایش وابسته به تمایز متیلاسیون لیزین‌های ۴ و ۹ در هیستون

H3 (H3-K9me3) و (H3-K4me3) و نیز کاهش کلی سطح استیلاسیون هیستون‌های H3 و H4 اشاره کرد (۳۷، ۳۸). این یافته‌ها نشان می‌دهد که کروماتین سلول‌های بنیادی ماهیت فعال‌تری دارند و با شاخصه‌های مدیفیکاسیون هیستونی مربوط به نواحی فعال ژنوم در ارتباطند. حال آنکه طی تمایز، این شاخصه‌ها عموما جای خود را به تغییرات هیستونی معرف کروماتین غیرفعال و خاموش می‌دهند. الگوی تغییر شکل هیستونی در سطح ژنوم سلول‌های بنیادی را می‌توان در دو حالت کلی و جزیی مورد بررسی قرار داد. تغییرات کلی مشاهده شده شامل H3-K9me، H3-K27me و H4-K20me است که پس از القای این سلول‌ها با یک عامل تمایزدهنده در سطح کلی ژنوم آنها بروز می‌کند (۳۹). علاوه بر تغییرات کلی قابل مشاهده در سطح ژنوم، تغیر الگوی مدیفیکاسیون هیستونی نواحی پروموتری ژن‌های درگیر در فرایند تمایز نیز می‌تواند در بروز فرایند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موثر باشد. به عنوان مثال پروموتر ژن OCT4 در سلول‌های تمایز نیافته غنی از هیستون‌های H3 و H4 استیله شده است که شاخصه‌ای از کروماتین فعال محسوب می‌شود؛ حال آنکه در طی تمایز این الگو دست‌خوش تغییر می‌شود (۴۰).

استفاده از عوامل مهارکننده تغییرات هیستونی مثل تریکوستاتین A (Trichostatin A) نقش بسیار مهم این نوع مکانیسم اپی‌ژنتیکی را در تمایز هدف‌دار سلول‌های بنیادی مشخص‌تر می‌کند. به عنوان مثال بررسی‌های انجام شده توسط محققان نشان می‌دهد که حضور این ترکیب مهارکننده در محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش، باعث توقف فرایند تمایز در این سلول‌ها می‌شود (۳۸). همچنین مهار هیستون داستیلاز توسط این ترکیب می‌تواند باعث القای تمایز به عصب در سلول‌های پیش‌ساز نورون گردد (۴۱). نکته جالب توجه دیگر این است که اخیرا تاثیر تریکوستاتین A در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سلول‌های هپاتوسیت گزارش شده است (۴۲). این مثال نقش تغییرات ساختاری کروماتین و به ویژه مدیفیکاسیون هیستون‌ها را در تمایز سلول‌های اپی‌تلیال از مزانشیم به خوبی نشان می‌دهد. اگر چه گزارش‌های زیادی مبنی بر تاثیر این نوع مهار کننده‌ها در مدیفیکاسیون هیستونی مطرح شده ولی به خاطر عملکرد آنها در سطح ژنوم، هنوز ناشناخته‌های فراوانی در جهت چگونگی استفاده از آنها باقی مانده است.

واریته‌های هیستونی

یکی از عوامل مهم تنظیم‌کننده ساختار کروماتین در سلول‌ها، جایگزینی پروتئین‌های هیستونی توسط واریته‌های آنهاست. این هیستون‌های فرعی نسبت به انواع اصلی خود متفاوتند به گونه‌ای که از روی mRNA دارای دم پلی A رونویسی شده‌اند و جایگزینی آنها در کروماتین نیز به فرایند همانندسازی وابسته نیست (۴۳). این پروتئین‌ها که تاکنون در مورد هیستون‌های H1، H2A و H3 گزارش شده‌اند شامل H2A.Z، H2A.X، macroH2A، H2A.Bdb، H3.1-3 و H1a-d و نیز H10 هستند. هر کدام از واریته‌های هیستونی مختلف را می‌توان به عنوان شاخصه‌ای از یک نوع کروماتین خاص در نظر گرفت، به گونه‌ای که حضور هر یک از آنها در ساختار نوکلئوزوم می‌تواند باعث القای حالت‌های مختلفی از کروماتین مانند خاموشی غیرقابل برگشت، خاموشی قابل برگشت و یا کروماتین فعال در آن ناحیه شود.

تغییر واریته‌های هیستونی در روند تمایز سلول‌های بنیادی نیز گزارش شده است. در مطالعه انجام شده روی سلول‌های بنیادی جنینی موشی مشخص شده که در حین تمایز وابسته به رتینوییک اسید این سلول‌ها مقدار H3.3 نسبتا افزایش یافته، حال آنکه از میزان دو واریته دیگر هیستون H3 یعنی H3.2 و H3.1 تا حدودی کاسته می‌شود (۴۴). بنابراین هیستون‌ها نه تنها با تغییرات شیمیایی مختلفی که روی آنها صورت می‌گیرد، بلکه به واسطه جایگزینی با واریته‌های دیگر می‌توانند به عنوان یک عامل اپی‌ژنتیکی مهم در تغییر ساختار و در نتیجه عملکرد ناحیه کروماتینی دربرگیرنده خود عمل نمایند.

متیلاسیون DNA

بین وضعیت تمایز سلول‌های بنیادی و متیلاسیون DNA رابطه تنگاتنگی وجود دارد. متیلاسیون DNA شامل افزوده شدن گروه متیل روی باز سیتوزین موجود در نواحی غنی از دی نوکلیوتید CpG در سطح ژنوم است که به جزایر CpG (CpG Islands) معروف‌اند (چارچوب ۴). این فرایند به عنوان یک مکانیسم القاکننده برای غیرفعال شدن نواحی از ژنوم شناخته شده است (۴۵، ۴۶). متیلاسیون DNA نقش مستقیمی در تنظیم ساختار کروماتین ایفا می‌کند و برای حفظ این ساختار در طول تمو بسیار ضروری است (۴۷). در مراحل اولیه جنین زایی نیز، الگوی متیلاسیون در سطح ژنوم پاک می‌شود و موج متیلاسیون جدیدی بعد از مرحله لانه گزینی شکل می‌گیرد (۴۸).

تاثیر مواد باز دارنده متیلاسیون DNA در تمایز سلول‌های بنیادی به دودمان‌های مختلف سلولی بررسی شده است. تحقیقات نشان داده است که تیمار سلول‌های بنیادی با ۵ آزا - سیتیدین (5-Aza-cytidine) از تمایز آنها جلوگیری می‌کند (۴۹). لازم به ذکر است تاثیر این ماده در رده‌های مختلف سلولی متفاوت است. به عنوان مثال در سلول‌های رده C3H/10T1/2 تاثیر این مهارکننده باعث القای تمایز به سمت سلول‌های ماهیچه‌ای، چربی و غضروف می‌شود (۵۰). اگرچه این ممکن است یک تضاد به نظر برسد ولی دانشمندان معتقدند که در این حالت یک نوع برگشت درالگوی متیلاسیون این سلول‌ها روی می‌دهد و آنها را به سمت سلول‌های چند توان با قابلیت تمایز به سلول‌های دیگر می‌کشاند. برای تایید این موضوع نشان داده شده که تاثیر این ماده بر سلول‌های بنیادی تروفوبلاست که در حالت طبیعی ژن OCT4 را بیان نمی‌کنند، القای بیان مجدد این ژن صورت می‌پذیرد (۴۰). این داده‌ها باعث پررنگ‌تر شدن نقش متیلاسیون گسترده DNA (متیلاسیون در سطح ژنوم) در روند تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود.

متیلاسیون DNA در فرایندهایی مانند ایمپرینت ژنومی، غیرفعال شدن کروموزوم X و همچنین مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis)، نقش تعیین‌کننده‌ای دارد.همچنین ژنوم میزبان از طریق سیستم متیلاسیون

DNA و بـه کـارگیری آنـزیم‌های مـحدودگر حـساس بـه مـتیلاسیون (Methlation-sensitive restriction enzymes)، ویـروس‌ها و رتـرو‌ویروس‌ها حـفاظت مـی‌شود. از دیـگر نـقش‌های متیلاسیون DNA می‌توان به تنظیم بیان برخی از ژن‌ها اشاره کرد، به عنوان مثال پس از سرطانی شدن سلول، کاهش متیلاسیون گسترده در ژنوم آنها دیده می‌شود که نمایانگر افزایش رونویسی در سطح ژنوم است. بررسی توالی DNA در برخی ژن‌های کلیدی مثل مهارکننده تومور، به طور متضادی افزایش شدید متیلاسیون موضعی DNA را در نواحی تنظیمی آنها نشان می‌دهد که بیانگر غیرفعال شدن آن ژن‌ها است.

microRNAها به عنوان RNAهای کوچک غیرکدشونده و تنظیمی

microRNAها یا miRNAها یکی از جدیدترین یافته‌ها در مباحث اپی‌ژنتیک و کنترل بیان ژن در یوکاریوت‌ها هستند و نقش آنها در سلول‌های بنیادی هر روز نمایان‌تر می‌شود. اولین microRNAها به عنوان RNAهای کوچکی شناخته شدند که در تنظیم ترتیب زمانی برخی تحولات تکوینی جنین نقش داشتند و به همین خاطر short temporal RNA نام‌گذاری شدند. با گذشت زمان و کشف انواع بیشتری از آنها، مشخص شد که short temporal RNAها در واقع اولین اعضای شناخته شده microRNA محسوب می‌شوند. البته باید دانست عملکرد microRNAها تنها به تنظیم ترتیب زمانی وقایع تکوین محدود نمی‌شود بلکه در بسیاری از مسیرهای فیزیولوژیک نیز نقش تنظیمی مهمی را ایفا می‌کنند (۵۱). در حال حاضر انواع زیادی از miRNAها در کرم‌ها، مگس‌ها، گیاهان، پستانداران و همچنین انسان شناخته شده‌اند (چارچوب ۵).

چارچوب ۴: متیلاسیون DNA

در اوایل دهه ۱۹۷۰ میلادی تحول عظیمی در زمینه اپی‌ژنتیک رخ داد. این تحول در ادامه کشف رویدادهای زیر صورت پذیرفت:

۱. کشف آنزیم‌هایی که DNA پستانداران را به صورت حفاظتی و یا *de novo* متیله می‌کنند. امروزه این آنزیم‌ها در خانواده DNA متیل ترانسفرازها (Methyltransferases: Dnmts) طبقه‌بندی شده‌اند.

۲. پیدایش روش‌هایی برای شناسایی نواحی متیله مولکول DNA مانند روش‌های (Merthylation Spectific PCR: MSP) و به ویژه روش (Bisulfite Sequencing Analysis: BSA) که به طور مستقیم می‌توانند نوکلئوتیدهای متیله را شناسایی کنند.

۳. کشف آنزیم‌های محدودالاثر ویژه‌ای که به متیلاسیون مولکول DNA حساس بودند و به تبع آن روش‌هایی مثل (Combined Bisulfite Resticition Enzyme Analysis: COBRA) که بر مبنای استفاده از این آنزیم‌ها طراحی شده‌اند.

۴. شناسایی رابطه متیلاسیون ژن‌های ناهنجار و روند پیری.

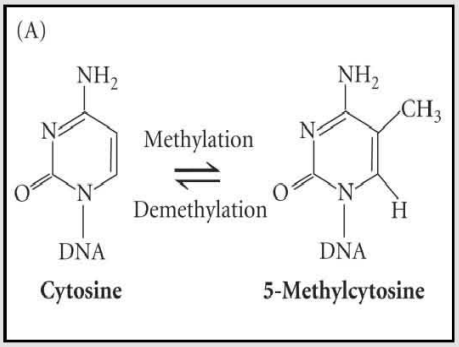
۵. شناسایی رابطه متیلاسیون DNA و Chromatin Remodeling و تاثیر آن دربیان ژن‌ها.

متیلاسیون DNA بر روی باز سیتوزین در دی نوکلئوتیدهای سیتوزین-گوانین (CpG) روی می‌دهد (شکل الف). این فرایند تقریبا در همه مهره‌داران، اکثر بی‌مهرگان و تعدادی از گونه‌های گیاهی دیده می‌شود، اگر چه در گیاهان متیلاسیون برروی بازهای دیگری نیز رخ می‌دهد (۲).

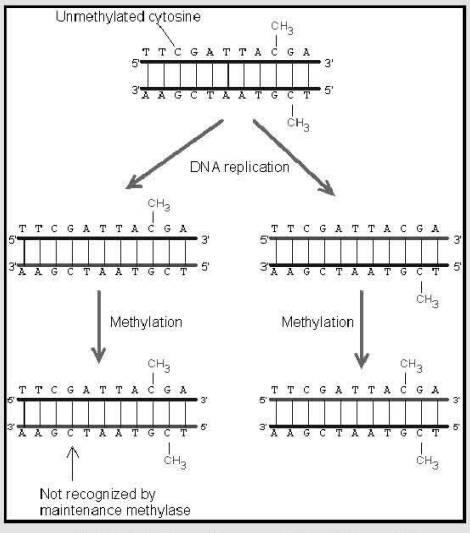
در پستانداران الگوی متیلاسیون به طور پایداری توسط آنزیم DNA متیل ترانسفراز -I(DNMT1) حفظ می‌شود. این آنزیم در هنگام همانندسازی در صورت متیله بودن رشته DNA مادری، می‌تواند رشته تازه ساخته شده را متیله کند. این ویژگی به منظور حفظ الگوی متیلاسیون در پدیده‌ای به نام ایمپرینت ژنی بسیار حائز اهمیت است.

DNA غیرمتیله به صورت de novo و به وسیله آنزیم‌های DNMT3a، DNMT3b و یا دیگر آنزیم‌های ناشناخته متیله می‌شود. دمتیلاسیون هم‌زمان با فرایند همانندسازی DNA و در غیاب آنزیم DNMT1 به صورت دمتیلاسیون گذرا (Passive demethylation) صورت می‌گیرد، اما دمتیلاسیون فعال (Active demythylation) توسط آنزیم‌های دمتیلاز در بسیاری از مراحل اولیه جنین پستانداران و نیز در سلول‌های سرطانی گزارش شده است. تاکنون آنزیم خاصی در مورد دمتیلاسیون فعال شناسایی و یا گزارش نشده است (شکل ب).

امروزه مشخص شده که جنین موش‌هایی که به علت نقص در آنزیم‌های DNMT1 و DNMT3a و DNMT3b دچار تغییر درالگوی متیلاسیون شده‌اند، پس از لانه‌گزینی سقط می‌شوند. اگر چه هنوز علت و مکانیسم مرگ این جنین‌ها کاملا مشخص نیست.



شکل الف: فرایند متیلاسیون DNA



شکل ب: توارث متیلاسیون در طی همانندسازی DNA

چارچوب ۵: RNAهای تنظیمی کوچک مولکول

میکرو RNAها که آنها را به اختصار miRNA می‌نامند خانواده‌ای از RNAهای کوچک مولکول با اندازه تقریبی ۲۱ تا ۲۵ نوکلئوتید به شمار می‌روند. این مولکول‌ها بیان ژن‌های خاصی را در سطح پس از رونویسی به طور منفی کنترل می‌کنند یعنی با عملکرد ویژه‌ای که برروی مولکول RNA پیک (mRNA) دارند از ترجمه آنها به پروتئین جلوگیری می‌کنند. در حال حاضر مشخص شده است که این عمل را از طریق اتصال به ناحیه مکمل خود در انتهای ۳ منطقه (Untranslated region: UTR) مولکول mRNA انجام می‌دهند (۵۲).

miRNA اولین بار توسط Lee و همکارانش درسال ۱۹۹۳ معرفی شد، آنها ابتدا این مسئله را در C.elegans یافتند و متوجه شدند miRNA در تکوین این جانور اهمیت خاصی دارد (۵۳). این کشف منجر به یافته‌های جدیدی در سال‌های اخیر شد و با کشف صدها miRNA که در بسیاری از فرایندهای سلولی موثرند، هم اکنون اهمیت این کشف بیش از پیش آشکار شده است.

به طور کلی می‌توان چند نقش مهم را برای miRNAها ذکر کرد که عبارتند ازمهارکردن ویروس‌ها و عناصر قابل جابجایی (Transposable eslements)، سازماندهی کروموزوم و خاموش کردن ژن‌های کدکننده پروتئین (۵۴). miRNAها در تمایز سلولی، تکثیر سلولی و آپوپتوزیس ازطریق سرکوب بیان ژن در مرحله پس از رونویسی نقش خود را ایفا می‌کنند.

تا کنون بیش از ۵۰۰ مولکول متفاوت microRNA در جانوران و گیاهان شناسایی شده است، اما انتظار بر این است که در آینده برای هر گونه بین ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ مولکول miroRNA شناسایی شود. میزان پیش‌بینی شده در حدود ۲ تا ۳ درصد ژن‌های کدکننده پروتئین ارزیابی می‌شود (۵۵). این مولکول‌ها الگوی بیان مشخصی را طی مراحل مختلف تمایز به بافت‌ها و سلول‌های متفاوت از خود بروز می‌دهند. به طور کلی جهت استاندارد کردن نام‌گذاری ابتدا از سه حرف miR که نماد miRNA است استفاده می‌شود و سپس عدد مشخصی را ذکر می‌کنند که برای هر نوع miRNA منحصر به فرد است.

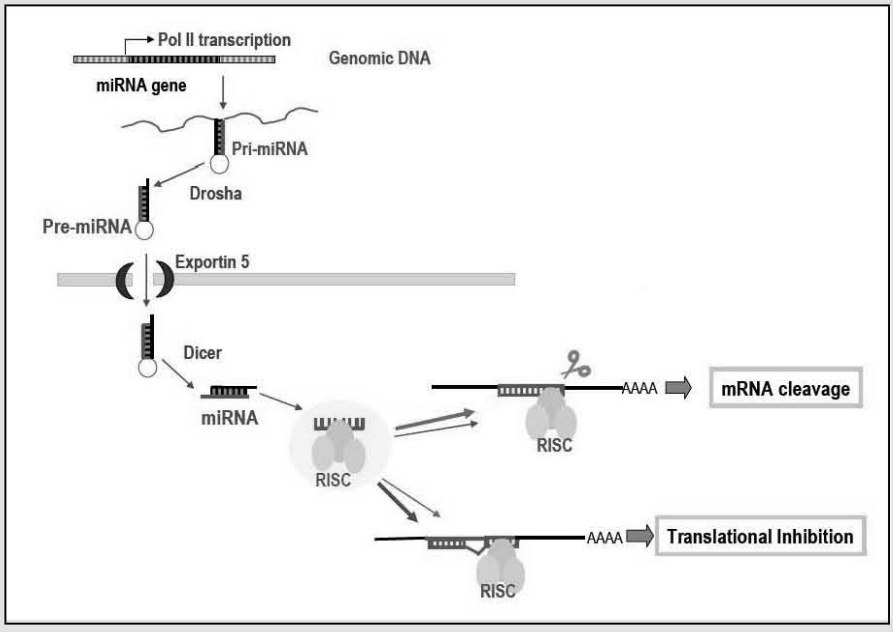
سنتز miRNAها در سلول:

miRNAها توسط RNA پلی مراز II رونویسی می‌شوند و در ابتدا مولکولی بزرگ در حدود ۷۰ نوکلئوتیدند که primicroRNA نام دارد. این مولکول دارای ساختمان دوم است و ساختار سنجاق سری (hairpin) دارد. اندکی پس از رونویسی، یک پروتئین آنزیمی به نام Drosha که حاوی دومین آنزیم III RNase است PrimicroRNA را در محل‌های خاصی برش می‌زند و آن را تبدیل به مولکول PremicroRNA می‌کند. پس از این مرحله PremicroRNA با کمک پروتئینی به نام Exportin5 از هسته به سیتوپلاسم منتقل می‌شود.

در سیتوپلاسم پروتئین آنزیمی دیگری که باز هم دارای دومین III RNase است و Dicer نام دارد PremicroRNA را برش می‌زند و یک مولکول RNA دو رشته‌ای پدید می‌آورد. یکی از این دو رشته عملکردی بوده و در کمپلکس RISC شرکت می‌کند. اتصال این کمپلکس به mRNA آغاز فعالیت جهت کنترل بیان ژن از طریق microRNA محسوب می‌شود (۵۶، ۵۷) (شکل الف).

مکانیسم تنظیم بیان ژن توسط microRNA:

miRNAها در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی نقش دارند. این فرایند تنظیمی از طریق دومکانیسم عمده انجام می‌گیرد که انتخاب آنها بستگی به ویژگی شناسایی هدف از جانب miRNA دارد. اگر miRNA با هدف خود از نظر توالی محل اتصال کاملا مکمل باشد و یا حداقل نزدیک به مکمل باشد مکانیسم برش و تخریب مستقیم مولکول mRNA توسط کمپلکس RISC آغاز می‌شود و mRNA کاملا تخریب می‌شود. اما اگر ناحیه اتصال از نظر مکمل بودن از امتیاز پایین‌تری برخوردار باشد مکانیسم دیگری آغاز می‌شود که از ترجمه آن جلوگیری می‌کند و سپس به تدریج این mRNA تخریب خواهد شد (۵۸) (شکل الف).



شکل الف: مکانیسم سنتز و عملکرد miRNA (۵۹)

سلول بنیادی و miRNA

بررسی‌ها نشان داده است که miRNAها در تنظیم مولکولی بیان ژن‌های سلول بنیادی نیز دخالت دارند. در سال ۲۰۰۳ هوباری و همکارانش فهرستی از miRNAهایی که با روش کلونینگ ژنی و تعیین توالی از سلول‌های بنیادی موشی به دست آمده بودند گزارش کردند (۶۰). سپس با استفاده از روش نورترن بلات بیان این miRNAها بین سلول‌های بنیادی موشی و اجسام شبه جنینی (Embryoid Body) بررسی و مشخص شد که بیان آنها در این دو مرحله سلولی متفاوت است . با مقایسه miRNAهای تعیین توالی شده مشخص شد که بیان برخی از miRNAها ویژه سلول‌های بنیادی است و در اجسام شبه جنینی هیچ‌گونه بیانی از آنها دیده نمی‌شود. همچنین مشخص شده که برخی از فاکتورهای رونویسی سلول‌های بنیادی از قبیل Nanog و Sox2 و Oct4 که در خود نوزایی نقش دارند با برخی از miRNAها در ارتباط هستند. علاوه بر این، مناطق پروموتری mir-137 و mir-301 نشانه‌هایی از تنظیم توسط Nanog، Sox2 و Oct4 به همراه دارند که می‌تواند بیانگر تنظیم این ژن‌ها توسط این فاکتورهای رونویسی باشد. اجسام شبه جنینی نیز miRNAهای خاص خود را دارند که احتمالا مخصوص مراحل پیش از لانه‌گزینی جنین و مراحل اولیه تکوین است. در واقع هیچ کدام از سلول‌ها پس از مرحله لانه‌گزینی تشابهی در بیان miRNAها با سلول‌های بنیادی تمایز نیافته ندارند (۶۱). یافته‌های دیگر بیانگر این واقعیت است که بیان خوشه‌ای miR-12-13-14 در کروموزم ۱۹ در فرایند تکوین بسیار حایز اهمیت است، چراکه کاهش بیان آن بسیار زودتر از کاهش بیان Oct4 شروع می‌شود و بنابراین بسیار سریع‌تر از فاکتورهای رونویسی روی حالت بنیادینگی تاثیر می‌گذارد (۶۰).

در حال حاضر اطلاعات مربوط به miRNAهای سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به کندی در حال پیشرفت است و این مسئله به خاطر دشواری‌های تکنیکی در کشت این سلول‌هاست. چرا که حفظ و توسعه سلول‌های بنیادی جنینی انسانی نیاز به وسایل و مهارت‌های خاص آزمایشگاهی دارد و به علاوه زمان دو برابر شدن (Doubling time) این سلول‌ها تقریبا ۳ برابر سلول‌های موشی است (۶۲). در سال ۲۰۰۴ مطالعاتی روی بیان miRNAها در سلول‌های بنیادی انسانی انجام پذیرفته و از بین RNAهای کوچک مولکول کلون شده انسانی، ۳۶ مورد واجد خصوصیات microRNA شناخته شده‌اند که از این میان ۱۶ مورد قبلا از بافت‌های متفاوت انسانی گزارش شده بودند. بنابراین در مجموع ۲۰ مورد به عنوان microRNAهای ویژه سلول‌های بنیادی جنینی انسانی گزارش شده‌اند که ۳ مورد از آنها کاملا با انواع گزارش شده موشی در سال ۲۰۰۳ یکسان بوده و بقیه متفاوت هستند (۶۳).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که برخی از miRNAها همچون miR-302d, miR-302c و miR-302b که از کروموزوم ۴ انسانی رونویسی می‌شوند همولوژی نزدیکی با miR-302 دارند که از سلول‌های بنیادی جنینی موشی جدا شده است. همچنین miR-371، miR372 و miR-373 که روی کروموزوم ۱۹ قرار دارند همولوگ انسانی miR-290، miR-291s، miR-291as، miR-292s، miR-292as، miR-293، miR-294 و miR-295 در موش هستند (۶۰). بنابراین می‌توان گفت که دو خوشه ژنی miRNA انسانی و موشی به صورت حفاظت شده‌ای در ژنوم وجود دارند.

با مقایسه miRNAهای مطالعه شده، به نظر می‌رسد می‌توان آن نوع RNAهای تنظیمی را در سلول‌های بنیادی به چهار گروه زیر طبقه‌بندی کرد (۶۰، ۶۳):

۱. microRNAهایی مانند miR-302a، miR-302b، miR-302c، miR-302d و miR-367 که در هر دو نوع سلول بنیادی جنینی و سرطانی بیان می‌شوند و می‌توانند نقش حفاظت شده‌ای در سلول‌های پرتوان داشته باشند.

۲. miRNAهایی مانند miR-154، miR-200، miR-371، miR-372، miR-373 و miR-368 که فقط در سلول‌های بنیادی جنینی بیان می‌شوند و می‌توانند عملکرد ویژه‌ای در این سلول‌ها داشته باشند.

۳. miRNAهایی مانند miR-21، miR-29، miR-301، miR-347 و Let-7a که در سلول‌های بنیادی جنینی نادرند اما در سلول‌هایی مانند HeLa دیده می‌شوند واحتمالا در مراحل تکوین نقش دارند.

۴. miRNAهایی مانند miR-16، miR-17-5p، miR-19b، miR-26a، miR-92، miR-103، miR-130a و miR-222 که در اکثر خطوط سلولی بیان آنها نشان داده شده، و احتمالا در عملکردهای عمومی سلولی نقش دارند.

از مجموع این مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که miRNAها ممکن است تنظیم‌کننده اولیه حفظ حالت بنیادینگی و تمایز باشند و قبل از دیگر فاکتورهای بنیادینگی شناخته شده از جمله OCT4/NANOG عمل کنند.

miRNAها در تمایز

تاکنون مطالعات فراوانی در مورد miRNAهایی که در بافت‌های مختلف بیان اختصاصی دارند انجام و نقش آنها در تمایز بررسی شده است که به اختصار مواردی از آنها ذکر می‌شود.

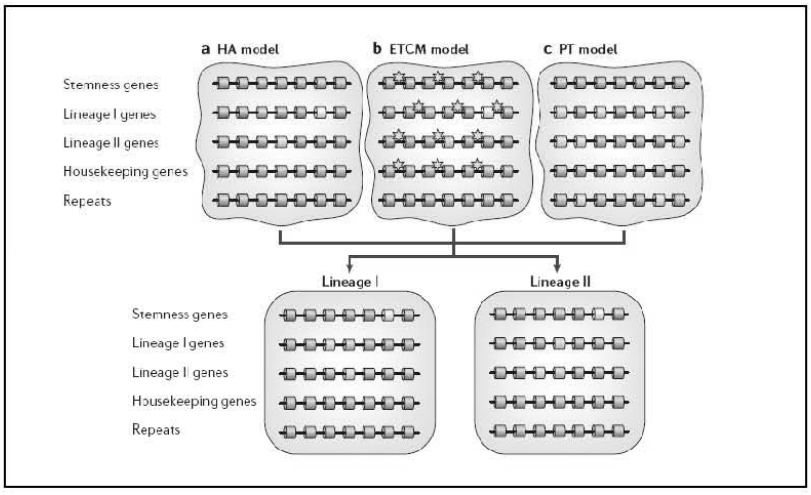
آزمایش‌ها نشان داده است که بیان بیش از حد miR-124 که در مغز به طور طبیعی صورت می‌گیرد منجر به تغییر الگوی بیانی سلول‌های HeLa به سمت سلول‌های مغزی خواهد شد. با توجه به مطالعات انجام شده، miR-124a در حدود ۲۵ تا ۵۰ درصد کل miRNAها را در بافت مغز تشکیل می‌دهد و همچنین مشخص شده است که این miRNAها در انتقال پیش‌سازهای عصبی به نرون از طریق سرکوب فعالیت ژن‌های غیرعصبی موثرند (۶۴). در یک تحقیق مشابه بیان بالای miR-1 این سلول‌ها را به سمت سلول‌های عضلانی پیش می‌برد. این در حالی است که به طور طبیعی نیز در سلول‌های عضلانی بیان بالایی از miR-1 قابل ردیابی است.

اخیرا مشخص شده است که miRNAها همچنین در تمایز سلول‌های هماتوپویتیک پستانداران نقش ویژه‌ای دارند به عنوان مثال miR-181 در تیموس و سلول‌های لنفوسیت B موشی بیان مشخص دارد و می‌توان با بیان بالا درسلول‌های هماتوپویتیک باعث تمایز آن‌ها یا سلول‌های پیش‌ساز آن‌ها به سلول‌های B شود (۶۵). همچنین مشخص شده است که بیان بالای miR-181a تمایز به مگاکاریوسیت را سرکوب می‌کند (۶۶)، به طوری که در القای تمایز به مگاکاریوسیت بیان miR-181a ساخته شده توسط سلول از طریق مسیر آبشاری استیل کولین استراز، پروتئین کیناز-C و پروتئین کیناز-A کاهش می‌یابد. این نتایج مشخص می‌کند که miRNA نقش مهمی در عملکرد سلول‌های بنیادی، تمایز سلولی و ایجاد ویژگی‌های جدید درسلول ایفا می‌کند (۶۷).

مدل‌های مطرح در تنظیم اپی‌ژنتیکی سلول‌های بنیادی

بررسی اپی‌ژنتیکی سلول‌های بنیادی و سلول‌های تمایز یافته پیش‌ساز، نشان داده است که رابطه پایداری بین مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی و ماهیت قابل توارث بودن آنها وجود دارد. بر اساس آنچه تا کنون ذکر شد شاخص‌های اپی‌ژنتیکی با وجود قابل توارث بودن و پایداری، ماهیت کاملا دینامیک و قابل برگشتی دارند و به واسطه عوامل مختلف تغییردهنده ساختار کروماتین تنظیم می‌شوند. مدل‌های زیادی درخصوص مکانیسم عملکرد تغییرات اپی‌ژنتیکی در سلول‌های بنیادی توسط محققان مطرح شده است که در اینجا به اختصار ارایه می‌شود، با این وجود باید در نظر داشت که تا کنون جزئیات کاملی از آنها مورد تایید قرار نگرفته است.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که علاوه بر ژن‌های خانگی، گروه دیگری از ژن‌ها که مسئول پرتوانی و خود نوزایی سلول‌های بنیادی هستند تقریبا در این سلول‌ها بیان دایمی دارند (شکل ۵ قسمت a). طی تمایز سلولی، ژن‌های مسئول بنیادینگی (که شامل ژن‌های اختصاصی برای سلول‌های بنیادی‌اند) خاموش خواهند شد و بیان فاکتورهای رونویسی اختصاصی دیگر باعث ظهور دودمان جدیدی از ژن‌های اختصاصی در جهت ایجاد سلول جدید می‌شود. این فعالیت سلسله مراتب به عنوان مدل فعالیت سلسله مراتبی (Hierarchical Activation: HA) مطرح می‌شود که با تغییر شبکه‌های رونویسی در طول تمایز و نمو سلولی صورت می‌گیرد (۶۸). در مدل دوم تصور بر این است که اگر چه ژن‌های اختصاصی بافتی درسلول‌های بنیادی جنین بیان نمی‌شوند، اما این ژن‌ها به طور اپی‌ژنتیکی برای بیان در مراحل بعدی نشانه‌دار شده‌اند (شکل ۵ قسمت b). مطابق این مدل شکل‌گیری کروماتین فعال در سلول‌های بنیادی جنینی به وفور رخ می‌دهد، اما این نواحی نشانه‌گذاری شده لزوما فعالیت ضروری را به عهده ندارند و صرفا به عنوان عوامل پیش‌برنده محسوب می‌شوند. انتخاب این نواحی ژنومی به وسیله ارتباط فاکتورهایی با ویژگی اتصال به توالی‌های خاص صورت می‌گیرد. این برهم‌کنش باعث فراخوان عوامل تغییردهنده دیگری می‌شود که نهایتا منجر به بیان ژن‌های اختصاصی دودمان‌های مختلف می‌شود (۶۸).



شکل ۵: مدل‌های رونویسی ژنوم در روند تمایز سلول‌های بنیادی. (a) مدل فعالیت سلسله مراتبی (HA): در این مدل صرفا ژن‌های خانگی و ژن‌هایی که برای حفظ پرتوانی و خود نوزایی سلول ضروری‌اند فعال هستند (نواحی سبز رنگ)، در طول تمایز ژن‌های بنیادینگی خاموش و ژن‌های ویژه هر دودمان به طور انتخابی روشن می‌شوند. (b) مدل نشانگرهای مستعد به رونویسی در مراحل اولیه (ETCM): در این مدل اگر چه فقط ژن‌های بنیادینگی و خانگی فعال‌اند ولی به طور اپی‌ژنتیکی فعالیت ژن‌های اختصاصی با فت‌های مختلف نشانه‌گذاری شده است. (c) مدل پراکندگی یا آشفتگی رونویسی (PT): در این مدل علاوه بر بیان سطح بالایی از ژن‌های بنیادینگی و خانگی، بیان ژن‌های اختصاصی بافت‌های مختلف نیز به طور محدود صورت می‌گیرد. در طی تمایز سلولی با خاموش شدن بخش‌هایی از کروماتین و تبدیل آن به شکل هتروکروماتین از بیان ژن‌های مربوط به مراحل قبلی کاسته شده و فرایند رونویسی محدود به ژن‌های اختصاصی هر بافت می‌شود (۶۸).
(مشاهده نمونه رنگی تصاویردر انتهای مقالات)

مـدل نـشانگرهای مـستعد بـه رونـویسی در مـراحـل اولیـه (ETCM: Early Transcription-Competent Marks model) بـر اساس شواهدی مطرح شده است که نشان می‌دهد اگرچه بسیاری از ژن‌هـای مـربوط بـه دودمـان‌های خـاص در سـلول‌های بـنیادی جـنینی غـیرفعالند، ولیـکن کـروماتین ایـن ژن‌هـا بـرای بـیان در مـراحـل بـعدی نشانه‌گذاری شده‌انـد (۷۰-۶۸). مـدل سـوم تـحت عـنوان پـراکـندگی یـا آشـــفتگی رونـــویسی (PT: Promiscuous Transcription) نام‌گذاری می‌شود (شکل ۵ قسمت c). در این دیدگاه سلول‌های بنیادی جنینی یک مجموعه‌ای از ژن‌های مختص به خود را به وسیله فاکتورهای ویژه‌ای رونویسی می‌کنند. اما برخلاف تاکید مدل HA، بقیه ژنوم به طـور کـامل خـاموش نـیست و بـیشتر نـواحـی آن درسـطح پـایینی بـیان می‌شوند. در سـلول‌های تـمایز یـافته به طـور هـم‌زمان و گـسترده از بـیان ژن‌هـای مـرتبط بـا بـنیادینگی کـاسته مـی‌شود و دسـته دیـگری از ژن‌هـای اختصاصی مسئول تمایز و حفظ آن شروع به رونویسی می‌کنند.

کـشت سـلول‌های بـنیادی در مـحیط آزمـایشگاه و تـشکیل جـسم شـبه جنینی، تقلیدی از مراحل اولیه نمو جنینی است. اجسام شبه جنینی تحت شرایط محیط کشتی مناسب می‌توانند به چندین رده سلولی تمایز یابند. بـررسی‌های بـیشتر روی مـراکـز تـنظیمی رونـویسی در سـلول‌های بـنیادی جـنینی، سـه فـاکـتور رونـویسی Sox2, NANOG و Oct-4را بـه عـنوان عـوامـل اصـلی تـاثیرگـذار بـرروی پـرومـوتر ایـن ژن‌هـا مـعرفی مـی‌کـند. از آنجایی که بیش از نیمی از این ژن‌ها غیرفعال هستند بنابراین فاکتورهای رونویسی فوق در هر دو فرایند فعال و غیرفعال کردن ژن‌ها موثرند.

تـا کـنون مـدل‌های مـختلفی از چـگونگی تـنظیم اپـی‌ژنتیکی بـیان مارکرهای سلولی، به خصوص در سلول‌های بنیادی مطرح شده است اما هـیچ کـدام از آنـها قـادر بـه تـوجیه هـمه ابـعاد ایـن فـرایـند نـیستند. بـنابـرایـن دسـتیابی بـه مـکانیسم‌های پـیچیده سـلولی، نـیاز بـه تـحقیقات بـیشتر دانشمندان دارد و حقیقت در آینده پنهان است.

نتیجه‌گیری

مثال‌های ارایه شده در این مقاله مروری، پویایی دانش اپی‌ژنتیک را در علوم زیستی نشان می‌دهد و نیاز به مطالعات منظم و سازمان‌دهی شده‌ای در سطح ژنوم و همچنین در مراحل مختلف رشد و نمو آشکار می‌کند.

در حال حاضر مکانیسم‌های مختلف اپی‌ژنتیکی و اهمیت آنها در کنترل بیان ژن‌ها به خصوص در زمان تغییر شرایط سلول همچون مراحل تکوین جنین و تمایز، بیش از پیش شناخته شده است. شناخت بیشتر ارتباط موجود بین این مکانیسم‌ها و نقش آنها در بروز تغییرات ساختاری و عملکردی در سطح ژنوم می‌تواند اطلاعات قابل توجهی در خصوص الگوی مولکولی روند تمایز سلول‌های بنیادی در اختیار ما قرار دهد و راه را برای برقراری شرایط تمایز هدفمند سلولی هموارتر سازد.

امـروزه بـا پـیشرفت‌های وسـیع در زمـینه‌ایـجاد رده‌هـای سـلول‌های بنیادی، نیاز مبرم به تمایز هدفمند آنها به سلول‌ها و بافت‌های ویژه جهت درمـان بـرخی از بـیماری‌های مـربوط بـه تـخریب بـافت مـانند بـرخی سرطان‌ها، دیابت تخریبی، سکته‌های قلبی، قطع نخاع و غیره بیش از پیش احساس می‌شود. نقش مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی در این تمایزات کـاملا بـدیهی و اسـتفاده از آنـها در آینده‌ای نه چندان دور بسیار حایز اهمیت است. ابداع تکنیک‌ها و روش‌های نوین جهت مطالعه فرایندهای اپی‌ژنتیکی گامی مثبت در جهت کشف هرچه بیشتر واقعیات علمی این مبحث خواهد بود.

References

1. Haig D. The dual origin of epigenetics. Epigenetics: Symposia on quantitative biology. Vol. LXIX 2004, Cold Spring Harbor Laboratory Press
2. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in aminal DNA. Nuc Acid Res 1980; 8: 1499
3. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS. Core transcpi tional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005; 122: 947-956
4. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. Cell 1999; 99: 247-257
5. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nat Rev Genet 2002; 3: 662-673
6. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SIS. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. Science 2002; 297:1833-1837
7. Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. Genes Dev 2005; 19: 489-501
8. Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K. Faithful Expression of Imprinted Genes in Cloned Mice. Science 2002; 5553:295-297
9. Moore T, Haig D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war Trends Genet 1991; 7: 45-49
10. Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mamÿÿmals. Society for Reproduction and Fertility 2004; 51: 1741-7899
11. Delaval K, Feil R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. Current Opinion in Genetics & Development 2004; 14: 188-195

12. Reik W, Santos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. Hum Mol Genet 2000; 9: 2395-2402
13. Francastel C, Schubeler D, Martin DI, Groudine M. Nuclear compartmentalization and gene activity. Nature Rev Mol Cell Biol 2000; 1: 137-143
14. Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. Nature Rev Mol Cell Biol 2006; 17 May
15. Arney KL, Fisher AG. Epigenetic aspects of differentiation. J Cell Sci 2004; 117: 4355-4363
16. Cammas F. Cell differentiation induces TIF1β association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. J Cell Sci 2002; 115: 3439-3448
17. Kurisaki A. Chromatin-related proteins in pluripotent mouse embryonic stem cells are downregulated after removal of leukemia inhibitory factor. Biochem Biophys Res Commun 2005; 335: 667-675
18. Xi R, Xie T. Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. Science 2005; 310:1487-1489
19. Kaji K. The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. Nature Cell Biol 2006; 8: 285-292
20. Luger K, Mader AW, Richmond R, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A° resolution. Nature 1997; 389: 251-260
21. Johns EW. The electrophoresis of histones in polyacrylamide gel and their quantitative determination. Biochem J 1997; 104: 78
22. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. Curr Opin Genet Dev 2002; 5: 174-179
23. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. Curr Biol 14(14): 546-551
24. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 1964; 51: 786-794
25. Kurdistani SK. Grunstein M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 276-284
26. Nakayama JI, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal S. Role of histone H3 Lysine9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. Science 2001; 15: 1060118
27. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyl-transferases. Nature 2000; 406: 593-599
28. Melcher M, Schmid M, Aagaard L, Selenko P, Laible G, Jenuwein T. Structure–function analysis of SUV39HI reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation and mitotic progression. Mol Cell Biol 2000; 20: 3728-3741
29. Nowak SJ, Croces VG. Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. Genes Dev 2000; 14: 3003- 3013
30. Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. A role for Saccharomyces cerevisiae histone H2A in DNA repair. Nature 2000; 408: 1001-1004
31. Finley D, Chau V. Ubiquitination. Annu Rev Cell Biol 1991; 7: 25-69
32. Zhang Y. Transciptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. Genes Dev 2003; 17: 2733-2740
33. Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? Genes Dev 2004; 18: 2046-2059
34. Shilo Y, Elsenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional control. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 13225-13230
35. Cosgrove MS, Wolberger C. How dose the histone code work? Biochem Cell Biol 2005; 83:468-476
36. Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. Nat Rev Mol Cel Biol 2006; 1938
37. Buszczak M, Spradling AC. Searching chromatin for stem cell identity. Cell 2006; 125: 315-326
38. Lee JH, Hart SR, Skalnik DG. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. Genesis 2004; 38: 32-38
39. Martens JH. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. EMBO J 2005; 24: 800-812
40. Hatori N, Nishino K, Ko Y. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. J Biol Chem 2004; 279: 17063-17069
41. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural

progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 16659-16664
42. Snykers S, Vanhaecke T, De Becker A. Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow. BMC Dev Biol 2007; 7: 24
43. Kamakaka RT, Biggins S. Histone variants: deviants? Genes Dev 2006; 19: 295-310
44. Hake SB, Garica BA, Duncan EM. Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. J Biol Chem 2006; 281: 559-568
45. Lande-Diner L, Cedar H. Silence of the genes: mechanisms of long-term repression. Nature Rev Genet 2005; 6: 648–654
46. Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. Nature Struct Mol Biol 2004; 11: 1068–1075
47. Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. Nature 2002; 415: 810-813
48. Eden S, Constancia M, Hashimshony T, Dean W. An upstream repressor element plays a role in Igf2 imprinting. The EMBO J 2001; 20: 3518-3525
49. Tsuji-Takayama K. Demethylating agent, 5-azacytidine, reverses differentiation of embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 323:86–90
50. Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. Cell 1979; 17: 771-779
51. He L, and Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role gene regulation. Nature 2004; 5:522-532
52. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116: 281-297
53. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C.elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993; 75: 843-854
54. Carthew RW. Gene regulation by microRNAs. Curr Opin in Genet Develop 2006; 16: 203-208
55. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. Trend Genet 2006
56. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J 2004; 23: 4051-4060
57. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. Nature 2004; 432: 235-240
58. Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. Oncogene 2006; 25: 6163-6169
59. Jayasena SD. Designer siRNAs to overcome the challenges from the RNAi pathway. J RNAi Gene Silen 2006; 2:109-117
60. Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cellspecific MicroRNAs. Dev Cell 2003; 5: 351-358
61. Lee C-T, Risom T, Strauss WM. MicroRNAs in Mammalian Development. Birth Defects Research (Part C) 2006; 78: 129-139
62. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol 2000; 227: 271-278
63. Suh MR, Lee Y, Kim JY. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. Develop Biol 2004; 270: 488-498
64. Smirnova L, Grafe A, Seiler A. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. Eur J Neurosci 2005; 21: 1469-1477
65. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science 2004; 303: 83-86
66. Guimaraes-Sternberg C, Meerson A, Shaked I, Soreq H. MicroRNA modulation of megakaryoblast fate involves cholinergic signaling. Leuk Res 2006; 30: 583-595
67. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature 2005; 433: 769-773
68. Szutorisz H, Dillon N. The epigenetic basis for embryonic stem cell pluripotency. Bioessays 2005; 27: 1286-1293
69. Szutorisz H. Formation of an active tissuespecific chromatin domain initiated by epigenetic marking at the embryonic stem cell stage. Mol Cell Biol 2005; 25:1804-1820
70. Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M.

Chromatin signatures of pluripotent cell lines. Nature Cell Biol 2006; 8: 532-538
71. Golan-Mashiach M, Dazard JE, Gerecht-Nir S. Design principle of gene expression used by human stem cells: implication for pluripotency. FASEB J 2005; 19: 147-149