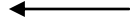


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FUMONİSİN B1'İN TOKSİSİTESİNDE EPİGENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

GÖKSUN DEMİREL

**DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. SİBEL ÖZDEN**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

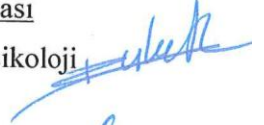
TEZ ONAYI

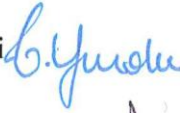
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Göksun Demirel tarafından hazırlanan Fumonisin B1'in Toksisitesinde Epigenetik Değişikliklerin Rolünün Araştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

06 / 06 / 2012

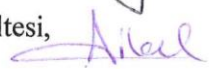
Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Prof. Dr. Buket Alpertunga (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı) 

2.Prof. Dr. Turkan Yurdun (Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı) 

3. Doç. Dr. Gül Özhan (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı) 

4.Yard. Doç. Dr. Sibel Özden - Danışman (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı) 

5.Yard. Doç. Dr. Gökçe Topal Tanyılmaz (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı) 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla 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.

Göksun Demirel

İTHAF

Sevgili Annem ve Babama ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde büyük emeği geçen, her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yard. Doç. Dr. Sibel Özden'e; bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya;

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca desteklerini gördüğüm, en başta bilgilerini esirgemeyen Doç. Dr. Gül Özhan olmak üzere; değerli arkadaşlarım Uzm. Ecz. Esra Ünal, Yard. Doç. Dr. Betül Çatalgöl ve Uzm. Ecz. Anıl Candaş'a; tezimin yazım aşamasında yardımını esirgemeyen arkadaşım Zeynep Güven'e; Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı çalışanlarından Bengül Çalık, Fatih Mehmet Sarı ve Ramazan Uğurlu'ya;

Bu tez çalışmasında hücre kültürü uygulamalarını bana titizlikle öğreten ve yardımlarını esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ayhan Bilir'e ve öğrencilerine;

Önce insan olmayı öğreten ve yirmi yıl boyunca eğitimime maddi manevi hiç bir desteği esirgemeyen benim ilk öğretmenlerim olan saygı değer annem Melahat Karakuş ve babam Cemal Karakuş'a; örnek aldığım tek insan olan sevgili ablam Gökçe Karakuş Kılıç'a; tez çalışmam boyunca büyük sevgisinin desteğiyle daima yanımda olan çok değerli eşim Raif Demirel'e; hayatımızda kısa bir sürede olsa bulunan tezimin yazım aşamasında kaybettiğim sevgili kardeşim Baran Demirel'e;

teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tez çalışmam sırasında 109S187 No'lu TÜBİTAK projesi kapsamında bursiyer olarak desteklenmiş olduğumdan dolayı TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 11059.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epigenetik	3
2.2. DNA Metilasyonu	3
2.2.1. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesinin Düzenlenmesi.....	6
2.2.2. DNA Metilasyonu ve Kanser	7
2.2.3. Tez Çalışmasında Araştırılan Genler	10
2.2.4. DNA Metilasyonu ve Kimyasal Karsinogenez.....	12
2.2.5. DNA Metilasyonunun Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler	14
2.3. Mikotoksinler.....	16
2.4. Fumonisinler	17
2.5. Fumonisin B1'in Toksikokinetiği	18
2.6. FB1'in Toksisite Mekanizması ve Toksik Etkileri	19
2.7. Fumonisinler ile İlgili Yasal Düzenlemeler	22
2.8. Hücre Kültürü	24
2.8.1. Primer Hücre Kültürleri	25
2.8.2. Sekonder Hücre Kültürleri	26
2.8.3. Devamlı Hücre Kültürleri	26
2.8.4. Hücre Kültürlerinin Avantajları	26
2.8.5. Hücre Kültürlerinin Dezavantajları.....	27

2.9. Sitotoksosite Testleri.....	27
2.9.1. Laktat Dehidrojenaz Tayini (LDH Testi).....	28
2.9.2. MTT Testi	28
2.9.3. XTT Testi	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	30
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	31
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	33
3.4. Hücre Kültürü	34
3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği	34
3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini	35
3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	35
3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması	36
3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)	36
3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	37
3.4.7. Hücrelerin Sayılması.....	37
3.4.8. Hücre Dizisinin Üreme Zamanının Hesaplanması.....	38
3.5. Sitotoksiste Testleri.....	39
3.5.1. LDH ve XTT Testi	39
3.5.1.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanışı	40
3.5.1.2. Negatif Kontrol ve Total LDH Kontrolünün Hazırlanışı	41
3.5.1.3. Sitotoksosite Testleri için FB1 Çözeltilerinin Hazırlanışı	41
3.5.1.4. Sitotoksosite Tayini için FB1'in Hücre Dizilerine Maruziyeti	41
3.5.1.5. LDH Test Protokolü	42
3.5.1.6. XTT Test Protokolü	44
3.5.1.7. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	45
3.6. DNA Metilasyonunun Analizi	46
3.6.1. FB1'in Hücre Dizilerine Maruziyeti	46
3.6.2. DNA İzolasyonu	47
3.6.3. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	48
3.6.4. Global DNA Metilasyonunun Tayini.....	48
3.6.4.1. Kullanılan Çözeltiler	48
3.6.4.2. DNA Hidrolizi.....	50

3.6.4.3. HPLC Metodu	50
3.6.4.4. HPLC Yönteminin Doğrusallığı	51
3.6.4.5. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	52
3.6.5. Gene-özü DNA Metilasyonunun Araştırılması.....	52
3.6.5.1. Bisülfid DNA Modifikasyonu.....	52
3.6.5.2. Metilasyona-özü PCR (MSP).....	54
3.6.5.3. <i>İn Vitro</i> DNA Metilasyonu.....	55
3.6.5.4. <i>İn vitro</i> Metillenmiş DNA'nın Saflaştırılması	55
3.6.5.5. Primer Çiftleri	56
3.6.5.6. PCR Uygulaması.....	57
3.6.5.7. Agaroz Jel Elektroforezi	58
3.6.5.8. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	59
4. BULGULAR.....	60
4.1. Hücre Çoğalma Verileri.....	60
4.2. FB1'in NRK-52E ve Clone9 Hücrelerinde Sitotoksosite Üzerine Etkileri	60
4.3. NRK-52E ve Clone 9 Hücrelerinden İzole Edilen DNA'ların Agaroz Jel Görüntüleri ve Miktarları.....	62
4.4. Global DNA Metilasyonu Sonuçları.....	63
4.5. Gene-özü Metilasyon Tayini Sonuçları	66
5. TARTIŞMA	75
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	99

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kanserde promotor bölge CpG adalarında hipermetilasyona uğrayan önemli genler (Das and Singal, 2004).....	11
Tablo 2-2: Gıdalardaki fumonisin düzeyleri ile ilgili yasal düzenlemeler	23
Tablo 2-3: Türk Gıda Kodeksi tarafından gıdalarda belirlenen maksimum fumonisin limitleri	23
Tablo 3-1: Deoksiribonükleozidlerin analizi için optimum kromatografik çalışma koşulları	51
Tablo 3-2. MSP için kullanılacak primer çiftleri	57
Tablo 4-1: NRK-52E Hücrelerine FB1 uygulanan bütün gruplara ait <i>e-cadherin</i> , <i>p16</i> , <i>VHL</i> , <i>c-myc</i> ve <i>p15</i> genlerinin MSP sonuçları.....	72
Tablo 4-2: Clone 9 Hücrelerine FB1 uygulanan bütün gruplara ait <i>e-cadherin</i> , <i>p16</i> , <i>VHL</i> , <i>c-myc</i> ve <i>p15</i> genlerinin MSP sonuçları.....	73

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Başlıca epigenetik mekanizmalar (Sawan ve ark., 2008).	4
Şekil 2-2: Memeli genomunda sitozinin metilasyonu (Herman ve Baylin, 2003).	4
Şekil 2-3: Tümör oluşumunda DNA metilasyonu değişimleri (Esteller, 2007).	7
Şekil 2-4: Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi (Esteller ve Herman, 2002).	8
Şekil 2-5: Kanserli hücrelerde gelişen DNA metilasyonu (Gonzalgo ve Jones 1997).	9
Şekil 2-7: <i>Fusarium</i> cinsi mikotoksin ile kontamine olmuş mısır.	18
Şekil 2-8: Sfingozin ve sfinganinin kimyasal yapıları.	19
Şekil 2-9: Fumonisinlerin toksik etki mekanizması (Soriano ve ark., 2005).	20
Şekil 3-1: a) Hemasitometre lamı. b) Hemasitometre lamında hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri.	38
Şekil 3-2: 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimi.	41
Şekil 3-3: 96 Kuyucuklu mikropalakaya FB1 maruziyetinin şematik gösterilmesi.	42
Şekil 3-4: LDH test protokolü.	43
Şekil 3-5: XTT test protokolü.	45
Şekil 3-6: Sitozinin bilsüfit ile deaminasyonu reaksiyonu.	52
Şekil 3-7: Kit ile bisüfit DNA modifikasyonunun şematik gösterimi.	53
Şekil 3-8: Bisüfite modifikasyonu ve PCR amplifikasyonunun metillenmiş ve metillenmemiş dizide şematik olarak gösterilmesi (Zilberman and Henikoff, 2007). ...	55
Şekil 4-2: NRK-52E ve Clone 9 Hücrelerinde 1-50 μ M konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrası LDH testi sonuçları.	61
Şekil 4-3: NRK-52E ve Clone 9 Hücrelerinde 1-50 μ M konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrası XTT testi sonuçları.	61
Şekil 4-4: 1-50 μ M Konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden izole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü.	63
Şekil 4-6: 5-mdC Standardına ait kalibrasyon eğrisi.	64
Şekil 4-7: dC Standardına ait kalibrasyon eğrisi.	64
Şekil 4-8: dC, dG, dT ve dA için 1 μ M; 5-mdC için ise 0,04 μ M konsantrasyonda hazırlanan deoksinükleozid standartlarına ait kromatogram.	65
Şekil 4-9: NRK-52E hücrelerine ait hidrolize DNA'nın kromatogramı.	65

Şekil 4-10: FB1 Uygulanan NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde % metilasyon seviyeleri.	66
Şekil 4-11 : <i>e-cadherin</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	67
Şekil 4-12: <i>e-cadherin</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	67
Şekil 4-13: <i>p16</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	68
Şekil 4-14: <i>p16</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	68
Şekil 4-15: <i>VHL</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	69
Şekil 4-16: <i>VHL</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	69
Şekil 4-17: <i>c-myc</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	70
Şekil 4-18 : <i>c-myc</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	70
Şekil 4-19: <i>p15</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52 E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	71
Şekil 4-20: <i>p15</i> Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.	71

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
Clone 9	Sıçan karaciğer epitel hücresi
CMF-PBS	Kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi
CO ₂	Karbondioksit
CpG	Sitozin fosfat guanin
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metil transferaz
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
FB1	Fumonisin B1
FBS	Fetal sığır serumu
GC	Guanin sitozin
HDAC	Histondeasetilaz
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC ₅₀	%50 inhibisyon sağlayan konsantrasyon
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
ISO	Uluslararası Kalite Değerlendirme Sistemi
JEFCA	Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Uzman Komitesi (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
kg	Kilogram
LD ₅₀	Medyan letal doz
LDH	Laktat dehidrojenaz
M	Molar
MBD	Metil bağlayıcı protein
MSP	Metilasyona-özü polimeraz zincir reaksiyonu
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre

mm	Milimetre
mM	Milimolar
miRNA	MikroRNA
NRK-52E	Sıçan böbrek epitel hücresi
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NOAEL	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen değer (No observed adverse effect level)
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMTDI	Kesin olmayan maksimum tolare edilebilir günlük değer (Provisional maximum tolerable daily intake)
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki dönüş
SA	Sfinganin
SO	Sfingozin
SAM	S-adenozil metiyonin
SAH	S-adenozil homosistein
SCF:	Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi (Scientific Committee on Food)
TEMED	Tetra etil metilen diamin
TBE	Tris-borik asit-etilen diamin tetra asetik asit
TDI	Tolare edilebilir günlük değeri (Tolerable daily intake)
UV-DAD	Ultraviyole-diode array detektör
XTT	2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid
WHO	Dünya sağlık örgütü (World Health Organization)
ZnCl ₂	Çinko klorür
5-mdC	5-metil-2-deoksisitidin
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre

ÖZET

Demirel, G. (2012). Fumonisin B1'in toksisitesinde epigenetik değişikliklerin rolünün araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Fumonisin B1 (FB1), *Fusarium* türü küfler tarafından üretilen ve dünyada mısırın kontaminasyonunda en yaygın olarak rol aldığı bilinen bir mikotoksindir. FB1, hücre membranının önemli bileşenlerinden olan sfingolipidlere benzerliğinden dolayı, sfingolipidlerin biyosentezini inhibe ederek toksik etkilerini gösterir ve bu da birçok hücresel sistemi etkileyen ve sitotoksik olan sfinganinin birikmesine sebep olur. Bununla birlikte, FB1'in sitotoksik ve genotoksik etki mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bundan hareketle, FB1'in karsinojenik etkisinde non-genotoksik (epigenetik) mekanizmaların rol alabileceği düşünülmektedir. DNA metilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin anlatımını değiştiren epigenetik karsinogenezde rol oynayan önemli bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır. Tez çalışmasında, epigenetik bir karsinojen olarak FB1'in doza bağlı toksisitesinde, DNA metilasyonunun rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, FB1'in sıçan karaciğer (Clone 9) ve böbrek (NRK-52E) epitel hücrelerinde global DNA metilasyonu üzerine etkileri ultraviyole-diode array (UV-DAD) detektör donanımlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve anahtar tümör baskılayıcı genlerin (*e-cadherin*, *p16*, *VHL*, *c-myc*, *p15*) promotor bölgelerindeki CpG adası DNA metilasyonu üzerine etkileri metilasyona-ölgü PCR (MSP) teknikleri kullanılarak araştırılmıştır. FB1'in, her iki hücre dizisinde de kontrol grupları ile kıyaslandığında global DNA metilasyonunda anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı gösterildi. FB1, Clone 9 hücrelerinde *c-myc* geninde metilasyonda değişikliğe sebep olurken, NRK-52E hücrelerinde ise metilasyonda değişikliğe sebep olmamıştır. FB1, her iki hücre dizisinde *VHL* geninde kısmi metilasyona sebep olurken; *e-cadherin*, *p16* ve *p15* genlerinde ise metilasyona sebep olmamıştır. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile FB1 toksisitesinde DNA metilasyonundaki değişikliklerin rolünün olabileceği ileri sürülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fumonisin B1, DNA metilasyonu, Sitotoksosite, Clone 9 hücreleri, NRK-52E hücreleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 11059

ABSTRACT

Demirel, G. (2012). The role of epigenetic alterations in Fumonisin B1-induced toxicity. İstanbul University, Institute of Health Science, Programme of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. İstanbul.

Fumonisin B1 (FB1) is a mycotoxin produced by the fungus *Fusarium verticillioides*, which commonly infects corn and other agricultural products. Due to structural similarities with sphingolipid, FB1 exerts its toxic effects by disruption of sphingolipid biosynthesis, accumulation of sphinganine which can be highly cytotoxic and affects a wide variety of cellular system. However, the mechanisms underlying FB1 cytotoxicity and genotoxicity were still unclear. Therefore, non-genotoxic (epigenetic) alterations may play an important role in the mechanism of FB1 carcinogenicity. There is increasing evidence to suggest that altered expression of tumor suppressor genes and oncogenes, which is regulated in part at the level of DNA methylation, is important event involved in epigenetic carcinogenesis. The aim of the proposed study is to investigate the dose-related effects of FB1 as an epigenetic carcinogen on DNA methylation. Therefore, we investigated the effects of FB1 on global DNA methylation by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet-diode array detection (UV-DAD) and promoter CpG island methylation of key tumor suppressor genes (*e-cadherin*, *p16*, *VHL*, *c-myc*, *p15*) by methylation-specific PCR (MSP) techniques in rat liver epithelium (Clone 9) and kidney epithelium (NRK-52E) cells. No significant dose-related effects on global DNA methylation were observed in both of cell lines compared to controls. For the investigated genes *c-myc* was found to be partially methylated in Clone 9 cells while not to be methylated in NRK-52E cells treated with FB1. *VHL* was found to be partially methylated in both of cells treated with FB1. No methylation changes of *e-cadherin*, *p16* and *p15* genes were seen in response to treatment with FB1 in both of cells. This study suggest that DNA methylation as an epigenetic mechanism may play an important role in the mechanism of FB1 toxicity.

Key Words: Fumonisin B1, DNA methylation, Cytotoxicity, Clone 9 cells, NRK-52E cells

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 11059

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kimyasal karsinojenler günümüzde etki mekanizmalarına göre genotoksik ve non-genotoksik (epigenetik) karsinojenler olarak iki grupta incelenmektedir. Genotoksik karsinojenler, DNA dizisinde değişikliğe sebep olurken, epigenetik karsinojenler DNA dizisini değiştirmeden gen ifadesini değiştirerek toksik etkilerini göstermektedirler. Genotoksik karsinojenez hızlı standart toksisite testleri (Ames testi, kardeş kromatin değişim testi ve mikronükleus testleri) ile tayin edilirken non-genotoksik karsinojenezin tanınması ancak 2 yıllık karsinojenezite testleri ile mümkün olabilmektedir. Bu yüzden, non-genotoksik karsinojenezin belirlenebilmesinde daha ucuz, daha çabuk ve az sayıda hayvanın kullanıldığı yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda, genlerin anlatımlarının düzenlenmesinde rolü olan DNA metilasyonundaki değişikliklerin tayininin non-genotoksik karsinojenlerin indüklediği tümörlerin erken belirlenmesinde kullanılabilecek, potansiyeli en yüksek biyogöstergelerden biri olabileceği yönündeki çalışmalar ön plana çıkmaktadır (Pogribny ve ark., 2008, Jiang ve ark., 2008; Koturbash ve ark., 2011). DNA hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonunun baskılanmasında önemli rol oynarken, DNA hipometilasyonu onkogenlerin anlatımının artmasına sebep olur. Her iki durumun da tümör gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Fumonisinler, *Fusarium* cinsi küfler tarafından sentezlenirler (Gelderblom ve ark., 1991). *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) türü, dünyada mısırın kontaminasyonunda rol oynayan en yaygın küftür. Fumonisinler, 1988 yılında *Fusarium* kültürlerinden ilk kez izole edilmiş olup, kimyasal yapıları aydınlatılmıştır (Bezuidenhout ve ark., 1988). Fumonisinler arasında doğada en sık Fumonisin B1'e (FB1) rastlanmakta olup, çalışmalar Fumonisin B1 üzerine odaklanmıştır (Smith ve ark., 1996). Fumonisin B1 ve Fumonisin B2'nin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu mısır yetişen bölgelerde, özofagus kanserinin görülme sıklığının yüksek olduğu gösterilmiştir (Sydenham ve ark., 1990; Chu ve ark., 1994). Fumonisin içeren mısır ve bu mısırdan yapılan yemlerle beslenen atlarda beyin zarı iltihabı (equine leucoencephalomalacia, ELEM) (Marasas ve ark., 1988), domuzlarda akciğer ödemi (PPE) (Haschek ve ark., 2001), farelerde böbrek hastalıkları ve erkek sıçanlarda sıçanın türüne göre karaciğer ve böbrek kanseri (Stockmann ve ark., 2008) ortaya çıktığı gösterilmiştir. FB1 yapısal olarak sfingozine benzemesinden dolayı, sfingolipidlerin

biyosentezini inhibe ederek toksik etkilerini gösterir. Hücre membranının önemli bileşenlerinden olan sfingolipidlerin yapısının bozulması hücre büyümesi, morfolojisi, farklılaşması ve davranışında önemli değişikliklere yol açabilir. Uluslararası Kansere Araştırma Merkezi (IARC), hayvan deneyleri ve insanlarda özofagus kanserine sebep olmasına dayanarak FB1'i 'insanlar için muhtemel karsinojen (Grup 2B)' grubunda sınıflandırmıştır (IARC, 1993). FB1'in sitotoksik ve genotoksik etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olup, FB1'in çeşitli türlerdeki farklı hastalıkların etiyopatogenezesinden sorumlu non-genotoksik özellikte karsinojenlerden olabileceği öne sürülmektedir (Smith ve ark., 1996). Epigenetik mekanizmaların FB1'in karsinojenik etkisindeki rolü hakkında kaynaklarda yeterli bilgiye rastlanmamaktadır. Bundan hareketle, FB1'in karsinojenik etki mekanizmasında epigenetik değişikliklerin rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışmasında bu amaçla; global DNA metilasyonu ve anahtar tümör baskılayıcı genlerin (*e-cadherin*, *p16*, *VHL*, *c-myc*, *p15*) promotor bölgelerindeki CpG adası DNA metilasyonu araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

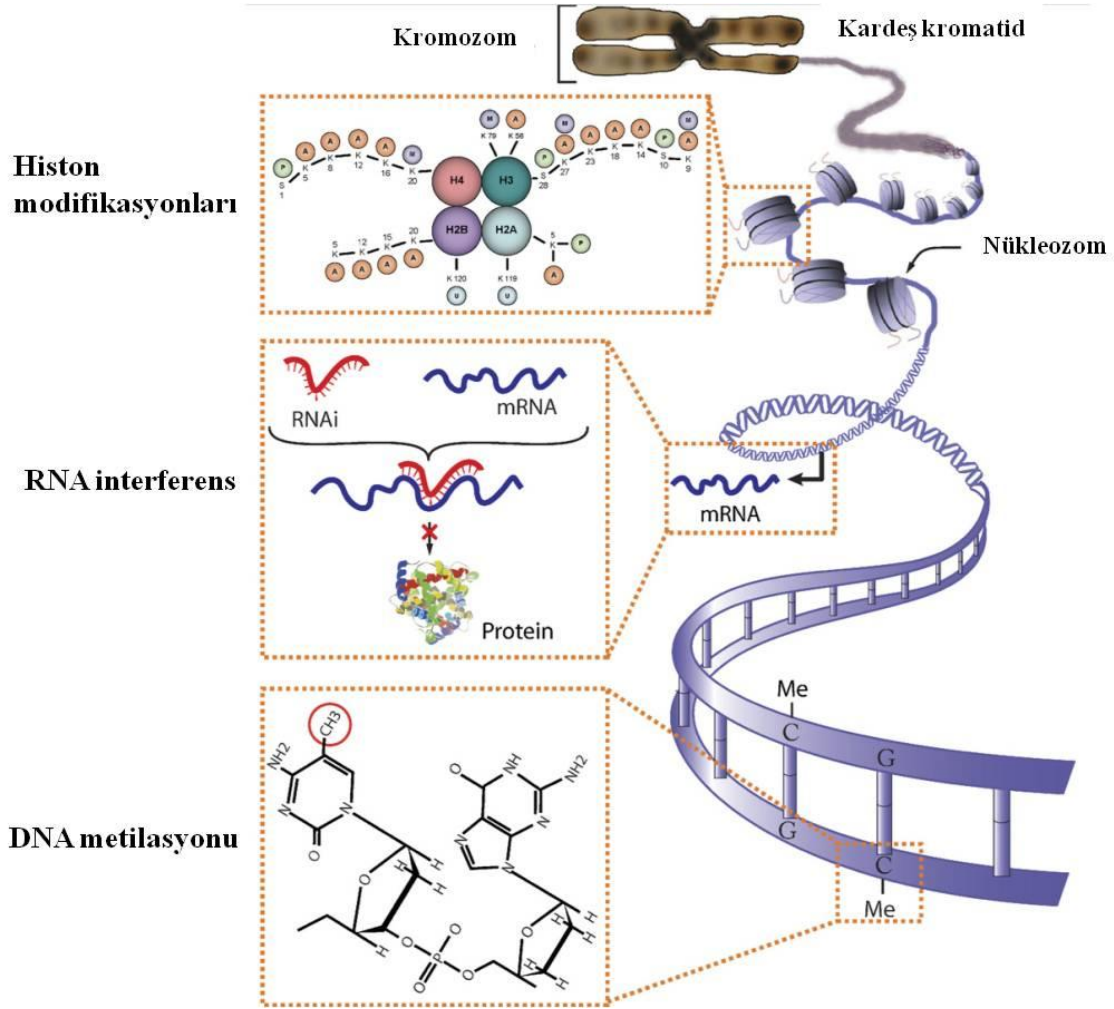
2.1. Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisinde bir değişiklik olmaksızın gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik değişiklikler genetik modifikasyonlardan farklı olarak; geri dönüşebilme potansiyellerine sahip olma, genomda yakınındaki bir diğer gen grubunu etkileyebilme ve çevre ile modifiye edilebilme gibi ortak özelliklere sahiptirler (Feinberg, 2004). Epigenetik değişiklikler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA'ların (miRNA) regülasyonu olmak üzere başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır (Şekil 2-1) (Sawan ve ark., 2008). Bu mekanizmaların herhangi birindeki hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına sebep olarak epigenetik hasarlara neden olmaktadır.

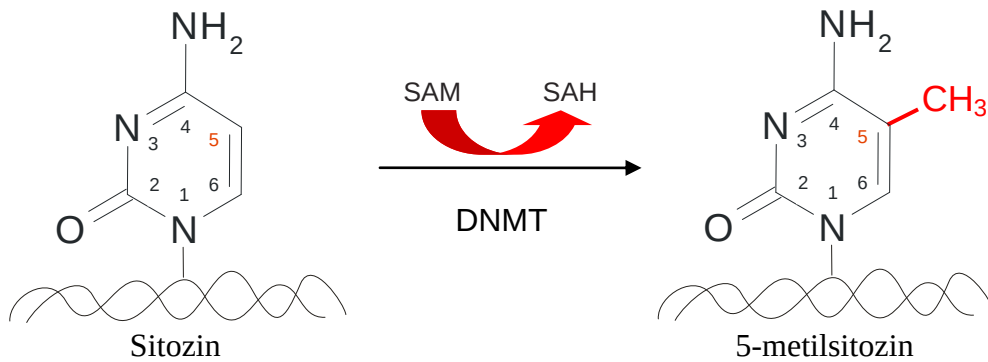
Histon modifikasyonları, histon proteinlerinin kovalent post translasyonel değişimleri olarak tanımlanır. Histonların N-terminal uçlarında meydana gelen bu modifikasyonlar; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon şeklindedir. Histon modifikasyonları kromatin yapısını değiştirerek gen ifadesinin kontrolünde rol oynamaktadır. Histonlardaki modifikasyonların ve DNA metilasyonunun birlikte çalışarak gen ifadesinin durumunu etkilediği ve bu şekilde hücrenin yazgısının belirlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. Kodlanmayan RNA'lar epigenetik mekanizmalar arasında son yıllarda ortaya çıkmakta olup, mikroRNA'lar olarak da bilinmektedir. MikroRNA'lar küçük, protein kodlamayan RNA molekülleridir. Bazı mikroRNA'lar epigenetik mekanizmalar ile kontrol edilirken, bazıları da doğrudan veya dolaylı olarak epigenetik mekanizmada rol oynayan faktörleri hedef alırlar. DNA metilasyonu, CpG (sitozin fosfat guanin) dinükleotidleri içinde bulunan sitozinlerin metilasyonu olup, epigenetik mekanizmalar arasında en yaygın olanıdır.

2.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, genomun doğal bir modifikasyon mekanizması olup, CpG dinükleotidinde bulunan sitozinin 5. konumundaki karbonuna bir metil grubu (CH_3) bağlanması ile gerçekleşir ve sonuçta 5-metildeoksisitozin oluşur (Şekil 2-2) (Herman ve Baylin, 2003). Memeli genomunda sitozinlerin yaklaşık %2-5'i metillenmiş ve guanin ile baz çifti oluşturmuş durumdadır (Bombail ve ark., 2004).



Şekil 2-1: Başlıca epigenetik mekanizmalar (Sawan ve ark., 2008).



Şekil 2-2: Memeli genomunda sitozinin metilasyonu (Herman ve Baylin, 2003).

Sitozin ve guaninin genomik bölgelerde tekrarlanan şekillerde bulunduğu bölgeler CpG adacıkları olarak adlandırılır. CpG adacıkları 1-2 kb uzunluğunda kısa DNA bölgeleridir ve genomun yaklaşık olarak %2'sini oluşturmaktadır. CpG adaları genlerin promotör bölgelerinde ve ilk ekzonlarında bulunur ve bu bölgeler %60-70 oranında guanin ve sitozince (GC) zengin dizilere sahiptir. CpG adaları genellikle tüm normal dokularda metile değil iken; imprinted genler ve inaktif X kromozom genlerinde ise metile halde bulunur. Metillenmemiş durumda bulunan CpG adalarındaki yeniden metillenmeler yaşlanma süreci ve kanser gibi bazı hastalıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, genom boyunca bulunan CpG dinükleotidlerinin ise %70-80'i metile haldedir, çoğunlukla tekrarlayan genomik bölgelerde bulunur ve kromatinin yeniden düzenlenmesine aracılık etmektedir (Herman ve Baylin, 2003).

DNA metilasyonunun DNA metiltransferaz (DNMT) ve s-adenozil metiyonin (SAM) önemli rol oynamaktadır. DNMT'ler, SAM tarafından sağlanan metil grubunu sitozinin 5. konumundaki karbona aktaran enzimlerdir. Şimdiye kadar memelilerde 5 tip DNMT enzimi saptanmış olup; bunlar DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve onun izoformu olan DNMT3L'dir (Robertson, 2002). DNMT1, gerçek metiltransferazlar olarak da bilinir ve replikasyon sırasında daha önce metillenmiş halde bulunan sitozin bazlarını tanıma ve metilasyonu yavru hücrelere aktarma yani metilasyonun korunmasını sağlama özelliğine sahiptir. DNMT1, yarı-metillenmiş DNA bölgelerine bağlanır. DNMT3a ve DNMT3b *de novo* metiltransferaz aktivitesi gösterir ve erken embriyogenez gelişim döneminde önemli rol oynarlar. Yarı-metillenmiş ve hiç metillenmemiş bölgelere bağlanarak metilasyonu gerçekleştirirler. DNMT3L ise; DNMT3a ve DNMT3b enzimleri ile ilişkili olup *de novo* DNA metilasyonunu indüklemektedir. DNMT2'nin diğer metil transferazlar gibi korunmuş olan metiltransferaz motifini taşıdığı gösterilmiş olup, ancak aktivitesi görülmemiştir (Das ve Singal, 2004; Szyf, 2011).

SAM birçok metilasyon reaksiyonunun metil vericisidir. Artışı DNA metiltransferazları aktive eder, hipermetilasyonu tetikler ve global hipometilasyona karşı genomu korur (Caudill ve ark., 2001 Choumenkovitch ve ark., 2002). DNMT'lerin etkisiyle SAM'dan s-adenozil homosistein (SAH) oluşur. SAM/SAH oranı metilasyon

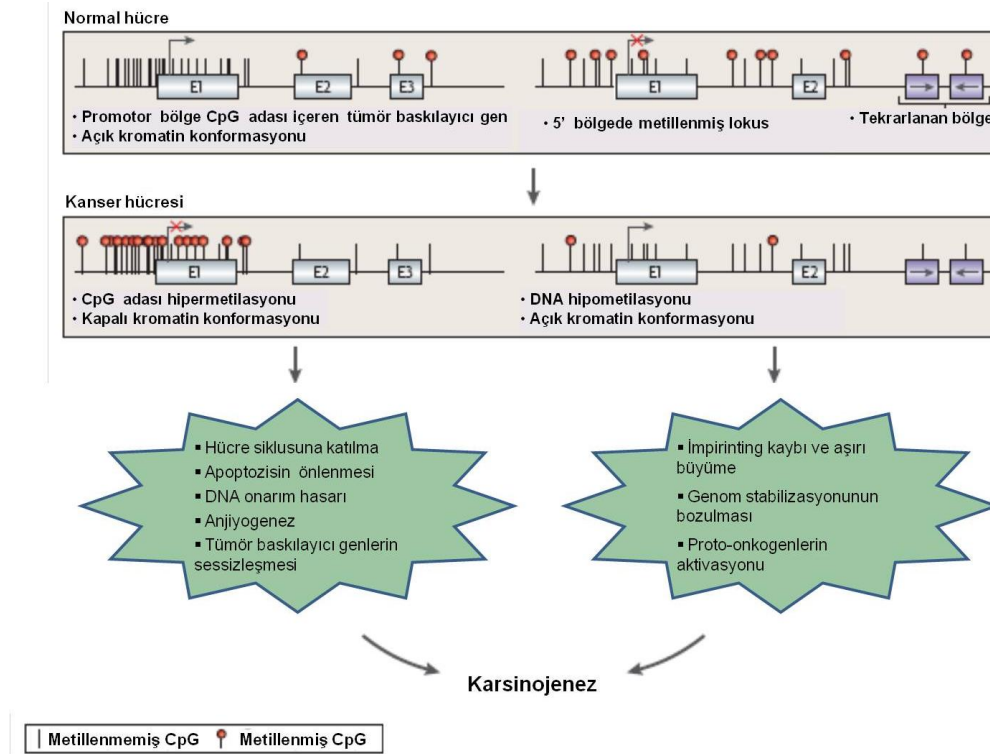
durumunun metabolik göstergesi olup metilasyon potansiyeli olarak da ifade edilir (Davis ve Uthus , 2004; Detich ve ark., 2003).

2.2.1. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarında görülen DNA metilasyonu, kromatin yapısının organizasyonunda ve gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Aktif kromatinin (açık yapı) yani transkripsiyon faktörlerinin ve diğer koaktivatörlerin promotore bağlanabildiği kromatin yapısı metillenmemiş CpG dinükleotidleri içerir. Buna karşın, inaktif kromatin (kapalı yapı) yani transkripsiyon faktörlerinin promotore bağlanamadığı kromatin yapısı metillenmiş CpG dinükleotidleri içerir (Esteller, 2007). Bir genin metillenme derecesi ile ifade edilme derecesi arasında ters bir ilişki vardır. Yani, düşük derecedeki metilasyon yüksek oranda gen ifadesi ile ve yüksek derecedeki metilasyon ise düşük oranda gen ifadesi ile bağlantılıdır. Hücre farklılaşmasıyla beraber farklı dokularda farklı genlerin ifade edilmesinin temelinde bu düzenlenme yatmaktadır. Ayrıca metilasyon dokuya özgüdür ve bir kere gerçekleşince o dokunun bütün hücrelerine aktarılır. Şekil 2-3’de tümör oluşumunda DNA metilasyonu değişimleri gösterilmiştir (Esteller, 2007).

DNA metilasyonu ile transkripsiyonel baskılanmada çeşitli mekanizmaların rol oynadığı öne sürülmüştür. Bunlardan ilki, promotor bölgelerinde tanınma alanlarında spesifik transkripsiyon faktörlerinin direkt bağlanmasının önlenmesini içerir. Bazı transkripsiyon faktörleri (*Ap-2*, *c-Myc/Myn*, *E2F*) CpG kalıntılarını içeren dizileri tanır ve bunların herbirine bağlanmanın metilasyon ile inhibe edildiği gösterilmiştir (Das ve Singal, 2004). Pek çok transkripsiyon faktörünün metilasyon tanıma bölgelerinin bulunduğu ve metilasyona duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Ancak, daha sonra metilasyon tanıma bölgeleri bulunmayan ve metilasyona duyarsız transkripsiyon faktörleri de keşfedilmiştir. Diğer bir mekanizma ise; spesifik transkripsiyonel baskılayıcıların metillenmiş DNA’ya direkt olarak bağlanmasını içerir. Yani, promotore bağlanacak transkripsiyon faktörlerinin tanıyacağı bölgeler, metilsitozine bağlanan proteinler (‘metil bağlayıcı protein’, MBD) tarafından maskelenir. Bu proteinlerin en iyi tanınmış örnekleri MeCP2, MBD2 ve MBD3’tür. Bu proteinler histon deasetilazlar (HDAC1 ve HDAC2) ile ve kromatin yeniden modellenme aktiviteleri ile birlikte çalışırlar. Tüm bu kompleksler kompakt bir kromatin yapısı meydana getirerek, transkripsiyonu baskırlar. Böylece, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve

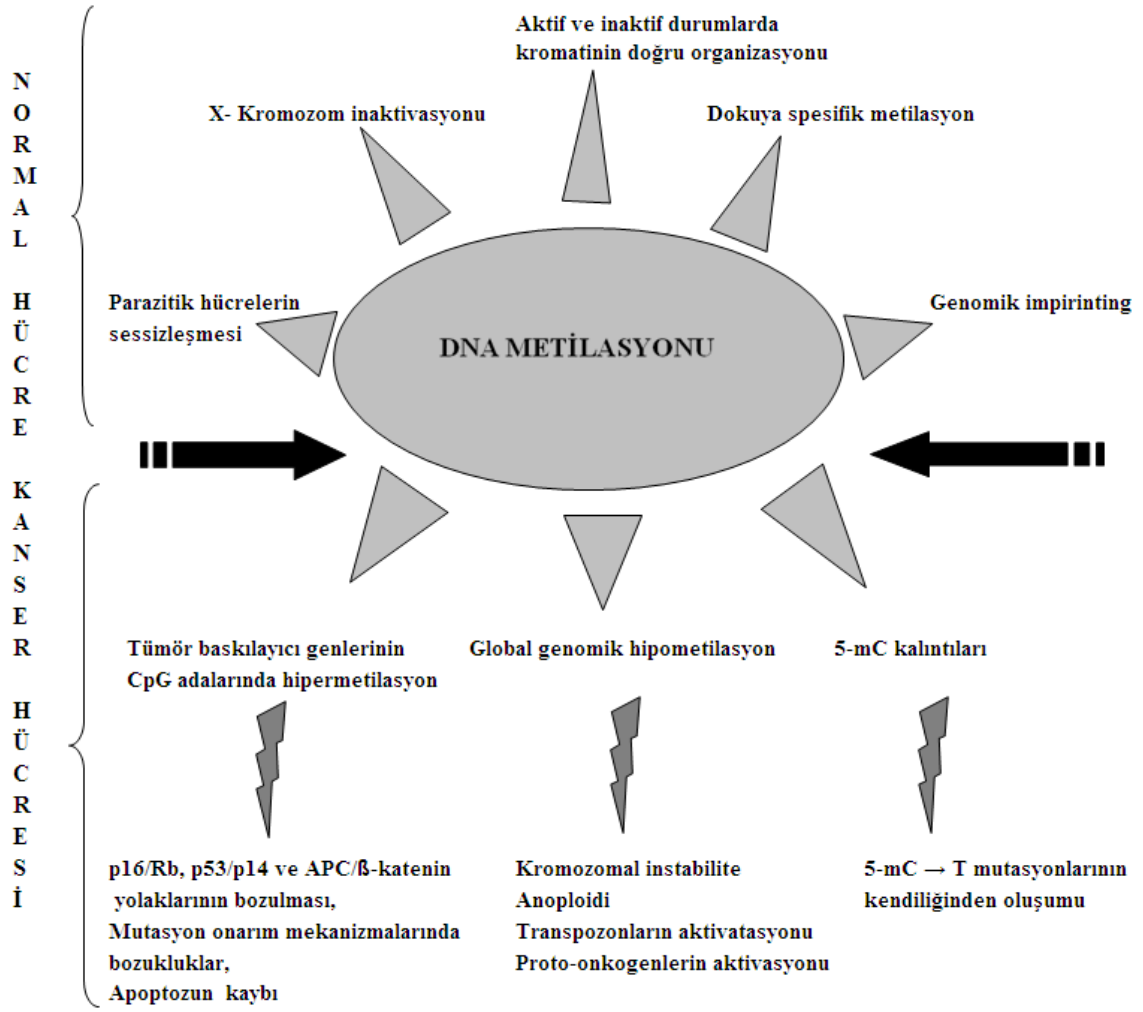
kromatin yapısını da etkiler ve bu da gen ifadesinin değişmesiyle ortaya çıkar (Das ve Singal, 2004).



Şekil 2-3: Tümör oluşumunda DNA metilasyonu değişimleri (Esteller, 2007).

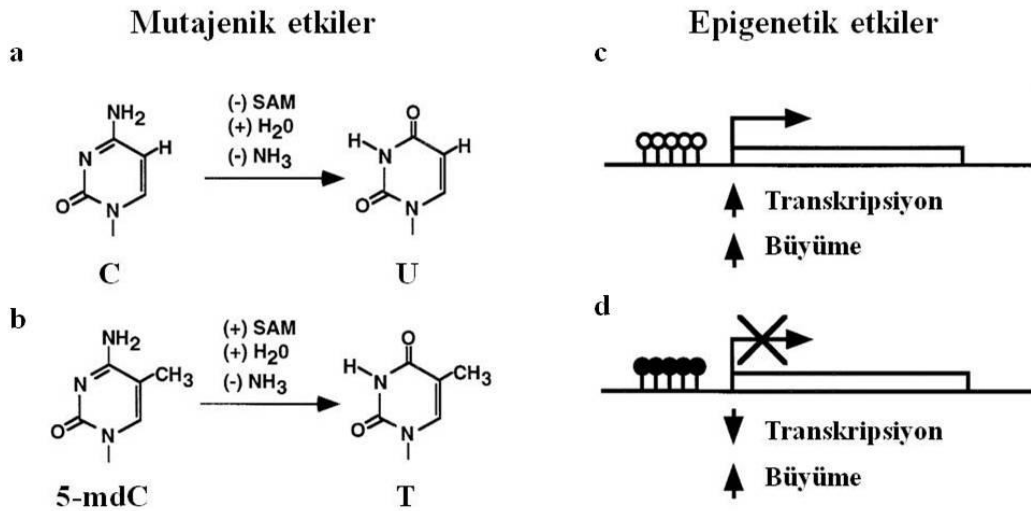
2.2.2. DNA Metilasyonu ve Kanser

Kanserde DNA metilasyonundaki değişiklikler erken safhalarda ve en fazla gözlenen olaylar olarak ortaya çıkmaktadır. Normal hücreler ile karşılaştırıldığında kanserli hücreler, DNA metilasyonu açısından major değişimler göstermektedir (Baylin ve Herman, 2000). Kanserli hücrelerde gelişen DNA metilasyonu; üç farklı mekanizma ile incelenebilir: 5-metilsitozinin deaminasyonu sonucu mutasyon oluşması; genomun global hipometilasyonu ve tümör baskılayıcı genlerinin promotor bölgelerinde CpG adalarında hipermetilasyon ile baskılanmasıdır (Gonzalzo ve Jones, 1997). Bununla birlikte, DNA metilasyonu embriyonik gelişme, X kromozom inaktivasyonu, ve genomik imprinting gibi birçok normal hücresel olay ile de ilişki halindedir. Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi Şekil 2-4'de gösterilmiştir (Esteller ve Herman, 2002).



Şekil 2-4: Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi (Esteller ve Herman, 2002).

Bu mekanizmalardan ilki, 5-metilsitozinin mutasyon oluşturma riskidir. Normalde DNA'da bulunan sitozin en sık gözlenen mutasyon mekanizmalarından biri olan deaminasyon sonucu urasile dönüşür (Şekil 2-5a) ve bir RNA bazı olması nedeniyle onarım mekanizmalarınca kolayca tanılarak onarılır. Buna karşılık, 5-metilsitozinin spontan deaminasyonu sonucu oluşan timin (Şekil 2-5b) normalde de DNA'da bulunan bir baz olduğu için onarım mekanizmalarından kolayca kaçır (Gonzalzo ve Jones 1997). Tüm genomdaki nokta mutasyonlarının yaklaşık üçte birinden fazlasının CpG adacıklarında gözlenmesi, bu etkinin en açık belirtisidir. Bu olaya tümör baskılayıcı gen olan *p53* örnek verilebilir. İnsan solid tümörlerinin %50'sinden fazlasında *p53* geninde mutasyon görülmektedir ve bunların %24'ünü, CpG adacıklarındaki C→T dönüşümü oluşturmaktadır (Singal ve Ginder, 1999).



İçi boş yuvarlak: metillenmemiş; içi dolu yuvarlak: metillenmiş geni ifade eder.

Şekil 2-5: Kanserli hücrelerde gelişen DNA metilasyonu (Gonzalgo ve Jones 1997).

Hipometilasyon

Genom boyunca çoğunlukla tekrarlayan genomik bölgelerde bulunan CpG dinükleotidlerinin %70-80'i metile haldedir. Kanserin erken aşamasında sitozin metilasyonunda global bir azalma gösterilmiştir. Hipometilasyon kromozomal instabiliteye, retrotranspozon¹ aktivasyonu ve bazı protoonkogenlerin ekspresyonunda artışa sebep olmaktadır (Das ve Singal, 2004). Hipometilasyon ve gen ekspresyonu arasındaki bu ters ilişki akciğer ve kolon kanserlerinde *k-ras* proto-onkogeninde gösterilmiştir (Feinberg ve Vogelstein, 1983). Tümörlerde sıklıkla hipometilasyon gözlenen diğer bölgeler ise retrotranspozonlar ve SINE ('short interspersed nucleotide elements') ve LINE-1 ('long interspersed nucleotide element type 1') tekrarlanan bölgelerdir (Şekil 2-5c).

DNA metilasyonu DNA'nın sıkı bir şekilde paketlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sıkı paketlenmeden dolayı örneğin, transpozonların genom içerisinde hareket etmeleri engellenmiş olmaktadır. Ancak, metilasyon kaybı ile DNA sıkı bir şekilde paketlenemeyeceğinden transpozonlar genomda rahatlıkla hareket ederek kromozomal instabiliteye neden olmaktadır. Ayrıca, DNA onarım genlerindeki anomaliler de kromozomal instabiliteye neden olmaktadır (Singal ve Ginder, 1999).

¹ Hareket edebilen genetik elemanlar

Hipermetilasyon

Promotor bölgelerde CpG adası hipermetilasyonu, normalde metillenmemiş olarak bulunan başta tümör baskılayıcı genler olmak üzere genomda hayati fonksiyonu olan pek çok genin (DNA tamir genleri, hücre siklus regülatörleri, apoptozis ve detoksifikasyonla ilişkili genler gibi) hipermetilasyon ile sessizleştirilerek fonksiyonlarının kaybına sebep olur. (Şekil 2-5d).

İlk olarak, 1993 yılında sporadik retinoblastomda retinoblastoma (*Rb*) (Ohtani-Fujita, 1993) geninde hipermetilasyon gözlenmiş olup, bunu takiben *von Hippel Lindau* (*VHL*) (Herman, 1994), *CDNK2A* (*p16*) (Gonzalez-Zulueta, 1995, Merlo, 1995), *CDH1* (*e-cadherin*) (Yoshiura, 1995, Graff, 1995) ve *hMLH1* (Kane, 1997) genlerinde hipermetilasyon olduğu kanser ile ilgili çalışmalarda gösterilmiştir.

Kanserde hipermetilasyonda rol oynayan genler (Tablo 2-1); hücre siklusunun regülasyonu (*p16*, *p15*, *Rb*, *p14*), DNA tamir sistemi (*BRCA1*, *MGMT*(*O*(6)-*metilguanin-DNA metiltransferaz*), apoptozis (ölümle ilişkili *protein kinaz-DAPK*), *transmembran segmenti-TMS1*), ilaç direnci, detoksifikasyon, anjiogenez ve metastaz gibi olaylardan sorumludur. Bununla birlikte; *RASSF1A* ve *p16* gibi belirli genler bir çok çeşit kanserde sıklıkla metile halde iken, diğer genler ise sadece spesifik bazı kanserlerde metiledir. Örneğin; *GSTP1* geni %90'dan fazla prostat kanserinde hipermetile durumda iken, akut miyeloid lösemide büyük oranda metillenmemiş durumdadır (Lee, 1994; Melki, 1999). Tablo 2-1'de kanserde hipermetilasyonda rol oynayan önemli bazı genler verilmiştir.

CpG dalarının metilasyonunun tümör gelişiminin özellikle erken dönemlerinde önemli olduğu, kanser için bir nevi zemin hazırladığı, kanserin prognoz, ve yayılım hızına etki ettiği düşünülmektedir. Bu durum bir tümör göstergesi olarak metilasyonun önemini vurgulamaktadır.

2.2.3. Tez Çalışmasında Araştırılan Genler

Tez çalışmasında kanser ile ilişkili olduğu bilinen önemli tümör baskılayıcı genlerden *e-cadherin*, *VHL*, *p16* ve *p15*, onkogenlerden ise *c-myc* genleri promotör bölgelerinde metilasyonunun araştırılması amacıyla seçilmiştir. Proto-onkogenlerden biri olan *c-myc* bir transkripsiyon faktörünü kodlamakta olup, hücre çoğalmasını kontrol eder. *c-myc* Geninde meydana gelen hipometilasyon ile genin ekspresyonu artar ve bu

da karaciğer ve böbrek kanserlerinde hücre çoğalması ile ilişkilidir (Du ve ark., 2009; Tao ve ark., 2000; Tao ve ark., 2005). *e-cadherin* Bir adezyon molekülüdür ve doku bütünlüğünün korunması, tümör invazyonu ve tümör metastazı gibi birçok olayda rol alır. *e-cadherin* Geninin promotor bölgelerinde CpG adalarının hipermetilasyonu mide (Suzuki ve ark., 1999; Leung ve ark., 2001), karaciğer (Matsumara ve ark., 2001; Yang ve ark., 2003; Kwon ve ark., 2005) ve böbrek (Kawakami ve ark., 2003; Dulaimi ve ark., 2004; Costa ve ark., 2007) kanserlerinde gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Kanserde promotor bölge CpG adalarında hipermetilasyona uğrayan önemli genler (Das and Singal, 2004)

Gen	Tümör Gelişimindeki Rolü	Tümör Tipi
<i>APC</i>	Hücre çoğalmasında dengesizlik, e hücre göçü, hücre adhezyonu ve kromozomal stabilite	Meme, akciğer, özofagus
<i>BRCA1</i>	DNA tamir ve transkripsiyon aktivasyonunu etkileme	Meme, ovaryum
<i>p16 (CDKN2A)</i>	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü	GIT, baş ve boyun, NHL, akciğer
<i>DAPK1</i>	Apoptozun baskılanması	Akciğer
<i>e-cadherin (CDH1)</i>	Hücre çoğalmasında artış, invazyon, ve/veya metastaz	Meme, tiroid, mide
<i>ER</i>	Hormon resistansı	Meme, prostat
<i>GSTP1</i>	Bazı karsinojenlerin aktif metabolitlerinin detoksifikasyonunun kaybı	Prostat, meme, böbrek
<i>hMLH1</i>	DNA onarımının bozulması ve gen mutasyonları	Kolon, mide, endometriyum, ovaryum
<i>MGMT</i>	p53 ilgili gen içeren DNA onarımı ve ilaç direnci	Akciğer, beyin
<i>p15</i>	Proliferasyon ve aktivasyona kontrolsüz hücre girişi	Lösemi, lenfoma, skuamöz hücre karsinoması, akciğer
<i>RASSF1A</i>	Hücre çoğalması kontrolünün kaybı	Akciğer, meme, ovaryum, böbrek, nazofarengial
<i>Rb</i>	Hücre bölünmesi ve DNA replikasyonu kontrolü için gerekli olan genlerin transkripsiyonunun bozulması	Retinoblastoma, oligodendroglioma
<i>VHL (von Lindel Hippau)</i>	RNA bağlı protein degradasyonunda hata sonucu RNA stabilitesinde değişiklik	Böbrek hücresi kanseri

VHL tümör baskılayıcı geninin CpG metilasyonunun ise böbrek kanserli hücrelerinin transkripsiyonel inaktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Herman ve ark., 1994; McRonald ve ark., 2009). *p16* Tümör baskılayıcı geni hücre siklusunun gelişmesini inhibe eden siklin-D-bağımlı protein kinazların inhibitörüdür. Bir çok çalışma, DNA metilasyonundaki değişikliklerin *p16* geninin inaktivasyonuna sebep olduğu ve karaciğer, akciğer ve böbrek kanserlerinde erken aşamalarda gözlenebildiğini göstermiştir (Belinsky ve ark., 1998; Kaneto ve ark., 2001; Tannapfel ve Wittekind, 2002 ; Qin ve ark., 2004; Dulaimi ve ark., 2004; Ko ve ark., 2008). *p15* Tümör baskılayıcı geni ise *5p32* kromozomu üzerinde *p16* genine komşu olup, hücre siklusunun gelişmesini inhibe eden siklin-D bağımlı protein kinazların inhibitörüdür. Karaciğer (Herman ve ark., 1996; Wong ve ark., 2000; Qin ve ark., 2004), mide kanseri (Leung ve ark., 2001) ve lösemi (Batova, 1997) gibi bir çok tümörde *p15* geninde metilasyon yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

2.2.4. DNA Metilasyonu ve Kimyasal Karsinogenez

Kimyasal karsinogenler günümüzde etki mekanizmalarına göre genotoksik ve non-genotoksik karsinogenler olarak iki grupta incelenmektedir. Genotoksik karsinogenler kanserin başlangıç ve ileri safhalarında önemli rol oynarken, non-genotoksik karsinogenlerin ise kanserin tümör gelişimi safhasında güçlü bir rolü olduğu düşünülmektedir (Klaunig ve ark., 2000). Genotoksik karsinogenler, geri dönüşümsüz olarak DNA dizisini değiştirirler ve bu yüzden güvenlik dozuna sahip değildirler. Non-genotoksik karsinogenler ise DNA dizisini değiştirmeden genin ifadesinde değişikliğe sebep olurlar ve karsinogenik etkilerini sıklıkla uzun dönem maruziyette ve sadece eşik değer aşıldığında gösterirler. Non-genotoksik karsinogenlerin etkileri organ, cinsiyet ve türe ait farklılıklar gösterebilir (Mally ve Chipman, 2002). Non-genotoksik karsinogenlere ait tümör oluşumu mekanizmaları çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, sitotoksik özellikte bir madde olan kloroform, hücre çoğalmasını artırarak farelerde karaciğer ve erkek sıçanlarda böbrek tümörlerine sebep olur. Karaciğer hücrelerinde çoğalmayı arttıran ve apoptozisi inhibe eden Wyeth-14,643 gibi peroksizom proliferatörleri mitojen olarak etki gösterirler (Mally ve Chipman, 2002). Oksidatif stres gibi diğer mekanizmalar da non-genotoksik karsinogenezde rol alabilirler (Williams ve Whysner, 1996). Non-genotoksik karsinogenlerin, hücre büyümesi ve hücre ölümü arasındaki dengeyi bozduğu düşünülmektedir. Bu yüzden birçok non-genotoksik

karsinojenlerin ortak özellikleri hücre çoğalmasının stimülasyonu ve apoptozis ile hücre ölümünün inhibisyonu olarak ortaya çıkmaktadır (Williams ve Whysner, 1996).

Non-genotoksik karsinojenler transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel seviyelerde gen ifadesini değiştirebilirler (Moggs ve ark., 2004). Genetik mekanizmaların aksine epigenetik mekanizmalar geri dönüşümlü etkililerdir. Buna ilave olarak, non-genotoksik karsinojenlerin genomik DNA hipometilasyonunu ve gene özgü hipermetilasyonunu indükleyerek karsinogenez oluşumuna katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Moggs ve ark., 2004).

Bazı çalışmalarda non-genotoksik karsinojenlere maruziyet ile DNA metilasyonundaki değişiklikler arasında yakın bir ilişki gözlenmiş ve farklı karsinojenler tarafından deneysel olarak tümör gelişmesinin erken safhalarında DNA hipometilasyonunun indüklendiği gösterilmiştir. Örneğin, Pereira ve arkadaşları non-genotoksik karsinojenlerin (safra asitleri, rutin, bromdiklorometan, 5-aza-2-deoksisitidin) fare ve sıçan bağırsak kolonunda hipometilasyona sebep olduğunu saptamışlardır (Pereira ve ark., 2004). Benzer olarak, tekrarlanan dozlarda dikloroasetik asit ve trikloroasetik asidin fare karaciğerinde DNA hipometilasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Ge ve ark., 2001a). Ayrıca, peroksizom proliferatorü ve sıçanlarda karsinojenik bir ajan olan Wy-14,643'ün sıçan karaciğerinde *c-myc* geninde (proto-onkogen) hipometilasyonu indüklediği gösterilmiştir (Ge ve ark. 2001b).

Farelere oral yol ile verilen trihalometanların (kloroform, bromodiklorometan, klorodibromometan, bromoform) karaciğer DNA'sında 5-metilsitozin düzeylerinde azalmaya ve *c-myc* geninin promotor bölgelerinde de hipometilasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Coffin ve ark., 2000). Tao ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada da kloroform, bromodiklorometan, dikloroasetik asit, trikloroasetik asitin de sıçan ve fare böbreklerinde global DNA hipometilasyonuna ve *c-myc* geninde de hipometilasyona sebep oldukları gösterilmiş olup, DNA hipometilasyonunun bu maddelerin böbrek üzerindeki karsinojenik mekanizmalarda rol aldığı ve karaciğer ve kolon kanserlerinin de bu mekanizma ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Tao ve ark., 2005).

Metapirilen uygulanmış sıçanlarda yapılan araştırmalarda karaciğer DNA'sında 5-metilsitozin düzeyi yüksek bulunmuş olup, yapılan gen anlatımı tayinininde de bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Hernandez ve ark., 1991). Hepa 1c1c7 hücreleri

üzerinde yapılan başka bir araştırmada TCDD'nin çeşitli genler üzerindeki etkisinde hücrel DNA metilasyonunun etkili olduğu gösterilmiştir (Jin ve ark., 2004). Krom indüklü akciğer kanserinde *p16* (Kondo ve ark., 2005) ve *MLH1* (Takahashi ve ark., 2005) genlerinde hipermetilasyon olduğu; daha yeni bir çalışmada ise A549 hücrelerinde histon metilasyonu ile birlikte *MLH1* geninin ifadesinde azalma olduğu (Sun ve ark., 2009) gösterilmiş olup, kromun karsinojenik etkisinde epigenetik mekanizmaların rolü olabileceği öne sürülmektedir.

Zhang ve ark. (2011), ilaç indüklü epigenetik değişikliklere dikkat çekmiştir. Non-genotoksik sıçan karaciğer karsinogeni olarak kabul edilen izoniyazid ile yapılan bir çalışmada; 42 gün süre ile 10 mg/kg izoniyazid maruziyetinin sıçan karaciğerinde global DNA metilasyonunda azalmaya ve LINE-1 gibi tekrarlanan dizilerde ise hipometilasyona sebep olduğu gösterilmiş ve bu durumun da genomik stabiliteyi bozabileceği ileri sürülmüştür (Zhang ve ark., 2011).

2.2.5. DNA Metilasyonunun Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

DNA metilasyonunun araştırılması amacıyla çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Bu amaçla, tüm genoma yönelik (global/genom çapında) ya da gene özgü düzeyde metilasyon analiz yöntemleri geliştirilmiştir.

5-metilsitozin içeriğinin tayini, global olarak DNA metilasyonundaki değişiklikleri tayin etmede hızlı ve kullanışlı bir parametredir. Bu amaçla, DNA'da 5-metil-2-deoksisitidin'in (5-mdC) kantitatif tayini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmektedir. Bunun için, genomik DNA önce nükleaz P1 enzimi, daha sonra alkali fosfataz enzimi ile deoksiribonükleozidlerine hidrolize edilir ve serbest nükleozidler ultraviyole diode-array detektör (UV-DAD) donanımlı HPLC (Gehrke, 1984, Ramsohoye, 1992, Fuke ve ark., 2004; Sandhu ve ark., 2009; Armstrong ve ark., 2011) ya da kütle spektrofotometre donanımlı sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) sistemi (Song ve ark., 2005; Ma ve ark., 2009; Hu ve ark., 2010) ile analiz edilir.

Gene özgü metilasyon analizlerinde ilk olarak southern blot yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, genomik DNA'nın metilasyona duyarlı bir restriksiyon enzimi ile (Örn: *HpaII*) kesimi ve ardından hibridizasyonu esasına dayanır (Bird ve Southern, 1978). Fakat fazla miktarda DNA (5 µg ya da daha fazla) kullanılıyor olması bu yönteme sınırlamalar getirmiştir. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile

kesiminden sonra PCR uygulaması ('methylation-sensitive restriction enzyme related PCR') southern blot analizinden daha hassas bir yöntem olmuştur.

Bisülfite modifikasyonunu takiben DNA dizi analizi (bisülfite dizi analizi) ilk olarak Frommer ve arkadaşları (Frommer ve ark., 1992) tarafından 1992'de geliştirilmiş olup, bu yöntem Clark ve arkadaşları (Clark ve ark., 1994) tarafından optimize edilmiştir. O zamandan bugüne kadar bisülfite genomik dizileme metilasyon analizlerinde standart bir test olmuştur. Bu yöntem, hedef dizide 5-mdC'lerin tayini için çok iyi bir araçtır. Yöntem, tek iplikçikli DNA'daki sitozinleri sodyum bisülfitin urasile deamine etmesi esasına dayanır ve bu esnada 5-mdC değişmeden kalır. Daha sonra bu modifiye edilmiş DNA, değiştirilmiş dizi için özgün olan bir primer seti kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Bu çoğalmada tüm urasiller (değiştirilmiş sitozinler) timin olarak çoğalırken, yalnızca 5-mdC'ler sitozin olarak kalır. Çoğalmış parçalara ya direkt olarak ya da her bir molekülün klonlanmasından sonra dizi analizi yapılır. Elde edilen analiz sonucu, referans DNA dizisi ile kıyaslanarak metilasyon analizi kantitatif olarak gerçekleştirilir. Böylece bisülfite dizi analizi sonucunda bölgedeki her CpG'nin metilasyon durumu ile ilgili bilgi edinilir. Ayrıca, bisülfite PCR sonrasında elde edilen ürün restriksiyon enzimleri ile kesim yapılarak da analiz edilebilir. Bu teknik kombine bisülfite restriksiyon analizi (combined bisulfite restriction analysis, COBRA) olarak adlandırılır (Xiong ve Laird, 1997).

Daha sonraları, Herman ve arkadaşları tarafından bisülfite modifikasyonunu takiben PCR analizi (metilasyona-özgü PCR, MSP) geliştirilmiştir (Herman ve ark., 1996). Bu yöntemde, bisülfite ile modifikasyon sonrası metillenmiş ve metillenmemiş DNA'lar arasındaki dizi farklılıklarından yola çıkılarak tayin yapılmaktadır. Bisülfite ile modifikasyon sonrasında sitozinler urasile deamine olur ve urasiller PCR sırasında timine dönüşür. PCR, metillenmiş ve metillenmemiş diziler için özgün olan primer çiftleri kullanılarak yapılır. MSP, DNA'nın belirli bir bölgesindeki metilasyonun varlığı hakkında bilgi verir, fakat kaç adet CpG dinükleotidinde metilasyon olduğu saptanamaz. Bununla birlikte, basit, hızlı ve az miktarda DNA'dan sonuç elde edilebilen bir yöntemdir. İkincil olarak da çok az maliyet gerektirir ve çok fazla sayıda örneğin analizine olanak sağlar. Bu nedenle, sık kullanılan altın standart teknik olarak görülmektedir. Son yıllarda metilasyon analizlerine birçok yeni yöntemler de eklenmektedir. Bunlardan bazıları ise bisülfite modifikasyonunu takiben yapılan

MethyLight (Eads ve ark., 2000), HeavyMethyl (Cottrell ve ark., 2004) ve MethylQuant (Thomassin ve ark., 2004) gibi real-time PCR analizleridir.

Yukarıda bahsedilen yöntemler gene/diziye özgü yöntemler olup, genom çapında da DNA metilasyonu analizlerinin yapılması büyük önem taşımaktadır (Brena ve ark., 2006). Metillenmiş DNA immünopresipitasyonu ('methylated DNA immunoprecipitation, MeDIP') tekniği, metillenmiş DNA'ların anti-metilsitozin antikorları ile immünopresipitasyon prensibine dayalı olarak izole edilmesi esasına dayanır (Weber ve ark., 2005). Elde edilen MEDIP DNA'ların mikrodizilere uygulanması son yıllarda oldukça ön plana çıkmaktadır (Chen ve ark., 2010; Butcher ve Beck, 2010; Cheung ve ark., 2010; Li ve ark., 2010; Pålme ve ark., 2011; Ruike ve ark., 2010). Böylece; mikrodizi analizi ile genom çapında metillenmiş ve metillenmemiş genler açığa çıkarılarak kıyaslama yapılmaktadır.

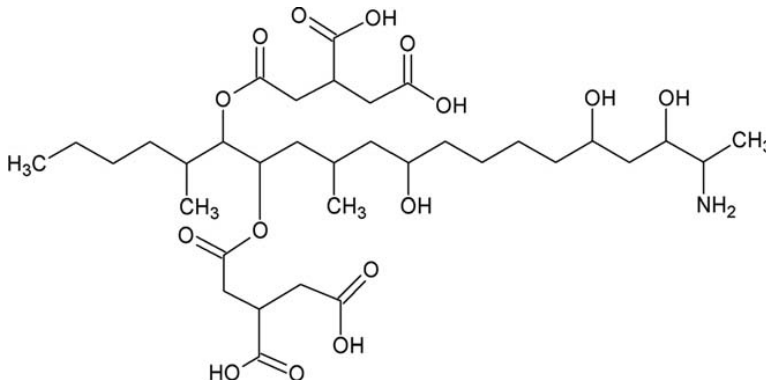
2.3. Mikotoksinler

Mikotoksinler çeşitli küfler tarafından salgılanan ikincil metabolitler olup, insanlar ve hayvanlarda istenmeyen patolojik ve fizyolojik değişiklikler meydana getirirler. Mikotoksin terimi mantar anlamına gelen 'myco' ve zehir anlamındaki 'toxin' kelimelerinin birleştirilmesinden türemiştir. İnsan ve hayvanlarda mikotoksinlerin sebep oldukları olaylar mikotoksin zehirlenmeleri "mikotoksikozis" olarak bilinmektedir. Günümüzde çeşitli küf cinsleri tarafından üretilen yaklaşık 300 mikotoksinin varlığı bilinmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar farklı mikotoksinlerin farklı organları etkilediğini ve akut toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olduğunu, bazılarının bu etkilerin birkaçını birden gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, mikotoksinler buğday, arpa, mısır ve pirinç gibi besin kaynaklarının yaygın kontaminantları olup, insan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Mikotoksinlerin çoğu *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsleri tarafından sentezlenmektedir (Bennett ve Klich, 2003; Creppy, 2002; Omurtag, 2002). Mikotoksinler içinde en çok incelenen ve toksisite oluşturma potansiyeli en yüksek olanı, aflatoksin grubundan hepatotoksik ve karsinojenik özellikteki aflatoksin B1'dir. Afrika ve Güneydoğu Asya'da yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda aflatoksin içeren küflü gıdaların tüketimi ile karaciğer kanseri sıklığı arasında bir ilişki saptanmıştır (Yurdun, 1996; Williams ve ark., 2004). Son yıllardaki mikotoksin

çalışmalarında üzerinde yoğunlaşıl原因 diğer mikotoksin grupları ise okratoksinler, patulin, trikotesenler, zearalenon ve fumonisinlerdir.

2.4. Fumonisinler

Fumonisinler, *Fusarium* cinsi küfler tarafından sentezlenir (Gelderblom ve ark., 1991). Fumonisinler, dünyada mısırın kontaminasyonunda rol oynayan en yaygın küfler olan *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) ve *F. proliferatum* küfleri tarafından 1988 yılında ilk kez izole edilmiş olup, kimyasal yapıları aydınlatılmıştır (Bezuidenhout ve ark., 1988). Ayrıca, *F. napiforme*, *F. anthophilum*, *F. dlamini* ve *F. nygamai* türü küflerin de fumonisinleri ürettiği gösterilmiştir (EHC, 2000; NTP, 1999). Nem, yaklaşık 20°C sıcaklık ve 11-13 haftalık süre fumonisinlerin üremeleri için optimum koşulları oluşturmaktadır. Kimyasal yapıları, 2-amino-12,16-dimetil polihidroksieikosan iskeletinin C14 ve C15 konumlarından propan-1,2,3-trikarboksilik asit ile esterleşmesiyle oluşmuştur (Şekil 2-6) (Steyn ve ark., 1999).

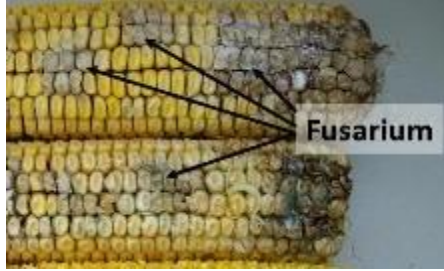


Şekil 2-6: Fumonisin B1'in kimyasal yapısı.

Hayvanlardaki toksik etkileri, mısır ve mısır bazlı insan besinlerinde sık rastlanmalarından dolayı, araştırmacılar tarafından fumonisinlere çok fazla ilgi gösterilmiştir. Bugüne kadar yedi farklı fumonisin tanımlanmıştır. Bunlardan fumonisin B1 (FB1) ve FB2 major toksinler olup, FB3, FB4, FA1, FA2 ve FC1 minör olanlarıdır. FB1 ve FB2 yapısal olarak birbirine benzemekle birlikte, doğada en sık FB1'e rastlanmakta olup, çalışmalar FB1 üzerine odaklanmıştır (Smith ve ark.,1996).

Bu mikotoksinler, özellikle insan ve hayvan gıdası olarak kullanılan doğal veya işlenmiş mısır çeşitlerinde bulunmaktadır. Şekil 2-7'de *Fusarium* cinsi mikotoksin ile kontamine olmuş mısır gösterilmiştir. Gıdaların işlenmesinde kullanılan yöntemlere

karşı dayanıklıdırlar. Mısırın kuru değirmende öğütülmesi ile FB1'in kepek, tohum ve una dağıldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, mısır nişastası üretiminde nemli değirmende öğütme sonucunda, suda çözünmesi nedeniyle FB1 konsantrasyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. İşlenmiş gıdalardan FB1'in uzaklaştırılmasında birçok faktörün rol oynadığı gösterilmiştir (EHC, 2000).



Şekil 2-7: *Fusarium* cinsi mikotoksin ile kontamine olmuş mısır.

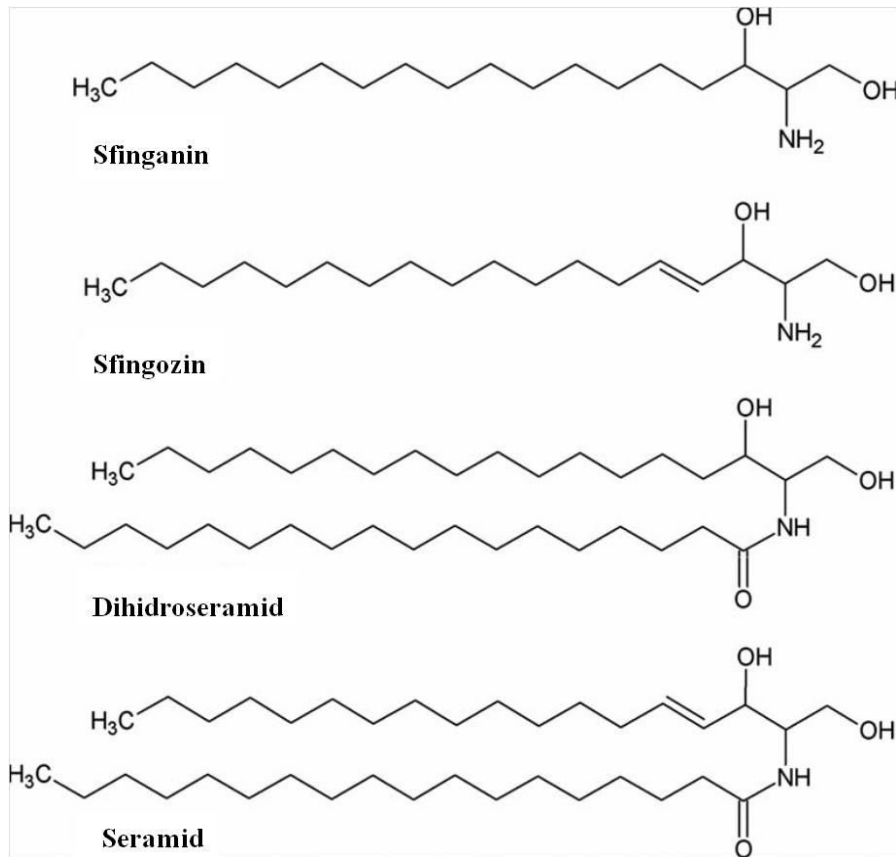
Epidemiyolojik çalışmalar bazı ülkelerde insan özofagus kanserinin görülme sıklığı ve fumonisinler arasında bir ilişki olabileceğini ortaya koymuştur. Özofagus kanserinin görülme sıklığının düşük sosyoekonomik sınıfa sahip ve mısır bazlı gıdaları tüketen ülkelerde daha fazla olduğu gösterilmiştir. Güney Afrika ve Çin'in bazı bölgelerinde yapılan çalışmalarda; FB1 ve FB2'nin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu mısır yetişen bölgelerde özofagus kanserinin görülme sıklığının yüksek olduğu gösterilmiştir (Sydenham ve ark., 1990; Chu ve ark., 1994). Fumonisin içeren mısır ve bu mısırdan yapılan yemlerle beslenen atlarda beyin zarı iltihabı (equine leucoencephalomalacia, ELEM) (Marasas ve ark., 1988), domuzlarda akciğer ödemi (Haschek ve ark., 2001) ve farelerde böbrek hastalıkları ve erkek sıçanlarda sıçanın türüne göre karaciğer ve böbrek kanseri (Stockmann ve ark., 2008) geliştiği gösterilmiştir.

2.5. Fumonisin B1'in Toksikokinetiği

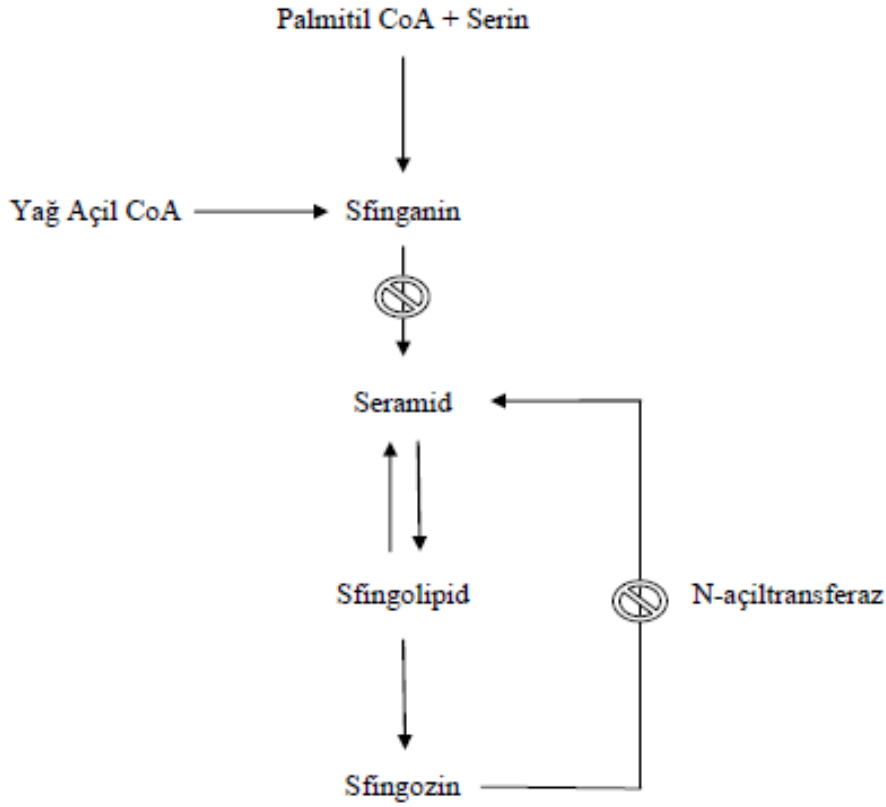
FB1, gastrointestinal sistemden zayıf olarak absorbe edilir ve feçesle atılır. Absorbe olan FB1 birçok doku ve organa dağılmaktadır. Bazı hayvan türlerinde FB1'in plasentayı geçmediği ve süte atılmadığı gösterilmiştir. Safra yolu ile hızla atıldığı ve az miktarda da idrarla atıldığı gösterilmiştir. FB1'in karaciğer ve böbrekte biriktiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, insanlarda ve diğer memelilerde FB1'in toksikokinetiği hakkında ayrıntılı bir bilgi bulunmamaktadır (EHC, 2000).

2.6. FB1'in Toksisite Mekanizması ve Toksik Etkileri

FB1'in, sfingozin (SO) ve sfinganine (SA) yapısal olarak benzerlik göstermesinden dolayı, sfingolipid biyosentezini inhibe ettiği bildirilmiştir. Şekil 2.8'de sfingoid bazlarının yapısı gösterilmiştir. Sfingolipidler, hücre membranının önemli bileşenlerinden olan uzun zincirli serbest bazlardır ve mekanizmalarının bozulması hücre büyümesi, morfolojisi, farklılaşması ve davranışında önemli değişikliklere sebep olabilir. Fumonisinler, sfinganin N-açıl transferaz (seramid sentetaz) enziminin inhibisyonu ile SA'in N-açilsfinganinlere (dihidroseramidlere) dönüşümünü inhibe eder (Şekil 2-9). Bu olay, serbest SA'in birikimine ve dokulardaki SA/SO oranının artması ile sonuçlanır ve toksinlerin alımından sonra erken bir safhada ortaya çıktığı gösterilmiştir (Merril ve ark., 1996; Wang ve ark., 1999).



Şekil 2-8: Sfingozin ve sfinganinin kimyasal yapıları.



⊗ : Fumonisinler tarafından engellenen bölge

Şekil 2-9: Fumonisinlerin toksik etki mekanizması (Soriano ve ark., 2005).

Farklı hayvan türlerinde FB1 maruziyetinin çeşitli dokularda apoptozu arttırdığı gösterilmiş olup, bunun da FB1'in tümör oluşumu mekanizmasında önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (Lim ve ark., 1996).

Aynı zamanda FB1 toksisitesinde oksidatif hasarın da rol oynayabileceği gösterilmiştir. İnsan ve sıçan glioblastoma hücre kültüründe ve fare hipotalamik hücrelerinde 10-100 μ M FB1'e 48-144 saat maruziyetlerde reaktif oksijen türlerinde artış olduğu gösterilmiştir (Galvano ve ark., 2002). Ayrıca, FB1'in sıçan karaciğer, maymun böbrek, insan ve sıçan glioma, fare hipotalamik, insan nöroblastoma, insan intestinal ve fare embriyonik fibroblast hücrelerinde lipid peroksidasyonunu indüklediği belirtilmiştir. (Stockmann ve Savolainen, 2008).

FB1'in hücre canlılığı üzerine etkileri çeşitli hücre tiplerinde çalışılmıştır. FB1'in sıçan hepatosit, sıçan hepatoma, köpek ve domuz böbrek hücrelerinde orta derecede sitotoksik olduğu görülmüş, buna ilave olarak tavuk makrofajları için de sitotoksik olduğu belirtilmiştir (Eriksen ve Alexander, 1998).

Yapılan çalışmalarda FB1'in zayıf bir kanser başlatıcısı ve kanser geliştiricisi olduğu ve genotoksik etkili olmadığı gösterilmiştir. FB1'in *Salmonella* testi ile TA97a, TA98, TA100 ve TA102 sujlarında S9 mikrozomal fraksiyonu yokluğunda ve varlığında mutajenik etkilerinin olmadığı gösterilmiştir (Gelderblom and Snyman, 1991; Park ve ark., 1992). Sıçan karaciğerinde DNA onarım testi ile de *in vitro* olarak 0,04-80 µM/plaka konsantrasyonlarda ve *in vivo* olarak 100 mg/kg konsantrasyonda FB1'in genotoksik olmadığı gösterilmiştir (Gelderblom ve ark., 1989; 1992b). Primer hepatositler ile yapılan *in vitro* çalışmalarda FB1'in DNA üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığı gösterilmiştir (Norred ve ark., 1990;1992). Daha sonraları, *Salmonella* mutajenite testi, *Salmonella* ile umu-mikrotest, *Escherichia coli* ile DNA onarım testi, mikroçekirdek testi ve mitotik aktivite testinin de gerçekleştirildiği *in vitro* genotoksisite test sistemlerinde de FB1'in genotoksik olmadığı konfirme edilmiştir (Gelderblom ve ark., 1995a).

FB1'e 50 ppm konsantrasyonda iki yıl boyunca maruziyet sonrasında erkek BD IX sıçanlarında kolongiokarsinoma ve karaciğer hücre karsinomalarının olduğu gösterilmiştir (Gelderblom ve ark., 2001). FB1'in erkek F344 sıçanlarda renal tübül tümörlerine sebep olduğu, karaciğer üzerine ise karsinojenik etkilerinin olmadığı bildirilmiştir. FB1'e 100 ppm konsantrasyonda iki yıl boyunca maruziyet sonrasında dişi F344 sıçanlarda karsinojenik etkiler oluşmadığı belirtilmiştir. 50 ve 80 ppm konsantrasyonlara FB1 maruziyetinin dişi B6C3F1 farelerde karaciğer hücre adenomları ve karsinomalarına sebep olduğu, erkeklerde ise karsinojenik etki oluşturmadığı gösterilmiştir (Howard ve ark., 2001).

Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi (The Scientific Committee on Food, SCF) sıçan çalışmalarından elde edilmiş tüm verileri toplamış ve FB1'i tek başına değerlendirerek gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen FB1 dozunu (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL) 0,2-0,25 mg/kg bw/gün olarak ve güvenlik faktörünü 100 alarak da tolare edilebilir günlük değerini (tolerable daily intake, TDI) de 2 µg/kg bw olarak belirlemiştir (SCF, 2000). Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Uzman Komitesi (Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives, JECFA) de FB1, FB2 ve FB3 için tek başına ya da kombinasyonları halinde Fischer sıçanlardaki böbrek toksisitesi için NOEL değeri 0,2 mg/kg bw/gün ve güvenlik faktörünü de 100 kabul ederek, kesin olmayan maksimum

tolare edilebilir günlük değeri (provisional maximum tolerable daily intake, PMTDI) 2 µg/kg bw olarak belirlemiştir (JECFA, 2001).

Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC), hayvan deneylerine ve insanlarda özofagus kanserine sebep olmasına dayanarak FB1'i insanlar için muhtemel karsinojen (Grup 2B) grubunda sınıflandırmıştır (IARC, 1993). Yapılan çalışmalarda FB1'in genotoksik olmadığı gösterilmiş olup, etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Fumonisinlerin, çeşitli türlerdeki farklı hastalıkların etiyopatogenezesinden sorumlu non-genotoksik özellikte karsinojenlerden biri olabileceği ileri sürülmektedir (Smith ve ark.,1996). Bununla birlikte, epigenetik mekanizmaların FB1'in karsinojenik etkisindeki rolü hakkında kaynaklarda yeterli bilgiye rastlanmamaktadır.

2.7. Fumonisinler ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Tolare edilebilir maksimum seviyeler o ülkede yaşayan insanların bu yiyeceği ne kadar sıklıkla tükettiği ile ilintili olduğu için bu seviyeler ülkeden ülkeye değişiklik gösterebilir.

Gıda ve yemler için izin verilen maksimum fumonisin miktarları Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.)'nde Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından belirlenmiştir (FDA, 2001) (Tablo 2-2). 1 Ekim 2006 tarihinde ise yürürlüğe giren Avrupa Birliği'nin Komisyon Direktifinde ('European Commission Regulation') Avrupa Birliği ülkeleri için *Fusarium* toksinlerinin maksimum seviyeleri belirlenmiştir ('EC Regulation, 2006) (Tablo 2-2). Bu düzenlemeye göre birçok üründe *Fusarium* toksinleri için limitler öngörülen değerlerin üstünde tutulmuş ve mısırın çeşitli partikül büyüklüklerindeki öğütme fraksiyonları için limit değerler belirlenmiştir.

Türkiye'de ise fumonisinlerin (FB1+FB2) mısır ve ürünleri için maksimum limitlerine ilişkin sınırlamalar 17 Mayıs 2008 tarihli ve 26879 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan 'Türk Gıda Kodeksi-Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ' (Tebliğ No: 2008/26) ile belirlenmiştir (26879 sayılı Resmi Gazete). Daha sonra, bu tebliğ yürürlükten kaldırılmış ve 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan 'Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği' geçerli olmuştur (28157 sayılı Resmi Gazete). Yapılan kıyaslamalarda 2011 yılında yayımlanan yönetmelikte fumonisinlerin maksimum limitlerinde bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Tablo 2-3'de Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenen limitler verilmiştir.

Tablo 2-2: Gıdalardaki fumonisin düzeyleri ile ilgili yasal düzenlemeler

Ülke	Ürün	Maksimum düzey (µg/g)	
A.B.D.¹	Kuru öğütme ile elde edilmiş mısır ürünleri (Öğütülmüş mısır, yağ içeriği kuru bazda < %2,25 olan mısır unu, vb)	FB ₁ + FB ₂ + FB ₃	2,0
	Bütün ya da kısmen kuru öğütme ile elde edilmiş mısır ürünleri (Öğütülmüş mısır, yağ içeriği kuru bazda ≥ %2,25 olan mısır unu, vb)	FB ₁ + FB ₂ + FB ₃	4,0
	Kuru öğütme ile elde edilmiş mısır kepeği	FB ₁ + FB ₂ + FB ₃	4,0
	Patlamış mısır üretiminde kullanılan temizlenmiş mısır	FB ₁ + FB ₂ + FB ₃	3,0
Avrupa Birliği²	İşlenmemiş mısır	FB ₁ + FB ₂	2,0
	Mısır unu, öğütülmüş mısır, yağı alınmış öğütülmüş mısır, rafine mısır yağı	FB ₁ + FB ₂	1,0
	Direkt tüketilen mısır bazlı ürünler (Mısır unu, öğütülmüş mısır, yağı alınmış öğütülmüş mısır, rafine mısır yağı, işlenmiş mısır bazlı bebek ve çocuk gıdaları hariç)	FB ₁ + FB ₂	0,4
	İşlenmiş mısır bazlı bebek ve çocuk gıdaları	FB ₁ + FB ₂	0,2

¹ FDA, 2001² EC Regulation, 2006**Tablo 2-3: Türk Gıda Kodeksi tarafından gıdalarda belirlenen maksimum fumonisin limitleri**

2.6.	Fumonisinler	FB ₁ + FB ₂ (µg/g)
2.6.1.	İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	4,0
2.6.2.	Mısır ve mısır bazlı ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan) (Bölüm 2.6.3 ve 2.6.4’de belirtilenler hariç)	1,0
2.6.3.	Mısır bazlı kahvaltılık tahıllar ve mısır bazlı çerezler	0,8
2.6.4.	İşlenmiş mısır bazlı bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,2
2.6.5.	500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelleter (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	1,4
2.6.6.	500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	2,0

2.8. Hücre Kültürü

Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına ve bunların bir besiyeri ortamında doku ile bağlantısı olmadan *in vitro* olarak çoğaltılmasına hücre kültürü adı verilmektedir (Davis, 1996). 1952’de insan serviks karsinomasından ilk devamlı hücre kültürü (HeLa) elde edilmiştir. 1955–1960 yılları arasında, hücre kültürü çalışmalarında çok önemli bir adım atılarak günümüzde kullanılan anlamda temel hücre kültürü vasatları hazırlanmıştır (Freshney,1986 ; Mutlu, 2003). Son 20 yıldır hücre kültürü, yalnızca spesifik araştırmalar için kullanılan bir araç olmaktan çıkarak, dünyanın en hızlı gelişen endüstri alanlarından biri olan biyoteknolojinin temel taşlarından biri haline gelmiştir.

Hücre kültürü üretmek için kullanılan ortamlarda hücresel metabolizma faaliyetlerinin devamı ve hücrelerin çoğalması amacıyla gerekli maddeler ortama ilave edilir. Hücre üretme ortamları, hücrenin organlardan ayrılmasından sonra doku tabakası oluşana kadar hücrelerin üretilmesi için kullanılmakta ve genel olarak serumla birlikte hücrelerin çabuk üremelerini sağlayan diğer maddeleri içermektedir. Ortam içerisinde; glikoz, plazma ve serum, esansiyel aminoasitler, vitamin, mineraller, şeker, tuz ve antibiyotikler yer almaktadır (Freshney,1986; Davis, 1996).

Günümüzde, hücre kültürleri tek tabaka ve süspansiyon halinde hücre kültürleri olmak üzere iki yolla üretilmektedir. Tek tabaka hücre kültürleri; cam veya plastik zemin üzerine tutunarak yaşayan, işlevlerini sürdüren ve üreyen hücrelerdir. Hücre kültür malzemesinin yüzeyi, hücrelerin tutunma ve çoğalmalarını kolaylaştırmak amacıyla çeşitli makromoleküller ile kaplanabilir. Bunlar, hücrelerin yüzeylerinde eksprese olan integrin proteinleri ile etkileşerek dokuda var olan hücrelerarası matrikse benzer etki gösterirler. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde ise; hücreler yaşamsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde bulundukları ortamda sürdürebilir. Kan, dalak, kemik iliği kültürleri ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde kültüre edilir. Bugün için artık tek tabakalı ve süspansiyon hücre kültürlerini ele alarak klinik faydalarını en üst düzeye çıkarmak üzere orijinal doku mikro çevre özelliklerini yansıtan üç boyutlu kültür metodları da geliştirilmiştir. Bunların en önemli avantajları arasında orijinal doku özelliklerini yansıtmaları sayılabilir (Bilir, 2004).

Hücre kültürleri, günümüzde sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik ve toksikolojik çalışmalarda tanı veya araştırma amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, hücre kültürleri hayvan deneylerinin yerini alması yolunda alternatif uygulamalar olarak da son yıllarda oldukça önem kazanmıştır.

Hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanınmaları, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi gibi nedenlerden dolayı da tercih edilmektedir. (Schmalz, 1994; Schmalz, 1997; Browne, 1988) Buna karşın, hücre kültürü testleri ile sadece materyallerin ilk toksisite reaksiyonları konusunda bilgi edinilebilmekte, materyalin uzun süreli doku temasında oluşturacağı sitotoksosite düzeyi konusunda ise veri elde edilememektedir.

Farklı dokulardan sağlanan hücre kültürleri primer hücre kültürleri, diploid hücre kültürleri ve devamlı hücre kültürleri olmak üzere üç grupta toplanmaktadır.

2.8.1. Primer Hücre Kültürleri

Organizmadan doğrudan doğruya alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen ve ilk olarak kültür şartlarında bulunan hücrelerden oluşmaktadır. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücrelerin genotipi ve fenotipi, orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri taşımaktadır. Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınmaktadır. Bu işleme *subkültür* adı verilmektedir. Bu kültürlerde hücre soyu ‘sonlu’dur, yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölür. Bu nedenle, primer hücrelerle belirli sayıda pasajlama yapılabildiğinden; deneyleri bu dönemde yapmak gereklidir. Primer hücreler ile çalışılabilecek pasaj sayısı hücre tipine göre değişmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz olabilirler; bu durumda aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre dizileri elde edilmiş olur (Baysal ve ark., 2011; Mutlu, 2003).

Primer hücre kültürleri, üretim aşamalarının zor olmasına, hassas hücreler olmalarına, çalışma esnasında ortaya çıkabilecek sorunlara ve kontrollerinin son derece güç olmasına rağmen orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri nedeniyle değer kazanmıştır (Browne, 1988; Mjör, 1983; Özdemir, 2007).

2.8.2. Sekonder Hücre Kültürleri

Primer kültürlerden sonra hücreler ortalama 40-50 pasaj süresince fenotipik ve genotipik özellikleri değişmeden sabit bir oranda çoğalarak devam ettirilebilir. Bu dönemdeki hücrelere ‘diploid hücre kültürü’ adı verilir. Bu kültürlerdeki bütün hücreler, alındıkları dokunun karyotipini %85 oranında korumaktadırlar. Ancak, bu hücrelerde genellikle 30-40 pasaj arasında spontan bir dejenerasyon başlar. Bu arada hücrelerin bazıları spontan bir transformasyon gösterir. Diploid kültürlerde bazı hücrelerde kromozom tipleri kaybolabilmektedir (Spier ve Griffiths, 1985). Fenotipik veya genotipik değişikliğe uğrayan hücreler eğer vital kromozomlarını kaybetmemişlerse üremeye devam ederek devamlı hücre kültürlerini oluştururlar. Hücrelerin heteroploid oluşları onların habis hücreler oldukları veya *in vitro* çoğalmalarının sınırsız oldukları anlamına gelmez. Hücre kültüründe sınırsız çoğalan hücre soy veya suşları, devamlı hücre dizileri şeklinde tanımlanarak, yaşam süreleri sınırlı diploid veya heteroploid hücre dizilerinden ayrılırlar.

2.8.3. Devamlı Hücre Kültürleri

Hücre dizileri, primer kültürlerden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek oluşturulan kültürlerdir. Subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir. Transformasyonları nedeniyle fizyolojik özelliklerini koruyamamaktadırlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Üç gün ara ile en az 70 defa pasajı yapılan hücre dizileri ‘devamlı hücre dizisi’ olarak kabul edilmektedirler. Hücre dizilerinin primer kültürlerden farkları; kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim göstermeleri ve sonsuz çoğalma yetenekleri olarak sıralanabilir.

Primer hücre kültürlerinden veya hücre dizilerinden özel seçim veya klonlama yöntemi ile belirleyici bazı özellikleri olan hücreler elde edilir. Bu hücrelerin kültürde yaşamları süresince belirleyici özellikleri devam eder; hücrelerin pasajlanması ile onların belirleyici özellikleri etkilenmez.

2.8.4. Hücre Kültürlerinin Avantajları

Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilmektedir. Sıcaklık, pH, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay

sağlanırken, canlı vücudunda sabit bir çevre oluşturarak bir takım testleri yapmak daha zordur. Aynı zamanda hücre kültürlerinde örnek homojenitesinin kontrolü sağlanabilmektedir. Hücre kültürü teknikleri ile deney hayvanı kullanımının da sayısı azalarak alternatif yöntemler geliştirilmektedir.

2.8.5. Hücre Kültürlerinin Dezavantajları

Primer kültür ile başlandığında, birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Yani hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusu olabilir.

Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir.

2.9. Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisite, hücresel aktivitenin geri dönüşümsüz olarak durdurulması ve hücresel yapının onarılamaz bozukluğu olarak tanımlanabilir. Sitotoksisite testleri, test maddesinin uygun hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirilmesi amacıyla yapılmaktadır (ISO 7405, ISO 10993).

Sitotoksisite testleri ile genellikle maddelerin; hücre sayısı veya büyümesi, hücre membran bütünlüğü, biyosentez veya enzim aktivitesi ve hücre genetik materyali üzerindeki etkileri ölçülür.

Bir materyalin sitotoksik etkisinin belirlenmesinde kullanılan testler; tekrarlanabilir olmalı, test edilen konsantrasyonları için doz-cevap eğrisini vermeli, hücre sayısı ve test cevabı arasında doğrusal ilişki olmalı ve test sonucunda elde edilen verilerin *in vivo* koşullara yorumlanabilmelidir (Schmalz 1997).

İn vitro sitotoksisite testlerinin avantajları:

- Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasındaki spesifik bir fonksiyon değerlendirilir.
- Çok sayıda örnek kısa zamanda ve ekonomik olarak incelenebilir.
- Kantitatif sonuçlara ulaşılabilir.
- Test yöntemleri standardize edilebilir.

İn vitro sitotoksosite testlerinin dezavantajları:

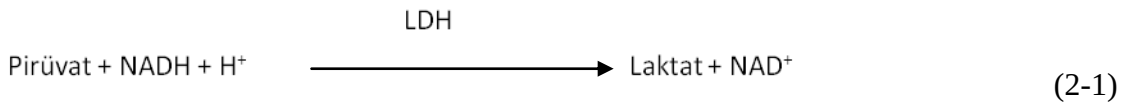
- Her test için bir tür hücre kullanılması,
- Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
- Kültür ortamında doku koruyucu mekanizmalarının olmamasıdır (Schmalz 1997).

Sitotoksosite çalışmaları için genellikle hücre metabolizmasında oluşan değişikliklerin tespit edildiği testler kullanılır. Metabolizma testlerinde 96-kuyucuklu mikropalakalara yerleştirilmiş hücrelerin canlılıkları mikropalaka okuyuculu spektrofotometre yardımıyla tespit edilir. Bu yöntemler çok sayıda örneğin incelenmesine olanak veren, hızlı, besiyeri ortamı ve kullanılan plastik malzeme miktarını azalttığı için ucuz olan ve genellikle tayinleri kolorimetrik olarak yapılan yöntemlerdir.

In vitro hücre topluluğunda, %50 oranında hücre ölümüne neden olan konsantrasyon IC_{50} olarak ifade edilir ve sitotoksitenin gösterilme biçimidir.

2.9.1. Laktat Dehidrojenaz Tayini (LDH Testi)

LDH, tüm hücrelerde var olan stabil bir sitoplazmik enzimdir ve hücre lizisi veya membran hasarı oluştuğunda hızlıca hücre kültürü süpernatantına salınır. Bir test materyeli ile inkübasyon sonrası, plazma membranındaki değişimleri belirleyen hızlı ve basit bir testtir. LDH, nikotinamid adenine dinükleotidin (NADH) NAD^+ ’ye oksidasyonu ile piruvatı laktata indirger (2-1). NADH tüketimi spektrofotometrede 340 nm’deki düşüş ile ölçülür. LDH testi ile maddenin IC_{50} , membran bütünlüğü ve hücre canlılığı üzerine etkisi hakkında bilgi edinmek mümkündür.



2.9.2. MTT Testi

Test, canlı hücrelerde MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür) bileşiğinin tetrazolyum halkasının mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır. Soluk sarı renkli MTT, tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli

formazan kristallerine dönüşür (Kawahara ve ark. 1968). Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluştururken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluşturmaz. Oluşan mavi-mor renkli kristaller isopropil alkol veya dimetilsülfoksit ile çözündürülerek oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm’de ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitoksisitesi belirlenir (Kildal ve Ruyter 1994, Kehe ve ark. 2001).

2.9.3. XTT Testi

Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid), MTT testinde olduğu gibi metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz enzim sistemi aracılığıyla suda çözünebilen turuncu renkli bir formazan boyaya dönüşür ve elde edilen sonuçlar 450-490 nm’de spektrofotometrede ölçülür. MTT testindeki gibi çözündürme aşamasını içermeyen bu test günümüzde hücre çoğalması ve canlılığının belirlenmesinde ve sitotoksisite analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve Williams 2001, Wataha 2001). XTT testi ile maddenin IC₅₀, metabolik toksisite ve solunum zinciri üzerine etkisi hakkında bilgi edinmek mümkündür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Absolü alkol	Sigma-Aldrich 32221
Agaroz	Sigma A5093
Alkali fosfataz	Biomatik A1130
Amonyum asetat	Riedel 25006
Amonyum bikarbonat	Sigma-Aldrich A6141
Amonyum persülfat	Sigma-Aldrich 248614
Asetik asit	Riedel 27225
Bisulfit modifikasyon kiti	Zymo Research D5005
CpG Metiltransferaz (M.SssI)	NEB M0226S
Çinko klorür	Merck 7815
2-deoksiadenozin monohidrat	Amresco 0456
2-deoksiguanozin monohidrat	Amresco 0475
2-deoksisitidin	Sigma D3897
2-deoksitimidin	Amresco 0481
DNA göstergesi (50 bç)	Fermentas SM0371
DNA göstergesi (100 bç)	Fermentas SM0321
DNA izolasyon kiti	Roche 11796828001
DNA saflaştırma kiti	Roche 11732668001
Dubelco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri (DMEM) (4,5 g glukoz içeren)	Wisent 319020CL
Etidyum bromür	Sigma E8751
Etilendiamin tetra asetik asid (EDTA)	Sigma E5134
Fetal sığır serumu (FBS)	Wisent 080110
Fosfat tamponu (PBS-CMF) (kalsiyum ve magnezyumsuz)	Wisent 311012CL

Fosfat tamponu (PBS)	Wisent 311010CL
Fumonisin B1	Sigma F1147
Gliserin	Merck K32593693
Ham's F12 besiyeri	Wisent 318010CL
Hidroklorik asit	Merck 6216865
Hot-start PCR master karışımı	NEB M04842
Kloroform	Riedel 24216
Klorofom:izoamil alkol çözeltisi (24:1)	Sigma C0549
Metanol	Merck K3681508
5-metil-2-deoksisitidin	MP Biomedicals 198883
Nukleaz P1	Sigma N8630
Penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) çözeltisi	Wisent 450201EL
Poliakrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (29:1)	Sigma A2792
RNase A	Fermentas EN0531
RNase T1	Roche 10109193001
Sitotoksikite test kiti	Xenometrix
Sodyum asetat	Sigma-Aldrich 32319
Tetra etil metilen diamin (TEMED)	AppliChem A1148
Tripsin	Biomart A4027
Triton X-100	Sigma T8787
Trisma baz	Wisent 600127LG

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı pipetler (1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf

Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (30-300 µL)	Eppendorf
Blok ısıtıcı	SBH130D-Stuart
Buzdolabı (+4°C)	5231 NFY-Arçelik
CO ₂ 'li inkübatör	Heracell 150i-Thermo-Scientific
Çalkalamalı blok ısıtıcı	TS-100C-Biosan
Çalkalayıcı	Kottermann
Derin dondurucu (-20 °C)	2041 D-Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	Wisecry-Daihan-Scientific
Dikey elektorforez sistemi	Owl B-Thermo-Scientific
Elektroforez güç kaynağı	EC 300 XL2-Thermo-Scientific
Elektronik hassas terazi	XB 220 A-Precisa
Etüv	Nüve
Faz-kontrast invert mikroskop	CKX4-Olympus
Hassas terazi	H20-Mettler
Jel görüntüleme sistemi	QuantumST4-Vilber Lourmat
Laminar kabin ('Biosafety Level 2')	Tezsan
Mikroplaka okuyucu spektrofotometre	Biotek-Epoch
Mikrodalga fırın	MD 1510 S-Beko
Mikrosantrifüj aleti	Micro 120-Hettich
Mini orbital çalkalayıcı	SSMI-Stuart
Mobil faz filtre sistemi	Phenomenex
Otomatik pipetör	Eppendorf
Otoklav	HV-50L-Hirayama
pH metre	HI 1131 B-Hanna
Bidistile su cihazı	Millipore-Gradient

Soğutmalı mikrosantrifüj	Micro 200R-Hettich
Spektrofotometre	UV-1200-Shimadzu
Su banyosu	WB14-Memmert
Spin santrifüj	C1301B-Labnet
Termal döngü cihazı-Altın blok	9700-Applied Biosystems
Termal döngü cihazı-Gradient	Therm-1000-Axygen
UV transilluminator	Bencthop 3UV-UVF
Vakum pompası	ES 35-Speedivac
Vorteks	NC 28405-Ika
Yatay elektroforez sistemi	Owl P81-Thermo-Scientific

Yükek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemi

HPLC sistemi	Shimadzu LC-20A
Sistem kontrol ünitesi	Shimadzu CBM-20A
Pompa ünitesi	Shimadzu LC-20AD
Degazer ünitesi	Shimadzu DGU-20A5
Kolon fırını	Shimadzu CTO-10AS
Photodiode array UV-VIS detektör	Shimadzu SPD-M20A
Otomatik örnekleyici	Shimadzu SIL-20AHT
Yazılım programı	LC-Solution
Bilgisayar ve yazıcı	HP L1706 ve Xerox
HPLC kolonu (Snergy, 4 μ m, C ₁₈ , Polar RC 80A, 250 mm $\times$ 4,6 mm)	Phenomenex
Koruyucu kolon (C ₁₈ , 5 μ m, 4mm Lx3.0 mm ID)	Phenomenex

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Cerrahi maske	Broche
DNA saklama kutusu	Greiner bio-one

Enjektör (10 mL; 50mL)	Set inject
Enjektör ucu steril filtre (0,22 µm naylon)	Minisart-Sartorius
Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Hücre kültürü flaskı (25 cm ² ; 75 cm ²)	Nest
İnce duvarlı PCR tüpü (0,2 mL)	Greiner bio-one
Kryo vial (2 mL)	Greiner bio-one
Lateks eldiven	Broche
Mikroplaka (6; 24; 96 kuyucuklu)	Nest
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner bio-one
Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Nitril eldiven	Broche
Otoklav Bandı	Sussex
Otoklavlanabilir schott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Pastör Pipeti (2 mL)	Greiner bio-one
Phase-lock gel light (1,5 mL)	Prime 2302800
Pipet ucu (0,1-10 µl; 30-300 µl)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5-10 µl; 2-20 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl)	Nest
Santrifüj filter ünitesi	Millipore-Amicon Ultra-0,5
Serolojik pipet (10 mL; 50 mL)	Greiner bio-one

3.4. Hücre Kültürü

3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği

Deneyler İ. Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Cam malzemeler musluk altında 7-8 defa bol su ile alkalandılar ve sodyum hipoklorit (amaşır suyu) içeren distile su dolu kovada 1 gece bekletildiler. Ertesi gün tekrar musluk altında 7-8 defa yıkanarak çamaşır suyunun malzemelerden tamamen uzaklaştırılması sağlandı ve 1 gece distile su içeren kovada bekletildi. 40°C’lik etüvde kurutulan cam malzemeler, 165°C’de 2 saat süre ile kuru-sıcak hava sterilizasyonuna tabi tutuldular. Isıya dayanıklı pipet uçları, mikrotpler, schott şişelerin kapakları gibi plastik malzemelerin ve hazırlanan çözeltilerin sterilizasyonu otoklavda 121°C’ de 3 atm basınçta 15 dk.da gerçekleştirildi. Besiyeri ve serum gibi ısıya dayanıksız çözeltiler ise 0,22 m’lik steril filtrelerden geçirilerek steril edildi.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışma alanları ve laminar kabinin içi %70’lik alkol ile düzenli olarak temizlendi. Çalışma ncesi ve sonrasında belli sreler ile hücre kültürü laboratuvarı ve laminar kabinin UV lambaları açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Hücre kültürü laboratuvarında çalışırken tek kullanımlık galoş ve eldiven kullanıldı, laboratuvar önlüklerinin ise başka çalışmalarda kullanılmamasına zen gösterildi.

3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini

Normal sıçan böbrek epitel hücreleri (NRK-52E, CRL-1571) ve normal sıçan karaciğer epitel hücreleri (Clone 9, CRL-1439) Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri kriyovialler içerisinde -196°C de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan zeltiler

Tripsin/EDTA zeltisi (%0,2 / %0,04): 0,2 g tripsin ve 0,04 g EDTA tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü. Otoklavda 120°C’de 15 dk. steril edildi. Porsiyonlanarak -20°C’de saklandı.

Fetal sığır serumu (FBS): Hazır inaktive edilmiş FBS kullanıldı. Ancak, FBS inaktive edilmemiş ise; 56°C’de 30 dk. inkübe edilerek inaktive edildi ve daha sonra kullanıldı. FBS, besiyerine eklenmeden önce 0,2 m steril filtreden geçirilerek steril edildi. -20 °C’de saklandı ve 37 °C’de çözündürülerek kullanıldı.

Böbrek epitel hücreleri için besiyeri: 10 mL inaktive edilmiř FBS (%10), 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 g/mL) zeltisi (%1) DMEM (yüksek glukoźlu) besiyeri ile 100 mL’ye tamamlanarak hazırlandı. Çalıřmaya bařlamadan önce besiyeri

37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

Karaciğer epitel hücreleri için besiyeri: 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) çözeltisi (%1) DMEM (yüksek glukozlu) besiyeri ile 100 mL’ye tamamlanarak hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37°C’lik su banyosunda 1-2 dk. çözülene kadar bekletildi. Vial kapağının su ile temas etmemesi için dikkat edildi. Vial %70’lik alkol ile silindi ve laminar kabin içine alındı. Hücreler, %10 FBS içeren besiyeri bulunan 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı, besiyerinde süspande edildi ve 1500 rpm’de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti besiyerinde tekrar süspande edildi ve DMSO’nun toksik etkisinden kurtulmak amacıyla işlem tekrar edildi. Daha sonra, hücre pelletine 1 mL besiyeri eklendi, yavaşça pipetleme yapılarak hücreler süspande edildi ve 7-10 mL besiyeri içeren 25cm²’lik ya da 75 cm²’lik flasklara ekildi. Flasklar 37 °C’de % 5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakıldılar.

3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)

Hücre kültür flasklarının tüm yüzeyini kaplamış halde bulunan yoğunlaşmış hücreler için ‘konfluent durumda’ ifadesi kullanılır. Hücreler konfluent duruma geldiğinde pasajlandılar. Pasajlama için flask inkübatörden alındı, laminar kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Hücrelerin yüzeyi 2 mL kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (CMF-PBS) ile yıkandı. Bu adım, tripsin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntılarını uzaklaştırmak amaçlı yapılır. Yıkama işleminden sonra PBS döküldü ve 2 mL tripsin/EDTA çözeltisi ilave edildi, flask 37°C’de %5CO₂’li inkübatörde 5-10 dk. bekletildi. Tripsin ile hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlanır. Hücrelerin tripsin içinde gereğinden fazla beklememesi için mikroskop ile yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmelidir. Tripsin aktivasyonunu durdurmak amacıyla flaska 2-3 mL besiyeri eklendi, pipetleme yapıldı ve hücreler 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm’de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet 2 mL besiyeri ile süspande edildi. Hücreler hemasitometrede sayılarak, yaklaşık 10⁵ hücre/mL olacak şekilde içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekildi. Flasklar, %90

bağıl nem, 37°C’de %5CO₂’li inkübatörde inkübe edildiler. Hücre dizisinin devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi ortalama haftada 2 kez tekrarlandı.

3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

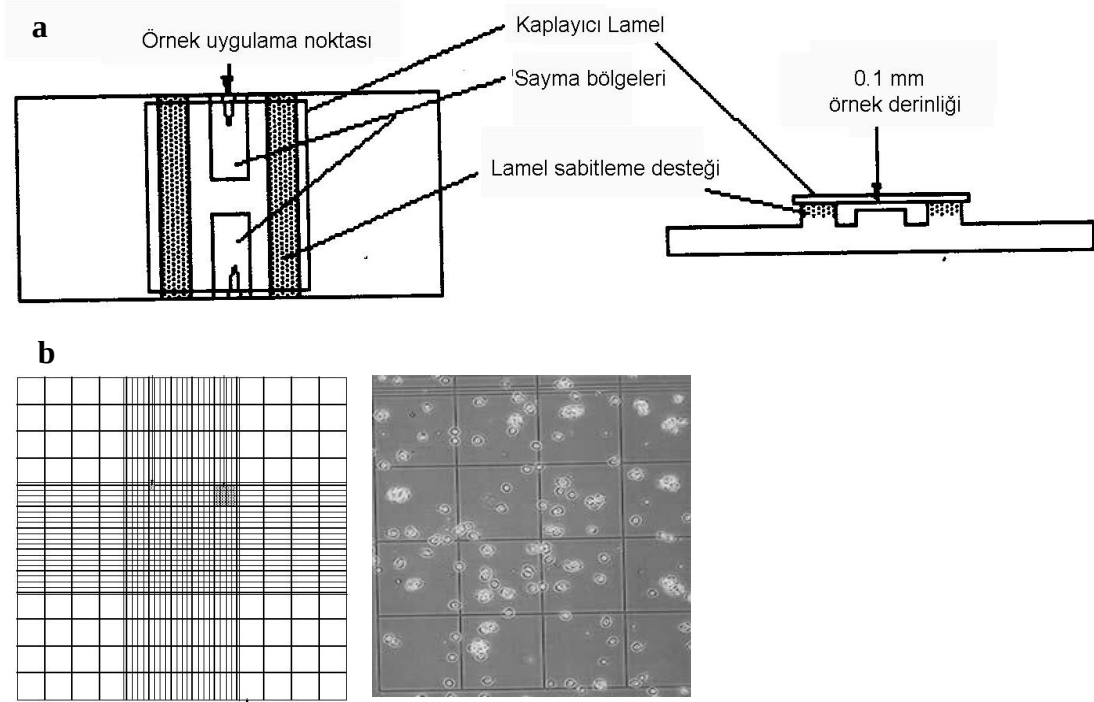
Hücre kültüründe meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklar ile dondurularak saklandılar. Bölüm 3.4.5.’de elde edilen hücre pelletinin üzerine 800 µl FBS, 200 µl 55°C’ye ısıtılmış gliserin eklendi. Pastör pipeti ile pipetleme yapılarak karıştırıldı. Yaklaşık 10⁷ hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları soğuğa dayanıklı kriyoviallere aktarıldı, sırasıyla -20°C’de 30 dk., -80°C’de 16-24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

3.4.7. Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımı tripan mavisi testi ile yapıldı. Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, ölü hücrelerin bozulmuş hücre membranlarından boyayı hücre içerisine alabilmeleri esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

Hücre sayımı için thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4x16 küçük kareden oluşan özel sayım lamaları kullanıldı (Şekil 3-1). Hücre süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (3-1):

$$\text{Toplam hücre sayısı/mL} = \text{Sayım sonucu} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4 \times \text{Besiyeri miktarı (mL)} \quad (3-1)$$



Şekil 3-1: a) Hemasitometre lamı. b) Hemasitometre lamında hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri.

3.4.8. Hücre Dizisinin Üreme Zamanının Hesaplanması

Üreme zamanı (ikilenme zamanı, ‘doubling time’) bir hücre bölünmesi için geçen süredir ve hücreleri karakterize etmek için kullanılır. Hücrelerin büyüme oranı, hücreler genetik olarak değişmedikçe ve kontamine olmadıkça kontrollü koşullar altında değişmemeleri gerekir. Bu nedenle, üreme zamanındaki değişiklikler popülasyondaki değişikliklerin bir göstergesidir. Aynı zamanda hücre dizilerinin ikiye katlanma zamanının belirlenmesi, uygulanacak test materyalleri ile hücrelerin en az kaç saat muamele edilmesi gerektiğinin anlaşılmasında da önemli rol oynar. Bu amaçla, NRK-52E ve Clone 9 hücre dizilerinin 3 gün boyunca çoğalma miktarları ve ikiye katlanma zamanları belirlendi.

Hücre dizileri, hemositometrede sayılarak 5×10^4 hücre/mL olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi, 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat inkübe edildiler. Kültür kaplarının üç kuyusu üçer kez CMF-PBS ile yıkandı ve 100 µl Tripsin/EDTA ilave edilerek 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 15 dk. inkübe edildi. Tripsin/EDTA uygulanan kuyulara 900 µl serumlu besiyeri ilave edilerek hücreler süspande edildi. Hücre süspansiyonundan 100 µl ve tripan mavisi çözeltisinden de 100 µl alınarak 1:1 oranında karıştırıldı ve hücrelerin hemositometrede sayımları yapıldı. Bu işlem her 24 saatte bir üç kuyudaki hücreler sayılacak şekilde toplam 3 gün (72 saat)

boyunca tekrarlandı. Hücrelerin birbirlerinin çoğalmalarını engelleyici maddeleri besiyerine bırakmaları (kontakt inhibisyon) ve kuyularda fazla miktarda olan hücrelerin besiyerinin pH'sını değiştirmesi sebebiyle 3. günün sonunda her gün olmak koşulu ile besiyerleri taze serumlu besiyeri ile değiştirildi. İkilenme zamanı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Ebato ve ark. 1988) (3-2):

$$DT = (t - t_0) \log_2 / \log N_t - \log N_0 \quad (3-2)$$

DT: İkilenme zamanı

t, t₀: Hücrelerin sayıldığı zaman

N_t: t zamanındaki hücre sayısı

N₀: başlangıçtaki hücre sayısı

Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda sayıldı, log₂ tabanına göre hesaplandı ve t (t₁, t₂, t₃, t₄) değerleri elde edildi. 1. Gün t₀ değeri olarak kabul edildi. Her bir t değeri, t₀ değerinden çıkarıldı. İnkübasyon sürelerinin elde edilen değerlere oranı üreme zamanını göstermektedir. Çalışmada kullanılan NRK-52E ve Clone 9 hücre dizileri için üreme zamanı 24 saat olarak tespit edildi.

3.5. Sitotoksiste Testleri

3.5.1. LDH ve XTT Testi

LDH ve XTT testlerini içeren 2 parametrelili sitotoksiste test kiti Xenometrix firmasından satın alındı.

Kit içeriği:

LDH I (Seyreltme çözeltisi)	360 mL
LDH II (NADH)	260 mL
LDH III (Piruvat)	60 mL
XTT I (Substrat)	66 mL
XTT II (Tampon)	0,66 mL

Saklama koşulları:

LDH I ve LDH III: 4°C'de saklandı.

LDH III: -20°C'de 2 aya kadar saklandı.

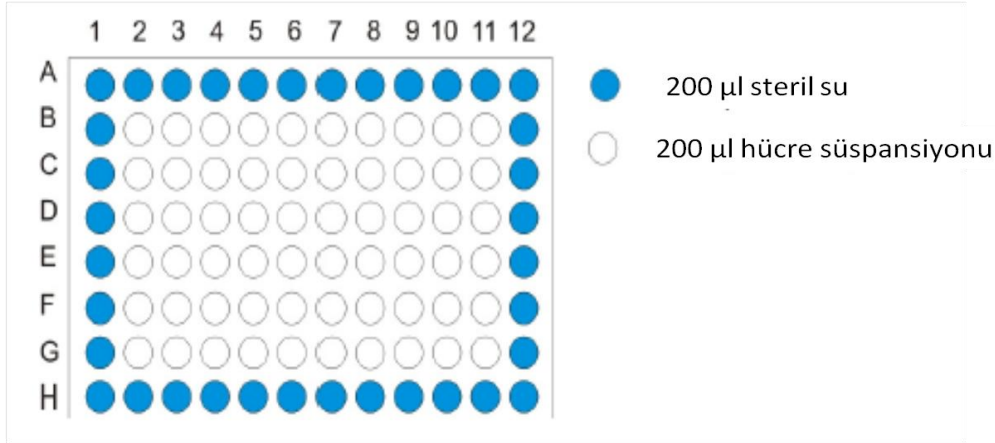
LDH II: -20°C’de saklandı. Seyreltildikten sonra en fazla bir gün 4°C’de muhafaza edildi. Uzun süreli muhafaza edilmesi gerektiğinde -20°C’de tutuldu. LDH II beyaz ile açık sarı arasında bir renge sahip olmalıdır. Aksi takdirde kullanılmamalıdır, testin hassaslığı bozulabilir. LDH II ve LDH III’ün içerikleri şişe duvarına yapışabilir. Bu durumda gerekli miktarda LDH I ilavesi ile şişe alt üst edilerek tüm içeriğin çözünmesi sağlanmalıdır.

XTT I ve XTT II: -20°C’de dondurma ve çözme işleminin sürekli tekrarlanmaması için porsiyonlanarak saklandı. Hücre kültürü ve reaktiflerdeki mikrobiyal kontaminasyon XTT’nin kırılmasına ve XTT formazan formuna dönüşmesine sebep olabilir ve bu nedenle hatalı sonuçlar ortaya çıkabilir.

3.5.1.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanışı

Hücre kültürlerinin mikroplakalara uygulanması esnasında kuyucuklarda düzensiz hücre yoğunluğu olabilir. Hücre süspansiyonunun homojen olduğundan emin olunmalı ve hücre topraklarının oluşumu engellenmelidir. Testin uygun hassasiyette olması için test esnasında hücrelerin yakın bitişiklikte olması gerekir. Doğru hücre sayısı, hücrelerin büyüklüğü, hücrelerin ikilenme zamanı ve deney öncesi kültür fazının süresine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Örneğin; fare fibroblastları gibi ortalama büyüklükteki yapışık hücreler için ve 48 saatlik kültür fazı için, her bir kuyucuğa 20×10^3 hücre ekilmesi tavsiye edilir. Daha az hücre sayısı, daha büyük hücreler ve daha uzun maruziyet süresi söz konusu olduğunda düşünülebilir. Tez çalışmasında ise; NRK-52E ve Clone-9 hücreleri için her bir kuyucuğa 10^4 hücre ve 24 saatlik kültür fazı uygulandı.

Her bir kuyucuk için 10^4 hücre 200 µl besiyeri içinde olacak şekilde hazırlandı. Steril bir rezervuar içerisine steril bidistile su konuldu. İnkübasyon sırasında kültür besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla A ve H sıraları ile 1. ve 12. sütunların her bir kuyucuğuna 200 µl su dağıtıldı. Aynı steril rezervuar içerisine hücre süspansiyonu konuldu ve 96 kuyucuklu mikroplakanın kalan tüm kuyucuklarına bu hücre süspansiyonundan 200 µl dağıtıldı (Şekil 3-2). 96 kuyucuklu mikroplaka 37°C’de %5CO₂’li inkübatörde 24 saat ya da 1 gece inkübe edildi.



Şekil 3-2: 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimi.

3.5.1.2. Negatif Kontrol ve Total LDH Kontrolünün Hazırlanışı

Her bir mikropalaka için; 4,5 mL besiyeri ile 500 µl çözücü (PBS) karıştırıldı (solvent kontrolü=SC). %1 Triton X-100 içeren 700 µl besiyeri hazırlandı (total LDH kontrolü=TL).

3.5.1.3. Sitotoksosite Testleri için FB1 Çözeltilerinin Hazırlanışı

96 kuyucuklu mikropalakalarda örneklerin düzeni Şekil 3-3'de gösterilen çizelgeye uygun bir şekilde yapıldı. Bu durumda; bir mikropalakada FB1 tek başına 3 tekrarlı ve 8 seri dilüsyonu şeklinde, negatif ve pozitif kontroller ile birlikte değerlendirildi. FB1, 1xPBS içinde çözündürüldü ve 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakalarda bulunan 200 µL besiyeri içindeki hücrelere uygulandı.

3.5.1.4. Sitotoksosite Tayini için FB1'in Hücre Dizilerine Maruziyeti

Hücreler mikroskopta incelenerek hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları incelendi. Steril koşullarda 8 kanallı mikropipet kullanılarak kültür besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Kuyucuk yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin zarar görmemesine dikkat edildi. Besiyerinin uzaklaştırılmasının ardından, vakit kaybedilmeden FB1 içeren besiyeri eklendi. Bu aşamada hücre ölümü veya stresine neden olabilecek hücre tabakasının kurumamasına özen gösterilmelidir. Sitotoksosite testleri aynı düzende 2. farklı bir günde de tekrar edildi.

Şekil 3-3'de gösterildiği üzere doz kofigürasyonu şu şekilde yapıldı:

1. B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 200 µl besiyeri konuldu (hücre büyümesi kontrolü=GC).
2. E11, F11 ve G11 kuyucuklarına 200 µl %1 Triton X-100 içeren besiyeri konuldu (total LDH kontrolü=TL).
3. İçerisinde hücre bulunan E2, F2, G2, B11, C11, D11 kuyucuklarına 200 µl besiyeri:çözücü karışımından koyuldu (solvent kontrolü=SC).
4. İçerisinde hücre bulunmayan 1 ve 12 sütunlarının kuyucuklarına 200 µl besiyeri:çözücü karışımından koyuldu (blank=B).
5. 3 numaralı sütunun B, C, D kuyucuklarına FB1'in en düşük konsantrasyonundan (X1) 200 µl, 4 numaralı sütunun B, C, D kuyucuklarına test bileşiğinin 2. konsantrasyonundan (X2) 200 µl konuldu. Aynı şekilde, test bileşiğinin diğer konsantrasyonlarından (X3-X8) da 10 numaralı sütuna kadar 200 µl dağıtıldı
6. Mikroplaka 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	B	GC	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	SC	B
C	B	GC	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	SC	B
D	B	GC	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	SC	B
E	B	SC	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	TL	B
F	B	SC	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	TL	B
G	B	SC	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	TL	B
H												

A + H sıraları:	Steril bidistile su
B:	Kültür besiyeri + hücresiz çözücü (negatif kontrol)
GC:	Kültür besiyeri + hücreler (hücre büyüme kontrolü)
SC:	Kültür besiyeri + hücreler + çözücü (solvent kontrolü)
TL:	Kültür besiyeri + hücreler + %1 triton X-100 (total LDH kontrolü)
X1, X2, ..., X8:	Kültür besiyeri + hücre FB1'in 8 farklı konsantrasyonu

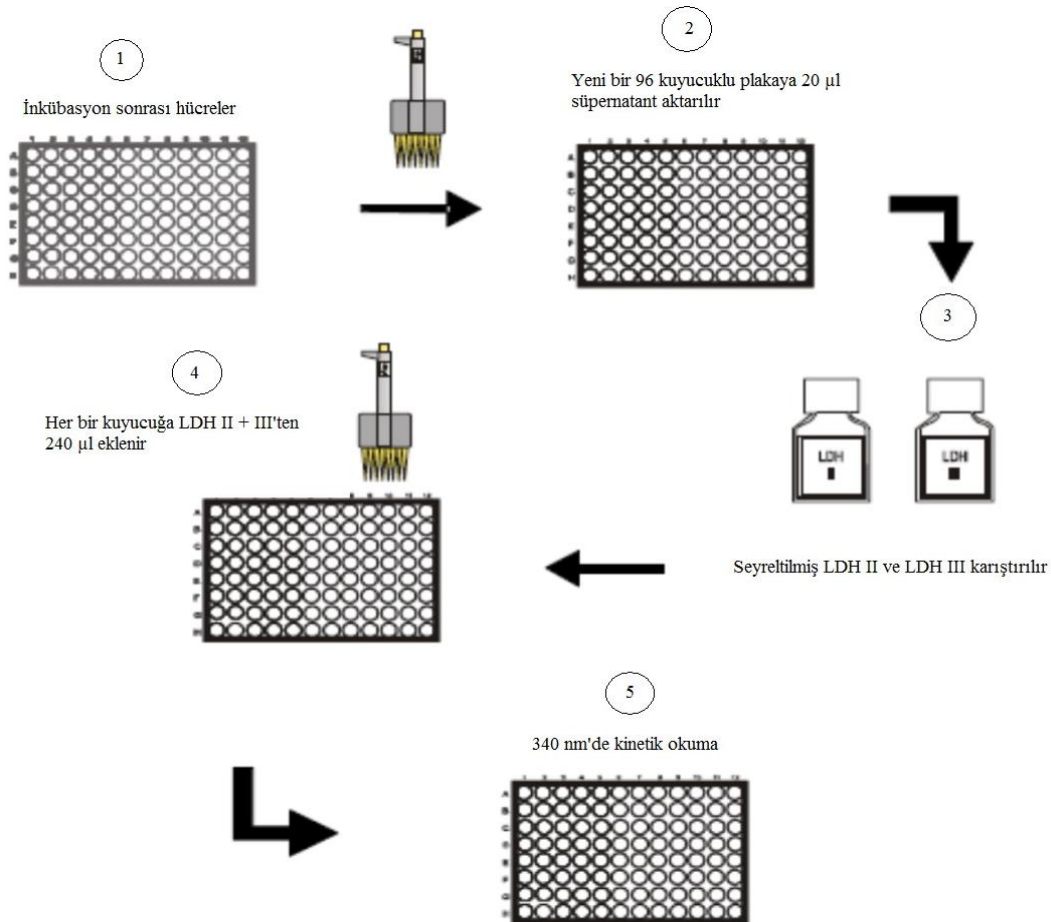
Şekil 3-3: 96 Kuyucuklu mikroplakaya FB1 maruziyetinin şematik gösterilmesi.

3.5.1.5. LDH Test Protokolü

LDH test protokolü Şekil 3-4'de şematize olarak gösterilmiştir. Kullanmadan hemen önce LDH II (130 mL) ve LDH III (60 mL) LDH I içinde çözündürüldü. Bu miktarlar, LDH II için 8 adet, LDH III için ise 16 adet mikroplakaya uygulama için

yeterlidir. Kullanmadan önce LDH I, II ve III çözeltileri 37 °C’de ısıtıldı. Diğer işlemler sırasıyla aşağıdaki gibi yapıldı:

1. 96 Kuyucuklu mikrolaka inkübatörden çıkarıldı.
2. 8 Kanallı mikropipet ile B’den G’ye olan sıralardaki kuyucuklardan 20 µl süpernatant yeni bir 96 kuyucuklu mikrolakaya aynı düzende aktarıldı. Orijinal 96 kuyucuklu mikrolaka XTT testi için inkübatöre geri konuldu.
3. 16 mL LDH II ve 3,4 mL LDH III karıştırıldı (1 mikrolaka = 72 kuyucuk için).
4. LDH II/ LDH III karışımından 240 µl tüm kuyucuklara eklenerek reaksiyon başlatıldı.
5. Oluşabilecek baloncuklar ölçümde hataya sebep olabileceğinden dolayı; gaz alevi, azot altında veya saç kurutma makinesi ile uzaklaştırılmalıdır. Ardından hemen mikrolaka okuyucu spektrofotometrede oda sıcaklığında 340 nm’de 5 dk. aralıklar ile 1 saat boyunca mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede kinetik ölçüm yapıldı.

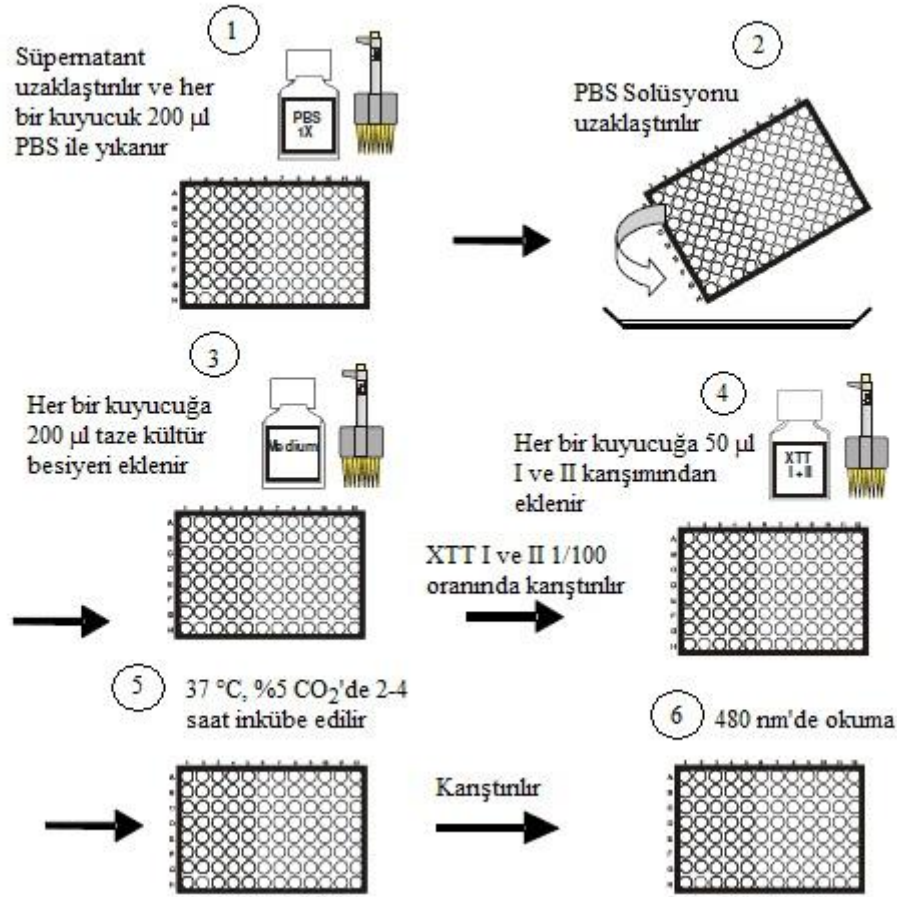


Şekil 3-4: LDH test protokolü.

3.5.1.6. XTT Test Protokolü

XTT test protokolü Şekil 3-5’de şematize olarak gösterilmiştir. İşlemler sırasıyla aşağıdaki gibi yapıldı:

1. XTT solüsyonları 37°C’de su banyosunda berrak bir görüntü elde edilinceye kadar ısıtıldı.
2. 96 kuyucuklu mikrolaka inkübatörden çıkarıldı.
3. Hücreler PBS ile yıkandı ve test maddesi ile boyanın etkileşmemesi için her kuyucuğa taze kültür besiyerinden 200 µl eklendi.
4. Kullanımdan hemen önce XTT I ve XTT II solüsyonları 100:1 oranında karıştırıldı 1 mikrolaka (= 72 kuyucuk için) 4 mL XTT I ve 40 µl XTT II karıştırılır.
5. Bu karışımdan blank kuyucukları dahil tüm kuyucuklara 50 µl dağıtıldı.
6. Mikrolaka 37°C’de %5 CO₂’li ortamda 2-3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi hücrenin cinsi ve maksimum hücre yoğunluğuna göre 1-4 saat arasında değişiklik gösterebilir. İnkübasyon süresince gözle yapılan inceleme sonucunda blank ile solvent kontrolü arasında belirgin bir fark var ise inkübasyon süresini uzatmak gerekli değildir. Tez çalışması için 1 saatlik inkübasyonun yeterli olduğu gözlemlendi.
7. Kuyucukların içeriği dikkatli bir şekilde aşağı ve yukarı pipetleme yöntemiyle ya da orbital karıştırıcıda karıştırıldı, aynı zamanda baloncuklar da uzaklaştırıldı.
8. Mikrolaka okuyucu spektrofotometrede 480 nm’de 690 nm referans dalgaboyu alınarak absorbans ölçümü yapıldı.



Şekil 3-5: XTT test protokolü.

3.5.1.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

FB1 içermeyen kuyucukların (solvent kontrol) absorpsiyon değerleri %100 canlılığı gösterir (E2, F2, G2, B11, C11 ve D11). Solvent kontrollerin (SC) 96 kuyucuklu mikropakanın sağ ve sol kenarında bulunmaları sistematik hataların belirlenmesini sağlar. Testin uygunluğu için, sağ ve sol taraftaki solvent kontrollerin ortalamaları ile tüm solvent kontrollerin ortalamaları arasında %15'ten fazla fark olmaması gerekir.

Hücre büyüme kontrolleri (GC) solventin etkisini belirlemeyi sağlar. Eğer solvent kontrollerin değerleri büyüme kontrolleri ile ciddi oranda fark gösterirse, test bileşiklerinin inhibisyon değerleri dikkatle yorumlanmalıdır. Mümkünse farklı bir solvent seçilmelidir.

LDH testi için hesaplama: 340 nm'deki absorbens değerleri 5'er dk. aralıklar ile 1 saat boyunca kinetik olarak ölçüldü. Kinetik ölçmenin ardından absorbens değerleri ile zaman (dk) grafiği çizilip test bileşiğinin aktivitesinin blank, solvent kontrolü, hücre büyüme kontrolü ve LDH kontrolü ile karşılaştırılması mümkün oldu. Bu grafikten 12 ölçüm içerisinde eğrinin en linear olduğu zaman aralığı seçildi. Genelde ilk 10 dk. değerlendirilmez. Her kuyucuk için $\Delta OD/dk$ değerleri hesaplandı. Her bir test maddesi için $\Delta OD/dk$ değerlerinin ortalamaları alındı ve bu değerden ortalama blank değeri çıkarıldı. Hücre dışı LDH "nmol NADH tüketimi/dk/mL" olarak ünite biçiminde ifade edildi (3-3).

$$\text{NADH tüketimi (nmol/dk./mL)} = (\Delta OD_{\text{ort}}/dk \times 0,260 \times 1000) / 6,2 \times 20 \quad (3-3)$$

$\Delta OD_{\text{ort}}/dk$: 340 nm'deki absorbensların ortalaması

0,260: mL'deki reaksiyon hacmi

1000: sonucun 1 mL'ye dönüştürülmesi

6,2: 340 nm'de NADH'ın milimolar tükenme katsayısı

20 μ l: test için alınan hacim

Yukarıda verilen formüle göre tüketilen ünite NADH değeri nmol/dk./mL olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlar; %100 sitotoksik olarak kabul edilen Triton X100 (TL) değerleri ile yüzde olarak orantılandı ve bu şekilde relatif LDH aktivitesi grafik çizilerek hesaplandı.

XTT testi için hesaplama: Herbir kuyucuk için 480 nm'deki ölçülen absorbens değerlerinden 690 nm'de ölçülen absorbens değerleri çıkarıldı. Her bir test maddesi için ortalama OD değerleri hesaplandı. Herbir solvent kontrol ve örnek absorbens ortalama değerlerinden ortalama blank absorbens değerleri çıkarılarak düzeltilmiş OD değerleri elde edildi. Relatif inhibisyon aktivitesi solvent kontrolün yüzdesi olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı (3-4).

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - (\text{düzeltilmiş ort.OD}_{\text{örnek}} \times 100 / \text{düzeltilmiş ort.OD}_{\text{solvent kontrol}}) \quad (3-4)$$

3.6. DNA Metilasyonunun Analizi

3.6.1. FB1'in Hücre Dizilerine Maruziyeti

Her bir 25cm²'lik flaska 1,5x 10⁶ hücre ekildi. CO₂'li inkübatörde 24 saat bekletildi. PBS çözeltisi içinde hazırlanan FB1, 1, 5, 10, 25, 50 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde NRK-52E ve Clone 9 hücrelerine 24 saat uygulandı. Aynı ortam

koşullarında kontrol grupları da oluşturuldu. FB1'in her bir dozu için 2'şer adet flaska ekim yapıldı ve deneyler 2. farklı bir günde tekrar edildi. NRK-52 E hücreleri için 2 farklı günde her bir konsantrasyon 2'şer tekrarlı; Clone 9 hücreleri için 1. günde her bir konsantrasyon 2'şer tekrarlı, 2. günde ise sadece 1'er kere olmak üzere FB1 maruziyet grupları oluşturuldu. Hücreler 24 saat 37°C'lik %5 CO₂'li inkübatörde FB1'e maruz bırakıldıktan sonra toplanarak sayıldı ve DNA izolasyonuna hazır hale getirildi.

3.6.2. DNA İzolasyonu

Hücre kültüründen genomik DNA izolasyonu 'High Pure PCR Template Preparation Kit' (Roche) ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit İçeriği:

Bağlama tamponu: 6 M Guanidin HCl / 10 mM üre / 10 mM Tris HCl / % 20 Triton-X 100 (v/v) (pH 4.4)

İnhibitör temizleme: 5 M Guanidin HCl / 20 mM Tris HCl / alkol (pH 6.6)

Yıkama tamponu: 2 mM Tris HCl / alkol (pH 7.5)

Elüsyon tamponu: 4 M üre / 200 mM Tris / 20 mM NaCl / 200 mM EDTA (pH 7.4)

Deney protokolü:

1. Flasktaki hücreler 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti 1 mL besiyeri ile süspande edildi. 1×10^6 hücre sayılarak 1,5 mL'lik mikrotüpe alındı.
2. 1×10^6 hücre 200 µl PBS içinde süspande edildi.
3. Üzerine 200 µl bağlama tamponu, 40 µl proteinaz K eklendi. Hemen karıştırıldı ve 70°C'de 10 dk. inkübe edildi.
4. Üzerine 100 µl isoproponal eklendi ve iyice karıştırıldı.
5. Kitin içerisinde çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.
6. Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
7. Filtreli tüpe 500 µL inhibitör temizleme tamponu eklendi ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
8. Filtreli tüpe 500 µL yıkama tamponu eklendi ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

9. Yıkama tamponunun kalıntılarını temizlemek üzere bir kez daha 10 sn. santrifüj edildi.
10. Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp 1,5 mL'lik mikrotüp içine yerleştirildi.
11. Önceden 70°C'ye getirilmiş elüsyon tamponundan 200 µL filtreli tüpe eklendi. 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
12. Elde edilen DNA'lar daha sonraki aşamalarda kullanılmak +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.6.3. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

1-50 µM konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrasında NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinden izole edilen DNA'lar bisülfid modifikasyonu öncesinde agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi. Aynı zamanda, elde edilen DNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikropilaka okuyucu spektrofotometrede de ölçüldü. 260 nm'de ölçülen absorbans değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng ya da µg düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. 260 nm dalga boyunda okunan değer ile 280 nm ve 230 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi verir. Saflaştırılmış DNA'da A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranı yaklaşık 1,75-1,8 üzerinde olmalıdır.

3.6.4. Global DNA Metilasyonunun Tayini

5-metilsitozin içeriğinin tayini, global olarak DNA metilasyonundaki değişiklikleri tayin etmede hızlı ve kullanışlı bir parametredir (Christman, 1982; Ramsahoye, 2002; Fuke ve ark. 2004). Bu amaçla, DNA'da 5-metil-2-deoksisisitidin'in (5-mdC) kantitatif tayini, hidrolize DNA'daki serbest deoksiribonükleozidlerin HPLC-UV-DAD sisteminde analizi ile gerçekleştirildi.

3.6.4.1. Kullanılan Çözeltiler

1 M Amonyum asetat, 45 mM Çinko klorür, pH 5,1: 1,927 g Amonyum asetat ve 0,1533 g çinko klorür tartılarak 23 mL bidistile suda çözöldü. Asetik asit ile pH 5,1'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi 25 mL olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.

1,5 M Tris baz: 4.543 g tris baz 23 mL bidistile suda çözöldü. %25'lik amonyak yada HCL yardımıyla pH 8'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi 25 mL olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı.

25 mM Amonyum aseetat, 1 mM Çinko klorür, pH 5,1: 0,048 g Amonyum asetat ve 3.407 mg çinko klorür tartılarak 23 mL bidistile suda çözüldü. Asetik asit ile pH 5,1'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi 25 mL olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı. Bu çözelti nükleaz P1 enzim çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

Nükleaz P1 enzim çözeltisinin hazırlanışı (1 ünite/μl): 247 ünite/mg protein konsantrasyonunda ve 1,36 mg protein miktarında sağlanan nükleaz P1 enzimi toplam 336 ünite enzim içermektedir. 1 ünite/μl konsantrasyona ulaşmak için nükleaz P1, 336 μl '25 mM amonyum aseetat, 1 mM çinko klorür, pH 5,1' çözeltisi içinde çözüldü. Porsyonlara ayrılarak -20°C'de saklandı.

100 mM amonyum bikarbonat çözeltisi, pH 8,0: 0.198 g amonyum bikarbonat 23 mL bidistile suda çözüldü. %25'lik NH₃ ile pH 8'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi 25 mL olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. 4°C'de saklandı. Bu çözelti alkali fosfataz enzim çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

Alkali fosfataz enzim çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg/mL konsantrasyonda gliserin içinde sağlanan alkali fosfataz enzimi, son konsantrasyonu 1 unite/μl olacak şekilde 1,7 mL saklama tamponu (%50 gliserin, 5mM tris, 5mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, pH 7) içinde çözüldü.

Mobil faz tampon çözeltisinin hazırlanışı (50 mM KH₂PO₄ çözeltisi, pH 4,1): 6,804 g KH₂PO₄ 950 mL bidistile suda çözülerek, 1M ortofosforik asit çözeltisi ile pH 4,1'e ayarlandı ve hacmi 1 L'ye tamamlandı. 0,2 μm membran filtreden süzildükten sonra ultrasonik su banyosunda degaze edildi.

Kullanılan deoksiribonükleozid standart çözeltilerinin hazırlanışı: 5-mdC, 2-deoksisitidin (dC), 2-deoksiguanozin (dG), 2-deoksiadenozin (dA), 2-deoksitimidin (dT) ana stok standard çözeltileri bidistile su içinde 5 mM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra dC, dG, dT, dA standartları 100 μM; 5-mdC standardı 4 μM olacak şekilde karışım standard çözeltisi ve bu çözeltiden seyreltmeler yapılarak kalibrasyon eğrisi için karışım standard çözeltileri mobil faz içinde hazırlandı. Çalışma standard çözeltileri -20°C'de cam vial içerisinde saklandı ve analizde kullanılmadan önce sıcaklığının oda koşullarına gelmesi sağlandı.

3.6.4.2. DNA Hidrolizi

İzole edilen DNA'lardan RNA'yı uzaklaştırmak amacıyla; DNA 10 µl RNaseA ve 10 µl RNaseT1 ile 37°C'de 1 saat ve enzimi inaktive etmek için de 70°C'de 15 dk. inkübe edildi. RNase ile muamele edilmiş DNA'lar saflaştırıldıktan sonra hidrolize edildiler. DNA hidrolizi, genomik DNA'nın önce nükleaz P1, daha sonra alkali fosfataz enzimi ile inkübasyonu sonucu deoksiribonükleozidlerine parçalanarak gerçekleştirildi (Chen ve ark., 2010). DNA hidrolizi deneysel aşamaları aşağıda belirtilmiştir:

1. 5 µg izole edilmiş DNA 50 µl bidistile su ile seyreltilerek 0,2 µg/µl konsantrasyonuna ulaşıldı.
2. 1,25 µl tampon '1 M amonyum asetat, 45 mM çinko klorür, pH 5,1' tamponu DNA örneğine eklendi.
3. Üzerine 5 µl 5 ünite nükleaz P₁ (1 ünite/µl) eklendi. Çözelti 37 °C'de 2 saat inkübe edildi.
4. Karışıma, 5 µL 1,5 M 'trisma baz, pH 8' eklendi.
5. Karışıma 5 µl 1 ünite alkali fosfataz (0,2 ünite/µl) eklendi.
6. Karışım 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
7. Hidrolize edilmiş DNA Millipore-Amicon Ultra-0,5 mL'lik santrifüj filtre ünitesi kullanılarak saflaştırıldı. 4°C'de 14.000 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi.
8. Elde edilen DNA hidrolizatı -20° C'de saklandı.
9. HPLC analizi için hacmi 100 µL'ye bidistile su ile tamamlanarak cam viallere konuldu. 50 µL HPLC cihazına enjekte edildi.

3.6.4.3. HPLC Metodu

Deoksiribonükleozidlerin HPLC sisteminde analizi için çeşitli mobil faz sistemleri denenmiş olup, Gehrke (1984) ve Ramsohoye (2002) tarafından uygulanmış olan mobil faz sistemleri modifiye edilerek kullanıldı. Deoksiribonükleozidlerin analizi için optimum kromatografik çalışma koşulları Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Deoksiribonükleozidlerin analizi için optimum kromatografik çalışma koşulları

Kolon:	Phenomenex, Synergi Polar RP C ₁₈ , 250 mm × 4,6 mm, 4µm, 80 Å		
Koruyucu kolon:	Phenomenex, C ₁₈ 5µm, 4mm Lx3.0 mm ID		
Mobil faz:	50 mM KH ₂ PO ₄ çözeltisi, pH 4,1 (A); Metanol (B)		
Gradient sistem:	Süre (dk)	A	B
	0	97,5	2,5
	15	97,5	2,5
	20	90	10
	30	90	10
	31	97,5	2,5
	40	97,5	2,5
Akış hızı:	1 mL/dk.		
Enjeksiyon hacmi:	50 µL		
Kolon sıcaklığı:	35°C		
Pompa basıncı:	Minumun 0 bar, maksimum 300 bar		
Detektör dalgaboyu:	UV-DAD (278 nm)		
Alıkonma zamanı (dk.):	dC: 4,9		
	5-mdC: 6,8		
	dG: 10,7		
	T: 11,9		
	dA: 22,6		

3.6.4.4. HPLC Yönteminin Doğrusallığı

Deoksiribonükleozidlerin standart çözeltilerine karşı detektörün cevabının belli konsantrasyon aralığındaki doğrusallığını belirlemek amacıyla; dC, dG, dT ve dA için 0,5; 1; 2,5; 5; 10 µM ve 5-mdC için ise 0,02; 0,04, 0,1 ve 0,2; 0,4 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde standart karışım çözeltilerinden 4'er adet hazırlandı. Her çözeltiden 4'er kez HPLC cihazına enjekte edildi. Kromatogramlarda her bir deoksiribonükleozid için standartlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak $y=ax+b$ formülüne göre bir kalibrasyon eğrisi çizildi.

3.6.4.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

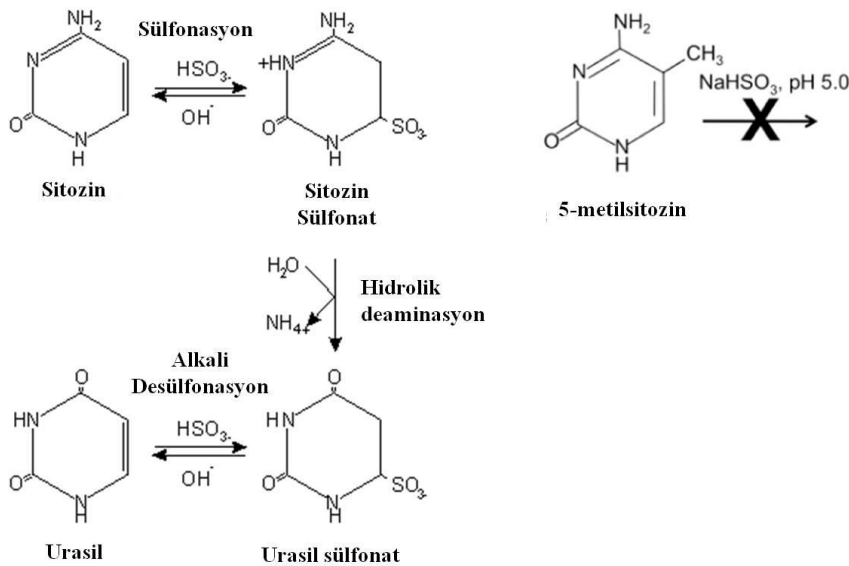
%5-mdC miktarı, " $5\text{-mdC} \times 100 / 5\text{-mdC} + \text{dC}$ " formülü kullanılarak hesaplandı. Aynı zamanda dG miktarının dC miktarı ile eşdeğer olduğu düşünülerek %5-mdC miktarı dG ile de oranlararak sonuçların doğruluğu kontrol edildi.

Elde edilen sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterildi. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS-17 paket programı kullanılarak ANOVA post hoc testlerinden 'Dunnet's multiple comparison' testi uygulandı.

3.6.5. Gene-özgü DNA Metilasyonunun Araştırılması

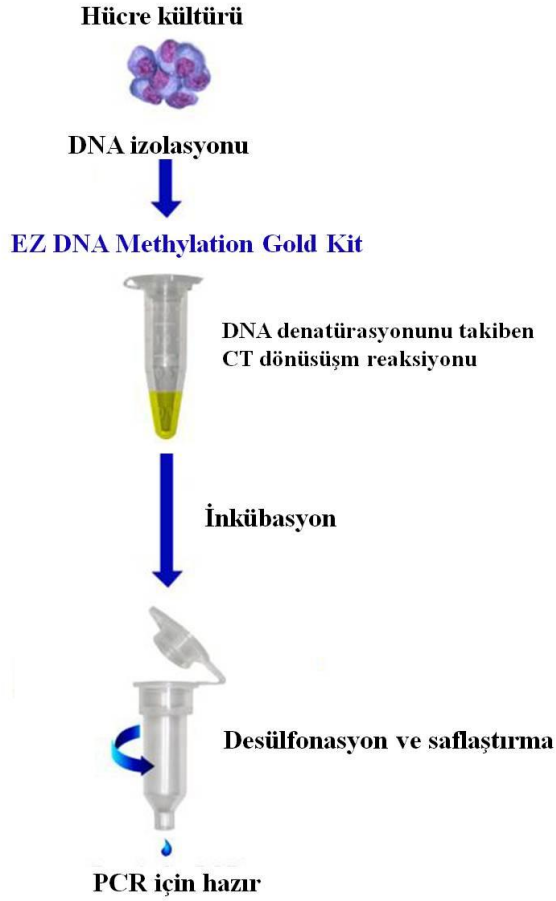
3.6.5.1. Bisülfid DNA Modifikasyonu

DNA örneklerinin bisülfid modifikasyonu, ilk olarak Frommer ve ark. (1992) tarafından tarif edilen ve Clark ve ark. (1994) tarafından modifiye edilen yöntem esas alınarak yapıldı. Yöntemin esası, tek iplikli DNA'daki tüm metillenmemiş sitozinleri sodyum bisülfidin urasile deamine etmesine dayanır. Diğer yandan, metillenmiş sitozinler değişmeden kalır (Şekil 3-6). Böylece metillenmiş ve metillenmemiş DNA'lar arasındaki dizi farklılıklarından yola çıkılarak tayin yapılabilmektedir. Daha sonra, modifiye edilmiş DNA, metillenmiş ve metillenmemiş diziler için özgün olan primer çifti kullanılarak PCR ile amplifiye edilir.



Şekil 3-6: Sitozinin bisülfid ile deaminasyonu reaksiyonu.

Bisülfid modifikasyonu ‘EZ DNA Methylation Gold Kit’ (Zymo Research-D5005) kullanılarak yapıldı (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: Kit ile bisülfid DNA modifikasyonunun şematik gösterimi.

Kit içeriği:

Bağlama tamponu

CT Dönüşüm (modifikasyon) belirtecinin hazırlanması: Kit içinde bulunan toz halindeki CT Dönüşüm belirteci aşağıdaki şekilde hazırlandı:

900 µl su	}	CT dönüşüm belirteci tüpüne eklendi.
300 µl M-seyreltme tamponu		
50 µl M-çözücü tampon		

Vorteks ile oda sıcaklığında karıştırıldı ya da 10 dk. çalkalandı.

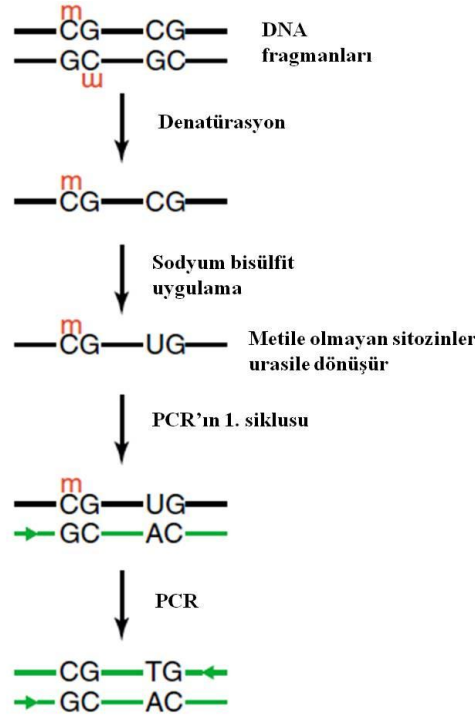
M-Yıkama tamponunun hazırlanması: 24 mL %100'lük etanol 6 mL M-yıkama tamponuna eklendi ve karıştırıldı.

Deney Protokolü:

1. 0,5 mL mikrotüpe 20 µl DNA örneği (0,05 µg/µl) ve 130 µl CT dönüşüm belirteci eklendi. Eğer DNA örneğinin hacmi 20 µl den az ise aradaki fark su ile tamamlanmalıdır.
2. Örnek tüpleri, ısıtıcı blokta 98°C'de 10 dk. ve 64°C de 2.5 saat süre ile inkübe edildi.
3. Filtreli tüp toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine 600 µl bağlayıcı tampon kondu.
4. 2. basamakta inkübasyon sonrası elde edilen örnek bağlayıcı tampon içeren filtreli tüpe kondu. Toplama tüpünün kapağı kapatıldı ve alt üst edilerek karıştırıldı.
5. 14.000 x rpm'de 30 sn. santrifüj edildi. "Toplama tüpünün içindeki sıvı atıldı.
6. 100 µl yıkama tamponu filtreli tüp eklendi. 14.000 x rpm'de 30 sn. santrifüj edildi.
7. 200 µl desülfonasyon tamponu filtreli tüpe eklenir ve oda sıcaklığında (20-30°C) 15-20 dk. bekletildi. İnkübasyondan sonra 14.000 x rpm'de 30 sn. santrifüj edildi.
8. 200 µl yıkama tamponu filtreli tüpe eklendi. 14.000 x rpm'de 30 sn. santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
9. Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp 1,5 mL'lik mikrotüp içine yerleştirildi.
10. 10 µl elüsyon tamponu direkt olarak filtreli tüpe eklendi. 14.000 x rpm'de 30 sn. santrifüj edildi.
11. Elde edilen bisülfite modifiye DNA'lar daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 20°C'de saklandı.

3.6.5.2. Metilasyona-özü PCR (MSP)

E-cadherin, *p16*, *VHL*, *c-myc* ve *p15* genlerinin promotor bölgelerindeki CpG adalarında metilasyon tayini, Herman ve ark. (1996) tarafından tarif edilen yöntem esas alınarak yapılmıştır. Bu yöntemde bisülfite modifikasyonu ile urasile dönüşen sitozinler PCR sırasında adeninle eşleşirler (Şekil 3-8).



Şekil 3-8: Bisülfite modifikasyonu ve PCR amplifikasyonunun metillenmiş ve metillenmemiş dizide şematik olarak gösterilmesi (Zilberman and Henikoff, 2007).

3.6.5.3. *In Vitro* DNA Metilasyonu

Pozitif kontrol olarak *in vitro* metillenmiş DNA; genomik DNA'nın SssI-CpG metiltransferaz enzimi (Zymo Research-E2011; New England Biolabs-M0226S) katalizörlüğünde SAM'ı substrat olarak kullanarak *in vitro* metillenmesi ile hazırlandı.

Reaksiyon Bileşenleri:

10x CpG Reaksiyon tampon	2 µl
20X SAM (12 mM)	1 µl
DNA (1 µg/µl)	1 µl
CpG Metilaz (4 unite/µl)	1 µl
Nükleaz-free su	15 µl

Sırasıyla yukarıdaki reaksiyon içerikleri mikrosantrifüj tübüne konuldu.

30°C'de 1 gece inkübasyon gerçekleştirildi.

3.6.5.4. *In vitro* Metillenmiş DNA'nın Saflaştırılması

Sodyum asetat çözeltisi: 2,4 g sodyum asetat tartılarak 10 mL bidistile suda çözöldü. pH asetik asit ile 6.0'ya ayarlandı. 0,2 µm steril filtreden geçirilerek steril edildi. +4 °C'de buzdolabında saklandı.

1. 20 µl in vitro metile edilmiş DNA çözeltisine 20 µl nükleaz-free su eklendi.
2. İçerisinde jel bulunan 1,5 mL'lik tüp ('phase lock gel light') kullanılmadan önce 11.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi ve DNA çözeltisi jelin üzerine konuldu.
3. Üzerine 1 hacim (40 µl) kloroform:izoamil alkol (24:1) karışımı eklendi.
4. 1 dk. boyunca çalkalandı ve 11.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
5. Üstteki sıvı (40 µl) jel tabakasına değmeden yeni bir ependorf tübüne alındı.
6. Üzerine 0,1 hacim (4 µl) 3M sodyum asetat (pH=6) tamponu ve 2 hacim (80 µl) soğuk absolü etanol eklendi.
7. -80°C'de 1 saat ya da -20°C'de 1 gece bekletildi.
8. 4°C'de, 10.000 x g'de 30 dk. santrifüj edildi.
9. Üstteki sıvı kısım atıldı.
10. DNA pelleti %90'lık soğuk etanol ile yıkandı ve 4°C'de 10.000 x g'de 30 dk. santrifüj edildi.
11. Oda sıcaklığında 10 dk. kurutuldu.
12. DNA pelleti üzerine 20 µl nükleaz-free su eklendi ve 55 °C'de 1 saat inkübe edildi. Metillenmiş DNA sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.6.5.5. Primer Çiftleri

Bazı genlere ait primer çiftleri, "Methyl Primer Ekspres (Applied Biosystems)" ve "Meth Primer" gibi metilasyon analizleri için özgün primer tasarım programları kullanılarak, metillenmiş ve metillenmemiş diziler için genlerin promotor bölgelerinde CpG adalarındaki dizilere uygun olarak tasarlandı. Kullanılan primer çiftleri Tablo 3-2'de gösterilmiştir. Primer çiftleri Elips firması aracılığıyla sağlandı (Integrated DNA Technologies, Amerika Birleşik Devletleri). Tüm primerler 100 pmol/µl konsantrasyonunda olacak şekilde nükleaz-free suda çözülerek stok çözelti hazırlandı. Daha sonra PCR uygulamalarında kullanılmak üzere 10 pmol/µl olacak şekilde seyreltildi ve porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklandı.

Tablo 3-1. MSP için kullanılacak primer çiftleri

Primer set	İleri primer 5' → 3'	Geri primer 3' → 5'	Annealing Sıcaklığı (°C)	Kaynak
<i>e-cadherin</i> – M	gtt ttt agt taa tta gcg gcg tc	aaa ctc aat aat acg ccg cg	60	Niwa ve ark., 2005
<i>e-cadherin</i> – U	gtg ttt tta gtt aat tag tgg tgt t	ctt aaa aac tca ata ata cac cac a	57	
<i>p16</i> – M	aat tcg agg aga gcg att cg	aac gtt taa taa aac ccc ga	55	Swafford ve ark., 1997
<i>p16</i> – U	gtg aat ttg agg aga gtg att tg	caa aac att taa taa aac ccc aa	55	
<i>VHL</i> – M	gta cgt tcg cgt cgt tta c	ttc aca aaa cgt aaa acc ga	55	Methyl Primer Express
<i>VHL</i> – U	gta tgt ttg tgt tgt tta t	ttc aca aaa cat aaa acc aa	51	
<i>c-myc</i> – M	ttt gtt ttt tcg att tta gag aga c	tta tcc tac gta tat taa tca ccg c	55	Meth-Primer Design
<i>c-myc</i> – U	tgt ttt ttt gat ttt aga gag atg a	ctt atc cta cat ata tta atc acc aca	55	
<i>p15</i> – M	cga gag ggt ttt ttg gat ac	aac gta caa ata cct cgc aa	51	Methyl Primer Express
<i>p15</i> – U	ggt tga gag ggt ttt ttg gat at	aac aac ata caa ata cct cac aa	55	

3.6.5.6. PCR Uygulaması

50 ng bisülfıt ile modifiye edilmiş DNA' dan (1000 ng/20 µl) 1 µl alındı, üzerine 12,5 µl hot-start PCR master karışımı, 2'şer µl 10 pmol “ileri” ve “geri” primerler ve 7,5 µl su eklenerek PCR amplifikasyonu başlatıldı.

PCR koşulları:

Enzim aktivasyonu	95 °C	4 dk.
Parçalanma	95 °C	30 s.
Annealing *		30 s. 35 siklus
Uzama	72 °C	30 s.
Final uzama	72 °C	7 dk. 1 siklus

* Her gene ait “annealing sıcaklığı” Tablo 3-2’de verilmiştir.

Her bir PCR ürünü (10 µl) %5 lik poliakrilamid jellerde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV transluminatör ve jel görüntüleme sisteminde incelendi.

PCR uygulaması, pozitif kontrol örnekleri kullanılarak her gene ait metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primer çiftleri ile farklı annealing sıcaklıkları denenerek optimize edildi. Her gen için PCR metodu optimize edildikten sonra; FB1 uygulanmış

NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinden izole edilen DNA örneklerine MSP uygulamalar 2'şer tekrarlı olarak yapıldı.

Metodun özgünlüğünü konfirme etmek amacıyla; her PCR uygulamasında hem metillenmiş (M), hem de metillenmemiş (U) primer çiftleri için, pozitif kontrol olarak *in vitro* metillenmiş DNA, negatif kontrol olarak ise bisülfid modifikasyonu yapılmamış DNA kullanıldı.

3.6.5.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel yükleme tamponu: 0,25 g Brom fenol mavisi, 0,25 g ksilen siyanol tartıldı. 30 mL Gliserin ve 70 mL steril su ilave edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

10xTBE çözeltisi: 108 g Trizma baz, 55 g borik asit, 9.3 g EDTA tartılarak 1000 mL'ye bidistile su ile tamamlandı. Otoklavda 120 °C'de 15 dk. steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

1xTBE çözeltisi: 10xTBE tamponundan 100 mL alınıp 1000 mL'ye steril su ile tamamlandı.

Etidyum bromür: 10 mg etidyum bromür 10 mL bidistile suda çözündürüldü. +4°C' de saklandı.

DNA göstergeleri: Çalışmada 50 ve 100 bç'lik DNA göstergeleri kullanıldı. 4 µL DNA göstergesi, 1 µL 6xDNA yükleme boyası ve 1 µL steril su 0,5 mL'lik mikrotüpte karıştırıldı. +4 °C'de saklandı.

Agaroz jel (%1,5) hazırlanışı: 0,75 g Agaroz tartılıp 50 mL'ye 1xTBE ile tamamlanıp, mikrodalga fırında çözündürüldü. Ilıkken, PCR ürünlerini görünür hale getirmek için, 2 µL etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve taraklar konulmuş olan plağa döküldü. Jellerin donması için 20 dk. beklendi. Taraklar çıkartılarak jeller hemen kullanıldı ya da +4°C'de saklandı.

Enzim amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü için örnekler, PCR işlemi bitiminde %1,5'lik rutin agaroz jellere tatbik edildi.

Agaroz jele uygulama: Her 7 µL PCR ürünü için 2 µL yükleme tamponu ilave edildi. Jel, 1xTBE tamponu içeren elektroforez tankına alındı. Yükleme tamponu ile karıştırılmış olan PCR ürünleri, tarak dişleri sayesinde oluşan boşluklara teker teker

uygulandı. 1 Jele 13 örnek ve oluşan ürünün büyüklüğünü ölçebilmek için uygun DNA göstergesi uygulandı. Yatay elektroforez, güç kaynağına takılarak PCR ürünleri direkt olarak 150 volt, 85 miliamper varlığında 40 dk. yürütüldü. İşlem sonunda amplifiye edilen genlerin spesifik bantları UV-transilluminatörde 254 veya 301 nm'de görüntülendi ve jel dökümantasyon sistemi ile elde edilen resimler kaydedildi

3.6.5.8. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Akrilamid jel yükleme tamponu: %95 Formamid, 20 mM EDTA, %0.05 brom fenol mavisi, %0.05 ksilen siyanol olacak şekilde 10 mL hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Amonyum persulfat: 10 gram amonyum persulfat tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü. +4 °C' de saklandı.

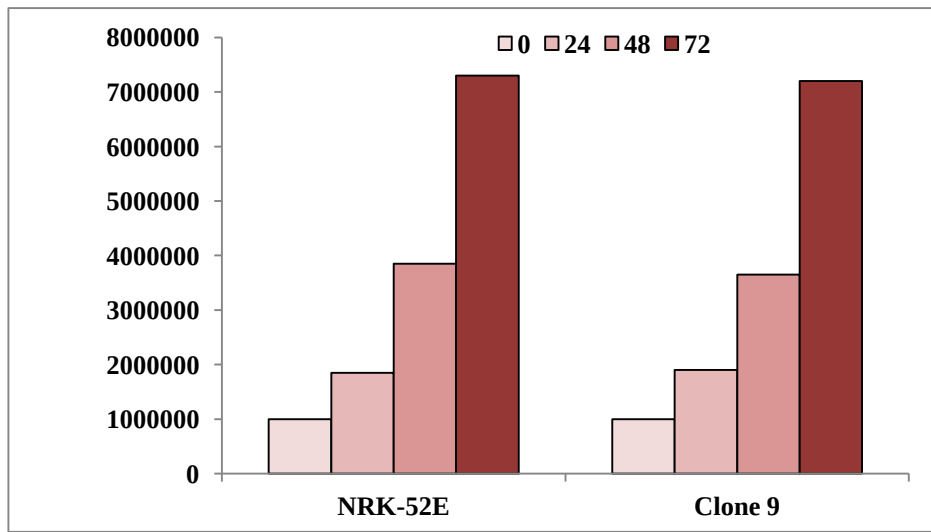
Akrilamid jel (%8) hazırlanışı: 3.214 µL poliakrilamid : bisakrilamid (29 : 1) ve 1 mL 10xTBE 15 mL'lik falkona konuldu, hacmi bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Üzerine 150 µL amonyum persulfat ve 25 µL TEMED ilave edildi. Hazırlanan çözelti dikey elektroforez jel dökme tankında enjektör ile iki cam arasına döküldü ve uygun tarak yerleştirildi. Hazırlanan jel donduktan sonra su ile yıkanarak kuyucuklarda kalmış olabilecek polimerleşmemiş çözeltinin ve hava kabarcıklarının giderilmesi sağlandı. Jel, dikey elektroforez tankına yerleştirildi ve tank 1xTBE çözeltisi ile dolduruldu.

Akrilamid jele uygulama: 7 µL'lik PCR ürünleri üzerine 2 µL yükleme tamponu ilave edilip karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi. Her jel yüklemesinde uygun DNA göstergeleri de yüklendi. Dikey elektroforez, güç kaynağına takılarak PCR ürünleri 150 volt, 85 miliamper varlığında 50 dk. boyunca yürütüldü. Daha sonra akrilamid jel tanktan çıkarıldı ve 100 mL bidistile suya 10 µL etidyum bromür ilavesiyle hazırlanmış çözeltide 15 dk. çalkalandı ve UV-transilluminatörde 254 veya 302 nm'de görüntülendi ve jel dökümantasyon sistemi ile elde edilen resimler kaydedildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Çoğalma Verileri

NRK-52E ve Clone 9 hücre dizilerinin kontrol gruplarında 24., 48. ve 72. saatler boyunca hücre sayısı beklenildiği üzere sağlıklı ve katlanarak çoğalma gösterdi (Şekil 4-1). Clone-9 ve NRK-52E hücre dizileri için üreme zamanı 24 saat olarak tespit edildi.



Şekil 4-1: NRK-52E ve Clone 9 Hücrelerinin zamana bağlı çoğalma verileri.

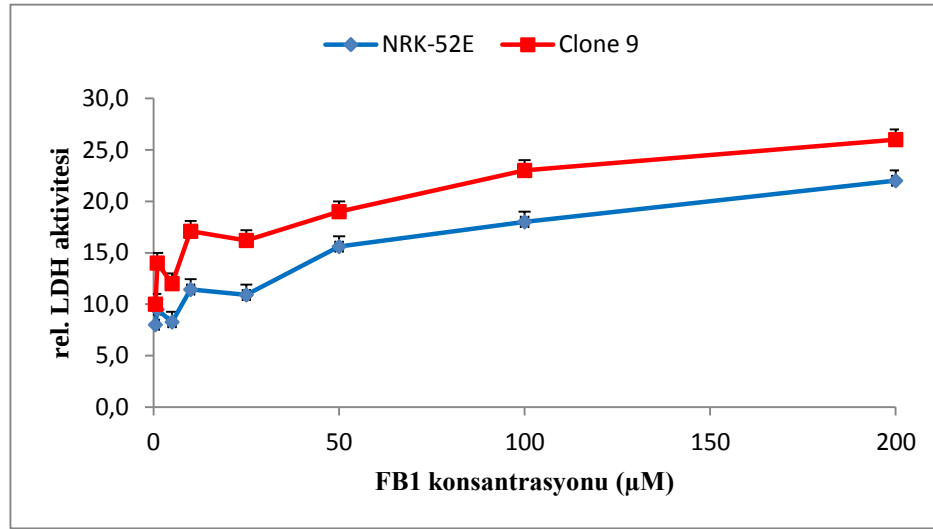
4.2. FB1'in NRK-52E ve Clone9 Hücrelerinde Sitotoksikite Üzerine Etkileri

FB1'in NRK-52E ve Clone 9 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, membran bütünlüğü üzerine etkinin tayin edildiği LDH testi ve solunum zinciri üzerine etkinin tayin edildiği XTT testleri ile yapıldı. LDH ve XTT testleri için hücreler FB1 ile 8 farklı konsantrasyonda ve 3'er tekrarlı olacak şekilde maruz bırakıldı. Aynı zamanda, testler farklı bir günde ikinci kez tekrarlandı.

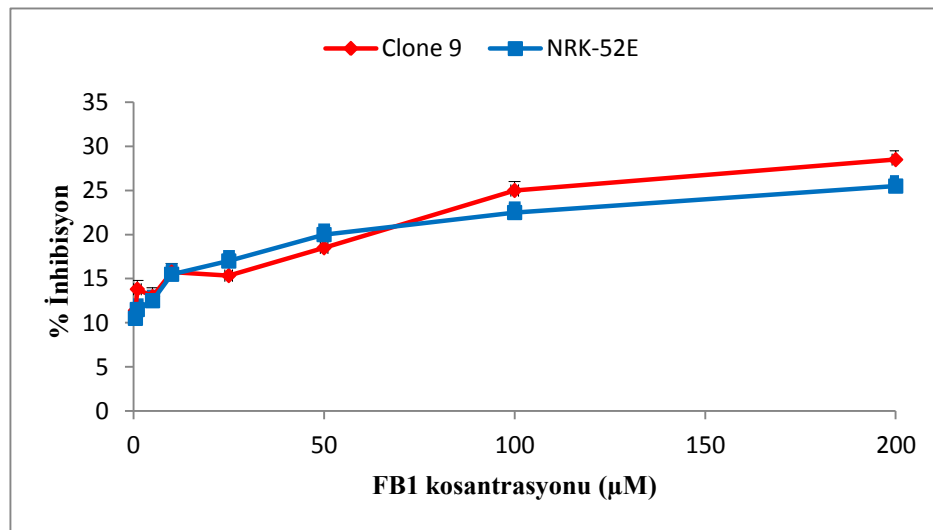
FB1'e maruz bırakılmış hücrelerin 340 nm'deki absorbanslarının ölçülmesiyle NADH tüketiminin hesaplandığı LDH testinde, pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X-100 ile kıyaslama sonucu relatif LDH aktivitesi hesaplandı (Bölüm 3.5.1.7). FB1 maruziyeti sonrası konsantrasyona karşı relatif LDH aktivitesi grafiği Şekil 4-2'de gösterilmiştir. FB1'in 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 μ M konsantrasyonlarındaki

maruziyetinin her iki hücre dizisinde de relatif LDH aktivitesi %50'nin altında bulunmuştur.

XTT testinde de 480 nm'deki absorbansların ölçülmesi ve hücre canlılığının blank ile kıyaslanması sonucu tayin edilen (Bölüm 3.5.1.7) % relatif inhibisyon değerleri Şekil 4-3'de gösterilmiştir. FB1'in 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 μM konsantrasyonlarındaki maruziyetinin her iki hücre dizisinde de %50 inhibisyonun altında bulunmuştur.



Şekil 4-2: NRK-52E ve Clone 9 Hücrelerinde 1-50 μM konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrası LDH testi sonuçları



Şekil 4-3: NRK-52E ve Clone 9 Hücrelerinde 1-50 μM konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrası XTT testi sonuçları.

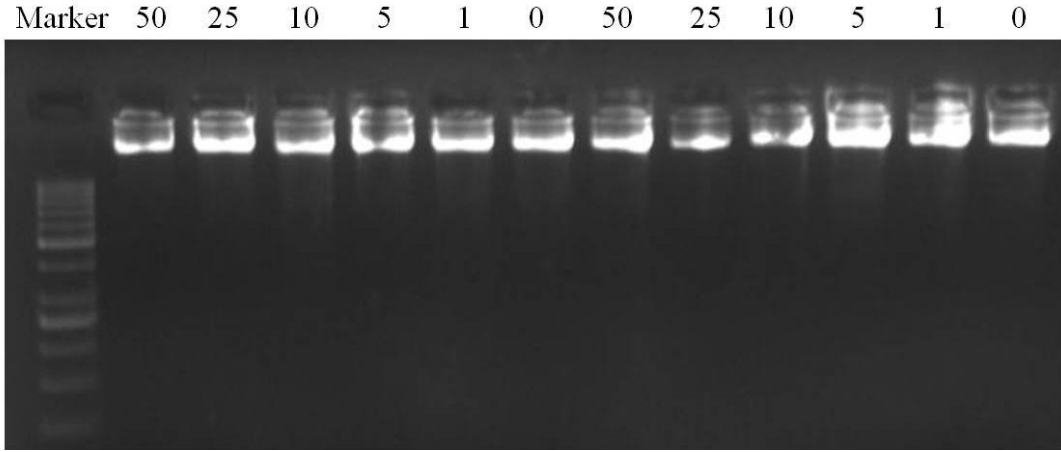
Sitotoksosite test sonuçlarının doğrultusunda FB1'in sitotoksik olmayan konsantrasyonları belirlendi. DNA metilasyonu uygulamaları için FB1 1, 5, 10, 25, 50 μM konsantrasyonlarda olacak şekilde NRK-52E ve Clone 9 hücrelerine 24 saat uygulandı. 24 saat sonunda hücreler toplanarak sayıldı ve DNA izolasyonu yapıldı.

4.3. NRK-52E ve Clone 9 Hücrelerinden İzole Edilen DNA'ların Agaroz Jel Görüntüleri ve Miktarları

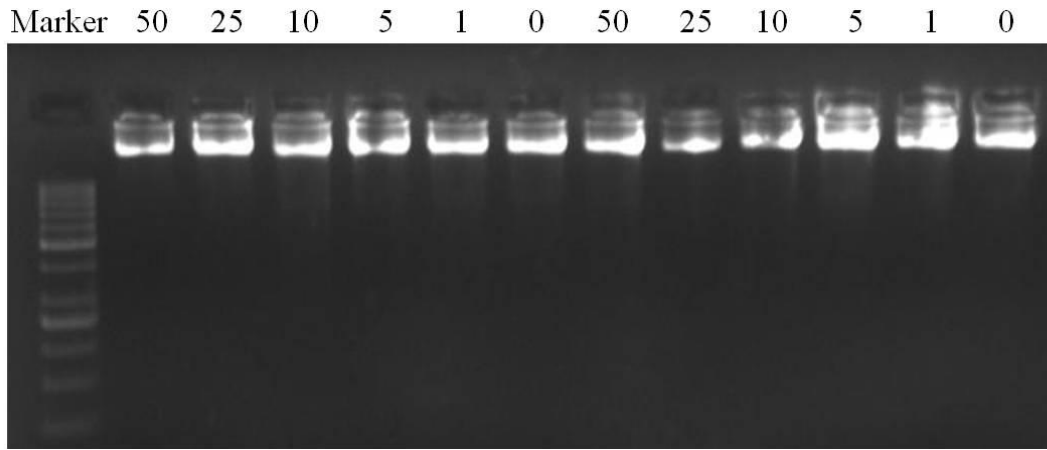
1-50 μM konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrasında NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinden izole edilen DNA'lar bisülfıt modifikasyonu öncesinde agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi. 1. Gruba ait DNA'ların jel görüntüleri Şekil 4-4 ve 4-5'de gösterilmiştir. Aynı zamanda, elde edilen DNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikropılaka okuyucu spektrofotometrede de ölçüldü. 1. Gruba ait DNA'ların miktarı ve saflığı Tablo 4-1'de gösterilmiştir. İzole edilen DNA'ların A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranlarında saflıklarının iyi olduğu görüldü ve DNA metilasyonu analizleri için uygulamalara başlandı.

Tablo 4-1: 1-50 μM Konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrasında NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinden izole edilen DNA'ların miktar ve saflıkları

DNA Örnekleri	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Miktarı (ng/ μL)
NRK-52E Hücreleri			
50 μM	1,958	2,25	301,834
50 μM	1,958	2,319	571,809
25 μM	1,991	2,276	420,553
25 μM	1,966	2,31	508,908
10 μM	1,979	1,971	375,513
10 μM	1,96	2,303	428,18
5 μM	1,941	2,15	470,731
5 μM	1,927	1,88	358,066
1 μM	1,934	2,256	535,575
1 μM	1,937	2,212	587,27
0 μM	1,928	2,184	689,388
0 μM	1,938	2,078	480,435
Clone 9 Hücreleri			
50 μM	1,958	2,108	723,417
50 μM	1,933	2,039	692,637
25 μM	1,93	2,169	677,896
25 μM	1,937	2,167	698,062
10 μM	1,959	2,239	726,899
10 μM	1,926	2,127	438,987
5 μM	1,874	1,291	366,715
5 μM	1,918	1,735	251,189
1 μM	1,946	2,046	366,605
1 μM	1,931	1,652	454,423
0 μM	1,947	2,203	614,332
0 μM	1,95	2,257	599,612



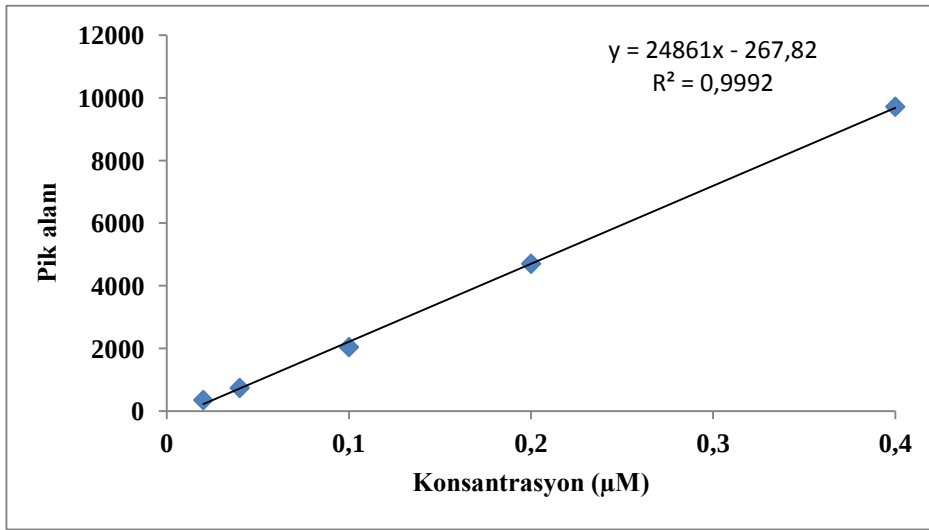
Şekil 4-4: 1-50 μ M Konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrasında NRK-52E hücrelerinden izole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü.



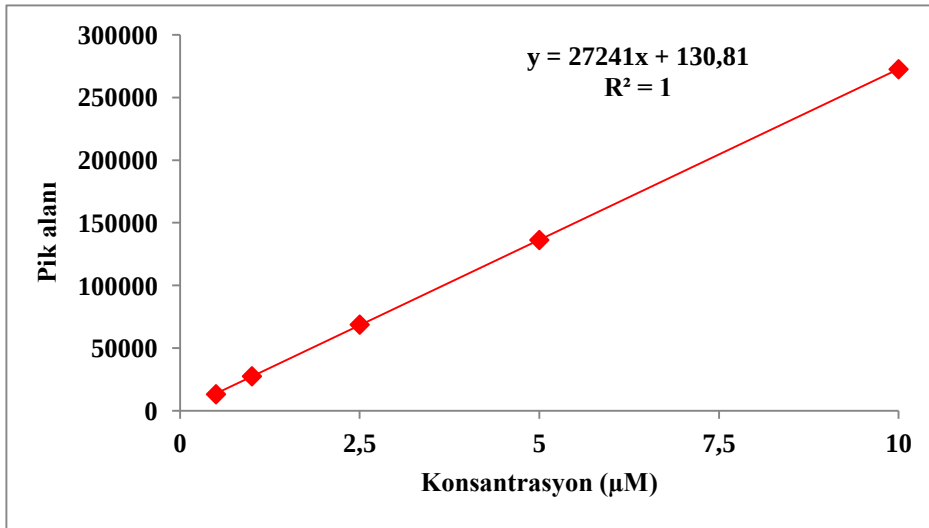
Şekil 4-5: 1-50 μ M Konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrasında Clone 9 hücrelerinden izole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü.

4.4. Global DNA Metilasyonu Sonuçları

Global 5-mdC içeriğinin kantitatif tayini; hidrolize DNA'daki serbest deoksiribonükleozidlerin UV-DAD donanımlı HPLC sisteminde analizi ile gerçekleştirildi. dC, dG, dT ve dA için 0,5; 1; 2,5; 5; 10 μ M ve 5-mdC için ise 0,02; 0,04, 0,1 ve 0,2; 0,4 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde kalibrasyon eğrileri hazırlandı. %5-mdC miktarı toplam dC üzerinden hesaplandı (Bölüm 3.6.4.5). Tez çalışmasında Şekil 4-6'da 5-mdC'e ait kalibrasyon eğrisi ve Şekil 4-7'de ise dC'e ait kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir.

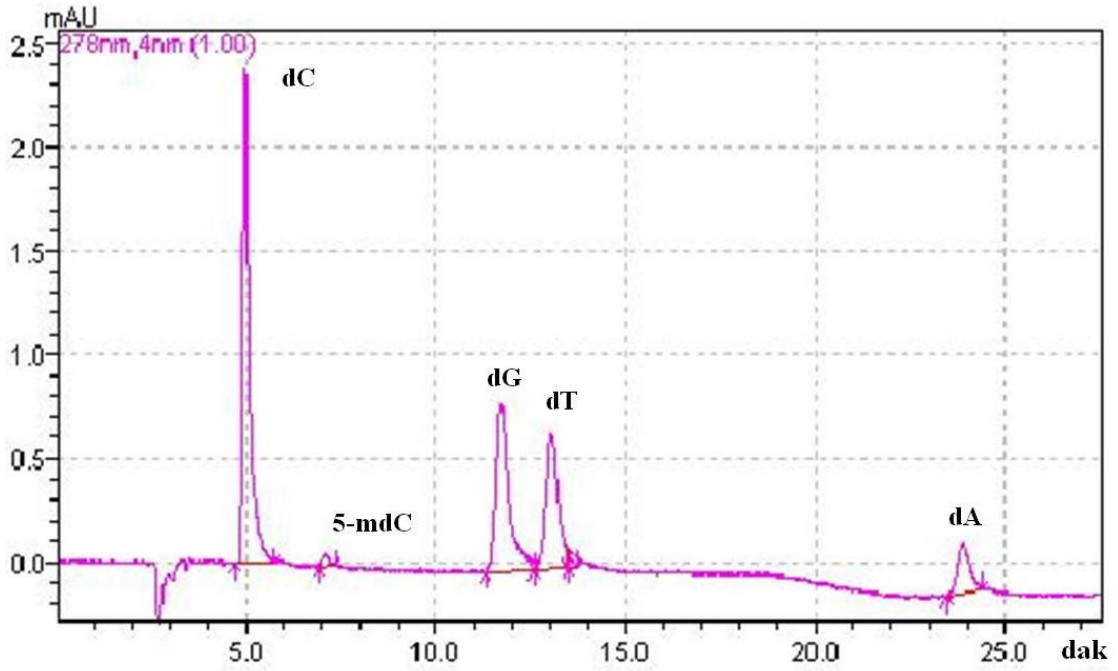


Şekil 4-6: 5-mdC Standardına ait kalibrasyon eğrisi

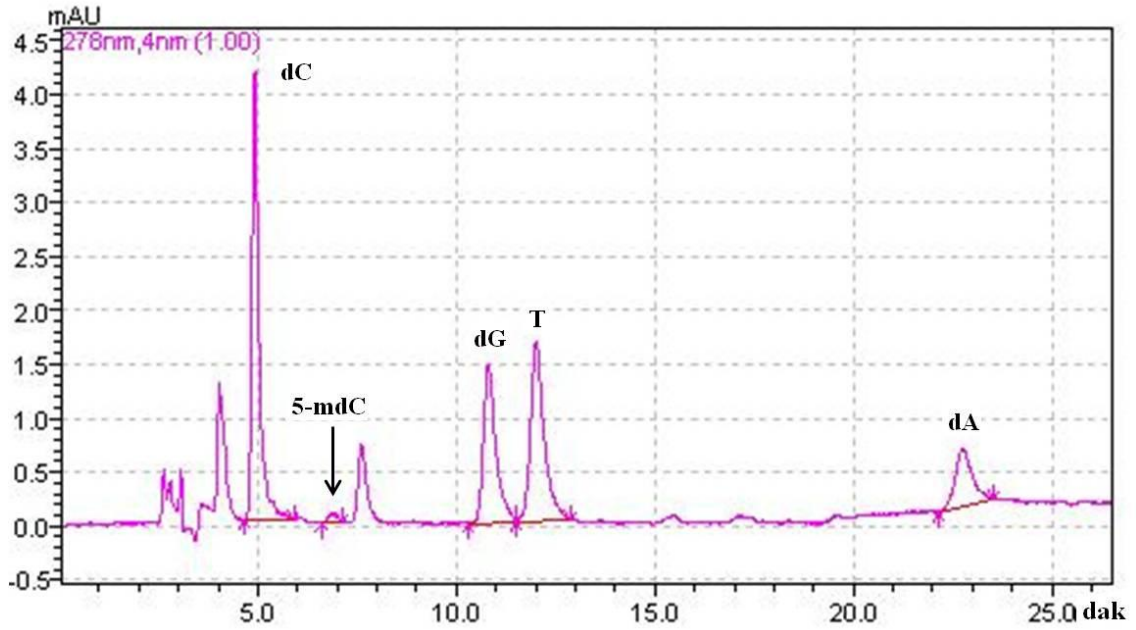


Şekil 4-7: dC Standardına ait kalibrasyon eğrisi.

Deoksiribonükleozidlerin C₁₈ kolonda ayrılması, 50 mM KH₂PO₄ çözeltisi (pH 4,1) ve metanol gradient mobil faz sisteminde gerçekleştirildi. dC, dG, dT ve dA için 1 µM; 5-mdC için ise 0,04 µM konsantrasyonda hazırlanan deoksiribonükleozid standartlarına ait kromatogram Şekil 4-8'de gösterilmiştir. DNA'da normal koşullarda 5-mdC miktarı %4 civarında olduğundan dolayı diğer deoksiribonükleozid konsantrasyonlarına kıyasla daha düşük seviyelerde hazırlanmıştır. NRK-52E ve Clone 9'a ait hidrolize DNA'ların kromatogramları benzer olduğundan dolayı, Şekil 4-9'da sadece NRK-52E hücrelerine ait hidrolize DNA'nın kromatogramı gösterilmiştir.

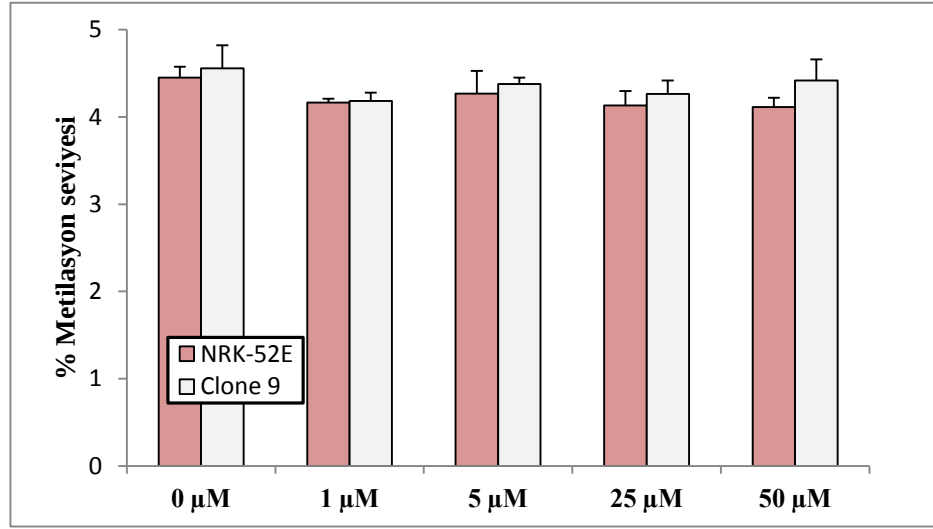


Şekil 4-8: dC, dG, dT ve dA için 1 μ M; 5-mdC için ise 0,04 μ M konsantrasyonda hazırlanan deoksiribonükleozid standartlarına ait kromatogram.



Şekil 4-9: NRK-52E hücrelerine ait hidrolize DNA'nın kromatogramı.

Şekil 4-10'da 1, 5, 25, 50 μ M konsantrasyonlarda FB1 uygulanan NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde % metilasyon seviyeleri gösterilmiş olup, kontrol grubuna kıyasla FB1 uygulanan hücrelerde % metilasyonda anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

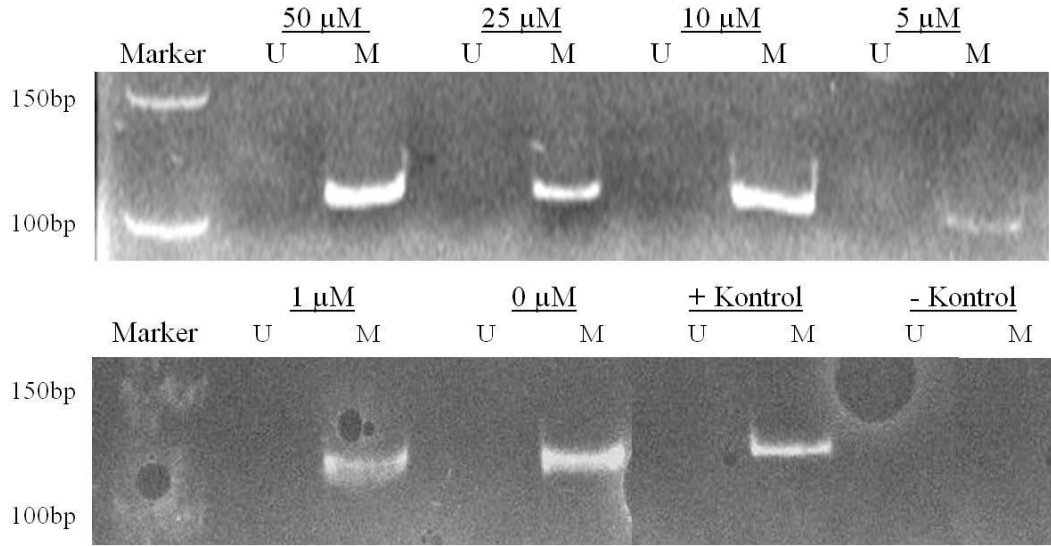


Şekil 4-10: FB1 Uygulanan NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde % metilasyon seviyeleri.

4.5. Gene-özü Metilasyon Tayini Sonuçları

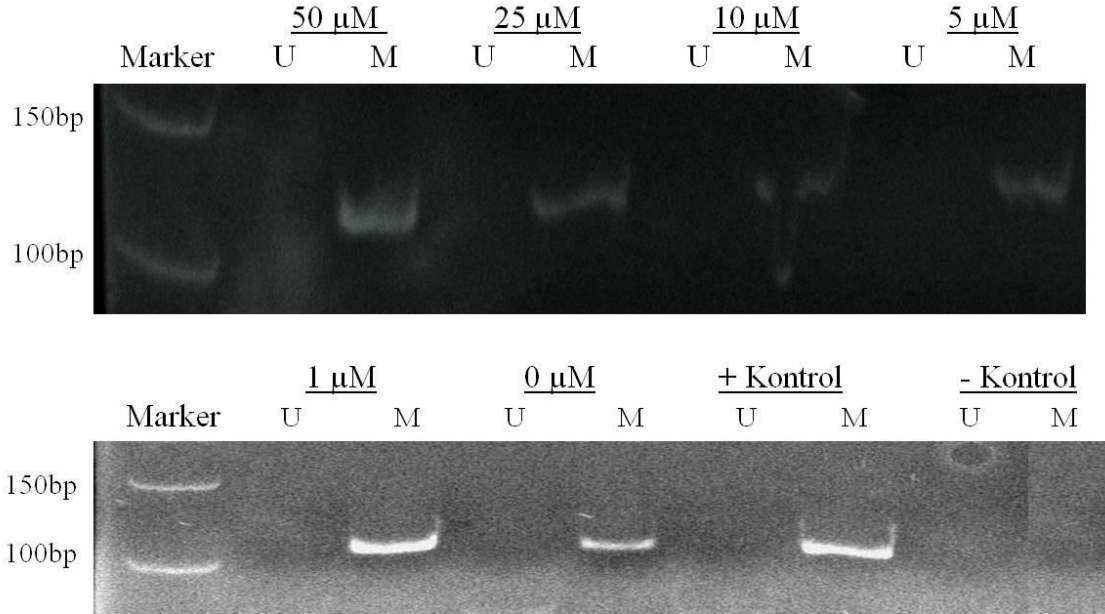
e-cadherin, *p16*, *VHL*, *c-myc* ve *p15* Genlerinin promotor bölgelerindeki CpG adalarında metilasyon tayini FB1 uygulanan NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinden elde edilen DNA örneklerinde metilasyona özgü PCR (MSP) yöntemi ile yapıldı. MSP tayini her bir örnek için hem metillenmiş (M), hem de metillenmemiş (U) primer çiftleri kullanılarak yapıldı. FB1 maruziyeti her konsantrasyon için NRK-52 E hücrelerine 4'er tekrarlı; Clone 9 hücrelerine 3'er tekrarlı yapıldı.

e-cadherin Geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon hem kontrol hem de FB1 uygulanan NRK-52E (Şekil 4-11) ve clone 9 hücrelerinde (Şekil 4-12) gözlenmiştir.



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfite ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: M primer çifti için 107 baz çifti (bp); U primer çifti için 114 bp.

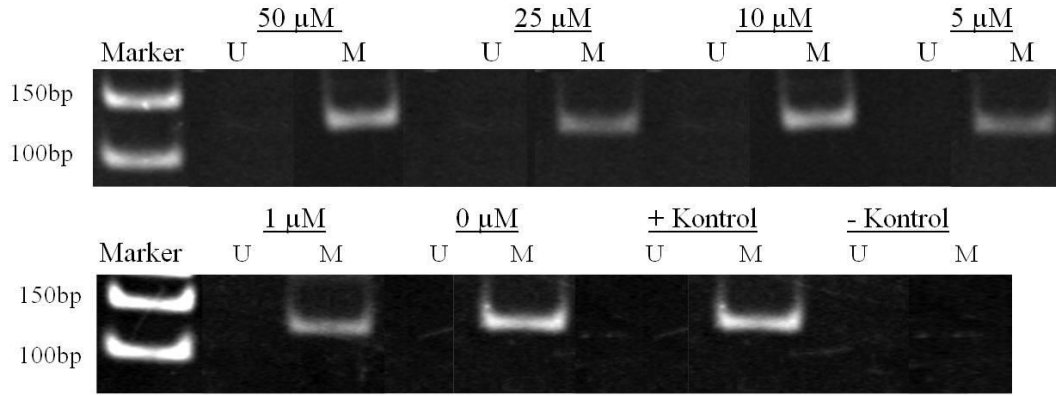
Şekil 4-11 : *e-cadherin* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfite ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: M primer çifti için 107 baz çifti (bp); U primer çifti için 114 bp.

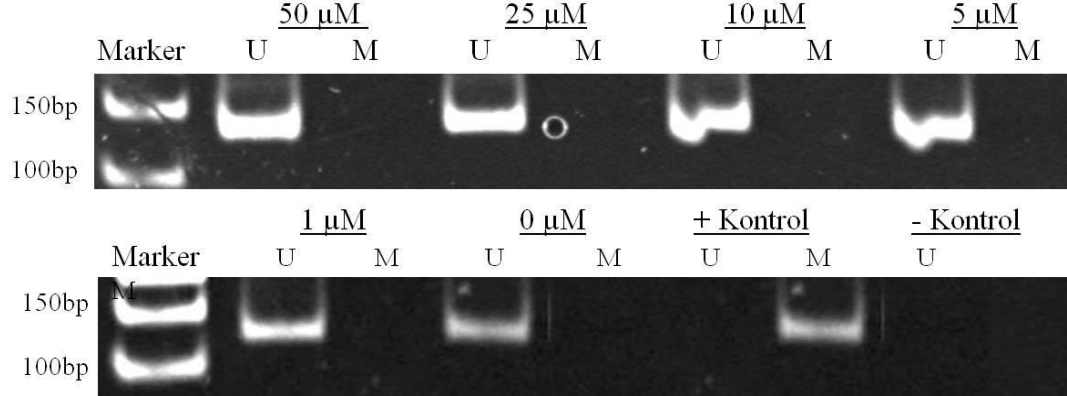
Şekil 4-12: *e-cadherin* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.

p16 Geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon NRK-52E hücrelerinde hem kontrol hem de FB1 uygulanan örneklerde gözlenirken (Şekil 4-13), Clone 9 hücrelerinde gözlenmemiştir (Şekil 4-14).



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfid ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: 132 baz çifti (bp).

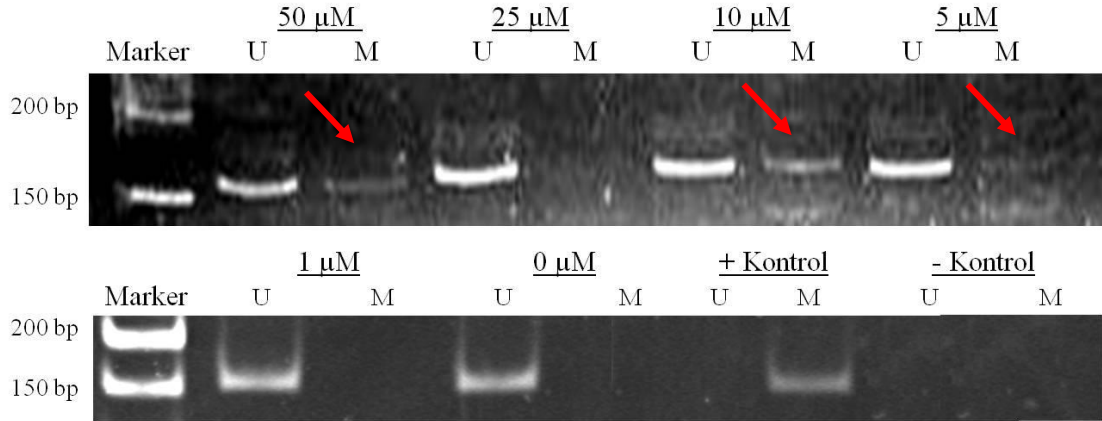
Şekil 4-13: *p16* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfid ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: 132 baz çifti (bp).

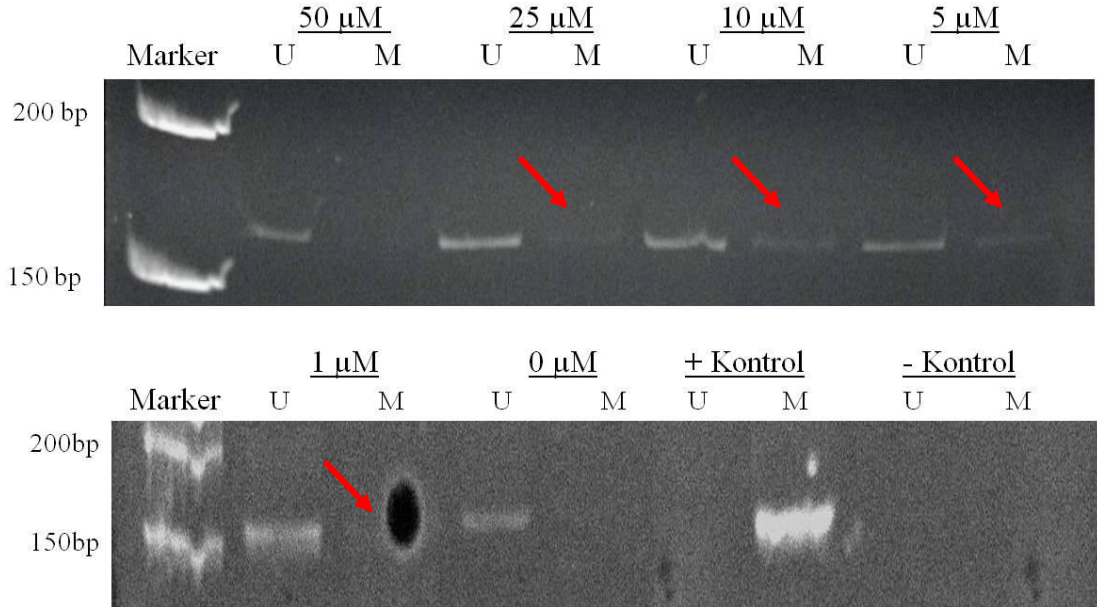
Şekil 4-14: *p16* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.

VHL Geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon her iki hücre dizisinde de kontrol örneklerinde gözlenmemiştir. 5, 10, 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarda FB1 uygulanan NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde *VHL* geninde kısmi metilasyon gözlenmiştir. Şekil 4-15 ve 4-16'da *VHL* genine ait NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde örnek MSP sonuçları gösterilmiştir.



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfıt ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: 154 baz çifti (bp).

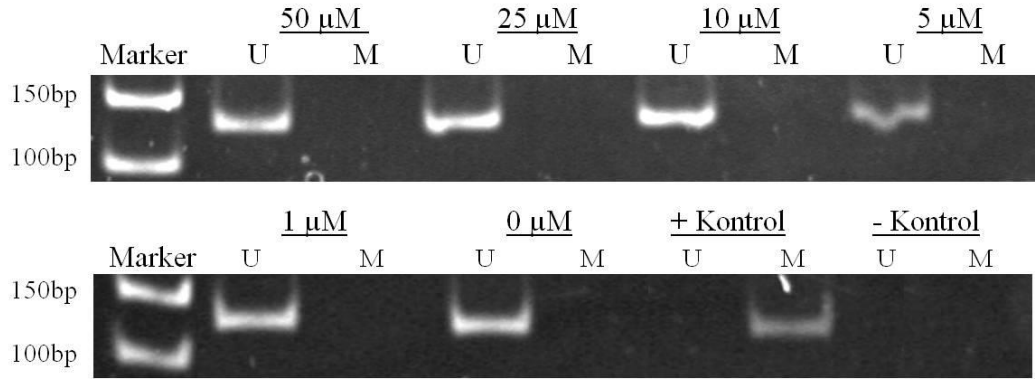
Şekil 4-15: *VHL* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfıt ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: 154 baz çifti (bp).

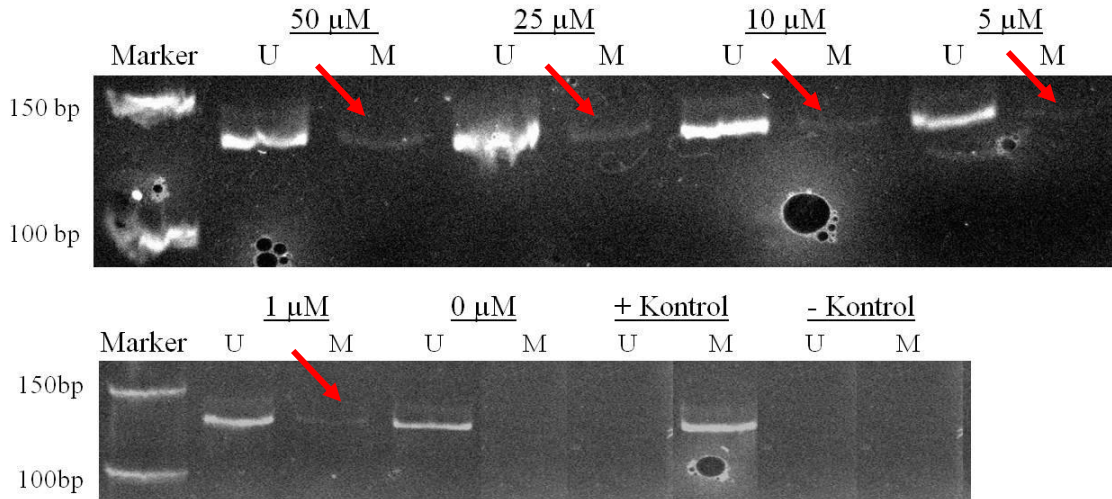
Şekil 4-16: *VHL* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.

c-myc Geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon her iki hücre dizisinde de kontrol örneklerinde gözlenmemiştir. 1, 5, 10, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarda FB1 uygulanan NRK-52E hücrelerinde (Şekil 4-17) *c-myc* geninde metilasyon gözlenmezken, Clone 9 (Şekil 4-18) hücrelerinde kısmi metilasyon gözlenmiştir.



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfıt ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: 127 baz çifti (bp).

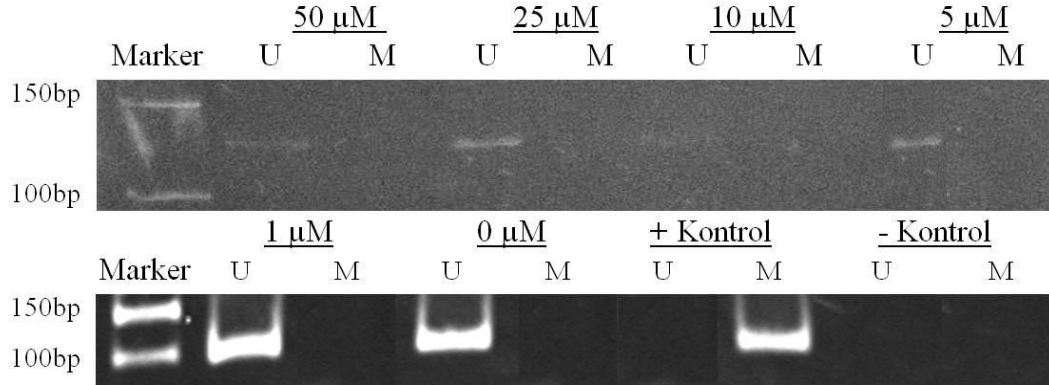
Şekil 4-17: *c-myc* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfıt ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: 127 baz çifti (bp).

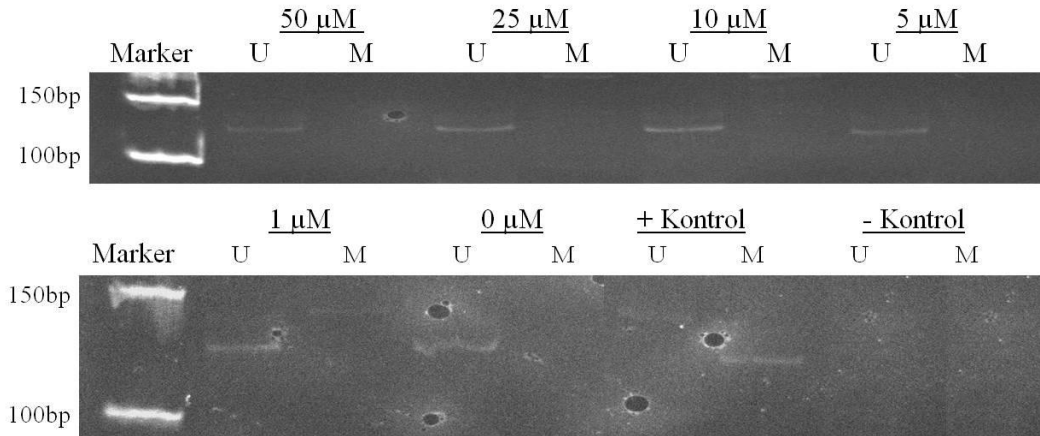
Şekil 4-18 : *c-myc* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.

p15 Geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon her iki hücre dizisinde hem kontrol örneklerinde hem de FB1 uygulanan örneklerinde gözlenmemiştir (Şekil 4-19 ve 4-20).



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfıt ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: 138 baz çifti (bp).

Şekil 4-19: *p15* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış NRK-52 E hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.



+ Kontrol: *in vitro* metillenmiş DNA; - Kontrol: bisülfıt ile modifiye edilmemiş genomik DNA; PCR ürünü büyüklüğü: 138 baz çifti (bp).

Şekil 4-20: *p15* Genine ait kontrol ve FB1 uygulanmış Clone 9 hücrelerinde metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) primerler ile uygulanan MSP sonuçları.

NRK-52E ve Clone 9 hücrelerine 1-50 μM konsantrasyonlarda FB1 uygulanan bütün gruplara ait *e-cadherin*, *p16*, *VHL*, *c-myc* ve *p15* genlerinin MSP sonuçları Tablo 4-2 ve 4-3'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: NRK-52E Hücrelerine FB1 uygulanan bütün gruplara ait *e-cadherin*, *p16*, *VHL*, *c-myc* ve *p15* genlerinin MSP sonuçları

NRK-52E	<i>e-cad</i>		<i>p16</i>		<i>VHL</i>		<i>c-myc</i>		<i>p15</i>	
	U	M	U	M	U	M	U	M	U	M
50 µM	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
50 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
50 µM	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
50 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	0/4	4/4	0/4	4/4	4/4	2/4	4/4	0/4	4/4	0/4
25 µM	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
25 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
25 µM	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
25 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	0/4	4/4	0/4	4/4	4/4	2/4	4/4	0/4	4/4	0/4
10 µM	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
10 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
10 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
10 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	0/4	4/4	0/4	4/4	4/4	1/4	4/4	0/4	4/4	0/4
5 µM	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
5 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
5 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
5 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	0/4	4/4	0/4	4/4	4/4	1/4	4/4	0/4	4/4	0/4
1 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
1 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
1 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
1 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	0/4	4/4	0/4	4/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4
0 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
0 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
0 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
0 µM	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	0/4	4/4	0/4	4/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4	0/4

Tablo 4-2: Clone 9 Hücrelerine FB1 uygulanan bütün gruplara ait *e-cadherin*, *p16*, *VHL*, *c-myc* ve *p15* genlerinin MSP sonuçları.

Clone 9	<i>e-cad</i>		<i>p16</i>		<i>VHL</i>		<i>c-myc</i>		<i>p15</i>	
	U	M	U	M	U	M	U	M	U	M
50 µM	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
50 µM	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
50 µM	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	0/3	3/3	3/3	0/3	3/3	2/3	3	2/3	3/3	0/3
25 µM	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
25 µM	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
25 µM	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	0/3	3/3	3/3	0/3	3/3	2/3	3	2/3	3/3	0/3
10 µM	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
10 µM	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
10 µM	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	0/3	3/3	3/3	0/3	3/3	2/3	3	2/3	3/3	0/3
5 µM	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
5 µM	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
5 µM	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	0/3	3/3	3/3	0/3	3/3	1/3	3	2/3	3/3	0/3
1 µM	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
1 µM	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
1 µM	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
	0/3	3/3	3/3	0/3	3/3	0/3	3	1/3	3/3	0/3
0 µM	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
0 µM	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
0 µM	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
	0/3	3/3	3/3	0/3	3/3	0/3	3	0/3	3/3	0/3

Sonuç olarak;

1-50 μ M FB1 uygulanan NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla global metilasyonda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

e-cadherin Geni her iki hücre dizisinde de hem kontrol hem de FB1 maruziyet gruplarında metile bulunmuştur.

p16 Geni NRK-52E hücrelerinde hem kontrol hem de FB1 maruziyet gruplarında metile iken; Clone 9 hücrelerinde ise her iki grupta da metile değildir.

VHL Geni her iki hücre dizisinde kontrol gruplarında metile değil iken; FB1 maruziyet gruplarında ise kısmen metiledir.

c-myc Geni NRK-52E hücrelerinde kontrol ve FB1 uygulama gruplarında metile değildir. Clone 9 hücrelerinde ise *c-myc* geni kontrol gruplarında metile değil iken; FB1 uygulama gruplarında ise kısmen metiledir.

p15 Geni ise her iki hücre dizisinde hem kontrol hem de FB1 maruziyet gruplarında metile değildir.

5. TARTIŞMA

Gen anlatımlarının epigenetik modülasyonu ve bunun karsinojenezdeki rolü toksikogenomik alanında ortaya çıkan önemli bir konudur. DNA metilasyonu ve kromatin yapısındaki değişiklikler ile ortaya çıkan genomun epigenetik mekanizmaları, DNA dizisinde bir değişiklik yapmadan tümörle ilişkili genlerin ifadelerinde değişiklik yaparak karsinojeneze zemin hazırlar (Jones ve Baylin 2002). Son araştırmalar, DNA metilasyonundaki değişikliklerin ve histon modifikasyonlarının ve bu yüzden oluşan gen ifadesindeki değişikliklerin karsinojenezin erken safhalarında ortaya çıktığını göstermiştir (Szyf, 2011). Genlerin anlatımlarının düzenlenmesinde önemli rolü olan DNA metilasyonundaki değişikliklerin tayininin non-genotoksik karsinojenlerin indüklediği tümörlerin erken belirlenmesinde kullanılabilecek ve potansiyeli en yüksek biyogöstergelerden biri olabileceği yönündeki çalışmalar ön plana çıkmaktadır (Watson ve Goodman, 2002; Pogribny ve ark., 2008, Jiang ve ark., 2008; Koturbash ve ark., 2011).

FB1 yapısal olarak sfingozine benzemesinden dolayı, sfingolipidlerin biyosentezini inhibe ederek toksik etkilerini gösterdiği bildirilmiştir. Hücre membranının önemli bileşenlerinden olan sfingolipidlerin yapısının bozulması; hücre büyümesi, morfolojisi, farklılaşması ve davranışında önemli değişikliklere yol açmaktadır (Merril ve ark., 1996; Wang ve ark., 1999). Ayrıca, FB1'in toksisitesinde oksidatif değişikliklerin rol oynayabileceği (Galvano ve ark., 2002; Stockmann ve Savolainen, 2008) ve çeşitli hücre tiplerinde sitotoksik olduğu da bildirilmiştir. Bazı hayvan türlerinde tümör oluşumuna ve insanlarda özofagus kanserine sebep olmasından dolayı, IARC FB1'i "insanlar için muhtemel karsinojen (Grup 2B)" grubunda sınıflandırmıştır (IARC, 1993). Çeşitli *in vitro* genotoksisite test sistemlerinde FB1'in genotoksik özelliklerinin olmadığı gösterilmiştir (Gelderblom ve ark., 1995a). FB1'in karsinojenik etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olup, çeşitli türlerdeki farklı hastalıkların etiyopatojenezinden sorumlu non-genotoksik özellikte karsinojenlerden olabileceği öne sürülmektedir (Smith ve ark., 1996). Epigenetik mekanizmaların FB1'in karsinojenik etkisindeki rolü hakkında kaynakta yeterli bilgiye rastlanmamaktadır. Bundan hareketle, FB1'in karsinojenik etki mekanizmasında epigenetik değişikliklerin rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında; FB1'in global DNA metilasyonu ve anahtar tümör baskılayıcı genlerin (e-

cadherin, *p16*, *VHL*, *c-myc*, *p15*) ve *c-myc* onkogeninin promotor bölgelerinde CpG adalarındaki metilasyonu *in vitro* koşullarda NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde araştırılmıştır.

Bazı çalışmalarda, non-genotoksik karsinojenlerin tümör gelişmesinin erken safhalarında DNA hipometilasyonunu indüklediği bildirilmiştir. Örneğin, Pereira ve arkadaşları safra asitleri, rutin, bromdiklorometan ve 5-aza-2-deoksisitidin gibi non-genotoksik karsinojenlerin fare ve sıçan bağırsak kolonunda hipometilasyona sebep olduğunu göstermiştir (Pereira ve ark., 2004). Benzer olarak, tekrarlanan dozlarda dikloroasetik asit ve trikloroasetik asidin fare karaciğerinde DNA hipometilasyonuna sebep olduğu (Ge ve ark., 2001b) ve peroksizom proliferatorü ve sıçanlarda karsinojenik bir ajan olan Wy-14,643'ün sıçan karaciğerinde *c-myc* geninde hipometilasyonu indüklediği gösterilmiştir (Ge ve ark., 2001a).

Farelere oral yol ile verilen kloroform, bromodiklorometan, klorodibromometan, bromoform gibi trihalometanların karaciğer DNA'sında 5-metilsitozin düzeylerinde azalmaya ve *c-myc* geninin promotor bölgelerinde de hipometilasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Coffin ve ark., 2000). Diğer bir çalışmada Tao ve arkadaşları kloroform, bromodiklorometan, dikloroasetik asit, trikloroasetik asitin de sıçan ve fare böbreklerinde global DNA hipometilasyonuna ve *c-myc* geninde de hipometilasyona sebep olduğunu gösterilmiş olup, DNA hipometilasyonunun bu maddelerin böbrek, karaciğer ve kolon üzerindeki karsinojenik mekanizmalarında rol oynadığını belirtmişlerdir (Tao ve ark., 2005).

Diğer bir çalışmada ise; primer insan hepatositlerine ve HepG2 karaciğer karsinoma hücrelerine 0,03 ve 0,3 ng/mL konsantrasyonda hekzabromosiklododekan uygulamasının global DNA metilasyonunda değişikliğe sebep olmadığı; 17- β östradiolün ise 0,1 ng/mL konsantrasyonda HepG2 hücrelerinde global DNA metilasyonunda azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Aniagu ve ark., 2009).

Tez çalışmasında, FB1'e maruz bırakılmış Clone 9 ve NRK-52E hücrelerinde global DNA metilasyonu tayini hidrolize DNA'daki serbest deoksiribonükleozidlerin UV-DAD donanımlı HPLC sisteminde analizi ile gerçekleştirildi. 1, 5, 25, 50 μ M konsantrasyonlarda FB1 maruziyetinin NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde global DNA metilasyonunda anlamlı bir değişiklik meydana getirmediği gözlemlendi. Bombail ve ark. tarafından sıçan dokularında 5-mdC'nin 2dC'ye oranı %2-5 olarak gösterilmiştir

(Bombail ve ark., 2004). Tez çalışmasında da hem NRK-52E hem de Clone 9 hücrelerinde 5-mdC'nin 2dC'ye oranı %4-5 olarak bulunmuş olup, bunun önceki çalışmalar ile uyumluluk gösterdiği görülmektedir. Elde edilen bulgulara paralel olarak; Chen ve ark. da 2 mg/kg bw dozda 28 gün furan uygulamasının erkek F344/N sıçanların karaciğerlerinde global DNA metilasyonunda değişikliğe sebep olmadığını (Chen ve ark., 2010); hatta daha yüksek dozlarda (30 mg/kg bw) 90 gün furan uygulamasının da metilasyonda değişiklik oluşturmadığını göstermişlerdir (Chen ve ark., 2011). FB1'in metilasyon üzerine etkileri konusunda çalışmalar sadece global metilasyonunun tayini ile sınırlı kalmıştır. Sıçan C6 glioma hücrelerinde 9 ve 18 μ M FB1 maruziyetinin global DNA metilasyonunu arttırdığı, daha yüksek konsantrasyonlarda ise bir değişiklik gözlenmemesinin sebebinin ise FB1'in sebep olduğu sitotoksosite olarak açıklanmıştır (Mobio ve ark., 2000). Yapılan diğer bir çalışmada ise; insan kolon kanser hücresi olan Caco-2 hücrelerinde de 10, 20 ve 40 μ M FB1 maruziyetinin global DNA metilasyonunu arttırdığı (%8-9,5) gösterilmiştir (Kouadio ve ark., 2007).

Tez çalışmasında global DNA metilasyonunda değişiklik gözlenmemiş olup, bu sonuçtan hareketle; DNA metilasyonunun daha özgün olarak tümör baskılayıcı genler ile onkogenlerin anlatımları üzerinde etkili olabileceği düşünülmüş ve bu etkilerin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, tez çalışmasının ikinci bölümünde çeşitli kanserlerde DNA metilasyonu ile ilişkili olan genlerin promotor bölgelerindeki CpG adalarında metilasyon tayini MSP yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Epigenetik karsinogenlerin hücre siklusu ve apoptoz ile ilgili genlerin ifadesini etkilediği bilinmektedir. Promotor bölgelerinde CpG adaları içerdiği bilinen ve DNA metilasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülen ve kanserde önemli rolleri olan tümör baskılayıcı genlerden *e-cadherin*, *p16*, *VHL*, *p15* ve onkogenlerden *c-myc* genleri seçilmiştir. Gene-özgü metilasyon çalışmalarında kullanılan MSP yöntemi ile DNA'nın belirli bir bölgesindeki metilasyonun varlığı hakkında bilgi edinilir, fakat kaç adet CpG dinükleotidinde metilasyon olduğu saptanamaz. Bununla birlikte, basit, hızlı, maliyeti az ve az miktarda DNA ile sonuç elde edilebilmesi bakımından, kanserle ilişkili olarak yapılan metilasyon çalışmalarında en sık tercih edilen yöntem olarak yerini korumaktadır.

e-cadherin geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon hem kontrol örneklerinde hem de FB1 uygulanan NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde

gözlenmiştir. *e-cadherin* bir adezyon molekülüdür ve doku bütünlüğünün korunması, tümör invazyonu ve tümör metastazı gibi birçok olayda rol alır. *e-cadherin* Geninin promotor bölgelerinde CpG adalarının hipermetilasyonu mide (Suzuki ve ark., 1999; Leung ve ark., 2001), karaciğer (Matsumara ve ark., 2001; Yang ve ark., 2003; Kwon ve ark., 2005) ve böbrek (Kawakami ve ark., 2003; Dulaimi ve ark., 2004; Costa ve ark., 2007) kanserlerinde gösterilmiştir. Elde edilen bulgularda, normal hücre dizilerinde *e-cadherin* geninde metilasyon gözlenmesinin, transkripsiyonel baskılanmanın sonucu olabileceği düşünülmektedir. *e-cadherin* Geninin ifadesinin baskılanmasının hipermetilasyon ile ilişkili olduğu çeşitli kanserlerde gösterilmiştir (Corn ve ark., 2000 ; Tischoff ve Tannapfel, 2008).

NRK-52E hücrelerinde hem kontrol örneklerinde hem de FB1 uygulanan gruplarda *p16* geninin promotor bölgesindeki CpG adalarında metilasyon gözlenirken, Clone 9 hücrelerinde metilasyon gözlenmemiştir. Böbrek çeşitli hücre tiplerini içeren heterojen bir doku olduğu için genler farklı şekillerde ifade edilebilir. *p16* Tümör baskılayıcı geni hücre siklusunun gelişmesini inhibe eden siklin-D-bağımlı protein kinazların inhibitörüdür. Bir çok çalışma, DNA metilasyonundaki değişikliklerin *p16* geninin inaktivasyonuna sebep olduğu ve karaciğer, akciğer ve böbrek kanserlerinde erken aşamalarda gözlenebildiğini göstermiştir (Belinsky ve ark., 1998; Kaneto ve ark., 2001; Tannapfel ve Wittekind, 2002 ; Qin ve ark., 2004; Dulaimi ve ark., 2004; Ko ve ark., 2008). Asada ve arkadaşları *p16* geninde Clone 9 hücrelerinde hipermetilasyon gözlerken, primer karaciğer hücrelerinde ise hipermetilasyona rastlamamışlardır ve bu değişikliğin in vitro büyüme esnasında olabileceğini vurgulamışlardır (Asada ve ark., 2006). Tez çalışmasında ise; normal NRK-52E hücrelerinde metilasyon gözlenirken normal Clone 9 hücrelerinde metilasyona rastlanmamıştır.

VHL Geni her iki hücre dizisinde kontrol gruplarında metile değil iken; FB1 maruziyet gruplarında ise kısmen metiledir. *VHL* tümör baskılayıcı geninin CpG metilasyonunun ise böbrek kanserli hücrelerinin transkripsiyonel inaktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Herman ve ark., 1994; McRonald ve ark., 2009). Elde edilen bulgularda bu gendeki hipermetilasyonun FB1'in toksik etki mekanizmalarında önemli bir rolünün olabileceği düşünülmektedir.

c-myc Geni NRK-52E hücrelerinde kontrol ve FB1 uygulama gruplarında metile değildir. Clone 9 hücrelerinde ise *c-myc* geni kontrol gruplarında metile değil iken; FB1 uygulama gruplarında ise kısmen metiledir. Proto-onkogenlerden biri olan *c-*

myc bir transkripsiyon faktörünü kodlamakta olup, hücre çoğalmasını kontrol eder. *c-myc* Geninde meydana gelen hipometilasyon ile genin ekspresyonu artar ve bu da karaciğer ve böbrek kanserlerinde hücre çoğalması ile ilişkilidir (Du ve ark., 2009; Tao ve ark., 2000; Tao ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda global DNA metilasyonu ve *c-myc* geninde hipometilasyon arasında bir ilişki olabileceği gösterilmiştir. Tez çalışmasında ise; Clone 9 hücrelerinde FB1 ile global metilasyonda değişiklik gözlenmemesinin *c-myc* geninde hipometilasyon gözlenmemesi ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

p15 Geni ise her iki hücre dizisinde hem kontrol hem de FB1 maruziyet gruplarında metile değildir. *p15* Tümör baskılayıcı geni ise 5p32 kromozomu üzerinde *p16* genine komşu olup, hücre siklusunun gelişmesini inhibe eden siklin-D bağımlı protein kinazların inhibitörüdür. Karaciğer (Herman ve ark., 1996; Wong ve ark., 2000; Qin ve ark., 2004), mide kanseri (Leung ve ark., 2001) ve lösemi (Batova, 1997) gibi bir çok tümörde *p15* geninde metilasyon yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Sonuç olarak, FB1 uygulanan NRK-52E ve Clone 9 hücrelerinde *e-cadherin*, *p16* ve *p15* genlerinin promotor bölgelerindeki CpG adalarındaki metilasyonda belirgin bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. FB1 uygulanan hem NRK-52E hem de Clone 9 hücrelerinde *VHL* geninin promotor bölgelerindeki CpG adalarında kısmi metilasyon gözlenirken ; *c-myc* geninde metilasyon sadece Clone 9 hücrelerinde gözlenmiştir. Bazı durumlarda kimyasallar ilk önce gen ekspresyonundaki değişiklikleri indükleyebilir, sonra gen ekspresyonundaki değişiklikler sınırlı sayıdaki CpG bölgelerinde DNA metilasyonunu indükleyebilir. Bu nedenle, MSP yöntemi bu bölgelerde metilasyonun ölçülmesinde yetersiz kalmış olabilir.

Sadece sınırlı sayıda kimyasalın DNA metilasyonunu değiştirdiği bilinmekte olup (Ushijima ve Okochi 2005), non-genotoksik karsinogenlerin DNA metilasyonu üzerine etkileri konusunda çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Kostka ve arkadaşları 1800 mg/kg oral doz dibutil ftalatın 1, 3 ve 14 gün maruziyeti sonucunda erkek sıçanların karaciğerlerinde *c-myc* geninin promoter bölgelerindeki CpG adalarında hipometilasyona sebep olduğunu göstermiştir (Kostka ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada; sıçanlarda nikel indüklü kanser modelinde *p16*, *RARBeta2* ve *RASSF1A* genlerinin ifadelerinde azalmaya hem akciğer hem de kas tümörlerinde rastlanmış olup, bu genlerdeki hipermetilasyon ise sadece kas tümörlerinde rastlanmıştır (Jun ve ark.,

2011). Kostka ve arkadaşları fenobarbitalin sıçanlara 1/10 LD₅₀ dozlarında 1 ve 3 gün süreyle uygulanması sonucunda *p16* geninin CpG bölgelerinde metilasyona sebep olduğunu bildirmiştir (Kostka ve ark., 2007). Trikloroetilen ve metabolitleri (Tao ve ark., 1999 ; Tao ve ark., 2000) ve peroksizom proliferatörü WY-14,643'ün (Pogribny, 2007; 2008) de hücresel epigenetik değişikliklere sebep olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Erkek Wistar sıçanlara içme suyuyla 2000 ppm konsantrasyonda 12 hafta boyunca N-nitrosobis(2-Hydroxypropyl)amin maruziyeti sonucu oluşturulan akciğer adenokarsinomasında *e-cadherin* ve *p16* genlerinde hipermetilasyon gözlenmiş ve bunun da azalan gen ifadesi ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Kato ve ark., 2006).

Pogribny tarafından yapılan bir çalışmada genotoksik bir hepatokarsinojen olan 2-asetilaminofluorenin karsinojenik etkisinde bazı kritik genlerin (*Rassf1a* ve *p16*) promotor bölgelerinde erken hipermetilasyona ve mikroRNA ifadesinde değişikliğe sebep olduğu gösterilmiş (Pogribny, 2011), aynı zamanda, kimyasal karsinogeneze genotoksik karsinojenlerin etki mekanizmalarında non-genotoksik etkilerin de önemi vurgulanmıştır.

Devamlı hücre kültürleri, kanser çalışmalarında ve hatta epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Clone 9 hücreleri de Sprague Dawley türü sıçanlardan elde edilmiş karaciğer epitel hücreleridir. NRK-52E hücreleri ise; nefrotoksik ajanların hedef aldığı proksimal tübül epitel hücrelerinin karakteristik özelliklerine sahiptirler. Her iki hücre dizisinin de karsinogeneze çalışmaları için uygun olduğu belirtilmiştir. Fakat, bu hücre sistemlerinde epigenetik çalışmaların yapılması ve *in vitro* modellerin oluşturulması toksikoloji alanında önemli bir yere sahiptir. Tez çalışmasında, normal hücre kültürlerinde kanserde rol oynayan önemli genlerin metilasyonlarının belirlenmesinin gelecekte yapılacak olan epigenetik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda; FB1'in *in vitro* olarak NRK-52E ve Clone 9 hücrelerine maruziyeti sonucunda kanserle ilişkili olan bazı genlerin promotor bölgelerindeki CpG adalarında metilasyonda değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlardan hareketle, FB1'in karsinojenik etkisinde epigenetik bir mekanizma olarak DNA metilasyonundaki değişikliklerin rolünün olabileceği öne sürülmektedir. Sonuç olarak FB1'in toksisitesinde DNA metilasyonunun gen ifadesi ve histon

modifikasyonları ile ilişkisi konuları üzerine çalışmalar yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

Aniagu, S.O., Williams, T.D. ve Chipman, J.K. (2009). Changes in gene expression and assessment of DNA methylation in primary human hepatocytes and HepG2 cells exposed to the environmental contaminants-Hexabromocyclododecane and 17-beta oestradiol. *Toxicology*, 256(3), 143-151.

Armstrong, K.M., Bermingham, E.N., Bassett, S.A., Treloar, B.P., Roy, N.C. ve Barnett, M.P. (2011). Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. *Biotechnology Journal*, 6(1), 113-117.

Asada, K., Asada, R., Yoshiji, H., Fukui, H., Floyd, R.A. ve ark. (2006). DNA cytosine methylation profile in various cancer-related genes is altered in cultured rat hepatocyte cell lines as compared with primary hepatocytes. *Oncology Reports* 15: 1241-1248.

Batova, A. (1997). Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research*, 57, 832–836.

Baylin, S.B. ve Herman, J.G. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics*, 16, 168-174.

Baysal, K., Acılan, C, Serhatlı, M., Adıgüzel, Z. Ve Kacar, Ö. (2011). Temel moleküler hücre biyolojisi teknikleri eğitimi. Tübitak MAM Gen mühendisliği ve Biyoteknoloji enstitüsü.

Belinsky, S.A., Nikula, K.J., Palmisano, W.A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E. ve ark. (1998). Aberrant methylation of p16 (INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 11891-11896.

Bennett, J.W. ve Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 , 497-516.

Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G. ve ark. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 11, 743–745.

Bilir, A., Solakoglu, S. ve Ahışalı, B. (2004). Uygulamalı Flow Sitometri-PCR ve Hücre Kültürü Kursu, İstanbul.

Bird, A.P., Southern, E.M. (1978). Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *Jornal of Molecular Biology*, 118(1), 27-47.

Bombail, V., Moggs, J.G. ve Orphanides, G. (2004). Perturbation of epigenetic status by toxicants. *Toxicology Letters*, 149(1-3), 51-58.

Brena, R.M., Huang, T.H., Plass, C. (2006). Toward a human epigenome. *Nature Genetics*, 38(12), 1359-1360.

Browne, R.M. (1988). The In Vitro Assessment of the Cytotoxicity of Dental Materials--Does It Have a Role? *International Endodontic Journal*, 21, 50-58.

Butcher, L.M. ve Beck S. (2010). AutoMeDIP-seq: A high-throughput, whole genome, DNA methylation assay, *Methods*, 52(3), 223-231.

Caudill, M.A., Wang, J.G., Melnyk, S., Pogribny, I.P., Jernigan, S., Collins, M.D. ve ark. (2001). Adenosylhomocysteine concentratinos predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine Beta-synthase heterozygous mice. *Journal of Nutrition*, 131(11), 2811-2818.

Chen, T., Mally, A., Ozden, S. ve Chipman, J.K. (2010). Low Doses of the Carcinogen Furan Alter Cell Cycle and Apoptosis Gene Expression in Rat Liver Independent of DNA Methylation. *Environmental Health Perspectives*, 118(11), 1597-1602.

Chen, T., Williams, T.D., Mally, A., Hamberger, C., Mirbahai, L., Hickling, K. ve ark.(2011). Gene expression and epigenetic changes by furan in rat liver. *Toxicology*, 26, 63-70.

Cheung, H.H., Lee, T.L., Davis, A.J., Taft, D.H., Rennert, O.M. ve Chan, W.Y. (2010). Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated

genes and non-coding RNAs in human testicular cancer. *British Journal of Cancer*, 102(2), 419-427.

Choumenkovitch, S.F., Selhub, J., Bagley, P.J., Maeda, N., Nadeau, M.R., Smith, D.E. ve ark. (2002). In the cystathionine beta-synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific. *Journal of Nutrition*, 132(8), 2157-2160.

Christman, J.K. (1982). Separation of major and minor deoxyribonucleoside monophosphates by reverse-phase high-performance liquid chromatography: a simple method applicable to quantitation of methylated nucleotides in DNA. *Analytical Biochemistry*, 119(1), 38-48.

Chu, F.S. ve Li, G.Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 847-852.

Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. ve Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research*, 22(15), 2990-2997.

Coffin, J.C., Ge, R., Yang, S., Kramer, P.M., Tao, L. ve Pereira, M.A. (2000). Effect of trihalomethanes on cell proliferation and DNA methylation in female B6C3F1 mouse liver. *Toxicological Sciences*, 58(2), 243-252.

Corn, P.G., Smith, B.D., Ruckdeschel, E.S., Douglas, D., Baylin, S.B. ve Herman, J.G. (2000). E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia. *Clinical Cancer Research*, 6, 4243-4248.

Costa, V.L., Henrique, R., Ribeiro, F.R., Pinto, M., Oliveira, J., Lobo, F. ve ark. (2007). Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors. *BMC Cancer*, 7, 133.

Cottrell, S.E., Distler, J., Goodman, N.S., Mooney, S.H., Kluth, A., Olek, A. ve ark. (2004). A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Research*, 32(1), e10.

Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.

Das, P.M. ve Singal, R. (2004). DNA Methylation and Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 4632-4642.

Davis, J.M. (1996). Basic Cell Culture. A Practical Approach. Oxford University Press INC., New York.

Davis, C.D. ve Uthus, E.O. (2004). DNA methylation, Cancer Susceptibility and Nutrient Interactions. *The Society for Experimental Biology and Medicine*, 229(10), 988-995.

Detich, N., Hamm, S., Just, G.K., Nox, J.D. ve Szyf, M. (2003). The methyl donor S- Adenosylmethionine inhibits active demethylation of DNA: a candidate novel mechanism for the pharmacological effects of S-Adenosylmethionine. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 20812-20820.

Du, Y.P., Peng, J.S., Sun, A., Tang, Z.H., Ling, W.H. ve Zhu, H.L. (2009). Assessment of the effect of betaine on p16 and c-myc DNA methylation and mRNA expression in a chemical induced rat liver cancer model. *BMC Cancer.*, 9, 261.

Dulaimi, E., Ibanez de Caceres, I., Uzzo, R.G., Al-Saleem, T., Greenberg, R.E., Polascik, T.J. ve ark. (2004). Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(12 Pt 1), 3972-3979.

Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Blake, C., Shibata, D. ve ark. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 28(8), E32.

EC. (2006). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006. L 364/18.

EHC. (2000). Fumonisin B1. Environmental Health Criteria International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva. 219, 1-150.

Eriksen, G.S. ve Alexander, J. (1998). Fusarium toxins in cereals: a risk assessment. *Copenhagen: Nordic Council of Ministers Publisher*.

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 286-298.

Esteller, M. ve Herman, J.G.(2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *The Journal of Pathology*, 196(1), 1-7.

FDA. (2001). Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance. 9.

Feinberg, A.P. ve Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301, 89-92.

Feinberg, A.P. (2004). The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biology*, 14(6), 427-432.

Freshney R.I. (1986). Animal cell culture: A practical approach. Oxford: IRL Press Limited.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W. ve ark. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1827-1831.

Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A., Sugimoto, J., Oda, T., Miura K.,ve ark. (2005). Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Annals of human genetics*, 69(Pt 1), 134.

Galvano, F, Campisi, A, Russo, A, Galvano, G, Palumbo, M, Renis, M, ve ark. (2002). DNA damage in astrocytes exposed to fumonisin B1. *Neurochemical Research*, 27, 345–351.

Galvano, F, Russo, A, Cardile, V, Galvano, G, Vanella, A, ve Renis, M. (2002). DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 25–31.

Ge, R., Wang, W., Kramer, P.M., Yang, S., Tao, L. ve Pereira, M.A. (2001a). Wy-14,643-induced hypomethylation of the c-myc gene in mouse liver. *Toxicological Sciences*, 62(1), 28-35.

Ge, R., Yang, S., Kramer, P.M., Tao, L. ve Pereira, M.A. (2001b). The effect of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid on DNA methylation and cell proliferation in B6C3F1 mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15(2), 100-106.

Gehrke, C.W. (1984). Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA. *Journal of chromatography*, 301, 199-219.

Gelderblom, W.C.A., Marasas, W., Thiel, P., Semple, E. ve Farber, E. (1989). Possible non-genotoxic nature of active carcinogenic components produced by *Fusarium moniliforme*. *The American Association for Cancer Research*, 30, 144-147.

Gelderblom, W.C.A. ve Snyman, S.D. (1991). Mutagenicity of potentially carcinogenic mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Mycotoxin Residues*, 7, 46-52.

Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O. ve Thiel, P.G. (1991). Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. *Carcinogenesis*, 12, 1247-1251.

Gelderblom, W.C.A., Semple, W., Marasa, W.F.O. ve Farber, E. (1992b). The cancer initiating potential of the fumonisin B1 mycotoxins. *Carcinogenesis*, 13, 433-437.

Gelderblom, W.C.A., Snyman, S.D., Abel, S., Lebepe-Mazur, S., Smuts, C.M., Van der Westhuizen, L. ve Marasas, W.F.O. (1995a). Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats: A review regarding mechanistic implications for establishing risk in humans.

Gelderblom, W.C.A., Abel, S., Smuts, C.M., Marnewick, J., Marasas, W.F.O., Lemmer, E.R., ve ark.(2001). Fumonisin induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion. *Environmental Health Perspect*, 109, 291-300.

Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C.M., Yang, A.S., Nguyen, T., Beart, R.W., Van Tornhout, J.M. ve ark. (1995). Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing, *Cancer Research*, 55(20), 4531-4535.

Gonzalzo, M.L. ve Jones, P.A. (1997). Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Research*, 25(12), 2529-2531.

Graff, J.R., Herman, J.G., Lapidus, R.G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D.F. ve ark. (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Research*, 55(22), 5195-5199.

Haschek, W.M., Gumprecht, L.A., Smith, G., Tumbleson, M.E. ve Constable, P.D. (2001). Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environmental Health Perspectives*, 109, 251–257.

Herman, J.G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M.I., Zbar, B., Liu, S. ve ark.(1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9700-9704.

Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. ve Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9821-9826.

Herman, J.G. ve Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042-2054.

Hernandez, L., Petropoulos, C.J., Hughes, S.H. ve Lijinsky, W. (1991). DNA methylation and oncogene expression in methapyrilene-induced rat liver tumors and in treated hepatocytes in culture. *Molecular Carcinogenesis*, 4(3), 203-209.

Howard, P.C., Eppley, R.M., Stack, M.E., Warbritton, A., Voss, K.A., Lorentzen, R.J., ve ark.(2001). Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3 F1 mice. *Environmental Health Perspect*, 109, 277–282.

Hu J., Zhang W., Ma, H., Cai, Y., Sheng, G., ve Fu, J.(2010). Simultaneous determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in DNA sample by high performance liquid chromatography/positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878, 2765–2769.

IARC, 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol: 56, Lyon, France.

ISO 7405 (1997). International Standard 7405. “Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials.” International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 10993 (1999). International Standard 10993 “Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods.” International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

JECFA. (2001). In: Fumonisin B₁, B₂ and B₃, in “Safety evaluations of specific mycotoxins”. Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, Switzerland.

Jin, B., Kim, G., Park D.W. ve Ryu, D.Y. (2004). Microarray analysis of gene regulation in the Hepa1c1c7 cell line following exposure to the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology In Vitro*, 18(5), 659-664.

Jones, P.A. ve Baylin, S.B., (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 415-428.

Jun, Z., Jing, Z., MengJie, L., YouJun, W., YingYing, F., Yang, Z. ve ark. (2011). Methylation of *RAR-β2*, *RASSF1A*, and *CDKN2A* genes induced by nickel subsulfide and nickel-carcinogenesis in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 24(2), 163-171.

Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H. ve ark. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Research*, 57(5), 808-811.

Kaneto, H., Sasaki, S., Yamamoto, H., Itoh, F., Toyota, M., Suzuki, H. ve ark. (2001). Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut*, 48, 372-377.

Kato, A., Shimizu, Y., Fujii, H., Honoki, K. ve Tsujiuchi, T. (2006). Aberrant DNA methylation of E-cadherin and p16 genes in rat lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine. *Molecular carcinogenesis*, 45, 106-111.

Kawahara, H., Yamagami, A. ve Nakamura, M. (1968). Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Journal of Dental Hygiene*, 18, 443-467.

Kawakami, T., Okamoto, K., Ogawa, O. ve Okada, Y. (2003). Multipoint methylation and expression analysis of tumor suppressor genes in human renal cancer cells. *Urology*, 61(1), 226-230.

Kehe, K., Reichl, F.X., Durner, J., Walther, U., Hickel, R. ve Forth, W. (2001). Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials*, 22, 317-322.

Kildal, K.K. ve Ruyter, L. (1994). How different curing methods affect the degree of conversion of resin based inlay/onlay materials. *Acta Odontologica Scandinavica*, 52, 315-322.

Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. ve Xu, Y. (2000). Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Human and Experimental Toxicology*, 19(10), 543-555.

Ko, E., Kim, Y., Kim, S.J., Joh, J.W., Song, S., Park, C.K. ve ark. (2008). Promoter hypermethylation of the p16 gene is associated with poor prognosis in recurrent early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 17(9), 2260-2267.

Kondo, K., Takahashi, Y., Hirose, Y., Nagao, T., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M. ve ark. (2006). The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer*, 53(3), 295-302.

Kostka, G., Urbanek, K. ve Ludwicki, J.K. (2007). The effect of phenobarbital on the methylation level of the p16 promoter region in rat liver. *Toxicology*, 239, 127-135.

Kostka, G., Olejnik, K.U. ve Wiadrowska, B. (2010). Di-butyl phthalate-induced hypomethylation of the c-myc gene in rat liver. *Toxicology and Industrial Health*, 26(7) 407-416.

Kouadio JH, Dano SD, Moukha S, Mobio TA, Creppy EE. (2007). Effects of combinations of Fusarium mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. *Toxicon*, 49(3), 306-317.

Kwon, G.Y., Yoo, B.C., Koh, K.C., Cho, J.W., Park, W.S. ve Park, C.K. (2005). Promoter methylation of E-cadherin in hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *Journal of Korean Medicine Science*, 20, 242-247.

Lee, W.H., Morton, R.A., Epstein, J.I., Brooks, J.D., Campbell, P.A. ve Bova, G.S. ve ark. (1994). Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11733-11737.

Leung, W.K., Yu, J., Ng, E.K., To, K.F., Ma, P.K., Lee, T.L. ve ark. (2001). Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer*, 91(12), 2294-2301.

Li, N., Ye, M., Li, Y., Yan, Z., Butcher, L.M., Sun, J. ve ark. (2010). Whole genome DNA methylation analysis based on high throughput sequencing technology. *Methods*, 52(3), 203-212

Lim, C.W., Parker, H.M., Vesonder, R.F. ve Haschek, W.M. (1996). Intravenous fumonisin B1 induces cell proliferation and apoptosis in the rat. *Natural Toxins*, 4, 34-41.

Ma, H., Zhang, W., Hu, J., Yu, Z., Chen, Y., Luo Q. ve ark.(2009). Analysis of global DNA methylation levels in human blood using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 15, 555-561.

Mally, A. ve Chipman, J.K. (2002). Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology*, 180, 233-248.

Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W., Thiel, P.G. ve Van der Lugt, J.J. (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55, 197-203.

Matsumura, T., Makino, R. ve Mitamura, K. (2001). Frequent down regulation of E-cadherin by genetic and epigenetic changes in the malignant progression of hepatocellular carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 7, 594-599.

McRonal, F.E., Morris, M.R., Gentle, D., Winchester, L., Baban, D., Ragoussis, J. ve ark. (2009). CpG methylation profiling in vhl related and VHL unrelated renal cell carcinoma. *Molecular Cancer*, 8, 31.

Melki, J.R., Vincent, P.C. ve Clark, S.J. (1999). Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Research*, 59(15), 3730-3740.

Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C. ve ark. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Medicine*, 1(7), 686-692.

Merrill, A.H. Jr., Wang, E., Vales, T.R., Smith, E.R., Schroeder, J.J., Menaldino, D.S. ve ark. (1996). Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. *Advances in experimental Medicine and Biology*, 392, 297-306.

MethPrimer–Design Primers for Methylation PCRs.
<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>.

Methyl Primer Express Software 1. Applied Biosystems. (designed and created by M.F. Fraga, C. Ferrero, M. Esteller).

Mjör, I.A. ve Hensten-Pettersen A. (1983). The Biological Compatibility of Alternative Alloys. *The International Dental Journey*, 33, 35–40.

Mobio TA, Anane R, Baudrimont I, Carratú MR, Shier TW, Dano SD, Ueno Y, Creppy EE. (2000). Epigenetic properties of fumonisin B(1): cell cycle arrest and DNA base modification in C6 glioma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164(1), 91-96.

Moggs, J.G., Goodman, J.I., Trosko, J.E. ve Roberts R.A. (2004). Epigenetics and cancer: implications for drug discovery and safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(3), 422-30.

Niwa, T., Yamashita, S., Tsukamoto, T., Kuramoto, T., Nomoto, T., Wakazono, K. ve ark. (2005). Whole-genome analyses of loss of heterozygosity and methylation analysis of four tumor-suppressor genes in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas. *Cancer Sciences*, 96(7), 409-413.

Norred, W.P., Plattner, R.D., Vesonder, R.F., Hayes, P.M., Bacon, C.W. ve Voss, K.A. (1990). Effect of *Fusarium moniliforme* metabolites on unscheduled DNA synthesis (UDS) in rat primary hepatocytes. *The Toxicologist*, 10, 65 – 171.

Norred, W.P., Plattner, R.D., Vesonder, R.F., Bacon, C.W. ve Voss, K.A. (1992). Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 30, 233 - 237.

NTP. (1999). NTP technical report on the Toxicology and Carcinogenesis studies of fumonisin B1. (Cas No. 116355-83-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed studies). NTP TR 496, NIH Publication No. 99-3955, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.

Ohtani-Fujita, N., Fujita, T., Aoike, A., Osifchin, N.E., Robbins P.D. ve ark. Sakai, T., (1993). CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene*, 8(4), 1063-1067.

Omurtag, G.Z. (2002). Mikotoksinli besinlerin oluşturacağı tehlikeler. *Clinic*, 1, 34-37.

Özdemir, G.K. (2007). Farklı yumuşak astar materyellerinin sitotoksitelerinin fare fibroblastları üzerinde hücre kültürü yöntemi ile in vitro olarak değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara Üniversitesi. Ankara.

Qin, Y., Liu, J.Y., Li, B., Sun, Z.L. ve Sun, Z.F. (2004). Association of low p16INK4a and p15INK4b mRNAs expression with their CpG islands methylation with human hepatocellular carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 10(9), 1276-1280.

Palmke, N., Santacruz, D. ve Walter, J. (2011). Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip. *Methods*, 53(2):175-184.

Park, J.G. ve Chapman, V. M. (1994). CpG island promoter region methylation patterns of the inactive-X-chromosome hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt) gene. *Molecular Cell Biology*, 14, 7975–7983.

Pereira, M.A., Wang, W., Kramer, P.M. ve Tao, L. (2004). DNA hypomethylation induced by non genotoxic carcinogens in mouse and rat colon. *Cancer Letters*, 212(2), 145-151.

Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Woods, C.G., Witt, S.E.ve Rusyn I. (2007). Epigenetic effects of the continuous exposure to peroxisome proliferator WY-14,643 in mouse liver are dependent upon peroxisome proliferator activated receptor alpha,, 1, 625(1-2), 62-71.

Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Boureiko, A., Melnyk, S., Bagnyukova, T.V., Montgomery, B ve ark. (2008). Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutation Research*, 644(1-2), 17-23.

Pogribny, I.P., Muskhelishvili, L., Tryndyak, V.P. ve Beland F.A. (2011). The role of epigenetic events in genotoxic hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene, *Mutation Research*. 17, 722(2), 106-113.

Ramsahoye, B.H. (2002). Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods*, 27(2), 156-161.

Robertson, K.D. (2002). DNA methylation and chromatin: Unraveling the tangled web. *Oncogene*, 21, 5361-5379.

Ruike, Y., Imanaka, Y., Sato, F., Shimizu, K. ve Tsujimoto, G. (2010). Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 11, 137.

Sandhu, J., Kaur, B., Armstrong, C., Talbot, C. J., Steward, W.P., Farmer, P.B. ve ark. (2009). Determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine in genomic DNA using high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 877, 1957-1961.

Sawan, C., Vaissie`re, T., Murr, R. ve Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research*, 642, 1–13.

SCF. (2000). Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins Part 3: Fumonisin B1, 17 October 2000, SCF/Cs/CNTM/myc/24 Final, European Commission, Brussels.

Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22, 6-11.

Schmalz, G. (1997). Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical Oral Investigations*, 1, 154-162.

Singal, R. ve Ginder, G.D. (1999). DNA methylation. *Blood*, 93, 4059-4070.

Smith, D.C. ve Williams, D.F. (2001). Biocompatibility of dental materials. (Vol II). Florida: Boca Raton Crc.

Smith, J.S. ve Thakur, R.A. (1996). Occurance and fate of fumonisins in beef. In: Jackson L, ed. Fumonisin in Food. *New York: Plenum Press*, 39-55.

Song, L., James, S.R., Kazim, L. ve Karpf, A.R.(2005). Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(2), 504-510.

Soriano, J.M., González, L. ve Catalá, A.I. (2005). *Progress in Lipid Research*, 44, 345-356.

Spier RE. ve Griffiths JB. (1985). Animal Cell Biotechnology. Volume 1: Cell Biology Experimental Aspects. Academic Pres Inc., London.

Stockmann-Juvala, H. ve Savolainen, K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human and Experimental Toxicology*, 27, 799-809.

Steyn, P.S. ve Stander, M.A. (1999). Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisin. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM, eds. General and Applied Toxicology. 2nd Edition. *United Kingdom: Macmillan Reference Ltd*, 2145-2176.

Sun, H., Zhou, X., Chen, H., Li, Q. ve Costa, M. (2009). Modulation of histone methylation and MLH1 gene silencing by hexavalent chromium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 15, 237(3), 258-266.

Suzuki, H., Itoh, F., Toyota, M., Kikuchi, T., Kakiuchi, H., Hinoda, Y. ve ark. (1999). Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 83(3), 309-313.

Swafford, D.S., Middleton, S.K., Palmisano, W.A., Nikula, K.J., Tesfaigzi, J., Baylin, S.B. ve ark. (1997). Frequent aberrant methylation of p16INK4a in primary rat lung tumors, *Molecular Cell Biology*, 17(3), 1366-1374.

Sydenham, E.W., Theil, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Van Schalkwyk, D.J. ve Koch, K.R. (1990). Natural occurrence of some Fusarium mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1900-1903.

Szyf, F.M. (2011). The implications of DNA methylation for toxicology: toward toxicomethylomics, the toxicology of DNA methylation, *Toxicological Sciences*, 120(2), 235-255.

Takahashi, Y., Kondo, K., Hirose, T., Nakagawa, H., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M. ve ark. (2005). Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Molecular Carcinogenesis*, 42(3), 150-158.

Tannapfel, A. ve Wittekind, C. (2002). Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Archiv*, 440, 345-352.

Tao, L., Ge, R., Xie, M., Kramer, P.M. ve Pereira, M.A. (1999). Effect of trichloroethylene on DNA methylation and expression of early-intermediate protooncogenes in the liver of B6C3F1 mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 13, 231-237.

Tao, L., Yang, S., Xie, M., Kramer, P.M. ve Pereira, M.A. (2000). Hypomethylation and overexpression of c-jun and c-myc protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoted mouse liver tumors. *Cancer Letters*, 158, 185-193.

Tao, L., Wang, W., Li, L., Kramer, P.K. ve Pereira, M.A. (2005). DNA hypomethylation induced by drinking water disinfection by-products in mouse and rat kidney. *Toxicological Sciences*, 87, 344-352.

T.C. Resmi Gazete, 17 Mayıs 2008. Sayı: 26879. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ. Tebliğ No: 2008/26.

T.C. Resmi Gazete, 29 Aralık 2011. Sayı: 28157 (3. Mükerrer). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği.

Thomassin, H., Kress, C. ve Grange T. (2004). MethylQuant: a sensitive method for quantifying methylation of specific cytosines within the genome. *Nucleic Acids Research*, 32(21), e168.

Tischoff, I. ve Tannapfel, A. (2008). DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 21, 1741-1748.

Ushijima, T. ve Okochi,T.E. (2005). Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from?. *Cancer Science*, 96(4), 206-211.

Ushijimata, T., Morimura K., Hosoya Y., Okonogi H., Tatematsu M. ve Sugimura T. (1997). Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2284-2289.

Wang , E., Riley, R.T., Meredith, F.I. ve Merrill, A.H. Jr. (1999). Fumonisin B1 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *Journal of Nutrition*, 129, 214 – 220.

Wataha, J.C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 86, 203-209.

Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haase, M., Lam, W.L. ve ark.(2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*, 37(8), 853-862.

WHO. (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic risk to Humans, vol. 56, 445–466.

Williams, J.H., Philips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K. ve Jolly, C.M. ve Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.

Wong, I.H., Lo, Y.M., Yeo, W., Lau, W.Y. ve Johnson, P.J. (2000). Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients. *Clinical Cancer Research*, 6(9), 3516-3521.

Xiong, Z. ve Laird P.W. (1997). A sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Research*, 25(12), 2532-2534.

Yoshiura, K., Kanai, Y., Ochiai, A., Shimoyama, Y., Sugimura, T., Hirohashi, S. (1995). Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7416-7419.

Yang, B., Guo, M., Herman, J.G. ve Clark, D.P. (2003). Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *American Journal of Pathology*, 163(3), 1101-1107.

Yurdun, T. (1996). Aflatoksinler üzerine kısa açıklama. *Marmara Üniversitesi. Eczacılık Derneği*, 12(1), 1-8.

Zhang, B., Sun, S., Shen, L., Zu, X., Chen, Y., Hao, J. ve ark.(2011). DNA methylation in the rat livers induced by low dosage isoniazid treatment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(3), 486-490.

Zilberman, D. ve Henikoff, S.(2007). Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Developments*, 134, 3959-3965.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Göksun	Soyadı	Demirel
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	15.03.1985
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	36794129078
Email	goksun_karakus@hotmail.com	Tel	05558543430

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi-Fen Fakültesi-Biyoloji Bölümü	2008
Lise	O.C.F. Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Bursiyer	İstanbul Üniversitesi-Eczcılık Fakültesi	2009-2011

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	76	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	77	77	70
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Ozden S, **Demirel G**, Alpertunga B. Effects of Fumonisin B1 on DNA methylation changes in rat cell cultures. Society of Toxicology 51th Annual Meeting and ToxExpo 2012, 11-15 Mart 2012, San Fransico, Amerika Birleşik Devletleri.

Özden S, Turgut Kara N, **Karakuş G**, Chen T, Alpertunga B, Dekant W, Chipman JK, Mally A. Promoter DNA methylation profile as an early event in non-genotoxic carcinogenesis. 47th Congress of the European Societies of Toxicology, 28-31 Ağustos 2011, Paris, Fransa.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Yüzmek.