



**AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ALX3
GENİNİN İFADE VE PROMOTOR BÖLGESİNİN
METİLASYON DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elif Beyza KARTALOĞLU



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ALX3 GENİNİN İFADE VE
PROMOTOR BÖLGESİNİN METİLASYON DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elif Beyza KARTALOĞLU
0000-0002-6995-5740

Dr.Öğr.Üyesi Elif UZ YILDIRIM
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2021
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ALX3 GENİNİN İFADE VE PROMOTOR BÖLGESİNİN METİLYASYON DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif Beyza KARTALOĞLU

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Elif UZ YILDIRIM

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar çeşitli kanserlerde bazı genlerin biyobelirteç olabileceğini göstermiştir. Buna bağlı olarak yapılan genom boyu taramalarda ALX genlerinin de normal dokulara kıyasla metilasyon farklılıkları gösterip bu biyobelirteçlerden olabileceği gösterilmiş olmakla birlikte özellikle ALX3 geninde yapılan çalışmaların sayısı çok azdır. Buna karşılık yapılan bu az çalışmada bile ALX3 geninin metilasyon profilindeki farklılıklar bazı kanserlerde normal dokulara kıyasla farklılık göstermiştir. Ancak literatürde ALX3 geni ve akciğer kanseri arasında bir ilişkiye rastlanmamıştır. Bu bakımdan bu çalışmada ALX3 geni ve akciğer kanseri arasındaki ilişkinin gen ifadesi ve metilasyon profilleri açısından incelenmesi ve bu genin akciğer kanseri patogeneğinde bir biyobelirteç olup olmayacağıının bulunması amaçlanmıştır. Bu amaçla bu tez çalışmasında *in vitro* olarak A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre hatları ile Beas-2B normal akciğer dokusu hücre hattı kullanılmıştır. Metilasyon analizi için COBRA yöntemi, gen ifadesi analizi için ise Gerçek-Zamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak akciğer kanseri hücre hatları normal akciğer dokusu hücre hattına kıyasla belirgin şekilde hipermetilasyon göstermiş olup gen ifadelerinde belirgin bir farka rastlanmamıştır. Sonuçlara göre ALX3 geni akciğer kanserinde belirgin bir hipermetilasyon modeli sergilediği için biyobelirteç olma potansiyeli bulunmaktadır. Yapılan bu *in vitro* analizlere ek olarak aynı araştırmaların *in vivo* bir şekilde hasta örneklerinde yapılmasının bu potansiyelin kesinleştirilmesine fayda sağlayabileceği düşünülmektedir. Tüm bu sonuçlar ışığında ALX3 geni akciğer kanseri için potansiyel bir biyobelirteçtir ve bu genin hipermetilasyonunu tersine çevirecek bir biyoteknolojik ilaç geliştirilmesi yönünde yapılabilecek çalışmalar için temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteç, metilasyon, gen ifadesi, ALX3, akciğer kanseri

2021, x + 79 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE EXPRESSION OF THE *ALX3* GENE AND THE METILATION LEVEL OF THE PROMOTOR REGION IN LUNG CANCER CELL LINES

Elif Beyza KARTALOĞLU

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Dr. Elif UZ YILDIRIM

Some studies in recent years have shown that some genes may be biomarkers in various cancers. Accordingly, although it has been shown in genome-wide scans that *ALX* genes show methylation differences compared to normal tissues and may be one of these biomarkers, the number of studies especially on the *ALX3* gene is very few. However, even in these few studies, differences in the methylation profile of the *ALX3* gene differed in some cancers compared to normal tissues. However, no relationship was found between the *ALX3* gene and lung cancer in the literature. In this regard, in this study, it was aimed to examine the relationship between the *ALX3* gene and lung cancer in terms of gene expression and methylation profiles and to find out whether this gene can be a biomarker in the pathogenesis of lung cancer. For this purpose, A549 and H1299 lung cancer cell lines and Beas-2B normal lung tissue cell lines were used *in vitro* in this thesis study. COBRA method was used for methylation analysis and Real-Time PCR method was used for gene expression analysis. As a result, lung cancer cell lines showed significant hypermethylation compared to normal lung tissue cell lines, and no significant difference was found in gene expressions. According to the results, *ALX3* gene has the potential to be a biomarker since it exhibits a prominent hypermethylation pattern in lung cancer. In addition to these *in vitro* analysis, it is thought that performing the same studies on patient samples *in vivo* may help to confirm this potential. In the light of all these results, the *ALX3* gene is a potential biomarker for lung cancer and forms the basis for studies to develop a biotechnological drug that will reverse the hypermethylation of this gene.

Key words: Biomarker, methylation, gene expression, *ALX3*, lung cancer

2021, x + 79 pages.

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her zaman destek olan, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen ve bana her türlü imkanı sağlayan danışman hocam Doktor Öğretim Üyesi Elif UZ YILDIRIM' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneyleirim süresince bana her türlü imkanı sağlayan ve laboratuvarını açan sayın Profesör Doktor Ferda ARI ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde ve projemizde her zaman engin fikirlerine ve yardımlarına ihtiyaç duyduğumuz sayın Doktor Öğretim Üyesi Tolga ACUN hocama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneyleirimizi yapmamız için bize laboratuvarını açan sayın Doçent Doktor Figen ERSOY hocama teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK 2211 Yurtiçi Lisansüstü Burs Programı'na tezimi öncelikli alanlar kategorisine layık gördükleri ve destekledikleri için teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca KUAP(F)-2020/5 proje numarası ile çalışmalarımı destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi BAP birimine teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte benim her zaman yanımda olan, beni her daim motive eden ve destekleyen sevgili annem Zeynep KARTALOĞLU ve babam HARUN KARTALOĞLU' na sonsuz teşekkür ederim.

Elif Beyza KARTALOĞLU
16/12/2021

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2.KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1.Kanser.....	4
2.2. Kanser Çeşitleri.....	4
2.3. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	5
2.4. Kanser Oluşumunda Etkili Moleküler Faktörler	6
2.5. Akciğer Kanseri	7
2.5.1. Akciğer kanseri türleri	8
2.6. Epigenetik Modifikasyonlar	10
2.6.1. Metilasyon	10
2.6.2. Metilasyon analizinde kullanılan yöntemler	11
2.7. ALX Genleri.....	13
2.7.1. ALX3	14
2.8. ALX Genleri ve Kanser	15
2.8.1. ALX3 ve kanser ilişkisi	16
2.9.mRNA(Mesajcı Ribonükleik Asit) İfadesinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	19
2.9.1. Gerçek-Zamanlı PCR	19
2.9.2. Northern blot	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	24
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	25
3.1.3. Kullanılan cihazlar	25
3.2. Yöntemler	26
3.2.1. Hücre kültürü	26
3.2.2. Hücre kültürü için kullanılan besiyerinin hazırlanması	27
3.2.3. Hücre hatlarının stoktan çıkarılması	27
3.2.4. Hücre hatlarından DNA izolasyonu	27
3.2.5. İzole edilen DNA örneklerinin jel elektroforezi	28
3.2.6. Bisülfıt modifikasyonu	29
3.2.7. Bisülfıt modifiye DNA örneklerine PCR yapılması	30
3.2.8. 500 ng'lık PCR ürünlerine nested PCR yapılması	33
3.2.9. PCR ve nested PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi	34
3.2.10. Nested PCR ürünlerine enzim kesimi yapılması	35
3.2.11. Nested PCR ve enzim kesimi ürünlerinin yanyana jele yüklenmesi	35
3.2.12.Hücre hatlarından RNA izolasyonu	36
3.2.13.RNA örneklerinden ilk zincir cDNA sentezi	37
3.2.14.cDNA örneklerine Gerçek-Zamanlı PCR yapılması	37

4. BULGULAR	40
4.1. Akciğer Kanseri ve Normal Akciğer Dokusu Hücre Hatlarının Mikroskop Görüntüleri.....	40
4.2. DNA ve RNA Örneklerinin Nanodrop Ölçüm Sonuçları	42
4.3. İzole Edilen DNA'ların Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri	43
4.4. DNA'ların Bisüfit ile Muamelesi.....	44
4.5. Nested ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüleri	44
4.6. Enzim Kesimi ve Nested PCR Ürünlerinin Birlikte Agaroz Jel Görüntüsü	46
4.7. Enzim Kesimi ve Nested PCR Ürünlerinin Metilasyon Oranları	47
4.8. Gerçek-Zamanlı PCR Sonuçları	48
5.SONUÇ ve TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR	55
EKLER	71
EK 1. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarında ALX3 Geninin Amplifikasyon Grafikleri	72
EK 2. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarında GAPDH Geninin Amplifikasyon Grafikleri	73
EK 3. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarında ALX3 Geninin Erime Eğrisi Grafikleri	74
EK 4. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarında GAPDH Geninin Erime Eğrisi Grafikleri	76
EK 5. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarının Ct Değerlerini İçeren Excel Tablosu.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	79

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
α	alfa
β	beta
δ	gama
%	yüzde
°C	santigrat derece
bp	baz çifti
cm ²	santimetrekare
dk	dakika
g	gram
M	molar
mg	miligram
ml	mililitre
mM	milimolar
ng	nanogram
nmol	nanomol
pmol	pikomol
sn	saniye
μ g	mikrogram
μ l	mikrolitre
μ M	mikromolar
U	ünite

Kısaltmalar Açıklama

5-Aza-CdR	5-aza-2p-deoksisitidin (5-aza-2p-deoxycytidine)
A549	İnsan Adenokarsinomik Alveolar Bazal Epitel Hücreleri (Human Alveolar Basal Epithelium Cells)
ALK	ALK Reseptör Tirozin Kinaz (ALK Receptor Tyrosine Kinase)
ALX	Aristaless-Benzeri Homeobox Domaini (Aristaless-Like Homeobox Domain)
ALX1	ALX Homeobox 1
ALX3	ALX Homeobox 3
ALX4	ALX Homeobox 4
ANTP	Antennapedia-Sınıfı Homeobox Genleri (Antennapedia-Class Homeobox Genes)
AP-PCR	Keyfi Olarak Çoğaltılmış PCR (Arbitrarily Primed PCR)
Beas-2B	İnsan Bronşiyal Normal Epitel Hücreleri (Human Bronchial Normal Epithelium Cells)
BRAF	B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Threonin Kinaz (B-Raf Proto-Oncogene, Serin/Threonin Kinase)

bHLH	basic helix-loop-helix
cDNA	Komplementer DNA (Complementary DNA)
CFTR	Kistik Fibroz Transmembran İletkenlik Regülatörü (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductivity Regulator)
CO ₂	Karbondioksit (Corbondioxide)
COBRA	Kombine Bisülfite Restriksiyon Analizi (Combined Bisulfite Restriction Analysis)
DAMD	Metilasyon Farklılıklarının Denatürasyon Analizi (Denaturation Analysis of Methylation Differences)
DMH	Diferansiyel Metilasyon Hibridizasyonu (Differential Methylation Hybridization)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit (Deoxyribo Nucleic Acid)
DNMT	DNA Metiltransferaz (DNA Methyltransferase)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)
FBS	Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
FND	Frontanazal Displazi (Frontanatal Dysplasia)
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase)
GCK	Glikokinaz (Glucokinase)
gDNA	Genomik DNA (Genomic DNA)
H1299	İnsan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu Hücreleri (Human Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells)
H2A	Histon 2A
H2B	Histon 2B
H3	Histon 3
H4	Histon 4
<i>Hpa</i> II-PCR	<i>Hpa</i> II-Küçük Fragman Zenginleştirilmesi (<i>Hpa</i> II Small Fragment Enrichment)
mRNA	Mesajcı RNA (Messenger RNA)
MEK	Mitojen ile Aktivate Olan Protein Kinaz 1 (Mitojen-Activated Protein Kinase 1)
MEM	Minimum Essential Medium
miRNA	Mikro RNA (Micro RNA)
MS-HRM	Metilasyon-Spesifik Yüksek Çözünürlüklü Eritme (Methylation-Specific High Resolution Dissolution)
MSP	Metilasyon-Spesifik PCR (Methylation-Specific PCR)
NaOH	Sodyum Hidroksit (Sodium Hydroxide)
NTD	Nöral Tüp Defektleri (Neural Tube Defects)
PBS	Fosfat Tuz Tamponu (Phosphate Salt Buffer)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PRD	Paired-Sınıfı Homeobox Genleri (Paired-Class Homeobox Genes)
RB1	Retinoblastoma ile İlişkili Protein 1 (Retinoblastoma-Associated Protein 1)
RLGS	Restriksiyon Bölgesi Genomik Tarama (Restriction Landmark Genomic Screening)
RNA	Ribo Nükleik Asit (Ribo Nucleic Acid)

ROS1	Ros Proto-Onkogen 1, Reseptör Tirozin Kinaz (Ros Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase)
RP-HPLC	Ters Fazlı Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-qPCR	Gerçek-Zamanlı Kinetik PCR (Real-Time Kinetic PCR)
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tm	Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)
TP53	Tümör Proteini p53 (Tumor Protein p53)
UBC	Ubikitin C (Ubiquitin C)
UV	Ultraviyole (Ultraviolet)
VGS	Sanal Genom Taraması (Virtual Genome Screening)



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kanserin kazanılmış yetenekleri	6
Şekil 2.2. Kanser hücrelerinde ortaya çıkan ayırt edici ve etkinleştirici özellikleri	6
Şekil 2.3. COBRA yönteminin şematik diyagramı	13
Şekil 2.4. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yönteminin açılımı ve şematik diyagramı	22
Şekil 2.5. Northern blot şematik diyagramı	23
Şekil 3.1. <i>ALX3</i> gen sekansında primerlerin denk geldiği yerler	32
Şekil 3.2. Bisülfid modifikasyonu sonrası <i>ALX3</i> gen sekansında primerlerin denk geldiği yerler	32
Şekil 4.1 A549 mikroskop görüntüsü	40
Şekil 4.2. H1299 mikroskop görüntüsü	41
Şekil 4.3. Beas-2B mikroskop görüntüsü	41
Şekil 4.4. DNA izolasyonu sonrası jel görüntüsü	43
Şekil 4.5. Nested PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü-1	45
Şekil 4.6. Nested PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü-2	45
Şekil 4.7. Enzim kesimi ve Nested PCR örneklerinin jel görüntüsü	46
Şekil 4.8. Gerçek-Zamanlı PCR sonucunda <i>ALX3</i> primeri kullanılan örneklerin agaroz jeldeki görüntüsü	49
Şekil 4.9. Gerçek-Zamanlı PCR sonucunda GAPDH primeri kullanılan örneklerin agaroz jeldeki görüntüsü	50
Şekil 4.10. Akciğer kanseri hücre hatlarında <i>ALX3</i> geni göreceli ifadesi	50
Ek Şekil 1.1. A549 hücre hattında <i>ALX3</i> geninin amplifikasyon grafiği	72
Ek Şekil 1.2. H1299 hücre hattında <i>ALX3</i> geninin amplifikasyon grafiği	72
Ek Şekil 1.3. Beas-2B hücre hattında <i>ALX3</i> geninin amplifikasyon grafiği	72
Ek Şekil 2.1. A549 hücre hattında GAPDH geninin amplifikasyon grafiği	73
Ek Şekil 2.2. H1299 hücre hattında GAPDH geninin amplifikasyon grafiği	73
Ek Şekil 2.3. Beas-2B hücre hattında GAPDH geninin amplifikasyon grafiği	73
Ek Şekil 3.1. A549 hücre hattında <i>ALX3</i> geninin erime eğrisi grafiği	74
Ek Şekil 3.2. H1299 hücre hattında <i>ALX3</i> geninin erime eğrisi grafiği	74
Ek Şekil 3.3. Beas-2B hücre hattında <i>ALX3</i> geninin erime eğrisi grafiği	75
Ek Şekil 4.1. A549 hücre hattında GAPDH geninin erime eğrisi grafiği	76
Ek Şekil 4.2. H1299 hücre hattında GAPDH geninin erime eğrisi grafiği	76
Ek Şekil 4.3. Beas-2B hücre hattında GAPDH geninin erime eğrisi grafiği	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. <i>ALX3</i> geni metilasyon farklılıkları ve buna bağlı olarak gen ekspresyonunda değişiklik görülen kanserler.....	18
Çizelge 3.1.COBRA ve nested PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ve özellikleri.....	31
Çizelge 3.2.PCR reaksiyonu mix bileşenleri.....	33
Çizelge 3.3.PCR reaksiyonuna eklenen bisülfite modifiye DNA miktarları	33
Çizelge 3.4. Nested PCR reaksiyonu mix bileşenleri.....	34
Çizelge 3.5. Enzim kesimi reaksiyon bileşenleri	35
Çizelge 3.6. cDNA sentezi komponent miktarları	37
Çizelge 3.7.Gerçek-Zamanlı PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ve özellikleri.....	38
Çizelge 3.8.Gerçek-Zamanlı PCR mix bileşenleri	39
Çizelge 4.1. DNA örneklerinin nanodrop ölçüm sonuçları.....	42
Çizelge 4.2. RNA örneklerinin nanodrop ölçüm sonuçları.....	42
Çizelge 4.3. Enzim kesimi sonucu elde edilen bantların ölçüm değerleri	47
Çizelge 4.4. Gerçek-Zamanlı PCR sonucu A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarında... <i>ALX3</i> ve <i>GAPDH</i> genleri için elde edilen Ct değerleri.....	49
Ek Çizelge 5.1. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarının Ct değerlerini içeren excel tablosu.....	78

1. GİRİŞ

Vücuttaki hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması sonucu oluşan hastalıklara kanser adı verilmektedir (Nam ve Nei 2005). Çeşitli kanserlerde kalıtsal faktörlerin etkisiyle beraber çevresel etkenler, diyet, yaş, cinsiyet, yaşam tarzı gibi etmenler de önem arz etmektedir (Lichtenstein ve ark. 2000).

Akciğer kanseri ise Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre tüm dünyada ölüme en fazla sebep olan kanser türüdür (Globocan, 2018). Genel olarak artan yaş ve sigara kullanımına bağlı olarak görülme sıklığı artmaktadır. 2015-2017 yıllarındaki akciğer kanseri ölüm oranı % 4.8 olarak; 2010-2016 yıllarındaki 5 yıllık bağlı sağkalım oranlarına göre akciğer kanseri sağkalım oranı ise %20 olarak bildirilmiştir ("American Cancer Society | Cancer Facts & Statistics," n.d.)

Çeşitli kanserlerde olduğu gibi akciğer kanserinde de farklı gen mutasyonları görülmekte ve tedavide bu genleri regüle edecek biyolojik ilaçlar kullanılmaktadır. Asya-Pasifik bölgesindeki küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tipi olan adenokarsinomlu hastalarda yaygın olarak EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) mutasyonu görülmüş ve bu mutasyonu barındıran hastalarda kullanılmak üzere EGFR tirozin kinaz inhibitörü olarak erlotinib ve gefitinib ilaçları geliştirilmiştir (Rosell ve ark. 2012, Midha ve ark. 2015). Benzer şekilde ALK (ALK Reseptör Tirozin Kinaz) ve ROS1 (Ros Proto-Onkogen 1, Reseptör Tirozin Kinaz) mutasyonları için crizotinib, anjiyogenez inhibitörü olan bevacizumabin, BRAF (B-Raf Proto-Onkogen, Serin / Threonin Kinaz) inhibitörü dabrafenib ve MEK (Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz 1) inhibitörü trametinib de akciğer kanseri tedavisinde kullanılan moleküler tabanlı ilaçlardır (Sandler ve ark. 2006, Planchard ve ark. 2016).

Epigenetik mekanizmalar normal süreçlerde memelilerde gen ekspresyonunu kontrol eden regülatör mekanizmalardır. Vücudumuzdaki tüm hücreler aynı genoma sahip olmakla beraber her hücrenin spesifik özelliği ve işlevi bu epigenetik modifikasyonlar sayesinde belirlenmektedir. Buradaki epigenetik mekanizmaların doğru işlememesi sonucu da kanser, diyabet, astım, nörolojik hastalıklar gibi bazı hastalıklar ortaya

çıkılmaktadır (Fardi ve ark. 2018). Son zamanlardaki çalışmalar epigenetik modifikasyonların DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) metilasyonları, histon modifikasyonları, nükleozomal değişiklikler gibi birtakım proseslere etki ederek tümör oluşumu, kanserin ilerlemesi ve metastaz ile olan ilişkisini göstermektedir (Park ve Han 2019, Shin ve ark. 2020). Metilasyon kanserlerde en fazla görülen ve en çok çalışılan epigenetik modifikasyondur. Özellikle de kanserlerde onkogen hipometilasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu kanserin oluşumu ve ilerlemesinde önemli süreçlerdir. Bu nedenle kanserdeki proseslerde rol alan genlerin promotor metilasyon paternlerinin incelenmesi kanser teşhisinde önemli rol oynamaktadır.

Epigenetik mekanizmaların geri dönüşlü olduğu bilinmektedir. Akut hastalıklarda ve kanserde görülen anormal epigenetik modifikasyonların tersine çevrilmesi çoğu kanser türünde biyobelirteç ve terapötik hedef oluşturulması bakımından insanlık için çok önemlidir. Örneğin baş ve boyun kanserinde CFTR (Kistik Fibroz Transmembran İletkenlik Regülatörü) geninin hipermetile olduğu ve bunu tersine çevirmek için tedavide 5-aza-2p-deoksisitidin (5-Aza-CdR) kullanımının CFTR geninin ekspresyonunu regüle ettiği bulunmuştur (Shin ve ark. 2020). Benzer şekilde DNMT (DNA Metiltransferaz) enzimlerinin işlevini azaltarak akut miyeloid lösemide hipometilasyona ve tümör supressör genlerin ekspresyonunun artışına sebep olacak bir miRNA-(Micro RNA)- (MicroRNA-29b) bildirilmiştir (Garzon ve ark. 2009).

ALX (Aristaless-Benzeri Homeobox Domain) gen ailesi temel olarak gelişim dönemlerinde önemli rol oynayan transkripsiyon faktörü ailelerinden birisidir. *ALX* gen ailesi memelilerde *ALX1* (*ALX* Homeobox 1), *ALX3* (*ALX* Homeobox 3) ve *ALX4* (*ALX* Homeobox 4) olmak üzere üç paralog gen içermektedir. Gelişim dönemine etkilerinin yanında yapılan çeşitli çalışmalarda *ALX* genlerinin bazı kanserlerde de rol oynadığı görülmüştür. Bu çalışmalar içinde akciğer kanseri ve *ALX* genleri arasındaki ilişki pek fazla incelenmemiş olup; akciğer kanserinde *ALX* genlerinden *ALX1*'in küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde hipermetile olduğu bildirilirken (Sandoval ve ark. 2013) ; benzer şekilde *ALX4* geninin de akciğer kanserinde hipermetile olduğu bildirilmiştir (W. Bin Liu ve ark. 2014). Günümüze kadar yapılan çalışmalar arasında *ALX3* promotor

metilasyon düzeyleri ve akciğer kanseri arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışma bulunmamaktadır.

Bazı kanserlerde (örneğin kolorektal kanserde) epigenomdaki anomalilikler ilaç direncine sebep olabilmektedir (Barretina ve ark. 2012). Biyobelirteç olarak kullanılan bu genlerin metilasyon düzeylerini değiştirecek epigenetik ajanlarla yapılan kombine tedaviler bu direnci azaltmaktadır. Bu şekilde *ALX3* geninin metilasyon düzeylerinin araştırılarak akciğer kanseri tanısında biyobelirteç olup olamayacağının belirlenmesi ve eğer biyobelirteç olarak kullanılacaksa bu genin hipermetilasyonunu engelleyen biyoteknolojik ilaçların kullanımı ve geliştirilmesi gibi gelişmelerin de önünün açılması beklenmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, A549 (İnsan Adenokarsinomik Alveolar Bazal Epitel Hücreler), H1299 (İnsan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinoma Hücreleri) ve Beas-2B (İnsan Bronşiyal Normal Epitel Hücreleri) akciğer kanseri hücre hatlarında *ALX3* geninin ifade ve promotor metilasyon paternleri araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Vücudumuzdaki organları oluşturan hücreler normal olarak bölünüp çoğalma eğilimi gösterirler, böylece eski hücrelerin yerini yenileri alır. Ancak ortamda herhangi bir toksik bileşiğin hücrelerdeki kalıtım materyali olan DNA'ya hasar vermesi durumunda hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalarak tümör denilen yapıyı oluşturur. Kanser aynı zamanda normal hücrelere kıyasla sınırsız büyüme özellikleri gösteren anormal hücre popülasyonu olarak da tanımlanmaktadır (Clark, 1991). Tümörler en temel olarak benign ve malign tümörler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Benign tümörler az agresif özellik gösteren, kanserli olmayan ve bulunduğu alana yayılmayan tümörlerdir. Malign tümörler ise hızlı, kontrolsüz olarak çoğalan, çevre dokulara yayılan, kanser olarak adlandırılan agresif tümörlerdir. Bazı lezyonlarda benign tümörlerin artan malignite göstererek malign tümöre dönüşebildiği gösterilmiştir (Clark, 1991). Malign tümör hücreleri çevre dokularda yeni damarlar oluşturur, invazyon yapar ve proliferer olur. Malign tümör hücrelerinin bu geçirdiği aşamalar ve yayılımı metastaz olarak adlandırılmaktadır (Woodhouse ve ark. 1997).

2.2. Kanser Çeşitleri

Yüzden fazla tipi olmakla beraber kanserler, oluştuğu organ, doku veya bu yapıları oluşturan hücre tipi ile isimlendirmektedirler:

1.Karsinomlar: Vücuttaki epitel hücreler tarafından kaynaklanan en yaygın kanser tipidir. Epitel hücrelerinin farklı tiplerinde başlayan çeşitli karsinom türleri vardır: Adenokarsinom, Bazal hücreli karsinom, Skuamöz hücreli karsinom ve Geçiş hücreli karsinom.

2.Sarkomlar: Vücuttaki yumuşak doku ve kemik dokularında görülen kanser tipidir. Osteosarkom örnek olarak verilebilir.

3.Lösemi: Kan ve kemik iliğinin kan yapan dokularından kaynaklanan tümörlerdir.

4.Lenfoma: Vücutta bağışıklık hücrelerinde (T ve B lenfositlerde) başlayıp lenf düğümleri ile lenfatik kanallarda gelişen tümörlerdir.

5.Multiple Miyelom: Plazma hücrelerinde başlayan tümörlerdir.

6.Melanom: Özellikle cilt olmak üzere vücutta çeşitli pigmentli dokularda oluşabilen tümörlerdir. Burada oluşan tümörlerin kaynağı melanosit hücreleridir.

7.Beyin ve Omurilik Tümörleri: Tümörün merkezi sinir sisteminde olduğu yere, kaynaklandığı hücre türüne bağlı olarak oluşan farklı tipleri vardır.

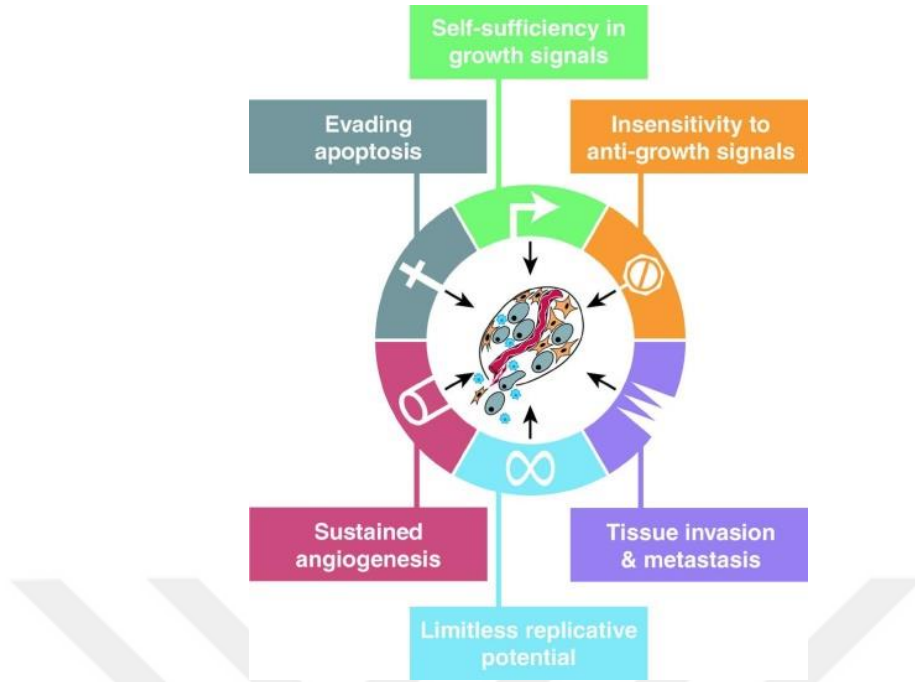
8.Germ Hücreli Tümörler: Vücutta sperm ve yumurtayı oluşturan hücrelerden köken alan tümörlerdir.

9.Nöroendokrin Tümörler: Kana hormon salgılayan hücreler tarafından kaynaklanan tümörlerdir.

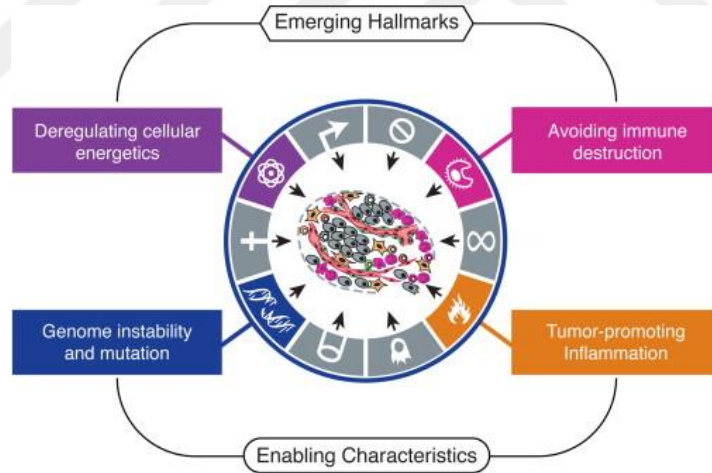
10.Karsinoid Tümörler: Bu tip tümörler aslında nöroendokrin tümör sınıfına dahildir. Gastrointestinal sistemde görülen hormon kaynaklı tümörler örnek olarak verilebilir. Küçük hücreli akciğer kanseri de nöroendokrin tümörler sınıfına girmektedir (“Kanser Nedir? - Ulusal Kanser Enstitüsü,” n.d.)

2.3. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak istilacı özelliklerini desteleyecek birtakım özelliklere sahiptir. Kanser işaretleri (hallmarks of cancer) olarak adlandırılan bu özellikler, sürekli anjiyogenez, apoptozdan kaçış, sınırsız çoğalma potansiyeli, doku invazyonu ve metastaz, büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik ve büyüme inhibitör sinyallerine duyarsızlık olmak üzere Şekil 2.1’ de görüldüğü üzere altı tanedir (Hanahan & Weinberg, 2000). Daha sonra bu belirtilere Şekil 2.2.’ de görüldüğü üzere enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık tahribatından kaçınmak olmak üzere iki yeni belirti, genom kararsızlığı ve mutasyon ile tümör teşvik edici inflamasyon olmak üzere kanser hücrelerinde etkinleştirici iki belirti de dahil edilmiştir (Hanahan & Weinberg, 2011).



Şekil 2.1. Kanserın kazanılmış yetenekleri (Hanahan & Weinberg, 2000)



Şekil 2.2. Kanser hücrelerinde ortaya çıkan ayırt edici ve etkinleştirici özellikler (Hanahan & Weinberg, 2011)

2.4. Kanser Oluşumunda Etkili Moleküler Faktörler

Kanser hücrelerinin oluşup oluşmama kararını birtakım faktörler ve bu faktörlerde görülen mutasyonlar düzenlemektedir. Bu faktörler protoonkogenler ve tümör supressör genlerdir. Onkogenlerde görülen aşırı ifade ve tümör supressör genlerde görülen düşük seviyede ifade tümör oluşumunu hedeflemektedir (Guo ve ark. 2014).

Protoonkogenler normal süreçlerde hücre sel büyüme yi ve bölünme yi sa ğlayan genlerdir. Çe şitli sebeplerden ve etkenlerden dolayı nokta mutasyonu, kromozom translokasyonu vb. mutasyonlar ge çirip amplifiye olarak fonksiyon kazanırlar, daha sonra aktif form olan onkogenlere dönü şürler, böylece kontrolsüz ço ğalmaya ve kanser hücrelerinin oluşumuna sebep olurlar (Oláh, 2005). Tümör supressör genler ise protoonkogenlerin aksine hücre büyümesi ve bölünmesini kontrol eden genlerdir. Ge çirdikleri işlev kaybı mutasyonları sonucunda bu kontrol yeteneklerini kaybederler. İlk tanımlanmış tümör supressör geni RB1'dir (Retinoblastoma ile İlişkili Protein 1). Di ğer bir tümör supressör gen ise TP53 (Tümör Proteini p53) 'tür. Bu genin kodladığı protein olan p53, DNA hasarının tamir edilemedi ği durumlarda hücreyi apoptoza götürür. p53 proteinin mutasyona uğraması hücrelerin invazyon, metastaz, proliferasyon gibi birtakım özellikler kazanmasına yol açmaktadır (Muller & Vousden, 2013).

2.5. Akci ğer Kanseri

Akci ğer kanseri, klinik olarak önemli olan çe şitli histolojik formlara sahip oldukça kompleks bir hastalıktır (Rodriguez-Canales ve ark. 2016). 1985 yılından bu yana dünyada en yaygın görülen kanser türüdür. Aynı zamanda moleküler olarak hem çevresel hem de kalıtsal kökenlere sahip dünyada en fazla ölüm oranı görülen kanserlerdendir. Akci ğer, mide, karaci ğer kanseri gibi yüksek oranda ölüme sebep olan kanserler erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülmektedir (Houts ve ark. 2000). Özel olarak ise akci ğer kanseri cinsiyet bakımından erkeklerde daha fazla oranda görülürken kadınlarda daha düşük insidans göstermektedir (Parkin ve ark. 1993, 2005).

Belirti ve bulguları arasında öksürük, kanlı balgam, gö ğüs ağrısı, seste de ğişiklikler, a ğırlaşan nefes darlığı, bronşit ve zatürre bulunmaktadır (Houts ve ark. 2000).

2016-2018 verilerine göre insanların yaklaşık %6,1' inin yaşamlarında akci ğer ve bronş kanserine yakalanma ihtimalleri bulunmaktadır. Ayrıca akci ğer ve bronş kanseri teşhisi konan hastaların 5 yıllık ba ğıl sa ğkalım oranları %21,7 olarak verilmiştir ("Akci ğer ve Bronş Kanseri - Kanser Durumuyla İlgili Gerçekler," n.d.).

DNA onarım mekanizmalarında rol oynayan genler, interlökin kodlayan genler, matris metaloproteinaz genleri, p53 gibi tümör supressör genleri, hücre döngüsünde rol

oyunayan genler akciğer kanseri riski ve yatkınlığı üzerinde etkisi görülen genlerdir. Özellikle bu genlerdeki epigenetik modifikasyonlar akciğer kanserinde duyarlılığı artıran önemli etkenlerdendir (Dela Cruz ve ark. 2011).

2.5.1 Akciğer kanseri türleri

Akciğer kanserinin temel sınıflandırılması mikroskop görüntülerine bakılarak yapılmış olup ana olarak iki formu bulunmaktadır: küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %83'ünü oluşturur) ve küçük hücreli akciğer kanseri (tüm akciğer kanserlerinin %13'ünü oluşturur). Bunların dışında kalan yüzdeler kısmı ise salivary gland-type (tükürük bezi tipi) tümörler, sarcomatoid karsinomlar ve diğer tipleri içermektedir (Rodriguez-Canales ve ark. 2016). Küçük hücreli akciğer kanseri daha ileriki evrelerde teşhis edilen, hastalarda zayıf prognoz ile ilişkili olan malign bir tümördür.

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri farklı histolojik alt tiplerden oluşmaktadır. Bunlar adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli akciğer kanserleridir. Adenokarsinom akciğer kanserinde en yaygın görülen tipken bunu squamous-cell karsinom ve büyük hücreli karsinom izlemektedir (Herbst ve ark. 2008, Dela Cruz ve ark. 2011).

Akciğer kanserinde hava kirliliği, radon gazı, iyonize radyasyon, asbest, diyet ve bazı mesleki maruziyetlerin yanı sıra ana risk faktörü sigara kullanımınıdır ve tüm akciğer kanseri tiplerinde etkisi görülmektedir. Ancak en fazla küçük hücreli akciğer kanseri ve squamous-cell karsinom üzerinde etkisi görülürken sigara kullanmayan hastalarda ise en yaygın olarak adenokarsinom görülmektedir (Yang ve ark. 2002, Herbst ve ark. 2008, Dela Cruz ve ark. 2011). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında tümör heterojenitesi, klinik olarak hastaların farklı sonuçlara ve tedaviye farklı cevaplar vermesine sebep olmaktadır (Herbst ve ark. 2008).

- Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri:

Küçük hücreli akciğer kanserine göre tedaviye daha az duyarlıdır. 2010-2016 yılları arasındaki verilere göre 5 yıllık sağkalım oranı %21' dir (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002). Bu kanser türleri akciğerin hem merkezinde hem de periferalde yerleşim göstermektedir (Yeleser İrem, 2020).

- a) Adenokarsinomlar: Adenokarsinomlar akciğer kanserinin en yaygın türü olmakla birlikte akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur (Herbst ve ark. 2008, Dela Cruz ve ark. 2011, Zappa & Mousa, 2016). Akciğerdeki mukus vb. maddeleri salgılayan tip-2 alveolar hücrelerden kaynaklanmaktadır ("Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis - PubMed," n.d.). Aynı zamanda glandüler lezyonları da bulunan malign özellikte epitelyal bir tümör çeşididir (Rodriguez-Canales ve ark. 2016).
- b) Skuamöz hücreli karsinom: Skuamöz hücreli karsinom tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %20-25'ini oluşturmaktadır. Akciğerlerdeki bronş tüplerinde bulunan skuamöz hücrelerinden kaynaklanmaktadır (Zappa & Mousa, 2016).
- c) Büyük hücreli karsinom: Bu küçük hücreli olmayan akciğer kanseri türü ise üm akciğer kanserlerinin yaklaşık %5'ini oluşturmakla birlikte incelendiğinde skuamöz, glandüler veyahut adenokarsinoma gibi spesifik özellikler göstermediği için diğer sınıfların dışında kalır ve mikroskop altında diğer türlere kıyasla daha büyük hücreleri olduğu için bu şekilde sınıflandırılmıştır (Zappa & Mousa, 2016, Yeleser İrem, 2020).

- Küçük hücreli akciğer kanseri:

Bronşiyal karsinomların %15' ini oluşturan sınıftır. Tedaviye daha duyarlı olmasının yanında geniş bir yayılma eğilimi gösterdiğinden genellikle tedavide zorlanılmaktadır. 5 yıllık sağkalım oranı %5-10 arasında değişmektedir (NCI (National Cancer Institute),

2019). Bu kanser türü daha çok akciğer merkezi etrafında dağılım göstermektedir (Yeleser İrem, 2020).

2.6. Epigenetik Modifikasyonlar

Epigenetik terimi ilk olarak yüksek yapılı organizmalarda farklılaşmaya neden olan çevre ve genom arasındaki etkileşimler olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda DNA sekansında değişiklik oluşturmayan kalıtsal değişiklikler olarak da tanımlanmaktadır (Handy ve ark. 2011). Bu modifikasyonlar normal olarak çeşitli biyolojik süreçlerde gözlenmekte, kromatin yapısını değiştirerek gen ekspresyonunu kontrol etmektedir. Kromatini oluşturan DNA sarmalı H2A (Histon 2A), H2B (Histon 2B), H3 (Histon 3) ve H4 (Histon 4) histonları tarafından oluşturulan nükleozom yapıları olarak paketlenmektedir. Bu DNA sarmalı ve histon proteinleri arasındaki etkileşimler epigenetik modifikasyonlar ve histon modifikasyonları arasındaki koordinasyonu sağlamaktadır (Fardi ve ark. 2018).

Metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon en fazla bilinen ve çalışılan epigenetik modifikasyonlar arasında bulunmaktadır.

2.6.1. Metilasyon

Metilasyon 1980'lerin başlarında insanlarda ilk bulunan epigenetik modifikasyondur (Cooper, 1983). Ayrıca epigenetik modifikasyonlar arasında en iyi incelenen ve memeli gelişimi için gerekli olan bir modifikasyondur. Metilasyon %98 oranında genlerin promotor bölgelerindeki CpG adaları denilen sitozin ve guanin bazlarınca zengin bölgelerde görülmektedir (Fardi ve ark. 2018). DNMT enzimleri tarafından düzenlenmektedir. Metil grupları CpG bölgelerindeki sitozin bazlarına 5-metilsitozin oluşturmak üzere takılarak transkripsiyon faktörü gibi bazı bileşenlerin bağlanmasını engeller ve ilgili genin ekspresyonunu durdurur. Aynı zamanda genomda metillenmiş CpG bölgeleri mutasyon geçirmeye eğilimli bölgeler olduklarından bu durumda kimyasal kanserojenlerin DNA'ya bağlanmasına neden olabilmektedir (Baylin & Jones, 2016). Anormal DNA metilasyonu (hipometilasyon ve hipermetilasyon) prostat, karaciğer, meme, akciğer, baş ve boyun kanseri, lösemi ve glioblastoma gibi çok sayıda ve çeşitli kanserlerde görülmektedir (Barbano ve ark. 2013, Chao ve ark. 2013, Mehta

ve ark. 2015, X. Liu ve Brenner 2016, Cecotka ve Polanska 2018, Klughammer ve ark. 2018, Shin ve ark. 2020).

DNA metilasyonunun yanında histonlar da metilasyon modifikasyonu geçirebilir (Moore, Le, & Fan, 2013). Lizin ve arginin aminoasitleri metile olabilir. Bu histon metilasyonu da DNA transkripsiyonunu düzenlemektedir. Örneğin H3K4, H3K36 ve H3K79 metilasyonları genlerin transkripsiyonunu artırırken H3K9, H3K27 ve H3K20 metilasyonları transkripsiyonu baskılamaktadır (Barski ve ark. 2007). Bu histon modifikasyonları genellikle kromatin yapısıyla ilişkilidir. DNA metilasyonu kanserin yanı sıra genomik damgalama, X-inaktivasyonu, dokuya özgü gen ekspresyonu gibi birçok biyolojik süreçte önemli bir moleküler mekanizma olarak kabul edilmektedir (Riggs 1975, Razin ve Cedar 1991 ,Li ve ark. 1993).

2.6.2. Metilasyon analizinde kullanılan yöntemler

DNA metilasyonunun analizinde kullanılan yöntemler temel olarak 3 başlığa ayrılabilir: Erken Dönem Spesifik Olmayan Yöntemler, Gen-Spesifik Yöntemler ve Genom Boyu Metilasyon Analizi (Harrison ve Parle-McDermott 2011, Kurdyukov ve Bullock 2016). Erken Dönem Spesifik Olmayan Yöntemler daha çok genomda epigenetik değişiklikleri genel olarak belirlemek ve profillerini çıkarmak için kullanılmaktadır. Bu yöntemler restriksiyon endonükleaz kesimi ve izotop birleştirme (Bestor ve ark. 1984), RP-HPLC (Ters Fazlı Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) (Kuo ve ark. 1980), anti 5-metilsitozin antikoru kullanımı (Adouard ve ark. 1985, Oakeley ve ark. 1997), HPLC-kütle spektrometrisidir (Annan ve ark. 1989).

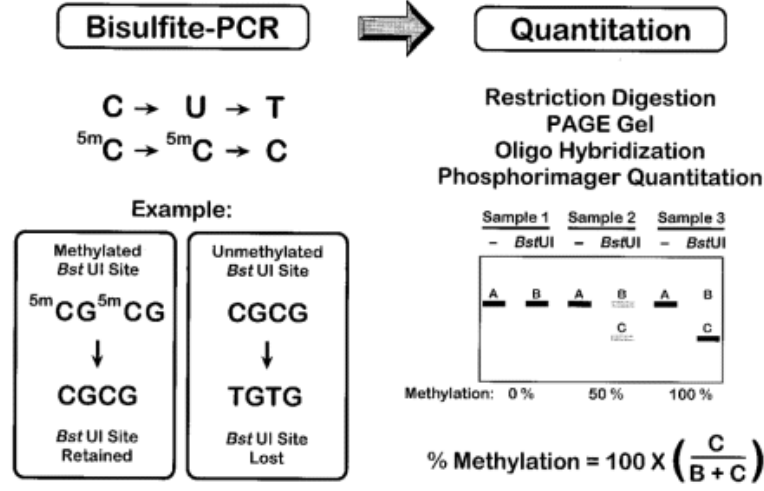
Ardından sodyum bisülfidin pürin ve pirimidin bazları üzerindeki etkisinin anlaşılmasıyla (Hayatsu ve ark. 1970, Wang ve ark. 1980) ve *Hpa* II-PCR (*Hpa* II küçük Fragman Zenginleştirme-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) , Ligasyon Aracılı PCR gibi tekniklerin gelişmesiyle bu epigenetik değişikliklerin keşfi daha da kolaylaşmış ve gen seviyesine indirgenebilmiştir (Pfeifer ve ark. 1989, Singer-Sam ve ark. 1990). Bisülfitle muamele edilen DNA ardından sekanslanılarak ilgili genin metilasyon durumu tespit edilebilir (bu yöntem bisülfid sekanslama olarak da bilinir) (Frommer ve

ark. 1992) veya enzim kesimi kullanılarak COBRA (Kombine Bisülfite Restriksiyon Analizi) yöntemiyle gen metilasyon seviyeleri analiz edilebilir (Xiong & Laird, 1997). Bu yöntemler haricinde MSP (Metilasyon-Spesifik PCR) (Herman ve ark. 1996) veya MS-HRM (Metilasyon-Spesifik Yüksek Çözünürlüklü Eritme) (Wojdacz & Dobrovic, 2007) gibi yöntemler kullanılarak da bisülfite muamele edilen DNA'daki metilasyon seviyeleri RT-qPCR (Gerçek-Zamanlı Kantitatif PCR) ile de analiz edilebilir.

Sonraları insan genom dizilenmesi tamamlanıp Epigenom Projesi'nin önünün açılmasıyla birlikte genom boyu tarama yöntemleri geliştirilmiştir. Genom boyu metilasyon analizinde ise yine HPLC-UV (Kuo ve ark. 1980), RLGS (Restriksiyon Bölgesi Genomik Tarama) (Hatada ve ark. 1991), AP-PCR (Keyfi Olarak Çoğaltılmış PCR) (Welsh ve McClelland 1990, Liang ve ark. 2002), DMH (Diferansiyel Metilasyon Hibridizasyonu) (Huang ve ark. 1999), Tüm Genom Bisülfite Sekanslama (Lister ve ark. 2009) veya ELISA tabanlı yöntemler kullanılabilir. Kullanılacak yöntem araştırmacının istediği hedef doğrultusunda seçilebilir.

Tezimizde tek genin metilasyon seviyesi analiz edileceği için seçtiğimiz COBRA yönteminin şematik diyagramı Şekil 2.3 'te görülmektedir. COBRA yöntemi, ucuz ve güvenilir bir yöntemdir. Bu yöntem temel olarak DNA örneğinin bisülfite muamele edilmesiyle başlar. Bisülfite temel olarak metilasyon analizinde kullanılabilen bir kimyasaldır ve halen metilasyon analizi için altın standart olarak kabul görmektedir (Frommer ve ark. 1992). Bisülfitin etkisiyle metillenmemiş sitozinler urasile dönüşür ve PCR sonrası timin olarak okunurken metillenmiş sitozinler aynen kalmaktadır. Bisülfite muamele edilen DNA'ya hedef gen bölgesine uygun primerler kullanılarak PCR yapılır. PCR sonrası hedef gen bölgesine spesifik restriksiyon enzimleriyle kesim yapılır, daha sonra jel elektroforezinde enzim kesim bölgelerinin modellerinin metilli-metilsiz kontrol DNA örneklerinin jel modelleriyle kıyaslanmasıyla metilasyon seviyeleri hakkında tespit yapılır.

COBRA - Combined Bisulfite Restriction Analysis



Şekil 2.3. COBRA yönteminin şematik diyagramı (Xiong ve Laird 1997)

2.7. ALX Genleri

Homeobox genleri tanımlanabilir bir protein domaini kodlayan DNA sekansına sahip embriyonik gelişimde önemli rol oynayan yüksek oranda korunmuş genlerdir. İnsan genomunda 11 sınıfa ve 100 gen ailesine ayrılan yaklaşık 200 homeobox geni tanımlanmıştır (Holland ve ark. 2007). Homeobox genleri çok fazla alt ve üst sınıfa ayrılmakla birlikte genel olarak hücrel süreçlerde ve gelişimde önemli rol oynayan ANTP (Antennapedia-Sınıfı Homeobox Genleri) ve PRD (Paired-Sınıfı Homeobox Genes) olmak üzere iki ana sınıf içermektedir (Galliot ve ark. 1999, Nam ve Nei 2005). Bu isimleri *Drosophila melanogaster* 'deki birtakım genlerden almaktadır. PRD sınıfı homeoproteinlerin bir kümesi aristaless domaini ile karakterize edilmektedir (Pérez-Villamil ve ark. 2004). ALX genleri de PRD sınıfına ait bir homeobox gen ailesidir (Holland ve ark. 2007). Ayrıca ilk olarak ALX ismi *Drosophila melanogaster* 'deki aristaless homeobox domaininden türetilmiştir (Beverdam & Meijlink, 2001).

ALX genleri bir homeobox tipi transkripsiyon faktörü ailesidir ve insanda 3 gen olarak bulunur: ALX1, ALX3 ve ALX4. Gelişim döneminde ekspresyon paternleri nöral krest, uzuv tomurcukları, vücut duvarı mezodermi ve branchial kemerlerin oluşturduğu kraniyal mezenkim dokularıdır (Beverdam ve Meijlink 2001, Pérez-Villamil ve ark.

2004). Dolayısıyla omurgalılarda embriyonik dönemde craniyofasiyal gelişim, temel polarizasyonun belirlenmesi, nöral tüp gelişimi (Q. Zhao ve ark. 1996), uzuv gelişimi ve oluşumunda (Qu ve ark. 1997) önemli rol oynamaktadırlar.

İnsanlarda bu *ALX* genlerindeki mutasyonlar genel olarak kraniyofasiyal malformasyonlara neden olmaktadır (Wuyts ve ark. 2000, Twigg ve ark. 2009, Uz ve ark. 2010). Özel olarak, *ALX1* mutasyonları ciddi frontanazal bozukluklara ve nöral tüp defektlerine yol açarken (Q. Zhao ve ark. 1996) *ALX3* mutasyonları bu bakımdan daha hafif bir fenotipe sebep olmaktadır. *ALX4* mutasyonları ise farklı saç gelişimi problemlerine sebep olmaktadır (Kayserili ve ark. 2009). Farede *ALX4* mutasyonları ise kraniyal kemik defektlerine, vücut duvarı malformasyonlarına ve insandan farklı olarak polidaktiliye neden olmaktadır (S. Qu ve ark. 1998, Takahashi ve ark. 1998).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar kanser hücrelerinin epigenomunda görülen birtakım değişikliklerin dolayısıyla promotor metilasyon düzeylerinin önemi gösterilmeye başlanmıştır (You ve Jones 2012, Shen ve Laird 2013, Bouras ve ark. 2019, Michalak ve ark. 2019).

Genom boyu metilasyon analizi yapılan tümör örneklerinde *ALX* ailesi genlerinin de metilasyon düzeylerinin ve ekspresyon seviyelerinin kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak farklı olduğu ve çeşitli kanserlerde biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Mori ve ark. 2011, Mahoney ve ark. 2012, Sun ve ark. 2018). Bazı kanserlerde (örneğin kolorektal kanserde) epigenomdaki anomalilikler ilaç direncine sebep olabilmektedir (Barretina ve ark. 2012). Bu epigenetik anomalileri tersine çevirecek ilaç kullanımı da kanser tedavisinde önem arz etmektedir.

2.7.1. *ALX3*

ALX3 embriyonik gelişim döneminde eksprese edilen aristaless benzeri homeobox genidir (Pérez-Villamil ve ark. 2004). Kraniyofasiyal gelişimde ve özellikle göz, burun ve frontanazal bölgenin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. *ALX3* mutasyonları bu bölgelerin gelişmesini engelleyerek Frontanazal Displazi I' e (FND I) (MIM#136760)

sebeptir (Twigg ve ark. 2009, Pham ve ark. 2011, Ullah ve ark. 2018). Benzer şekilde *ALX3* mutasyonları nöral tüp kapanmasını engelleyerek Nöral Tüp Defektlerine (NTD) de sebep olmaktadır (Lakhwani ve ark. 2010).

ALX genlerinin gelişim dönemlerindeki işlevlerinin bilinmesine rağmen hedef genleri tam olarak bilinmemektedir. İlginç bir şekilde yaklaşık 15 yıldır yapılan çalışmalarda *ALX3*' ün pankreatik adacıkların gelişiminde önemli rol oynayan genlerin (insülin gibi) ekspresyonunu düzenlediği görülmüştür (M. Mirasierra ve ark. 2011). Pankreastaki insülin, glukagon ve somatostatin ifade eden α , β ve δ hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir. *ALX3*, basic helix-loop-helix proteinleri ile (bHLH) –özellikle E47 ile etkileşerek pankreatik β hücrelerinde insülin gen promotoruna bağlanarak transkripsiyonunu düzenler. Böylece insülin *ALX3* için ilk hedef gen olarak belirlenmiştir (Mercedes Mirasierra & Vallejo, 2006). Benzer şekilde *ALX3*, GCK (Glikokinaz) ve glukagon genlerinin transkripsiyonunu da düzenlemektedir ve yapılan fare deneylerinde *ALX3* eksikliğinin glikoz homeostazını bozarak hiperglisemiye, apoptotik hücrelerin artmasıyla pankreatik adacık büyüklüğünün azalmasına ve aynı zamanda ileriki dönemlerde insülin direncine neden olduğu gösterilmiştir (M. Mirasierra ve ark. 2011). *ALX3* aynı zamanda glikoza bağımlı olarak pankreatik α hücrelerinde glukagon ekspresyonunu da düzenlemekte, *ALX3* eksikliği glukagon ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır (Mercedes Mirasierra & Vallejo, 2016).

2.8. *ALX* Genleri ve Kanser

ALX genleri yapılarındaki homeobox domaini sayesinde çeşitli genlerin promotor bölgelerine bağlanarak gen ifadelerini etkileyebilmektedir. Son dönemlerdeki çalışmalarda ise *ALX* genlerinin gelişim dönemlerindeki rollerinin yanı sıra promotor metilasyon düzeylerinin farklı kanser türlerinde biyobelirteç olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. *ALX1* metilasyon düzeyleri ağız kanserleri (Acquafreda ve ark. 2010), akciğer, (Sandoval ve ark. 2013) , meme (De Groot ve ark. 2014 ve 2016, akciğer, mide, böbrek, meme ve karaciğer çoklu kanserlerinde (Ohara ve ark. 2017) ve glioblastomada (Zhao ve ark. 2019) biyobelirteç olarak işaret edilmiş ve kontrol grubuna göre hipermetile olarak ifadesinin azaldığı, buna karşın over (Yuan ve

ark. 2013), osteosarkom (M. Yang ve ark. 2015) ve bazı akciğer tümör dokularında (Yao ve ark. 2015) ifadesinin arttığı bildirilmiştir. Benzer şekilde metilasyondan bağımsız olarak melanomada (Jiao ve ark. 2019) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (G. Wang ve ark. 2020) overeksprese olduğu bildirilmiştir.

ALX4 metilasyon düzeyleri kolorektal (Ebert ve ark. 2006, Zou ve ark. 2007, He ve ark. 2010, Tänzler ve ark. 2010, Kim ve ark. 2011, Shull ve ark. 2013, Amiot ve ark. 2014, Perez-Carbonell ve ark. 2014, Salehi ve ark. 2015, Rasmussen ve ark. 2016, 2017, Sambuudash ve ark. 2017, Sobhani ve ark. 2019, Bach ve ark. 2021, Sobanski ve ark. 2021), mide (Chen ve ark. 2012), akciğer (W. Bin Liu ve ark. 2014, Song ve ark. 2020), over (Yuan ve ark. 2015), mesane (Yu ve ark. 2007, Deng ve ark. 2015), hepatoselüler (Shi ve ark. 2017, Ji Zhao ve ark. 2019 , Lu ve ark. 2020, Xu ve ark. 2020), pankreas (Henriksen ve ark. 2017), meme (J. Yang ve ark. 2017) ve tiroid (X. Zhao & Hu, 2019) kanserlerinde biyobelirteç olarak işaret edilmiş, hipermetile olarak ifadesinin azaldığı bildirilmiştir. Metilasyondan bağımsız olarak farklı meme kanserlerinde *ALX4* overekspresyonu (Gu ve ark. 2020) ve *ALX4* ekspresyon kaybı (Chang ve ark. 2009 , Zhu ve ark. 2020) bildirilirken; medullablastomada (Koso ve ark. 2014), mide kanserinde (Ghasemvand ve ark. 2016) ve osteosarkomda ise *ALX4* upregülasyonu (Xie ve ark. 2018) bildirilmiştir.

ALX3 metilasyon düzeyleri hakkında yapılan çalışmaların sayısı ise daha az görülmekte olup; nöroblastoma (Wimmer ve ark. 2002), kolorektal (Mori ve ark. 2011), rabdomiyosarkom (Mahoney ve ark. 2012) kanserlerinde hipermetile olduğu ve ifadesinin azaldığı, hepatoselüler karsinomda (Sun ve ark. 2018) ve rahim ağzı kanserinde (Qi ve ark. 2021) ise ifadesinin bir miktar arttığı belirtilmiştir.

2.8.1. *ALX3* ve kanser ilişkisi

Özellikle 2000 yılı sonrası yapılan birtakım çalışmalar bazı kanserlerde *ALX3*' ün CpG bölgelerininin farklı metilasyon profili sergilediği bulunmuştur. Nöroblastom hücre hatlarında ve tümör dokularında yapılan sanal genom taramalarında *ALX3* geninde promotor hipermetilasyonu ve gen ekspresyonunda baskılanma gözlenmiştir (Wimmer

ve ark. 2002). Kolorektal kanserli tümör dokularında yapılan mikroarray tabanlı metilasyon taramasında *ALX3*' ün hipermetile olduğu ve biyobelirteç olarak belirlendiği gösterilirken (Mori ve ark. 2011), genom boyu metilasyon taramaları sonucunda rabdomayosarkomlu tümör dokularında ve hücre hatlarında *ALX3*' ün hipermetile olduğu (Mahoney ve ark. 2012); hepatoselüler karsinomda yapılan *in silico* genom boyu metilasyon taramasında da normale göre farklı eksprese edildiği ve hipermetilasyon profili sergilediği gözlenmiştir (Sun ve ark. 2018). Rahim ağzı kanserinde de yine ifadesinin arttığı bildirilmiştir (Qi ve ark. 2021). *ALX3* geni metilasyon farklılıkları ve buna bağlı olarak gen ekspresyonunda değişiklik görülen kanserler temel olarak Çizelge 2.1' de belirtilmiştir.



Çizelge 2.1. *ALX3* geni metilasyon farklılıkları ve buna bağlı olarak gen ekspresyonunda değişiklik görülen kanserler (**VGS:** sanal genom taraması, **DAMD:** metilasyon farklılıklarının denatürasyon analizi)

Kanser Tipi	Kullanılan Örnekler	Kullanılan Yöntem	Sonuç	Referans
Nöroblastoma	SH-SY5Y, IMR-32, MHH-NB-11 ve KCNR hücre hatları ile kontrol ve nöroblastoma tümör dokuları	RLGS VGS Northern Blot RT-PCR	Nöroblastoma tümörlerinde <i>ALX3</i> metilasyonunda artış (hipermetilasyon) ile birlikte ifadesinde düşüş gözlenmiştir.	(Wimmer ve ark. 2002)
Kolorektal Kanser	Kontrol ve tümör dokuları	Metilasyon Microarray Analizi MSP RT-PCR	Kolorektal kanser hücrelerinde <i>ALX3</i> geni dahil 14 gende kontrol grubu olan neoplastik olmayan kolorektal hücrelerine kıyasla hipermetilasyon gözlenmiştir.	(Mori ve ark. 2011)
Rabdomयो-sarkoma	RD, RhJT, Rh18 ve Rh30 hücre hatları ve tümör dokuları	DAMD Bisülfid dönüşümü RT-PCR Sekanslama	RMS hücre hatları ve tümör dokularında <i>ALX3</i> geni dahil birçok genin promoter CpG adalarında anormal DNA hipermetilasyonu gözlenmiştir.	(Mahoney ve ark. 2012)
Hepatoselüler Karsinoma	<i>In silico</i> analiz	Hepatoselüler karsinoma DNA ekspresyonu ve metilasyon verileri TCGA (Kanser Genom Atlası) 'dan indirilmiştir. Diferansiyel analiz yapılmıştır.	HCC tümör grubunun eşleşen adjacent dokuya kıyasla hipermetile olduğu gösterilmiştir. <i>ALX3</i> geni de dahil 14 farklı gen, kontrol gurubuna kıyasla az miktarda upregüle olmuştur.	(Sun ve ark. 2018)
Rahim Ağzı Kanseri	<i>In silico</i> analiz, CSCC ve normal hücre hatları	RT-PCR Western blot	<i>ALX3</i> ekspresyonu kanser hücre hatlarında artmıştır.	(Qi ve ark. 2021)

2.9. mRNA (Mesajcı Ribonükleik Asit) İfadesinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

2.9.1. Gerçek-Zamanlı PCR

Bu çalışmamızda gen ifade düzeylerinin belirlenmesinde temel olarak kullandığımız kantitatif PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) olarak da bilinen Gerçek-Zamanlı PCR yöntemi, ilk olarak 1990'ların başında kullanılmaya başlanmış olup (Higuchi ve ark. 1992, 1993) ileriki yıllarda ve halen günümüzde de sıklıkla kullanılmaya devam etmekte olan, hedef DNA'nın amplifikasyonu ve eş zamanlı olarak DNA miktarının da ölçülebildiği bir tekniktir (Singh & Roy-Chowdhuri, 2016). Gerçek-Zamanlı PCR' da hedef DNA molekülünün çoğaltılması sırasında kullanılan probler veya floresan boyalar da çoğalır ve böylece oluşan sinyal okunarak ürünün ne kadar çoğaldığı analiz edilebilir. Yapılan çoğaltma ve okuma işlemi kapalı bir tüp içerisinde gerçekleştiği için kontaminasyon riski de azdır. Bu sayede çok az miktardaki bir örnek bile hızlı, hassas ve kontaminasyon riski az olacak şekilde güvenilir olarak çalışılabilir.

Bu yöntemde kantitatif çalışmalar diziye özgül ve özgül olmayan saptama olarak ikiye ayrılmaktadır. Diziye özgül olmayan yöntemde çift zincirli floresan boyalar kullanılmakta olup en yaygın ve basit olanı SYBR Green I' dir. Bu floresan boya çift iplikli DNA'ya bağlanır, amplifikasyona paralel olarak okunan floresan sinyal de eş zamanlı olarak artış gösterir. Böylece DNA konsantrasyonları ölçülebilir. Basit bir yöntem olmasına karşın sadece ortamdaki hedef PCR ürünlerine değil diğer çift iplikli DNA moleküllerine de bağlanabildiği için istenmeyen PCR ürünlerinin de çoğaltılmasına ve yanlış sonuç elde edilmesine yol açabilen bir yöntemdir (Zipper ve ark. 2004).

Bu yöntemde kullanılan primerlerin dimer yapmamasına ve cDNA' ya (komplementer DNA) özgü olmasına dikkat edilmelidir (Rodríguez ve ark. 2015). Böyle bir durum olma ihtimaline karşı Gerçek-Zamanlı PCR' da çoğaltılan DNA'nın hedef DNA olup olmadığını anlayabilmek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmaktadır. Her çift iplikli DNA'nın kendine özgü Tm (Erime Sıcaklığı -çift iplikli DNA'nın %50'sinin tek iplikli hale geçmesi için gerekli sıcaklık-) değeri vardır. PCR amplifikasyonu sonrası sıcaklık kademeli olarak yükseltilir ve floresan miktarı kaydedilir. Erime eğrisi

analizi yapılarak Tm değeri hesaplanır. Başlangıçta ortama eklenen pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak PCR ürününün özgül olup olmadığı anlaşılabilir (Ririe ve ark. 1997). Bu yöntem mutlak niceleme olarak da bilinir. (Livak & Schmittgen, 2001).

Gerçek-Zamanlı PCR' da yapılan diğer bir kantitatif çalışma yöntemi de özgül olan problarla saptamadır. Bu yöntemde TaqMan problemleri (hidroliz problemleri), hibridizasyon problemleri veya moleküler boncuk yöntemleri kullanılabilir. Bu problemler de yine floresan işaretlidir (raportör-baskılayıcı, donör-acceptor) ancak ilgili prob dizisini içeren DNA bölgesinin amplifikasyonu sırasında primerin uzamasına bağlı olarak ışımaya neden olur.

PCR yöntemi arkaplan fazı, log fazı ve plato fazı olmak üzere üç fazdan oluşur (Prada-Arismendy & Castellanos, 2011). Gerçek-Zamanlı PCR' da ölçüm bir eşik değere göre yapılır, bu eşik değeri (Ct) ürünün oluşturduğu spesifik floresan sinyalinin arkaplan floresan sinyalini geçtiği değerdir. Miktar tayini için yaygın olarak bu Ct değerinin kullanıldığı $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılır. Yöntemin açılımı ve şematik diyagramı Şekil 2.4' te belirtildiği gibi olup bu yöntem nispi nicelendirme olarak da bilinmektedir (Livak & Schmittgen, 2001). $2^{-\Delta\Delta CT}$ yönteminde temel olarak seçilen referans bir gene göre hedef genin ekspresyonundaki değişiklikler belirlenir (Rao ve ark. 2013).

Gen ifadesini analiz etmek için normal koşullarda bir organizmanın her hücresinde sabit bir şekilde ifade olan aynı zamanda housekeeping genler olarak da bilinen referans genler kullanılır (Eisenberg & Levanon, 2013). Son yıllarda GAPDH (Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz) ve beta-actin genleri bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır (Radonić ve ark. 2004, Kozera ve Rapacz 2013). Bu referans genler kullanılarak örnekler arasındaki gen ifadesi miktarları karşılaştırılır.

Akciğer dokusu için kullanılan bazı referans genler ise şu şekildedir: GAPDH (Minn ve ark. 2005, Silvia ve ark. 2006, Jen ve ark. 2017, Marco ve ark. 2017, Saxon ve ark. 2018), endojen UBC (ubikitin C) (Cooke ve ark. 2019), beta-actin (X. Xu ve ark. 2020), tubulin (Minn ve ark. 2005).

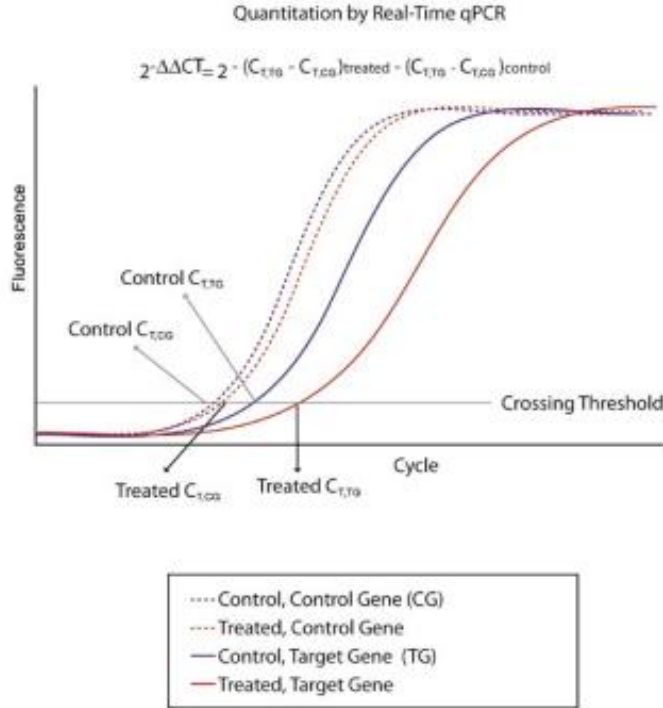
Bu yöntemin dayandığı iki varsayım şu şekildedir: reaksiyonun %100 verimli bir şekilde çalışması, örnekler arasında referans gen kullanılmasıdır (Livak ve Schmittgen 2001, VanGuilder ve ark. 2008).

Eğer kullanılan primerin verimliliği %100 değilse yani reaksiyon tam verimle çalışmıyorsa o zaman Pfaffl Metodu ile reaksiyon verimliliği hesaplanır (1,1) (Pfaffl, 2001).

$$\Delta Ct = [(E_{\text{hedef}})^{\Delta Ct_{\text{hedef}} (\text{kontrol-örnek})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{referans}} (\text{kontrol-örnek})}] \quad (1,1)$$

Bu formüldeki E değeri PCR reaksiyonunun verimliliğini göstermektedir. Bu değeri hesaplamak için reaksiyon her primer çifti için cDNA örnekleri (1-1:100 000 seyreltme) dilüe edilerek gerçekleştirilir. Daha sonra bu seyreltme serisindeki her örneğin log10 türevinden miktarına karşılık gelen Ct değerleri kullanılarak bir grafik elde edilir. Bu grafiğin eğim değeri kullanılarak ($E=10_{(-1/\text{eğim})}$) formülü ile primerlerin/reaksiyonun verimliliği hesaplanır.

Gerçek-Zamanlı PCR’da kullanılacak primer ve problemlerin tasarımına dikkat edilmelidir, bu durum amplifikasyon verimliliğini artırır. Önemli bir özellik primerlerin uzunluğudur. Kullanılacak primerler 16-28 nükleotit olmalıdır. Daha uzun primerler dimerlere ve ikincil yapılara sebep olurken, daha kısa primerler PCR özgüllüğünü değiştirmektedir. Tm değeri de uygun primer tasarımı için önemlidir. Her iki primer aynı Tm değerine sahip olmalı ve bu değer genellikle 58-60 °C aralığında seçilmelidir. Amplifiye edilen ürün 100-250 bp aralığında bulunmalı, GC içeriği ise %35-65 olmalıdır. Düşük miktarda GC içeriği bağlanan primer oranında azalmaya sebep olurken yüksek miktardaki GC içeriği ise yanlış hizalanmaya ve yanlış ampikon sentezine neden olabilir (Prada-Arismendy & Castellanos, 2011).



Şekil 2.4. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yönteminin açıklımı ve şematik diyagramı (VanGuilder ve ark. 2008)

2.9.2. Northern blot

Northern blot, ilk olarak 1977 yılında elektroforezde ayrılan RNA (Ribo Nükleik Asit)'ların jelden membrana aktarım tekniği adıyla geliştirilen gen ifadesinin belirlenmesinde kullanılan temel bir yöntemdir (Alwine ve ark. 1977). Genel olarak doku veya hücrelerdeki total RNA izole edilir. Daha sonra RNA örnekleri genellikle % 1.2 agaroz jelde (Kroczek, 1993) ayrılır. Ayrılan RNA örnekleri naylon veya nitroselüloz membrana aktarılır ve tek sarmallı hedef gen ürünü RNA'ya komplementer çoğunlukla radyoaktif etiketli problarla hibridize edilir (Sabelli & Shewry, 1995). Hibridize olmayan problemlerin arka plan sinyallerini önlemek için membran yıkanır. Daha sonra membrandaki hibridize olan RNA örneklerinin hedef gen ürünü olup olmadığı otoradyografiyle tespit edilir (Şekil 2.5.).

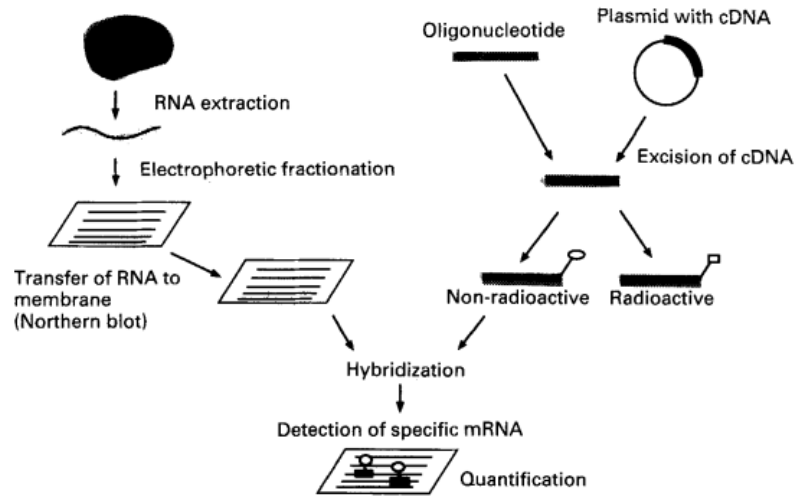


Fig. 1. A schematic representation of Northern blotting.

Şekil 2.5. Northern blot şematik diyagramı (Trayhurn, 1996)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X) (10000 U/ml penisilin,10.00 mg/ml streptomisin, 9.00 mg/ml sodyum klorid), Cegrogen-biotech
- MEM (Minimum Esasential Medium) Nonessential Amino Asit (100X), Diagonovum
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Gibco
- Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit K1820-01, ThermoFisher Scientific
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit K1622, ThermoFisher Scientific
- Monarch T2010S Total RNA Miniprep Kit, NEB
- Epimark E3318S Bisulfite Conversion Kit, NEB
- Luna Universal qPCR Master Mix M3003S, NEB
- DreamTaq DNA Polimeraz EP0702, ThermoFisher Scientific
- dNTP mix N0447S, NEB
- Primerler-(ALX3) , sentebiolab
- TaqI-v2 R0149S, NEB
- Marker, N3233S NEB
- Methylated Human Control DNA N1231, Promega
- HeLa Genomic DNA (Serviks Adenokarsinoma) N4006S, NEB
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco
- 0.05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit 1X (Tripsin-EDTA), Gibco
- Etanol (%96-100), Merck
- NaOH (Sodyum Hidroksit), Fisher Scientific, UK
- Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA-Dihydrate), Bioshop
- Tris Base, Fisher Scientific
- Boric Asit, Bioshop
- Agaroz, Prona Basica Le
- DNA yükleme boyası, abm G030
- Etidyum Bromür, Merck

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Steril Santrifüj Tüpleri 15 ml, Nest
- Steril Santrifüj Tüpleri 50 ml, Nest
- 25cm² ve 75cm²'lik flask, Sunub
- 1,5 ml Steril Nüclelease-free mikrofüj tüpleri (Ependorf) , Isolab
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Genject
- 10 µl pipet uçları, Biopointe scientific
- 100 µl pipet uçları, Biopointe scientific
- 200 µl pipet uçları, Vertex
- 1000 µl pipet uçları, Isolab
- 0,2 ml PCR tüpleri, ThermoFisher Scientific
- 0.1 ml RT-PCR tüpleri ve kapakları, ThermoFisher Scientific
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Isolab
- Mezür 100 ml-1000 ml, SUPERIOR MARIENFELD
- Erlen 250 ml, S&H labware
- Parafilm, PARAFILM

3.1.3. Kullanılan cihazlar

- Steril Kabin, Fagus
- -80 °C Dondurucu, HARRIS
- -20 °C Dondurucu, Arçelik
- Sıvı azot tankı, International Cryogenics, Inc. IC 20D
- 10 µl mikropipet, Nichipet EX-Plus II
- 10 µl mikropipet, JENCONS SEALPETTE
- 100 µl mikropipet, RAININ
- 1000 µl mikropipet, RAININ
- Santrifüj, NÜVE- NF-800R
- Aspiratör, Value- VE115N
- CO₂ inkübatörü (%5 CO₂ ; 37 °C), Panasonic
- Inverted mikroskop, Euromex- CMEX PRO 5
- Mikrosantrifüj, Microfuge 16- Beckman Coulter

- Vortex, VELP Scientifica
- Vortex, Vortex-Genie2 –Scientific Industries
- Nanodrop, ThermoFisher Scientific NANODROP 2000
- Kuru hava sterilizatörü, NÜVE- FN-500
- Hassas terazi, Radwag AS220/C/2
- pHmetre, Adwa AD1000
- Mikrodalga, Arçelik MD564
- Mini jel elektroforez sistemi, ThermoFisher Scientific OWL EASYCAST B1-BP
- Elektroforez güç kaynağı, life technologies PowerEase 90W
- Ultraviyole (UV) görüntüleme cihazı, Major Science UVDI
- Termal döngüleyici PCR Cihazı, MJ RESEARCH ,INC. PTC-100
- Mikrosantrifüj, Scanspeed mini, Labogene
- Isı bloğu, Thermo Block TDB-120- Biosan
- Etüv, nüve FN-500
- Distile su cihazı, MILLIPAK 20 MILLIPORE
- Manyetik karıştırıcı, Biosan
- Buz makinası, Biobase FIM20
- Güç kaynağı, Tescom Neoline 2000
- Gerçek-Zamanlı PCR, StepOnePlus ThermoFisher Scientific

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

BURSA Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Ferda ARI' dan temin edilen A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatları bu tez çalışmasında kullanılmış olup kriyoviyaller içerisinde -80 °C dolaplarda saklanmıştır. A549 (İnsan Adenokarsinomik Alveolar Bazal Epitel Hücreleri) ve H1299 (İnsan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu Hücreleri) hücre hatları insan akciğer kanseri hücre hatları olup Beas-2B (İnsan Bronşiyal Normal Epitel Hücreleri) normal akciğer dokusu hücre hattıdır ve kontrol amaçlı kullanılmıştır.

3.2.2. Hücre kültürü için kullanılan besiyerinin hazırlanması

A549 ve H1299 hücre hatları için %10 FBS (PAA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X- 10000 U/ml penisilin,10.00 mg/ml streptomisin, 9.00 mg/ml sodyum klorid, Cegrogen-biotech) ve %1 L-Glutamin içeren RPMI (1640, Gibco) solüsyonu kullanılmıştır.

Beas-2B hücre hattı için %10 FBS (PAA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X- 10000 U/ml penisilin,10.00 mg/ml streptomisin, 9.00 mg/ml sodyum klorid, Cegrogen-biotech), %1 MEM Nonessential Amino Asit (100X, Diagonvum) ve %1 L-Glutamin içeren RPMI (1640, Gibco) solüsyonu kullanılmıştır.

3.2.3. Hücre hatlarının stoktan çıkartılması

Hücreler -80 °C' den çıkartılarak oda sıcaklığındaki bir su banyosunda hızlıca çözdürüldü. Hücre süspansiyonları (yaklaşık 1 ml) her hücre hattı için hazırlanan 5 ml RPMI besiyeri içerisine konuldu. 1000 rpm' de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilen falkon tüpün üzerindeki süpernatant aspire edildi. Hücre pelleti üzerine 10 ml besiyeri eklendi ve pipetaj ile süspansiyon edildi. Her hücre hattı için DNA ve RNA izolasyonunda kullanılmak üzere 2'şer flaska 5'er ml bu solüsyondan 25 cm²' lik flasklara alınarak 37 °C %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. İnvazif tümörler daha hızlı çoğalma eğilimindedirler, normal doku hücreleri ise daha yavaş çoğalırlar bundan dolayı A549 ve H1299 hücre hatları 4 gün inkübe edilirken Beas-2B hücre hattı 1 hafta inkübe edilmiştir.

3.2.4. Hücre hatlarından DNA izolasyonu

25 cm²' lik flasklara ekilen A549, H1299 ve Beas-2B hücrelerinin tamamı (yaklaşık 5x10⁶ hücre) DNA izolasyonu için kullanıldı. A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarından DNA, Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit (K1820-01) kullanılarak izole edildi. Deneye başlamadan önce ısı bloğu 55 °C'ye ayarlandı. Yıkama Tamponu solüsyonlarına kitin talimatlarına göre etanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Flasklardaki hücreler (yaklaşık 5x10⁶ hücre) iki kez Fosfat-Tuz Tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra 1 ml tripsin kullanılarak tripsinizasyon ile kaldırıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika

santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelletin üzerine 200 µl Fosfat-Tuz Tamponu eklenerek hücreler süspansiyon haline getirildi. Solüsyon steril bir ependorfa aktarıldı. Bu aşamaya kadar olan tüm işlemler steril kabin içinde yapıldı. Ependorftaki hücre süspansiyonu üzerine 20 µl proteinaz K ve 20 µl RNaz A eklendi. Kısaca vorteks yapılarak oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından üzerine 200 µl Lysis / Binding Tamponu eklendi, kısaca vorteks yapılarak 55 °C'ye ayarlanan ısı bloğunda 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplere 200 µl etanol eklenip köpürmeyecek şekilde 5 saniye pipetaj yapılarak karışması sağlandı. Solüsyon (yaklaşık 640 µl) kitin içerisinden çıkan spin kolonlarına aktarıldı. Oda sıcaklığında 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından spin kolon kitin içerisinden çıkan temiz bir toplama tüpüne alındı. 500 µl Yıkama Tamponu 1 eklenerek oda sıcaklığında 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolon temiz bir toplama tüpüne alınıp üzerine 500 µl Yıkama Tamponu 2 eklenerek oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi. Spin kolon steril 1.5 ml ependorf tüpe aktarılarak üzerlerine 100 µl Elüsyon Tamponu eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. DNA'nın spin kolondan tam ayrılmasını sağlamak için iki aşamalı elüsyon yapıldı. Bunun için 100 µl daha Elüsyon Tamponu eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip maksimum hızda 1.5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen toplama tüpleri etiketlendi, nanodropla ölçüm yapıldıktan sonra örnekler -20 °C'de saklandı.

- DNA örneklerinin nanodrop ile ölçülmesi

DNA örnekleri ölçülmeden önce nanodrobin bilgisayarındaki program açıldı ve örnek adı vb. bilgiler girildi. DNA izolasyonunda elüsyon için Elüsyon Tamponu kullanıldığından blank olarak 1 µl bu tampon çözelti okutuldu. Sonra her DNA örneğinden 1 µl kullanılarak ölçüm gerçekleştirildi.

3.2.5. İzole edilen DNA örneklerinin jel elektroforezi

Elektroforez için hazırlık aşaması süresinde DNA örnekleri çözünmesi için -20 °C' den buz aküsüne alındı. İlk olarak 10X stok TBE (Tris-Boric Asit-EDTA) solüsyonu hazırlandı. Bunun için önce 10X stok TBE solüsyonunda kullanılacak 0.5 M EDTA

hazırlandı. 37 g disodyum EDTA hassas terazide tartıldı ve cam bir kaba alındı. Üzerine distile su eklenerek 200 ml'ye tamamlandı. pH metre ile pH=8 civarı olana kadar 10 M NaOH solüsyonundan damla damla eklendi. Toz EDTA' nın çözünmesi sağlandı. 10 X TBE için; 108 g Tris Base, 55 g Boric Asit hassas terazide tartılıp 1 litrelik mezüre alındı. Az bir miktar distile su ile çözüldü ve manyetik karıştırıcıya alındı. Partiküller tamamen çözüldükten sonra 40 ml 0.5 M EDTA eklendi ve 1 litreye tamamlandı.

10 X stok TBE solüsyonundan 1X working TBE solüsyonu hazırlamak için 100 ml 10 X TBE ve 900 ml distile su karıştırıldı.

%1'lik agaroz jel hazırlamak için 0.5 g agaroz tartıldı ve 250 ml'lik erlenmayere alındı. Üzerine oda sıcaklığındaki 50 ml 1 X TBE ve 10 ml distile su eklendi. Mikrodalga fırının en yüksek derecesinde ara ara çalkalayarak 2 dakika ısıtıldı. Toz eriyince jel biraz soğuduktan sonra içine 1 µl Etidyum Bromür (10 mg/ml) eklendi. Jel kıvam alınca mini elektroforez tankına döküldü ve tarak yerleştirildi. Jel donunca tarak yavaşça çıkarıldı ve üzerini kaplayıncaya kadar 1X TBE eklendi. DNA örneklerinden 3 µl ve DNA yükleme boyasından (6X) 1 µl alınıp pipetaj yapıldıktan sonra kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağı bağlandı ve DNA örnekleri 100 voltta yaklaşık 1 saat yürütüldü. Daha sonra UV görüntüleme sisteminde fotoğraflandı.

3.2.6. Bisülfite modifikasyonu

A549, H1299 ve Beas-2B DNA örnekleri ve kontrol olarak kullanılacak HeLa Genomik DNA (NEB N4006S) ile Methylated Human Control DNA (Promega N1231) örneklerine NEB Epimark Bisülfite Conversion Kit (E3318S) kullanılarak bisülfite dönüşümü yapıldı.

Deney öncesinde DNA örnekleri çözümleri için buz aküsüne alındı. Kitin talimatlarına göre Yıkama Tamponuna 40 ml ve Desulphonation Reaction Tampon konsantresine 27 ethanol eklendi. Bisülfite mix için kitte sağlanan katı sodyum metabisülfite 650 µl nükleaz-free su ve 250 µl Solubilization Tamponu eklendi ve katı sodyum metabisülfitin iyice çözünmesi için 2-5 dakika vorteks yapıldı ve 55-60 °C'de 1 dakika ısıtıldı. 0.2 ml'lik PCR tüpleri etiketlendi ve tüplere her reaksiyon için 10 µl

DNA ve 130 µl Bisülfite mix konularak pipetaj yapıldı. PCR cihazı aşağıdaki programa ayarlandı ve program çalıştırıldı.

Denatürasyon: 95 °C 5 dakika

İnkübasyon: 65 °C 30 dakika

Denatürasyon: 95 °C 5 dakika

İnkübasyon: 65 °C 60 dakika

Denatürasyon: 95 °C 5 dakika

İnkübasyon: 65 °C 90 dakika

Hold: 18 °C 12 saat

Reaksiyonun ardından her tüpteki karışım ayrı ayrı 1.5 ml'lik ependorflara alındı ve üzerlerine 500 µl DNA Binding Tampon eklenip pipetaj yapıldı. Solüsyonun tamamı kiste sağlanan spin kolonlarına aktarıldı. 15.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki kısım atıldı ve 500 µl Yıkama Tamponu eklenerek 15.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki kısım atıldı ve 500 µl Desulphonation Reaction Tampon eklenip oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Ardından 15.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki kısım atıldı. Üzerine 500 µl Yıkama Tamponu eklendi ve 15.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki kısım atılarak yıkama adımı tekrarlandı. Spin kolonlar steril 1.5 ml'lik ependorflara alındı. 20 µl Elüsyon Tamponu eklenip 15.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. 20 µl Elüsyon Tamponu daha eklenip 15.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Hazırlanan bisülfite mix, DNA ve bisülfite modifiye DNA'lar -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.7. Bisülfite modifiye DNA örneklerine PCR yapılması

A549, Beas-2B, H1299, HeLa Genomik DNA ve Methlylated Human Control DNA bisülfite modifiye DNA örnekleri ilk olarak 500 ng olacak şekilde hesaplanarak PCR ile çoğaltıldı. Kullanılan primerler ve özellikleri Çizelge 3.1.' de, genomik sekansta denk geldiği yerler ise Şekil 3.1. ve Şekil 3.2. 'de belirtilmiştir. PCR için gerekli bileşenler Çizelge 3.2 'de belirtildiği gibi olup her bir hücre hattı için hesaplanarak mix buz üzerinde oluşturulup spin down ile çöktürüldü. Ardından her hücre hattı için 500 ng' a

göre hesaplanan bisülfite modifiye DNA miktarları Çizelge 3.3.' te verildiği gibi tüplere eklendi ve spin down ile çöktürülerek PCR cihazına konuldu.

PCR programı;

95 °C 5 dk

95 °C 30 sn

50 °C 30 sn

72 °C 40 sn

4 °C hold

35 döngü

Çizelge 3.1. COBRA ve nested PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ve özellikleri

Primer Adı	Sekans (5'-3')	Skala	Tm (°C)
ALX3C(F)	TTT GAG TTG TTT GGG ATT GG	200 nmol	47.68 °C
ALX3C(R)	CTC TAA AAA ATA AAA CTC CAA AAA CC	200 nmol	50.08 °C
ALX3C2(F)	TGG ATG GTT TTA GTA TTA AGT TAG A	200 nmol	54.8 °C
ALX3C3(R)	CAC ACT AAC CTT TAC CTA ACC C	200 nmol	58.4 °C

Çizelge 3.2. PCR reaksiyonu mix bileşenleri

PCR mix bileşenleri	Final Konsantrasyon	1 rxn
dNTP (10 mM)	0.2 mM	0.5 µl
Buffer (10X) (20 mM MgCl ₂)	1X, 2.0 mM MgCl ₂	2.5 µl
Taq Polymerase (5U/µl)	1U	0.2 µl
Forward Primer (ALX3C(F)) – (10 pmol/µl)	10 pmol/ µl	1.0 µl
Reverse Primer (ALX3C3(R)) - (10 pmol/µl)	10 pmol/ µl	1.0 µl
Total Hacim	-	5.2 µl

Çizelge 3.3. PCR reaksiyonuna eklenen bisülfite modifiye DNA miktarları

	A549	Beas-2B	H1299	Methylated Control	HeLa Control	Negatif Control
Bisülfite modifiye DNA (-500 ng)	5.4 µl	3.58 µl	5.8 µl	1.96 µl	5.0 µl	0 µl
Nükleaz-free su	14.44 µl	16.22 µl	14.0 µl	17.84 µl	14.8 µl	19.8 µl
PCR mix	5.2 µl	5.2 µl	5.2 µl	5.2 µl	5.2 µl	5.2 µl
Total Hacim	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

3.2.8. 500 ng'lık PCR ürünlerine nested PCR yapılması

İlk olarak 500 ng'a göre çoğaltılan PCR ürünleri daha sonra başka primer çifti kullanılarak nested PCR ile tekrar çoğaltıldı. Bunun için ilk olarak 500 ng olarak çoğaltılan PCR ürünleri 1:3 oranında nükleaz-free su ile sulandırıldı. Nested PCR reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.4. 'te verildiği gibi olup her bir hücre hattı için bu miktarlara göre mix buz üzerinde hazırlandı ve ardından ilgili her tüpe 1:3 oranında sulandırılan 500 ng 'lık PCR ürünlerinden eklendi. Ardından tüpler spin down ile santrifüj edilerek PCR cihazına konuldu.

PCR programı;

95 °C 5 dk

95 °C 30 sn

50 °C 30 sn

72 °C 40 sn

4 °C hold

35 döngü

Çizelge 3.4. Nested PCR reaksiyonu mix bileşenleri

Nested PCR mix bileşenleri	Final Konsantrasyon	1 rxn
dNTP (10 mM)	0.2 mM	0.5 µl
Buffer (10X) (20 mM MgCl ₂)	1X, 2.0 mM MgCl ₂	2.5 µl
Taq Polymerase (5U/µl)	1U	0.2 µl
Forward Primer (ALX3C2(F)) – 10 pmol/ µl	10 pmol/ µl	1.0 µl
Reverse Primer (ALX3C(R)) – 10 pmol/ µl	10 pmol/ µl	1.0 µl
1:3 oranında sulandırılan 500 ng'lık PCR ürünleri	-	3 µl
Nükleaz-free su	-	16.8 µl
Total Hacim	-	25.0 µl

3.2.9. PCR ve nested PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

PCR ürünleri 1 µl etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 1X TBE kullanılarak 120 voltta yaklaşık 1.5 saat yürütüldü. Daha sonra UV görüntüleme sisteminde fotoğraflandı.

Yükleme sırasında PCR ürünlerinden 5 µl alınıp 1 µl yükleme boyasıyla karıştırıldı. Markerdan (New England Biolabs, N3233S) ise 2 µl alındı, 3 µl su ve 1 µl yükleme boyasıyla karıştırıldı.

3.2.10. Nested PCR ürünlerine enzim kesimi yapılması

Nested PCR ürünlerine enzim kesimi yapmak için her bileşen buz üzerine alındı. Her reaksiyon için 0.1 µl *TaqI*-v2 restriksiyon enzimi ve 5 µl 10 X Buffer olacak şekilde enzim mix hazırlandı. Ardından Çizelge 3.5. 'teki miktarlara göre nested PCR ürünleri ve toplam hacim 50 µl olacak şekilde nükleaz-free su içeren tüplere enzim mixinden dağıtılarak 65 °C 15 dk PCR cihazında inkübe edildi. Ardından enzim kesimi ürünleri %2 'lik agaroz jelde 120 voltta yaklaşık 1.5 saat yürütülüp fotoğraflandı. Yükleme sırasında enzim kesimi ürünlerinden 25 µl alınıp 5 µl yükleme boyasıyla karıştırıldı. Markerdan ise 2 µl alındı, 3 µl su ve 1 µl yükleme boyasıyla karıştırıldı.

Çizelge 3.5. Enzim kesimi reaksiyon bileşenleri

	A549	Beas-2B	H1299	Methylated Control	Hela Control	Negatif Control
Nested PCR ürünü	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	0 µl
Enzim mix	5.1 µl	5.1 µl	5.1 µl	5.1 µl	5.1 µl	5.1 µl
Nükleaz-free su	24.9 µl	34.9 µl	34.9 µl	34.9 µl	34.9 µl	44.9 µl
Total Hacim	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

3.2.11. Nested PCR ve enzim kesimi ürünlerinin yan yana jele yüklenmesi

Tüm ürünlerin yanyana yüklenmesi için önce %3' lük agaroz jel hazırlandı. 1.5 µl etidyum bromür içeren 1X TBE içerisinde 120 voltta yaklaşık 2 saat yürütüldü.

Yükleme sırasında enzim kesimi ürünlerinden 20 µl alınıp 4 µl yükleme boyasıyla karıştırıldı. Nested PCR ürünlerinden 5 µl ve 1 µl yükleme boyası karıştırıldı. Markerdan ise 2 µl alındı, 3 µl su ve 1 µl yükleme boyasıyla karıştırıldı.

Yürütme sonrası bant yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.12. Hücre hatlarından RNA izolasyonu

25 cm²' lik flasklara ekilen A549, H1299 ve Beas-2B hücrelerinin tamamı (yaklaşık 3,5 x10⁶ hücre) RNA izolasyonu için kullanıldı. A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarından RNA Monarch NEB Total RNA Miniprep Kit (T2010S) kullanılarak izole edildi. Deneye başlamadan önce kitin talimatlarına göre Yıkama Tamponu solüsyonuna etanol eklendi ve iyice karıştırıldı. DNaz I ise kitin talimatlarına göre nükleaz-free su ile çözüldü. Her hücre hattı için DNaz I'den 5 µl ve DNaz I Reaction Tamponu'ndan 75 µl olmak üzere hesaplanarak birleştirildi. RNA Lysis Tamponu ısıtıldı. Flasklardaki hücreler (yaklaşık 3,5 x10⁶ hücre) iki kez Fosfat-Tuz Tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra 1 ml tripsin kullanılarak tripsinizasyon ile kaldırıldı ve 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelletin üzerine 450 µl RNA Lysis Tamponu eklendi ve köpüklenmemesi için yavaşça pipetaj yapıldı. Yaklaşık 600 µl hücre lizatı kitin içerisinden çıkan gDNA (Genomik DNA) Removal kolona aktarıldı. 30 saniye spin edildikten sonra spin kolonlar atıldı. Lizatın üzerine örnek hacmi kadar (yaklaşık 500 µl) etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Lizat daha sonra kitin içerisinden çıkan RNA Purification kolonuna aktarıldı. 30 saniye spin edildikten sonra alt kısım olan toplama tüpleri atıldı. Spin kolona 500 µl RNA Yıkama Tamponu eklenip 30 saniye spin edildi ve alt kısım olan toplama tüpleri atıldı. Spin kolon RNaz-free mikrofüj tüpüne alınıp üstüne DNaz I ve DNaz I Reaction Tamponu karışımından 80 µl eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. 500 µl RNA Priming Tamponu eklenip 30 saniye spin edildi ve toplama tüpü atıldı. 500 µl RNA Yıkama Tamponu eklenip 30 saniye spin edildi ve toplama tüpü atıldı. 500 µl daha RNA Yıkama Tamponu eklenip 2 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı. Spin kolon RNaz-free mikrofüj tüpüne alındı. 35 µl nükleaz-free su eklenip 30 saniye spin edildi. RNA'nın kolondan tam ayrılmasını sağlamak için iki aşamalı elüsyon yapıldı. Bunun için 35 µl daha nükleaz-free su eklenip 30 saniye spin edildi. Elde edilen toplama tüpleri etiketlendi, nanodropla ölçüm yapıldıktan sonra örnekler -80 °C'de saklandı.

- RNA örneklerinin nanodrop ile ölçülmesi

RNA örnekleri ölçülmeden önce nanodrobun bilgisayarındaki program açıldı ve örnek adı vb. bilgiler girildi. RNA izolasyonunda elüsyon için nükleaz-free su

kullanıldığından blank olarak 1 µl nükleaz-free su okutuldu. Sonra her RNA örneğinden 1 µl kullanılarak ölçüm gerçekleştirildi.

3.2.13. RNA örneklerinden ilk zincir cDNA sentezi

A549, H1299 ve Beas-2B RNA örneklerinden cDNA sentezi RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher (K1622) kullanılarak yapıldı. Deney öncesi RNA örnekleri -80 °C'den çıkarılarak buz aküsü üzerine yerleştirildi ve cDNA sentez kiti oda sıcaklığında çözdürüldü. Kullanılan bütün solüsyonlar kullanmadan önce kısaca vortekslendi. Nükleaz-free PCR tüpleri etiketlendikten sonra kitin talimatlarına ve nanodropta ölçülen RNA konsantrasyonlarına göre hesaplanan miktarlarda komponentler Çizelge 3.6.' da belirtildiği gibi eklendi. Kısaca spin atıldıktan sonra kitin talimatlarına göre önce 42 °C' de 60 dakika ardından 70 °C' de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon sonlandırıldı. İnkübasyon sonrası cDNA örnekleri -80 °C'ye kaldırıldı.

Çizelge 3.6. cDNA sentezi komponent miktarları

örnek	Total RNA miktarı (1 µg)	oligodT primer	su	toplam	5X- Reaction Buffer	Ribolock RNase Inhibitor	dNTP mix	Revertaid M-MuLV RT enzim	TOTAL
A549	3,92 µl	1 µl	7,08 µl	12 µl	4 µl	1 µl	2 µl	1 µl	20µl
H1299	3,79 µl	1 µl	7,21 µl	12 µl	4 µl	1 µl	2 µl	1 µl	20µl
Beas-2B	2,98 µl	1 µl	8,02 µl	12 µl	4 µl	1 µl	2 µl	1 µl	20µl

3.2.14. cDNA örneklerine Gerçek-Zamanlı PCR yapılması

Sentezlenen cDNA örneklerine gerçek zamanlı PCR yapılmasında NEB Luna M3003S kiti ve ThermoFisher Scientific StepOnePlus cihazı kullanıldı. İlk olarak cDNA dışındaki bileşenler kullanılarak hücre hattı sayısına göre hesaplanarak mix hazırlandı. Bu mixte her bir örnek için üçlü tekrar yapılacak şekilde hesap yapıldı.

Bu mixten her stripe 19 µl dağıtıldı. Son olarak striplere ilgili cDNA'dan 1 µl eklendi, spin down santrifüjlemenin ardından cihaza yüklendi.

Gerçek-Zamanlı PCR programı;

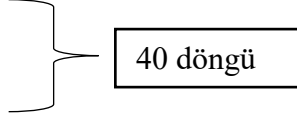
95 °C 60 sn

95 °C 15 sn

55 °C 30 sn

(60 °C 30 sn GAPDH)

60-95 °C erime eğrisi analizi



Gerçek-Zamanlı PCR deneyi sonrası gen ekspresyonunda meydana gelen ifade değişikliği (kat değişikliği), elde edilen erime eğrisi ve relatif kantitasyon verilerinin GAPDH referans geni (housekeeping genes) ile normalize edilmesi ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemiyle hesaplanması ile belirlendi.

Kullanılan primerlerin özellikleri Çizelge 3.7. 'de, Gerçek-Zamanlı PCR mix için kullanılan bileşenler ise Çizelge 3.8. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Gerçek-Zamanlı PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ve özellikleri

Primer Adı	Sekans (5'-3')
ALX3RT-(F)	ATC CTG ATG TGT ATG CCC GG
ALX3RT-(R)	AGG GAG TTC TGC AGC TGA G
GAPDH- (F)	AAC AGC CTC AAG ATC ATC AGC
GAPDH- (R)	GCG TCA AAG GTG GAG GAG TG

Çizelge 3.8. Gerçek-Zamanlı PCR reaksiyonu mix bileşenleri

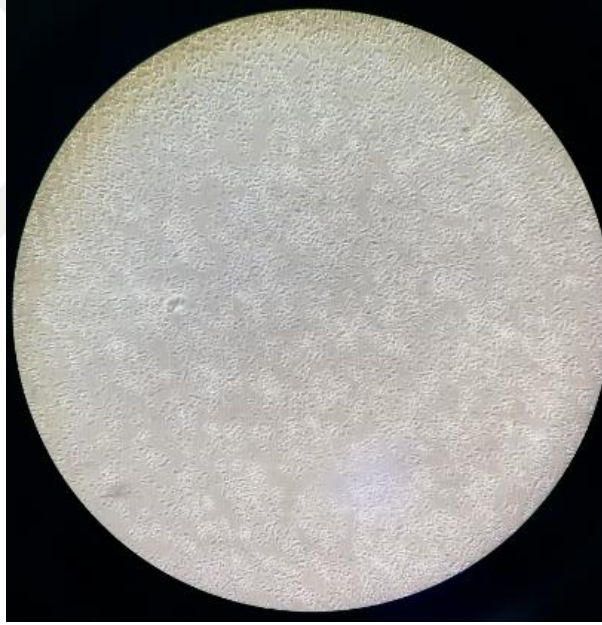
ALX3 mix	20 µl rxn (1 tüp)	Final Konsantrasyon	20 rxn
Luna qPCR Master Mix (2X)	10 µl	1X	200 µl
Forward Primer (10 pmol/ µl)	0.5 µl	0.25 pmol/ µl	10 µl
Reverse Primer (10 pmol/ µl)	0.5 µl	0.25 pmol/ µl	10 µl
cDNA	1 µl	< 100 ng	-
Nükleaz-free su	8 µl	-	160 µl
Total Hacim	20 µl	-	380 µl

GAPDH mix	20 µl rxn (1 tüp)	Final Konsantrasyon	20 rxn
Luna qPCR Master Mix (2X)	10 µl	1X	200 µl
Forward Primer (10 pmol/ µl)	1 µl	0.5 pmol/ µl	20 µl
Reverse Primer (10 pmol/ µl)	1 µl	0.5 pmol/ µl	20 µl
cDNA	1 µl	< 100 ng	-
Nükleaz-free su	7 µl	-	140 µl
Total Hacim	20 µl	-	380 µl

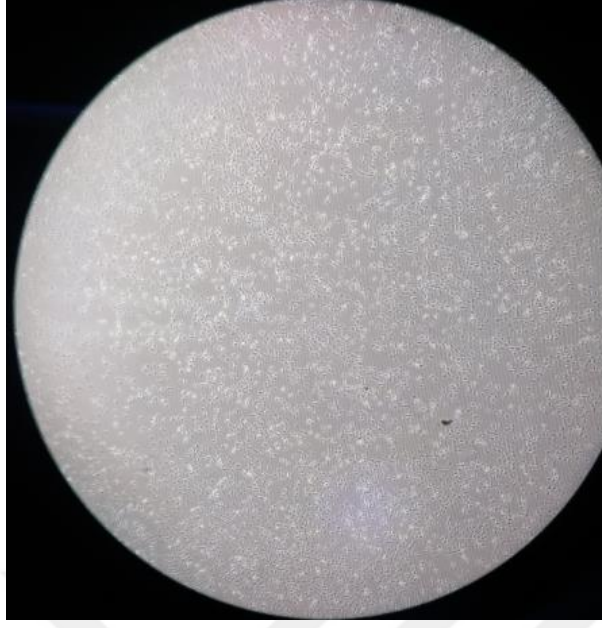
4. BULGULAR

4.1. Akciğer Kanseri ve Normal Akciğer Dokusu Hücre Hatlarının Mikroskop Görüntüleri

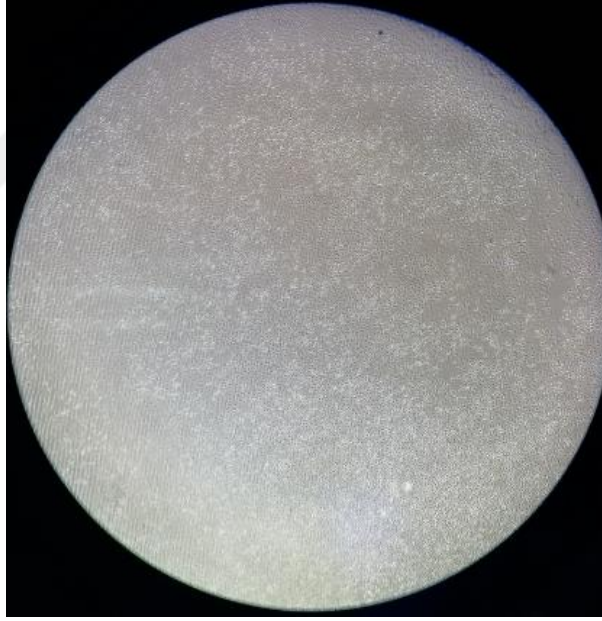
Tez çalışması kapsamında temin edilen ve kültüre edilen A549, H1299 akciğer kanseri hücre hatları ile Beas-2B normal akciğer dokusu hücre hattı inverted mikroskop ile görüntülendi ve fotoğraflandı. Bu kapsamda Şekil 4.1. 'de akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücre hattının mikroskop görüntüsü, Şekil 4.2.'de ise bu çalışmada kullanılan bir diğer akciğer kanseri hücre hattı olan H1299 hücre hattının mikroskop görüntüsü, Şekil 4.3.'te ise normal akciğer dokusu hücre hattı olan Beas-2B hücre hattının mikroskop görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.1. A549 mikroskop görüntüsü



Şekil 4.2. H1299 mikroskop görüntüsü



Şekil 4.3. Beas-2B mikroskop görüntüsü

4.2. DNA ve RNA Örneklerinin Nanodrop Ölçüm Sonuçları

Akciğer kanseri ve normal akciğer dokusu hücre hatlarından izole edilen DNA ve RNA örnekleri ThermoFisher Scientific NANODROP 2000 ile ölçülüp, DNA örneklerinde blank olarak izolasyon sırasında kullanılan Elüsyon Tamponundan kullanıldı. DNA örneklerinden 1 µl kullanılarak ölçüm yapıldı. RNA örneklerinde ise blank olarak 1 µl nükleaz-free su kullanıldı. RNA örneklerinden 1 µl kullanılarak ölçüm gerçekleştirildi. DNA örneklerinin ölçüm sonuçları Çizelge 4.1.'de, RNA örneklerinin ölçüm sonuçları ise Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

Çizelge 4.1. DNA örneklerinin nanodrop ölçüm sonuçları

Örnek Adı	DNA konsantrasyonu (ng/ µl)	A260/280	A260/230
A549	93,2	1,89	2,73
H1299	85,4	1,90	2,78
Beas-2B	139,6	1,90	2,63

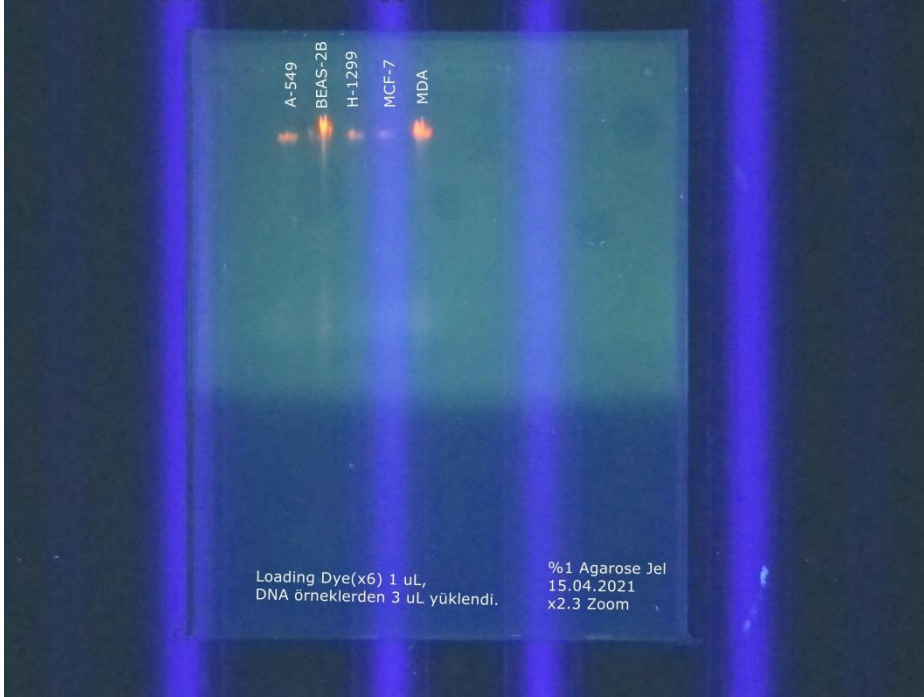
Çizelge 4.2. RNA örneklerinin nanodrop ölçüm sonuçları

Örnek Adı	RNA konsantrasyonu (ng/ µl)	A260/280	A260/230
A549	255,2	2,08	2,24
H1299	263,4	2,03	2,27
Beas-2B	335,1	2,10	2,28

4.3. İzole Edilen DNA'ların Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri

İzole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve DNA'larda bozulma -smear- olup olmadıklarına bakıldı. İzole edilen DNA'ların jelde oluşturdukları bantlar Şekil 4.4' te görülmektedir. Jel görüntüsüne bakıldığı zaman yükleme sırasında bazı kuyucuklara tam yüklenememiş olmasına rağmen görüntüye bakıldığında smear olmaması DNA'mızda bozulma olmadığını göstermektedir.

(Deneylerimiz sırasında akciğer kanseri ve normal akciğer dokusu hücre hatlarıyla birlikte başka kanser hücre hatları da çalışılmış olup bu nedenle jel görüntülerinde bu hücre hatları da görülmektedir ancak bu hücre hatları tezimiz kapsamı dışında olup bu tezde sadece A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarının sonuçları kullanılmıştır.)



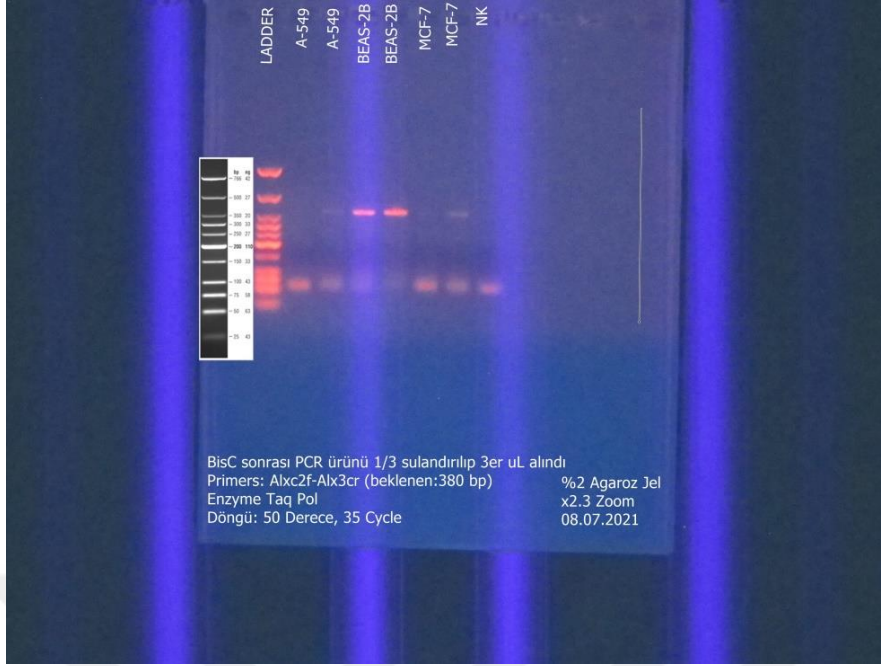
Şekil 4.4. DNA izolasyonu sonrası jel görüntüsü (Bu tez kapsamında A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatları kullanılmış olup MCF-7 ve MDA hücre hatları çalışma kapsamı dışındadır.)

4.4. DNA'ların Bisülfıt ile Muamelesi

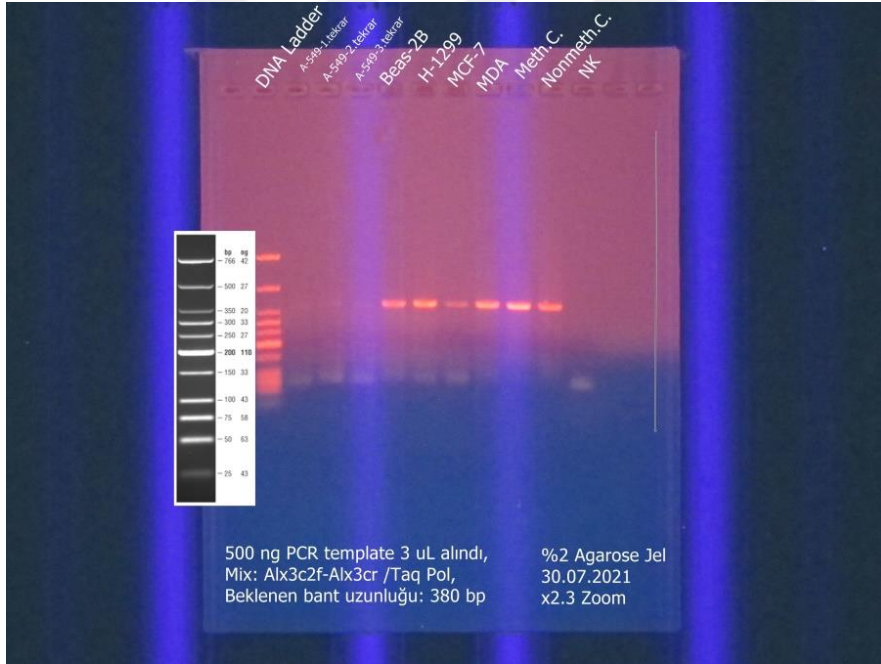
A549, H1299 ve Beas-2B hücrelerinden izole edilen DNA'lara NEB E3318S bisülfıt modifikasyon kiti kullanılarak bisülfıt modifikasyonu yapıldı, deney sonucunda her örnek için 40'ar µl ürün elde edildi ve PCR için hazırlandı.

4.5. Nested ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüleri

Bisülfıt ile muamele edilen genomik DNA'lar farklı primer çiftleri ile çoğaltılmaya çalışılmış olup, birden fazla primer denemesi sonucunda PCR için (bisülfıt modifiye DNA'lardan 500 ng olacak şekilde) *ALX3C(F)* (TTT GAG TTG TTT GGG ATT GG) ve *ALX3C3(R)* (CAC ACT AAC CTT TAC CTA ACC C) kullanıldı, ardından elde edilen bu ürünler 1:3 oranında sulandırıldı ve her bir örnekten Nested PCR'da template olarak 3 µl kullanıldı. Nested PCR'da bu templateleri çoğaltmak için ise *ALX3C2(F)* (TGG ATG GTT TTA GTA TTA AGT TAG A) ve *ALX3C(R)* (CAC ACT AAC CTT TAC CTA ACC C) primer çifti kullanıldı. Aynı zamanda Nested PCR'da A549, H1299 ve Beas-2B haricinde bisülfıt ile muamele edilmiş metile kontrol ve HeLa kontrol DNA'lar da aynı primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Nested PCR sonucunda beklenen ürün boyutu 380 bp olup deneylerimiz boyunca A549 DNA'sında uzun bir süre boyunca bant elde edememiş olmamıza rağmen sonunda hafif de olsa bir bant elde edilmiştir. Sonuç olarak Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da görüldüğü üzere A549 (hafif bir şekilde olsa da), H1299, Beas-2B, metile kontrol ve HeLa kontrol ürünlerinde 380 bp civarında bantlar elde edildi. Tüm jelde yürütme işlemlerinde marker olarak NEB N3233S kullanıldı.



Şekil 4.5. Nested PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü-1

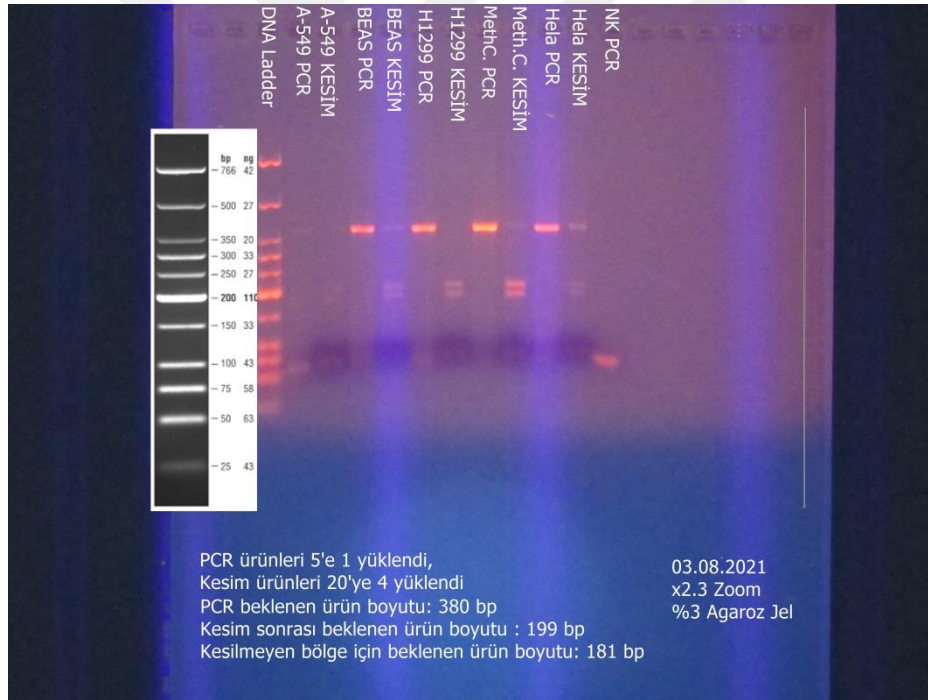


Şekil 4.6. Nested PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü-2 (Nested PCR sırasında A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatları ile birlikte kontrol olarak metile kontrol ve HeLa kontrol DNA'lar kullanılmıştır. Aynı zamanda olup bu tez kapsamında olmayan MCF-7 ve MDA hücre hatları da çalışılmış olup bu hücre hatları bu tezin kapsamı dışındadır.)

4.6. Enzim Kesimi ve Nested PCR Ürünlerinin Birlikte Agaroz Jel Görüntüsü

Nested PCR ürünleri uncut (kesilmeyen) ve enzim kesimi ürünleri cut (kesilen) olmak üzere sırasıyla A549, H1299, Beas-2B, metile kontrol ve HeLa kontrol olmak üzere %3'lük agaroz jele yüklendi ve yürütüldü. Yükleme sırasında PCR ürünlerinden 5 µl alınıp 1 µl yükleme boyasıyla, enzim kesimi ürünlerinden ise 20 µl alınıp 4 µl yükleme boyasıyla karıştırıldı.

Şekil 4.7.'de görüldüğü üzere kesim olmayan PCR ürünlerinde sadece 380 bp ürün görülürken metilasyon olan ve dolayısıyla kesime uğrayan ürünlerde 199 ve 181 bp olmak üzere ikişer adet bant görülmektedir. Kesim ürünlerinden Beas-2B, metile kontrol ve HeLa kontrol ürünlerinde 199 ve 181 bp ile birlikte aynı zamanda 380 bp civarında da bant görülmektedir. Bu durum Beas-2B'de %100 metilasyon olmadığını, kontrol olarak kullanılan örneklerin ise %100 verimli olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.7. Enzim kesimi ve Nested PCR örneklerinin jel görüntüsü (A549 örneği tam verimle çoğaltılamamış olup kesim sonrasında da jelde hafif bant vermiştir. A549 PCR sütununda 380 bp'de bant görülürken A549 Kesim sütununda 199 ve 181 bp'lerde bant görülmektedir. Marker:NEB N3233S)

4.7. Enzim Kesimi ve Nested PCR Ürünlerinin Metilasyon Oranları

Kesilen ve kesilmeyen ürünlerin bant yoğunlukları ImageJ programı ile ölçülmüş olup sonuçlar Çizelge 4.3.'teki gibidir. Bu değerler kullanılarak Şekil 2.3.'teki COBRA yönteminde ifade edildiği gibi metilasyon hesabı yapıldı ve akciğer kanseri hücre hatları A549 ve H1299'da %100 metilasyon görülürken normal akciğer dokusu hücre hattı olan Beas-2B'de %66,55 metilasyon görülmektedir. Kontrol örneklerinde ise sırasıyla metile kontrolde %68,07, HeLa kontrol de %65,60 metilasyon görülmektedir. Bu sonuçlara göre akciğer kanseri hücre hatları normal akciğer dokusu hücre hattına göre hipermetilasyon sergilemektedir. Aynı zamanda bu sonuçlar kontrol olarak kullanılan metile ve HeLa kontrol örneklerinin %100 verimli olmadığını da göstermektedir.

Çizelge 4.3. Enzim kesimi sonucu elde edilen bantların ölçüm değerleri

	Template	Area	Mean	Min	Max
1	Beas-2B-380 bp	4028	153.096	140.333	164.667
2	Beas-2B-199 bp	4028	153.248	134.667	165.333
3	Beas-2B-181 bp	4028	151.396	135.667	164.000
4	H1299-199 bp	4028	139.827	123.000	158.000
5	H1299-181 bp	4028	138.180	124.000	154.333
6	A549-199 bp	4028	124.992	116.333	134.000
7	A549-181 bp	4028	124.562	113.667	138.000
8	Methly.C-380 bp	4028	142.540	127.333	153.000
9	Methyl .C-199 bp	4028	153.479	127.000	174.333
10	Methyl.C-181 bp	4028	150.396	121.000	173.333
11	Hela.C- 380 bp	4028	140.022	121.333	157.667
12	Hela.C- 199 bp	4028	133.852	118.000	146.667
13	Hela.C-181 bp	4028	133.198	115.667	146.000

4.8. Gerçek-Zamanlı PCR Sonuçları

ALX3 geninin ifadesi ve metilasyon profili arasındaki farkın incelenmesi amacıyla kullandığımız Gerçek-Zamanlı PCR yöntemi, Luna Universal qPCR Master Mix kullanarak gerçekleştirildi. Bu amaçla GAPDH geni housekeeping gen olarak kullanıldı.

Akciğer kanseri hücre hatları A549 ve H1299 ile normal akciğer dokusu hücre hattı Beas-2B hücrelerinden RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi yapıldı. Daha sonra hedef genimize uygun primer çifti kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen Ct değerleri Çizelge 4.4.'te görülmekte olup bu değerler kullanılarak *ALX3* geninin ifadesini analiz etmek amacıyla hücre hatlarında görülen ifade değişikliklerini (kat değişimleri) belirleyebilmek için GAPDH referans geni ile relatif kantitasyon testi gerçekleştirildi ve sonuçlar grafiğe aktarıldı.

Çizelge 4.4.'teki Ct değerlerine ve Şekil 4.10.'daki grafiğe bakıldığında akciğer kanseri hücre hatlarında *ALX3* ifadesi yok denecek kadar az olmakla birlikte Ct değerlerine bakıldığı zaman normal akciğer dokusu ve akciğer kanseri arasında ifade bakımından pek fark görülmemektedir. Buna karşılık GAPDH referans genimizin ifadesi normal seviyelerdedir. Bunu doğrulamak için PCR reaksiyonu sonrası örnekler %2'lik agaroz jelde yürütülüp fotoğraflandı. Şekil 4.8.'de görüldüğü üzere *ALX3* primerleri kullanılan örneklerimizde herhangi bir banda rastlanmamışken Şekil 4.9.'da görüldüğü üzere GAPDH primerleri kullanılan örneklerde bant gözlenmektedir.

Tek başına Şekil 4.10.'daki ifade değişimlerine bakıldığında normal akciğer dokusu Beas-2B'ye göre hesaplanan relatif kantitasyon sonucunda A549'da yaklaşık 0,645 katlık bir artış ve H1299'da ise yaklaşık 0,252 katlık bir artış belirlendi.

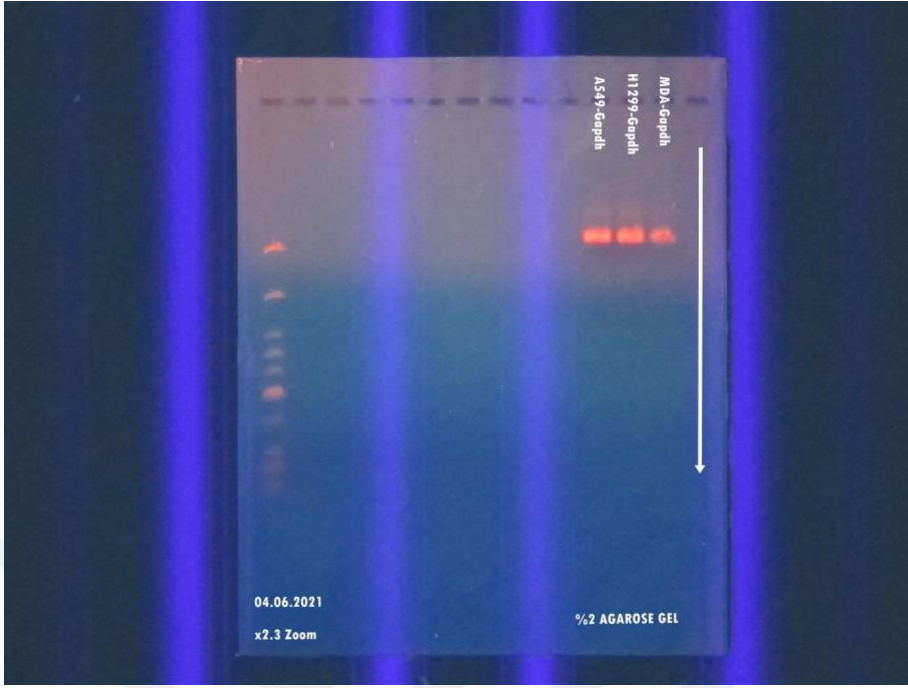
Deney sonucunda elde edilen ham verilerimiz EK 1-5 'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Gerçek-Zamanlı PCR sonucu A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarında *ALX3* ve *GAPDH* genleri için elde edilen Ct değerleri

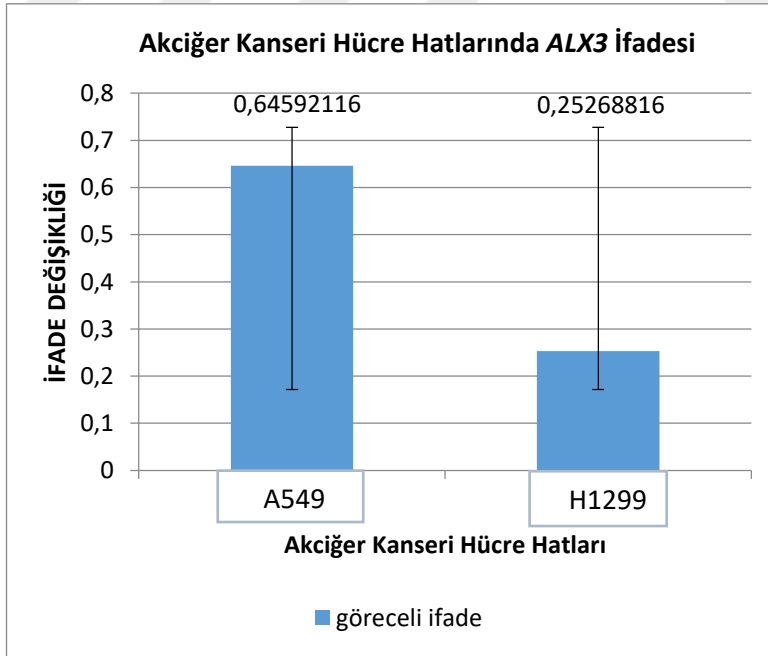
Hücre hattı	Gen	Tüp	Ct	Ct Ortalaması
A549	<i>ALX3</i>	1	35,10084	35,7349
		2	36,71748	
		3	35,38652	
	<i>GAPDH</i>	1	17,50546	17,2007
		2	17,13725	
		3	16,95938	
H1299	<i>ALX3</i>	1	36,61535	35,7091
		2	35,87493	
		3	34,63724	
	<i>GAPDH</i>	1	15,70007	15,8209
		2	16,12303	
		3	15,63958	
Beas-2B	<i>ALX3</i>	1	35,50784	35,35274
		2	34,96534	
		3	35,58504	
	<i>GAPDH</i>	1	17,31346	17,44911
		2	17,32303	
		3	17,71084	



Şekil 4.8. Gerçek-Zamanlı PCR sonucunda *ALX3* primeri kullanılan örneklerin agaroz jeldeki görüntüsü (Gerçek-Zamanlı PCR deneyimizde akciğer örnekleri haricinde yine meme örnekleri olan MDA ve MCF-7 hücre hatları da çalışılmış olup bu sonuçlar tez kapsamı dışındadır.)



Şekil 4.9. Gerçek-Zamanlı PCR sonucunda GAPDH primeri kullanılan örneklerin agaroz jeldeki görüntüsü (Gerçek-Zamanlı PCR deneyimizde akciğer örnekleri haricinde yine meme örnekleri olan MDA ve MCF-7 hücre hatları da çalışılmış olup bu sonuçlar tez kapsamı dışındadır.)



Şekil 4.10. Akciğer kanseri hücre hatlarında ALX3 geni göreceli ifadesi

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Kanser geçmişten günümüze genetik etmenlerin yanı sıra çevresel etmenler, yaş, cinsiyet vb. faktörlerin etkisiyle süregelen ve halen de kesin bir tedavisi olmayan, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz olarak bölünüp çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır (Lichtenstein ve ark. 2000, Nam & Nei 2005). Kanser hücreleri hem benign/malign olma eğilimi göstermekle birlikte malign tümörler çeşitli özelliklere sahiptirler. Bu özellikler; sürekli anjiyogenez, apoptozdan kaçış, sınırsız çoğalma potansiyeli, doku invazyonu ve metastaz, büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik ve büyüme inhibitör sinyallerine duyarsızlık, enerji metabolizmasının yeniden programlanması, bağışıklık tahribatından kaçınmak, genom kararsızlığı ve mutasyon ile tümör teşvik edici inflamasyon olarak verilmektedir (Hanahan & Weinberg 2000, Hanahan & Weinberg 2011). Tezimize konu olan akciğer kanseri ise Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünyada en fazla ölüme sebep olan kanser türü olmakla birlikte bu ölüm oranı erkeklerde daha fazla görülmektedir (Houts ve ark. 2000, Globocan 2018).

Epigenetik mekanizmalar vücutta her mekanizmada rol alabilme özellikleri olan ve aynı zamanda gen ekspresyonunu kontrol ettiği düşünülen ve doğru işlememeleri sonucunda astım, diyabet, nörolojik hastalıkların yanında kansere de neden olduğu bilinen regülatör mekanizmalardır (Fardi ve ark. 2018).

Epigenetik mekanizmalar arasında en çok öne çıkan metilasyon profilindeki değişiklikler prostat, karaciğer, meme, akciğer, baş ve boyun kanseri, lösemi ve glioblastoma gibi çok sayıda ve çeşitli kanserlere sebebiyet verebilmektedir (Barbano ve ark. 2013, Chao ve ark. 2013, Mehta ve ark. 2015, X. Liu ve Brenner 2016, Cecotka ve Polanska 2018, Klughammer ve ark. 2018, Shin ve ark. 2020). Aynı zamanda epigenetik mekanizmalar arasında en çok bilinen metilasyonun gen ekspresyonuyla ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Genel olarak promotordaki hipermetilasyon gen ifadesinin azalmasına neden olmaktadır.

ALX genleri temel olarak transkripsiyon faktörü olan 3 genden oluşur. Bu genler: *ALX1*, *ALX3* ve *ALX4*'tür. Bilinen görevleri arasında embriyodaki uzuv oluşumu ve nöral tüp

gelişimi bulunmaktadır. Aynı zamanda son yıllarda kanser hücrelerinin promotorlarındaki epigenetik profillerindeki değişikliklerin öneminin anlaşılmasıyla birlikte yapılan bazı çalışmalar bu *ALX* genlerinin çeşitli kanserlerin patogeneğinde biyobelirteç olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (Mori ve ark. 2011, Mahoney ve ark. 2012, Sun ve ark. 2018). Daha özel olarak *ALX1* ve *ALX4* daha geniş bir yayılım ile akciğer kanserinden over kanserine kadar biyobelirteç olarak işaret edilmişken (Sandoval ve ark. 2013, Yuan ve ark. 2013, De Groot ve ark. 2014, W. Bin Liu ve ark. 2014, Yuan ve ark. 2015, J. Yang ve ark. 2017, Song ve ark. 2020), *ALX3* ile ilgili yapılan çalışmalar daha kısıtlı kalmış bunun yanında akciğer kanseri ve *ALX3* arasındaki ilişkiyi inceleyen bir araştırma bulunamamıştır.

Bu bilgilere dayanarak tezimizdeki hipotezimiz akciğer kanseri hücre hatlarında *ALX3* geninin kontrol grubuna göre ifade ve metilasyon farklarının olabileceği ve buna dayanarak bu profilleri tersine çevirecek biyoteknolojik ilaç geliştirilmesine katkı sağlanabileceği üzerinedir.

Bu tez çalışmasında *ALX3* ve akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyebilmek adına akciğer kanseri hücre hatları kullanılarak metilasyon ve gen ifadesi analizi yapıldı. Bu tez çalışmasının temel amacı, akciğer kanseri hücre hatları ve normal akciğer dokusu hücre hattındaki gen ifadesini analiz etmek ve buna bağlı olarak promotor metilasyon profillerinin korelasyon gösterip göstermediğini incelemektir.

Bu amaçla bu çalışmada gen ifadesini analiz edebilmek amacıyla hızlı, hassas ve kontaminasyon riski az olan Gerçek-Zamanlı PCR yöntemi, promotor metilasyon profillerini analiz etmek amacıyla ise tek geni analiz edeceğimiz için ve aynı zamanda diğer yöntemlere göre daha az maliyetli ve güvenilir olmasıyla birlikte metilasyon analizinde altın standart olan bisülfid modifikasyonunu içerdiği için COBRA yöntemi kullanıldı.

Gerçek-Zamanlı PCR’da referans gen olarak GAPDH (housekeeping gen) kullanıldı. Housekeeping genler normal koşullarda bir organizmanın her hücresinde sabit bir şekilde ifade olan referans genlerdir (Eisenberg & Levanon, 2013). Yapılan literatür

taramasında akciğer dokusu için çoğunlukla GAPDH (Minn ve ark. 2005, Silvia ve ark. 2006, Jen ve ark. 2017, Marco ve ark. 2017, Saxon ve ark. 2018), endojen UBC (ubikitin C) (Cooke ve ark. 2019), beta-actin (X. Xu ve ark. 2020) ve tubulin (Minn ve ark. 2005) genleri referans gen olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle tezimizde sıklıkla çalışılan GAPDH referans genini kullanmayı tercih ettik.

Metilasyon analizi sonuçlarına göre deneyimiz sonunda akciğer kanseri hücre hatları A549 ve H1299'da Beas-2B'ye kıyasla hipermetilasyon gözlenmiştir. Bu da *ALX3* geninin akciğer kanserinde farklı metilasyon profiline sahip olması yönüyle biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. Ancak Gerçek-Zamanlı PCR ile yaptığımız gen ifadesi analizi sonuçlarımıza göre A549, H1299 akciğer kanseri ve normal akciğer dokusu Beas-2B hücre hatları arasında belirgin bir fark görülmemiştir ve bununla beraber *ALX3* geninin ifadesi neredeyse yok denecek kadar azdır. Yani sonuçlarımıza göre akciğer kanseri hücre hatlarında normal akciğer dokusu hücre hattına kıyasla hipermetilasyon görülürken gen ifadeleri birbirine göre değişkenlik göstermemiş ve neredeyse gen ifadesi gözlenmemiştir. Bu durum *ALX3* ekspresyonunun fare embriyolarında frontanazal kafa mezenkimi, kuyruk, uzuvlar, vücut duvarı ve genital tüberkülda (ten Berge ve ark. 1998) ve yetişkin hamsterlarda sadece pankreas ve testislerde eksprese edilmesiyle (Rudnick ve ark. 1994) açıklanabilir.

Bu durum teorikte bilinen promotor bölgesindeki hipermetilasyonun gen ifadesini baskılamasının beklenmesi yönündeki yaklaşım ile uyuşmamaktadır. Bununla birlikte yine literatürde farklı metilasyon profillerinin gen ifadesini farklı yönlerde etkileyebildiği veya gen ifadesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı ile ilgili farklı yayınlar mevcuttur (Lan, 1984, Carrington ve ark. 1987, Lee ve ark. 1987, Lambert ve ark. 1990, Moarii, 2015, Spainhour ve ark. 2019, J. Lu ve ark. 2020).

Bu yayınlara göre gen ifadesi sadece promor metilasyon profiline değil, ortamdaki bir metilasyon ajanına bağlı olabileceği gibi bu ajanlar (TET dioksijenaz, timidin DNA glikozilaz gibi) aynı zamanda genomdaki 5-metilsitozini 5-hidroksimetilsitozine dönüştürebilmektedir (J. Lu ve ark. 2020). Bir başka yaklaşıma göre de gen ifade modelleri farklılık gösteren farklı hücre hatları birbiriyle aynı metilasyon profili

sergileyebilmektedir (Carrington ve ark. 1987). Gen promotor bölgesindeki metilasyon durumu aynı zamanda gen ifadesini artırıcı yönde de etki edebilirken (Lee ve ark. 1987), gen ifadesi az olan hücre hatlarında da hipometilasyon görülebilmektedir (Lan, 1984).

Buradan anlaşılacağı üzere teorikte doğru olan “hipermetilasyon gen ifadesinin azalmasına yol açar” ifadesi pratikte her zaman geçerli olmamakla birlikte bunun sebebi olarak şunlar düşünülebilir: Hücreler hücre döngüsünün farklı aşamalarından geçerken birtakım faktörlerin etkisiyle metilasyon modelleri değişebilir veya metillenmiş bölgeler gen ifadesine izin verilen bir konfigürasyonda olabilir ya da metilasyon bölgesinin yakınlarındaki bir polimorfizm veya kromatin yapısı diziyi değiştirmeden metilasyon durumunun özgülüğünü etkileyebilir ve bu şekilde gen ifadesini etkileyebilir. Aynı zamanda kullanılan hücreler metilasyon bakımından heterojenlik göstermiş olabilir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak özetle *ALX3* geni akciğer kanserinde farklı promotor metilasyonu profili sergilemesi yönüyle akciğer kanseri patogenezinde potansiyel bir biyobelirteçtir. Ancak bu alanda yapılacak *in vivo* çalışmalar *ALX3* geninin bu potansiyelinin kesinleştirilmesi yönünde katkı sağlayacaktır. Bu şekilde *ALX3* geninin promotor hipermetilasyonunu tersine çevirecek biyoteknolojik ilaçların geliştirilmesi yönünde de yapılacak çalışmalara temel oluşturacaktır. Bu sayede bu duruma özel geliştirilecek bir biyoteknolojik ilaç akciğer kanserinin oluşumunun engellenmesi veya oluşumundan sonra tedavisinde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Acquafreda, T., Nunes, F. D., Soprano, D. R., & Soprano, K. J. (2010). Expression of homeobox genes in oral squamous cell carcinoma cell lines treated with all-trans retinoic acid. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(6), 1437–1444. <https://doi.org/10.1002/jcb.22871>

Adouard, V., Dante, R., Niveleau, A., Delain, E., Revet, B., & Ehrlich, M. (1985). The accessibility of 5-methylcytosine to specific antibodies in double-stranded DNA of Xanthomonas phage XP12. *European Journal of Biochemistry*, 152(1), 115–121. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09170.x>

Akciğer ve Bronş Kanseri - Kanser Durumuyla İlgili Gerçekler. (n.d.). Retrieved April 19, 2021, from <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>

Alwine, J. C., Kemp, D. J., & Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5350–5354. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5350>

American Cancer Society | Cancer Facts & Statistics. (n.d.). Retrieved April 19, 2021, from [https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.260974413.1504426794.1585048988399447058.1584958710#/#/](https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.260974413.1504426794.1585048988399447058.1584958710#/)

Amiot, A., Mansour, H., Baumgaertner, I., Delchier, J. C., Tournigand, C., Furet, J. P., ... Sobhani, I. (2014). The detection of the methylated Wif-1 gene is more accurate than a fecal occult blood test for colorectal cancer screening. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099233>

Annan, R. S., Kresbach, G. M., Giese, R. W., & Vouros, P. (1989). Trace detection of modified dna bases via moving-belt liquid chromatography-mass spectrometry using electrophoric derivatization and negative chemical ionization. *Journal of Chromatography A*, 465(3), 285–296. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)92666-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)92666-4)

Bach, S., Paulis, I., Sluiter, N. R., Tibbesma, M., Martin, I., Wiel, M. A. van de, ... Steenbergen, R. D. M. (2021). Detection of colorectal cancer in urine using DNA methylation analysis. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-81900-6>

Barbano, R., Muscarella, L. A., Pasculli, B., Valori, V. M., Fontana, A., Coco, M., ... Parrella, P. (2013). Aberrant Keap1 methylation in breast cancer and association with clinicopathological features. *Epigenetics*, 8(1), 105–112. <https://doi.org/10.4161/epi.23319>

Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., ... Garraway, L. A. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive

modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, 483(7391), 603–607. <https://doi.org/10.1038/nature11003>

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., ... Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129(4), 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>

Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>

Bestor, T. H., Hellewell, S. B., & Ingram, V. M. (1984). Differentiation of two mouse cell lines is associated with hypomethylation of their genomes. *Molecular and Cellular Biology*, 4(9), 1800–1806. <https://doi.org/10.1128/mcb.4.9.1800>

Beverdam, A., & Meijlink, F. (2001). Expression patterns of group-I aristaless-related genes during craniofacial and limb development. *Mechanisms of Development*, 107(1–2), 163–167. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00450-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00450-6)

Bouras, E., Karakioulaki, M., Bougioukas, K. I., Aivaliotis, M., Tzimagiorgis, G., & Chourdakis, M. (2019). Gene promoter methylation and cancer: An umbrella review. *Gene*, 710, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.06.023>

Carrington, M., Chedid, M., Ting, J. (1987). Differential expression of the HLA-DR genes in various melanoma cell lines treated with interferon-gamma: methylation of the HLA-DR alpha gene in these lines is not correlated with its expression. *Human Immunology*, 18(2), 151–161. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(87\)90012-7](https://doi.org/10.1016/0198-8859(87)90012-7)

Cecotka, A., & Polanska, J. (2018). Region-Specific Methylation Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 10(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s12539-018-0285-4>

Chang, H., Mohabir, N., Done, S., & Hamel, P. A. (2009). Loss of ALX4 expression in epithelial cells and adjacent stromal cells in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 62(10), 908–914. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.067298>

Chao, C., Chi, M., Preciado, M., & Black, M. H. (2013). Methylation markers for prostate cancer prognosis: A systematic review. *Cancer Causes and Control*, Vol. 24, pp. 1615–1641. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0249-2>

Chen, H. Y., Zhu, B. H., Zhang, C. H., Yang, D. J., Peng, J. J., Chen, J. H., ... He, Y. L. (2012). High CpG island methylator phenotype is associated with lymph node metastasis and prognosis in gastric cancer. *Cancer Science*, 103(1), 73–79. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02129.x>

Clark, W. H. (1991). Tumour progression and the nature of cancer. *British Journal of Cancer*, 64(4), 631–644. <https://doi.org/10.1038/bjc.1991.375>

Cooke, M., Casado-Medrano, V., Ann, J., Lee, J., Blumberg, P. M., Abba, M. C., & Kazanietz, M. G. (2019). Differential Regulation of Gene Expression in Lung Cancer Cells by Diacylglycerol-Lactones and a Phorbol Ester Via Selective Activation of Protein Kinase C Isozymes. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-42581-4>

Cooper, D. N. (1983). Eukaryotic DNA methylation. *Human Genetics*, 64(4), 315–333. <https://doi.org/10.1007/bf00292363>

de Groot, J. S., Moelans, C. B., Elias, S. G., Fackler, M. J., van Domselaar, R., Suijkerbuijk, K. P. M., ... van der Wall, E. (2016). DNA promoter hypermethylation in nipple fluid: A potential tool for early breast cancer detection. *Oncotarget*, 7(17), 24778–24791. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8352>

De Groot, J. S., Pan, X., Meeldijk, J., Van Der Wall, E., Van Diest, P. J., & Moelans, C. B. (2014). Validation of DNA promoter hypermethylation biomarkers in breast cancer - A short report. *Cellular Oncology*, 37(4), 297–303. <https://doi.org/10.1007/s13402-014-0189-1>

Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, Vol. 32, pp. 605–644. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001>

Deng, Y., Yi, L., Lin, X., Lin, L., Li, H., & Lin, J. M. (2015). A non-invasive genomic diagnostic method for bladder cancer using size-based filtration and microchip electrophoresis. *Talanta*, 144, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.065>

Ebert, M. P. A., Model, F., Mooney, S., Hale, K., Lograsso, J., Tonnes-Priddy, L., ... Lofton-Day, C. (2006). Aristaless-like Homeobox-4 Gene Methylation Is a Potential Marker for Colorectal Adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 131(5), 1418–1430. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.034>

Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, Vol. 29, pp. 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>

Fardi, M., Solali, S., & Farshdousti Hagh, M. (2018). Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. *Genes and Diseases*, Vol. 5, pp. 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.06.003>

Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., ... Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1827–1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>

Galliot, B., De Vargas, C., & Miller, D. (1999). Evolution of homeobox genes: Q50 Paired-like genes founded the Paired class. *Development Genes and Evolution*, 209(3), 186–197. <https://doi.org/10.1007/s004270050243>

Garzon, R., Liu, S., Fabbri, M., Liu, Z., Heaphy, C. E. A., Callegari, E., ... Marcucci, G. (2009). MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*, *113*(25), 6411–6418. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170589>

Ghasemvand, F., Nezafat, N., Hesami Tackallou, S., Momenzadeh, D., & Rahmanzadeh, S. (2016). Differential expression of aristaless-like homeobox 4: a potential marker for gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, *9*(4), 286–294. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27895854>

Globocan. (2018). Lung Fact Sheet. *International Agency for Research on Cancer, WHO*, 876, 2018–2019. Retrieved from <http://gco.iarc.fr/today>

Gu, X., Wang, B., Zhu, H., Zhou, Y., Horning, A. M., Huang, T. H. M., ... Sun, L. Z. (2020). Age-associated genes in human mammary gland drive human breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, *22*(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01299-2>

Guo, X., Ngo, B., Modrek, A., & Lee, W.-H. (2014). Targeting Tumor Suppressor Networks for Cancer Therapeutics. *Current Drug Targets*, *15*(1), 2–16. <https://doi.org/10.2174/1389450114666140106095151>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, Vol. 100, pp. 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Handy, D. E., Castro, R., & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic modifications: Basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*, *123*(19), 2145–2156. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>

Harrison, A., & Parle-McDermott, A. (2011). DNA methylation: A timeline of methods and applications. *Frontiers in Genetics*, Vol. 2. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00074>

Hatada, I., Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Komatsubara, H., & Mukai, T. (1991). A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(21), 9523–9527. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9523>

Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K., & Iida, S. (1970). Reaction of Sodium Bisulfite with Uracil, Cytosine, and Their Derivatives. *Biochemistry*, *9*(14), 2858–2865. <https://doi.org/10.1021/bi00816a016>

- He, Q., Chen, H. Y., Bai, E. Q., Luo, Y. X., Fu, R. J., He, Y. S., ... Wang, H. Q. (2010). Development of a multiplex MethyLight assay for the detection of multigene methylation in human colorectal cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 202(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2010.05.018>
- Henriksen, S. D., Madsen, P. H., Larsen, A. C., Johansen, M. B., Pedersen, I. S., Krarup, H., & Thorlacius-Ussing, O. (2017). Promoter hypermethylation in plasma-derived cell-free DNA as a prognostic marker for pancreatic adenocarcinoma staging. *International Journal of Cancer*, 141(12), 2489–2497. <https://doi.org/10.1002/ijc.31024>
- Herbst, R. S., Heymach, J. V., & Lippman, S. M. (2008). Molecular origins of cancer: Lung cancer. *New England Journal of Medicine*, Vol. 359, pp. 1367–1380. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0802714>
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9821–9826. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Sean Walsh, P., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology*, 10(4), 413–417. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 11(9), 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
- Holland, P. W. H., Booth, H. A. F., & Bruford, E. A. (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biology*, 5, 47. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-47>
- Houts, P. S., Lenhard, R. E., & Varricchio, C. (2000). ACS cancer facts and figures. *Cancer Practice*, 8(3), 105–108. <https://doi.org/10.1046/j.1523-5394.2000.83001.x>
- Huang, T. H. M., Perry, M. R., & Laux, D. E. (1999). Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Human Molecular Genetics*, 8(3), 459–470. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.3.459>
- Institute, N. N. C. (2020). *Cancer Facts & Figures 2020*.
- Jen, J., Tang, Y.-A., Lu, Y.-H., Lin, C.-C., Lai, W.-W., & Wang, Y.-C. (2017). Oct4 transcriptionally regulates the expression of long non-coding RNAs NEAT1 and MALAT1 to promote lung cancer progression. *Molecular Cancer*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-017-0674-Z>
- Jiao, J. X., Jiao, L. J., Yang, S., & Zhao, Y. J. (2019). Knockdown of aristaless-like homeobox1 inhibits epithelial-mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin signaling pathway in melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,

511(1), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.050>

Lee, J.S. & Linda, O'N. (1987). Methylation of the HLA-DR alpha gene is positively correlated with expression. *Immunogenetics*, 26(1–2), 92–98. <https://doi.org/10.1007/BF00345460>

Kanser Nedir? - Ulusal Kanser Enstitüsü. (n.d.). Retrieved April 19, 2021, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

Kayserili, H., Uz, E., U., Niessen, C.... (2009). ALX4 dysfunction disrupts craniofacial and epidermal development. *Human Molecular Genetics*, 18(22), 4357–4366. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDP391>

Kim, J. C., Lee, H. C., Cho, D. H., Choi, E. Y., Cho, Y. K., Ha, Y. J., ... Kim, Y. S. (2011). Genome-wide identification of possible methylation markers chemosensitive to targeted regimens in colorectal cancers. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(10), 1571–1580. <https://doi.org/10.1007/s00432-011-1036-7>

Klughammer, J., Kiesel, B., Roetzer, T., Fortelny, N., Nemc, A., Nenning, K. H., ... Bock, C. (2018). The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nature Medicine*, 24(10), 1611–1624. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0156-x>

Koso, H., Tshako, A., Lyons, E., Ward, J. M., Rust, A. G., Adams, D. J., ... Watanabe, S. (2014). Identification of FoxR2 as an oncogene in medulloblastoma. *Cancer Research*, 74(8), 2351–2361. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1523>

Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, Vol. 54, pp. 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>

Kroczek, R. A. (1993). Southern and Northern analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 618(1–2), 133–145. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)80031-X](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80031-X)

Kuo, K. C., Mccune, R. A., Gehrke, C. W., Midgett, R., & Ehrlich, M. (1980). Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(20), 4763–4776. <https://doi.org/10.1093/nar/8.20.4763>

Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2016). DNA methylation analysis: Choosing the right method. *Biology*, Vol. 5. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>

Lakhwani, S., García-Sanz, P., & Vallejo, M. (2010). Alx3-deficient mice exhibit folic acid-resistant craniofacial midline and neural tube closure defects. *Developmental Biology*, 344(2), 869–880. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.06.002>

Lambert, M., van Eggermond, M., Kraakman, M.... (1990). The MHC class II deficiency syndrome: heterogeneity at the level of the response to 5-azadeoxycytidine.

Research in Immunology, 141(2), 129–140. [https://doi.org/10.1016/0923-2494\(90\)90132-I](https://doi.org/10.1016/0923-2494(90)90132-I)

Lan, N. C. (1984). The effects of 5-azacytidine on the expression of the rat growth hormone gene. Methylation modulates but does not control growth hormone gene activity. *Journal of Biological Chemistry*, 259(18), 11601–11606. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)90906-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)90906-3)

Li, E., Beard, C., & Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366(6453), 362–365. <https://doi.org/10.1038/366362a0>

Liang, G., Gonzalgo, M. L., Salem, C., & Jones, P. A. (2002). Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Methods*, 27(2), 150–155. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00068-3](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00068-3)

Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., ... Hemminki, K. (2000). Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine*, 343(2), 78–85. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007133430201>

Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., ... Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature08514>

Liu, W. Bin, Han, F., Du, X. H., Jiang, X., Li, Y. H., Liu, Y., ... Liu, J. Y. (2014). Epigenetic silencing of Aristaless-like homeobox-4, a potential tumor suppressor gene associated with lung cancer. *International Journal of Cancer*, 134(6), 1311–1322. <https://doi.org/10.1002/ijc.28472>

Liu, X., & Brenner, D. A. (2016). Liver: DNA methylation controls liver fibrogenesis. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, Vol. 13, pp. 126–128. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.16>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lu, J., Tan, T., Zhu, L., Dong, H., & Xian, R. (2020). Hypomethylation Causes MIR21 Overexpression in Tumors. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 18, 47–57. <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2020.05.011>

Lu, Y., Yang, L., Qin, A., Qiao, Z., Huang, B., Jiang, X., & Wu, J. (2020). miR-1470 regulates cell proliferation and apoptosis by targeting ALX4 in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 522(3), 716–723. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.139>

- Mahoney, S. E., Yao, Z., Keyes, C. C., Tapscott, S. J., & Diede, S. J. (2012). Genome-wide DNA methylation studies suggest distinct DNA methylation patterns in pediatric embryonal and alveolar rhabdomyosarcomas. *Epigenetics*, 7(4), 400–408. <https://doi.org/10.4161/epi.19463>
- Marco, C. De, Laudanna, C., Rinaldo, N., Oliveira, D. M., Ravo, M., Weisz, A., ... Viglietto, G. (2017). Specific gene expression signatures induced by the multiple oncogenic alterations that occur within the PTEN/PI3K/AKT pathway in lung cancer. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0178865>
- Mehta, A., Dobersch, S., Romero-Olmedo, A. J., & Barreto, G. (2015). Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(2), 229–241. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9563-3>
- Michalak, E. M., Burr, M. L., Bannister, A. J., & Dawson, M. A. (2019). The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 20, pp. 573–589. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0143-1>
- Midha, A., Dearden, S., & McCormack, R. (2015). EGFR mutation incidence in non-Small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: A systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *American Journal of Cancer Research*, 5(9), 2892–2911.
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., ... Massagué, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436(7050), 518. <https://doi.org/10.1038/NATURE03799>
- Mirasierra, M., Fernández-Pérez, A., Díaz-Prieto, N., & Vallejo, M. (2011). Alx3-deficient mice exhibit decreased insulin in beta cells, altered glucose homeostasis and increased apoptosis in pancreatic islets. *Diabetologia*, 54(2), 403–414. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1975-6>
- Mirasierra, Mercedes, & Vallejo, M. (2006). The Homeoprotein Alx3 Expressed in Pancreatic β -Cells Regulates Insulin Gene Transcription by Interacting with the Basic Helix-Loop-Helix Protein E47. *Molecular Endocrinology*, 20(11), 2876–2889. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0472>
- Mirasierra, Mercedes, & Vallejo, M. (2016). Glucose-dependent downregulation of glucagon gene expression mediated by selective interactions between ALX3 and PAX6 in mouse alpha cells. *Diabetologia*, 59(4), 766–775. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3849-4>
- Moarii, M., Boeva, V., Dikey, J.... (2015). Changes in correlation between promoter methylation and gene expression in cancer. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1994-2>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23. <https://doi.org/10.1038/NPP.2012.112>

- Mori, Y., Oлару, A. V., Cheng, Y., Agarwal, R., Yang, J., Luvsanjav, D., ... Meltzer, S. J. (2011). Novel candidate colorectal cancer biomarkers identified by methylation microarray-based scanning. *Endocrine-Related Cancer*, 18(4), 465–478. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0083>
- Muller, P. A. J., & Vousden, K. H. (2013). P53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, Vol. 15, pp. 2–8. <https://doi.org/10.1038/ncb2641>
- Nam, J., & Nei, M. (2005). Evolutionary change of the numbers of homeobox genes in bilateral animals. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12), 2386–2394. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi229>
- NCI (National Cancer Institute). (2019). Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*.
- Oakeley, E. J., Podestà, A., & Jost, J. P. (1997). Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11721–11725. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11721>
- Ohara, K., Arai, E., Takahashi, Y., Ito, N., Shibuya, A., Tsuta, K., ... Kanai, Y. (2017). Genes involved in development and differentiation are commonly methylated in cancers derived from multiple organs: A single-institutional methylome analysis using 1007 tissue specimens. *Carcinogenesis*, 38(3), 241–251. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw209>
- Oláh, E. (2005). Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination. *EJIFCC*, 16(2), 10–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29942228>
- Park, J. W., & Han, J. W. (2019). Targeting epigenetics for cancer therapy. *Archives of Pharmacal Research*, Vol. 42, pp. 159–170. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01126-z>
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(2), 74–108. <https://doi.org/10.3322/canjclin.55.2.74>
- Parkin, D. M., Pisani, P., & Ferlay, J. (1993). Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *International Journal of Cancer*, 54(4), 594–606. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910540413>
- PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389304>
- Perez-Carbonell, L., Balaguer, F., Toiyama, Y., Egoavil, C., Rojas, E., Guarinos, C., ... Goel, A. (2014). IGFBP3 methylation is a novel diagnostic and predictive biomarker in colorectal cancer. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104285>

- Pérez-Villamil, B., Mirasierra, M., & Vallejo, M. (2004). The homeoprotein Alx3 contains discrete functional domains and exhibits cell-specific and selective monomeric binding and transactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 38062–38071. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400800200>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pfeifer, G. P., Steigerwald, S. D., Mueller, P. R., Wold, B., & Riggs, A. D. (1989). Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science*, 246(4931), 810–813. <https://doi.org/10.1126/science.2814502>
- Pham, N. S., Rafii, A., Liu, J., Boyadjiev, S. A., & Tollefson, T. T. (2011). Clinical and genetic characterization of frontorhiny: Report of 3 novel cases and discussion of the surgical management. *Archives of Facial Plastic Surgery*, 13(6), 415–420. <https://doi.org/10.1001/archfacial.2011.684>
- Planchard, D., Besse, B., Groen, H. J. M., Souquet, P. J., Quoix, E., Baik, C. S., ... Johnson, B. E. (2016). Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAFV600E-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 17(7), 984–993. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30146-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30146-2)
- Prada-Arismendy, J., & Castellanos, J. E. (2011). Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Medica*, 243–258. <https://doi.org/10.25100/cm.v42i2.778>
- Qi, J., Zhou, L., Li, D., Yang, J., Wang, H., Cao, H., ... Yuan, Y. (2021). Oncogenic role of ALX3 in cervical cancer cells through KDM2B-mediated histone demethylation of CDC25A. *BMC Cancer*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-021-08552-7>
- Qu, S., Tucker, S. C., Ehrlich, J. S., Levorse, J. M., Flaherty, L. A., Wisdom, R., & Vogt, T. F. (1998). Mutations in mouse Aristaless-like4 cause Strong's luxoid polydactyly. *Development*, 125(14).
- Qu, Shimian, Niswender, K. D., Ji, Q., Van der Meer, R., Keeney, D., Magnuson, M. A., & Wisdom, R. (1997). Polydactyly and ectopic ZPA formation in Alx-4 mutant mice. *Development*, 124(20), 3999–4008.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171>

- Rasmussen, S. L., Krarup, H. B., Sunesen, K. G., Pedersen, I. S., Madsen, P. H., & Ussing, O. T. (2016). Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: A systematic review. *Colorectal Disease*, Vol. 18, pp. 549–561. <https://doi.org/10.1111/codi.13336>
- Rasmussen, S. L., Krarup, H. B., Sunesen, K. G., Johansen, M. B., Stender, M. T., Pedersen, I. S., ... Thorlacius-Ussing, O. (2017). Hypermethylated DNA, a circulating biomarker for colorectal cancer detection. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180809>
- Razin, A., & Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiological Reviews*, Vol. 55, pp. 451–458. <https://doi.org/10.1128/mmbr.55.3.451-458.1991>
- Riggs, A. D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetic and Genome Research*, 14(1), 9–25. <https://doi.org/10.1159/000130315>
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2), 154–160. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916>
- Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E., & Wistuba, I. I. (2016). Diagnosis and molecular classification of lung cancer. In *Cancer Treatment and Research* (Vol. 170, pp. 25–46). https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_2
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods in Molecular Biology*, 1275, 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., ... Paz-Ares, L. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 13(3), 239–246. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70393-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70393-X)
- Rudnick, A., Ling, T., Odagiri, H.... (1994). Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 12203–12207. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.25.12203>
- Sabelli, P. A., & Shewry, P. R. (1995). Northern analysis and nucleic acid probes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 49, pp. 213–228. <https://doi.org/10.1385/0-89603-321-x:213>
- Salehi, R., Atapour, N., Vatandoust, N., Farahani, N., Ahangari, F., & Salehi, A. (2015). Methylation pattern of ALX4 gene promoter as a potential biomarker for blood-based early detection of colorectal cancer. *Advanced Biomedical Research*, 4(1), 252. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.170677>
- Sambuudash, O., Kim, H. S., & Cho, M. Y. (2017). Lack of aberrant methylation in an

adjacent area of left-sided colorectal cancer. *Yonsei Medical Journal*, 58(4), 749–755. <https://doi.org/10.3349/ymj.2017.58.4.749>

Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., ... Johnson, D. H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 355(24), 2542–2550. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061884>

Sandoval, J., Mendez-Gonzalez, J., Nadal, E., Chen, G., Carmona, F. J., Sayols, S., ... Esteller, M. (2013). A prognostic DNA methylation signature for stage I non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(32), 4140–4147. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.5516>

Saxon, J. A., Yu, H., Polosukhin, V. V., Stathopoulos, G. T., Gleaves, L. A., McLoed, A. G., ... Blackwell, T. S. (2018). p52 expression enhances lung cancer progression. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-24488-8>

Shen, H., & Laird, P. W. (2013). Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*, Vol. 153, pp. 38–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.008>

Shi, Y., Sun, X., & He, X. (2017). Overexpression of aristaless-like homeobox-4 inhibits proliferation, invasion, and EMT in hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Research*, 25(1), 11–18. <https://doi.org/10.3727/096504016X14685034103833>

Shin, Y., Kim, M., Won, J., Kim, J., Oh, S. B., Lee, J.-H., & Park, K. (2020). Epigenetic Modification of CFTR in Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 734. <https://doi.org/10.3390/jcm9030734>

Shull, A. Y., Clendenning, M. L., Ghoshal-Gupta, S., Farrell, C. L., Vangapandu, H. V., Dudas, L., ... Buckhaults, P. J. (2013). Somatic Mutations, Allele Loss, and DNA Methylation of the Cub and Sushi Multiple Domains 1 (CSMD1) Gene Reveals Association with Early Age of Diagnosis in Colorectal Cancer Patients. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058731>

Silvia, S., Francesca, C., Marco, L. I., Silvia, N., V, S. G., & Raffaele, C. A. (2006). Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 6, 200. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-200>

Singer-Sam, J., Grant, M., LeBon, J. M., Okuyama, K., Chapman, V., Monk, M., & Riggs, A. D. (1990). Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pkg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. *Molecular and Cellular Biology*, 10(9), 4987–4989. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.9.4987>

Singh, C., & Roy-Chowdhuri, S. (2016). Quantitative real-time PCR: Recent advances. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1392, pp. 161–176). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_15

Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis - PubMed. (n.d.). Retrieved September 5, 2021, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7773933/>

Sobanski, T., Arantes, L., dos Santos, K.... (2021). Methylation profile of colon cancer genes in colorectal precursor lesions and tumor tissue: perspectives for screening. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 56(8), 920–928. <https://doi.org/10.1080/00365521.2021.1922744>

Sobhani, I., Bergsten, E., Couffin, S., Amiot, A., Nebbad, B., Barau, C., ... Sansonetti, P. J. (2019). Colorectal cancer-associated microbiota contributes to oncogenic epigenetic signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(48), 24285–24295. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912129116>

Song, T., Zhou, H., Wei, X., Meng, Y., & Guo, Q. (2020). Downregulation of microRNA-324-3p inhibits lung cancer by blocking the NCAM1-MAPK axis through ALX4. *Cancer Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-00231-2>

Spainhour, J., Lim, H., Yi, S..... (2019). Correlation Patterns Between DNA Methylation and Gene Expression in The Cancer Genome Atlas. *Cancer Informatics*, 18. <https://doi.org/10.1177/1176935119828776>

Sun, X. J., Wang, M. C., Zhang, F. H., & Kong, X. (2018). An integrated analysis of genome-wide DNA methylation and gene expression data in hepatocellular carcinoma. *FEBS Open Bio*, 8(7), 1093–1103. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12433>

Takahashi, M., Tamura, K., Büscher, D., Masuya, H., Yonei-Tamura, S., Matsumoto, K., ... Belmonte, J. C. I. (1998). The role of Alx-4 in the establishment of anteroposterior polarity during vertebrate limb development. *Development*, 125(22), 4417–4425.

Tänzer, M., Balluff, B., Distler, J., Hale, K., Leodolter, A., Röcken, C., ... Ebert, M. P. A. (2010). Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009061>

ten Berge, D., Brouwer, A., el Bahi..... Meijlink, F.. (1998). Mouse Alx3: an aristaless-like homeobox gene expressed during embryogenesis in ectomesenchyme and lateral plate mesoderm. *Developmental Biology*, 199(1), 11–25. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1998.8921>

Trayhurn, P. (1996). Northern blotting. *Proceedings of the Nutrition Society*, 55(1B), 583–589. <https://doi.org/10.1079/pns19960051>

Twigg, S. R. F., Versnel, S. L., Nürnberg, G., Lees, M. M., Bhat, M., Hammond, P., ... Wilkie, A. O. M. (2009). Frontorhiny, a Distinctive Presentation of Frontonasal Dysplasia Caused by Recessive Mutations in the ALX3 Homeobox Gene. *American Journal of Human Genetics*, 84(5), 698–705. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.009>

- Ullah, A., Umair, M., E-Kalsoom, U., Shahzad, S., Basit, S., & Ahmad, W. (2018). Exome sequencing revealed a novel nonsense variant in ALX3 gene underlying frontorhiny. *Journal of Human Genetics*, 63(1), 97–100. <https://doi.org/10.1038/s10038-017-0358-y>
- Uz, E., Alanay, Y., Aktas, D., Vargel, I., Gucer, S., Tuncbilek, G., ... Akarsu, N. A. (2010). Disruption of ALX1 Causes Extreme Microphthalmia and Severe Facial Clefting: Expanding the Spectrum of Autosomal-Recessive ALX-Related Frontonasal Dysplasia. *American Journal of Human Genetics*, 86(5), 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.002>
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, Vol. 44, pp. 619–626. <https://doi.org/10.2144/000112776>
- Wang, G., Bie, F., Li, G., Shi, J., Zeng, Y., & Du, J. (2020). Study of the co-expression gene modules of non-small cell lung cancer metastases. *Cancer Biomarkers*, 1–9. <https://doi.org/10.3233/CBM-201605>
- Wang, R. Y. H., Gehrke, C. W., & Ehrlich, M. (1980). Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Research*, 8(20), 4777–4790. <https://doi.org/10.1093/nar/8.20.4777>
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24), 7213–7218. <https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>
- Wimmer, K., Zhu, X. X., Rouillard, J. M., Ambros, P. F., Lamb, B. J., Kuick, R., ... Hanash, S. M. (2002). Combined restriction landmark genomic scanning and virtual genome scans identify a novel human homeobox gene, ALX3, that is hypermethylated in neuroblastoma. *Genes Chromosomes and Cancer*, 33(3), 285–294. <https://doi.org/10.1002/gcc.10030>
- Wojdacz, T. K., & Dobrovic, A. (2007). Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): A new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research*, 35(6), e41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm013>
- Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F., & Liotta, L. A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 80(S8), 1529–1537. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19971015\)80:8+<1529::AID-CNCR2>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19971015)80:8+<1529::AID-CNCR2>3.0.CO;2-F)
- Wuyts, W., Cleiren, E., Van Hul, W., Homfray, T., Rasore-Quartino, A., & Vanhoenacker, F. (2000). The ALX4 homeobox gene is mutated in patients with ossification defects of the skull (foramina parietalia permagna, OMIM 168500). *Journal of Medical Genetics*, 37(12), 916–920. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.12.916>
- Xie, L., Yao, Z., Zhang, Y., Li, D., Hu, F., Liao, Y., ... Yang, Z. (2018). Deep RNA sequencing reveals the dynamic regulation of miRNA, lncRNAs, and mRNAs in

osteosarcoma tumorigenesis and pulmonary metastasis article. *Cell Death and Disease*, 9(7). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0813-5>

Xiong, Z., & Laird, P. W. (1997). COBRA: A sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Research*, 25(12), 2532–2534. <https://doi.org/10.1093/nar/25.12.2532>

Xu, Q., Zhou, L., Yang, G., Meng, F., Wan, Y., Wang, L., & Zhang, L. (2020). Overexpression of circ_0001445 decelerates hepatocellular carcinoma progression by regulating miR-942-5p/ALX4 axis. *Biotechnology Letters*, 42(12), 2735–2747. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02985-z>

Xu, X., Xu, L., Huang, H., Li, J., Dong, S., Jin, L., ... Li, L. (2020). Identification of Hub Genes as Biomarkers Correlated with the Proliferation and Prognosis in Lung Cancer: A Weighted Gene Co-Expression Network Analysis. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3416807>

Yang, J., Han, F., Liu, W., Chen, H., Hao, X., Jiang, X., ... Liu, J. (2017). ALX4, an epigenetically down regulated tumor suppressor, inhibits breast cancer progression by interfering Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0643-9>

Yang, M., Pan, Y., & Zhou, Y. (2015). Depletion of ALX1 causes inhibition of migration and induction of apoptosis in human osteosarcoma. *Tumor Biology*, 36(8), 5965–5970. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3271-z>

Yang, P., Cerhan, J. R., Vierkant, R. A., Olson, J. E., Vachon, C. M., Limburg, P. J., ... Sellers, T. A. (2002). Adenocarcinoma of the lung is strongly associated with cigarette smoking: Further evidence from a prospective study of women. *American Journal of Epidemiology*, 156(12), 1114–1122. <https://doi.org/10.1093/aje/kwf153>

Yao, W., Liu, Y., Zhang, Z., Li, G., Xu, X., Zou, K., ... Zou, L. (2015). ALX1 promotes migration and invasion of lung cancer cells through increasing snail expression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(10), 12129–12139.

Yeleser, İ. (2020) Adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom tanılı akciğer kanseri hastalarında bazı pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin araştırılması (Yüksek Lisans Tezi) , <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>

You, J. S., & Jones, P. A. (2012). Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell*, Vol. 22, pp. 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.008>

Yu, J., Zhu, T., Wang, Z., Zhang, H., Qian, Z., Xu, H., ... Zhu, J. (2007). A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(24), 7296–7304. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0861>

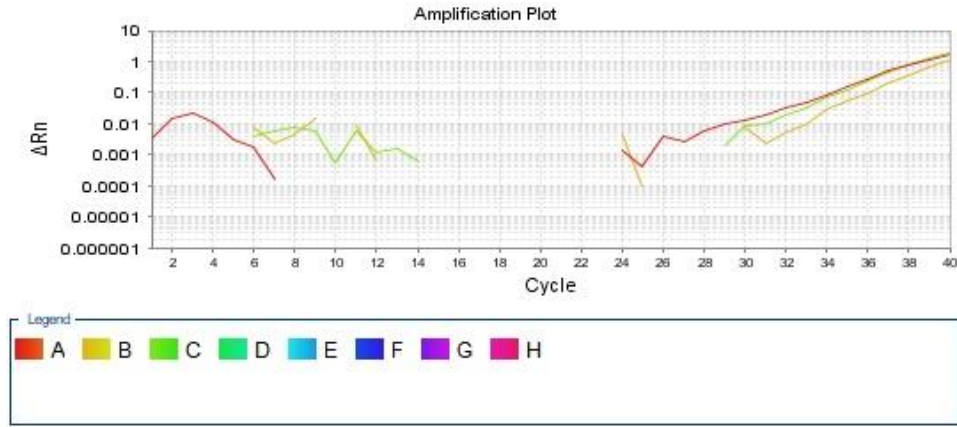
- Yuan, H., Kajiyama, H., Ito, S., Chen, D., Shibata, K., Hamaguchi, M., ... Senga, T. (2015). HOXB13 and ALX4 induce SLUG expression for the promotion of EMT and cell invasion in ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 6(15), 1–12. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3673>
- Yuan, H., Kajiyama, H., Ito, S., Yoshikawa, N., Hyodo, T., Asano, E., ... Senga, T. (2013). ALX1 induces snail expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 73(5), 1581–1590. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2377>
- Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research*, 5(3), 288. <https://doi.org/10.21037/TLCR.2016.06.07>
- Zhao, Ji, Chen, H. qiang, Yang, H. fang, Li, Y., Chen, D. jiao, Huang, Y. jing, ... Liu, W. bin. (2019). Epigenetic silencing of ALX4 regulates microcystin-LR induced hepatocellular carcinoma through the P53 pathway. *Science of the Total Environment*, 683, 317–330. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.144>
- Zhao, Jingwei, Wang, L., Kong, D., Hu, G., & Wei, B. (2019). Construction of Novel DNA Methylation-Based Prognostic Model to Predict Survival in Glioblastoma. *Journal of Computational Biology*, 26(0), 1–11. <https://doi.org/10.1089/cmb.2019.0125>
- Zhao, Q., Behringer, R. R., & De Crombrughe, B. (1996). Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the *Cart1* homeobox gene. *Nature Genetics*, 13(3), 275–283. <https://doi.org/10.1038/ng0796-275>
- Zhao, X., & Hu, X. (2019). Downregulated long noncoding RNA LINC00313 inhibits the epithelial–mesenchymal transition, invasion, and migration of thyroid cancer cells through inhibiting the methylation of ALX4. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 20992–21004. <https://doi.org/10.1002/jcp.28703>
- Zhu, Y., Wang, Q., Xia, Y., Xiong, X., Weng, S., Ni, H., ... Lin, Y. (2020). Evaluation of MiR-1908-3p as a novel serum biomarker for breast cancer and analysis its oncogenic function and target genes. *BMC Cancer*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07125-4>
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12). <https://doi.org/10.1093/nar/gnh101>
- Zou, H., Harrington, J. J., Shire, A. M., Rego, R. L., Wang, L., Campbell, M. E., ... Ahlquist, D. A. (2007). Highly methylated genes in colorectal neoplasia: Implications for screening. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16(12), 2686–2696. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0518>

EKLER

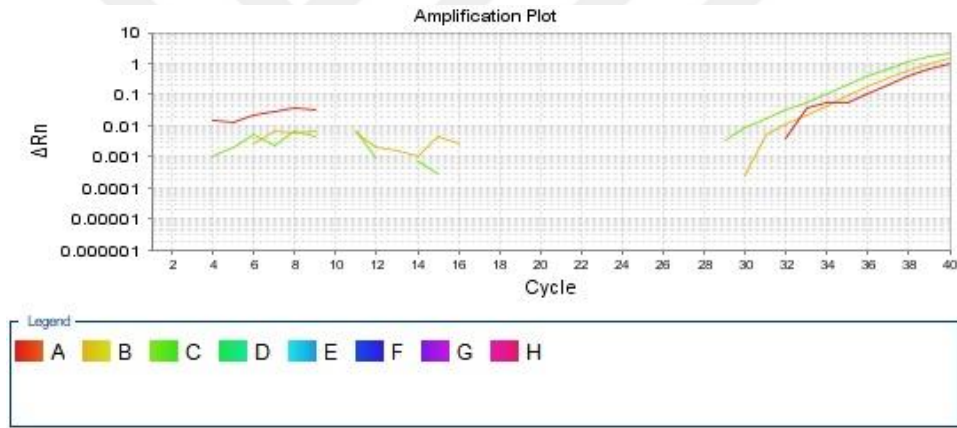
- EK 1.** Gerçek-Zamanlı PCR analizi sonucuna göre A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarında *ALX3* geninin amplifikasyon grafikleri
- EK 2.** Gerçek-Zamanlı PCR analizi sonucuna göre A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarında *GAPDH* geninin amplifikasyon grafikleri
- EK 3.** Gerçek-Zamanlı PCR analizi sonucuna göre A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarında *ALX3* geninin erime eğrisi grafikleri
- EK 4.** Gerçek-Zamanlı PCR analizi sonucuna göre A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarında *GAPDH* geninin erime eğrisi grafikleri
- EK 5.** Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarının Ct değerlerini içeren excel tablosu



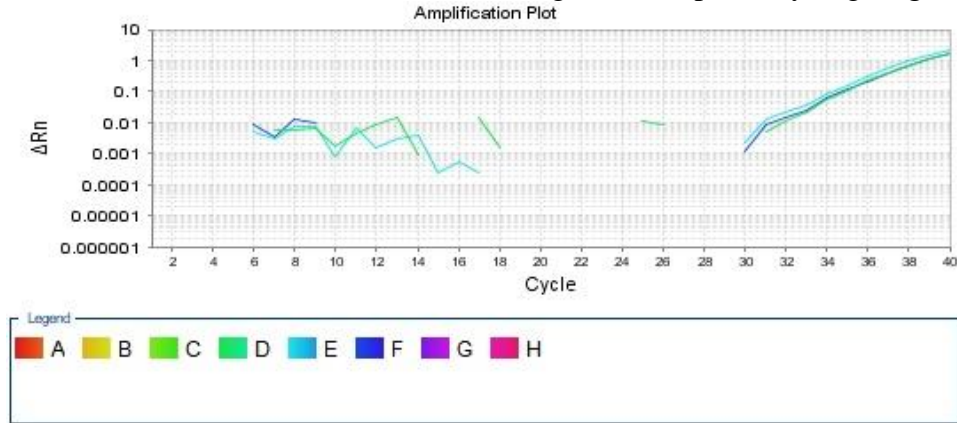
EK 1. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarında *ALX3* Geninin Amplifikasyon Grafikleri



Ek Şekil 1.1. A549 hücre hattında *ALX3* geninin amplifikasyon grafiği

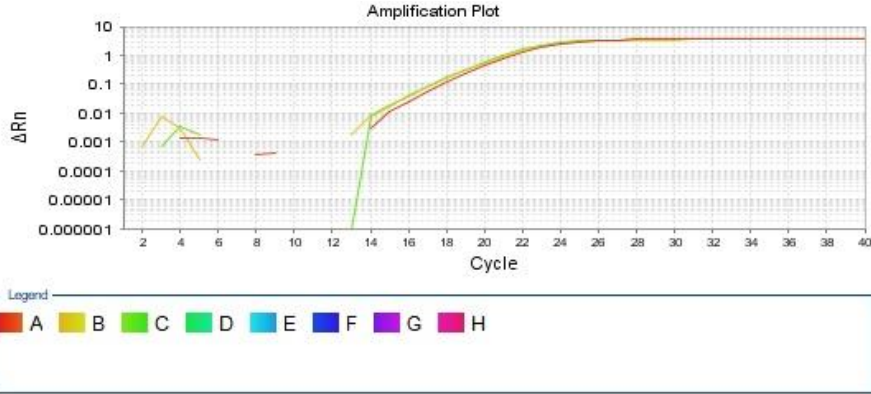


Ek Şekil 1.2. H1299 hücre hattında *ALX3* geninin amplifikasyon grafiği

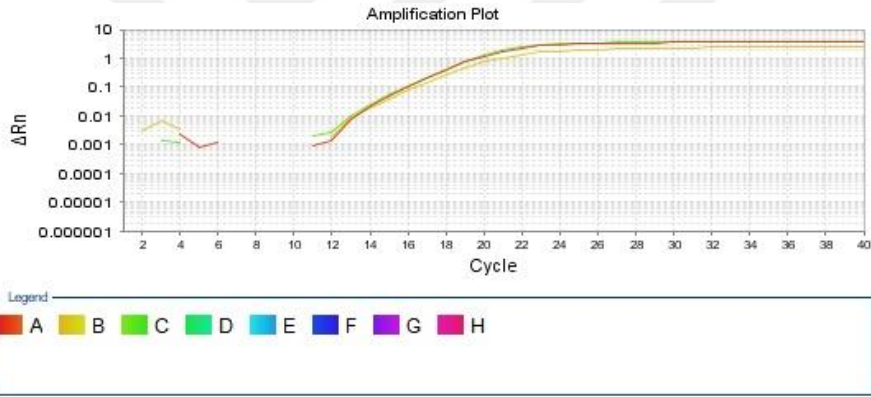


Ek Şekil 1.3. Beas-2B hücre hattında *ALX3* geninin amplifikasyon grafiği

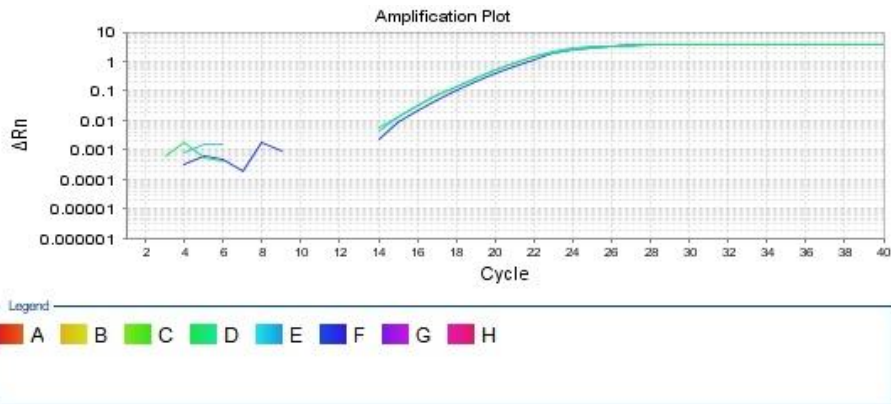
EK 2. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarında GAPDH Geninin Amplifikasyon Grafikleri



Ek Şekil 2.1. A549 hücre hattında GAPDH geninin amplifikasyon grafiği

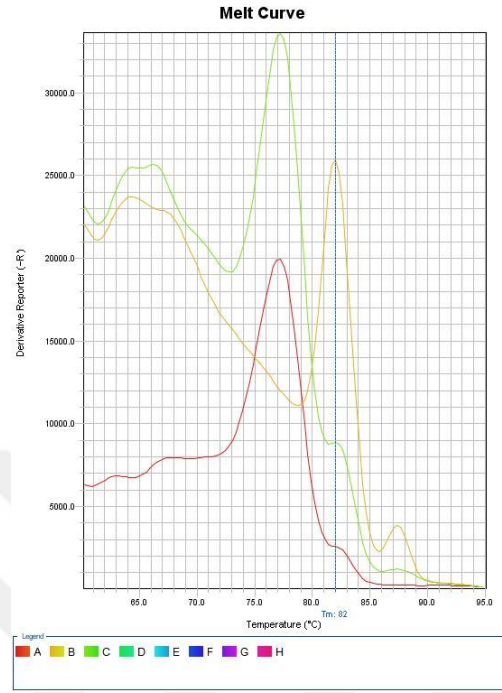


Ek Şekil 2.2. H1299 hücre hattında GAPDH geninin amplifikasyon grafiği

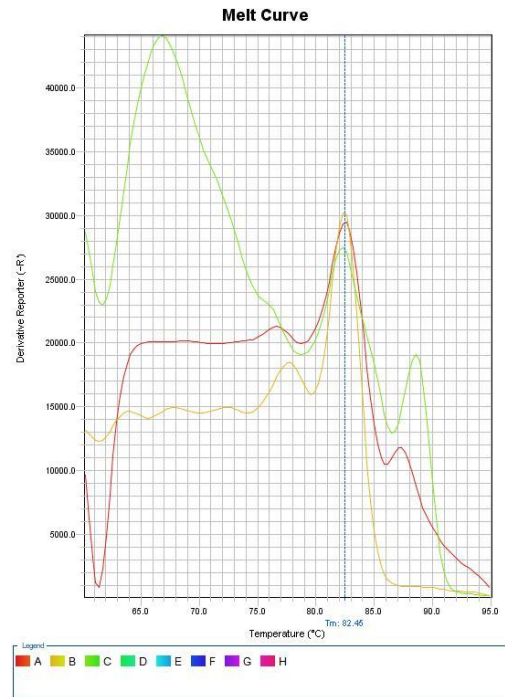


Ek Şekil 2.3. Beas-2B hücre hattında GAPDH geninin amplifikasyon grafiği

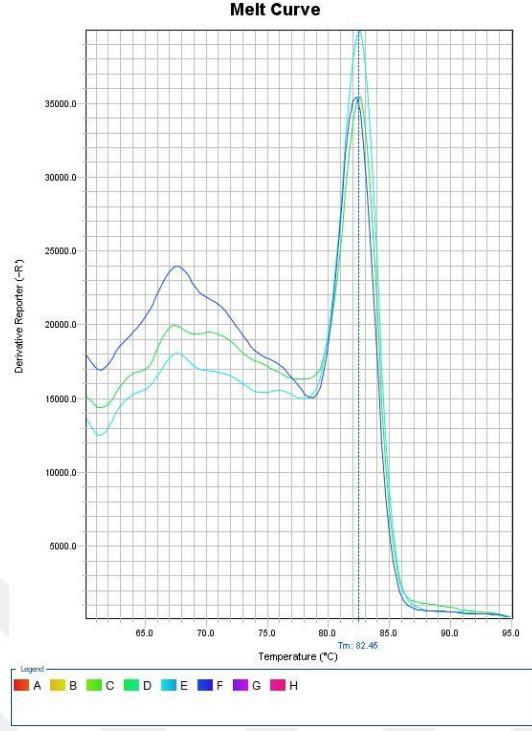
EK 3. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarında ALX3 Geninin Erime Eğrisi Grafikleri



Ek Şekil 3.1. A549 hücre hattında ALX3 geninin erime eğrisi grafiği

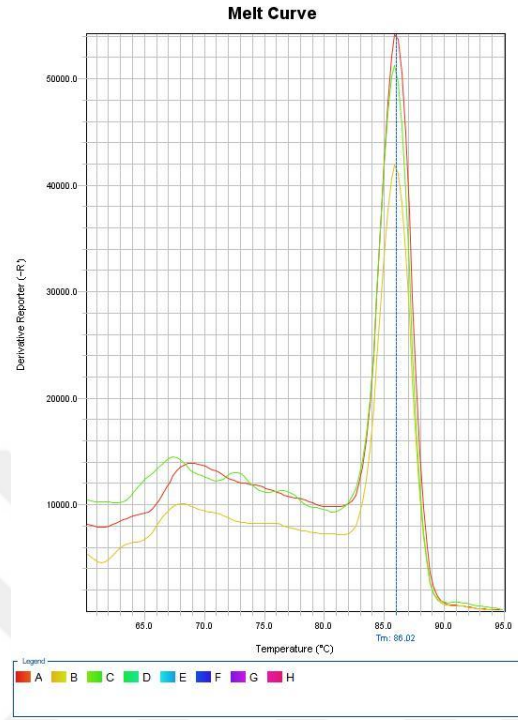


Ek Şekil 3.2. H1299 hücre hattında ALX3 geninin erime eğrisi grafiği

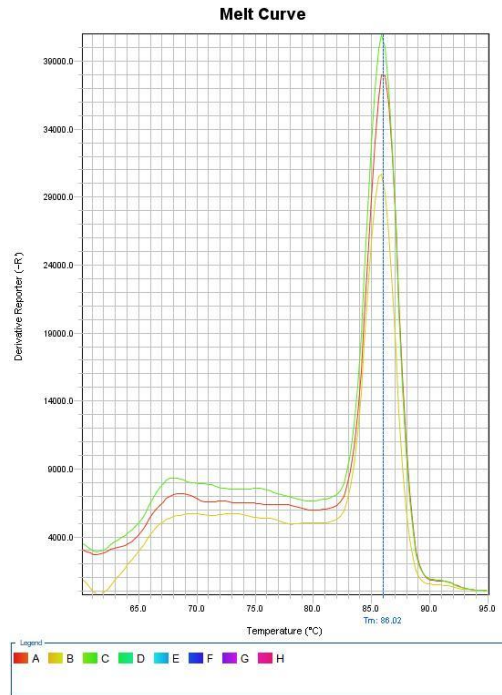


Ek Şekil 3.3. Beas-2B hücre hattında *ALX3* geninin erime eğrisi grafiği

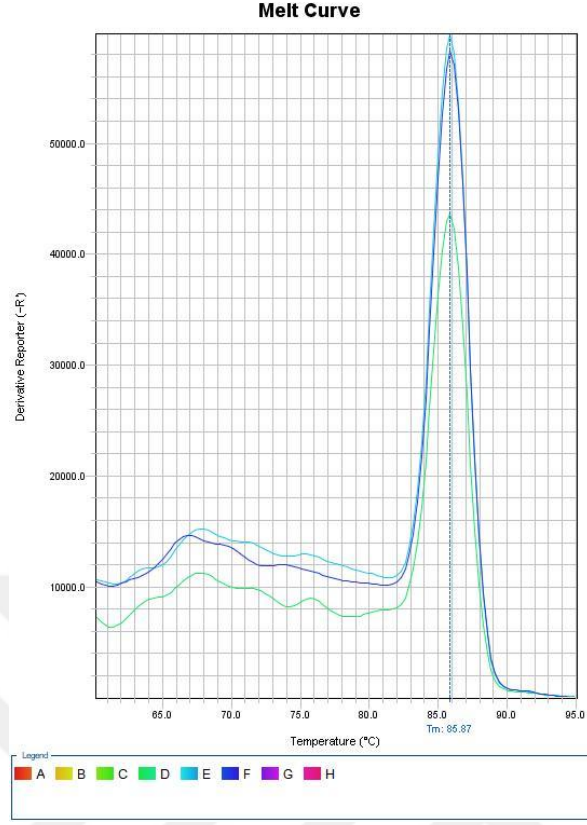
EK 4. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarında GAPDH Geninin Erime Eğrisi Grafikleri



Ek Şekil 4.1. A549 hücre hattında GAPDH geninin erime eğrisi grafiği



Ek Şekil 4.2. H1299 hücre hattında GAPDH geninin erime eğrisi grafiği



Ek Şekil 4.3. Beas-2B hücre hattında GAPDH geninin erime eğrisi grafiği

EK 5. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B Hücre Hatlarının Ct Değerlerini İçeren Excel Tablosu

Ek Çizelge 5.1. Gerçek-Zamanlı PCR Analizi Sonucuna Göre A549, H1299 ve Beas-2B hücre hatlarının Ct değerlerini içeren excel tablosu

Well	Zone	Sample Nr	Target	Nar	Task	Reporter	Quencher	RQ	RO Min	RO Max	Ct	Ct Mean	Ct SD	ΔCt	ΔCt Mean	ΔCt SE	HK Control	HK Control ΔCt	Automatic Ct	Ct Thresh	Automatic Baseline S	Baseline E	Efficiency	Tm1	Tm2	Tm3	Comments	HIGHSD	OUTLIER	EXPFAIL	MTP					
A1	1	A549	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				35.10084	35.73495	0.862804						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	30	1	77.08366											
A2	1	H1299	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				38.61536	35.70918	0.898416						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	34	1	82.44893	76.63668	87.2175									
A3	2	MDA	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				31.48538	31.58751	0.102389						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	27	1	82.59186											
A5	3	A549	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	1	0.365177	2.738395	17.50546	17.2007	0.278513	-18.5342	0.52345			0	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	14	1	86.01952											
A6	3	H1299	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	2.556262	0.810724	0.060044	15.70007	15.8209	0.263403	-19.8883	0.596717			-1.35404	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	12	1	86.01952											
A7	4	MDA	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	0.128083	0.106675	0.153787	16.10978	16.01811	0.128384	-15.5694	0.095033			2.96485	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	13	1	86.16789											
B1	1	A549	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				36.71748	35.73495	0.862804						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	32	1	82.00156	64.26733	87.36553									
B2	1	H1299	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				35.87493	35.70918	0.898416						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	31	1	82.44893	77.67976										
B3	2	MDA	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				31.5854	31.58751	0.102389						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	27	1	82.59186											
B5	3	A549	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	1	0.365177	2.738395	17.13725	17.2007	0.278513	-18.5342	0.52345			0	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	14	1	85.87049											
B6	3	H1299	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	2.556262	0.810724	0.060044	16.12303	15.8209	0.263403	-19.8883	0.596717			-1.35404	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	13	1	85.72147											
B7	4	MDA	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	0.128083	0.106675	0.153787	15.87137	16.01811	0.128384	-15.5694	0.095033			2.96485	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	12	1	86.16789											
C1	1	A549	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				35.38632	35.73495	0.862804						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	30	1	77.23289											
C2	1	H1299	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				34.63725	35.70918	0.898416						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	30	1	86.93979	82.29811	88.56575									
C3	2	MDA	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				31.69155	31.58751	0.102389						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	27	1	82.59186											
C5	3	A549	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	1	0.365177	2.738395	16.95938	17.2007	0.278513	-18.5342	0.52345			0	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	14	1	85.87049											
C6	3	H1299	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	2.556262	0.810724	0.060044	16.03696	15.8209	0.263403	-19.8883	0.596717			-1.35404	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	12	1	85.87049											
C7	4	MDA	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	0.128083	0.106675	0.153787	16.07318	16.01811	0.128384	-15.5694	0.095033			2.96485	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	13	1	86.16789											
D1	1	BEAS2B	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				35.50784	35.35274	0.337711						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	31	1	82.44893											
D2	1	HCF7	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				37.05488	36.46731	0.522011						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	32	1	82.59186	67.39985										
D3	2	NK	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				Undetermined								DOGRU	0.158426	DOGRU	3	35	1	76.63636	62.17369										
D5	3	BEAS2B	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	0.6459	0.411044	1.014945	17.31345	17.44911	0.226715	-17.9036	0.234839			0.630617	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	14	1	85.87049											
D6	3	HCF7	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	1.56992	0.873496	2.821593	17.23932	17.28237	0.076962	-19.1849	0.304641			-0.65029	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	14	1	85.72147											
D7	4	NK	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None				Undetermined	37.09281							DOGRU	0.081284	DOGRU	3	39	1	61.87405											
E1	1	BEAS2B	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				34.96534	35.35274	0.337711						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	31	1	82.44893	67.69495										
E2	1	HCF7	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				36.05576	36.46731	0.522011						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	32	1	82.23961											
E3	2	NK	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				Undetermined								DOGRU	0.158426	DOGRU	3	35	1	62.02465	76.63036										
E5	3	BEAS2B	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	0.6459	0.411044	1.014945	17.32303	17.44911	0.226715	-17.9036	0.234839			0.630617	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	14	1	85.87049											
E6	3	HCF7	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	1.56992	0.873496	2.821593	17.23932	17.28237	0.076962	-19.1849	0.304641			-0.65029	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	14	1	85.72147											
E7	4	NK	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None				37.09281	37.09281							DOGRU	0.081284	DOGRU	3	34	1	83.634											
F1	1	BEAS2B	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				35.58604	35.35274	0.337711						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	32	1	82.15958	67.69495										
F2	1	HCF7	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				36.29169	36.46731	0.522011						DOGRU	0.158426	DOGRU	3	32	1	82.00156	66.94382										
F3	2	NK	ALX3	UNKNOW	SYBR	None	None				Undetermined								DOGRU	0.158426	DOGRU	3	35	1	61.57754	82.23379										
F5	3	BEAS2B	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	0.6459	0.411044	1.014945	17.71084	17.44911	0.226715	-17.9036	0.234839			0.630617	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	14	1	85.87049											
F6	3	HCF7	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None	1.56992	0.873496	2.821593	17.37122	17.28237	0.076962	-19.1849	0.304641			-0.65029	DOGRU	0.081284	DOGRU	3	14	1	85.72147											
F7	4	NK	GAPDH	UNKNOW	SYBR	None	None				Undetermined	37.09281							DOGRU	0.081284	DOGRU	3	39	1	61.57597											

Analysis: T:Singleplex
 Endogen: ALX3
 RQ Min/M: 95.0
 Reference: A549