



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PREİMLANTASYON DÖNEMİNDEKİ EMBRİYOLARIN
GELİŞİM SÜRECİNDE DNMT1 VE DNMT3A
GENLERİNİN
ROLLERİ**

Fatma Uysal

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alp CAN**

**ANKARA
2021**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PREİMLANTASYON DÖNEMİNDEKİ EMBRİYOLARIN
GELİŞİM SÜRECİNDE DNMT1 VE DNMT3A
GENLERİNİN
ROLLERİ**

Fatma Uysal

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alp CAN**

**ANKARA
2021**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum 'Preimplantasyon dönemindeki embriyoların gelişim sürecinde *Dnmt1* ve *Dnmt3a* genlerinin rolleri' başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Fatma UYSAL

TARİH: 13.04.2021

İMZA

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Fatma UYSAL tarafından hazırlanan ‘Preimplantasyon dönemindeki embriyoların gelişim sürecinde *Dnmt1* ve *Dnmt3a* genlerinin rolleri’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi: 13.04.2021

Prof. Dr. Alp CAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Jüri başkanı

Prof. Dr. Özgür ÇINAR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
(Raportör)

Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
(Üye)

Prof. Dr. Esra ERDEMLİ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
(Üye)

Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
(Üye)

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	
1.1. Memelilerde İmplantasyon Öncesi Embriyonun Gelişim Süreci	1
1.2. Embriyonik Genom Aktivasyonu	4
1.3. Epigenetik Mekanizmalar	5
1.4. DNA Metilasyonu	7
1.5. DNMT'lerin Genel Yapısı	10
1.6. DNMT'lerin Genel Özellikleri	12
1.7. İmplantasyon Öncesi Embriyo Gelişim Sürecinde DNA Metilasyonu ile DNMT'lerin ifadenmeleri ve Görevleri	14
1.8. İç Hücre Kitlesi ve Trofoektoderm Tabakalarındaki DNA Metilasyonu Farklılıkları	19
1.9. siRNA (Small Interfering RNA; Küçük müdahaleci (susturucu) RNA)	21
2. GEREÇ ve YÖNTEM	
2.1. Süperovülasyon Protokolü	25
2.2. Gonadotropinlerin Hazırlanışı	25
2.3. Embriyoların Süperovülasyon ile Toplanması ve Kullanıma Hazırlanması	25
2.4. Grupların Oluşturulması ve Embriyo Kültür Koşulları	26
2.5. siRNA Uygulaması	27
2.6. İmmünfloresan Boyama Yöntemi	28
2.6.1. Kullanılan Solüsyonlar	29
2.7. Mikroskopik Gözlemler	31
2.8. Western Blot Uygulaması	32
2.9. İstatistiksel Analizler	34
3. BULGULAR	
3.1 Embriyonun Gelişim Dinamiği	35
3.1.1. Blastokistin Gelişim Dinamiği	36
3.2. Protein Miktarı ve Hücre içi Dağılım Analizleri	38
3.2.1. Dnmt1 Proteininin Miktarı	38
3.2.2. Dnmt3a Proteininin Miktarı	39
3.2.3. İmmünfloresan Analizler	40
3.2.3.1. Dnmt1 Proteininin Dağılımı ve Yoğunluğu	41
3.2.3.2. Dnmt3a Proteininin Dağılımı ve Yoğunluğu	44
3.2.3.3. 5-Metil Sitozin (5mC) Boyaması	48

4. TARTIŞMA	50
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	54
ÖZET	56
SUMMARY	57
KAYNAKLAR	58
EKLER	65
Ek-1. Etik Kurul Raporu	65
ÖZGEÇMİŞ	66



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının hipotezi “*Dnmt1* ve *Dnmt3a* enzimlerinin kodladığı proteinler farede implantasyon öncesi dönemdeki embriyonun gelişim sürecinde yaşamsal rol oynar” olup bu iki önemli enzimin embriyo gelişimine olan etkisi gösterilmiştir. Aynı zamanda bu genlerin susturulması ile global DNA metilasyonu arasındaki ilişki de ortaya konulmuştur.

Akademik kariyerimde destek olup yol göstericiliği ile yanımda olan, tezimin ve tez projemin şekillenmesinde kıymetli önerileri ile destekleyen, bilimsel ilerleme yolunda tecrübelerinden yararlandığım ve örnek aldığım danışman hocam Prof. Dr. Alp Can’a,

Tezimin projelendirilmesi ve gerçekleştirilmesi sırasında gerek öneri, bilgi ve tecrübeleri gerekse manevi desteği ile her zaman yanımda olan ve akademik bakış açımın gelişmesinde önemli katkısı olan Prof. Dr. Özgür Çınar’a,

Tüm akademik hayatım boyunca her zaman yanımda olarak en büyük destekçim olan, bilimsel ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Çiler Çelik Özenci ve Prof. Dr. Emin Türkay Korgun’a,

Tez projemi gerçekleştirirken bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nın tüm değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına; aynı zamanda Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nın çok kıymetli öğretim üyelerine ve çalışanlarına,

Yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün tüm değerli çalışanlarına;

Son olarak, eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AdoMet	Adenozil Metiyonin
ATRX	Sitozin Zengin Çinko Parmak DNA Bağlama
BSA	Bovine Serum Albumin
CRR	Yükten Zengin Bölge
CpG	Sitozin Fosfat Guanin
CXXC	Sisteinden Zengin Bölge
DNMT	DNA Metiltransferaz
DRFTS	DNA Replikasyon Odakları Hedefleme Dizisi
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
LH	Luteinleştirici Hormon
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
PBD	Proliferatif Hücre Nükleer Antijen Bağlama
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PFA	Paraformaldehit
PHD	Polybromo Homoloji
PMSG	Gebe Kısırak Serum Gonadotropini
PWWP	Tetrapeptit Kromatin Bağlama
RNAi	RNA Etkileşimi

SCNT	Somatik Hücre Çekirdeği Transferi
siRNA	Küçük Müdahaleci (susturucu) RNA



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Fare embriyosunun preimplantasyon sürecindeki gelişim aşamaları	1
Şekil 1.2. 8 hücreli (A) ve kompaksiyon aşamasındaki (B) embriyoların taramalı elektron mikroskopunda kaydedilmiş görüntüleri	2
Şekil 1.3. Blastokist aşamasındaki fare embriyosu	4
Şekil 1.4. Epigenetik mekanizmalar	6
Şekil 1.5. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları	7
Şekil 1.6. DNA metilasyonu	8
Şekil 1.7. DNA'nın metilasyonunda DNA metiltransferazların rolü	9
Şekil 1.8. DNA metilasyonunun rol oynadığı temel hücrel olaylar	10
Şekil 1.9. DNA metiltransferazların genel yapısı	12
Şekil 1.10. Gametogenez ve embriyogenez sürecinde global DNA metilasyonunun izlediği düzey	15
Şekil 1.11. DNMT'lerin farklı türlerde farklı gelişim süreçlerindeki yerleşimleri	16
Şekil 1.12. Blastokist aşamasında DNA metiltransferazların ifadenmeleri	20
Şekil 1.13. dsRNA aracılı siRNA teknolojisi	22
Şekil 2.1. Deney tasarımı	28
Şekil 3.1. Zigotun kültürüyle embriyo gelişiminin DIC görüntüleri	37
Şekil 3.1.1. Zigotun kültürüyle embriyo (2H-Morula) ve blastokist gelişim oranları	38
Şekil 3.2. Dnmt1 proteininin miktarı	39
Şekil 3.3. Dnmt3a proteininin miktarı	40

Şekil 3.4. Dnmt1 kontrol grubu	42
Şekil 3.4.1. Dnmt1 NT (Hedef geni içermeyen siRNA) grubu	42
Şekil 3.4.2. Dnmt1 siRNA grubu	43
Şekil 3.4.3. Dnmt1 proteini ifadenmesi	44
Şekil 3.5. Dnmt3a kontrol grubu	45
Şekil 3.5.1. Dnmt3a NT (Hedef geni içermeyen siRNA) grubu	46
Şekil 3.5.2. Dnmt3a siRNA grubu	46
Şekil 3.5.3. Dnmt3a proteini ifadenmesi	47
Şekil 3.5.4. Dnmt1 ve Dnmt3a özet	48
Şekil 3.6. 5mC işaretleme	49

ÇİZELGELER

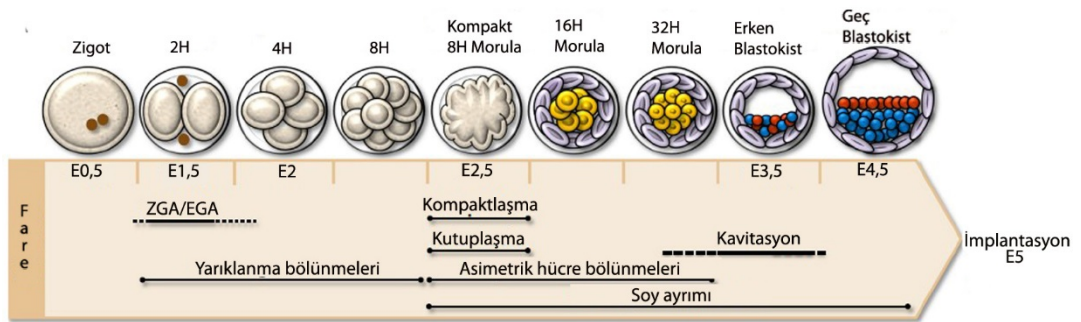
Çizelge 2.1. İmmünfloresan boyama yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları	31
Çizelge 2.2. Western blot yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları	34



1. GİRİŞ

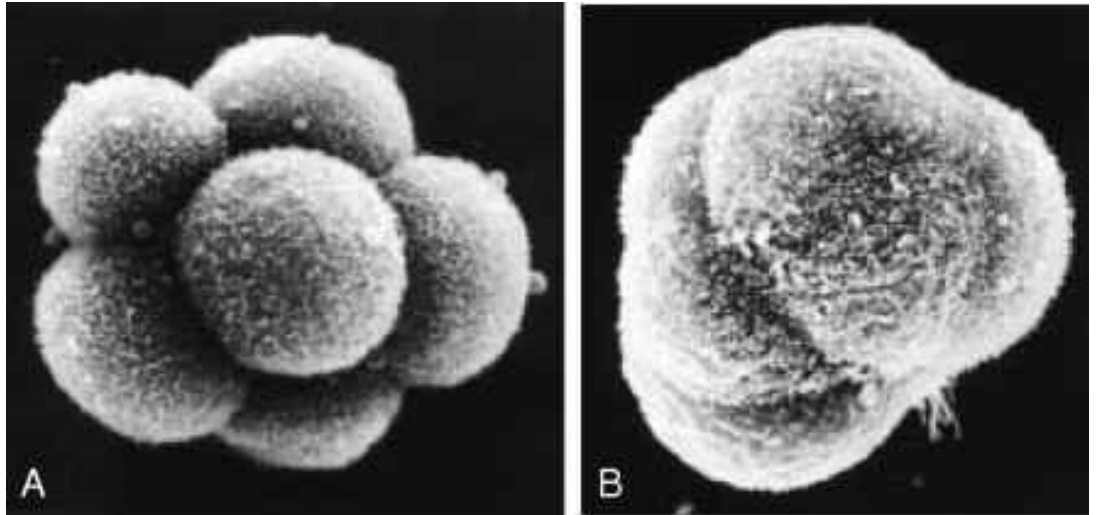
1.1. Memelilerde İmplantasyon Öncesi Embriyonun Gelişim Süreci

Memeli organizmasının gelişimi ovosit ve spermatozoonun fertilizasyonu ile başlar. Fertilizasyonla oluşan zigot, Fallop tüplerinden uterus doğru ilerlerken embriyoya dönüşür ve bu aşamada implantasyona (yataklanma) hazırlanır. Zigotun endometriyuma tutunması ve yataklanması anlamına gelen implantasyona kadar geçirdiği süreç, “implantasyon öncesi (preimplantasyon) embriyo gelişim süreci” olarak tanımlanır. Preimplantasyon gelişim süreci, pronükleus oluşumu, zigotun yarıklanma bölünmeleri, embriyoda genom aktivasyonu, kompaksiyon (tıkızlaşma), kavitasyon (boşluk oluşumu) ve blastokist (kist benzeri yapı) oluşumu aşamalarını kapsar (Şekil 1.1). Bu aşamalar genel olarak tüm memelilerde benzer olmakla beraber insanın ve farenin gelişimi aşamalarında zaman farklılıkları gösterir (Sozen ve ark., 2014).



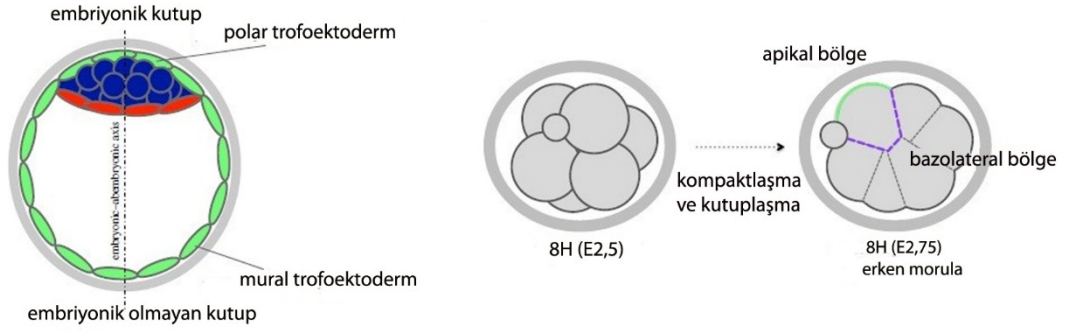
Şekil 1.1. Fare embriyosunun preimplantasyon sürecindeki gelişim aşamaları. Preimplantasyon gelişim süreci embriyonun endometriyumuna tutunup gömülene kadar olan sürecidir. Bu süreç, pronükleus oluşumu, zigotun yarıklanma bölünmeleri, embriyoda genom aktivasyonu, kompaksiyon, kavitasyon ve blastokist oluşumu aşamalarını kapsar. 2H; 2 hücreli embriyo, 4H; 4 hücreli embriyo, 8H; 8 hücreli embriyo, ZGA/EGA; Zigotta genom aktivasyonu/Embriyoda genom aktivasyonu, E0,5; Embriyonik 0,5 gün (Sozen ve ark., 2014). Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

Farede birinci yarıklanma fertilizasyondan bir gün sonra gerçekleşir. Bu yarıklanmanın eksenini hakkında farklı görüşler olsa da (Bolton ve ark., 1984; Davies ve Gardner, 2002; Plusa ve ark., 2002), ilk yarıklanma ekseninin kutup cisimciklerinin pozisyonuyla ilişkili olduğu kabul edilir. Hücre zarıyla zona pellusida arasında yer alan I. ve II. kutup cisimciklerinin olduğu yerleşimde hücre zarı içeri doğru çöker ve ilk bölünme bu çöküntü noktasından başlayıp karşı tarafa doğru ilerler ve sonunda iki blastomerli embriyo (2 hücreli embriyo) meydana gelir (Marikawa ve Alarcon, 2012). İkinci yarıklanmadan sonra dört blastomerli (4 hücreli embriyo), üçüncü yarıklanmadan sonra ise sekiz blastomerli embriyo (8 hücreli embriyo) oluşur (Marikawa ve Alarcon, 2009). Dördüncü yarıklanmadan önce, yani 8 hücreli embriyo aşamasından sonra blastomerlerin zarları silikleşmeye başlar; bu süreç “kompaksiyon (tıkızlaşma)” olarak adlandırılır (Şekil 1.2). Bu süreçte blastomerlerde apikal-bazal kutuplaşma meydana gelir (Fleming ve Pickering, 1985; Johnson ve McConnell, 2004) ve hücre yüzeyindeki yapışma glikoproteinleri ve özellikle epitelyal kaderin (E-kaderin) proteininin ifadenmesi ve fosforilasyonu ile gerçekleştirilir.



Şekil 1.2. 8 hücreli (A) ve kompaksiyon aşamasındaki (B) embriyoların taramalı elektron mikroskopunda kaydedilmiş görüntüleri. Kompakt hale gelmeden önce her blastomerin dış hatları seçilebilirken, kompakt hale geldikten sonra hücrelerin dış hatları ayırt edilemez hale gelir. Zona pellusida çıkarılmıştır.

Dördüncü yarıklanma ile birlikte 16 blastomerden oluşan embriyo oluşur ki; dutu andırması nedeniyle buna “morula” adı verilir. Morulayı oluşturan blastomerlerin bazıları yüzeye yakın yerleşim gösterirken bazılarıysa diğer blastomerlerle çevrilmiş durumdadır. Çalışmalar göstermektedir ki, bu aşamada ortalama 6-7 adet iç, 9-10 adet dış blastomer bulunmaktadır. Dış blastomerler apikal-bazal kutuplaşma gösterirken iç blastomerler kutuplaşma göstermez (Fleming, 1987; Johnson ve Ziomek, 1981; Suwinska ve ark., 2008). Beşinci yarıklanmanın sonucunda iç ve dış blastomer sayısı artar ve 32 hücreli evrede halen morula olarak isimlendirilen embriyo ortalama 12-13 iç ve 19-20 dış blastomere sahip hale gelir (Marikawa ve Alarcon, 2009). Beşinci yarıklanmanın sonrasında blastomerler arasında boşluklar ortaya çıkar (kavitasyon). Hücreler arası boşluklar, iç blastomerlerdeki hücre içi veziküllerin ya da vakuollerin ekzositoz yoluyla salınmasıyla oluşur. Kaviteler tek bir kavite oluşturmak üzere genişleyip birleşir. Bu aşamadaki embriyoya kiste benzeyen bir yapısı olması nedeniyle “blastokist” adı verilir. Kavitasyon blastosöl (boşlukları dolduran sıvı) oluşumunu tetikler. Blastokistin bir kutbunda yerleşmiş olan iç hücre kitlesi “embriyoblast”, dış hücre kitlesi (trofoektoderm) ise “trofoblast” olarak isimlendirilir (Şekil 1.3). İç hücre kitlesinden embriyonun üç germ tabakasına ait dokular, dış hücre kitlesinden ise plasentayı oluşturacak olan trofoblastlar gelişir (Marikawa ve Alarcon, 2012). Fare embriyolarının 1 hücreli embriyo aşamasından (zigot) blastokist aşamasına kadar gelişmeleri yaklaşık 3,5 günde tamamlanır.



Şekil 1.3. Blastokist aşamasındaki fare embriyosu. Bu aşamada embriyo iç hücre kitlesi ve trofoektoderm tabakalarından oluşur. Trofoektoderm tabakası ise polar trofoektoderm ve mural trofoektoderm olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. 8 hücreli embriyo aşamasında kompaktlaşma ve kutuplaşma olayları başlar. 8H; 8 hücreli embriyo, E2,5; Embriyonik E2,5 gün (Mihajlovic ve Bruce, 2017). Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

1.2. Embriyonik Genom Aktivasyonu

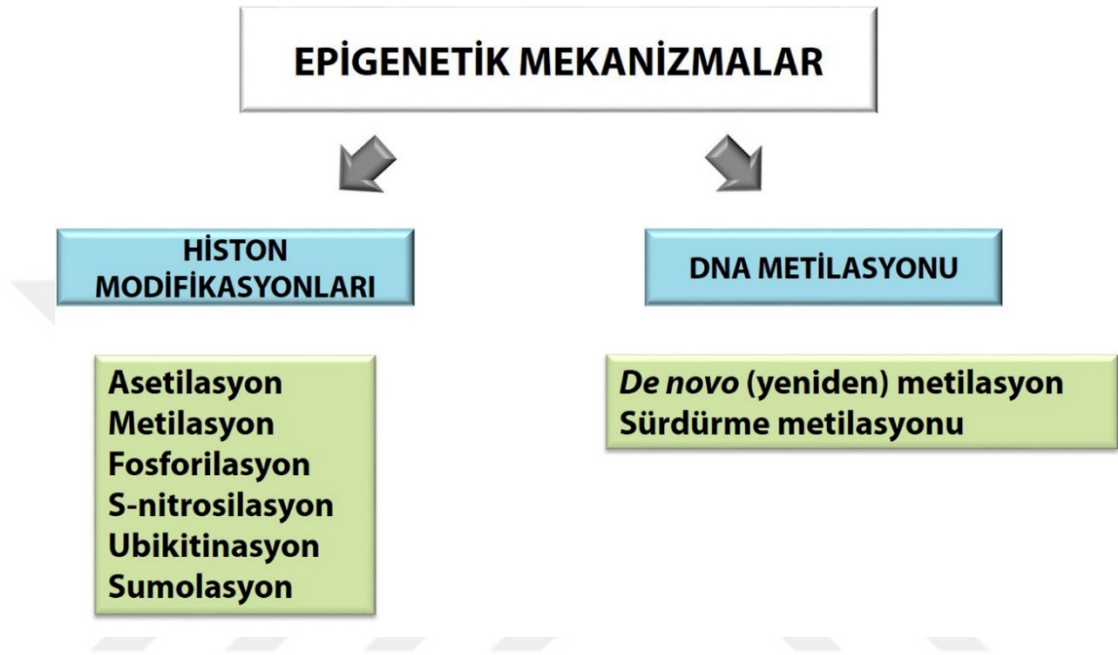
İkinci mayoz bölünmenin metafaz evresindeki ovositte transkripsiyonun duraksamasıyla beraber mesajcı ribonükleik asit (mRNA) moleküllerinin translasyonu da azalır. Fare embriyoları, 2 hücreli embriyo aşamasına kadar protein sentezini maternal mRNA'ları kullanarak gerçekleştirir (Piko ve Clegg, 1982; Tadros ve Lipshitz, 2009). Ancak 2 hücreli embriyo aşamasında maternal mRNA rezervi tükenmeye başlar ve özellikle zigot aşamasında, bu aşamaya özgü genlerin ifade bulmasıyla birlikte embriyoda gen aktivasyonu başlar ve 2 hücreli embriyo aşamasında tamamlanır. Bu süreçten sonra gelişecek embriyolar artık protein sentezi için maternal kaynaklı mRNA'lar yerine yeni sentezlenmiş, kendi mRNA'larını kullanmaya başlar. Embriyoda gen aktivasyonu türler arasında farklılık gösterir. Farede 2 hücreli embriyo aşamasında (Braude ve ark., 1988), insanda 4-8 hücreli embriyo aşamasında (Morgan ve ark., 2005; Vassena ve ark., 2011) sığırdaki 8-16 hücreli embriyo aşamasında meydana gelir (Pradhan ve ark., 1999).

Memelilerde implantasyon öncesi dönemdeki embriyo gelişimi için birçok genin belirli zamanlarda ifade edilmesine ihtiyaç duyulur. Bu genlerin ifadelenmesinde belirli epigenetik mekanizmaların kontrolü söz konusudur. Bu mekanizmalarından birisi olan DNA metilasyonu embriyonun erken dönemdeki gelişiminde oldukça kritik öneme sahiptir.

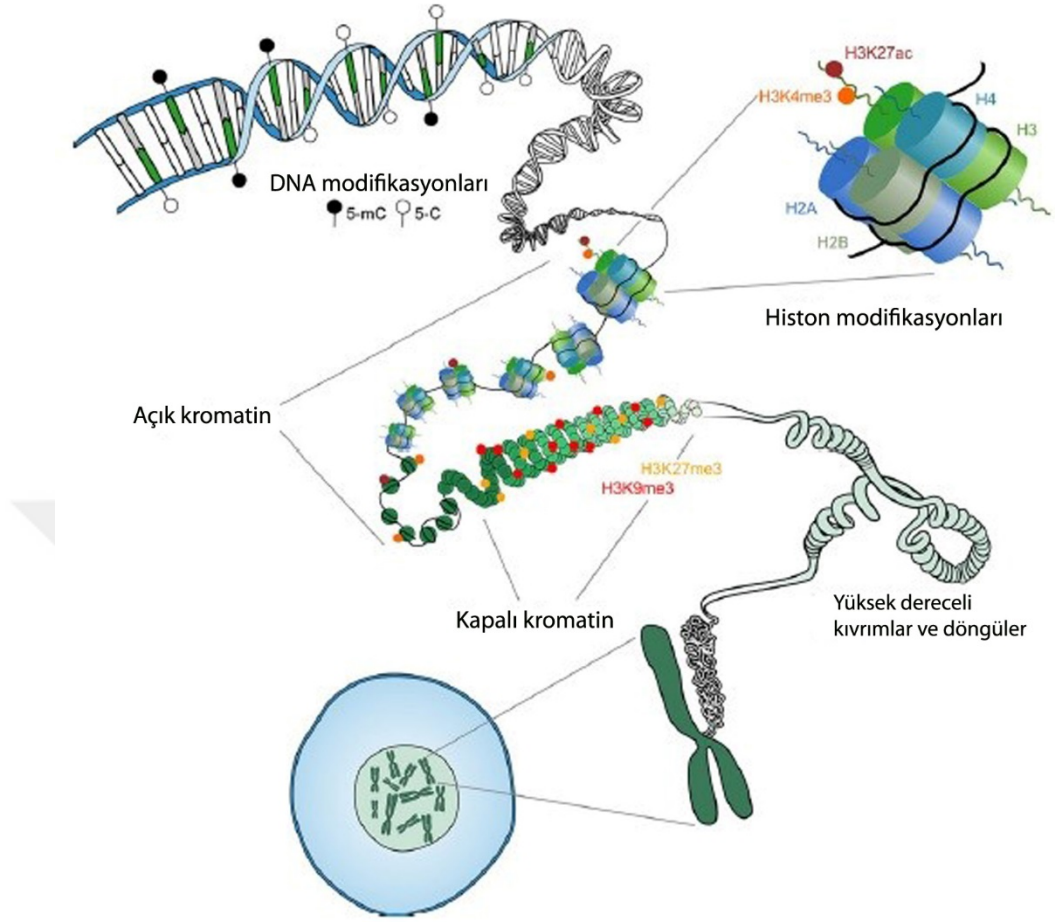
1.3. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik, 1942 yılında Conrad Waddington'un ortaya attığı ve embriyoloji alanında kullanılmaya başlanan; moleküler tekniklerin gelişmesiyle kalıtım bilgilerine önemli katkı sağlayan bir kavramdır. Eski Yunanca; epi-; “üstünde”, “öncesinde”, “üzerinde” anlamları taşıırken; genesis ise “yaratılış”, “köken” veya “oluşum” anlamlarına gelir. Epigenetik; DNA dizisi değişikliklerinden kaynaklanmayan, ancak kalıtsal olup gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bir bilim dalıdır.

Epigenetik mekanizmalar doğrudan ve dolaylı gen ifadesi değişikliklerini kontrol eden mekanizmalar olmak üzere ikiye ayrılır. Dolaylı yoldan gen ifadesi değişikliklerini kontrol eden mekanizmalar transkripsiyon sonrası mekanizmalardır (örn; mRNA sessizleştirilmesi). Doğrudan gen ifadesi değişikliklerini kontrol eden mekanizmalar ise kromatin düzeyindeki ve DNA düzeyindeki değişimlerdir. Kromatin düzeyindeki değişimler, histon asetilasyonu, metilasyonu, fosforilasyonu, nitrosilasyonu, ubiquitinasyonu ve sumolasyonu iken, DNA düzeyindeki değişimler ise DNA metilasyonunu kapsar (Hanna ve ark., 2018) (Şekil 1.4). DNA metilasyonu DNA düzeyindeki epigenetik değişimlere neden olurken histon modifikasyonları ise histon düzeyindeki değişimleri sağlar (Şekil 1.5).



Şekil 1.4. Epigenetik mekanizmalar. Hücre çekirdeğinde histon modifikasyonları altı epigenetik mekanizma tarafından kontrol edilirken DNA metilasyonu iki mekanizma tarafından gerçekleştirilir. Histon modifikasyonları histon asetilasyonu, metilasyonu, fosforilasyonu, nitrosilasyonu, ubikitinasyonu ve sumolasyonu mekanizmalarını içerirken DNA metilasyonu *de novo* ve sürdürme metilasyonunu içerir.

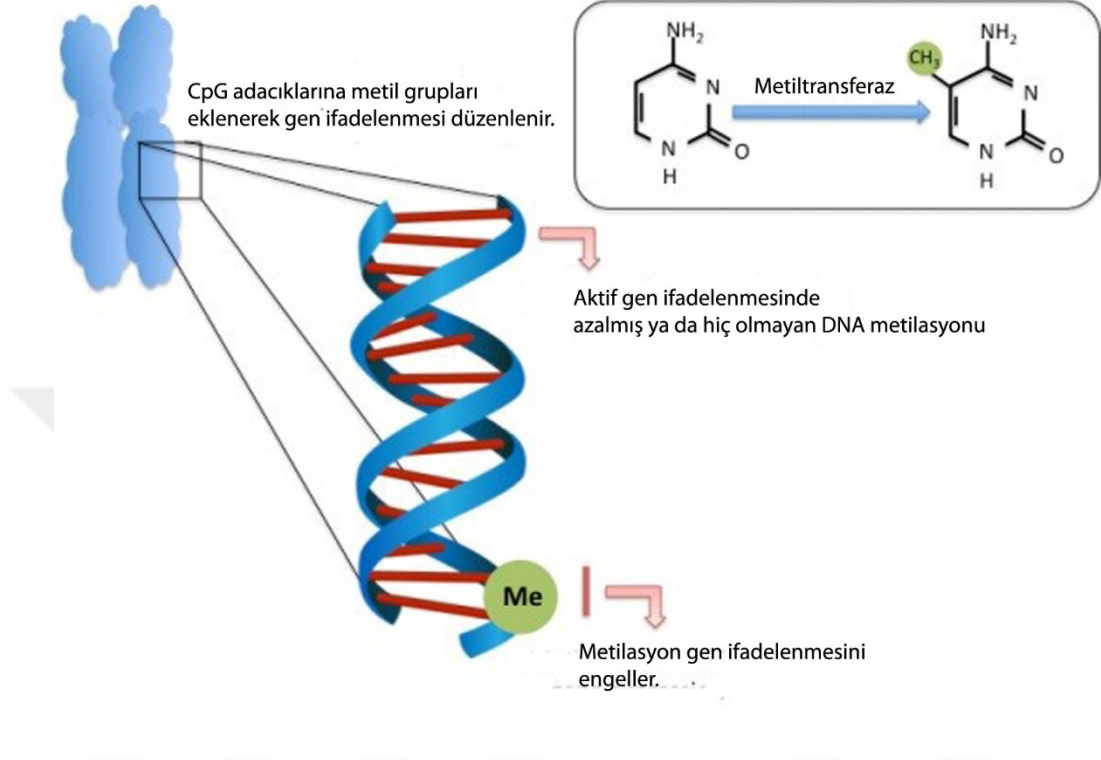


Şekil 1.5. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları (Hanna ve ark., 2018). DNA metilasyonu DNA düzeyindeki epigenetik değişimlere neden olurken histon modifikasyonları ise histon düzeyindeki değişimleri sağlar. Her iki mekanizmada genel olarak transkripsiyonun baskılanmasına neden olur. Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

1.4. DNA Metilasyonu

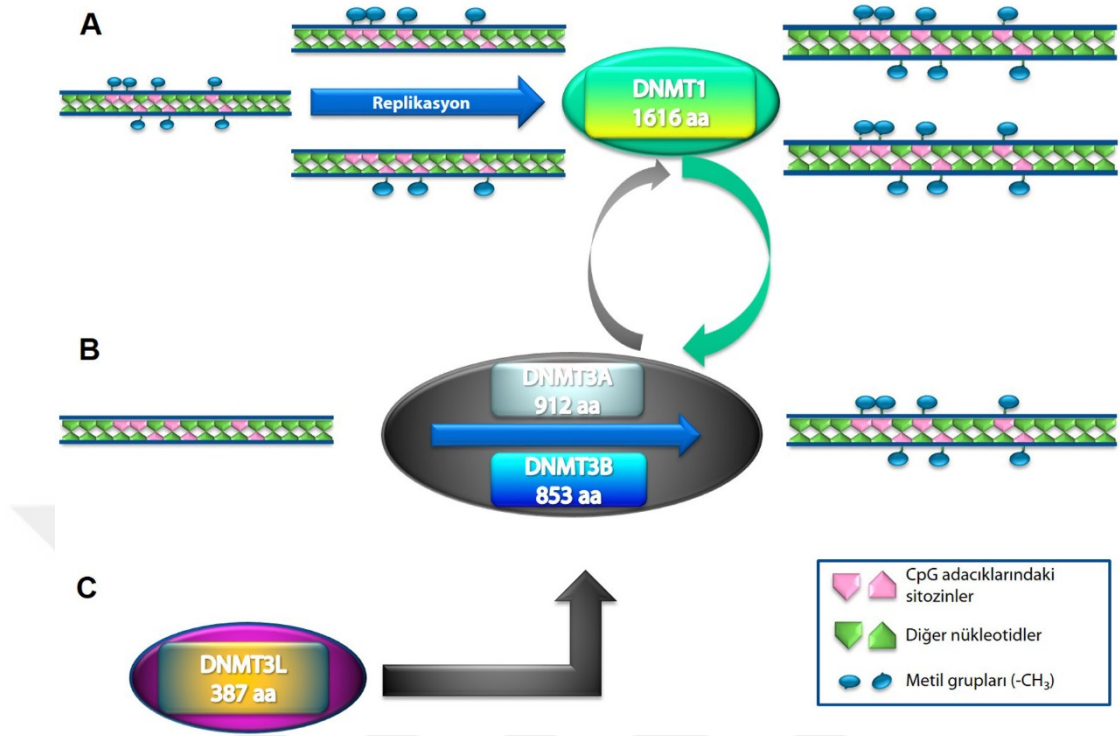
DNA'nın metilasyonu, DNA zincirindeki sitozin nükleotidlerinin beşinci karbon atomuna metil grubu (CH_3) eklenmesiyle gerçekleşir (Reik ve Dean, 2001) (Şekil 1.6). Bu süreçte S-Adenozil Metiyonin (AdoMet) metil grubu vericisi olarak kullanılmaktadır (Ehrlich, 2003). DNA metilasyonu genel olarak Sitozin-fosfat-Guanin (CpG) adacıklarında, ancak nadir olarak da CpG adacığı olmayan Sitozin-fosfat-Adenin (CpA), Sitozin-fosfat-Timin (CpT) ve Sitozin-fosfat-Sitozin (CpC)

adacıklarında meydana gelir. Literatürde, CpG adacığı olmayan bölgelerde DNA'nın metile olması durumu henüz net olarak aydınlatılamamıştır.



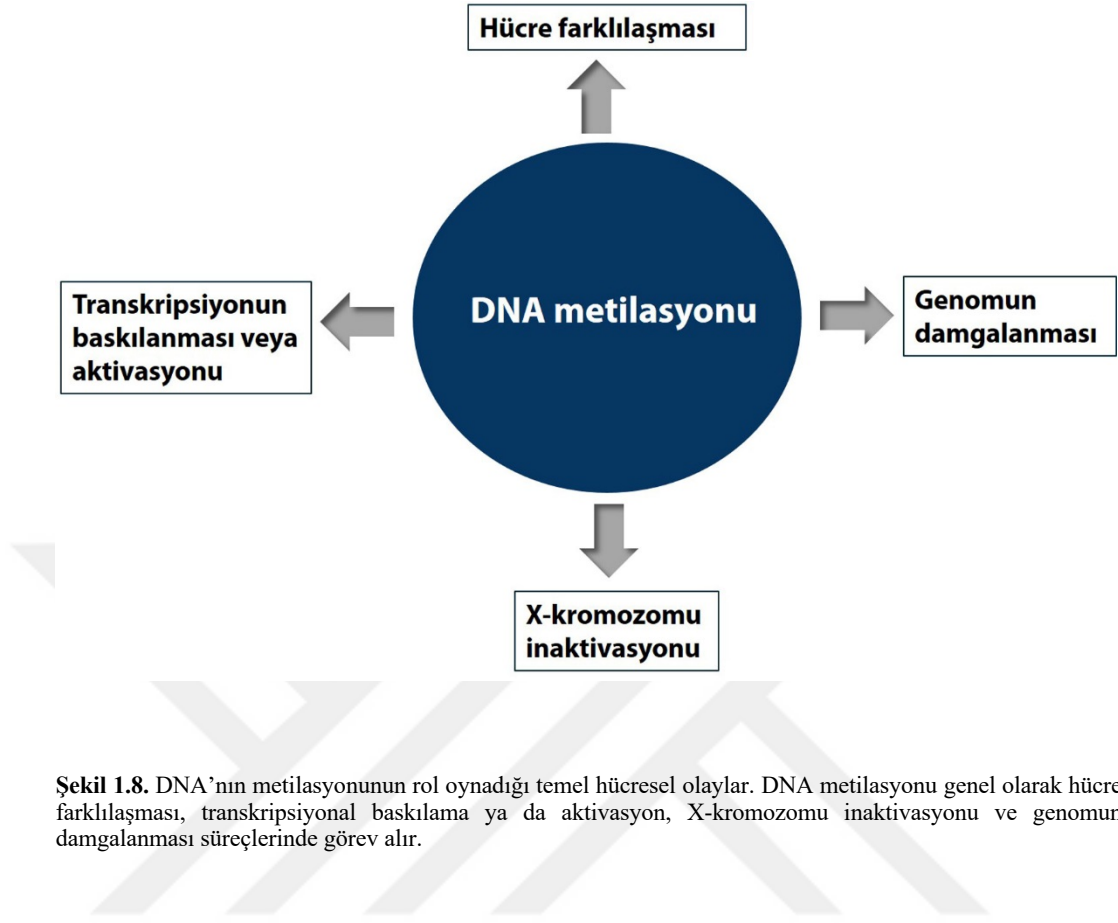
Şekil 1.6. DNA metilasyonu. DNA'nın metilasyonu, DNA zincirinde sitozine metil grubu (CH₃) bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu işlem DNA metiltransferaz adı verilen enzimler tarafından katalizlenir. Genel olarak DNA metilasyonu gen ifadenmesini engeller (Carroll, 2015). Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

DNA metilasyonu, sürdürme (*maintenance*) ve yeni baştan (*de novo*) metilasyon olmak üzere iki farklı biçimde ortaya çıkar (Şekil 1.7). Yeni baştan metilasyon, metillenmemiş DNA zincirinin metilasyonu iken, sürdürme metilasyonu ise DNA'nın replikasyonu sırasında yarı metillenmiş DNA zincirinin metilasyonu olarak tanımlanır. Her iki mekanizmada da, DNA'nın metilasyonu "DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri" tarafından katalizlenir (Bestor, 2000). Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L ve DNMT3C olmak üzere 6 adet farklı DNMT enzimi tanımlanmıştır (Barau ve ark., 2016; Uysal ve ark., 2015).



Şekil 1.7. DNA'nın metilasyonunda DNA metiltransferazların rolü. **A:** Sürdürme metilasyonu ve DNMT1. **B:** Yeni baştan (*de novo*) metilasyon ve DNMT3A-DNMT3B. **C:** DNMT3L (Uysal ve ark., 2015). Sürdürme metilasyonu, yarı metillenmiş DNA zincirinin metilasyonu iken *de novo* metilasyon metillenmemiş DNA zincirinin metilasyonudur. DNMT1 sürdürme metilasyonda, DNMT3A ve DNMT3B ise *de novo* metilasyonda görev alır. DNMT3L ise *de novo* metilasyonunu uyarır. aa; amino asit. Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

DNA'nın metilasyonu temel olarak embriyonun gelişimiyle ilgili belirli genlerin ifadenmesinin etkinleştirilmesi ya da baskılanması, genomun damgalanması (*genomic imprinting*) ve X-kromozomunun inaktivasyonu, tümöröenez, yaşlanma gibi süreçlerde rol alır (Feinberg, 2000; Feinberg ve ark., 2002; Kumar ve ark., 1994) (Şekil 1.8).



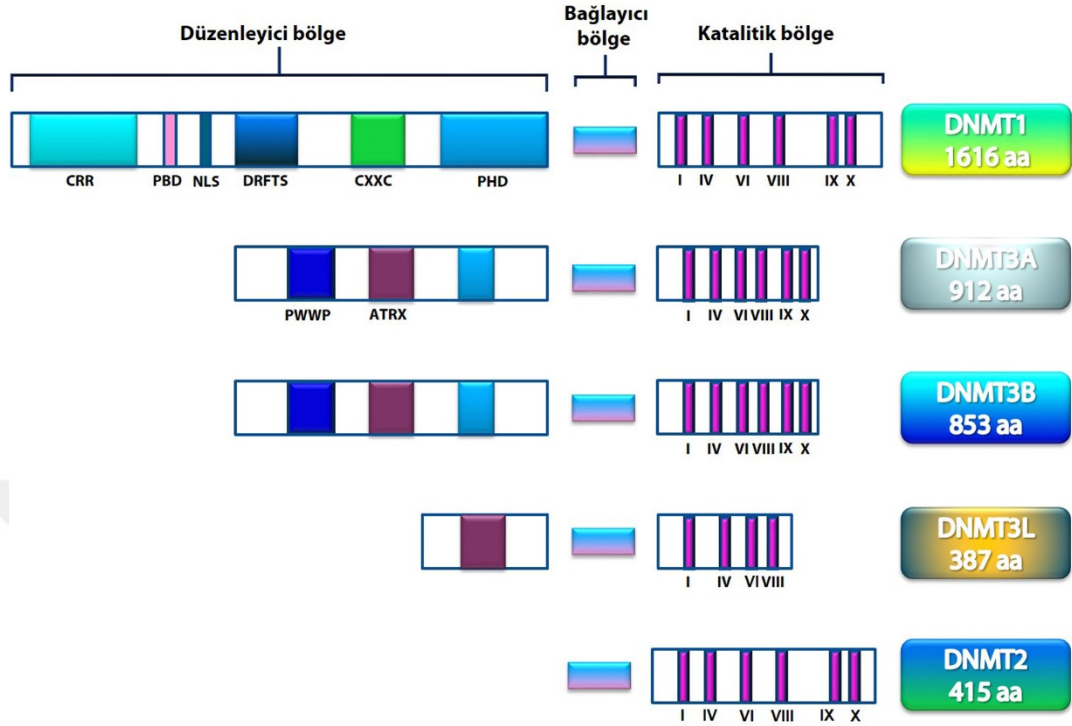
Şekil 1.8. DNA'nın metilasyonunun rol oynadığı temel hücresel olaylar. DNA metilasyonu genel olarak hücre farklılaşması, transkripsiyonal baskılama ya da aktivasyon, X-kromozomu inaktivasyonu ve genomun damgalanması süreçlerinde görev alır.

1.5. DNMT'lerin Genel Yapısı

İlk DNMT enzimi bir bakteri olan *Haemophilus haemolyticus* den izole edilip klonlanmıştır (Araujo ve ark., 2001). DNMT enzimleri, yapısal olarak NH_3^+ (amino) ucu (düzenleyici bölge), COOH^- (karboksil) ucu (katalitik bölge) ve merkezde yer alan bağlayıcı bölge olmak üzere üç ana parçadan oluşur (Posfai ve ark., 1989) (Şekil 1.9). Amino ucu, DNMT enzimlerinin hücre içi yerleşimlerinin belirlenmesinden ve metillenmemiş/yarı metillenmiş DNA zincirlerinin ayırt edilmesinde rol oynar. Amino ucu, proliferatif hücre nükleer antijen bağlama (*proliferating cell nuclear antigen-binding*; PBD), nükleer lokalizasyon sinyali (*nuclear localization signal*; NLS), sitozinden zengin çinko parmak DNA bağlama (*cytosine-rich zinc finger DNA-binding*; ATRX), polybromo homoloji (*polybromo homology*; PHD), yükten zengin bölge (*charge rich-region*; CRR), sisteinden zengin bölge (*cysteine rich region*;

CXXC), DNA replikasyon odakları hedefleme dizisi (*DNA replication foci targeting sequence*; DRFTS) ve tetrapeptit kromatin bağlama (*tetrapeptide chromatin binding*; PWWP) bölgeleri olmak üzere alt yapılar içerir (Chuang ve ark., 1997). Bunlardan, PBD bölgesi DNA'nın replikasyonu sırasında DNMT'lerin DNA dizileri ve PCNA proteini ile etkileşimini sağlarken (Easwaran ve ark., 2004) PHD bölgesi replikasyon sırasında dengeyi kurar ve yeni DNA zincirlerinin biyosentezini uyarır (Robertson ve ark., 2004). Buna ek olarak, bu yapılar DNMT'lerin SNF2 ailesi üyesi ATP-bağımlı kromatin remodeling enzimi (hSNF2H) (Robertson ve ark., 2000), siklin bağımlı kinaz inhibitör 1 (p21WAF1) (Easwaran ve ark., 2004), E2F transkripsiyon faktör 1 (E2F1) (Fuks ve ark., 2000), histon deasetilaz 1 (HDAC1) ve 2 (HDAC2) gibi hücre içi proteinlerle etkileşimini kolaylaştırabilir (Grayson ve Guidotti, 2013; Rountree ve ark., 2000). DNMT1 enzimi aynı zamanda CpG adacıklarındaki metillenmemiş DNA dizilerinin tanınmasına olanak sağlayan CXXC (sisteinden zengin bölge) domaini içerir (Turek-Plewa ve Jagodzinski, 2005).

DNMT enziminin karboksil (COOH) ucu ise, 10 farklı motif içerir ve bunlardan 6 tanesi (I, IV, VI, VIII, IX ve X) evrimsel olarak korunmuştur. Motif I, AdoMet bağlanma yerinin oluşumuna katılır; motif IV aktif bölgede sitozin sübstratına bağlanır, motif VI bir proton vericisi gibi hizmet eden glutamil rezidüsü içerir, motif VIII'in fonksiyonu hâlâ bilinmemektedir. Motif IX, sübstrat bağlanma yeri yapısını korurken motif X AdoMet bağlanma yerinin oluşumuna katılır. Üçüncü DNMT bölgesi olan merkezi bağlayıcı parça, lizin-glisin dipeptid tekrarlarından oluşur ve amino ve karboksil uçları arasında yapısal bağlayıcılık ilişkisi kurar (Posfai ve ark., 1989) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. DNA metiltransferazların genel yapısı (Uysal ve ark., 2015). DNMT'ler düzenleyici bölge, katalitik bölge ve bağlayıcı bölge olmak üzere üç ana bölgeden oluşur. Düzenleyici bölge, DNMT enzimlerinin hücre içi yerleşimlerinin belirlenmesinden ve metillenmemiş/yarı metillenmiş DNA zincirlerinin ayırt edilmesinde rol oynar. Katalitik bölge enzimlere katalitik (işlevsel) özelliği kazandıran bölgedir. Bağlayıcı bölge ise iki bölge arasında bağlayıcılık ilişkisi (köprü) kurar. CRR; yükten zengin bölge (*charge rich-region*), PBD; proliferatif hücre nükleer antijen bağlama (*proliferating cell nuclear antigen-binding*), NLS; nükleer lokalizasyon sinyali (*nuclear localization signal*), DRFTS; DNA replikasyon odakları hedefleme dizisi (*DNA replication foci targeting sequence*), CXXC; sistein zengin bölge (*cysteine rich region*), PHD; polybromo homoloji (*polybromo homology*), PWWP; tetrapeptit kromatin bağlama (*tetrapeptide chromatin binding*), ATRX; sitozinden zengin çinko parmak DNA bağlama (*cytosine-rich zinc finger DNA-binding*). Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

1.6.DNMT'lerin Genel Özellikleri

DNMT1, DNA'nın replikasyonu sırasında yarı-metillenmiş DNA zincirini metilleyerek sürdürme metilasyonunu sağlayan temel enzimdir. Bu görevine ek olarak, DNMT3A tarafından uyarıldığında minimum düzeyde yeni baştan metilasyon sürecinde de rol oynar (Yoder ve ark., 1997). DNMT1'in şu ana kadar tanımlanan üç izoformu bulunmaktadır. Bunlar; pakiten spermatositlerde ifade olan DNMT1p,

ovosite özgü olan DNMT1o ve somatik hücrelerde bulunan DNMT1s'dir (Trasler ve ark., 1992). Bu izoformların yerleşimleri alternatif bölünme-eklemelerin (*splicing*) biyosenteziyle *Dnmt1* geninin birinci ekzonunda yerleşmiş olan domainler tarafından düzenlenir (Hermann ve ark., 2004). Farede *Dnmt1* geninin susturulması (*Dnmt1^{-/-} knockout*) gastrülasyonda ya da sonrasında embriyonun ölümüne ve global DNA metilasyonunda bozukluklara neden olur (Kurihara ve ark., 2008; Okano ve ark., 1998). Ayrıca, *Dnmt1*'in yokluğu farede embriyonik kök hücrelerdeki *de novo* metilasyonunun da minimal düzeyde kaybıyla sonuçlanır. Çünkü yeni baştan metilasyon büyük ölçüde Dnmt3a ve Dnmt3b tarafından gerçekleştirilir (Ostler ve ark., 2007).

DNMT3A ve DNMT3B, yeni baştan metilasyonu gerçekleştiren temel enzimlerdir. Her ne kadar DNMT3A genel olarak CpG adacıklarındaki metilasyondan sorumlu olsa da CpA, CpT ve CpG alanlarındaki sitozinin metilasyonunda da görev alır (Arand ve ark., 2012; Shirane ve ark., 2013). DNMT3A enzimi DNMT1 ile karşılaştırıldığında daha düşük enzim aktivitesine sahiptir. Bundan dolayı aktivitesini artırmaya yönelik özgün bir kofaktöre ihtiyaç duyabilir (Ko ve ark., 2005). Şimdiye kadar tanımlanan iki izoformu bulunmaktadır (Watanabe ve ark., 2002). Bu izoformlar, ağırlıklı olarak embriyonik gen aktivasyonuna (EGA) kadar ovositte ve erken dönemdeki embriyolarda ifade edilmektedir (Okano ve ark., 1999). *Dnmt3a* geninin farede susturulması (*Dnmt3a^{-/-} knockout*) doğum öncesinde ölümlere neden olurken bazıları ise canlı doğumla sonuçlanır (Okano ve ark., 1999).

DNMT3B enzimi DNMT3A enziminden farklı olarak sentromerik satellit (kromozomun sentromerik bölgesinde yerleşimde olan uydu DNA) bölgedeki DNA dizilerinde bulunan CpG dinükleotitlerinin metilasyonunda özelleşmiştir (Gowher ve ark., 2005; Okano ve ark., 1999). Yirmiden fazla izoformu bulunmaktadır (Watanabe ve ark., 2002). Farede *Dnmt3b* geninin susturulması (*Dnmt3b^{-/-} knockout*), *Dnmt1^{-/-}* farelerde olduğu gibi embriyonun ölümüyle sonuçlanır (Kato ve ark., 2007). *Dnmt3b* geninde mutasyon meydana gelirse ICF (immün yetmezliği, sentromerik kararsızlık

ve yüz anomalileri) sendromu oluşur ki bu sendrom immün yetmezlik (I), sentromerik instabilite (C) ve fasyal dismorfizm (F) ile karakterize konjenital bir hastalıktır (Geiman ve ark., 2004; Miniou ve ark., 1997). Perisentrik bölgedeki kromozom 1, 9 ve 16'nın satellit bölgeleri metile durumdayken, bu sendromu taşıyan hastalarda bu bölgeler tamamen metillenmemiş durumdadır (Bourc'his ve ark., 2001).

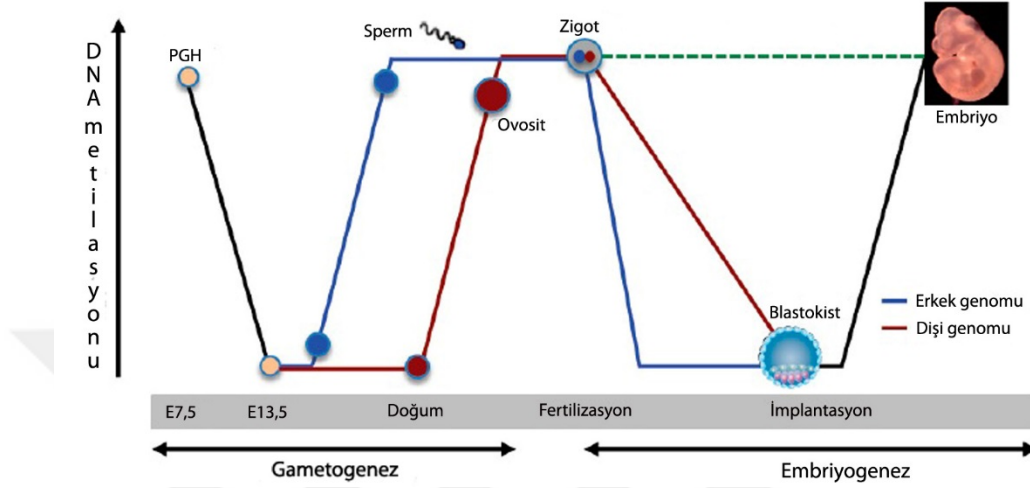
DNMT3L, katalitik yapısı olmayan ancak DNMT3A ve DNMT3B enzimlerinin karboksil uçlarına bağlanarak bu enzimlerinin aktivitelerini uyarır (Suetake ve ark., 2004). DNMT3L enzimi gametogenez sırasında annede genomik damgalanma bölgelerinin kurulmasında dolaylı olarak rol oynar (Bourc'his ve Bestor, 2004). Farede *Dnmt3l* geninin susturulması (*Dnmt3l^{-/-} knockout*) sonucunda fareler canlılığını sürdürür; ancak düşük yeni baştan metilasyon düzeyi nedeniyle erkek farelerde kısırlığa yol açar (Vlachogiannis ve ark., 2015).

DNMT2 hem yapısal hem de işlevsel olarak diğer DNMT'lerden farklıdır, çünkü amino ucunu içermemektedir. DNMT2, karboksil ucu içermesine karşın, yapısında amino ucu olmadığı için yeni baştan ve sürdürme metilasyon süreçlerini katalizleyemez (Uysal ve ark., 2015). Ek olarak, DNMT2 DNA'yı metillemek yerine aspartik asit tRNA'sının antikodon ilmiğindeki sitozin 38'i metiller (Goll ve ark., 2006). Bu görevleriyle uyumlu olarak, farede *Dnmt2* geninin farede susturulması (*Dnmt2^{-/-} knockout*) sonucunda herhangi bir anormal fenotip gözlenmemiştir (Ratnam ve ark., 2002). DNMT3C ise en son tanımlanan DNMT'dir. Erkek germ hücrelerinin genomunu potansiyel transpozon aktivitesinden korumaktadır (Barau ve ark., 2016).

1.7.İmplantasyon Öncesi Embriyo Gelişim Sürecinde DNA Metilasyonu ile DNMT'lerin İfadelemeleri ve Görevleri

Embriyonun implantasyon öncesindeki gelişim sürecinde global DNA metilasyonu zigot aşamasından sonra dramatik olarak düşer, blastokist aşamasından

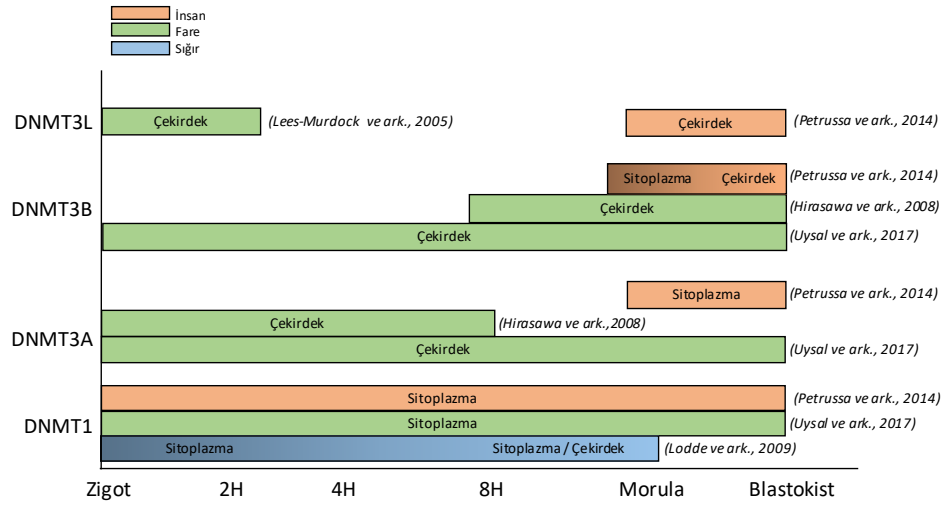
başlayarak tekrar artışa geçer (Saitou ve ark., 2012) (Şekil 1.10). Dolayısıyla bu dönemde global DNA metilasyonunu gerçekleştiren DNMT'lerin ifadenmeleri de bir dizi çalışmada ele alınmıştır.



Şekil 1.10. Gametogenez ve embriyogenez sürecinde global DNA metilasyonunun izlediği düzey (Chen, 2019). Global DNA metilasyonu, primordiyal germ hücrelerinde yüksektir. Doğumda ise metilasyon düzeyi düşük olup olgun ovosit ve spermde ise tekrar yükselir. Zigot aşamasında ise metilasyon düzeyi yüksek olup blastokist aşamasına kadar kritik ve kademeli olarak düşer ve bu aşamadan sonra yeniden yükselir. PGH; primordiyal germ hücresi. Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

DNMT'ler zigottan blastokiste kadar süren implantasyon öncesi süreçte dinamik ifadenme örneği gösterir. Dnmt1 proteinlerinin varlığı farede zigottan blastokist aşamasına kadar izlenmiş; Dnmt1'in yerleşimi 2 hücreli, 4 hücreli ve blastokist aşamasındaki embriyolarda sitoplazmada bulunurken (Hirasawa ve ark., 2008), 8 hücreli embriyoda çekirdekte tanımlanmıştır. Ancak bu aşamadaki bir hücrede Dnmt1'in çekirdekte yerleşimi tartışmalı bulunmuştur (Carlson ve ark., 1992). Hirasawa ve ark. (2008) (Hirasawa ve ark., 2008) ve Kurihara ve ark.'nın (2008) (Kurihara ve ark., 2008) çalışmalarında Dnmt1 ve Dnmt1o yerleşimlerinin sitoplazmada olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan Lodde ve ark. (2009) sığırdaki Dnmt1'nin varlığını zigot aşamasından 8-16 hücreli embriyo aşamaya kadar araştırmış (Lodde ve ark., 2009); Dnmt1 yerleşimini zigot aşamasında sitoplazmada gözlemlerken, 8-16 hücreli embriyolarda bu proteinin 8-16 hücreli embriyolarda bazı blastomerlerde çekirdekte izlenirken bazı blastomerlerde ise sitoplazmada olduğunu

bildirmişlerdir (Şekil 1.10). (Lodde ve ark., 2009). Bir başka araştırmada farede Dnmt1 proteininin zigottan blastokiste kadar yoğun olarak sitoplazmada olduğu, ancak az da olsa çekirdekte yerleştiği gösterilmiştir (Uysal ve ark., 2017). İnsan embriyolarında ise fareden farklı olarak DNMT1 proteininin zigot aşamasından blastokist aşamasına kadar yoğun olarak sitoplazmada yerleştiği bulunmuştur (Petrussa ve ark., 2014) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. DNMT'lerin farklı türlerde farklı gelişim süreçlerindeki yerleşimleri. Farklı renkler farklı türleri temsil eder. S; hücre sitoplazmasında yerleşim, Ç; hücre çekirdeğinde yerleşim, 1H; 1 hücreli embriyo, 2H; 2 hücreli embriyo, 4H; 4 hücreli embriyo, 8H; 8 hücreli embriyo, M; morula, B; blastokist.

Dnmt1 proteininin zigottan morula aşamasına göreceli olarak düştüğü, blastokist aşamasında ise arttığı bulunmuştur. Maymun embriyolarında Dnmt1'in düzeyinin 8 hücreli embriyo aşamasında anlamlı olarak düştüğü rapor edilmiştir (Guenatri ve ark., 2013). İneklerde *Dnmt1*'in mRNA düzeyi ilk olarak 2 hücreli embriyo aşamasında gözlenirken blastokiste kadar süreklilik göstermiştir (Cardoso ve Leonhardt, 1999). Diğer taraftan *DNMT1*'in mRNA ifadenmesi blastokist aşamasına doğru gidildikçe insan (Petrussa ve ark., 2014) ve maymunda (Guenatri ve ark., 2013) anlamlı derecede düşmektedir. *DNMT1*'in mRNA ifadelerinin ve protein miktarlarının, fare, sığır, maymun ve insanı içeren memeli türlerinde erken embriyo gelişimi sırasında farklı düzeylerde olduğu gösterilmiştir. Bu farklılık, türler arasındaki embriyonik genom aktivasyonunun başlangıç zamanının farklılığından veya farklı tekniklerin kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir.

Farede implantasyon öncesi dönemdeki süreçte, *Dnmt3a*'nın mRNA ifadesi maymun (Guenatri ve ark., 2013) ve insanda (Petrussa ve ark., 2014) zigot aşamasından blastokist aşamasına kadar irdelenmiştir. Diğer türlerin erken dönem embriyolarıyla karşılaştırıldığında farede 8 hücreli ve blastokist aşamaları arasında anlamlı derecede artmış olduğu görülür (Guenatri ve ark., 2013). Farede *Dnmt3a* proteininin zigottan 8 hücreli embriyo aşamasına kadar çekirdekte yerleşim gösterdiği, ancak bu aşamadan sonra ifadenmesinin olmadığı bulunmuştur (Hirasawa ve ark., 2008) (Şekil 1.11). *Dnmt3b* proteinin ise 8 hücreli embriyo aşamasından sonra ifadenmesinin olduğu ve çekirdekte yerleştiği gösterilmiştir. Bir başka araştırmada farede *Dnmt3a* ve *Dnmt3b* proteinlerinin zigottan blastokiste kadar çekirdekte yoğun olduğu, ancak sitoplazmada da yerleştiği gösterilmiştir (Uysal ve ark., 2017) (Şekil 1.10). Bu proteinlerin düzeyi göreceli analiz edildiğinde zigottan morula aşamasına kadar anlamlı derecede düştüğü, blastokist aşamasında ise arttığı bulunmuştur. İlginç olarak, sığırdaki *Dnmt3a*'nın mRNA ifadenmesi 2 hücreli aşamada başlar ve blastokist aşamasına kadar sürer (Cardoso ve Leonhardt, 1999). İnsan embriyolarında yapılan çalışmadaysa DNMT3A proteininin morula ve blastokistlerde sitoplazmada, DNMT3B proteininin ise morula aşamasında sitoplazmada blastokist aşamasında ise çekirdekte yerleştiği gösterilmiştir (Petrussa ve ark., 2014) (Şekil 1.11). Embriyogenezin sonraki dönemlerindeyse, farede *Dnmt3a*'nın ifadenmesinin E4,5-E8,5 günlerinde bulunmadığı, *Dnmt3b* E4,5-E7,0 günlerde yüksek oranda var olduğu gözlenmiştir (Okano ve ark., 1999). Bu bilgiyle uyumlu olarak, farede *Dnmt3b*, E4,5 günde blastokistin iç hücre kitlesinde; E5,5 günde ise epiblast tabakasında ve E7,0 günde ise embriyonik ektoderm tabakasında saptanmıştır. Ayrıca, *Dnmt3b*, POU domain sınıf 5 transkripsiyon faktör 1 (POU5F1) ile benzer yerleşim bölgesine sahiptir ki bu gen bir transkripsiyon faktörü olarak totipotent hücrelerde ifade edilip bir endoderm belirteci olarak kullanılmaktadır (Lucifero ve ark., 2007). Bunun anlamı; *Dnmt3b*, *Dnmt3a*'dan daha yüksek oranda embriyonik kök hücrelerde ifade edilir (Okano ve ark., 1999). Ancak, embriyonik kök hücreler somatik hücrelerden daha yüksek oranda *Dnmt3a* ve *Dnmt3b* mRNA'larını ifade ederler (Ostler ve ark., 2007). E10,5 günden sonra *Dnmt3a* tekrar ifade edilmeye başlarken *Dnmt3b*, E10,5-E14,5 günlerdeki embriyolarda saptanır. Bununla birlikte, *Dnmt3a*'nın ve *Dnmt3b*'nin embriyonik kök hücrelerde *de novo* metilasyonunda, ovosit ve embriyo gelişiminde

implantasyon sonrası süreçlerde gerekli olduğu görülmektedir (Geuns ve ark., 2003). Golding ve ark. (2003) sığırdaki *Dnmt1*, *Dnmt2*, *Dnmt3b* ve *Dnmt3c* genlerini RT-PCR yöntemi kullanarak 2 hücre, 4 hücre, 8 hücre, 16 hücre, morula ve blastokist aşamasındaki embriyolarda ifadelendiğini bulmuştur (Golding ve Westhusin, 2003). Benzer olarak, insanda da *DNMT3B* mRNA ifadenmesi zigotta blastokist aşamasına kadar tanımlanmıştır (Petrussa ve ark., 2014).

Dnmt3l de erken dönemdeki fare embriyolarında farklı ifade göstermektedir. 1 hücreli embriyo aşamasında *Dnmt3l* proteininin varlığı maternal ve paternal pronükleuslarda eşit olarak dağılmıştır (Lees-Murdock ve ark., 2005). Bu proteinin 2 hücreli embriyo aşamasında çekirdekte tanımlanırken, 4 hücreli embriyodan morula aşamasına (E2,5 gün) kadar varlığı belirlenmemiştir (Şekil 1.11). E3,5 gündeki embriyolarda ve blastokistte *Dnmt3l* varlığı saptanırken, blastokist aşamasında trofoektoderm ve iç hücre kitlesinde ifadenmede fark olduğu görülmüştür. Ancak, E4,5 gündeki blastokistte *Dnmt3l*'nin varlığı iç hücre kitlesinde trofoektodermden daha yüksektir (Lees-Murdock ve ark., 2005). İnsanda ise *DNMT3L* proteininin morula ve blastokist aşamasındaki embriyolarda çekirdekte yerleştiği gösterilmiştir (Petrussa ve ark., 2014) (Şekil 1.10). Diğer taraftan, *Dnmt3L* ifadesi, farede 2 hücreli, 4 hücreli, morula ve blastokist aşamalarındaki benzerdir. Maymunda *Dnmt3l* erken embriyo gelişimi sırasında kademeli olarak artan ifadenme gösterir (Guenatri ve ark., 2013). İnsan embriyolarında ise 4 hücreli embriyo aşamasından blastokist aşamasına kadar belirgin *DNMT3L* varlığı gözlenir (Hata ve ark., 2002; Petrussa ve ark., 2014). *DNMT2*'nin mRNA'sı, insan embriyolarında sadece blastokist aşamasında bulunmuştur (Huntriss ve ark., 2004). Gelecek çalışmalarda *DNMT2* enziminin erken dönemdeki embriyolarda gerek insan gerekse farklı türlerde tanımlanması, bu genin görevinin daha net anlaşılmasını sağlayacaktır.

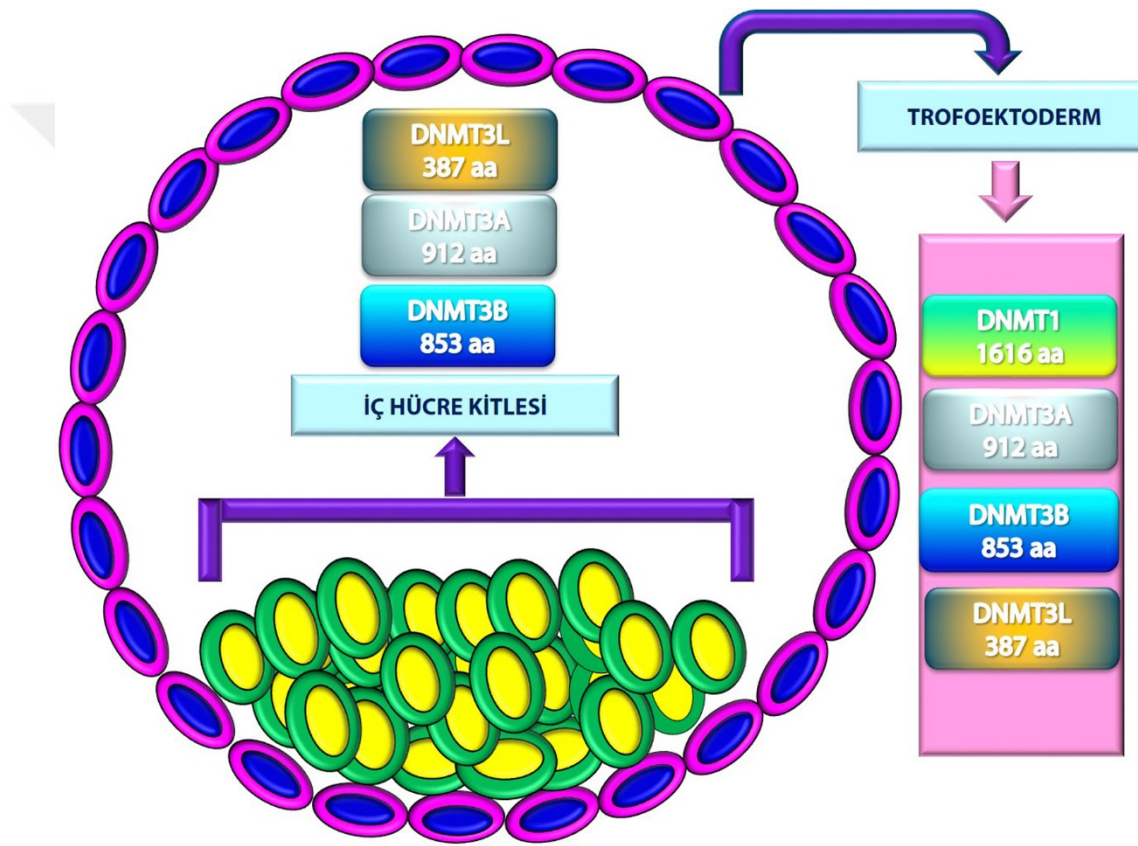
Sonuç olarak ovosit ve erken dönemdeki embriyo gelişimi sırasında *DNMT*'lerin farklı memeli türlerinde belirgin olarak farklı ifadelendiği gösterilmiştir. Bunun en önemli nedeni, embriyonik genom aktivasyonunun farklı türlerde farklı zamanlarda başlaması olabilir. Embriyonik genom aktivasyonu farede 2 hücreli embriyoda, (Bolton ve ark., 1984) (Bolton ve ark., 1984) insanda 4-8 hücreli

embriyoda, sığırda ise 8-16 hücreli embriyoda meydana gelmektedir. İkinci olarak, metilasyon damgalanmaları (*imprinting*) farklı gelişimsel süreçlerde kurulmaktadır. Farede gelişmiş blastokist aşamasında, insanda erken blastokistlerde kurulurken sığırda ise 16 hücreli embriyo aşamasında kurulmaya başlar. Sonuç olarak; memelilerdeki bu farklılıklar, DNMT'lerin hücre içindeki yerleşimlerini, bölgesel ve zamansal ifadeleneimlerinin düzenleyen hücre içi sinyal yollarından kaynaklanabiliyor olabilir.

1.8. İç Hücre Kitlesi ve Trofoektoderm Tabakalarındaki DNA Metilasyonu Farklılıkları

DNA metilasyonu, blastokist aşamasında trofoektoderm ve iç hücre kitlesi olmak üzere iki yöndeki ilk hücre farklılaşması aşamasında önemli rol oynar. Ancak bu süreçte hangi DNMT enziminin rol aldığı net olarak bilinmemektedir. Bu süreçte en fazla görev alan enzimin Dnmt3b olduğu bilgisi, bu enzimin 2 hücreli embriyo aşamasından blastokist aşamasına kadar var olduğu gerçeğine dayanmaktadır (Hirasawa ve Sasaki, 2009). Bu bilgi ile uyumlu olarak Watanabe ve ark. 2002 yılında Dnmt3b varlığının iç hücre kitlesinde trofoektoderm tabakasına göre daha fazla olduğunu göstermiştir (Watanabe ve ark., 2002). Bu bilgiye karşıt olarak, Hattori ve ark. (2004) (Hattori ve ark., 2004) ve Li ve ark. (2001) (Li ve ark., 2007) yılında Dnmt3b ifadeleneimlerinin hem protein hem de mRNA düzeyinde trofoektoderm tabakasında daha yoğun olduğunu bulmuşlardır. Buna benzer olarak DNMT3B varlığının fare (Hirasawa ve ark., 2008), insan ve sığırda trofoektoderm tabakasında daha yoğun olduğunu göstermişlerdir (Fulka ve ark., 2004). Assou ve ark. (2012) yılında *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *DNMT3L* genlerinin insan trofoektoderm hücrelerinde var olduğunu göstermişler (Assou ve ark., 2012); ilginç olarak, DNMT3L yüksek oranda trofoektoderm hücrelerinde olmasına karşın plasentada da ifadelendiğini bildirmişlerdir (Bai ve ark., 2012). Diğer yandan, Galan ve ark. (2010) DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L'nin insan iç hücre kitlesi hücrelerinde yüksek oranda var olduğunu bulmuşlardır (Galan ve ark., 2010). Buna karşın Petrusa ve ark. (2014) yılında iki hücre tabakası arasında fark bulmamıştır (Petrusa ve ark., 2014)

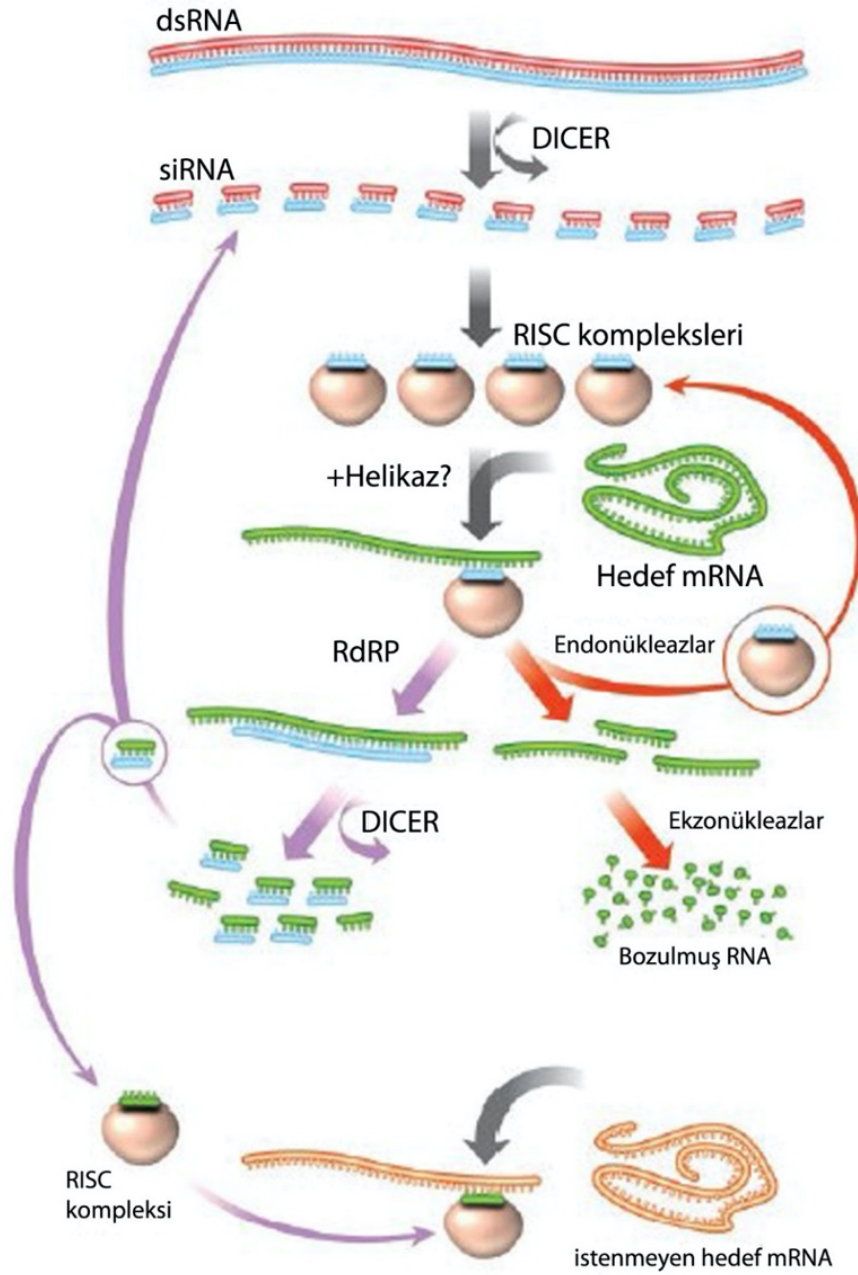
(Şekil 1.12). Sonuç olarak; bu farklılıklar kullanılan tekniklerden, tür farklılıklarından ya da *in vitro* kültür koşullarından kaynaklanıyor olabilir. DNMT enzimlerinin her iki tabakada da var olduğu, bu tabakaların farklanmasında gerekli olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.12. Blastokist aşamasında DNA metiltransferazların ifadenmeleri (Uysal ve ark., 2015). Blastokist aşamasındaki embriyoda trofoektdoderm ve iç hücre kitlesi tabakasında DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L enzimleri bulunur; ancak bu enzimlerin hangi tabakada daha yoğun olduğu net olarak aydınlatılmamıştır. Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

1.9. siRNA (*Small Interfering RNA*; Küçük müdahaleci (susturucu) RNA)

Gen susturma mekanizmaları genlerin kendisini ya da onların kodladığı mRNA'ları hedefler. Genin kendisini hedef alan az mekanizma olsa da mRNA hedefli teknikler hızla artmaktadır (Kurreck, 2003). mRNA hedefli tekniklerde “antisens (*antisense*) teknolojisi” genel olarak kullanılır. Antisens teknolojisinde hedef alınan proteini kodlayan mRNA'ya, ters tamamlayıcı (*komplementer*) olan bir DNA veya RNA nükleik asit zincirini hücrelere aktarmaya dayanır (Gewirtz, 2007). Genel olarak ilaçlar proteine bağlanarak onların işlevini değiştirir ancak tek zincirli DNA/RNA antisens oligonükleotidleri, tamamlayıcı hedef mRNA'ya bağlanırlar ve translasyonu engelleyebilirler. Ya da Ribonükleaz H gibi nükleazlar veya ribozim (RNA enzimi), deoksiribozim (DNA enzimi) gibi katalitik olarak aktif oligonükleotidler hedef mRNA'nın parçalanmasına yol açabilirler (Gewirtz, 2007; Kurreck, 2003). RNA etkileşimi (RNAi) ilk kez Fire ve ark. (1998) tarafından *Caenorhabditis elegans*'ın hücrelerinde transkripsiyon sonrası gen sessizleşmesini sağlayan bir mekanizma olarak tanımlanmıştır (Fire ve ark., 1998). RNAi içinde çift sarmallı RNA (*double-stranded RNA*; dsRNA) tamamlayıcı mRNA dizisinin bozulmasını sağlayarak hedef genin ifadenmesini bastırır (Fire ve ark., 1998; Takeshita ve Ochiya, 2006). dsRNA, hücrenin içine girerken bir ribonükleaz enzimi olan Dicer tarafından simetrik 2-3 nükleotid 3' çıkıntıları ve 5' fosfata ve 3' hidroksil gruba sahip küçük (21 ila 23 nt) RNA'lara (siRNA'lar) ayrılır (Dillin, 2003) (Şekil 1.13). Bu RNA'lar, bir RNA indükleyici sessizleştirme kompleksi (*RNA-inducing silencing complex*; RISC) ile ilişkilidir. RISC'yi tamamlayıcı bir hedef mRNA'ya yönlendirir ve RISC kompleksinde bulunan bir enzim olan Slicer (Argonaute-2) ile endonükleolitik bölünmeyi başlatır. RISC'ye siRNA'ların eklenmesi için siRNA'ların 5' ucunda fosforile edilmelidir. Hedef mRNA'nın bölünmesi, siRNA molekülünün antisens ipliğinin 5' fosfatından 10 nükleotid uzaklıkta olan tek bir yerde gerçekleşir. 5' 7-metilguanin veya 3' poli (A) kuyruk yapısının kaybindan dolayı, bölünmüş hedef mRNA, artık endojen RNA enzimlerine karşı korunmaz ve parçalanır (Lage, 2005). 21 ila 23-nt siRNA içinde 1-2 bp (*base pair*, baz çifti)'den fazla uyumsuzluklar, hedef mRNA'nın düzgün bir şekilde parçalanmasını bozmaktadır (Dillin, 2003). RNAi özellikle kanser çalışmalarında büyük vaatler içeren güçlü ve spesifik bir gen susturma işlemidir.



Şekil 1.13. dsRNA aracılı siRNA teknolojisi (Dillin, 2003). Hücrelere girişte dsRNA, Dicer tarafından 21-23-nt siRNA'lara bölünür. siRNA'lar, büyük bir multiprotein kompleksi olan RISC ile birleşir. RISC'nin uygun mRNA'yı (yeşil ile gösterilmiştir) hedeflemeye yardımcı olmak için siRNA'yı çözdüğü düşünülmektedir. siRNA/mRNA hibridi bölünür ve salınan siRNA ve mRNA endo ve ekzonükleazlar tarafından bozulur. siRNA'nın uzaması (turuncu ile gösterilen) daha fazla siRNA üretimine yol açabilir ve genlerin bozulmasına neden olabilir. dsRNA; çift sarmallı RNA, RISC; RNA indükleyici sessizleştirme kompleksi. Şekil orijinal halinden Türkçeleştirilmiştir.

Literatürde var olan bilgiler ışığında *DNMT* genlerinin normal olmayan ifadelenmelerinin ve normal olmayan DNA metilasyonunun infertiliteye neden olabileceği bilinir. Ovositte ve erken dönem embriyolarda *Dnmt* proteinlerinin (*Dnmt1* ve *Dnmt3a*) dağılımları ve miktarları bir araştırma makalesinde yayınlanmıştır (Uysal ve ark., 2017). Her iki proteinin de ifadelenmesinin farede embriyodaki genom aktivasyonundan sonra düşmesi ve blastokist aşamasında tekrar artması literatürde bulunan global DNA metilasyonunun seyriyle uyumludur. Bu enzimlerin erken dönemdeki embriyoların gelişiminde rol alan kritik genlerin düzenlenmesinde ya da baskılanmasında rol oynadığı kanısındayız. Genin tamamen işlevsiz hale getirildiği çalışmalardaysa embriyonun ölümüyle sonuçlanan bulgular mevcuttur. Planlamış olduğumuz bu tez çalışmasında siRNA teknolojisini kullanarak *Dnmt1* ve *Dnmt3a* genlerinin susturulması ve bunun embriyo gelişimi üzerine olan etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu tezin hipotezi, “*Dnmt1* ve *Dnmt3a* enzimlerinin kodladığı proteinler farede implantasyon öncesi dönemdeki embriyonun gelişim sürecinde yaşamsal rol oynar”dır.

Tezin amacı ise, *Dnmt1* ve *Dnmt3a* genlerinin siRNA teknolojisi ile susturularak implantasyon öncesi dönemdeki embriyoların gelişim sürecinde sergilediği hücre içi miktar ve dağılım farklılıklarıyla literatür bilgisi ışığında rollerini anlamaya katkıda bulunmaktır.

Bu tez çalışmasının hedefleri,

1. *Dnmt1* ve *Dnmt3a* genlerinin embriyonun gelişimine olan katkısını göstermek.
2. Bu genlerin susturulması ile embriyonun hangi aşamada durakladığı ya da etkilenmediği analiz etmek.
3. Bu genlerin susturulmasıyla global DNA metilasyonu arasındaki ilişkiyi göstermek.

4. Bilindiği üzere; DNA metilasyonu gen kontrolünü sağlayan ana şalter gibi davranmaktadır. Erken dönemdeki embriyoların gelişimde DNA metilasyonunu katalizleyen Dnmt enzimlerinin işlevine ilişkin çıkarımlarda bulunarak literatüre katkı sağlamak.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Süperovülasyon Protokolü

Bu çalışmada dişi farelerde folikülogenezi uyarmak için Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) analogu olan Gebe Kısırak Serum Gonadotropini (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*; PMSG) ve ovülasyonu uyarmak içinse Luteinleştirici Hormon (LH) analogu olan İnsan Koryonik Gonadotropin (*Human Chorionic Gonadotropin*; hCG) kullanıldı.

2.2. Gonadotropinlerin Hazırlanışı

PMSG (Intervet) ve hCG (Sigma CG-10) enjeksiyonluk steril su içerisinde 50 IU/mL ve 75 IU/mL olacak şekilde çözüldü. Stok solüsyonlar küçük parçalar şeklinde hazırlanarak -20°C'de kullanıma kadar saklandı.

2.3. Embriyoların Süperovülasyon ile Toplanması ve Kullanıma Hazırlanması

Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi tarafından sağlanan ve standart laboratuvar koşullarında beslenen 240 adet BALB/c soyu yetişkin (4-5 haftalık) dişi fare ve damızlık olarak 10 adet BALB/c soyu yetişkin erkek fare

kullanıldı. Folikülogenezi uyarmak için dişi farelere intraperitoneal 5 IU/hayvan PMSG enjeksiyonu yapıldı. PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra ovülasyonu uyarmak için intraperitoneal olarak 5 IU/hayvan hCG enjeksiyonu yapıldı. hCG enjeksiyonunun yapıldığı günün akşamında bir dişi fare bir erişkin erkekle aynı kafeste bırakılarak çiftleşmeleri sağlandı Ertesi sabah vajinal plak kontrolü yapılan ve plak belirlenen fareler fertilizasyonun 0,5. gününde kabul edildi. Vajinal plak kontrolü yapılarak gebeliğin pozitif olduğu varsayılan dişi farelerin Fallop tüpleri hCG enjeksiyonundan 20 saat sonra çıkartılarak G-MOPS (*G-3-N-morfolino propanesülfonik asit*, Vitrolife) medyumuna içerisine alındı; Fallop tüplerinin ampulla bölgesi stereo mikroskop altında insülin enjektörüyle patlatıldı ve zigotlar toplandı. Her grup için en az 100 zigot kullanıldı ve 6 kez deney tekrarı yapıldı.

2.4. Grupların Oluşturulması ve Embriyo Kültür Koşulları

Deneye başlamadan bir gün öncesinde medyumun gece boyu gazlanması için GTL (*G-Time Lapse*, Vitrolife) ve parafin yağı (Ovoil, Vitrolife) inkübatöre (Panasonic, MCO 5M) konuldu. İnkübatör şartları %5 O₂, %5 CO₂ ve 37°C olarak ayarlandı.

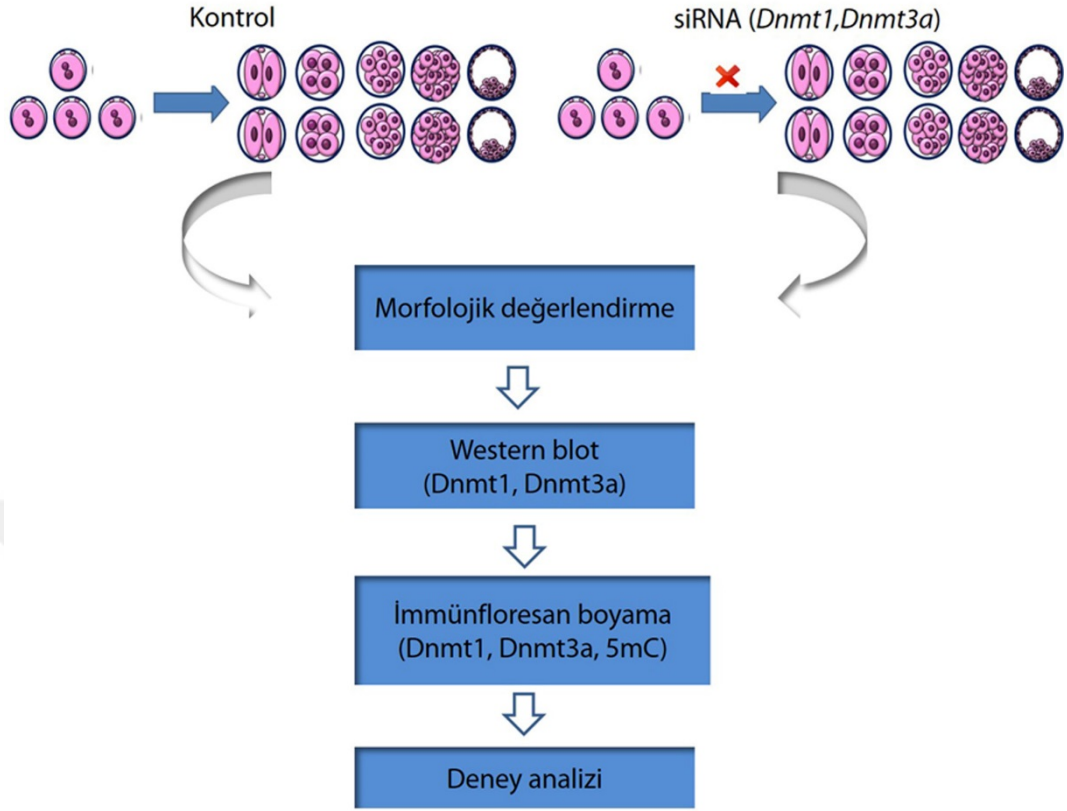
Çalışmamızda kontrol grubu ve siRNA uygulanan grup (deney grubu) olmak üzere dört grup oluşturuldu.

- 1. Grup:** Kontrol grubu için toplanan zigotlar embriyo kültür ortamı içine alınarak blastokist aşamasına kadar kültüre edildi.
- 2. Grup:** Zigotlar *Dnmt1* siRNA'sını içeren kültür ortamına alınarak blastokist aşamasına kadar kültüre edildi.
- 3. Grup:** Zigotlar *Dnmt3a* siRNA'sını içeren kültür ortamına alınarak blastokist aşamasına kadar kültüre edildi.
- 4. Grup:** Zigotlar hedef olmayan geni içeren siRNA içeren kültür ortamına

alınarak yukarıdaki deney gruplarının kontrolü olarak blastokist aşamasına kadar kültüre edildi (Şekil 2.1).

2.5. siRNA Uygulaması

1. İlk olarak, kullanılacak olan siRNA'ların embriyogenez üzerine etkisini görmek amacıyla değişen dozlarda siRNA kullanılarak en uygun doza karar verildi. Literatürde farklı genleri hedefleyen siRNA uygulaması çalışmalarında genin %60 ve üzerinde susturulması başarılı olarak kabul edilir (O'Meara ve ark., 2011). Bu kapsamda en uygun doz olarak 50 nM belirlendi. En uygun doza karar verildikten sonra siRNA embriyo kültür medyumuna içine karıştırılarak 50 µL'lik damlacıklar şeklinde Petri kabına konulup üzeri parafin yağı ile kaplandı (ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplar için) (Kuscu ve ark., 2019).
2. İkinci, üçüncü ve dördüncü gruplar için toplanan zigotlar Petri kabında damlacıklar içine alınıp kültüre edildi.
3. Kullanılan siRNA'ların embriyonun içine girdiğini doğrulamak amacıyla floresan işaretli transfeksiyon ajanı (siGLO Green Transfection Indicator, Dharmacon) kullanıldı.
4. Embriyoların gelişmesi zaman aralıklı görüntüleme tekniği kullanılarak süper çözünürlüklü konfokal mikroskop (Zeiss LSM-880) altında blastokist aşamasına kadar (3-4 gün) izlendi.
5. **Not:** Birinci grup içinde toplanan zigotlar ise Petri kabında damlacık (sadece kültür medyumunu içeren) içine alınıp kültüre edildi. Zaman aralıklı görüntüleme tekniği kullanılarak süper çözünürlüklü konfokal mikroskop altında blastokist aşamasına kadar (3-4 gün) embriyoların gelişmesi izlendi.
6. Bütün gruplarda morfolojik değerlendirme yapıldı. Embriyoların hangi aşamada durakladığı not edildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Deney tasarımı. Kontrol ve deney gruplardan alınan blastokistler, morfolojik değerlendirme, Western blot yöntemi, immü floresan yöntemi, qRT-PCR yönteminde kullanıldı. Elde edilen veriler analiz edildi.

2.6. İmmü floresan Boyama Yöntemi

1. Blastokistler %4 PFA içerisine alınarak 20 dk. fikse edildi.
2. Fiksasyon işleminden sonra 3×10 dk. PBS-BSA (%2) damlasından geçirilerek yıkandı.
3. Yıkamanın ardından blastokistler PBS-Tween 20 (%1) içerisinde oda ısısında 15 dk. permeabilize edildi.
4. Permeabilizasyon işleminin ardından blastokistler, bloklama solüsyonu içerisinde oda ısısında 60 dk. bloklandı.
5. Bloklama işleminin ardından blastokistler, antikor seyreltme solüsyonu içerisinde hazırlanmış olan primer antikorların içerisine alınarak gece

boyunca +4°C’ de inkübe edildiler. Primer antikorlar: Dnmt1, Dnmt3a ve 5 metilsitozin (5mC). 5mC global DNA metilasyonunu göstermek için uygulandı (Çizelge 2.1).

6. Primer antikor ile inkübe edilme işleminin ardından blastokistler, 3×10 dakika PBS+BSA (%2) damlasından geçirilerek yıkama yapıldı.
7. Yıkama işleminin ardından blastokistler, antikor seyreltme solüsyonu içerisinde hazırlanmış olan floresan işaretli sekonder antikor içerisine aktarıldılar ve 60 dk. oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi.
8. Sekonder antikor ile inkübe edilme işleminin ardından blastokistler, 3×10 dk. PBS+BSA (%2) damlasından geçirilerek yıkandı.
9. Son olarak blastokistler üzeri parafin yağ ile kaplı çekirdek boyası (Hoechst 33242, 1 µg/mL) içeren kapatma solüsyonunu içeren damlacıklara aktarılarak floresan görüntüleme yapıldı (Şekil 2.1). Fare blastokistlerinin çapı yaklaşık 150 µm'dir; bu nedenle, bu tür bir hazırlık embriyonun yüzeyini ve iç yapılarını olabildiğince doğal olarak görselleştirmemizi sağladı (Celikkan ve ark., 2020).

2.6.1. Kullanılan Solüsyonlar

%4'lük Paraformaldehit (PFA) Solüsyonu

6 g paraformaldehit 200 mL bidistile suya konuldu ve berraklaşınca kadar içerisine 1 N NaOH eklenip manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica, F20520162) karıştırıldı. Berrak çözelti oluşmasının ardından süzüldü ve 1 tablet PBS karışıma eklendi (1× PBS, Sigma P4417). Solüsyonun pH'ı 7,2- 7,4 arasında olacak şekilde ayarlandı ve daha sonra solüsyon eşit hacimlere bölünerek -20°C’ de kullanıma kadar saklandı.

Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) Solüsyonu -%2'lik Bovine Serum Albumin (BSA) Solüsyonu

Bir tablet PBS (Sigma, P4417) 200 mL bidistile su içerisinde çözülerek kullanılacak olan 1× PBS solüsyonu hazırlandı. %2'lik BSA solüsyonu taze olarak ve 10 ml PBS içine 0.2 gr BSA (Sigma A9647) eklenip çözülerek hazırlandı.

Permeabilizasyon Solüsyonu

1000 µL PBS içerisine 10 µL Tween-20 (Sigma P1379) eklenerek kullanılacağı zaman taze hazırlandı.

Antikor Seyreltme Solüsyonu

%0,05'lik Tween-20 içeren PBS-%2 BSA solüsyonu antikor dilüe edici solüsyon olarak kullanıldı. 1000 µL PBS-%2 BSA solüsyonu içerisine 0,5 µL Tween-20 eklenerek hazırlandı.

Bloklama Solüsyonu

799 µL PBS içerisine, 1 µL Tween 20 ve 200 µl normal keçi serumu (Vector N0912) eklenerek taze hazırlandı.

Hoechst 33242 İçeren Kapatma Solüsyonu

1 µL Hoechst (ThermoFisher 33242) 1 mL PBS içerisine eklenmesiyle çözüldü. 0,005 mL (1 mg/mL stok Hoechst 33242 solüsyonu), 2,5 mL gliserol, 2,5 mL PBS ve 125 mg sodyum azid (Sigma S8032) eklenmesiyle kapatma solüsyonu hazırlandı ve +4 °C’de saklandı.

Primer Antikor	Katalog numarası	Seyreltme	Sekonder antikor	Katalog numarası	Seyreltme
Dnmt1	Abcam ab87654	1:200	Alexa Fluor 488 Goat Anti- Rabbit IgG	Jackson Immuno Research 111-545-003	1:400
Dnmt3a	Abcam ab188470	1:200	Alexa Fluor 488 Goat Anti- Rabbit IgG	Jackson Immuno Research 111-545-003	1:400
5mC	Cell Signaling 28692S	1:200	Alexa Fluor 488 Goat Anti- Rabbit IgG	Jackson Immuno Research 111-545-003	1:400

Çizelge 2.1. İmmünfloresan boyama yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları.

2.7. Mikroskopik Gözlemler

Bu çalışmada fikse edilmiş embriyolar üzerinde Zeiss LSM-880 Airyscan sistemi (Zeiss, Almanya) kullanılarak floresan gözlemler ve ölçümler yapıldı. Floresan proba uygun olarak 405 ve 488 nm lazer hatları kullanıldı. Tüm laser ve tarama parametreleri referans histogram kullanılarak optimize edildikten sonra sabit tutuldu. Sinyal algılamalarında 20× (NA: 1,2) ve 40× sulu (NA: 1,4) objektifleri galyum-arsenik ve airyscan dedektörleri kullanıldı. İki boyutlu (X-Y) ve üç boyutlu (X-Y-Z) analizlerde piksel çözünürlüğü tüm görüntülerde sabit tutuldu. Z aksı görüntü

toplamada 1 µm aralıklarla 35 kesit alındı ve Zen Black programında birleştirildi. Analizlerin bir kısmı da Zen Blue programında gerçekleştirildi.

2.8. Western Blot Uygulaması

1. Blastokistler 50µL lizis tamponu ve 5 µL proteaz inhibitör kokteyli (PIK) içeren karışıma eklendi.
2. Tüpteki karışım, iyice vortekslenip –20°C'ye kaldırıldı.
3. Protein miktarının belirlenmesi, Lowry metodu (Pierce, 23240) ile üretici firmanın önerdiği basamaklarda gerçekleştirildi.
4. Standart olarak BSA (*bovine serum albumin*) kullanıldı. BSA, 2 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Ayrıca, standart ve örneklerin hazırlandığı protein içermeyen solüsyon kör olarak kullanıldı.
5. Lowry metoduna göre hazırlanan çözeltilerin spektrofotometre ile 750 nm'de ölçümleri gerçekleştirildi.
6. Gruplardaki protein miktarları her örnek için elde edilen absorbans değeri kullanılarak belirlendi.
7. Protein miktarları belirlendikten sonra Dnmt1 ve Dnmt3a proteinleri için WB uygulamasına geçildi. β-aktin internal kontrol amaçlı kullanıldı (Çizelge 2.2).
8. Western blot uygulaması için ayrıştırma jeli %10 konsantrasyonda hazırlandı.
9. Ayrıştırma ve toplama jelleri hazırlandıktan sonra polimerizasyon için oda ısısında 45 dk. bekletildi.
10. Jeldeki kuyucuklara, 2× Laemmli tamponu ve distile suyla seyreltilerek istenilen 25 µg miktara getirilen protein çözeltileri 5 dk. kaynayan suda bekletildi. Böylece, proteinlerin çizgisel hale gelmeleri sağlandı.
11. Toplama jeli polimerize olduktan sonra ince ve kısa olan camlar iç tarafa gelecek şekilde elektroforezin yapılacağı tutucuya karşılıklı olarak yerleştirildi. Bu tutucu tank içerisine 1× elektroforez yürütme solüsyonu

iç ve dış havuzcuklara döküldü. Yürütme solüsyonu konulduktan sonra jelin ilk kuyucuğuna moleküler ağırlık markeri ve diğer kuyucuklara örnekler yüklendi.

12. Örnekler, önce 20 dk. 80 voltta; sonra 2 saat 100 voltta yürütüldü.
13. Elektroforez işlemi bittikten sonra camlar tank içerisinde çıkarıldı ve jelin kalın camdan ayrılması sağlandı.
14. Jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için sandviç hazırlandı. Sandviç sırasıyla sünger, filtre kâğıdı, jel, PVDF membran, filtre kâğıdı ve sünger katlarını içerecek şekilde yerleştirildi.
15. Tanka blotlama solüsyonu da eklendikten sonra +4°C, 32 volt/65 mA'de gece boyunca blotlama gerçekleştirildi. Böylece, jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı.
16. Ertesi gün sandviç açılarak, membran 10 dk. TBS-T'de yıkandı.
17. TBS-T ile yıkama aşamasından sonra membran 1 saat, %5'lik süt tozunda inkübe edilerek özgün olmayan bağlanmalar engellendi.
18. Bloklama işleminden sonra, süt tozunda hazırlanmış olan tavşan anti fare Dnmt1, Dnmt3a ve β -aktin antikoru (1/1000 dilüsyonda) +4'de gece boyunca inkübe edildi.
19. Süre sonunda membran, TBS-T ile çalkalayıcı da 30 dk. yıkandı. Her 10 dk'da bir TBS-T solüsyonu yenilendi.
20. Yıkama işleminden sonra membran 1/2000 dilüsyon oranında, IRDye 800 konjuge goat-anti rabbit IgG ile 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor TBS-T'de hazırlandı.
21. Süre sonunda membran, TBS-T ile çalkalayıcı da 30 dk. yıkandı. Her 10 dk.'da bir TBS-T solüsyonu yenilendi.
22. Ardından membranlar kurutulmadan, Li-Cor Odyssey CLx sistemi (LICOR Biosciences, ABD) kullanılarak protein bantları görüntülendi (Şekil 2.1).

Primer Antikor	Katalog numarası	Seyreltme	Sekonder antikor	Katalog numarası	Seyreltme
Dnmt1	Abcam ab87654	1:1000	IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	LI-COR 926-32211	1:2000
Dnmt3a	Abcam ab188470	1:1000	IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	LI-COR 926-32211	1:2000
β -aktin	Abcam ab8227	1:1000	IRDye® 800CW Goat anti- Rabbit IgG Secondary Antibody	LI-COR 926-32211	1:2000

Çizelge 2.2. Western blot yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları.

2.9. İstatistiksel Analiz

İmmüno floresan ve Western blot yöntemleri için görüntüler ImageJ programında sayısallaştırıldı. Elde edilen veriler SigmaStat (USA) programına girildi. Gruplar arasındaki farkın anlamlılığı nonparametrik testlerle değerlendirildi (Şekil 2.1).

3. BULGULAR

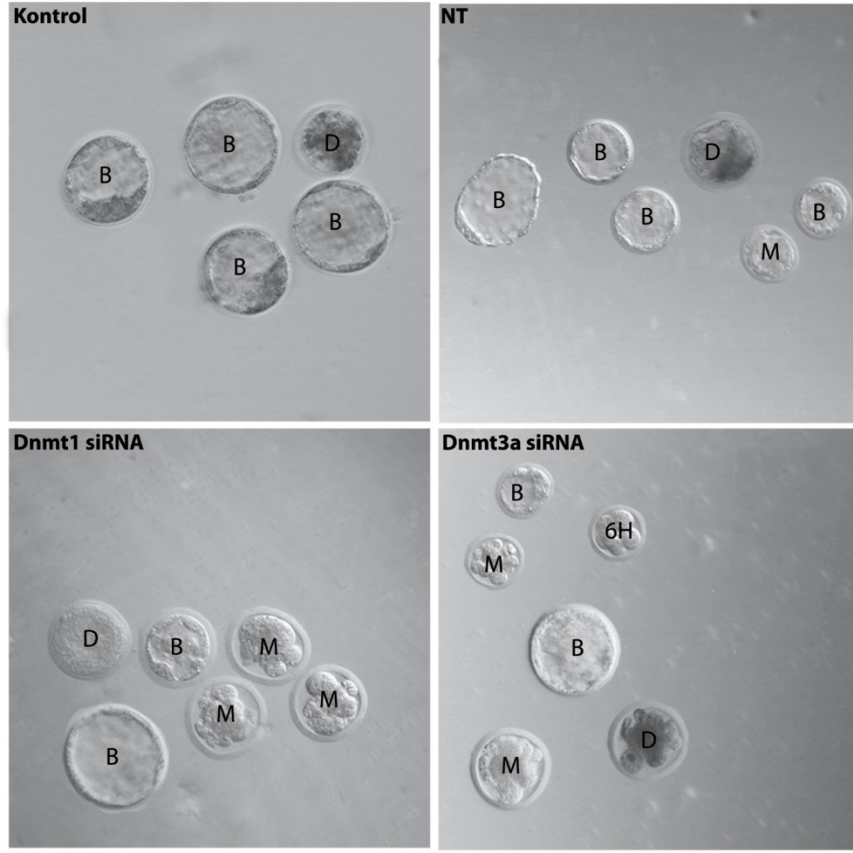
3.1. Embriyonun Gelişim Dinamiği

Çalışmamızda ilk olarak, embriyonun gelişim oranları analiz edildi. Zigot aşamasında kültüre alınan embriyolar 3,5 gün sonra kültürden alınarak stereo mikroskop altında aşamalarına göre sayıldı. Her bir grup için toplam 305 embriyo analiz edildi. İlk olarak; 2-hücreli embriyo aşamasındaki embriyolar sayıldı. Kontrol grubunda toplam 305 embriyodan 9 embriyo (%2,9), hedef olmayan siRNA içeren grupta 305 embriyodan 10 embriyo (%3,2), *Dnmt1* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 90 embriyo (%29,5), *Dnmt3a* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 80 embriyo (%26,2) 2-hücreli aşamada duraklamıştı (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2.1.1 A, B). 4-hücreli embriyo aşamasında ise; kontrol grubunda toplam 305 embriyodan 12 embriyo (%3,9), hedef olmayan siRNA içeren grupta 305 embriyodan 20 embriyo (%6,5), *Dnmt1* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 48 embriyo (%15,7), *Dnmt3a* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 67 embriyo (%21,9) duraklamıştı (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2.1.1 A, B). 8-hücreli embriyo aşamasında ise; kontrol grubunda toplam 305 embriyodan 0 embriyo (%0), hedef olmayan siRNA içeren grupta 305 embriyodan 0 embriyo (%0), *Dnmt1* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 0 embriyo (%0), *Dnmt3a* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 0 embriyo (%0) duraklamıştı (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2.1.1 A, B). Morula aşamasında ise; kontrol grubunda toplam 305 embriyodan 20 embriyo (%6,8), hedef olmayan siRNA içeren grupta 305 embriyodan 27 embriyo (%8,8), *Dnmt1* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 30 embriyo (%9,8), *Dnmt3a* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 28 embriyo (%9,1) duraklamıştı (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2.1.1 A, B). Dejenere embriyolar analiz edildiğinde ise; kontrol grubunda toplam 305 embriyodan 10 embriyo (%3,2), hedef olmayan siRNA içeren grupta 305 embriyodan 18 embriyo (%5,9), *Dnmt1* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 86

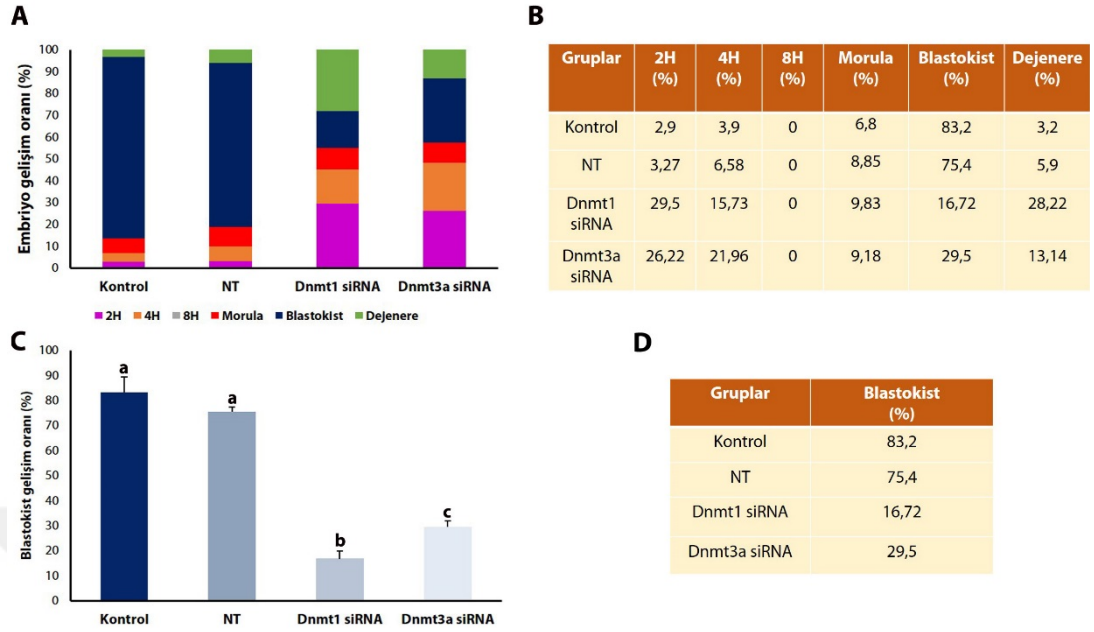
embriyo (%28,2), *Dnmt3a* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 40 embriyo (%13,1) tanımlandı (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2.1.1 A, B).

3.1.1. Blastokistin Gelişim Dinamiği

Çalışmamızda embriyo gelişim/duraklama oranları analiz edildikten sonra blastokiste ulaşma oranları analiz edildi. Zigot aşamasında kültüre edilen embriyolar 3,5 gün sonra kültürden alınarak stereo mikroskop altında blastokistler sayıldı. Toplamda her bir grup için 305 embriyo analiz edildi. Kontrol grubunda 305 embriyodan 254 embriyo (%83,2), hedef olmayan siRNA içeren grupta 305 embriyodan 230 embriyo (%75,4) *Dnmt1* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 51 embriyo (%16,7), *Dnmt3a* siRNA içeren grupta 305 embriyodan 90 embriyo (%29,5) blastokist aşamasındaydı (Şekil 3.1 ve Şekil 3.1.1 C, D).



Şekil 3.1. Zigotun kültürüyle embriyo gelişiminin DIC görüntüleri. *Dnmt1* ve *Dnmt3a* siRNA uygulanan gruplarda blastokist oranları kontrol ve hedef geni içermeyen siRNA gruplarına göre anlamlı olarak ($P<0,05$) azdı. Her grup için 305 embriyo analiz edildi. Grafikte bulunan farklı harfler istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0,05$). NT; hedef geni içermeyen siRNA grubu, B; Blastokist, D; dejenere embriyo, M; morula, 6H; 6 hücreli embriyo.



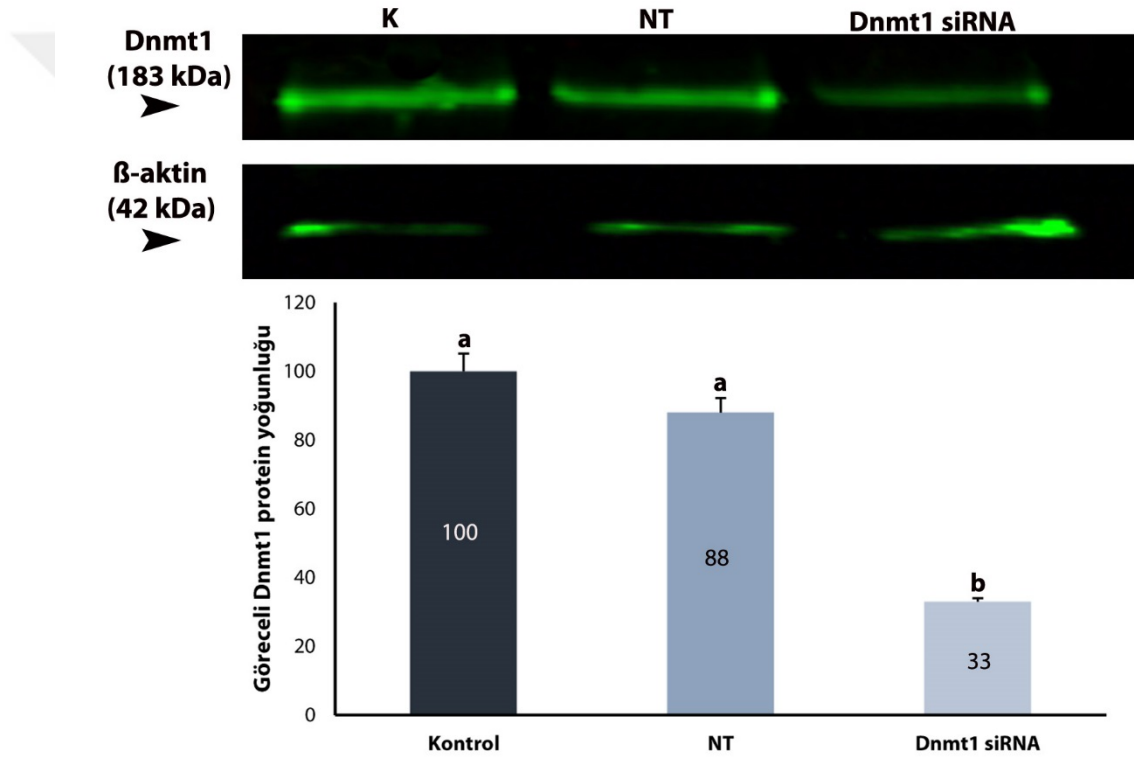
Şekil 3.1.1. Zigotun kültürüyle embriyo (2H-Morula) ve Blastokist gelişim oranları. **A.** Embriyo gelişim oranları. **B.** Embriyo gelişim oranlarının sayısal değerleri. Her grup için 305 embriyo analiz edildi. Grafiklerde sonuçlar oransal (%) olarak verildi. NT; hedef geni içermeyen siRNA grubu. Grafikte bulunan farklı harfler istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0,05$).

3.2. Protein Miktarı ve Hücre içi Dağılım Analizleri

Bu çalışmada fare embriyolarında siRNA teknolojisi kullanılarak gen susturma işlemi yapıldı. Zigot aşamasında alınan embriyoların kültür ortamlarına siRNA eklenerek kültüre edildi, kültür sonunda alınan embriyolarda Western blot yöntemi ile Dnmt1 ve Dnmt3a proteinlerinin miktarına bakılarak susturma başarısı belirlendi. İnternal kontrol olarak ise β -aktin kullanıldı. Elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

3.2.1. Dnmt1 Proteininin Miktarı

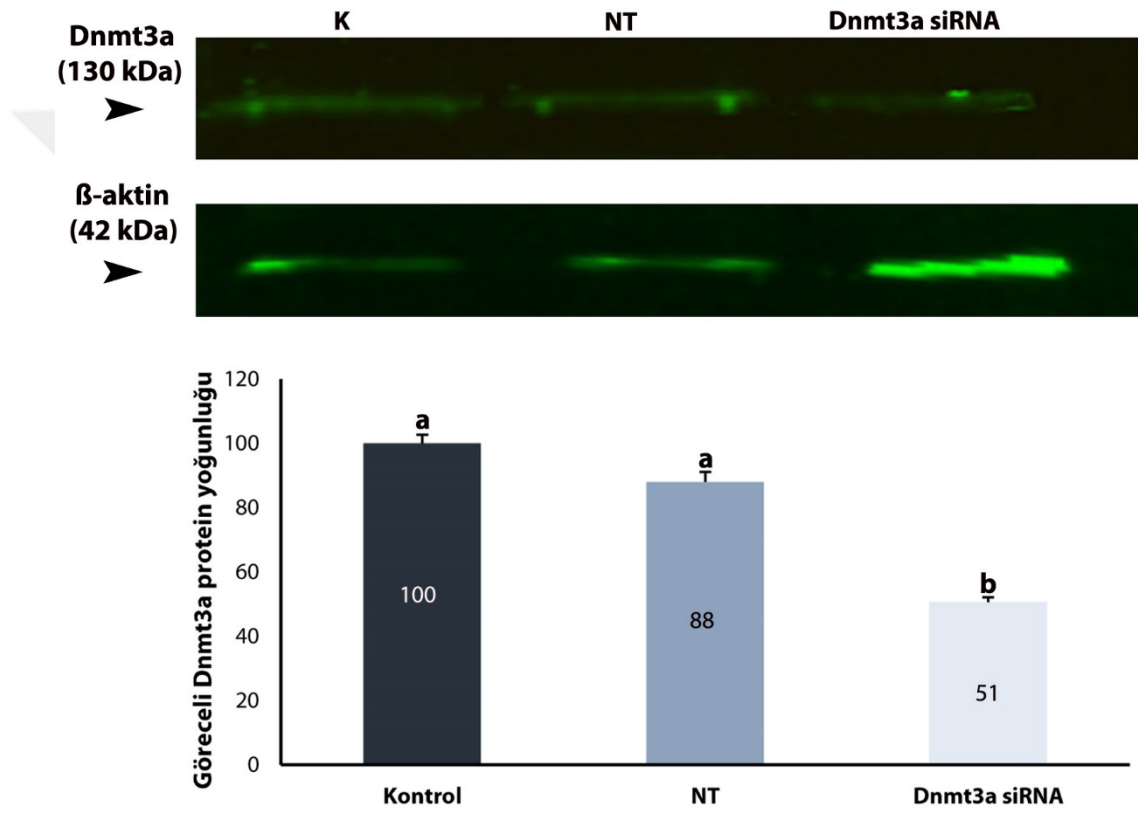
Dnmt1 siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde *Dnmt1* miktarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış bulundu ($P<0,001$) (Şekil 3.2). Benzer olarak, *Dnmt1* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde de *Dnmt1* düzeyi hedef olmayan siRNA içeren gruba göre anlamlı olarak azaldığı saptandı ($P<0,001$) (Şekil 3.2). Kontrol ve hedef olmayan siRNA içeren gruplar arasında ise anlamlı fark olmayıp ($p=0,1$), *Dnmt1* protein miktarı benzerdi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Dnmt1* proteininin miktarı. **A.** Western blot sonuçları. **B.** Göreceli *Dnmt1* proteini ifadenmesi sonuçları. *Dnmt1* siRNA uygulanan grupta kontrol ve hedef geni içermeyen siRNA grubuna göre anlamlı azalma bulundu. NT; hedef geni içermeyen siRNA grubu. β-aktin internal kontrol olarak kullanıldı. Grafikte bulunan farklı harfler istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0,05$).

3.2.2. Dnmt3a Proteininin Miktarı

Dnmt3a siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde Dnmt3a protein miktarı analiz edildiğinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış bulundu ($P<0,05$) (Şekil 3.3). Benzer olarak, *Dnmt3a* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde de Dnmt3a protein düzeyi hedef olmayan siRNA içeren gruba göre anlamlı olarak azalmıştı ($P<0,05$). Kontrol ve hedef olmayan siRNA içeren gruplar arasında ise anlamlı fark olmayıp ($P=0,1$), Dnmt3a protein seviyesi benzerdir (Şekil 3.3) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Dnmt3a proteininin miktarı. **A.** Western blot sonuçları. **B.** Göreceli Dnmt3a proteini ifadenmesi sonuçları. *Dnmt3a* siRNA uygulanan grupta kontrol ve hedef geni içermeyen siRNA grubuna göre anlamlı azalma bulundu ($P<0,05$). NT; hedef geni içermeyen siRNA grubu. β-aktin internal kontrol olarak kullanıldı. Grafikte bulunan farklı harfler istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0,05$).

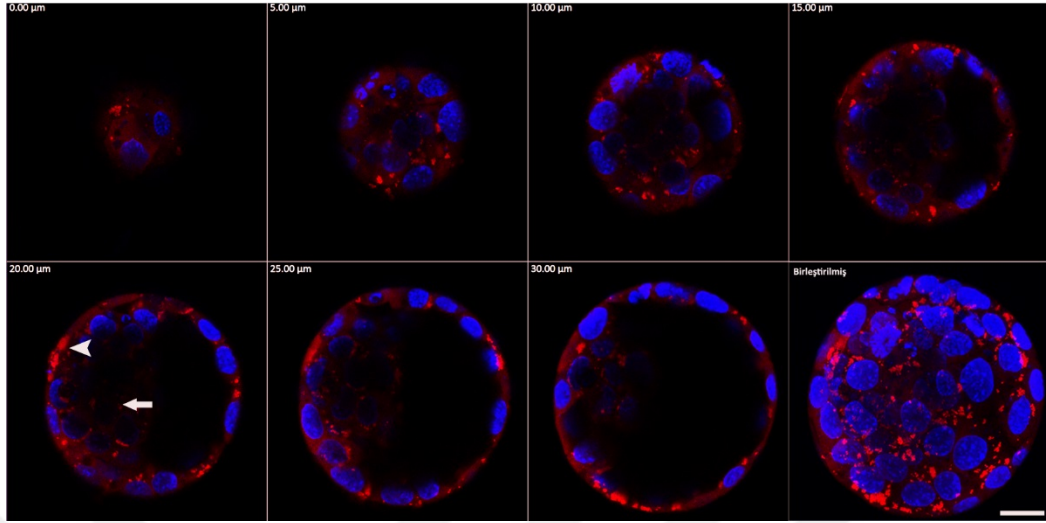
3.2.3. İmmünfloresan Analizler

Bu çalışmada siRNA teknolojisi kullanılarak gen susturma işlemi yapılan fare embriyolarında zigot aşamasında alınan embriyoların kültür ortamlarına siRNA eklenerek kültür edildi; kültür sonunda alınan embriyolarda immünfloresan boyama ile Dnmt1 ve Dnmt3a proteinlerinin ifadenmelerine bakılarak susturma başarısı belirlendi. Ayrıca bu proteinlerin susturulması ile global DNA metilasyonu arasındaki farkı göstermek amacıyla 5mC boyaması yapıldı.

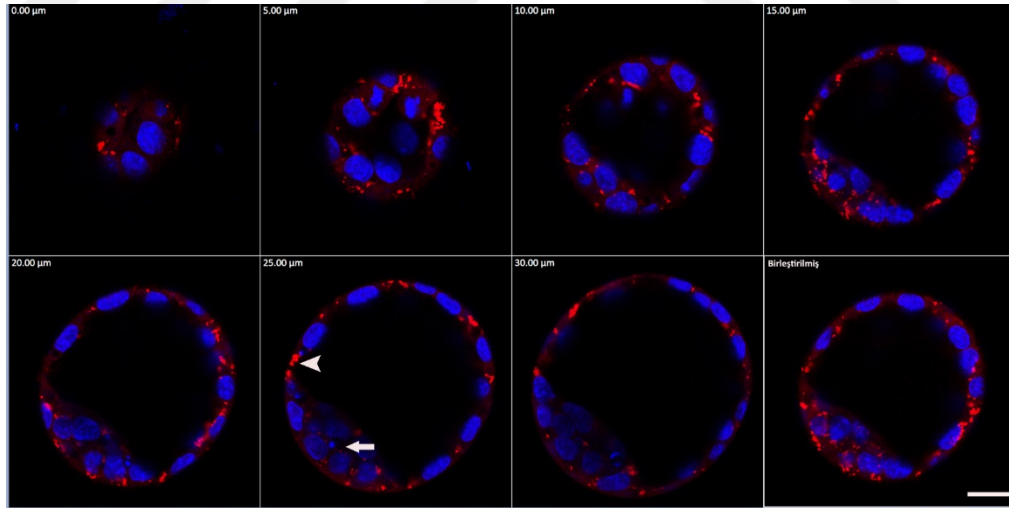
3.2.3.1. Dnmt1 Proteininin Dağılımı ve Yoğunluğu

Dnmt1'in hücre içi yerleşimleri değerlendirildiğinde ise proteinin yoğun olarak sitoplazmada yerleşim gösterdiği saptandı (Şekil 3.4). Dnmt1 proteini çekirdekte değil çekirdeğe komşu alanda (*juxtaanuclear*) gözlemlendi. Trofoektodermi oluşturan trofoblastlarda yoğun sinyale rastlandı. İç hücre kitlesinde ise trofoektoderm tabakasına göre sinyalde azalma bulundu. *Dnmt1* siRNA uygulanan grupta ise hem trofoektoderm hem de iç hücre kitlesinde sinyal şiddetinde belirgin azalma saptandı (Şekil 3.4.2.). Ancak kontrol ve hedef olmayan siRNA içeren gruplarda Dnmt1 sinyali birbirine benzer biçimde sitoplazmada çekirdeğe komşu olarak yerleşmişti (Şekil 3.4. ve Şekil 3.4.1.).

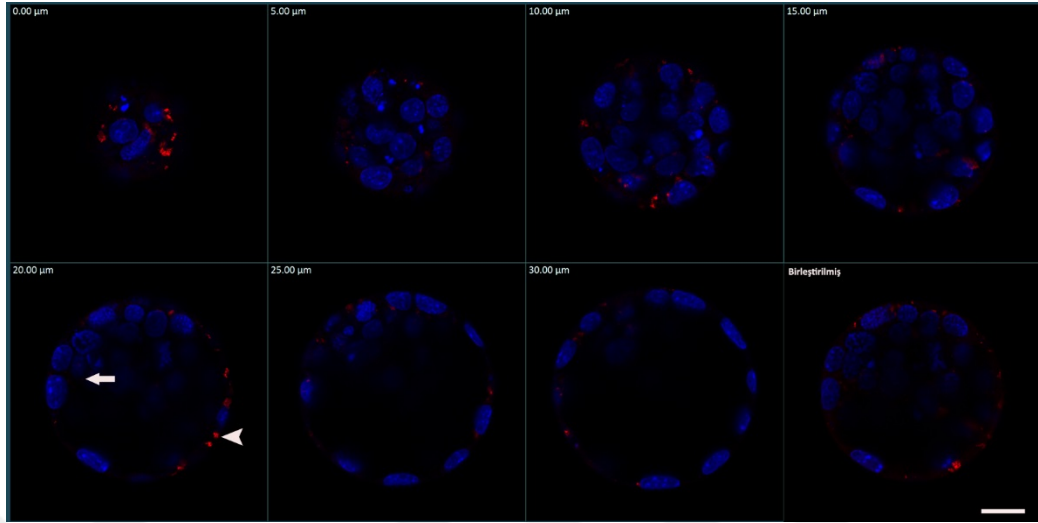
Dnmt1 siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde Dnmt1 proteini yoğunluğunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu ($P<0,001$) (Şekil 3.4.3.B). Benzer olarak, *Dnmt1* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde de Dnmt1 protein miktarı hedef olmayan siRNA içeren gruba göre anlamlı olarak azalmıştı ($P<0,001$). Kontrol ve hedef olmayan siRNA içeren gruplar arasında ise anlamlı fark olmayıp ($P=0,9$), bu gruplarda DNMT1 protein yoğunluğu benzerdi (Şekil 3.4.3.B).



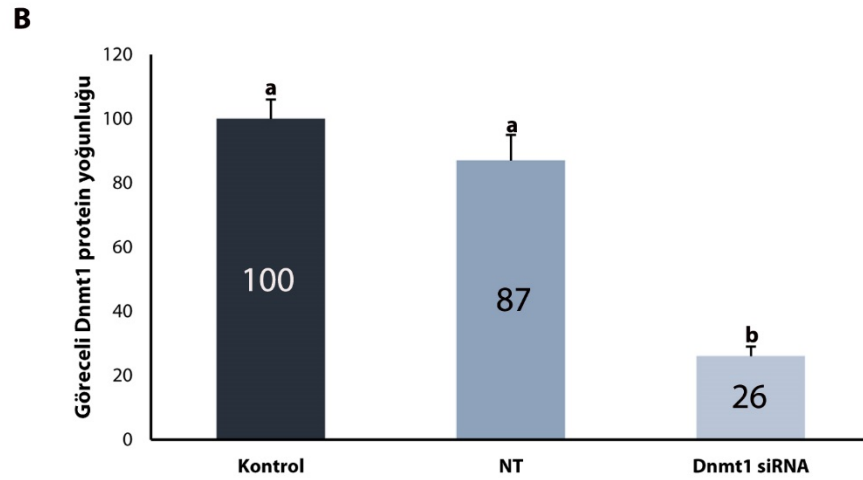
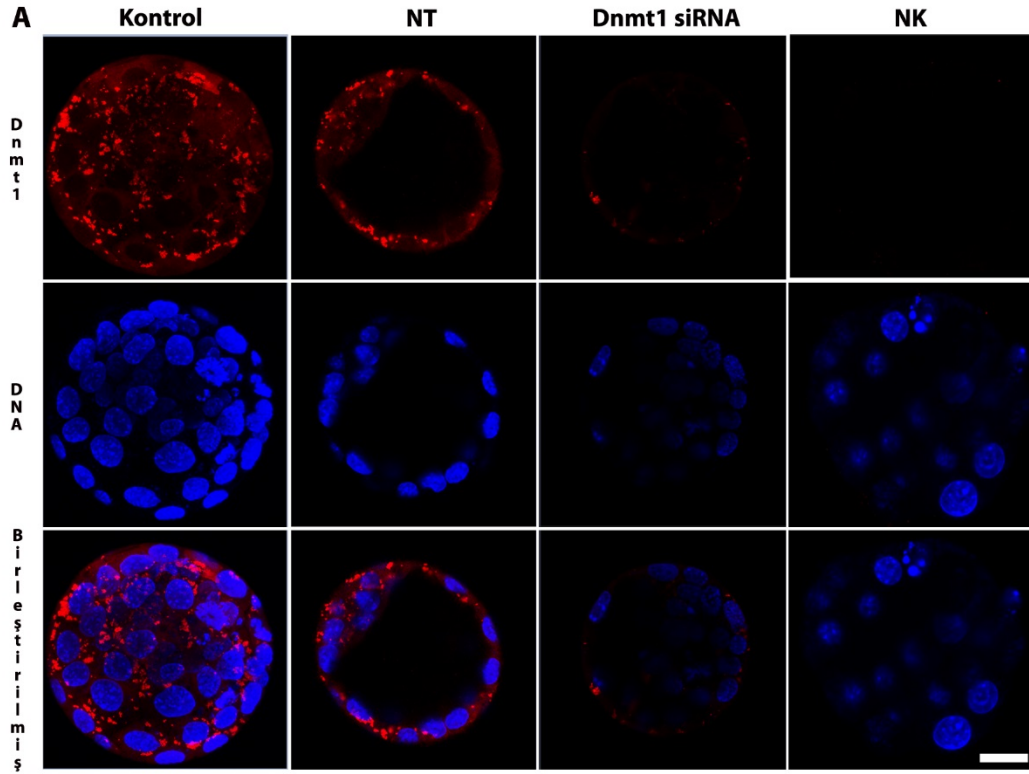
Şekil 3.4. Dnmt1 kontrol grubu. Dnmt1 sinyali trofoblastlarda sitoplazmik ve diffüz olarak bulunmasının yanında çekirdek komşuluğunda yamalar halinde (ok başı); iç hücre kitlesinde sitoplazmada küçük noktacıklar (kalın ok) şeklinde ve bir miktar çekirdek kenarında izlendi. Genel olarak sinyal şiddeti ve dağılımı iç hücre kitlesinde daha zayıf olarak saptandı. Dnmt1'in (kırmızı sinyal) kontrol grubunun immünfloresan analizlerinde z ekseninde 1 µm aralıklarla 35 kesit alındı ve 3B görüntü oluşturacak şekilde üst üste birleştirildi. Yukarıda beşer mikrometre atlayarak toplam 7 görüntü ve birleştirilmiş görüntü verilmiştir. DNA (mavi sinyal), ölçüm çubuğu=10 µm.



Şekil 3.4.1. Dnmt1 NT (hedef geni içermeyen siRNA) grubu. Dnmt1 sinyali gerek trofoblastlarda (ok başı); gerekse iç hücre kitlesinde (kalın ok) kontrol grubu ile aynı yerleşimde izlendi. Dnmt1'in (kırmızı sinyal) immünfloresan analizlerinde z ekseninde 1 µm aralıklarla 35 kesit alındı ve 3B görüntü oluşturacak şekilde üst üste birleştirildi. Yukarıda beşer mikrometre atlayarak toplam 7 görüntü ve birleştirilmiş görüntü verilmiştir. DNA (mavi sinyal), ölçüm çubuğu=10 µm.



Şekil 3.4.2. Dnmt1 siRNA grubu. Dnmt1 sinyali gerek trofoblastlarda (ok başı); gerekse iç hücre kitlesinde (kalın ok) kontrol ve NT grubu ile aynı yerleşimde izlendi. Ancak hem iç hücre kitlesinde hem de trofoektoderm tabakasında sinyal şiddetinde gözle görülür azalma izlendi. Dnmt1'in (kırmızı sinyal) immünfloresan analizlerinde z ekseninde 1 µm aralıklarla 35 kesit alındı ve 3B görüntü oluşturacak şekilde üst üste birleştirildi. Yukarıda beşer mikrometre atlayarak toplam 7 görüntü ve birleştirilmiş görüntü verilmiştir. DNA (mavi sinyal), ölçüm çubuğu=10 µm.

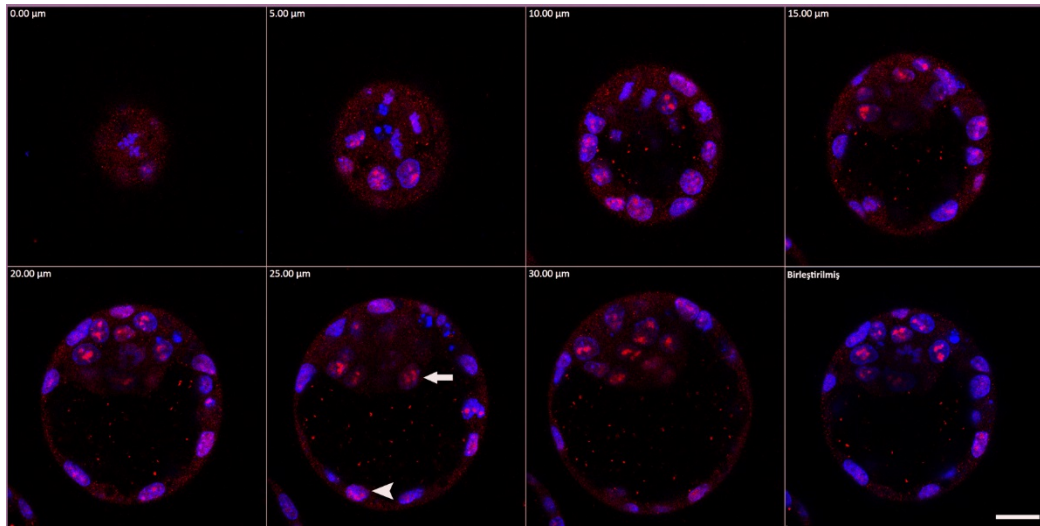


Şekil 3.4.3. Dnmt1 proteini ifadenlenmesi. **A.** İmmünfloresan sonuçları. **B.** Göreceli Dnmt1 proteini ifadenlenmesi sonuçları. *Dnmt1* siRNA uygulanan grupta kontrol ve hedef geni içermeyen siRNA grubuna göre anlamlı azalma bulundu ($P<0,001$). NT; hedef geni içermeyen siRNA grubu, NK; negatif kontrol. Grafikte bulunan farklı harfler istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0,05$). 1 μm aralıklarla alınan 35 optik kesitin birleştirilmesi ile elde edilen mikrograflardır.

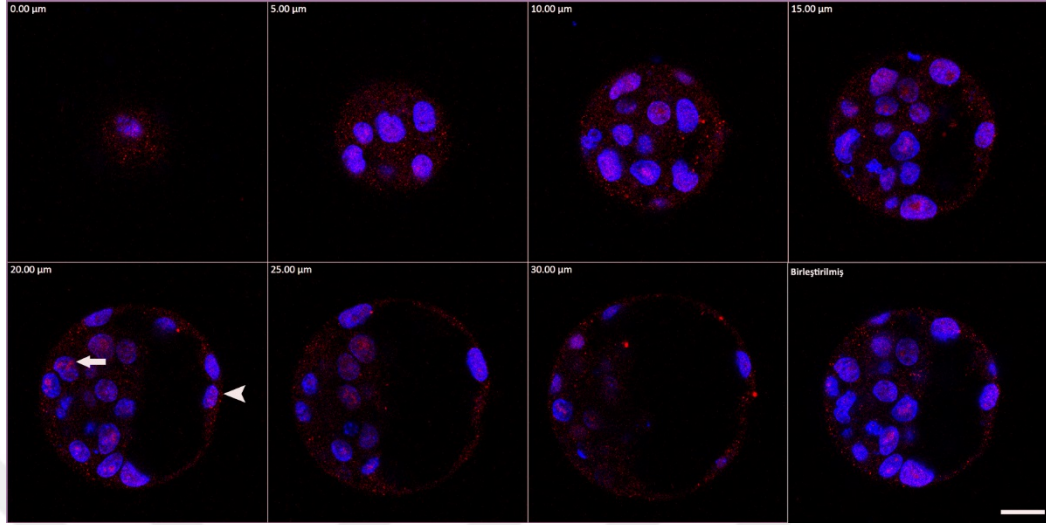
3.2.3.2. Dnmt3a Proteininin Dağılımı ve Yoğunluğu

Dnmt3a'nın hücre içi yerleşimi değerlendirildiğinde yoğun olarak sitoplazmada ve çekirdekte yerleşim gösterdiği saptandı (Şekil 3.5). Trofoektodermin bazı hücrelerinde yoğun çekirdek içi sinyale rastlandı. İç hücre kitlesinde trofoektoderm tabakasına göre sinyal daha zayıf bulundu. *Dnmt3a* siRNA uygulanan grupta ise hem trofoektoderm hem de iç hücre kitlesinde sinyal şiddetinde belirgin azalma görüldü (Şekil 3.5.2). Yerleşim olarak kontrol ve hedef olmayan siRNA içeren gruplarla benzer olmayıp yaygın noktasal yerleşim gösterdi (Şekil 3.5.1).

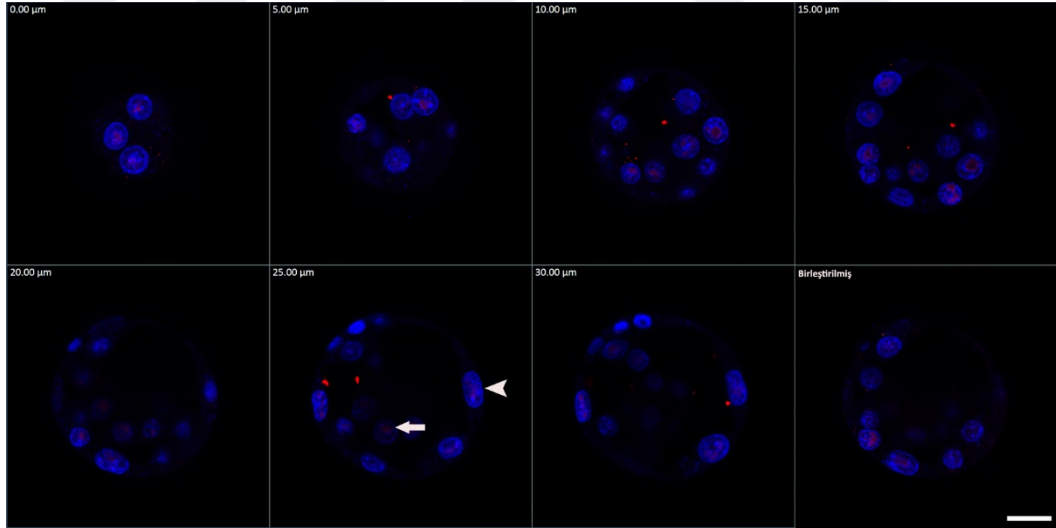
Dnmt3a siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde Dnmt3a proteini yoğunluğu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu ($P<0,001$) (Şekil 3.5.3B). Benzer olarak, *Dnmt3a* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde de Dnmt3a proteini miktarında hedef olmayan siRNA içeren gruba göre anlamlı olarak azaldı ($P<0,001$). Kontrol ve hedef olmayan siRNA içeren gruplar arasında ise anlamlı fark olmayıp Dnmt3a proteini düzeyi benzerdi ($P=0,1$) (Şekil 3.5.3B).



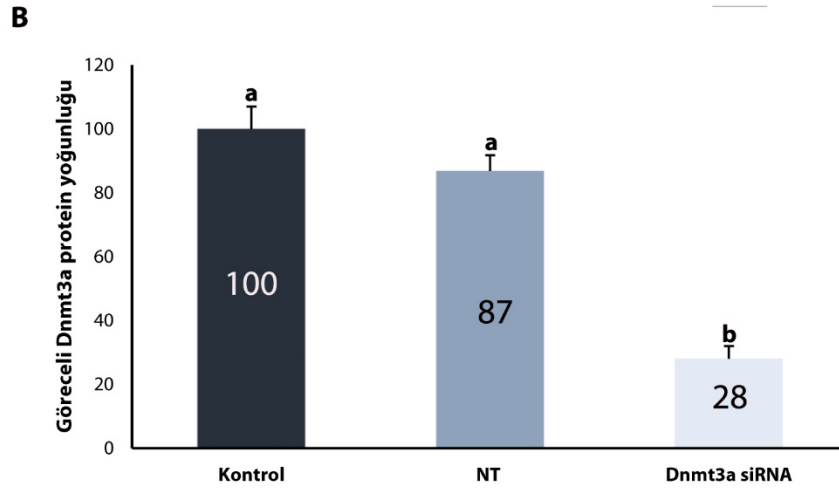
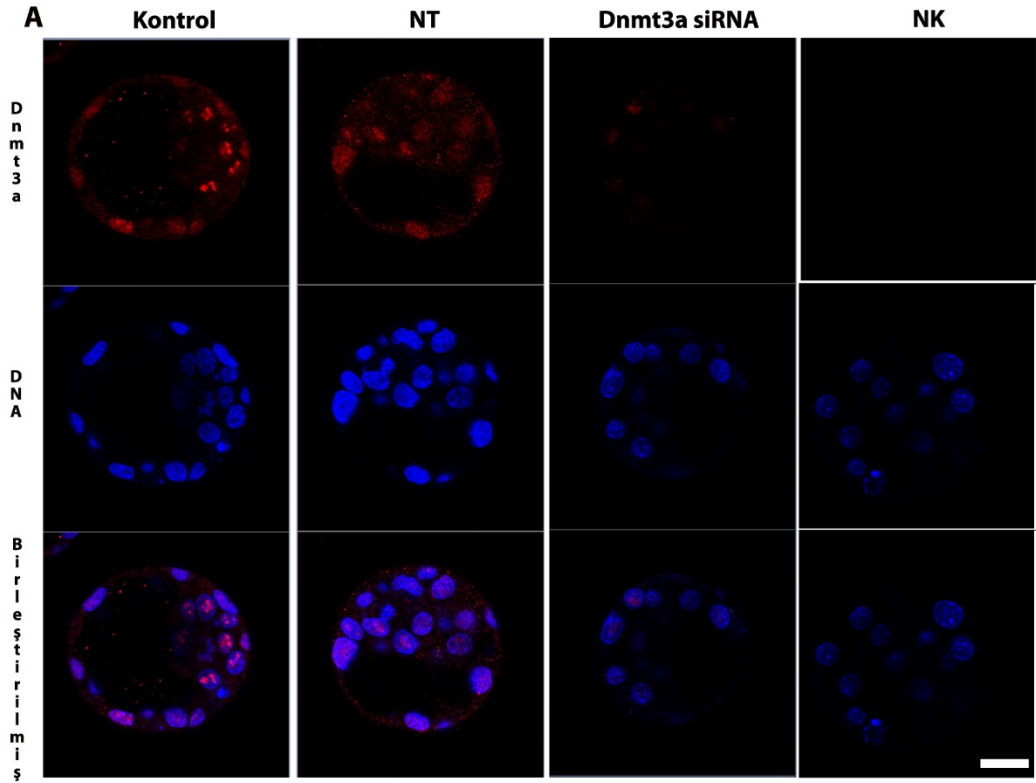
Şekil 3.5. Dnmt3a kontrol grubu. Dnmt3a sinyali trofoblastlarda sitoplazmik bulunmasının yanında çekirdekte de yerleştiği (ok başı); iç hücre kitlesinde çekirdekte büyük yuvarlaklar (kalın ok) şeklinde yerleşimde olduğu izlendi. Genel olarak sinyal şiddeti ve dağılımı iç hücre kitlesinde ve trofoektoderimde benzerdi. Dnmt3a'nın (kırmızı sinyal) immüno floresan analizlerinde z ekseninde 1 µm aralıklarla 35 kesit alındı ve 3B görüntü oluşturacak şekilde üst üste birleştirildi. Yukarıda beşer mikrometre atlayarak toplam 7 görüntü ve birleştirilmiş görüntü verilmiştir. DNA (mavi sinyal), ölçüm çubuğu=10 µm.



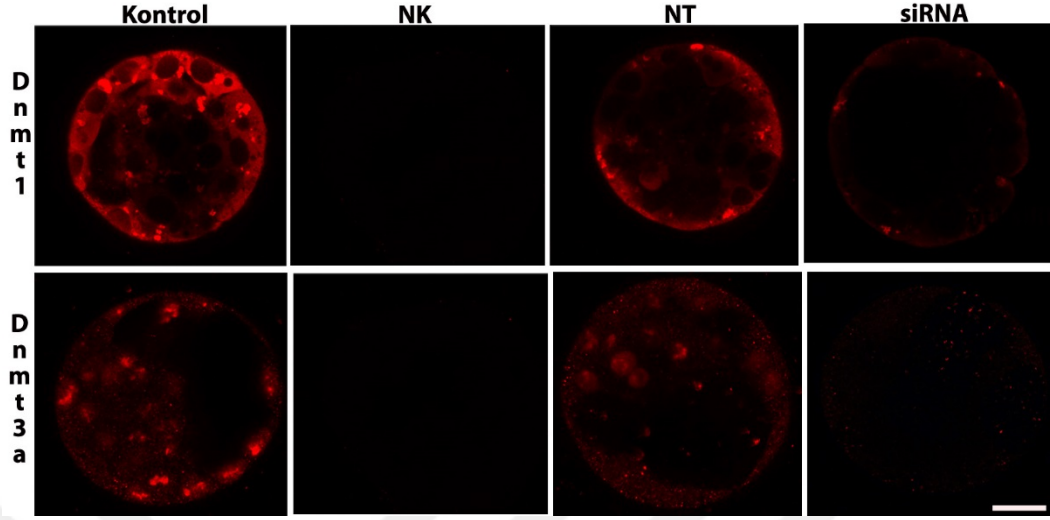
Şekil 3.5.1. Dnmt3a NT (hedef geni içermeyen siRNA) grubu. Dnmt3a sinyali gerek trofoblastlarda (ok başı); gerekse iç hücre kitlesinde (kalın ok) kontrol grubu ile aynı yerleşimde izlendi. Dnmt3a'nın (kırmızı sinyal) immünfloresan analizlerinde z ekseninde 1 µm aralıklarla 35 kesit alındı ve 3B görüntü oluşturacak şekilde üst üste birleştirildi. Yukarıda beşer mikrometre atlayarak toplam 7 görüntü ve birleştirilmiş görüntü verilmiştir. DNA (mavi sinyal), ölçüm çubuğu=10 µm.



Şekil 3.5.2. Dnmt3a siRNA grubu. Dnmt3a sinyali gerek trofoblastlarda (ok başı); gerekse iç hücre kitlesinde (kalın ok) kontrol ve NT grubu ile aynı yerleşimde izlendi. Ancak hem iç hücre kitlesinde hem de trofoektoderm tabakasında sinyal şiddetinde gözle görülür azalma izlendi. Dnmt3a'nın (kırmızı sinyal) immünfloresan analizlerinde z ekseninde 1 µm aralıklarla 35 kesit alındı ve 3B görüntü oluşturacak şekilde üst üste birleştirildi. Yukarıda beşer mikrometre atlayarak toplam 7 görüntü ve birleştirilmiş görüntü verilmiştir. DNA (mavi sinyal), ölçüm çubuğu=10 µm.



Şekil 3.5.3 Dnmt3a proteini ifadenmesi. **A.** İmmünfloresan sonuçları. **B.** Göreceli Dnmt3a proteini ifadenmesi sonuçları. *Dnmt3a* siRNA uygulanan grupta kontrol ve hedef geni içermeyen siRNA grubuna göre anlamlı azalma bulundu ($P<0,001$). NT; hedef geni içermeyen siRNA grubu, NK; negatif kontrol. Grafikte bulunan farklı harfler istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0,05$). 1 μ m aralıklarla alınan 35 optik kesitin birleştirilmesi ile elde edilen mikrograflardır.



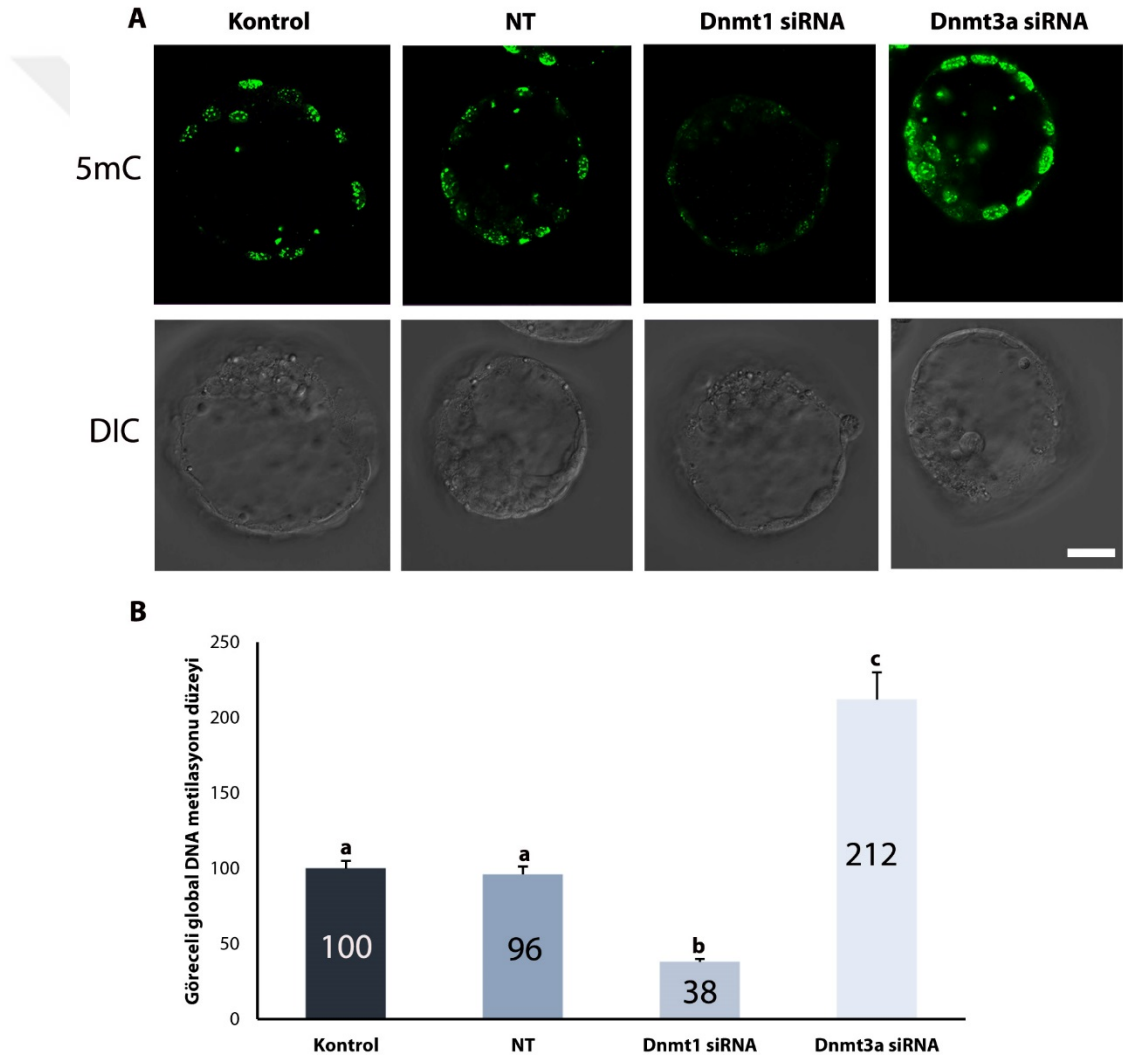
Şekil 3.5.4. Dnmt1 ve Dnmt3a özeti. Kontrol ve NT gruplarında Dnmt1 ve Dnmt3a (kırmızı sinyal) proteinleri benzerdi. Dnmt1 ve Dnmt3a siRNA gruplarında kontrol ve NT gruplarına göre anlamlı derecede azalma izlendi. NK; negatif kontrol, NT; hedef geni içermeyen siRNA grubu. Ölçüm çubuğu=10 µm.

3.2.3.3. 5-Metil Sitozin (5mC) Boyaması

Global DNA metilasyonu analizi yapmak için 5mC boyaması yapıldı. Hücre içi yerleşimleri değerlendirildiğinde ise 5mC boyası yoğun olarak sitoplazmada ve çekirdekte yerleşim gösterdi (Şekil 3.6). Trofoektordermde ve iç hücre kitlesinde yaygın boyama modeline sahip olup, yoğunluk olarak fark göstermedi. *Dnmt1* siRNA uygulanan grupta ise hem trofoektorderm hem de iç hücre kitlesinde sinyal şiddetinde belirgin azalma görüldü (Şekil 3.6). *Dnmt3a* siRNA uygulanan grupta ise hem trofoektorderm hem de iç hücre kitlesinde sinyal şiddetinde anlamlı artma gözlemlendi (Şekil 3.6). Kontrol ve hedef olmayan siRNA içeren gruplar arasında ise yerleşim açısından fark yoktu (Şekil 3.6).

Yukarıda özetlenen sinyal şiddetindeki değişimler sinyal yoğunluk ölçümüyle sayısal hale getirildi (Şekil 3.6B). *Dnmt1* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde

global DNA metilasyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak (azalmış iken ($P<0,001$), *Dnmt3a* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde ise anlamlı artış saptandı ($P<0,001$). Benzer olarak, *Dnmt1* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde global DNA metilasyonu hedef olmayan siRNA içeren gruba göre anlamlı olarak azalmış iken, *Dnmt3a* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde ise anlamlı artış analiz edilmiştir ($P<0,001$). Kontrol ve hedef olmayan siRNA içeren gruplar arasında ise anlamlı fark olmayıp, global DNA metilasyon seviyesi benzer bulundu (Şekil 3.6B).



Şekil 3.6. 5mC işaretlemesi. **A.** İmmünfloresan sonuçları. **B.** Göreceli global DNA metilasyonu düzeyi. *Dnmt1* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde global DNA metilasyonu kontrol ve hedef olmayan siRNA içeren gruba göre anlamlı olarak azalmış iken, *Dnmt3a* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde ise anlamlı artış analiz edildi ($P<0,001$). NT; hedef geni içermeyen siRNA grubu, NK; negatif kontrol. Grafikte bulunan farklı harfler istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0,05$). 1 μ m aralıklarla alınan 35 optik kesitin birleştirilmesi ile elde edilen mikrograflardır.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda fare embriyolarında *Dnmt1* ve *Dnmt3a* genlerini susturarak embriyo gelişim oranları ve global DNA metilasyon analizi yapıldı. İlk olarak bu genleri hedefleyen siRNA moleküllerini zigotları içeren kültüre ekleyerek blastokist aşamasına kadar geliştirdik. Protein düzeyindeki analizler susturma başarımızı göstermektedir. *Dnmt1* geni susturulan grupta blastokist gelişim oranı %16,7 iken, *Dnmt3a* genini susturduğumuz grupta ise blastokist gelişim oranı %29,5 idi. Kontrol ve hedef olmayan geni içeren siRNA gruplarında bu oranlar sırası ile %83,2 ve %75,4 idi. Sonuçlar göz önüne alındığında gerek *Dnmt1* gerekse *Dnmt3a* genlerinin erken dönem embriyo gelişimi için kritik olduğunu ortaya çıkardı. Hatta *Dnmt1* geninin fare preimplantasyon dönemi embriyo gelişiminde daha da gerekli olduğu sonucuna ulaşıldı. İlginç olarak, dört grupta da global DNA metilasyonu analizi yaptığımızda *Dnmt1* geni susturulan blastokistlerde global DNA metilasyon düzeyi anlamlı olarak düşerken, *Dnmt3a* geni susturulan blastokistlerde ise anlamlı olarak artış bulundu.

Dnmt1 ve *Dnmt3a* proteinlerinin yerleşimi değerlendirildiğinde, *Dnmt1* proteininin blastokist aşasında trofoblastlarda sitoplazmik ve çekirdeğin kenarında yamalar halinde olduğunu iç hücre kitlesinde ise sitoplazmada küçük noktacıklar şeklinde olduğu izlendi. Yapılmış olan birçok çalışmada, çalışmamızla uyumlu olarak *Dnmt1* proteininin blastokist aşamasında sitoplazmada yerleştiği rapor edilmiştir (Hirasawa ve ark., 2008; Howell ve ark., 2001; Uysal ve ark., 2017). *Dnmt1*'in izoformu olan *Dnmt1o* enzimi ise preimplantasyon dönemindeki embriyoların gelişim sürecinde değerlendirildiğinde zigot aşamasından blastokist aşamasına kadar 8 hücreli embriyo aşaması haricinde sitoplazmada yerleşim gösterdiği, 8 hücreli embriyo aşamasında ise çekirdekte yerleşim gösterdiği bulunmuştur. Bu aşamada çekirdekte olması ilginç bulunmakla beraber nedeni henüz net olarak aydınlatılamamıştır. *Dnmt3a* proteininin ise blastokist aşamasında trofoblastlarda sitoplazmada ve çekirdekte

iç hücre kitlesinde ise çekirdekte büyük yuvarlaklar şeklinde olduğu saptandı. Çalışmamızla uyumlu olarak literatürde ortak kanının Dnmt3a proteininin çekirdekte daha yoğun yerleştiği yönündedir (Hirasawa ve ark., 2008; Ko ve ark., 2005; Uysal ve ark., 2017; Watanabe ve ark., 2002).

Literatürde gerek bu genlerin ifadesinin tamamen ortadan kaldırıldığı gerekse farklı teknikler ve türler kullanılarak susturulduğu farklı çalışmalar bulunur. Koyunda yapılan bir çalışmada *Dnmt1* geni ovosit aşamasında susturulmuş, sonrasında *in vitro* fertilizasyon (*in vitro fertilization*; IVF) ve embriyo kültürü yapılmıştır (Taylor ve ark., 2009). Embriyoların morula aşamasında durakladığı gözlenirken, bu genin blastokist gelişimi için kritik olduğu gösterilmiştir (Taylor ve ark., 2009). Bu çalışma sonucuyla benzer olarak; *Dnmt1* geni susturulan grubumuzda blastokistin gelişiminin kontrole göre anlamlı olarak azaldığı, en fazla olarak da 2 hücreli embriyo aşamasında durakladığını bulduk. Domuzlarda yapılan çalışmada ise GV aşamasındaki ovositlerde siRNA uygulaması yapılmış ve MII aşamasında *Dnmt1* geninin anlamlı olarak azaldığı, bununla beraber mitokondriyon DNA'sının kopya sayısı ya da gelişimsel bazı genlerin MII aşamasında anlamlı olarak düştüğü görülmüştür. Bu çalışmada aynı zamanda partenogenetik aktivasyon, somatik hücre çekirdeği transferi (*somatic cell nuclear transfer*; SCNT) yapılmış ve IVF'la elde edilmiş embriyolarda siRNA uygulamasının embriyo gelişim oranlarını kontrole göre anlamlı olarak düşürdüğü bulunmuştur (Huan ve ark., 2015). Çalışmamızda benzer olarak, bu genin susturulmasıyla embriyoların gelişim oranlarının düştüğü ve dejenere embriyoların ise arttığını bulduk. Sığırlarda yapılan çalışmada ise partenogenetik, SCNT yapılmış ve IVF ile elde edilmiş embriyolarda siRNA ile *Dnmt1* geni susturulmuş ve genel olarak blastokist oranlarında azalma gözlenmiştir (Golding ve ark., 2011). Sığırdan yapılan bir başka çalışmada SCNT yapılmış embriyolara *Dnmt1* siRNA'sı uygulanmış ve farklı olarak blastokist oranında siRNA uygulanan grupta artma gözlenmiştir (Yamanaka ve ark., 2011). Bu çalışma ile benzer olarak sığırdan yapılan bir başka çalışmada SCNT yapılmış embriyolara *Dnmt1* siRNA uygulayarak, Dnmt1 protein düzeyinin düştüğü, global DNA metilasyon seviyesinin değişmediği ve blastokist gelişim oranlarının ise arttığı belirtilmiştir (Selokar ve ark., 2015). Bu çalışmadan farklı olarak bu genin susturulmasıyla global DNA metilasyonunun düştüğünü ve blastokistin gelişiminin ise azaldığını gözlemledik. Farede yapılan bir çalışmada Dnmt1s (Dnmt1'in somatik

izoformu) ovosit aşamasında susturulmuş ve sonrasında intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapıp embriyo oluşturulmuştur. Bu çalışmada paternal kaynak göz ardı edilmiştir. 8-16 hücreli embriyo aşamada *Dnmt1s* geninin susturulduğu ve sadece morula aşamasında global DNA metilasyonunun azaldığı görülmüştür (Kurihara ve ark., 2008). Çalışmamızda zigot aşamasında susturma işlemi yapılmaya başlanmış ve blastokist aşamasına kadar embriyolar kültüre edilmiştir; blastokist aşamasında ise susturulan grupta global DNA metilasyonunda anlamlı azalma gözlenmiştir. Sığırdaki yapılan bir başka çalışmada SCNT uygulanmış embriyolara *Dnmt1* siRNA'sı uygulanmış, diğer çalışmalardan farklı olarak embriyo gelişim oranları açısından fark bulunamamıştır. Ancak global DNA metilasyonu ve *Dnmt1* geni, siRNA uygulanmış grupta kontrole göre 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli ve blastokist aşamalarındaki embriyolarda anlamlı olarak azalmıştır (Zhang ve ark., 2015). Bu çalışma ile bizim çalışmamızın farkı embriyo gelişim oranlarıdır. *Dnmt1* geni susturulan gruplarda embriyo gelişim oranı olarak azalma bulduk. Benzer tarafımız ise bu genin susturulması ile global DNA metilasyonun düşmesi olmuştur. Literatürdeki farklı tür ve faredaki çalışmalarda sıklıkla kullanılan IVF, SCNT gibi tekniklerin kendi başlarına DNA metilasyonu ve DNMT'lerin ifadenmelerini değiştirdiği bilinmektedir (Uysal ve ark., 2015).

Human koryokarsinoma hücre hattında (BeWo hücre hattı) *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* genleri siRNA uygulayarak ayrı ayrı susturulduğunda E-cadherin ve plakoglobin ifadenmelerinde ve BeWo hücrelerinin göçünde bir fark gözlenmemiştir (Rahnama ve ark., 2009). Ancak *DNMT3A* ve *DNMT3B* genleri beraber susturulduklarında E-cadherin ve plakoglobin ifadenmelerinde anlamlı artış ve BeWo hücre migrasyonunda ise anlamlı azalış bulunmuştur. Çalışmamızda ise *Dnmt1* ve *Dnmt3a* genlerinin ayrı ayrı susturulduğu gruplarda blastokistin gelişim oranlarında anlamlı azalma, embriyo duraklama/dejenerasyon oranlarında ise anlamlı artma bulduk. Global DNA metilasyonu analizi yapıldığında *Dnmt1* siRNA grubunda anlamlı azalma, *Dnmt3a* siRNA grubunda ise anlamlı artma bulduk. Global DNA metilasyonunun azalması ya da artması preimplantasyon dönemindeki embriyoların gelişim sürecinde önemli olan genlerin ifadenmesini olumsuz etkileyebileceğini düşünmekteyiz. Bu durum bazı genleri hipometile yada hipermetile hale getirerek ifadenmelerini bozarak preimplantasyon embriyo gelişim sürecini olumsuz

etkileyebilir. Benzer olarak kardiyomiyositler üzerinde yapılan bir çalışmada da global DNA metilasyonu analizi yapıldığında *Dnmt1* siRNA grubunda anlamlı azalma, *Dnmt3a* siRNA grubunda ise anlamlı artma bulunmuştur (Fang ve ark., 2016). Bu genlerin tamamen işlevsiz hale getirildiği çalışmalardaysa embriyonun ölümüyle sonuçlanan bulgular mevcuttur (Uysal ve ark., 2016).

Bu tez çalışması ile *Dnmt1* ve *Dnmt3a* genlerinin embriyonun gelişimine olan katkısı gösterilmiştir. Bu genin susturulması ile embriyonun hangi aşamada durakladığı analiz edilmiştir. DNA metilasyonu analizi sonucu bu genlerin susturulmasıyla metilasyonun ne kadar etkilendiği de gözlemlenmiştir. Bilindiği üzere; DNA metilasyonu gen kontrolünü sağlayan ana şalter gibi davranmaktadır. Erken dönem embriyoların gelişimde DNA metilasyonunu katalizleyen DNMT enzimlerinin işlevine ilişkin çıkarımlarda bulunulmuştur. Bu çalışmanın sonuçları yeni büyük projelerin kapısını açıp, genom düzeyinde analizler yapılarak bu genlerin hangi genlerin transkripsiyonal aktivasyonunda / baskılanmasında rol aldığının ortaya koyulması açısından literatüre katkı sağlayacaktır. Böylece özellikle IVF’de embriyo gelişimindeki duraklamaların epigenetik açıdan değerlendirilmesi gerektiğine yönelik farklı teknik ve biyobelirteçlere katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması sırasında yapılan deneyler sonucunda elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıda özetlenmiştir:

DNA metilasyonunun birçok farklı mekanizmada kilit rol oynadığı bilinmektedir. Yaptığımız bu çalışmadaki hipotezimiz DNA metilasyonunu gerçekleştiren Dnmt1 ve Dnmt3a enzimlerinin preimplantasyon embriyo gelişim sürecinde yaşamsal rol oynadığı yönünde olup, amacımız ve hedefimiz bu enzimleri öncelikle susturmayı başarmak, embriyo gelişim sürecine olan ve global DNA metilasyonu üzerine olan etkisini göstermektir. Yaptığımız deneyler sonucunda bu genleri susturmayı başardık. Preimplantasyon dönemindeki embriyonun gelişim sürecinde ise bu enzimlerin yaşamsal önemi olduğunu saptadık. Susturulan gruplarda blastokist gelişim oranları oldukça düşüktü. Ancak ileri moleküler düzeydeki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Dnmt1 genini susturduğumuz gruplarda global DNA metilasyonu anlamlı olarak azaldı. Global DNA metilasyonunun azalması bu süreçteki hipermetile olması gereken genleri hipometile hale getirebilir. Farklı olarak Dnmt3a genini susturduğumuz gruplarda global DNA metilasyonu anlamlı olarak arttı. Global DNA metilasyonunun artması bu süreçteki hipometile olması gereken genleri hipermetile hale getirebilir. Her iki durumda istenmeyen bir mekanizma olup blastokist gelişimini etkileyebilir. Genom düzeyinde dizi analizi yapıp bu genlerin susturulması ile hangi genlerin ya da gen gruplarının etkilendiği ileri çalışmalarda gösterilmelidir. Preimplantasyon dönemindeki embriyonun gelişim sürecinde blastokist aşaması soy ayrımının gerçekleştiği oldukça önemli dönemdir. Gerek iç hücre kitlesi gerekse trofoektoderm tabakalarında kritik genler ifade edilir. Dnmt1 ve Dnmt3a genlerinin

susturulması ile her iki tabakada da sinyal şiddetinde anlamlı azalmanın görölmesi, her iki tabaka içinde kritik genlerle ilişkili olup olmadığını akla getirmiştir. Benzer şekilde bu genleri de içinde bulunduran çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmanın sonuçları yeni büyük projelerin kapısını açıp, genom düzeyinde analizler yapılarak bu genlerin hangi genlerin transkripsiyonal aktivasyonunda/baskılanmasında rol aldığının ortaya koyulması açısından literatüre katkı sağlayacaktır. Böylece özellikle IVF’de embriyo gelişimindeki duraklamaların epigenetik açıdan değerlendirilmesi gerektiğine yönelik farklı teknik ve biyobelirteçlere katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

ÖZET

Preimplantasyon Embriyo Gelişim Sürecinde Dnmt1 ve Dnmt3a Genlerinin Rollerini

Bir epigenetik mekanizma olan DNA metilasyonu, memelilerde ovogenez ve erken embriyo gelişim süreçlerinde önemli rol oynar. Ek olarak, DNA metilasyonu ovosit ve erken dönemdeki embriyonun gelişim süreçlerinde kritik rol oynayan genlerin transkripsiyonunda aktivatör veya baskılayıcı olarak rol alır. DNA metilasyonu, CpG adacıklarında ya da CpG adacığı olmayan alanlarda sitozin nükleotidinin beşinci karbon atomuna metil grubunun bağlanmasıyla gerçekleşir. Sürdürme ve de novo (yeni baştan) metilasyonu olmak üzere iki biçimde gerçekleşen bu mekanizmalar DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenir. Memelilerde altı farklı DNMT enzimi (DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C ve DNMT3L) tanımlanmıştır, DNMT1 sürdürme metilasyonundan sorumluyken DNMT3A de novo metilasyonunda görev alır. Bilindiği üzere, sürdürme ve de novo metilasyonu erken dönemdeki embriyonun gelişiminde gerçekleşir. Bu çalışmanın amacı *Dnmt1* and *Dnmt3a* genlerinin susturulmasıyla preimplantasyon dönemindeki embriyonun gelişimi üzerine olan etkisini araştırmaktır. Bu amaçla fare embriyolarının in vitro ortamda gelişimi modeli üzerinde dört grup oluşturuldu; kontrol, *Dnmt1* siRNA, *Dnmt3a* siRNA ve hedef olmayan geni içeren siRNA grubu. *Dnmt* genlerini susturmadaki başarı protein seviyesinde immünfloresan ve Western blot yöntemi yöntemiyle değerlendirildi. *Dnmt1* ve *Dnmt3a* genlerini 1 hücreli aşamada susturduktan sonra, embriyonun gelişimi kapasitesi ve global DNA metilasyonu analizi immünfloresan yöntemle blastokist aşamasında analiz edildi. Fare embriyolarında *Dnmt* genlerini başarılı olarak susturuldu. Bu genlerin preimplantasyon dönemindeki embriyolarda kritik olduğunu saptandı. İlginç olarak; *Dnmt1* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde global DNA metilasyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış ve *Dnmt3a* siRNA uygulanan gruptaki blastokistlerde ise kontrol grubuna göre anlamlı artış saptandı ($P<0,05$). Bu sonuçlar *Dnmt* genlerinin farede preimplantasyon dönemindeki embriyonun gelişimine katkı sağladığını göstermektedir ve bu genlerin insanda da önemli rol oynayıp oynamadığının araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Dnmt1, Dnmt3a, embriyo, siRNA

SUMMARY

The Roles of *Dnmt1* and *Dnmt3a* Genes During Preimplantation Embryo Development

DNA methylation is one of the epigenetic mechanisms and plays important roles during oogenesis and early embryo development in mammals. In addition, DNA methylation have important roles on transcriptional repression or activation of genes which critical during early oocyte and embryo development. DNA methylation is basically known as adding a methyl group to the fifth carbon atom of cytosine residues within cytosine-phosphate-guanine (CpG) and non-CpG dinucleotide sites. This mechanism is composed of two main processes: de novo methylation and maintenance methylation, both of which are catalyzed by specific DNA methyltransferase (DNMT) enzymes. To date, six different DNMT enzyme have been characterized in mammals defined as DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C, and DNMT3L. While DNMT1 primarily functions in maintenance methylation, DNMT3A is essentially responsible for de novo methylation. As it is previously shown, either maintenance or de novo methylation processes appears in early embryo development. The aim of the present study was to investigate the role of *Dnmt1* and *Dnmt3a* genes in preimplantation embryo development by knocking down *Dnmt1* and *Dnmt3a* genes. For this purpose, the following groups were created in an in vitro mouse embryo model: control, *Dnmt1* siRNA, *Dnmt3a* siRNA and non-targeted siRNA groups. Knockdown of *Dnmt* genes using siRNA was confirmed by analyzing the proteins using immunofluorescence and Western blot techniques. Following knockdown of *Dnmt1* and *Dnmt3a* in one-cell mouse embryos, we analyzed the developmental competence of embryos and global DNA methylation levels by immunofluorescence in blastocyst stage. We found that both *Dnmt* genes were successfully knockeddown in mouse embryos and found out that these genes play critical roles in mouse preimplantation embryo development. Interestingly, we found that global DNA methylation level significantly decreased in *Dnmt1* knockdown group while increased in *Dnmt3a* knockdown group ($P < 0.05$). These results suggested that *Dnmt* genes could contribute to the mouse preimplantation embryo development; therefore, there is a need to study whether they also a play role in the human preimplantation embryos.

Keywords: *Dnmt1*, *Dnmt3a*, embryo, siRNA

KAYNAKLAR

- ARAND J, D SPIELER, T KARIUS, M R BRANCO, D MEILINGER, A MEISSNER, T JENUWEIN, G XU, H LEONHARDT, V WOLFJ WALTER (2012). In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genet*, **8**: **6**: e1002750.
- ARAUJO F D, S CROTEAU, A D SLACK, S MILUTINOVIC, P BIGEY, G B PRICE, M ZANNIS-HADJOPOULOS SZYF (2001). The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus. *J Biol Chem*, **276**: **10**: 6930-6936.
- ASSOU S, I BOUMELA, D HAOUZI, C MONZO, H DECHAUD, I J KADOCHS HAMAMAH (2012). Transcriptome analysis during human trophoctoderm specification suggests new roles of metabolic and epigenetic genes. *PLoS One*, **7**: **6**: e39306.
- BAI Q, S ASSOU, D HAOUZI, J M RAMIREZ, C MONZO, F BECKER, S GERBAL-CHALOIN, S HAMAMAHJ DE VOS (2012). Dissecting the first transcriptional divergence during human embryonic development. *Stem Cell Rev Rep*, **8**: **1**: 150-162.
- BARAU J, A TEISSANDIER, N ZAMUDIO, S ROY, V NALESSO, Y HERAULT, F GUILLOUD BOURC'HIS (2016). The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*, **354**: **6314**: 909-912.
- BESTOR T H (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, **9**: **16**: 2395-2402.
- BOLTON V N, P J OADESM H JOHNSON (1984). The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol*, **79**: 139-163.
- BOURC'HIS DT H BESTOR (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, **431**: **7004**: 96-99.
- BOURC'HIS D, G L XU, C S LIN, B BOLLMANT H BESTOR (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, **294**: **5551**: 2536-2539.
- BRAUDE P, V BOLTONS MOORE (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, **332**: **6163**: 459-461.
- CARDOSO M CH LEONHARDT (1999). DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. *J Cell Biol*, **147**: **1**: 25-32.
- CARLSON L L, A W PAGET H BESTOR (1992). Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes Dev*, **6**: **12B**: 2536-2541.
- CARROLL C N A M (2015). Sperm DNA Methylation, Infertility and Transgenerational Epigenetics. *Journal of Human Genetics & Clinical Embryology*.

- CELIKKAN F T, C MUNGAN, M SUCU, F UYSAL, S KAHVECI HAYME, S HAYME, N KUSCU, S OZKAVUKCU, C CELIK-OZENCIA CAN (2020). PFA is superior to glyoxal in preserving oocyte, embryo, and stem cell proteins evidenced by super-resolution microscopical surveys of epitopes. *J Assist Reprod Genet*, **37: 2**: 369-384.
- CHEN Y Z A T (2019). DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. *Genes*.
- CHUANG L S, H I IAN, T W KOH, H H NG, G XUB F LI (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*, **277: 5334**: 1996-2000.
- DAVIES T JR L GARDNER (2002). The plane of first cleavage is not related to the distribution of sperm components in the mouse. *Hum Reprod*, **17: 9**: 2368-2379.
- DILLIN A (2003). The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100: 11**: 6289-6291.
- EASWARAN H P, L SCHERMELLEH, H LEONHARDT M C CARDOSO (2004). Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO Rep*, **5: 12**: 1181-1186.
- EHRlich M (2003). Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem*, **88: 5**: 899-910.
- FANG X, R R POULSEN, J WANG-HU, O SHI, N S CALVO, C S SIMMONS, S A RIVKEESC C WENDLER (2016). Knockdown of DNA methyltransferase 3a alters gene expression and inhibits function of embryonic cardiomyocytes. *FASEB J*, **30: 9**: 3238-3255.
- FEINBERG A P (2000). DNA methylation, genomic imprinting and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*, **249**: 87-99.
- FEINBERG A P, H CUIR OHLSSON (2002). DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol*, **12: 5**: 389-398.
- FIRE A, S XU, M K MONTGOMERY, S A KOSTAS, S E DRIVER C MELLO (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391: 6669**: 806-811.
- FLEMING T P (1987). A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol*, **119: 2**: 520-531.
- FLEMING T PS J PICKERING (1985). Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *J Embryol Exp Morphol*, **89**: 175-208.
- FUKS F, W A BURGERS, A BREHM, L HUGHES-DAVIES T KOUZARIDES (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*, **24: 1**: 88-91.
- FULKA H, M MRAZEK, O TEPLAJ FULKA, JR. (2004). DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction*, **128: 6**: 703-708.

- GALAN A, D MONTANER, M E POO, D VALBUENA, V RUIZ, C AGUILAR, J DOPAZOC SIMON (2010). Functional genomics of 5- to 8-cell stage human embryos by blastomere single-cell cDNA analysis. *PLoS One*, **5: 10**: e13615.
- GEIMAN T M, U T SANKPAL, A K ROBERTSON, Y CHEN, M MAZUMDAR, J T HEALE, J A SCHMIESING, W KIM, K YOKOMORI, Y ZHAOK D ROBERTSON (2004). Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery. *Nucleic Acids Res*, **32: 9**: 2716-2729.
- GEUNS E, M DE RYCKE, A VAN STEIRTEGHEMI LIEBAERS (2003). Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum Mol Genet*, **12: 22**: 2873-2879.
- GEWIRTZ A M (2007). On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *J Clin Invest*, **117: 12**: 3612-3614.
- GOLDING M CM E WESTHUSIN (2003). Analysis of DNA (cytosine 5) methyltransferase mRNA sequence and expression in bovine preimplantation embryos, fetal and adult tissues. *Gene Expr Patterns*, **3: 5**: 551-558.
- GOLDING M C, G L WILLIAMSON, T K STROUD, M E WESTHUSIN R LONG (2011). Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Mol Reprod Dev*, **78: 5**: 306-317.
- GOLL M G, F KIRPEKAR, K A MAGGERT, J A YODER, C L HSIEH, X ZHANG, K G GOLIC, S E JACOBSENT H BESTOR (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, **311: 5759**: 395-398.
- GOWHER H, K LIEBERT, A HERMANN, G XUA JELTSCH (2005). Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem*, **280: 14**: 13341-13348.
- GRAYSON D RA GUIDOTTI (2013). The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*, **38: 1**: 138-166.
- GUENATRI M, R DUFFIE, J IRANZO, P FAUQUED BOURC'HIS (2013). Plasticity in Dnmt3L-dependent and -independent modes of de novo methylation in the developing mouse embryo. *Development*, **140: 3**: 562-572.
- HANNA C W, H DEMONDG KELSEY (2018). Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Hum Reprod Update*, **24: 5**: 556-576.
- HATA K, M OKANO, H LEIE LI (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, **129: 8**: 1983-1993.
- HATTORI N, K NISHINO, Y G KO, N HATTORI, J OHGANE, S TANAKAK SHIOTA (2004). Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem*, **279: 17**: 17063-17069.
- HERMANN A, R GOYALA JELTSCH (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem*, **279: 46**: 48350-48359.

- HIRASAWA R, H CHIBA, M KANEDA, S TAJIMA, E LI, R JAENISCHH SASAKI (2008). Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev*, **22: 12**: 1607-1616.
- HIRASAWA RH SASAKI (2009). Dynamic transition of Dnmt3b expression in mouse pre- and early post-implantation embryos. *Gene Expr Patterns*, **9: 1**: 27-30.
- HOWELL C Y, T H BESTOR, F DING, K E LATHAM, C MERTINEIT, J M TRASLERJ R CHAILLET (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, **104: 6**: 829-838.
- HUAN Y, B XIE, S LIU, Q KONGZ LIU (2015). A novel role for DNA methyltransferase 1 in regulating oocyte cytoplasmic maturation in pigs. *PLoS One*, **10: 5**: e0127512.
- HUNTRISS J, M HINKINS, B OLIVER, S E HARRIS, J C BEAZLEY, A J RUTHERFORD, R G GOSDEN, S E LANZENDORFH M PICTON (2004). Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev*, **67: 3**: 323-336.
- JOHNSON M HJ M MCCONNELL (2004). Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, **15: 5**: 583-597.
- JOHNSON M HC A ZIOMEK (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*, **24: 1**: 71-80.
- KATO Y, M KANEDA, K HATA, K KUMAKI, M HISANO, Y KOHARA, M OKANO, E LI, M NOZAKIH SASAKI (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet*, **16: 19**: 2272-2280.
- KO Y G, K NISHINO, N HATTORI, Y ARAI, S TANAKAK SHIOTA (2005). Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem*, **280: 10**: 9627-9634.
- KUMAR S, X CHENG, S KLIMASAUSKAS, S MI, J POSFAL, R J ROBERTSG G WILSON (1994). The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, **22: 1**: 1-10.
- KURIHARA Y, Y KAWAMURA, Y UCHIJIMA, T AMAMO, H KOBAYASHI, T ASANOH KURIHARA (2008). Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Dev Biol*, **313: 1**: 335-346.
- KURRECK J (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*, **270: 8**: 1628-1644.
- KUSCU N, N E GUNGOR-ORDUERI, B SOZEN, D ADIGUZELC CELIK-OZENCI (2019). FoxO transcription factors 1 regulate mouse preimplantation embryo development. *J Assist Reprod Genet*, **36: 10**: 2121-2133.
- LAGE H (2005). Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer. *Future Oncol*, **1: 1**: 103-113.
- LEES-MURDOCK D J, T C SHOVLIN, T GARDINER, M DE FELICIC P WALSH (2005). DNA methyltransferase expression in the mouse germ line during periods of de novo methylation. *Dev Dyn*, **232: 4**: 992-1002.

- LI J Y, M T PU, R HIRASAWA, B Z LI, Y N HUANG, R ZENG, N H JING, T CHEN, E LI, H SASAKI G L XU (2007). Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Mol Cell Biol*, **27**: **24**: 8748-8759.
- LODDE V, S C MODINA, F FRANCIOSI, E ZUCCARI, I TESSAROA M LUCIANO (2009). Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow. *Eur J Histochem*, **53**: **4**: e24.
- LUCIFERO D, S LA SALLE, D BOURC'HIS, J MARTEL, T H BESTORJ M TRASLER (2007). Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. *BMC Dev Biol*, **7**: 36.
- MARIKAWA YV B ALARCON (2009). Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev*, **76**: **11**: 1019-1032.
- MARIKAWA YV B ALARCON (2012). Creation of trophectoderm, the first epithelium, in mouse preimplantation development. *Results Probl Cell Differ*, **55**: 165-184.
- MIHAJLOVIC A IA W BRUCE (2017). The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity. *Open Biol*, **7**: **11**.
- MINIOU P, M JEANPIERRE, D BOURC'HIS, A C COUTINHO BARBOSA, V BLANQUETE VIEGAS-PEQUIGNOT (1997). alpha-satellite DNA methylation in normal individuals and in ICF patients: heterogeneous methylation of constitutive heterochromatin in adult and fetal tissues. *Hum Genet*, **99**: **6**: 738-745.
- MORGAN H D, F SANTOS, K GREEN, W DEANW REIK (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, **14 Spec No 1**: R47-58.
- O'MEARA C M, J D MURRAY, S MAMO, E GALLAGHER, J ROCHEP LONERGAN (2011). Gene silencing in bovine zygotes: siRNA transfection versus microinjection. *Reprod Fertil Dev*, **23**: **4**: 534-543.
- OKANO M, D W BELL, D A HABERE LI (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**: **3**: 247-257.
- OKANO M, S XIEE LI (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, **19**: **3**: 219-220.
- OSTLER K R, E M DAVIS, S L PAYNE, B B GOSALIA, J EXPOSITO-CESPEDES, M M LE BEAUL A GODLEY (2007). Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins. *Oncogene*, **26**: **38**: 5553-5563.
- PETRUSSA L, H VAN DE VELDEM DE RYCKE (2014). Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod*, **20**: **9**: 861-874.
- PIKO LK B CLEGG (1982). Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol*, **89**: **2**: 362-378.
- PLUSA B, K PIOTROWSKAM ZERNICKA-GOETZ (2002). Sperm entry position provides a surface marker for the first cleavage plane of the mouse zygote. *Genesis*, **32**: **3**: 193-198.

- POSFAI J, A S BHAGWAT, G POSFAIR J ROBERTS (1989). Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, **17**: 7: 2421-2435.
- PRADHAN S, A BACOLLA, R D WELLSR J ROBERTS (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*, **274**: 46: 33002-33010.
- RAHNAMA F, B THOMPSON, M STEINER, F SHAFIEI, P E LOBIEM D MITCHELL (2009). Epigenetic regulation of E-cadherin controls endometrial receptivity. *Endocrinology*, **150**: 3: 1466-1472.
- RATNAM S, C MERTINEIT, F DING, C Y HOWELL, H J CLARKE, T H BESTOR, J R CHAILLETJ M TRASLER (2002). Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol*, **245**: 2: 304-314.
- REIK WW DEAN (2001). DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis*, **22**: 14: 2838-2843.
- ROBERTSON A K, T M GEIMAN, U T SANKPAL, G L HAGERK D ROBERTSON (2004). Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**: 1: 110-118.
- ROBERTSON K D, S AIT-SI-ALI, T YOKOCHI, P A WADE, P L JONESA P WOLFFE (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, **25**: 3: 338-342.
- ROUNTREE M R, K E BACHMANS B BAYLIN (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, **25**: 3: 269-277.
- SAITOU M, S KAGIWADAK KURIMOTO (2012). Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, **139**: 1: 15-31.
- SELOKAR N L, M SAINI, H AGRAWAL, P PALTA, M S CHAUHAN, R MANIKS K SINGLA (2015). Downregulation of DNA methyltransferase 1 in zona-free cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos by small interfering RNA improves in vitro development but does not alter DNA methylation level. *Cell Reprogram*, **17**: 2: 89-94.
- SHIRANE K, H TOH, H KOBAYASHI, F MIURA, H CHIBA, T ITO, T KONO H SASAKI (2013). Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet*, **9**: 4: e1003439.
- SOZEN B, A CANN DEMIR (2014). Cell fate regulation during preimplantation development: a view of adhesion-linked molecular interactions. *Dev Biol*, **395**: 1: 73-83.
- SUETAKE I, F SHINOZAKI, J MIYAGAWA, H TAKESHIMAS TAJIMA (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem*, **279**: 26: 27816-27823.
- SUWINSKA A, R CZOŁOWSKA, W OZDZENSIA K TARKOWSKI (2008). Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol*, **322**: 1: 133-144.

- TADROS WH D LIPSHITZ (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, **136: 18**: 3033-3042.
- TAKESHITA FT OCHIYA (2006). Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci*, **97: 8**: 689-696.
- TAYLOR J, H MOORE, N BEAUJEAN, J GARDNER, I WILMUT, R MEEHANL YOUNG (2009). Cloning and expression of sheep DNA methyltransferase 1 and its development-specific isoform. *Mol Reprod Dev*, **76: 5**: 501-513.
- TRASLER J M, A A ALCIVAR, L E HAKE, T BESTORN B HECHT (1992). DNA methyltransferase is developmentally expressed in replicating and non-replicating male germ cells. *Nucleic Acids Res*, **20: 10**: 2541-2545.
- TUREK-PLEWA JP P JAGODZINSKI (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett*, **10: 4**: 631-647.
- UYSAL F, G AKKOYUNLUS OZTURK (2015). Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie*, **116**: 103-113.
- UYSAL F, G AKKOYUNLUS OZTURK (2016). DNA methyltransferases exhibit dynamic expression during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*, **33: 6**: 690-702.
- UYSAL F, S OZTURKG AKKOYUNLU (2017). DNMT1, DNMT3A and DNMT3B proteins are differently expressed in mouse oocytes and early embryos. *J Mol Histol*, **48: 5-6**: 417-426.
- VASSENA R, S BOUE, E GONZALEZ-ROCA, B ARAN, H AUER, A VEIGAJ C IZPISUA BELMONTE (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*, **138: 17**: 3699-3709.
- VLACHOGIANNIS G, C E NIEDERHUTH, S TUNA, A STATHOPOULOU, K VIIRI, D G DE ROOIJ, R G JENNER, R J SCHMITZS K T OOI (2015). The Dnmt3L ADD Domain Controls Cytosine Methylation Establishment during Spermatogenesis. *Cell Rep*, **11: 6**: 990.
- WATANABE D, I SUETAKE, T TADAS TAJIMA (2002). Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev*, **118: 1-2**: 187-190.
- YAMANAKA K, M SAKATANI, K KUBOTA, A Z BALBOULA, K SAWAIM TAKAHASHI (2011). Effects of downregulating DNA methyltransferase 1 transcript by RNA interference on DNA methylation status of the satellite I region and in vitro development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J Reprod Dev*, **57: 3**: 393-402.
- YODER J A, N S SOMAN, G L VERDINET H BESTOR (1997). DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol*, **270: 3**: 385-395.
- ZHANG H, L WANG, W LI, Q MAO, Y WANG, Q LI, S HUAY ZHANG (2015). A simple and efficient method to transfect small interference RNA into bovine SCNT embryos. *Theriogenology*, **84: 6**: 846-852.

EKLER

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 17/04/2019
TOPLANTI NO : 2019-9
DOSYA NO : 2019-62
KARAR NO : 2019-9-93

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Alp CAN'ın yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Özgür ÇINAR ve Fatma UYSAL ALAOĞLU'nun katıldığı "Preimplantasyon Dönemindeki Embriyoların Gelişim Sürecinde Dnmt1 ve Dnmt3a Genlerinin Rollerini" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 250 (240 Dişi+10 Erkek)
Geçerlilik Süresi : 19/07/2019-19/01/2021

ASLININ AYNIDIR
17/04/2019

Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Fatma

Soyadı : Uysal

Doğum yeri ve tarihi :

Uyruğu : TC

İletişim adresi ve telefon :

II- Eğitimi

02 Eylül 2008 - 28 Haziran 2012

Lisans, SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.33 / 4.0

12 Kasım 2010 - 29 Temmuz 2013

Ön Lisans, ANADOLU ÜNİVERSİTESİ, AÇIKÖĞRETİM FAKÜLTESİ

SAĞLIK KURUMLARI İŞLETMECİLİĞİ

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.54 / 4.0

01 Şubat 2013 - 01 Ocak 2016

Yüksek Lisans, Tezli Program, AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ, SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ (ÜREME BİYOLOJİSİ) (YL) (TEZLİ)

Tez Başlığı: Süperovulasyon uygulamasının DNA metiltransferaz genlerinin ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılması

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.69 / 4.0

Yabancı dili: İngilizce (YÖKDİL-81.25)

SCI ve SCI-expanded dergilerdeki toplam yayın sayısı	19
Uluslararası kitap bölümü	1
Atıflar	258
h-endeksi	7

Uluslararası yayınlar

F. UYSAL, E. G. KOSEBENT, H. S. TORU & S. OZTURK, Decreased expression of TERT and telomeric proteins as human ovaries age may cause telomere shortening, JOURNAL OF ASSISTED REPRODUCTION AND GENETICS, 2020, 1058-0468.

F. T. CELIKKAN, C. MUNGAN, M. SUCU, **F. UYSAL**, S. K. HAYME, S. HAYME, N. KUSCU, S. OZKAVUKCU, C. CELIK-OZENCI & A. CAN, PFA is superior to glyoxal in preserving oocyte, embryo, and stem cell proteins evidenced by super-resolution microscopical surveys of epitopes, JOURNAL OF ASSISTED REPRODUCTION AND GENETICS, 2020, 1058-0468, 37, 2, 369-384.

E. G. KOSEBENT, **F. UYSAL** & S. OZTURK, The altered expression of telomerase components and telomere-linked proteins may associate with ovarian aging in mouse, EXPERIMENTAL GERONTOLOGY, 2020, 0531-5565, 138.

F. UYSAL & S. OZTURK, The loss of global DNA methylation due to decreased DNMT expression in the postnatal mouse ovaries may associate with infertility emerging during ovarian aging, HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, 2020, 0948-6143.

F. UYSAL, G. AKKOYUNLU & S. OZTURK, Decreased expression of DNA methyltransferases in the testes of patients with non-obstructive azoospermia leads to changes in global DNA methylation levels, REPRODUCTION FERTILITY AND DEVELOPMENT, 2019, 1031-3613, 31, 8, 1386-1394.

F. UYSAL & S. OZTURK, Embryonic poly(A)-binding protein is differently expressed and interacts with the messenger RNAs in the mouse oocytes and early

embryos, JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, 2019, 0730-2312, 120, 3, 4694-4709.

M. BULBUL, O. SINEN, V. N. IZGUT-UYSAL, G. AKKOYUNLU, S. OZTURK & **F. UYSAL**, Peripheral apelin mediates stress-induced alterations in gastrointestinal motor functions depending on the nutritional status, CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY, 2019, 1440-1681, 46, 1, 29-39.

F. TEPEKOY, **F. UYSAL**, N. ACAR, I. USTUNEL & G. AKKOYUNLU, The effect of GnRH antagonist cetrorelix on Wnt signaling members in pubertal and adult mouse ovaries, HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, 2019, 0948-6143.

S. ÖZTÜRK & **F. UYSAL**, Potential roles of the poly(A)-binding proteins in translational regulation during spermatogenesis, JOURNAL OF REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, 2018, 0916-8818, 64(4), 289-296, 8.

F. UYSAL, S. OZTURK & G. AKKOYUNLU, Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos, JOURNAL OF ASSISTED REPRODUCTION AND GENETICS, 2018, 1058-0468, 35, 3, 503-513.

E. G. KÖSEBENT, **F. UYSAL** & S. ÖZTÜRK, Telomere length and telomerase activity during folliculogenesis in mammals, JOURNAL OF REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, 2018, 0916-8818, 64(6), 477-784, 8.

F. UYSAL & S. OZTURK, DNA Methyltransferases in Mammalian Oocytes, OOCYTES: MATERNAL INFORMATION AND FUNCTIONS, 2017, 0080-1844, 63, 211-222.

F. UYSAL, S. OZTURK & G. AKKOYUNLU, DNMT1, DNMT3A and DNMT3B proteins are differently expressed in mouse oocytes and early embryos, JOURNAL OF MOLECULAR HISTOLOGY, 2017, 1567-2379, 48, 5-6, 417-426.

E. HIDISOGLU, D. K. GOK, H. ER, D. AKPINAR, **F. UYSAL**, G. AKKOYUNLU, S. OZEN, A. AGAR & P. YARGICOGLU, 2100-MHz electromagnetic fields have

different effects on visual evoked potentials and oxidant/antioxidant status depending on exposure duration, BRAIN RESEARCH, 2016, 0006-8993, 1635, 1-11.

F. UYSAL, G. AKKOYUNLU & S. ÖZTÜRK, DNA methyltransferases exhibit dynamic expression during spermatogenesis, REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE, 2016, 1472-6483, 33 (6), 690-702, 13.

S. ÖZTÜRK & **F. UYSAL**, Poly(A)-binding proteins are required for translational regulation in vertebrate oocytes and early embryos, REPRODUCTION FERTILITY AND DEVELOPMENT, 2016, 1031-3613, 29 (10), 1890-1901, 12.

S. OZTURK, B. SOZEN, **F. UYSAL**, I. C. BASSORGUN, M. F. USTA, G. AKKOYUNLU & N. DEMIR, The poly(A)-binding protein genes, EPAB, PABPC1, and PABPC3 are differentially expressed in infertile men with non-obstructive azoospermia, JOURNAL OF ASSISTED REPRODUCTION AND GENETICS, 2016, 1058-0468, 33, 3, 335-348.

F. UYSAL, G. AKKOYUNLU & S. ÖZTÜRK, Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos, BIOCHIMIE, 2015, 0300-9084, 116, 103-13, 39.

G. AKKOYUNLU, F. TEPEKOY, A. BEBIS & **F. UYSAL**, Bilateral total ovarian hypoplasia in a Holstein Friesian heifer, ACTA HISTOCHEMICA, 2014, 0065-1281, 116, 8, 1519-1521.

Bildiriler

F. UYSAL & S. ÖZTÜRK, DNMT3L GENİNİN POSTNATAL FARE OVARYUM DOKULARINDAKİ EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ, Poster Sunumu, TSRM 2018- Ulusal Üreme Sağlığı ve Infertilite Kongresi, 08 Kasım 2018, 11 Kasım 2018.

F. UYSAL & S. ÖZTÜRK, OVARYAN YASLANMA SÜRECİNDE DNA METİLASYONU VE DNMT GENLERİNİN EKSPRESYONU DEĞİŞİM GÖSTERİR, Sözlü Sunum, TSRM

2018 - Ulusal Üreme Sağlığı ve Infertilite Kongresi, 08 Kasım 2018, 11 Kasım 2018.

E. G. KÖSEBENT, F. UYSAL & S. ÖZTÜRK, POSTNATAL FARE OVARYUM DOKULARINDA TELOMERAZ, TRF1, TRF2, POT1 GENLERİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ, Sözlü Sunum, TSRM 2018 - Ulusal Üreme Sağlığı ve Infertilite Kongresi, 08 Kasım 2018, 11 Kasım 2018.

F. UYSAL & S. ÖZTÜRK, Embriyonik poli(A)-baglanma proteini (EPAB), fare oosit ve erken dönem embriyolarda farklı düzeylerde eksprese edilir ve belirli mRNA'lar ile ilişki kurar, Sözlü Sunum, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi , 10 Mayıs 2018, 13 Mayıs 2018.

F. UYSAL, G. AKKOYUNLU & S. ÖZTÜRK, Non-obstrüktif azospermi tanılı hasta testis dokularında DNA metiltransferaz protein ekspresyonu ve global DNA metilasyon düzeyinin belirlenmesi, Poster Sunumu, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10 Mayıs 2018, 13 Mayıs 2018.

E. G. KÖSEBENT, F. UYSAL & S. ÖZTÜRK, Postnatal fare ovaryum dokularında telomeraz, Trf1 ve Trf2 genlerinin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, Sözlü Sunum, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10 Mayıs 2018, 13 Mayıs 2018.

F. UYSAL & S. ÖZTÜRK, Producing a Polyclonal Antibody Specific to Embryonic Poly(A)-binding Protein (EPAB) and characterizing EPAB protein expression in mouse somatic tissues, oocytes and early embryos, Poster Sunumu, ESHRE, 02 Temmuz 2017, 05 Temmuz 2017.

F. UYSAL & S. ÖZTÜRK, Embriyonik Poli(A)-Baglanma Proteinine Özgü Poliklonal Antikor Üretimi, Sözlü Sunum, Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan 2016, 03 Mayıs 2016.

F. UYSAL, S. ÖZTÜRK & G. AKKOYUNLU, Fare oosit ve preimplantasyon dönem embriyolarda DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin göreceli ekspresyon düzeyleri ile hücre içi yerleşimlerinin belirlenmesi, Poster Sunumu, Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan 2016, 03 Mayıs 2016.

F. UYSAL, G. AKKOYUNLU & S. ÖZTÜRK, Non-obstrüktif Azospermi Tanılı Erkek Hastalarda DNMT3A ve DNMT3B Proteinlerinin Ekspresyon Düzeylerinin

Belirlenmesi, Poster Sunumu, Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan 2016, 03 Mayıs 2016.

S. ÇELİK, F. UYSAL, F. TOPAL ÇELİKKAN, I. S. ÖZKAVUKCU, G. AKKOYUNLU & Ç. ÇELİK ÖZENCI, Yavas dondurma tekniği şçan ovaryumlarında DNA metiltransferaz proteinlerinin ekspresyonların degistirir, Poster Sunumu, Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan 2016, 03 Mayıs 2016.

F. UYSAL, S. ÖZTÜRK & G. AKKOYUNLU, Süperovulasyon, Fare Oosit ve Erken Dönem Embriyolardaki DNA Metiltransferaz (DNMT) Proteinlerinin Ekspresyonların Degistirir, Poster Sunumu, V. Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Derneği Kongresi, 28 Ekim 2015, 31 Ekim 2015.

F. UYSAL, B. SÖZEN, S. ÖZTÜRK, C. I. BASSORGUN, M. F. USTA, G. AKKOYUNLU & N. DEMİR, Infertil erkek testis dokularında PABPC1 ve PABPC3 proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi, Sözlü Sunum, National Histology And Embryology Congress, 27 Mayıs 2014, 30 Mayıs 2014.

S. ÖZTÜRK, B. SÖZEN, F. UYSAL, C. I. BASSORGUN, M. F. USTA & N. DEMİR, Infertil

erkek testis dokularında ePABP, PABPC1 ve PABPC3 genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi, Poster Sunumu, National Histology And Embryology Congress, 27 Mayıs 2014, 30 Mayıs 2014.

F. TEPEKÖY, F. UYSAL & G. AKKOYUNLU, Identification of Wnt signaling pathway components in bovine cumulus-oocyte complexes, Tam Metin Bildiri, The EMBO Workshop, 12 Haziran 2013, 15 Haziran 2013.

G. AKKOYUNLU, F. TEPEKÖY, F. UYSAL, Localization of WNT glycoproteins are varied through gonadotrophin dependence of postnatal mouse ovaries, Tam Metin Bildiri, The EMBO Workshop, 12 Haziran 2013, 15 Haziran 2013.

F. TEPEKÖY, F. UYSAL & G. AKKOYUNLU, DOĞUM SONRASI DÖNEMİN FARKLI EVRELERİNDEKİ FARE OVARYUMLARINDA WNT GLIKOPROTEİNLERİNİN YERLEŞİMLERİ , Poster Sunumu, 21. ULUSAL ELEKTRON MIKROSKOPI KONGRESİ (ULUSLARARASI KATILIMLI) , 28 Mayıs 2013, 31 Mayıs 2013.

G. AKKOYUNLU, S. OZER, F. TEPEKÖY & F. UYSAL, HIPOKSI MODELİ UYGULANAN SIÇANLARDA CONNEXIN 43 ve ZONA PELLUCIDA 1?IN OVARYUMDAKI LOKALİZASYONU, Poster Sunumu, 21. ULUSAL ELEKTRON MIKROSKOPI KONGRESİ (ULUSLARARASI KATILIMLI) , 28 Mayıs 2013, 31 Mayıs 2013.

Kitap bölümü

F. UYSAL & S. OZTURK, DNA Methyltransferases in Mammalian Oocytes, OOCYTES: MATERNAL INFORMATION AND FUNCTIONS. 2017.

Görev aldığı bilimsel projeler

TUBİTAK-1001 (112S169) İnsan Testis Dokusunda Epab ve Pabpc1 Transkriptlerinin Hücresel Yerleşimleri ve Spermatogenik Hücrelerdeki Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi. Burslu. Sonuçlandı.

TUBİTAK-1001 (213S015) Fare Oosit ve Erken Dönem Preimplantasyon Embriolarında ePABP ilişkili mRNA'ların Belirlenmesi. Burslu. Sonuçlandı.

TUBİTAK- 1001 (117S258) Gelişimin Farklı Yaşlarındaki İnsan Ve Fare Ovaryum Dokularında Ve İzole Edilen Foliküllerde Telomeraz Ekspresyonu Ve Telomer Uzunluğunun Belirlenmesi. Burslu. Sonuçlandı.

TUBİTAK- 1002 (120S175) Oosit/embriyo kültür medyumları farklılıklarının DNA metilasyonunu düzenleyici enzimler ve DNA metilasyonu üzerine etkisi. Bursiyer, Devam Ediyor.

BAP Araştırma Projesi (2012.01.0103.003) Fare ovaryumunda Wnt sinyal yolağı elemanlarının gonadotropinler ve gelişim faktörleri ile etkileşimi. Araştırmacı. Sonuçlandı.

BAP Araştırma Projesi (TSA-2017-2775) DNA metiltransferaz genlerinin postnatal fare ovaryum dokularındaki ekspresyonlarının belirlenmesi. Araştırmacı. Sonuçlandı.

BAP Araştırma Projesi (19B0230004) Preimplantasyon dönemindeki embriyoların gelişim sürecinde Dnmt1 ve Dnmt3a genlerinin rolleri. Araştırmacı. Sonuçlandı.

BAP Araştırma Projesi (2014.02.0122.013) Süperovulasyon uygulamasının DNA metiltransferaz genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi. Araştırmacı. Sonuçlandı.

Burslar

Y K-100/2000  ncelikli Alanlar Doktora Programı.

Davetli Konuşmalar

Embriyo gelişiminin olmazsa olmazı: DNA metilasyonu. I. Kök Hücre ve Hücresel Tedavi Sempozyumu. Kütahya. 2019.

 d ller

Sözel Bildiri 3.l k  d l . Türk Histoloji ve Embriyoloji Kongresi.  eşme-İzmir. 2016

 ye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği