T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BİSFENOL A'NIN FARKLI HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE DNA METİLASYONU VE HİSTON MODİFİKASYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MİNE ŞENYILDIZ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SİBEL ÖZDEN

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı YÜKSEK LİSANS Programında Mine ŞENYILDIZ tarafından hazırlanan Bisfenol A'nın Farklı Hücre Kültürlerinde DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları Üzerine Etkilerinin Araştırılması başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

04 / 01 / 2016

Tez Sınav Jürisi

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

1.Prof.Dr. BUKET ALPERTUNGA
İ. Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

2.Prof.Dr. Gülden Z. OMURTAG
M. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

3.Doç.Dr. Sibel ÖZDEN
İ.Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

4.

5.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

MİNE ŞENYILDIZ

İTHAF

Aileme, dedem ve babaanneme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Her konuda desteğini esirgemeyen, üzerimde çok fazla emeği olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Sibel Özden'e teşekkürü bir borç bilirim.

Desteklerinden dolayı İ. Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim Doç. Dr. Gül Özhan'a ve Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı üyelerine,

Gerek teknik gerekse hayata dair tecrübelerini esirgemeyen değerli ağabeyim Fatih Mehmet Sarı'ya, her konuda paylaşımda bulunabildiğim ve desteğini her zaman hissettiğim değerli dostum Merve Arıcı'ya, kendisinden çok fazla şey öğrendiğime inandığım Öğr. Gör. Dr. Mahmoud Abudayyak'a, her konuda desteklerini her zaman yanımda hissettiğim arkadaşlarım Arş. Gör. Ezgi Öztaş ve Ecem Fatma Karaman'a,

Yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, deneysel çalışmalarımın bir kısmını birlikte yürüttüğüm İ. Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Pelin Arda Pirinççi ve Yard. Doç. Dr. Serap Sancar'a, yardımsever çalışma partnerim sevgili Cansu Özal'a ve ilgi ve alakalarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı üyelerine,

Üzerimdeki hakkı şüphesiz en fazla olup bu tecrübeleri yaşamama vesile olan annem Nurhan Şenyıldız, babam Mehmet Ali Şenyıldız'a, beni büyüten rahmetli dedem Hikmet Şenyıldız ve rahmetli babaannem Ayşe Şenyıldız'a varlıklarıyla bana dünyanın en şanslı insanı olduğumu hissettirdikleri için, yeri her zaman ayrı olan biricik kız kardeşim Melike Hambarlı ve eşi Mehmet Hambarlı'ya, tanıdığım günden bu yana her zaman güvendiğim ve ailemden biri olarak gördüğüm Asım Can Çağlayan'a, kuzenim Kudret Erol, eşi Serpil Erol ve sevimli kızları Amine Hatice Erol'a her türlü destekleri ve yardımları için, yerleri her zaman ayrı olan değerli dostlarım Sevinç Akay, Ayşe Aslan, Turhan Hosanlı'ya, zor zamanlarımda çıkış noktası bulmamı sağlayan ve destek olan sevgili Sümeyye Yaşar'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans tez çalışmam sırasında TÜBİTAK-BİDEB "2210-C/Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı" 2014/2 kapsamında bursiyer olarak desteklenmiş olduğumdan dolayı TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 49182.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET ..... XVİİ
ABSTRACT ..... XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Epigenetik 3
2.2. DNA Metilasyonu 5
2.3. Histon Modifikasyonları 9
2.3.1. Histon Asetilasyonu 10
2.3.2. Histon Metilasyonu 12
2.3.3. Epigenetik Değişikliklerin Araştırımasında Kullanılan Teknikler 13
2.4. Bisfenol A (BPA) 20
2.4.1. BPA'nın Kimyasal Yapısı 20
2.4.2. BPA'nın Fizikokimyasal Özellikleri 21
2.4.3. BPA'nın Kullanım Alanları 21
2.4.4. BPA'ya Maruziyet 22
2.4.5. BPA'nın Toksikokinetiği 23
2.4.6. BPA'nın Toksisite Mekanizmaları 23
2.4.6.1. Genotoksik Etkiler 24
2.4.6.2. Epigenetik Etkiler 25
2.4.6.3. Endokrin Bozucu Etkiler 25
2.4.6.4. Oksidatif Stres ve Mitokondrial Fonksiyon Bozukluğu Üzerine Etkiler 27
2.4.6.5. Hücre Sinyal Yolakları Üzerine Etkiler 27

2.4.7. BPA'nın Toksik Etkileri 28
2.4.7.1. Akut Toksik Etkileri.....28
2.4.7.2. Üreme ve Gelişim Sistemi Üzerine Toksik Etkiler.....28
2.4.7.3. Nörolojik Sistem Üzerine Toksik Etkiler.....29
2.4.7.4. İmmün Sistem Üzerine Toksik Etkiler.....30
2.4.7.5. Hormonal Sistem Üzerine Toksik Etkiler.....30
2.4.7.6. Obezite ve Diyabet Üzerine Toksik Etkiler 31
2.4.7.7. BPA ve Karsinojenez İlişkisi 32
2.4.8. BPA'nın Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkileri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar 33
2.4.9. BPA ile ilgili Yasal Düzenlemeler.....43
2.5. Hücre Kültürü 44
2.5.1. Hücre Kültür Koşulları.....47
2.6. Sitotoksisite Testleri.....49
2.6.1. Laktat Dehidrojenaz Tayini (LDH Testi).....50
2.6.2. MTT Testi 51
2.6.3. XTT Testi.....51
2.6.4. Nötral kırmızı alım (NRU) testi 51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....53
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler.....53
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar 55
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler.....56
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....57
3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği 57
3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini.....57
3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler.....58
3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması 58
3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama).....59
3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması 59
3.4.7. Hücrelerin Sayılması.....59
3.5. Sitotoksisite Testleri.....60
3.5.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması 60
3.5.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması.....61

3.5.3. BPA'nın Hücre Kültürüne Maruziyeti 62
3.5.4. MTT Testi 64
3.5.4.1. MTT Testinin Esası 64
3.5.4.2. MTT Testi Protokolü 64
3.5.5. NRU testi 65
3.5.5.1. NRU Testinin Esası 65
3.5.5.2. NRU Testi için Çözeltilerin Hazırlanışı 65
3.5.5.3. NRU Testi Protokolü 65
3.5.6. Sonuçların Değerlendirilmesi 66
3.6. BPA'nın Hücre Dizilerine Maruziyeti 67
3.7. DNA Metilasyonunun Analizi 68
3.7.1. DNA İzolasyonu 68
3.7.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini 69
3.7.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini 69
3.7.3.1. 5-mC'nin Eliza Kit ile Tayini 70
3.7.3.2. 5-hmC'nin Eliza Kit ile Tayini 72
3.7.4. Gene-özgü DNA Metilasyonunun Tayini 74
3.8. Gen Ekspresyonların tayini 76
3.8.1. Total RNA İzolasyonu 76
3.8.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini 78
3.8.3. cDNA Sentezi 78
3.8.4. Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Tayini 79
3.9. Histon Proteinlerinin Western Blot Yöntemi ile Tayini 80
3.9.1. Histon Proteinlerinin İzolasyonu 80
3.9.2. Proteinlerin Miktar Tayini 82
3.9.3. Histon Modifikasyonlarının Western Blot Tekniği ile Tayini 83
3.10. İstatistiksel Değerlendirme 85
4. BULGULAR 86
4.1. BPA'nın SH-SY5Y ve PC-3 Hücrelerinde Sitotoksisite Üzerine Etkileri 86
4.2. BPA'ya Maruz Bırakılmış SH-SY5Y ve PC-3 Hücrelerinden İzole Edilen DNA ve RNA'ların Miktarları ve Saflıkları 87
4.3. Global DNA Metilasyonu Sonuçları 89
4.4. Gene özgü DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi Sonuçları 93

4.5. Global Histon Modifikasyonları Sonuçları 98
4.5.1. Protein Tayini 98
4.5.2. BPA'nın Histon Modifikasyonları Üzerine Etkileri 99
5. TARTIŞMA 101
KAYNAKLAR 107
ÖZGEÇMİŞ 133

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kanserde promotor bölge CpG adalarında hipermetilasyona uğrayan önemli genler (Das and Singal, 2004; Henrique ve ark., 2006). 7
Tablo 2-2: DNA metilasyonunu analiz etmek için kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları 16
Tablo 2-3: BPA'nın genel özellikleri (Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2014). 21
Tablo 2-4: BPA'nın epigenetik mekanizmalar üzerine etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalar 36
Tablo 2-5: EFSA/AFC Panelinde bildirilen BPA'nın günlük tüketim maruziyetleri (EFSA, 2015). 43
Tablo 3-1: 'OneStep qMethyl array'lerin RT-PCR'da çalışma koşulları 76
Tablo 3-2: 'Roche LightCycler 480 Probes' RT-PCR protokolü 80
Tablo 4-1: 0-10 μM Konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında SH-SY5Y hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları. 88
Tablo 4-2: 0-10 μM Konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında PC-3 hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları. 89
Tablo 4-3: SH-SY5Y ve PC-3 hücrelerinde 0-10 μM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin relatif histon H3K9me3, H3K27me3 ve H3K9ac seviyeleri (kontrolün %'si) üzerine etkisi. 100

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Epigenetik modifikasyonlar (Sawan ve ark., 2008). 3
Şekil 2-2: A. Nükleozom yapısı; B. Kromatin yapısı. 4
Şekil 2-3. A. Heterokromatin; B. Ökromatin. 4
Şekil 2-4: Memeli genomunda sitozinin metilasyonu (Herman ve Baylin, 2003). 5
Şekil 2-5: DNA metilasyonu ve demetilasyonunun şematik gösterilmesi (Thomson, 2014). 9
Şekil 2-6: Nükleozom yapısı ve majör histon modifikasyonlarının şematik gösterimi ve rol oynayan enzimler (Tollefsbol, 2011). 10
Şekil 2-7: HAT enzimi aracılığıyla histon asetilasyonu ve HDAC enzimi aracılığıyla histon deasetilasyonunun şemetik gösterimi (Kim and Yang, 2011). 11
Şekil 2-8: Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu ile ilişkili açık ve kapalı gen ifadesi (McIntyre ve ark., 2007). 12
Şekil 2-9: Lizin rezidülerinin mono-, di- ve trimetilasyonu (Klose ve Zhang, 2007). ... 12
Şekil 2-10: BPA, DES ve β-östradiol'ün kimyasal yapısı. 20
Şekil 2-11: BPA'nın kronik hastalıklarda rol oynayan hücresel ve moleküler mekanizmaları (Rezg ve ark., 2014). 24
Şekil 2-12: Fibroblastik (veya fibroblast benzeri) hücreler. 47
Şekil 2-13: Epitelyal benzeri hücreler. 48
Şekil 2-14: Lenfoblast benzeri hücreler. 48
Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikroplakaya hücre ekimi. 61
Şekil 3-2: BPA'nın 1/2 oranında seyreltilmesi. 62
Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikroplaka düzeni. 63
Şekil 3-4: 5-mC DNA Eliza kitinin temeli. 70
Şekil 3-5: 5-hmC DNA Eliza kitinin sandviç temelli modeli. 72
Şekil 3-6: 'qMethyl array' Mikroplaka düzeni. 75
Şekil 3-7: Histon proteinlerinin izolasyon basamakları 81
Şekil 4-1: SH-SY5Y hücrelerine 0-1000 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonucu MTT ve NRU testi sonuçları. 86
Şekil 4-2: PC-3 hücrelerine 0-1000 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonucu MTT ve NRU testi sonuçları. 87
Şekil 4-3: 5-mC Standardına ait kalibrasyon eğrisi. 90

Şekil 4-4: 0-10 µM konsantrasyon aralığında 48 ve 96 saat BPA ile maruz bırakılan SHSY-5Y hücrelerinde % 5-mC seviyeleri. 90
Şekil 4-5: 0-10 µM konsantrasyon aralığında 48 ve 96 saat BPA ile maruz bırakılan PC-3hücrelerinde % 5-mC seviyeleri. 91
Şekil 4-6: 5-hmC Standardına ait kalibrasyon eğrisi. 91
Şekil 4-7: 0-10 µM konsantrasyon aralığında 48 ve 96 saat BPA ile maruz bırakılan SHSY-5Y hücrelerinde % 5-hmC seviyeleri. 92
Şekil 4-8: 0-10 µM konsantrasyon aralığında 48 ve 96 saat BPA ile maruz bırakılan PC-3 hücrelerinde % 5-hmC seviyeleri. 92
Şekil 4-9: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *p16* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi. 93
Şekil 4-10: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *p16* geni relatif ekspresyonu üzerine etkisi. 94
Şekil 4-11: SH-SY5Y hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *p16* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi. 94
Şekil 4-12: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *siklinD2* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi. 95
Şekil 4-13: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *siklinD2* geni relatif ekspresyonu üzerine etkisi. 95
Şekil 4-14: SH-SY5Y hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *siklinD2* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi. 96
Şekil 4-15: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *Rassf1* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi. 97
Şekil 4-16: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *Rassf1* geni relatif ekspresyonu üzerine etkisi. 97
Şekil 4-17: SH-SY5Y hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *Rassf1* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi. 98
Şekil 4-18: Protein standart ölçü eğrisi. 98
Şekil 4-19: SH-SY5Y ve PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin histon H3K9me3, H3K27me3 ve H3K9ac western blot görüntüleri. 99

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
5-hmC	5-hidroksimetilsitozin
5-mC	5-metilsitozin
A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
Actb	β-aktin geni
AR	Androjen reseptör
AR-T877A	AR reseptörü nokta mutasyonlu insan prostat kanser hücresi
ATCC	Amerikan hücre kültür bankası (‘American Type Culture Collection’)
ATP	Adenozin trifosfat
BPA	Bisfenol A
BSA	Sığır serum albümini
C	Sitozin bazı
CCND2	G1/S-spesifik *siklinD2*
CDKN2A	siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A, *p16*
CMF-PBS	Kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi
CO_2	Karbondioksit
COMT	Katekol-O-metiltransferaz
CpG	Sitozin fosfat guanin
D3	Dopamin reseptör
DES	Dietilstilbestrol
DMEM	Dulbecco’nun modifiye edilmiş eagle besiyeri
DMEM/F12	Dulbecco’nun modifiye edilmiş eagle besiyeri /F12
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EMEM	Eagle’ın minimum esansiyel besiyeri
ER	Östrojen reseptör

ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar
EZH2	Histon lizin N-metiltransferaz enzimi (‘Enhancer of zeste homolog 2’)
FBS	Fetal sığır serumu
G	Guanin bazı
GC	Guanin sitozin
GPR30	G-protein ilişkili reseptör
G-protein	Guanin nükleotidi bağlayıcı proteinler
HAT	Histon asetil transferaz
HCO_3^-	Bikarbonat
HDAC	Histon deasetilaz
HDM	Histon demetilaz
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit
hIAPP	İnsan adacık amiloid polipeptit
HKMT	Histon lizin metiltransferaz
HMT	Histon metiltransferaz
HOTAIR	HOX transkript antisens RNA
HOX	Homeotik genler
HRMT	Arjinin metiltransferaz
HRP	Horseradish peroksidaz enzimi
HT-22	Hipokampal nöronal hücre
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
IC_{50}	%50 İnhibisyon konsantrasyonu
IgG	İmmünglobulin G
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
kg	Kilogram
LAMP3	Lizozomlarla ilişkili membrane protein
LD_{50}	Medyan letal doz
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDS	Lityum dodesil sülfat
M	Molar
MBD	Metil bağlayıcı protein
MeCP2	Metile CpG bağlanma protein
MES	2-(N-morfolin) ethansülfonik asit

mg	Miligram
MGMT	O^6-metilguanin-DNA metiltransferaz
miRNA	Mikro RNA
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MMTVerbB2	Transjenik fare modeli
mRNA	Mesajcı RNA
MSP	Metilasyona özgü PCR
MSRE	Metilasyon duyarlı restriksiyon enzimleri
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADH	Nikotinamid adenine dinükleotid
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
NOAEL	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen değer (‘No observed adverse effect level’)
NRU	Nötral kırmızı alım testi
O_2	Oksijen
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PC-3	İnsan prostat kanser hücresi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PVC	Polivinil klorür
Rassf1	Ras ilişkili domain içeren protein 1
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki dönüş
RT-PCR	Gerçek zamanlı termal döngü cihazı (‘Real-Time PCR’)
SAM	S-adenozil metiyonin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH-SY5Y	İnsan nöroblastoma hücresi
SULT2A1	İnsan sulfotransferaz enzimleri 2A ailesi

SYTO® 9	Yeşil floresan nükleik asit boyası
T3	Triiodotironin hormonu
T4	Tiroksin hormone
TBST	Tuzlu ve Tween 20'li tris tamponu
TDI	Tolare edilebilir günlük alım miktarı ('Tolarable daily intake')
TET	Translokasyon metilsitozin dioksijenaz
TR	Tiroid reseptör
t-TDI	Geçici tolare edilebilir günlük alım miktarı ('Temporary tolerable daily intake)
UV	Ultraviyole (Mor ötesi)
XTT	2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid

ÖZET

Senyildiz, M. (2016). Bisfenol A'nın Farklı Hücre Kültürlerinde DNA Metilasyonu ve Histon Modifikasyonları Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Sentetik monomer olarak endüstride polikarbonat plastik ve epoksi reçinesinin üretiminde kullanılan bisfenol A (BPA), endokrin bozucu özelliğinden dolayı insan sağlığında yüksek risk oluşturmaktadır. Kimyasalların risk değerlendirmesinde tehlikenin tanımlanması aşamasında toksisite mekanizmalarının aydınlatılması önemli bir adımdır. Son zamanlarda endokrin etkiler gösteren çevresel kimyasalların gen ifadesindeki değişiklikler üzerindeki rolünün epigenetik mekanizmalar ile ilişkili olabileceği alternatif bir yol olarak ortaya çıkmaktadır. Yüksek lisans tezi kapsamında insan nöroblastoma (SH-SY5Y) ve insan prostat kanseri (PC-3) hücrelerinde BPA'nın doza bağlı olarak gelişen toksisitesinde, DNA metilasyonunun, gen ekspresyonlarının ve histon modifikasyonlarının rolünün araştırılması amaçlanmıştır. MTT ve NRU testlerine göre BPA'nın IC_{50} değerleri SH-SY5Y hücrelerinde sırası ile 183 ve 129 μM ve PC-3 hücrelerinde ise sırası ile 217 ve 190 μM olarak belirlendi. % 5-metilsitozin (% 5-mC) seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 10 μM 96 saat BPA uygulanan SHSY-5Y hücrelerinde %45,42 ($p<0,05$) oranında artarken, PC-3 hücrelerinde ise %30,45 (<0,05) oranında azaldı. % 5-Hidroksimetilsitozin (% 5-hmC) seviyeleri ise kontrol grubuna kıyasla 10 μM 96 saat BPA uygulanan SHSY-5Y hücrelerinde %64,78 ($p<0,001$) oranında, PC-3 hücrelerinde ise %90,55 (<0,001) oranında artttı. PC-3 hücrelerinde *p16* geni promotor bölgesinde anlamlı şekilde metilasyonda artış, genin ekpresyonunda ise azalma gözlenirken, *siklinD2* ve *Rassf1* genlerinin promotor bölgelerinde metilasyonda ve gen ekspresyonunda ise anlamlı olmayan değişiklikler gözlendi. SHSY-5Y hücrelerinde ise tüm çalışma gruplarında metilasyonda ve gen ekspresyonlarında değişiklikler olmadığı gözlendi. SHSY-5Y ve PC-3 hücrelerinde H3K9 trimetilasyon, H3K9 asetilasyon ve H3K27 trimetilasyon seviyelerinde ise kontrol grupları ile kıyaslandığında anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlendi. Tez çalışmasından elde edilecek sonuçların, endokrin bozucu kimyasalların toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A; DNA metilasyonu; Histon modifikasyonları, İnsan nöroblastoma hücreleri, İnsan prostat kanseri hücreleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 49182.

ABSTRACT

Senyildiz, M. (2016). Investigation on the Effects of Bisphenol A on DNA Methylation and Histone Modifications in Various Cell Cultures. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. Istanbul.

Bisphenol A (BPA), as synthetic monomer used in industry in the production of polycarbonate plastic and epoxy resins, has endocrine disruptor properties and high risk on human health. Defining the hazard identification under the risk assessment of chemicals is an important step in the elucidation of the mechanism of toxicity. Recently, showing the role of endocrine effects of environmental chemicals on the changes in gene expression may be associated with epigenetic mechanisms are emerging as an alternative way. The aim of this Master Thesis was to investigate the effects of BPA on DNA methylation, gene expressions and histone modifications in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and human prostate cells (PC-3). IC_{50} value of BPA was determined as 183 and 129 μM in SH-SY5Y cells and 217 and 190 in PC-3 cells by MTT and NRU tests. We revealed decrease on the global levels of 5-methylcytocine (5-mC%) at 10 μM after 96 h BPA exposure in SH-SY5Y (45,42%, $p<0,05$) and increase in PC-3 cells (30,45%, <0,05) when we compared to control groups. 5-hydroxymethylcytocine (5-hmC%) levels increased at 10 μM after 96 h BPA exposure in SH-SY5Y (64,78%, $p<0,001$) and PC-3 cells when we compared to control groups. We observed significant increase on promoter DNA methylation and decrease on gene expression of p16 gene, while non-significant changes were found on promoter methylation and gene expression of *cycline D2* and *Rassf1*. In SHSY-5Y cells we did not show any changes on promoter methylation and gene expression of these genes. Furthermore, we did not found significant changes in global histon modifications (H3K9me3, H3K9ac, HeK27me3) SHSY-5Y and PC-3 cells. It is expected that results from this thesis will contribute to better understanding of key molecular events in the toxicity of endocrine disrupting chemicals for risk assessment process.

Key Words: Bisphenol A, DNA methylation, Histone modifications, Human neuroblastoma cells, human prostate cancer cells.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 49182.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Organizmaya dışarıdan alınarak endokrin fonksiyonları ve dengeyi bozan, doğal ya da sentetik maddeler endokrin bozucular (‘Endocrine Disruptors’) olarak adlandırılır. Endokrin bozucular; hormon yapımını, taşınmasını, yıkımını ve atılımını değiştirebildikleri gibi hedef hücrelerdeki etkilerini de değiştirebilirler (Choi ve Jeung, 2003). Bu maddeler çok düşük konsantrasyonlarda bile etki gösterirler. Etkileri geri dönüşümsüz olabilir ve gelişme aşamasındaki bir organizmada meydana gelen bu etkiler ömür boyu da gözlenebilir. Endokrin bozucular insan, hayvan ve bitkilerde üreme ve gelişim sistemleri üzerine ciddi zararlı etkiler göstermektedir. Sonuç olarak, endokrin sistem bozukluğu dünyada özellikle kadınlarda ve çocuklarda oldukça önemli bir sağlık sorunu olarak ortaya çıkmaktadır (Solomon ve Schettler, 2000; Borget ve ark., 2003; Daston ve ark., 2003). Endokrin bozucu kimyasallar yapısal olarak östrojen ya da androjene benzerler ve östrojen ya da androjen reseptörlerine bağlanarak endojen steroid hormonların aktivitelerini interfere ederler (Borget ve ark., 2003; Daston ve ark., 2003; Hwang ve ark., 2011).

Bisfenol A [2,2-bis (4-hidroksifenil) propan] (BPA) iki molekül fenolün bir molekül aseton ile düşük pH’da ve yüksek sıcaklıkta birleşmesi ile elde edilen organik bir bileşiktir. 1950'lerden itibaren sentetik monomer olarak endüstride polikarbonat plastik ve epoksi reçinesinin üretiminde kullanılan BPA, endokrin bozucu özelliğinden dolayı özellikle insan sağlığında yüksek risk oluşturmaktadır (Wolstenholme ve ark., 2011). BPA, gözlük lenslerinde, medikal malzemelerde, CD ve DVD’lerde, yiyecek ve içecek kutularının iç kaplamalarında, cep telefonlarında, bilgisayarlarda, termal faks kağıtlarında, güvenlik kasklarında, kurşun geçirmez malzemelerde, PVC pencerelerde, otomobil parçalarında, koruyucu giysilerde, toz boyalarda, polikarbonat şişeler ve kaplarda (süt ve su şişeleri, bebek biberonları), elektrik malzemeleri ve elektronik parçaların kaplamalarında, diş dolgu malzemelerinde ve yapışkanlar gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Olea ve ark., 1996). Normal koşullarda BPA'nın plastik taşıyıcılardan salınımı söz konusu olmakta ve özellikle de yeni doğmuş bebekler yoğun bakım ünitelerinde yüksek miktarda BPA’ya maruz kalmaktadır. Östrojenik özellikte olan BPA anne sütü ile bebeğe aktarılırken gebelikte de transplesental yol ile fetüse ulaşabilmektedir (Zama ve Üzümcü, 2010; LeBaron ve ark., 2010). BPA'nın plastik

taşıyıcılardan gıda, içecekler ve çevreye sürekli salınımı insanların bu kimyasala maruziyetine sebep olmakta ve bu nedenle BPA insan sağlığında yüksek risk oluşturmaktadır (Brotons ve ark., 1995; Vandenberg ve ark., 2007).

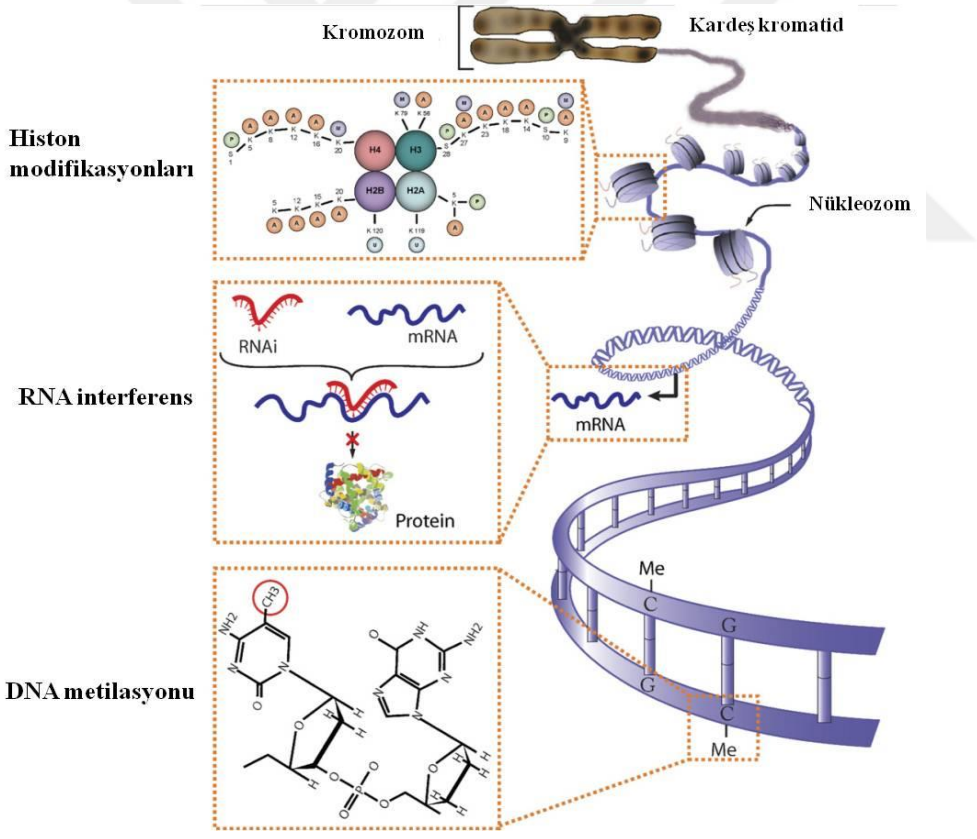
Endokrin bozucuların risk değerlendirilmesinde tehlikenin tanımlanması amacıyla toksisitelerinde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması, regülasyonlar için gereklilik olarak ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, endokrin etkiler gösteren çevresel kimyasalların gen ifadesindeki değişiklikler üzerindeki rolünün epigenetik mekanizmalar ile ilişkili olabileceği alternatif bir yol olarak gösterilmektedir (Fleisch ve ark., 2012; Greally ve Jacobs, 2013). BPA'nın da çeşitli sistemler üzerine toksik etkilerinde epigenetik değişikliklerin rolünün olabileceği belirtilmektedir (Kundakovic ve Champagne, 2011; Rezg ve ark., 2014). Yenidoğan sıçanlara 24 saat BPA maruziyetinin sıçan testislerinde östrojen reseptörlerinin promotor bölgelerinde hipermetilasyonda artışa ve spermatojenez ve fertilite üzerine de advers etkilere sebep olduğu gösterilmiştir (Doshi et al., 2011). Weng ve ark. (2010) yaptığı bir çalışmada da primer epitel meme hücrelerinde düşük doz BPA maruziyetinin *lizozom ilişkili membran protein* ('*lysosomal associated membrane protein*', *LAMP3*) geninin CpG adalarında DNA metilasyonunda artışa sebep olduğu ve beraberinde *LAMP3* geninin ekspresyonunu baskıladığı ve bu durumun meme kanseri riskini arttırabildiği gösterilmiştir. BPA'nın dişi farelerdeki epigenetik etkilerinin kuşaklararası sürdüğü görülmüştür (Singh ve ark., 2012). Tez çalışmasında; BPA'nın epigenetik değişiklikler üzerine etkisini araştırmak amacıyla, farklı hücre kültürlerinde (prostat kanseri ve nöroblastoma hücreleri) BPA'nın doza bağlı olarak gelişen toksisitesinde, DNA metilasyonu, gen ifadesi ve histon modifikasyonları üzerine değişiklikler araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, BPA'nin belirli konsantrasyonlarda hücrelere maruziyeti sonucu; 1) sitotoksisitesi; 2) global DNA metilasyonu ve 5-hidroksimetilsitozin tayini; 3) bazı tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin promotor bölgelerindeki CpG adalarındaki gene-özgü DNA metilasyonu ve gen ifadeleri ve 4) histon modifikasyonları araştırıldı.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, risk değerlendirme sürecinde endokrin bozucu kimyasalların toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik

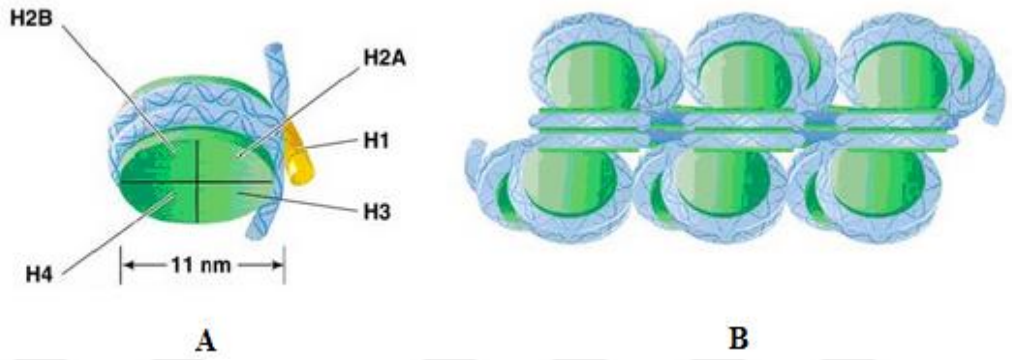
DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtımsal olarak aktarılan gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim dalı 'Epigenetik' olarak adlandırılmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA'ların (miRNA) regülasyonu olmak üzere başlıca üç temel mekanizma ile açıklanmaktadır (Şekil 2-1) (Sawan ve ark., 2008). Bu mekanizmaların herhangi birindeki hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına sebep olarak epigenetik hasarlara neden olmaktadır. Gen ifadesinde oluşan değişiklikler, DNA'nın farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır.



Şekil 2-1: Epigenetik modifikasyonlar (Sawan ve ark., 2008).

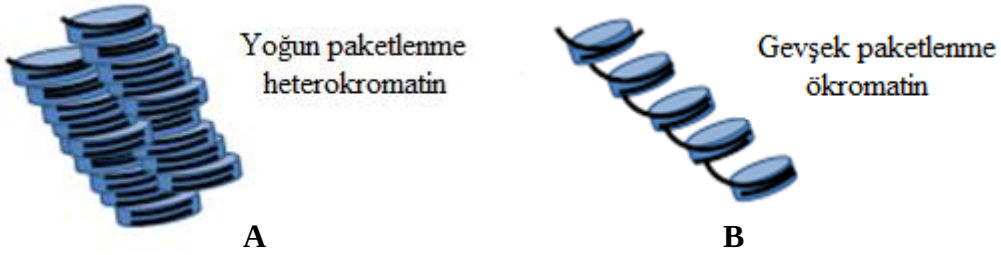
Ökaryotik hücrelerde DNA, histon proteinlerine bağlanır ve oluşan bu yapıya kromatin denir. Kromatin, hücre çekirdeğinde DNA, histon ve histon olmayan proteinlerden oluşan bir kompleks yapıdır (Tsankova ve ark., 2007). Kromatinin temel

yapısal birimi olan nükleozom H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden ikişer tane içeren bir histon oktomerinin etrafına sarılmış 146 baz çiftlik DNA molekülünden oluşmaktadır (Conley ve ark., 2006). Bu protein yapılar birbirlerine H1 histonlarıyla bağlanırlar (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: A. Nükleozom yapısı; B. Kromatin yapısı.

Gen ifadesi hücrelerde nükleozomlar kullanılarak kontrol edilir. Kromatin yapısındaki değişiklikler, transkripsiyonu düzenleyici komplekslerin DNA'ya ulaşabilirliğini etkileme yolu ile gen ifadesini kontrol eder. Kromatinin sıkılaşıp yoğunlaşmış hali (heterokromatin) inaktif iken, gevşek hali (ökromatin) aktiftir (Şekil 2-3).



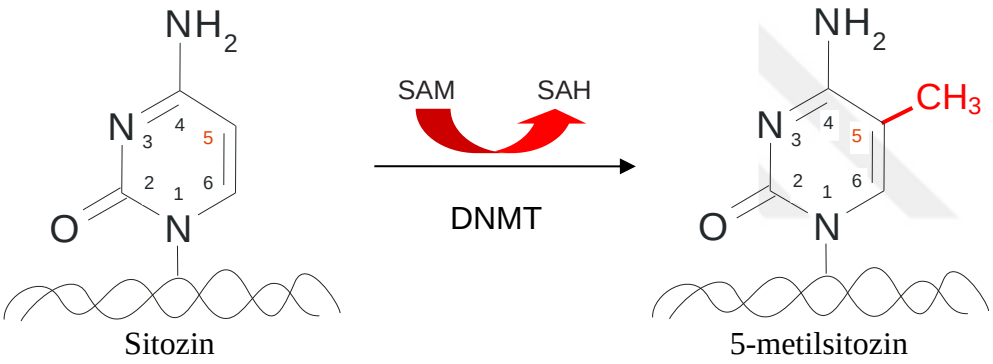
Şekil 2-3. A. Heterokromatin; B. Ökromatin.

Epigenetik mekanizmalar, DNA ve histonlar arasındaki ilişkiyi düzenleyerek genin transkripsiyonel olarak aktif veya inaktif olmalarını sağlarlar. Bu mekanizmaların herhangi birinde oluşan modifikasyon, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına sebep olarak epigenetik hasarlara neden olmaktadır. Değişimler, nesilden nesile DNA'daki diziyle değil, mitoz veya mayoz bölünme yoluyla aktarılır.

Kromatin yapısında meydana gelen başlıca epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıdır.

2.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, genomun geri dönüşebilir doğal bir modifikasyon mekanizması olup, CpG dinükleotidinde bulunan, guanozin (G) tarafından takip edilen sitozin (C) bazının 5. konumundaki karbonuna bir metil grubu (-CH_3) bağlanması ile gerçekleşir ve sonuçta 5-metilsitozin (5-mC) oluşur (Şekil 2-4) (Herman ve Baylin, 2003). Genom genelinde dağınık halde bulunan CpG dinükleotidlerinin %70'i metillenmiş durumdadır. CpG adaları ise özellikle dokularda devamlı ifade edilen bazı genlerin promoter bölgeleri ve ilk ekzonlarında ve metillenmemiş halde bulunurlar (Jones ve Takai, 2001). Promoter bölgelerinde 5-mC varlığı, bulunduğu kromozom bölgesinde lokalize olan genlerin sessizleşmesine yol açar.



Şekil 2-4: Memeli genomunda sitozinin metilasyonu (Herman ve Baylin, 2003).

DNA metilasyonunda DNA metiltransferaz (DNMT) ve S-adenozil metiyonin (SAM) önemli rol oynamaktadır. DNMT'ler, SAM tarafından sağlanan metil grubunu sitozinin 5. konumundaki karbona aktaran enzimlerdir. Şimdiye kadar memelilerde 5 tip DNMT enzimi saptanmış olup; bunlar DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve onun izoformu olan DNMT3L'dir (Yokochi ve Robertson, 2002).

Genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarında görülen DNA metilasyonu, kromatin yapısının organizasyonunda ve gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin ve diğer koaktivatörlerin promotore bağlanabildiği aktif kromatin yapısı, metillenmemiş CpG dinükleotidleri içerir. Buna karşın, transkripsiyon faktörlerinin promotore bağlanamadığı inaktif kromatin yapısı

metillenmiş CpG dinükleotidleri içerir (Esteller, 2007). Bir genin metillenme derecesi ile ifade edilme derecesi arasında ters bir ilişki vardır. Hücre farklılaşmasıyla beraber farklı dokularda farklı genlerin ifade edilmesinin temelinde bu düzenleme yatmaktadır. Ayrıca metilasyon dokuya özgüdür ve bir kere gerçekleşince o dokunun bütün hücrelerine aktarılır. Kanser hücrelerinde genomda yaygın CpG dinükleotidlerinde hipometilasyonla birlikte, promotor bölgelerdeki CpG adacıklarında hipermetilasyon gözlenir. Promotor bölge hipermetilasyonu devamındaki genin susturulmasına neden olur ve özellikle tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesinde önemlidir. Tablo 2-1'de kanserde promotor bölge CpG adalarında hipermetilasyona uğrayan önemli genler gösterilmiştir (Das and Singal, 2004). Genomda gözlenen yaygın hipometilasyon ise; genomik kararsızlığa yol açarak ya da susturulmuş parazitik dizilerin ifade bulmasına neden olarak kanser gelişimine katkıda bulunabilir (Esteller, 2007).

Sitozinin 5-mC'den faklı olarak modifiye olmuş değişik formları da bulunmaktadır. Bunlardan ilk keşfedileni 5-hidroksimetilsitozin (5-hmC)'dir (Şekil 2-5). Son çalışmalar, tüm sitozinlerin % 0,1-0,7 kadarının hidroksimetilasyonla işaretlendiğini göstermektedir ki bu oran, 5-mC oluşum oranından daha azdır (Song ve ark., 2012). Demir ve α-ketoglutarat bağımlı dioksijenazların TET ailesine ait bir enzim grubunun, moleküler oksijen kullanarak bir hidroksil grubunu 5-mC'ye transfer ederek 5-hmC'in oluşumuna neden olduğu rapor edilmektedir (Tahiliani ve ark., 2009). Bu TET proteinleri, insan akut miyeloid lösemi gibi pek çok kanser türünde ve çeşitli hücre soylarında sıklıkla mutasyona uğramış veya ifadeleri baskılanmıştır (Figueroa ve ark., 2010; Nestor ve ark., 2011; Yang ve ark., 2013). Literatürde, 5-hmC ile modifiye edilmiş CpG'lerin, tipik olarak aktif transkripsiyonu yapılan gen bölgelerinde fazla miktarda bulunduğu ve enhancer element ile transkripsiyona başlama bölgesinde de küçük topluluklar haline yer aldığı konusunda yaygın bir görüş bulunmaktadır (Thomson ve ark., 2014). Nestor ve arkadaşları (Nestor ve ark., 2011) arrayler kullanarak yaptıkları analizlerde, 5-hmC paterninin aynı dokularda son derece benzer olmasına karşın, farklı doku ve hücre tiplerinde faklılıklar içermesi nedeniyle hücre ve doku tiplerinin ayırt edilmesinde kullanılabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, fare beyninde global 5-hmC paterninin yaşla birlikte dinamik olarak değiştiği ve melonama oluşumu sırasında global 5-hmC kaybının olduğu belirlenmiştir (Lian ve ark., 2012; Szulwach ve ark., 2011). Bu bilgiler ışığında, 5-hmC paternindeki

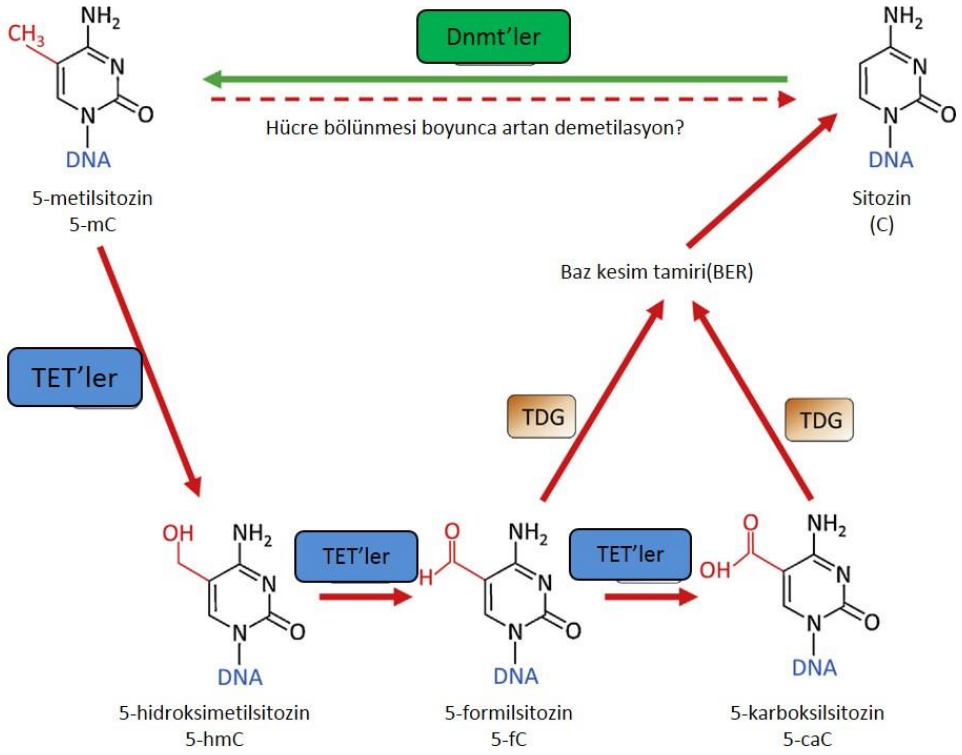
değişimlerin bazı hastalıklarda tanımlayıcı bir marker olarak kullanımı yararlı olabileceği bildirilmektedir.

Tablo 2-1: Kanserde promotor bölge CpG adalarında hipermetilasyona uğrayan önemli genler (Das and Singal, 2004; Henrique ve ark., 2006).

Gen	Tümör Gelişimindeki Rolü	Tümör Tipi
APC	Hücre çoğalmasında dengesizlik, e hücre göçü, hücre adhezyonu ve kromozomal stabilite	Meme, akciğer, özofagus
BRCA1	DNA tamir ve transkripsiyon aktivasyonunu etkileme	Meme, ovaryum
SiklinD2	Hücre siklusu regülasyonu	Ovaryum, testis, mide
p16 (*CDKN2A*)	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü	GIT, baş ve boyun, NHL, akciğer
DAPK1	Apoptozun baskılanması	Akciğer
e-cadherin (*CDH1*)	Hücre çoğalmasında artış, invasyon, ve/veya metastaz	Meme, tiroid, mide
ER	Hormon resistansı	Meme, prostat
GSTP1	Bazı karsinojenlerin aktif metabolitlerinin detoksifikasyonunun kaybı	Prostat, meme, böbrek
hMLH1	DNA onarımının bozulması ve gen mutasyonları	Kolon, mide, endometriyum, ovaryum
MGMT	p53 ilgili gen içeren DNA onarımı ve ilaç direnci	Akciğer, beyin
p15	Proliferasyon ve aktivasyona kontrolsüz hücre girişi	Lösemi, lenfoma, skuamöz hücre karsinomasi, akciğer
*R*assf*1*	Hücre çoğalması kontrolünün kaybı	Akciğer, meme, ovaryum, böbrek, nazofarengial
Rb	Hücre bölünmesi ve DNA replikasyonu kontrolü için gerekli olan genlerin transkripsiyonunun bozulması	Retinoblastoma, oligodendroglioma
VHL (*von Lindel Hippau)*	RNA bağlı protein degredasyonunda hata sonucu RNA stabilitesinde değişiklik	Böbrek hücresi kanseri

Sitozinin 5-mC'den faklı olarak modifiye olmuş değişik formları da bulunmaktadır. Bunlardan ilk keşfedileni 5-hidroksimetilsitozin (5-hmC)'dir (Şekil 2-

5). Son çalışmalar, tüm sitozinlerin % 0,1-0,7 kadarının hidroksimetilasyonla işaretlendiğini göstermektedir ki bu oran, 5-mC oluşum oranından daha azdır (Song ve ark., 2012). Demir ve α-ketoglutarat bağımlı dioksijenazların TET ailesine ait bir enzim grubunun, moleküler oksijen kullanarak bir hidroksil grubunu 5-mC'ye transfer ederek 5-hmC'in oluşumuna neden olduğu rapor edilmektedir (Tahiliani ve ark., 2009). Bu TET proteinleri, insan akut miyeloid lösemi gibi pek çok kanser türünde ve çeşitli hücre soylarında sıklıkla mutasyona uğramış veya ifadeleri baskılanmıştır (Figueroa ve ark., 2010; Nestor ve ark., 2011; Yang ve ark., 2013). Literatürde, 5-hmC ile modifiye edilmiş CpG'lerin, tipik olarak aktif transkripsiyonu yapılan gen bölgelerinde fazla miktarda bulunduğu ve enhancer element ile transkripsiyona başlama bölgesinde de küçük topluluklar haline yer aldığı konusunda yaygın bir görüş bulunmaktadır (Thomson ve ark., 2014). Nestor ve arkadaşları (Nestor ve ark., 2011) arrayler kullanarak yaptıkları analizlerde, 5-hmC paterninin aynı dokularda son derece benzer olmasına karşın, farklı doku ve hücre tiplerinde faklılıklar içermesi nedeniyle hücre ve doku tiplerinin ayırt edilmesinde kullanılabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, fare beyninde global 5-hmC paterninin yaşla birlikte dinamik olarak değiştiği ve melonama oluşumu sırasında global 5-hmC kaybının olduğu belirlenmiştir (Lian ve ark., 2012; Szulwach ve ark., 2011). Bu bilgiler ışığında, 5-hmC paternindeki değişimlerin bazı hastalıklarda tanımlayıcı bir marker olarak kullanımı yararlı olabileceği bildirilmektedir.

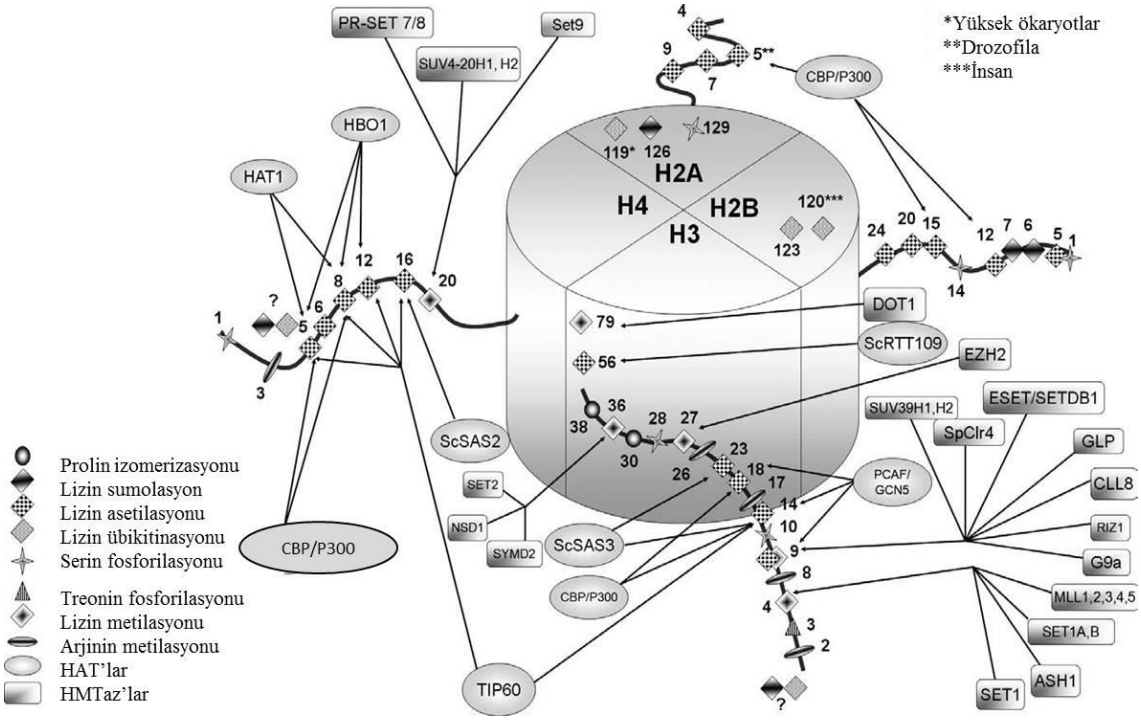


Şekil 2-5: DNA metilasyonu ve demetilasyonunun şematik gösterilmesi (Thomson, 2014).

2.3. Histon Modifikasyonları

Histonlar, ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde, DNA'nın nüklezomlar halinde paketlenmesini sağlayan, lizin ve arjinince zengin olan bazik proteinler olup, bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Nükleozomdan dışarıya çıkan histon proteinlerinin, çıkıntı yapan bazik NH_2 (-amino) terminal uçlarında gerçekleşen farklı tipteki modifikasyonların, kromatine degişik görevler yüklemesine "histon kodu hipotezi" adı verilmektedir. Histon modifikasyonları, enzimler yardımıyla histon proteinlerine başka moleküllerin eklenmesi veya çıkarılmasıyla oluşur. Böylece, histon proteinlerinin -amino ucunda asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiqutinizasyon, ADP ribozilasyon ve sumozilasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar gerçekleşir (Tsankova ve ark., 2007). Şekil 2-6'da nükleozom yapısı ve majör histon modifikasyonları gösterilmiştir (Tollefsbol, 2011). Bu modifikasyonlar birbirleriyle ilişkili olarak ve diziye özgül bir biçimde gerçekleşmektedir. Modifikasyonların histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değistirdiği ve protein kompleksleri için tanıma bölgesi olusturduğu düşünülmektedir. Böylece histon-DNA ve histon-histon ilişkisi etkilenmekte, DNA paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen

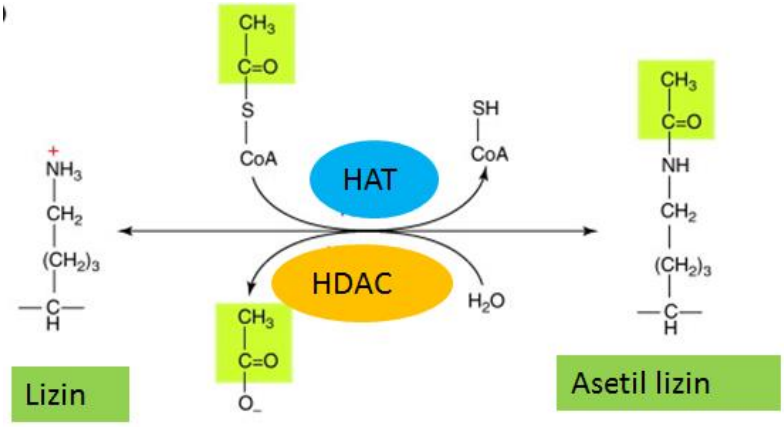
ifadesinin kontrolü gibi birçok biyolojik olay kontrol edilebilmektedir. (Strahl ve Allis, 2000; Grant, 2001; Peterson ve Laniel, 2004; Lizuka ve Smith, 2003).



Şekil 2-6: Nükleozom yapısı ve majör histon modifikasyonlarının şematik gösterimi ve rol oynayan enzimler (Tollefsbol, 2011).

2.3.1. Histon Asetilasyonu

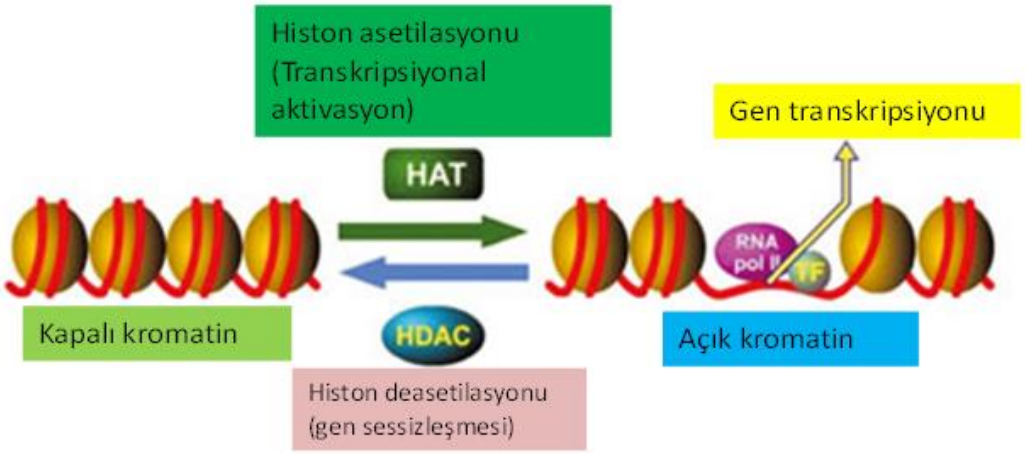
Histonların, N-uçlarındaki lizin rezidülerine asetil-koA'dan alınan asetil grubunun eklenerek ε-N-asetil lizin'e dönüşmesi olayına histon asetilasyonu denir. Histon asetiltransferazlar (HAT) bu reaksiyonu katalizleyen enzimlerdir. Günümüze kadar HAT aktivitesine sahip, substrat özgüllügü olan 30 protein gösterilmiştir. Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bir olay olup; histon deasetilasyonu ise, histon deasetilaz (HDAC) enzimleri ile gerçekleştirilen asetil grubunu lizinden koptuğu reaksiyonlardır (Şekil 2-7). Bugüne kadar 18 insan HDAC enzimi tanımlanmıştır.



Şekil 2-7: HAT enzimi aracılığıyla histon asetilasyonu ve HDAC enzimi aracılığıyla histon deasetilasyonunun şemetik gösterimi (Kim and Yang, 2011).

Histon asetilasyonu, transkripsiyonel aktivasyonla (açık kromatin-ökromatin oluşumu) ilişkilidir. Asetilasyon; histonlardaki pozitif yüklü amin gruplarını nötral amid bağlarına dönüştürür. HAT, artı yüklü histon ve eksi yüklü DNA omurgası arasındaki güçlü bağı zayıflatarak DNA'nın transkripsiyon faktörleri tarafından ulaşılabilir hale gelmesine yardımcı olur. Bu durumda transkripsiyonel faktörler DNA'ya bağlanabilir hale gelir. DNA'nın açılması ve RNA polimeraz gibi enzimlere maruz kalması gen ifadesini başlatır.

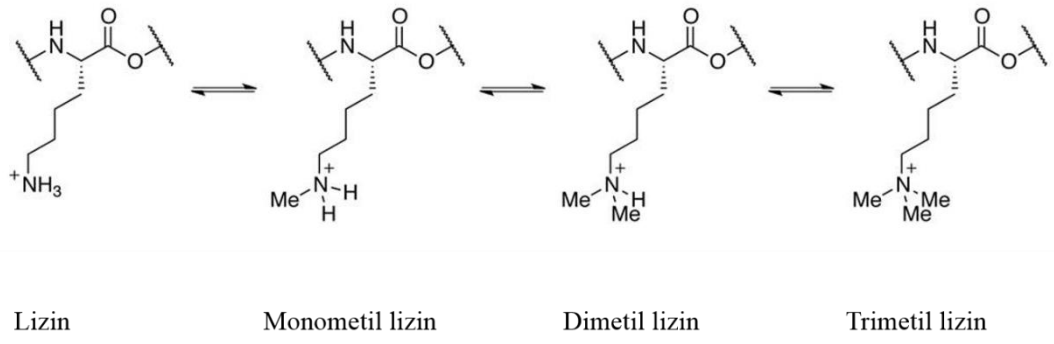
Histon kuyruklarında asetile edilecek olan lizinin yakınındaki aminoasit dizisinin, asetilasyon enzimlerinin özgül bağlanmasında rolü vardır. Asetilasyon her zaman aynı aminoasitlerden gerçekleştirilmektedir. Örneğin, histon H3 özellikle K9, K14, K18 ve K23; histon H4 ise K5, K8, K12 ve K16 pozisyonlardaki lizin aminoasitlerinden asetillenmektedir. Genel olarak, histon H3 veya H4'ün lizin rezidülerinin asetilasyonu açık kromatin yapısına, transkripsiyon faktörlerinin kolay ulaşılabilirliğine ve dolayısıyla aktif gen ifadesine yol açmaktadırlar. Deasetilasyonu ise, inaktif gen ifadesi ile ilişkili olup ve genel olarak metilasyon ile korelasyon göstermektedir (Berger, 2007; Baguet ve Bix, 2004; Tanaka ve ark., 2011). Şekil 2-8'de histon asetilasyonu ve deasetilasyonu ile ilişkili açık ve kapalı gen ifadesi şematik olarak gösterilmiştir (McIntyre ve ark., 2007).



Şekil 2-8: Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu ile ilişkili açık ve kapalı gen ifadesi (McIntyre ve ark., 2007).

2.3.2. Histon Metilasyonu

Histonlarda lizin ve arjininin azot atomlarında lizin metiltransferaz (HKMT) ve arginin metiltransferaz (HRMT) enzimleri ile gerçekleşen post-translasyonel kovalent bir modifikasyondur. Histon metiltransferaz (HMT) enzimleri, metil gruplarını SAM'dan alarak, histonların lizin ve arginin rezidülerine eklerler. Günümüzde, proteomda 90'dan fazla HMT bilinmektedir. Histon demetilaz (HDM) enzimleri ise, metil gruplarını lizin ve arginin rezidülerinden uzaklaştıran enzimlerdir. Lizin rezidüleri, mono-, di- ve trimetile olabilirken (Şekil 2-9), arginin rezidüleri yalnızca mono- veya dimetile olmaktadır (Greer ve Shi, 2012). Modifikasyona uğramış rezidünün konumuna bağlı olarak lizin metilasyonu son zamanlarda en çok çalışılan olaylardan biridir; çünkü gen ifadesinde önemli bir aktivatör veya inhibitör olarak rol almaktadır. (Schlesinger ve ark., 2007).



Şekil 2-9: Lizin rezidülerinin mono-, di- ve trimetilasyonu (Klose ve Zhang, 2007).

En çok çalışılan lizin metilasyonları, histon H3'ün K4, K9, K27, K36 ve K79 rezidülerinde ve Histon H4'ün K20 rezidüsünde olmaktadır. Özellikle, histon H3 kuyruğu metilasyonunun epigenetik düzenlemede merkezi bir rolü vardır. Histon H3'ün -amino terminalindeki K9 ve K27 lizin rezidülerinin di- ve trimetilasyonu (H3K9me2, H3K9me3, H3K27me2, H3K27me3) ile H4'ün K20 lizin rezidisünün trimetilasyonu (H4K20me3) heterokromatik bölgelerde yaygındır (Jorgensen ve ark., 2013). Diğer yandan, histon H3'ün K4 lizin rezidüsünün di- ve trimetilasyonu (H3K4me2, H3K4me3) ile K36 lizin rezidisünün trimetilasyonu (H3K36me3) ökromatik bölgelerde yaygındır (Baguet ve Bix, 2004; Berger, 2007; Tanaka ve ark., 2011). Bu nedenle bu modifikasyonlar, kanser ve diğer birçok hastalıkta patojenik rollere sahip olabilen proteinleri oluşturan biyokimyasal ve biyolojik bilginin kontrolünde ve gen ifadelerinde çok önemlidir (Schneider ve ark., 2002; Jones ve Baylin, 2007).

Kanser hücrelerinde, histonlardaki lizinlerin asetilasyonunda ve metilasyonunda artış ve azalmalar olmaktadır. Farklı kanser tiplerinde, hatta aynı kanser tipinin değişik evrelerinde farklı histon modifikasyonları gözlenir.

2.3.3. Epigenetik Değişikliklerin Araştırımasında Kullanılan Teknikler

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

5-mC içeriğinin tayini, global olarak DNA metilasyonundaki değişiklikleri tayin etmede hızlı ve kullanılışlı bir parametredir. Bu amaçla, DNA'da 5-mC'nin kantitatif tayini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmektedir. Bunun için, genomik DNA önce nükleaz P1 enzimi, daha sonra alkali fosfataz enzimi ile deoksiribonükleozidlerine hidrolize edilir ve serbest nükleozidler ultraviyole diode-array detektör (UV-DAD) donanımlı HPLC (Gehrke, 1984, Ramsahoye, 1992, Fuke ve ark., 2004; Sandhu ve ark., 2009; Armstrong ve ark., 2011) ya da kütle spektrofotometre donanımlı sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) sistemi (Song ve ark., 2005; Ma ve ark., 2009; Hu ve ark., 2010) ile analiz edilir. Ayrıca son yıllarda 5-mC'ye özgül anti-5-mC antikor ile Elisa tekniği ile global 5-mC tayini gerçekleştirilmiştir (Jenkins ve ark. 2013; Guz ve ark. 2014; Senyildiz ve Ozden, 2015).

Gene özgü metilasyon analizlerinde ilk olarak southern blot yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, genomik DNA'nın metilasyona duyarlı bir restriksiyon

enzimi ile (Örn: *HpaII*) kesimi ve ardından hibridizasyonu esasına dayanır (Bird ve Southern, 1978). Fakat fazla miktarda DNA (5 μg ya da daha fazla) kullanılıyor olması bu yönteme sınırlamalar getirmiştir. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesiminden sonra PCR uygulaması ('methylation-sensitive restriction enzyme related PCR') southern blot analizinden daha hassas bir yöntem olmuştur.

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

Daha sonraları, Herman ve arkadaşları tarafından bisülfit modifikasyonunu takiben PCR analizi (metilasyona-özgü PCR, MSP) geliştirilmiştir (Herman ve ark., 1996). Bu yöntemde, bisülfit ile modifikasyon sonrası metillenmiş ve metillenmemiş DNA'lar arasındaki dizi farklılıklarından yola çıkılarak tayin yapılmaktadır. Bisülfit ile modifikasyon sonrasında sitozinler urasile deamine olur ve urasiller PCR sırasında timine dönüşür. PCR, metillenmiş ve metillenmemiş diziler için özgün olan primer çiftleri kullanılarak yapılır. MSP, DNA'nın belirli bir bölgesindeki metilasyonun varlığı hakkında bilgi verir, fakat kaç adet CpG dinükleotidinde metilasyon olduğu saptanamaz. Bununla birlikte, basit, hızlı ve az miktarda DNA'dan sonuç elde edilebilen bir yöntemdir. İkincil olarak da çok az maliyet gerektirir ve çok fazla sayıda örneğin

analizine olanak sağlar. Bu nedenle, sık kullanılan altın standart teknik olarak görülmektedir. Son yıllarda metilasyon analizlerine birçok yeni yöntemler de eklenmektedir. Bunlardan bazıları ise bisülfite modifikasyonunu takiben yapılan MethyLight (Eads ve ark., 2000), HeavyMethyl (Cottrell ve ark., 2004) ve MethylQuant (Thomassin ve ark, 2004) gibi real-time PCR analizleridir.

Yukarıda bahsedilen yöntemler gene/diziye özgü yöntemler olup, genom çapında da DNA metilasyonu analizlerinin yapılması büyük önem taşımaktadır (Brena ve ark., 2006). Metillenmiş DNA immünopresipitasyonu (‘methylated DNA immunoprecipitation, MeDIP’) tekniği, metillenmiş DNA’ların anti-metilsitozin antikorları ile immunopresipitasyon prensibine dayalı olarak izole edilmesi esasına dayanır (Weber ve ark., 2005). Elde edilen MEDIP DNA’ların mikrodizilere uygulanması son yıllarda oldukça ön plana çıkmaktadır (Chen ve ark., 2010; Butcher ve Beck, 2010; Cheung ve ark., 2010; Li ve ark., 2010; Palmke ve ark., 2011; Ruike ve ark., 2010). Böylece; mikrodizi analizi ile genom çapında metillenmiş ve metillenmemiş genler açığa çıkarılarak kıyaslama yapılmaktadır. Gene özgü histon modifikasyonlarının protein seviyeleri Chip tekniği, sensitive PCR ya da sekanslama ile yapılmaktadır. Global histon modifikasyonları total histon proteinlerinde antikor kullanılarak Western Blot yöntemi ya da Elisa tekniği ile gerçekleştirilmektedir. Tablo 2-2’de epigenetik değişiklikleri tayin etmede kullanılan yöntemler avantajları ve dezavantajlarıyla verilmiştir.

Tablo 2-2: DNA metilasyonunu analiz etmek için kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları

Kategori	Yöntem	Avantajları	Dezavantajları	Referans
Global metilasyon analizi	Metil gruplarının radyoaktif işaretlenmesi	Maliyeti azdır, CpG adalarının tamamını kapsar.	Lokal metilasyon değişikliklerini ölçmek için uygun değildir. Radyoaktif temellidir.	(Balaghi ve ark. 1993; Soarez ve ark. 1999)
Global metilasyon analizi	DNA metilasyonuna farklı duyarlılıktaki restriksiyon enzimlerinin kombinasyonu	Maliyeti azdır. Radyoaktif olmayanlarda temel cihazlar kullanılır.	Lokal metilasyon değişikliklerini ölçmek için uygun değildir. Tamamen CpG adalarını kapsamaz.	(Goelz ve ark. 1985; Ben-Hattar ve ark. 1988)
Global metilasyon analizi	Anti-metilsitosin antikoru tarafından yakalanan DNA metil gruplarının fluorimetrik ölçümü	Radyoaktif olmayanlarda tüm CpG adaları ölçülür.	Lokal metilasyon değişikliklerini ölçmek için uygun değildir. Maliyet antikor ve özel cihazlarla ilişkilidir.	(Habib ve ark. 1999; Poloni ve ark. 2013)
Global metilasyon analizi	Metil-sitozinlerin HPLC ile belirlenmesi	Radyoaktif olmayanlarda tüm CpG adaları ölçülür.	Lokal metilasyon değişikliklerini ölçmek için uygun değildir. Maliyet özel cihazlarla ilişkilidir. İleri derecede cihaz bilgisi gerektirir.	(Friso ve ark. 2002; Ramsahoye ve ark. 2002)
Global metilasyon analizi	Tekrarlanan elementlerde DNA metilasyonunun saptanması	Radyoaktif olmayanlarda sadece temel cihazlar kullanılır.	Lokal metilasyon değişikliklerini ölçmek için uygun değildir. Tamamen CpG adalarını kapsamaz.	(Kim ve ark. 2007; Yang ve ark. 2004)
Lokal metilasyon analizi	DNA metilasyonuna farklı şekillerde duyarlı olan restriksiyon enzimleriyle kesilmiş DNA materyalinin PCR ile amplifikasyonu	Radyoaktif olmayanlarda sadece temel cihazlar kullanılır.	Restriksiyon enzimleri ile kesim hedef CpG adalarını kısıtlı kapsar.	(Singer ve ark. 1990)
Lokal metilasyon analizi	DNA metilasyonuna farklı şekillerde duyarlı olan restriksiyon enzimleriyle kesilmiş DNA materyalinden genomik bölgelerin Southern Blotlama ile tespit edilmesi	Sadece temel cihazlar kullanılır.	Radyoaktif blotlamada, restriksiyonların hedef CpG adalarını kısıtlı kapsar.	(Goelz ve ark. 1985)
Lokal metilasyon analizi	Bisülfit modifikasyonu ve direkt sekanslama	Sadece temel cihazlar kullanılır. CpG'lerdeki DNA metilasyonunu belirleme yeteneği restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerindeki sınırlamalardan	Bisülfit modifikasyonundan sonra timinlerin uzamasına göre bazen primer dizaynı zor olabilir. Elektroferogram sekanslama	(Formmer ve ark. 1992; (Paul ve ark. 1996)

		bağımsızdır.	sinyallerinin sitozinlerin üzerindeki timinlerin yüksek oranda bulunmasına göre ölçümü zordur.	
Lokal metilasyon analizi	DNA materyalini kesen ve farklı duyarlılıktaki Cpg adalarını TpG'ye modifiye olmasını sağlayan restriksiyon enzimleriyle bisülfit modifikasyonu ve PCR amplifikasyonu (COBRA) ve restriksiyon enzimleri ile kesim	Sadece temel cihazların kullanımını gerektiren çok kolay bir yöntemdir.	Bisülfit modifikasyonundan sonra timinlerin uzamasına göre bazen primer dizaynı zor olabilir. Tamamen CpG adalarını kapsamaz.	(Eads ve ark. 2002; Xiong ve ark. 1997)
Lokal metilasyon analizi	Bisülfit modifikasyonu, klonlama ve sekanslama	Sadece temel cihazlar kullanılır. CpG'lerdeki DNA metilasyonunu belirleme yeteneği restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerindeki sınırlamalarından bağımsızdır. Güvenli sekanslama elektroferogramları mevcuttur.	Bisülfit modifikasyonundan sonra timinlerin uzamasına göre bazen primer dizaynı zor olabilir. İstatistiksel olarak kıyaslayabilmek için her örnek için yüksek sayıda klona ihtiyaç vardır.	(Warnecke ve ark. 2002)
Lokal metilasyon analizi	Bisülfit modifikasyonu (dijital bisülfit sekanslama)	Sadece temel cihazlar kullanılır. CpG'lerdeki DNA metilasyonunu belirleme yeteneği restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerindeki sınırlamalardan bağımsızdır. Güvenli elektroferogramları mevcuttur.	Bisülfit modifikasyonundan sonra timinlerin uzamasına göre bazen primer dizaynı zor olabilir.	(Weisenberger ve ark. 2008)
Lokal metilasyon analizi	Bisülfit modifikasyonu ve pirosekanslama	Sadece temel cihazlar kullanılır. CpG'lerdeki DNA metilasyonunu belirleme yeteneği restriksiyon bölgelerindeki sınırlamalardan bağımsızdır ve kolay ölçülebilir.	Amplikon buyutu sınırlıdır. Bisülfit modifikasyonundan sonra timinlerin uzamasına göre bazen primer dizaynı zor olabilir.	(Tost ve ark. 2007)
Lokal metilasyon analizi	Bisülfit modifikasyonu ve kütle spektrometresi ile tespit etme	CpG'lerdeki DNA metilasyonunu belirleme yeteneği restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerindeki sınırlamalardan bağımsızdır. Pirosekanslamadan sonra geniş amplikonların analizlerini elde etmek mümkündür.	Lokal metilasyon değişikliklerini ölçmek için uygun değildir. Maliyet özel cihazlarla ilişkilidir. İleri dereceli cihaz bilgisi gerektirir.	(Ehrich ve ark. 2005)

Genom çapında metilasyon analizi	Metile- duyarlı ve metile duyarlı olmayan enzimlerin kombinasyonu ile elde edilen metile bölgelerin amplifikasyonu (AIMS)	Sadece temel cihazlar kullanılır. Genom çapındaki bölgesel metilasyon değişikliklerini saptayabilir.	Epigenom haritalaması için bir yöntem olmasından ziyade epigenetik farklılıkları belirler.	(Frigola ve ark. 2002)
Genom çapında metilasyon analizi	Ligasyon aracılı PCR(HELP) ile HpaII küçük boyuttaki parçacıkların zenginleştirilmesi. (Zenginleştirme metile-duyarlı olan ve metile-duyarlı olmayan enzimlerin kombinasyonları ile meydana gelir.)	Sadece temel cihazlar kullanılır. Genom çapındaki bölgesel metilasyon değişikliklerini saptayabilir.	Epigenom haritalaması için bir yöntem olmasından ziyade epigenetik farklılıkları belirler.	(Weber ve ark. 2005)
Genom çapında metilasyon analizi	Metillenmiş DNA immunopresipitasyon ve chip hibridizasyon (MeDIP ve Chip)	Genom çapındaki bölgesel metilasyon değişikliklerini saptayabilir. Sınırlı restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerinden bağımsızdır.	Maliyet spesifik antikor ve dizilemeyle ilişkilidir. Verilerin bir kısmı biyoinformatik bilgi gerektirir. CpG rezolüsyonu olmaksızın DNA metilasyonundaki değişiklikler tespit edilebilir.	(Ordaway ve ark. 2006)
Genom çapında metilasyon analizi	DNA'nın metile fraksiyonlarının McrBC enzimi ile azalması ve Chip dizilerine hibridizasyon	Genom çapında bölgesel metilasyon değişikliklerini saptama özelliğindedir. Bütün metile sitozinlerdeki MrcBC'lerin etkisinden dolayı sınırlı restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerinden bağımsızdır.	Maliyet spesifik antikor ve dizilemeyle ilişkilidir. İnsan genomunda sınırlıdır. Bazı spesifik CpG adalarında kapsamı sınırlıdır. Verilerin bir kısmı biyoinformatik bilgi gerektirir.	(Bibikova ve ark., 2011; Bibikova ve ark. 2009)
Genom çapında metilasyon analizi	Infinium Human Methylation27 Bead-Chip dizileme. Bisülfit modifiye edilmiş CpG metilasyon bölgelerindeki SNP'lerin C/T (oranını tespit eden DNA'lar ile SNP dizileme.	Genom çapında bölgesel metilasyon değişikliklerini saptama yeteneğindedir. Sınırlı restriksiyon enzimleri ile kesimbölgelerinden bağımsızdır. İnsanlarda biyolojik olarak uygun CpG adalarını sorgulamada verimli bir yöntemdir.	Maliyet spesifik antikor ve dizilemeyle ilişkilidir. İnsan genomunda sınırlıdır. Bazı spesifik CpG adalarında kapsamı sınırlıdır. Verilerin bir kısmı biyoinformatik bilgi gerektirir.	(Taiwo ve ark. 2012)
Genom çapında	Metile DNA bağlama	Genom çapında bölgesel metilasyon	Maliyet sekanslamayla ilişkilidir.	(Brinkman ve ark.

metilasyon analizi	domaini MeCP2 kullanılarak metile DNA'ların yakalanması takiben sekanaslama yapılması.	değişikliklerini saptama yeteneğindedir. Sınırlı restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerinden bağımsızdır. Sekanslamanın maliyeti genomun azaldığını gösteren analize göre düşüktür. Genomdaki metilasyonu iyi kapsar.	Verilerin bir kısmı biyoinformatik bilgi gerektirir.	2010)
Genom çapında metilasyon analizi	Bisülfit sekanslamanın azaldığını gösterilmesi (RRBS)	Genom çapında bölgesel metilasyon değişikliklerini saptama yeteneğindedir. Sınırlı restriksiyon bölgelerinden bağımsızdır. Sekanslamanın maliyeti genomun azaldığını gösteren analize göre düşüktür.	Maliyet spesifik antikor ve sekanslamayla ilişkilidir. Verilerin bir kısmı biyoinformatik bilgi gerektirir. Zayıf CpG bölgelerinde metilomların kapsamı kısıtlıdır.	Gu ve ark. 2010; Gu ve ark. 2011)
Genom çapında metilasyon analizi	Bisülfit uygulanmış DNA'ların deep sekanslanması	Genom çapında bölgesel metilasyon değişikliklerini saptama yeteneğindedir. Sınırlı restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerinden bağımsızdır. CpG adalarındaki DNAmetilasyonu direkt ölçülebilir.	Sekanslamaların maliyeti yüksektir. Verilerin bir kısmı biyoinformatik bilgi gerektirir.	(Lister ve ark. 2008; Lister ve ark. 2009)
Genom çapında metilasyon analizi	Tek molekül, Real Time sekanslama (SMART)	Genom çapında bölgesel metilasyon değişikliklerini saptama yeteneğindedir. Sınırlı restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerinden bağımsızdır. CpG adalarındaki DNAmetilasyonu direkt ölçülebilir. Bisülfit modifikasyonuna gerek yoktur.	Sekanslamaların maliyeti yüksektir. Verilerin bir kısmı biyoinformatik bilgi gerektirir.	(Flusberg ve ark. 2010)

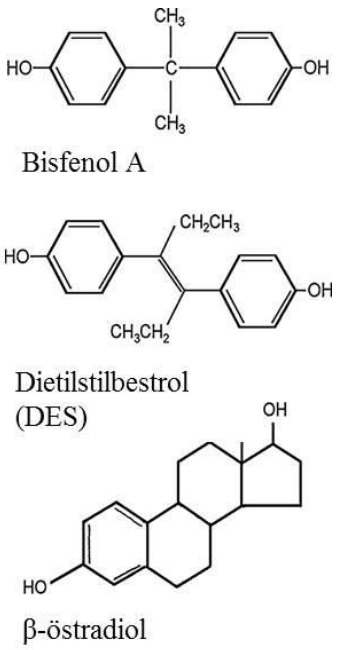
2.4. Bisfenol A (BPA)

1950'lerden itibaren endüstride polikarbonat plastik ve epoksi reçinesinin üretiminde sentetik monomer olarak kullanılan BPA, endokrin bozucu özelliğinden dolayı özellikle insan sağlığı açısından yüksek risk oluşturmaktadır (Wolstenholme ve ark., 2011). BPA'nın yüksek üretim hacmi, plastiklerin yaygın kullanımı ve sağlık açısından yan etkileri nedeniyle bilimsel çevreler, düzenleyici otoriteler ve halkın dikkatini çekmektedir (Halden, 2010).

2.4.1. BPA'nın Kimyasal Yapısı

BPA [2,2-bis (4-hidroksifenil) propan] iki molekül fenolün bir molekül aseton ile düşük pH'da ve basınçta ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile elde edilen bir bileşiktir. 1891 yılında Kimyager A. P. Dianin tarafından ilk defa sentezi gerçekleştirilmiştir (Lintelmann ve ark., 2003). Sanayide birçok amaçla üretilen ürünlerde hammadde olarak kullanılmaktadır.

BPA, doymamış iki fenol halka içermesi bakımından güçlü sentetik östrojen olarak bilinen dietilstilbestrol (DES)'e benzer kimyasal yapıya sahiptir. Ancak endojen östrojen hormonu olan 17 β-östradiol ile kimyasal yapıları karşılaştırıldığında aralarında hiçbir benzerlik olmadığı görülmektedir (Gaido ve ark., 1997). Şekil 2-10'da BPA, DES ve β-östradiol'ün kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2-10: BPA, DES ve β-östradiol'ün kimyasal yapısı.

2.4.2. BPA'nın Fizikokimyasal Özellikleri

BPA'nın fizikokimyasal özellikleri Tablo 2-3'de verilmiştir.

Tablo 2-3: BPA'nın genel özellikleri (Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu, 2014).

Genel Adı	Bisfenol A
IUPAC adlandırması	2,2-bis(4-hidroksifenil)propan
CAS numarası	80-05-7
Endeks numarası	604-030-00-0
Görünüş	Fiziksel hal: kristal; Renk: bej
Koku	Kokusuz
Kimyasal formülü	$C_{15}H_{16}O_2$
Yapısal formülü	$(CH_3)_2$-$C(C_6H_4$-$OH)_2$
Moleküler ağırlığı	228,9 g/mol
Erime sıcaklığı	158-159°C-lit
Donma sıcaklığı	-156,5°C
Kaynama sıcaklığı	220°C (0,5 kPa)
Su içerisindeki çözünürlüğü	25°C'de 0,298 g/L
Uçuculuğu	193°C (1 atm basınçta)
Sudaki çözünürlüğü (25°C)	120 mg/L
Bağıl yoğunluk (su=1)	1,2 g/L

BPA hem asit hem de alkaliyle katalizlenebilen reaksiyon sonucu oluşsa da yan ürün miktarının ve sayısının minimuma indirilmesi için endüstriyel üretimde asitle (hidroklorik asit) katalizleme tercih edilmektedir. Reaksiyon sonucu, daha düşük saflıkta ve epoksi reçine imalatında kullanılan BPA ve yüksek saflıkta ve polikarbonat imalatında kullanılan BPA olmak üzere iki farklı kalitede ürün oluşmaktadır (Yıldız, 2009).

2.4.3. BPA'nın Kullanım Alanları

BPA, 1930'lu yıllarda Dodds ve Lawson tarafından sentetik östrojen olarak sentezlenmiş, ancak östrojenik etkinliğinin az olması nedeniyle kullanıma girmemiştir (vom Saal ve ark, 2004; Dodds ve Lawson. 1936). 1950'li yıllarda polikarbonatların üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. BPA dünya genelinde en fazla üretilen kimyasal maddelerden biridir. Yıllık üretimi 2-3 milyon tonu aşmaktadır. BPA, gözlük lenslerinde, medikal malzemelerde, CD ve DVD'lerde, yiyecek ve içecek kutularının iç

kaplamalarında, cep telefonlarında, bilgisayarlarda, termal faks kağıtlarında, güvenlik kasklarında, kurşun geçirmez malzemelerde, PVC pencerelerde, otomobil parçalarında, koruyucu giysilerde, toz boyalarda, polikarbonat şişeler ve kaplarda (süt ve su şişeleri, bebek biberonları), elektrik malzemeleri ve elektronik parçaların kaplamalarında, diş dolgu malzemelerinde ve yapışkanlar gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Olea ve ark., 1996).

2.4.4. BPA'ya Maruziyet

Gıda ve içeceklerin insan maruziyetinin temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Normal koşullarda dahi BPA'nın plastik taşıyıcılardan salınımının söz konusu olduğu belirtilmektedir. Özellikle yeni doğan yoğun bakım ünitelerinde bebekler yüksek miktarda BPA'ya maruz kalabilmektedir. Ayrıca, yazar kasa fişlerinde kullanılan termal kağıtlar aracılığıyla deri yolu ile de yaygın bir maruziyet söz konusudur (Singh ve Li, 2012).

BPA polikarbonat içecek şişelerinde yapısal bir bileşendir. Aynı zamanda bu bileşen yiyecekleri koruyabilmek için metal kutuları kaplamada kullanılmaktadır. BPA 1960'lardan beri yiyecek paketlemede kullanılmaktadır. Çoğu zaman yiyecekler bazı ambalaj materyalleri ile indirekt temasta olduğundan, ambalajlama materyallerinden küçük fakat ölçülebilir miktarda BPA yiyeceklere geçip bozulmalarına sebep olabilmektedir.

Avrupa Gıda Güvenliği Uzmanlar Kurulu ('European Food Safety Authority' EFSA) BPA maruziyeti ve toksisitesini değerlendirdiği raporunda; BPA'nın mevcut maruziyet seviyelerinin herhangi bir yaş grubunda risk oluşturmadığını bildirilmiştir. EFSA, BPA'nın geçici tolore edilebilir günlük alım seviyesinin ('temporary tolerable daily intake', t-TDI) 50 µg/kg vücut ağırlığı'ından 4 µg/kg vücut ağırlığı'na indirildiğini vurgulamıştır (EFSA, 2015).

BPA'nın insan serumu, idrarı, amniyotik sıvısı, foliküler sıvısı, plesental dokuları, göbek kordonu kanında ölçülebilir olduğu gösterilmiştir (Vandenberg ve ark., 2007).

BPA'nın çok geniş kullanım alanının olması günlük hayatta kişilerin BPA ile temas etme risklerini arttırmaktadır (Staples ve ark. 1998; Sheedan, 2000).

2.4.5. BPA'nın Toksikokinetiği

BPA insan vücuduna en çok oral yolla alınır (Völkel ve ark. 2002) ve sindirim sisteminden hızlıca emilir. Oral ve intravenöz uygulamalardan sonra total BPA plazma konsantrasyon-zaman grafiklerinde eğrinin altındaki alan incelendiğinde, sindirim yolundan yüksek miktarda (sıçan ve maymunlarda %85-86'ya kadar çıkabilen) emilimin gerçekleştiği gösterilmiştir. Benzer olarak insanlarla yapılan çalışmalarda da düşük dozda oral yolla alınan BPA'nın tamamen emildiğini gösterilmektedir (EU-RAR, 2003, 2008).

Oral emilimi takiben BPA polimorfik bir enzim olan UDP-glukuroniltransferaz tarafından bağırsak duvarında ve karaciğerde (ilk geçiş etkisi) hızlıca suda çözünür metaboliti olan BPA-glukronide dönüşür ve 6 saatten kısa süre içerisinde renal yolla atılmaktadır (Völkel ve ark. 2002). Oral maruziyetten sonra ilk geçiş etkisinden dolayı insanlarda kandaki konjuge olmayan BPA seviyesi genellikle çok düşük olarak rapor edilmiştir (konjuge olmayan BPA insanlarda ve maymunlarda total serumun %5'inden azdır). İnsanlarda oral dozun %75-85'i beş saat içinde idrara geçmektedir. BPA-glukuronid, BPA'nın östrojen reseptörlerindeki inaktif formudur. BPA ayrıca düşük oranda sülfat ile konjugasyona da uğrar. İnsanlarda kemirgenlere benzer olarak sülfat konjugasyonunun sülfotrasferaz enzimleri tarafından sağlandığı gösterilmiştir. (EFSA, 2008; EU-RAR, 2003, 2008; ANSES, 2011, 2013; EFSA CEF Panel, 2010).

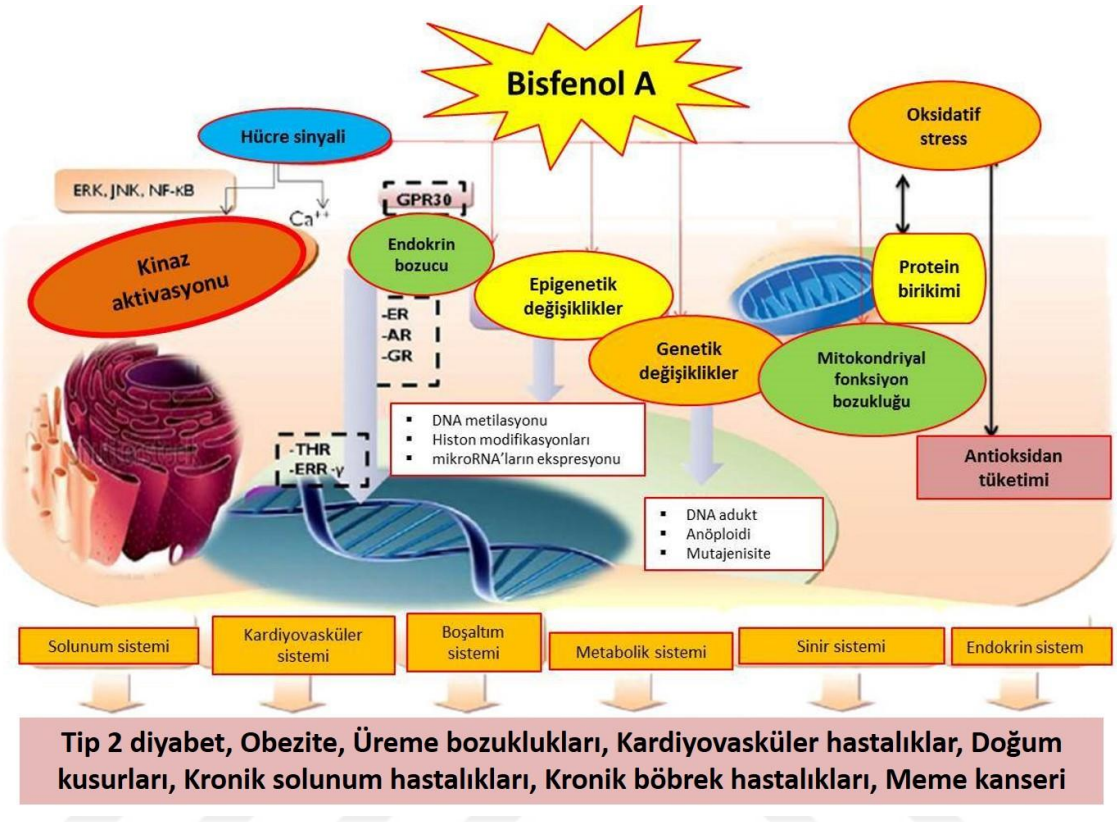
Yapılan çalışmalarda perkütan yol ile alınan BPA'nın 24 saat içerisinde insan derisinden % 2.3-8.6 oranında geçtiğini göstermiştir.

BPA'nın anne sütü ile bebeğe aktarılırken gebelikte de transplesental yol ile fetüse ulaştığı bilinmektedir (Zama ve Üzümcü, 2010; LeBaron ve ark., 2010). BPA'ya maruz kalmış dişi sıçanların sütünde konjuge olmayan ve konjuge olan BPA formlarının her ikisinin de varlığı gözlenmiştir. İnsan sütünde ise konjuge olmayan BPA varlığı rapor edilmiştir.

2.4.6. BPA'nın Toksisite Mekanizmaları

Son yıllarda BPA'nın diyabet, obezite, üreme bozuklukları, kardiyovasküler bozukluklar, doğum anomalileri, kronik solunum ve böbrek bozuklukları ve meme kanseri gibi birçok kronik hastalığın etiyolojisinde rolünün olabileceği üzerinde durulmaktadır. BPA maruziyeti ve kronik hastalıklar ile ilişkisinde rol oynayan mekanizmların oksidatif stress, mitokondriyal bozukluklar, hücre sinyal yolaklarını

kapsayan genetik, epigenetik ve endokrin bozucu mekanizmalar ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Şekil 2-11) (Rezg ve ark., 2014).



AR: androjen reseptör, ER: östrojen reseptör, ERK: ekstraselüler sinyal regüle eden kinaz, ERR-γ: östrojen ilişkili gama reseptör, GPR 30: G proteinle birleşik reseptör 30, GR: glukokortikoid reseptör, JNK: c-Jun N-terminal kinaz, NF-κb: nükleer factor-kappa B, THR: tiroid hormon reseptör.

Şekil 2-11: BPA'nın kronik hastalıklarda rol oynayan hücresel ve moleküler mekanizmaları (Rezg ve ark., 2014).

2.4.6.1. Genotoksik Etkiler

İn vitro çalışmalar, BPA'nın DNA adduktları, anöploidi oluşumu ve insanlarda kısırlık, düşük ve ölü doğumlarla ilişkisi olan mutajeniteyi indüklediğini göstermiştir (George ve ark., 2008; Johnson ve Parry, 2008; Takahashi ve ark., 2001). Hem 2 ay düşük doz BPA hem de 24 saat yüksek doz BPA uygulanan prostat hücre dizisinde DNA adduktlarının oluştuğu gösterilmiştir (De Flora ve ark., 2011). Ayrıca çeşitli *in vivo* çalışmalarda içme suyu ile BPA'ya maruz kalan farelerin meme dokusunda DNA adduktları oluşumu ve proteom değişimleri kanıtlanmıştır (Izzotti ve ark., 2009, 2010). BPA'nın hücre kültüründeki memeli hücrelerinde doza bağlı olarak mitotik iğ ipliklerinin mikrotübül organize edici merkezinin fonksiyonunu değiştirdiği ve mikronükleus oluşumunu indüklediği, ayrıca mayotik çift zincir kırıkları tamir sürecini bozduğu bildirilmiştir (Allard ve Colaiacovo, 2010).

2.4.6.2. Epigenetik Etkiler

Son araştırmalarda çevresel kimyasal ksenobiyotiklere maruziyet ile epigeentik etkinin tetiklenmesi arasındaki ilişki sıklıkla incelemektedir ve pek çok toksik maddenin epigenetik mekanizmaları modifiye etmede potansiyel bir rolü olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2008). BPA'ya maruziyetin de epigenetik mekanizmalar aracılığıyla gelişimsel yolaklar ve hücresel süreçleri değiştirdiği bildirilmiştir (Singh ve Li, 2012).

BPA'ya maruziyetinin yenidoğan sıçanların testislerinde östrojen reseptör promotör bölgelerinin hipermetilasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bu durum, BPA'nın olası etki mekanizmalarından biri olarak metilasyon aracılı epigenetik değişikliklerin spermatojenez ve üreme üzerine yan etkileri tetiklediğini göstermektedir (Doshi ve ark., 2011). Erken gelişimsel dönemde BPA maruziyetinin epigenom değişimi aracılığıyla yavru fenotipini değiştirebildiği gösterilmiştir. (Dolinoy ve ark., 2007). İnsan primer meme epiteliyal hücrelerinin düşük doz BPA maruziyetinin lizozomal ilişkili membran proteini 3 (‘*lysosomal-associated membrane protein 3’, LAMP3*) geninin CpG adalarında DNA metilasyonunu arttırdığı ve *LAMP3* geninin ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiştir, bu durum BPA maruziyetinin ileri dönemlerde meme kanseri riskini arttırabileceğini göstermektedir (Weng ve ark., 2010). Diğer taraftan, gelişmekte olan hipotalamik hücrelerin BPA maruziyetinde doza bağlı olarak (0.02–200 μM) BPA'nın DNA metiltransferazlar, metil CpG bağlayıcı protein 2 (‘*methyl-CpG binding protein 2’, MECP2*) gibi epigenetik düzenleyici faktörlerin gen ekspresyonunu değiştirdiği bildirilmiştir. Bu çalışmadan BPA'nın epigenetik gen regülasyonunun stabilitesini ve esnekliğini bozduğu sonucuna varılmıştır (Warita ve ark., 2013). Ayrıca rahimde BPA'ya maruz kalan 6 haftalık farelerin meme bezlerinde ve insan meme kanseri MCF7 hücrelerinde yapılan çalışmalarda BPA'nın histon metiltransferaz *Zeste homolog arttırıcı 2* (*EZH2*) ekspresyonunu arttırdığı gösterilerek endokrin bozucular ve meme bezleri arasındaki epigenetik ilişki gösterilmiştir (Doherty ve ark., 2010).

2.4.6.3. Endokrin Bozucu Etkiler

BPA'nın çeşitli dokularda enzim aktivitesini ve metabolizmayı etkilediği, hedef dokularda hormon reseptörlerinin sayısında ve hormon reseptör geni aktivitesinde değişikliğe yol açtığı, özellikle zayıf östrojenik etkileri sebebiyle endokrin sistem üzerine zararlı etkileri çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (EFSA, 2008). BPA'nın

östrojen reseptör α ve β'ya (ERα ve ERβ) bağlanarak hedef genlerde aktivasyona ya da baskılanmaya sebep olduğu belirtilmiştir (Stanisic ve ark., 2010). Bu mekanizmalar da hormon bağlı kanserler kadar doğum kusurları, üreme, gelişim, metabolik, immün ve nörodavranışsal bozuklukları kapsayan sağlık sorunlarına yol açmaktadır.

BPA, nüklear ER'lere bağlanır ve hedef doku, hücre tipi, ER alttürü ve diferensiyel kofaktörlere bağlı agonist ve/veya antagonist etkilerin birleşimini gösterir. (Whelshons ve ark., 2006). Klasik nüklear ER'lere bağlanarak (Vandenberg ve ark., 2009), G protein ilişkili reseptör 30, (*GPR30*) gibi klasik ve klasik olmayan membran ER'lere bağlanarak (Alonso-Magdalena ve ark., 2005; Thomas ve Dong, 2006) ve genomik olmayan yolaklar aracılığıyla (Ropero ve ark., 2006) etkisini gösteren bir ksenoöstrojendir, ancak östrojeni taklit etmez (Gould ve ark., 1998; Vandenberg ve ark., 2009). Bu etkiler beyin, rahim, yumurtalık, meme bezleri gibi östrojenin hedef organlarında değişikliklerin farklıaşmasına yol açar (Vandenberg ve ark., 2009).

BPA'nın memeli fetal beyni ve plasentada ERα sonra oldukça yüksek olan ERγ'ya afinitesinin *in vitro* (Matsushima ve ark., 2007; Takayanagi ve ark., 2006) ve *in vivo* (Tohme ve ark., 2014) çalışmalarda 80-kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir. BPA, ayrıca androjen reseptörünün (AR) de antagonistidir (Molina-Molina ve ark., 2013; Wetherill ve ark., 2007). Diğer bilinen AR antagonistlerinin aksine, BPA AR'lerin etkili nüklear translokasyonunu inhibe eder ve çeşitli mekanizmalar yoluyla fonksiyonlarını engeller (Teng ve ark., 2013). BPA ayrıca seks hormonu bağlayıcı globuline bağlanır (Dechaud ve ark, 1999), bu da androjen-östrojen dengesini değiştirebilir (Takeuchi ve Tsutsumi, 2002) ve hipotalamik-pituiter eksenin nöroendokrin düzenlemesini engeller (Gore, 2010; Chen ve ark., 2014).

Ek olarak, endokrin ilişkili BPA'nın etki mekanizması, *in vitro* olarak azalan aril hidrokarbon reseptörü (Bonefeld-Jorgensen ve ark., 2007) ve in vitro olarak 0,02 µg/kg/gün gibi son derece düşük dozlarda bu reseptörün beyindeki *in vivo* mRNA ekspresyonunun artmasıyla (Nishizawa ve ark., 2005) ilişkilidir. Ayrıca BPA, *in vitro* aromataz aktivitesini (Bonefeld-Jorgensen ve ark., 2007) ve *in vivo* östradiol ve testesteron sentezini de (Akingbemi ve ark., 2004) azaltır.

Antagonist gibi davranan BPA, tiroid reseptörlerine (TR) de bağlanır (Moriyama ve ark., 2002). *İn vitro* çalışmalar BPA'nın düşük afinitesine rağmen TRα ve β alttürlerinin her ikisine de bağlandığını göstermektedir (Delfosse ve ark., 2014 ve Kitamura ve ark., 2005). Bunlara ek olarak BPA tiroid hormon sülfotransferaz

aktivitesini inhibe edebilir (Butt ve ark., 2013) ve hem deneysel modellerde hem de *in vitro* olarak TR'lerin gen ekspresyonunu ve transkripsiyonunu değiştirebildiği gösterilmiştir (Gentilcore ve ark., 2013; Sheng ve ark., 2012). BPA'nın kemirgenlerde davranışları ve beyinin seksüel farklılaşmasını etkileyen glukokortikoid ile regüle edilen cevapları değiştirdiği de bulunmuştur (Poimenova ve ark., 2010) ve kortikoid agonisti olarak gösterilmiştir (Prasanth ve ark., 2010).

2.4.6.4. Oksidatif Stres ve Mitokondrial Fonksiyon Bozukluğu Üzerine Etkiler

Reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin artması ve/veya antioksidan savunma kapasitesinin azalması mitokondrideki nükleik asit, protein, karbonhidrat, lipitler gibi hücre bileşenlerinin değişmesine yol açarak ve sinyal yolaklarını aktive ya da inaktive ederek oksidatif dengeyi bozar. Nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diyabet gibi çoğu patolojik bozukluklar ve yaşlanmada oksidatif stres oldukça önemlidir (Lenaz, 2012). Diğer taraftan BPA indüklü hasarın oksidatif stresle ilişkili olabileceği konusunda kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır (Anjum ve ark., 2011; Tiwari ve ark., 2012). BPA, mitokondriyal fonksiyonların da dahil olduğu doğrudan ya da dolaylı yolaklar aracılığıyla oksidatif homeostaziyi bozmaktadır (Ooe ve ark., 2005). Sıçan karaciğeri ve beyin dokusunda BPA indüklü oksidatif stresin etkileri C vitamini uygulamasıyla geri dönüştürülebildiği gösterilmiştir (Bindhumol ve ark., 2003; Aydogan ve ark., 2008). Epidemiyolojik bir çalışmada BPA'nın kadınlarda oksidatif stres ve inflamasyonu belirgin bir şekilde tetiklediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada üriner BPA konsantrasyonları ile malondialdehid, 8-hidroksi-deoksiguanozin ve C reaktif protein arasında pozitif ilişki bulunmuştur (Yang ve ark., 2009). Ayrıca, BPA indüklü oksidatif stres pankeas β hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan bir hormon olan insan adacık amiloid polipeptidinin (hIAPP) toksik agregasyonuna neden olabileceği ileri sürülmüş olup, β hücrelerinin ölümüne yol açan bu durum tip 2 diyabete neden olan faktörlerden biri olarak görülmektedir (Gong ve ark., 2013). NOAEL değerinin altındaki dozlarda BPA'nın karaciğerde ATP tüketimi, sitokrom C salımı, mitokondriyal kütle ve membran potansiyeli kaybı ile mitokondriyal fonksiyonu bozduğu ve hepatotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (Moon ve ark., 2012).

2.4.6.5. Hücre Sinyal Yolakları Üzerine Etkiler

BPA'nın intraselüler kalsiyum ve ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve nüklear faktör kappa B (NF-κB)'nin fosforilasyonunu

arttırarak hücre sinyalleşme mekanizmalarını etkilediği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2008). Kalsiyum, ROS, ERK ve JNK'nın HT-22 hipokampal sinir hücrelerinde BPA indüklü apoptotik hücre ölümünde rol aldığı, tersine NF-κB sinyal yolağının ise BPA'dan sonra hayatta kalma sinyalini aktive ettiği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2008). Ayrıca, BPA düşük konsantrasyonlarda sıçan hipofiz hücre hattında çeşitli kinazları aktive edebilmektedir ve ksenoöstrojen karışımları fizyolojik östrojene hücresel cevabı değiştirerek hücre regülasyonu ve fonksiyonel cevapların hormonal mekanizmaları üzerine etkilerini bozduğu gözlenmiştir (Vinas ve Watson, 2013; Vinas ve ark., 2012).

2.4.7. BPA'nın Toksik Etkileri

2.4.7.1. Akut Toksik Etkileri

Akut toksisitesi ile ilgili insanlarda kaydadeğer bir maruziyet etkisi belirtilmemesine rağmen, sıçan ve farelerde oral LD_{50} değeri 2.000 mg/kg'ın üzerinde ve tavşanlarda dermal LD_{50} değeri de 2.000 mg/kg'ın üzerinde bulunmuştur (EU Risk Assesment, 2003). 6 saatlik 170 mg/m^3 BPA tozuna solunum yolu ile maruz kalındığında burun epitel tabakasında geçici ve hafif enflamasyon ve oranazal boruda da ülserasyon görülmüştür (National Toxicology Program (NTP) Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR), 2008).

2.4.7.2. Üreme ve Gelişim Sistemi Üzerine Toksik Etkiler

BPA'ya maruz kalan farelerin vajina ağırlığında azalma, endometriumdaki epitel hücrelerinde artış ve endometriyum epiteli ile subepitelyal stromada ERα gen ifadesinde artış olduğu gösterilmiştir (Markey ve ark., 2005). BPA'nın, *in vivo* ve *in vitro* olarak nöroblastoma hücrelerinin çoğalmasına güçlü bir şekilde katkı sağladığı ve bu etkinin hücre döngüsü regülasyon yolağı ve ER-bağımlı yolaklar yoluyla gerçekleştiği belirtilmiştir (Zhu ve ark., 2008). Son dönemde yapılan çalışmalarda BPA maruziyetinin semen kalitesinin (Li ve ark., 2011), serbest testeron seviyesinin azalması ve cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin seviyesinin artmasıyla (Zhou ve ark., 2013) yüksek derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan hayvan çalışmalarında östrus siklusu, oosit sayısı, reseptör ekspresyonu ve hücre proliferasyonunun, ergenlikte testis ağırlığının, yetişkinlikte prostat boyutunun bozulmasıyla BPA'nın üreme sistemini etkilediği gösterilmiştir (Richter ve ark., 2007; Vandenberg ve ark., 2009).

Çalışmalarda düşük doz BPA'nın, gelişmekte olan fare ve sıçan beyninin yapısını, gelişimini ve davranışlarını etkilediği gösterilmiştir (Richter ve ark., 2007). Farelerde doğum sonrası uzun süreli BPA maruziyetinde çift cinsiyet, beyin fonksiyonlarının etkilenmesi ve yetişkinlerde nöronal fenotiplerde değişimler gözlenmiştir (Patisual ve Polston, 2008). Maternal düşük doz BPA ile maruziyet sonrasında doğan erkek fare yavrularında prostat hiperplazisinin arttığı, anogenital uzaklığın oluştuğu ve epididimal ağırlığın azaldığı gösterilmiş olup, prostat hiperplazisi ile ER arasında ilişki bulunmuş ve bunun antiöstrojenlerle bloke edildiği belirtilmiştir (Timms ve ark. 2005; Gupta, 2000). Fetal gelişim döneminde BPA'ya maruz kalan sıçanların yaşamlarının ilerleyen zamanlarında prostat kanseri görülme riskinin arttığı gösterilmiştir (Ho ve ark., 2006). Bu etkinin doğrudan DNA modifikasyonu ile ilgili olmadığı, BPA'nın hücre fonksiyonlarını kontrol eden proteinlerde, tranlasyon aşamasında değişikliklere neden olması sonucu oluştuğu ileri sürülmüştür (Ho ve ark., 2006).

Epidemiyolojik çalışmalar kadınlarda BPA kan seviyeleri ve endometrial hiperplazi ve obezite gibi çeşitli sağlık bozuklukları arasında ilişkileri göstermiştir (Lang ve ark., 2008). BPA'nın erken çocukluk gelişimi boyunca fetal dönemde ikincil cinsel gelişim değişiklikleri ve nörodavranışsal değişimler gibi olumsuz sağlık etkilerine sahip olduğu gösterilmiştir (Welshons ve ark., 2006). Hamile kadın ve çocuklardaki artan maruziyet endişe vericidir, çünkü BPA hassasiyetinin bilinen yönleri ile aynı düzeyde BPA'ya maruz kalan yetişkinlere göre gelişen fetüs ve çocuklarda daha yüksek risk olduğunu göstermektedir.

2.4.7.3. Nörolojik Sistem Üzerine Toksik Etkiler

BPA maruziyeti hem insan harici primat modellerinde hem de sıçanlarda prefrontal omurga sinapslarında ve hipokampüste östradiole sinaptojenik cevabı büyük ölçüde bozmaktadır (Leranth ve ark., 2008 ve MacLusky ve ark., 2005). Bu inhibe edici etkisi çevresel olarak ilişkili dozlarda hızlı cevapların oluşmasını sağlayan membran reseptörleri yoluyla ortaya çıkmaktadır (Hajszan ve Leranth, 2010). Dolayısıyla düşük doz BPA (40-400 µg/kg/gün), sıçanlarda sinaptojenik yeniden oluşumu değiştirmiş ve *in utero* maruz bırakılmış insan harici primatların hipokampüsündeki omurga sinapslarını ve dopamin nöronlarını etkilemiştir (Elsworth ve ark., 2013).

BPA'nın beyindeki dopamine sistemi üzerine etkileri konusunda da çalışmalar yapılmıştır. İlk çalışma dopamin reseptörleri, dopamin taşıyıcıları ve G-proteini (guanin nükleotid-bağlayıcı protein) sinyalizasyonunun uyarılmış dopamin aktivasyonu üzerine olmuştur (Suzuki ve ark., 2003). Hücre membranlarında nörotransmitter reseptörlerinin aktivasyonlarını modifiye eden G-proteinine bağlı membran reseptörünün aksine BPA'nın klasik bir östrojen reseptörü gibi davranıp düşük dozda etki yaratmadığı konusunda hipotezler vardır. Sonraki çalışmalarda, dopamine bağlı G-protein aktivasyonu üzerinde BPA'nın etkisi teyit edilmiştir (Mizuo ve ark., 2004; Narita ve ark., 2006, 2007). Gelişimsel olarak maruz bırakılan farelerde (Mizuo ve ark., 2004) ve *in vitro* çalışmalarda (Miyatake ve ark., 2006) gen ekspresyonunda değişiklik olmaksızın D3 reseptörlerinin bağlanmasındaki değişim bu değişikliği raporlayan çalışma ile desteklenmiştir.

2.4.7.4. İmmün Sistem Üzerine Toksik Etkiler

İmmün sistem vücudun mikroorganizmalara karşı sahip olduğu temel savunma mekanizmasıdır. İmmün sistemin baskılanması savunmanın zayıflamasına ve vücudun enfeksiyonlara açık hale gelmesine sebep olurken immün sistemin aşırı uyarılması da sağlıklı hücrelerin ölümü gibi hasarlara sebep olmaktadır. İmmün sistemdeki regülasyon bozuklukları otoimmün hastalıklara yol açabilir. Günümüzde sahip olunan veriler BPA'nın immün sistemin çalışma düzenini bozabileceğini; buna bağlı olarak savunma mekanizmasının zayıflayabileceğini ya da immün fonksiyonların aşırı stimüle edilebileceğini göstermiştir. BPA'nın immün sisteme etkisinin direkt veya nöroendokrin sisteme etki yoluyla indirekt olabileceği bildirilmiştir. İmmün sistemin kontrolünde tiroid ve endokrin hormonlarının rolü büyüktür. BPA'nın bu hormonlara etkisi immün sistemi de etkilemektedir (Carlisle ve ark., 2009).

2.4.7.5. Hormonal Sistem Üzerine Toksik Etkiler

Tiroid hormonları tiroksin (T4) ve triiodotironin (T3) vücutta beyin gelişimi, büyüme hormononunu uyararak büyümenin kontrol edilmesi, lipid ve karbonhidrat metabolizmalarının düzenlenmesi ve bazal metabolizma hızının ayarlanmasından sorumludur. BPA gibi çevresel kimyasallar tiroid aktivitesini bozabilirler. Sıçan karaciğer hücreleri üzerinde yapılan çalışmada BPA'nın tiroid reseptörlerine etki ettiği ve T3 stimüle edici cevabı baskıladığı gösterilmiştir (Moriyama ve ark., 2002). Buna bağlı olarak BPA'nın T3'ün yerine reseptörlere bağlanarak gen baskılanmasına neden

olabileceği de anlaşılmıştır. BPA bir tiroid hormonu reseptörü antagonistidir (Zoeller ve ark., 2005; Zoeller, 2007) ve gen ekspresyonu üzerindeki tiroid hormonu etkisini önleyebilir (Moriyama ve ark., 2002). BPA'nın serum T4 konsantrasyonunu da arttırdığı gösterilmiş ve artışın sebebi BPA'nın T4 ile yarışarak tiroid reseptörlerine bağlanması olarak açıklanmıştır (Zoeller ve ark., 2005). Araştırmacılar bu durumu BPA'nın tiroid yolağını bozmasına bağlamışlardır (Carlisle ve ark., 2009). BPA, hamile kadınların serumunda, amniyotik sıvıda, göbek kordonunda ve plasentada tespit edilmiştir (Ikezuki ve ark., 2002). Gebelik döneminde BPA'ya maruziyet tiroid fonksiyonlarını etkileyerek ve hipotiroidizme bağlı olarak gelişimin kritik evrelerinde mental geriliğe ve cüceliğe sebep olabilmektedir (Carlisle ve ark., 2009).

2.4.7.6. Obezite ve Diyabet Üzerine Toksik Etkiler

Hormonlar adipoz dokunun oluşumunda ve devamlılığında önemli yere sahiptir. Steroid yapıdaki cinsiyet hormonları ve büyüme hormonu anti-adipoz etki gösterirken kortizol ve insülin lipojenik etki gösterir. Yağ hücrelerindeki lipoprotein lipaz salınımını inhibe ederek lipojenezi azaltmak yağ hücrelerinden salınan östojenin önemli görevlerinden biridir. BPA östrojen reseptörlerine agonist etki gösterir, bu durumda reseptörler aktive olur, ancak östrojen salınamaz. BPA'nın bu mekanizmaya bağlı obeziteyi tetiklediği görülmüştür. 20 obez kadın üzerinde yapılan çalışmada bu kadınların %55'inin adipoz doku örneklerinde oranında BPA'ya rastlanmıştır (Fernandez ve ark., 2007).

Yapılan bir çalışmada vücut kitle indeksi 25kg/m^2 ve bunun üzerinde olan 20 obez kadının serum BPA seviyeleri vücut kitle indeks ortalamaları 19,7 kg/m^2 olan sağlıklı 19 kadının serum BPA seviyeleri ile kıyaslanmıştır. Obez kadınların serum BPA seviyelerinin belirgin derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Takeuchi ve ark., 2004). Aynı çalışmada polikistik over sendromu olan 19 kadının ve 7 obez kadının 19 sağlıklı kontrol deneğinden daha yüksek serum BPA konsantrasyonuna sahip oldukları saptanmıştır.

Yapılan son çalışmalar, BPA'nın insülin direnci, pankreatik β hücrelerinin fonksiyon bozuklukları, adipojenez, oksidatif stres ve inflamasyon gibi çeşitli mekanizmalara bağlı olarak glukoz metabolizmasını etkilediğini göstermiştir (Alonso-Magdalena ve ark., 2006, 2010, 2011). Üriner BPA seviyeleri ile diyabet öncesi durum arasındaki pozitif ilişki 3516 kişide diyabet riski olarak bildirilmiştir (Shankar and

Teppala, 2011; Silver ve ark., 2011). BPA maruziyetinin adiposit farklılaşmasının değişmesini veya beslenme davranışlarını düzenleyen nöral dolaşımı bozarak obezite gibi diyabet risk faktörleri için tetikleyici olabileceği bildirilmektedir (Sabanayagam ve ark., 2013).

2.4.7.7. BPA ve Karsinojenez İlişkisi

İn vitro raporlar düşük dozda BPA'nın MMTV-erbB2 farelerinde metastaz ve memeli tümorijenezini hızlandırabileceğini (Jenkins ve ark., 2011) ve meme kanseri hastalarından alınan yüksek risk içeren hücrelerde tümör agresifliği profilini arttırabileceğini de göstermiştir (Dairkee ve ark., 2008). Hiroi ve arkadaşları, 2004'te yaptıkları bir çalışmada kompleks endometriyal hiperplazi ve endometriyal kanser ile BPA maruziyeti arasında bir ilişkinin var olduğunu öne sürmüşlerdir (Hiroi ve ark., 2004).

Kemirgen modelleri ve insan prostat hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda BPA'nın karsinojenezi etkileyebileceği, prostat kanser hücresi proliferasyonunu değiştirebileceği ve bazı tümörler için progresyonu uyarıcı olabileceği gösterilmiştir. Yayınlanan raporlar BPA'ya erken maruziyetin prostat bezinde karsinojeneze duyarlılığı arttırabileceğini kanıtlamıştır (Ho ve ark., 2006; Prins ve ark., 2008).

Çalışmalarda kullanılan sıçan modelleri düşük doz BPA'ya (10µg/kg bw/gün) maruz bırakılmış ve yetişkin östrojen maruziyetini takiben prostatik intraepitelyal neoplazi tabakasında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir. Bu modelin, insanlarda hormonal karsinojeneze duyarlılığın, yaşlanan erkeklerde östradiol seviyelerinin artmasıyla ilişkilili olduğundan prostat hastalık riskine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Kaufman ve Vermeulen, 2005). Bazı çalışmalarda ise; BPA maruziyetinin prostat dokusunda çoklu hücre sinyali genlerinde DNA metilasyon paternlerindeki değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (Ho ve ark, 2006; Prins ve ark., 2008).

Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC), BPA diglisidil eter'i "İnsandaki karsinojenik etkileri yönünden sınıflandırılabilir olmayanlar: Hiçbir gruba girmeyen etkenler " (Grup 3)' grubunda sınıflandırmıştır (IARC, 1989; 1999).

2.4.8. BPA'nın Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkileri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

BPA'nın toksisitesinin değerlendirilmesinde yukarıda da belirtildiği gibi birçok çalışma yapılmakta olup, çeşitli sistemler üzerinde toksik etkilerinin değerlendirilmesinde epigenetik mekanizmaların da rolünün olabileceği son yıllarda yapılan araştırmalarda önemle vurgulanmaktadır (Kundakovic ve Champagne, 2011: Rezg ve ark., 2014).

Perinatal ve trans-jenerasyonal BPA maruziyetinin kalıcı etkilerinin gelişimsel, kanser, davranışsal ve üreme fonksiyonlarında rol oynayan genlerin ekspresyonunun epigenetik programlamasında olası bozucu etkisinin olduğu öne sürülmektedir. Çalışmalar BPA maruziyetinin DNA metilasyonu ve spesifik gen veya genlerin ekspresyonunda değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Ortaya çıkan bu BPA-aracılı metilasyon değişikliklerinin BPA'nın östrojenik aktivitesiyle ilişkili olup olmadığı henüz netliğe kavuşmamıştır. Yine de son zamanlarda yapılan çalışmalar BPA'nın sebep olduğu metilasyonun regülasyonunda rol oynayan DNA metiltransferazların DNMT-1 ve DNMT-3a ekspresyonunun BPA-ERα regülasyonu aracılığıyla olabileceğini göstermiştir (Kundakovic ve ark, 2013).

Neonatal BPA maruziyetinin erkek farelerde DNMT-3a ve DNMT-3b ekspresyonu ve erkek farelerin testislerinde ERα ve ERβ'nin promoter bölgelerinde metilasyon arttırdığı gösterilmiştir (Doshi ve ark, 2011). Farklı bağımsız gruplarda DNMT'lerde ve metil-CpG bağlayıcı protein 2 (MECP2) seviyelerinde BPA'dan kaynaklanan değişiklikler rapor edilmiştir (Doshi ve ark, 2012; Yeo ve ark, 2013).

24 saat BPA maruziyetini takiben yenidoğan sıçan testislerinde östrojen reseptörlerinin promotor bölgelerinde hipermetilasyonda artış tespit edilmiş, spermatojenez ve fertilite üzerine advers etkilere sebep olabileceği bildirilmiştir (Doshi ve ark., 2011). Weng ve ark. (2010) yaptığı bir çalışmada primer epitel meme hücrelerinde düşük doz BPA maruziyetinin lizozom ilişkili membran protein ('lysosomal associated membrane protein', *LAMP3*) geninin CpG adalarında DNA metilasyonunda artışa sebep olduğu ve beraberinde *LAMP3* geninin ifadesini baskıladığı ve bu durumun meme kanseri riskini arttırabildiği gösterilmiştir. Ayrıca BPA'nın dişi farelerdeki epigenetik etkilerinin kuşaklararası sürebileceği belirtilmiştir. Düşük dozlarda BPA'nın rahim içine ve yenidoğan maruziyeti sonucu bazı genlerin promotör bölge CpG adalarında DNA hipermetilasyonu ve hipometilasyonuna, histon

modifikasyonlarına ve miRNA'ları içeren kodlanmayan RNA'ların ifadesinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Bu epigenetik değişikliklerin gen ifadelerini yaşam boyu değiştirebileceği ve bunun da bir takım sağlık problemlerini beraberinde getirebileceği gösterilmektedir. Gebe dişi farelerin BPA'ya geçici maruziyetinin 3. kuşak jenerasyonda DNA metilasyonunda değişikliklere sebep olabileceği gösterilmiştir. (Singh ve Li, 2012). Yenidoğan sıçanların BPA'ya maruziyetinin prostat neoplazinin sıklığında artışa ve prostat dokularında metilasyon değişikliklerine (örn: phosphodiesterase type 4 variant 4, *Pde4d4* geninde hipometilasyon ve gen ifadesinde artış) sebep olduğu gösterilmiştir (Conti ve ark., 2003; Ho ve ark., 2006; Prins ve ark., 2008). Ayrıca, yenidoğan sıçanların BPA'ya maruziyetinin nukleozom binding protein-1 (*Nsbp1*) ve hippocalcin-like 1 (*Hpcal1*) genlerinin metilasyonunda ve ifadesinde değişikliklere sebep olduğu bildirilmiştir (Tang ve ark., 2011).

BPA'ya maruz kalmış insan meme kanseri MCF7 hücrelerinin ve *in utero* BPA'ya maruziyet sonucu 6 haftalık farelerin meme bezlerinde histon metiltransferaz Enhancer of Zeste Homolog 2 (*EZH2*) ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda bu enzimin katalize etttiği gen ifadesi ile ilişkili olan histon modifikasyonu H3K27 metilasyonunda da BPA'nın artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Bhan ve ark. 2014; Doherty ve ark., 2010).

İnsan meme epitel hücrelerinde 1 hafta süre ile BPA maruziyetinin (10, 100 nM) tümör ile ilişkili genlerde (*BRCA1, CCNA1, p16, THBS1, TNFRSF10C ve TNFRSF10D*) metilasyonu arttırdığı gösterilmiş olup, BPA'nın genetik ve epigenetik değişikliklere sebep olarak meme epitel hücre fonksiyonlarına zarar verdiği ve bunun hücre çoğalması ve yaşlanma ile ilişkili olabileceği ve bunun sonucunda memelerde karsinojeneze sebep olabileceği bildirilmiştir (Qin ve ark. 2012). İnsan meme epitel hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada ise; DNA onarım genlerinin (*BRCA1, BRCA2, BARD1, CtIP, RAD51, ve BRCC3*) ifadelerinin arttığı ve apoptoz ile ilişkili *PDCD5* ve *BCL2L11* genlerinin ise ifadelerinin azaldığı gösterilmiştir (Fernandez ve ark, 2012).

İnsan meme kanseri hücrelerinde ve sıçan meme bezlerinde gen ifadesinde anahtar bir molekül olan kodlanmayan RNA *HOTAIR* ifadesinin BPA ile indüklendiği gösterilmiş olup, aynı zamanda kromatin (histon metilasyonu ve asetilasyonu) modifikasyonuna sebep olarak gen aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Bhan ve ark., 2014). Dhimolea ve ark. (2014) da sıçanlarda gebelikte BPA'ya maruziyetin meme bezlerinde genom düzeyinde epigenetik değişikliklere sebep olduğunu göstermiştir.

Uzun süreli BPA maruziyetinin N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptör seviyelerini ve yetişkin fare hipokampüsündeki histon deasetilaz 2 (HDAC2) ekspresyon ve fonksiyonlarını arttırdığı gösterilmiştir (Zhang ve ark, 2014). Prenatal BPA maruziyetli Wistar-Furth sıçanlarına postnatal 4. günde α-laktalbümin promotör bölgesinde histon H3K4 trimetilasyon pro-aktivasyonunda artış olmuş ve meme bezinde α-laktalbüminin mRNA ekspresyonu artmıştır (Dhimolea ve ark, 2014).

Tablo 2.4'de BPA'nın epigenetik mekanizmalar üzerine etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 2-4: BPA'nın epigenetik mekanizmalar üzerine etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalar

Çalışma düzeni	Epigenetik değişiklik	Kullanılan yöntem	Sonuç	Kaynak
Sinir dokuları/hücreleri				
50 mg/kg BPA içeren diyet ile beslenmiş dişi farelerin döllerinden elde edilmiş kortikal nöron kültürü	Kcc2 (potasyum-klor taşıyıcı) ekspresyonunda artış H3K9ac'da azalma	RT-qPCR Kromatin-ChIP	Santral sinir sistemini suprese eder, nöronal klorür ekstrüzyonunu etkiler, seksüel dimorfizme sebep olabilir	Yeo ve ark, 2012.
Fare N2A nöroblastoma hücresi (10 µM BPA) Human SK-N-A5 nöroblastoma (10 µM BPA) Fare preadiposit fibroblast (3T3-L1) (10 µM BPA)	Global DNA metilasyonunda azalma Global DNA metilasyonunda değişiklik yok Global DNA metilasyonunda değişiklik yok	HPLC AP-PCR (RSA I ve HPA II restriksiyon enzimleri)		Bastos ve ark, 2013.
90 gün boyunca 40 mg/kg/day BPA'ya maruz bırakılmış erkek farelerin beyin dokuları	N-metil-D-aspartik asit (NMDA) Reseptörünün alt birimi olan NR1'de azalma ERK 1/2 histon asetilasyonunda artış ERK1/2 histon fosforilasyonunda artış	Western-blot	ERK 1/2 sinyal yolaklarının aktivasyonu ile ilgili. NMDA reseptör seviyesinde artış. Korku ile alakalı belleğin retansiyonu ve ediniminde artış olmuştur.	Qin ve ark, 2014.
20 µg/kg vücut ağırlığı BPA'ya maruz bırakılmış fetal fare önbeyninden elde edilen dokular	CPG adalarında lokalize 2500 NotI lokusunda demetile 48 lokus tespit edilmiş Lokus spesifik hipometilasyon ve hipermetilasyon oluşumu gözlenmiş	Genome-wide analiz Ters ranskripsiyon aracılı q-PCR RLGS ve spot DNA'nın klonlanması	Gen sessizleşmesi, kromatinin yeniden biçimlenmesi. Beyin gelişiminde etkili olabilir.	Yaoi ve ark, 2008.

20 µg/kg bw BPA'ya maruz bırakılmış fetal fare önbeyninden elde edilen dokular	Endomembran sistemde protein-transport-ilişkili proteinler *Spot12B6* (*Vps52*) ve *Spot12B9* (LOC72325) ekspresyon değişiklikleri gözlenmiştir.	RT-PCR	NotI'de de novo demetilasyon ve mRNA transkripsiyonuna sebep olur, nöron diferansiyonu ve migrasyonu hızlandırır.	Yaoi ve ark, 2008.
Prostat dokuları/hücreleri				
70 gün boyunca oral yolla 50µg/kg BPA'ya neonatal maruz kalmış 12 aylık sıçanların prostat dokusu	*Scgb2a*1 (prostat tarafından salgılanan başlıca androjen bağlama proteini, sekretoglobin 2A) ekspresyonunda artış ve CpG dinükleotidlerinde hipometilasyon Histon H3K9 asetilasyonu	RT-PCR Bisülfit sekanslama Kromatin immunopresipitasyon (ChIP ve qPCR)	İnflamasyon Doku tamiri Tümörijenez CpG dinükleotid hipometilasyonu ve *Scgb2a1* gen ekspresyonunu arttırmış olabilir.	Wong ve ark, 2015.
90 gün boyunca,10 µg/kg bw BPA'ya maruz bırakılmış yenidoğan erkek farelerin prostat dokuları	Siklik AMP'nin bozulmasında etkili bir enzim olan *fosfodiesteraz tip 4 varyant 4* (*PDE4D4*) ekspresyonunda artış. *PDE4D4* 5' CpG adalarında hipometilasyon, yaşlanmayla birlikte hipermetilasyon ve gen sessizleşmesi. *HPCAL* (cAMP üretilmesinde kullanılır) spesifik metilasyon ve ekspresyon.		Prostat kanseri hassasiyetinde artış.	Prins ve ark, 2007)

10 µg/kg vücut ağırlığı BPA'ya maruz bırakılmış yeni doğan Spraque-Dawley sıçanların prostat dokusu	*PDE4D4* için normal yaşlanmayla beraber prostat dokusunda hipermetilasyon.	MSRF (metilasyon sensitive restriksiyon fingerprinting-*Mse*I, *Bst*UI) Bisülfit genomik sekanslama Metilasyon spresifik PCR (MSPCR) RT-PCR	*PDE4D4* geninin hipometilasyonu bu genin transkripsiyonel sessizleşmesiyle alakalıdır.	Ho ve ark, 2006.
10 µg/kg vücut ağırlığı BPA'ya maruz bırakılmış yeni doğan Spraque-Dawley sıçanların prostat dokusu	Nsbp1, Hpcal1 Ribozomal protein L19 (Rpl19) Metil CpG bağlama proteini (MeCP2) Mbd1, Mbd2, Mbd3, Mbd4 genlerinde erken ve kalıcı aşırı ekspresyon.	Syber green bazlı RT-PCR		Tang ve ark, 2012.
10 µg/kg vücut ağırlığı BPA'ya maruz bırakılmış yeni doğan Spraque-Dawley sıçanların prostat dokusu	*Pd4d4*'te metilasyon. Aşırı ekspresyon (*Ssbp1* promoterinde hipometilasyon indüklenmesi sonucu).	Syber green bazlı RT-PCR	Seksüel matürasyon	Tang ve ark, 2012.
10 µg/kg vücut ağırlığı BPA'ya maruz bırakılmış yeni doğan Spraque-Dawley sıçanların prostat dokusu	*Nsbp1* (nükleozom bağlama proteini 1) promoteri hipometilasyonu.	Bisülfit genomik sekanslama Metilasyon spesifik PCR(MSPCR)		Tang ve ark, 2012.
Meme dokuları/hücreleri				
MCF-7 (insan meme adenokarsinom hücresi) Sıçan meme bezi dokusu	*HOTAIR* ekspresyonunda artış. *HOTAIR* ekspresyonunda artış	Lusiferaz yöntemi	Tümör metastazı Kanserin yayılması	Arunoday ve ark, 2014.
HMEC (insan meme epitel hücreleri)	*BRCA1, CCNA1, CDKN2A (P16) THBS1, TNFRSF10C, TNFRSF10D* % DNA metilasyonunda artış	q-PCR	Proliferasyonun artışı	Qin ve ark, 2012.

	(hipermetilasyon) *H1C1* DNA metilasyonunda azalma. *p16* ekspresyonunda doza bağlı artış. *Siklin-e* ekspresyonunda yüksek dozda artış (10^{-7} M) gözlenirken, düşük dozda (10^{-8} M) etki görülmemiştir	 q-PCR q-PCR q-PCR		
Meme epitel hücresi	*LAMP3* geni CpG adalarında DNA metilasyonunda artış (4 nM BPA dozu için)		Epigenetik sessizleşme	Weng ve ark, 2010.
MCF-10F (3-D kültür)	*BRCA1*, *BRCA*2, *BARD1* *CtIP*, *RAD51*, *BRCC3* ekspresyonlarında artış. *PDCD5*, *BCL2L11* (BIM) down-regülasyonu. *BCL2L11*, *PARD6G*, *FOXP1* *SFRS11* hipermetilasyonda artış. *NUP98*, *CtIP (RBBP8)* hipermetilasyonda artış.		DNA tamiri Apoptoz	Fernandez ve ark, 2012.
25 µg/kg vücut ağırlığı BPA' ya maruz bırakılmış sıçan meme bezi dokusu MCF-7 (insan meme adenokarsinom hücresi)	Histon metiltransferaz *EZH2* ekspresyonunda artış. Histon metiltransferaz *EZH2* ekspresyonunda artış.	RT-PCR Western blot immunohistokimyasal q-PCR	Meme karsinomu Meme karsinomu	Arunoday ve ark, 2014.

			Regülasyonda bozukluk	
250 µg /kg vücut ağırlığı /gün BPA'ya subkutan maruz bırakılan Wistar –Furth dişi sıçanların meme dokusu	*Alfa-laktalbumin* geninin transkripsiyon başlatma bölgesinde Histon H3K4 trimetilasyon proaktivayonunda artış.	Anti-5 metil sitozin antikoru kullanılarak immunopresipitasyon	Memeli bezi epigenomunda değişiklikler	Dhimolea ve ark, 2014.
Testis/Over dokuları/hücreleri				
Erkek *Gobiocypris rarus* testislerinde; 35 günlük 15 mg/L BPA maruziyetini takiben dişi overinden elde edilen dokular	Global DNA metilasyonu nda artış DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ekspresyonlarında azalma.	DNA'ya bisülfit uygulanması, PCR amplifikasyonu, qPCR	*DNMT* ekpresyonu global DNA metilasyon seviyesini etkileyebilir *Cyp19a1a* ile mRNA ekspresyonu ve CpG metilasyon seviyesi arasında negatif korelasyon	Liu ve ark, 2014.
Resorbed embriyo	*Sp1, Sp3* transkripsiyon faktörlerinin eskpresyonlarında azalma.		DNMT'lerin ekspresyonunu regüle eder. Embriyo gelişimi ve subfertiliteye öncülük eder sperm sayısı ve motilitede azalma	Liu ve ark, 2014.
50 ng/kg BPA'ya maruz bırakılmış neonatal Eker sıçanlar; 10 µg/kg BPA'ya maruz bırakılmış Sprague Dawley sıçanlarından elde edilen dokular	*Calbindin D9k, Dio2, Gdf10, Car8, Gria2, Spp1, Sfrp2* *Rasd2 e*kspresyonlarında değişiklikler			Greathouse ve ark, 2012.
Postnatal 10-12. günlerde 50 mg/kg BPA'ya 3 ay boyunca maruz bırakılmış yetişkin	*EZH2* ekspresyonunda artış. AKT pregenomik sinyalizasyonunda			Greathouse ve ark, 2012.

sıçanların miyometriyum dokuları	azalma. EZH2 fosforliyasyonunda artış. H3K27 trimetilasyonunda artış.			
2,4 µg BPA/gün 'ya maruz bırakılmış neonatal erkek sıçanlardan elde edilen testis hücreleri.	*ERα, ERβ* promoter bölgelerinin hipermetilasyonunda artış. ERα promoterinde %40'dan %60' a artış, ERβ promoterinde %20'den %65'e artış. DNMT3A, DNMT3B ekspresyonlarında artış (yaklaşık 2 kat).	Bisülfit sekanslama HPLC qPCR	Testislerde anormal DNA metilasyonu, spermatogenez ve fertilitede advers etkiler. Spermatogenez ve fertilite de advers etkiler.	Doshi ve ark, 2011.
(ER)-pozitif BG1 ovaryum kanser hücreleri (10^{-5} M BPA)	*RAB31* (U59877) *SiklinD1* (X59798) *Siklin bağımlı kinaz 4* (U37022) İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteini 4(U20982) Anti müllerien hormon (NM_000479) mRNA seviyesi ve transkripsiyon seviyelerinde artış.	Microarray RT-PCR	Apoptoz Kanser Hücre döngüsü Sinyal transdüksiyonu Nükleik asit bağlanması	Hwang ve ark, 2011.
Prepuberte dişi Wistar sıçanlarından 1 hafta boyunca 10 mg/kg, 40 mg/kg, 160 mg/kg BPA maruziyeti sonucu elde	160 mg/kg maruziyetli sıçanlarda *FIGLA* (germ hattı alfadaki ekspresyon faktörü) *H1FOO* (oosit spesifik histon H1	RT-PCR Western blot	Folikül gelişimi	Li ve ark, 2014.

edilen ovaryum dokuları.	varyantı) *AMH* (anti müllerien hormon) FIGLA ve H1FOO'nın mRNA ekspresyonu ve protein ekspresyonlarında azalma, AMH'nin mRNA ekspresyonu ve protein ekspresyonlarında artış.			
Diğer dokular/hücreler				
Embriyonik fare hipotalamik hücresi (0,02-200 µM BPA maruziyeti)	*DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, MeCP2* izoformlarının ekspresyonlarında DNMT'ler 200 µM'da değişim gösterirken MeCP2 20µM'dan büyük dozlarda değişim göstermiştir.	RT-reverse transkripsiyon PCR	Normal hipotalamik fonksiyonların gelişimine zarar verebilir, neonatal ya da prenatal kalıcı advers etkiler meydana gelebilir.	Warita ve ark, 2013.
hESC (insan embriyonik kök hücresi-meme epitelyal hücrelerine farklılaşma boyunca düşük doz (10^{-9}- 10^{-6} M) BPA maruziyeti)	*Oct4* (oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4) Nanog proteinlerinin ekspresyonunda değişiklik.	Western blot	Hücre farklılaşması, farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesi(çoğalması).	Warita ve ark, 2013.

2.4.9. BPA ile ilgili Yasal Düzenlemeler

Dünyada BPA'nın halk sağlığı üzerine riskleri konusunda birçok risk değerlendirme otoriteleri rapor yayınlamıştır.

EFSA Gıda ile temas eden Gıda Katkı Maddeleri, Tat vericiler ve Ambalaj Materyelleri Paneli ('Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food', AFC) 2006 yılında yayınladığı raporda çeşitli populasyon grupları için BPA'nın tolere edilebilir günlük alım değerini ('tolerable daily intake', TDI) 50 µg/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir (EFSA, 2006). EFSA/AFC Panelinde bildirilen BPA'nın günlük tüketim maruziyetleri Tablo 2.5'de gösterilmiştir (EFSA, 2006). EFSA/AFC Paneli 2008'de ve 2010 yılında EFSA Gıda ile temas eden Maddeler, Enzimler, Tat vericiler ve İşlem Yardımcıları Paneli (Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids, CEF) Paneli'nde de BPA'nın TDI değeri 50 µg/kg vücut ağırlığı olarak bildirilmiştir. EFSA/CEF Paneli 2015'de yayınladığı son raporda ise geçici tolare edilebilir günlük değeri (t-TDI: temporary Tolerable daily intake) 4 µg/kg vücut ağırlığı'na düşürmüştür. EFSA bu değişikliği yeni veriler ve risk değerlendirmesi ve özellikle de meme bezi, üreme, metabolik, nörodavranışsal ve immün sistemler hakkındaki veritabanlarındaki belirsizlikler yüzünden gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak, EFSA gıda maddelerinden alınan BPA seviyelerinin günlük maruziyet seviyesinden çok daha düşük olmasından dolayı BPA'nın insan sağlığı üzerinde risk oluşturmadığı sonucuna varmıştır. Ayrıca, bunun hamile bayan ve yaşlılar için de uygun olduğunu bildirmişlerdir (EFSA, 2015).

Tablo 2-5: EFSA/AFC Panelinde bildirilen BPA'nın günlük tüketim maruziyetleri (EFSA, 2015)**.**

Tüketici Yaşı	Tüketilen Yiyecek / İçecek	Mikrogram/kg vücut ağırlığı/günlük olarak BPA'nın korunumlu göç değerine bağlı günlük tüketim maruziyeti
3 aylık yenidoğan bebek	Sadece anne sütü	0,2
3 aylık yenidoğan bebek	PC içermeyen şişe veya cam şişede bebek maması	2,3
3 aylık yenidoğan bebek	PC şişede bebek maması	11* (4[#])
6 aylık yenidoğan bebek	PC şişede bebek maması ve hazır yiyecek/içecek	13* (8,3[#])
1,5 yaşındaki çocuk	2 kg hazır yiyecek/içecek	5,3
Yetişkin	3 kg hazır yiyecek/içecek	1,5

* 50 mgBPA/litre'de bebek mamasına bağlı en yüksek değer [#] 10 mgBPA/litre'de bebek mamasına bağlı tipik değer

28 Ocak 2011 tarihli Avrupa Birliği Direktifi'nde (Commision Directive 2011/8/EU) 1 Mart'tan itibaren tüm Avrupa Birliği üye ülkelerinde BPA içeren polikarbonat biberonların üretiminin artık mümkün olmayacağı ve 1 Haziran ve sonrasında ise bu maddeyi içeren biberonların ithal edilmesine de izin verilmeyeceği bildirilmiştir (Avrupa Birliği Komisyonu, 2011). 2008 yılı Nisan ayında Kanada'da ve 2010 yılı Nisan ayında Danimarka'da BPA içeren bebek biberonlarının kullanımı yasaklanmıştır.

7 Şubat 2011 tarihli ve 27839 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan "Emzik, Biberon, Biberon Başlığı, Alıştırma Bardağı, Alıştırma Bardağı Kapağı ve Benzeri Ürünlerin Üretimi, İthalati ve Bildirim Esaslarına Dair" Tebliğ'in ekinde bu tip ürünlerin teknik dosyasında bulunması gereken spesifikasyonlar arasında polikarbonat içeren termoplastik biberonlarda BPA miktarı da yer almaktadır (27839 sayılı Resmi Gazete, 2011). Daha sonra 31 Ekim 2013 tarihli ve 28807 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan bu tebliğlerle aynı Tebliğ güncellenerek yayınlanmıştır (28807 sayılı Resmi Gazete, 2013). Böylelikle bu ürünlerin halk sağlığına ve çevreye zarar vermesini engellemek, topluma güvenli şekilde ulaşmasını teminen piyasaya arz edilmeden önce Bakanlığa yapılacak bildirimin usul ve esasları belirlenmiştir.

Türkiye'de 2013/34 Türk Gıda Kodeksi 'Gıda İle Temas Eden Plastik Madde Ve Malzemeler' Tebliğinde TGK-Bebek Formülleri ve TGK-Devam Formülleri Tebliğlerinde bebek olarak tanımlanan tüketici grubu için kullanılan, polikarbonat madde ve malzemelerin üretiminde kullanılamaz kısıtlaması getirilmiştir. Spesifik migrasyon limit değeri 0,6 mg/kg olarak belirlenmiştir.

2.5. Hücre Kültürü

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

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

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

Hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi gibi nedenlerden dolayı da tercih edilmektedir. (Schmalz, 1994; 1997; Browne, 1988). Hücre kültürleri, günümüzde sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik ve toksikolojik çalışmalarda tanı veya araştırma amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, hücre kültürleri hayvan deneylerinin yerini alması yolunda alternatif uygulamalar olarak da son yıllarda oldukça önem kazanmıştır.

Hücre kültürlerinin dezavantajları olarak; birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusu olabilir. Ayrıca, hücre kültürü testleri ile sadece materyallerin akut toksisite reaksiyonları konusunda bilgi edinilebilmekte, materyalin

uzun süreli doku temasında oluşturacağı sitotoksisite düzeyi konusunda ise veri elde edilememektedir (Schmalz 1994). Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir. İn vitro çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskobik inceleme uzmanlık gerektirmektedir.

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

Primer hücre kültürleri

Primer hücre kültürü, organizmadan doğrudan doğruya alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen ve ilk olarak kültür şartlarında bulunan hücrelerden oluşmaktadır. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücreler, genotip ve fenotip olarak orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri içerir. Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınmaktadırlar. Bu işleme subkültür adı verilmektedir. Bu kültürlerde hücre soyu "sonlu"dur, yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölür. Bu nedenle, primer hücrelerle belirli sayıda pasajlama yapılabildiğinden; deneyleri bu dönemde yapmak gereklidir. Primer hücreler ile çalışılabilecek pasaj sayısı hücre tipine göre değişmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz olabilirler; bu durumda aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre dizileri elde edilmiş olur. Primer hücre kültürleri genellikle hayvan serumu ve diğer bileşenler eklenmiş karışık besin medyumlarına ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla primer hücre kültür sistemlerini standardize etmek oldukça zordur. Primer hücre kültürleri, üretim aşamalarının zor olmasına, hassas hücreler olmalarına, çalısma esnasında ortaya çıkabilecek sorunlara ve kontrollerinin son derece güç olmasına rağmen orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri nedeniyle değer kazanmışlardır (Browne, 1988; Özdemir, 2007).

Sekonder Hücre Kültürleri

Primer kültürlerden sonra hücreler ortalama 40-50 pasaj süresince fenotipik ve genotipik özellikleri değişmeden sabit bir oranda çoğalarak devam ettirilebilir. Bu dönemdeki hücrelere "diploid hücre kültürü" ya da "sekonder hücre kültürleri" adı verilir. Bu kültürlerdeki bütün hücreler, alındıkları dokunun karyotipini %85 oranında korumaktadırlar. Ancak, bu hücrelerde genellikle 30-40 pasaj arasında spontan bir farklılaşma ya da transformasyon gözlenmeye başlar.

Devamlı Hücre Kültürleri

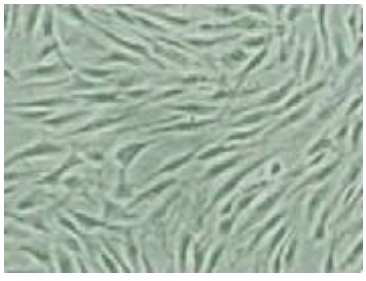
Hücre dizileri, primer kültürlerden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek oluşturulan kültürlerdir. Primer hücre kültürleri transformasyona uğradığında ve süresiz olarak bölünme yeteneği kazandığında oluşurlar. Transforme hücreler genellikle daha hızlı ve daha kolay büyürler ve genellikle fazladan yani anormal kromozomlara sahiptirler. Subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir. Transformasyonları nedeniyle fizyolojik özelliklerini koruyamamaktadırlar. Tümör dokusundan da alınan hücrelerden de elde edilirler. Üç gün ara ile en az 70 defa pasajı yapılan hücre dizileri "devamlı hücre dizisi" olarak kabul edilmektedirler. Hücre dizilerinin primer kültürlerden farkları; kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim göstermeleri ve sonsuz çoğalma yetenekleri olarak sıralanabilir.

2.5.1. Hücre Kültür Koşulları

Kültür koşulları her hücre tipi için oldukça çeşitlidir. Hücreler, amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller gibi önemli besin maddelerinin, büyüme faktörlerinin, hormonların, O_2 ve CO_2 gibi gazların, pH, ozmotik basınç, sıcaklık gibi düzenleyici fizikokimyasal çevrelerin olduğu uygun bir substrat ya da besiyeri ile kültüre alınır.

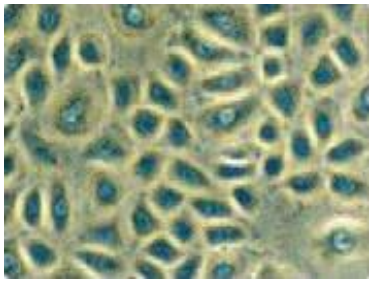
Hücrenin morfolojik durumu: Kültürdeki hücreler şekilleri ve görünümleri bakımından üç ana kategoriye ayrılırlar:

Fibroblastik (veya fibroblast benzeri) hücreler, bipolar ya da multipolar olup uzamış şekle sahiptirler ve substrata tutunarak büyürler (Şekil 2-12).



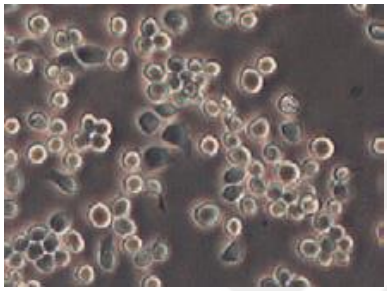
Şekil 2-12: Fibroblastik (veya fibroblast benzeri) hücreler.

Epitelyal benzeri hücreler çokgen biçimli olup daha muntazam boyutlara sahiptir ve substrata tutunarak büyürler (Şekil 2-13).



Şekil 2-13: Epitelyal benzeri hücreler.

Lenfoblast benzeri hücreler küre şeklinde olup genellikle yüzeye tutunmaksızın süspansiyonda büyütülürler (Şekil 2-14).



Şekil 2-14: Lenfoblast benzeri hücreler.

Besiyeri: Besiyeri, kültür çevresinin en önemli bileşenidir. Çünkü kültür için düzenleyici pH ve ozmotik basıncın yanı sıra gerekli besin maddelerini, büyüme faktörlerini, hücre büyümesi için gereken hormonları sağlar. Önceleri hücre kültürü deneylerinde doku ekstraktlarından, vücut sıvılarından elde edilen doğal besiyeri kullanılmasına rağmen, standardizasyona ihtiyaç duyulduğu için besiyerlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Serum ilavesi ihtiyacına göre sınıflandırılmış üç temel besiyeri kullanılır. Bunlar; bazal besiyeri, azaltılmış serumlu besiyeri ve serumsuz besiyeridir.

Serum, bazal besiyerindeki hücrelerin kültürleri için büyüme ve adhezyon faktörlerinin, hormonların, lipidlerin, ve minerallerin kaynağı olarak oldukça önemlidir. Buna ilaveten serum hücre membranının geçirgenliğini düzenler ve hücredeki lipidler, enzimler, mikrobesinler ve iz elementler için taşıyıcı olarak hizmet eder. Bununla birlikte, besiyerinde serum kullanımının maliyet, standardizasyon problemleri, spesifiklik, çeşitlilik ve bazı hücre kültürlerinde hücresel/büyüme fonksiyonlarının inhibisyonu veya uyarılması gibi istenmeyen etkileri içeren bazı dezavantajları da vardır.

pH: Normal memeli hücrelerinin çoğunun düzgün büyümesi için en uygun pH=7,4 olsa da hücre dizilerinde küçük değişiklikler olabilmektedir. Bazı trasforme hücre hatları daha asidik çevrelerde daha iyi büyüme gösterirken (pH=7-7,4), bazı normal fibroblast hücre hatları daha bazik çevreleri tercih eder(pH=7,4-7,7).

Karbondioksit (CO_2): pH'daki değişikliklere karşı kültürdeki hücrelerin büyüme besiyerinin ve tamponun pH'sını kontrol eder. Genellikle, tampon olarak HEPES veya karbondioksit/bikarbonat (CO_2/HCO_3^-) bazlı bir tampon kullanılır. Çünkü besiyerinin pH'sı çözünen CO_2'in ve HCO_3^-'ın hassas dengesine bağlıdır. Çünkü atmosferik CO_2'deki değişiklikler medyumun pH'sını değiştirebilir. Bu yüzden, özellikle transforme hücre hatları yüksek konsantrasyonlarda kültürleniyorsa kullanılan besiyeri HCO_3^- bazlı ise tamponlamak amacıyla eksojen CO_2 kullanmak gerekmektedir. Çoğu hücre kültürü yönteminde CO_2 havada %5-7 oranında kullanılmaktadır. CO_2/HCO_3^- konsantrasyonu doğru pH'a ve ozmolaliteye ulaşmada etkili olmaktadır.

Sıcaklık: Hücre kültürü için uygun sıcaklık genelde hücrelerin izole edildiği konağın vücut sıcaklığına bağlıdır ve sıcaklıktaki farklılık anatomik olarak daha az bir dereceye kadar olabilir (örn. cilt sıcaklığı iskelet kaslarındaki sıcaklıktan daha düşüktür). Fazla sıcaklık az sıcaklığa göre hücre kültürü için daha ciddi bir problem olabilmektedir. Çoğu insan ve hayvan hücre hattı için uygun sıcaklık 36-37°C aralığındadır.

2.6. Sitotoksisite Testleri

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

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

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

İn vitro sitotoksisite testlerinin avantajları:

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

İn vitro sitotoksisite testlerinin dezavantajları:

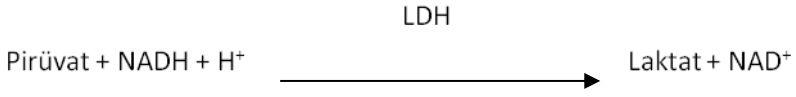
- Her test için bir tür hücre kullanılması,
- Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
- Kültür ortamında doku koruyucu mekanizmalarının olmamasıdır (Schmalz 1997).

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

In vitro hücre topluluğunda, %50 oranında hücre ölümüne neden olan konsantrasyon (inhibisyon konsantrasyonu, IC_{50}) olarak ifade edilir ve sitotoksisitenin gösterilme biçimidir.

2.6.1. Laktat Dehidrojenaz Tayini (LDH Testi)

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



Formül 2-1

2.6.2. MTT Testi

Test, canlı hücrelerde MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] bileşiğinin tetrazolyum halkasının mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır. Soluk sarı renkli MTT, tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluştururken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluşturmaz. Oluşan mavi-mor renkli kristaller isopropil alkol veya dimetilsülfoksit ile çözündürülerek oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm'de ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitoksisitesi belirlenir (Alley ve ark., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Mosmann, 1983; Van Meerloo ve ark., 2011).

2.6.3. XTT Testi

Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid), MTT testinde olduğu gibi metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz enzim sistemi aracılığıyla suda çözünebilen turuncu renkli bir formazan boyaya dönüşür ve elde edilen sonuçlar 450-490 nm'de spektrofotometrede ölçülür. MTT testindeki gibi çözündürme aşamasını içermeyen bu test günümüzde hücre çoğalması ve canlılığının belirlenmesinde ve sitotoksisite analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve Williams 2001; Wataha 2001). XTT testi ile maddenin IC_{50}, metabolik toksisite ve solunum zinciri üzerine etkisi hakkında bilgi edinmek mümkündür.

2.6.4. Nötral kırmızı alım (NRU) testi

Canlı hücreler lizozomlarında nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesine sahiptirler. Böylece, hücre canlılığı nötral kırmızı boyasını tutma kapasitelerinin inhibisyonu ile ölçülür. Nötral kırmızı zayıf katyonik bir boya olduğundan kolaylıkla hücre mebranına penetre olur ve lizozomlarda intraselüler olarak birikir (lizozomal pH

< sitoplazmik pH) ve oradaki anyonik bölgelerle lizozomal matrikse bağlanır. Hücre yüzeyinde ya da duyarlı lizozomal membrandaki değişiklikler nötral kırmızı boyasının alınmasını ve bağlanmasını azaltır. Böylelikle canlı hücreler boyayı tutarken, zarar görmüş ya da ölü hücreleri tutmazlar. Boyanın nüfuz ettiği hücrelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 540 nm'de ölçülür (Fotakis ve Timbrell, 2006; Repetto ve ark., 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Ayrıca, histon proteinlerinin western blot tekniği ile analizi de İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

%12 Bis-tris protein jeli	Novex NuPAGE NP0341BOX
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Biomatik A3338
5-hmC DNA ELISA Kit	Zymo Research D5426
5-mC DNA ELISA Kit	Zymo Research D5326
Absolu alkol	Sigma-Aldrich 32221
Anti-asetil histon H3K9 antikoru	Milipore 07-352
Anti-rabbit IgG, HRP-bağlı antikor	Santa Cruz SC-2004
Anti-trimetil histon H3K27 antikoru	Milipore 07-449
Anti-trimetil histon H3K9 antikoru	Milipore 07-442
Bisfenol A (%99)	Sigma-Aldrich 239658
Blueelf protein standartı (3.5-245 kDa)	Jena Bioscience PS-105
cDNA sentez kiti	Roche Life Science 05091284001
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Biomatik A2424
DNA izolasyon kiti	Roche Life Science 11796828001
Dubelco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri (DMEM) (4,5 g glukoz içeren)	Wisent-Multicell 319020CL
Dubelco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri/F12 besiyeri (DMEM/F12)	Wisent-Multicell 319010CL
Eagle'ın minimum esansiyel besiyeri (EMEM)	Wisent-Multicell 320026CL
Etilendiamin tetra asetik asid (EDTA)	Sigma E5134
Fetal sığır serumu (FBS)	Wisent-Multicell 080110
Fosfat tamponu (PBS-CMF) (kalsiyum ve magnezyumsuz) (10x)	Wisent-Multicell 311012CL

Gen ekspresyonu probu (*ACTB)* 'RealTime ready custom single assays'	Roche Life Science 05532957001 Assay ID: 143636
Gen ekspresyonu probu (*CCND2, siklin D2)* 'RealTime ready custom single assays'	Roche Life Science 05532957001 Assay ID: 101384
Gen ekspresyonu probu (*CDKN2A, p16)* 'RealTime ready custom single assays'	Roche Life Science 05532957001 Assay ID: 101437
Gen ekspresyonu probu (*Rassf1)* 'RealTime ready custom single assays'	Roche Life Science 05532957001 Assay ID: 139830
Gen ekspresyonu probu master karışımı	Roche Life Science 04707494001
Glasiyel asetik asit	Riedel-de Haen 27225
iBlot Transfer Stack (nitroselüloz membran içeren)	Novex Lifetech NR19114-01
LDS Örnek tamponu (4X)	Novex NuPAGE B0007
MES SDS Yürütme tamponu (20X)	Novex NuPAGE NP0002
Metilasyon array (*CCND2, siklin D2)* 'OneStep qMethyl Arrays'	Zymo Research D5312-5-A
Metilasyon array (*CDKN2A, p16)* 'OneStep qMethyl Arrays'	Zymo Research D5312-3-A
Metilasyon array (*Rassf11)* 'OneStep qMethyl Arrays'	Zymo Research D5312-1-A
Nötral kırmızı	Sigma-Aldrich N7005
Örnek indirgeyici ajan (10X)	Novex NuPAGE, B0004
Penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) çözeltisi	Wisent-Multicell 450201EL
Proteaz inhibitor kokteyli	Sigma P2714-1BTL
RNA izolasyon kiti	Roche Life Science 11828665001
Sığır serum albumini (BSA)	Applichem A7906
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich L5750
Sodyum klorür	J. T. Baker 0278
Total histon ekstraksiyon kiti	Epigentek OP-0006
Tripan mavisi	Fluka 93595
Tripsin (1:250)	Biomatic A4027
Tris hidroklorür	Applichem A3452

Tween 20	Applichem A49640
Western blot görüntüleme çözeltisi	Santa Cruz SC-2048

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (30-300 µL)	Eppendorf
Blok ısıtıcı	Stuart SBH130D
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik 5231 NFY
CO_2'li inkübatör	Thermo-Scientific Heracell 150i
Çalkalamalı blok ısıtıcı	Biosan TS-100C
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2041 D
Derin dondurucu (-80 °C)	Daihan-Scientific Wisecry
Elektronik hassas terazi	Precisa XB 220 A
Etüv	Nüve
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus CKX4
Hassas terazi	Mettler H20
Laminar kabin ('Biosafety Level 2')	Tezsan
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Epoch Biotek
Mikrodalga fırın	Beko MD 1510 S
Mikrosantrifüj aleti	Hettich Micro 120
Mini orbital çalkalayıcı	Stuart SSMI
Dikey Elektroforez Jel Tankı	Life Technologies İnvitrogen Mini Gel Tank A25977
Otomatik pipetör	Eppendorf
Otomatik hücre sayımı cihazı	Luna Automated Cell Counter (Logos model: L10001)
Otoklav	Hirayama HV-50L
pH metre	Hanna HI 1131 B
Bidistile su cihazı	Millipore Gradient

Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich Micro 200R
Görüntüleme cihazı	Kodak Gel Logic System 1500
Görüntüleme cihazı yazılım programı	Carestream
Su banyosu	Memmert WB14
Blok Isıtıcı	Techne Dri-Block DB-2D
Western blot kuru aktarım cihazı	Invitrogen i-Blot
Spin santrifüj	Labnet C1301B
Termal döngü cihazı-Altın blok	Applied Biosystems 9700
Termal döngü cihazı-Gradient	Axygen Therm-1000
Vorteks	NC 28405-Ika
Gerçek zamanlı termal döngü cihazı (‘Real-time PCR’, RT-PCR)	Roche Life Science Lightcycler 480-II
Ayarlanabilir 8 kanallı pipetler (1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

DNA saklama kutusu	Greiner bio-one
Enjektör (10 mL; 50 mL)	Set inject
Enjektör ucu steril filtre (0,22 µm naylon)	Minisart-Sartorius
Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Hücre kültürü flaskı (25 cm^2; 75 cm^2)	Nest
İnce duvarlı PCR tüpü (0,2 mL)	Greiner bio-one
Kriyo vial (2 mL)	Greiner bio-one
Lateks eldiven	Broche
Mikroplaka (6; 24; 96 kuyucuklu)	Nest
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner bio-one
Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Nitril eldiven	Broche
Otoklav bandı	Sussex

Otoklavlanabilir schott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Pastör pipeti (2 mL)	Greiner bio-one
Pipet ucu (0,1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Nest
Serolojik pipet (10 mL; 50 mL)	Greiner bio-one

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği

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

Hücre kültürü laboratuvarı çalışma alanları ve laminar kabinin içi %70'lik alkol ile düzenli olarak temizlendi. Çalışama öncesi ve sonrasında belli süreler ile hücre kültürü laboratuvarı ve laminar kabinin UV lambaları açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Hücre kültürü laboratuvarında çalışırken tek kullanımlık galoş ve eldiven kullanıldı, laboratuvar önlüklerinin ise başka çalışmalarda kullanılmamasına özen gösterildi.

3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini

İnsan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) ve insan prostat kanser hücreleri (PC-3) Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri kriyo vialler içerisinde -196ºC'de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Tripsin/EDTA çözeltisi (%0,2 / %0,04): 0,2 g tripsin ve 0,04 g EDTA tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü. 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi. Porsiyonlanarak -20°C'de saklandı.

Fetal sığır serumu (FBS): Hazır inaktive edilmiş FBS kullanıldı. Ancak, FBS inaktive edilmemiş ise; 56ºC' de 30 dk. inkübe edilerek inaktive edildi. Porsyonlanarak -20ºC'de saklandı. Çalışma günü 37ºC'de çözündürülerek kullanıldı. FBS, besiyerine eklenmeden önce 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi.

Antibiyotik çözeltisi [penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) %10]: 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) ana stok çözeltisinden alınır, 10 mL'ye CMF-PBS ile tamamlanır.

Hücre dondurma çözeltisi: 10 mL DMSO, 10 mL FBS ve 1 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi hücreler için uygun besiyeri ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

SH-SY5Y hücresi için besiyeri: DMEM/F12:EMEM (1:1) besiyerine 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 10 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi eklenerek 100 mL olacak şekilde hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

PC-3 hücresi için besiyeri: DMEM/F12 besiyerine 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 10 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi, eklenerek 100 mL olacak şekilde hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması

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

hücreler süspande edildi ve 7-10 mL besiyeri içeren 25 cm^2'lik ya da 75 cm^2'lik flasklara ekildi. Flasklar 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde inkübasyona bırakıldılar.

3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)

Hücre kültür flasklarının tüm yüzeyini kaplamış halde bulunan yoğunlaşmış hücreler için 'konfluent durumda' ifadesi kullanılır. Hücreler konfluent duruma geldiğinde pasajlandılar. Pasajlama için flask inkübatörden alındı, laminar kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Hücrelerin yüzeyi 2 mL CMF-PBS çözeltisi ile yıkandı. Bu adım, tripsin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntılarını uzaklaştırmak amaçlı yapılır. Yıkama işleminden sonra CMF-PBS döküldü ve 2 mL tripsin/EDTA çözeltisi ilave edildi, flask 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde 5-10 dk. bekletildi. Tripsin ile hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücrelerin tripsin içinde gereğinden fazla beklememesi için mikroskop ile yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmelidir. Tripsin aktivasyonunu durdurmak amacıyla flaska 2-3 mL serumlu besiyeri eklendi, pipetleme yapıldı ve hücreler 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet 2 mL besiyeri ile süspande edildi. Hücreler hemasitometrede sayılarak, yaklaşık 10^5 hücre/mL olacak şekilde içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekildi. Flasklar, %90 bağıl nem, 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edildiler. Hücre dizisinin devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi ortalama haftada 2-3 kez yapıldı.

3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücre kültüründe meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklar ile dondurularak saklandılar. Bölüm 3.4.5.'de elde edilen hücre pelletinin üzerine 1 mL hücre dondurma çözeltisi eklendi ve pastör pipeti ile pipetleme yapılarak karıştırıldı. Yaklaşık 10^6 hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları soğuğa dayanıklı kriyo viallere aktarıldı, sırasıyla -20°C'de 30 dk., -80°C'de 16-24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

3.4.7. Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımı tripan mavisi testi ile yapıldı. Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, ölü hücrelerin bozulmuş hücre membranlarından boyayı hücre içerisine alabilmeleri esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde;

canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

Hücre sayımı otomatik hücre sayım cihazı ile gerçekleştirildi. Ayrıca, kontrol etme amacıyla hücre sayımı thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm^2 alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4x16 küçük kareden oluşan özel sayım lamları kullanılarak da ışık mikroskobunda gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Formül 3-1):

Toplam hücre sayısı/mL = Sayım sonucu x Seyreltme faktörü x 10^4 x Besiyeri miktarı (mL) Formül 3-1

3.5. Sitotoksisite Testleri

BPA'ya maruz bırakılan hücrelerin canlılığının tespiti MTT ve NRU testi uygulanarak gerçekleştirildi.

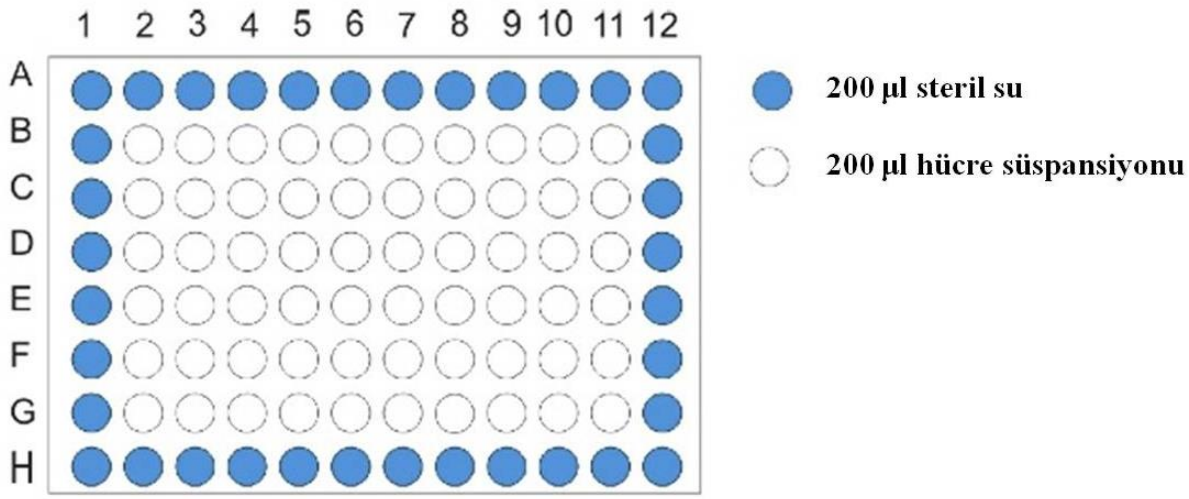
3.5.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Hücre kültürlerinin mikroplakalara uygulanması esnasında kuyucuklarda düzensiz hücre yoğunluğu gerçekleşebilir. Hücre süspansiyonunun homojen olduğundan emin olunmalı ve hücre topaklarının oluşumu engellenmelidir. Aynı zamanda, testin uygun hassasiyette olması için test esnasında hücrelerin yakın bitişiklikte olması gerekir. Hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları mikroskopta incelenmelidir. Hücre kültürleri aşağıda belirtildiği şekilde 96 kuyucuklu mikroplakalarda hazırlandı:

1. Bir rezervuar içerisine steril bidistile su konuldu ve inkübasyon sırasında kültür besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla 96 kuyucuklu mikroplakanın A ve H sıraları ile 1. ve 12. sütunlarındaki her bir kuyucuğuna 100 µL su dağıtıldı (Şekil 3-1).

2. Her bir kuyucukta 10^4 hücre 100 µL besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakanın diğer kuyucuklarına hücreler şu şekilde dağıtıldı: 6,5 x 10^5 hücre 6,5 mL besiyerinde süspande edildi ve steril rezervuar içerisine hücre süspansiyonu konuldu. 96 kuyucuklu mikroplakalara Şekil 3.1'de gösterildiği şekilde 100 µL hücre süspansiyonu dağıtıldı.

3. 96 kuyucuklu mikroplakadaki hücre süspansiyonu 37ºC'de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi.



Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikroplakaya hücre ekimi.

3.5.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Sitotoksisite testleri için BPA stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde cam vial içinde 22,829 mg BPA 1 mL DMSO'da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

%10'luk DMSO çözeltisinin hazırlanışı: 10 mL DMSO besiyeri ile 100 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1 olması sağlandı.

%1'lik SDS ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 0,1 g SDS, PBS ile 10 mL'ye tamamlandı.

%0,1'lik SDS çalışma çözeltisinin hazırlanışı: %1'lik SDS ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek hücrelere 0,1 mg/mL konsantrasyonunda SDS (~IC_{50}) pozitif kontrol olarak uygulandı (ISO-10993-5) ve çözelti içindeki PBS konsantrasyonunun da %1 olması sağlandı.

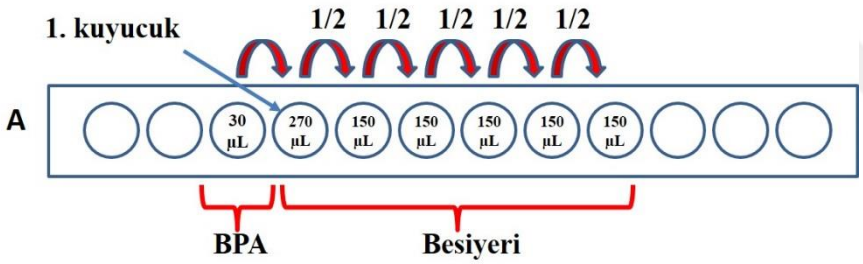
BPA'nın çözündürüldüğü DMSO'nun hücrelere maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1'i geçmemesi gerektiğinden dolayı BPA 100 katı konsantrasyonda stok çözeltisi halinde DMSO içerisinde hazırlandı. Daha sonra BPA çözeltisinin farklı konsantrasyonları besiyerinde seyreltilerek aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

BPA çözeltisinin seyreltilmesi: Stok BPA çözeltisi 96 kuyucuklu mikroplakada 1/10 oranında besiyeri ile seyreltildi. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiden 1/2 oranında seyreltme yapılarak toplam 6 konsantrasyonda BPA standart çözeltileri hazırlandı. Seyreltme işlemi için uygulanan plaka düzeni Şekil 3-1'de gösterildi:

1. A sırasındaki 1. kuyucuğa 270 µL besiyeri 2.-6. kuyucuklara 150 µL besiyeri konuldu.

2. A sırasındaki 1. kuyucuğa BPA'nın DMSO içinde hazırlanan çözeltisinden 30 µL konuldu ve iyice karıştırıldı.

3. 1. kuyucuktan 150 µL alınarak 2. kuyucuğa aktarıldı (1/2 oranında seyreltme), iyice karıştırıldı ve bu kuyucuktan 150 µL alınarak 3. kuyucuğa aktarıldı. Bu işlem 5. kuyucuk da dahil olmak üzere yapıldı. En son 6. kuyucuktaki fazla olan 150 µL atıldı. Bu şekilde toplam 6 konsantrasyonda olmak üzere BPA seyreltmeleri hazırlanmış oldu.



Şekil 3-2: BPA'nın 1/2 oranında seyreltilmesi.

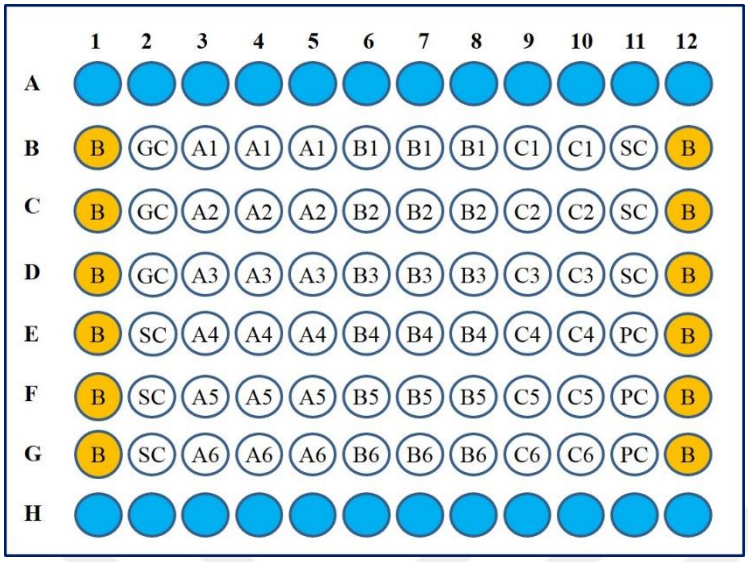
3.5.3. BPA'nın Hücre Kültürüne Maruziyeti

1. Bölüm 3.5.1'de belirtilen 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücre kültür mikroplakasındaki kuyucuklardan (A ve H sırası hariç) 8 kanallı pipet kullanılarak kültür besiyeri uzaklaştırıldı.

2. Bu kuyucuklara 50 µL PBS ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi (kuyucuk yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin kazınmamasına, zarar görmemesine dikkat edilmelidir).

3. Vakit kaybetmeden her bir kuyucuğa 90 µL taze hücre kültürü besiyeri eklendi (hücre katmanının kurumasından dolayı oluşabilecek hücre ölümü veya stresini engellemek için hızlı yapılmalıdır).

4. Maruziyet mikroplakası Şekil 3.3'te gösterildiği şekilde düzenlendi:



A + H sıraları: Steril bidistile su
B: Kültür besiyeri + hücre yok (blank, negatif kontrol)
GC: Kültür besiyeri + hücre (hücre büyüme kontrolü)
SC: Kültür besiyeri + hücre + DMSO (%1) (çözücü kontrolü)
PC: Kültür besiyeri + hücre + SDS (0,1 mg/mL) (pozitif kontrol)
A1, A2, ..., A6: Kültür besiyeri + hücre + BPA'nın 6 farklı konsantrasyonu

Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikroplaka düzeni.

5. 1 ve 12. Sütunların B-G kuyucuklarına 100 µL besiyeri konuldu (blank, negatif kontrol).

6. B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 10 µL hücre kültürü besiyeri konuldu (hücre büyümesi kontrolü, GC).

7. E2, F2, G2, B11, C11 ve D11 kuyucuklarına 10 µL %10'luk DMSO çözeltisi konuldu (çözücü kontrolü, SC).

8. E11, F11 ve G11 kuyucuklarına 10 µL %0,1'lik SDS çözeltisi konuldu (pozitif kontrol, PC).

9. A1-A6 şeklinde yazılmış kuyucuklara Bölüm 3.5.2'de belirtildiği üzere seyreltmeleri yapılmış BPA çözeltilerinden 10'ar µL tatbik edildi (6 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı). Her test 1 mikroplakada 24 saatlik maruziyet için hazırlandı. Aynı düzende 2. farklı bir günde çalışılmak üzere toplam her konsantrasyon için 6 tekrar yapıldı.

10. 96 kuyucuklu mikroplaka 37^{o}C'de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

MTT testi ve nötral kırmızı testleri için yukarda belirtildiği şekilde ayrı maruziyet plakaları oluşturuldu.

SH-SY5Y ve PC-3 hücreleri için yukarıda belirtilen koşullarda çalışıldı.

3.5.4. MTT Testi

3.5.4.1. MTT Testinin Esası

MTT bileşiğinin tetrazolyum halkasının hücredeki (canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış) mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır (Mosmann, 1983; Alley ve ark., 1988). Canlı hücrede soluk sarı renkli MTT, enzim ile tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu koyu mavi-mor renkli çözünmeyen formazan ürününe dönüşür. Böylece canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Hücreler organik çözücü (örn. isopropanol, DMSO) ile çözündürüldükten sonra, oluşan formazan çözeltisine ait rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm'de (670 nm referans dalga boyuna karşı) ölçülür. MTT'nin redüksiyonu sadece metabolik olarak aktif olan hücrelerde meydana gelir ve bu aktivitenin seviyesi hücrelerin canlılıklarıyla ölçülür (Mosmann, 1983; Alley ve ark., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Van Meerloo ve ark., 2011).

3.5.4.2. MTT Testi Protokolü

MTT çözeltisinin hazırlanışı: 5 mg MTT, 1 mL 1 x CMF-PBS içinde çözündürüldü. Çözelti +4ºC'de karanlıkta saklandı.

Deneyin yapılışı

1. Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı gibi BPA ile inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikroplakanın her kuyucuğuna 20 µL MTT çözeltisi eklendi.

2. 150 rpm'de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.

3. 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde 3 saat inkübe edildi.

4. Kuyucuklardaki üstteki sıvı atıldı ve kuyucuklara 100 µL %100'lük DMSO ilave edildi.

5. 150 rpm'de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.

6. Oluşan rengin şiddeti 590 nm'de (670 nm referans dalga boyuna karşı) mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.5.5. NRU testi

3.5.5.1. NRU Testinin Esası

Canlı hücreler lizozomlarında nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesine sahiptirler. Böylece, hücre canlılığı nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesi ile ölçülür. Nötral kırmızı boyası zayıf katyonik bir boya olduğundan kolaylıkla hücre mebranına penetre olur ve lizozomlarda intraselüler olarak birikir (lizozomal pH < sitoplazmik pH) ve oradaki anyonik bölgelerle lizozomal matrikse bağlanır. Hücre yüzeyinde ya da duyarlı lizozomal membrandaki değişiklikler nötral kırmızı boyasının alınmasını ve bağlanmasını azaltır. Böylelikle canlı hücreler boyayı tutarken, zarar görmüş ya da ölü hücreleri tutamazlar. Boyanın nüfuz ettiği hücrelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 540 nm'de ölçülür (Fotakis ve Timbrell, 2006; Repetto ve ark., 2008).

3.5.5.2. NRU Testi için Çözeltilerin Hazırlanışı

Nötral kırmızı boyası ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg nötral kırmızısı boyası 10 mL hücre kültürü besiyerinde çözüldü. Çözelti steril 0,22 µm naylon enjektör ucu filtreden geçirildi. Porsyonlanarak -20^{o}C'de saklandı. Boya kristallerinin iyi çözündürülmesi için çözelti çalışma gününden önce 37ºC'de 1 gece inkübe edildi.

Nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisinin hazırlanışı: 100 µL nötral kırmızı ana stok çözeltisinden alındı, hücre kültürü besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı ve 0,22 µm naylon enjektör ucu filtreden geçirildi (Bu aşamada boya kristallerinin iyi çözündürülmesi sağlanmalıdır).

Nötral kırmızı boyası çözündürme çözeltisinin hazırlanışı: 150 µL glasiyel asetik asit, 7,35 mL distile su ve 7,5 mL absolu alkol karıştırılarak hazırladı. Kullanmadan hemen önce hazırlanmalı ve 1 saat içerisinde kullanılmalıdır.

3.5.5.3. NRU Testi Protokolü

1. Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı gibi BPA ile inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikroplakanın kuyucuklarındaki besiyeri atıldı ve kuyucuklar 150 µL PBS ile yıkandı.

2. Her kuyucuğa 100 µL nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisi eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi.

3. Mikroplakanın kuyucuklarındaki boya çözeltisi atıldı ve 150 µL PBS ile dikkatlice yıkandı (nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisinden kaynaklanabilecek boya kristallerinin kalmamasına dikkat edildi).

4. Her kuyucuğa 150 µL nötral kırmızı çözündürme çözeltisi eklendi.

5. 150 rpm'de 10 dk. inkübatör dışında orbital çalkalayıcıda bekletildi.

6. Oluşan rengin şiddeti 540 nm'de mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.5.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

1. Çözücü kontrol grubundan (SC) elde edilen absorbans değeri %100 canlılığı ifade eder. Örneklerde canlı hücre oranı, çözücü kontrol grubunun (SC) absorbans değeri ile kıyaslanarak % cinsinden hesaplandı.

2. Çözücü kontrollerinin (SC) 96 kuyucuklu mikroplakanın sağ ve sol kenarında bulunması sistematik hataların belirlenmesini sağlar. Testin anlamlı olabilmesi için, sağ ve sol taraftaki çözücü kontrollerin ortalamaları ile tüm çözücü kontrollerin ortalamaları arasında %15'ten fazla fark olmaması gerekir.

3. Hücre büyüme kontrolleri (GC) çözücünün etkisini belirlemeyi sağlar. Eğer çözücü kontrollerin değerleri hücre büyüme kontrolleri ile belirgin bir fark gösterirse, test bileşiklerinin inhibisyon değerleri dikkatle yorumlanmalı, mümkünse farklı bir çözücü seçilmelidir.

4. Testin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla her maruziyet mikroplakasına SDS çözeltisi (son konsatrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde) eklenerek pozitif kontrol grubu (PC) oluşturuldu. Çalışılan koşullarda, SDS çözeltisine (0,1 mg/mL) ait hücre ölümünün yaklaşık %50 olması gerekir (ISO-10993-5).

5. Her çözücü kontrol (SC) ve örnek absorbans değerlerinden, blank (B) değerlerine ait ortalama absorbans değeri çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edildi.

6. Düzeltilmiş çözücü kontrol (düzeltilmiş OD_{SC}) ve örnek (düzeltilmiş $OD_{Örnek}$) absorbans değerlerinin ortalaması alındı.

7. % Relatif inhibisyon (% hücre ölümü) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Formül 3-2):

% Relatif inhibisyon = 100 - (düzeltilmiş ort. $OD_{Örnek}$ x 100 / düzeltilmiş ort. OD_{SC})

Formül 3-2

8. X ekseninde maruziyet konsantrasyonu, Y ekseninde % relatif inhibisyon (% hücre ölümü) olacak şekilde excel programı kullanılarak konsantrasyona karşı % inhibisyon (% hücre ölümü) eğrisi çizildi.

9. Eğriden %50 inhibisyona (hücre ölümüne) karşılık gelen konsantrasyon hesaplanarak çalışılan maddelerin IC_{50} (%50 oranında hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon) değeri belirlendi.

3.6. BPA'nın Hücre Dizilerine Maruziyeti

10 mM BPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 22,829 mg BPA 10 mL DMSO'da çözülerek hazırlandı.

1 mM BPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 10 mM BPA çözeltisinden 1 mL alınarak DMSO ile 10 mL'ye tamamlandı.

0,1 mM BPA çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 1 mM BPA çözeltisinden 1 mL alınarak DMSO ile 10 mL'ye tamamlandı.

Her bir $25cm^2$'lik flaska $1,5x\ 10^6$ hücre 5 mL besiyeri içinde ekildi. CO_2'li inkübatörde 24 saat bekletildi. Flaskın içindeki besiyeri döküldü ve tekrar 5 mL taze besiyeri konuldu. Aşağıda belirtildiği şekilde BPA maruziyetleri gerçekleştirildi:

10 µM BPA maruziyeti: 5 µL 10 mM BPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

1 µM BPA maruziyeti: 5 µL 1 mM BPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

0,1 µM BPA maruziyeti: 5 µL 0,1 mM BPA çözeltisi içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

Kontrol grupları: 5 µL %100 DMSO içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

Bu şekilde BPA 0,1; 1; 10 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde SH-SY5Y ve PC-3 hücrelerine uygulandı ve 48 veya 96 saat boyunca 37°C'lik %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edildi. 96 saatlik maruziyetler için 48. saatte maruziyet flasklarındaki BPA içeren besiyeri yenisi ile değiştirildi. Aynı ortam koşullarında kontrol grupları da oluşturuldu. BPA'in her bir konsantrasyonda maruziyeti için 3'şer adet flaska ekim yapıldı ve deneyler 2. farklı bir günde tekrar edildi. En son maruziyet süreleri tamamlandıktan sonra BPA'ya maruz bırakılan hücreler pasajlandı ve sayıldı. Besiyeri içindeki hücreler 4°C'de 1000 x g'de 5 dk. santrifüj edildi, üstteki besiyeri atıldı ve hücreler PBS ile yıkanarak 4°C'de 1000 x g'de 5 dk. tekrar santrifüj edildi. Hücreler PBS'de süspande edildi ve DNA, RNA ve histon proteinlerinin izolasyonunu yapabilmek amacıyla yaklaşık $1x10^6$ sayıda hücre 200 µL PBS içinde olacak şekilde kısımlara ayrıldı.

3.7. DNA Metilasyonunun Analizi

3.7.1. DNA İzolasyonu

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

Kit İçeriği

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

Proteinaz K: Liyofilize proteinaz K, 4,5 ml bidistile su ile çözündürüldü. -20ºC'de saklandı.

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

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

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

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1. Bölüm 3.6'da belirtildiği üzere hazırlanan $1x10^6$ hücre 200 µl PBS içinde süspande edildi.

2. Üzerine 200 µL bağlama tamponu, 40 µL proteinaz K eklendi. Hemen karıştırıldı ve 70ºC'de 10 dk. inkübe edildi.

3. Üzerine 100 µL isoproponal eklendi ve iyice karıştırıldı.

4. Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.

5. Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

6. Filtreli tüpe 500 µL inhibitör temizleme tamponu eklendi ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

7. Filtreli tüpe 500 µL yıkama tamponu eklendi ve 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

8. Yıkama tamponunun kalıntılarını temizlemek üzere bir kez daha 10 sn. santrifüj edildi.

9. Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp 1,5 mL'lik mikrotüp içine yerleştirildi.

10. Önceden 70°C'ye getirilmiş elüsyon tamponundan 100 µL filtreli tüpe eklendi. 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.

11. Elde eldilen DNA'lar daha sonraki aşamalarda kullanılmak -20°C'de buzdolabında saklandı.

3.7.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

0,1-10 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında SH-SY5Y ve PC-3 hücrelerinden izole edilen DNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikroplaka okuyucu spektrofotometrede de ölçüldü. 260 nm'de ölçülen absorbans değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng ya da µg düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. 260 nm dalga boyunda okunan değer ile 280 nm ve 230 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi verir. Saflaştırılmış DNA'da A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranı yaklaşık 1,75-1,8 üzerinde olmalıdır.

3.7.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini

5-metilsitozin (5-mC) ve 5-hidroksimetilsitozin (5-hmC) içeriğinin tayini, global olarak DNA metilasyonundaki değişiklikleri tayin etmede hızlı ve kullanılışlı bir parametredir (Christman, 1982; Ramsahoye, 2002; Fuke ve ark. 2004). Bu amaçla, DNA'da 5-mC'nin tayini 5-mC DNA Eliza kit (Zymo Research) ve 5-hmC'nin tayini de 5-hmC DNA Eliza kit ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

3.7.3.1. 5-mC'nin Eliza Kit ile Tayini

Kit İçeriği

5-mC Kaplama tamponu (15 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

5-mC Eliza tamponu (250 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

Anti-5-metilsitozin monoklonal antikoru (1 µg/µL, 30 µL): - 20°C'de saklanmalıdır.

Sekonder antikor (1 µg/µL, 30 µL): 4°C'de saklanmalıdır.

HRP geliştirici (15 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

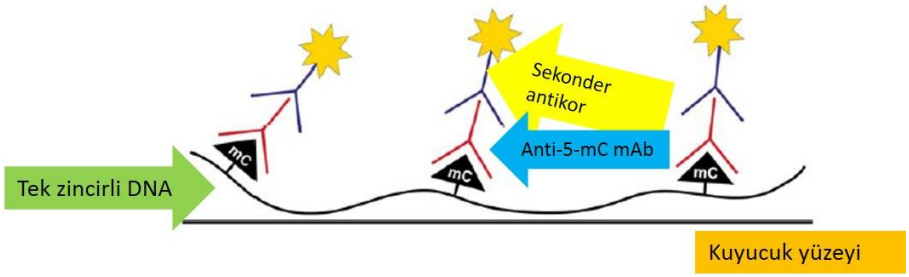
Negatif kontrol (100 ng/µL, 50 µL): - 20°C'de saklanmalıdır.

Pozitif kontrol (100 ng/µL, 50 µL): - 20°C'de saklanmalıdır.

96-kuyucuklu mikroplaka: Oda sıcaklığında saklanmalıdır.

Deneyin esası

5-mC DNA Eliza kitinin temeli dolaylı eliza tekniğidir. Denatüre, tek zincirli DNA örnekleri 5-mC kaplama tampon içinde mikroplaka kuyucuk yüzeylerine kaplanır. Anti-5mC monoklonal antikoru ve HRP bağlı sekonder antikor 5-mC Eliza tamponunda hazırlanır ve kuyucuklara eklenir. HRP geliştiricinin eklenmesi sonucu oluşan rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile 5-mC tayini gerçekleştirilir (Şekil 3-4) .



Şekil 3-4: 5-mC DNA Eliza kitinin temeli.

Deneyin yapılışı

Bölüm 3.7.1'de izole edilen ve Bölüm 3.7.2'de miktarı tespit edilen DNA örnekleri 100 ng konsantrasyonda olacak şekilde 100 µL 5-mC kaplama tampon içinde hazırlandı.

DNA örnekleri ile birlikte kit ile tedarik edilen negatif kontrol (100 ng/100 µL) ve pozitif kontrollerin (100 ng/100 µL) karışımıyla hazırlanan metilasyon standartları

(% 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 oranında 5-mC) da parallel olarak çalışıldı. Blank olarak herhangi bir DNA örneği içermeyen 100 µL 5-mC kaplama tamponu kullanıldı.

DNA bağlama

1. Gerektiği kadar kuyucuk standart ve örnekler için mikroplakadan ayrıldı.

2. 0,2 µL'lik PCR tüpüne 100 ng örnek DNA'ları ve negatif ve pozitif DNA'lar konuldu ve üzerine 100 µL 5-mC kaplama tamponu eklendi.

3. DNA'lar 98°C'de 5 dk. denatüre edildi ve denatürasyondan sonra hızlıca 10 dk. buzda bekletildi.

4. Denatüre edilmiş DNA'lar kit ile tedarik edilen mikroplaka kuyucuklarına eklendi ve üzeri mikroplaka filmi ile kapatıldı. Mikroplaka 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

Bloklama

5. Kuyucuklardaki tampon uzaklaştırıldı ve tüm kuyucuklar 200 µL 5-mC Eliza tamponu ile 3 kez yıkandı.

6. Kuyucuklara 200 µL 5-mC Eliza tamponu eklendi ve üzeri mikroplaka filmi ile kapatıldı. Mikroplaka 37°C'de 30 dk. inkübe edildi.

Antikor eklenmesi

7. Kuyucuklardaki tampon uzaklaştırıldı.

8. Antikor karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı (18 kuyucuk için):

5-mC Eliza tamponu	2000 µL
Anti-5-metilsitozin	1 µL
Sekonder antikor	2 µL

9. Kuyucuklara antikor karışımından 100 µL eklendi ve üzeri mikroplaka filmi ile kapatıldı. Mikroplaka 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

Renk gelişimi

10. Antikor karışımı kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve tüm kuyucuklar 200 µL 5-mC Eliza tamponu ile 3 kez yıkandı.

11. Kuyucuklara 100 µl HRP geliştirici eklendi. Mikroplaka oda sıcaklığında renk gelişimi için 20 dk. bekletildi.

12. Oluşan rengin şiddeti 405 nm'de mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

Sonuçların değerlendirilmesi

13. Metilasyon standardları (%0, %5, %10, %25, %50, %75, %100) ile hazırlanan ölçü eğrisi yardımıyla DNA örneklerindeki metilasyon oranı % olarak belirlendi.

3.7.3.2. 5-hmC'nin Eliza Kit ile Tayini

Kit İçeriği

5-hmC Kaplama tamponu (15 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

5-hmC Eliza tamponu (30 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

Anti-5-hmC poliklonal antikoru (1 µg/µl, 25 µl): -20°C'de saklanmalıdır.

Anti-DNA HRP antikoru x 100 (100 µL): -80°C'de saklanmalıdır.

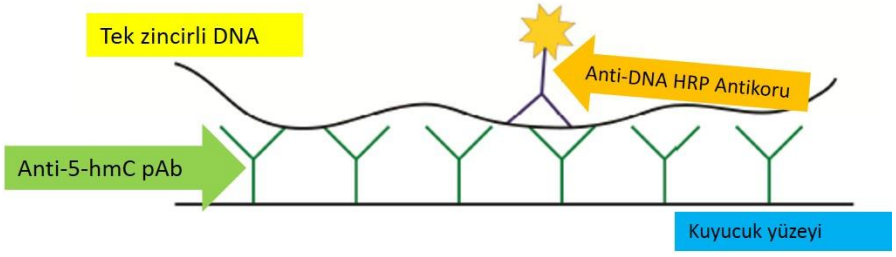
HRP geliştirici (15 mL): 4°C'de saklanmalıdır.

Kontrol DNA seti (5 kontrol x 40 µL): -20°C'de saklanmalıdır.

96-kuyucuklu mikroplaka: Oda sıcaklığında saklanmalıdır.

Deneyin Esası

5-hmC DNA Eliza kiti sandviç temelli bir Eliza modelidir. İlk önce anti-5-hmC poliklonal antikoru mikroplaka kuyucuklarının yüzeyine kaplanır. Denatüre tek zincirli 5-hmC içeren DNA örneği, anti-5-hmC poliklonal antikoruna bağlanır. Sonrasında anti-DNA HRP antikoru (seconder antikor) anti-5-hmC poliklonal antikoruna bağlanır. HRP geliştiricinin eklenmesi sonucu oluşan yeşilimsi mavi rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile 5-hmC tayini gerçekleştirilir (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: 5-hmC DNA Eliza kitinin sandviç temelli modeli.

Deneyin Yapılışı

Bölüm 3.7.1'de izole edilen ve Bölüm 3.7.2'de miktarı tespit edilen DNA örnekleri 100 ng konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı.

DNA örnekleri ile birlikte kit ile tedarik edilen kontrol DNA seti kullanılarak hazırlanan (% 0; 0,03; 0,12; 0,23; 0,55 oranında 5-hmC) standartlar da paralel olarak

çalışıldı. Blank olarak herhangi bir DNA örneği içermeyen 100 µL 5-hmC kaplama tamponu kullanıldı.

Kaplama

1. Gerektiği kadar kuyucuk standart ve örnekler için mikroplakadan ayrıldı.

2. Anti-5-hmC poliklonal antikoru 5-hmC kaplama tamponu içerisinde 1 ng/µL olacak şekilde 1/1000 oranında seyreltildi.

3. Seyreltilen bu antikor karışımından her kuyucuğa 100 µL eklendi ve mikroplaka filmi ile kapatılarak 37^{o}C'de 1 s. inkübe edildi.

Bloklama

4. Mikroplaka kuyucuklarından tampon uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklar 200 µL 1 x Eliza tamponu ile 3 kez yıkandı ve her bir kuyucuktan sıvının uzaklaştırılması sağlandı.

5. 200 µl 1 x Eliza tamponu her kuyucuğa eklendi ve üzeri mikroplaka filmi ile kapatılarak 37^{o}C'de 30 dk. inkübe edildi.

DNA ekleme/bağlama

6. Örnek DNA'lar ve kontrol DNA'lar 98^{o}C'de 5 dk. termal ısıtıcıda denatüre edildi ve denatürasyondan sonra hızlıca 10 dk. buzda bekletildi.

7. Denatüre tek zincirli örnek ve kontrol DNA'lar son konsantrasyonu 1 ng/µL olacak şekilde 1 x Eliza tamponu ile seyreltildi.

8. Mikroplakanın tüm kuyucuklarındaki tampon uzaklaştırıldı.

9. Seyreltilmiş örnek ve standart DNA'lardan 100 µL her kuyucuğa eklendi ve mikroplaka filmi ile kapatılarak 37^{o}C'de 1 s. inkübe edildi.

Anti-DNA HRP antikorunun eklenmesi

10. İnkübasyondan sonra, kuyucuklardaki tampon uzaklaştırıldı ve 200 µL 1 x Eliza tamponu ile 3 kez yıkandı.

11. Anti-DNA HRP antikoru 1 x Eliza tamponu ile 1:100 oranında seyreltildi. Bu karışımdan her kuyucuğa 100 µL eklendi ve mikroplaka filmi ile kapatılarak 37^{o}C'de 30 dk. inkübe edildi.

Renk gelişimi

12. Kuyucuklardaki tampon uzaklaştırıldı ve tüm kuyucuklar 200 µL 1 x Eliza tamponu ile 3 kez yıkandı.

14. Kuyucuklara 100 µL 1 x HRP geliştirici eklendi. Mikroplaka oda sıcaklığında renk gelişimi için 20 dk. bekletildi.

15. Oluşan rengin şiddeti 405 nm'de mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

Sonuçların değerlendirilmesi

16. Kontrol DNA seti standartları (% 0; 0,03; 0,12; 0,23; 0,55 oranında 5-hmC) ile hazırlanan ölçü eğrisi yardımıyla DNA örneklerindeki 5-hmC oranı % olarak belirlendi.

3.7.4. Gene-özgü DNA Metilasyonunun Tayini

p16, siklinD2, Rassf1 Genlerinin promotor bölgelerindeki CpG adalarında DNA metilasyonu tayini 'OneStep qMethyl array'ler (Zymo Research) ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Deneyin esası

Test edilecek DNA örnekleri test reaksiyonu ve referans reaksiyonu olarak iki kısma ayrılır. Test reaksiyonundaki DNA metilasyona hassas restriksiyon enzimleri ('methylation sensitive restriction enzymes, MSREs) ile kesilirken, referans reaksiyonundaki DNA kesilmez. Daha sonra her iki DNA örneği SYTO®9 fluoresans boyası varlığında RT-PCR kullanılarak çoğaltılır ve miktarı belirlenir. Test ve referans DNA örneklerine ait döngü eşik değerleri ('cycle threshold', Ct) metilasyon durumuna göre değişiklik göstermekte ve bu farktan metilasyon oranı hesaplanmaktadır. Mikroplakalarda hazır olarak her kuyucuğa 15 µL konulmuş test ve referans kuyucukların içeriği Tablo 3-1'de verilmiştir.

Kit içeriği

'qMethyl array' Mikroplakası: -20°C'de saklanmalıdır.

Optik mikroplaka filmi

Test ve referans master karışımlarının içeriği aşağıda verilmiştir:

Test reaksiyonu (bir kuyucuktaki)

10 µL	2 x Test reaksiyon karışımı (MSRE'leri içerir)
1 µL	10 µM forvard primer (ya da *MGMT* Primer I)
1 µL	10 µM revers primer (ya da *MGMT* Primer II)
3 µL	DNaz/RNaz içermeyen su
15 µL	Toplam hacim

Referans reaksiyonu (bir kuyucuktaki)

10 µL	2 x Referans reaksiyon karışımı (MSRE'leri içerir)
1 µL	10 µM forvard primer (ya da *MGMT* Primer I)
1 µL	10 µM revers primer (ya da *MGMT* Primer II)
3 µL	DNaz/RNaz içermeyen su
15 µL	Toplam hacim

Deneyin yapılışı

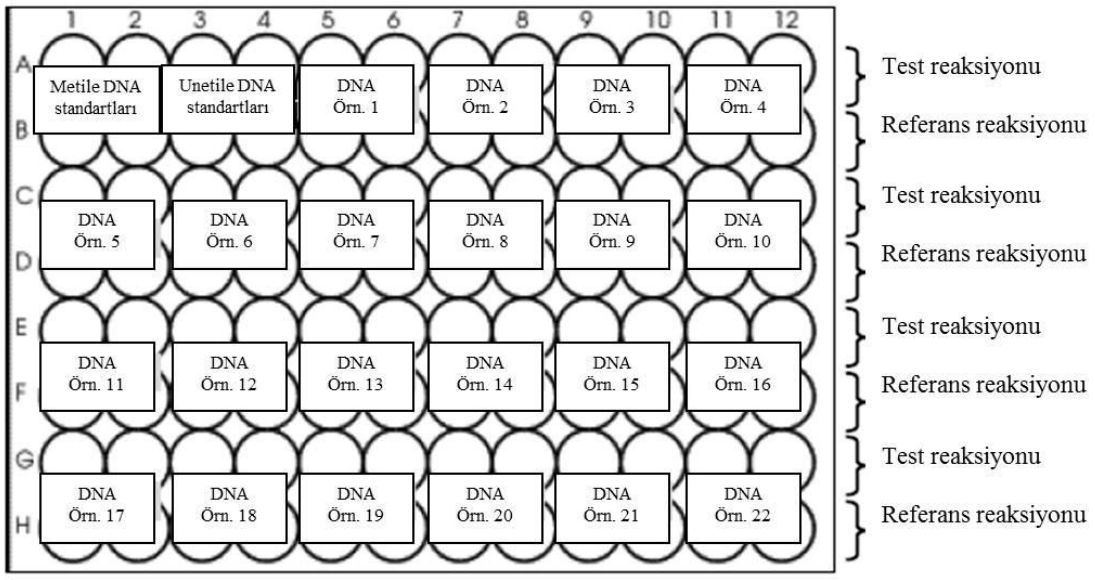
1. 'qMethyl array' Mikroplakası buz üzerinde çözüldü.

2. Plaka 1 dk. spin santrifüj edildi.

3. Mikroplaka kuyucuklarının üzerindeki kapak dikkatlice açıldı ve atıldı. Kontaminasyonun önlenmesi amacıyla içerisindeki karışımın sıçramasından sakınılmalıdır.

4. A1, A2, B1, B2 kuyucuklarında metile DNA standartları, A3, A4, B3, B4 kyucuklarında ise unmetile standartı mikroplakada hazır şekilde array ile temin edildi.

5. 4 ng/µL konsantrasyonda olacak şekilde ayarlanan DNA örneklerinden 5'er µL metileDNA standartları (A1, A2 ,B1, B2) ve unmetile DNA standartları (A3, A4, B3, B4) dışındaki tüm kuyucuklara hem test hem de referans reaksiyonu eklendi. Mikroplaka düzeni Şekil 3-6'da gösterildi.



Şekil 3-6: 'qMethyl array' Mikroplaka düzeni.

6. Mikroplakanın üzeri film ile kaplandı ve RT-PCR cihazında analiz başlatıldı.

7. 'OneStep qMethyl array'ler DNA örneklerinin MSRE kesimi ve 'real-time' amplifikasyonunu kombine olarak gerçekleştirmektedir. RT-PCR cihazında eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 465 nm ve 510 nm (SyberGreen boyası ile çalışma koşullarındaki gibi) olarak ayarlandı. RT-PCR çalışma koşulları Tablo 3-2'de gösterildi.

Tablo 3-1: 'OneStep qMethyl array'lerin RT-PCR'da çalışma koşulları

Aşamalar	**Sıcaklık (^{o}C)**	**Süre**
MSRE kesimi	37	2 saat
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dk.
Denatürasyon (DNA Zincirinin Açılması)	95	30 sn.
Annealing (Primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması)	*Rassf1*: 63 *p16*: 65 *siklinD2*: 63	60 sn. 45 siklus
Primer uzaması	72	60 sn.
Son uzama	72	7 dk.
Erime eğrisi (Spesifik olamayan ürünlerin ve primer dimerlerinin oluşumunun saptanması için)		
Bekletme	4	-

Sonuçların hesaplanması

8. Çoğalan bölgelerdeki metilasyon seviyesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ metilasyon} = 100 \times 2^{-\Delta Ct} \qquad \text{Formül 3-3}$$

ΔCt = Ortalama test reaksiyonu Ct değeri - Ortalama referans reaksiyonu Ct değeri

Aynı zamanda Zymo Research tarafından oluşturulmuş web-bazlı 'OneStep qMethyl' hesap cetveli (www.zymoresearch.com/qmEthylcalc) kullanılarak da hesaplar yapıldı.

3.8. Gen Ekspresyonların tayini

3.8.1. Total RNA İzolasyonu

Hücre kültüründen total RNA izolasyonu 'High Pure RNA Isolation Kit' (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Lizis/Bağlama tamponu: 4,5 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, %30 Triton X-100 (ağırlık/hacim) (pH 6,6). 25°C'de saklandı.

DNaz I (rekombinant, liyofilize): 10 KU liyofilize DNaz I. Çözündürüldükten sonra porsyonlarak -20°C'de saklandı.

DNaz inkübasyon tamponu: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,0). 25°C'de saklandı.

Yıkama tamponu I: 5 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl (pH 6,6). 25°C'de saklandı.

Yıkama tamponu II: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl (pH 7,5). 25°C'de saklandı.

Elüsyon tamponu: PCR kalitede su.

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1. Bölüm 3.6'da belirtildiği üzere hazırlanan $1x10^6$ hücre 200 µL PBS içinde süspande edildi.

2. Üzerine 200 µL bağlama tamponu eklendi ve 15 sn. vorteks ile karıştırıldı.

3. Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.

4. Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g'de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

5. Steril bir mikrotüpte her bir örnek için 90 µL DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz I eklendi ve karıştırıldı.

6. 100 µL DNaz I çözeltisi filtreli tüpün üst yüzeyine konuldu. 15-25°C'de 15 dk. inkübe edildi.

12. Filtreli tüpe 500 µL Yıkama tamponu I eklendi ve 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

13. Filtreli tüpe 500 µL Yıkama tamponu II eklendi ve 8000 g' de 15 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.

14. Filtreli tüpe 200 µL Yıkama tamponu II eklendi ve en yüksek devirde (yaklaşık 13000 g) 2 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı.

15. Filtreli tüp 1,5 mL'lik mikrotüp içine yerleştirildi.

16. Elüsyon tamponundan 50 µL filtreli tüpe eklendi. 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.

17. Elde edilen RNA'lar, cDNA sentezi için -80°C'de saklandı.

3.8.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

0,1-10 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında SH-SY5Y ve PC-3 hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikroplaka okuyucu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm'deki ölçümler RNA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. RNA'nın saflığının belirlenmesinde kullanılan A_{260}/A_{280} oranı ise yaklaşık 1.95± 0.1 olmalıdır.

3.8.3. cDNA Sentezi

cDNA tek veya çift sarmallı olabilir ve mRNA kalıbından ters transkriptaz enzimi kullanılarak sentezlenir. Eğer yapılan deney çift sarmallı cDNA gerektiriyorsa, bir başka DNA sentez basamağı ile gerçekleştirilebilir.

Ölçüm sonucunda elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi için total 1000 ng olacak şekilde 'Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit' (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

Transkriptör ters transkriptaz: 50 µL; 200 mM potasyum fosfat, 2 mM ditiyotreitol, %0,2 Triton X-100, %50 gliserol (pH 7,2)

Transkriptör ters transkriptaz reaksiyon tamponu (x5): 1 mL; 250 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 40 mM $MgCl_2$ (pH 8,5)

Koruyucu RNaz inhibitörü: 50 µL; 20 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 8 mM ditiyotreitol, %50 gliserol (pH 7,6)

Deoksinükleotid karışımı: 200 µL; 10 mM, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Anchored-oligo $(dT)_{18}$ primer: 100 µL

Random heksamer primer: 100 µL

Kontrol RNA: 20 µL

Kontrol primer, insan porfobilinojen deaminaz (PBGD) karışımı: PBGD için 5 µM ileri ve geri primer

PCR kalitede su

Deney protokolü

1. Steril, nükleaz içermeyen, ince duvarlı PCR tüpü buz içine konuldu ve içerisinde kalıp primer karışımı hazırlandı:

Toplam RNA: 1000 ng

Anchored-oligo$(dT)_{18}$ primer (vial 5): 1 µL

Random heksamer primer (vial 6): 1 µL

Su (vial 8): Reaksiyonun toplam hacmi 13 µL olacak şekilde su eklendi.

2. Kalıp primer karışımını denatüre etmek için karışım 65°C'de 10 dk. inkübe edildi ve tüp hızlı bir şekilde buz üstüne alındı.

3. Kalıp primer karışımını içeren tüpe ters transkriptaz karışımının geri kalan bileşenleri aşağıdaki belirtildiği sırayla eklendi:

Ters transkriptaz reaksiyon tamponu (x 5):	4 µL
Koruyucu RNaz inhibitörü:	0,5 µL
Deoksinükleotid karışımı:	2 µL
Transkriptoz ters transkriptaz:	0,5 µL
Toplam hacim:	20 µL

4. Tüp içindeki maddeler dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve spin santrifüj yapıldı. Vorteks yapılmamalıdır.

5. Daha sonra ters transkriptaz karışımı 55°C'de 30 dk. boyunca inkübe edildi.

6. Transkriptaz ters transkriptaz 85°C'de 5 dk inkübe edilerek inaktif hale getirildi.

7. Tüp buz üstüne alınarak reaksiyon durduruldu.

8. cDNA saflaştırmaya gerek olmaksızın PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.8.4. Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Tayini

p16, siklinD2 ve *Rassf1* genlerinin ekspresyonları 'RealTime ready custom single assays' primer prob karışımı kullanılarak RT-PCR ile gerçekleştirildi.

Kullanılan malzemeler

'LightCycler 480 Probes Master' PCR karışımı, x 2 (1mL; FastStart Taq DNA polimeraz reaksiyon tamponu, dNTP karışımı, 6,4 mM $MgCl_2$)

'RealTime ready custom single assays' primer prob karışımı

PCR kalitede su

Deney protokolü

1. Malzemeler açılmadan önce dikkatlice spin yapıldı. Çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi.

2. PCR primerleri ve hidroliz probu içeren çözelti hazırlandı.

3. Buz üstündeki her bir 1.5 mL'lik reaksiyon tüpüne aşağıdaki gösterildiği gibi uygun miktarlarda bileşenler ilave edilerek PCR karışımı hazırlandı ve dikkatlice pipetleme yapıldı:

'RealTime ready custom single assays' primer prob karışımı:	2 µL
'LightCycler 480 Probes Master' PCR karışımı:	10 µL
PCR kalitede su:	3 µL
Toplam hacim:	15 µL

4. Hazırlanan PCR karışımından 15 µL mikroplakanın her kuyucuğuna ilave edildi.

5. cDNA örnekleri steril su ile 1:10 oranında seyreltildi.

6. Hazırlanan cDNA örneklerinden 5 µL her bir kuyucuğa eklendi ve mikroplakanın üzeri mikroplaka filmi ile kapatıldı.

7. Mikroplaka 1500 g'de 2 dk. santrifüj edildi.

8. Mikroplaka LightCycler 480 RT-PCR cihazına konularak ölçüm yapıldı. RT-PCR protokolü Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: 'Roche LightCycler 480 Probes' RT-PCR protokolü

Program adı	**Siklus**	**Analiz modu**	**Sıcaklık ^{o}C**	**Süre**
Pre-inkübasyon	1	None	95	5 dk.
Amplifikasyon	45	Quantification	95	10 sn.
			50	15 sn.
			72	1 sn.
Soğuma	1	None	-	10 sn.

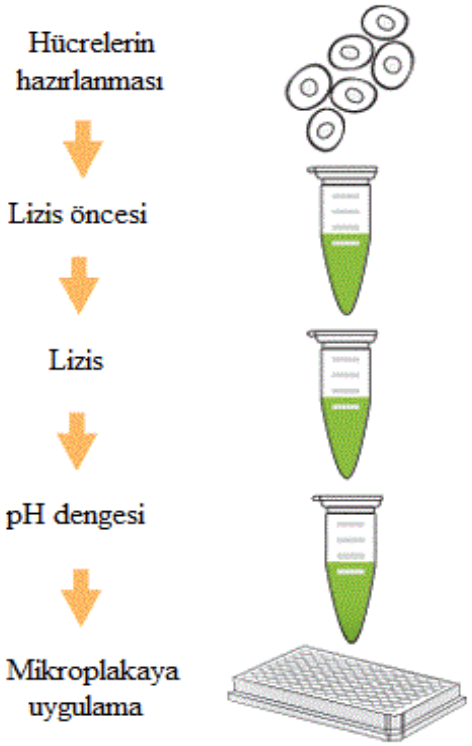
3.9. Histon Proteinlerinin Western Blot Yöntemi ile Tayini

3.9.1. Histon Proteinlerinin İzolasyonu

Hücreden histon proteinlerinin izolasyonu EpiQuick^{TM} toplam histon ekstraksiyon kiti (Epigentek) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi (Şekil 3-7).

Kit içeriği

10x ön-lizis çözeltisi	10 mL
Lizis çözeltisi	20 mL
Balans tamponu	8 mL
DTT çözeltisi	20 µL



Şekil 3-7: Histon proteinlerinin izolasyon basamakları

Deney protokolü

1. Bölüm 3.6'da belirtildiği üzere hazırlanan 1x10^6 hücre 200 µL PBS içinde süspande edildi.

2. PBS ile yıkanan hücreler 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücreler 4^{o}C'de 1000 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldı.

3. 10x ön-lizis çözeltisi, distile su ile 1:10 oranında seyreltilerek 1X ön-lizis çözeltisi hazırlandı (1 mL 10x ön-lizis çözeltisi + 9 mL su şeklinde).

4. Hücre pelletine 200 µL 1x ön-liziz çözeltisi eklendi ve süspande edildi ve 10 dk. buz içinde nazikçe karıştırılarak lizis edildi.

5. Lizatlar 4^{o}C' de 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı.

6. Hücre pelletine 200 µL lizis çözeltisi eklendi ve tekrar süspande edildi ve 30 dk. buz içinde inkübe edildi.

7. Hücre süspansiyonu 4^{o}C'de 12.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üstteki sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.

8. Balans tamponuna 1:500 oranında DTT çözeltisi eklenerek balans-DTT tamponu hazırlandı (1 µL DTT çözeltisi + 500 µL balans tamponu şeklinde).

9. Üstteki sıvıya 60 µL (0,3 hacimde) balans-DTT tamponu eklendi.

10. Böylece histon proteinlerinin izolasyonu gerçekleştirildi ve protein konsantrasyonu ölçülmek üzere hazır hale getirildi.

11. Elde edilen histon proteinleri daha sonraki kullanımlar için porsiyonlandı ve -80^{o}C'de saklandı.

3.9.2. Proteinlerin Miktar Tayini

İzole edilen nükleer ve histon proteinleri ekstrelerinde protein miktarları Bio-Rad protein tayini II kiti ile Bradford prensibine göre ölçüldü (Bradford, 1976).

Kit içeriği

Protein tayini boya reaktifi konsantresi: 450 mL boya

Sığır serum proteini (BSA, standart): BSA standardı kit protokolüne uygun olarak 1,41 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 20 mL bidistile suda çözüldü. BSA ana stok çözeltisi porsiyonlanarak -20°C'de saklandı.

Yöntemin esası

Bio-Rad protein tayini, Bradford prensibine dayanır, basit ve doğrusallığı yüksek bir yöntem olup çözünmüş proteinlerin konsantrasyonlarını tayin eder. Asidik 'coomassie® brilliant blue G-250 boyasının, eklendiği protein çözeltisinde özellikle arginin olmak üzere, esas olarak basit ve aromatik aminoasit rezidülerine bağlanması sonucu oluşan rengin absorbansının 465-595 nm'de mikroplaka okuyucu ile ölçülmesi esasına dayanır.

Protein standart çözeltileri

BSA ana stok çözeltisinden konsantrasyonları 8; 10; 20; 40; 80 µg/mL olacak şekilde BSA standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler protein tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı. Standartlar 3'er defa tekrarlı çalışıldı.

Deney protokolü

1. 1 hacim konsantre boya reaktifi, 4 hacim distile su ile seyreltildi.

2. 10'ar µL Standart çözeltiler ve histon proteinlerinden 96'lı mikroplaka kuyucuklarına uygun konfigürasyonda konuldu.

3. Her kuyucuğa seyreltilmiş boya reaktifinden 200 µL eklendi.

4. Oda sıcaklığında en az 5 dakika inkübe edildi. Zaman geçtikçe absorbans artacağından dolayı örnekler 1 saatten fazla oda ısısında bekletilmemelidir.

5. Mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm yapıldı.

Protein miktarının hesaplanması

Ölçülen her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine göre hesaplandı. Histon proteinleri ve nükleer ekstrelerde protein miktarı ng/µL olarak hesaplandı.

3.9.3. Histon Modifikasyonlarının Western Blot Tekniği ile Tayini

İzole edilen histon proteinlerinde histon H3K9me3, H3K9ac ve H3K27me3 tayinleri western blot tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

Deneyin esası

Jelde ayırımı yapılmış proteinlerin membrana emdirilerek ilgilenilen proteinin işaretlenmiş spesifik antikor yardımıyla membrane üzerinde yarı kantitatif ya da kantitatif olarak belirlenmesidir.

Çözeltilerin hazırlanışı

%0,1'lik Tuzlu ve Tween 20'li Tris tamponu (TBST) çözeltisinin hazırlanışı: 7,88 g Tris hidroklorür (son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde) tartıldı ve üzerine 800 mL deiyonize su eklendi ve pH:7,5 olacak şekilde 1 M NaOH ile ayarlandı. Üzerine 8,766 g NaCI (son konsantrasyonu 150 mM olacak şekilde) ve 1 mL Tween 20 (%0,1) eklendi ve 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

%5'lik BSA çözeltisinin hazılanışı: 5 g BSA 100 mL %0,1'lik TBST çözeltisinde hazırlandı.

%2,5'lik BSA çözeltisinin hazılanışı: 2,5 g BSA 100 mL %0,1'lik TBST çözeltisinde hazırlandı.

%1'lik BSA çözeltisinin hazılanışı: 1 g BSA 100 mL %0,1'lik TBST çözeltisinde hazırlandı.

Primer antikor çözeltilerinin hazırlanışı: Primer antikor 1:1000 oranında (Örn: 5 µL antikor üzerine 5 mL %2,5'lik BSA çözeltisi) %2,5'lik BSA çözeltisi ile seyreltildi.

Sekonder antikor çözeltilerinin hazırlanışı: Sekonder antikor 1:5000 oranında (Örn: 1 µL antikor üzerine 5 mL %2,5'lik BSA çözeltisi) %0,1'lik BSA çözeltisi ile seyreltildi.

Deney protokolü

1. Bölüm 3.9.1'de izole edilen histon proteinlerinin konsantrasyonu 2 µg olacak şekilde hesaplandı ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

2. Çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi.

3. Protein örneklerine 2 µL örnek indirgeyici ajan ve 5 µL LDS örnek tamponu ilave edildi ve son hacim 20 µL olacak şekilde deiyonize su eklendi

4. Protein örneklerine vorteks ve daha sonra spin yapıldı.

5. Örnekler blok ısıtıcıda 95°C'de 5 dk. denatüre edildi.

6. Örnekler buz üzerine konuldu ve spin yapıldı.

7. %12 Bis-tris jel dikey elektroforez tankına yerleştirildi. Tank MES SDS yükleme tamponu ile doldurulduu.

8. Birinci kuyucuğa 5 µL protein standartı ve diğer kuyucuklara da 20'şer µL protein karışımı yüklendi ve 165 volt, 300 miliamperde 35 dk. yürütüldü.

9. Jelde yürütülmüş proteinler nitroselüloz membran stacklarına kuru aktarım cihazında 7 dk. sürede aktarıldı.

10. Membran ponceau-S ile 20 dk süresince boyandı.

11. 1-2 damla 1 M NaOH ile fazla boya uzaklaştırıldı.

12. Bloklama için membran 50 mL falkon tüp içerisinde 5 mL %5'lik BSA çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda döndürülerek inkübe edildi ve %5'lik BSA çözeltisi atıldı.

13. 5 mL Primer antikor içeren çözelti, içerisinde membran bulunan falkon tüpe konuldu ve 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda cihazında döndürülerek inkübe edildi. Primer antikor içeren çözelti atıldı.

14. Membran art arda 2 kez 5 dk. ve 2 kez 10 dk. olmak üzere %0,1'lik TBST çözeltisi ile yıkandı.

15. 5 mL Sekonder antikor içeren çözelti, içerisinde membran bulunan falkon tüpe konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda cihazında döndürülerek inkübe edildi. Sekonder antikor içeren çözelti atıldı.

16. Membran art arda 2 kez 5 dk. ve 2 kez 10 dk. olmak üzere %0,1'lik TBST çözeltisi ile yıkandı.

17. Membranlar asetat kağıtları arasına koyularak western blot görüntüleme (luminol) çözeltisi eklendi, 5 dk. bekletildi ve görüntüleme cihazında 1 dk. ve 5 dk. sonrasında görüntüleme yapıldı.

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

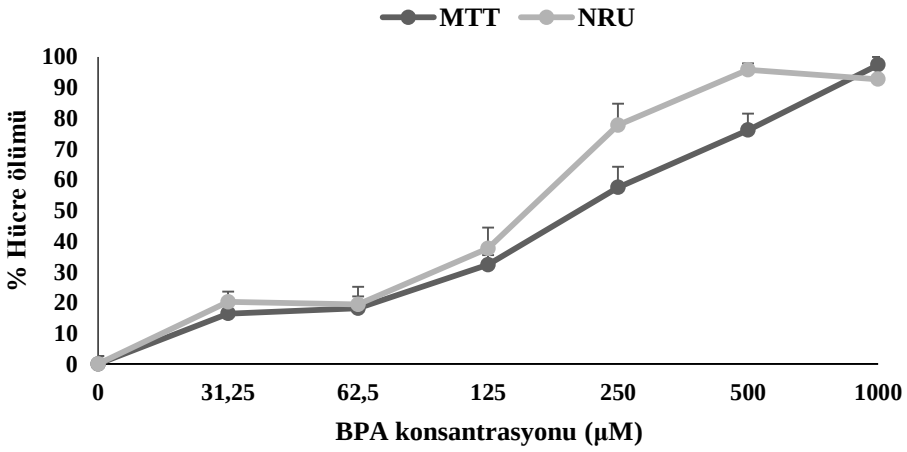
Veriler "ortalama ± standart sapma" olarak verildi. Verilerin istatistiksel olarak "SPSS 21.0 for Windows" paket programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm parametreler için öncelikle normalite testi ve varyansların homojenliği testi uygulandıktan sonra, normal dağılım gösteren veriler için 'Tek Yönlü Varyans' (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi) analizi ile çoklu karşılaştırma uygulandı. $p<0,001$ ve $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. BPA'nın SH-SY5Y ve PC-3 Hücrelerinde Sitotoksisite Üzerine Etkileri

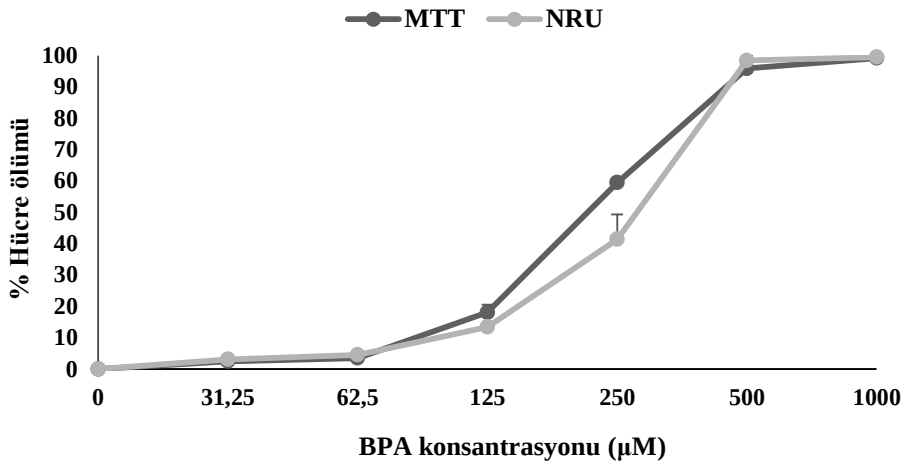
BPA'nın SH-SY5Y ve PC-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, hücre canlılığının kantitatif ölçümüne dayanan MTT ve NRU testleri ile yapıldı. MTT ve NRU testleri için hücreler BPA ile 6 farklı konsantrasyonda ve 3'er tekrarlı olacak şekilde maruz bırakıldı. Aynı zamanda, testler farklı bir günde ikinci kez tekrarlandı.

BPA maruziyeti sonrası konsantrasyona karşı MTT ve NRU testleri ile % hücre ölümü grafiği SH-SY5Y hücrelerinde Şekil 4.1'de ve PC-3 hücrelerinde ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir. BPA'nın 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarındaki maruziyetinin SH-SY5Y hücrelerinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 183 ve 129 µM (Şekil 3.1) ve PC-3 hücrelerinde ise MTT ve nötral kırmızısı testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 217 ve 190 µM (Şekil 3.2) olarak belirlendi.



Şekil 4-1: SH-SY5Y hücrelerine 0-1000 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonucu MTT ve NRU testi sonuçları.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4-2: PC-3 hücrelerine 0-1000 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonucu MTT ve NRU testi sonuçları.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.2. BPA'ya Maruz Bırakılmış SH-SY5Y ve PC-3 Hücrelerinden İzole Edilen DNA ve RNA'ların Miktarları ve Saflıkları

0-10 µM konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında SH-SY5Y ve PC-3 hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktarı ve saflığı 'Take-3 Plate' kullanılarak mikroplaka okuyucu spektrofotometrede de ölçüldü. 1. Gruba ait DNA ve RNA'ların miktarı ve saflığı Tablo 4-1 ve 4.2'de gösterilmiştir. İzole edilen DNA ve RNA'ların A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranlarında saflıklarının iyi olduğu görüldü ve DNA ve RNA örnekleri ileri analizler için kullanıldı.

Tablo 4-1: 0-10 μM Konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında SH-SY5Y hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları.

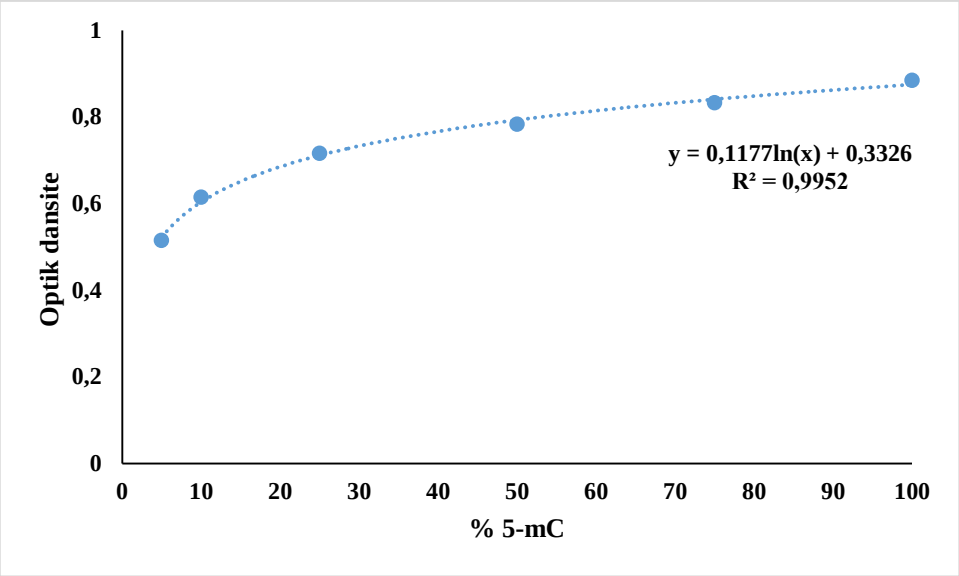
SH-SY5Y HÜCRELERİ						
		DNA Örnekleri			RNA Örnekleri	
Maruziyet konsantrasyonları		A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Miktarı (ng/μL)	A_{260}/A_{280}	Miktarı (ng/μL)
48 saat	0 μM	1,875	2,374	43,765	1,897	57,642
	0 μM	1,91	2,42	64,895	1,878	48,969
	0 μM	1,843	2,328	61,524	1,906	61,807
	100 μM	1,853	2,384	59,283	1,939	55,677
	100 μM	1,908	2,364	68,062	1,836	59,137
	100μM	1,878	2,414	74,767	1,925	51,086
	1 μM	1,905	2,409	75,143	1,867	56,7
	1μM	1,912	2,39	75,331	1,922	51,169
	1 μM	1,846	2,381	74,421	1,853	43,016
	10 μM	1,808	2,231	59,501	1,981	42,583
	10 μM	1,852	2,373	50,688	1,913	70,89
96 saat	0 μM	1,813	2,056	48,343	1,857	62,138
	0 μM	1,827	2,14	41,273	1,933	55,949
	0 μM	1,853	2,019	33,919	1,906	64,098
	100 μM	1,888	2,256	43,671	1,904	64,18
	100 μM	1,879	2,295	71,303	1,92	58,084
	100μM	1,876	2,365	62,039	1,953	67,634
	1 μM	1,905	2,42	59,003	1,889	61,628
	1μM	1,834	2,077	77,336	1,919	78,745
	1 μM	1,867	2,356	67,373	1,848	74,292
	10 μM	1,854	1,95	67,462	1,908	61,32
	10 μM	1,741	2,289	61,531	1,899	58,035

Tablo 4-2: 0-10 µM Konsantrasyonlarda BPA maruziyeti sonrasında PC-3 hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA'ların miktar ve saflıkları.

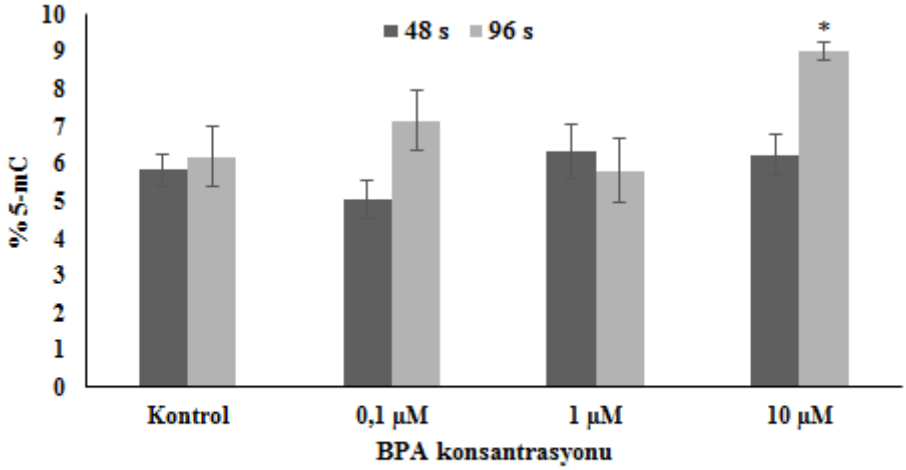
PC-3 HÜCRELERİ						
		DNA Örnekleri			RNA Örnekleri	
Maruziyet konsantrasyonları		A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Miktarı (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	Miktarı (ng/µL)
48 saat	0 µM	1,944	1,382	64,16	2,029	37,82
	0 µM	1,861	1,367	79,87	1,938	32,749
	0 µM	1,961	1,549	69,299	1,933	22,638
	100 µM	1,947	1,139	63,142	1,978	33,715
	100 µM	1,949	1,213	77,644	1,977	39,055
	100µM	1,941	1,769	59,71	1,985	37,187
	1 µM	1,953	1,725	73,733	2,014	41,668
	1µM	1,94	1,853	65,171	1,998	33,795
	1 µM	1,916	1,276	77,999	1,991	45,25
	10 µM	1,96	2,235	74,904	2,012	34,763
	10 µM	1,975	1,984	61,523	1,97	39,53
	10 µM	1,944	1,559	55,493	1,897	57,642
96 saat	0 µM	1,892	2,228	56,392	2,025	56,587
	0 µM	1,769	2,374	57,937	1,929	55,861
	0 µM	1,886	2,104	38,157	1,969	59,367
	100 µM	1,9	2,351	50,809	1,976	64,222
	100 µM	1,634	2,185	46,099	1,988	33,799
	100µM	1,791	2,285	41,093	1,992	74,829
	1 µM	1,845	2,191	31,048	1,883	53,975
	1µM	1,757	2,424	25,657	1,934	54,891
	1 µM	1,871	2,329	34,203	1,704	62,367
	10 µM	1,737	2,389	20,329	1,759	48,684
	10 µM	1,891	2,371	34,23	1,946	45,125
	10 µM	1,806	2,358	54,464	1,568	40,744

4.3. Global DNA Metilasyonu Sonuçları

Global 5-mC içeriğinin kantitatif tayini 5-mC Eliza kitleri ile gerçekleştirildi. Bölüm 3.7.3.1'de anlatıldığı şekilde %5-mC miktarı kit ile temin edilen standartlar ile hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplandı (Şekil 4.3). Şekil 4.4 ve 4.5'de 0; 0,1; 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulanan SHSY-5Y ve PC-3 hücrelerinde %5-mC seviyeleri gösterilmiştir. %5-mC seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 10 µM 96 saat BPA uygulanan SHSY-5Y hücrelerinde %45,42 ($p<0,05$) oranında artarken, PC-3 hücrelerinde ise %30,45 (<0,05) oranında azaldığı görülmüştür.

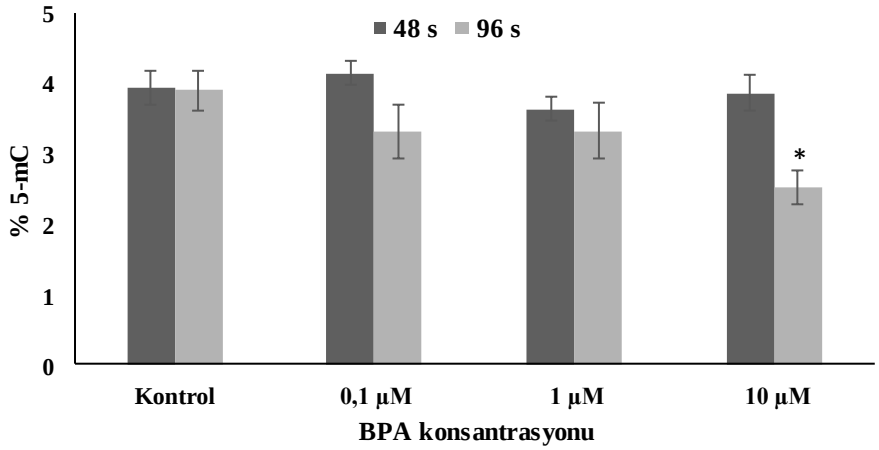


Şekil 4-3: 5-mC Standardına ait kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4-4: 0-10 µM konsantrasyon aralığında 48 ve 96 saat BPA ile maruz bırakılan SHSY-5Y hücrelerinde % 5-mC seviyeleri.

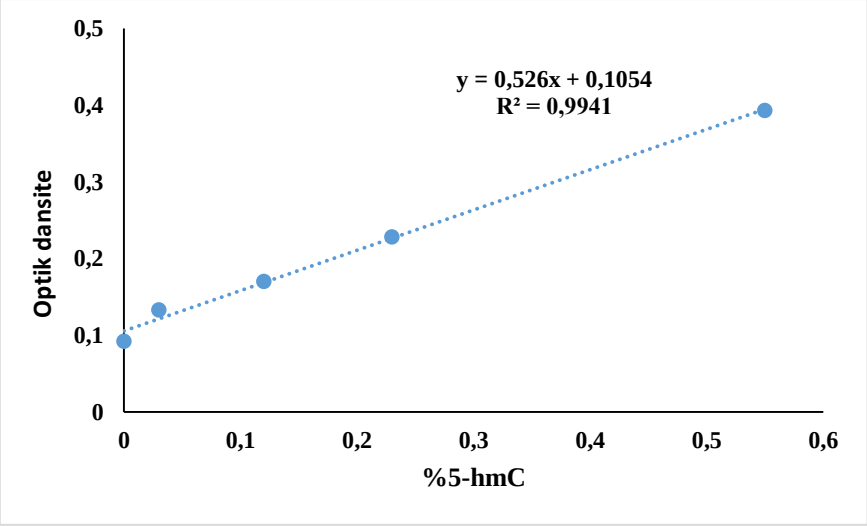
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).



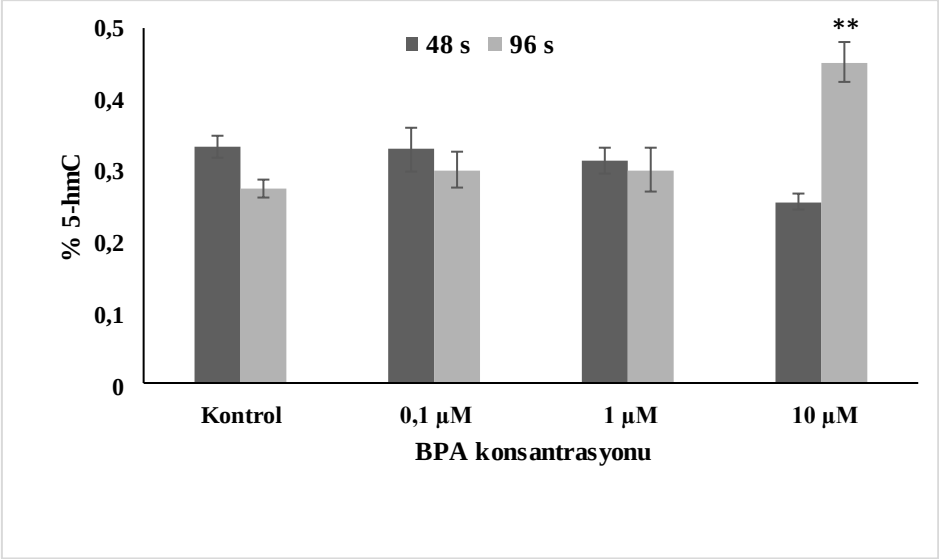
Şekil 4-5: 0-10 µM konsantrasyon aralığında 48 ve 96 saat BPA ile maruz bırakılan PC-3hücrelerinde % 5-mC seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,05 (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

Global 5-hmC içeriğinin kantitatif tayini 5-hmC Eliza kitleri ile gerçekleştirildi. Bölüm 3.7.3.2'de anlatıldığı şekilde %5-hmC miktarı kit ile temin edilen standartlar ile hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplandı (Şekil 4-6). Şekil 4.7 ve 4.8'de 0,1; 1; 10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulanan SHSY-5Y ve PC-3 hücrelerinde %5-hmC seviyeleri gösterilmiştir. 5-hmC seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 10 µM 96 saat BPA uygulanan SHSY-5Y hücrelerinde %64,78 (p<0,001) oranında, PC-3 hücrelerinde ise %90,55 (<0,001) oranında arttığı görülmüştür.

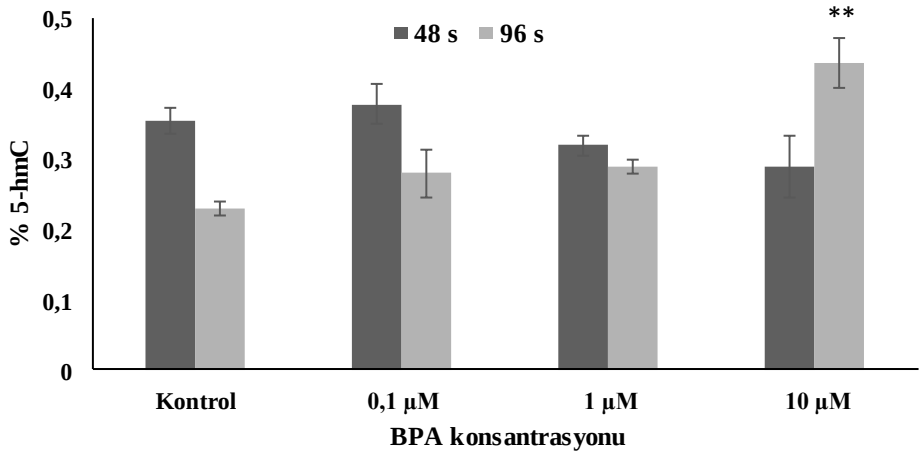


Şekil 4-6: 5-hmC Standardına ait kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4-7: 0-10 µM konsantrasyon aralığında 48 ve 96 saat BPA ile maruz bırakılan SHSY-5Y hücrelerinde % 5-hmC seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,001 (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

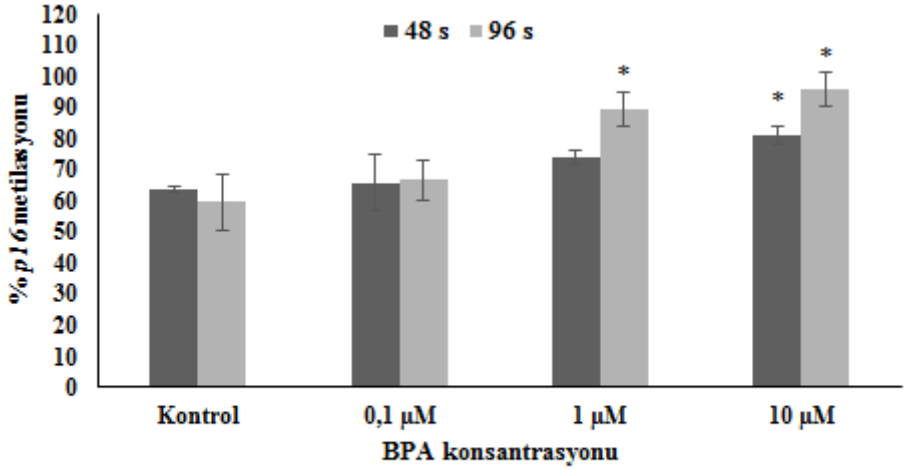


Şekil 4-8: 0-10 µM konsantrasyon aralığında 48 ve 96 saat BPA ile maruz bırakılan PC-3 hücrelerinde % 5-hmC seviyeleri.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,001 (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

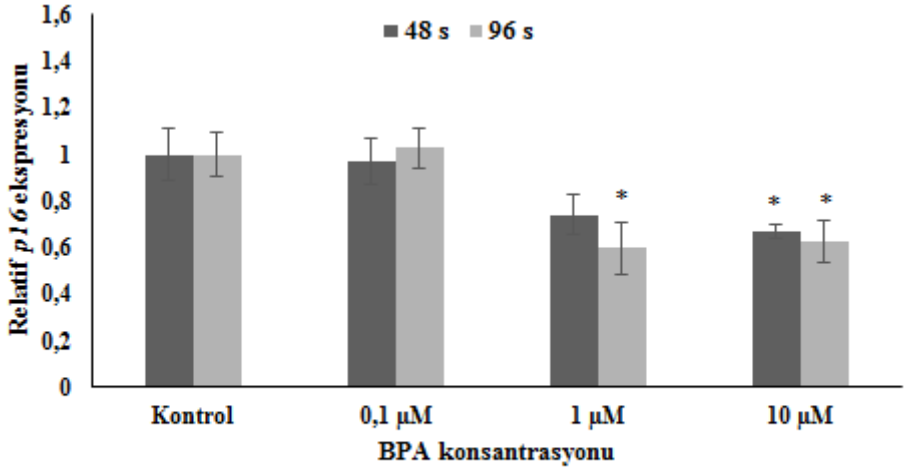
4.4. Gene özgü DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi Sonuçları

p16 Geni: 96 saat 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulanan PC-3 hücrelerinde *p16* geninin promotor bölgesinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %50,32 ($p<0,05$) ve %61,12 ($p<0,05$) oranında metilasyonda artış tespit edildi (Şekil 4-9). p16 Geninin ekspresyonunun ise 96 saat 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulanan PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %40,33 ($p<0,05$) ve %37,57 ($p<0,05$) oranında azaldığı görüldü (Şekil 4-10).



Şekil 4-9: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *p16* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi.

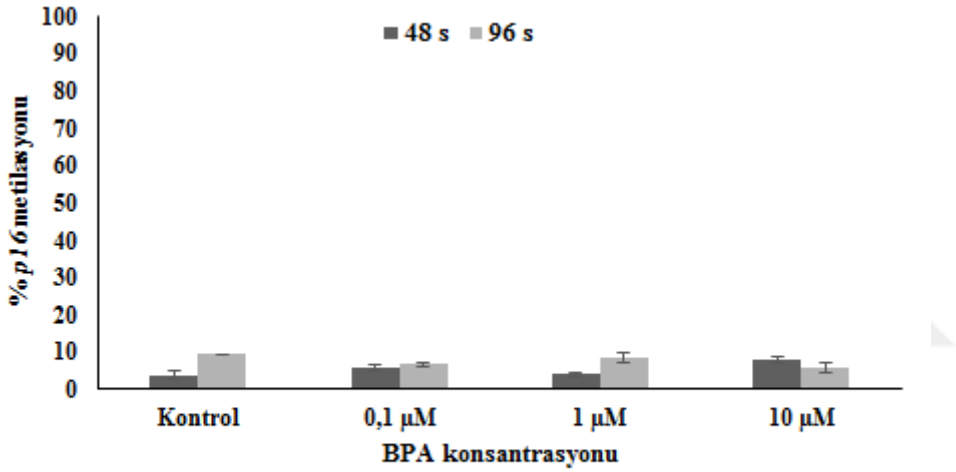
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).



Şekil 4-10: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *p16* geni relatif ekspresyonu üzerine etkisi.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.
* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,05 (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

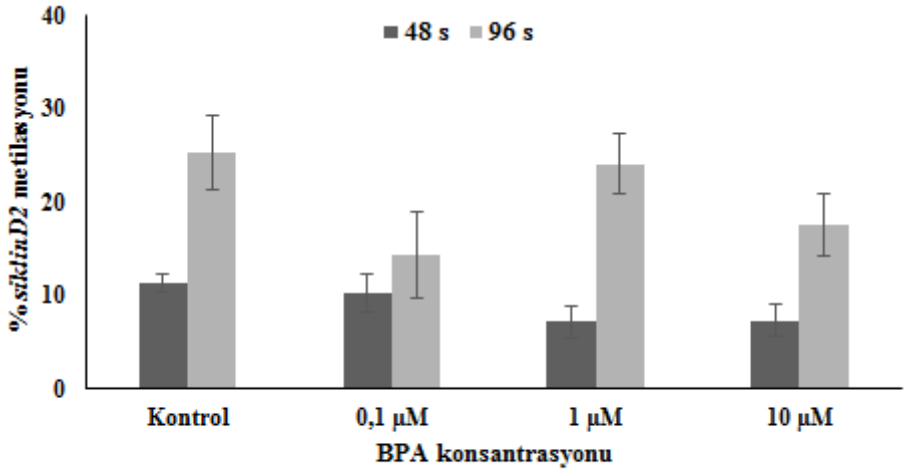
BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ise tüm maruziyet gruplarında *p16* geni promotor bölgesinde % metilasyon düzeyi çok düşük düzeylerde (%3,92-9,6) bulunmuş olup, metilasyonda bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4-11). BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde *p16* geni ekspresyonuunda ise tüm örnekler için referans genin (*β-aktin*) Ct değerleri 24,13-25,84 siklus arasında sonuç verirken, *p16* genine ait Ct değerleri elde edilememiştir. SH-SY5Y hücrelerinde *p16* geninin eskprese olmadığı sonucuna varılmaktadır.



Şekil 4-11: SH-SY5Y hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *p16* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi.

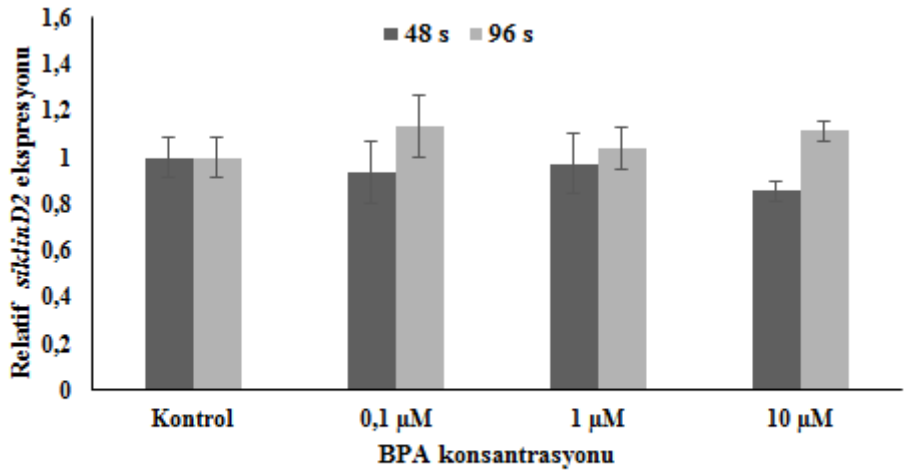
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

siklinD2 Geni: 96 saat BPA uygulanan PC-3 hücrelerinde *siklinD2* geninin promotor bölgesinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 4-12). *siklinD2* Geninin ekspresyonunun ise her iki maruziyet süresi ve 0,1-10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulamasının PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklik olmadığı gösterildi (Şekil 4-13).



Şekil 4-12: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *siklinD2* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

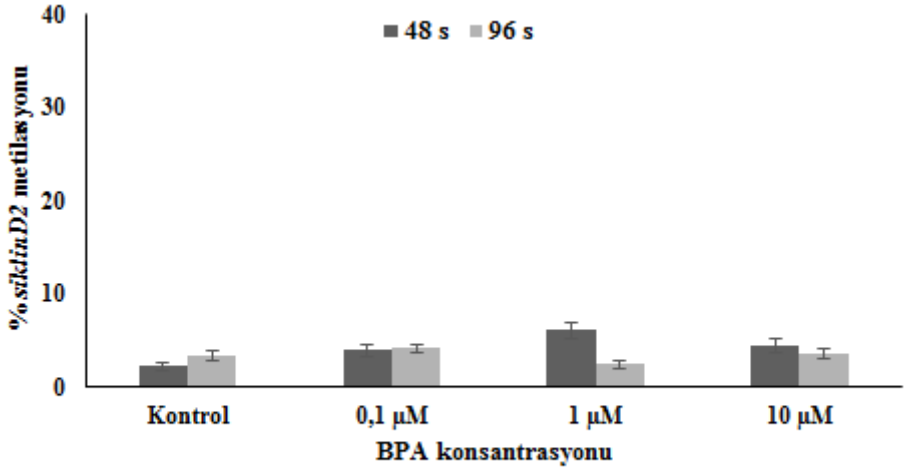


Şekil 4-13: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *siklinD2* geni relatif ekspresyonu üzerine etkisi.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ise tüm maruziyet gruplarında *siklinD2* geni promotor bölgesinde % metilasyon düzeyi çok düşük düzeylerde (%2,26-6,12) bulunmuş olup, metilasyonda bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4-14). BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde *siklinD2* geni ekspresyonuunda ise tüm örnekler için referans genin (β-aktin) Ct değerleri 23,75-27,71 siklus arasında sonuç verirken,

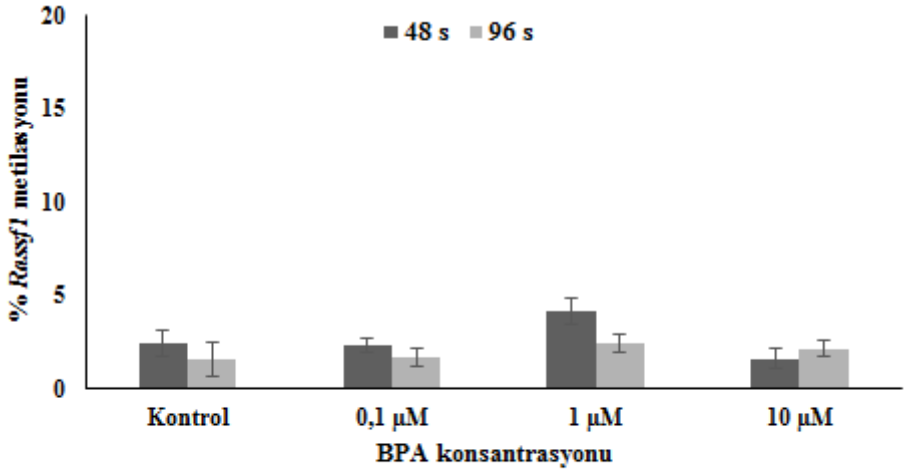
siklinD2 genine ait Ct değerleri elde edilememiştir. SH-SY5Y hücrelerinde *siklinD2* geninin eskprese olmadığı sonucuna varılmaktadır.



Şekil 4-14: SH-SY5Y hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *siklinD2* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi.

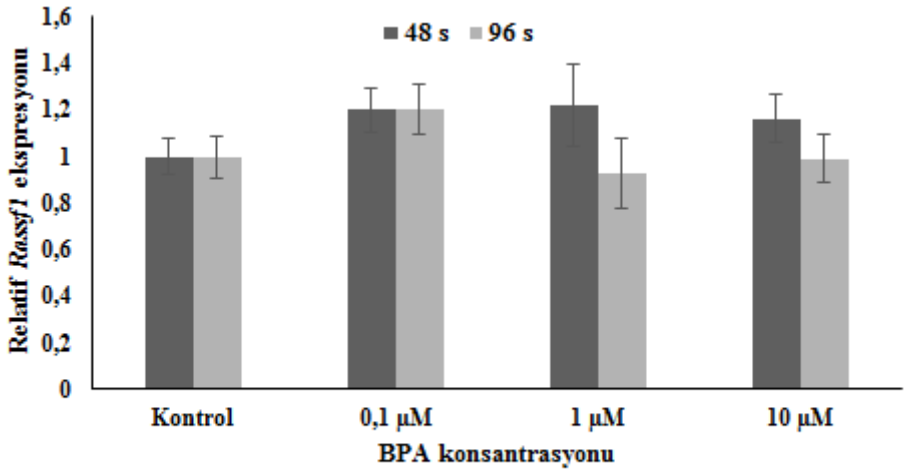
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Rassf1 geni: 96 saat BPA uygulanan PC-3 hücrelerinde *Rassf1* geninin promotor bölgesinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiş olup, bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 4-15). *Rassf1* Geninin ekspresyonunun ise her iki maruziyet süresi ve 0,1-10 µM konsantrasyonlarda BPA uygulamasının PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklik olmadığı gösterildi (Şekil 4-16).



Şekil 4-15: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *Rassf1* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

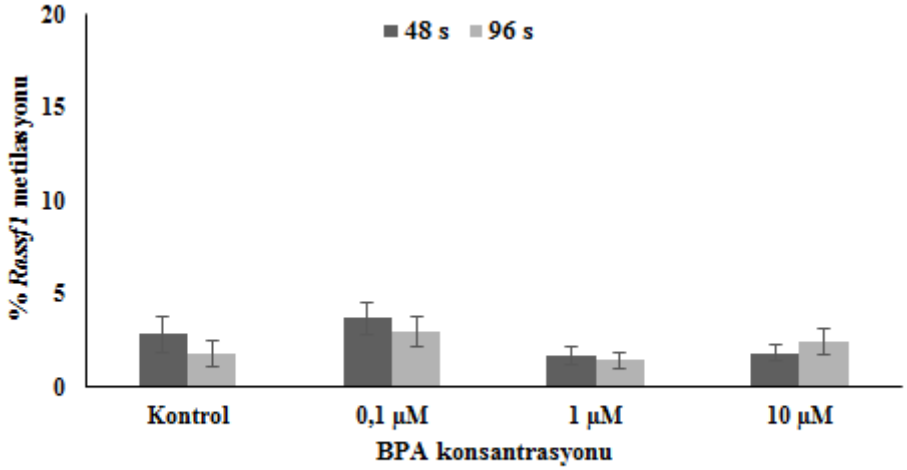


Şekil 4-16: PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *Rassf1* geni relatif ekspresyonu üzerine etkisi.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde ise tüm maruziyet gruplarında *Rassf1* geni promotor bölgesinde % metilasyon düzeyi çok düşük düzeylerde (%1,48-3,03) bulunmuş olup, metilasyonda bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4-17). BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde *Rassf1* geni ekspresyonuunda ise tüm örnekler için referans genin (*β-aktin*) Ct değerleri 23,32-24,79 siklus arasında sonuç verirken, *Rassf1*

genine ait Ct değerleri elde edilememiştir. SH-SY5Y hücrelerinde *Rassf1* geninin eskprese olmadığı sonucuna varılmaktadır.



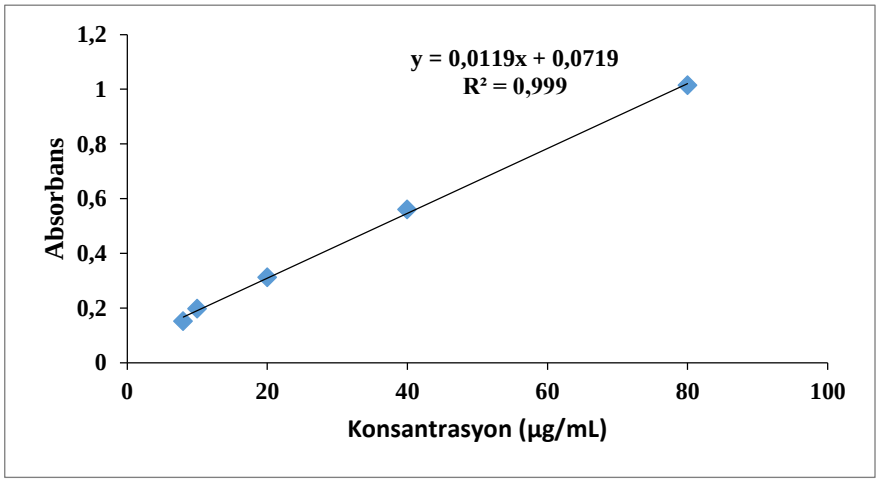
Şekil 4-17: SH-SY5Y hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin *Rassf1* geni promoter bölgesinde % metilasyona etkisi.

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5. Global Histon Modifikasyonları Sonuçları

4.5.1. Protein Tayini

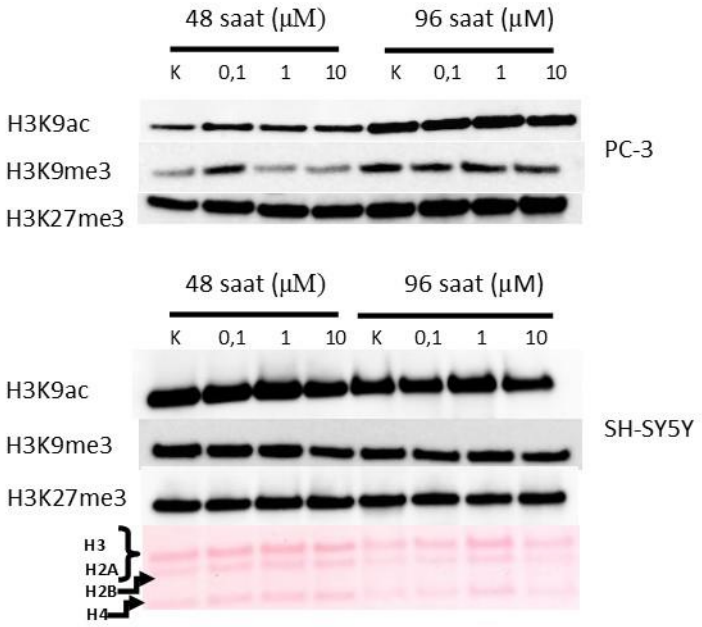
Histon proteinlerindeki protein miktarı standart olarak BSA kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi üzerinden hesaplandı. Bölüm 3.9.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan konsantrasyonları, 8, 10, 20, 40, 80 µg/mL olan BSA standart çözeltileri ile çizilen standart ölçü eğrisi Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4-18: Protein standart ölçü eğrisi.

4.5.2. BPA'nın Histon Modifikasyonları Üzerine Etkileri

0,1; 1; 10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat süre ile BPA'ya maruz bırakılmış SHSY-5Y ve PC-3 hücrelerinden izole edilen histon proteinlerinde global H3K9me3, H3K9ac ve H3K27me3 modifikasyonları western blot yöntemi kullanılarak araştırıldı. BPA maruziyetinin SHSY-5Y ve PC-3 hücrelerinde tüm maruziyet gruplarında H3K9me3, H3K9ac ve H3K27me3 modifikasyonlarında kontrole kıyasla anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı gösterildi (Şekil 4.19, Tablo 4-3).



Şekil 4-19: SH-SY5Y ve PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin histon H3K9me3, H3K27me3 ve H3K9ac western blot görüntüleri.

Tablo 4-3: SH-SY5Y ve PC-3 hücrelerinde 0-10 µM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat BPA maruziyetinin relatif histon H3K9me3, H3K27me3 ve H3K9ac seviyeleri (kontrolün %'si) üzerine etkisi.

BPA Maruziyetleri		PC-3			SH-SY5Y		
		H3K9ac	H3K9me3	H3K27me3	H3K9ac	H3K9me3	H3K27me3
48 saat	Kontrol	1±0,05	1±0,9	1±0,13	1±0,8	1±0,12	1±0,11
	0,1 µM	0,802±0,17	1,037±0,08	0,814±0,16	0,597±0,1	0,800±0,15	0,661±0,12
	1 µM	0,736±0,12	0,748±0,25	0,811±0,12	0,741±0,12	0,777±0,18	0,697±0,14
	10 µM	0,793±0,24	0,973±0,25	0,887±0,17	0,681±0,11	0,679±0,12	0,757±0,12
96 saat	Kontrol	1±0,078	1±0,088	1±0,067	1±0,045	1±0,069	1±0,077
	0,1 µM	0,800±0,13	0,994±0,02	0,818±0,21	0,756±0,16	0,531±0,06	0,697±0,09
	1 µM	0,747±0,05	1,052±0,21	0,779±0,27	0,807±0,12	0,708±0,17	0,699±0,16
	10 µM	0,714±0,18	0,985±0,16	0,790±0,13	0,715±0,04	0,649±0,08	0,656±0,12

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Epigenetik mekanizmalar, DNA ve histonlar arasındaki ilişkiyi düzenleyerek genin transkripsiyonel olarak aktif veya inaktif olmalarını sağlarlar. Bu mekanizmaların herhangi birinde oluşan modifikasyon, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına sebep olarak epigenetik hasarlara neden olmaktadır. Değişimler, nesilden nesile DNA'daki diziyle değil, mitoz veya mayoz bölünme yoluyla aktarılır. Kromatin yapısında meydana gelen başlıca epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıdır

Organizmaya dışarıdan alınarak endokrin fonksiyonları ve dengeyi bozan, doğal ya da sentetik maddeler endokrin bozucu kimyasallar olarak adlandırılır. EDC'ler hormon yapımını, taşınmasını, yıkımını ve atılımını değiştirebildikleri gibi hedef hücrelerdeki etkilerini de değiştirmektedirler (Choi ve Jeung, 2003). Çok düşük konsantrasyonlarda bile etki gösteren EDC'lerin etkileri geri dönüşümsüz olabilir ve organizmanın gelişme aşamasında meydana gelen bu etkiler ömür boyu da gözlenmektedir. Bilindiği üzere, endokrin sistem bozukluğu dünyada özellikle kadınlarda ve çocuklarda oldukça önemli bir sağlık sorunu olarak değerlendirilmektedir (Solomon ve Schettler, 2000; Borget ve ark., 2003; Daston ve ark., 2003). EDC'ler yapısal olarak östrojen ya da androjene benzerler ve östrojen ya da androjen reseptörlerine bağlanarak endojen steroid hormonların aktivitelerini interfere ederler (Borget ve ark., 2003; Daston ve ark., 2003; Hwang ve ark., 2011). Son yıllarda yapılan araştırmalarda, endokrin etkiler gösteren çevresel kimyasalların gen ifadesindeki değişiklikler üzerindeki rolünün epigenetik mekanizmalar ile ilişkili olabileceği alternatif bir yol olarak gösterilmektedir (Fleisch ve ark., 2012; Greally ve Jacobs, 2013).

EDC'lerden biri olan BPA endüstride polikarbonat plastik ve epoksi reçinesinin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. BPA'nın yüksek üretim hacmi, plastiklerin yaygın kullanımı ve sağlık açısından yan etkileri nedeniyle bilimsel çevreler, düzenleyici otoriteler ve halkın dikkatini çekmektedir. Son yıllarda BPA'nın diyabet, obezite, üreme bozuklukları, kardiyovasküler bozukluklar, doğum anomalileri, kronik solunum ve böbrek bozuklukları ve meme kanseri gibi birçok kronik hastalığın etiyolojisinde rolünün olabileceği üzerinde durulmaktadır. BPA maruziyeti ve kronik hastalıklar ile

ilişkisinde rol oynayan mekanizmaların oksidatif stress, mitokondriyal bozukluklar hücre sinyal yolaklarını kapsayan genetik, epigenetik ve endokrin bozucu mekanizmalar ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Rezg ve ark., 2014).

BPA'nın toksisitesinin değerlendirilmesinde birçok çalışma yapılmakta olup, çeşitli sistemler üzerinde toksik etkilerinde epigenetik mekanizmaların da rolünün olabileceği son yıllarda yapılan araştırmalarda önemle vurgulanmaktadır (Kundakovic ve Champagne, 2011: Rezg ve ark., 2014). Tez çalışmasında; BPA'nın epigenetik değişiklikler üzerine etkisini araştırmak amacıyla, farklı hücre kültürlerinde (insan prostat kanseri ve nöroblastoma hücreleri) BPA'nın doza bağlı olarak gelişen toksisitesinde, DNA metilasyonu, gen ifadesi ve histon modifikasyonları üzerine değişiklikler araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, BPA'nin belirli konsantrasyonlarda hücrelere maruziyeti sonucu; 1) sitotoksisitesi; 2) global DNA metilasyonu ve 5-hidroksimetilsitozin tayini; 3) bazı tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin promotor bölgelerindeki CpG adalarındaki gene-özgü DNA metilasyonu ve gen ifadeleri ve 4) histon modifikasyonları araştırıldı.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlarda % 5-mC seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 10 µM 96 saat BPA uygulanan SHSY-5Y hücrelerinde %45,42 ($p<0,05$) oranında artarken, PC-3 hücrelerinde ise %30,45 (<0,05) oranında azaldığı gösterildi. % 5-Hidroksimetilsitozin (% 5-hmC) seviyelerinin ise kontrol grubuna kıyasla 10 µM 96 saat BPA uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde %64,78 ($p<0,001$) oranında, PC-3 hücrelerinde ise %90,55 (<0,001) oranında artttığı gözlendi. Bombail ve ark. tarafından sıçan dokularında %5-mC seviyeleri %2-5 olarak gösterilmiştir (Bombail ve ark., 2004). Tez çalışmasında da PC-3 ve SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubunda % 5-mC seviyeleri % 4-5 olarak bulunmuş olup, bunun önceki çalışmalar ile uyumluluk gösterdiği görülmektedir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlarda BPA'nın global düzeyde DNA metilasyonunu değiştirmesi, genomik yapıda kararsızlığa sebep olabileceği ve hatta karsinojenik etkiye zemin hazırlayabileceğini düşündürmektedir.

Daha sonra tez çalışmasında, DNA metilasyonunun tümör baskılayıcı genler ile onkogenlerin anlatımları üzerinde etkili olabileceği düşünülmüş ve bu etkilerin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, çeşitli kanserlerde DNA metilasyonu ile ilişkili olan genlerin promotor bölgelerindeki CpG adalarında metilasyon tayini gerçekleştirildi. Hücre siklusu regülasyonunda önemli rolleri olan tümör baskılayıcı

genlerden *p16, siklinD2* ve onkogenlerden *Rassf1* genleri DNA metilasyonu analizi için seçilmiştir. Metilasyon çalışmaları Zymo Research tarafından temin edilen gene-özgü metilasyon 'array'ler kullanılarak gerçekleştirildi.

1 ve 10 μM konsantrasyonlarda 96 saat BPA uygulanan PC-3 hücrelerinde *p16* geninin promotor bölgesinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %50,32 ($p<0,05$) ve %61,12 ($p<0,05$) oranında metilasyonda artış tespit edildi. Ayrıca, *p16* Geninin ekspresyonunun ise 1 ve 10 μM konsantrasyonlarda 96 saat BPA uygulanan PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %40,33 ($p<0,05$) ve %37,57 ($p<0,05$) oranında azaldığı görüldü. Bu sonuçlardan BPA'nın prostat kanseri hücre kültürlerinde hücre siklusunda önemli bir işlevi olan *p16* geninin ekspresyonunu etkilediği ve bunun da promoter bölge DNA metilasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. PC-3 hücrelerinde *siklinD2* ve *Rassf1* genlerinin ise promotor bölgelerinde metilasyonda ve gen ekspresyonunda ise anlamlı olmayan değişiklikler gözlendi. Bununla birlikte SHSY-5Y hücrelerinde ise tüm çalışma gruplarında metilasyonda değişiklik olmadığı gözlendi. Ayrıca, *p16, siklinD2* ve *Rassf1* genlerinin ise hem kontrol gruplarında hem de BPA uygulanmış SHSY-5Y hücrelerinde eksprese olmadığı gösterildi.

24 saat BPA maruziyetini takiben yenidoğan sıçan testislerinde östrojen reseptörlerinin promotor bölgelerinde hipermetilasyonda artış tespit edilmiş, spermatojenez ve fertilite üzerine advers etkilere sebep olabileceği bildirilmiştir (Doshi ve ark., 2011). Weng ve ark. (2010) yaptığı bir çalışmada primer epitel meme hücrelerinde düşük doz BPA maruziyetinin lizozom ilişkili membran protein ('lysosomal associated membrane protein', *LAMP3*) geninin CpG adalarında DNA metilasyonunda artışa sebep olduğu ve beraberinde *LAMP3* geninin ifadesini baskıladığı ve bu durumun meme kanseri riskini arttırabildiği gösterilmiştir. Ayrıca BPA'nın dişi farelerdeki epigenetik etkilerinin kuşaklararası sürebileceği belirtilmiştir (Singh ve ark., 2012). Düşük dozlarda BPA'nın rahim içine ve yenidoğan maruziyeti sonucu bazı genlerin promotör bölge CpG adalarında DNA hipermetilasyonu ve hipometilasyonuna, histon modifikasyonlarına ve miRNA'ları içeren kodlanmayan RNA'ların ifadesinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Bu epigenetik değişikliklerin gen ifadelerini yaşam boyu değiştirebileceği ve bunun da bir takım sağlık problemlerini beraberinde getirebileceği gösterilmektedir. Gebe dişi farelerin BPA'ya geçici maruziyetinin 3. kuşak jenerasyonda DNA metilasyonunda değişikliklere sebep olabileceği

gösterilmiştir. (Singh ve Li, 2012). Yenidoğan sıçanların BPA'ya maruziyetinin prostat neoplazinin sıklığında artışa ve prostat dokularında metilasyon değişikliklerine (örn: phosphodiesterase type 4 variant 4, *Pde4d4* geninde hipometilasyon ve gen ifadesinde artış) sebep olduğu gösterilmiştir (Conti ve ark., 2003; Ho ve ark., 2006; Prins ve ark., 2008). Ayrıca, yenidoğan sıçanların BPA'ya maruziyetinin(10 μg/kg vücut ağırlığı) nukleozom binding protein-1 (*Nsbp1*) ve hippocalcin-like 1 (*Hpcal1*) genlerinin metilasyonunda ve ifadesinde değişikliklere sebep olduğu bildirilmiştir (Tang ve ark., 2011). Bu çalışma ile yaşamın erken evrelerindeki BPA maruziyetin düzenleyici genlerin ekspresyon ve metilasyon durumlarını değiştirdiği görülmüştür (Tang ve ark., 2011). BPA'ya maruz kalmış insan meme kanseri MCF7 hücrelerinin ve rahim içi BPA'ya maruziyet sonucu 6 haftalık farelerin meme bezlerinde histon metiltransferaz *EZH2* ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda bu enzimin katalize etttiği gen ifadesi ile ilişkili olan histon modifikasyonu H3K27 metilasyonunda da BPA'nın artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Doherty ve ark., 2010).

İnsan meme epitel hücrelerinde 1 hafta süre ile BPA maruziyetinin (10, 100 nM) tümör ile ilişkili genlerde (*BRCA1, CCNA1, p16, THBS1, TNFRSF10C ve TNFRSF10D*) metilasyonu arttırdığı gösterilmiş olup, BPA'nın genetik ve epigenetik değişikliklere sebep olarak meme epitel hücre fonksiyonlarına zarar verdiği ve bunun hücre çoğalması ve yaşlanma ile ilişkili ve memelerde karsinojeneze sebep olabileceği bildirilmiştir (Qin ve ark. 2012). İnsan meme epitel hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada ise; DNA onarım genlerinin (*BRCA1, BRCA2, BARD1, CtIP, RAD51, ve BRCC3*) ifadelerinin arttığı ve apoptoz ile ilişkili *PDCD5* ve *BCL2L11* genlerinin ise ifadelerinin azaldığı gösterilmiştir (Fernandez ve ark., 2012). Metillenmiş-immünopresipitasyon ve array tekniği kullanılarak yürütülen metilasyon analizlerinde bazı genlerde metilasyonda değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (Fernandez ve ark., 2012). Insan meme kanseri hücrelerinde ve sıçan meme bezlerinde gen ifadesinde anahtar bir molekül olan kodlanmayan RNA *HOTAIR* ifadesinin BPA ile indüklendiği gösterilmiş olup, aynı zamanda kromatin (histon metilasyonu ve asetilasyonu) modifikasyonuna sebep olarak gen aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Bhan ve ark., 2014). Dhimolea ve ark. (2014) da sıçanlarda gebelikte BPA'ya maruziyetin meme bezlerinde genom düzeyinde epigenetik değişikliklere sebep olduğunu göstermiştir.

Yeo ve arkadaşlarının 2012 yılında kemirgen kortikal nöronları üzerine yaptıkları çalışmada, potasyum-klor taşıyıcı Kcc2 ekspresyonunda artış ve H3K9 asetilasyonunda azalma gözlenmiş, bunların santral sinir sistemini baskıladığı, nöronal klorür ekstrüzyonunu etkilelediği, seksüel dimorfizme sebep olabileceği belirtilmiştir (Yeo ve ark., 2012).

Sales ve arkadaşlarının 2003'te yaptıkları çalışmada; 10 μM BPA'ya maruz bırakılmış fare N2A nöroblastoma hücrelerinde global DNA metilasyonunda azalma gözlenirken, insan SK-N-AS nöroblastoma ve fare preadiposit fibroblast (3T3-L1) hücrelerinde ise global DNA metilasyonunda değişim gözlenmemiştir (Sales ve ark., 2003). Meydana gelen global DNA metilasyonun farelerde adiposit farklılaşmasında meydana gelen fonksiyonel değişiklikleri arttırdığı ispat edilmiştir.

Qin ve arkadaşlarının 2014'te yaptıkları çalışmada erkek yetişkin fareler 90 gün boyunca BPA'ya maruz bırakıldıktan sonra hipokampüs dokuları western blot tekniği kullanılarak incelenmiş ve uzun süreli BPA maruziyetinin ERK 1 ve 2 sinyal yolağında histon asetilasyonu ve histon fosforilasyonunda artışa sebep olduğu bildirilmiştir. Bundan dolayı BPA'nın insanlarda korkularla ilgili olan belleği tetikleyebileceği ve psikolojik hastalıklara sebep olabileceği düşünülmüştür (Qin ve ark., 2014).

Yaoi ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları genom çapındaki çalışmada 20 μg/kg vücut ağırlığı BPA'ya maruz bırakılmış fetal fare önbeyninden elde edilen dokularda CpG adalarında lokalize 2500 NotI locisinde lokus spesifik hipometilasyon ve hipermetilasyon oluşumu ve endomembran sistemde protein-transport-ilişkili proteinler Spot12B6 (Vps52) ve Spot12B9'de anormal ekspresyon gözlenmiştir. Bu değişikliklerin gen sessizleşmesi, kromatinin yeniden biçimlenmesi ve beyin gelişiminde etkili olabileceği, nöron farklılaşması ve migrasyonu hızlandırabileği düşünülmektedir (Yaoi ve ark., 2008).

Wong ve arkadaşlarının 2015'te yaptığı bir çalışmada, neonatal BPA'ya maruz kalmış yetişkin Spraque-Dawley sıçanlarının prostat dokularında Scgb2a1 (sekretoglobin 2A[1]) geninin ekspresyonunda artış, CpG dinükleotidlerinde

[1] Prostat tarafından salgılanan başlıca androjen bağlama protein

hipometilasyon ve histon H3K9 asetilasyonunda ise artış gözlenmiştir (Wong ve ark., 2015).

BPA'nın DNA metilasyonu üzerine birçok çalışmanın yapıldığı görülmekte olup, BPA'nın histon modifikasyonları üzerine etkileri konusunda çalışmalar kısıtlı kalmıştır. Dolayısıyla, tez çalışmasında ayrıca BPA'nın global histon modifikasyonları üzerine etkileri araştırılmıştır. Histon modifikasyonlarının kromatin konformasyonunu ve düzenleyici proteinlerin DNA dizisine erişimini modüle ederek, gen ekspresyonunu regüle ettiği bilinmektedir. Dolayısıyla tez çalışmasında gen regülasyonunda önemli rol oynayan H3K9me3, H3K27me3 ve H3K9ac modifikasyonları çalışıldı. 0,1; 1; 10 μM konsantrasyonlarda 48 ve 96 saat süre ile BPA'ya maruz bırakılmış SHSY-5Y ve PC-3 hücrelerinde tüm maruziyet gruplarında global düzeyde H3K9me3, H3K9ac ve H3K27me3 modifikasyonlarında kontrole kıyasla anlamlı bir değişikliğe sebep gösterildi. BPA'ya maruz kalmış insan meme kanseri MCF7 hücrelerinde ve *in utero* BPA'ya maruziyet sonucu 6 haftalık farelerin meme bezlerinde histon metiltransferaz *EZH2* ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda bu enzimin katalize etttiği gen ifadesi ile ilişkili olan histon modifikasyonu H3K27 metilasyonunda da BPA'nın artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Bhan ve ark. 2014; Doherty ve ark., 2010). Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar histon modifikasyonlarının global düzeyde tayini olup, BPA'nın epigenetik değişikliklere sebep olduğu genlerde histon modifikasyonlarındaki değişikliklerin tayininin gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Tez çalışmasından elde edilen bulgular doğrultusunda, BPA'nın nöroblastoma ve prostat kanser hücrelerinde global düzeyde DNA metilasyonunu değiştirdiği ve bununla birlikte bazı genlerin regülasyonunu etkileyebileceği gözlenmektedir. Dolayısıyla, bu bulgular doğrultusunda BPA'nın kromatin modifiye eden genler üzerine, genom-çapında DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları üzerine etkileri konularında çalışmaların yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, risk değerlendirme sürecinde endokrin bozucu kimyasalların toksisitesinde ortaya çıkan anahtar moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Abdel-Maksoud, F.M., Leasor, K.R., Butzen, K., Braden, T.D., & Akingbemi, B.T. (2015). Prenatal Exposures of Male Rats to the Environmental Chemicals Bisphenol A and Di (2-Ethylhexyl) Phthalate Impact the Sexual Differentiation Process. *Endocrinology*, ***156***(12), 4672-4683.

Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., & Hardy, M.P. (2004). Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*, ***145***(2), 592-603.

Allard, P., & Colaiácovo, M. P. (2010). Bisphenol A impairs the double-strand break repair machinery in the germline and causes chromosome abnormalities.*Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(47), 20405-20410.

Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., & Boyd, M.R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, ***48***(3), 589-601.

Alonso-Magdalena, P., Laribi, O., Ropero, A.B., Fuentes, E., Ripoll, C., Soria, B., & Nadal, A. (2005). Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca2+ signals in pancreatic α-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environmental Health Perspectives*, 969-977.

Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic β-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*, 106-112.

Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., & Nadal, A. (2011). Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, ***7***(6), 346-353.

Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., & Nadal, A. (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental Health Perspectives*, ***118***(9), 1243-1250.

Anjum S., Rahman, S., Kaur, M., Ahmad, F., Rashid, H., Ansari, R.A. (2011). Melatonin ameliorates bisphenol A-induced biochemical toxicity in testicular mitochondria of mouse. *Food Chem Toxicol*., ***49***:2849–2854.

ANSES (Agence Nationale de Sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environement et du travail), (2011). Effets sanitaires du bisphénol A and Connaissances relatives aux usages du bisphénol A. 383 pp.

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

Authority, E.F.S. (2015). Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, ***13***(1).

Avissar-Whiting, M., Veiga, K.R., Uhl, K.M., Maccani, M.A., Gagne, L.A., Moen, E.L., & Marsit, C.J. (2010). Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reproductive Toxicology*, ***29***(4), 401-406.

Baguet, A., Bix, M. (2004). Chromatin landscape dynamics of the Il4-Il13locus during T helper 1 and 2 development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, ***101***, 11410–11415.

Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature*, ***447***, 407–412.

Bhan, A., Hussain, I., Ansari, K.I., Bobzean, S.A., Perrotti, L.I., & Mandal, S.S. (2014). Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR in vitro and in vivo. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, ***141***, 160-170.

Bhan, A., Hussain, I., Ansari, K.I., Bobzean, S.A., Perrotti, L.I., & Mandal, S.S. (2014). Histone methyltransferase EZH2 is transcriptionally induced by estradiol as well as estrogenic endocrine disruptors bisphenol-A and diethylstilbestrol. *Journal of Molecular Biology*, ***426***(20), 3426-3441.

Bhandari, R., Xiao, J., & Shankar, A. (2013). Urinary bisphenol A and obesity in US children. *American Journal of Epidemiology*, ***177***(11), 1263-1270.

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

Bindhumol, V., Chitra, K.C., & Mathur, P.P. (2003). Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*, ***188***(2), 117-124.

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

Bombail, V., Moggs, J.G., Orphanides, G. (2004). Perturbation of epigenetic status by toxicants. *Toxicology Letters*, ***149***(1-3), 51-59.

Bonefeld-Jorgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M.V., & Vinggaard, A.M. (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environmental Health Perspectives*, ***115***, 69.

Bontempo, P., Mita, L., Doto, A., Miceli, M., Nebbioso, A., Lepore, I., Franci, G., Menafra, R., Carafa, V., Conte, M., De Bellis, F., Manzo, F., Di Cerbo, V., Benedetti, R., D'Amato, L., Marino, M., Bolli, A., Del Pozzo, G., Diano, N., Portaccio, M., Mita, G.D., Vietri, M.T., Cioffi, M., Nola, E., Dell'Aversana, C., Sica, V., Molinari, A.M., & Altucci, L. (2009). Molecular analysis of the apoptotic effects of BPA in acute myeloid leukemia cells. *Journal of Translational Medicine*, ***7***(1), 48.

Borgert, C.J., LaKind, J.S., Witorsch, R.J. (2003). A critical review of methods for comparing estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula. *Environmental Health Perspectives*, ***111***(8), 1020-1036.

Bromer, J.G., Zhou, Y., Taylor, M.B., Doherty, L., & Taylor, H.S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *The FASEB Journal*, ***24***(7), 2273-2280.

Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Pedraza, V., Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatingsin food cans. *Environmental Health Perspectives*, ***103***, 608-612.

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

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

Buterin, T., Koch, C., & Naegeli, H. (2006). Convergent transcriptional profiles induced by endogenous estrogen and distinct xenoestrogens in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, ***27***(8), 1567-1578.

Butt, C.M., & Stapleton, H.M. (2013). Inhibition of thyroid hormone sulfotransferase activity by brominated flame retardants and halogenated phenolics. *Chemical Research in Toxicology*, ***26***(11), 1692-1702.

Carlisle, J., Chan, D., Golub, M., Henkel, S., Painter, P., Lily W.K. (2009). Toxicological Profile for Bisphenol A. September 2009. *Office of Environmental Health Hazard Assessment Ocean Protection Council under an Interagency Agreement*, Number 07-055.

Cell and Tissue Culture (1975) John Paul, 5th edition, Churchill Livingstone, Edinburgh.

Chen, M., Zhou, K., Chen, X., Qiao, S., Hu, Y., Xu, B., Han, X., Tang, R., Mao, z., Dong, C., Wu, Y.W., Wang, S., Zhou, Z., Xia, Y., & Wang, X. (2014). Metabolomic analysis reveals metabolic changes caused by bisphenol A in rats. *Toxicological Sciences*, kfu016.

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

Cheung, H.H., Lee, T.L., Davis, A.J., Taft, D.H., Rennert, O.M. ve Chan, W.Y. (2010). Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated genes and non-coding RNAs in human testicular cancer. *British Journal of Cancer*, ***102***(2), 419-427.

Choi, K.C., Jeung, E.B. (2003). The biomarker and endocrine disruptors in mammals. *Journal of Reproduction and Development*, ***49***(5), 337-345.

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

Conley, B.A., Wright, J.J., Kummar, S. (2006). Targeting epigenetic abnormalities with histone deacetylase inhibitors. *Cancer, **107***(4), 832-40.

Conti, M., Richter, W., Mehats, C., Livera, G., Park, J.Y., & Jin, C. (2003). Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *Journal of Biological Chemistry*, ***278***(8), 5493-5496.

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

Dairkee, S. H., Seok, J., Champion, S., Sayeed, A., Mindrinos, M., Xiao, W., Xiao, W., Davis, R,. W., & Goodson, W. H. (2008). Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients. *Cancer Research, **68***(7), 2076-2080.

Daston, G.P., Cook, J.C., Kavlock, R.J. (2003). Uncertainties for endocrine disrupters: our view on progress. *Toxicological Sciences, **74***(2), 245-252.

De Flora, S., Micale, R.T., La Maestra, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Camoirano, A., Davoli, S.A., Troglio, M.G., Rizzi, F., Davalli, P., & Bettuzzi, S. (2011). Upregulation of clusterin in prostate and DNA damage in spermatozoa from bisphenol A–treated rats and formation of DNA adducts in cultured human prostatic cells. *Toxicological Sciences,**122***(1), 45-51.

Déchaud, H., Ravard, C., Claustrat, F., de la Perrière, A. B., & Pugeat, M. (1999). Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG) 1. *Steroids, **64***(5), 328-334.

Delfosse, V., Grimaldi, M., Le Maire, A., Bourguet, W., & Balaguer, P. (2014). Nuclear receptor profiling of bisphenol-A and its halogenated analogues. *Vitam Horm, **94***, 229-251.

Dhimolea, E., Wadia, P.R., Murray, T.J., Settles, M. L., Treitman, J.D., Sonnenschein, C., Shioda, T., & Soto, A.M. (2014). Prenatal exposure to BPA alters the epigenome of the rat mammary gland and increases the propensity to neoplastic

development. *PLoS One*, Doi: 10.1371/journal.pone.0099800.

Dodds, E.C. & Lawson, W. (1936). Synthetic Estrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus.*Nature, **137***, 996.

Doherty, L.F., Bromer, J.G., Zhou, Y., Aldad, T.S., & Taylor, H.S. (2010). In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Hormones and Cancer*, ***1***(3), 146-155.

Dolinoy, D.C., Huang, D., & Jirtle, R.L. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***104***(32), 13056-13061.

Dolinoy, D.C., Weinhouse, C., Jones, T.R., Rozek, L.S., & Jirtle, R.L. (2010). Variable histone modifications at the Avy metastable epiallele. *Epigenetics*, ***5***(7), 637-644.

Doshi, T., D'Souza, C., Dighe, V., & Vanage, G. (2012). Effect of neonatal exposure on male rats to bisphenol a on the expression of DNA methylation machinery in the postimplantation embryo. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, ***26***(9), 337-343.

Doshi, T., Mehta, S. S., Dighe, V., Balasinor, N., & Vanage, G. (2011). Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology*, ***289***(2), 74-82.

Drugs of the Future. (2007). ***32***(1), 45−50. Copyright © 2007 Prous Science, S.A.

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

EFSA (European Food Safety Authority). (2006). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A). *The EFSA Journal*, ***428***, 1-75.

EFSA (European Food Safety Authority). (2008). Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission on the toxicokinetics of Bisphenol A. *The EFSA Journal*, ***759***, 1-10 pp.

EFSA Panel on Food Contact Materials Enzymes Flavourings and Processing Aids (CEF). (2010). Scientific Opinion on bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of bisphenol A. *EFSA Journal*, ***8***(9):1829, 110 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1829

EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). (2015). Bisphenol A (BPA) in foodstuffs: PART II - Toxicological assessment and risk characterisation. *EFSA Journal*, ***13***(1):3978.

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

EU-RAR (European Union Risk Assessment Report). (2003). European Union Risk Assessment Report: 4,4'-Isopropylenediphenol (bisphenol-A*). EUR - Scientific and Technical Research Reports*, ***37***, 1-302.

Fang, L., Wuptra, K., Chen, D., Li, H., Huang, S. K., Jin, C., & Yokoyama, K. K. (2014). Environmental-stress-induced Chromatin Regulation and its Heritability. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, ***5***(1).

Fernandez, M.F., Arrebola, J.P., Taoufiki, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., Vilchez, C. L., & Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive Toxicology*, ***24***(2), 259-264.

Fernandez, S.V., Huang, Y., Snider, K.E., Zhou, Y., Pogash, T.J., & Russo, J. (2012). Expression and DNA methylation changes in human breast epithelial cells after bisphenol A exposure. *International Journal of Oncology*, ***41***(1), 369-377.

Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A. & Melnick, A. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation, *Cancer Cell*, ***18***(6), 553-567.

Fleisch, A.F., Robert, O.W., Baccarelli, A.A. (2012). Environmental epigenetics: a role in endocrine disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, ***49***, R61–R67.

Fotakis, G., & Timbrell, J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, ***160***(2), 171-177.

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

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

Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, D., Portier, C.J., & McDonnell, D.P. (1997). Evaluation of chemicals with endocrine-modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143,** 205–212.

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

Gentilcore, D., Porreca, I., Rizzo, F., Ganbaatar, E., Carchia, E., Mallardo, M., De Felice, M., & Ambrosino, C. (2013). Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology*, ***304***, 21-31.

George, O., Bryant, B.K., Chinnasamy, R., Corona, C., Arterburn, J.B., & Shuster, C.B. (2008). Bisphenol A directly targets tubulin to disrupt spindle organization in embryonic and somatic cells. *ACS Chemical Biology*, ***3***(3), 167-179.

Gong, H., Zhang, X., Cheng, B., Sun, Y., Li, C., Li, T., Zeng, L., & Huang, K. (2013). Bisphenol A accelerates toxic amyloid formation of human islet amyloid polypeptide: a possible link between bisphenol A exposure and type 2 diabetes. *PLoS One*, ***8***(1), e54198.

Gore, A.C., & Patisaul, H.B. (2010). Neuroendocrine disruption: historical roots, current progress, questions for the future. *Frontiers in Neuroendocrinology*, ***31***(4), 395.

Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T. (1998). Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol*, ***142***:203–214.

Grant, A.P. (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biology*, ***2***, 1-6.

Greally, J.M., Jacobs, M.N. (2013). State of the Science on in vitro and in vivo testing methods of epigenomic endpoints for evaluating endocrine disruptors. *ALTEX Online*, S1868696X1302211X.

Greathouse, K.L., Bredfeldt, T., Everitt, J.I., Lin, K., Berry, T., Kannan, K., Mittelstadt, M.L., Ho, S.M., & Walker, C.L. (2012). Environmental estrogens differentially engage the histone methyltransferase EZH2 to increase risk of uterine tumorigenesis. *Molecular Cancer Research*, ***10***(4), 546-557.

Greer, E. L.; Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews and Genetics*, ***13***, 343-357.

Gupta, C. (2000). Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, ***224***(2), 61-68.

Guz, J., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., & Olinski, R. (2014). Comparison of the Absolute Level of Epigenetic Marks--5-Methylcytosine, 5-Hydroxymethylcytosine, and 5-Hydroxymethyluracil Between Human Leukocytes and Sperm. *Biology of Reproduction*, biolreprod-114.

Hajszan, T., & Leranth, C. (2010). Bisphenol A interferes with synaptic remodeling. *Frontiers in Neuroendocrinology*, ***31***(4), 519-530.

Halden, R.U. (2010). Plastics and Health Risks. *Annual Review of Public Health*, ***31***, 179-194.

Henrique, R., Costa, V.L., Cerveira, N., Carvalho, A.L., Hoque, M.O., Ribeiro, F.R., Oliveira, J., Teixeira, R.M., Sidransky, D., & Jeronimo, C. (2006). Hypermethylation of Cyclin D2 is associated with loss of mRNA expression and tumor development in prostate cancer. *Journal of Molecular Medicine*, ***84***(11), 911-918.

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

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

Hiroi, H., Tsutsumi, O., Takeuchi, T., Momoeda, M., Ikezuki, Y., Okamura, A., Yokota, H., & Taketani, Y. (2004). Differences in serum bisphenol a concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia. *Endocrine Journal*, ***51***(6), 595-600.

Ho, S.M., Tang, W.Y., de Frausto, J.B., & Prins, G.S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research*, ***66***(11), 5624-5632.

Hwang, K.A., Park, SH., Yi, B.R., & Choi, K.C. (2011). Gene alterations of ovarian cancer cells expressing estrogen receptors by estrogen and bisphenol a using microarray analysis. *Laboratory Animal Research*, ***27***(2), 99-107.

IARC, 1989. Some Organic Solvents, Resin Monomers and Related Compounds, Pigments and Occupational Exposures in Paint Manufacture and Painting. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol: 47, Lyon, France.

IARC, 1999. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol: 71, Lyon, France.

Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., & Taketani, Y. (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*, ***17***(11), 2839-2841.

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

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

Izzotti, A., Kanitz, S., D'Agostini, F., Camoirano, A., & De Flora, S. (2009). Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, ***679***(1), 28-32.

Izzotti, A., Longobardi, M., Cartiglia, C., D'Agostini, F., Kanitz, S., & De Flora, S. (2010). Pharmacological modulation of genome and proteome alterations in mice treated with the endocrine disruptor bisphenol A. *Current Cancer Drug Targets*, ***10***(2), 147-154.

Jenkins, S., Betancourt, A.M., Wang, J., & Lamartiniere, C.A. (2012). Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, ***129***(3), 191-200.

Jenkins, T.G., Aston, K.I., Cairns, B.R., & Carrell, D.T. (2013). Paternal aging and associated intraindividual alterations of global sperm 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine levels. *Fertility and Sterility*, ***100***(4), 945-951.

Johnson, G.E., & Parry, E.M. (2008). Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, ***651***(1), 56-63.

Jones, P.A. ve Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, ***128***, 683-692.

Jones, P.A., Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, ***293***, 1068-70.

Jorgensen, S., Schotta, G., Sorensen, C.S. (2013). Histone H4 Lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Research*, 1–10.

Kang, J. H., Kondo, F., & Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, ***226***(2), 79-89.

Kaufman, J.M., & Vermeulen, A. (2005). The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocrine reviews*, ***26***(6), 833-876.

Kim, G.W., & Yang, X.J. (2011). Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, ***36***(4), 211-220.

Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., & Ohta, S. (2005). Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences*, ***84***(2), 249-259.

Kundakovic, M., & Champagne, F.A. (2011). Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain, Behavior, and Immunity*, ***25***(6), 1084-1093.

Kundakovic, M., Gudsnuk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R.L., Perera, F.P., & Champagne, F.A. (2013). Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure.*Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***110***(24), 9956-9961.

Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B., & Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama*, ***300***(11), 1303-1310.

LeBaron, M.J., Rasoulpour, R.J., Klapacz, J., Ellis-Hutchings, R.G., Hollnagel, H.M., Gollapudi, B.B. (2010). Epigenetics and chemical safety assessment. *Mutation Research*, ***705***(2), 83-95.

Lee, H.R., Hwang, K.A., Park, M.A., Yi, B.R., Jeung, E.B., & Choi, K.C. (2012). Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, ***29***(5), 883-890.

Lee, S., Suk, K., Kim, I.K., Jang, I.S., Park, J.W., Johnson, V.J., Kwon, T.K., Choi, B-J., & Kim, S.H. (2008). Signaling pathways of bisphenol A–induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: Role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor–κB. *Journal of neuroscience Research*, ***86***(13), 2932-2942.

Lenaz, G. (2012). Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology?. *In Advances in Mitochondrial Medicine*, (pp. 93-136). Springer Netherlands.

Leranth, C., Szigeti-Buck, K., MacLusky, N. J., & Hajszan, T. (2008). Bisphenol A prevents the synaptogenic response to testosterone in the brain of adult male rats. *Endocrinology*, ***149***(3), 988-994.

Li, D.K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L., Gao, E., & Yuan, W. (2011). Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertility and Sterility*, ***95***(2), 625-630.

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

Li, Y., Zhang, W., Liu, J., Wang, W., Li, H., Zhu, J., Weng, S., Xiao, S., & Wu, T. (2014). Prepubertal bisphenol A exposure interferes with ovarian follicle development and its relevant gene expression. *Reproductive Toxicology*, ***44***, 33-40.

Lian, C.G., Xu, Y., Ceol, C., Wu, F., Larson, A., Dresser, K., Xu, W., Tan, L., Hu, Y., Zhan, Q., Lee, C.W., Hu, D., Lian, B.Q., Kleffel, S., Ynag, Y., Neiswender, J., Khorasani, J., Fang, R., Lezcano, C., Duncan, L.M., Scolyer, R.A., Thompson, J.F., Kakavand, H., Houvras, Y., Zon, L.I., Mihm, M.C., Kaiser Jr, U.B., Schatton, T., Woda, B.A., Murphy, G.F. & Shi, Y. G. (2012). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*, ***150***(6), 1135-1146.

Lin, Y., Sun, X., Qiu, L., Wei, J., Huang, Q., Fang, C., Ye, T., Kang, M., Shen, H., & Dong, S. (2013). Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death & Disease*, ***4***(1), e460.

Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., & Wenzel, A.(2003). Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure. Appl. Chem*., ***75***, 631-681.

Liu, G.F., Ma, J., Guan, C.Y., Li, X. C., Qin, Q.D., & Li, G.B. (2008). Study on adsorption of bisphenol A from aqueous solution on modified activated Carbons. *Huan*

jing ke xue= Huanjing kexue/[bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui" Huan jing ke xue" bian ji wei yuan hui.], ***29***(2), 349-355.

Liu, Y., Yuan, C., Chen, S., Zheng, Y., Zhang, Y., Gao, J., & Wang, Z. (2014). Global and cyp19a1a gene specific DNA methylation in gonads of adult rare minnow Gobiocypris rarus under bisphenol A exposure. *Aquatic Toxicology*, ***156***, 10-16.

Lizuka, M., Smith, M.M. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Current Opinion in Genetics & Development*, ***13***, 154-60.

Ma, Y., Xia, W., Wang, D.Q., Wan, Y.J., Xu, B., Chen, X., Li, Y.Y., & Xu, S.Q. (2013). Hepatic DNA methylation modifications in early development of rats resulting from perinatal BPA exposure contribute to insulin resistance in adulthood. *Diabetologia*, ***56***(9), 2059-2067.

MacLusky, N.J., Hajszan, T., & Leranth, C. (2005). The environmental estrogen bisphenol A inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 675-679.

Markey, C.M., Wadia, P.R., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., & Soto, A.M. (2005). Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biology of Reproduction*, ***72***(6), 1344-1351.

Matsushima, A., Kakuta, Y., Teramoto, T., Koshiba, T., Liu, X., Okada, H., & Shimohigashi, Y. (2007). Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERRγ. *Journal of biochemistry*, ***142***(4), 517-524.

McIntyre, J., Moral, M.A., Bozzo, J. (2007). Combination therapy with valproic acid in cancer: Initial clinical approach. Drugs of the Future, ***32***(1),45.

Miyatake, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Narita, M., & Suzuki, T. (2006). Dynamic Changes in Dopaminergic Neurotransmission Induced by a Low Concentration of Bisphenol-A in Neurones and Astrocytes. *Journal of Neuroendocrinology*, ***18***(6), 434-444.

Mizuo, K., Narita, M., Yoshida, T., Narita, M., & Suzuki, T. (2004). Functional changes in dopamine D3 receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice. *Addiction Biology*, ***9***(1), 19-25.

Molina-Molina, J.M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., & Olea, N. (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, ***272***(1), 127-136.

Moon, M.K., Kim, M.J., Jung, I.K., Koo, Y.D., Ann, H.Y., Lee, K.J., Kim, S.H., Yoon, Y.C., Cho, B-J., Park, S.K., Park, Y. J., & Jang, H.C. (2012). Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *Journal of Korean Medical Science*, ***27***(6), 644-652.

Moral, R., Wang, R., Russo, I.H., Lamartiniere, C.A., Pereira, J., & Russo, J. (2008). Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *Journal of Endocrinology*, ***196***(1), 101-112.

Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hayata, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., & Nakao, K. (2002). Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, ***87***(11), 5185-5190.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, ***65***(1), 55-63.

Nahar, M.S., Kim, J.H., Sartor, M.A., & Dolinoy, D.C. (2014). Bisphenol A-associated alterations in the expression and epigenetic regulation of genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes in human fetal liver. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, ***55***(3), 184-195.

Nakamura, K., Itoh, K., Yaoi, T., Fujiwara, Y., Sugimoto, T., & Fushiki, S. (2006). Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of bisphenol A. *Journal of Neuroscience Research*, ***84***(6), 1197-1205.

Narita, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Yoshida, T., & Suzuki, T. (2006). Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. *Neuroscience Letters*, ***402***(3), 249-252.

Narita, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Yoshida, T., & Suzuki, T. (2007). Preclinical Study: Changes in central dopaminergic systems and morphine reward by

prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A in mice: evidence for the importance of exposure period. *Addiction Biology*, ***12***(2), 167-172.

Nestor, C.E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D., Dunican, D., Katz, E., Dixon, J.M., Harrison, D.J. & Meehan, R. (2011). Tissue-type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Research*, gr-126417.

Nishizawa, H., Imanishi, S., & Manabe, N. (2005). Effects of exposure in utero to bisphenol a on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, ***51***(5), 593-605.

NTP-CERHR (National Toxicological Program - Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction). (2008). Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *NTP CERHR MON*, *22*, No. 08-5994, v, vii-ix, 1-64 passim.

Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of Resin-Based Composites and Sealants Used in Dentistry. *Environmental Health Perspectives*, ***104***, 298-305

Ooe, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M., & Ariga, H. (2005). Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicological Sciences*, ***88***(1), 114-126.

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

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

Patisaul, H.B., & Polston, E.K. (2008). Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. *Brain Research Reviews*, ***57***(2), 352-362.

Peterson, L.C., Laniel, M. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, ***14***, 546-51.

Pistek, V.L., Fürst, R.W., Kliem, H., Bauersachs, S., Meyer, H.H., & Ulbrich, S.E. (2013). HOXA10 mRNA expression and promoter DNA methylation in female pig offspring after in utero estradiol-17β exposure. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, ***138***, 435-444.

Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Boureiko, A., Melnyk, S., Bagnyukova, T.V., Montgomery, B., & Rusyn, I. (2008). Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, ***644***(1), 17-23.

Poimenova, A., Markaki, E., Rahiotis, C., & Kitraki, E. (2010). Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience*, ***167***(3), 741-749.

Prasanth, G. K., Divya, L. M., & Sadasivan, C. (2010). Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study. *Journal of Applied Toxicology*, ***30***(8), 769-774.

Prins, G.S., Tang, W.Y., Belmonte, J., & Ho, S.M. (2008). Developmental exposure to bisphenol A increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated. *Fertility and Sterility*, ***89***(2 Suppl), e41.

Prins, G.S., Tang, W.Y., Belmonte, J., & Ho, S.M. (2008). Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, ***102***(2), 134-138.

Prokop, Z., Hanková, L., & Jeřábek, K. (2004). Bisphenol A synthesis–modeling of industrial reactor and catalyst deactivation. *Reactive and Functional Polymers*, ***60***, 77-83.

Putnik, M., Zhao, C., Gustafsson, J.A., & Dahlman-Wright, K. (2012). Global identification of genes regulated by estrogen signaling and demethylation in MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, ***426***(1), 26-32.

Qin, X.Y., Fukuda, T., Yang, L., Zaha, H., Akanuma, H., Zeng, Q., Yoshinaga, J., & Sone, H. (2012). Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Biology & Therapy*, ***13***(5), 296-306.

Qin, X.Y., Zaha, H., Nagano, R., Yoshinaga, J., Yonemoto, J., & Sone, H. (2011). Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicology Letters*, ***206***(2), 152-157.

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

Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, ***3***(7), 1125-1131.

Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N., Mornagui, B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*, ***64***, 83–90

Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenbergh, J.G., Walser-Kuntz, D.R., & vom Saal, F.S. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, ***24***(2), 199-224.

Ropero, A.B., Alonso-Magdalena, P., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A. (2006). Rapid endocrine disruption: environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*., ***102***, 163–169.

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

Sabanayagam, C., Teppala, S., & Shankar, A. (2013). Relationship between urinary bisphenol A levels and prediabetes among subjects free of diabetes. *Acta diabetologica*, ***50***(4), 625-631.

Sales, L.B., Kamstra, J.H., Cenijn, P.H., van Rijt, L.S., Hamers, T., & Legler, J. (2013). Effects of endocrine disrupting chemicals on in vitro global DNA methylation and adipocyte differentiation. *Toxicology in vitro*, ***27***(6), 1634-1643.

Sandhu, J., Kaur, B., Armstrong, C., Talbot, C.J., Steward, W.P., Farmer, P.B. ve ark. (2009). Determination of 5-methyl-2 '-deoxycytidine in genomic DNA using

high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B.*, ***877***, 1957-1961.

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

Schlesinger, Y., Straussman, R., Keshet, I., Farkash, S., Hecht, M., Zimmerman, J., Eden, E., Yakhini, Z., Ben-Shushan, E., Reubinoff, B.E., Bergman, Y., Simon, I., Cedar, H. (2007). Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nature Genetics*, ***39***, 232-236.

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

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

Schneider, R., Bannister, A.J., Kouzarides, T. (2002). Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, ***27***, 396-402.

Senyildiz, M., Ozden, S. (2015). Alteration in Global DNA Methylation after Bisphenol A Exposure in MCF-7 Cells. Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University. Basımda.

Shankar, A., & Teppala, S. (2011). Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *96*(12), 3822-3826.

Sheehan, D.M. (2000). Activity of environmentally relevant low doses of endocrine disruptors and the bisphenol A controversy: initial results confirmed. *Experimental Biology and Medicine*, ***224***(2), 57-60.

Sheng, Z.G., Tang, Y., Liu, Y.X., Yuan, Y., Zhao, B.Q., Chao, X.J., & Zhu, B. Z. (2012). Low concentrations of bisphenol a suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, ***259***(1), 133-142.

Sigma-Aldrich. (28 Kasım 2014). Sigma-Aldrich Ürün Güvenlik Bilgi Formu. http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=TR&language=tr&productNumber=239658&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%

2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F239658%3Flang%3Den.

Silver, M. K., O'neill, M. S., Sowers, M. R., & Park, S. K. (2011). Urinary bisphenol A and type-2 diabetes in US adults: data from NHANES 2003–2008. *PLoS One*, ***6***(10), e26868.

Singh, S., Li, S.L. (2012). Epigenetic Effects of Environmental Chemicals Bisphenol A and Phthalates. *International Journal of Molecular Sciences*, ***13***, 10143.

Singh, S., Shoei-Lung Li, S. (2012). Epigenetic Effects of Environmental Chemicals Bisphenol A and Phthalates. *International Journal of Molecular Sciences*, ***13***, 10143-10153.

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

Smith-Bindman, R. (2012). Environmental causes of breast cancer and radiation from medical imaging: findings from the Institute of Medicine report. *Archives of Internal Medicine*, ***172***(13), 1023-1027.

Solomon, G.M., Schettler, T. (2000). Environment and health:6. Endocrine disruption and potential human health implications. *Canadian Medical Association or its Licensors*, ***163***(11), 1471-1476.

Song, C. X., Yi, C., & He, C. (2012). Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. *Nature Biotechnology*, ***30***(11), 1107-1116.

Stanisic, V., Lonard, D.M., & O'Malley, B.W. (2010). Modulation of steroid hormone receptor activity. *Progress in Brain Research*, ***181***, 153-176.

Staples, C.A., Dome, P.B., Klecka, G.M., Oblock, S.T., & Harris, L.R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, ***36***(10), 2149-2173.

Strahl, D.B. & Allis, D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, ***403***, 41-5.

Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H., & Nishida, T. (2003). Removal of estrogenic activities of 17β-estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Research*, ***37***(8), 1972-1975.

Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., Upadhyay, A.K., Gearing, M., Levey, A.I., Vasanthakumar, A., Godley, L.A., Chang, Q., Cheng, X., He, C. & Jin, P. (2006). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature Neuroscience*, ***14***(12), 1607-1616.

T.C. Resmi Gazete, 31 Ekim 2013. Sayı: 28807. Emzik, Biberon, Biberon Başliği, Aliştirma Bardağı, Aliştirma Bardağı Kapağı Ve Benzeri Ürünlerin Üretimi, İthalati, Piyasa Gözetimi Ve Denetimi İle Bildirim Esaslarina Dair Tebliğ.

T.C. Resmi Gazete, 7 Şubat 2011. Sayı: 27839. Emzik, Biberon, Biberon Başlığı, Aliştirma Bardağı, Alıştırma Bardağı Kapağı ve Benzeri Ürünlerin Üretimi, İthalati ve Bildirim Esaslarına Dair Tebliğ.

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y. & Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, ***324***(5929), 930-935.

Takahashi, O., & Oishi, S. (2001). Testicular toxicity of dietary 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rats. *Archives of Toxicology*, ***75***(1), 42-51.

Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., & Shimohigashi, Y. (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERRγ) with high constitutive activity. *Toxicology Letters*, ***167***(2), 95-105.

Takeuchi, T., & Tsutsumi, O. (2002). Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, ***291***(1), 76-78.

Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Takai, Y., & Taketani, Y. (2004). Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocrine Journal*, ***51***(2), 165-169.

Tanaka, S., Motomura, Y., Suzuki, Y., Yagi, R., Inoue, H., Miyatake, S., Kubo, M. (2011). The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated Il4 transcription in T(H)2 cells. *Nature Immunology*, ***12***, 77–85.

Tang, W.Y., Morey, L.M., Cheung, Y.Y., Birch, L., Prins, G.S., & Ho, S. M. (2011). Neonatal Exposure to Estradiol/Bisphenol A Alters Promoter Methylation and Expression of Nsbp1 and Hpcal1 Genes and Transcriptional Programs of Dnmt3a/b and Mbd2/4 in the RatProstate Gland Throughout Life. *Endocrinology*, ***153***(1), 42-55.

Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., Merrick, A. B., Jetten, A.M., Austin, C.P., & Tice, R.R. (2013). Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, ***203***(3), 556-564.

Thomas, P., Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. J Steroid Biochem Mol Biol., **102**, 175–179.

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

Thomson, B.M., Cressey, P.J., & Shaw, I.C. (2003). Dietary exposure to xenoestrogens in New Zealand. Journal of Environmental Monitoring, **5**(2), 229-235.

Thomson, J.P., Moggs, J.G., Wolf, C.R., & Meehan, R.R. (2014). Epigenetic profiles as defined signatures of xenobiotic exposure. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, ***764***, 3-9.

Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A., & Vom Saal, F.S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, ***102***(19), 7014-7019.

Tiwari, V.K., McGarvey, K.M., Licchesi, J.D., Ohm, J.E, Herman, J.G., Schubeler, D., Baylin, S.B. (2008). PcG proteins DNA methylation and gene repression by chromatin looping. *PLoS Biol*, ***6***, 2911–2927.

Tohmé, M., Prud'homme, S. M., Boulahtouf, A., Samarut, E., Brunet, F., Bernard, L., Bourguet, W., Gibert, Y., Balaguer, P., & Laudet, V. (2014). Estrogen-related receptor γ is an in vivo receptor of bisphenol A. *The FASEB Journal*, ***28***(7), 3124-3133.

Tollefsbol, T. (Ed.). (2011). Handbook of Epigenetics. London, UK: Academic Press is an imprint of Elsevier.

Trapphoff, T., Heiligentag, M., El Hajj, N., Haaf, T., & Eichenlaub-Ritter, U. (2013). Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility*, ***100***(6), 1758-1767.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., Nestler, E.J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, ***8***(5), 355-67.

Türk Gıda Kodeksi, 17 Temmuz 2013. Sayı: 28710. Türk Gida Kodeksi Gida İle Temas Eden Plastik Madde Ve Malzemeler Tebliği. Tebliğ No: 2013/34.

Van Meerloo, J., Kaspers, G.J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *In Cancer Cell Culture* (pp. 237-245). Humana Press.

Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, ***24***, 139-177.

Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., & Soto, A.M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, ***30***(1), 75-95.

Vinas, R., & Watson, C.S. (2013). Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions. *Environmental Health Perspectives*, ***121***(3), 352-358.

Vinas, R., Jeng, Y.J., & Watson, C.S. (2012). Non-genomic effects of xenoestrogen mixtures. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, ***9***(8), 2694-2714.

vom Saal, F. S., Richter, C. A., Ruhlen, R. L., Nagel, S. C., & Welshons, W. V. (2004, October). Disruption of laboratory experiments due to leaching of bisphenol A from polycarbonate cages and bottles and uncontrolled variability in components of animal feed. In Proceedings of the International Workshop on Development of Science-Based Guidelines for Laboratory Animal Care. Washington, DC: National Academy Press (pp. 65-69).

Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., & Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*, ***15***(10), 1281-1287.

Warita, K., Mitsuhashi, T., Ohta, K. I., Suzuki, S., Hoshi, N., Miki, T., & Takeuchi, Y. (2013). In vitro evaluation of gene expression changes for gonadotropin-releasing hormone 1, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2, in response to bisphenol A treatment. *Congenital Anomalies*, ***53***(1), 42-45.

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

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

Welshons, W.V., Nagel, S.C., & vom Saal, F.S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, ***147***(6), 56-69.

Weng, Y.I., Hsu, P.Y., Liyanarachchi, S., Liu, J., Deatherage, D.E., Huang, Y. W., Zuo, T., Rodriguez, B., Lin, C.H., Cheng, A. L., & Huang, T.H.M. (2010). Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, ***248***(2), 111-121.

Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, T.R., & Belcher, S.M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, ***24***(2), 178-198.

Wetherill, Y.B., Hess-Wilson, J.K., Comstock, C.E., Shah, S.A., Buncher, C.R., Sallans, L., Limbach, P.A., Schwemberger, S., Babcock, G.F., & Knudsen, K.E. (2006). Bisphenol A facilitates bypass of androgen ablation therapy in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, ***5***(12), 3181-3190.

Wolstenholme, J.T., Rissman, E.F., Connelly, J.J. (2011). The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Hormones and Behavior*, *59*, 296–305.

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

Yang, H., Liu, Y., Bai, F., Zhang, J.Y., Ma, S.H., Liu, J., Xu, Z.D., Zhu, H.G., Ling,.L., Ling, Z.Q., Ye, D., Guan, K. & Xiong, Y. (2013). Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*, ***32***(5), 663-669.

Yang, Y.J., Hong, Y.C., Oh, S.Y., Park, M.S., Kim, H., Leem, J.H., & Ha, E.H. (2009). Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environmental Research*, ***109***(6), 797-801.

Yaoi, T., Itoh, K., Nakamura, K., Ogi, H., Fujiwara, Y., & Fushiki, S. (2008). Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, ***376***(3), 563-567.

Yeo, M., Berglund, K., Hanna, M., Guo, J.U., Kittur, J., Torres, M.D., Abramowitz, J., Busciglio, J., Gao, Y., Birnbaumer, L., & Liedtke, W.B. (2013). Bisphenol A delays the perinatal chloride shift in cortical neurons by epigenetic effects on the Kcc2 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***110***(11), 4315-4320.

Yokochi, T., & Robertson, K.D. (2002). Preferential methylation of unmethylated DNA by mammaliande Novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *Journal of Biological Chemistry*, ***277***(14), 11735-11745.

Zama, A.M., Uzumcu, M. (2010). Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective. *Frontiers Neuroendocrinology*, ***31***(4), 420-439.

Zhang, Q., Xu, X., Li, T., Lu, Y., Ruan, Q., Lu, Y., Ruan, Q., Lu, Y., Wang, Q., Dong, F., Yang, Y., & Zhang, G. (2014). Exposure to bisphenol-A affects fear memory and histone acetylation of the hippocampus in adult mice. *Hormones and Behavior*, ***65***(2), 106-113.

Zhang, X., & Ho, S.M. (2011). Epigenetics meets endocrinology. *Journal of Molecular Endocrinology*, ***46***(1), R11-R32.

Zhou, Q., Miao, M., Ran, M., Ding, L., Bai, L., Wu, T., Yuan, W., Gao, E., Wang, J., Li, G., & Li, D.K. (2013). Serum bisphenol-A concentration and sex hormone levels in men. *Fertility and Sterility*, ***100***(2), 478-482.

Zhu, H., Xiao, X., Zheng, J., Zheng, S., Dong, K., & Yu, Y. (2009). Growth-promoting effect of bisphenol a on neuroblastoma in vitro and in vivo. *Journal of Pediatric Surgery*, ***44***(4), 672-680.

Zhu, Z., Edwards, R.J., & Boobis, A.R. (2009). Increased expression of histone proteins during estrogen-mediated cell proliferation. *Environmental health perspectives*.

Zoeller, R.T. (2007). Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences. *Thyroid*, ***17***(9), 811-817.

Zoeller, R.T., Bansal, R., & Parris, C. (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*, ***146***(2), 607-612.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mine	**Soyadı**	Şenyıldız
Doğ.Yeri	Gönen	**Doğ.Tar.**	01.07.1988
Uyruğu	T.C	**TC Kim No**	31465103272
Email	mine.senyildiz@gmail.com	**Tel**	0546 818 35 31

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2012
Lise	İstanbul Yakacık Lisesi (YDA)	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Bursiyer	İ. Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	2014-2015
2.	Öğretmen	Beyhan Şenyuva Orta Okulu	2012-2013

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	İyi	İyi	55	68,75

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
MS Office	iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınları

Mine Senyildiz, Sibel Ozden. (2015). Alteration in Global DNA Methylation after Bisphenol A Exposure in MCF-7 Cells. J. Fac. Pharm. Istanbul. Basımda.

Sibel Ozden, **Mine Senyildiz**, Buket Alpertunga. (2015). The role of DNA methylation alterations in 3-MCPD and Glycidol induced toxicity in rat kidney epithelial cells. Drug and Chemical Toxicology (Değerlendirmede).

Ulusal Veya Uluslararasi Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Tam Metni veya Özeti Yayinlanan Poster

Mine Senyildiz, Buket Alpertunga, Sibel Ozden. Alteration in Global DNA Methylation after Bisphenol A Exposure in MCF-7 cells. 50th Congress of the European Societies of Toxicology, 7-10 Eylül 2014, Edinburg-İskoçya.

Buket Alpertunga, **Mine Senyildiz**, Sibel Ozden. The role of DNA methylation alterations in 3-MCPD and Glycidol induced toxicity in rat kidney epithelial cells. 50th Congress of the European Societies of Toxicology, 7-10 Eylül, Edinburg-İskoçya.

Mine Senyildiz, Sibel Ozden. Epigenetic Mechanisms and Endocrine Distrupting Chemicals. 4th International Meeting on Pharmacy & Pharmaceutical Sciences (IMPPS-4), 18-21 Eylül 2014, Marmara Üniversitesi, İstanbul.

Mine Senyildiz, Sibel Ozden. Metformin and Diabetes: The Risks of Cancer ?. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi (İVEK). 28-30 Kasım 2014, İstanbul.

Mine Senyildiz, Sibel Ozden. Does DNA Methylation as an Epigenetic Mechanisms Play a Role in Personalized Medicine? International Symposium on Advances in Predictive & Personalized Medicine (APPM2015). 2-3 Nisan 2015, Acıbadem Üniversitesi, İstanbul.

Mine Senyildiz, Sibel Ozden. DNA methylation profiles of Bisphenol A in Human Neuroblastoma Cells. 13th European Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX). 22-25 Haziran 2015, The University of Strathclyde Glasgow, Scotland.

Mine Senyildiz, Ecem Fatma Karaman, Sibel Ozden. Global and gene-spesific promoter DNA methylation profiles of bisphenol A in HepG2 cells. 9th Cogress of Turkish Society of Toxicology with participation of the Hellenic Society of Toxicology. 21-24 Ekim 2015, Çeşme, İzmir. (***Poster birincilik ödülü***)

Sertifikalar

Abcam seminer. Introduction and optimization of ChIP, Optimization of ELISA. 14 Mayıs 2015, İstanbul Bilim Üniversitesi.

I. Deneysel Tasarım ve Ön Biyoistatistik Sempozyumu. İstanbul Üniversitesi

TÜBA Akademi. "Epigenetik Diyet". 27 Mayıs 2015. İstanbul.

Karaköy Otofaji Sempozyumu. 22 Ekim 2014. İstanbul.

Mini sempozyum. Drug Induced Liver Injury: Genomic Approaches and Risk

Assessment. 25 Kasım 2015, İstanbul Üniversitesi, Farmasötik Toksikoloji A.B.D.

Yeni Nesil Psikoaktif Maddeler Sempozyumu, 26 Kasım 2013, Adli Tıp Kurumu, İstanbul.

IEIS, İlaçta Ar-Ge; Kamu-Üniversite-Sanayi İşbirliğinin Önemi Toplantısı, 17 Ekim 2014, Levent, İstanbul.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Genel kültür, Uzakdoğu sporları, müzik, kitap okumak, kaligrafi, okültizm, komplo teorileri, metafizik, felsefe, sosyoloji, astronomi, kuantum fiziği, şiir, resim, ebru sanatı, sinema.