



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEK YUMURTA İKİZLERİNDE METİLASYON
ANALİZLERİ**

Kaniye ŞAHİN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Mayıs, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEK YUMURTA İKİZLERİNDE METİLASYON
ANALİZLERİ**

Kaniye ŞAHİN

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

Danışman

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Mayıs, 2010

İSTANBUL

Bu çalışma 07/05/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Avni KURU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ahmet ZEHİR
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin 3342 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim ile tez çalışmam boyunca bana yol gösteren saygıdeğer tez danışmanım **Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI**'ya;

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında her türlü katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki tüm eğitimcimime;

Laboratuvar çalışmalarım boyunca tecrübelerinden yararlandığım çalışma arkadaşlarıma, özellikle de **Sibel YILMAZ**, **Levent DALYAN** ve **Aslıhan TEMEL**'e;

Laboratuvardaki çalışmalarımı daha eğlenceli hale getiren tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine;

Tez çalışmam için form doldurup kan veren, isimlerini veremediğim bütün tek ve çift yumurta ikizlerine;

Eğitimimin her aşamasında bana maddi ve manevi destek olan **AİLEME** teşekkür ederim.

Nisan, 2010

Kaniye ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	V
TABLO LİSTESİ	VII
SEMBOL LİSTESİ	VIII
ÖZET	X
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. İKİZ OLUŞUMU	3
2.1.1. Tek Yumurta İkizleri	4
<i>2.1.1.1. Tek Yumurta İkizlerinde Konkordans ve Diskordans</i>	<i>6</i>
2.2. EPİGENETİK	6
2.2.1. DNA Metilasyonu	10
2.2.2. DNA Metiltransferazlar	12
<i>2.2.2.1. DNMT1</i>	<i>13</i>
<i>2.2.2.2. DNMT2</i>	<i>13</i>
<i>2.2.2.3. DNMT3a ve DNMT3b</i>	<i>13</i>
2.2.3. Epigenetik Yeniden Programlama	13
2.2.4. DNA Metilasyonlarının Hastalıklarla İlişkisi	15
<i>2.2.4.1. Kanser</i>	<i>15</i>
<i>2.2.4.2. Gelişimsel Hastalıklar</i>	<i>16</i>
<i>2.2.4.3. Otoimmün Hastalıklar</i>	<i>16</i>
2.2.5. İnsan Epigenom Projesi (HEP)	17

2.3. MOLEKÜLER MARKER ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	18
2.3.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD).....	21
2.3.2. DNA Metilasyon Markerları	22
2.4. DNA METİLASYON PROFİLLERİNİN ANALİZİ.....	22
2.4.1. Bisülfid Dönüşümü.....	23
2.4.2. Afinite Saflaştırması.....	24
2.4.3. Metilasyona Duyarlı Restriksiyon Enzimleri İle Kesim.....	24
2.3.3.1. <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> enzimleri	25
3. MALZEME VE YÖNTEM	26
3.1. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	26
3.2. ÖRNEKLERDEN GENOMİK DNA İZOLASYONU	26
3.3. DNA'NIN KALİTE VE MİKTARININ BELİRLENMESİ	27
3.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi ile İnceleme.....	27
3.3.2. Spektrofotometri İle DNA Miktarının Belirlenmesi.....	28
3.4. RAPD-PCR OPTİMİZASYONU	29
3.4.1. Primer Seçimi.....	29
3.4.2. Magnezyum Klorür Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	29
3.4.3. RAPD-PCR Koşullarının Optimizasyonu.....	29
3.5. CRED-RA YÖNTEMİ İLE İKİZ DNA'LARININ ANALİZİ	30
3.5.1. DNA'ların Restriksiyon Enzimleri İle Kesilmesi	30
3.5.2. Kesim Sonrası DNA Ürünlerinin RAPD-PCR İle Çoğaltılması	30
3.6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	31
4. BULGULAR	32
4.1. DENEKLERİN ANALİZ FORMLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	32
4.2. GENOMİK DNA'NIN KALİTATİF VE KANTİTATİF ANALİZİ	34
4.2. RAPD-PCR OPTİMİZASYONU BULGULARI.....	35
4.4. CRED-RA ANALİZİ BULGULARI.....	36
4.4.1. Restriksiyon Enzim Kesimi Bulguları.....	36
4.4.2. CRED-RA Analizi Kapsamında RAPD-PCR Bulguları	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
KAYNAKLAR	48

EK 1	46
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Çift yumurta ikizlerinin oluşumu: dizigotik, dikoryonik, diamniyotik.....	3
Şekil 2.2	: Tek yumurta ikizlerinin oluşumu: monozigotik, dikoryonik, diamniyotik...	5
Şekil 2.3	: Tek yumurta ikizlerinin oluşumu: monozigotik, monokoryonik, diamniyotik.....	5
Şekil 2.4	: Tek yumurta ikizlerinin oluşumu: monozigotik, monokoryonik, monoamniyotik.....	5
Şekil 2.5	: Epigenetik mekanizmalar.....	7
Şekil 2.6	: Sitozin bazının 5'-metil sitozine dönüşümü	10
Şekil 2.7	: Epigenetik yeniden programlama döngüsü.....	14
Şekil 2.8	: Çeşitli hücre tipleri ve dokuları arasındaki metilasyon farklılıkları oranları	18
Şekil 2.9	: DNA temelli bazı moleküler marker teknikleri.....	19
Şekil 2.10	: RAPD tekniğinde DNA'nın tek primer ile çoğaltılması.....	21
Şekil 2.11	: Metillenmemiş sitozinin sodyum bisülfid uygulaması sonucu urasile dönüşümü	23
Şekil 2.12	: Bisülfid dönüşümü	23
Şekil 2.13	: Metillenmiş DNA'nın afinite saflaştırma yöntemi ile elde edilmesi.....	24
Şekil 2.14	: DNA metilasyonunun metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri ile saptanması	25
Şekil 2.15	: Restriksiyon enzimi tanıma bölgelerindeki sitozin metilasyonlarının enzim kesimi üzerine etkisi	25
Şekil 3.1	: Elektroforezde kullanılan marker'ın %1'lik agaroz jeldeki, ticari firmasının belirttiği bant görüntüsü ile bantların büyüklük ve konsantrasyonu	28
Şekil 4.1	: Çift yumurta ikizlerinden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jelde UV ışık altındaki görünüşleri	34
Şekil 4.2	: Tek yumurta ikizlerinden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jelde UV ışık altındaki görünüşleri.....	34
Şekil 4.3	: Bazı farklı primerler ile yapılan RAPD-PCR sonucu jelde gözlenen bantlar.....	35
Şekil 4.4	: Ç-01 – Ç-06 DNA'larının <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü	36
Şekil 4.5	: Ç-07 – Ç-14 DNA'larının <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü	36
Şekil 4.6	: T-01 – T-06 DNA'larının <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü	37
Şekil 4.7	: T-07 – T-12 DNA'larının <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü	37
Şekil 4.8	: T-13 – T-18 DNA'larının <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü	37

Şekil 4.9	: T-19 – T-24 DNA'larının <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	38
Şekil 4.10	: T-25 – T-32 DNA'larının <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü	38
Şekil 4.11	: 1 numaralı çift yumurta ikizlerinin (Ç-01 ve Ç-02 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar.....	39
Şekil 4.12	: 2 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-03 ve T-04 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar	39
Şekil 4.13	: 3 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-05 ve T-06 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar	39
Şekil 4.14	: 5 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-09 ve T-10 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar.....	40
Şekil 4.15	: 6 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-11 ve T-12 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar.....	40
Şekil 4.16	: 10 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-19 ve T-20 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar.....	40
Şekil 5.1	: Çift yumurta ikizlerinde yaşa göre % polimorfizm oranları.....	44
Şekil 5.2	: Tek yumurta ikizlerinde yaşa göre % polimorfizm oranları.....	44

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 : Elektroforezde kullanılan tamponlar ve boyalar.....	27
Tablo 3.2 : Araştırmada kullanılan farklı jel konsantrasyonları ile farklı agaroz:tampon miktarları.....	27
Tablo 3.3 : RAPD-PCR’da kullanılan primerlerin nükleotid dizileri.....	29
Tablo 3.4 : Enzim kesiminde kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.....	30
Tablo 3.5 : RAPD-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	31
Tablo 3.6 : RAPD-PCR koşulları.....	31
Tablo 4.1 : Çift yumurta ikizlerinin anket formlarının değerlendirilmesi.....	32
Tablo 4.2 : Tek yumurta ikizlerinin anket formlarının değerlendirilmesi.....	33
Tablo 4.3 : CRED-RA analizi sonucu tek yumurta ikizlerinde gözlenen bant sayıları.....	41
Tablo 4.4 : CRED-RA analizi sonucu çift yumurta ikizlerinde gözlenen bant sayıları.....	42

SEMBOL LİSTESİ

°C	: santigrad derece
µl	: mikrolitre
4mC	: N4'-metil sitozin
5mC	: 5'-metil sitozin
6mA	: N6'-metil adenin
A^{vy}	: “agouti viable yellow”
AFLP	: “amplified fragment length polymorphism”
CD4	: “cluster of differentiation 4”
CD8	: “cluster of differentiation 8”
CpG	: sitozin fosfat guanin
CpT	: sitozin fosfat timin
CRED-RA	: “coupled restriction enzyme digestion – random amplification”
Ç-	: çift yumurta ikizi
dH₂O	: distile su
dNTP	: dezoksiribonükleotid trifosfat
dsRNA	: çift iplikli RNA
DAMD	: “directed amplification of microsatellite DNA”
DNA	: dezoksiribonükleik asit
DNMT	: DNA metiltransferaz
EDTA	: etilen diamin tetra asetik asit
EtBr	: etidyum bromür
FSH	: folikül uyarıcı hormon
g	: yerçekimi
GATC	: guanin adenin timin sitozin
GC	: guanin sitozin
H2A	: histon2A
H2B	: histon2B
H3	: histon3
H4	: histon4
HLA	: insan lökosit antijeni
IAP	: “intracisternal A particle”
I-SSR	: “inter-simple sequence repeats”
kb	: kilobaz
K	: lizin aminoasidi
mg	: miligram
ml	: mililitre
mM	: milimolar
mRNA	: haberci ribonükleik asit
miRNA	: mikro ribonükleik asit
M-Sat	: mini satellit
MBD	: metil bağlanma domeni

MHC	: “major histocompatibility complex”
nm	: nanometre
pH	: hidrojen iyonu konsantrasyonu
PcG	: “polycomb” grup proteinleri
PCR	: polimeraz zincir reaksiyonu
R	: arjinin aminoasidi
RAPD	: “randomly amplified polymorphic DNA”
RFLP	: “restriction fragment length polymorphism”
RISC	: “RNA-induced silencing complex”
RNA	: ribonükleik asit
rpm	: dakikadaki dönme sayısı
siRNA	: “small interfering” ribonükleik asit
S	: serin aminoasidi
SSR	: “single sequence repeats”
T	: treonin aminoasidi
T-	: tek yumurta ikizi
TAE	: tris-asetat EDTA
TE	: tris-EDTA
TrxG	: “trithorax” grup proteinleri
U	: ünite
UTR	: “untranslated region”
UV	: ultraviyole
V	: volt
VNTR	: “variable number of tandem repeats”

ÖZET

TEK YUMURTA İKİZLERİNDE METİLASYON ANALİZLERİ

Epigenetik değişimler, primer DNA dizisindeki değişimleri kapsamayan, kalıtımla aktarılabilen modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlardan biri olan DNA metilasyonu, genom stabilitesi, X kromozomu inaktivasyonu ve imprinting gibi önemli hücrel fonksiyonları düzenler. DNA metilasyonu, memeli genomlarının transkripsiyonel durumlarını değiştiren en kararlı epigenetik modifikasyondur. Anormal metilasyon düzenlerinin birçok ciddi patolojik sonuç ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır.

Tek yumurta ikizleri, aynı zigottan meydana geldikleri için aynı genotipe sahiptirler. Bununla beraber, ikiz kardeşler sıklıkla hastalıklara yatkınlık ve çok çeşitli morfolojik özellikler gibi bir çok fenotipik farklılık gösterirler. Bunun gibi birbirine uymayan durumlar, genellikle çevresel ve epigenetik etmenlere dayandırılmıştır. Tek yumurta ikizlerinin genetik olarak aynı oldukları var sayıldığı için, kompleks hastalıklar ve fenotipte çevresel faktörlerin etkisini araştırmak için ideal deney modelleri olarak kabul edilmişlerdir.

Bu tez projesinde 16 çift tek yumurta ikizi ve 8 çift çift yumurta ikizinde sitozin metilasyonu analizleri, CRED-RA (“Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification”) yöntemi ile gerçekleştirildi. Genomik DNA izolasyonu için lenfosit hücreleri ve CRED-RA analizleri için 5'-GATGACCGCC-3' primeri kullanıldı. Kullanılan primer için her ikiz çiftinde kendine özgü DNA profili gözlemlendi. Bazı tek yumurta ikizi çiftleri yüksek derecede metilasyon benzerliği gösterirken %56.2'sinin metilasyon profilleri belirgin şekilde farklılık gösterdi. Monozigotik ikizlerin CRED-RA analizlerindeki bu farklı amplifikasyon ürünleri, belirgin sitozin metilasyon farklılıklarını göstermekte ve tek yumurta ikizlerinin bireysel tanısı yönünden yararlı olabileceği düşünülmektedir.

SUMMARY

METHYLATION ANALYSES ON MONOZYGOTIC TWINS

Epigenetic changes are heritable modifications that do not comprise changes in the primary DNA sequence. Being one of these modifications, DNA methylation regulates crucial cellular functions such as genome stability, X chromosome inactivation and imprinting. DNA methylation is the most stable epigenetic modification modulating the transcriptional states of mammalian genomes. It has been proven that aberrant methylation patterns are associated with many serious pathological consequences.

Monozygotic twins share the same genotype as they have been derived from the same zygote. Despite that, twins frequently display phenotypic differences such as susceptibility to diseases and various morphologic features. Such discordance has mostly been attributed to environmental and epigenetic effects. As monozygotic twins are assumed to be genetically identical, they are recognized as ideal experiment models to study complex diseases and effects of environmental factors on phenotype.

In this thesis project, cytosine methylation analyses were performed on 16 monozygotic and 8 dizygotic twin pairs by CRED-RA (Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification) method. Lymphocyte cells were used for genomic DNA isolation and 5'-GATGACCGCC-3' primer for CRED-RA analyses. Each twin pair had their own CRED-RA analysis profile with tested primer. Some monozygotic twin pairs showed a high degree of methylation concordance, whereas 56.2% differed markedly in their methylation profiles. Different amplification products in monozygotic twins during CRED-RA analyses indicated evident cytosine methylation alterations which could be useful for individual identification of monozygotic twins.

1. GİRİŞ

Epigenetik, ilk olarak Waddington (1942), tarafından genlerin çevreleriyle olan ve fenotipi meydana getiren ilişkileri biçiminde tanımlanmıştır. Günümüzde epigenetik; DNA nükleotid dizilerinde bir değişiklik olmadan, gen anlatımındaki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik, genel olarak DNA metilasyonları, histon modifikasyonları, kodlama yapmayan RNA'larla mRNA anlatımının kontrol edilmesi ve kromatin modifikasyonları gibi gen anlatımını değiştiren olayları kapsar. Epigenetik modifikasyonlar (DNA metilasyonları; histon kromatin modifikasyonları -asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon-; imprinting, paramutasyon, siRNA ve mikroRNA yolları, vb.), gen anlatımının susturulmasında ve susturulmanın sistematik olarak yayılmasında etkin olan mekanizmalardır. Epigenetik değişimlerin saptanması ve incelenmesi, canlılardaki çeşitli biyolojik olayların anlaşılmasında önemli bir adımdır.

DNA metilasyonu, gen anlatımını ve dolaylı olarak da hücre işlevlerini değiştiren, hücre bölünmesi ile nesilden nesile geçebilen epigenetik bir mekanizmadır. DNA metilasyonu ökaryotlarda CpG dizilerindeki sitozinde meydana gelir. DNA metiltransferaz (DNMT) enzimi tarafından bir metil grubu CpG dinükleotidindeki sitozinin 5'-karbonuna kovalent şekilde bağlanır. Metillenmiş sitozin episitozin olarak adlandırılır. DNA metilasyonu, stabilitesi nedeni ile en kolay incelenebilen epigenetik mekanizmadır. Tam genom metilasyon analizleri için, değişik genlerdeki birden çok CpG bölgesinin aynı anda analiz edilebilmesi ve metilasyon düzeylerinin sayısal olarak belirlenebilmesi önemlidir. DNA metilasyon analizleri için kullanılan yöntemler ya PCR temelli, ya da metilasyona duyarlı restriksiyon enzimi temellidir. Ayrıca, mikroçip teknolojisi ve karşılaştırmalı genomik melezleme teknikleri de yüksek verimli metilasyon analizlerine olanak sağlamaktadır.

Tek yumurta ikizleri, aynı zigottan meydana geldikleri için aynı genotipe sahiptirler. Buna karşın, ikiz kardeşler hastalıklara yatkınlık ve çok çeşitli morfolojik özellikler gibi

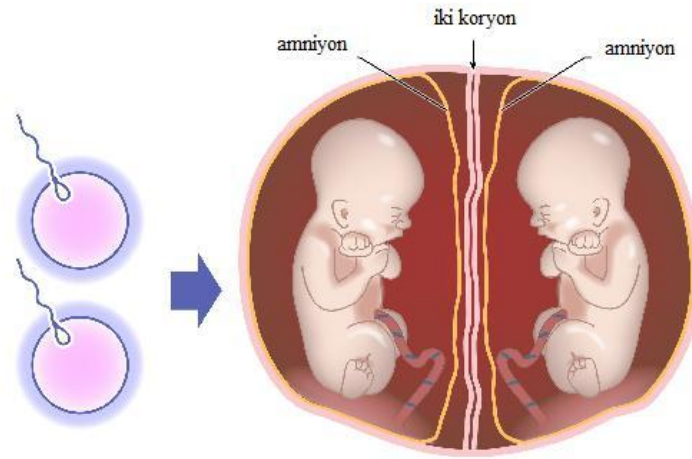
fenotipik farklılık gösterebilirler. Tek yumurta ikizleri aynı genetik bilgiye sahip oldukları için, multifaktöriyel hastalıkların ve fenotipte çevresel etmenlerin etkisinin araştırılmasında ideal deney modelleri olarak kabul edilmektedirler. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, şizofreni, diyabet, Beckwith-Wiedemann sendromu gibi hastalıkların epigenetik temellerinin de olduğu anlaşılmıştır.

Bu çalışma kapsamında, tek yumurta ikizlerinin lenfositlerinden izole edilen DNA'ların metilasyon durumunun moleküler marker yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Proje kapsamında, farklı yaşlardaki tek yumurta ikizlerinden alınan DNA örneklerinde metilasyon, CRED-RA ("Coupled Restriction Enzyme Digestion and Random Amplification") yöntemi ile incelenmiştir. Kontrol materyali olarak çift yumurta ikizlerinin lenfositlerinden izole edilen DNA'lar kullanılmıştır. Belli yaş aralıklarında tüm genom düzeyinde DNA sitozin metillenmelerindeki farklılıklar moleküler marker olarak araştırılmıştır. Elde edilen bulguların, gen anlatımındaki değişikliklerin hangi ölçüde çevresel etmenlerden etkilendiğinin saptanmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. İKİZ OLUŞUMU

İkiz doğum oranı dünya genelinde yaklaşık olarak 80 canlı doğumda 1'dir (Hall, 2003). En yüksek oran Afrikalılar'da (40/1000), en düşük oran ise Asyalılar'da (6/1000) görülmektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da bu oran 1000 doğumda 20-40'tır (Turton ve diğ., 2009). Tek yumurta ikizleri, bir sperm ile döllenmiş yumurtadan oluşan zigotun bir veya birkaç embriyo oluşturacak şekilde bölünmesi ile oluşurken; çift yumurta ikizleri iki farklı yumurtanın, iki farklı sperm ile döllenmesi sonucu meydana gelir (Hoekstra ve diğ., 2008) (Şekil 2.1). Tek yumurta ikizlerinin meydana gelme sıklığı dünya genelinde ortalama 4/1000 iken, çift yumurta ikizlerinin meydana gelme sıklığı bölgeler arasında yüksek farklılık gösterir. Çift yumurta ikizlerinin oluşumu, annede yüksek miktarda FSH (folikül uyarıcı hormon) miktarı (Lambalk ve diğ., 1998b), ailede çoklu doğum görülmesi, anne yaşının (Bulmer, 1970), vücut kütle indeksinin ve artmış gonadotropine bağlı olarak boy uzunluğunun fazla olması (Basso ve diğ., 2004) gibi etmenlere bağlıdır. Gelişmiş ülkelerde çift yumurta ikizleri doğum oranı, anne yaşının küçülmesi ve doğurganlığın azalmasına karşın, yardımcı üreme tekniklerinin sıklıkla kullanılması nedeni ile artmaktadır (Pison ve D'Addato, 2006).



Şekil 2.1: Çift yumurta ikizlerinin oluşumu: dizigotik, dikoryonik, diamniyotik

Tek ve çift yumurta ikizlerinde zigositenin tanımlanması önemlidir. Tek yumurta ikizleri ve bazen de monokoryonik çift yumurta ikizleri arasında (Boklage, 2006) gerekli durumlarda organ nakli, dokusal reddetme riski olmadan uygulanabilir. Bazı tek yumurta ikizleri çeşitli nedenlerden oluşabilen farklılıklar gösterebildiği için dizigotik olarak tanımlanabilmektedirler. Bu durum, klinik tanı ve tedavilerde olumsuzluklara yol açmaktadır.

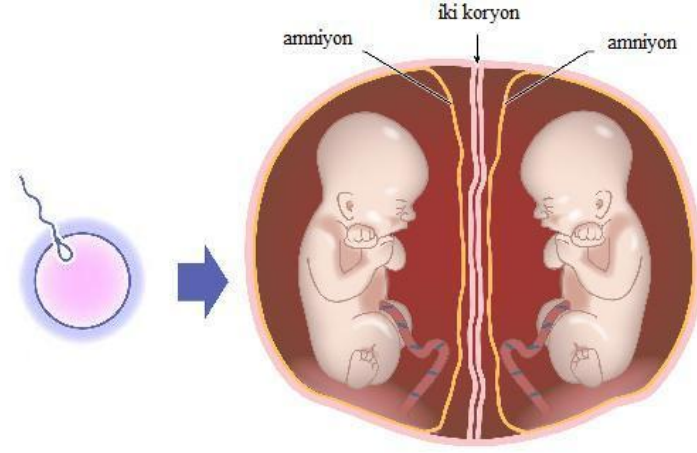
Genel olarak tanı, doğum sonrası fiziksel karakterlerin (boy, ağırlık, vs) karşılaştırılması, biyokimyasal özellikler (kan grubu, enzim polimorfizmleri, HLA - insan lökosit antijen- tipleri) ve DNA parmakizi tanımlanması ile yapılmaktadır. Ancak monozigotik ikizlerle dizigotik ikizlerin kesin tanısının yapılması zordur. Genetik laboratuvarlarında yanaktan alınan epitel doku hücrelerinde, 8 bölgedeki ardışık tekrar sayılarının karşılaştırılmasına olanak sağlayan VNTR (“variable number of tandem repeats”) analizleri yapılmaktadır (Machin, 2009; Reed ve diğ., 2005). Ancak sonradan meydana gelen mutasyonlar da göz önünde bulundurulmalıdır.

2.1.1. Tek Yumurta İkizleri

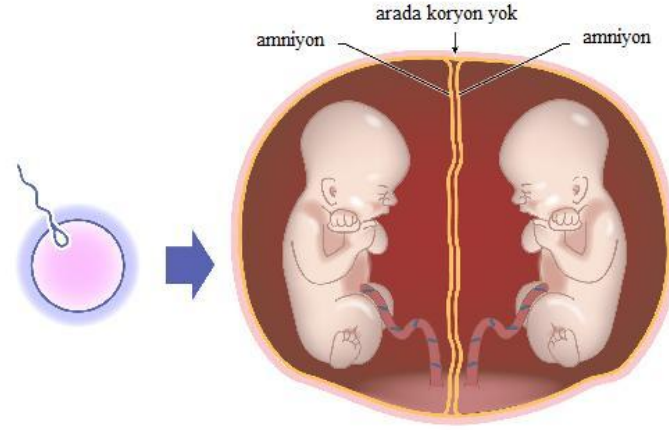
Tek yumurta ikizleri (monozigotik ikizler) genetik çalışmalar için önemli olgulardır. Fenotipik olarak farklılıklar gösterdikleri zaman, genom ve epigenom incelemeleri ile bu farklılıkların oluşumları hakkında daha doğru bilgiler elde edilebilir. Farklılıklar hem post-zigotik olarak embriyonik aşamada, hem de doğumdan sonraki yaşam süresi boyunca oluşabilir. Bu genetik/epigenetik farklılıklara ek olarak, ikizlerin anne rahminde bulunduğu çevresel koşullar da bireyleri farklı olarak etkilemektedir.

Embriyo gelişimi sırasında zigotik hücrelerde ayrılma zigotun oluşmasını takip eden 3 gün içerisinde meydana geldiyse plasentalar dikoryonik diamniyotik olarak meydana gelir (Şekil 2.2). Koryon, hamilelik sırasında fetüs ile anne arasında oluşan bir zarıdır. Zigot oluşumundan sonraki 4. günden itibaren plasentayı oluşturan öncül hücreler, embriyoyu oluşturan iç hücrelerden ayrılır. Bu yüzden zigotik hücrelerde bölünme zigotun oluşumunu takip eden ilk 4 gün sonrasında meydana gelirse sadece bir plaseenta (monokoryonik) gelişebilir. 4. ve 8. günler arasında gerçekleşen ayrılma sonucunda monokoryonik ve diamniyotik (Şekil 2.3); 9. ve 12. günler arasında gerçekleşen ayrılma sonucunda monokoryonik ve monoamniyotik ikizler meydana gelir (Şekil 2.4). Bu

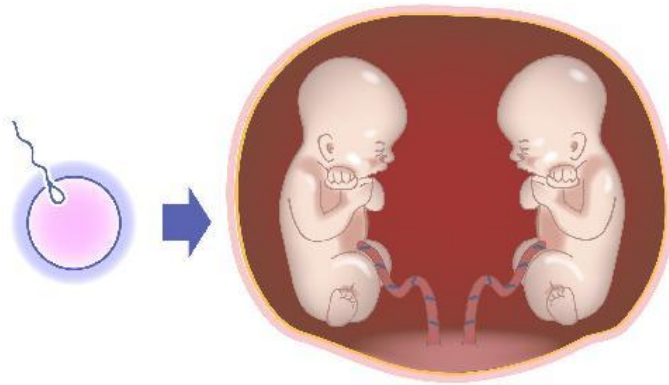
durumda kordonların karışıp dolaşma riski vardır. Bölünme 13. ve 14. günlerde meydana gelirse yapışık ikizlerin oluşma ihtimali artar (Gringras ve Chen, 2001).



Şekil 2.2: Tek yumurta ikizlerinin oluşumu: monozygotik, dikoryonik, diamniyotik



Şekil 2.3: Tek yumurta ikizlerinin oluşumu: monozygotik, monokoryonik, diamniyotik



Şekil 2.4: Tek yumurta ikizlerinin oluşumu: monozygotik, monokoryonik, monoamniyotik

2.1.1.1. Tek yumurta ikizlerinde konkordans ve diskordans

Bir ailedeki iki bireyde aynı hastalık gözleniyor ise kişiler bu hastalık için konkordantlardır. Bu iki bireyden sadece birinde hastalık varsa, kişiler diskordanttır. Tek yumurta ikizleri çeşitli sebeplerden dolayı bazı hastalıklar için diskordant olabilirler. Cinsiyet, gonadal fonksiyon, cinsel tercih ve eksensel yönelim (solaklık, sağlaklık) de diskordansa örnek olarak verilebilir. Bu sebeplerin araştırılıp aydınlatılması hem insan embriyonik gelişiminin hem de hastalık mekanizmalarının anlaşılmasında önemlidir.

Tek yumurta ikizlerinde gözlenen farklılıkların nedenleri belli başlıklar altında toplanabilir (Machin, 2009):

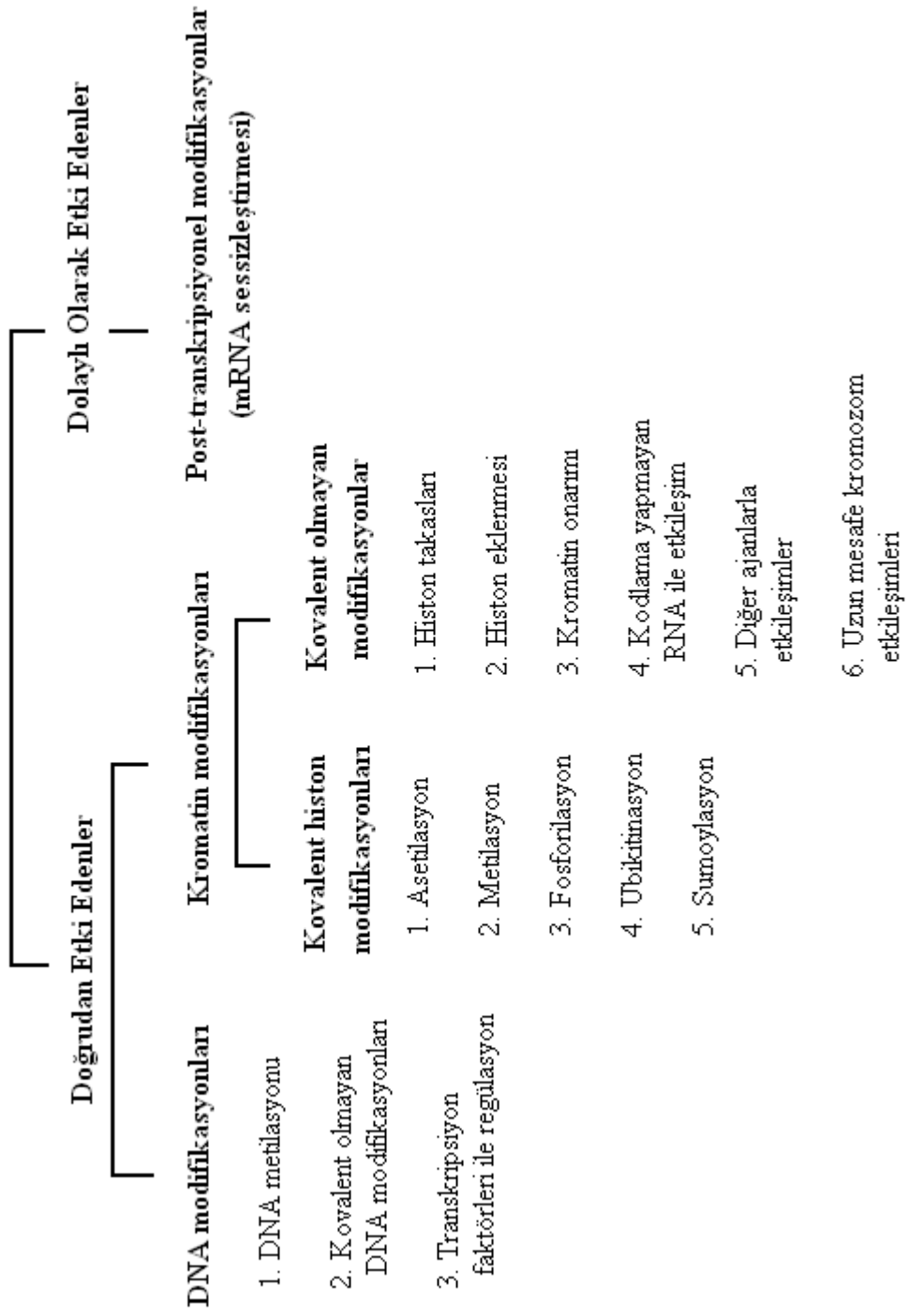
- (a) Eşit olmayan blastomer dağılımı
- (b) Genel ve bölgesel doğumsal bozukluklar: Doğumsal kalp kusurları, nöral tüp kusurları, uzuv anomalileri, kuyruk sokumunda mezodermal kusurlar.
- (c) Genetik diskordans: kromozomal mozaiklik, tek nükleotid polimorfizmi, tek gen mutasyonu, DNA kopya sayısı değişimleri, mitokondri DNA'sında mutasyon.
- (d) Epigenetik diskordans

2.2. EPİGENETİK

Epigenetik, DNA'daki dizi değişimleriyle açıklanmayan, gen anlatımındaki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. DNA metilasyonu, DNA modifikasyonları, genomik imprinting, transgen sessizleşmesi, histon modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon, ubikitinasyon, fosforilasyon, vb.), X kromozom inaktivasyonu, kodlama yapmayan RNA'larla mRNA anlatımının kontrol edilmesi ile "polycomb (PcG)" ve "trithorax (TrxG)" grup proteinleri tarafından yönlendirilen ve kromatinin sessiz kalmasına yol açan kromatin modifikasyonları başlıca epigenetik olaylardır (Murrell ve diğ., 2005) (Şekil 2.5).

Epigenetik değişimler eski haline dönüştürülebilir ve sonraki kuşaklara aktarılabilir. Ancak; bu değişimlerin hücre bölünmesi sırasında yavru hücreye nasıl aktarıldığı tam olarak anlaşılamamakla birlikte (Martin ve Zhang, 2007), kalıtılan epigenetik değişimlerin kromatin durumlarıyla taşındığı düşünülmektedir.

EPIGENETİK MEKANİZMALAR



Şekil 2.5: Epigenetik mekanizmalar

Epigenetik, terim olarak “klasik genetiğin dışında” demektir. Epigenetik mekanizmalar tek tek veya birleşerek bir genin sessizleşmesine ya da anlatım yapmasına neden olurlar. Hastalıklara yatkınlık, içsel ve/veya dışsal çevresel etmenlerin tetiklediği epigenetik modifikasyonlar ile genetik bilginin karmaşık etkileşimleri sonucu oluşur. Daha önceki araştırmalarda DNA düzeyindeki mutasyonlar, delesyonlar, gen birleşmeleri, ardışık duplikasyonlar ve gen amplifikasyonlarının, herhangi bir hastalığa yatkınlık veya hastalık genlerinde anlatımın bozulmasında etkili ana mekanizmalar olduğu belirlenmiştir. Ancak, günümüzde gen anlatımlarının epigenetik olarak değişmesinin de hastalık gelişiminde aynı oranda etkili olduğu anlaşılmıştır.

Memelilerdeki ilk epigenetik çeşitlilik analizleri transgenik fareler üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmalarda tek bir lokustaki epigenetik değişimin fenotipteki etkileri gözlenmiştir. Buna en iyi örnek "Agouti viable yellow (A^{vy})" allelidir. Memelilerde bulunan bir retrotranspozon olan IAP ("intracisternal A particle"), Agouti geninin içine kararlı bir şekilde yerleşir. Bu IAP dizilerindeki metil grupları uzaklaştırıldığı zaman, fare sarı tüylü olur ve diyabete yatkınlık gösterir. Bu diziler metilasyona uğradığı zaman ise Agouti geninin anlatımı yabani tipteki gibi olur ve fare fenotipik olarak normal görünür. Hamile bir fareye uygulanan diyet değişimleri sonucu, yavrularda sarı tüyler de farklı oranlarda gözlenir. Örneğin annenin beslenmesinde betain, metiyonin ve folik asit gibi metil donörleri olarak zengin maddeler bulunuyorsa yavruların renkleri sarıdan agoutiye döner (Waterland ve Jirtle, 2003). Başka bir çalışmada, soya sütünde bulunan genistein maddesi de buna benzer sonuçlar vermiştir (Dolinoy ve diğ., 2006).

Bitki, fare, *Drosophila* ve maya gibi çeşitli organizmalarda epigenetik kalıtım gözlenmiş olmasına karşın (Rakyan ve Beck, 2006) insanda epigenetik kalıtıma dair kanıtlar az sayıdadır. Pembrey ve arkadaşları 2006'da yaptıkları bir çalışmada, ergenlik öncesi sigara içen erkeklerin oğullarında (kızlarında değil) artmış vücut kitle indeksinin sigara içimi ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada, baba tarafından olan büyükbabaların ergenlik öncesi beslenmeleri, erkek torunlarındaki ölüm risk oranını etkilerken; anne tarafından olan büyükannelerin ergenlik öncesi beslenmeleri, kız torunlarının ölüm riski oranıyla bağlantılı bulunmuştur. Bu tip kuşaklar arası etkiler toplumsal faktörlerle açıklanmasına karşın henüz epigenetik bilginin gametler yoluyla doğrudan transferine moleküler bir kanıt bulunamamıştır.

Epigenetik değişimleri başlatan ve devam ettiren üç ayrı ve birbiriyle örtüşen mekanizma tanımlanmıştır: (a) siRNA'lar, (b) histon modifikasyonları ve (c) DNA metilasyonları (Şekil 2.5). Bu işlemler transkript kararlılığını, DNA katlanmasını, nükleozom yerleşimini, kromatin paketlenmesini ve nükleus organizasyonunu etkiler.

(a) Epigenetik mekanizmalardan biri olan siRNA'lar ("small interfering RNAs"), 21-24 baz çifti uzunluğunda çift iplikli RNA'lardır (Mello ve Conte Jr, 2004). Bunlar tek iplikli hale geçerek RISC ("RNA-induced silencing complex") adı verilen protein kompleksleriyle birleşir ve hedef mRNA'ya bağlanıp parçalanmasını sağlar. Böylece mRNA'nın translasyonda kalıp olarak kullanılması engellenmiş olur. Heterokromatin oluşumunun başlaması için çift iplikli RNA'lara (dsRNA) gereksinim vardır. Çeşitli model organizmalarda siRNA mekanizması ile ilgili genler mutasyona uğratıldığı zaman heterokromatin oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (Wassenegger, 2005; Grewal ve Elgin, 2007).

(b) Kromatin yapısını meydana getiren nükleozomlar, 147 baz çifti uzunluğundaki DNA'nın histon oktameri çevresinde dönümler yapması ile oluşur (Campos ve Reinberg, 2009). Histonlar, küresel bir domen ile daha esnek ve yüklü amino ucundan oluşan küçük bazik proteinlerdir. Her histon (H) oktameri, iki ayrı H2A-H2B dimerine tutunmuş, bağlı iki H3-H4 dimerinin oluşturduğu kararlı tetramerden meydana gelir. Her nükleozom 10-60 baz çifti uzunluğundaki DNA ile birbirine bağlanır ve böylece yaklaşık 10 nm çapında kromatin ipliği oluşur. İç kısımdaki her histon proteininin, oktamer içindeki histon-histon etkileşimlerini ve nükleozomal DNA'yı düzenleyen domenleri ile bazik aminoasit bakımından zengin, nükleozom yüzeyinden uzanan 20-35 aminoasit bakiyesi içeren amino-terminal domenleri bulunur. Bu histon kuyrukları denilen bölgeler histon kodunu oluşturur ve nükleozomal dizilerin katlanmasında önemli rol oynar (Jenuwein ve Allis, 2001).

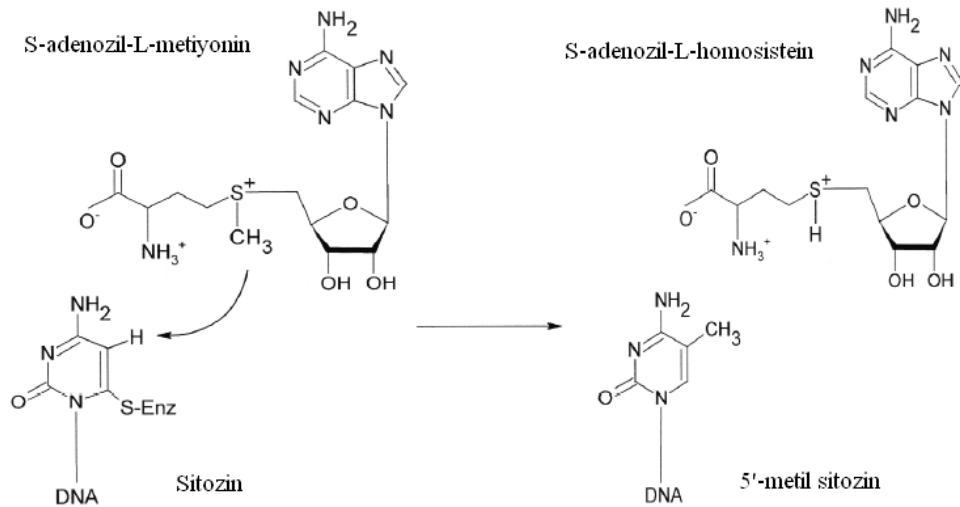
Histonlar çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirirler. Bunlar; lizin (K) ve arjinin (R) bakiyelerinin asetilasyon ve metilasyonu, serin (S) ve treonin (T) bakiyelerinin fosforilasyonu, lizin bakiyelerinin ubikitilasyon, sumoylasyon ve ribozilasyonunu içerir (Berger, 2002). Bu modifikasyonlar histon olmayan proteinlerin kromatin ipliğine bağlanmasını kontrol eder. Son çalışmalar, özgün histon modifikasyon

kombinasyonlarının transkripsiyon, transkripsiyonel baskılama gibi çeşitli biyolojik işlevlerle bağlantılı olduğunu göstermiştir.

(c) DNA metilasyonu; gelişim süresince gen düzenlenmesi, kromatin organizasyonu, CpG bakımından yoğun bölgelerde transkripsiyonel baskılama, tekrarlı ve sentromerik dizilerde sessizleşme, memelilerde genomik imprinting ve dişi memelilerde X kromozomu inaktivasyonunda önemli bir role sahiptir (Goldberg ve diğ., 2007). DNA metilasyonu kararlı ve dölden döle aktarılan önemli bir epigenetik mekanizmadır.

2.2.1. DNA Metilasyonu

İntronlara, tekrarlanan elementlere ve aktif olarak yer değiştiren dizilere sahip kodlama yapmayan DNA'nın uzun süreli sessizleştirilmesi için etkili mekanizmalar gereklidir. Memeliler bunun için sitozin metilasyonunu kullanır (Jones ve Takai, 2001). Sitozin metilasyonu, S-adenozil-L-metiyonin'i metil donörü olarak kullanan metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2.6). Genler metillenmemiş promotörler yardımıyla, bitişiklerindeki anlatımı yapılan ve yapılmayan bölgeler metillenmiş olmasına rağmen anlatım yapabilir. Başka bir deyişle kodlama yapmayan bölgeler baskılanmış halde iken gen promotörleri kullanılıp anlatım düzenlenebilir. Metilasyon aynı zamanda X'e bağlı ve imprint halde bulunan genlerin de uzun süreli sessizleştirilmesinde kullanılır.



Şekil 2.6: Sitozin bazının 5'-metil sitozine dönüşümü. CpG dinükleotidlerindeki sitozinin metilasyonu S-adenozil-L-metiyonin'i metil donörü olarak kullanan metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilir.

Belirli bir bölgeye özgü DNA metilasyonu, bütün canlılarda gözlenen bir epigenetik olaydır. Archaea ve Eubacteria domenlerinde çeşitli şekilde metillenmiş nükleotidlere rastlanır: N4'-metil sitozin (4mC), 5'-metil sitozin (5mC), N6'-metil adenin (6mA) (Pomraning ve diğ., 2009). α -proteobacteria'da GATC dizilerinde gözlenen 6mA, tek hücreli canlılarda en iyi incelenmiş DNA modifikasyonlarından biridir. Genomun korunması, DNA yanlış eşleşme onarımları, DNA replikasyonu ve gen anlatımının düzenlenmesinde iş görür (Marinus, 1987). *Tetrahymena* cinsi gibi bazı ökaryotlarda da 6mA bulunmasına karşın 5mC, ökaryotlarda en yaygın, en çok çalışılan ve en iyi anlaşılmiş olan DNA modifikasyonudur (Ratel ve diğ., 2006).

Çoğu ökaryotta DNA metilasyonunun, DNA-protein etkileşimlerini değiştirerek DNA anlatımını düzenlediği düşünülmektedir. Metilasyon seviyeleri farklı türlerde çeşitlilik gösterir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* ile *Caenorhabditis elegans* genomlarında DNA metiltransferaz genlerine benzer diziler bulunmakla birlikte (Colot ve Rossignol, 1999), çeşitli yöntemler denendiği halde DNA metilasyonu saptanamamıştır (Volpe ve diğ., 2002). DNA metilasyon araştırmaları için en çok kullanılan iki fungi, *Neurospora crassa* ve *Ascobolus immersus*'ta bütün olası bölgelerde heterojen 5mC modifikasyonu bulunmaktadır. Bu türlerde metilasyonun, genomun dışarıdan gelen transpozisyon yapan dizilerden korunması için yapıldığı düşünülmektedir (Selker ve diğ., 2003).

Arabidopsis thaliana'da 5mC modifikasyonu, CpG, CpHpG ve CpHpH (H: A, C veya T'yi temsil eder) bölgelerinde simetrik veya simetrik olmayan şekilde yoğun olarak gözlenmektedir. Genom boyutunda yapılan metilasyon haritaları çalışmalarında, perisentromik heterokromatin, tekrarlanan diziler ve siRNA oluşturan dizilerin yoğun bir şekilde metillendiği ortaya çıkmıştır. Anlatım yapan genlerin 1/3'ünden fazlasında gen içinde yoğun metilasyon gözlenirken, genlerin promotör bölgelerinin sadece ~%5'inde metilasyona rastlanmıştır. Bununla birlikte; gen içinde metilasyona uğramış genlerin devamlı bir şekilde yoğun olarak anlatımı yapılırken, promotörleri metillenmiş genlerin dokuya özgü anlatım yaptığı ortaya çıkmıştır (Zhang ve diğ., 2006).

Drosophila melanogaster'in metilasyona uğramadığı düşünülürken genomlarında DNA metiltransferaza benzer bir gen bulunmuştur (Hung ve diğ., 1999) ve CpG'den çok CpT

adalarında düşük seviyede 5mC'lere sahip olduğu gözlenmiştir (Gowher ve diğ., 2000). Bunlarla birlikte omurgalı genomları en yüksek oranda 5mC modifikasyonuna sahiptir. Metilasyon, genomun büyük çoğunluğuna dağılmıştır (Bird, 2002).

İnsan somatik hücrelerindeki toplam DNA bazlarının ~%1'ini 5mC'ler oluşturur ve bu metillenmiş sitozin bazıları genomdaki bütün CpG dinükleotidlerinin %70-80'ini etkiler. Omurgalılarda, organizmalardaki türler arası DNA metilasyonunun farklı görevlerde rol oynaması sonucu çeşitli metilasyon oranları gözlenebilmektedir (Bird, 2002). Farelerde embriyonik gelişim sırasında somatik hücrelerde genel olarak gözlenen metilasyon oranında ~%30'luk ani bir azalma meydana gelir (Kafri ve diğ., 1992). Fareler ve büyük olasılıkla diğer memeliler için de embriyonik demetilasyon ve ardından gelen *de novo* metilasyon, somatik DNA metilasyon profillerinin oluşturulması için büyük önem taşır. Metilasyonda genom düzeyinde bir düşüş, proliferasyon evreleri sırasında öncül germ hücrelerinde de gözlenmektedir (Reik ve diğ., 2001).

2.2.2. DNA Metiltransferazlar

Memeli gelişiminde DNA metilasyonu çok önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmalar sonucu 4 tane aktif DNA sitozin metiltransferaz bulunmuştur: DNMT1, DNMT2, DNMT3a ve DNMT3b (Okano ve diğ., 1998). DNMT1 geni, şempanze, köpek, inek, fare, sıçan, tavuk, zebra balığı, *Arabidopsis thaliana* ve pirinçte korunmuştur ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1786?log\\$=activity](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1786?log$=activity) 08.12.2009).

DNA sentezi sonrası sitozinlerin 5' pozisyonlarına metil grubunun eklenmesi ile DNA sarmalındaki büyük oluğun görünümü değişir ve bu oluktan DNA'ya bağlanan proteinler, bağlanamaz hale gelir. DNA üzerindeki bu epigenetik işaretler, DNA sentezi sonrasında kopyalanabilir ve kromatin yapısındaki kalıtılabilir değişiklikleri oluşturur. CpG'ce zengin promotörlerin metilasyonu memeliler tarafından transkripsiyonun başlamasını engellemek, inaktif X kromozomundaki genlerin, imprint genlerin ve parazit DNA'nın sessiz kalmasını sağlamak için kullanılır. Metilasyon, transkripsiyonun başlamasını engellerken, memelilerde transkriptin uzamasını engellemez (Jones, 1999). Ancak *Neurospora*'da transkriptin uzaması engellenir (Rountree ve Selker, 1997). Metilasyonun bu özelliği, memeli hücrelerinin genomlarına giren ve memeli genlerinin düzenlenmesine müdahale etmeyen parazitlerde transkripsiyonun engellenmesine

yardımcı olmaktadır.

2.2.2.1. DNMT1

DNMT1, DNA replikasyonu sonrasındaki yarı yarıya metillenmiş DNA'ya afinite gösterdiği için koruyucu metilaz olarak isimlendirilmektedir (Pradhan ve diğ., 1999). Yeni sentezlenmiş bir DNA molekülündeki metillenmemiş zincirin, replikasyondan önceki metilasyon motifini sürdürmesini sağlar. DNMT1'in olmaması ölümcüldür; DNMT1 sentezleyemeyen fare embriyoları, genom boyutunda demetilasyona uğradığı için gastrulasyon aşamasından sonra ölmüştür (Li ve diğ., 1992). DNMT1'in aşırı anlatımı ise kanser hücre hatlarında CpG adalarında *de novo* metilasyona yol açmıştır (Rhee ve diğ., 2000).

2.2.2.2. DNMT2

DNMT2'nin tam görevi anlaşılamamıştır. Sitozin metiltransferazların korunmuş motifini içermesine karşın, *in vitro* aktivitesi gözlenmemiştir (Okano ve diğ., 1998b). Sentromerik bölgeleri kontrol ettiği düşünülmektedir (Warburton, 1999; Dong ve diğ., 2001).

2.2.2.3. DNMT3a ve DNMT3b

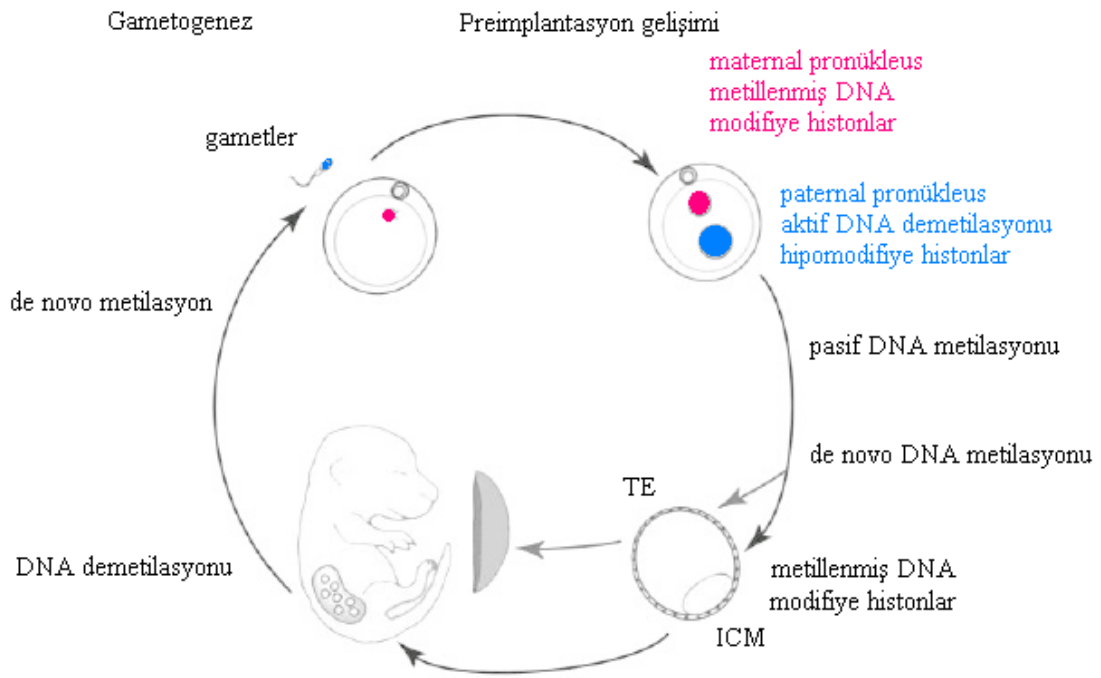
DNMT3a ve DNMT3b, *de novo* metiltransferaz aktivitesi gösterir ve erken embriyogenez sırasında önemli rol oynarlar (Okano ve diğ., 1999). Farelerde döllenmeden sonra zigot genomu, belli bazı imprint bölgeler dışında demetilasyona uğrar. Genom boyutunda *de novo* yeniden metillenme DNMT3a ve DNMT3b ile olur ve normal memeli gelişimi için gereklidir (Reik ve diğ., 2001). DNMT3a ve DNMT3b enzimleri olmayan farelerde anormal morfoloji ve gastrulasyondan kısa bir süre sonra ölüm gözlenmiştir. *De novo* metilasyon olmamasına karşın bu mutantların daha önceki metilasyon motiflerini korumaları DNMT1 aktivitesine bağlanmıştır. DNMT3a veya DNMT3b enzimlerinin sadece birini sentezleyebilen farelerde farklı gelişimsel bozukluklar ve yaşam süreleri gözlenmiştir (Okano ve diğ., 1999).

2.2.3. Epigenetik Yeniden Programlama

İnsan vücudundaki her tip hücre; genotipi, gelişimsel özellikleri ve çevresel etkileri yansıtan kendine özgü bir epigenetik profile sahiptir. Bu özellikler hücrenin ve organizmanın fenotipinde de gözlenir. Vücuttaki çoğu hücre tipi için bu epigenetik işaretler hücreler farklılaşmasını tamamladığı veya hücre döngüsünden çıktığı andan

itibaren sabitlenir ve değişmez. Ancak normal gelişim veya hastalık durumlarında bazı hücreler nükleustaki epigenetik işaretlerin silinmesi ve farklı işaretlerin kaydedilmesi gibi epigenetik yeniden programlamaya uğrarlar (Morgan ve diğ., 2005).

Başlıca yeniden programlama öncül germ hücrelerinde gözlenir. Bu hücrelerde parental imprintler silinir ve totipotensi korunur. Kanser hücreleri gibi farklılaşma özelliğini yitiren hücrelerde de yeniden programlama olur (Feinberg ve Tycko, 2004). Döllenme sırasında çoğu gametik işaretler silinip embriyonik gelişim ile toti- veya pluripotensi için gerekli embriyonik işaretler eklenir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Epigenetik yeniden programlama döngüsü. Epigenetik modifikasyonlar yaşam boyunca iki kere yeniden programlanır: gametogenez ve preimplantasyon gelişimi sırasında. TE: Trofektroderm. ICM: "Inner cell mass"

Ebeveyn genomları hücre döngüsünün farklı aşamalarında bulunur ve çok farklı epigenetik işaretlere ve kromatin organizasyonuna sahiptirler. Paternal genom, olgun sperm tarafından tek kopya halinde alınır. Genetik bilgi histonlar yerine çoğu yerde protamin tarafından yoğun olarak paketlenir. Buna karşın maternal genom metafaz II aşamasında durmuş olarak bulunur ve iki kopyalı halde histonlar tarafından paketlenir

(Morgan ve diğ., 2005). Dölllenme sonrası, sperm kromatinindeki protaminler histonlarla hızlı bir şekilde yer değiştirirken, maternal genom da mayozu tamamlar.

Yapılan çalışmalar sonucunda paternal kromatinle ilişkili H3 ve H4 histonlarının maternal kromatindekilerden daha fazla asetillenmiş halde olduğu saptanmıştır (Santos ve diğ., 2002). Farelerle yapılan indirekt immünofloresans ile tek gen ve tekrarların bisülfid dizilenmesi araştırmaları, histon kazanımından sonra paternal genomda, genom çapında DNA metilasyon kaybı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Fulka ve diğ., 2004; Lane ve diğ., 2003). Demetilasyon, paternal pronükleusta DNA replikasyonundan önce meydana gelir. Ancak, bu aşamada sentromer içinde ve çevresinde bulunan heterokromatin diziler, IAP retrotranspozonları ve paternal metillenmiş imprint genler demetilasyona uğramazlar.

2.2.4. DNA Metilasyonlarının Hastalıklarla İlişkisi

2.2.4.1. Kanser

CpG dinükleotidlerindeki DNA metilasyonunun kaybolması, kanser hücrelerinde tanımlanan ilk epigenetik anormalliktir (Feinberg ve Vogelstein, 1983). Kanserlerin daha çok ileri yaşlarda ortaya çıktığı düşünüldüğünde, DNA metilasyon profillerinin yaşa bağlı olarak değiştiğinin gözlenmesi ile kanser ve DNA metilasyonu arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmüştür (Piyathilake ve diğ., 2003). Kanser türlerinin çoğunda, genomda tekrarlanan DNA dizilerinde ve intronik dizilerde yaygın hipometilasyon gözlenmektedir (Weber ve diğ., 2005). Kanser hücreleri iyi huylu formdan metastatik forma dönüşürken hipometilasyon seviyelerinde artış gözlenir (Fraga ve diğ., 2004). DNA hipometilasyonu ile kanser arasındaki ilişkinin 3 mekanizma ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir: (a) genomik instabilitenin artması, (b) transpozisyon yapan dizilerin reaktivasyonu ve (c) imprinting'in ortadan kalkması (Esteller, 2008). Rahim kanserinde, HPV (Human Papilloma Virus) genomunun hipometilasyon sonucu aktive olması da söz konusudur (Badal ve diğ., 2003). İnsanda *de novo* metiltransferaz olan DNMT3b'nin iş görememesi durumunda kanser hücrelerinde anöploidi artışı gözlenmiştir (Karpf ve Matsui, 2005).

Genom boyutunda yaygın hipometilasyonla beraber, kanser hücrelerinde genomun bazı bölgelerinde *de novo* hipermetilasyon da gözlenmektedir (Mulero-Navarro ve Esteller,

2008). Özellikle tümör baskılayıcı ve hücre farklılaşması ile ilgili genlerin hipermetilasyon ile inaktivasyonu, kanser başlangıcını tetikleyebilir. CpG adalarındaki hipermetilasyon, kanserde önemli düzenleyici mikroRNA (miRNA)'ların sessizleşmesine de neden olabilir. miRNA'lar kısa, 18-22 nükleotid uzunlukta kodlama yapmayan RNA'lardır. Hücre çoğalması, programlı hücre ölümü ve hücre farklılaşması gibi hücrel olayları, özgün hedef genleri transkripsiyonel olarak baskılayarak düzenler (Calin ve Croce, 2006).

2.2.4.2. Gelişimsel hastalıklar

Erken gelişim evrelerinde embriyo demetilasyona uğrar ve neredeyse tüm CpG metilasyonları kaybedilir (Reik ve diğ., 2001). Hızlı hücre çoğalması sırasında genomik metilasyon profilinin yeniden oluşturup korunabilmesi için beslenme ile sağlanan yeterli düzeyde metil donörlerine (örneğin metiyonin) ve kofaktörlere (örneğin folik asit) ihtiyaç vardır (Waterland ve diğ., 2006). Dünyada farklı bölgelerdeki kıtlık zamanında doğan bireyler incelenerek, bu dönemdeki yetersiz folat alımının, genom metilasyonunu azaltarak (Castro ve diğ., 2003), kişilik bozuklukları ve merkezi sinir sisteminde konjenital anomaliler gibi çeşitli hastalıklara yol açtığı saptanmıştır (Susser ve diğ., 1998; St Clair ve diğ., 2005).

DNA metilasyonundan sorumlu genlerdeki bozukluklar da hastalık gelişimine neden olabilir. Örnek olarak, imprinting kaybı sonucu zeka geriliği ve davranışsal bozukluklarla karakterize edilen Prader-Willi sendromu ve Angelman sendromu verilebilir. İlgili genlerin diğer allellerinde, delesyon veya *de novo* metilasyon oluşması sonucu hastalık gelişir. DNA metilasyonu ile bağlantılı diğer hastalıklar ise tekrarlı dizilerin instabilitesi sonucu gözlenir. Frajil X sendromu, erkeklerde kalıtılan zeka geriliğine yol açar. Bu X'e bağlı bozuklukta, FMR1 (frajil X mental retardasyon 1) geninin 5' UTR bölgesindeki polimorfik CGG tekrarları hipermetilasyona uğrayıp genin sessizleşmesine neden olur (Crawford ve diğ., 2001).

2.2.4.3. Otoimmün hastalıklar

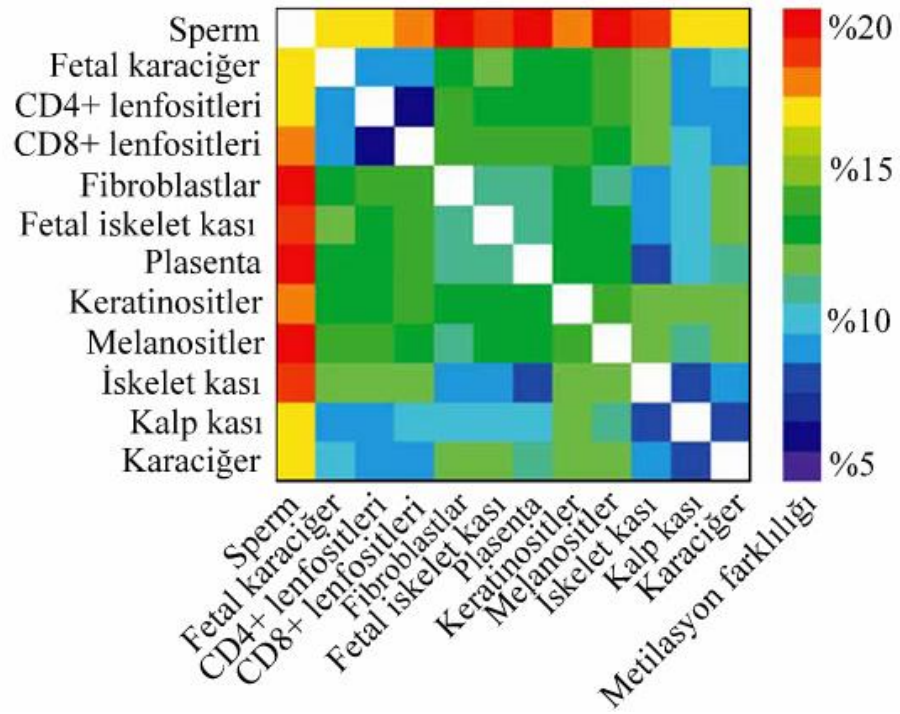
Otoimmün hastalıklar, bir organizmanın kendi hücrelerine veya dokularına karşı ürettiği immün cevap ile karakterize edilir. DNA metilasyonu ile otoimmün bozukluklar arasındaki bağlantı en iyi romatizmal hastalıklarda tanımlanmıştır (Rahman ve Isenberg, 2008).

2.2.5. İnsan Epigenom Projesi (HEP)

İnsan Epigenom Projesi, İnsan Epigenom Kurulu tarafından yürütülen hem kamusal hem özel bir işbirliğidir. Bütün insan genlerinin çoğu dokuda genom boyutundaki metilasyon profillerini tanımlamayı, kataloglamayı ve yorumlamayı amaçlamaktadır. Metilasyonun, genom, hastalık ve çevre arasındaki tam olarak çözülememiş bağlantıyı kurduğu düşünülmektedir (<http://www.epigenome.org/index.php?page=project> 13.10.2009). Metillenmiş sitozinler, doku tiplerine ve hastalık durumlarına özgü farklı motifler gösterir. Bu gibi değişken metilasyon pozisyonları (MVPs = “methylation variable positions”), yaygın epigenetik markerlardır.

Pilot bir çalışma olarak insanda 6. kromozomda (6p21.3) bulunan “Major Histocompatibility Complex (MHC)”in DNA metilasyon haritası çıkarılmış ve sonuçlar 2004 yılında yayınlanmıştır (Rakyan ve diğ., 2004). MHC, insanda en yoğun gen oranına sahip olmakla birlikte, çoğunlukla bağışıklıkta rol oynamak üzere çok çeşitli farklı fonksiyonlara sahip genler içerir. Pilot çalışma 1999 yılında başlatıldığı zaman MHC bölgesinin tam olarak dizilenmiş olan birkaç bölgeden biri olması, genomdaki en polimorfik bölge olması ve birçok hastalıkla doğrudan ilişkili olması, bu bölgenin çalışma için seçilmesinde etkili olmuştur (Rakyan ve diğ., 2004). Çalışmada, farklı kişilerden alınmış 34 örnekte beyin, meme, akciğer, karaciğer, yağ, kas ve prostat dokularının metilasyon profilleri karşılaştırılmış ve amplikonların %10’unun dokular arasında farklı metilasyon profili oluşturduğu gözlenmiştir.

İnsan Epigenom Projesi kapsamında 2006 yılında yapılan bir başka çalışmada, insanda 6, 20 ve 22. kromozomların metilasyon profilleri incelenmiştir. Bu çalışmada 42 farklı örnekte, 12 farklı sağlıklı doku karşılaştırılmıştır (Eckhardt ve diğ., 2006). Dokular arası (Şekil 2.8) ve bireyler arası karşılaştırmaların yanı sıra, bazı ortolog amplikonlarda türler arası (insan ve fare) metilasyon profillerinin korunma derecesi de araştırılmıştır. 2009 yılında ise insana ait B hücrelerinin metilom analizi sonuçları 100 baz çiftlik çözünürlükle yayınlanmıştır (Rauch ve diğ., 2008). Bu çalışma sonucunda, gen içindeki bölgelerin metillenmiş olmasının transkripsiyonu azaltmayı artırıldığı ve bölgesel duplikasyonların çoğunlukla metillenmiş durumda buldukları anlaşılmıştır.

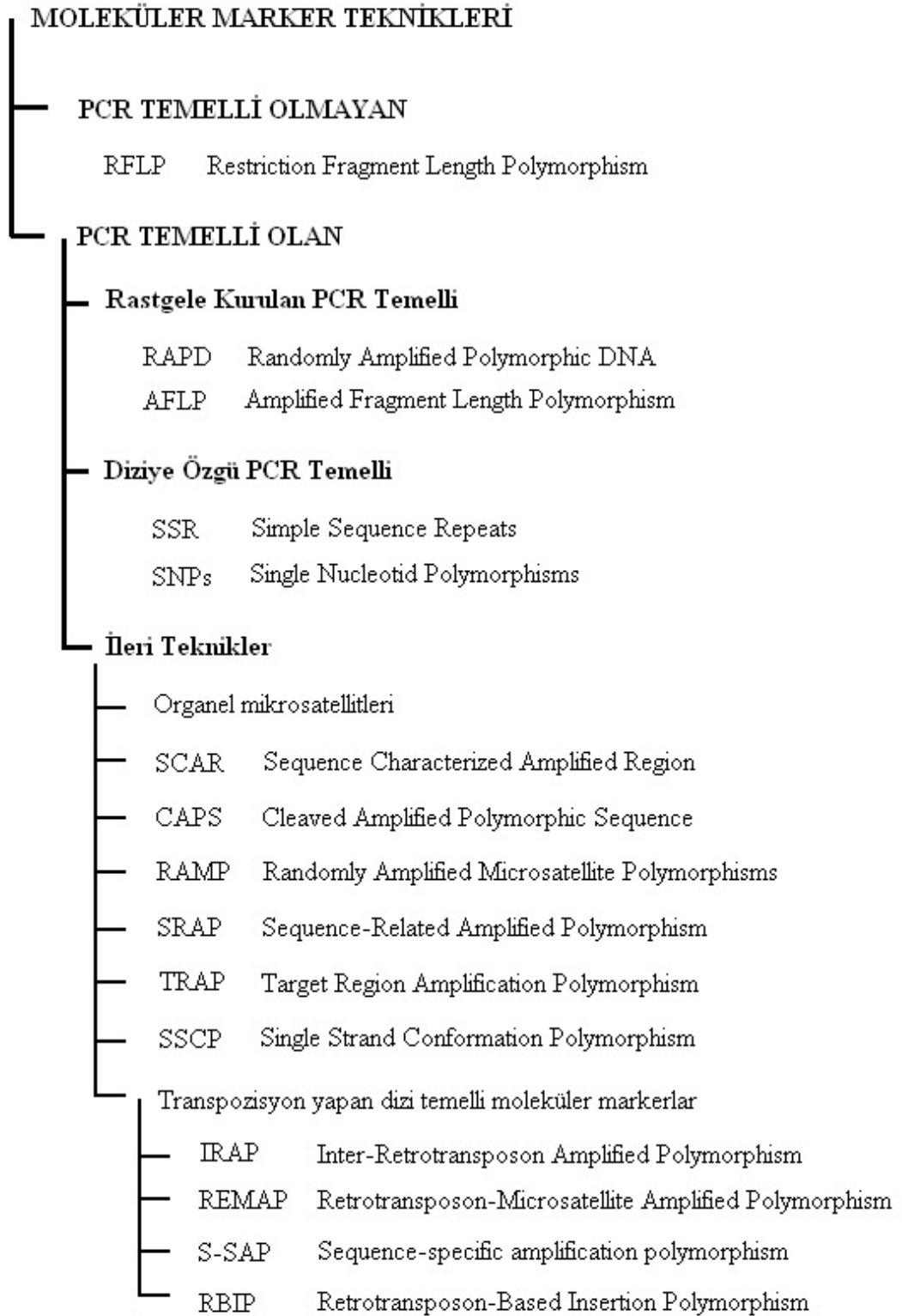


Şekil 2.8: Çeşitli hücre tipleri ve dokuları arasındaki metilasyon farklılıkları oranları. Oranlar ikili karşılaştırmalar sonucu elde edilmiştir. Mavi renkten kırmızıya doğru değişim, metilasyon farkı yüzdesinde %5'ten %20'ye doğru değişimi temsil etmektedir.

2.3. MOLEKÜLER MARKER ANALİZ YÖNTEMLERİ

Moleküler veya genetik marker; genellikle tanımlama, sınıflandırma, genom haritalama, moleküler evrim araştırmaları, kimliklendirme veya teşhis için kullanılan, genomda hangi kromozomda ve bölgede bulunduğu bilinen bir DNA parçasıdır. Bu parça bir gen veya bilinen hiçbir fonksiyonu olmayan bir dizi olabilir. Moleküler marker analizleri genel olarak 3 temel yöntem ile yapılır: (a) Restriksiyon enzimi kullanımı, (b) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), (c) Restriksiyon kesimi sonrası PCR uygulaması. Bu temel yöntemlerden çeşitli analiz yöntemleri geliştirilmiştir (Şekil 2.9).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği; çoklu amplifikasyon ürünlerinin kalıp DNA baz alınarak, kısa dizili oligonükleotidler (primer), DNA polimeraz enzimi ve 4 çeşit nükleotid kullanımı ile *in vitro* olarak sentezlenmesine dayanır. İşlem basamaklarında kullanılan sıcaklık değerleri ile primer uzunluklarının/nükleotid içeriklerinin değiştirilmesi ve başka işlemlerin eklenmesi ile farklı PCR yöntemleri geliştirilmiştir.



Şekil 2.9: DNA temelli bazı moleküler marker teknikleri.

Minisatellit (M-Sat) yöntemi, DNA markerları arasında ilk geliştirilen sistemdir. Yöntemde ardışık tekrarlı DNA dizilerinin bir bölümü prob olarak kullanılarak genomlar arasındaki minisatellit farklılığı belirlenmektedir. Southern hibridizasyon ve izotop veya floresan etiketleme gerektirir. Kaliteli ve bol miktarda genomik DNA'ya gerek duyulur ve bu sistemde genellikle eş-baskın markerlar üretilir. Bu yöntemin yeni bir versiyonu olan DAMD ("Directed Amplification of Microsatellite DNA"), PCR tabanlı olmakla birlikte; southern hibridizasyon, izotop veya floresan etiketleme gerektirmemektedir.

SSR ("Simple Sequence Repeats"), genomda bulunan ardışık tekrarlı (düzenli veya değişken) mikrosatellit alanları üstten ve alttan çevreleyen özel primer çiftleriyle çoğaltarak ardışık tekrar sayısındaki polimorfizmi belirler. Bu yöntem PCR tabanlı olup az miktarda DNA'ya gerek duyar ve oldukça yaygın kullanımı olan eş-baskın marker sistemidir. Bu yöntemde mikrosatellit alanlarındaki polimorfizm, marker olarak kullanılmakla birlikte, özellikle son dönemlerde bu yöntem kullanılarak mikrosatellitlerin genomdaki dağılımları, işlevleri ve gen anlatımı üzerindeki etkileri de çalışılmaktadır.

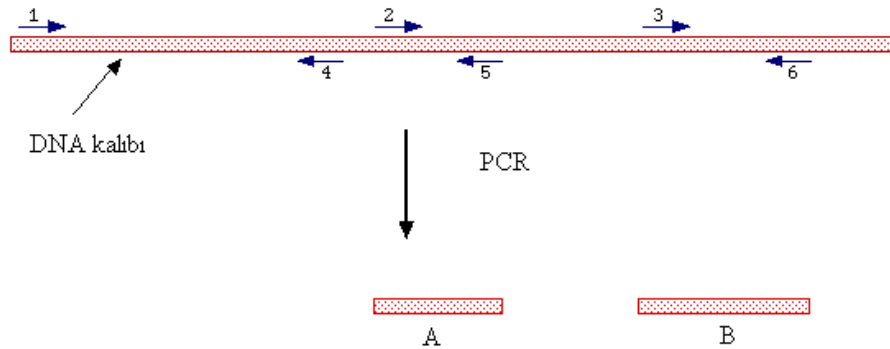
I-SSR ("Inter-Simple Sequence Repeats"), genomda bulunan ardışık tekrarlı DNA kısımları arasındaki uzunluk farkını belirler. PCR tabanlı olup az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyar ve genellikle baskın marker üretir. Bu yöntemin oluşturduğu polimorfizm, iki mikrosatellit alanı arasındaki büyüklük farkı ile ortaya çıkmaktadır; ancak SSR kadar güvenilir bir yöntem değildir. Agaroz jel elektroforez ayırma tekniğini kullanması ve üzerinde çalışılan organizmanın genomik dizilerinin bilinmesine gerek duymaması nedeni ile bazı araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir.

RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), bir veya daha fazla DNA probu kullanılarak, genomlar arasındaki farklılıkların belirlenmesi temeline dayanan bir marker tekniğidir. Southern hibridizasyon, izotop veya floresan etiketleme gerektirir. PCR tabanlı olmaması nedeniyle, oldukça kaliteli ve de bol miktarda genomik DNA'ya gerek duyulur. Bu marker sistemi genellikle eş-baskın marker üretmekle birlikte, baskın markerlar da elde edilebilmektedir.

AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”), RAPD ve RFLP yöntemlerinin birleşmesi ile oluşturulmuş bir marker sistemidir (Vos ve diğ., 1995). Bu teknikte genomik DNA genellikle iki özel restriksiyon enzimi ile kesilir. Kesim noktalarına özel adaptörler bağlanır ve bu adaptör DNA dizisine bağlanabilen primer çiftleri ile seçici olarak çoğaltılmış olan DNA parçalarının oluşturduğu polimorfizme dayanır. Genellikle poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş nitrat etiketleme yöntemi ile analiz edilir. Bu yöntem günümüzde kapiller jel elektroforezi ile kullanılmaktadır. Genellikle baskın marker vermesi ve karmaşık bant profili oluşturması dezavantajlarındandır.

2.3.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”); genomik DNA kullanılarak seçilen organizmanın polimorfik profillerinin oluşturulmasında kolay ve kısa süren bir yöntemdir. Bu yöntemde 10 nükleotidlik tek bir primerin genoma rastgele bağlanmasıyla farklı boyutlarda DNA parçaları oluşur (Williams ve diğ., 1990). Amplifikasyon için primerlerin tamamlayıcı dizileri ile hibridize olmaları ve karşılıklı iki primer arasındaki mesafenin 3-4 kb’den uzun olmaması gerekmektedir (Şekil 2.10). İyi seçilmiş primerlerle farklı bireylerden farklı profiller elde edilebilir. Primerlerin %40-60 oranında GC içermesi ve tekrarlı dizilerin veya palindromların olmaması önemlidir (Roux, 1995).



Şekil 2.10: RAPD tekniğinde DNA'nın tek primer ile çoğaltılması

Oluşan DNA profilleri bireyler arasında; (1) primer bağlanma bölgelerinin olup olmamasına, (2) bağlanmanın tam komplementer olup olmamasına, (3) primer bağlanma bölgeleri arasındaki uzaklığa göre farklılık gösterebilir. Özellikle primer bağlanma bölgesinin 3' ucundaki nokta mutasyonları, inversiyon, delesyon, adisyonlar veya büyük kromozomal yeniden düzenlenmeler primer bağlanma bölgelerini ya da

aralarındaki uzaklığı değiştirerek farklı bant görünmesine neden olur; bir bant kazanılır veya gözlenen bir bant kaybedilir. Farklı moleküler ağırlığa sahip RAPD bantları, ayrı lokus olarak ve bant olup olmamasına göre (+/-) değerlendirilir (De Wolf ve diğ., 2004).

RAPD yönteminin hızlı ve kolay olması, genomik haritalama için yüksek sayıda marker oluşturması, genomik dizi bilgisine ihtiyaç duymaması ve az miktarda kalıp DNA'ya ihtiyaç duyması gibi üstünlüklerine rağmen, yöntemin tekrarlanabilirlik yönünden duyarlılığı çeşitli koşulların aynı olmasına bağlıdır: DNA'nın konformasyonu ve kalitesi, primer/kalıp DNA oranı, primer bağlanma sıcaklığı, PCR tamponundaki katyon konsantrasyonu ve magnezyum miktarı (Ellsworth ve diğ., 1993). Bu koşulların yanı sıra farklı ticari firmalardan alınan polimerazlar ile farklı PCR aletlerinin kullanımı da farklı bant oluşmasına neden olabilir (Meunier ve Grimont, 1993). Diploid organizmalarda gözlenen tek dominant bant olduğu için, genomik allelin homozigot ya da heterozigot olduğunun anlaşılması güçtür (Dassanayake ve Samaranayake, 2003).

2.3.2. DNA Metilasyon Markerları

Bölüm 2.3'te anlatılmış olan benzer tekniklerle iki grup DNA arasındaki metilasyon farklılıkları da saptanabilir. Klinik örneklerin karşılaştırılmasıyla, araştırılan hastalığa ait metilasyon markerları elde edilebilmektedir. Bir kanser hastasına ait kanserli hücreler ile normal hücrelerin metilom analizi ile kansere yatkınlık belirlenebilir. Aynı dokuya ait, hastalık gelişen hücrelerin hastalığın farklı evrelerinde (normal hücreden metastatik hücreye dönüşüm) analizi ile evreye özgül metilasyon markerları bulunabilir. Örneğin, kolorektal kanser gözlenen bireylerin kan hücreleri de dahil olmak üzere normal hücrelerinde, kontrol gruba kıyasla genomik imprinting kaybı gözlenmiştir (Kim ve diğ., 2010).

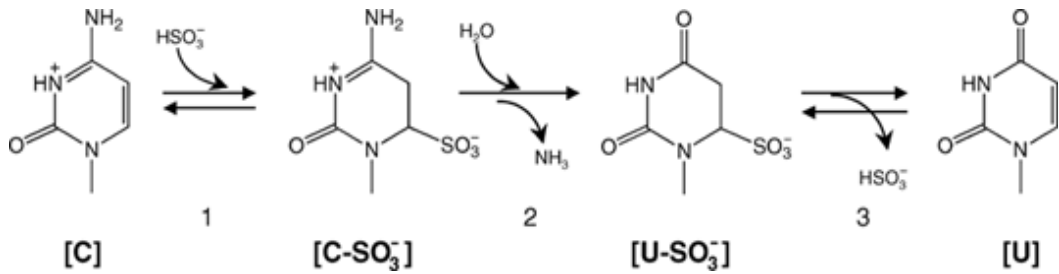
2.4. DNA METİLASYON PROFİLLERİNİN ANALİZİ

Feinberg, bir hücredeki DNA metilasyon modifikasyonlarının tamamını belirtmek için “metilom (“methyloome”)” terimini öne sürmüştür (Feinberg, 2001). Metilom analizleri, genom ve hastalıklar ile toplumlardaki polimorfik çeşitliliğin anlaşılmasında önemlidir. Bu analizler için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bütün bu yöntemler temel 3 teknikten birine dayanmaktadır (Zilberman ve Henikoff, 2007): (1) bisülfid dönüşümü, (2)

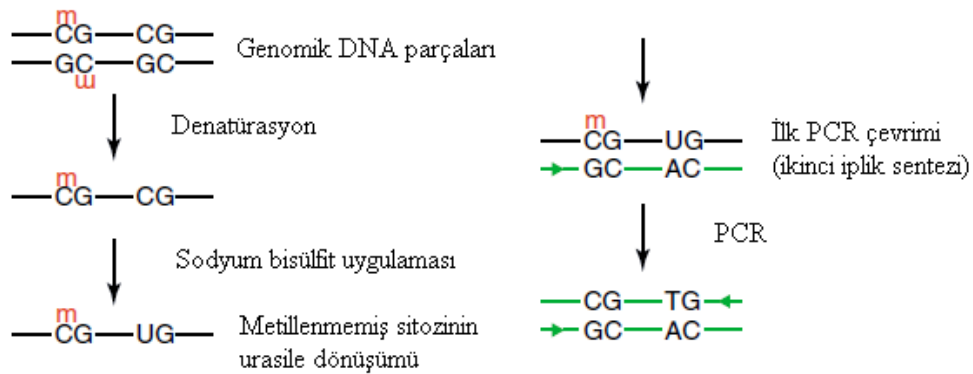
metillenmiş DNA'nın afinite ile saflaştırılması ve (3) metilasyona duyarlı restriksiyon enzimi ile kesim.

2.4.1. Bisülfid Dönüşümü

Metillenmiş sitozin ile metillenmemiş sitozin, standart dizileme yöntemleri ile ayırt edilemez; ancak genomik DNA denatüre edilip sodyum bisülfid uygulandığında, uygun koşullar altında, metillenmemiş sitozin deaminasyona uğrayarak urasile dönüşürken (Şekil 2.11), metillenmiş sitozin aynen kalır. Bisülfid uygulamasından sonra DNA'nın PCR ile çoğaltımı sonucu urasil, timine dönüşür (Şekil 2.12). Burada dikkat edilmesi gereken nokta DNA'nın artık tamamlayıcı olmadığıdır. Bu yüzden istenilen DNA dizisinin metilasyon durumunu belirleyebilecek primerler tasarlanmalıdır. PCR ürünlerinin analizi Sanger dizileme (Eckhardt ve diğ., 2006) veya mass spektrofotometri (Ehrich ve diğ., 2008) ile yapıлып her bir sitozinin metilasyon durumu saptanabilir.



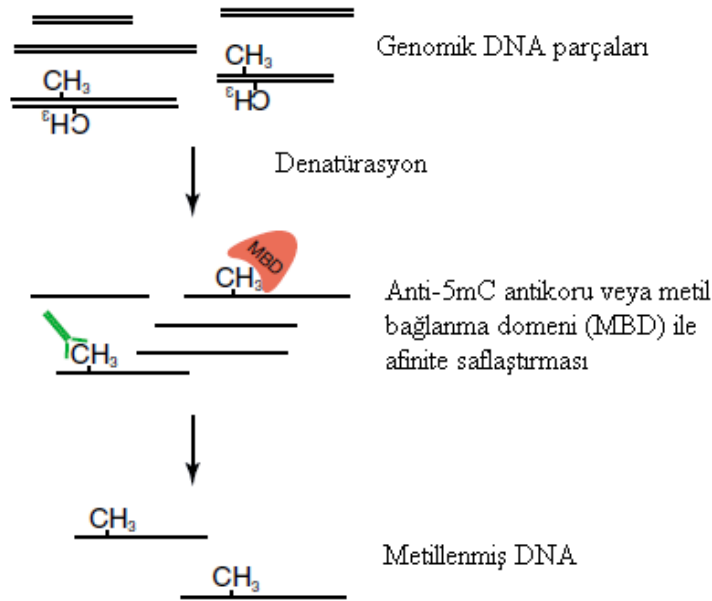
Şekil 2.11: Metillenmemiş sitozinin sodyum bisülfid uygulaması sonucu urasile dönüşümü. [C]: sitozin, [U]: urasil



Şekil 2.12: Bisülfid dönüşümü. DNA denatüre edilir ve sodyum bisülfid uygulaması ile metillenmemiş sitozinler urasile dönüşür. Urasil de PCR sonucu timine dönüşür.

2.4.2. Afinite Saflaştırması

Metillenmiş DNA parçalarının elde edilmesinde kullanılan en yeni ve zahmetsiz yöntem afinite saflaştırmasıdır (Zilberman ve Henikoff, 2007). Metillenmiş CG bölgelerine bağlanan metil bağlanma domeni (MBD) ile metillenmiş DNA elde edilebilir (Zhang ve diğ., 2006). Bunun için *E. coli*'de anlatımı yapılan işaretlenmiş bir MBD kullanılır. Bunun yanı sıra ticari olarak bulunabilen ve metillenmiş sitozini tanıyan monoklonal antikolar da metillenmiş DNA'nın elde edilmesinde kullanılabilir (Weber ve diğ., 2007) (Şekil 2.13).



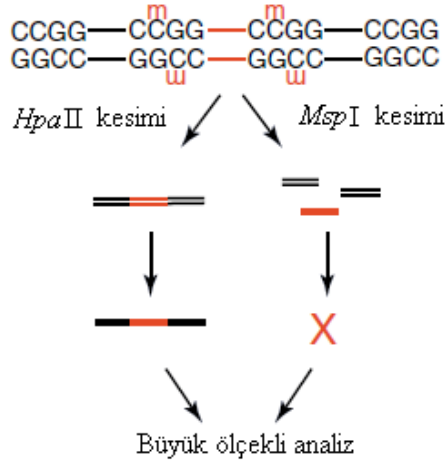
Şekil 2.13: Metillenmiş DNA'nın afinite saflaştırma yöntemi ile elde edilmesi. Genomik DNA denatüre edilir, kolona eklenmiş uygun antikor (yeşil) veya MBD proteini (kırmızı) ile metillenmiş DNA'nın ayrışması sağlanır.

2.4.3. Metilasyona Duyarlı Restriksiyon Enzimleri İle Kesim

Restriksiyon endonükleazları, bakteriler tarafından yabancı DNA'ların kesilmesi için savunma amaçlı üretildiği düşünülen enzimlerdir. Bu enzimler çift zincirli DNA molekülünün şeker-fosfat omurgasında iki kırık yaparak küt veya yapışkan uç oluşmasını sağlar. Bakteri, kendi DNA'sını metilleyerek kendi ürettiği enzimin kesimine karşı korunur.

Metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri, metilasyon analizlerinde sıklıkla kullanılır. Karşılaştırmalar genellikle: a) tek veya birkaç enzim kesimi yapılmış örnek ve hiç

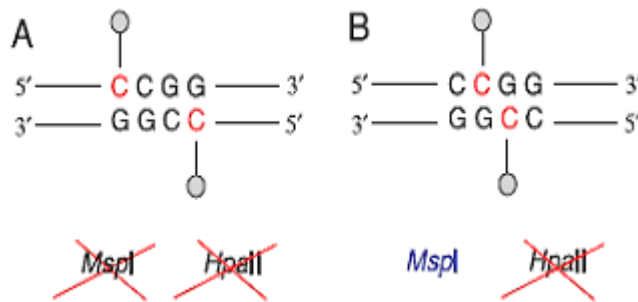
enzim uygulanmamış kontrol arasında; b) metilasyona duyarlı bir enzimle kesilmiş örnek ve metilasyona duyarsız olan izoşizomeri ile kesim yapılmış kontrol arasında (Şekil 2.14) veya c) iki farklı doku ya da mutant ve yabancı tip gibi iki deney örneği arasında yapılabilir.



Şekil 2.14: DNA metilasyonunun metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri ile saptanması. Metil grubu (m) bağlanmış DNA bölgesi, *HpaII* (solda) ve *MspI* (sağda) enzimleri ile kesilir. Metillenmemiş DNA kesime uğrayacağı için PCR ile çoğalmaz. PCR sonrası, *HpaII* kesimi olan örnekte, *MspI* kesimi olan örnekten daha fazla metillenmiş DNA parçaları bulunur.

2.3.3.1. *HpaII* ve *MspI* enzimleri

HpaII enzimi, *Moraxella* türlerinden, *MspI* enzimi ise *Haemophilus parainfluenzae*'dan elde edilir. İki enzimin de tanıma dizileri aynıdır: 5'-CCGG-3'. Restriksiyon kesimi iki sitozin nükleotidi arasında olur. 5' ucundaki sitozin metillenmiş olduğu zaman iki enzim de kesim yapamazken, iç taraftaki sitozin metillenmiş olduğu zaman sadece *HpaII* bloke olur, *MspI* her durumda kesim yapar (Şekil 2.15). Omurgalı genomlarında metillenmiş CpG bölgeleri olduğu için, *HpaII* kesimi sonrası daha az ve daha uzun fragmentler oluşurken; *MspI* kesimi sonrası daha çok ve daha kısa fragmentler oluşur.



Şekil 2.15: Restriksiyon enzimi tanıma bölgelerindeki sitozin metilasyonlarının enzim kesimi üzerine etkisi. Metillenmiş sitozinler kırmızı olarak (C) gösterilmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Çalışmada, moleküler düzeydeki analizlere başlanmadan önce ikizlerin farklı yaşam standartlarının olup olmadığının anlaşılabilmesi için bir analiz formu oluşturuldu (Ek 1). Form oluşturulurken yaş, cinsiyet, sigara ve devamlı ilaç kullanımı gibi DNA metilasyon düzeyini değiştirebileceği düşünülen etmenlerin sorgulanması amaçlandı.

3.1. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Yaş ve cinsiyet farkı gözetmeksizin, 16 adet tek ve 8 adet çift yumurta ikizlerinden kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı. Gönüllülerden analiz formunu doldurmaları istendi ve bilgilendirildiklerine dair imzaları alındı. 18 yaşından küçük gönüllülerin formları velileri tarafından imzalandı. Kan örneklerinden, her örnek için 0.5 ml kan kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. Kalan kanlar, EDTA'lı tüplerin içinde -20°C dondurucuda saklandı. Gerekli durumlarda örnekler çözündürülerek yeniden DNA izolasyonu yapıldı.

3.2. ÖRNEKLERDEN GENOMİK DNA İZOLASYONU

Kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu "SpinKlean Genomic DNA Miniprep Kit" (Biomatik Corporation, Katalog No: K5125) kullanılarak, firmanın önerdiği protokole göre yapıldı. Her örnek için 500 µl kan, 1 ml otoklavlanmış distile suya eklendi ve örnekler 5000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Çöken beyaz kan hücreleri 200 µl TE solüsyonu içinde süspansiyon haline getirildi. Örnek solüsyonuna kitin içinde bulunan sindirim solüsyonundan 400 µl ve Proteinaz K'dan 3 µl eklendi ve karıştırıldı. Solüsyon 55°C'de 20-40 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler 10 dakika 10000xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar yeni eppendorf tüplere aktarıldı. Tüplere 200 µl B solüsyonu eklendikten sonra karıştırıldı ve karışım 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilen SpinKlean kolonuna eklendi. Oda sıcaklığında 6000xg hızda 1 dakika santrifüjlendikten sonra alt kısma geçen sıvı uzaklaştırılıp kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Örneğe

500 µl yıkama solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 6000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Alt kısma geçen sıvı uzaklaştırılarak yıkama işlemi tekrarlandı. Örnekler 6000xg'de ek olarak 2 dakika daha santrifüj edilerek yıkama solüsyonu kalıntılarının kolondan toplama tüplerine geçmesi sağlandı. Toplama tüpleri atılarak, kolonlar yeni eppendorf tüplere yerleştirildi ve kolonların merkezine önceden 37°C'ye ısıtılmış TE tamponundan 30 µl eklendi. Örnekler 2 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. DNA'nın kolondan ayrılması için 6000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. İzole edilen genomik DNA'ların kalitesi %0.7'lik agaroz jelde 80 V'de 20 dakika yürütülerek gözlemlendi. DNA miktarı ise spektrofotometri ile belirlendi. Genomik DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

3.3. DNA'NIN KALİTE VE MİKTARININ BELİRLENMESİ

3.3.1. Agaroz Jel Elektrofrezisi ile İnceleme

Çalışmadaki bütün elektroforez basamakları yatay agaroz jel elektroforezinde gerçekleştirildi. Kullanılan bütün boyaların ve tamponların içerikleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Jellerde tampon olarak TAE (Tris-Asetat EDTA) ve farklı konsantrasyonlarda agaroz kullanıldı. Kullanılan jel konsantrasyonlarına göre agaroz:tampon:etidyum bromür (EtBr) oranı Tablo 3.2'de verilmiştir.

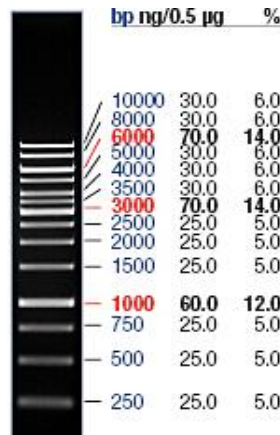
Tablo 3.1: Elektroforezde kullanılan tamponlar ve boyalar

Adı	İçeriği
10X TAE tamponu	400 mM Tris, %1.2 glasiyel asetik asit, 10 mM EDTA (pH:8.0)
1X TAE tamponu	100 ml 10X TAE tamponu, 900 ml dH ₂ O (pH:8.0)
EtBr stok solüsyonu	10 mg etidyum bromür, 1 ml dH ₂ O
6X yükleme tamponu	10 mM Tris (pH:7.5), 60 mM EDTA (pH:8.0), %0.3 bromofenol mavisi, %60 gliserol

Tablo 3.2: Araştırmada kullanılan farklı jel konsantrasyonları ile farklı agaroz:tampon miktarları

Jel konsantrasyonu	Agaroz (g)	1X Tampon (ml)	EtBr (µl)
% 1	0.4	40	2
% 1.2	0.48	40	2
% 1.8	0.72	40	2

Jel hazırlanırken, agaroz 1X TAE tamponu içinde berraklaşana kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Ardından 50-55°C'ye kadar soğutuldu. Jele 10 mg/ml stok EtBr solüsyonundan (jelin 1 ml'sinde 0.5 µg EtBr olacak şekilde) eklendi ve jel elektroforez kasetine döküldü. Örneklerin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için tarak yerleştirildi ve jel oda sıcaklığında polimerize olması için 30 dakika bekletildi. Örnekler 6X yükleme tamponu ile karıştırıldı ve jele yüklendi. Örnek boyutlarının anlaşılabilmesi için bir kuyucuğa marker (Fermentas GeneRuler 1 kb DNA Ladder #SM0311/2/3) yüklendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Elektroforezde kullanılan marker'ın %1'lik agaroz jeldeki, ticari firmasının belirttiği bant görüntüsü ile bantların büyüklük ve konsantrasyonu

İzole edilen DNA'ların kalitesinin belirlenmesi için %1'lik agaroz jel hazırlandı. 3 µl genomik DNA, 1 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Agaroz jel elektroforezinde 70 V'ta 45 dakika yürütülen örnekler, UV ışık altında görüntülendi.

3.3.2. Spektrofotometri ile DNA Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen DNA'nın miktarının belirlenmesi için spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Steril distile su ile 1/200 oranında sulandırılan genomik DNA örneklerinin 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri, 200 µl hacimde çoklu plate içinde µQuant (Bio-Tek Instruments, Inc.) cihazı ile ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri ile çift zincirli DNA molekülünün konsantrasyonu, Formül 3.1 kullanılarak hesaplandı. Enzim kesiminde gereken DNA konsantrasyonu (0.25 µg/µl) için, DNA'nın uygun sulandırım oranları belirlendi.

$$\text{DNA miktarı (ng/µl)} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{sulandırım oranı (200)} \quad (3.1)$$

3.4. RAPD-PCR OPTİMİZASYONU

3.4.1. Primer Seçimi

İkizler arasında genom düzeyindeki polimorfizmin belirlenmesi için RAPD-PCR’da kullanılmak üzere 20 farklı primer denendi (Tablo 3.3). Ürünler, %1.8’lik agaroz jelde (Tablo 3.2) incelendi.

Tablo 3.3: RAPD-PCR’da kullanılan primerlerin nükleotid dizileri

Primer no	Primer adı	Primer nükleotid dizisi	Primer No	Primer Adı	Primer nükleotid dizisi
1	OPA11	5’-CAG GCC CTT C-3’	11	OPC18	5’-TGA GTG GGT G-3’
2	OPA15	5’-CAA ACG TCG G-3’	12	OPC20	5’-ACT TCG CCA G-3’
3	OPA22	5’-TGC CGA GCT G-3’	13	GA05	5’-AGG GGT CTT G-3’
4	OPB12	5’-CCT TGA CGC A-3’	14	GA09	5’-GGG TAA CGC C-3’
5	OPB22	5’-TGA TCC CTG G-3’	15	GA11	5’-CAA TCG CCG T-3’
6	OPC03	5’-GGG GGT CTT T-3’	16	GA17	5’-GAC CGC TTG T-3’
7	OPC05	5’- GAT GAC CGC C -3’	17	GA18	5’- AGG TGA CCG T -3’
8	OPC08	5’- TGG ACC GGT G -3’	18	GB07	5’- GGT GAC GCA G -3’
9	OPC12	5’- TGT CAT CCC C -3’	19	GB08	5’- GTC CAC ACG G -3’
10	OPC13	5’- AAG CCT CGT C -3’	20	GB09	5’- TGG GGG ACT C -3’

En uygun primerlerin belirlenmesi için rastgele seçilen bazı çift yumurta ikizlerinin DNA’ları kalıp olarak kullanıldı. En iyi bant veren 7 numaralı primer ile diğer optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

3.4.2. Magnezyum İyonu Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Uygun Mg⁺⁺ konsantrasyonunun belirlenmesi için en uygun bant profili veren primer ile farklı konsantrasyonlarda (1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM) MgCl₂ kullanılarak RAPD-PCR yapıldı. Ürünler, %1.8’lik agaroz jelde (Tablo 3.2) incelendi. 2.5 mM MgCl₂ konsantrasyonu ile RAPD-PCR koşullarının optimizasyonu gerçekleştirildi.

3.4.3. RAPD-PCR Koşullarının Optimizasyonu

En iyi kalite ve sayıda bant profili veren primer ve MgCl₂ konsantrasyonu kullanılarak RAPD-PCR koşulları optimize edildi. Bunun için farklı denatürasyon ve primer bağlanma süreleri (0.5-1 dakika) denendi. Ürünler, %1.8’lik agaroz jelde (Tablo 3.2) incelendi. En iyi bant profili veren koşullar CRED-RA (“Coupled Restriction Enzyme

Digestion-Random Amplification” / Çift Restriksiyon Enzimi Kesimi ve Rastgele Çoğaltım) analizinde kullanıldı.

3.5. CRED-RA YÖNTEMİ İLE İKİZ DNA’LARININ ANALİZİ

3.5.1. DNA’ların Restriksiyon Enzimleri İle Kesilmesi

Metilasyon farklılıklarının gözlenmesi için *MspI* (Fermentas #ER0541) ve *HpaII* (Fermentas #ER0511) enzimleri kullanıldı. Aynı bireye ait DNA için her iki enzimin kesim reaksiyonu farklı mikrosantrifüj tüplerinde son hacim 20 µl olacak şekilde gerçekleştirildi (Tablo 3.4). DNA’nın enzimatik kesimi için, tüpler üretici firmanın önerdiği gibi 37°C’deki su banyosunda 16 saat inkübe edildi. Kesim sonunda enzimlerin inaktivasyonunun sağlanması için *MspI* içeren tüp 80°C’de, *HpaII* içeren tüp ise 65°C’de 20 dakika inkübe edildi.

Enzim inaktivasyonu sonrasında kesim sonucu elde edilen ürünlerden, kontrol amaçlı 5 µl alınarak, 1 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra %1.2’lik agaroz jele yüklendi (Tablo 3.2). Örnekler, 70 V’ta 45 dakika yürütüldükten sonra UV ışık altında incelendi.

Tablo 3.4: Enzim kesiminde kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılan hacim (µl)	Son Konsantrasyon
Tampon (10X)	2	1X
DNA (0.25 µg/µl)	2	25 ng/µl
Enzim (<i>HpaII</i> , <i>MspI</i>)	1	10 U
dH ₂ O	15	-
Toplam	20 µl	

3.5.2. Kesim Sonrası DNA Ürünlerinin RAPD-PCR İle Çoğaltılması

Optimizasyon çalışmaları ile belirlenen PCR koşulları, ikiz DNA’larının enzim kesimi sonrasında RAPD-PCR analizleri yapılması için kullanıldı. PCR bileşenleri ve konsantrasyonları Tablo 3.5’te, PCR basamaklarının sıcaklık ve süreleri Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.5: RAPD-PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılan hacim (µl)	Son Konsantrasyon
Tampon	2.5	1X
MgCl ₂	2.5	2.5 mM
dNTP	2	10 mM
DNA polimeraz	0.2	0.5 U
RAPD primeri	1	10 µM
DNA (25 ng/µl)	2	2 ng/ µl
Steril dH ₂ O	14.8	-
Toplam	25 µl	

Tablo 3.6: RAPD-PCR koşulları

	Başlangıç denatürasyonu	Denatürasyon	Primer bağlanma	Uzama	Son uzama	Reaksiyon sonu
Sıcaklık (°C)	94	94	34	72	72	10
Süre (dakika)	2	0.5-1	0.5-1	2	15	∞
Döngü sayısı	1	40			1	1

3.6. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.

Tek yumurta ve çift yumurta ikizi bireyler kendi aralarında karşılaştırıldı. Bireylerin *HpaII* kesimi sonrası RAPD ürünleri ve *MspI* kesimi sonrası RAPD ürünleri kendi içinde değerlendirildi. *HpaII* enzimi metilasyona duyarlı olduğu için bu enzimle kesilen DNA'ların RAPD ürünlerindeki farklılıklar metilasyon değişimleri; *MspI* kesimi sonrası RAPD ürünlerindeki farklılıklar ise genomik polimorfizm olarak kabul edildi (Khulan ve diğ., 2006). RAPD ürünlerinin elektroforezi sonrası gözlenen homomorfik ve polimorfik bantlar sayılarak tablo halinde gösterildi. Bu değerlerden yararlanılarak polimorfizm oranları hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. DENEKLERİN ANALİZ FORMLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

32 tek yumurta ikizi ve 16 çift yumurta ikizi bireylerinin doldurdıkları formlara göre, yaşantılarına dair önemli olan bilgiler tablo şeklinde değerlendirildi (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Tablo 4.1: Çift yumurta ikizlerinin anket formlarının değerlendirilmesi

Çift no	Birey kodu	Cinsiyet	Yaş	Ailede genetik bozukluğu olan birey var mı?		Ailede kanser olan birey var mı?		Kimyasal / radyoaktif ajanlara maruz kaldı mı?		Sürekli bir ilaç kullanılıyor mu?		Sigara kullanılıyor mu?	
				Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır
1	Ç-01	K	11		X	X			X		X		X
	Ç-02	K	11		X	X			X		X		X
2	Ç-03	E	36		X		X		X		X	X	
	Ç-04	E	36		X		X	X			X	X	
3	Ç-05	E	23		X		X		X		X	X	
	Ç-06	E	23		X		X		X		X	X	
4	Ç-07	E	12	X		X			X		X		X
	Ç-08	E	12	X		X			X		X		X
5	Ç-09	K	20		X		X		X		X		X
	Ç-10	E	20		X		X		X		X	X	
6	Ç-11	K	25		X		X		X		X		X
	Ç-12	E	25		X		X		X		X		X
7	Ç-13	K	46		X		X		X		X		X
	Ç-14	E	46		X		X	X			X	X	
8	Ç-15	K	35		X	X		X			X		X
	Ç-16	K	35		X	X		X		X			X

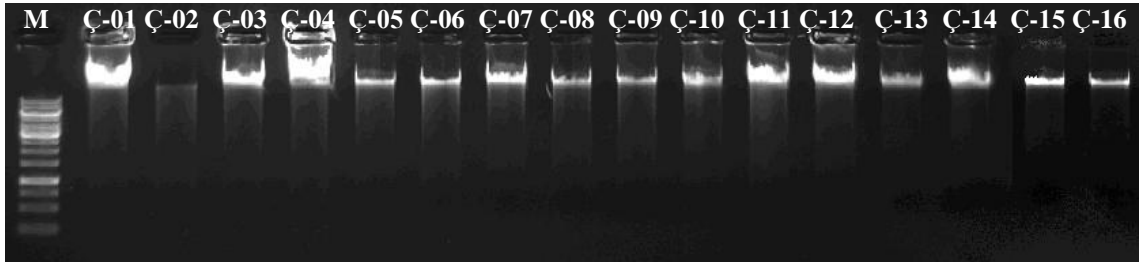
K: Kadın, E: Erkek

Tablo 4.2: Tek yumurta ikizlerinin anket formlarının değerlendirilmesi

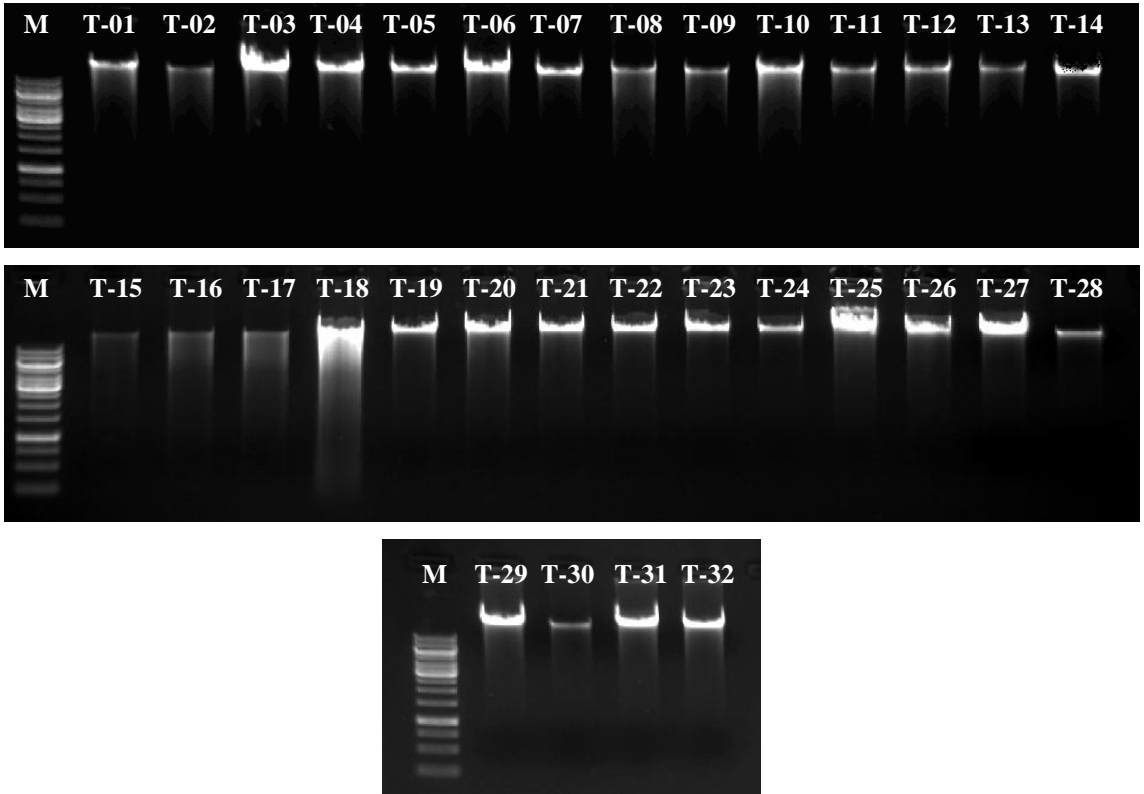
Denekler		Cinsiyet	Yaş	Ailede genetik bozukluğu olan birey var mı?		Ailede kanser olan birey var mı?		Kimyasal / radyoaktif ajanlara maruz kaldı mı?		Sürekli bir ilaç kullanıyor mu?		Sigara kullanıyor mu?	
Çift no	Birey kodu			Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır
1	T-01	K	24		X	X			X		X		X
	T-02	K	24		X	X			X		X		X
2	T-03	K	6		X		X		X		X		X
	T-04	K	6		X		X		X		X		X
3	T-05	K	20		X	X			X		X		X
	T-06	K	20		X	X			X		X		X
4	T-07	K	39		X	X		X		X			X
	T-08	K	39		X	X		X			X		X
5	T-09	E	28		X		X		X		X	X	
	T-10	E	28		X		X		X	X		X	
6	T-11	E	40		X		X		X		X	X	
	T-12	E	40		X		X		X		X	X	
7	T-13	K	38	X			X	X			X		X
	T-14	K	38	X			X		X		X		X
8	T-15	K	17	X		X			X		X		X
	T-16	K	17	X		X			X		X		X
9	T-17	E	40		X	X		X			X	X	
	T-18	E	40		X	X			X		X	X	
10	T-19	K	57		X	X			X	X			X
	T-20	K	57		X	X			X		X		X
11	T-21	E	32		X	X			X		X	X	
	T-22	E	32		X	X			X		X	X	
12	T-23	E	25		X		X		X		X		X
	T-24	E	25		X		X		X		X		X
13	T-25	K	25		X		X		X		X		X
	T-26	K	25		X		X		X		X	X	
14	T-27	K	14		X		X		X		X		X
	T-28	K	14		X		X		X		X		X
15	T-29	E	9		X	X			X	X			X
	T-30	E	9		X	X			X	X			X
16	T-31	E	30		X		X		X	X		X	
	T-32	E	30		X		X		X	X		X	

4.2. GENOMİK DNA'NIN KALİTATİF VE KANTİTATİF ANALİZİ

Tek ve çift yumurta ikizlerinden izole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. İkizler Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'deki numara sıralarına göre jele yüklendi (Şekil 4.1, 4.2). Jel görüntülerine göre elde edilen genomik DNA'lar CRED-RA yönteminde kullanılması için yeterli bulundu. Jel görüntüsü elde edilmeden önce DNA'lar uzun bir süre -20°C 'de bekletildiği için kırılmıştır.



Şekil 4.1: Çift yumurta ikizlerinden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jelde UV ışık altındaki görünüşleri, M: 1 kb marker

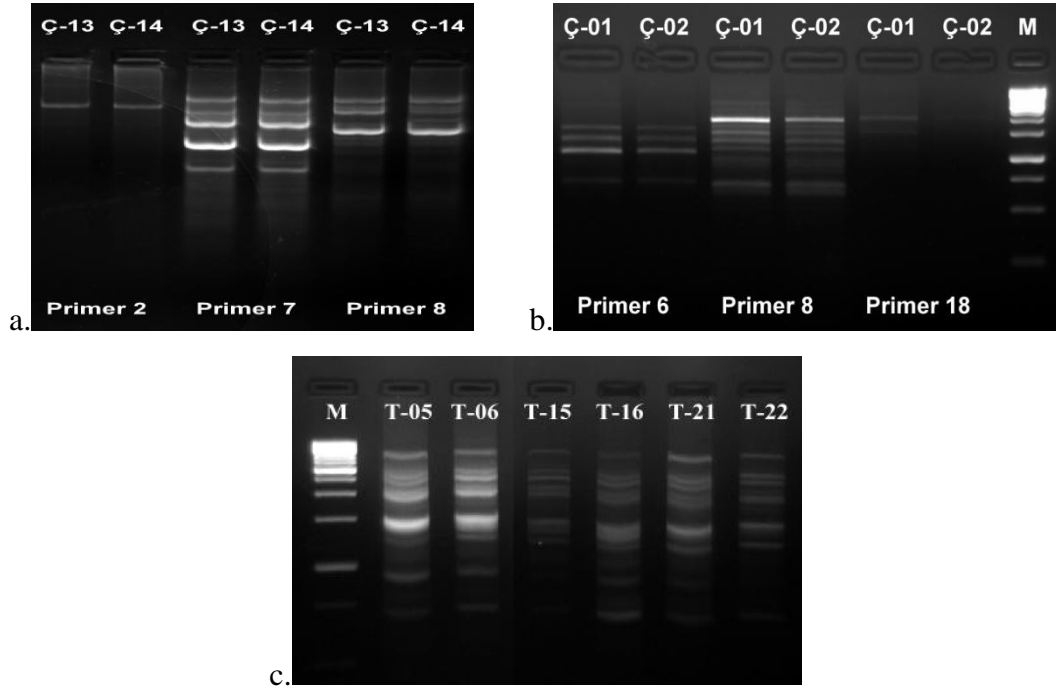


Şekil 4.2: Tek yumurta ikizlerinden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jelde UV ışık altındaki görünüşleri, M: 1 kb marker

Elde edilen genomik DNA'ların miktarları, spektrofotometrik ölçüm sonucu 0.65 µg/µl ile 1.4 µg/µl arasında hesaplanmıştır. Enzim kesiminde gereken DNA konsantrasyonu (0.25 µg/µl) için, her örnek uygun oranda sulandırılmıştır.

4.3. RAPD-PCR OPTİMİZASYONU BULGULARI

PCR sonucu en çok bant veren primerlerin seçilmesi için çift yumurta ikizlerine ait genomik DNA kullanıldı. Denenen 20 primerden, 6 tanesi (primer no 5, 12, 14, 15, 16, 17) hiç bant oluşturmadı. Diğer 14 primerden sadece 7 numaralı primer (OPC05) sonuçların değerlendirilebilmesi açısından yeterli miktarda ve kalitede bant oluşturduğu için bu primer ile CRED-RA deneylerine devam edildi (Şekil 4.3).



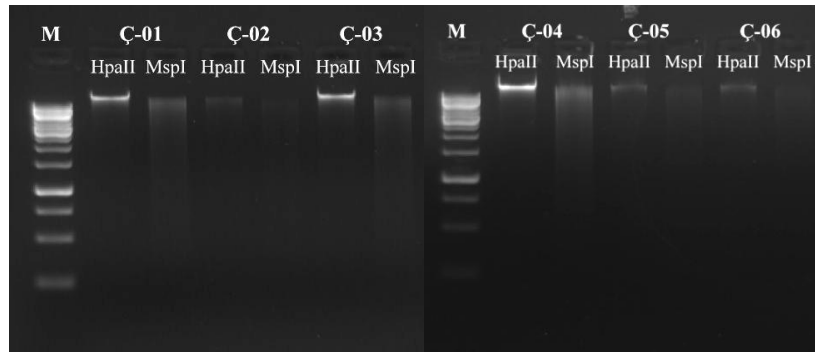
Şekil 4.3: Bazı farklı primerler ile yapılan RAPD-PCR sonucu jelde gözlenen bantlar. M: Marker, Ç: Çift yumurta ikizi, T: Tek yumurta ikizi. Çift yumurta ikizi DNA'larının farklı primerlerle rastgele çoğaltımı sonucu elde edilen bantlar (a, b) ve tek yumurta ikizi DNA'larının 7 numaralı primerle çoğaltımı sonucu elde edilen bantlar.

RAPD-PCR çalışmalarında en iyi sonuç veren 7 numaralı primer ile farklı MgCl₂ konsantrasyonları denendi; bunun sonucunda 2.5 mM MgCl₂ son konsantrasyonun en kaliteli bantları verdiği gözlemlendi. Ayrıca, RAPD-PCR sırasında denatürasyon ve primer bağlanma süresinin 30 saniye olması uygun görüldü.

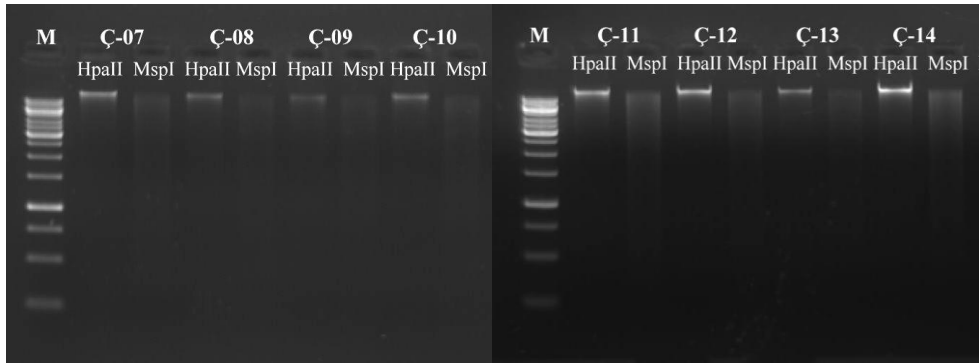
4.4. CRED-RA ANALİZİ BULGULARI

4.4.1. Restriksiyon Enzim Kesimi Bulguları

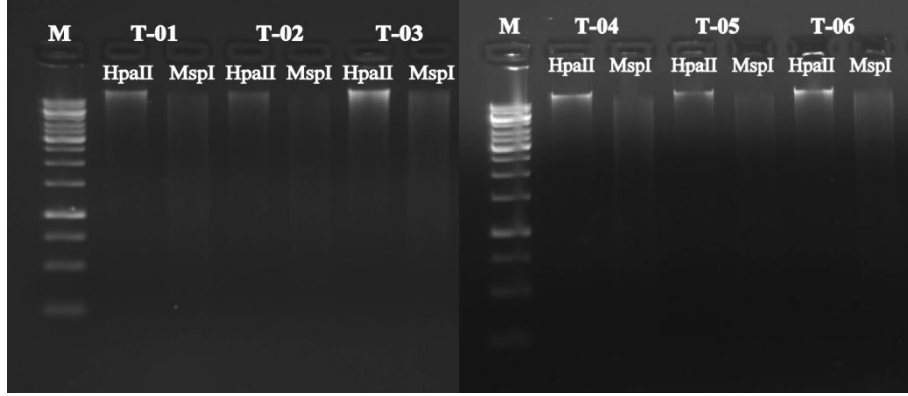
Her bir bireye ait genomik DNA'lar hem *HpaII* hem *MspI* ile ayrı ayrı kesildi. *HpaII* enzimi, tanıma dizisinde metilasyon olduğu zaman kesim yapmadığı için bu enzimle kesilen DNA'lar, beklenildiği gibi jelde daha kalın bir bant gösterdi (Şekil 4.4 – 4.9). *MspI* enzimi metilasyona duyarlı olmadığı için daha fazla kesim yaptı ve jelde “smear” şeklinde bir bant profili verdi.



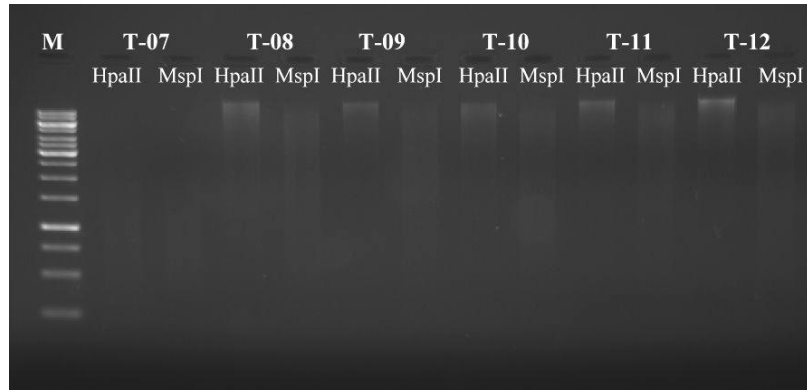
Şekil 4.4: Ç-01 – Ç-06 DNA'larının *HpaII* ve *MspI* ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü.
M: 1 kb marker



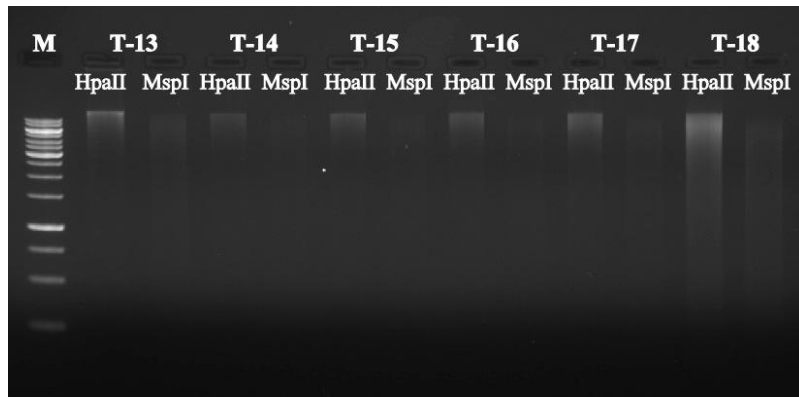
Şekil 4.5: Ç-07 – Ç-14 DNA'larının *HpaII* ve *MspI* ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü.
M: 1 kb marker



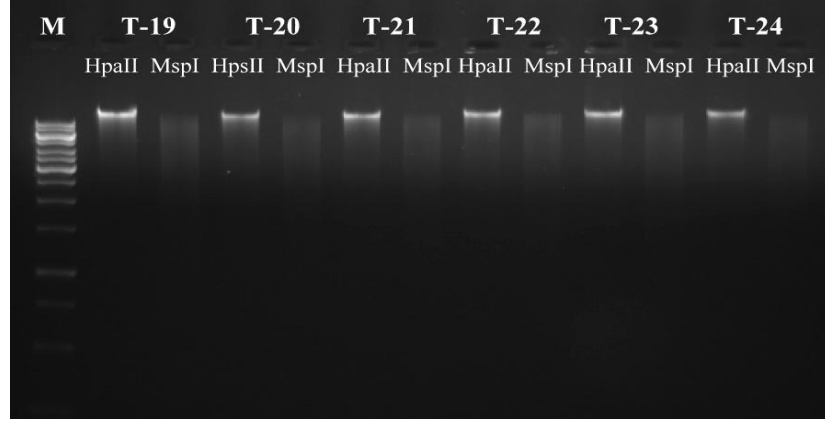
Şekil 4.6: T-01 – T-06 DNA'larının *HpaII* ve *MspI* ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü.
M: 1 kb marker



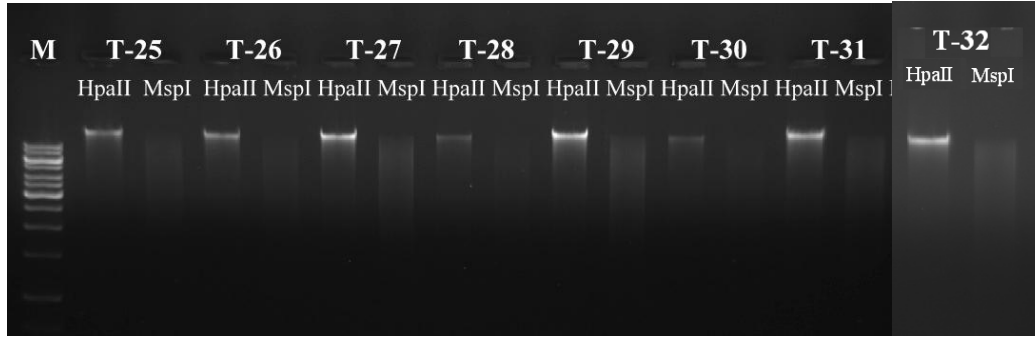
Şekil 4.7: T-07 – T-12 DNA'larının *HpaII* ve *MspI* ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü.
M: 1 kb marker



Şekil 4.8: T-13 – T-18 DNA'larının *HpaII* ve *MspI* ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü.
M: 1 kb marker



Şekil 4.9: T-19 – T-24 DNA'larının *HpaII* ve *MspI* ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü.
M: 1 kb marker

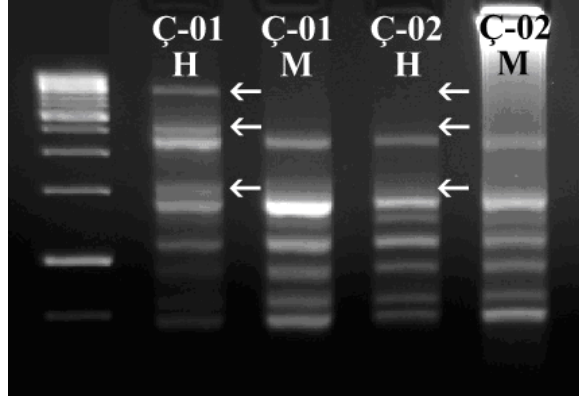


Şekil 4.10: T-25 – T-32 DNA'larının *HpaII* ve *MspI* ile kesimi sonucu elde edilen jel görüntüsü.
M: 1 kb marker

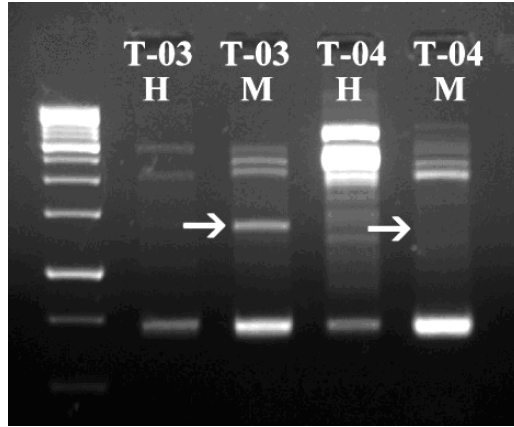
4.4.2. CRED-RA Analizi Kapsamında RAPD-PCR Bulguları

Restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesilmiş örneklerin, OPC05 primeri ile rastgele çoğaltımı sonucu, çift yumurta ikizlerinin profillerinde belirli farklar gözlenmiştir. Şekil 4.11'de 1 numaralı çifte ait jel fotoğrafı verilmiştir.

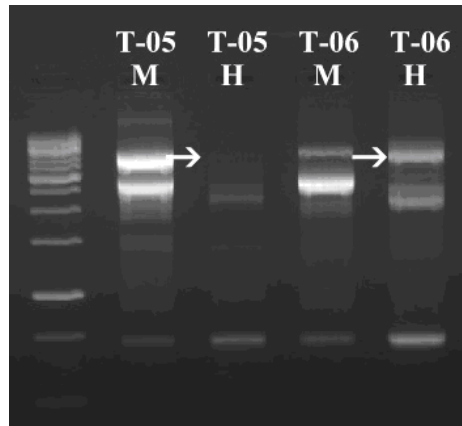
CRED-RA yöntemi uygulanan bazı tek yumurta ikizlerinde farklı bantlar elde edildi. Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16'da farklı bant gözlenen bazı tek yumurta ikizlerine ait CRED-RA analizi sonucundaki jel görüntüleri verilmiştir. Belirgin olarak farklı bantlar beyaz ok ile belirtilmiştir. Bütün çiftlere ait jel görüntülerindeki bantların sayısı Tablo 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.



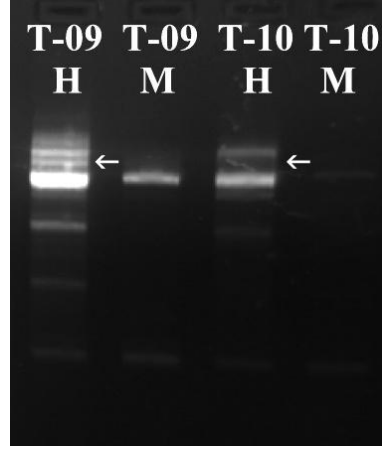
Şekil 4.11: 1 numaralı çift yumurta ikizlerinin (Ç-01 ve Ç-02 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar. İlk kuyuda 1 kb DNA Ladder, H: *HpaII* kesimi yapılmış örnek, M: *MspI* kesimi yapılmış örnek.



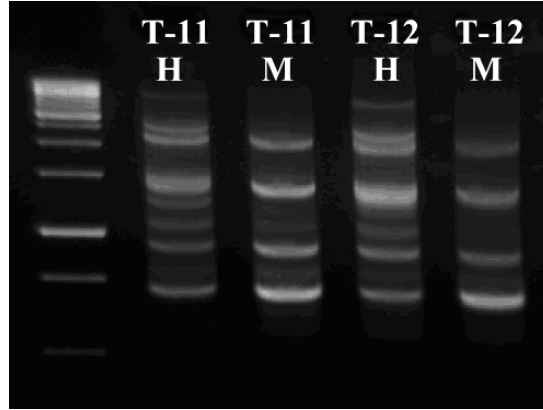
Şekil 4.12: 2 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-03 ve T-04 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar. İlk kuyuda 1 kb DNA Ladder, H: *HpaII* kesimi yapılmış örnek, M: *MspI* kesimi yapılmış örnek.



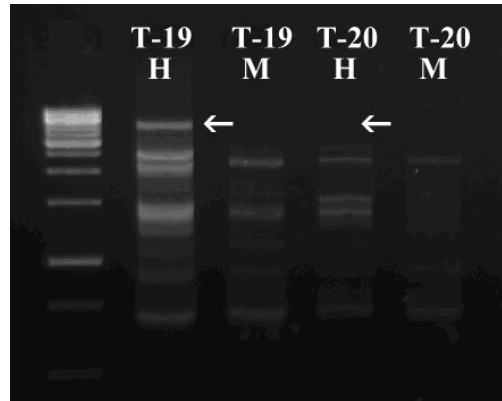
Şekil 4.13: 3 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-05 ve T-06 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar. İlk kuyuda 1 kb DNA Ladder, H: *HpaII* kesimi yapılmış örnek, M: *MspI* kesimi yapılmış örnek.



Şekil 4.14: 5 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-09 ve T-10 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar. H: *HpaII* kesimi yapılmış örnek, M: *MspI* kesimi yapılmış örnek.



Şekil 4.15: 6 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-11 ve T-12 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar. İlk kuyuda 1 kb DNA Ladder, H: *HpaII* kesimi yapılmış örnek, M: *MspI* kesimi yapılmış örnek.



Şekil 4.16: 10 numaralı tek yumurta ikizlerinin (T-19 ve T-20 bireyleri) DNA'ları ile yapılan CRED-RA sonucu elde edilen bantlar. İlk kuyuda 1 kb DNA Ladder, H: *HpaII* kesimi yapılmış örnek, M: *MspI* kesimi yapılmış örnek.

Tablo 4.3: CRED-RA analizi sonucu tek yumurta ikizlerinde gözlenen bant sayıları

Çift No	Birey Kodu	<i>Hpa</i> II Kesimi Sonrası Toplam Bant Sayısı	<i>Msp</i> I Kesimi Sonrası Toplam Bant Sayısı	Toplamdaki Polimorfik Bant Sayısı		Toplamdaki Homomorfik Bant Sayısı		% Polimorfizm	
				<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I
1	T-01	8	6	1	0	7	6	12.5	0
	T-02	7	6						
2	T-03	3	5	1	2	3	4	25	33
	T-04	4	5						
3	T-05	8	4	3	1	5	4	37.5	20
	T-06	6	5						
4	T-07	8	5	6	0	6	5	50	0
	T-08	8	5						
5	T-09	7	2	2	0	5	2	28.6	0
	T-10	5	2						
6	T-11	9	7	0	2	9	5	0	28.6
	T-12	9	5						
7	T-13	10	8	1	1	10	7	9.1	12.5
	T-14	11	7						
8	T-15	8	5	0	1	8	5	0	16
	T-16	8	6						
9	T-17	13	6	4	0	9	6	30.7	0
	T-18	9	6						
10	T-19	9	7	4	2	5	5	44	28.6
	T-20	5	5						
11	T-21	8	5	0	2	8	4	0	33
	T-22	8	5						
12	T-23	13	10	1	0	12	10	7.7	0
	T-24	12	10						
13	T-25	7	4	2	0	7	4	22	0
	T-26	9	4						
14	T-27	10	4	1	0	9	4	10	0
	T-28	9	4						
15	T-29	12	8	0	0	12	8	0	0
	T-30	12	8						
16	T-31	13	9	1	1	12	8	7.7	11
	T-32	12	8						

16 çift tek yumurta ikizine ait CRED-RA analizleri sonucunda çiftlerin 12'sinde *HpaII* kesimi sonrası değişik oranlarda polimorfizm gözlemlendi. Çiftlerin 8 tanesinde *MspI* kesimi sonrası polimorfizm saptandı. 9 çiftte *HpaII* polimorfizmi, *MspI*'e oranla daha yüksek gözlenirken; 6 çiftte ise *MspI* polimorfizminin *HpaII*'ye oranla daha yüksek olduğu bulundu.

Tablo 4.4: CRED-RA analizi sonucu çift yumurta ikizlerinde gözlenen bant sayıları

Çift No	Birey Kodu	<i>HpaII</i> Kesimi Sonrası Toplam Bant Sayısı	<i>MspI</i> Kesimi Sonrası Toplam Bant Sayısı	Toplamdaki Polimorfik Bant Sayısı		Toplamdaki Homomorfik Bant Sayısı		% Polimorfizm	
				<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
1	Ç-01	10	9	3	1	7	8	30	11
	Ç-02	7	8						
2	Ç-03	9	6	4	0	8	6	25	0
	Ç-04	11	6						
3	Ç-05	9	6	2	0	7	6	22	0
	Ç-06	7	6						
4	Ç-07	12	7	1	1	11	6	8.3	14.3
	Ç-08	11	6						
5	Ç-09	5	4	0	0	5	4	0	0
	Ç-10	5	4						
6	Ç-11	8	6	2	0	8	6	20	0
	Ç-12	10	6						
7	Ç-13	9	5	1	1	8	4	11.1	20
	Ç-14	8	4						
8	Ç-15	8	7	0	1	8	6	0	14.3
	Ç-16	8	6						

8 çift yumurta ikizine ait CRED-RA analizleri sonucunda çiftlerin 6 tanesinde *HpaII* kesimi sonrası değişik oranlarda polimorfizm gözlemlendi. Çiftlerin 4 tanesinde *MspI* kesimi sonrası polimorfizm saptandı. 4 çiftte *HpaII* polimorfizmi, *MspI*'e oranla daha yüksek gözlenirken; 2 çiftte ise *MspI* polimorfizminin *HpaII*'ye oranla daha yüksek olduğu bulundu.

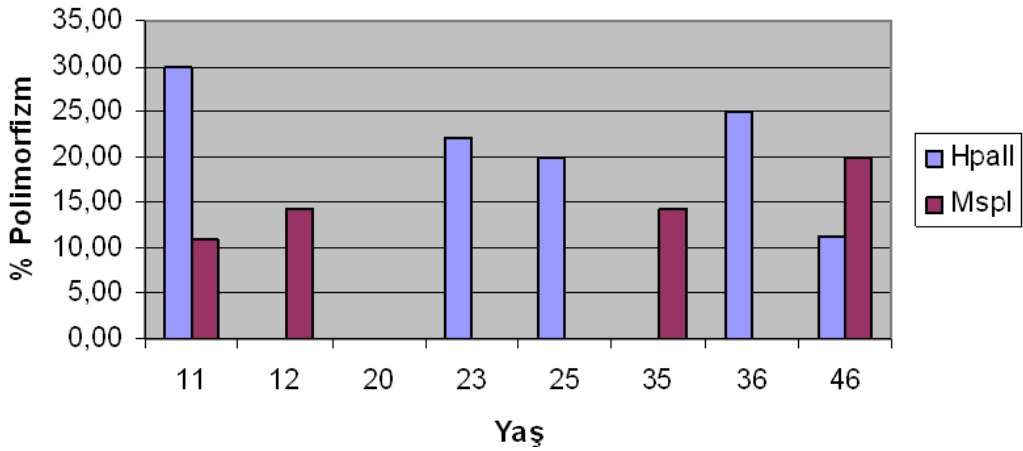
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Epigenetik değişimler, DNA dizisinde değişim olmadan meydana gelen kalıtılabilir modifikasyonlardır. Bu değişimleri başlatan ve koruyan temel moleküler mekanizmalar histon modifikasyonları ve DNA metilasyonlarıdır. Bu mekanizmalar birlikte çalışarak, DNA'nın kromatin halinde paketlenmesini ve böylece genlerin anlatımını düzenler (Jaenisch ve Bird, 2003; Bjornsson ve diğ., 2004). Kompleks organizmalarda genetik bilgi tüm hücrelerde aynı iken epigenetik değişimler dokulara göre farklılık gösterir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu değişimlerin sadece yavru hücrelere değil, sonraki jenerasyonlara da aktarıldığı gözlenmiştir (Rakyan ve diğ., 2002; Anway ve diğ., 2005; Pembrey ve diğ., 2006).

Bu tez çalışmasında 32 tek yumurta ve 16 çift yumurta ikizinde DNA metilasyonları CRED-RA "Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification" yöntemi ile karşılaştırmalı olarak incelendi. 20 adet rastgele seçilmiş primer içerisinde RAPD çalışmalarında iyi yanıt veren OPC05 (5'-GATGACCGCC-3') primeri, DNA'nın *HpaII* ve *MspI* kesimi sonrası RAPD analizinde kullanıldı.

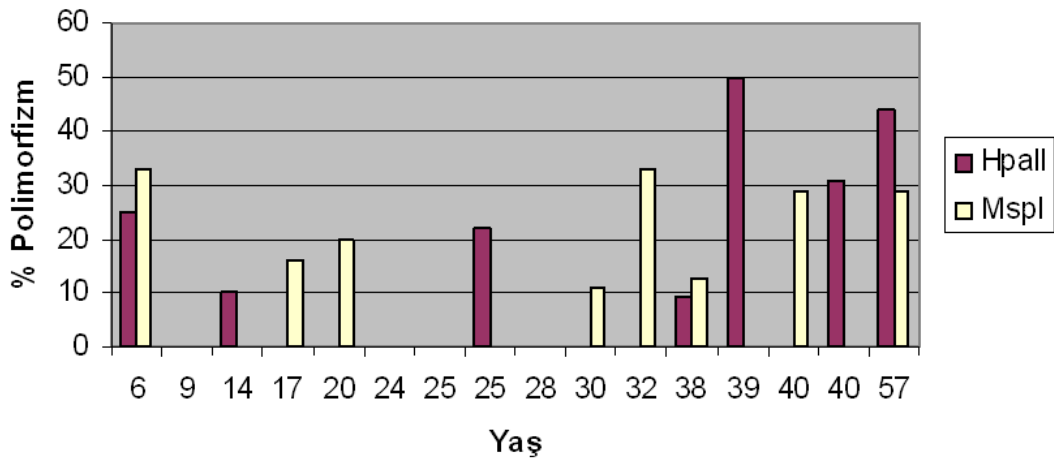
Analizler sonucunda 4 tane çift yumurta ikizinde (1, 2, 3 ve 6 numaralı çiftler), *HpaII* kesiminde polimorfizm, *MspI* kesimine oranla belirgin derecede farklı bulunmuştur (Şekil 5.1). Çift yumurta ikizlerinde bu beklenen bir durumdur. Bu ikizler farklı zigotlardan oluştuğu için; hem genomik polimorfizmin hem de epigenetik polimorfizmin, tek yumurta ikizlerine oranla daha yüksek derecede olması beklenmektedir. Elde edilen sonuçlar, bu çift yumurta ikizleri arasındaki metilasyona bağlı epigenetik değişikliklerin, nükleotid değişimlerinden kaynaklanan genomik polimorfizmden daha yüksek olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte; diğer 3 çift yumurta ikizinde (4, 7 ve 8 numaralı çiftler) *MspI* kesimindeki polimorfizm oranı *HpaII*'ye oranla daha yüksek saptandığından dolayı, bu çiftler arasındaki metilasyona bağlı epigenetik polimorfizm, genomik polimorfizmden daha düşük oranda meydana gelmiş olabilir. 5 numaralı çift yumurta ikizinde ise hiç polimorfizm gözlenmemiştir.

Bunun nedeni, sonuçların değerlendirilebilmesi için yeterli sayıda bant oluşmaması olabilir. Bu sonuç deneysel bir hata olarak yorumlanabilir.



Şekil 5.1: Çift yumurta ikizlerinde yaşa göre % polimorfizm oranları

Tek yumurta ikizlerinde genomik bilgi çok yüksek oranda benzerlik göstermesine karşın 16 tek yumurta ikizi çiftinden 9'unda (%56.2) belirgin sitozin metilasyonu farklılıkları gözlemlendi (Şekil 5.2). 80 tek yumurta ikiz çifti ile yapılan bir çalışmada, ikizlerin yaklaşık %33'ünde DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu farklılıklarının saptandığı belirtilmiştir (Fraga ve diğ., 2005). Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar da ikizler arasındaki sitozin metilasyonlarının belirgin olarak farklı olduğunu göstermiştir. Fraga ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada buldukları polimorfizm oranının bizim sonuçlarımızdan düşük olmasının nedeni denek sayısının fazla olmasından kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 5.2: Tek yumurta ikizlerinde yaşa göre % polimorfizm oranları

Bu tez çalışmasında yapılan analizler sonucunda, 6 tek yumurta ikizi çiftinde (2, 6, 7, 8, 11, 16 numaralı çiftler) *MspI* kesimi sonucunda gözlemlenen polimorfizm, *HpaII* kesimi sonucunda gözlemlenen polimorfizmden daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, bu bireyler arasındaki genomik polimorfizmin epigenetik polimorfizmden daha yüksek olabileceğini göstermektedir. 7 numaralı ikiz çiftinin anket formundaki değerlendirilmelere göre bireylerden biri (T-13) kimyasal ajana maruz kalırken, diğeri kalmamıştır. Bu kimyasal ajana maruz kalınması sonucunda, enzim tanıma bölgesinde oluşan bir mutasyon sonucunda kesim yapılamamış ya da metilasyon azalması meydana gelmiş olabilir. Yapılan çalışmalarda, metilasyon azalmasının kanser oluşumunu tetiklediği saptanmıştır (Ehrlich, 2002; Eden ve diğ., 2003).

1, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 13 ve 14 numaralı tek yumurta ikizi çiftlerinde, *HpaII* kesimi polimorfizmi, *MspI* kesimi polimorfizmine oranla daha yüksek gözlenmiştir. Bu bireylerde metilasyona bağlı epigenetik polimorfizmin, nükleotid değişimlerine bağlı genomik polimorfizmden daha yüksek oranda olduğu söylenebilir. En yüksek polimorfizmin görüldüğü bireyler (4, 5, 9, 10 ve 13 numaralı çiftler) sigara, ilaç kullanımı ve kimyasal ajanlara maruz kalma gibi çevresel koşullar bakımından farklılık göstermektedirler. Sigara kullanımının metilasyon düzeyini etkilediği daha önceki çalışmalarda da kanıtlanmıştır (Kim ve diğ., 2001). Bizim sonuçlarımız da bu bulguları desteklemektedir. 4, 5 ve 10 numaralı çiftlerin bireyleri arasında ilaç kullanımı bakımından farklılık görülmektedir. Bu çiftlerin bireylerinden biri sürekli bir ilaç (2 yıldan fazla) kullanıyor iken, diğeri kullanmamaktadır. Kullanılan ilaçların etken maddeleri farklı olmasına rağmen, metilasyon seviyelerinde diğere deney çiftlerine göre daha çok farklılık gözlemlendi. Çeşitli madde kullanımının metilasyon seviyesinde değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Örneğin 5-azasitidin (Vidaza) ve 5-aza-2'-deoksitidin (Decitabine), DNA metiltransferazlara bağlanarak inhibe eder (Goffin ve Eisenhauer, 2002) ve metilasyon azalması ile birlikte apoptoz gelişimi gözlenir (Kızıltepe ve diğ., 2007). Bu ilaçlar kanser tedavilerinde de kullanılmaktadır (Christman, 2002). Tez çalışmasındaki bireylerin kullandığı ilaçlarla daha önce metilasyon düzeyindeki değişiklikleri saptamaya yönelik analizler yapılmamış olduğu için elde edilen sonuçların doğruluğu literatür bilgileriyle desteklenmemektedir.

Tek yumurta ikizleri aynı genotipi taşımalarına karşın değişik fenotipik durumlar; örneğin hastalıklara yatkınlık farklılıkları gösterirler. Yapılan bir çalışmada, tek yumurta ikiz çiftlerinden biri sağlıklı iken diğerinde bir gendeki imprinting bozukluğunun Beckwith-Wiedemann sendromuna yol açtığı saptanmıştır (Weksberg ve diğ., 2002). Bu farklılıkların çeşitli açıklamaları olabilir; bunların en önemlilerinden biri epigenetik farklılıkların oluşmasıdır. Bu çalışmada tüm genom düzeyinde lokus özgünlüğü olmadan gözlemler yapılmıştır. Lenfositlerden elde edilen genomik DNA’larda sitozin metilasyonlarında farklılıklar izlenmiştir. Fraga ve diğ., (2005) tek yumurta ikizleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda yaşa bağlı olarak metilasyon profili farklılıklarının arttığını saptamışlardır. Bu tez çalışmasında denek olarak 6-57 yaş arasında 14 erkek ve 18 kadın tek yumurta ikizi kullanılmıştır; ancak yaşa bağlı olarak artan bir farklılık gözlenememiştir. Bununla birlikte, Eckhardt ve diğerlerinin (2006) yaptığı başka bir çalışmada, 2 farklı yaş grubu ile aynı yaştaki kadın ve erkek grubundaki DNA metilasyonu farklı dokularda (karaciğer, iskelet kası ve kalp kası) karşılaştırılmış ve yaş veya cinsiyetin metilasyon farklılığı üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı saptanmıştır ($p<0.05$). Bu sonuçlarla beraber, DNA metilasyonu araştırmalarının genom düzeyinde veya tek bir gene özgü yapılmasının ve kullanılan yöntemin duyarlılığının metilasyon farklılıklarını saptamada etkili olduğu söylenebilir.

Epigenetik değişimleri etkileyen faktörler arasında maruz kalınan kimyasallar, beslenme biçimi, sigara tüketimi ve benzeri iç ve dış faktörler sayılabilir. Bu etkileşimler sonucu her bir doku ve hücre örneğinde farklı metilasyon profilleri oluşabilir. Kaminsky ve diğ., 2009’da insandaki kompleks hastalıklar üzerinde çalışırken 114 tek ve çift yumurta ikizlerinde lenfositler, ağız içi epitel hücreleri ve gut biyopsilerinde karşılaştırmalı array temelli epigenetik analizler yapmışlardır. Analizler sonucunda, 6000 bölgede epigenetik metastabilite gözlemiştir ve tek yumurta ikizleri arasındaki en büyük metilasyon farklılığını ağız içi epitel hücrelerinde izlemişlerdir. Dolayısı ile epigenetik analizlerde elde edilen sonuçlar hücre, doku ve organ tipine göre de farklılıklar gösterebilmektedir. Çalışma, bireysel epigenomların her bir zigot için farklılık gösterdiğini de kanıtlamıştır. Bu tez çalışmasında da ikizlere ait lenfosit hücreleri, metilasyon farklılıkları bakımından her birey için ayrı ayrı incelendi ve çalışılan primer ile tek yumurta ikizlerinin %56.2’sinde epigenetik farklılık gözlemlendi.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar çeşitli literatür bilgileri ile benzerlik göstermesine karşın; bazı çiftlerde beklenmeyen sonuçlar gözlenmiştir. Örneğin, bazı tek yumurta ikizlerinde genomik farklılık epigenetik farklılıktan daha yüksek gözlenirken, bazı çift yumurta ikizlerinde genomik farklılık daha az gözlenmiştir. Bu durumun çeşitli nedenleri olabilir. Çalışmada kullanılan yöntem, restriksiyon enzimi temellidir. Sadece restriksiyon enziminin tanıma bölgesindeki metilasyon durumuna göre sonuç verebilmektedir. Genomda başka bölgelerde daha farklı metilasyon oranları gözlenebilir. Enzim kesimi sonrası uygulanan RAPD yöntemi de tekrarlanabilirliği düşük olduğu için hatalar verebilmektedir. Bunların dışında, DNA'nın kırılması veya pipet hataları gibi deneysel hatalar da olmuş olabilir. Deneyde tek yumurta ikizleri kullanılırken genomik bilgileri aynı olarak kabul edilmiştir; ancak yapılan araştırmalarda tek yumurta ikizlerinde tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) ve DNA kopya sayısı farklılıkları (CNV) bulunduğu saptanmıştır (Bruder ve diğ., 2008). Bunun yanı sıra, analizler için ikizlerin tam zigositesi, monokoryonik olup olmadığı ve ikizlerin ayrılma zamanları da epigenetik değişimler açısından önemlidir.

Bu çalışmanın, ikizler arasında görülen diskordansın anlaşılmasına ve hastalıkların belli fenotipinin oluşmasından sorumlu epigenetik faktörlerin araştırılmasına katkıları sağlanması beklenmektedir. Çalışmanın devamında, daha ileri tekniklerle, ikizlerden veya tek bireylerden farklı zamanlarda örnekler alınarak, zaman içindeki epigenetik değişimler ve fenotipik farklılıklar karşılaştırılabilir. Normal ve hastalıklı dokulara özgü metilom analizleri ile hastalıkların epigenetik temeli araştırılabilir. Bu konudaki çalışmalar, epigenetik tedavi yolları geliştirilebilmesi için de önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

BADAL, V., CHUANG, L.S.H., TAN, E.H.-H., BADAL, S., VILLA, L.L., WHEELER, C.M., LI, B.F.L., BERNARD, H.-U., 2003, CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: Genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression, *Journal of Virology*, 77 (11), 6227-6234.

BASSO, O., NOHR, E.A., CHRISTENSEN, K., OLSEN, J., 2004, Risk of twinning as a function of maternal height and body mass index, *Journal of the American Medical Association*, 291, 1564-1566.

BERGER, S.L., 2002, Histone modifications in transcriptional regulation, *Current Opinion in Genetics & Development*, 12, 142-148.

BIRD, A., 2002, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes & Development*, 16, 6-21.

BJORNSSON, H.T., FALLIN, M.D., FEINBERG, A.P., 2004, An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease, *Trends in Genetics*, 20, 350-358.

BOKLAGE, C.E., 2006, Embryogenesis of chimeras, twins and anterior midline asymmetries, *Human Reproduction*, 21 (3), 579-591.

BRUDER, C.E.G., PIOTROWSKI, A., GIJSBERS, A.A.C.J., ANDERSSON, R., ERICKSON, S., DE STAHL, T.D., MENZEL, U., SANDGREN, J., VON TELL, D., POPLAWSKI, A., CROWLEY, M., CRASTO, C., PARTRIDGE, E.C., TIWARI, H., ALLISON, D.B., KOMOROWSKI, J., VAN OMMEN, G.-J.B., BOOMSMA, D.I., PEDERSEN, N.L., DEN DUNNEN, J.T., WIRDEFELDT, K., DUMANSKI, J.P., 2008, Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles, *American Journal of Human Genetics*, 82 (3), 763-771.

BULMER, M.G., 1970, *The Biology of Twinning in Man*. Oxford, UK: Oxford Clarendon Press Oxford, UK

CAETANO-ANOLLES, G., 1996, Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: new developments and applications, *Nature Biotechnology*, 14, 1668-1674

CALIN, G.A., CROCE, C.M., 2006, MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells, *Oncogene*, 25, 6202-6210.

CAMPOS, E.I., REINBERG, D., 2009, Histones: Annotating chromatin, *Annual Review of Genetics*, 43, 559-599.

- CASTRO, R., RIVERA, I., STRUYS, E.A., JANSEN, E.E.W., RAVASCO, P., CAMILO, M.E., BLOM, H.J., JAKOBS, C., DE ALMEIDA, I.T., 2003, Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease, *Clinical Chemistry*, 49, 1292-1296.
- CHRISTMAN, J.K., 2002, 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy, *Oncogene*, 21 (35), 5483-5495.
- COLOT, V., ROSSIGNOL, J.L., 1999, Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device, *Bioessays*, 21 (5), 402-411.
- CRAWFORD, D.C., ACUÑA, J.M., SHERMAN, S.L., 2001, FMR1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review, *Genetics in Medicine*, 3 (5), 359-371.
- DASSANAYAKE, R.S., SAMARANAYAKE, L.P., 2003, Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*, *Critical Reviews in Microbiology*, 29 (1), 1-24.
- DE WOLF, H., BLUST, R., BACKELJAU, T., 2004, The use of RAPD in ecotoxicology, *Mutation Research*, 566, 249-262
- DOLINOY, D.C., WEIDMAN, J.R., WATERLAND, R.A., JIRTLE, R.L., 2006, Maternal genistein alters coat color and protects A^{vy} mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome, *Environmental Health Perspectives*, 114 (4), 567-572.
- DONG, A., YODER, J.A., ZHANG, X., ZHOU, L., BESTOR, T.H., CHENG, X., 2001, Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA, *Nucleic Acids Research*, 29 (2), 439-448.
- ECKHARDT, F., LEWIN, J., CORTESE, R., RAKYAN, V.K., ATTWOOD, J., BURGER, M., BURTON, J., COX, T.V., DAVIES, R., DOWN, T.A., HAEFLIGER, C., HORTON, R., HOWE, K., JACKSON, D.K., KUNDE, J., KOENIG, C., LIDDLE, J., NIBLETT, D., OTTO, T., PETTETT, R., SEEMANN, S., THOMPSON, C., WEST, T., ROGERS, J., OLEK, A., BERLIN, K., BECK, S., 2006, DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22, *Nature Genetics*, 38, 1378-1385.
- EDEN, A., GAUDET, F., WAGHMARE, A., JAENISCH, R., 2003, Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation, *Science*, 300, 455.
- EHRlich, M., 2002, DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements, *Journal of Nutrition*, 132, 2424S-2429S.
- EHRlich, M., TURNER, J., GIBBS, P., LIPTON, L., GIOVANNETÌ, M., CANTOR, C., VAN DEN BOOM, D., 2008, Cytosine methylation profiling of cancer cell lines, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (12), 4844-4849.

ELLSWORTH, D.L., RITTENHOUSE, K.D., HONEYCUTT, R.L., 1993, Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns, *Biotechniques*, 14, 214-217.

ESTELLER, M., 2008, Epigenetics in cancer, *New England Journal of Medicine*, 358, 1148-1159.

FEINBERG, A.P., 2001, Methylation meets genomics, *Nature Genetics*, 27, 9-10.

FEINBERG, A.P., TYCKO, B., 2004, The history of cancer epigenetics, *Nature Reviews Cancer*, 4, 143-153.

FEINBERG, A.P., VOGELSTEIN, B., 1983, Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 111 (1), 47-54.

FRAGA, M.F., BALLESTAR, E., PAZ, M.F., ROPERO, S., SETIEN, F., BALLESTAR, M.L., HEINE-SUÑER, D., CIGUDOSA, J.C., URIOSTE, M., BENITEZ, J., BOIX-CHORNET, M., SANCHEZ-AGUILERA, A., LING, C., CARLSSON, E., POULSEN, P., VAAG, A., STEPHAN, Z., SPECTOR, T.D., WU, Y-Z., PLASS, C., ESTELLER, M., 2005, Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 10604-10609.

FRAGA, M.F., HERRANZ, M., ESPADA, J., BALLESTAR, E., PAZ, M.F., ROPERO, S., ERKEK, E., BOZDOGAN, Ö., PEINADO, H., NIVELEAU, A., MAO, J-H., BALMAIN, A., CANO, A., ESTELLER, M., 2004, A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors, *Cancer Research*, 64, 5527-5534.

FROMMER, M., MCDONALD, L.E., MILLAR, D.S., COLLIS, C.M., WATT, F., GRIGG, G.W., MOLLOY, P.L., PAUL, C.L., 1992, A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 1827-1831.

FULKA, H., MRAZEK, M., TEPLA, O., FULKA, J. Jr., 2004, DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos, *Reproduction*, 128, 703-708.

GRINGRAS, P., CHEN, W., 2001, Mechanisms for differences in monozygous twins, *Early Human Development*, 64, 105-117.

GREWAL, S.I.S., ELGIN, S.C.R., 2007, Transkription and RNA interference in the formation of heterochromatin, *Nature*, 447, 399-406.

GOFFIN, J., EISENHAEUER, E., 2002, DNA methyltransferase inhibitors – state of the art, *Annals of Oncology*, 13, 1699-1716.

GOLDBERG, A.D., ALLIS, C.D., BERNSTEIN, E., 2007, Epigenetics: A landscape takes shape, *Cell*, 128, 635-638.

GOWHER, H., LEISMANN, O., JELTSCH, A., 2000, DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine, *European Molecular Biology Organization Journal*, 19 (24), 6918-6923.

HALL, J.G., 2003, Twinning, *Lancet*, 362 (9385), 735-743.

HOEKSTRA, C., ZHAO, Z.Z., LAMBALK, C.B., WILLEMSSEN, G., MARTIN, N.G., BOOMSMA, D.I., MONTGOMERY, G.W., 2008, Dizygotic twinning, *Human Reproduction Update*, 14 (1), 37-47.

HUNG, M.-S., KARTHIKEYAN, N., HUANG, B., KOO, H.-C., KIGERT, J., SHEN, C.K.J., 1999, *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (21), 11940-11945

JAENISCH, R., BIRD, A., 2003., Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature Genetics*, 33, Suppl:245-254.

JENUWEIN, T., ALLIS, C.D., 2001, Translating the histone code, *Science*, 293, 1074-1080.

JONES, P.A., 1999, The DNA methylation paradox, *Trends in Genetics*, 15 (1), 34-37.

JONES, P.A., TAKAI, D., 2001, The role of DNA methylation in mammalian epigenetics, *Science*, 293, 1068-1070.

KAFRI, T., ARIEL, M., BRANDEIS, M., SHEMER, R., URVEN, L., MCCARREY, J., CEDAR, H., RAZIN, A., 1992, Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the Mouse embryo and germ line, *Genes & Development*, 6, 705-714.

KAMINSKY, Z.A., TANG, T., WANG, S.-C., PTAK, C., OH, G.H.T., WONG, A.H.C., FELDCAMP, L.A., VIRTANEN, C., HALFVARSON, J., TYSK, C., MCRAE, A.F., VISSCHER, P.M., MONTGOMERY, G.W., GOTTESMAN, I.I., MARTIN, N.G., PETRONIS, A., 2009, DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins, *Nature Genetics*, 41 (2), 240-245.

KARPF, A.R., MATSUI, S.-I., 2005, Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells, *Cancer Research*, 65, 8635-8639.

KHULAN, B., THOMPSON, R.F., YE, K., FAZZARI, M.J., SUZUKI, M., STASIEK, E., FIGUEROA, M.E., GLASS, J.L., CHEN, Q., MONTAGNA, C., 2006, Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay, *Genome Research*, 16, 1046-1055.

KIM, D.-W., NELSON, H.H., WIENCKE, J.K., ZHENG, S., CHRISTIANI, D.C., WAIN, J.C., MARK, E.J., KELSEY, K.T., 2001, p16INK4a and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer, *Cancer Research*, 61, 3419-3424.

KIM, M.S., LEE, J., SIDRANSKY, D., 2010, DNA methylation markers in colorectal cancer, *Cancer Metastasis Reviews*, 29, 181-206.

KIZILTEPE, T., HIDESHIMA, T., CATLEY, L., RAJE, N., YASUI, H., SHIRAISHI, N., OKAWA, Y., IKEDA, H., VALLET, S., POZZI, S., ISHITSUKA, K., OCIO, E.M., CHAUHAN, D., ANDERSON, K.C., 2007, 5-azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 6 (6), 1718-1727.

LAMBALK, C.B., DE KONING, C.H., BRAAT, D.D., 1998b, The endocrinology of dizygotic twinning in human, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145, 97-102.

LANE, N., DEAN, W., ERHARDT, S., HAJKOVA, P., SURANI, A., WALTER, J., REIK, W., 2003, Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse, *Genesis*, 35 (2), 88-93.

LI, E., BESTOR, T.H., JAENISCH, R., 1992, Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality, *Cell*, 69 (6), 915-926.

MACHIN, G., 2009, Non-identical monozygotic twins, intermediate twin types, zygosity testing, and the non-random nature of monozygotic twinning: A review, *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)*, 151C, 110-127.

MARINUS, M.G., 1987, DNA methylation in *Escherichia coli*, *Annual Review of Genetics*, 21, 113-131.

MARTIN, C., ZHANG, Y., 2007, Mechanisms of epigenetic inheritance, *Current Opinion in Cell Biology*, 19 (3), 266-272.

MELLO, C.C., CONTE, JR., D., 2004, Revealing the world of RNA interference, *Nature*, 431, 338-342.

MEUNIER, J.R., GRIMONT, P.A., 1993, Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting, *Research in Microbiology*, 144, 373-379.

MORGAN, H.D., SANTOS, F., GREEN, K., DEAN, W., REIK, W., 2005, Epigenetic reprogramming in mammals, *Human Molecular Genetics*, 14 (Review Issue 1), R47-R58.

MULERO-NAVARRO, S., ESTELLER, M., 2008, Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 68: 1-11.

MURRELL, A., RAKYAN, V.K., BECK, S., 2005, From genome to epigenome, *Human Molecular Genetics*, 14 (Review Issue 1), R3-R10.

OKANO, M., BELL, D.W., HABER, D.A., LI, E., 1999, DNA methyl transferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development, *Cell*, 99, 247-257.

OKANO, M., XIE, S., LI, E., 1998b, Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases, *Nature Genetics*, 19 (3), 219-20.

PEMBREY, M.E., BYGREN, L.O., KAATI, G., EDVINSSON, S., NORTHSTONE, K., SJÖSTRÖM, M., GOLDING, J., 2006, Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans, *European Journal of Human Genetics*, 14, 159-166.

PISON, G., D'ADDATO, A.V., 2006, Frequency of twin births in developed countries, *Twin Research and Human Genetics*, 9 (2), 250-259.

PIYATHILAKE, C.J., HENAO, O., FROST, A.R., MACALUSO, M., BELL, W.C., JOHANNING, G.L., HEIMBURGER, D.C., NIVELEAU, A., GRIZZLE, W.E., 2004, Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung (United States), *Cancer Causes and Control*, 14 (1), 37-42.

POMRANING, K.R., SMITH, K.M., FREITAG, M., 2009, Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes, *Methods*, 47 (3), 142-150.

PRADHAN, S., BACOLLA, A., WELLS, R.D., ROBERTS, R.J., 1999, Recombinant human DNA (Cytosine-5) methyltransferase, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 33002-33010.

RAHMAN, A., ISENBERG, D.A., 2008, Mechanisms of disease: Systemic lupus erythematosus, *New England Journal of Medicine*, 358, 929-939.

RAKYAN, V.K., BECK, S., 2006, Epigenetic variation and inheritance in mammals. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16, 573-577.

RAKYAN, V.K., HILDMANN, T., NOVIK, K.L., LEWIN, J., TOST, J., COX, A.V., ANDREWS, T.D., HOWE, K.L., OTTO, T., OLEK, A., ve diğ., 2004, DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome Project, *Public Library of Science Biology*, 2 (12), e405.

RATEL, D., RAVANAT, J.-L., BERGER, F., WION, D., 2006, N6-methyladenine: the other methylated base of DNA, *Bioessays*, 28 (3), 309-315.

RAUCH, T. A., WU, X., ZHONG, X., RIGGS, A.D., PFEIFER, G.P., 2009, A human B cell methylome at 100-base pair resolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (3), 671-678.

REED, T., PLASSMAN, B.L., TANNER, C.M., DICK, D.M., RINEHART, S.A., NICHOLS, W.C., 2005, Verification of self-report of zygosity determined via DNA

testing in a subset of the NAS-NRC twin registry 40 years later, *Twin Research and Human Genetics*, 8 (4), 362-367.

REIK, W., DEAN, W., WALTER, J., 2001, Epigenetic reprogramming in mammalian development, *Science*, 293 (5532), 1089-1093.

RHEE, I., JAIR, K.-W., YEN, R.-W.C., LENGAUER, C., HERMAN, J.G., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., BAYLIN, S.B., SCHUEBEL, E., 2000, CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1, *Nature*, 404, 1003-1007.

ROUNTREE, M.R., SELKER, E.U., 1997, DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*, *Genes & Development*, 11 (18), 2383-2395.

ROUX, K.H., 1995, Optimization and troubleshooting in PCR, *PCR Methods and Applications*, 4, 185-194.

SANTOS, F., HENDRICH, B., REIK, W., DEAN, W., 2002, Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo, *Developmental Biology*, 241 (1), 172-182.

SELKER, E.U., TOUNTAS, A.N., CROSS, S.H., MARGOLIN, B.S., MURPHY, J.G., BIRD, A.P., FREITAG, M., 2003, The methylated component of the *Neurospora crassa* genome, *Nature*, 422, 893-897.

ST CLAIR, A., XU, M., WANG, P., YU, Y., FANG, Y., ZHANG, F., ZHENG, X., GU, N., FENG, G., SHAM, P., HE, L., 2005, Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961, *Journal of the American Medical Association*, 294 (5), 557-562.

SUSSER, E., WOEEK, H.W., BROWN, A., 1998, Neurodevelopmental disorders after prenatal famine, The story of the Dutch famine study, *American Journal of Epidemiology*, 147 (3), 213-216.

TURTON, P., NEILSON, J.P., QUENBY, S., BURDYGA, T., WRAY, S., 2009, A short review of twin pregnancy and how oxytocin receptor expression may differ in multiple pregnancy, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 144S, S40-S44.

VOLPE, T.A., KIDNER, C., HALL, I.M., TENG, G., GREWAL, S.I.S., MARTIENSSEN, R.A., 2002, Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi, *Science*, 297 (5588), 1833-1837.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., VE DÍĚ., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, 23 (21), 4407-4414.

WADDINGTON, C.H., 1942, The epigenotype, *Endeavour*, 1, 18-20.

WARBURTON, P.E., 1999, Making CENs of mammalian artificial chromosomes, *Molecular Genetics and Metabolism*, 68, 152-160.

WASSENEGGER, M., 2005, The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation, *Cell*, 122, 13-16.

WATERLAND, R.A., DOLINOY, D.C., LIN, J.-R., SMITH, C.A., SHI, X., TAHILIANI, K.G., 2006, Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at *Axin fused*, *Genesis*, 44 (9), 401-406.

WATERLAND, R.A., JIRTLE, R.L., 2003, Transposable elements: Targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation, *Molecular and Cellular Biology*, 23 (15), 5293-5300.

WEBER, M., DAVIES, J.J., WITTING, D., 2005, Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells, *Nature Genetics*, 37: 853-862.

WEBER, M., HELLMANN, I., STADLER, M.B., RAMOS, L., PAABO, S., REBHAN, M., SCHÜBELER, D., 2007, Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome, *Nature Genetics*, 39, 457-466.

WEKSBERG, R. ve diğ., 2002 Discordant *KCNQ1OT1* imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome, *Human Molecular Genetics*, 11, 1317-1325.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, 18 (22), 6531-6535.

ZHANG, X., YASAKI, J., SUNDARESAN, A., COKUS, S., CHAN, S., CHEN, H., HENDERSON, I., SHINN, P., PELLEGRINI, M., JACOBSEN, S., 2006, Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*, *Cell*, 126 (6), 1189-1201.

ZILBERMAN, D., HENIKOFF, S., 2007, Genome-wide analysis of DNA methylation patterns, *Development*, 134, 3959-3965.

**EK 1**

**TEK YUMURTA İKİZLERİNDE METİLASYON ANALİZLERİ
ARAŞTIRMA FORMU**

Kod No:

Tarih: .../.../2009

Adı Soyadı: _____

Adres: _____

Tel: _____

Doğum Tarihi: .../.../..... Cinsiyeti: Kadın / Erkek

Bugüne kadar yaşadığı yöreler: _____

Daha önce çalışılan işler: _____

Daha önce maruz kalınan mutajenik ajanlar:

Radyasyon ışıması Kömür ürünleri Petrol ürünleri Tarım ilacı veya hormon Boyalar Çözücüler Diğer kimyasal maddeler : _____**SİGARA İÇME ALIŞKANLIĞI:**Yok Sigara Puro Pipo

İçme süresi ve miktarı: _____

Daha önce içildi ise ne zaman bırakıldı? _____

Ne kadar süreyle kullanıldı? _____

SAĞLIK DURUMU:

Son on yıl içinde geçirilen önemli hastalıklar: _____

Teşhis ve tedavi amacıyla alınan X-ışınları veya diğer radyoaktif maddeler: _____

Devamlı kullanılan ilaç varsa, adı ve kullanılan süre: _____

GENETİK ÖZGEÇMİŞ:

Aileyi ve yakın akrabaları etkileyen herhangi bir doğumsal özür veya genetik bir kusur var mı?

Hayır Evet : _____

Ailede veya yakın akrabalarda kanser hastalığı geçiren kimse var mı?

Hayır Evet : _____

DNA metilasyon analiz testleri için hasta ve bazı koşullarda aile üyelerinden, 1 adet 2cc'lik EDTA'lı kan örneği alınması gereklidir. Örneğin yeterli olmaması durumunda yeniden kan örneği alınabilir.

İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEN) laboratuvarına gelen tüm kan örneklerine bir kayıt numarası verilerek söz konusu laboratuvarın yalnızca yetkilileri tarafından erişilebilen bir veri tabanında saklanacaktır. Bu bilgiler, üçüncü şahıslara kesinlikle aktarılmaz. Laboratuvarımızda elde edilen DNA örnekleri kodlanarak -20°C de saklanacaktır.

Burada attığım imza ile genetik testlerimin yapılması, materyalimin saklanması ve gereği halinde kimlik bilgilerim saklı olmak koşulu ile elde edilen verilerin bilimsel çalışmalarda kullanılmasını kabul ediyorum ve bu onayı verirken yukarıdaki bilgileri okuduğumu, anladığımı ve kabul ettiğimi de tasdik ediyorum.

Adı Soyadı:

İmza:



ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Bulgaristan’da doğdum. Orta ve lise öğrenimimi Bursa Anadolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ne kayıt oldum. 2006 yılında Mart-Temmuz aylarında Erasmus programı ile Hollanda’nın Groningen şehrinde bulunan University of Groningen’de eğitim gördükten sonra, bölümümden 2007 yılında mezun oldum. 2008 yılının Mart ayında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda eğitimime başladım. Şubat 2010’dan itibaren İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak görev almaktayım.