

NARGİZ İBRAHİMOVA

TİBBİ BİYOLÖJİ VE GENETİK

İSTANBUL - 2024

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS)

**DNA METİLTRANSFERAZ 1 GEN İFADE DÜZEYİNİN PC3 METASTATİK
PROSTAT KANSERİ HÜCRE SOYUNDA BELİRLENMESİ**

NARGİZ İBRAHİMOVA

DANIŞMAN
“DR. ÖĞR. ÜYESİ YEMLİHA YILDIZ”

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
İSTANBUL – 2024

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DNA METİLTRANSFERAZ 1 GEN İFADE DÜZEYİNİN PC3 METASTATİK
PROSTAT KANSERİ HÜCRE SOYUNDA BELİRLENMESİ**

NARGİZ İBRAHİMOVA

DANIŞMAN

“DR. ÖĞR. ÜYESİ YEMLİHA YILDIZ”

İSTANBUL – 2024

TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Veysel Sabri Hançer

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. İlhami Çolak

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Yemliha Yıldız
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri (İlk isim jüri başkanına, ikinci isim danışmana aittir)

Prof. Dr. Veysel Sabri Hançer
İstinye
Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Yemliha Yıldız
İstinye
Üniversitesi

Doç. Dr. Sevgi Maraklı
Yıldız Teknik
Üniversitesi

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “DNA Metiltransferaz 1 gen ifade düzeyinin Pc3 Metastatik prostat kanseri hücre soyunda belirlenmesi” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nargiz İbrahimova

İTHAF

Bu tezin başarıyla tamamlanmasını sağlayan değerli hocalarıma ve çok sevdiğim aileme ithaf ediyorum.

Sonsuz sevgi ve minnettarlıkla,

Nargiz İbrahimova



TEŞEKKÜR

Bu zorlu süreç boyunca tüm akademik desteğiyle bana destek olan, zorlandığım her aşamada yardımlarını esirgemeyen, her zaman motive edici ve yapıcı geri bildirimleriyle çalışmamı yönlendirdiği için danışman hocam Sn Dr. Öğr. Üyesi Yemliha YILDIZ'a;

Tez konusunun deney aşamaları ve malzemelerindeki yardım ve destekleri için hocam Sn Doç. Dr. Süreyya BOZKURT'a,

Yüksek lisans ders aşaması boyunca tıbbi biyoloji ve genetik bilimiyle ilgili tüm değerli ve önemli bilgileri bizimle paylaşan hocam Sn Doç. Dr. Muradiye ACAR'a;

Ders aşamasında ve her zaman hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan, ve değerli tecrübelerini bizimle bölüşen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sn Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e

Çalışmalarında yardımını esirgemeyen Sn Dr. Öğr. Üyesi Yalda HEKMATSHOAR'a

Yaptığım her doğru ve yanlışta her zaman benim yanımda olan, bana her zaman koşulsuz sevgi ve destek veren canım babama, anneme, ablama ve kardeşime;

Ve tezimin başarıyla sonuçlanmasında rolü olan herkese çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
ETİK BEYANI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	lix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. DNA Metilasyonu.....	3
2.1.1. DNA Metilasyon Dinamiği.....	5
2.1.2. Epigenetik Sinyal Bakımından DNA metilasyonu	6
2.2. DNA Metiltransferazlar	7
2.2.1. DNMT1 Enzimi	8
2.2.2. DNMT2 Enzimi	10
2.2.3. DNMT3 Enzimi	11
2.2.4. DNMT3L Enzimi.....	11
2.3. DNMT1'in Etkileştiği Faktörler Aracılığıyla Düzenlenmesi	12
2.4. DNMT1 Enzim Aktivitesinin Modifikasyonlar Aracılığıyla Düzenlenmesi.....	15
2.5. Ürogenital Kanserler ve DNA Metilasyonu	17
2.5.1. Renal Hücreli Kanserler.....	17
2.5.2. Mesane Kanseri.....	17
2.5.3. Prostat Kanseri.....	18
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	21
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	21
3.3. Kullanılan Cihazlar	22

3.4. Primer Dizileri	22
3.5. Kullanılan Hücre Hatları	23
3.5.1. Hücre Kültürünün Stoktan Çıkarılması	23
3.5.2. Besiyeri Değiştirme.....	23
3.5.3. Mikoplazma Testi	23
3.6. Hücre Kültürünün Pasajlanması	24
3.6.1. Hücre Sayılarının Stoklanması	24
3.6.2. Hücrelerin sayımı	25
3.7. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu(PZR)(Real-Time PCR).....	25
3.7.1. Total RNA İzolasyonu	25
3.7.2. cDNA (Tamamlayıcı DNA, Komplementer DNA) sentezi	26
3.7.3. Gerçek zamanlı PCR (qRT - PCR)	27
4.BULGULAR	29
4.1. Morfolojik Bulgular.....	29
4.2. Mikoplazma Testi Sonuçları	29
4.3. Hücre Hatlarının RNA İzolasyon Sonuçları	30
4.4. Hücre Hatlarından cDNA Elde Edilmesi	30
4.5. RealTime PCR Sonuçları	31
5.TARTIŞMA	33
6.SONUÇ,ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI	37
KAYNAKÇA	39
EKLER	46
EK-1: İNTİHAL RAPORU	46
EK-2: ÖZGEÇMİŞ	52

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kullanılan Primer Dizileri

Tablo 2. Reverse-Transkriptaz karışımı

Tablo 3. cDNA sentez reaksiyon aşamaları

Tablo 4. Gerçek zamanlı PCR karışımı

Tablo 5. qRT-PCR programı döngüsü

Tablo 6. RNA ların nanodrop cihazındaki ölçüm sonuçları

Tablo 7. PC3 Hücre hattının LNCaP hücre hattına göre kat artış sonuçları

Tablo 8. Kat Artışı Ortalaması

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Sitozin metilasyonunun biyokimyasal yolağı.....	4
Şekil 2. 2. DNA metilasyonunun transkripsiyonel baskılanmadaki rolü. HDAC; Histon deasetilaz, TF; Transkripsiyon faktörü, CR; Ko-aktivatör, HAT; Histon asetilaz, MBP; Metil sitozin bağlanma proteini, DNMT; DNA MTaz enzimi, CR; Korepresör.....	7
Şekil 2. 3. Memeli DNMT üyelerinin genel yapısı.....	8
Şekil 2.4. DNMT1 enzim izoformları.....	10
Şekil 2. 5. DNMT1 enziminin etkileşimde olduğu proteinler.	13
Şekil 2.6. DNMT1 enziminin psttranslasyonel modifikasyonla aracılığıyla düzenlenmesi.....	16
Şekil 2.7. PC3 ve LNCap hücre hatlarının invert mikroskopta görüntüsü.	27
Şekil 2.8. DAPI boyaması ile elde edilmiş mikoplazma test sonuçları.....	28

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

AdoMet	: S-adenozil-L-metiyonin
ATRX	: Sisteince zengin çinko parmağı DNA bağlanma motifi
BAH	: Brom-bitişik homoloji domain
CA	: Ko-aktivatör
CaP	: Prostat kanseri
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
-CH3	: Metil grubu
CK1	: Kazein kinaz 1
CpG	: Sitozin-Guanin dinükleotidi
CR	: Ko-represör
DKK	: Dickkorf
DMAP1	: DNA metiltransferaz 1 ilişkili protein 1
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNA MTaz	: DNA metiltransferaz
DNMT1	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 1
DNMT2	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 2
DNMT3A	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 3A
DNMT3B	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 3B
DNMT3L	: DNA metiltransferaz 3 benzeri
DNMT1o	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 1 oosit
DUB	: Deubiquitinaz
E1	: ATP-bağımlı ubiquitin enzim
E2	: Ubiquitin-konjuge edici enzim
E3	: Uç ubiquitin ligaz

E2F1	: E2F transkripsiyon faktör 1
EED	: Embriyonik ektoderm gelişim
EHMT2	: Ökromatik histon-lizin N-metiltransferaz 2
EZH2	: Enhancer of zeste homolog
Fz	: Frizzled reseptörü
GSK3p	: Glikojen sentez kinaz 3 beta
H3	: Histon 3
H3K4	: Histon 3 lizin 4
H3K9	: Histon 3 lizin 9
H3K27	: Histon 3 lizin 27
HAT	: Histon asetilaz
HAUSP	: Herpes ilişkili Ubiquitin Spesifik Proteaz
HDAC	: Histon deasetilaz
HECT	: E6-AP karboksik uç homolog
HP1	: Heterokromatin protein 1
kb	: Kilobaz
KDM1A	: Lizin spesifik demetilaz LSD1
KG	: Glisin-Lizin
Lys	: Lizin
mC	: Metil-Sitozin
5-mC	: 5-metilsitozin
ml	: Mikrolitre
MM	: Mikro Molar
ml	: Mililitre
MeCP	: Metile CpG bağlanma protein

MBP	: Metile bağlanma protein
NLS	: Nüklear lokalizasyon sinyal
OTU	: Overyen tümör domain
PBD	: Proliferatif hücre nüklear antijen bağlayıcı domain
PcG	: Polikomb grup
PCNA	: Proliferatif hücre nüklear antijen
PHD	: Polibrom homoloji domain
PRC2	: Polikomb baskılayıcı kompleks 2
PWWP	: Prolin-Triptofan-Triptofan-Prolin
Rb	: Retinoblastoma
RCC	: Renal hücreli karsinoma
rDNA	: Ribozomal DNA
Ser	: Serin
sFRP	: Salgılanan Frizzled ilişkili protein
SRA	: SET ve RING ilişkili domain
STAT3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyonel aktivatör 3
SKP2	: S fazı kinaz ilişkili protein 2
Suv39H1	: Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
UCH	: C uç hidrolaz
UHRF1	: PHD ve RING Parmak İçeren Ubiquitin Benzeri Domain
USP	: Ubiquitin spesifik proteaz
WIF-1	: Wnt baskılayıcı faktör 1
WNT	: Wingless-tip MMTV integrasyon bölge ailesi
TCC	: Transizyonel hücreli karsinom

ÖZET

Ibrahimova, Nargız., (2024). DNA Metiltransferaz 1 Gen İfade Düzeyinin Pc3 Metastatik Prostat Kanseri Hücre Soyunda Belirlenmesi. İstinye Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Prostat kanseri, erkekler arasında en sık görülen kanser türlerinden biridir, hastalığın ilerlemesi ve gelişiminde DNA metilasyonunun önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu araştırmada, metastatik prostat kanseri hücreleri olan PC3 ve LNCaP hücrelerinde DNA Metiltransferaz 1 (DNMT1) gen ifadesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Metastatik PC3 hücreleri ve az metastatik LNCaP hücreleri RPMI-1640 besiyerinde kültüre edilip, pasajlandıktan sonra RNA izolasyonu ve cDNA sentezi için kullanılmıştır. DNMT1 gen ifadesinin belirlenmesinde qRT-PCR analizi yapılmıştır.

qRT-PCR analizi sonuçlarına göre, PC3 ve LNCaP hücrelerinde DNMT1 gen ifade düzeylerinin belirlendiği gözlemlenmiştir. Her bir örnekte en az 3 adet Cp değeri alınmış ve bu değerlerin ortalaması kullanılarak gen ifade düzeyleri hesaplanmıştır.

Yapılan değerlendirme sonucuna göre metastatik olan PC3 kanser hücre hattı ile az metastatik olan LNCaP kanser hücre hattı arasında 0,80 kat ifade farklılığı olduğu bulunmuştur.

Çalışmamız, PC3 metastatik prostat kanseri hücrelerinde DNMT1 gen ifadesinin belirlenmesiyle ilgili veriler sunmaktadır. Elde edilen sonuçlar, DNMT1'in prostat kanseri patogeneziindeki rolünün anlaşılmasında ve potansiyel terapötik hedef olarak kullanılmasında katkılar sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, DNA metilasyonu, PC3 hücre hattı, DNMT1 gen ifadesi

ABSTRACT

Ibrahimova, Nargiz., (2024). Determination of Expression Levels of DNA Methyltransferase 1 in PC3 Metastatic Prostate Cancer Cell Line. . Istinye University, Postgraduate, Medical Biology and Genetics. Master Thesis. Istanbul.

Prostate cancer is one of the most common types of cancer among men, and it is known that DNA methylation plays a significant role in the progression and development of the disease. This study aims to determine the expression of DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) in metastatic prostate cancer cells, specifically PC3 and LNCaP cells. Metastatic PC3 cells and less metastatic LNCaP cells were cultured in RPMI-1640 medium, and after being passaged, they were used for RNA isolation and cDNA synthesis. qRT-PCR analysis was performed to determine DNMT1 gene expression levels.

According to the qRT-PCR analysis results, DNMT1 gene expression levels were determined in both PC3 and LNCaP cells. At least three Cp values were obtained for each sample, and the average of these values was used to calculate gene expression levels.

The evaluation revealed a 0.80-fold difference in expression between the metastatic PC3 cancer cell line and the less metastatic LNCaP cancer cell line. Our study provides data on DNMT1 gene expression in metastatic PC3 prostate cancer cells. The results obtained may contribute to understanding the role of DNMT1 in the pathogenesis of prostate cancer and its potential use as a therapeutic target.

Key Words: Prostate cancer, DNA methylation, PC3 cell line, DNMT1 gene expression

1. GİRİŞ

Kemik metastazı en sık genitoüriner tümörlerde görülür. Bunlar arasında en fazla prostat, mesane ve renal hücreli karsinomlarda kemik metastazı görülür. Özellikle primer tümörlerin büyüme ve metastazını tümörün mikroçevresinde yerleşen epigenetik değişiklikler etkilemektedir (Sozen ve ark., 2014).

Epigenetik modifikasyonlar, DNA dizisinde değişiklik olmadan gen ifadesinin bölgesinde ve dizisinde meydana gelen değişikliklerdir ve kromatin yapısının stabilitesinden, genom bütünlüğünden, gen ifadesinin doku tipine özgü düzenlenmesinden, embriyonik gelişimden, genomik imprinting ve inaktivasyondan sorumludur. En önemli epigenetik mekanizma, bir diğer epigenetik mekanizma olan histon modifikasyonu ile ilişkili olan DNA metilasyonudur. Epigenetik işaretlerin küçük ölçekli incelenmesi kanseri anlamak için önemlidir. Örneğin, tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu, transkripsiyonel baskılanmaları ile ilişkilidir ve kanserin tanımlanmasında önem arz etmektedir (Bolton ve ark., 1984; Davies ve Gardner, 2002; Plusa ve ark., 2002).

Memeli genomlarında DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz adı verilen enzimler tarafından gerçekleşir. DNA metiltransferazlar, CpG adaları olarak da bilinen genomik DNA'daki CpG dinükleotidlerini hedef alır. Bu enzimler, DNA metilasyon paternlerinin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Yapılan araştırmalar, DNMT1'in artan gen ifadesinin, DNA metilasyon profillerinde belirgin değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur (Marikawa ve Alarcon, 2012). Gen ifadesinin düzenlenmesi ve genom stabilitesi üzerinde de bu değişiklikler önemli etkiler yaratabilir.

DNMT1 enzimi birçok sinyal yolağının hedeflerinden biridir ve bu yolağın sürekli aktivasyonu nedeniyle özellikle kanser sırasında aşırı eksprese edilir (Fleming ve Pickering, 1985; Johnson ve McConnell, 2004).

Wnt/ β -katenin sinyal yolu, ürogenital sistemin gelişiminde önemli bir yoldur. DNMT1'in stabilitesi bu modifikasyonlar tarafından kontrol edilir. DNMT1 stabilitesini düzenleyen önemli enzimlerden biri deubikitinaz HAUSP (USP7) ve diğeri de E3 ubikitin ligaz olan UHRF1'dir. DNMT1'in stabilitesi, bu proteinlerin gen ifade seviyeleri ile doğrudan bağlantılıdır (Fleming, 1987; Johnson ve Ziomek, 1981;

Suwinska ve ark., 2008). Hücre içindeki DNMT1'in dengesi ve fonksiyonu için bu enzimlerin varlığı kritik öneme sahiptir.

DNMT1'in yüksek gen ifadesi genitoüriner kanserlerde yaygındır. Şu ana kadar yapılan araştırmalar, yalnızca genitoüriner kanserlerde değil, diğer kanser türlerindeki bu artışın nedenlerini tam olarak açıklayamamıştır. Bu bağlamda ilk olarak insan mesane kanseri hücre hattı olan T24, Caki-2 insan böbrek hücreli karsinom hücre hattı ve LNCaP ve PC3 insan prostat hücre hatlarında GSK3p inhibitörleri kullanılarak Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktive edilmiştir. Bu etkinin DNMT1, β -katenin ve pGSK3p (Ser9) protein ifade düzeyleri üzerindeki etkisi ortaya çıkarılmıştır. İkinci olarak, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inaktivasyonu için DNMT inhibitörleri kullanıldı ve ardından DNMT1, HAUSP ve UHRF1 enzim ifadesindeki değişiklikler belirlendi. Yapılan çalışma, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının genitoüriner kanserlerdeki DNA metilasyonunda rol oynayan DNMT1, HAUSP ve UHRF1 enzimlerinin ifade düzeylerini belirlemede önemli bir rol oynadığını ilk kez gösteren çalışmadır (Braude ve ark., 1988).

Gen ifadesinin düzenlenmesi birçok mekanizmayı içerir. Bunlardan biri de epigenetik kontrol mekanizmalarıdır. Epigenetik mekanizmalardan en çok çalışılanlar arasında DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları da yer alır. Genlerin düzenleyici bölgelerindeki CpG adalarının metilasyonu, bu genlerin transkripsiyonunu ya tamamen ya da kısmen durdurur. Ayrıca, gen ifadesinin bastırılmasına neden olan diğer bir epigenetik mekanizmada histon modifikasyonudur. Histon modifikasyonları, kromatin yapısının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu modifikasyonlar, histon proteinlerinin N-terminal uçlarında yerleşen amino asitlerdeki kimyasal değişikliklerdir. Özellikle, histon 3(H3) üzerinde yapılan deasetilasyon, H3 lizin 4(H3K4) üzerindeki demetilasyon ve H3 lizin 9(H3K9) üzerindeki metilasyon, kromatinin sıkışmasını ve gen ifadesinin düzenlenmesini etkileyen heterokromatin bölgelerin belirteçleridir. Bu modifikasyonlar, gen ifadesinin artırılması veya baskılanması ile sonuçlanabilir ve hücredeki birçok biyoloji süreci etkiler. Hücre döngüsü, büyüme ve ölüm, sinyalizasyon ve gen düzenlemesini kontrol eden genlerdeki anormal epigenetik düzenlemeler mesane, böbrek ve prostat kanseri olmak üzere birçok kanser türünde bulunmuştur (Marikawa ve Alarcon, 2009).

2. GENEL BİLGİLER

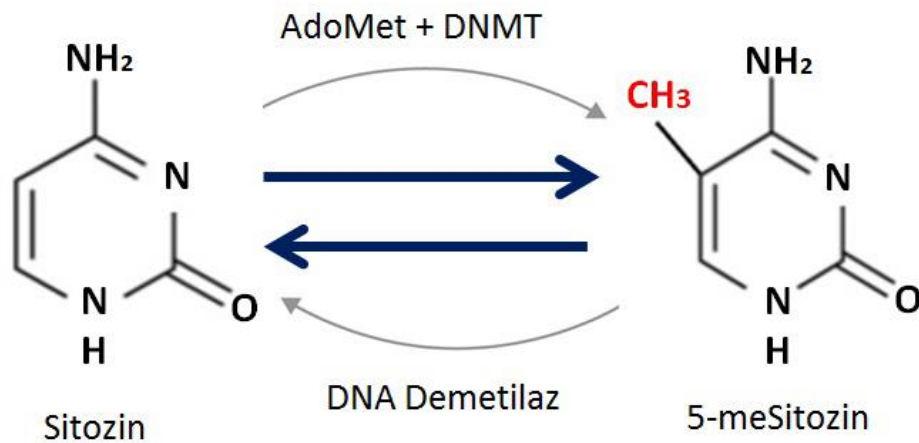
Gen ifadesinin düzenlenmesi birçok mekanizmayı içerir. Bunlardan biri de epigenetik kontrol mekanizmalarıdır. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu sık çalışmalarda kullanılan epigenetik mekanizmalar arasındadır. Genlerin düzenleyici bölgelerindeki CpG adalarının metilasyonu, bu genlerin transkripsiyonunu ya tamamen durdurur ya da kısmen durdurur. Histon modifikasyonu da, gen ifadesinin bastırılmasında önemli rol oynayan bir diğer epigenetik mekanizmadır. Histon modifikasyonları arasında, histon 3 (H3) deasetilasyonu, H3 lizin 4 (H3K4) demetilasyonu ve H3 lizin 9 (H3K9) metilasyonu gibi çeşitli işlemler bulunmaktadır. Bu modifikasyonlar, heterokromatik bölgelerin belirteçleridir ve gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Hücre döngüsünü, büyümeyi ve ölümü kontrol eden genlerdeki anormal epigenetik yeniden düzenlemeler mesane, böbrek ve prostat kanseri de dahil olmak üzere kanser türlerinin birçoğunda bulunmuştur (Morgan ve ark., 2005; Vassena ve ark., 2011).

2.1. DNA Metilasyonu

Bilinen dört bazın yanı sıra, metillenmiş sistein kalıntıları özellikle yüksek ökaryotik genomlarda CpG dinükleotid bölgelerinde (CpG adaları) bulunur. DNA metilasyonu, genellikle adenin ve sitozin bazlarında, hem prokaryotik organizmalarda hem de ökaryotik organizmalarda meydana gelir. İlk kez 1948 yılında Hotchkiss tarafından sığır timusunda kanonik düzende gözlemlenmiştir. Hayvan genomlarında, Metilasyon testi genellikle DNA'nın belirli bölgelerinde özellikle 5-CpG-3' dinükleotidindeki sitozin bazının 5. karbona bir metil grubu (-CH₃) bağlandığında gerçekleşir (Şekil 2.1). DNA'nın büyük bir kısmına bağlanacak olan bir metil grubu, Watson/Crick baz eşleşmesine müdahale etmeyecek ancak DNA-protein etkileşimine müdahale edecektir (Pradhan ve ark., 1999).

İnsan ve fare genomlarındaki CpG dinükleotidlerinin %3-8'i metillenmiştir. CpG adaları temel genlerde ("housekeeping" genler olarak adlandırılır), doku tipine özgü genlerin 5' promotör bölgesinde ve genlerin ekzonlarında bulunur. İnsan genomunda genellikle 45.000'in üzerinde CpG adası vardır ve bu bölgelerin çoğu normal hücrelerde metillenmemiş durumdadır. Bu sitozin modifikasyonu DNA replikasyonundan sonra

gerçekleşir ve DNA metiltransferazlar (MTazlar) tarafından katalize edilir. DNA metiltransferaz enzimleri, CpG adaları olarak adlandırılan ve genomik DNA'da yerleşen bu adacıkları substrat olarak kullanır. DNA metiltransferaz ilk olarak 1964 yılında Gold ve Hurwitz tarafından keşfedilmiştir. İlk memeli DNA MTaz Razin ve ekibi tarafından keşfedilmiştir ve şu anda Dnmt1 (DNA metiltransferaz) olarak adlandırılmaktadır. Tüm DNA MTazlar metil bölgesi olarak S-adenozil-L-metiyonin (AdoMet) kullanır. Epigenetik bilginin önemli parçalarında biri de DNA'da depolanmış, DNA metilasyonudur. Bu nedenle DNA metilasyonunun hayvanlarda gen üretimi, hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesi, kromozom bütünlüğünün korunması, ebeveyn baskısı ve X kromozomu inaktivasyonu gibi birçok önemli işlevi olması şaşırtıcı değildir. Ek olarak, DNA metilasyonu homolog rekombinasyonun engellenmesi ve endojen retrovirüslerin susturulması gibi önemli biyolojik süreçlere katkıda bulunur. Genomik metilasyon modellerindeki somatik değişiklikler kansere ve yaşlanmaya da katkıda bulunur. Bu nedenle, hayvanlarda normal embriyo gelişimi için DNA metilasyonu gereklidir. Bu reaksiyonun en kötü kısmı metillenmiş sitozinin deaminasyonudur. Metilsitozin (mC) timin bazına deamine olur. Metillenmemiş sitozin urasile deaminasyona uğrar, ancak bu durum DNA tamir sistemi tarafından algılanır ve etkin bir şekilde urasil-deglikozilaz yolu ile onarılır. Bu nedenle CpG bölgesi, germline ve edinilmiş somatik mutasyonların yaklaşık %30'undan sorumlu olan önemli bir mutasyon bölgesidir (Hanna ve ark., 2018).



Şekil 2. 1. Sitozin metilasyonunun biyokimyasal yolağı (Baylin, 2005)

Buna ek olarak, DNA metilasyonunun hedef genlerin ifadesini düzenlemek için metilasyon, ubikitinasyon, fosforilasyon ve asetilasyon gibi dinamik histon modifikasyonlarıyla iş birliği yaptığı görülmektedir (Ehrlich, 2003).

2.1.1. DNA Metilasyon Dinamiği

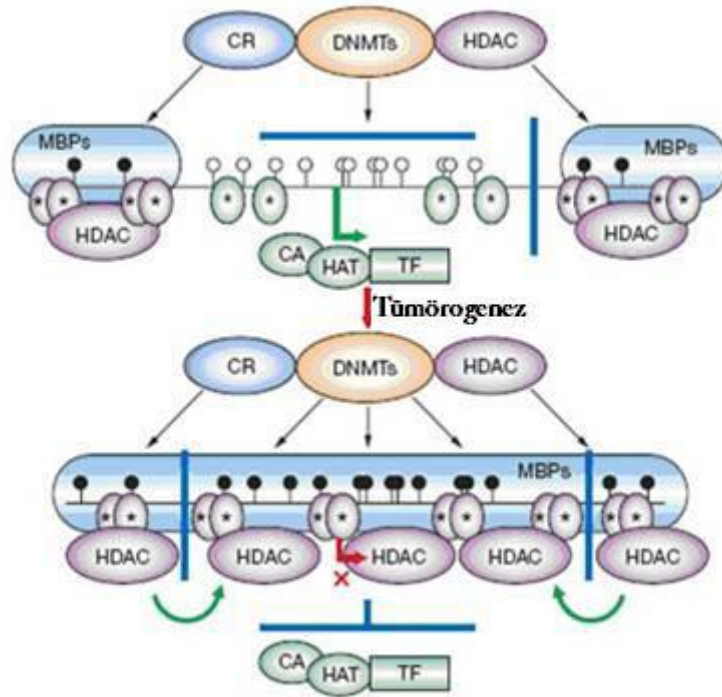
Memelilerde, DNA metilasyonunun yeniden programlanmasının, preimplantasyon embriyonun tüm genomu boyunca neredeyse tam metilasyondan sonra germ hücrelerinde ve preimplantasyon embriyolarda meydana geldiği bilinmektedir. Bu süreç, mevcut epigenetik bilgiyi ortadan kaldırmak ve büyüme döngüsünü yeniden başlatmak için gereklidir. Sperm kromatininin yeniden programlanma süreci, dölleme gerçekleşikten hemen sonra başlar ve DNA replikasyonu başlamasından hemen önce tamamlanır. Bu süreçte spermdeki protaminler asetillenmiş histonlarla değiştirilir, böylece kromatin yapısında yeniden düzenlenme süreci başlar ve embriyonik gelişim için uygun bir ortam sağlanır. Metilasyon-demetilasyon dönüşümünün mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ebeveynin genomu her bölünmede pasif mekanizmalarla kademeli olarak demetilasyona uğrar. Bu dönemde genomdaki önemli genlerin ve tekrarlayan dizilerin metilasyonu azalır. Bununla birlikte, çoğu baskılanmış gen ve retrovirüs genellikle bu süreçten etkilenmez ve metilasyon işaretleri korunur. Bu bölgeler farklı embriyonik ve ekstraembriyonik implantasyon hatları için yeni ve yeniden metillenir. Metilasyonun yeniden sağlanması, de novo metilasyon aktivitelerinin etkili bir şekilde çalışmasına bağlıdır (Bestor, 2000).

DNA metilasyonu başlangıç aşamasının ardından vücut hücrelerinde sürekli olarak devam eder ve bu hücrelerin işlevlerini düzenler. Somatik hücre genomları sperm ve yumurta genomlarından daha az metillenmiştir. Benzer bir yeniden programlama döngüsü, germ hücresi metilasyonu sırasında tüm genomun demetilasyonu yoluyla erkek ve dişi primordial germ hücrelerinin gelişimi sırasında meydana gelir. Erkek ve dişi germ hattında tekrarlanan metilasyon, gametogenez sürecinin çeşitli aşamalarında tekrarlanan bir süreç olarak gerçekleşir. Hücrelerdeki bu yeniden programlama, imprinting'i yeniden başlatmak için gereklidir ve epigenetik değişikliklerin ortadan kaldırılmasında rol oynar (Barau ve ark., 2016; Uysal ve ark., 2015).

2.1.2. Epigenetik Sinyal Bakımından DNA metilasyonu

Tekli yada çoklu CpG adalarının metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya birleşmesini bozabilir veya mC-bağlayıcı proteinlerin bu bölgelere birleşmesine sebep olabilir. Bu nedenle, DNA metilasyonu genel olarak kromatin yapısının stabilitesi ve organizasyonu ile yakından ilişkilidir. Metillenmemiş bölgelere ökromatin bölgeler, hipermetillenmiş bölgelere ise heterokromatin bölgeler denir (Feinberg, 2000; Feinberg ve ark., 2002; Kumar ve ark., 1994).

DNA metilasyonu genellikle asetilasyon, fosforilasyon ve ubikitilasyon gibi histon modifikasyonları ile ilişkilidir. DNA çoğunlukla metillenmemiş olduğunda, histonlar asetillenir, DNA metillendiğinde ise histonlar çoğunlukla deasetillenir ve H3K9 metillenmiş pozisyonadadır (Şekil 2.2). Baskılanmış kromatin yapıları, DNA metilasyonu ve histon kuyruğu deasetilasyonunun birlikte çalışarak birbirlerine etki etmesinden oluşur. Bitkilerde ve mantarlarda, H3K9 metilasyonu yeni metilasyona yol açar. Buna karşılık, Arabidopsis ve insanlarda CG metilasyonunun kaybı H3K9 metilasyonunu etkileyerek epigenetik düzenlemelerde önemli bir değişime yol açar. Böylece, DNA metilasyonu, H3K9 metilasyonu ve histon deasetilasyonu, kendi kendini organize eden bir epigenetik manzaranın oluşmasına yol açar. Bu yapı, aktif ve inaktif durumlar arasında geçiş yaparak gen ifadesini düzenleyen yarı epigenetik bir modifikasyondur. İşlevi kontrol eden genlerin kalıtımı çok önemlidir ve geri döndürülemez. Ek olarak, heterokromatin ve ökromatin bölgeleri replikasyon süreci ve zamanlaması açısından farklılık gösterir. Heterokromatin bölgeler daha uzun sürede çoğalırken, ökromatin bölgeler daha az sürede çoğalır. Heterokromatin yapıların yaranması, antibiyotiklerin etkinliğini ve stabilitesini büyük ölçüde artırır (Araujo ve ark., 2001).



Şekil 2. 2. DNA metilasyonunun transkripsiyonel baskılanmadaki rolü. HDAC; Histon deasetilaz, TF; Transkripsiyon faktörü, CR; Ko-aktivatör, HAT; Histon asetilaz, MBP; Metil sitozin bağlanma proteini, DNMT; DNA MTaz enzimi, CR; Korepresör (Baylin, 2005)

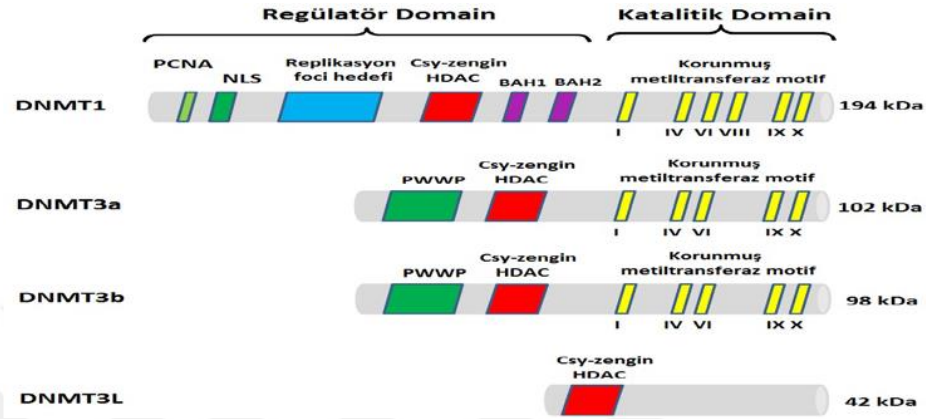
2.2. DNA Metiltransferazlar

Klonlanmış ve izole edilmiş İlk DNMT enzimi *Haemophilus haemolyticus*'tan elde edilmiştir. Ökaryotik DNMT'lerden üç kat küçük olan bu DNMT enzimi 327 amino asit uzunluğundadır. DNMT ailesinin ökaryotlarda tanımlanmış 5 üyesi vardır (Posfai ve ark., 1989);

Memelilerde DNMT'ler en az üç yapısal bölge içerirler;

- “N ucu düzenleyici domain: nükleusta DNMT'lerin lokalizasyonundan sorumludur, bu bölgede proliferatif hücre nüklear antijen bağlayıcı domain (PBD), nüklear lokalizasyon sinyal (NLS), sisteince zengin çinko parmağı DNA bağlanma motifi (ATRX), polibrom homoloji domain (PHD) ve PWWP tetrapeptid kromatin-bağlanma domain'leri bulunmaktadır”.

- C ucu katalitik domain; karakteristik olarak farklı on sekans modifi içerirler. Evrimsel süreçte altı tanesi korunabilmiştir; motif I, IV, VI, VIII, IX ve X
- Merkez bağlayıcı; tekrarlanan KG'lardan (glisin-lizin) oluşur (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3. Memeli DNMT üyelerinin genel yapısı (Turek-Plewa & Jagodziński, 2005)

Memeli sitozin DNA MTazları seçtikleri DNA substratı için 2 gruba ayrılır: yeni MTazlar (DNMT 3A ve 3B) ve idame MTazlar (DNMT1). Memeli DNA metilasyon modeli, de novo MTaz DNMT3A ve DNMT3B tarafından erken gelişimde replikatif mC'ye dönüştürülürken, idame MTaz DNMT1, replikasyon modeli sırasında hemimetillenmiş DNA'ya metil grupları ekleyerek somatik hücrelerde çoğalır (Chuang ve ark., 1997).

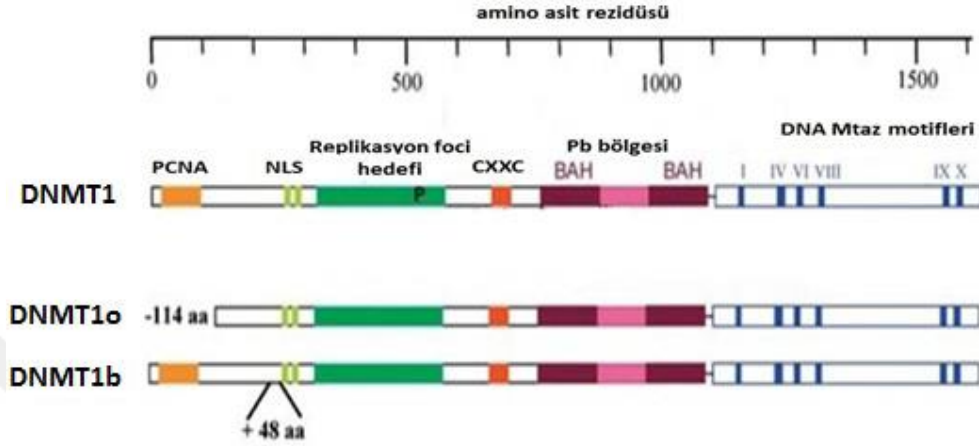
2.2.1. DNMT1 Enzimi

Memeli DNA MTaz'lardan ilk keşf edileni DNMT1'dir. Replikasyon sırasında DNA metilasyon modellerinin düzenlenmesinden sorumlu önemli bir enzimdir. Gen Kromozom 19 üzerinde bulunur. Hemimetillenmiş DNA'ya in vitro afinitesi, metillenmemiş DNA'ya göre 5-40 kat daha yüksektir. Ancak, enzimin de novo metilasyon yeteneği oldukça zayıftır. Prokaryotik bir DNMT ile memeli DNA bağlayıcı bir proteinin birleşmesi sonucu DNMT1 enzimi oluşturulur (Easwaran ve ark., 2004).

DNMT1 enziminin 621 amino asitlik büyük bir N-terminal alanı ile 500 amino asitten oluşan küçük bir C-terminal katalitik alanı vardır (Şekil 2.3). N-terminal motifi DNMT1 enziminin aktivitesi için gerekli olmamakla birlikte, hemimetillenmiş ve metillenmemiş DNA ipliklerinin ayrılmasında önemli bir role sahiptir. N-terminal alanı farklı işlevlere sahip alt alanlar içerir: PCNA (proliferating cell nuclear antigen) bağlanma alanı (PBD), heterokromatin hedefleme dizisi (TS), CXXC tipi çinko parmak alanları ve iki bromodial terminal homoloji alanı (BAH1 ile BAH2). DNMT1'in N-terminal alanı, 7 KG'lik bir tekrar dizisi aracılığıyla C-terminal alanına bağlanır. DNMT1 S fazı sırasında replikasyon odaklarına lokalize olurken, zigotta çekirdeğin dışında kalır ve sitoplazmada depolanır. Döllenmiş yumurtadaki ilk DNA replikasyon işlemi sırasında, DNA metilasyonu, DNA replikasyonu ile aynı anda değil birbirinden ayrı olarak devam eder. Bu dişi genomunun pasif demetilasyonu olup, bu sürecin bir parçası olarak gerçekleşir. Bu enzimin N-terminal alanının bazı kısımları tavuk polibromin-1 proteinine homologdur ve iki BAH alanı içerir. Bu BAH'ların proteinler arasındaki etkileşimlerde önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir. Polybrom-1 proteininin, çeşitli kromatin yapılarıyla etkileşime girerek aracılık ettiği bilinmektedir. DNMT1'in polibrom alanı, replikasyon sırasında DNMT1'in çekirdek içindeki hareketinde kritik bir rol oynar. BAH alanları kromatinle bağlantılı birçok proteinde bulunur. Bu açıklamaya göre, DNMT1'in N terminali, DNMT1 katalitik aktivitesinin ve hücre içi salınımının düzenlenmesi için gereklidir. DNMT1'in memeli hücrelerindeki temel işlevi, en çokta epigenetik stabiliteyi sağlamak ve DNA metilasyonunu sürdürülmesidir. Farelerde yapılan çalışmalar, DNMT1'in yokluğunun genellikle embriyonik ölüme veya gelişimde ciddi anormalliklere neden olduğunu göstermiştir. DNMT1 eksikliği, DNA metilasyonunda belirgin bir azalmaya ve hastalıklara neden olabilir. DNMT1'in katalitik alanı, proteinin C-terminal bölgesinde yer alır ve 500 amino asitten oluşur. Katalitik alan on benzersiz motif içerir; I, IV, VI, VIII, X ve IX (Robertson ve ark., 2000).

DNMT1 farklı bir çeviri geçmişine sahiptir ve bu nedenle farklıdır (Şekil 2.4). 1616 amino asitlik varyant çoğunlukla insan somatik hücrelerinde görülür. DNMT1'in DNMT1o adı verilen kısa, hastalığa özgü bir formu preimplantasyon gelişiminde ve oosit sırasında ifade edilir. DNMT1o, N-terminal 114 amino asit kalıntılarından yoksundur ve in vivo bozunmaya karşı stabildir. DNMT1o proteininin stabilitesi,

DNMT1o'nun ooplazmik depolanmasına ve embriyonik S fazı sırasında baskılanmış alellerinin metilasyon modelinin korunmasına izin verir. Başla bir Dnmt1 izoformu Dnmt1b'dir. 48 ek nükleotid içerir ve ekzonlardan 4 ve 5'in arasında yerleşir. İşlevi hala belirsizdir (Easwaran ve ark., 2004).



Şekil 2. 4. DNMT1 enzim izoformları (Hermann, Gowher & Jeltsch, 2004)

CpG adaları normal dokularda sıklıkla metillenmemiş olsa da kanser hücrelerinde gen inaktivasyonu sırasında CpG adalarının metillenmesine sıklıkla rastlanır. Metilasyon modellerindeki bu değişiklikler genellikle DNA MTaz seviyesi ile ilişkilidir ve birçok çalışma insan tümörlerinde DNMT1 ekspresyonunun arttığını göstermiştir. DNMT1, DNA'nın hemimetillenmiş bölgelerini substrat gibi algılar. Bundan başka DNMT1'in aktivitesi, hem N-terminal hem de C-terminal bölgelerin işbirliğiyle sağlanır (Grayson ve Guidotti, 2013; Rountree ve ark., 2000).

2.2.2. DNMT2 Enzimi

DNMT2, yalnızca C-terminal alanını içeren en küçük DNA değiştiricidir.

Bununla birlikte, DNMT2'nin aspartat transfer RNA'yı (tRNAasp) metilleştirdiği görülmektedir. Bu nedenle, DNMT2'nin DNA MTaz aktivitesi tartışmalı bir konudur. Bu enzim DNA hasarını tanımak ve DNA rekombinasyonunu veya mutasyonunu onarmak için gereklidir (Turek-Plewa ve Jagodzinski, 2005).

2.2.3. DNMT3 Enzimi

DNMT3A ve DNMT3B benzer yapıya sahip yeni MTazlar olmalarına rağmen, sırası ile 2p23 ve 20q11.2 kromozomlarında bulunurlar. Bunlar, DNA'yı hemimetillemekten, CpG dinükleotidlerini metilleyebilir. Bu enzimler, özellikle erken embriyonik gelişim sırasında DNA'nın de novo olarak metilasyonundan sorumludurlar. DNMT3A ve 3B'nin PHD alanları özellikle metillenmemiş H3K4 histonlarını tanır ve bu nedenle DNA metilasyonu ile histon modifikasyonu arasında bir bağlantı sağlayabilir (Hermann ve ark., 2004).

DNMT3A ve DNMT3B'nin aktiviteleri farklı embriyonik dokularda azalır ve yetişkinlerde çok düşüktür. DNMT3A neredeyse tüm hücrelerde ifade edilirken, DNMT3B düşük seviyelerde ifade edilir ve bu ifade genellikle testis, tiroid ve kemik iliği gibi belirli dokularla sınırlıdır. DNMT3B'nin birçok tümör hücre hattında artmış olduğu gözlemlenmiştir, bu durum da bu enzimin kanserde önemli bir işlevi olabileceğini düşündürmektedir. DNMT3A ve DNMT3B, DNMT1 ile etkileşime girerek hedef genlerin ifadesini inhibe eden HDAC1'i aktive eder. DNMT3B, bilhassa kromozomların etrafındaki uydularda tekrarlayan dizilerin metilasyonundan sorumlu bir enzimdir (Yoder ve ark., 1997).

2.2.4. DNMT3L Enzimi

DNMT3L (DNA sitozin benzeri 5-metiltransferaz) proteininin metiltransferaz aktivite bölgesi motifi, belirli bir silinme olayı sonucunda kaybolmuştur. Bu yüzden, diğer yeni DNMT'ler ile birleştirilmelidir. Kromozom 21q22.3 üzerinde yer alır ve DNA paterni sırasında postnatal dişi germ hücrelerinde ifade edilen maternal olarak baskılanmış genlerin metilasyonundan özellikle sorumludur. DNMT3L, PHD benzeri motifi aracılığıyla HDAC1'i bağlar ve aktifleştirir. HDAC1 aktivitesinin rolü, kromatin yapısının düzenlenmesi ve transkripsiyonel kontrolde önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Kristalografik çalışmalar DNMT3L'nin H3 histonunun N terminalindeki lizin 4'ün metillenmemiş olduğunu fark ettiğini ve de novo metilasyonu tetikleyerek hedef üzerinde DNMT3A varyantlarının aktivasyonuna ve işe alınmasına yol açtığını göstermektedir (Trasler ve ark., 1992).

DNMT3L, DNMT3A ve DNMT3B'nin C terminaline bağlanarak enzim aktivitesini artırır. DNMT3L, DNMT3A'nın aktivitesini 1,5 kat arttırırken DNMT3B'nin aktivitesini ise 3 kat artırır. DNMT1'in aktivitesi üzerinde herhangi bir

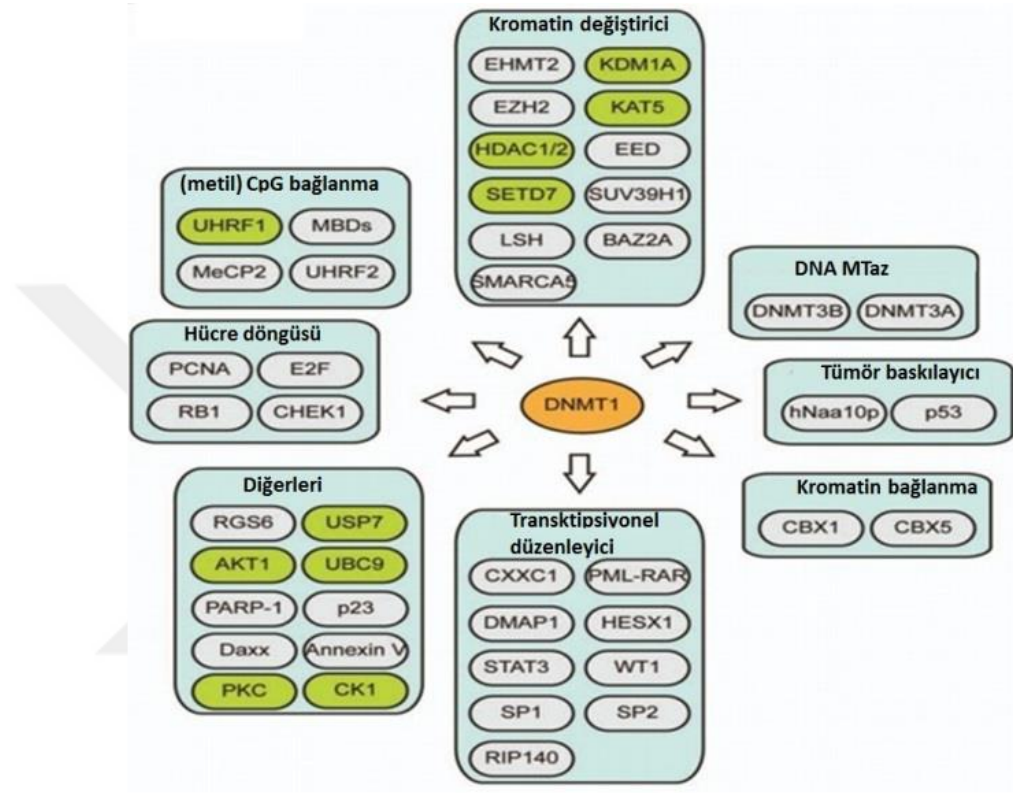
etkisi bulunmamaktadır. Buna ilaveten, DNMT3A/DNMT3L kompleksi, DNMT3A'nın DNA'ya bağlanma konusunda DNMT3A'nın tek başına sahip olduğundan daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu, DNMT3L'nin çekirdeğe girdiğini ve aktif DNMT3A ve DNMT3B için bir transkripsiyon unsuru olabileceğini göstermektedir. Ancak, DNMT3A ve DNMT3B, DNMT1 promotörünün metilasyonunu aktive ederek DNMT3L'nin düzenlenmesinde işbirliği yapar (Kurihara ve ark., 2008; Okano ve ark., 1998).

2.3. DNMT1'in Etkileştiği Faktörler Aracılığıyla Düzenlenmesi

DNMT1 enzimi, tek hücrelerden izole olduğunda işlevini kaybeder. Bu enzimin işlevini yerine getirebilmesi için belirli proteinlerle etkileşimde bulunması gerekmektedir. DNMT1'in PCNA ile direkt etkileşimi, metilasyon aktivitesini iki kat artırır. Bu bağlanma sayesinde, hücrelerdeki DNMT1 her 0,35 saniyede bir her nükleotide bir metil grubu eklerken, rekombinant DNMT1 her 70 ila 450 saniyede bir metil grubu ekler (Şekil 2.5). Ayrıca, enzim aktivitesini arttıran diğer bir etken de uyarıcı proteinlerle etkileşimdir. Maya iki hibrid ve/veya biyokimyasal çalışmalarda, DNMT1'in PCNA ve p21WAF1 gibi katalitik replikasyon çatalı faktörleri ve sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri ile etkileşime girerek hücre döngüsü düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, p21WAF1'in, DNA replikasyonunu doğrudan inhibe etmek için PCNA ile etkileşime girdiği bilinmektedir. İnhibe edilmiş DNA replikasyonu DNMT1'i inhibe edebilir. DNMT1'in ekspresyonu DNA replikasyonu ile yakından ilişkilidir (Ostler ve ark., 2007).

DNMT1'in etkileşimde bulunduğu diğer protein grupları arasında MeCP2, UHRF ailesi ve MBD2/3 gibi metil CpG bağlayıcı proteinler yer alır. MeCP2, DNA'ya bağlanarak kromatinin yoğunlaşmasını sağlar ve bu süreçte represör aktivitesiyle DNMT1 ile etkileşime girer. MeCP2 ve MBD2 spesifik olarak metillenmiş CpG bölgelerini tanıırken, MBD3 histon deasetilazlar HDAC1 ve HDAC2 ile bir kompleks oluşturur ve Dnmt1 ile etkileşime girer. Bu etkileşimler sonucu zayıf bölgelerdeki DNA hipermetilasyonu ile histon hipoasetilasyonu birbirleriyle bağlantı oluşturur. DNMT1 ile ilişkili protein (DAP1) bu kompleksin bir diğer içeriğidir. DNA metilasyonunu destekleyen bir diğer önemli kofaktör de UHRF1 kofaktörüdür. Embriyonik kök hücrelerde uhrf1 geni genetik olarak devre dışı bırakıldığında, bu durum, dnmt-a'ya benzer şekilde genomik hipometilasyona neden olur. UHRF1, S fazında DNMT1 ile

etkileşime geçerek, SET ve RING ile ilişkili bölgelerdeki (SRA) hemimetillenmiş DNA'da birlikte lokalize olur. DNMT1-UHRF1 etkileşimi stabiliteyi sağlar. DNMT1, hücrelerdeki DNA metilasyonunu düzenleyen de novo DNA metiltransferazları olan DNMT3A ve DNMT3B ile etkileşim içinde olur (Arand ve ark., 2012; Shirane ve ark., 2013).



Şekil 2. 5. DNMT1'in etkileşimde olduğu proteinler (Qin, Leonhardt & Pichler, 2011)

H3K9 metilasyonunu düzenleyen ökaryotik histon transferazları Suv39H1 ve EHMT2, DNMT1'in etkileşimde olduğu başka bir protein grubudur. Embriyonik kök hücrelerde ehmt2 ve suv39h'nin genetik olarak ablasyonu, genomik DNA'da bölgesel DNA hipometilasyonuna ve perisentrik uydu tekrarlarının DNA metilasyonundaki değişikliklere yol açar. Ayrıca DNMT1, polietilen grubu (PcG) proteinleri EZH2 ve EED ile etkileşime girer. PRC2/EED-EZH2 kompleksi, H3K27 metilasyonunu gerçekleştirir. EZH2, DNMT1'i hedef genlere toplayarak promotör metilasyonuna aracılık eder. Son çalışmalar, DNMT1'in inhibe edilmesinin PcG protein ekspresyonunu azalttığını ve hücre yaşlanmayı teşvik ettiğini göstermiştir (Ko ve ark., 2005).

Kromatin yeniden şekillendirici ATPaz benzeri LSH, histon modifiye edici enzimlere ek olarak DNA metilasyonunun düzenlenmesi için vazgeçilmezdir. LSH, SNF2 kromatin yeniden şekillendirici ATPaz ailesiyle ilişkilidir ve DNMT1, DNMT3B ve HDAC ile bir araya gelerek transkripsiyonel represyona katılır. Benzer şekilde, BAZ2A (TIP5 olarak da bilinir) nükleolar yeniden şekillendirme kompleksi NoRC'nin büyük alt birimidir ve DNMT1, DNMT3B, hSNF2H ve HDAC gibi çeşitli proteinlerle etkileşime girer ve nükleolar fonksiyonlarla ilişkilendirilmiş önemli bir regülatör kompleks oluşturur. Bu ilişki rDNA'ların birleşmesini destekler. Bu kompleksin bir parçası olan hSNF2H, DNMT1'in mononükleozomlara eğilimini artırır ve kromatin yeniden şekillendirme bileşeni DNMT1'in heterokromatik bölgelerdeki substrat bölgelerine bağlanmasına yardımcı olur (Watanabe ve ark., 2002).

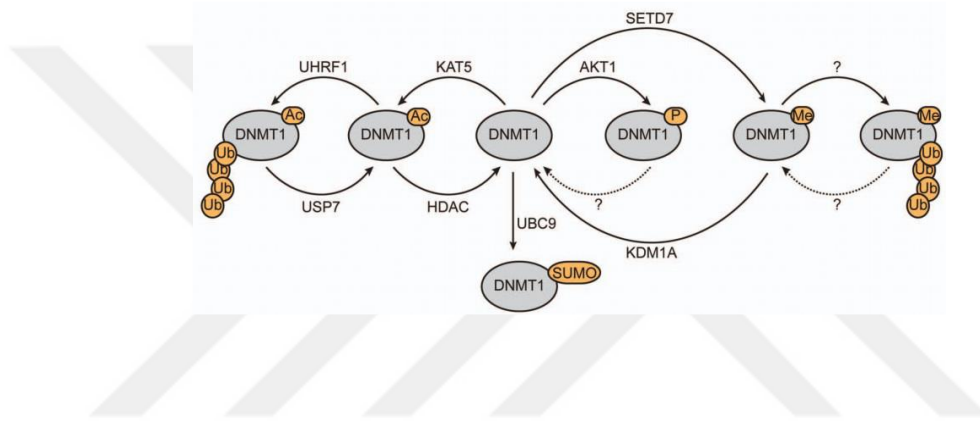
DNMT1'in transkripsiyonel düzenleme ile dolaylı bir ilişkisi vardır çünkü SP2, SP3 ve STAT3 gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girer. STAT3-DNMT1-HDAC1 kompleksi, hücre sinyalizasyonunun negatif bir düzenleyicisi olan shpl geninin promotör bölgesine birleşerek hücre göçünü indükler. DNMT1, transkripsiyon faktörü DMAP1 ve bunun inhibitörü RGS6 ile etkileşime geçerek HDAC2 ile doğrudan bağlantıya girer. Bu bağlantı, çift iplikçik kırılma bölgesi onarımı sırasında küresel veya bölgesel DNA metilasyonunu sağlamak için hayati öneme sahiptir. DMAP1'in eksikliği, onarım ürünlerinin hipometilasyonuna yol açarak homolog rekombinasyonu artırır ve genomik kararsızlığa sebebiyet verir. Buna ek olarak, DNMT1 heterokromatin yapılarının yaranmasına katkıda bulunduğundan, HP1 gibi heterokromatin bağlayıcı proteinlerle etkileşime girmesi beklenen bir durumdur. Etkileşimlerin her birinin sonucu DNA stabilitesi ile direncini sağlamaktır. Ek olarak, nükleer reseptör corepressor RIP140, DNMT1 ve DNMT3A ile etkileşime girer ve gen baskılanmasında önemli yer alır. Bunun yanı sıra, DNMT1, tümör baskılayıcılar olarak bilinen WT1, Rb, p53 ve hNaa10p gibi proteinlerle de etkileşime girer. Tümör baskılayıcı proteinlerden olan Wilms (WT1), Pax2 geninin promotör bölgesine bağlanarak DNMT1'leri etkiler ve bu da DNA hipermetilasyonuna neden olur. DNMT1'in N-terminal bölgesi, retinoblastoma (Rb) proteinleri gibi hücre döngüsü proteinleriyle etkileşime girer. Bu etkileşimler, hücre döngüsü düzenlemesinde önemli bir rol oynar ve hücrenin doğru zamanlamayla bölünmesini sağlar (Okano ve ark., 1999).

DNMT1, Rb proteinine bağlandığından, Rb proteini E2F1'e duyarlı promotörün transkripsiyonunu inhibe eder. Bununla birlikte, DNMT1'in promotörü, negatif geri besleme ile DNMT1'in uzamasını önleyen E2F1-Rb tarafından düzenlenir. DNMT1'in p53 ile etkileşimi, insan kolon hücrelerinde yapılan in vitro çalışmalarda survivin geninin promotör bölgesinin hipermetilasyonuna neden olur. Bu etki DNMT1'de veya p53 null hücrelerinde gözlenmemiştir. Kanser hastalarında yapılan çalışmalar, vahşi tip p53'ün DNMT1 ifadesini olumsuz yönde düzenlediğini ve p53'ten yoksun veya mutasyona uğramış hücrelerde DNMT1 ifadesini artırdığını göstermiştir. Son olarak, hNaa10p tümör baskılayıcı, DNMT1'in DNA'ya bağlanma yeteneğini artırarak tümör baskılayıcı genin promotör bölgesini aktive eder. Ayrıca, DNMT1, Annexin V ve p23 gibi bazı proteinlerle de ilişkilidir. Araştırmalar, bu proteinler arasındaki etkileşimlerin hücresel süreçlerde önemli rol oynadığını göstermektedir, ancak mekanizmaları hala net değildir. DNMT1, Rb proteinine bağlandığından, Rb proteini E2F1'e duyarlı promotörün transkripsiyonunu inhibe eder. Bununla birlikte, DNMT1'in promotörü, negatif geri besleme ile DNMT1'in uzamasını önleyen E2F1-Rb tarafından düzenlenir. DNMT1'in p53 ile etkileşimi, insan kolon hücrelerinde yapılan in vitro çalışmalarda survivin geninin promotör bölgesinin hipermetilasyonuna neden olur. Bu etki DNMT1 ya da p53 null hücrelerinde gözlenmemiştir. Kanser hastalarında yapılan çalışmalar, vahşi tip p53'ün DNMT1 ifadesini olumsuz düzenlediğini ve p53'ten yoksun veya mutasyona uğramış hücrelerde DNMT1 ifadesini artırdığını göstermiştir. Son olarak, tümör baskılayıcı hNaa10p, DNMT1'in DNA'ya bağlanma kapasitesini artırır ve tümör baskılayıcı genin promotör bölgesini aktive eder. Ayrıca, DNMT1'in Annexin V ve p23 gibi belirli proteinlerle etkileşimde bulunduğu bilinmektedir. Ancak bu proteinler arasındaki etkileşimlerin işlevi hala kesin olarak anlaşılamamıştır (Gowher ve ark., 2005; Okano ve ark., 1999).

2.4. DNMT1 Enzim Aktivitesinin Modifikasyonlar Aracılığıyla Düzenlenmesi

DNMT1'in işlevi post-translasyonel modifikasyonlar ve protein etkileşimleri ile düzenlenir (Şekil 2.6). DNMT1, asetilasyon ve fosforilasyon gibi hücre döngüsüne göre modifiye edilebilir. Öte yandan DNMT1, KAT5 tarafından asetillenir ve ardından E3 ubiquitin ligaz UHRF1 tarafından ubiquitine edilir. Bu, DNMT1'in proteolitik yıkımına işaret eden sinyaldir. DNMT1 proteini ölçüsü S fazında artar ve geç S ve G2 fazlarında azalır. Bu durum KAT5 değeri ile ters orantılıdır. Çünkü DNMT1'in KAT5 aracılığı

asetilasyonu DNMT1 degradasyonu için bir sinyaldir. Ayrıca DNMT1, USP7 (HAUSP) tarafından dehidrate edilir ve DNMT1'i proteolitik degradasyondan korumak için HDAC1 tarafından deasetile edilir. DNMT1 ve HAUSP arasındaki etkileşim S fazının ortasında kesintiye uğrar. Bu durum, DNMT1'in stabilitesi için HAUSP'in elzem olduğunu gösterir. Ayrıca, UHRF1 ve DNMT arasındaki etkileşim geç S fazında artar ve bu etkileşim DNMT1 üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Bu bulgular, hücre döngüsünün farklı aşamalarında DNMT1'in farklı düzenleyicilerle etkileşim içinde olduğunu göstermektedir (Watanabe ve ark., 2002).



Şekil 2. 6. DNMT1 enziminin posttranslasyonel modifikasyonlar aracılığıyla düzenlenmesi (Nucleus 2011; 2: 402)

Fare Dnmt1'in Ser515'te (DNMT1 Ser509) fosforilasyonunun DNMT1'in ilk post-translasyonel modifikasyonu olduğu ve DNMT131'in düzenleyici ve katalitik alanlarının etkileşimine aracılık ettiği gösterilmiştir. Dnmt1, Ser46'da kinaz kinaz 1δ/ε (sadece farelerde bulunur) tarafından fosforile edilir, böylece DNA bağlanma afinitesi azalır. Buna ek olarak, DNMT1'in fosforilasyonu, insan gliomlarında DNA hipometilasyonuna yol açarak DNMT1/PCNA/UHRF1 etkileşimini bozar. Erken ve orta S sırasında AKT1, DNMT1'i Ser143'te fosforile eder ve bitişik Ser142'nin SETD7 tarafından metilasyonunu bloke ederek DNMT1'i stabilize eder. SETD7 tarafından Lys142'deki metilasyon sinyali, geç S ve G2 sırasında DNMT1'in proteolitik bozunmasını aktive eder. Lys142'ye ek olarak, fare Dnmt1'in Lys1096 bölgesinde (DNMT1 Lys1094) SET7/9 metilasyonu da DNMT1'i destabilize eder. Tersine, KDM1A (LSD1 veya AOF2 olarak da bilinir) DNMT1'in stabilizasyonu sonucunda demetilasyon gerçekleştirilir. Son olarak, DNMT1 ubiquitin-konjugasyon enzimi UBC9

tarafından işe alınır. Bunun sonucunda, in vitro DNMT1 katalitik aktivitesi artar (Geiman ve ark., 2004; Miniou ve ark., 1997).

2.5. Ürogenital Kanserler ve DNA Metilasyonu

2.5.1. Renal Hücreli Kanserler

Böbrek kanseri (RCC) dünya çapında tüm organ malignitelerinin %2'sini içermektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da görülme sıklığı yılda %3 oranında artmaktadır. Bu genellikle erkeklerde görülür. Renal hücreli karsinom dört tip böbrek kanserinden biridir ve tüm böbrek kanserlerinin %90'ını oluşturur. Renal hücreli karsinom da histolojik gruplara ayrılır; (i) berrak hücreli (%80), (ii) papiller hücreli (%10-15), (iii) kromofob (%5) ve onkositom (çok nadir). Wnt sinyal yolunun bozulmasının, ancak diğer sinyal yollarının bozulmamasının, bu hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Aslında araştırmalar, Wnt sinyal yolunun renal hücreli karsinomun büyümesinde ve gelişmesinde rol oynadığını göstermektedir (Bourc'his ve ark., 2001).

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, epigenetik anormallikler renal hücreli tümör oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Son çalışmalar, renal hücreli karsinomdaki en önemli epigenetik anormalliklerden biri olan DNMT1'in artmış ekspresyonunu göstermiştir (Vlachogiannis ve ark., 2015).

Wnt antagonistleri sFRP1, sFRP2, sFRP4, sFRP5, WIF-1, DKK1 ve DKK3 genlerinin hipermetilasyon ile inhibisyonu, RCC'de sıklıkla bulunan β -katenin sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar. DNMT1 ekspresyonundaki değişikliğin nedeninin belirlenmesi, RCC'nin tanı, prognoz ve tedavisinde bir biyobelirteç olarak kullanılabilir (Uysal ve ark., 2015).

2.5.2. Mesane Kanseri

Genitoüriner kanserler arasında en sık görülen ikinci mesane kanseri türüdür. Mesane kanserleri üç gruba ayrılır: transizyonel hücreli karsinom (TCC) (%90), skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom. TCC'lerin yaklaşık %80'i kanserdir. Bu tümörlerin %70-80'i tekrarlayacak ve %20-30'u atak yapacaktır. Mesane kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserde tümör baskılayıcı genlerin DNA hipermetilasyonu meydana gelir ve bu metilasyonun kontrolünde ana rol DNMT1 enzimidir. Mesanede DNMT1 ekspresyonunda bir artış meydana gelir. DNMT1, mesane kanseri için ve

tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde önemli bir prognostik faktör olabilir. Zhang ve arkadaşları DNMT1 ve DNMT3A'nın mesanenin büyümesi ve gelişmesinde önemli bir rol oynayan CpG adalarının metilasyonunda rol oynadığını bildirmiştir. DNMT1, mesane kanseri tedavisi için potansiyel bir hedef olarak önerilmiştir (Goll ve ark., 2006).

Çalışmalar, Wnt antagonistlerinin inhibisyonu nedeniyle aktif kalan Wnt/ β -katenin yolağının mesane kanserinin büyümesi ve gelişmesinde rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte, Wnt yolunun aktivasyonu işlev bozukluğu ve kemorezistansla bağlantılıdır. Urakami ve ark. mesane tümörü örneklerinde ve hücre hatlarında (J82C, T24C, TCC, UMUC) wif-1 geni düzenleyici bölgesinin artmış metilasyonu bildirilmiştir. Sonuçlar β -katenin bağımlı Wnt sinyal yolunun aktive olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada, tümör hücrelerinde sfrp1, sfrp2, sfrp4, sfrp5, wif-1 ve dkk-3 genlerinin metilasyonunu belirlemişler ve bunların kanser teşhisinde epigenetik belirteç olarak kullanılabileceğini bulmuşlardır. Tang ve ark. mesane kanseri hücrelerinde (T24 ve TSU-PR1) WIF-1'in S-faz kinaz ilişkili protein 2 (skp2) ve c-myc ekspresyonunu inhibe ettiğini, p21 ve p27 ekspresyonunu ise yükselttiğini belirlemiştir. Sonuçlar, G1 fazında WIF-1'in hücre döngüsünü durdurduğu ve büyümeyi engellediğini göstermiştir (Ratnam ve ark., 2002).

2.5.3. Prostat Kanseri

Erkeklerde en sık görülen ikinci kanser olan prostat kanseri (CaP), genellikle akciğer ve kemik metastazlarıyla karakterizedir. Prostat kanseri, hem dünya genelinde hem de Türkiye'de ciddi bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, prostat kanseri erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür ve kansere bağlı ölümler arasında beşinci sırada yer almaktadır. Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) 2020 verilerine göre, dünya genelinde yaklaşık 1,41 milyon yeni prostat kanseri vakası bildirilmiş ve yaklaşık 375,000 kişi bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Global Cancer Observatory verilerine göre, Türkiye'de yaşa göre standardize edilmiş insidans oranı 100,000 erkek başına yaklaşık 35,1'dir.

Epidemiyolojisi; prostat kanserinin gelişiminden sorumlu risk faktörleri çeşitlilik gösterir. Önde gelen faktörlerden biri de ileri yaştır. Prostat kanseri genellikle 50 yaşın üzerindeki erkeklerde daha sık görülür. Bundan başka, ailesinde prostat kanseri öyküsü bulunan bireylerde, özellikle birinci derece akrabalar, prostat kanseri riski arttırır.

Önemli faktörlerden biri de genetik yatkınlıktır. Özellikle BRCA1 ve BRCA2 gibi gen mutasyonlarının erken yaşta prostat kanseri gelişimiyle ilişkilendirildiği bilinmektedir.

İrksal faktörler, sigara kullanımı, yüksek yağlı ve kalsiyumlu beslenme, ayrıca hormonal faktörlerden testestron seviyeleri prostat kanseri ile ilişkisi ortaya konulan veya bağlantısı olduğu düşünülen risk faktörlerindendir. Çevresel faktörlerin de prostat kanseri riskini artırabileceği düşünülmektedir, ancak bu konudaki araştırmaların henüz net değildir .

Genellikle erken aşamalarda hastalık kendini belli etmeyebilir. Ancak, ileri dönemlerde bazı belirtiler görülür. İdrar sorunları, meni ve idrarda kan görülmesi, erektil disfonksiyon, kemik ağrısı veya sırt ağrısı, kemik metastazına bağlı zayıflamış veya kırılmış kemik prostat kanserinin klinik bulgularıdır.

Hastalığın tanısı için genel olarak kullanılan birkaç yöntem vardır. Bunlar, kan ve görüntüleme testleri, klinik muayene ve biyopsidir.

Yaygın olarak kullanılan kan testi Prostat Spesifik Antijen'dir (PSA). Bununla birlikte ultrason, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve bilgisayarlı tomografi (BT) gibi görüntüleme testleri prostatın boyutunu ve dokusunu değerlendirmek ve olası tümörleri belirlemek için kullanılabilir.

En kesin yöntem ise biyopsidir. Biyosi zamanı iğne yardımıyla prostat dokusundan bir örnek alınır ve alınan örnek laboratuvar ortamında incelenir. Sonuçlar kanser hücrelerinin mevcutluğunu ve agreslik derecesini öğrenmeye ışık tutar.

Wnt sinyal yolu, prostat kanserinin ortaya çıkmasında, gelişmesinde ve metastazında kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Prostat kanserinde çeşitli Wnt'lerin ve bu yolun düzenlenmesinde yer alan diğer proteinlerin yüksek seviyeleri gözlenmiştir. DNA metilasyonu, prostat kanserinde erken somatik genom değişikliği olarak kabul edilir ve kanserin ortaya çıkması, yayılması ve metastazında önemli bir rol oynar. DNMT1 geni DNA metilasyon metabolizmasında yer alan enzimlerden biridir ve kanser hücrelerinde ekspresyonu sıklıkla artmaktadır. Prostat kanserinin tedavi hedeflerinden biri, DNMT1 ekspresyonundaki değişikliklerin nedenlerinin belirlenmesinin vurgulanmasıdır. Kinney ve arkadaşları farelerde prostat kanserinin erken evrelerinde DNMT1'in tümör baskılayıcı rol oynadığını, ancak ileri evrelerinde onkojenik aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Barau ve ark., 2016).

Wnt antagonistlerinden biri olan sFRP2'nin hipermetilasyonunu teşvik etmek prostat kanserinde sıklıkla bulunur ve sFRP2 hipermetilasyonunun prostat kanseri için bir biyobelirteç olabileceği önemlidir. Ayrıca, çeşitli prostat kanseri hücre hatlarında, APC, SFRP1 ve WIF-1 genlerinin hipermetilasyonu ile ilişkilendirilen β -katenin sinyal yolağının düzenlenmesinden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Saitou ve ark., 2012).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Penisilin-streptomisin solüsyonu, Gibco, ABD
- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, Gibco, ABD
- Fosfat tamponlu salin (dPBS), SERENA, Almanya
- %0,05 Tripsin-EDTA, Sigma-Aldrich, ABD
- β -Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, ABD
- RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Almanya
- RT² First Strand Kit içeriği, QIAGEN, Almanya
- SYBR Green
- 4,6-Diamidino-2-Fenilindol Dihidroklörür (DAPI), Sigma
- Paraformaldehit (PFA), Sigma&Aldrich, Almanya
- Primer Dizileri
- Alkol, Sigma-Aldrich, ABD

3.2. Kullanılan Sarflar

- 25 cm²'lik kültür kabı, Nest
- 35 mm hücre kültür kabı, Nest
- 10 μ l'lik, 100 μ l'lik, 1000 μ l'lik steril pipet uçları, Axygen
- 15 ml'lik steril santrifüj tüpü, Nest
- 0,2 ml ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpleri, Axygen
- 96 Kuyucuklu PCR Plaka, Nest
- Thoma lamı, Hausser Scientific, USA

3.3. Kullanılan Cihazlar

- MN 120 CLASS II Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini, Nüve
- Airstream PCR Kabini, Esco Lifesciences, Singapur
- Inverted Mikroskop, Nikon, Japonya
- Floresans Mikroskobu, Zeiss Axio.Observer.A2
- Masaüstü Santrifüj, Hitachi, Japonya
- Santrifüj, Hitachi, Japonya
- CO₂'li Hücre Kültürü İnkübatörü, PHCbi, Hollanda
- Mikropipet, Eppendorf, İsolab
- Thermal Cycler cihazı, BIO-RAD, ABD
- Vortex Mikser, SCILOGEX, ABD
- LightCycler 96, Roche, Almanya
- Etüv, Nüve FN055
- NanoDrop One, Thermo Scientific, ABD
- -80°C Buzdolabı, Panasonic

3.4. Primer Dizileri

Tez çalışmamızda kullandığımız Primer dizileri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan Primer Dizileri (Hu ve ark.,2011)

GEN	PRİMER DİZİSİ (5'-3')	
DNMT1	F	CCATCAGGCATTCTACCA
	R	CGTTCTCCTTGTCTTCTCT
β Aktin	F	TGTTTGAGACCTTCAACACCC
	R	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

3.5. Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan Prostat Kanseri Hücre hatları, American Tissue Culture Collection (ATCC)'den satın alınan, PC3 (CRL-1435™) ile LNCaP (CRL-1740™) hücre hatlarıdır.

PC3 Prostat kanser hücresinin – Besi yeri RPMI-1640(Gibco) içerisinde %10 FBS (fetal bovine serum) ve kontaminasyonu önlemek amacıyla %1 Penicilin/streptomisin eklenerek hazırlanmıştır.

3.5.1. Hücre Kültürünün Stoktan Çıkartılması:

Hücrelerin çoğalması için, -80°C'den alınan kriyovialler hızlıca 37°C'lik sıcak su banyosundan geçirilmiştir. 1 ml'de 1 milyon hücre dondurulmuştur. Hücre süspansiyonu, hücrenin büyütülmesi için kullanılan besi yerine (RPIM-1640) alınıp, 21°C'de 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sonra bize lazım olan kısım pelletin üstüne 1 ml besi yeri eklenerek hücreler süspansiyon hale getirilmiş ve supernatant atılmıştır. Hücre süspansiyonu, 5 ml besi yeri içeren 25 cm²'lik flasklara (T-25 NEST) yerleştirilip, %5 CO₂ içeren 37°C'deki ortamda inkübe edilmiştir.

3.5.2. Besiyeri Değiştirme:

Flask içindeki besi yeri aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra, hücrelerin yüzeylerinin temizlenmesi için 25 cm²'lik flaskın içine 2 ml 1X DPBS eklenmiş ve yüzeyler hafifçe yıkanmıştır. DPBS ortamı aspiratörle alınmış ve ardından 25 cm²'lik flask içine 5 ml taze besi yerinin eklenmesiyle hücrelerin beslenmesi sağlanmıştır.

3.5.3. Mikoplazma testi:

Mikoplazma testi, laboratuvarlarda sık sık karşılaşılan ve hücre kültür çalışmalarında önemli sorunlara neden olabilen kontaminasyon kaynağıdır. Bu kontaminasyon, kültürdeki hücrelerin büyümesini, morfolojisini, genlerin ifade edilmesini ve protein sentezlerini etkileyebilir. Tezimizde de bu test, sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak, kontaminasyonu önlemek için yapılmıştır.

Hücreler 35 mm'lik petri kabına ekilmiştir. Ertesi gün tüm medium toplanmış ve 1 ml PBS ile yıkama yapılmıştır. Tüm yüzeyi kaplayacak kadar %4 PFA (paraformaldehit) konulmuş ve 15 dakika +4°C'de bekletilmiştir. Sonra 3 kez 5 dakika olacak şekilde PBS

ile yıkanmış ve ardından DAPI boyası damlatılmıştır, 5 dakika karanlıkta inkübe edilmiş ve sonrasında floresans mikroskop ile incelenmiştir.

3.6. Hücre Kültürünün Pasajlanması:

Hücre kültürleri, flaskın %80-90'ını kapladıklarında, flask içindeki besi yeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Serumdan arındırma işlemi için, 25 cm²'lik flask içine 2 ml 1X DPBS eklenmiş ve hücrelerin yüzeyleri dikkatlice yıkanıp temizlenmiştir. DPBS çözeltisiyle temizleme işlemi tamamlandıktan sonra, flask içindeki hücrelerin yüzeyinden ayrılması için ısıtılmış %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu kullanılmıştır. Bu adım, hücrelerin pasajlanması için gereklidir ve yeni besi yeriyle taze ortama aktarılabilmesini sağlar. Hücreler, uygun nem ve CO₂ seviyelerinin sağlandığı 37°C'lik bir ortamda, beş dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bu koşullar, hücrelerin sağlıklı bir şekilde yaşamalarını ve istenilen deney koşullarında gelişmelerini sağlamak için yapılmıştır. Mikroskop altında flask yüzeyinden ayrıldığı belirlenen hücrelere, tripsin çözeltisinin etkisini durdurmak için on katı kadar besi yerinden oluşan bir solüsyon ilave edilmiştir. Hücreleri yüzeyden ayırmış tripsinin hücre zarlarına negatif etkisi engellenmiştir. Flask içindeki hücre süspansiyonu, 15 ml'lik bir falkon tüpe transfer edilmiştir ve içine besi yeri eklenmiştir. Bu işlem, hücrelerin kültür ortamında saklanması ve daha fazla çoğalması sağlanmıştır. 21 °C'de 800 rpm hızında 5 dakika süreyle santrifüj işlemi uygulandıktan sonra, elde edilen süpernatant aspire edilmiş ve hücre peleti 1 ml besi yerinde çözündürülmüştür. Çözündürülen hücre süspansiyonu daha sonra 25 cm²'lik flasklara aktarılarak, %5 CO₂ içeren bir ortamda 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.6.1 Hücre Soylarının Stoklanması:

Flask içindeki besi yeri, hücreler birleştiğinde aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler, yüzeydeki fazla DPBS'in aspirasyonu ile temizlendikten sonra, hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmasını kolaylaştırmak için 1-2 ml Trypsin-EDTA solüsyonu eklenmiştir. Hücreler, %5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de 5 dakika inkübasyona alınmıştır. Hücrelere, tripsin etkisini durdurmak için on katı hacimde besi yerinden ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu, içerisinde besi yeri bulunan 15 ml'lik bir falkon tüpe aktarılmış ve ardından oda sıcaklığında 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlemin ardından süpernatant kısım aspire edilmiştir. Hücre

süspansiyonu, 1.5 ml dondurucu ortamın (5 ml DMSO + 5 ml FBS + 40 ml DMEM) karanlık bir ortamda eklendiği bir kriyoviale aktarılmış ve ardından hemen -80°C'ye yerleştirilmiştir.

3.6.2 Hücrelerin Sayımı:

Hücrelerin sayısını belirlemek için Tripan boyası kullanılmıştır. Hücreler tripsin-EDTA ile ayrıldıktan sonra hücre süspansiyonundan 10 µL alınmış ve aynı hacimde (10 µL) Tripan mavisi boyası ile karıştırılmıştır. Karışımdan 10 µL Thoma lamına yüklenmiştir. Sulandırma katsayısıyla bulunan sayı çarpılarak, 1 ml besi yerindeki hücre miktarı hesaplanmıştır. Mikroskop altında 10x büyütme kullanılarak canlı (şeffaf) ve ölü (mavi) hücreler sayılmıştır. Hücre öldüğünde boya içine girdiği için mavi hücreler ölü olarak sayılır. Aşağıdaki formül kullanılarak hücre yoğunluğu hesaplanmıştır:

Thoma lamında hücre sayım formülü;

$$\text{Hücre Sayısı} = \text{Canlı Hücre Sayısı} \times \text{Dilüsyon Oranı} \times 10000$$

3.7. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) (Real-Time PCR)

Hücre hatlarından izole edilen RNA örnekleri kullanılarak Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) analizleri yapılmıştır. Bu çalışmamız için SYBR Green Mix kullanılmıştır. Mix hazırlama aşamaları şu şekildedir: İlk olarak SYBR Green mix karışımı eklenmiş, ardından master mix ve son olarak cDNA örnekleri eklenmiştir. Her bir kuyucukta toplam hacim 10 µl olacak şekilde karışımlar 96 kuyucuklu PCR plakalarına yüklenmiştir. Bu yöntem, RNA'ların hassas ve doğru bir şekilde analiz edilmesine olanak sağlamıştır.

3.7.1. Total RNA İzolasyonu

Kültürü yapılmış olan hücreden QIAGEN marka, RNeasy® Plus Mini Kit izolasyon kiti kullanılarak ve kitin protokolüne uyularak Total RNA izolasyonu yapılmıştır. İlk olarak tüpteki supernatantlar alınıp atılmıştır. 1 ml Buffer üzerine 10 ml B-merkapttoetanol eklenerek işleme başlanmıştır. Beta-merkapttoetanol kimyasal bir ajan olup, disülfid bağlarını kırar, DNAaz, RNAaz enzimlerinin enzim işlevselliğini sağlayan üç boyutlu konformasyonu bozar bu da istediğimiz nukleik asidi elde etmemizi sağlar.

Hücre pelletine 500 µl Buffer RLT eklenmiştir. Hazırlanmış mix 2ml'lik ependorfa yerleştirilmiş mor kolondan (GDNA eliminator column) geçirilmiştir. 30 saniye 10.000'rpm de santrifüjlenmiştir kolon atılmış ependorftakine eşit miktarda (500 µl) %70'lik etanol eklenmiştir. İyi çözülmesi için yaklaşık 10 kere pipetaj yapılmıştır. Yeni bir 2 ml'lik ependorfa yerleştirilmiş pembe kolondan (measy spin column) tüm örnek geçirilmiştir (Filtreye değdirmeden). 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenip alttaki tüp atılmıştır.

Kolonu yeni bir 2 ml'lik ependorfa alıp üstüne 700 µl RW1 eklenmiştir. 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenip alttaki tüp atılmıştır. Kolon yeni bir 2 ml'lik ependorfa alınıp üstüne 500 µl RPE eklenmiştir. 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Kolon yeni tüpe alınmadan sadece üstüne tekrardan 500 µl RPE eklenmiştir. 10.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir. Kolonu 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

Kolonu 1.5 ml'lik ependorfa koyulmuştur. Üzerine 30 µl RNeas-water su eklenip (tam filtrenin üzerine filtreye değmeden) kapağını kapatılıp 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilmiş RNA'lar -20°C dereceye kaldırılmıştır.

İzole edilen RNA'ların "Thermo Scientific™ NanoDrop™" cihazı ile RNA konsantrasyonu ve saflık oranları ölçülmüştür.

3.7.2. cDNA (Tamamlayıcı DNA, Komplementer DNA) sentezi

cDNA sentezi için QIAGEN markasına ait RT² First Strand Kit ürünü kullanılmış ve kitte belirtilen protokole göre işlem yapılmıştır. 6,31 ml (PC3) ve 3,71 ml (LNCaP) izole edilen RNA tüplere alınmıştır. Üzerine 2 µl Buffer GE, 1,69 µl(PC3 için) ve 4,29 µl (LNCaP için) RNase-free water eklenmiştir. Toplam hacim 10 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Örnekler BIO-RAD markalı Termal Döngü cihazına yerleştirilmiş ve 42°C 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 1 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Buzdan aldıktan sonra toplam hacim 10 µl olacak şekilde mix aşağıda gösterilen Tablo 2'deki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 2. Reverse-Transkriptaz karışımı

İçerik	Miktar
5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
RNase-free water	3 µl
Toplam Hacim	10 µl

Tablo 3'te bulunan sıcaklık ve inkübasyon değerlerine göre termal döngü cihazına yerleştirilmiştir.

Tablo 3. cDNA sentez reaksiyon aşamaları

cDNA Döngü Aşamaları	
Ters Transkriptasyon	42°C 15 dakika
İnaktivasyon	95°C 5 dakika

PCR sonrasında elde edilen ürünler sulandırılarak RT-PCR işlemi için kullanılmıştır. Ve numuneler tekrar kullanılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.7.3. GERÇEK ZAMANLI PCR (qRT-PCR)

Hücre hatlarından izole edilen cDNA'lar, gerçek zamanlı PCR için kullanılmıştır. İlk olarak, tüm malzemelerin buz üzerinde çözülmesi beklenmiştir. Malzemeler çözüldükten sonra spin santrifüj yapılmıştır. RT-PCR işlemleri için kullanılacak karışım hazırlama aşaması şu sırayla ilerlemiştir: önce SYBR Green, ardından primerler ve son olarak cDNA eklenmiştir. Her örnek için hesaplama yapılarak, kuyucuk başına toplam 10 µl olacak şekilde örnekler dağıtılmıştır.

Primerler önce spin yapılmıştır. Reaksiyon tüpüne 5 µl SYBR Green eklenmiştir. Forward ve reverse primerlerin her birinden 0,5 µl eklenmiştir. cDNA'lar 4 µl olacak şekilde sulandırılmıştır. Hazırlanan mix vortexlenmiş ve spin attırılmıştır. 96

kuyucuklu real time pleytine 6 µl mix ve 4 µl cDNA eklenmiştir. Aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4. Gerçek zamanlı PCR karışımı

MALZEMELER	MİKTAR
SYBR GREEN	5 µl
FORWARD PRİMER	0,5 µl
REVERSE PRİMER	0,5 µl
CDNA	4 µl
TOPLAM	10 µl

Çalışma süresince tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Örnekler, Tablo 4'de belirtilen miktarlara göre karıştırıldıktan sonra 96 kuyucuklu PCR plakasına yüklenmiş ve plaka kapatıcı ile kapatılmıştır. Çalışılan her bir örnek için 3 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır. Sonrasında, RT-PCR analiz bilgileri girilmiş ve plaka cihaza yerleştirilmiştir. Programın döngüsü Tablo 5'te gösterilmiştir.

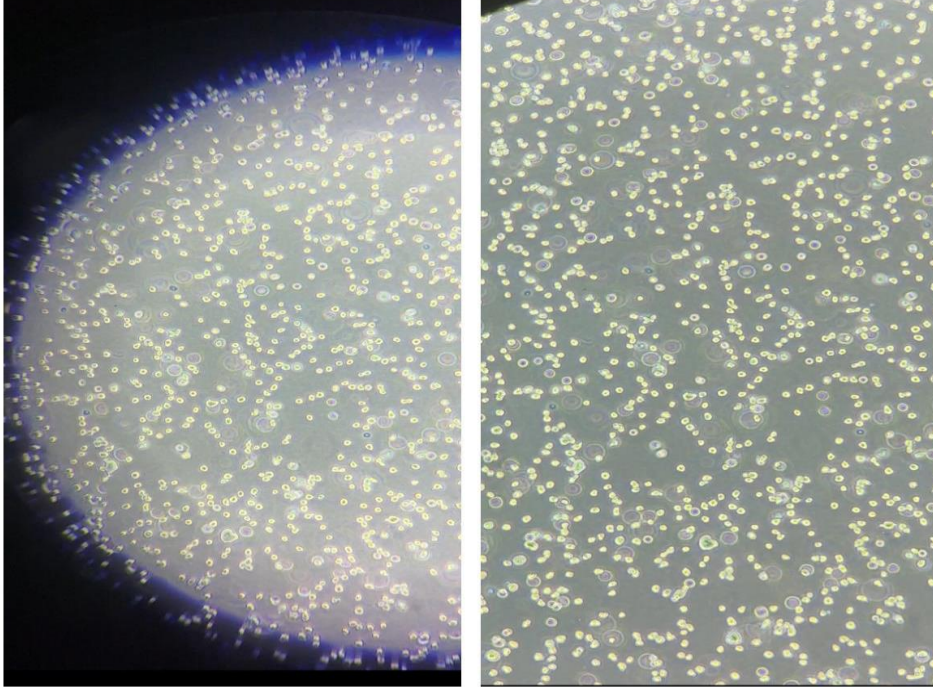
Tablo 5. qRT-PCR programı döngüsü

Döngü	Sıcaklık	Zaman	Aşama	
1	95 ⁰ C	10 dk	Preinkübasyon	
50	95 ⁰ C	30 sn	Denatürasyon	Amplifikasyon
	60 ⁰ C	30 sn	Bağlanma	
	72 ⁰ C	30 sn	Uzama	
1	95 ⁰ C	10 sn	Melting	
	65 ⁰ C	60 sn		
	97 ⁰ C	continuous		

4. BULGULAR

4.1. Morfolojik bulgular

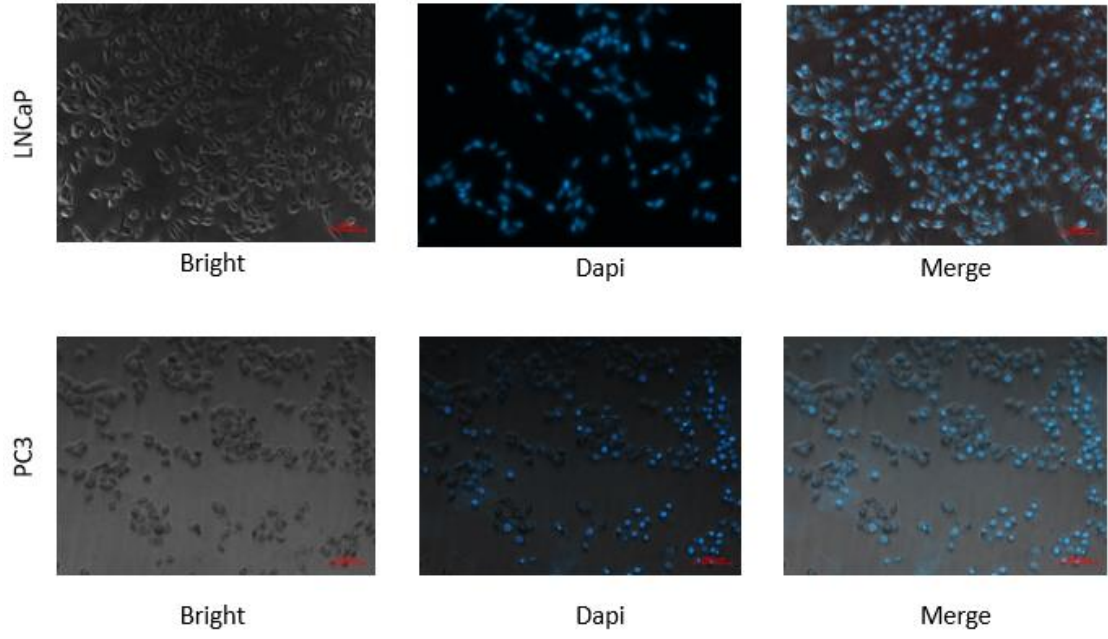
Tez çalışmamızda, ATCC'den satın alınan ticari PC3 (CRL-1435™) hücre hattı ile LNCaP (CRL-1740™) hücre hattı kullanılmıştır. -80°C'de saklanan hücre hatları çözülerek kültüre alınmış ve yeterli yoğunluğa ulaştıklarında enzim kullanılarak kültür kaplarından toplanmıştır. Hücre hatlarının çoğalma aşamaları düzenli olarak ters mikroskop altında incelenmiştir.



Şekil 2.7. PC3 ve LNCap hücre hatlarının invert mikroskoptaki görüntüsü.

4.2. Mikoplazma testi sonuçları

Hücre hatlarının mikoplazma testi yapılarak temiz ve sağlıklı oldukları doğrulanmıştır. Mikoplazma testi, DAPI boyaması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.8'de görüldüğü gibi, hücre hatlarının mikoplazma test sonuçları negatif çıkmıştır.



Şekil 2.8. DAPI boyaması ile elde edilmiş mikoplazma test sonuçları.

4.3. Hücre Hatlarının RNA İzolasyon Sonuçları

QIAGEN markasına ait RNeasy® Plus Mini Kit kullanılarak hücre hatlarının pasaj işleminden sonra RNA izolasyonu yapılmıştır. Kit protokolü değiştirilmeden uygulanmıştır. RNA izolasyonu sonrasında, izole edilen örneklerin miktarı ve saflığı nanodrop cihazında ölçülmüştür. Hücrelerin konsantrasyon ölçümü ve optik yoğunluk (OD) değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. RNA'ların nanodrop cihazındaki ölçüm sonuçları

Hücre Hattı	Konsantrasyon	A260/A280	A260/A230
PC3	1583,4 ng	2,09	2,28
LNCaP	2693,4 ng	2,07	2,25

4.4. Hücre hatlarından cDNA elde edilmesi

PC3 ve LNCaP hücre hatlarından elde edilen RNA'lar, QIAGEN markasına ait RT2 First Strand Kit'in protokolüne uygun olarak işlenmiştir. Ölçümler Nanodrop

kullanılarak ng/ μ L cinsinden yapılmış ve bu elde edilen değerlerler daha sonra μ L'ye dönüştürülmüştür. Ardından, izole edilen RNA'dan sırasıyla 6,31 μ L ve 3,71 μ L alınarak Thermal Cycler cihazında cDNA'ya dönüştürülmüştür.

4.5. Real-Time PCR Sonuçları

Metastatik PC3 hücre hattında ve az metastatik olan LNCaP hücre hattında, prostat kanserinde rol oynayan DNMT1 metiltransferazının gen ifade seviyelerini belirlemek için Real-Time PCR yöntemi kullanılmıştır. β Aktin primeri, çalışmada Housekeeping olarak kullanılmıştır.

Real-Time PCR için SYBR Green kiti kullanılmış, çalışılan genlere ve hücre hatlarına göre ayrı ayrı master mix hazırlanmıştır. PCR işlemleri için 96 kuyucuklu PCR Plakası kullanılmış ve örneklerin sıcaktan etkilenmemesi için işlem buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, iki farklı hücre hattında, DNMT1 geni, β Aktin geni ve cDNA bulunmayan bir negatif kontrol kullanılarak çalışılmıştır. Her bir örnek, en az 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Örneklerin analizinde, LightCycler 96 qPCR ve LightCycler® 96 Application Software programı kullanılmıştır. Analiz sonucunda her bir örnek için 3 Cp değeri hesaplanmış ve bu değerler delta-delta-Ct yöntemiyle değerlendirilmiştir. Gen ifadelerinin hesaplamalarında kullanılan formül aşağıdaki gibidir;

$$R = \frac{(E_{Hedef})^{\Delta CP_{Hedef}(Kontrol-Örnek)}}{(E_{Ref})^{\Delta CP_{Ref}(Kontrol-Örnek)}}$$

E (amplifikasyon etkinliği değeri)

Bu formül ile hasaplanan gen ifadesi oranları, log2 tabanına çevrilmiştir. Metastatik olan Pc3 hücre hattının, daha az metastatik olan LNCaP hücre hattına göre kat artışı aşağıdaki Tablo 7'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır.

Gen ifadesinin verdiği sonuçlarına göre; Metastatik olan Pc3 hücre hattının daha az metastatik olan LNCaP hücre hattına göre kat artışları DNMT1 geni için sırasıyla, 0,73, 0,91, 0,76 ve 0, 81 kat şeklinde ifade ettiği görölmüştür. Kendi aralarındaki tekrarlar da büyük bir fark görölmediği gözlemlenmiştir.

Tablo 7. PC3 Hücre hattının LNCaP hücre hattına göre kat artış sonuçları

PC3 vs LNCaP	Kat artışı
<i>DNMT1</i>	0,732042848
	0,91383145
	0,763129604
	0,812252396

Sonuç olarak, kat artışlarının aritmetik ortalaması alınarak hesaplanmış ve buna göre değerlendirme yapılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucuna göre metastatik olan Pc3 kanser hücre hattının az metastatik olan LNCaP kanser hücre hattına göre 0,80 kat daha fazla ifade edildiği bulunmuştur.

Tablo 8. Kat Artışı Ortalaması

PC3 vs LNCaP	Kat Artışı Ortalama
DNMT1	0,8053144983

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri, 2015 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerdeki tüm kanser vakalarının %26'sını (220,800) oluştuyordu. PCa, erkekler arasında kansere bağlı ölümlerin %9'unu (27,540) oluşturmasıyla bu grupta ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Siegel ve ark.,2015). Prostat kanserinin ilerlemesinde DNA metilasyonunun önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir (Smith et al., 2020).

Obezite ve sigara gibi kanser gelişiminde yaygın risk faktörlerinin, prostat kanseri (PCa) ile yalnızca zayıf bir ilişkisi vardır. Yaş, etnik köken ve aile öyküsüne ek olarak, DNA metilasyonu, PCa insidansındaki artışla ilişkilendirilen epigenetik bir olaydır (Neuget ve ark.,2004; Rodriquez ve ark.,1997). DNA metilasyonu, gen ifadesini değiştirerek hücre fonksiyonunu etkiler ve DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) tarafından sitozinin 5-karbonuna bir metil grubunun kovalent olarak eklenmesi sürecini ifade eder. Çoğu CpG adası, normal hücrelerde aktif transkripsiyona sahip genlerle ilişkili olup metillenmemiştir. Buna karşın, kanser hücrelerinde birçok CpG adası anormal hipermetilasyon gösterir ve bu da gen inaktivasyonuna yol açar (Esteller ve ark.,2001).

Yukarıda belirtilen risk faktörlerine ek olarak, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarındaki değişen metilasyon modeli nedeniyle epigenetik değişiklikler, kanserle ilişkili başka bir mekanizma olarak öne çıkmaktadır (Chinaranagari vd., 2015). Epigenetik değişiklikler arasında yaygın bir tür olan histon modifikasyonları yer alır. Histonların en yaygın modifikasyonları arasında metilasyon, asetilasyon, ubikuitinasyon ve fosforilasyon bulunur. Histon metilasyonu hem lizinlerde hem de arjininlerde meydana gelebilir ve bu değişiklikler transkripsiyonel aktivite ile ilişkilidir. H3K27, H3K9 veya H4K20'nin trimetilasyonu sıklıkla gen inaktivasyonu ile sonuçlanırken, H3K4, H3K36 veya H3K79'un trimetilasyonu gen aktivasyonu ile sonuçlanır (Rafikova vd., 2023).

Yang ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada insan DNA metiltransferazlarının (DNMT'lerin) normal dışı ifadesi, çeşitli insan kanserlerinin başlangıcı ve ilerleyişi ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Bu anormal gen ifadesi, kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılmasında önemli bir rol oynar, dolayısıyla DNMT'lerin

kanser biyolojisindeki etkilerini anlamak, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Yang ve ark.,2024).

Epigenetik değişikliklerin kalıbı veya değiştirilmiş gen transkripsiyonu/ifadesi, meme kanseri ve prostat kanseri gibi birçok kanser türünde kritik bir öneme sahiptir (Baylin ve ark.,2006). DNMT1, ilk olarak DNA metilasyonunun sürdürülmesinden sorumlu olan bir enzimdir. Jiao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada prostat kanserinde (PCa), birçok CpG bölgesinin hipermetilasyonunun gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu tanı, DNMT1 ekspresyonunun PCa ve benign prostat hiperplazisi (BPH) arasındaki farkı belirlemek için immünohistokimyasal yöntem ile yapılır. DNMT1 mRNA seviyeleri, BPH dokularındaki PCa dokularına göre daha düşüktür. Ayrıca, kötü dereceli PCa dokularında DNMT1 pozitif oranı, BPH dokularına göre anlamlı derecede yüksek ve bu farkların önemli olması önemlidir (Jiao ve ark.,2015).

DNMT1, DNA metilasyonunun bakımında başlıca rol oynar. Prostat kanserinde, birçok CpG adasında hipermetilasyon gözlenir. Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, prostat kanseri (PCa) ve benign prostat hiperplazisi (BPH) ile DNA (sitozin-5)-metiltransferaz 1 (DNMT1), glutatyon S-transferaz-P1 (GSTP1) ve adenomatozis polipozis koli (APC) genlerinin ifadesi arasındaki ilişkiyi ve GSTP1 ve APC'nin metilasyon durumunu araştırmıştır. Bu çalışmada, APC'nin ifadesi BPH ve PCa doku örneklerinde immünohistokimyasal bir yöntem kullanılarak incelenmiştir. PCa'da, BPH ile karşılaştırıldığında, APC metilasyon seviyelerinin arttığı ve ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu nedenle, metilasyonun APC'nin ifade kaybı ile ilişkili olabileceği ve PCa'nın gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Zhang ve ark.,2015).

DNMT1, replikasyon sırasında yarı metillenmiş DNA ipliğinin korunmasında rol oynar (Uysal ve ark.,2021). Prostat kanserinde (PCa), DNA metiltransferazlar sıkça etkilenen epigenetik düzenleyicilerdir ve bu, PTEN, CDKN2A veya AR gibi anahtar tümör baskılayıcı genlerin veya onkogenlerin hipermetilasyonuna ve sonrasında susturulmasına neden olur (Turnham ve ark.,2011; Nkayama ve ark.,2000).

Yapılan başka bir çalışmada, PCa hücre hatlarında yüksek düzeyde DNMT1 ifadesi tespit edilmiştir (M Szyf.,2001). Birçok kanserde ileri ve metastatik aşamalarda

yüksek DNMT1 ekspresyonu gözlenir. Ayrıca başka bir çalışma da, DNMT1'in anormal gen ifadesinin, normal durdurma sinyallerini ortadan kaldırarak kanser hücrelerinde kontrolsüz büyümeye yol açtığı gösterilmiştir (Szyf ve ark.,2001; Bigey ve ark.,2000).

Çalışmamızda DNMT1 geninin, kanser hücre hatları olan PC3 ve LNCaP'de ekspresyon seviyelerine qPCR yöntemi ile bakılmış ve sonuçlar 3 kez tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Ve metastatik PC3 hücre hattının, az metastatik LNCaP hücre hattına kıyasla DNMT1 geninin ifadesinde 0,80 kat artış olduğu saptanmıştır.

Friedman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, DNA metiltransferazlardan DNMT1 ve DNMT3B'nin prostat kanseri hücreleri olan DU145, CWR22, LNCaP ve PC-3'te oldukça bol bulunduğunu göstermiş ancak, bu DNMT'ler esas olarak RAD9 düzenlemesinde metilasyonun kritik olduğu tek hücreler olan DU145'te transkripsiyon baskılayıcıya bağlanır. DU145 hücrelerinde DNMT1 veya DNMT3B shRNA, RAD9 seviyesini ve tümörjeniteyi azaltmış ve DNMT'nin knockdown hücrelerinde RAD9'un ektopik ifadesi bu etkinliği geri kazandırmıştır. Prostat tümörlerinde, yüksek seviyelerde RAD9, DNMT1, DNMT3B ve RAD9 transkripsiyon baskılayıcısının hipermetilasyonu, normal prostat dokularında görülmeyen anlamlı bir ilişki göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, RAD9'un DNMT1 ve DNMT3B tarafından hedeflenmiş hipermetilasyon yoluyla epigenetik olarak düzenlendiği ve bunun sonucunda RAD9 aşırı üretiminin prostat tümörjenitesini teşvik ettiği yeni bir model önerilmiştir (Friedman ve ark.,2021).

Zhu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmadan, prostat kanseri DU145 hücrelerindeki RAD9 lokasyonundaki CpG bölgelerinin aşırı metilasyonunun proteinin anormal düzeylerinden sorumlu olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, RAD9'un metilasyon mekanizması hakkında çok az bilgi mevcuttur ve prostat kanseri için ne kadar yaygın olduğu belirsizdir (Zhu ve ark.,2008).

Prostat kanseri hücreleri, RAD9 üretiminde aşırı miktarda DNMT1 ve DNMT3B içerir. Lieberman ve arkadaşlarının yaptıkları araştırma zamanı daha önce, insan prostat kanseri hücreleri CWR22, DU145, LNCaP ve PC-3'ün, kanserli olmayan

prostat hücrelerine (PrEC) kıyasla yüksek RAD9 seviyelerine sahip olduğunu göstermiştir (Lieberman ve ark.,2011).

Hopkins ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, RWPE-1 ise, tümör olmayan, immortalize edilmiş prostat hücrelerinde RAD9 seviyesi orta düzeyde olmuştur. DU145 hücrelerinde, RAD9'un 2. intronundaki bir transkripsiyon baskılayıcı bölgenin hipermetile olduğunu ve bu durumun bu hücrelerde yüksek RAD9 ifadesinden sorumlu olduğunu tespit etmişlerdir (Hopkins ve ark.,2008).



6. SONUÇ, ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI

Prostat kanserinde epigenetik tedavi önemli bir rol oynamaktadır. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik değişiklikler, prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde kritik bir etkidir. Bu değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına ve onkogenlerin etkinleşmesine neden olabilir. Epigenetik tedaviler, bu anormal işaretleri hedefleyerek kanser hücrelerinin büyümesini durdurabilir veya tedavilere duyarlılıklarını artırabilir. Özellikle mevcut tedavilere dirençli hastalarda, epigenetik hedefli tedaviler umut verici sonuçlar göstermektedir (Sharma et al., 2010; Dawson & Kouzarides, 2012). Bu nedenle, epigenetik tedaviler, prostat kanserinde kişiselleştirilmiş tıbbi yaklaşımlar için büyük bir potansiyel taşımaktadır (Perry et al., 2020).

Çalışmamızda DNMT1 geninin, metastatik hücre hattı olan Pc3 ve daha az metastatik hücre hattı olan LNCaP'de gen ifade seviyelerine qPCR yöntemi ile bakılmış ve sonuçlar 3 kez tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. PCR sonuçlarının Delta-Delta-Ct hesaplaması ile PC3 hücre hattının LNCaP hücre hattına kıyasla DNMT1 geninin ifadesinde 0,80 kat artış olduğu saptanmıştır. Bu sonuç prostat kanseri ile ilgili yapılacak ilerideki çalışmalarda göz önünde bulundurulacaktır.

Bu araştırmada, odaklanılan nokta Pc3 hücre hattında DNMT1 gen ifadesidir. Bulgularımız, Pc3 hücrelerinde DNMT1 gen ifade düzeylerinin saptandığını ve bunun prostat kanserinin patogenezi üzerinde bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Öte yandan, bu çalışmanın bazı sınırlılıkları mevcuttur. Örneğin, çalışma sadece Pc3 hücre hattı ve LNCaP hücre hattı üzerinde gerçekleştirildiği için, sonuçların diğer prostat kanseri hücre hatları veya klinik örnekler üzerindeki genel geçerliliği belirsizdir. Ayrıca, DNMT1 gen ifadesinin prostat kanserinin patogenezi üzerindeki rolünü tam olarak anlamak için daha fazla mekanistik çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, bu çalışma prostat kanserinde DNMT1 gen ifadesinin önemini vurgulamaktadır. Bu bulguların klinik uygulamaları, prostat kanseri tedavisi ve hastalığın prognozu üzerine etkileri için çok daha kapsamlı, in vivo çalışmalarla da desteklenen araştırmalara ihtiyaç duyulduğu aşikardır. Bu araştırmalar, kanser hücrelerinin epigenetik değişikliklerini hedef alarak, hastalığın kökenlerine daha etkili bir şekilde müdahale etmeyi amaçlar. Bu sayede kansere daha spesifik ve kişiselleştirilmiş bir yaklaşım sunulması beklenmektedir. Dolayısıyla, epigenetik

tedavilerin prostat kanseri tedavisinde gelecekte önemli bir rol oynaması beklenmektedir.



KAYNAKÇA

Arand J, D Spieler, T Karius, M R Branco, D Meilinger, A Meissner, T Jenuwein, G Xu, H Leonhardt, V Wolfj Walter (2012). In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. PLoS Genet, 8: 6: e1002750.

American Cancer Society (ACS) – Prostate Cancer

Barau J, A Teissandier, N Zamudio, S Roy, V Nalesso, Y Herault, F Guilloud Bourc'his (2016). The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. Science, 354: 6314: 909-912.

Bestor T H (2000). The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet, 9: 16: 2395-2402.

Bestor, T. H., Xu, G. L., Bourc'his, D., Hsieh, C. L., Tommerup, N., Bugge, M., Viegas-Péquignot, E. (2011). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4366-4376. <https://doi.org/10.1038/46052>

Bolton V N, P J Oadesm H Johnson (1984). The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. JEmbryol Exp Morphol, 79: 139-163.

Bourc'his D, G L Xu, C S Lin, B Bollmant H Bestor (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. Science, 294: 5551: 2536-2539.

Braude P, V Boltions Moore (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. Nature, 332: 6163: 459-461.

Baylin SB and Ohm JE: Epigenetic gene silencing in cancer-a mechanism for early oncogenic pathway addiction? Nat Rev Cancer 6: 107-116, 2006.

Bigey P, Ramchandani S, Theberge J, Araujo FD, Szyf M. Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase (dnmt1) gene. Gene. 2000; 242: 407–418.

Cardoso M Ch Leonhardt (1999). DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. J Cell Biol, 147: 1: 25-32.

Chuang L S, H I Ian, T W Koh, H H Ng, G Xub F Li (1997). Human DNA- (cytosine- 5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*, 277: 5334: 1996-2000.

Chinaranagari, S., Sharma, P., Bowen, N. J., & Chaudhary, J. (2015). Prostate Cancer Epigenome. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1238, 125. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_7

Davies T Jr L Gardner (2002). The plane of first cleavage is not related to the distribution of sperm components in the mouse. *Hum Reprod*, 17: 9: 2368-2379.

Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12-27. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.013

Easwaran H P, L Schermelleh, H Leonhardt C Cardoso (2004). Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO Rep*, 5: 12: 1181-1186.

Ehrlich M (2003). Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *JCell Biochem*, 88: 5: 899-910.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB and Herman JG: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61: 3225-3229, 2001.

Feinberg A P (2000). DNA methylation, genomic imprinting and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*, 249: 87-99.

Feinberg A P, H Cuir Ohlsson (2002). DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol*, 12: 5: 389-398.

Fleming T P (1987). A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol*, 119: 2: 520-531.

Fleming T Ps J Pickering (1985). Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *J Embryol Exp Morphol*, 89: 175-208.

Geiman T M, U T Sankpal, A K Robertson, Y Chen, M Mazumdar J T Heale, J A Schmiesing, W Kim, K Yokomori, Y Zhaok D Robertson (2004). Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery. *Nucleic Acids Res*, 32: 9: 2716-2729.

Goll M G, F Kirpekar K A Maggert, J A Yoder, C L Hsieh, X Zhang, K G Golic, S E Jacobsent H Bestor (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311: 5759: 395-398.

Gowher H, K Liebert, A Hermann, G Xua Jeltsch (2005). Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *JBiol Chem*, 280: 14: 13341-13348.

Grayson D Ra Guidotti (2013). The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*, 38: 1: 138-166.

Hanna C W, H Demondg Kelsey (2018). Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Hum Reprod Update*, 24: 5: 556-576.

Hermann A, R Goyala Jeltsch (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *JBiol Chem*, 279: 46: 48350-48359.

Johnson M Hc A Ziomek (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*, 24: 1: 71-80.

Johns Hopkins Medicine – Prostate Cancer

Ko Y G, K Nishino, N Hattori, Y Arai, S Tanakak Shiota (2005). Stage-by- stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *JBiol Chem*, 280: 10: 9627-9634.

Kumar S, X Cheng, S Klimasauskas, S Mi, J Posfai, R J Robertsg G Wilson (1994). The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, 22: 1: 1-10.

Kurihara Y, Y Kawamura, Y Uchijima, T Amamo, H Kobayashi, T Asanoh Kurihara (2008). Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Dev Biol*, 313: 1: 335-346.

Kurreck J (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur JBiochem*, 270: 8: 1628-1644.

Lieberman, H.B. et al. (2011) The role of RAD9 in tumorigenesis. *J. Mol. Cell Biol.*, 3, 39–43.

Marikawa Yv B Alarcon (2009). Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol ReprodDev*, 76: 11: 1019-1032.

Marikawa Yv B Alarcon (2012). Creation of trophectoderm, the first epithelium, in mouse preimplantation development. *Results Probl Cell Differ*, 55: 165-184.

Miniou P, M Jeanpierre, D Bourc'his, A C Coutinho Barbosa, V Blanquette Viegas-Pequignot (1997). alpha-satellite DNA methylation in normal individuals and in ICF patients: heterogeneous methylation of constitutive heterochromatin in adult and fetal tissues. *Hum Genet*, 99: 6: 738-745.

Morgan H D, F Santos, K Green, W Deanw Reik (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No 1: R47-58.

National Cancer Institute (NCI) – Prostate Cancer

Nakayama, T.; Watanabe, M.; Suzuki, H.; Toyota, M.; Sekita, N.; Hirokawa, Y.; Mizokami, A.; Ito, H.; Yatani, R.; Shiraishi, T. Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. *Lab. Investig.* 2000, 80, 1789–1796.

Rodriguez C, Calle EE, Miracle-McMahill HL, Tatham LM, Wingo PA, Thun MJ and Heath CW Jr: Family history and risk of fatal prostate cancer. *Epidemiology* 8: 653-657, 1997.

Rafikova, G., Gilyazova, I., Enikeeva, K., Pavlov, V., & Kzhyshkowska, J. (2023). Prostate Cancer: Genetics, Epigenetics and the Need for Immunological Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16).

OKANO M, D W BELL, D A HABERE LI (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99: 3: 247-257.

Okano M, S Xie Li (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, 19: 3: 219-220.

Ostler K R, E M Davis, S L Payne, B B Gosalia, J Exposito-Cespedes, M M Le Beaul A Godley (2007). Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins. *Oncogene*, 26: 38: 5553-5563.

Plusa B, K Piotrowskam Zernicka-Goetz (2002). Sperm entry position provides a surface marker for the first cleavage plane of the mouse zygote. *Genesis*, 32: 3: 193-198.

Posfai J, A S Bhagwat, G Posfai J Roberts (1989). Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, 17: 7: 2421-2435.

Pradhan S, A Bacolla, R D Wellsr J Roberts (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *JBiol Chem*, 274: 46: 33002-33010.

Perry, A. S., Watson, R. W., Lawler, M., & Hollywood, D. (2020). The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 17(4), 292-306. DOI: 10.1038/s41585-020-0292-8

Ratnam S, C Mertineit, F Ding, C Y Howell, H J Clarke, T H Bestor, J R Chailletj M Trasler (2002). Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol*, 245: 2: 304-314.

Robertson K D, S Ait-Si-Ali, T Yokochi, P A Wade, P L Jonesa P Wolffe (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, 25: 3: 338-342.

Rountree M R, K E Bachmans B Baylin (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, 25: 3: 269-277.

Saitou M, S Kagiwadak Kurimoto (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, 139: 1: 15-31.

Shirane K, H Toh, H Kobayashi, F Miura, H Chiba, T Ito, T Konoh Sasaki (2013). Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet*, 9: 4: e1003439.

Sozen B, A Cann Demir (2014). Cell fate regulation during preimplantation development: a view of adhesion-linked molecular interactions. *Dev Biol*, 395: 1: 73-83.

Suwinska A, R Czolowska, W Ozdzenskia K Tarkowski (2008). Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol*, 322: 1: 133-144.

Szyf M, Detich N. Regulation of the DNA methylation mechanism and its role in cellular transformation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001; 69: 47–79.

Szyf M. The role of DNA methyltransferase 1 in growth control. *Front Biosci*. 2001; 6: D599–D609.

Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36. DOI: 10.1093/carcin/bgp220

Trasler J M, A A Alcivar L E Hake, T Bestorn B Hecht (1992). DNA methyltransferase is developmentally expressed in replicating and non-replicating male germ cells. *Nucleic Acids Res*, 20: 10: 2541-2545.

Turek-Plewa Jp P Jagodzinski (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett*, 10: 4: 631 - 647.

Turnham, D.J.; Bullock, N.; Dass, M.S.; Staffurth, J.N.; Pearson, H.B. The PTEN Conundrum: How to Target PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cells* 2020, 9, 2342.

Uysal F, G Akkoyunlus Ozturk (2015). DNA methyltransferases exhibit dynamic expression during spermatogenesis. *ReprodBiomed Online*, 33: 6: 690-702.

Uysal F, G Akkoyunlus Ozturk (2015). Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie*, 116: 103-113.

Uysal, F.; Cinar, O.; Can, A. Knockdown of Dnmt1 and Dnmt3a gene expression disrupts preimplantation embryo development through global DNA methylation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2021, 38, 3135–3144.

Vassena R, S Boue, E Gonzalez-Roca, B Aran, H Auer A Veigaj C Izpisua Belmonte (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*, 138: 17: 3699-3709.

Vlachogiannis G, C E Niederhuth, S Tuna, A Stathopoulou, K Viiri, D G De Rooij, R G Jenner, R J Schmitz K T Ooi (2015). The Dnmt3L ADD Domain Controls Cytosine Methylation Establishment during Spermatogenesis. *Cell Rep*, 11: 6: 990.

Watanabe D, I Suetake, T Tadas Tajima (2002). Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev*, 118: 1-2: 187-190.

Yoder J A, N S Soman, G L Verdinet H Bestor (1997). DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol*, 270: 3: 385-395.

Zhu, A., Zhou, H., Leloup, C., Marino, S., & Aylon, Y. (2008). Rad9 has a functional role in human prostate carcinogenesis. *Cancer Research*, 68(4), 1267–1274.

Şekil Kaynakları:

Şekil 2.1 – 2.2

Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. Nat Clin Pract Oncol 2005 2:4-11.

Şekil 2.3

Turek-Plewa J, Jagodziński PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. Cell Mol Biol Lett 2005; 10: 631-47.

Şekil 2.4

Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. Cell Mol Life Sci 2004; 61: 2571- 87.

Şekil 2.5 – 2.6

Qin W, Leonhardt H, Pichler G. Regulation of DNA methyltransferase 1 by interactions and modifications. Nucleus 2011; 2: 392-402.

EK-1: İNTİHAL RAPORU

Nargiz İbrahimova _DNA Metiltransferaz 1 Gen İfade
Düzeyinin Pc3 Metastatik Prostat Kanseri Hücre Soyunda
Belirlenmesi.doc

ORJİNALLİK RAPORU

% 18	% 17	% 5	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 11
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 2
3	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	lisansustu.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Avci, Hediye. "Benzofuran Kalkon Turevi Kimyasalların İnsan Akciger Kanseri Hucreleri uzerindeki Sitotoksik Etkikerinin Arastirilmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2021 Yayın	<% 1
7	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<% 1

8	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	<% 1
10	Eryilmaz, Isil Ezgi. "Farklı Direnç Fenotiplerine Sahip Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Apigenin ve Fenetil İzotiyosiyanat (PEITC) Kombinasyonu ile Oluşturulan Prooksidan Kanser Terapi Modeli Etkinliğinin ve Moleküler Hedeflerinin Araştırılması", Bursa Uludağ University (Turkey), 2022 Yayın	<% 1
11	journals.viamedica.pl İnternet Kaynağı	<% 1
12	Submitted to Bilkent University Öğrenci Ödevi	<% 1
13	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
14	Submitted to Pontificia Universidad Católica del Perú Öğrenci Ödevi	<% 1
15	blogs.otago.ac.nz İnternet Kaynağı	<% 1
16	saglikbilimleri.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

17	vimfay.com İnternet Kaynağı	<% 1
18	nolurbak.com İnternet Kaynağı	<% 1
19	salihlican.com İnternet Kaynağı	<% 1
20	Guven, Merve. "Endemik Verbascum Bombyciferum Boiss. Turunun Genetik cesitliliginin Issr yontemi İle Belirlenmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2021 Yayın	<% 1
21	kongre.akademikiletisim.com İnternet Kaynağı	<% 1
22	Cinar, Ilknur. "Rheum Ribes L. Bitki Ekstrelerinin Kolorektal Kanser Hucre Hatlarinda Antikanserojenik Etkisinin Arastirilmesi", Necmettin Erbakan University (Turkey), 2021 Yayın	<% 1
23	Yalçın, Pelin. "İmatinib-Dirençli Lösemik Hücrelerin Atimik Farelerde in Vivo İzlenmesi, Histopatolojik Analizi ve Lösemik Kök Hücre Belirteçleri Açısından Değerlendirilmesi", Dokuz Eylul Universitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
24	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	

		<% 1
25	papyrus.bib.umontreal.ca İnternet Kaynağı	<% 1
26	www.hurriyet.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
27	Öz, Özlem. "Alzheimer Hastalarında Genomik Değişimlerin Prognosa Etkilerinin Araştırılması", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
28	Düzen, Zehra Nur. "Juglon ve Fluorouracil Kombinasyonlarının LNCaP ve PC-3 Prostat Kanseri Hücreleri Üzerindeki in Vitro Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması", Bursa Uludag University (Turkey), 2022 Yayın	<% 1
29	Karakas, Didem. "Pankreas Kanseri ve Tumor Mikrocevresinin okaryotik Elongasyon Faktörü 2 Kinaz (Ef2k) Enzim İnhibisyonu Aracılığıyla Hedeflenmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2022 Yayın	<% 1
30	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
31	depot-e.uqtr.ca İnternet Kaynağı	<% 1

32	es.scribd.com İnternet Kaynağı	<% 1
33	jag.journalagent.com İnternet Kaynağı	<% 1
34	pdffox.com İnternet Kaynağı	<% 1
35	turkjem.org İnternet Kaynağı	<% 1
36	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<% 1
37	Uslu, Okan. "Prostat Kanserinin Tanisi İcin Sarkozin Hafizali Nanopartikullerin Kullanimi", Anadolu University (Turkey) Yayın	<% 1
38	"Poster Sessions", FEBS Journal, 2014. Yayın	<% 1
39	Aydinlik, seyma. "Palladyum (II) Bilesigi Ve Canertinibin Kolon Kanser Hucrelerinde Sitotoksisite, Anjiyogenez, Ilac Direncliligi Ve Otofaji Mekanizmalari ulerine Etkileri", Bursa Uludag University (Turkey), 2021 Yayın	<% 1
40	DNA Methylation and Cancer Therapy, 2005. Yayın	<% 1

- | | | |
|----|--|------|
| 41 | Erkisa, Merve. "Yeni Sentez Edilen Palladyum (II) Bilesiginin Otofaji Inhibitorleri Ile Kombinasyonunun Prostat Kanser Hucreleri izerindeki Sitotoksik Etkisinin Arastirilmesi", Bursa Uludag University
Yayın | <% 1 |
| 42 | Methods in Molecular Biology, 2015.
Yayın | <% 1 |
| 43 | Mokhberioskouei, Ziba. "Hyaluronik Asit Ile Modifiye Edilmiş Kurkuminin Anti-kanser Etkilerinin Aydınlatılması", Marmara Universitesi (Turkey), 2023
Yayın | <% 1 |
| 44 | Oral, Neylan. "Bakir (Ii) Metal-karşik Ligand Kompleksinin [Cu (5-Nitro-1-10-Fenantrolin) (L-Asparajin)] ClO4)n Sitotoksik ve Dna Hasar Etkilerinin Cesitli Hucre Hatlarında in Vitro Belirlenmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2022
Yayın | <% 1 |
| 45 | Tuna, Gamze. "Farklı Dejeneratif Demans Hastalarında Oksidatif Hasar: Alzheimer Hastalığında Oksidatif Makromolekül Hasarının ve Onarımının İncelenmesi", Dokuz Eylul Universitesi (Turkey), 2024
Yayın | <% 1 |