

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DNMT1 ENZİMİNİN ÜROGENİTAL KANSERLERDE İFADELENME DÜZEYİ

DOKTORA TEZİ

Nuray VAROL

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ece KONAÇ

ANKARA
KASIM 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DNMT1 ENZİMİNİN ÜROGENİTAL KANSERLERDE İFADELENME DÜZEYİ

DOKTORA TEZİ

Nuray VAROL

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ece KONAÇ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2013-06 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
KASIM 2013

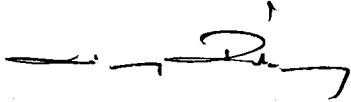
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

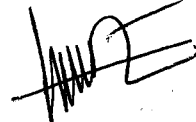
Tez Savunma Tarihi: 28/11/2013



Prof. Dr. ABDULLAH EKMEKÇİ
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. CENK YÜCEL BİLEN
Hacettepe Üniversitesi



Doç. Dr. ECE KONAÇ
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. MEHMET ALI ERGÜN
Gazi Üniversitesi



Doç. Dr. SERHAT GÜROCAĞ
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul Ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller Ve Grafikler	vi
Tablolar	ix
Semboller Ve Kısaltmalar	x
Önsöz	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. DNA Metilasyonu	3
2.1.1. DNA Metilasyon Dinamiği	5
2.1.2. Epigenetik Sinyal Olarak DNA Metilasyonu	6
2.2. DNA Metiltransferazlar	8
2.2.1. DNMT1 Enzimi	9
2.2.2. DNMT2 Enzimi	11
2.2.3. DNMT3 Enzimi	12
2.2.4. DNMT3L Enzimi	12
2.3. Etkileştiği Faktörler Aracılığıyla DNMT1'in Düzenlenmesi	13
2.4. Modifikasyonlar Aracılığıyla DNMT1 Enzim Aktivitesinin Düzenlenmesi	17
2.5. DNA Metilasyonu ve Ürogenital Kanseler	19
2.5.1 Renal Hücreli Kanseler	19
2.5.2. Mesane Kanseri	20
2.5.3. Prostat Kanseri	21
2.6. Ubiquitinasyon ve Deubiquitinasyon Mekanizması	22
2.6.1. Ubiquitin Konjugasyon Mekanizması	23
2.6.2. E3 Ubiquitin Ligaz ve Kanser	24
2.6.3. PHD ve RING Parmak İçeren Ubiquitin Benzeri Domain 1 (UHRF1)	25

2.6.4.	Ubiquitin Dekonjugasyon Mekanizması	26
2.6.5.	DUB'lar ve Kanser	27
2.6.6.	Herpes İlişkili Ubiquitin Spesifik Proteaz (HAUSP/USP7)	28
2.7.	WNT/ β -Katenin Sinyal Yolağı	29
2.7.1.	WNT/ β -Katenin Sinyal Yolağı ve Renal Hücreli Kanserler	33
2.7.2.	WNT/ β -Katenin Sinyal Yolağı ve Mesane Kanseri	34
2.7.3.	WNT/ β -Katenin Sinyal Yolağı ve Prostat Kanseri	35
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1.	Kullanılan Cihazlar	37
3.2.	Kullanılan Sarf Malzemeler	38
3.3.	Kullanılan Kimyasallar	38
3.4.	Kullanılan Kitler	39
3.5.	Hücre Hatları	39
3.6.	Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	40
3.6.1.	%10'luk RPMI 1640 ve McCoy's 5A Besiyerlerinin Hazırlanışı	40
3.6.2.	%1'lik RPMI 1640 ve McCoy's 5A Besiyerlerinin Hazırlanışı	40
3.6.3.	Hücre Lizis Solüsyonunun Hazırlanışı	40
3.6.4.	PMSF Solüsyonu	40
3.6.5.	Akrilamid/Bisakrilamid Solüsyonu	41
3.6.6.	1,5M Tris Buffer (pH:8,8) (150 ml)	41
3.6.7.	0,5M Tris Buffer (pH:6,8) (150 ml)	41
3.6.8.	10X Tris-Glisin Stok Solüsyonu	41
3.6.9.	10X Running Buffer (pH:8,3) (1000 ml)	41
3.6.10.	Transfer Buffer	42
3.6.11.	2X Sample Buffer	42
3.6.12.	Amonyum Persülfat (APS) Solüsyonu	42
3.6.13.	10X TBS Solüsyonu	42
3.6.14.	Yıkama Solüsyonu	42
3.6.15.	Primer ve Sekonder Antikor Dilüsyon Solüsyonu	43
3.6.16.	Bloklama Solüsyonu	43

3.7.	Yöntemler	43
3.7.1.	Hücre Kültürü	43
3.7.2.	WST-1 Sitotoksosite Deneyi	44
3.7.3.	DNA İzolasyonu	44
3.7.4.	Metilasyona Özgü PCR (MS-PCR)	45
3.7.5.	Agaroz Jel Elektroforezi	47
3.7.6.	Hücrelerden total RNA İzolasyonu	47
3.7.7.	cDNA Sentezi	48
3.7.8.	Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü	49
3.7.9.	Light Cycler (LC) 480 Deney Programı	50
3.7.10.	Protein İzolasyonu	52
3.7.11.	BCA Kiti İle Protein Miktar Tayini	52
3.7.12.	Western Blot Yöntemi İle Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	53
3.8.	İstatistiksel Analiz Yöntemleri	54
4.	BULGULAR	55
4.1.	Hücre Canlılığı sonuçlarının Değerlendirilmesi	55
4.2.	Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	59
4.2.1.	Kantitatif CTNNB1 Geninin İfade Düzeyinin ve DNMT1, β - katenin ve pGSK3 β Protein İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi	61
4.2.2.	WIF-1 Geninin İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	67
4.3.	UHRF1 ve HAUSP Protein İfade Düzeyler	67
4.4.	Metilasyon Profillerinin Belirlenmesi	71
4.5.	DAC Uygulaması Sonrasında DNMT1, β -katenin ve UHRF1 Protein Düzeyi	71
5.	TARTIŞMA	72
6.	SONUÇ	83
7.	ÖZET	85
8.	SUMMARY	86
9.	KAYNAKLAR	87

10.	EKLER	105
11.	ÖZGEÇMİŞ	106

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER

Şekil 1.	Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-mC'in mutagenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi	5
Şekil 2.	DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel baskılanma mekanizması.	7
Şekil 3.	Memeli DNMT üyelerinin genel yapısı	8
Şekil 4.	DNMT1 enzim izoformları	11
Şekil 5.	DNMT1 enziminin etkileşime girdiği proteinler	15
Şekil 6.	Postranslasyonel modifikasyonlar aracılığıyla DNMT1 enziminin düzenlenmesi	18
Şekil 7.	Ubiquitin-proteozom sistemi	24
Şekil 8.	UHRF1 proteininin yapısı	26
Şekil 9.	HAUSP proteininin yapısı	28
Şekil 10.	Wnt/ β -katenin sinyal yolağı (kanonikal Wnt sinyal yolağı) ve antagonistlerinin şematik gösterimi	31
Şekil 11.	<i>CTNNB1</i> , <i>WIF-1</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	60
Şekil 12.	T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	62
Şekil 13.	Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	63
Şekil 14.	Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 10 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	64
Şekil 15.	PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	65

Şekil 16.	PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 10µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β-katenin, pGSK3β(Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	66
Şekil 17.	T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	68
Şekil 18.	Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 1µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	68
Şekil 19.	Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 10µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	69
Şekil 20.	PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 1µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	70
Şekil 21.	PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 10µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	70
Şekil 22.	Caki-2 hücrelerinde DAC inkübasyonu öncesi ve sonrası <i>WIF1</i> genine ait metilasyon profilleri	71
Şekil 23.	10µM 72 saat DAC ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β-katenin, UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler	71
Şekil 24.	Wnt sinyal yolağında yer alan tümör baskılayıcı ve onkogenler	75
Şekil 25.	DNMT1'in kararlılığının posttranslasyonel düzenlenme modeli	79
Grafik 1.	T24 hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) SB216763 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.	56

Grafik 2.	Caki-2 hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) SB216763 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.	57
Grafik 3.	PC3 hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) SB216763 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.	58
Grafik 4.	LNCaP hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) SB216763 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.	59
Grafik 5.	T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında <i>CTNNB1</i> mRNA düzeyindeki değişimler	61
Grafik 6.	Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 1µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında <i>CTNNB1</i> mRNA düzeyindeki değişimler	62
Grafik 7.	PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 1µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında <i>CTNNB1</i> mRNA düzeyindeki değişimler	64
Grafik 8.	LNCaP hücrelerinin süre-bağımlı 1µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında <i>CTNNB1</i> mRNA düzeyindeki değişimler	66
Grafik 9.	10µM 72 saat DAC ile inkübasyonu sonrasında <i>WIF-1</i> ve <i>CTNNB1</i> mRNA düzeyindeki değişimler	67

TABLÖLER

Tablo 1.	MS-PCR primer dizileri	46
Tablo 2.	MSP reaksiyon koşulları	46
Tablo 3.	cDNA RT-PCR tepkime karışımı	48
Tablo 4.	Real-time PCR, primer, prob dizileri	50
Tablo 5.	<i>GAPDH</i> , <i>CTNNB1</i> ve <i>WIF-1</i> Real-Time PCR tepkime karışımı	50
Tablo 6.	<i>GAPDH</i> , <i>CTNNB1</i> ve <i>WIF-1</i> genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı	51

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AdoMet	: S-adenozil-L-metiyonin
ATRX	: Sisteince zengin çinkp parmağı DNA bağlanma motifi
BAH	: Brom-bitişik homoloji domain
CA	: Ko-aktivatör
CaP	: Prostat kanseri
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
-CH₃	: Metil grubu
CK1	: Kazein kinaz 1
CpG	: Sitozin-Guanin dinükleotidi
CR	: Ko-represör
DKK	: Dickkopf
DMP1	: DNA metiltransferaz 1 ilişkili protein 1
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNA MTaz	: DNA metiltransferaz
DNMT1	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 1
DNMT2	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 2
DNMT3A	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 3A
DNMT3B	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 3B
DNMT3L	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 3-benzerlike
DNMT1o	: DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 1 oosit
DUB	: Deubiquitinaz
E1	: ATP-bağımlı ubiquitin enzim
E2	: Ubiquitin-konjuge edici enzim
E3	: Uç ubiquitin ligaz
E2F1	: E2F transkripsiyon faktör 1
EED	: Embriyonik ektoderm gelişim
EHMT2	: Ökromatik histon-lizin N-metiltransferaz 2
EZH2	: Enhancer of zeste homolog

FOXO4	: Çatalbaş (Forkhead) kutu 1
Fz	: Frizzled reseptörü
GSK3β	: Glikojen sentez kinaz 3 beta
dH₂O	: Distile su
H3	: Histon 3
H3K4	: Histon 3 lizin 4
H3K9	: Histon 3 lizin 9
H3K27	: Histon 3 lizin 27
HAT	: Histon asetilaz
HAUSP	: Herpes ilişkili Ubiquitin Spesifik Proteaz
HDAC	: Histon deasetilaz
HECT	: E6-AP karboksik uç homolog
HIG2	: Hipoksi uyarılı protein-2
JAMM	: JAB17MPN7Mov34 metaloenzim domain
HP1	: Heterokromatin protein 1
kb	: Kilobaz
KDM1A	: Lizin spesifik demetilaz LSD1
KG	: Glisin-Lizin
Lys	: Lizin
^mC	: Metil-Sitozin
5-mC	: 5-metilsitozin
μl	: Mikro litre
μM	: Mikro Molar
ml	: Mililitre
MeCP	: Metile CpG bağlanma protein
MBP	: Metile bağlanma protein
MJD	: Machado Josephin domain
MMP	: Matriks metaloproteinaz
MS-PCR	: Metilasyon Spesifik PCR
NLS	: Nükleer lokalizasyon sinyal
OTU	: Overyen tümör domain

PBD	: Proliferatif hücre nüklear antijen bağlayıcı domain
PcG	: Polikomb grup
PCNA	: Proliferatif hücre nüklear antijen
PHD	: Polibrom homoloji domain
PKD	: Protein kinaz D
PRC2	: Polikomb baskılayıcı kompleks 2
PTEN	: Fosfotaz ve tensin homolog
PWWP	: Prolin-Triptofan-Triptofan-Prolin
Rb	: Retinoblastoma
RCC	: Renal hücreli karsinoma
rDNA	: Ribozomal DNA
Ser	: Serin
sFRP	: Salgılanan Frizzled ilişkili protein
SRA	: SET ve RING ilişkili domain
STAT3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyonel aktivatör 3
SKP2	: S fazı kinaz ilişkili protein 2
Sox7	: SRY (cinsiyet belirleyici bölge Y)- kutu 7
Suv39H1	: Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
UCH	: C uç hidrolaz
UHRF1	: PHD ve RING Parmak İçeren Ubiquitin Benzeri Domain
USP	: Ubiquitin spesifik proteaz
WIF-1	: Wnt baskılayıcı faktör 1
WNT	: Wingless-tip MMTV integrasyon bölge ailesi
TCC	: Transizyonel hücreli karsinom
TCF-1/LEF-1	: T hücre faktörü-1/lenfoid enhancer bağlanan-1
TF	: Transkripsiyon faktörü
Thr	: Treonin

ÖNSÖZ

“Dnmt1 Enziminin Ürogenital Kanserlerde İfadeleme Düzeyi” konulu bu doktora tezi, Gazi Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı’nca **01/2013-06** kod no’lu proje ile desteklenmiştir. Çalışmamız, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

1.GİRİŞ

Ürogenital sistem tümörleri kemiğe en sık metastaz yapan tümörlerdendir. Prostat kanseri, mesane kanseri ve renal hücreli kanserde yüksek oranda kemik metastazı görülmektedir. Tümör mikro çevresindeki epigenetik değişimler primer tümörlerin özellikle proliferasyonunu ve metastazını etkilemektedir.

Epigenetik değişiklikler, DNA sekansında herhangi bir değişiklik olmaksızın söz konusu bir genin ekspresyonundaki bölgesel ve geçici değişiklikler olup kromatin yapısının stabilitesi, genom bütünlüğü, doku tipine özgü gen ifadelerinin düzenlenmesi, embriyonik gelişim, genomik imprinting ve X kromozomunun inaktivasyonundan sorumludur. Epigenetik mekanizmalar içerisinde en önemlisi DNA metilasyonudur ve bir diğer epigenetik mekanizma olan histon modifikasyonu ile de ilişki içerisindedir. Küçük-ölçekli epigenetik işaretlerin çalışılması kanser biyolojisinin anlaşılmasında oldukça önemlidir. Örneğin, tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu onların transkripsiyonel baskılanmasıyla ilişkili olup kanser patogenezinin tanımlanmasında anahtar öneme sahiptir.

Memeli genomunda DNA metilasyon, DNA metiltransferaz adı verilen bir enzim aracılığıyla meydana gelir. DNA metiltransferaz enzimi, genomik DNA'daki CpG dinükleotidlerini (CpG adacıkları) substrat olarak kullanır. DNMT1'in artan ifadenme miktarından dolayı DNA metilasyon profilini değiştirdiği gösterilmiştir.

DNMT1 enzimi çoklu sinyal yollarının hedef genlerinden biri olup bu yolların özellikle kanser oluşum sürecinde sürekli aktivasyonlar sonucunda aşırı derecede ifadenmektedir. Bu sinyal yollarından biri

Wnt/ β -katenin sinyal yolağıdır ve ürogenital sistem kanserlerinin patogeneğinde rol oynayan önemli yolaklardan biridir.

DNMT1, hücre döngüsü bağımlı olarak asetilasyon ve ubiquitinasyon gibi modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Bu modifikasyonlar aracılığıyla DNMT1 kararlılığı kontrol edilmektedir. DNMT1'in kararlılığında önemli rol oynayan enzimlerden biri deubiquitinasyon enzimi HAUSP (USP7) ve bir diğeri ise E3 ubiquitin ligaz olan UHRF1 enzimidir. Bu proteinlerin ifadenme düzeyleri DNMT1 kararlılığı ile doğrudan ilişkilidir.

Ürogenital sistem kanserlerinde artmış, DNMT1 ifadenme düzeyi ile sıklıkla karşılaşılmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda yalnızca ürogenital sistem kanserlerinde değil diğerkanser türlerinde de bu artışın nedeni tam olarak belirlenebilmiş değildir. Bu amaçla çalışmamızda, DNMT1 protein düzeyindeki bu artışın nedenlerine yol açan moleküler faktörleri belirlemeyi hedefledik. Bu bağlamda ilk olarak GSK3 β inhibitörü kullanılarak Wnt/ β -katenin sinyal yolağı insan mesane kanser hücre hattı T24, insan renal hücre karsinoma hücre hattı Caki-2 ve insan prostat hücre hatları PC3 ve LNCaP hücrelerinde aktive edilmiş olup bu aktivasyonun DNMT1, β -katenin ve pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin ifadenme düzeyleri üzerine olan etkileri belirlenmiştir. İkinci olarak ise DNMT inhibitörü kullanılarak Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inaktive edildikten sonraki DNMT1, HAUSP ve UHRF1 enzimlerinin ifadenme düzeylerindeki değişimler tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda ürogenital kanserlerde DNA metilasyonun kalıtılmasında önemli role sahip olan DNMT1, HAUSP ve UHRF1 enzimlerinin ifadenme düzeylerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının önemli rol oynadığını gösteren ilk çalışmadır.

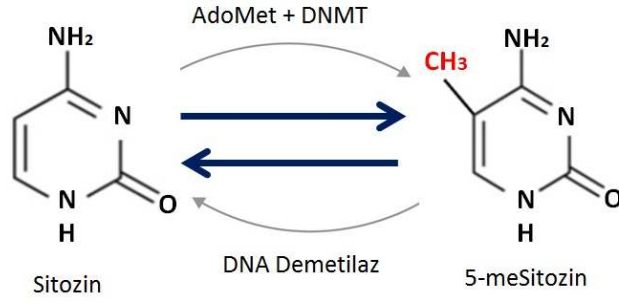
2. GENEL BİLGİLER

Gen ifadesinin düzenlenmesinde çeşitli mekanizmalar görev almaktadır. Bunlardan birisi epigenetik kontrol mekanizmasıdır. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları en çok çalışılan epigenetik mekanizmalardandır. Genlerin kontrol bölgelerinde yer alan CpG adacıklarının metillenmesi bu genlerin transkripsiyonunu tamamen veya kısmen durdurur. Bununla birlikte, gen ifadenmesinin baskılanmasına neden olan ikinci bir epigenetik mekanizma ise histon modifikasyonlarıdır¹. Histon modifikasyonları içerisinde, Histon 3 (H3) deasetilasyonu, H3 lizin 4 (H3K4)'ün demetilasyonu ve H3 lizin 9 (H3K9)'un metilasyonu heterokromatin bölgeler için bir belirteçtir. Mesane, böbrek ve prostat kanserlerinin de içinde yer aldığı birçok kanser tipinde hücre döngüsü, gelişimi ve ölümü; sinyal iletimi ve gen düzenlenmesini kontrol eden genlerde anormal epigenetik düzenlenmeler gözlenmektedir².

2.1. DNA Metilasyonu

Bilinen dört baza ek olarak özellikle yüksek ökaryotik genomda CpG dinükleotid bölgelerinde (CpG adacıkları) metilenmiş sistein rezidüleri bulunmaktadır. DNA metilasyonu hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda adenin ve sitozin bazlarında meydana gelmekte ve ilk kez Hotchkiss tarafından 1948 yılında dana timüs dokusunda keşfedilmiştir^{3,4}. Bu modifikasyon genellikle 5'-CG-3' kanonikal sekansında meydana gelmektedir. Memeli genomunda metilasyon yalnızca 5'-CpG-3' dinükleotidlerindeki guaninin 5' ucunda lokalize olan sitozin bazının 5. pozisyonundaki karbonuna metil (-CH₃) grubunun kovalent bağla eklenmesiyle meydana gelir⁵ (Şekil 1). Herhangi bir metil grubu DNA'nın büyük oluşuna bağlandığından dolayı Watson/Crick baz eşleşmesini bozmamakla birlikte DNA-protein interaksiyonunu etkilemektedir^{4,5}. İnsan

ve fare genomunda bulunan CpG dinükleotidlerin %3-8'i metillenmiştir⁴. CpG adacıkları, "house keeping" genleri olarak bilinen temel genlerde ve doku tipine özgü genlerin 5' promotör bölgelerinde ve ayrıca genlerin ekzon'larında bulunmaktadır. İnsan genomunda böyle tanımlanmış 45.000 CpG adacığı bulunmaktadır ve normal hücrelerde bu bölgeler genellikle metile değildir²⁵⁻²⁷. Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon DNA replikasyonundan sonra meydana gelir ve bu olay DNA metiltransferaz (MTaz) enzimi tarafından katalizlenir. DNA MTaz enzimi, genomik DNA'daki CpG adacıklarını substrat olarak kullanır^{3,4}. İlk kez 1964 yılında Gold ve Hurwitz tarafından DNA metiltransferaz enzimi keşfedilmiştir⁶. İlk memeli DNA MTaz ise Razin ve grubu tarafından keşfedilmiş olup bugün Dnmt1 (DNA methyltransferase) olarak adlandırılmaktadır⁷. Bütün DNA MTaz'lar S-adenozil-L-metiyonin (AdoMet)'i metil grubu kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. DNA metilasyonu DNA'da barındırılan epigenetik bilginin önemli bir taşıyıcısıdır⁴. DNA metilasyonunun memelilerde gen baskılanması, hücresel gelişim ve farklılaşmanın kontrolü, kromozomal bütünlüğünün korunumu, paternal imprinting ve X kromozomunun inaktivasyonu gibi çok çeşitli önemli fonksiyonları bulunması bu nedenle şaşırtıcı değildir. Ayrıca, DNA metilasyonu, endojen retrovirüslerin sessizleştirilmesi ve homolog rekombinasyonun engellenmesine neden olmaktadır. Genomik metilasyon örüntüsündeki somatik değişimler kanser gelişimine ve yaşlanmaya yol açmaktadır. Bundan dolayı, memelilerde normal embriyonik gelişim için DNA metilasyonu gereklidir^{3,4}. Bu olayın en önemli dezavantajı metile sitozinin deaminasyona uğramasıdır. Metil-sitozin (^mC) deaminasyon sonucunda timin bazına dönüşür. Unmetile sitozinin deaminasyonu sonucunda ise urasile dönüşür, fakat bu DNA onarım sistemi tarafından tanınır ve Urasil-deglikozilaz yolağı aracılığıyla etkin bir şekilde onarılır. Sonuç olarak CpG bölgeleri büyük mutasyonel sıcak bölgeleridir ve germline ve sonradan kazanılan somatik mutasyonların yaklaşık %30'undan sorumludur⁴.



Şekil 1. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-mC'in mutagenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi.

Ayrıca DNA metilasyonu, metilasyon, ubiquitinasyon, asetilasyon ve fosforilasyon gibi dinamik histon modifikasyonları ile birlikte hedef genlerin ifadelenmelerinin düzenlenmesinde işbirliği içerisinde hareket ettiği görülmektedir¹.

2.1.1. DNA Metilasyon Dinamiği

Memelilerde, genom boyunca preimplante embriyoda hemen hemen metilasyonunun silinmesinden sonra DNA metilasyonunun yeniden programlanması germ hücrelerinde ve preimplante olmuş embriyoda gerçekleştiği bilinmektedir. Bu işlem var olan epigenetik bilginin silinmesine ve gelişim döngüsü için sistemin resetlenmesi açısından oldukça önemlidir. Sperm kromatininin yeniden programlanması, DNA replikasyonu başlamadan önce spermdeki protaminlerin asetile histonlar ile yer değiştirmesiyle fertilizasyondan hemen sonra başlar. Metilasyon-demetilasyon dönüşüm mekanizmaları halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir⁸. Maternal olarak kalıtılan genom dereceli olarak her bir bölünmede pasif mekanizmalar ile demetile edilmektedir. Bu zaman süresince genomda temel genler ve tekrar sekanslarında metilasyon azalmaktadır⁹. Ancak geniş ölçüde imprintlenmiş genler ve retrovirüsler bu işlemde önemli derecede muaf tutulmuş ve onların metilasyon işaretleri

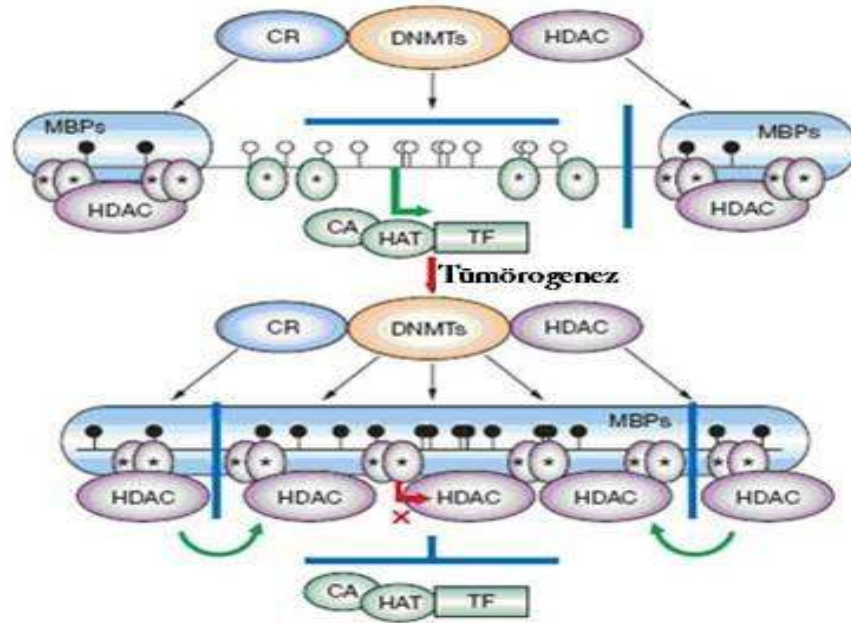
devam ettirilmiştir. Bu bölgelerin *de novo* metilasyonu, embriyonik ve ekstraembriyonik soylar boyunca farklı derecede implantasyon zamanında tekrardan metillenirler. Metilasyonun restorasyonu *de nova* metilasyon aktivitesine bağlıdır. Bundan sonra DNA metilasyonu somatik soylarda devam ettirilir. Sperm ve yumarta genomuna göre somatik hücre genomu daha düşük oranda metilasyona sahiptir. Germ hücrelerinin metilasyonu süresince, benzer yeniden programlanma döngüsü erkek ve dişi primordial germ hücrelerinin gelişiminde genom boyunca demetilasyon aracılığıyla meydana gelir. Erkek ve dişi germ hatlarının tekrardan metilasyonu, gametogenezin farklı aşamalarında sonradan meydana gelir. Germ hücrelerindeki bu tekrar programlanma imprintlerin resetlenmesi için gereklidir ve kazanılmış epigenetik modifikasyonların kaldırılmasında rol oynar⁸.

2.1.2. Epigenetik Sinyal Olarak DNA metilasyonu

Tek veya birkaç CG adacıklarının metilasyonu, DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyebilir veya ¹⁴C-bağlanma proteinlerinin bu bölgelere bağlanmasına neden olabilir. Dolayısıyla, DNA metilasyonu geniş ölçüde kromatin organizasyonu ile ilişkilidir; Unmetile bölgeler ökromatin bölgeleri, aşırı derecede metillenmiş bölgeler heterokromatin bölgeleri olarak adlandırılmaktadır¹.

DNA metilasyonu, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi histon kuyruğu modifikasyonları ile fonksiyonel olarak bağlantılıdır. DNA genellikle unmetile durumda iken histonlar asetile durumda, metillenmiş ise genellikle histonlar deasetile ve H3K9 metile pozisyonunda bulunmaktadır (Şekil 2). DNA metilasyonu ve histon kuyruğu deasetilasyonu birbirini tetiklemek suretiyle sinerjik olarak hareket eder ve baskılanmış kromatin yapısını oluştururlar. Bitkilerde ve

funguslarda H3K9 metilasyonu *de novo* metilasyonunu tetikler¹⁰. Buna karşın, *Arabidopsis* ve insanda CG metilasyonunun silinmesi H3K9 metilasyonunu değiştirir¹¹. Bu yüzden DNA metilasyonu, H3K9 metilasyonu ve histon deasetilasyonu kendinden dayatmacı epigenetik çevre oluşumuna neden olur. Bu yapı, aktif ve inaktif durum arasındaki değişim ile gen ifadenmesinin kontrolünde yarı kararlı epigenetik anahtardır. Epigenetik gen düzenlenme fonksiyonunun kalıtılabilmesi oldukça önemli olan durum olup geri dönüşümsüz değildir. Ayrıca, ökromatin ve heterokromatin bölgeler, replikasyon mekanizması ve zamanı bakımından farklılık göstermektedir. Heterokromatin bölgeler geç replike olurken ökromatin bölgeler daha erken replike olmaktadır. Heterokromatin yapısının oluşumu, geniş ölçüde gen baskılanmasının etkin ve kararlı olmasını sağlamaktadır¹².



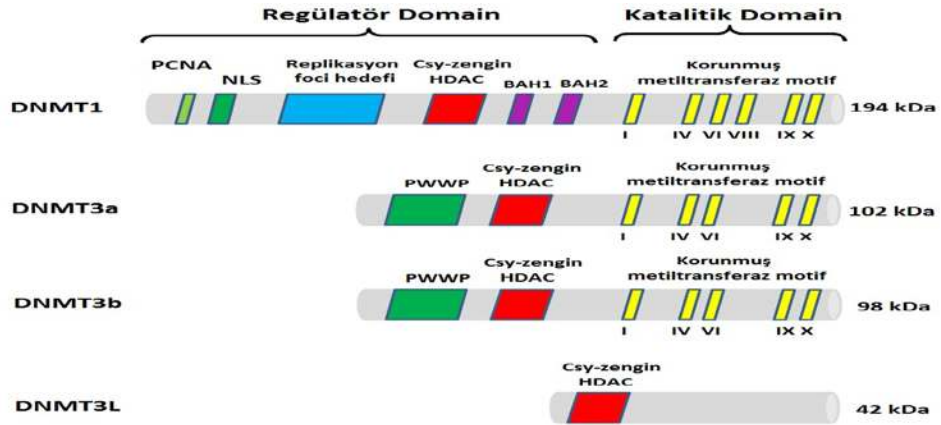
Şekil 2. DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel baskılanma mekanizması. HDAC; Histon deasetilaz, TF; Transkripsiyon faktörü, CR; Ko-aktivatör, HAT; Histon asetilaz, MBP; Metil sitozin bağlanma proteini, DNMT; DNA MTaz enzimi, CR; Korepresör⁵

2.2. DNA Metiltransferazlar

İlk DNMT enzimi, *Haemophilus haemolyticus*'dan izole edilmiş ve klonlanmıştır. Bu bakteriyal DNMT enzimi 327 amino asit uzunluğunda olup ökaryotik Dnmt'den üç kat daha küçüktür. Ökaryotik DNMT ailesinin tanımlanmış beş üyesi bulunmaktadır; DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L.

Memeli DNMT'ler en üç yapısal bölge içerirler;

- N uç düzenleyici domain: nükleusta DNMT'lerin lokalizasyonundan sorumludur, bu bölgede proliferatif hücre nükleer antijen bağlayıcı domain (PBD), nükleer lokalizasyon sinyal (NLS), sisteince zengin çinko parmağı DNA bağlanma motifi (ATRX), polibrom homoloji domain (PHD) ve PWWP tetrapeptid kromatin-bağlanma domain'leri bulunmaktadır.
- C uç katalitik domain; on farklı karakteristik sekans modifi içerirler. Bunların altı tanesi evrim süresince korunmuştur; motif I, IV, VI, VIII, IX ve X
- Merkez bağlayıcı; glisin-lizin (KG) tekrarlarından oluşur (Şekil 3).



Şekil 3. Memeli DNMT üyelerinin genel yapısı .

Memeli sitozin DNA MTaz enzimi, tercih ettikleri DNA substratlarına göre, *de novo* MTaz (DNMT 3A ve 3B) ve sürerlik (maintenance) MTaz (DNMT1) olmak üzere 2 gruba ayrılır. Memeli DNA metilasyon örüntüleri erken gelişim döneminde *de novo* MTaz DNMT3A ve DNMT3B tarafından postreplikasyonel m⁵C'e dönüştürürken sürerlik MTaz DNMT1 aracılığıyla ise replikasyon süresince yarı metile DNA'ya metil grubunu ekleyerek somatik hücrelerde metilasyon kalıbı kopyalanmaktadır^{3,4}.

2.2.1. DNMT1 Enzimi

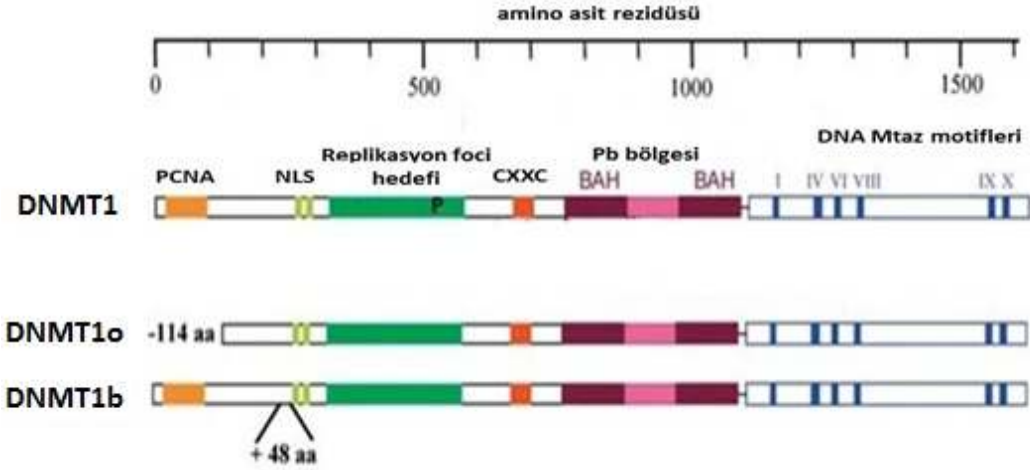
DNMT1, ilk keşfedilen memeli DNA MTaz enzimi ve DNA metilasyon örüntülerinin sürdürülmesi için replikasyon süresince sorumlu olan temel enzimdir. Kromozom 19'de yer almaktadır. Ökaryotik genomik DNA replikasyonu süresince DNMT1, replikasyon çatalında lokalize olup replikasyon döngüsünde doğrudan yeni sentezlenen DNA iplikçiklerini metillemektedir. Metillenmemiş DNA'ya göre yarı metile DNA'ya *in vitro* olarak 5 ila 40 kat daha yüksek afinitesi bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu enzimin oldukça zayıf *de novo* metilasyon aktivitesi bulunmaktadır. DNMT1 enzimi, prokaryotik DNMT ve memeli DNA bağlanma proteininin füzyonu sonucunda oluşmuştur³.

DNMT1 enzimi düzenleyici fonksiyon gören büyük 621 amino asitlik N uç domain ve 500 amino asitlik küçük C uç katalitik domainden oluşmaktadır⁴ (Şekil 3). N uç motif, DNMT1 enzimin aktivitesi için gerekli olmasa da yarı metile ve unmetile DNA iplikçiklerinin ayırımında oldukça önemli fonksiyonu bulunmaktadır³. N uç domaininde farklı fonksiyonlara sahip alt domainler bulunmaktadır; PCNA (proliferatif hücre nükleer antijen) bağlanma domaini (PBD), heterokromatin hedef sekansı (TS), CXXC-tip çinko parmağı domaini ve iki Brom-bitişik homoloji domainleri

(BAH1 ve BAH2). DNMT1'in N uç domini 7 KG tekrarı aracılığıyla C uç domainine bağlanmaktadır. DNMT1, S fazı süresince replikasyon foci bölgesinde lokalize olurken fertilize olmuş yumurtada nükleus dışında tutulur ve sitoplazmada depolanır. Fertil yumurtanın ilk DNA replikasyonu süresince DNA metilasyonu ve DNA replikasyonu birlikte gerçekleşmez. Bu durum dişi genomun pasif demetilasyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu enzimin N uç domaininin bir parçası tavuklardaki Polibrom-1 proteini ile homoloji gösterir ve iki BAH domaini içerir. Bu BAH domainleri protein-protein etkileşimi için gerekli olabileceği düşünülmektedir. Polibrom-1 proteini, farklı kromatin bileşikleri ile etkileşime aracılık etmektedir. DNMT1 polibrom domaini, DNMT1'in replikasyon çatallına taşınmasında rol oynamaktadır. BAH domain, kromatin-ilişkili proteinlerin birçoğunda bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında DNMT1'in N uç bölgesi DNMT1'in katalitik aktivitesinin düzenlenmesi ve intraselüler salınımı için gereklidir. Memeli hücrelerinde DNMT1'in önemli fonksiyonu farelerde DNMT1'in eksikliği ile gösterilmiştir. DNMT1'in eksikliğinde DNA metilasyonunda azalma ve hatta organizmanın kaybına yol açmaktadır^{3,4}. DNMT1'in katalitik bölgesi ise 500 amino asitten oluşur ve C uç domaininde lokalizedir. Katalitik bölge karakteristik on korunmuş motif içermektedir; I, IV, VI, VIII, X ve IX³.

DNMT1, farklı translasyonel başlama noktalarına dolayısıyla farklı varyantlarına sahiptir (Şekil 4). İnsan somatik hücrelerinde 1616 amino asitten oluşan varyantı en sık rastlanılandır. DNMT1'in kısa germ-hücre-özgün formu DNMT1o olarak adlandırılmakta ve oosit ve preimplantasyon gelişimi süresince ifadenlenmektedir. DNMT1o'de N uç 114 amino asit rezidüsü eksiktir ve parçalanmaya karşı *in vivo*'da artmış kararlılığa sahiptir. DNMT1o proteininin içsel kararlılığı DNMT1o'nun ooplazmik depolanmasına izin verir ve embriyonik S fazında imprintlenmiş gen allelerinin metilasyon örüntülerinin sürdürülmesini sağlar. Diğer bir Dnmt1 izoformu Dnmt1b'dir. Bu izoformda ekzon 4 ve ekzon 5 arasında

ilave 48 nükleotit yer almaktadır. Somatik hücrelerde bilinen Dnmt1'lerin %2-5'ini oluşturmaktadır ve enzimatik özelliği bakımından benzerlik göstermelerine karşın biyolojik fonksiyonu henüz bilinmemektedir^{3,13}.



Şekil 4. DNMT1 enzim izoformları⁴.

Normal dokuda CpG adacıkları genellikle unmetile olmasına karşın kanser hücrelerinde genlerin inaktivasyonunda CpG adacıklarının metilasyonuna sıklıkla karşılaşılmaktadır. Metilasyon örüntülerindeki bu değişim genellikle DNA MTazların düzeyleri ile ilişkili olup birçok çalışmada insan kanserlerinde in vivo olarak DNMT1'in artmış ifadenme düzeyi gösterilmiştir. DNMT1, DNA üzerindeki yarı metile bölgeleri substratı olarak tanır. Ayrıca DNMT1'in enzimatik aktivitesi için C uç bölgesi tek başına yeterli olmayıp N uç bölgesine de ihtiyaç duymaktadır.

2.2.2. DNMT2 Enzimi

DNMT2, DNA MTaz'ların en küçüğü olup yalnızca C uç domainini içermektedir. DNMT2 embriyonik kök hücrelerde veya yetişkin somatik hücrelerde *de novo* veya sürerlik MTaz aktivitesi göstermemektedir^{3,4}. Ancak DNMT2'nin aspartik asit transfer RNA

(tRNA^{asp})'yi metile ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle DNMT2'nin DNA MTaz aktivitesi tartişma konusudur¹⁴. Bu enzim DNA hasarının ve DNA rekombinasyonu tanınması veya mutasyon onarımı için gereklidir⁴.

2.2.3. DNMT3 Enzimi

DNMT3A ve DNMT3B her ne kadar primer yapıları yüksek derecede benzerlik gösteren *de novo* MTaz'lar olsalar da farklı kromozomlarda yer almaktadır, sırasıyla 2p23 ve 20q11.2. Bu enzimler yarı metile DNA'ya gerek duymaksızın CpG dinükleotitlerini metilleyebilirler. Özellikle embriyogenez ve erken embriyonik gelişim süresince DNA'nın *de novo* metilasyonundan sorumludurlar^{3,4}. DNMT3A ve 3B'nin PHD domaini spesifik olarak unmetile H3K4 histonunu tanımaktadır ve böylece DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları arasındaki bağlantıyı sağlıyor olabilir¹⁵. DNMT3A ve DNMT3B'nin aktivitesi farklılaşmış embriyonik kök hücrelerde azalmış, yetişkin somatik hücrelerde ise oldukça düşük seviyededir. DNMT3A ifadelenmesi hemen hemen bütün hücrelerde meydana gelirken DNMT3B, testis, tiroid ve kemik iliği gibi birçok dokuda düşük seviyede ifadelenmektedir. DNMT3B çeşitli tümör hücre hatlarında ciddi şekilde artması bu enzimin tümörogenezde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. DNMT3A ve DNMT3B ayrıca DNMT1 ile etkileşime girer ve HDAC1'i aktive etmek suretiyle hedef genin ifadelenmesini baskılamasına neden olurlar. DNMT3B özellikle kromozomların perisentrik satellit bölgelerindeki tekrar sekanslarının metilasyonundan sorumludur^{3,4}.

2.2.4. DNMT3L Enzimi

DNMT3L (DNA sitozin benzeri 5-metiltransferaz) proteininin MTaz aktif bölge motifi eksiktir. Bu nedenle diğer *de novo* DNMT'ler ile

birlikte hareket etmek zorundadır. Kromozom 21q22.3'de yer almakta ve özellikle maternal olarak imprintlenmiş genlerin metilasyonundan sorumlu olup DNA paterninin oluşturulması süresince postnatal dişi germ hücrelerinde ifadelenmektedirler. DNMT3L içerdiği PHD-benzeri motif sayesinde HDAC1'e bağlanır ve onu aktive eder. HDAC1 aktivitesindeki rolü göstermektedir ki bu enzim histon asetilasyonu, kromatin yeniden düzenlenmesi ve transkripsiyonel baskılama olaylarında rol oynamaktadır³. Kristalografi çalışmaları göstermiştir ki, DNMT3L, histon H3'ün N uç kuyruğundaki lizin 4 unmetile ise tanır ve DNMT3A varyantı olan DNMT3A'nın bu aktivasyonuna ve hedef bölgede toplanmasını sağlayarak *de novo* metilasyonu tetikler¹⁶.

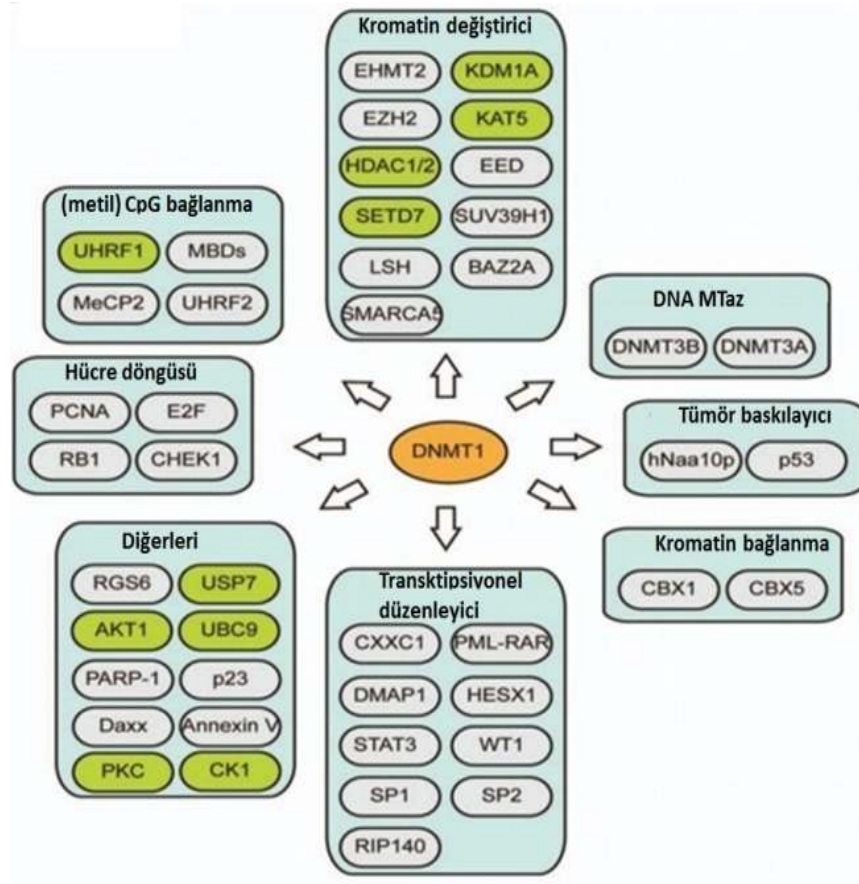
DNMT3L, DNMT3A ve DNMT3B'nin C uç bölgesine bağlanırlar ve enzim aktivitelerini artırır. DNMT3L, DNMT3A'nın aktivitesini 1.5 kat DNMT3B'nin aktivitesini 3 kat arttırırken DNMT1'in aktivitesi üzerine bir etkileri bulunmamaktadır. Buna ilaveten DNMT3A/DNMT3L kompleksi DNMT3A'ya göre yüksek DNA bağlanma afinitesine sahiptir. Bu durum gösteriyor ki, DNMT3L çekirdekçiğe geçerek fonksiyonel DNMT3A ve DNMT3B için değişim faktörü substratı olabilir. Bununla birlikte *dnmt3a* ve *dnmt3a*, *dnmt3l*'nin promotörünü metile etmek suretiyle koordineli olarak DNMT3L'nin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar^{3,4}.

2.3. Etkileştiği Faktörler Aracılığıyla DNMT1'in Düzenlenmesi

DNMT1 enzimi hücreden tek başına izole edildiğinde fonksiyonunu kaybetmektedir. Bu enzim fonksiyon görebilmesi için bazı proteinler ile etkileşim kurması gerekmektedir. DNMT1'in PCNA'ya doğrudan bağlanması metilasyon aktivitesini 2 kat arttırmaktadır. Böylece

bu bağlanma sonucunda hücre içerisinde DNMT1 her bir nükleotitte 0,35 saniyede metil grubu eklerken rekombinant DNMT1 ise 70 ila 450 saniyede bir metil grubu ekler¹⁷ (Şekil 5). Ayrıca stimulator proteinlerle etkileşimi enzimin aktivitesini arttırmaktadır. Maya iki-hibrid ve/veya biyokimyasal etkileşim çalışmalarında DNMT1, PCNA ve p21WAF1 ve siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitör gibi çatalının katalitik replikasyon faktörleri ile etkileşime girmek suretiyle hücre döngüsünün kontrolünde yer almaktadır. Ayrıca p21WAF1, PCNA ile direk etkileşime girerek DNA replikasyonunu baskılayabilir. DNMT1'in inhibisyonu DNA replikasyonunun engellenmesiyle de meydana gelebilmekte ve DNMT1'in ifadenmesi DNA replikasyonu ile yakından ilişkilidir¹⁸.

DNMT1'in etkileşime girdiği bir diğer protein grubu MeCP2, UHRF ailesi, MBD2/3 gibi metil CpG bağlanma proteinlerdir. MeCP2, DNA'ya bağlanarak kromatin kondensasyonuna neden olur ve transkripsiyon baskılayıcı domaini aracılığıyla DNMT1 ile etkileşime girer. MeCP2 ve MBD2 metillenmiş CpG bölgelerini özgül olarak tanıırken MBD3 ise histon deasetilaz HDAC1 ve HDAC2 ile kompleksi oluşturarak Dnmt1 ile etkileşime girerler¹⁹. Bu etkileşimler neticesinde transkripsiyonel olarak inaktif bölgelerde DNA hipermetilasyonu ve histon hipoasetilasyonu arasında bir bağlantı sağlanmış olur. Bu kompleks ayrıca DNMT1 ilişkili protein (DMP1)'de içerebilir. Sürelik DNA metilasyonu için temel kofaktörlerden bir diğeri UHRF1'dir. Embriyonik kök hücrelerde genetik olarak ablasyon yapılmış *uhrf1*, *dnmt*^{-/-} benzer şekilde genomik hipometilasyona yol açmaktadır. UHRF1, S fazı süresince ile SET ve RING ilişkili domaini (SRA) aracılığıyla yarı metile DNA'da DNMT1 ile etkileşime girerek birlikte lokalize olur. DNMT1-UHRF1 etkileşimi yapının kararlılığını sağlar²⁰. Ayrıca DNMT1, *de novo* DNA metiltransferazlar DNMT3A ve DNMT3B ile de etkileşime girdiği bilinmektedir²¹.



Şekil 5. DNMT1 enziminin etkileşime girdiği proteinler¹⁸.

DNMT1'in etkileşime girdiği diğer bir protein grubu H3K9 metilasyonu için gerekli olan ökaryotik histon MTaz'lar Suv39H1 ve EHMT2'dir. Embriyonik kök hücrelerde *ehmt2* ve *suv39h*'nin genetik olarak ablasyonu genomik DNA'da lokus özgü DNA hipometilasyonuna açmakta ve perisentrik satelit tekrarlarında DNA metilasyonunun değişimine neden olmaktadır²². Buna ilaveten, DNMT1, Polikomb grup (PcG) proteinler EZH2 ve EED etkileşime girerler. PRC2/EED-EZH2 kompleksi H3K27 metilasyonundan sorumludur. EZH2, DNMT1'in hedef gende toplanmasına sağlamak suretiyle promotör metilasyonuna aracılık etmektedir. Son zamanlardaki çalışmalarda, DNMT1'in baskılanması PcG proteinlerinin ifadenme düzeyini azalttığı ve hücrel senesensi uyardığı gösterilmiştir²³.

Histon modifiye edici enzimlere ilaveten kromatin yeniden yapılandırıcı ATPaz benzeri LSH'da DNA metilasyonunun sürdürülmesi için gereklidir. LSH, kromatin biçimlendirici ATPazların SNF2 ailesi ile ilişkili olup DNMT1, DNMT3B ve HDAC'lar ile bir kompleks oluşturarak transkripsiyonel baskılamada rol oynarlar²⁴. Benzer şekilde BAZ2A (TIP5 olarak da bilinmektedir) nükleolar yeniden yapılandırıcı kompleks NoRC'nin büyük alt ünitesidir ve DNMT1, DNMT3B, hSNF2H ve HDAC'lar ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleks rDNA'ların bir araya gelmesine aracılık eder²². Bu kompleksin bileşenlerinden biri olan hSNF2H, DNMT1'in mononüklozomlara bağlanma afinitesini arttırmakta ve kromatin yeniden biçimlendirici bileşenler heterokromatin bölgelerde DNMT1'in substrat bölgelerine bağlanmasına yardım ederler²⁵.

DNMT1'in transkripsiyonel düzenlenme ile doğrudan ilişkisinin yanı sıra SP2, SP3 ve STAT3 gibi transkripsiyonel faktörleri ile etkileşimi sonucunda dolaylı ilişkisi de bulunmaktadır. STAT3-DNMT1-HDAC1 kompleksi hücre sinyali negatif düzenleyici *shp1* geninin promotör bölgesine bağlanarak hücre transformasyonunu tetiklemektedirler¹⁸. DNMT1 ayrıca transkripsiyonel baskılayıcı DMAP1 ve onun inhibitörü RGS6 ile etkileşime girerek HDAC2 ile dolaylı olarak da etkileşime girmektedir. Bu etkileşim çift iplikçik kırığı bölgelerinin onarımında global veya bölgesel DNA metilasyonu için gereklidir. DMAP1'in eksikliğinde onarım ürünlerinin hipometilasyona neden olarak homolog rekombinasyonun artmasına ve bunun sonucu olarak genomik kararsızlığa neden olmaktadır²⁶. Bununla birlikte DNMT1 heterokromatin yapısının oluşumuna yardımcı olmasından dolayı HP1 gibi heterokromatin bağlanma proteinleri ile de etkileşime girmesi sürpriz değildir. Bütün bu etkileşimlerin sonucunda DNA'nın kararlılığı ve transkripsiyonel baskılanma sağlanmaktadır. Ayrıca, nüklear reseptör ko-baskılayıcı RIP140, DNMT1 ve DNMT3A ile etkileşime girerek gen baskılanmasında rol oynarlar²³.

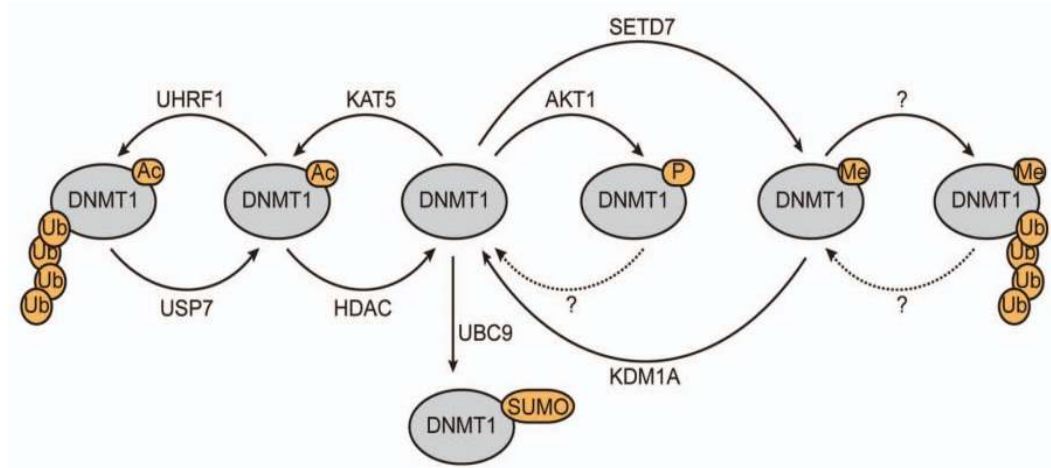
DNMT1, WT1, Rb, p53 ve hNaa10p gibi tümör baskılayıcı genlerle de etkileşime girmektedir. Wilms tümör baskılayıcı protein (WT1), *Pax2* geninin promotörüne DNMT1'lerin toplanmasını sağlayarak DNA hipermetilasyonuna neden olur. DNMT1'in N uç bölgesi ayrıca retinoblastoma (Rb) proteini ve diğer hücre döngüsü proteinleri ile etkileşime girmektedir. DNMT1'in Rb proteiniNe bağlanması sonucunda Rb proteini E2F1 duyarlı promotörlerin transkripsiyonunun baskılanmasına neden olur. Bununla birlikte DNMT1'in promotörü E2F1-Rb aracılığıyla düzenlenir ve böylece negatif-geri bildirim mekanizması aracılığıyla DNMT1'in sürekli ifadenmesi engellenmektedir²⁷. DNMT1'in p53 ile etkileşimi *in vitro*'da insan kolon hücrelerinde *survivin* promotör bölgesinin hipermetilasyonuna yol açmaktadır. DNMT1 veya p53 null olan hücrelerde bu etki görülmemektedir²⁸. Akciğer kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada ise yaban tip p53'ün DNMT1 ifadenmesini negatif olarak düzenlediği p53 null veya mutant hücrelerde DNMT1'in ifadenmesinin arttığı gözlemlenmiştir²⁹. Son olarak, tümör baskılayıcı gen hNaa10p, DNMT1'in DNA bağlanma afinitesini artırır ve tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde toplanması sağlar.

Bunlardan başka DNMT1, Annexin V, p23 gibi bazı proteinler ile de etkileşime girmektedir. Ancak bu etkileşimlerin fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir¹⁸.

2.4. Modifikasyonlar Aracılığıyla DNMT1 Enzim Aktivitesinin Düzenlenmesi

DNMT1'in aktivitesi etkileşime girdiği proteinlerin yanı sıra posttranslasyonel modifikasyonlar aracılığıyla da düzenlenmektedir (Şekil 6). DNMT1, hücre döngüsü bağımlı olarak asetilasyon ve fosforilasyon gibi modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Diğer taraftan, DNMT1, KAT5

aracılığıyla asetillenir ve sonrasında da E3 ubiquitin ligaz, UHRF1 aracılığıyla ubiquitinlenir. Bu DNMT1'in proteolitik parçalanması için bir işarettir. DNMT1 protein miktarı S fazı sürecince artarken geç S ve G2 fazında ise azalmaktadır. Bu durum KAT5 miktarı ile ters orantılıdır. Çünkü KAT5 aracılı DNMT1 asetilasyonu, DNMT1'in parçalanması için bir işarettir. Bunun yanı sıra DNMT1, USP7 (HAUSP) tarafından deubiquitinlenirken HDAC1 tarafından ise deasetile edilerek proteolitik parçalanmadan DNMT1'in korunmasını sağlarlar. DNMT1 ve HAUSP arasındaki etkileşim S fazının ortalarında bozulur. Bu durum DNMT1'in kararlılığı için HAUSP'nin gerekli olduğunu göstermektedir. Buna karşın UHRF1 ile DNMT arasındaki etkileşim geç S fazında artarken bu etkileşim DNMT1'in kararsızlığına neden olmaktadır³⁰.



Şekil 6. Posttranslasyonel modifikasyonlar aracılığıyla DNMT1 enziminin düzenlenmesi¹⁸.

Fare Dnmt1'in Ser515 (DNMT1 Ser509) pozisyonundan fosforilasyonu ilk posttranslasyonel modifikasyonu olarak gösterilmiş olup bu modifikasyon DNMT1'in düzenleyici ve katalitik domainleri arasında etkileşimi düzenlemektedir³¹. Yalnızca farelerde gösterilmiş olan Kasein kinaz 1δ/ε tarafından Dnmt1'in Ser146 pozisyonundan fosforilasyonu, DNA'ya bağlanma afinitesini azaltmaktadır. Ayrıca, DNMT1'in

fosforilasyonu DNMT1/PCNA/UHRF1 etkileşimini bozarak insan glial tümörlerde DNA hipometilasyonuna yol açmaktadır. Erken ve orta S fazları süresince AKT1 tarafından Ser143 pozisyonundan fosforilasyonu bitişik Ser142'in SETD7 tarafından metilasyonunu bloke ederek DNMT1'i kararlı hale getirmektedir. SETD7 tarafından Lys142 pozisyonundan metilasyonu geç S ve G2 fazları süresince DNMT1'in proteolitik parçalanması için bir işaret teşkil etmektedir. Lys 142'nin yanı sıra SET7/9, fare Dnmt1 Lys1096 (DNMT1 Lys1094) pozisyonundan metilasyonuda DNMT1'i kararsız hale getirmektedir. Bunun aksine KDM1A (lizin özgül demetilaz LSD1 veya AOF2 olarak da bilinmektedir) tarafından demetilasyonu ise DNMT1'in kararlılığını arttırmaktadır³². Son olarak DNMT1, ubiquitin konjugat enzim UBC9 aracılığıyla sumolasyona uğrar. Bu durum *in vitro*'da DNMT1'in katalitik aktivitesinin artmasına neden olmaktadır³³.

2.5. DNA metilasyonu ve Ürogenital Kanserler

2.5.1. Renal Hücreli Kanserler

Renal hücre karsinoma (renal hücreli kanserler, RCC), bütün dünyada iç organ malignansilerinin %2'sini oluşturmaktadır. Kuzey Amerika ve Avrupa'da insidansı yıllık %3 oranında artış göstermektedir. Erkeklerde daha sıklıkla karşılaşılmaktadır. Dört tip böbrek kanserinden biri olan renal hücre karsinoma, bütün böbrek kanserlerinin %90'ından sorumludur. Ayrıca RCC kendi içerisinde histolojik olarak sınıflara ayrılmaktadır; (i) Berrak hücreli (%80), (ii) Papiller (% 10-15), (iii) Kromofob (%5) ve Onkositom (oldukça nadir görülmektedir). Bu hastalığın gelişiminde diğer sinyal yollarından ziyade Wnt sinyal yolağındaki bozulmaların önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarla Wnt sinyal yolağının renal hücre karsinom gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir^{34,35}.

Epigenetik anomalılar diğerkanser türlerinde olduğu gibi renal hücre tümörogenezinde önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda epigenetik anomalilerin en önemli belirteçlerinden biri olan DNMT1 ifade artışı renal hücre karsinomlarında gösterilmiştir^{36,37}.

Wnt antagonistleri sFRP1, sFRP2, sFRP4, sFRP5, WIF-1, DKK1 ve DKK3 genlerinin hipermetilasyon aracılığıyla baskılanması β -katenin sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar ve RCC'ler de sıklıkla görölmektedir. DNMT1 ifadelenme düzeyindeki değışimlerin nedenlerinin belirlenmesi RCC'in tanı, safha, prognozu ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılabileceğı ifade edilmektedir^{38,39}.

2.5.2. Mesane Kanseri

Ürogenital kanserler içerisinde ikinci sıklıkta görölen mesane kanseridir. Üriner mesane kanserleri transizyonel hücreli karsinom (TCC) (%90), yassı hücreli karsinom ve adenokarsinom şeklinde üç sınıfa ayrılmaktadır. TCC'lerin yaklaşık %80'i yüzeysel tümörlerdir. Bu tümörlerin %70-80'i tekrarlayabilmekte ve bunların %20-30'u invaziv hale gelmektedir^{40,41}.

Tümör baskılayıcı genlerin DNA hipermetilasyonuna mesane kanserini de içersine alan çok çeşitli kanserlerde sıklıkla karşılaşılmaktadır ve bu metilasyonun sürdürölmesinde başlıca sorumlu faktör DNMT1 enzimidir. DNMT1 ifade artışı mesane kanserinde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur⁴². DNMT1, mesane kanserinin evrelerinin belirlenmesi ve tedaviye cevabın belirlenmesinde önemli bir klinik prediktör olabileceğı ifade edilmektedir^{42,43}. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında DNMT1 ve DNMT3A'nın mesane kanserinin gelişiminde önemli rol oynayan CpG adacıkların metilasyonunda sinerjik bir etkisi olduğu ifade

edilmiştir⁴⁴. DNMT1, mesane kanserinin tedavisinde potansiyel olarak hedef gen olabileceği vurgulanmaktadır⁴⁶.

Wnt antagonistlerinin baskılanması sonucunda sürekli aktif hale geçen Wnt/ β -katenin yolağının mesane kanser oluşumunda ve gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir³⁴. Bununla birlikte özellikle Wnt yolağının aktivasyonu kötü prognoz ve kemoterapiye direnç ile ilişkilidir⁴⁶. Urakami ve arkadaşları çalışmalarında, mesane tümör örneklerinde ve hücre serilerinde (J82C, T24C, TCC, UMUC) *wif-1* geninin kontrol bölgesinde metilasyon artışı olduğunu göstermişlerdir. Bunun sonucunda, β -katenin bağımlı Wnt sinyal yolağının aktifleştiği saptanmıştır³⁴. Diğer çalışmalarında ise tümör örneklerinde *sfrp1*, *sfrp2*, *sfrp4*, *sfrp5*, *wif-1* ve *dkk-3* genlerinin metilasyon profillerini belirleyerek bu genlerin mesane kanserinin tanısında epigenetik biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini önermişlerdir⁴⁷. Tang ve arkadaşları, invaziv mesane kanseri hücre serilerinde (T24 ve TSU-PR1) WIF-1'in S fazı kinaz ilişkili protein 2 (*skp2*) ve *c-myc* ifadesini baskılayıp, *p21* ve *p27* ifadelenme düzeyini arttırdığını belirlemişlerdir. Bunun sonucunda, WIF-1'in hücre döngüsünü G1 evresinde durdurarak, büyümenin baskılandığı gösterilmiştir⁴⁸.

2.5.3. Prostat Kanseri

Prostat kanseri (CaP), erkekler arasında en sık görülen ikinci kanser türüdür. Akciğer ve kemik metastazı ile karakterizedir. Wnt sinyal yolağı prostat kanserlerinin gelişimi, ilerleyişi ve metastazında önemli rol oynamaktadır. Prostat kanserlerinde çeşitli Wnt ve diğer yolağın düzenlenmesi ile ilişkili proteinlerin düzeylerinin artışı gözlemlenmiştir⁴⁹.

DNA metilasyonu, prostat kanserlerinde erken somatik genom değişimleri olarak kabul edilmektedir ve prostat kanserinin gelişimi,

invazyonu ve metastazında önemli rol oynamaktadır⁵¹. DNA metilasyonun metabolizmasının temel enzimlerinden biri olan DNMT1 genin prostat kanserlerinde artmış ifadenme düzeyi sıklıkla karşılaşılmaktadır. DNMT1 ifadenme düzeyindeki değişimlerin nedenlerinin belirlenmesi prostat kanserinin terapötik hedeflerinden biri olabileceği vurgulanmaktadır⁵⁰⁻⁵². Kinney ve arkadaşlarının farelerde yapmış oldukları çalışmada ise DNMT1'in prostat kanserinin erken evrelerinde tümör baskılayıcı fonksiyon gördüğü ileri aşamalarında ise onkogenik aktivite gösterdiğini ileri sürmüşlerdir⁵³.

Wnt antagonistlerinden *sFRP2*'in promotör hipermetilasyonu sıklıkla prostat kanserlerinde gözlemlenmekte ve *sFRP2* hipermetilasyonunun prostat kanseri için biobelirteç olabileceği vurgulanmaktadır⁶⁰. Ayrıca β -katenin sinyal yolağının düzenlenmesinden sorumlu olan *APC*, *SFRP1* ve *WIF-1* genlerinin hipermetilasyonu çeşitli prostat kanser hücre hatlarında gösterilmiştir³⁸.

2.6. Ubiquitinasyon ve Deubiquitinasyon Mekanizması

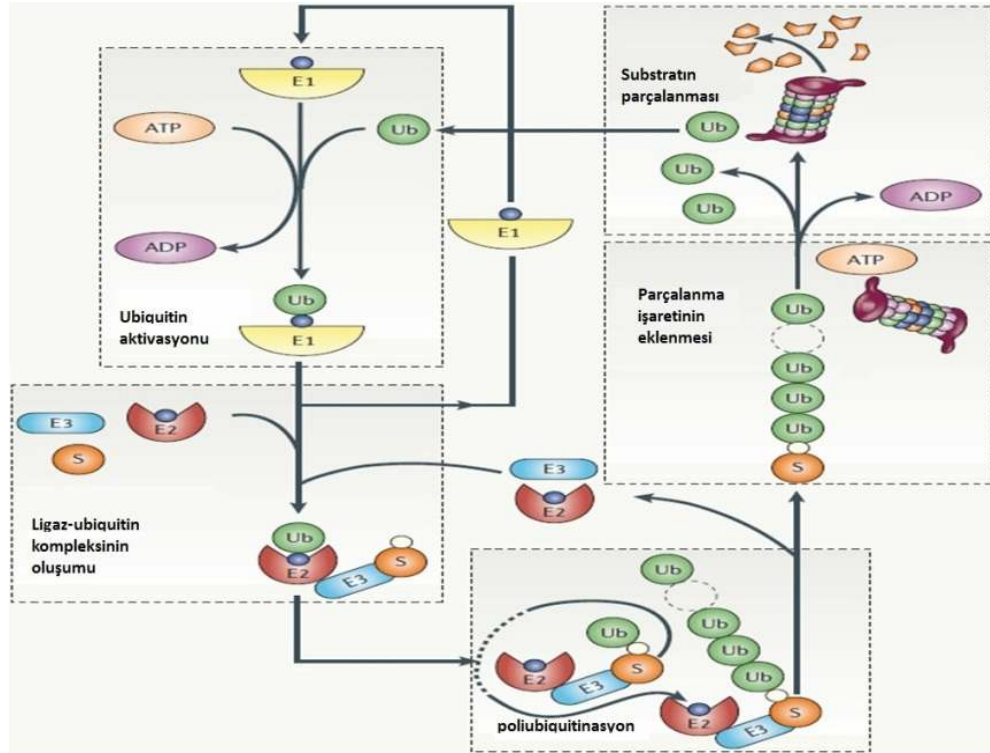
Ubiquitin, yüksek derecede korunmuş 76 amino asitten oluşan küçük düzenleyici bir proteindir ve kovalent olarak proteinlere bağlanarak proteozom parçalanması için sinyal molekülü olarak işlev görmektedir. Proteozom aracılı parçalanma, protein lokalizasyonu, hücre döngüsü kontrolü, transkripsiyon düzenlenmesi, DNA hasar onarımı, endositoz gibi çoklu hücresel işlevlerin kontrolü için gerekli olan bir mekanizmadır. Ökaryotik hücrelerde, ubiquitin zincirinin eklenmesi veya çıkarılması önemli biyolojik işlevlerden birisidir. Bu nedenle, ubiquitin metabolizma enzimlerinin kanser oluşum sinyal veya düzenleyici yollarında fonksiyon gören onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin düzenlenmesinde önemli rol oynaması sürpriz değildir. Bu nedenle

ubiquitin metabozlima enzimleri ubiquitinleyici ve deubiquitinazlar (DUB)'ın kanser tedavisine yönelik hedefler arasında önemli bir yere sahiptir. Ubiquitin/proteozom sisteminin bileşenlerinden E3 ve DUB'lar substratı yüksek bir spesifite ile tanırlar bu nedenle kanser ilaç hedeflerinde oldukça önemli derecede ilgi çekmektedir^{55,56}.

2.6.1. Ubiquitin Konjugasyon Mekanizması

Protein ubiquitinasyonu ATP bağımlı, son derece düzenli ve çok adımlı enzimatik bir işlemdir (Şekil 7). Bu olaya en az üç enzim aracılık etmektedir; ATP-bağımlı ubiquitin enzim (E1); aracı ubiquitin-konjuge edici enzim (E2) ve uç ubiquitin ligaz (E3)'tür. Bazı durumlarda ubiquitin uzama faktörleri, E4 enzimi olarak adlandırılmakta ve çoklu ubiquitin zinciri oluşumu için gereklidir. E1 aktive edici enziminin aktif bölgesindeki sistein ile ubiquitin C ucunda yer alan glisin arasında tiyoester bağı kurması ile ubiquitin aktive olur. Bu olay için enerji kaynağı olarak ATP kullanılır. Aktive olan ubiquitin peptidi E1'den E2 enzime transfer olur. Genellikle E2 enzimi partneri E3 ile etkileşime girer. E3 enzimi ubiquitin C uç glisin amino asiti ile substratın lizin amino asiti arasında izopeptit bağı kurmak suretiyle ubiquitin hedef proteine transfer olmasını sağlar. E2 enzimi katalitik domaininde bir çok korunmuş amino asit içermekte iken E3 ubiquitin ligaz ise sadece birkaç korunmuş motif içerir. Bu nedenle E2 enzimi substrat seçiminde rol oynuyor olabilse de ubiquitinasyonun olayında substrat özgünlüğü başlıca E3 ligaz aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. E3 enzimi, 600'den fazla protein ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. E3 ligaz başlıca dört büyük sınıfa ayrılmaktadır; HECT (E6-AP karboksik uç homoloğu) E3, genellikle monomerdir ve ubiquitin ile tiyoester bağı kurmak suretiyle hedef proteine ubiquitin transferine aracılık eder. RING domain E3, E2'den protein substratına doğrudan ubiquitin transferine aracılık eder. RING domain E3, E2/E3 kompleksi aracılığıyla otoubiquitinlenmektedir. PHD domain ve U-box-tip E3

ligazlar yeni keşfedilmiş E3 ailesi üyeleridir ve enzimatik domain yapıları RING motifine oldukça benzemektedir⁵⁸. E3 ligazlar, substrat proteinin Lys6, Lys11, Lys29, Lys48 ve Lys63 rezidülerinden mono-ubiquitinlemek suretiyle hedef proteinleri modifiye edebilmektedirler. Genelde, Lys48 bağlı poliubiquitinasyon işareti 26S proteozom aracılığıyla hedef proteinin parçalanmasına neden olmaktadır. Lys63-bağlı monoubiquitinasyon ise intraselüler trafik, DNA onarımı ve sinyal transdüksiyon yolağında sinyal olarak işlev görmektedir^{55,56,58}.



Şekil 7. Ubiquitin-proteozom sistemi^{57*}. * İlgili kaynaktan modifiye edilmiştir.

2.6.2. E3 Ubiquitin Ligaz ve Kanser

E3 ligazlar, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ve apoptoz gibi çeşitli hücresel işlevleri düzenlemektedir. E3 ligazların ve ilişkili olduğu ubiquitin ağındaki düzensizlikler özellikle nörodejeneratif hastalıklar

ve kanser gibi çeşitli insan hastalıkları ile bağlantılıdır ve protein kinazlardan sonra ikinci yaygın kanser ilişkili fonksiyonel gen ailesidir. E3 ubiquitin ligazlar, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin parçalanmasını tetikleyebildiklerinden dolayı hedeflerine göre onkogen veya tümör baskılayıcı genler gibi davranabilmektedirler. Bu nedenle kanser tedavilerinde özellikle terapötik hedefler olarak dikkati çeken hedeflerden birisidir⁵⁵.

2.6.3 PHD ve RİNG Parmak İçeren Ubiquitin Benzeri Domain 1 (UHRF1)

UHRF1, DNA metilasyonunun sürdürülebilmesi için DNMT1'in kritik kofaktörüdür. UHRF1 proteini, Ubiquitin benzeri domain (NIRF_N veya Ubl), Ubiquitin benzeri domain bitki homeodomain (PHD), Tudor, SET ve Ring ilişkili domain (SRA) ve RING domaininden oluşan 763 amino asitlik bir proteindir (Şekil 8). Evrim süresince yüksek derecede korunmuş olup kromozom 19 üzerinde yer almaktadır. UHRF1'in NIRF_N domainleri protein-protein etkileşimi için önemli olup ubiquitin bağlanma bölgeleridir. Bu domain hücre döngüsü süresince protein parçalanmasında veya gen transkripsiyonunda önemli role sahiptir. SRA domaini yarı metile DNA'ya bağlanma domaini olarak fonksiyon görmektedir. PHD domaini diğer proteinlerde bulunan PHD domainlerine benzer şekilde H3 kuyruğundaki rezidülerini tanır. Özellikle Tudor domainlerinin metillenmiş H3K9 bağlanma afinitesi bulunmaktadır. PHD ve Tudor domainlerinin üçlü metile H3K4 ile etkileşime girmek suretiyle gen aktivasyonu veya baskılanması olaylarını kontrol etmektedir. RING domaini ise E3 ligaz aktivitesine sahiptir. PHD domaini SRA domaini ile etkileşime girerek UHRF1'in HDAC1'e ve metile DNA'ya bağlanmasına aracılık eder. Bu nedenle UHRF ailesi histon trimetilasyonu, HDAC1 toplanması ve DNA metilasyonu belki de histon ubiquitinasyonunu yönetiyor olabilir. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro*'da UHRF1 histonların özellikle H3'ü ubiquitinlemektedir.

UHRF1 mRNA'sı timüs, fetal dokularda, kemik iliğinde bol miktarda bulurken farklılaşmış dokularda bulunmamaktadır. Bu durum UHRF ailesinin en azından UHRF1'in hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir^{59,60}.



Şekil 8. UHRF1 proteininin yapısı. NIRF_N; ubiquitin bağlanma bölgesi, Tudor; H3K9me3'ü tanıma bölgesi, PHD; H3 metile bölgeleri tanıma bölgesi, SRA; yarı metile DNA'ya bağlanma bölgesi, RING; H3 ubiquitinasyon bölgesi.

Henüz fonksiyonları tam olarak bilinmemesine karşın UHRF1, tümör hücrelerinin büyümesinin düzenlenmesi için gerekli bir E3 ligazdır. *UHRF1* kantitatif çalışmalarında akciğer, meme ve prostat primer tümörlerinde ifadenmesinin arttığı gözlemlenmiştir⁵⁷. DNA hasarına cevaben UHRF1 proteinin ve mRNA düzeyi azalmaktadır. Bu azalma hücre arrestinden dolayı değil p21^{Cip1/Waf1} ifadenmesiyle doğrudan düzenlenmektedir. UHRF1 ayrıca genom bütünlüğünün korunmasında da rol oynamaktadır. UHRF1'in ifadenmesinin artışı DNA hasarına karşı korumakta ve DNA hasarı sonrasında replikasyonu takiben genom bütünlüğünün sürdürülmesini sağlıyor olabilir⁶¹. Son zamanlarda UHRF1'in DNMT1'in ubiquitinasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir. Bu durum DNMT1'in asetilaz Tip60 ve HDAC1 ile olan koordinasyonunda kararlılığını kontrol etmektedir⁶².

2.6.4. Ubiquitin Dekonjugasyon Mekanizması

Ubiquitin konjugasyonu, diğer protein modifikasyonları gibi DUB enzimler aracılığıyla tersine dönüştürülebilmektedir. İnsan genomunda 100'den fazla DUB tanımlanmıştır. DUB ailesi yapısal ve

sekans benzerlikleri dikkate alındığında en az beş büyük sınıfa ayrılmaktadır; JAB17MPN7Mov34 metaloenzim (JAMM) domain, C uç hidrolaz (UCH), ubiquitin özgün proteaz (USP), ovaryen tümör domain (OTU) ve machado Josephin domain (MJD). JAMM ailesi çinko metallo proteaz iken UCH, USP, OTU ve MJD sistein proteazdır.

DUB'ların temel rolü, ubiquitin-konjüge proteinlerden ubiquitin zincirini uzaklaştırmaktır (Şekil 7). Böylece hedef proteinin proteozom aracılı parçalanmasını engelleyerek hedef proteinin kararlılığını sağlarlar. Ayrıca DUB'lar, ubiquitin pro-protein modifikasyonları aracılığıyla ubiquitin maturasyonunda fonksiyon görmektedirler. Ubiquitin pro-protein olarak ifadelenir ve genellikle ribozomal proteinlerle füzyon oluştururlar. DUB'ların histon ubiquitinasyonunu da kontrol ettiği düşünülmektedir.

Ubiquitin proteozomal ağında ubiquitinleyici enzimler ve DUB'lar birlikte protein miktarının dengelenmesi için çalışırlar. Bu nedenle ubiquitin proteozom yolağı intrasellüler proteinlerin özellikle yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılmasından sorumlu önemli bir sistemdir⁵⁵⁻⁵⁷.

2.6.5. DUB'lar ve Kanser

E3 ligazlar gibi, DUB'lar da proteozom bağımlı parçalanma, protein lokalizasyonu, transkripsiyon aktiviteleri ve endositozun düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. DUB'lardaki düzensizlikler insan hastalıkları özellikle kanserler ile ilişkilidir. DUB'lar ubiquitin/proteozom sistemi içerisinde fonksiyonlarının yanı sıra ilaç hedefleri olarak hizmet etmektedirler⁵⁵.

2.6.6. Herpes İlişkili Ubiquitin Özgü Proteaz (HAUSP/ USP7)

HAUSP, DUB enzimlerinden biri olup ubiquitin-özü proteaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzim, herpes simplex viral protein vmw 110 ve Epstein-Barr nükleer antijen I kompleksi olarak tanımlanmıştır (ayrıca infekte hücre protein 0, ICP0, olarak da bilinmektedir) ve Herpes ilişkili ubiquitin özgü proteaz (HAUSP veya USP7) olarak adlandırılmıştır (Şekil 9). HAUSP, epigenetik baskılama, DNA virüsleri aracılığıyla infeksiyonların yayılımında ve stres cevap yollarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır^{56,63}.



Şekil 9. HAUSP proteinin yapısı. TRAF; p53 ve MDM2'ye doğrudan bağlanma domaini, Ubl; konformasyonel değişimi hızlandırarak ubiquitin molekülünün bağlanmasına izin verir ve katalitik merkezi organize eder.

HAUSP, katalitik domain, N- ve C- uç domainlerinden oluşan 1103 amino asitlik bir proteindir. Kromozom 16'da yer almaktadır. C uç domaini protein-protein etkileşimi için gerekli bir bölgedir ve ayrıca HAUSP'nin deubiquitinasyon aktivitesi için önemli bir yere sahiptir. Bu protein p53 kararlılığında kritik düzenleyici olarak fonksiyon görmektedir. HAUSP, doğrudan p53 ve MDM2 proteinine bağlanır. HAUSP'nin yüksek derecede ifadenmesi p53 proteinini kararlı hale getirir. HAUSP, doğrudan olarak p53'e TRAF domaini aracılığıyla bağlanarak p53 bağımlı hücre büyümesini engeller ve apoptozu tetikler. DNA hasar stresinde ATM-bağımlı düzenlenme HAUSP ve MDM2 arasındaki etkileşimin azalmasına neden olur. Bu durum MDM2'inin kararsız hale gelmesine neden olur ve DNA hasarından sonra uygun p53 aktivasyonuna olanak

sağlar. p53-MDM2 yolağında HAUSP'nin dinamik rolü, DUB'ların tümörogenezdeki rolünü gösteren ilk kanıttır^{64,65}.

HAUSP, iki tümör baskılayıcı gen FOXO4 ve PTEN'in deubiquitinasyonundan sorumludur^{65,66}. HAUSP aracılı FOXO4'ün deubiquitinasyonu FOXO4'ün kararlılığını etkilemez ancak nükleusa taşınmasını ve transkripsiyonel aktivitesini düşürmektedir. PTEN'in ise sitoplazmik birikimine yol açar ve monoubiquitinasyonu nükleer lokalizasyon sinyali olarak fonksiyon görür. HAUSP ve ilişkili PTEN nükleer dışlanması insan prostat kanserlerinde gözlemlenmekte ve tümör agresifliği ile ilişkilidir⁶⁶.

Protein kararlılığının yanı sıra HAUSP kromatin yapısının ve gen baskılanmasının düzenlenmesinde fonksiyon görmektedir. Drosophila'da HAUSP'nin monoubiquitinlenmiş histon H2B'den ubiquitinin uzaklaştırmasını katalizlemektedir. Bu olay homeotik genlerin epigenetik susturulmasında önemlidir⁶⁷.

HAUSP ve UHRF1, DNMT1 ile birlikte dinamik bir kompleks oluşturmak suretiyle genomik DNA metilasyon örüntüsünün sürdürülmesi için kritik iki faktördür. UHRF1 aracılığıyla ubiquitinasyonu ve sonrasında HAUSP aracılığıyla deubiquitinlenmesi DNMT1'in kararlılığında rol oynamaktadır³⁰.

2.7. Wnt/ β -Katenin Sinyal Yolağı

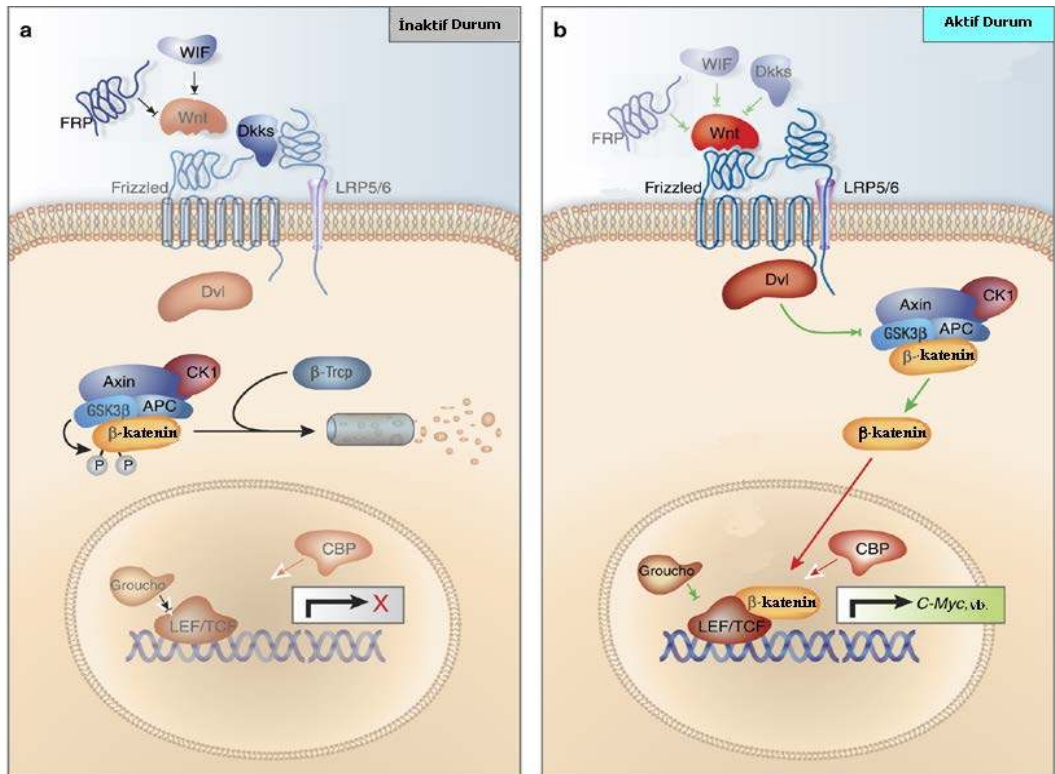
Wnt proteinleri aktiviteleri temel alınarak, β -katenin bağımlı ve β -katenin bağımsız Wnt sinyal yolağı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır⁴⁰. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı Wnt sinyal yolları içerisinde en çok çalışılmış yollardan birisi olup evrim süresince korunmuştur. Bu

yolaktaki değişimler mide kanseri, hepatosellüler karsinoma, koleraktal kanserler ve son zamanlarda da mesane ve prostat kanserlerini de içerisine alan bir çok insan malignansilerinde grlmektedir⁴¹.

Wnt sinyal yolağı, Wnt ligandının 7-TM reseptörü olan Frizzled (Fz) reseptörüne ve ko-reseptör LRP6 veya LRP5'e bağlanması ile aktive olur. Wnt aracılığıyla uyarılan kompleks Fz-LRP6'da yer alan LRP6'ın intraselüler domaininin Kazein kinaz 1 (CK1) sitoplazmik adaptör protein Dishevelled (Dsh) ve GSK-3β tarafından fosforile edilmesine yol açar. Bu fosforilasyon eksen inhibitör (Aksin) proteininin bağlanması için optimal bağlanma bölgesi oluşumuna neden olur. Aksin proteinin bu bölgeye bağlanması sonucunda Aksin-aracılı fosfo-parçalanma kompleksinin oluşumu engellenmiş olur. Böylece, "GSK-3β, Aksin, adenomatoz polipozis koli (APC)" kompleksinin β-katenin üzerindeki baskılayıcı etkisi ortadan kalkar. Stabilize olan sitosolik β-katenin proteinini nükleusa geçerek burada DNA bağlanma ailesi üyelerinden olan TCF-1 [T hücre faktörü-1/LEF-1 (Lefoid enhancer bağlanan-1)] ile kompleks oluşturur. Bu kompleks aynı zamanda Groucho ve histon deasetilaz CBP/p300 gibi ko-aktivatörlerin hedef bölgelerde toplanmasına neden olur. Böylece Wnt cevap genlerinin aktivasyonuna neden olur^{40,41}. Wnt hedef genleri içerisinde Siklin D1, c-MYC, Matriks Metalloproteinazlar (MMP-2, -3, -7, -9, -13) ve DNMT1 gibi önemli bazı proteinler yer almaktadır. Günümüze kadar yirmiden fazla daha çok anjiyogenez, tümör gelişimi ve metastazında önemli rolleri olan hedef genleri tanımlanmıştır ve bu sayı artmaya devam etmektedir⁴⁰.

Sinyal yokluğunda ise sitoplazmik scaffold proteinler (APC ve Aksin), "GSK-3β, CK1 ve protein fosfotaz 2a (PP2A)" kompleksi β-katenine bağlanır. Bu proteinler birlikte "parçalanma kompleksini" oluştururlar. Bu durum ilk önce N-terminal bölgesinde yer alan Ser⁴⁵ CK1 tarafından fosforile edilmesi sonrasında GSK-3β'nın β-katenini N terminal

bölgesinde yer alan diğer Ser/Thr rezidülerinin (Ser³³, Ser³⁷ ve Thr⁴¹) fosforile edilmesine imkan sağlar ve ubiquitin ligaz olan β -TrCF ve 26S proteozom tarafından tanınmasına yol açar. Böylece ubiquitinlenen β -katenin proteazomlar aracılığıyla parçalanır ve sitosolik β -katenin miktarı düşer^{40,68} (Şekil 10).



Şekil 10. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı (kanonikal Wnt sinyal yolağı) ve antagonistlerinin şematik gösterimi³⁵.

β -kateninin GSK-3 β bağımsız bir yolak aracılığıyla da sitosolik düzeyinin düştüğü gösterilmiştir. Bu yolda, E-kaderin ve traspain protein CD82 ve CD9 arasındaki etkileşim sonunda β -katenin'in eksozomal salınımına aracılık etmek suretiyle serbest sitosolik β -katenin'in miktarı düşmekte ve bunun sonucu olarak Wnt sinyal yolağı baskılanmaktadır⁴⁰.

β -katenin transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon görmesi haricinde kaderin bağlanma bölgelerinde çok yönlü fonksiyonları bulunmaktadır. Kaderin/ β -katenin/ α -katenin arasında köprü fonksiyonunun yanı sıra Golgi'den plazma membranına kaderin transportunda görev alır. Ayrıca, β -katenin, kaderin bağlanma noktalarının stabilizasyonunda veya fiziksel olarak diğer faktörlerin etkileşimlerinde temel birleşen olarak fonksiyon görür. Örneğin, vinkulin, hücre matriksinin temel birleşenidir ve kaderin birleşme noktalarına β -katenin aracılığıyla bağlanmaktadır.

β -katenin bağımlı Wnt sinyal yolağının aktivasyonu iki basamakta kontrol edilir: (i) β -katenin bağımlı olmayan Wnt sinyal yolağında aktifleşen kinazlar. (ii) Wnt antagonistleri (salgılanan Frizzled ilişkili protein (sFRP), Dickkopf (DKK) ve Wnt baskılayıcı faktör 1 (WIF-1).

β -katenin bağımlı olmayan Wnt sinyal yolağında aktifleşen kinazlar aracılığıyla β -katenin bağımlı yolağın sürekli aktivasyonu engellenir. β -katenin bağımsız Wnt ailesi üyeleri, β -katenin bağımlı Wnt sinyalini sitoplazmik kalsiyum düzeyini arttırarak baskılar. Dolayısıyla, Wnt hedef genlerinin β -katenin aracılığıyla ifadenmeleri sıkı bir şekilde kontrol altındadır^{68,69}.

Wnt antagonistleri, hücre dışı Wnt antagonistleri (sFRP, WIF-1) ve sitoplazmik Wnt antagonistleri (DKK) olmak üzere iki gruba ayrılır⁶⁹ (Şekil 10): sFRP; hücre dışından Wnt ligandlarına bağlanarak Wnt sinyal oluşumunu engeller. Şimdiye kadar sFRP ailesine ait 5 farklı protein tanımlanmıştır (sFRP-1, sFRP-2, sFRP-3, sFRP-4 ve sFRP-5). WIF-1 proteini sFRP'ler gibi hücre dışından Wnt ligandına bağlanır ve Wnt aracılı sinyal iletimini bloke ederler. DKK genlerinin ürünleri ise LRP5/6 proteinine bağlanarak, bu proteinin reseptörü ile etkileşimini engellerler. Böylece,

Wnt sinyal yolağının aktivitesi durdurulur. Günümüze kadar DKK ailesinin dört üyesi (DKK-1, DKK-2, DKK-3, DKK-4) tanımlanmıştır^{35,70}.

Wnt proteinleri, hidralardan omurgalılara kadar çok çeşitli hayvanlar gruplarında bulunmakta ve embriyonik örüntüleniş olaylarında ve yetişkin dokularda homostazi olaylarının sürdürülebilmesi için gereklidirler. Bu yolaktaki bozulmalar embriyonik anomalilere ve insan kanserlerinin oluşumuna neden olmaktadır.

2.7.1. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı ve Renal Hücreli Kanserler

Kararlı formdaki β -kateninin nüklusa geçtikten sonra aktive ettiği genlerden biri olan *c-Myc* onkogenidir. Papiller RCC ve primer berrak hücreli RCC'lerde bu onkogen kopya sayısının artışı bilinmektedir. β -katenin nokta mutasyonları ise RCC'lerde nadiren görülmektedir^{71,72}. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, kadmiyumun β -katenin sinyal yolağı birleşenlerinin ifadelenmelerini arttırdığı ve buna bağlı olarak *c-Myc* ve *Siklin D1* gibi hedef genlerin ifadelenmelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Bu proteinler hücre çoğalması ve yaşamı için gerekli proteinlerdir ve ifade artışları tümör oluşumunu hızlandırmaktadır. Kadmiyum aracılı Wnt sinyal yolağının aktivasyonu renal epitel dokularında kansere yol açtığı ifade edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise β -katenin sinyal yolağının bileşenlerinden olan APC'nin eksikliğinin farelerde renal tümörlere neden olduğu ve β -katenin düzeyinde artış olduğu saptanmıştır⁷³.

RCC'nin genetik temelleri 1993 yılında Von Hippel-Lindau (VHL) tümör baskılayıcı genin tanımlanmasıyla ortaya konmuştur⁷⁴. Bu gendeki birçok tanımlanmış mutasyon RCC vakalarında bulunmakta ve berrak hücreli karsinoma ile yüksek derecede ilişkilidir. VHL genindeki

anomaliler sporatik RCC'li hastaların %75'inde görülmektedir⁷⁵. Peruzzi ve arkadaşları β -katenin'in VHL'nin E3 ubiquitin ligaz aktivitesi ile parçalandığını keşfetmişlerdir. Böylece VHL'nin yeni hedefleri arasında onkogenetik β -katenin sinyalizasyonunda yer almakta ve renal kanser patogenezinde β -katenin yolağında rol oynadığını gösteren bir kanıt olmuştur⁷⁶. VHL'nin etkileşime girdiği bir diğer protein Jade-1'dir. Jade-1, yeni tanımlanmış E3-ubiquitin ligaz olup β -katenin'i ubiquitine ederek parçalanmasına yol açmaktadır. VHL aracılığıyla Jade-1 pozitif olarak düzenlenir. VHL'nin kaybı Jade-1 düzeyinin azalmasına ve buna bağlı olarak β -katenin düzeyinin artmasına neden olmaktadır. Bu VHL'nin renal tümörogenezi hızlandırmasına yönelik bir diğer mekanizmadır⁷⁷.

Wnt sinyal yolağı ve böbrek kanserleri arasındaki bir diğer bağlantı hipoksiya uyarılı protein-2 (HIG2)'dir. HIG2, Wnt reseptör Fz10'a bağlanır ve Wnt sinyal hedef genlerinin transkripsiyonunu uyarır. HIG2, hücre çoğalmasının indükleyicisi olarak fonksiyon görür ve RCC belirteci olarak tanımlanmıştır. HIG2 ayrıca β -katenin/Tcf4 kompleksinin hedefidir⁷⁸.

Renal karsinogenezde belirli Fzd ailesi üyelerinin ifadenmelerinde değişimler gözlemlenmektedir. Artmış Fzd5 ve Fzd8 ifadenmesi renal kanser hücrelerinde protein ve mRNA düzeyinde gözlemlenmektedir. Son olarak, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının negatif antagonistleri olan sFRP'lerin, WIF1 ve DKK'nın ifade düzeylerinin değiştiği ve böyle β -katenin yolağının aktive olduğu renal kanserlerde sıklıkla karşılaşılmaktadır⁷⁹.

2.7.2. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı ve Mesane Kanseri

Wnt antagonistlerinin baskılanması sonucunda sürekli aktif hale geçen Wnt/ β -katenin yolağının mesane kanser oluşumunda ve

gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir^{34,70}. Bununla birlikte özellikle Wnt yolağının aktivasyonu kötü prognoz ve kemoterapiye direnç ile ilişkilidir⁴⁶. β -katenin ve APC mutasyonlarına mesane kanserinde gözlemlenmemesine karşın Wnt antagonistlerinin mesane kanser oluşumunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Marsit ve arkadaşlarının çalışmalarında invaziv mesane tümörlerinde sFRP genlerinde belirlenen metilasyon artışı ile ilerlemiş tümör aşamaları arasında ilişki olduğunu saptayarak, sFRP metilasyonunun mesane kanserinin yayılımını etkileyebileceğini ileri sürmüşlerdir⁸⁰. Urakami ve arkadaşları ise çalışmalarında, mesane tümör örneklerinde ve hücre serilerinde (J82C, T24C, TCC, UMUC), Tang ve arkadaşları invaziv mesane kanseri hücre serilerinde (T24 ve TSU-PR1) WIF-1'in S fazı kinaz ilişkili protein 2 (SKP2) ve c-MYC ifadesini baskılayıp, p21 ve p27 ifadenme düzeyini arttırdığını belirlemişlerdir. Bunun sonucunda, WIF-1'in hücre döngüsünü G1 evresinde durdurarak, büyümenin baskılandığı gösterilmiştir^{34,48}.

2.7.3. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı ve Prostat Kanseri

Bir çalışmada Wnt5a'nın varlığının prostat kanserinin nüksetmesiyle ilişkilendirilmiştir. Wnt5a'nın Knockdown'ı veya aşırı derecede ifadenmesi prostat kanserinin invazyon ve göç aktivitesinin sırasıyla azalmasına ve uyarılmasına neden olmaktadır. Wnt5a, protein kinaz D (PKD) aracılığıyla Jun-N-uç kinazı (JNK)'ı aktive eder. PKD'nin baskılanması Wnt5a aracılı hücre göçü ve invazyonunun engellenmesine neden olur. Wnt5a, JunD'nin toplanması aracılığıyla MMP-1'in ifadenmesini tetikler ve böylece prostat kanserinin agresifliğinin artmasına katkıda bulunur⁴⁹.

Aktif Wnt/ β -katenin sinyali Foxo2 transkripsiyon faktörünü tetikler ve bu birincil prostat kanserinde invazif fenotip ile ilişkilidir. β -

katenin, prostat kanserinin biobelirtecidir ve çeşitli moleküller ile düzeyi kontrol edilmektedir. Prostat kanserlerinde Sox7'nin mutasyonları veya kayıpları bilinmektedir. Sox7, β -katenin sinyal aktivitesini baskılayan bir kontrol noktası olarak fonksiyon görmektedir. Ayrıca onkogenik K-ras ve β -katenin mutasyonları prostat kanserinin invazif forma dönüşümünü hızlandırır⁸¹.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının negatif antagonistleri olan ifade düzeylerinin değiştiği ve böyle β -katenin yolağının aktive olduğu prostat kanserlerinde sıklıkla karşılaşılmaktadır. Özellikle DKK1'in artmış ifadelenmesi prostat kanserinin erken olaylarından biri olup kemiğe metastazında önemli rol oynamaktadır⁸².

Bu bilgiler doğrultusunda, insan mesane, renal hüce karsinoma ve prostat hücre hatlarında DNMT1 düzeyi belirledikten sonra Wnt/ β -katenin yolağının DNMT1 ve kararlılığından sorumlu tutulan UHRF1 ve HAUSP proteinlerinin ifadelenmesi üzerine olan etkisini belirlemeyi hedefledik.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Karbondioksitli etüv (Sanyo)
- Laminar flow (Danlaf)
- Hassas terazi (AND-ER-182A)
- PCR-Sprint otomatik ısı döngü cihazı (Ependorf)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (Spectramax M3, Molecular Devices)
- Inverted mikroskop (Zeiss)
- Light Cycler Real Time PCR cihazı (Roche)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- Ph metre (WTW 422)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22R)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071)
- Spin vorteks (Biosan)
- Elektroforez tank ve kaseti (Biorad)
- Vorteks (Biosan)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Mikropipetler; 10µl, 100µl, 1000µl, 5000µl (Thermo)
- Derin dondurucu -30°C (Sanyo)
- Derin dondurucu -80°C (Sanyo)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Mini protean elektroforez ve blot sistem (Bio-Rad)
- Gel logic 2200 görüntüleme sistemi (Carestream)

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre üreme flaskları, 25cm² ve 75 cm² (Thermo Scientific)
- 15ml ve 50ml santrifüj tüpü (Thermo-Nunc)
- Hücre kültür plakları (96 ve 6 kuyucuklu plate) (Greiner)
- Hücre dondurma tüpleri (Greiner)
- 0.2ml, 0.5ml ve 1.5ml Mikrosantrifüj tüpleri (Greiner)

3.3. Kullanılan Kimyasallar

- Besiyeri RPMI 1640 (Gibco)
- Besiyeri McCoy's 5A (HyClone)
- Fetal Bovine Serum (HyClone)
- Penisilin/Streptomisin antibiyotik (HyClone)
- L-Glutamin (HyClone)
- Trypsin (Thermo)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Ambresco)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Roche)
- Etanol (Sigma)
- Metanol (Merck)
- Hücre Lizis Solusyonu (Roche)
- PBS (Gibco)
- Primerler (*GAPDH*, *CTNNB1* ve *WIF-1*) (Ella Biotech)
- Tripure Isolation Reagent (Roche)
- Universal prob (Roche)
- Amonyum Persülfat (Amresco)
- Temed (Amresco)
- Tris base (Sigma)
- Akrilamid (Amresco)

- Bisakrilamid (Amresco)
- Gliserol (Merck)
- Hidroklorik asit (Merck)
- Bromophenol blue boyası (Sigma)
- Yağsız süt tozu (CST)
- GSK3 β inhibitörü SB216763 (Sigma)
- DNMT inhibitörü 5-Aza-2'-deoksisitidin (Sigma)
- ColorPlus Protein Belirteci (NEB)
- Beta-Aktin antikor (CST)
- DNMT1 (Thermo)
- β -catenin (Thermo)
- HAUSP (Thermo)
- UHRF1 (Thermo)
- Fosfo-GSK3 β (CST)
- Sekonder antikor (Thermo)
- PhosphoSTOP tableti (Roche)

3.4. Kullanılan Kitler

- Hücre Proliferasyon Kiti, WST-1 (Roche)
- cDNA Sentez Kiti (Roche)
- DNA izolasyon kiti
- Bisülfid modifikasyonu kiti (Zymo)
- 480 Taqman Master Mix (Roche)
- BCA Protein Tayin Kiti (Thermo)

3.5. Hücre Hatları

Bu çalışmadaki, T24 insan mesane hücre hattı (p53 mutant) ve Caki-2 insan renal hücre karsinoma hücre hatları (yaban tip p53)

ATCC'den, LNCaP (yaban tip p53) ve PC3 insan prostat hücre (p53 null) hatlarımız, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Levent TÜRKERİ' den temin edilmiştir.

3.6. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

3.6.1. %10'uk RPMI 1640 ve McCoy's 5A Besiyerinin hazırlanışı

450 ml besiyeri içerisine inaktive edilmiş 50ml FBS, 5ml 200mM L-Glutamin, 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

3.6.2%10'uk RPMI 1640 ve McCoy's 5A Besiyerinin hazırlanışı

450 ml besiyeri içerisine inaktive edilmiş 5 ml FBS, 5 ml 200 mM L-Glutamin, 5 ml 100µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

3.6.3. Hücre Lizis Solüsyonunun Hazırlanışı

10x Cell Lizis buffer (Cell Signaling, Danvers MA; Kat. No:# 9803), dH₂O yardımıyla 1x haline getirildi ve 1 adet phosphostob tableti 10 ml 11 lizis buffer içerisinde çözülür.

3.6.4. PMSF Solüsyonu

0,03484 g PMSF, 10 ml izopropanol içerisinde çözüldü.

3.6.5. %30'luk Akrilamid/bisakrilamid Solüsyonu

29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid 100 ml dH₂O içerisinde çözöldü.

3.6.6. 1,5 M Tris Buffer (pH:8,8)

27,23 g Tris-base, 150ml dH₂O içerisinde çözöldü ve pH, HCl ile 8,5'e ayarlandı.

3.6.7. 0,5 M Tris Buffer (pH:6,8)

6 g Tris-base, 100ml dH₂O içerisinde çözöldü ve pH, HCl ile 8,5'e ayarlandı.

3.6.8. 10x Tris-Glisin Stok Solüsyonu

30.3 g Tris-base ve 144 g Glisin 1000 ml dH₂O içerisinde çözöldü ve pH, HCl ile 8,5'e ayarlandı.

3.6.9. 10x Running Buffer (pH:8,3)

10x konsantrasyondaki Tris-Glisin stotuğu dH₂O ile 1x haline getirildi ve 10 ml %10'luk SDS ilave edildi. pH, HCl ile 8,3'e ayarlandı.

3.6.10. Transfer Buffer

20 ml 10x Tris-Glisin stok solüsyonu, 40 ml Metanol ilave edildi ve toplam hacim dH₂O kullanılarak 200 ml'ye tamamlandı. pH, HCl ile 8,3'e ayarlandı.

3.6.11. 2x Sample Buffer

62,2 mM Tris-Hcl, %2 SDS, %10 Gliserol, 50mM DTT ve %0,01 bromfenol blue boyası karıştırılarak toplam hacim dH₂O kullanılarak 200 ml'ye tamamlandı. pH, HCl ile 8,3'e ayarlandı ve her kullanım öncesi total hacmin %5 β-merkaptoetanol eklendi.

3.6.12. Amonyum Persülfat (APS) Solüsyonu

100 mg APS, 1ml dH₂O içerisinde çözüldü.

3.6.13. 10x TBS Solüsyonu

12,1 g Tris-base ve 40 g NaCl 500 ml dH₂O içerisinde çözüldü.

3.6.14. Yıkama Solüsyonu

10x konsantrasyonundaki TBS stoğu, dH₂O kullanılarak 1x haline getirildi ve total hacmin %0,1'i kadar Tween-20 eklendi.

3.6.15. Primer ve Sekonder Dilüsyon Solüsyonu

1x TBS, %0,1 Tween-20 ve %5 yağsız süt tozu karıştırıldı. Primer ve sekonder antikorlar üretici firmanın belirttiği oranda dilüsyon solüsyonu ile dilue edildi.

3.6.16. Bloklama solüsyonu

1x TBS, %0,1 Tween-20 ve %5 yağsız süt tozu karıştırıldı.

3.7. Yöntemler

3.7.1. Hücre Kültürü

PC3 ve LNCaP hücreleri, %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerinde, T24 ve Caki-2 hücreleri %10 FBS içeren McCoy's 5A besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂'li ortamda 37°C ayarlı etüv içerisinde kültüre edildi.

T24, Caki-2, PC3, LNCaP hücreleri, (0,1 – 100µM) GSK3β inhibitörü SB216273 ile ayrı ayrı 0-72 saat süreyle inkübe edildi. Ayrıca, T24, Caki-2, PC3 ve LNCaP hücreleri 48 ve 72 saat boyunca, (0,1 – 10 µM) DNMT inhibitörü, 5-Aza-2'-deoksisitidin (DAC) ile inkübe edildi. DAC için çözücü olarak dH₂O, SB216763 için DMSO çözücü olarak kullanıldı ve aynı süre DMSO ile inkübe edilerek çözücü kontrolü olarak kullanıldı. İnkübasyon sonrasında her bir doz ve süre için sitotoksik etkileri araştırıldı. Her bir konsantrasyon için 3 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

3.7.2. WST-1 Sitotoksosite Deneyi

T24, Caki-2, PC3 ve LNCaP hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10^5 hücre/ kuyu olacak şekilde ekildi, bir gece %1'lik RPMI 1640 ve McCoy's 5A besiyerinde inkübe edilerek hücrelerin yapışmasını takiben besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra SB216763 (Sigma, Almanya; Kat. No: A3656) birlikte ve ayrı ayrı çeşitli konsantrasyonları ile hazırlanmış %10'luk RPI 1640 ve McCoy's 5A besiyerinde 0-72 saat süreyle 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonucunda her bir kuyucuğa 10 μl WST-1 solüsyonu (Roche, Almanya; Kat. No: 001 644 807 001) eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi T24 ve Cali-2 için 2 saat sonunda, PC3 ve LNCaP hücreleri için 4 saat sonunda spektrofotometre ile 450 nM dalga boyunda belirlendi. Negatif kontroller kör olarak kullanıldı. Hücre canlılığı % hesaplamaları excel programı ile gerçekleştirildi.

3.7.3. DNA İzolasyonu

İnkübasyon sürelerinin dolması ile birlikte hücre kültürleri sonlandırılıp DNA izolasyon kiti (Roche, Almanya; Kat. No: 11796828001) kullanılarak genomik DNA eldesi aşağıdaki protokole göre yapıldı;

1. 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine 200 μl örnek, 200 μl bağlanma solüsyonu, 40 μl proteinaz K karışımı 70°C 'de 10 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında 100 μl izopropanol ilave edildi ve karıştırıldı.
3. Örnekler filtreli tüplere aktarıldı ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Filtreli tüp yeni toplayıcı tüpe aktarılıp 500 μl İnhibitör Uzaklaştırıcı Solüsyon eklenip 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Filtreli tüp yeni toplayıcı tüpe aktarılıp 500 μl Yıkama Solüsyonu eklenip 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

6. Toplayıcı tüp içeriği uzaklaştırıldıktan sonra en yüksek hızda 40 saniye ilave santrifüj yapıldı ve toplayıcı tüp uzaklaştırıldı.
7. Filtreli tüpler steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüp içerisine yerleştirilip 200 µl elution buffer ilave edilerek 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Filtre uzaklaştırılarak örnekler – 20°C'ye kaldırıldı.
9. Elde edilen DNA' ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek MS-PCR'da kullanılabilecek kadar - 20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.7.4. Metilasyona Özgü PCR (MS-PCR)

Hücrelerden izole edilen DNA örnekleri EZ-DNA Methylation-Gold kit kullanılarak (Zymo Research, Irvine CA; Kat. No: D5005) aşağıdaki protokole göre bisülfid modifikasyonu yapıldı;

1. 500 ng DNA örneği üzerine 130µl CR Dönüşüm Ajanı ilave edildi ve karıştırıldı.
2. Örnekler ısı döngü cihazına yerleştirilerek,
98°C'de 10 dakika
64°C'de 150 dakika bekletildi.
3. Zymo-Spin IC kolonuna 600 µl M-Bağlanma Solüsyonu konulduktan sonra 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
4. Isı döngü cihazı içerisindeki örnekler M-bağlanma solüsyonu içeren Zymo-Spin IC kolonu içerisine konarak birkaç kez ters düz etmek suretiyle karıştırıldı.
5. 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
6. Kolon içerisine 100 µl M-yıkama solüsyonu konuldu ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.

7. Kolona 200 µl N-Desülfonasyon Solüsyonu koyulduktan oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilir.
8. Santrifüj sonrasında kolon içerisine 200 µl M-Yıkama Solüsyonu konulduktan sonra 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Bu basamak bir kez daha tekrarlandı.
9. Kolon steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüp içerisine yerleştirilip 10 µl elution buffer ilave edilerek 10.000 g'de 30 dakika santrifüj edildi.

Bisülfid modifikasyonuna maruz bırakılan DNA örneklerinde *WIF-1* geninin metilasyon örüntüsünü belirlemek amacıyla MS-PCR yapıldı. Bu amaçla; 0,5 U FastStart Taq DNA polimeraz (Roche, Almanya; Kat. No: 2 032 937) 1x PCR buffer, her bir dNTP'den 200 µmol/l, 2 mM MgCl₂, her bir primerden (Tablo 1) 2,5 mM ve 3 µl bisülfid DNA içeren 25 µl reaksiyon karışımında ısı döngü cihazında MS-PCR gerçekleştirildi. Uygulanan PCR protokolü Tablo 2'de gibidir.

Tablo 1. MS-PCR primer dizileri.

		Dizi (5'→3')	TM
WIF1	Metile	F GTT TTT GAG TGT TTT TTT TCG GGT TC	60°C
		R AAT ACG ATA CGC CCA ATA AAA CG	60°C
	Unmetile	F GGT TTT TGA GTG TTT TTT TTT GGG TTT	60°C
		R AAT ACA ATA CAC CCA ATA AAA CAC CCA	60°C

Tablo 2. MSP reaksiyon koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Pre-inkünasyon	95°C	5 dk	1 döngü
Amplifikasyon	Denatürasyon	95°C	45 sn
	Anneling	60°C	45 sn
	Uzama/Sentez	72°C	30sn
Soğutma	72°C	5 dk	1 döngü

3.7.5. Agaroz Jel Elektroforezi

MS-PCR sonuçları agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gösterildi. Bunun için daha önceden hazırlanmış olan %1,5'lik agaroz jele DNA örneklerinden 15 µL alınarak, 3 µL Oranj G jel yükleme tamponu mikropipet yardımı ile karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Aynı zamanda kuyulardan birine de 100 baz çiftlik (bp) DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenerek 60 dakika 90 volt sabit akımda yürütüldü. Süre sonunda "Kodak Gel Logic 100" görüntüleme sistemi kullanılarak jelin fotoğrafı çekildi.

3.7.6. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

6 kuyulu kültür kaplarında bulunan T24, Caki-2, PC3 ve LNCaP hücrelerinden inkübasyon sürelerinin ardından aşağıdaki basamaklara göre Tripure Isolation Reagent ile total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İşlemler laminar akım kabini içerisinde gerçekleştirildi.

1. Hücrelerden ilaçlı besiyerleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 1'er ml Tripure solüsyonu eklendi.
2. Hücre lizatları steril ependorf tüplere alındı ve nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrımı için 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
3. Her bir tüpe 200'er µl kloroform eklendi ve 15 saniye boyunca kuvvetlice vorteks yapıldı.
4. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyondan sonra 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
5. Süpernatantların her biri yeni ependorf tüplere alındı.
6. Her bir tüpe 500'er µl izopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

7. 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı ve pelletlerin üzerine 1'er ml %75 lik etanol yıkama amacıyla kondu.
8. Tüpler 7500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı.
9. 10-Pelletler belirli süre kurumaya bırakıldı ve 35µl DEPC muamele edilmiş H₂O eklendi.
- 10.11-Pelletlerin çözülmesi için kuru ısıtıcıda 60°C'de 15 dk inkübe edildi
- 11.Elde edilen RNA' ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılabilecek kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı

3.7.7.cDNA Sentezi

High Fidelity Transcriptor cDNA sentez kiti (Roche Almanya; Kat. No: 0508995001) ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Primer olarak random hekzamerler kullanıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. cDNA RT-PCR tepkime karışımı.

	Son Konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu (5x)	1x (8mM MgCl ₂)	4,00
dNTP	1mM	2,00
Random hekzamer primeri	60µM	2,00
RNaz inhibitörü	20 ünite	0,50
DTT	5 mM	1
Transcriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	1,1
Total RNA	1µg	1µg olacak şekilde

cDNA için PCR karışımı ince çeperli 0,2ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi. Aşağıda

belirtilen protokole uygun olarak cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi uygulandı.

1. Son konsantrasyon 100 ng/ml olacak şekilde RNA, 2 µl Hekzamer primer ve total hacim 11,4 µl olacak şekilde steril H₂O-PCR grade eklendi.
2. Otomatik ısı döngüsü cihazında 65⁰C'de 10 dakika inkübasyon edildikten sonra örnekler buz üzerine alındı.
3. 8,6 µl master karışım (5x Tampon, 1mM dNTP, 20U RNaz inhibitörü, 5mM DTT ve 10U Transkriptor Ters Transkriptaz enzimi) buz üzerinde bekletilen örneklerle eklendi.
4. Thermal Cycler cihazına yerleştirilen örnekler sırasıyla;
 - 29⁰C'de 10 dakika
 - 48⁰C'de 60 dsakika
 - 85⁰C'de 5 dakika inkübe edildi.
5. Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılıncaya kadar -20⁰C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.7.8. Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü

CTNNB1 (β -*katenin*) ve *WIF-1* genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) 480 cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde ; cDNA, bölgeye özgü primerler ve UPL TaqMan probu (Tablo 4), LightCycler TaqMan Master karışımı (Roche, Almanya; Kat. No:0470749400) ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. *CTNNB1* ve *WIF-1* gen ifadenmesini normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı.

Tablo 4. Real-time PCR, primer, prob dizileri.

		DİZİ (5'→3')
<i>CTNNB1</i>	F	TGG CCA TCT TTA AGT CTG GAG
	R	CAA CAC AGA ATC CAC TGG TGA
	P	# 37 (Roche, Almanya, Kat No: 04687957001)
<i>WIF-1</i>	F	CCA GGG AGA CCT CTG TTC AA
	R	TTG GGT TCA TGG CAG GTT
	P	#76 (Roche, Almanya, Kat No: 04688996001)
<i>GAPDH</i>	F	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C
	R	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C
	P	#60 Kat No: (Roche, Almanya, 04688589001)

GAPDH, *CTNNB1* ve *WIF-1* genlerine uygun primer ve proplar kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarı Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. *GAPDH*, *CTNNB1* ve *WIF-1* Real-Time PCR tepkime karışımı.

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	4.1µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.5µL
Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.5µL
TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.2µL
TaqMan karışımı (10x)	1x	2.5µL

3.7.9. Light Cyclers (LC) 480 Deney Programı

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara dağıtıldı ve üzerine cDNA' lar eklendi. Üzeri şeffaf kapatıcı ile kapatıldı ve cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 6'de belirtilen

amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. *GAPDH*, *CTNNB1* ve *WIF-1* genleri için aynı program kullanıldı.

Reaksiyon sonucunda, *GAPDH*, *CTNNB1* ve *WIF-1* genlerin mRNA düzeylerini gösteren Crossing point (CP) değerleri belirlendi. *CTNNB1* ve *WIF-1* ifade düzeyleri *GAPDH* ifade düzeyine göre normalize edildi.

Tablo 6. *GAPDH*, *CTNNB1* ve *WIF-1* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)			
Program Verisi		Değer	
Döngüler		1	
Analiz Modu		-	
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)		95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		10:00dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		4.40	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)			
Program Verisi		Değer	
Döngüler		50	
Analiz Modu		Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2	Kısım3
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10sn	20sn	1
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	4.40	2.20	4.40
Program 3. Soğutma			
Program Verisi		Değer	
Döngüler		1	
Analiz Modu		-	
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)		40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		2.20	

3.7.10. Protein İzolasyonu

T24, Caki-2, PC3 ve LNCaP hücreleri inkübasyon sürelerinin dolmasının ardından protein izolasyonu amacı ile aşağıdaki basamaklar sırası ile uygulandı.

- 1- Hücrelerden ilaçlı besiyerleri uzaklaştırıldı ve soğuk PBS ile yıkandı.
- 2- PBS çekildi ve 1mM PMSF içeren 1X Hücre Lizis Buffer'dan 500 µl kondu.
- 3- Hücreler buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 4- Hücreler scraper ile kaldırılıp 1.5ml'lik epondarf tüplerine alındı ve buz üzerinde sonike edildi.
- 5- 13500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüjden sonra süpernatant yeni tüplere alındı.
- 6- Tek kullanımlık alikotlandıktan sonra proteinler -80°C'ye kaldırıldı.

3.7.11. BCA Kiti İle Protein Miktar Tayini

T24, Caki-2, PC3 ve LNCaP hücrelerinden izole edilen proteinlerin miktarlarının tayini BCA protein ölçüm kiti (Pierce, USA, katalog no:23225) ile aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirildi;

- 1- Kit içerisinde gelen bovine serum albumin (BSA) ile 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,025 ve 0 µg/ml konsantrasyonlarda dH₂O kullanılarak standart tüpler hazırlandı.
- 2- Protein örnekleri ve standart 96 kuyucuklu plakanın her birine 25'er µl eklendi.
- 3- Kit içerinden çıkan Reaktif A:B oranı 50:1 olacak şekilde hazırlandı.
- 4- Bu reaktif karışımından her bir kuyucuğa 200'er µl eklendi.

5- 37°C lik inkübatörde yarım saat inkübasyondan sonunda spektrofotometre ile 562 nm dalga boyunda plaka okutuldu ve excel programında standart eğri çizilerek hesaplamalar yapıldı.

3.7.12. Western Blot Yöntemi İle Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

CTNNB1, pGSK3 β (fosfo Ser9), DNMT1 HAUSP ve UHFR1 (51 ve 516. amino asitler arasına özgül) genlerinin protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için, hücrelerden belirli dozlarda ve sürelerde ilaç muamelesi sonucu elde edilmiş proteinler ile western blot yöntemi kullanıldı.

İlk aşamada, BCA kiti ile miktarları ve standart grafikleri belirlenen proteinler yükleme için hazırlandı. Bu proteinlerle aynı miktarda üzerlerine 2x konsantrasyon değerinde sample buffer'ları eklendi. Böylece protein örnekleri 1:1 oranında dilüe edilerek çalışma konsantrasyonları elde edildi. Protein örnekleri denatürasyon için 70°C'ye ayarlı ısıtıcı blokta 10 dakika bekletildi ve yükleme aşamasına geçildi. Akrilamid ve bisakrilamid polimerleşmesi ile, üst jel olan stacking ve alt jel olan seperating jellerin önceden hazırlanıp donması ile yükleme jeli oluşturuldu. Jele yüklenen protein örnekleri, 1X running buffer eklenmesi ile 150 V ve 250 mA de 90 dakika boyunca yürütüldü.

Proteinler jel üzerinde moleküler yüklerine ve ağırlıklarına göre yürütüldükten sonra güç kaynağı kapatıldı ve jel alındı. Örnekler, wet blotting yöntemi ile PVDF membrana transferleri gerçekleştirildi. Transfer kaseti tank içerisine dikey kondu ve transfer buffer de eklendikten sonra 100 V ve 250 mA'de 2 saat boyunca aktarım gerçekleştirildi. Aktarım aşamasından sonra membran aranan proteine özgü primer (dilüsyon

oranı; 1:1000) ve sekonder antikorlarla (dilüsyon oranı; 1:1000) muamele edildi. Dilüe edilen primer antikorlar ile bir gece +4°C de, sekonder antikorla ise 2 saatlik inkübasyon gerçekleştirildi. Son aşamada ise membranın görüntülenmesi Gel logic 2200 görüntüleme sistemi ile gerçekleştirildi.

3.8. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Doza ve zamana bağlı olarak değişen, *GAPDH*, *CTNNB1* ve *WIF-1* mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı. Hücre canlılığı oranlardaki değişimler ise “tek yönlü Anova” testiyle karşılaştırıldı. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. 0,05’den küçük olan *p* değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

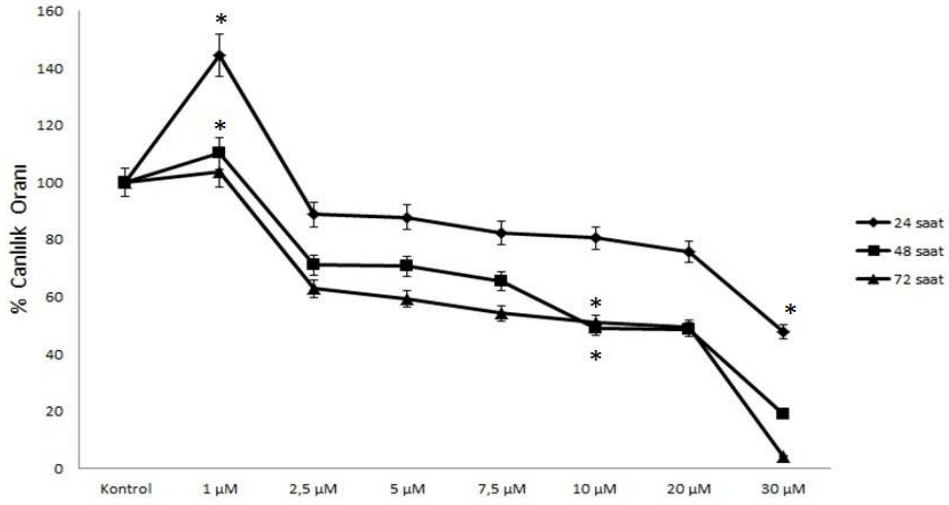
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda T24 hücrelerinin GSK3 β inhibitörü SB216763'e olan cevabının hücre canlılığı üzerine etkisi Grafik 1'de gösterilmiştir. Buna göre SB216763 ile muamele edilmiş T24 hücrelerinin doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu artırdığı ve azaldığı belirlenmiştir.

Kullandığımız 1 μ M SB216763 konsantrasyonunda T24 hücrelerinin hücre canlılığını 24'üncü saatte %44,5 arttırdığı, 48. saatte %10,2 arttırdığı, 72. saatte ise %3,6 arttığı görülmektedir. Sonuçlarımıza göre 24, 48 ve 72 saat sürelerinde 1 μ M SB216763'ün hücre proliferasyonu arttırdığı belirlendi.

24.saatte 30 μ M konsantrasyonunda hücre canlılığı %47,7; 48. ve 72.saatlerde ise 20 μ M konsantrasyonunda hücre canlılığı sırasıyla %49,1 ve %51,1 olarak belirlendi. Sonuçlarımıza göre SB216763 için 24 saat için IC₅₀ dozunun 30 μ M, 48 ve 72 saat için 10 μ M olduğu belirlendi.

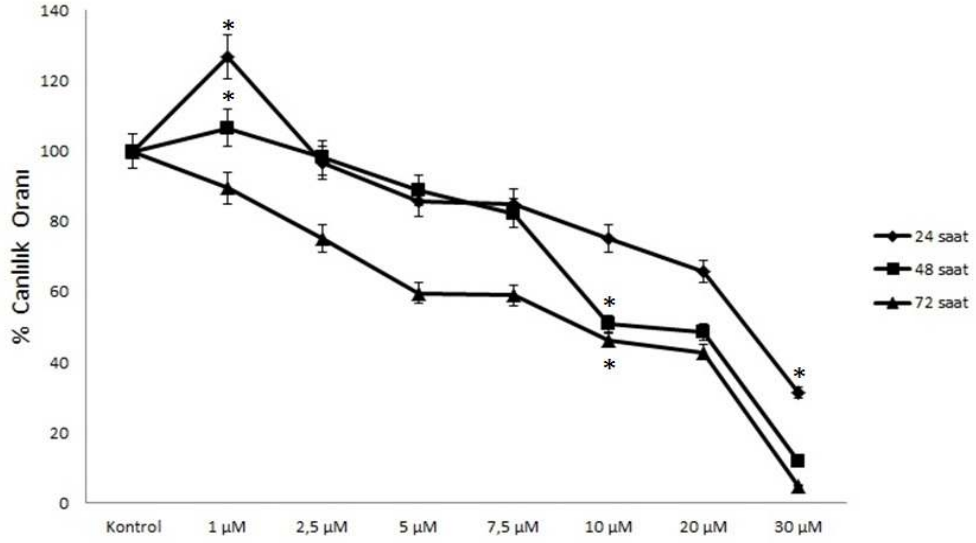


Grafik 1. T24 hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) SB216763 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda Caki-2 hücrelerinin GSK3 β inhibitörü SB216763'e olan cevabının hücre canlılığı üzerine etkisi Grafik 2'de gösterilmiştir. Buna göre SB216763 ile muamele edilmiş Caki-2 hücrelerinin doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu artırdığı ve azaldığı belirlenmiştir.

Kullandığımız 1µM SB216763 konsantrasyonunda Caki-2 hücrelerinin hücre canlılığını 24'üncü saatte %26,8 arttırdığı, 48. saatte %6,6 arttırdığı, 72. saatte ise %10,4 azaldığı görülmektedir. Sonuçlarımıza göre 24 ve 48 saat sürelerinde 1µM SB216763'ün hücre proliferasyonu arttırdığı 72. saatte hücre proliferasyonunun azaldığı belirlendi.

24.saatte 30 µM konsantrasyonunda hücre canlılığı %31,5; 48. ve 72.saatlerde ise 10µM konsantrasyonunda hücre canlılığı sırasıyla %48,6 ve %42,8 olarak belirlendi. Sonuçlarımıza göre SB216763 için 24 saat için IC₅₀ dozunun 20 µM, 48 ve 72 saat için 10µM olduğu belirlendi.

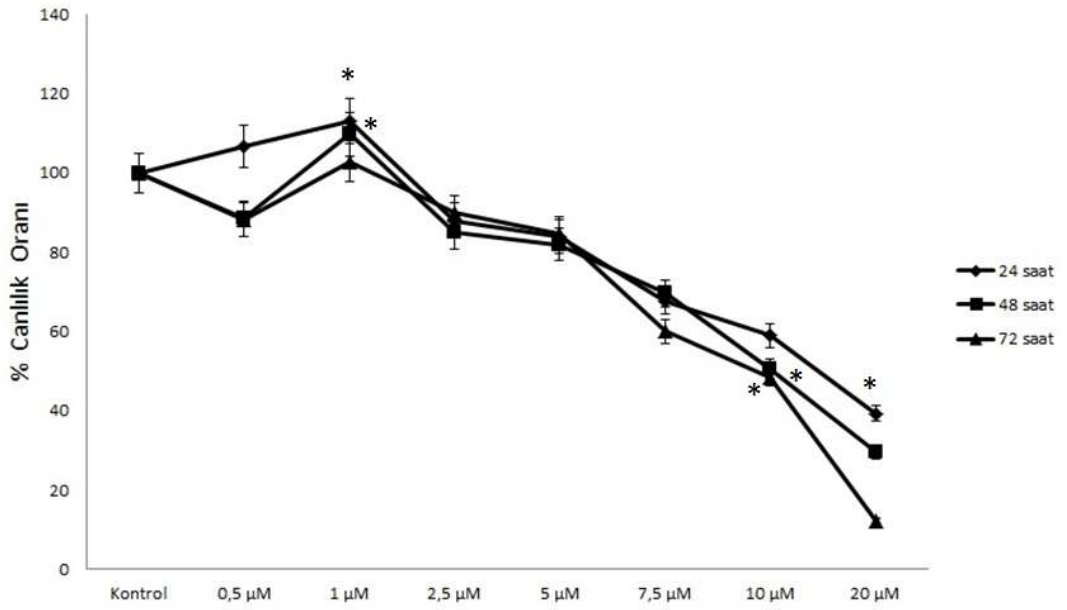


Grafik 2. Caki-2 hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) SB216763 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda PC3 hücrelerinin GSK3 β inhibitörü SB216763'e olan cevabının hücre canlılığı üzerine etkisi Grafik 3'de gösterilmiştir. Buna göre SB216763 ile muamele edilmiş PC3 hücrelerinin doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu artırdığı ve azaldığı belirlenmiştir.

Kullandığımız 1 μ M SB216763 konsantrasyonunda PC3 hücrelerinin hücre canlılığını 24'üncü saatte %13,2 arttırdığı, 48. saatte %9,8 arttırdığı, 72. saatte ise %2,8 arttığı görülmektedir. Sonuçlarımıza göre 24, 48 ve 72 saat sürelerinde 1 μ M SB216763'ün hücre proliferasyonu arttırdığı belirlendi.

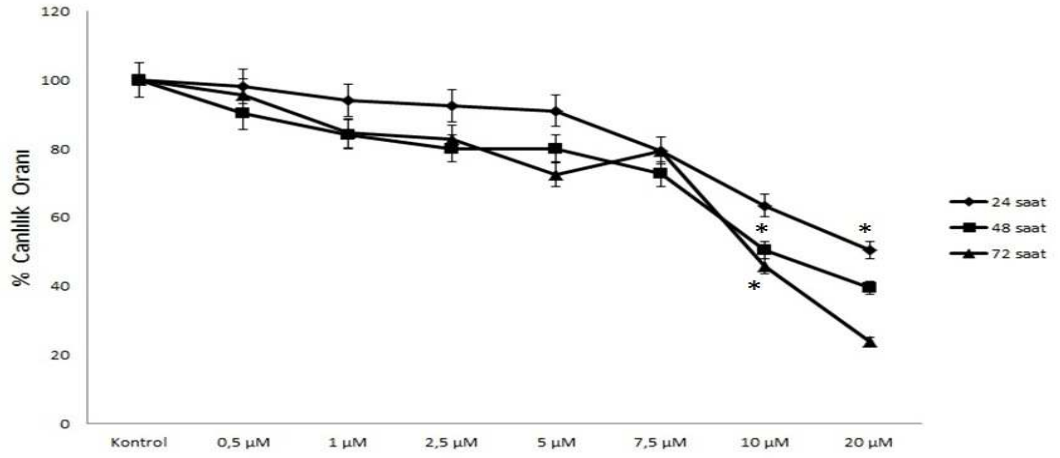
24.saatte 30 μ M konsantrasyonunda hücre canlılığı %39,2; 48. ve 72.saatlerde ise 10 μ M konsantrasyonunda hücre canlılığı sırasıyla %50,4 ve %48,5 olarak belirlendi. Sonuçlarımıza göre SB216763 için 24 saat için IC₅₀ dozunun 20 μ M, 48 ve 72 saat için 10 μ M olduğu belirlendi.



Grafik 3. PC3 hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) SB216763 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda LNCaP hücrelerinin GSK3 β inhibitörü SB216763'e olan cevabının hücre canlılığı üzerine etkisi Grafik 4'de gösterilmiştir. Buna göre SB216763 ile muamele edilmiş LNCaP hücrelerinin doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu azaldığı belirlenmiştir.

24.saatte 20 µM konsantrasyonunda hücre canlılığı %50,5; 48. ve 72.saatlerde ise 10µM konsantrasyonunda hücre canlılığı sırasıyla %50,4 ve %45,8 olarak belirlendi. Sonuçlarımıza göre SB216763 için 24 saat için IC₅₀ dozunun 20 µM, 48 ve 72 saat için 10µM olduğu belirlendi.

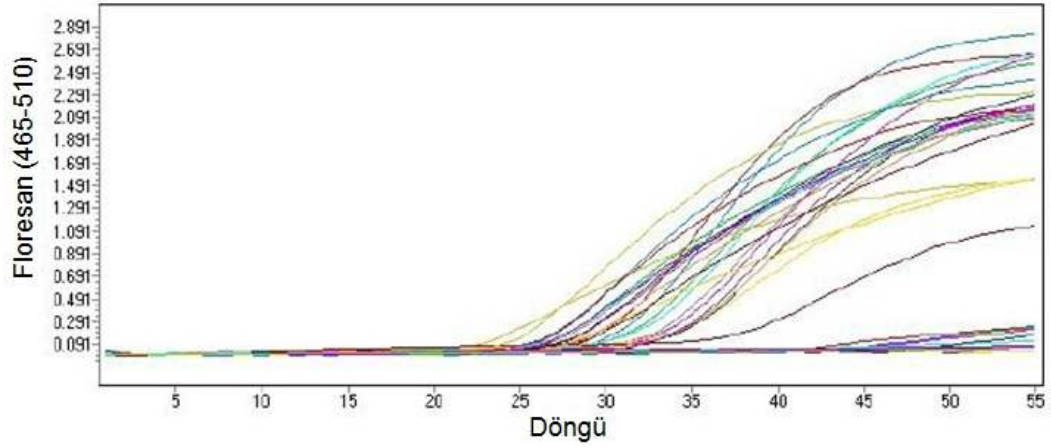


Grafik 4. LNCaP hücrelerinin (5.000 hücre/kuyu) SB216763 ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.

4.2. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

CTNNB1 ve *WIF-1* genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler 480 cihazı kullanıldı. T24, Caki-2, PC3 ve LNCaP hücre hatlarından elde edilen cDNA'larda *CTNNB1* ve *WIF-1* ve bu genlerin normalizasyonu için seçilen *GAPDH* genlerine özgül primerler ve UPL LNA problemleri kullanılarak çalışıldı.

CTNNB1, *WIF-1* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 11'de gösterildi.



Şekil 11. *CTNNB1*, *WIF-1* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. *CTNNB1*, *WIF-1* ve *GAPDH* geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

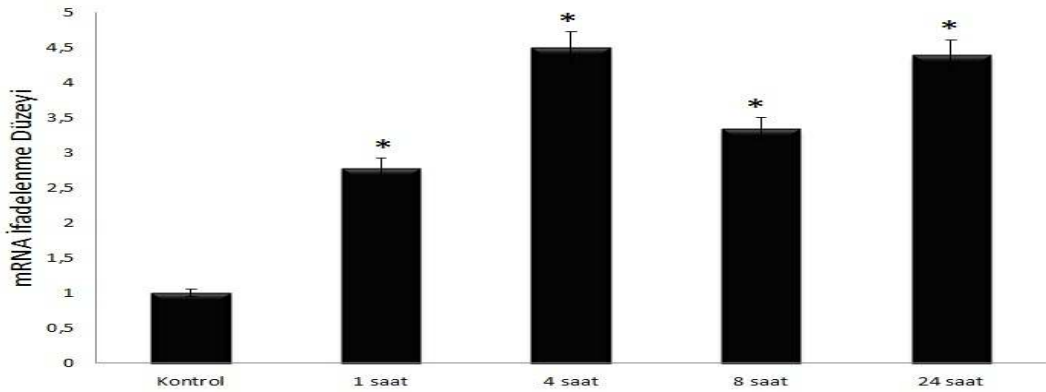
Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}$$

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

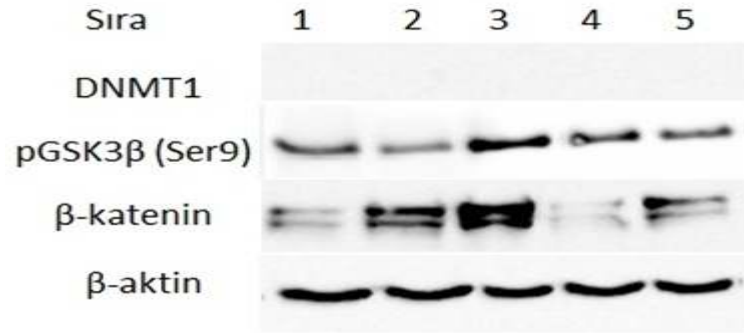
4.2.1. Kantitatif *CTNNB1* Geninin İfade Düzeyinin ve DNMT1, β -katenin ve pGSK3 β Protein İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi

T24 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 1 μ M SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası *CTNNB1* geninin mRNA düzeyindeki değişimler Grafik 5’de gösterildi. *CTNNB1* genin mRNA düzeyi kontrole göre 1. saatte 1.8 kat, 4. saatte 3.5 kat, 8. saatte 2,3 kat ve 24. saatte 3,4 kat arttığı belirlenmiş ve bu artma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).



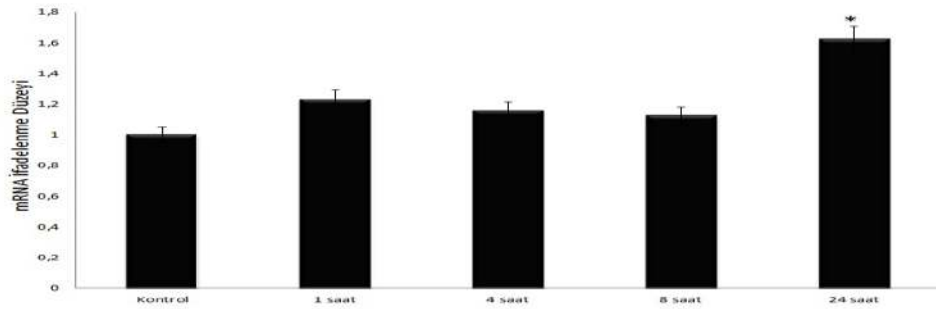
Grafik 5. T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında *CTNNB1* mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi,*; $p<0,01$.

T24 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 1 μ M SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 12’de gösterildi. 4. saat 1 μ M SB216763 inkübasyonu sonrasında pGSK3 β (Ser9) düzeyi artışına paralel olarak β -katenin protein düzeyinde artma gözlemlenmektedir. 8. ve 24. saatlerde β -katenin mRNA düzeyinin artmasına karşın protein düzeyinde azalma belirlendi. Ancak artmış pGSK3 β ve β -katenin protein düzeyine göre T24 hücrelerinde DNMT1 proteini bulunamadı.



Şekil 12. T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1μM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β-katenin, pGSK3β(Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 1μM SB216763 ile inkübasyon.

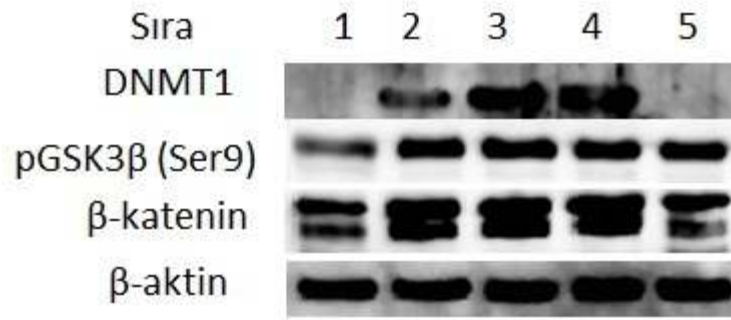
Caki-2 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 1μM SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası *CTNNB1* geninin mRNA düzeyindeki değişimler Grafik 6'de gösterildi. *CTNNB1* genin mRNA düzeyi kontrole göre yalnızca 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur ($p<0,01$).



Grafik 6. Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 1μM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında *CTNNB1* mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi,*; $p<0,01$.

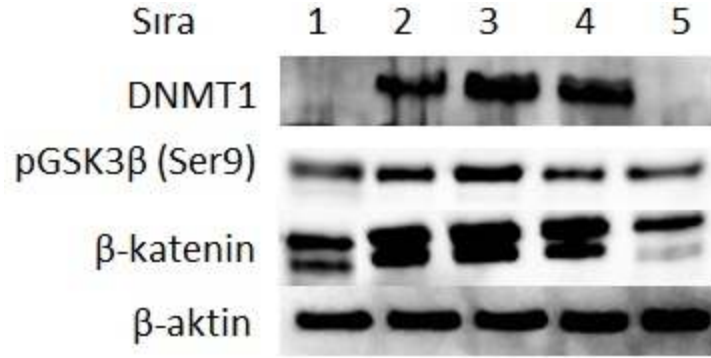
Caki-2 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 1μM SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası DNMT1, β-katenin, pGSK3β(Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 14'de gösterildi. 1. saat 1μM

SB216763 inkübasyonundan itibaren pGSK3 β (Ser9)'da artışı paralel olarak β -katenin ve Dnmt1 protein düzeylerinde artma gözlemlenmektedir. Ancak 24. saatte β -katenin mRNA düzeyinde artma olmasına karşın protein düzeyinde azalma belirlendi. Bununla birlikte pGSK3 β protein düzeyinde azalma görülürken, DNMT1 proteini ise bulunamadı.



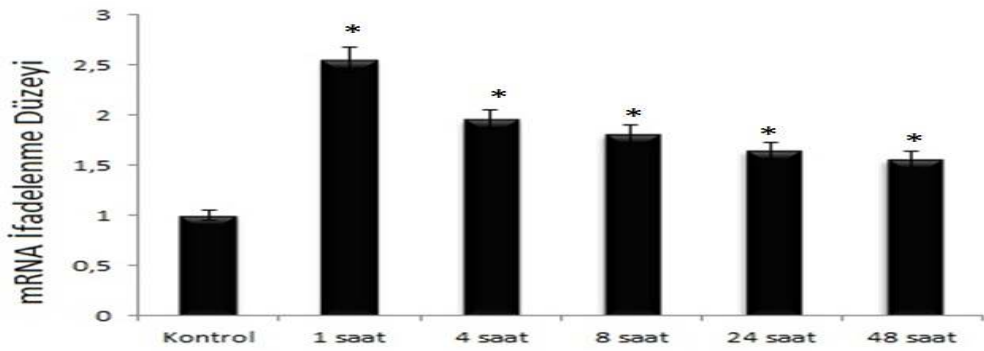
Şekil 13. Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 1 μ M SB216763 ile inkübasyon.

Caki-2 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 10 μ M SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 14'de gösterildi. 1. saat 10 μ M SB216763 inkübasyonundan itibaren pGSK3 β (Ser9)'da artışı paralel olarak β -katenin ve DNMT1 protein düzeylerinde artma gözlemlenmektedir. Ancak 24. saatte β -katenin mRNA düzeyinde artma olmasına karşın protein düzeyinde azalma belirlendi. Bununla birlikte pGSK3 β protein düzeyinde azalma görülürken, DNMT1 proteini ise bulunamadı. SB216763, Caki-2 renal hücre karsinoma hücrelerinde zaman ve doz bağımlı olarak β -katenin, DNMT1 protein ifade miktarını azaltmaktadır.



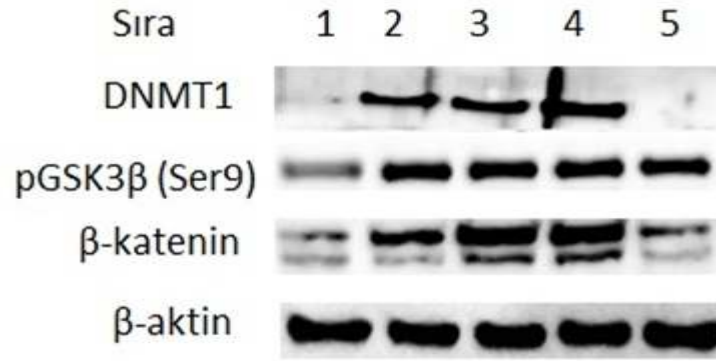
Şekil 14. Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 10μM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β-katenin, pGSK3β(Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 1μM SB216763 ile inkübasyon.

PC hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 1μM SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası *CTNNB1* geninin mRNA düzeyindeki değişimler Grafik 7’de gösterildi. *CTNNB1* genin mRNA düzeyi kontrole göre 1. saatte 1,55 kat, 4. saatte 0.96 kat, 8. saatte 0.809 kat ve 24. saatte 0.65kat arttığı belirlenmiş ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).



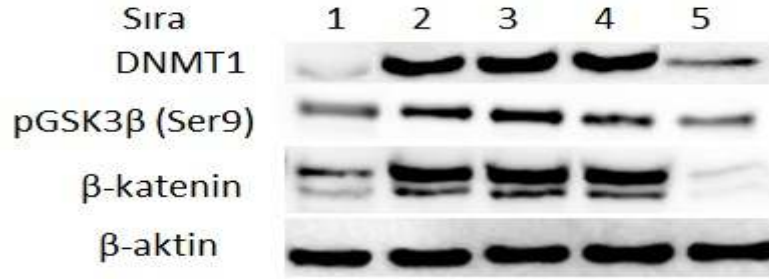
Grafik 7. PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 1μM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında *CTNNB1* mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi,*; $p<0,01$.

PC3 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 1 μ M SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 15’de gösterildi. 1. saat 1 μ M SB216763 inkübasyonundan itibaren pGSK3 β (Ser9)’da artışı paralel olarak β -katenin ve DNMT1 protein düzeylerinde artma gözlemlenmektedir. Ancak 24. saatte β -katenin mRNA düzeyinde artma olmasına karşın protein düzeyinde azalma belirlendi. Bununla birlikte pGSK3 β protein düzeyinde azalma görülürken, DNMT1 proteini ise bulunamadı.



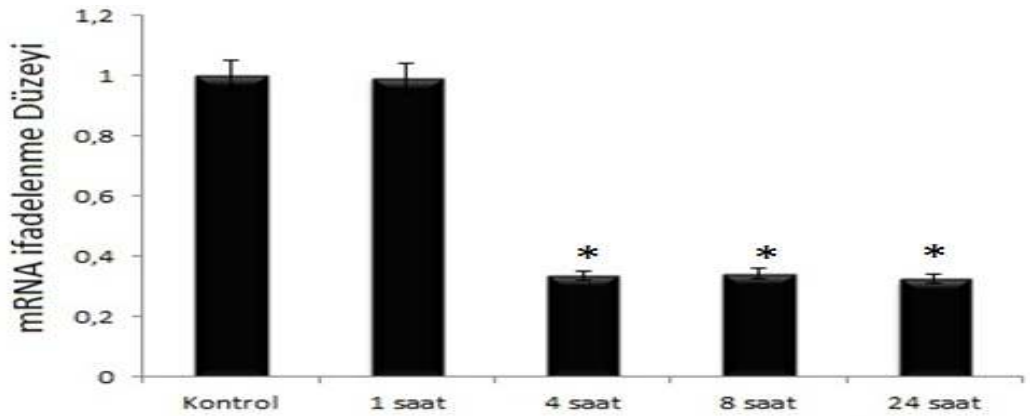
Şekil 15. PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 1 μ M SB216763 ile inkübasyon.

PC3 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 10 μ M SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası DNMT1, β -katenin, pGSK3 β (Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 16’de gösterildi. 1. saat 10 μ M SB216763 inkübasyonundan itibaren pGSK3 β (Ser9)’da artışı paralel olarak β -katenin ve Dnmt1 protein düzeylerinde artma gözlemlenmektedir. Ancak 24. saatte β -katenin, DNMT1 ve pGSK3 β düzeylerinde azalma belirlendi. SB216763, PC3 prostat hücrelerinde zaman ve doz bağımlı olarak β -katenin, DNMT1 protein ifade miktarını azaltmaktadır.



Şekil 16. PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 10µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β-katenin, pGSK3β(Ser9) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 1µM SB216763 ile inkübasyon.

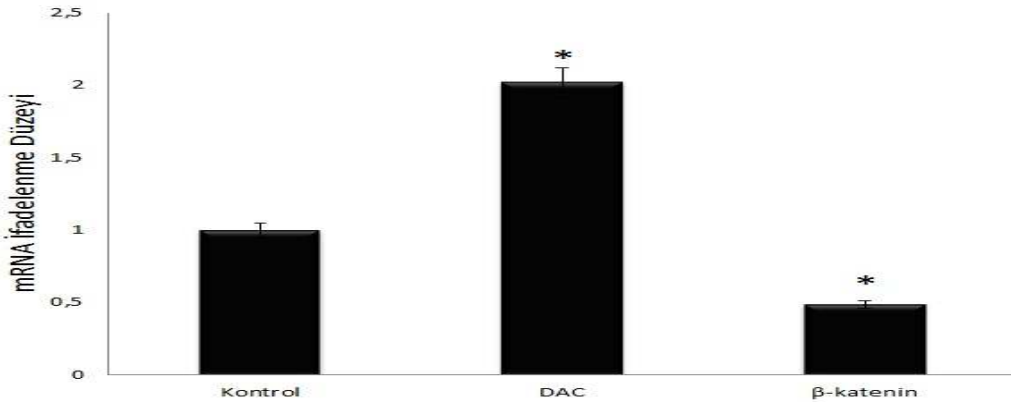
LNCaP hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 1µM SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası *CTNNB1* geninin mRNA düzeyindeki değişimler Grafik 8’de gösterildi. *CTNNB1* genin mRNA düzeyi kontrole göre 4. saatte itibaren 2,98 kat, 8. saatte 2,92 kat, 24. saatte 3,08 kat azaldığı belirlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).



Grafik 8. LNCaP hücrelerinin süre-bağımlı 1µM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında *CTNNB1* mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi, *; $p<0,01$.

4.2.2. WIF-1 Geninin İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

WIF-1 geninin mRNA'sı T24 hücrelerinde 5µM 72 saat DAC ve PC3 hücrelerinde 1µM 72 saat DAC inkübasyon sonrasında tespit edilmiş olup kontrol örneğinde tespit edilemediğinden dolayı istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Yalnızca Caki-2 hücrelerinde 10µM 72 saat DAC ile inkübasyon öncesi ve sonrası *WIF-1* geninin mRNA düzeyindeki değişimler istatistiksel olarak değerlendirildi. *WIF-1* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA düzeyindeki değişimler Grafik 9'da gösterildi. *WIF-1* genin mRNA düzeyi kontrole göre 1,02 kat arttığı belirlendi ve buna paralel olarak *CTNNB1* genin mRNA düzeyinde azalma tespit edildi ($p<0,01$).

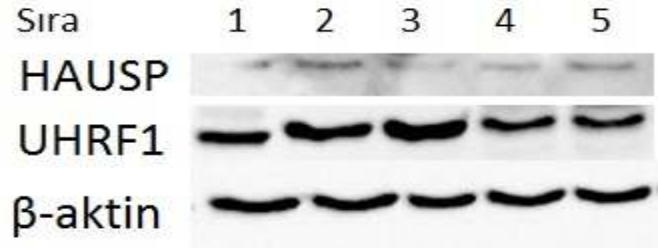


Grafik 9. 10µM 72 saat DAC ile inkübasyonu sonrasında *WIF-1* ve *CTNNB1* mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi,*; $p<0,01$.

4.3. UHRF1 ve HAUSP Protein İfade Düzeyleri

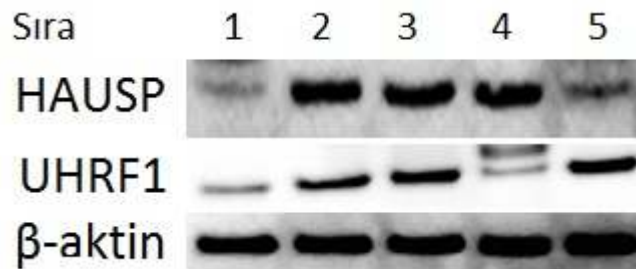
T24 hücrelerinin 1, 4, 8, 24 ve 48 saat süre 1µM SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 17'de gösterildi. HAUSP protein düzeyinde kontrole göre bir artış gözlenmemesine karşın 1. ve 4. saatte 1µM

SB216763 inkübasyonundan itibaren UHRF1 protein düzeyinde bir artış olmasına rağmen 8. saatten itibaren bir azalma gözlemlendi.



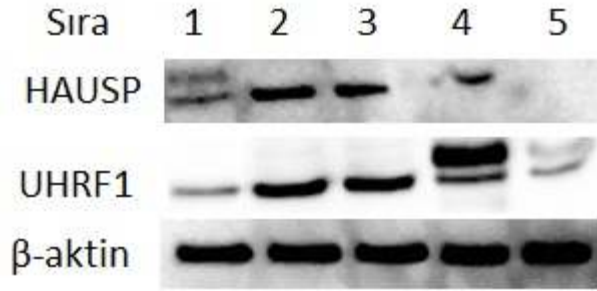
Şekil 17. T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1μM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 1μM SB216763 ile inkübasyon.

Caki-2 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 1μM SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 18'de gösterildi. HAUSP ve UHRF1 protein düzeyinde kontrole göre 1. saatten itibaren bir artış gözlemlendi. Hücrelerde HAUSP 24.saat inkübasyonunda azalma gözlenirken UHRF1'de 1.saatte itibaren bir artış belirlendi.



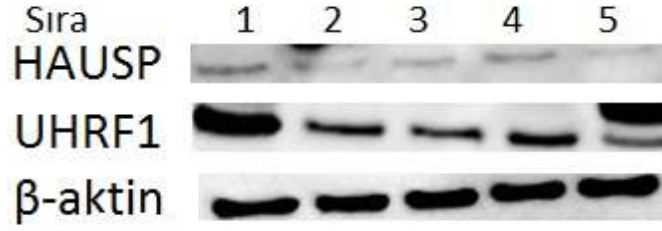
Şekil 18. Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 1μM SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 1μM SB216763 ile inkübasyon.

Caki-2 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 10 μ M SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 19'de gösterildi. HAUSP ve UHRF1 protein düzeyinde kontrole göre 1. ila 8. saatlerde bir artış gözlemlenirken 24. saatde azalma belirlendi. Hücrelerde HAUSP proteini 24.saat inkübasyonunda belirlenemedi. SB216763, Caki-2 renal hücre karsinom hücre hattında zaman ve doz bağımlı olarak HAUSP ve UHRF1 protein ifade miktarını artmaktadır.



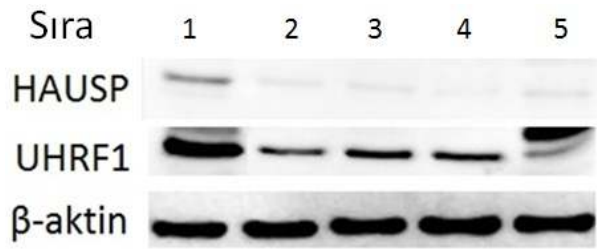
Şekil 19. Caki-2 hücrelerinin süre-bağımlı 10 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 1 μ M SB216763 ile inkübasyon.

PC3 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 1 μ M SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 20'de gösterildi. HAUSP protein düzeyinde kontrole göre bir artış gözlemlenmemesine karşın. PC3 hücrelerinde UHRF1'de kontrole karşın 1.saatten itibaren bir azalma gözlemlendi ancak 24. saatte ise artma belirlendi.



Şekil 20. PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 1 μ M SB216763 ile inkübasyon.

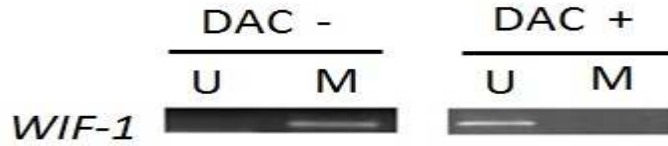
PC3 hücrelerinin 1, 4, 8 ve 24 saat süre 10 μ M SB216763 ile inkübasyon öncesi ve sonrası HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 21'de gösterildi. HAUSP protein düzeyinde kontrole göre 1. saatten itibaren bir azalma gözlemlenirken 8. ve 24. saat inkübasyonlarında HAUSP proteini gözlemlenmedi. PC3 hücrelerinde UHRF1'de kontrole karşın 1.saatten itibaren bir azalma gözlemlendi. SB216763, PC3 prostat hücrelerinde zaman ve doz bağımlı olarak HAUSP ve UHRF1 protein ifade miktarını azaltmaktadır.



Şekil 21. PC3 hücrelerinin süre-bağımlı 10 μ M SB216763 ile inkübasyonu sonrasında HAUSP ve UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Sıra 1; kontrol, 2; 1 saat, 3; 4 saat, 4; 8 saat ve 5; 24 saat 10 μ M SB216763 ile inkübasyon.

4.4. Metilasyon Profillerinin Belirlenmesi

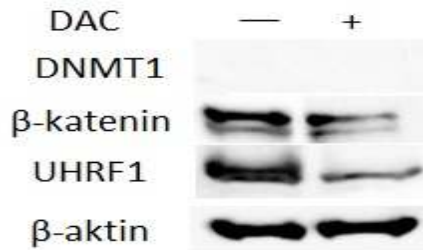
İlaç ile muamele edilmeyen Caki-2 hücrelerinden elde edilen DNA örnekleri önce bisülfid modifikasyonuna maruz bırakıldıktan sonra MSP sonuçlarına göre *WIF-1* genin promotör bölgesinin metile olduğu gözlemlendi. 10µM 72 saat DAC uygulaması sonrasında ise *WIF-1* geninin metilasyon profili unmetile olarak belirlendi (Şekil 22).



Şekil 22. Caki-2 hücrelerinde DAC inkübasyonu öncesi ve sonrası *WIF1* genine ait metilasyon profilleri.

4.5. DAC Uygulaması Sonrasında DNMT1, β -katenin ve UHRF1 Protein Düzeyi

Caki-2 hücrelerinin 10µM 72 saat DAC ile inkübasyon öncesi ve sonrası DNMT1, β -katenin, UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 23'de gösterildi. DAC uygulaması sonrasında β -katenin ve UHRF1 protein düzeylerinde azalma belirlendi. DAC muamelesi öncesi ve sonrasında DNMT1 proteini bulunamadı



Şekil 23. 10µM 72 saat DAC ile inkübasyonu sonrasında DNMT1, β -katenin, UHRF1 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

5. TARTIŞMA

Çok hücreli organizmalar, benzer genetik bilgiye sahip olmasına rağmen morfolojik ve fonksiyonel farklılığa sahip çok çeşitli özelleşmiş hücre çeşiti içermektedir. Gelişim süresince, farklı gen setleri aktive veya baskılanmak suretiyle özgün fonksiyona sahip farklı hücre soyları meydana gelmektedir. Hücre tipine özgü gen ifadenme örüntüleri, transkripsiyon faktörleri ve epigenetik düzenleyicilerin oluşturduğu kompleks aracılığıyla oluşturulmakta ve sürdürülmektedir. Özellikle DNA ve histon modifikasyonları, kromatin oluşumunu, yapısını ve dinamiğini kontrol etmek suretiyle gen ifadenmesinin düzenlenmesini kontrol eder^{1,5,18}.

DNA metilasyonu, ilk tanımlanan epigenetik modifikasyon olup, sitozinin 5. pozisyonundaki karbonuna metil grubunun eklenmesiyle meydana gelen bu post-replikatif olay DNMT'ler tarafından katalizlenmektedir. Bütün Dnmt'ler benzer korunmuş motifler içerirler ve kompleks moleküler mekanizmalar aracılığıyla metil grubu transfer ederler. Bu mekanizmaların temelinde DNMT'ler DNA'ya bağlanır ve S-adenozil metiyonini metil kaynağı olarak kullanarak sitozinin 5. pozisyonundaki karbonuna metil grubu eklerler¹⁸.

Özellikle tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde yer alan CpG adacıklarının hipermetilasyonu bugün çok çeşitli tümörlerde epigenetik değişiklikler olarak karakterize edilmiş olup ve transkripsiyonel gen baskılanmasına yol açmaktadır^{83,84}. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu gibi epigenetik mekanizmalar birbiri ile sıkı bağlantılı olup DNA MTaz'lar, metil-CpG bağlanma domain proteinleri, histon asetilaz/deasetilazlar, histon metiltransferaz/demetilazlar ve polikomb proteinler gibi çok çeşitli proteinler önemli rol oynamaktadır^{83,85}. Bu

epigenetik mekanizmada rol oynayan proteinlerin mRNA ve/veya protein düzeyindeki değişimleri özellikle de DNMT'lerin ifadenme düzeyindeki değişimler DNA metilasyonun artması veya azalması yoluyla kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır⁸³.

DNMT1, hücrelerde DNA metilasyonunun devamlılığından sorumlu DNA MTaz enzimidir. Bu nedenle, normal DNA metilasyon düzeyinin ve örüntüsünün korunması için *Dnmt1* ifadenmesinin kontrolü oldukça önemlidir. *Dnmt1*'in düşük ifadenmesi global hipometilasyona, tümör oluşumuna ve hücre ölümüne yol açmaktadır⁸⁶⁻⁸⁸. Buna karşın, *Dnmt1*'in aşırı ifadenmesi hipermetilasyona ve genomik kararsızlığa yol açmaktadır⁸⁹. Son zamanlarda DNMT1'in S fazında arttığı, S fazı ortalarında ve geç S fazında azaldığı belirlenmiştir⁹⁰. Ayrıca, hücre döngüsü süresince DNMT1 miktarı, posttranslasyonel modifikasyonlar aracılığıyla düzenlenmektedir³².

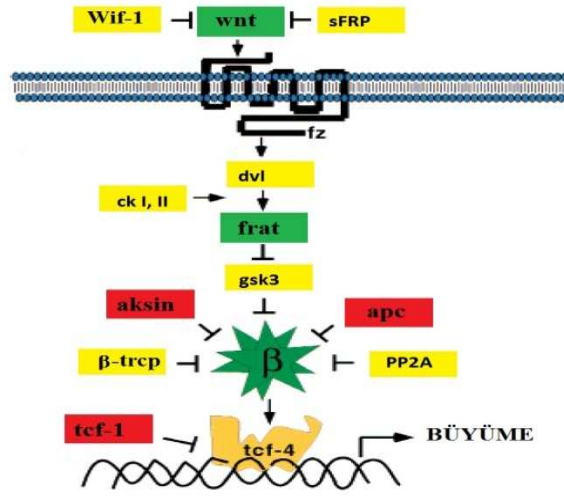
Günümüzün popüler fenomenlerinden biri hücre ve gen özgü olarak epigenetik regülasyon nasıl meydana geldiğidir. Bugün *Dnmt1* geninin ifadenmesinin nasıl meydana geldiği tam olarak aydınlatılamamıştır. Bazı araştırmacılar doğrudan olarak DNMT1 transkripsiyonel düzeyde bazıları ise posttranslasyonel düzeyde nasıl düzenlendiğine odaklanmışlardır⁴³. Transkripsiyonel olarak DNMT1'in ifadenme düzeyinin kontrolüne yönelik çalışmalarda PI3/PKB ve Wnt/ β -katenin sinyal yolları dikkati çekmektedir^{43,91}.

Wnt sinyal yolağı, embriyonik örüntüleniş olaylarının büyük bir kısmında ve yetişkin dokuların homeostazi olaylarının sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Bu yolağın patolojik rolü, Wnt sinyal yolağındaki mutasyonlar nedeniyle sürekli aktivasyonunun spesifik insan kanserlerinin gelişiminde rol oynadığını gösteren çalışmalarla gösterilmiştir. Bu yolağın

sürekli aktivasyonu solid tümörlerin genel özelliği olup çeşitli kanserlerde tümör oluşu, gelişimi ve metastazına yol açtığı bilinmektedir⁹².

Kolorektal⁹³, hepatoselüler karsinoma⁹⁴, mide⁹⁵, prostat⁹⁶ ve mesane³⁸ gibi birçok kanserde bu yolağın sıklıkla değişime uğradığı gösterilmiştir. Wnt ligandının reseptörü Frizzled ve ko-reseptörü LRP6/5'e bağlanmasıyla başlayan ve β -kateninin nükleusa geçmesi ve burada TCF-1 ile kompleks oluşturmak suretiyle DNA üzerinde yer alan WRE (Wnt response element)'lere bağlanarak hedef genlerin aktivasyonu ile kanonikal Wnt sinyal yolağı son bulmaktadır. Bu olaylar sırasında bir çok tümör baskılayıcı ve onkogen fonksiyon görmektedir⁴⁰ (Şekil 24). Bu yolakta görev alan her bir tümör baskılayıcı ve onkogenin yolağın aktivasyonu ve baskılanmasındaki fonksiyonları araştırmacılar tarafından çok büyük bir ilgi odağı oluşturmaktadır.

Epigenetik mekanizmaların β -katenin yolağının aktivasyonunda rol oynayan mekanizmalardan biri olduğu ifade edilmektedir. β -katenin yolağının hedef genlerinden biri olarak DNMT1 gösterilmesine karşın β -katenin yolağının hedef genlerinden biri olduğu henüz tam olarak belirlenememiştir. Bu nedenle çalışmamızda β -katenin aktivasyonu GSK3 β ÖZGÜ inhibitörü SB216763 ve inaktivasyonu DNA metiltransferaz inhibitörü DAC aracılığıyla sağlandıktan sonra DNMT1 ve Dnmt1 kararlılığından sorumlu UHRF1 ve HAUSP enzimlerinin ifadelenmelerindeki değişimleri mRNA ve protein düzeyinde incelendi.



Şekil 24. Wnt sinyal yolağında yer alan tümör baskılayıcı ve onkogenler. Kırmızı ile gösterilenler tümör baskılayıcı; yeşil ile gösterilenler onkogenler⁴⁰.

GSK3 β , β -katenin, c-Jun gibi pro-onkogenik molekülleri fosforile etmek suretiyle bu moleküllerin proteozom aracılı parçalanmasına yol açtığından dolayı tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmasına karşın son zamanlarda yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve sağkalımını pozitif olarak düzenlediği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda prostat, renal, mesane, tiroid, kolan kanserlerinde GSK3'ün inhibisyonunun kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir⁹⁸. Ayrıca, GSK3 β 'ın kanser kemoterapisinde ilaç duyarlılığına veya direncine yol açtığı ifade edilmektedir⁹⁹.

Wnt sinyalinin yokluğunda β -katenin, APC/Axin/GSK-3 β kompleksi ile etkileşime girer. Bu komplekste yer alan GSK-3 β tarafından fosforillenen β -katenin proteozom kompleksinin bir üyesi olan β -TrCP'ye bağlanarak proteozom aracılı parçalanma için hedef haline gelir. Sonuç olarak, serbest β -katenin çekirdeğe gidemez ve LEF/Tcf ile transkripsiyon kompleksi oluşturamaz böylece β -katenin aracılı gen ifadenmesi baskılanmış olur. Wnt'nin kendi reseptörü olan Fz reseptörüne ve ko-

reseptör LRP5/6'a bağlanması Dvl'nin aktivasyonuna yol açar. Dvl ise APC/Axin/GSK-3 β -aracılı β -katenin parçalanmasını baskılar. Kararlı formdaki β -katenin çekirdekte LEF/Tcf ile transkripsiyon kompleksi oluşturarak c-MYC, Siklin D1 gibi hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açar⁹⁹. GSK3 β spesifik ATP competitive inhibitörü SB216763 etkin bir şekilde β -katenin aracılı transkripsiyonu aktive eder¹⁰⁰. SB216763'ün Kaspaz3, Kaspaz9 aktivasyonu engellemek ve Bcl-2/Bax oranını artışına yol açmak suretiyle hücre ölümünü inhibe ettiği gösterilmiştir^{101,102}. GSK3 β 'ın nükleer birikimi, mesane kanserinin prognostik bir belirteci olarak tanımlanmakta ve ürotelial kanser hücre proliferasyonuna neden olduğu ileri sürülmektedir⁹⁸. Mesane kanser hücre hatları UMUC3 ve UMCU4'de SB216763'ün hücre yaşamını doz ve zaman bağımlı olarak azalttığı ve p21 mRNA ve protein düzeyini arttırdığı belirtilmiştir¹⁰³. Biz bu çalışmamızda T24 hücrelerine düşük konsantrasyonda (1 μ M) hücre proliferasyonunun arttığını yüksek konsantrasyonda (24 saat için 30 μ M; 48 ve 72 saat için 10 μ M) ise hücre proliferasyonunun azaldığını belirledik.

Bilim ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ACHN, KRC/Y, Caki1, Caki-2, A704, A498 ve KH39 renal hücre karsinoma hücre hatlarında GSK3 β 'ın yüksek düzeyde ifadelendiği belirlenmiş ve ACHN hücrelerinin SB216763 ile inkübasyonu sonrasında ACHN hücrelerinde zaman ve doz bağımlı olarak hücre canlılığının azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda GSK3 β 'ın nükleer birikimin renal hücre karsinomalarının yeni biyobelirteci ve GSK3 β 'nın inhibisyonunun renal hücre karsinomasının tedavisi için yeni umut edici bir yaklaşım olabileceği ifade edilmiştir¹⁰⁴. Bu çalışmamızda Caki-2 hücrelerine düşük konsantrasyonda (1 μ M) hücre proliferasyonunun arttığını yüksek konsantrasyonda (24 saat için 30 μ M; 48 ve 72 saat için 10 μ M) ise hücre proliferasyonunun azaldığını belirledik.

Birçok kanserde olduğu gibi prostat kanserinde de artmış GSK3 ifadenmesi görülmektedir. GSK3 inhibitörleri prostat kanser hücre büyümesini baskılamaktadır¹⁰⁵. Rinnab ve arkadaşlarının çalışmasında, GSK3 inhibitörü olan SB216763'ün androjen pozitif 22Rv1 ve LNCaP prostat hücrelerinde androjen reseptör (AR) mRNA ve protein düzeyinin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, SB216763 inkübasyonu sonrasında β -katenin düzeyinin AR “+” ve “-” hücrelerde arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, AR+ hücreler 22Rv1 ve LNCaP hücrelerinin 10 μ M SB216763 inkübasyonu sonrasında prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı buna karşın aynı koşullar altında AR- PC3 hücrelerinde hücre proliferasyonunun etkilenmediği belirtilmiştir¹⁰⁶. Bu çalışmamızda PC3 hücrelerinde, Caki ve T24 hücrelerinde olduğu gibi düşük konsantrasyonda (1 μ M) hücre proliferasyonunun arttığını yüksek konsantrasyonda (24 saat için 30 μ M; 48 ve 72 saat için 10 μ M) ise hücre proliferasyonunun azaldığını belirledik. LNCaP hücrelerinde ise Rinnab¹⁰⁶ ve Mazor¹⁰⁷ ile uyumlu olarak 10 μ M SB216763 inkübasyonu sonrasında hücre proliferasyonunun azaldığını belirledik.

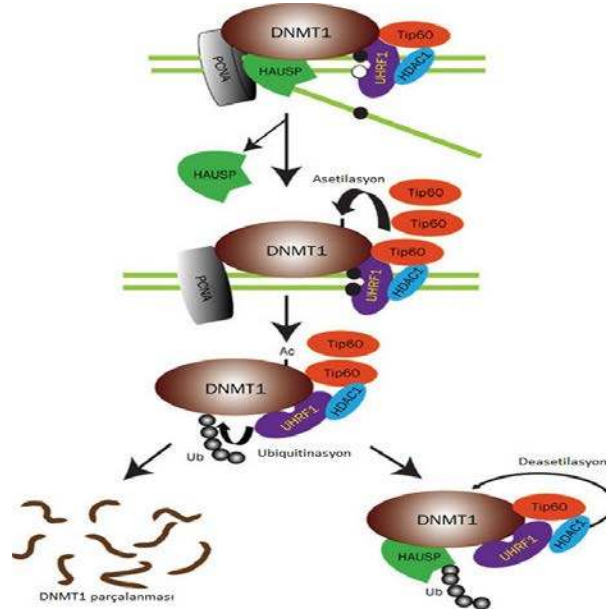
SB216763 inhübasyonu sonrasında pGSK3 β (Ser9) ve β -katenin düzeyi artmaktadır¹⁰⁸. Çalışmamızda T24, Caki ve PC3 hücrelerinde proliferasyonun arttığı doz olan 1 μ M SB216763 inkübasyonu sonrasında β -katenin mRNA düzeyinin arttığını belirledik. Bu çalışmamızın başlıca hedefi β -katenin sinyal yolağının DNMT1 ifadenmesi üzerine etkisi olup olmadığının araştırılmasıdır. Bu amaçla β -katenin mRNA'sın artmış olduğu 1 μ M SB216763 konsantrasyonunda T24 hücrelerinde 4.saatte pGSK3 β (Ser9) düzeyinde bir artma belirlenmiş olup aynı süre ve dozda β -katenin düzeyinde artma olmasına karşın olarak DNMT1 proteini saptanmadı. Ayrıca, literatürde T24 hücrelerinde DNMT1 proteini ifadenmesine karşın kontrol olarak kullandığımız GSK3 inhibitörü ile muame edilmemiş protein lizatlarında da DNMT1 proteini tespit edilememiştir^{44,109}. Bu durum T24 hücrelerinin pasaj ve labataruvar

koşullarından kaynaklanıyor olabilir. Buna karşın Caki-2 ve PC3 hücrelerinde ise pGSK3 β (Ser9) düzeyinde SB216763 inkübasyonunu takiben artma olduğunu ve buna bağlı olarak β -katenin düzeyinde bir artış gözlemledik. Bununla beraber β -katenin düzeyini artmasına paralel olarak DNMT1 protein düzeyinde de bir artış olduğu belirlendi. Ayrıca hücre proliferasyonunun azaldığı 10 μ M SB216763 inkübasyonunda da aynı sonuçlar gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarımız Campbell ve arkadaşlarının HT-29 hücreleriyle yaptığı çalışma ile uyum sağlamasına karşın Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyum göstermemektedir^{43,91}. Sun ve arkadaşları, 10 μ M SB216763 ile Hela hücrelerini inkübe etmişler ve β -katenin aktivasyonu olmadan önce DNMT1 protein düzeyinin arttığını göstermişler ve sonuç olarak PKB aracılığıyla GSK3 β 'nin Dnmt1 protein stabilizasyonuna aracılık ettiğini ifade etmişlerdir⁴³.

Çalışmamızda T24 hücrelerinde DNMT1 protein düzeyi literatürden farklı olarak tespit edilememiştir. Ancak kendi yapmış olduğumuz önceki çalışmada ve literatürden biliyoruz ki T24 hücrelerinde bazı tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgeleri hipermetiledir. Ting ve arkadaşlarında çalışmalarında DNMT1'in yokluğunda hücrelerde büyüme defektleri olmadığı ve promotör hipermetilasyonun devam ettiği gözlemlenmiştir¹⁰⁹. Bu durum Rhee ve arkadaşların çalışması ile uyum göstermektedir¹¹⁰. Çalışmalarında Dnmt3b'nin *de novo* metiltransferaz olmasına karşın Dnmt1 ile örtüşen fonksiyona sahip olduğu için Dnmt1 knockout HCT116 hücrelerinde promotör hipermetilasyonu sürdürdüğü ifade edilmiştir.

Birçok insan kanserinde artmış DNMT1 gözlemlenmekte ve genetik knockout veya RNAi-aracılı knockdown çalışmalarıyla DNMT1'in tümörögenezdeki rolü gösterilmiştir¹¹¹. Artmış DNMT1 protein düzeyine mRNA'sındaki artıştan çok DNMT1'in artmış kararlılığa neden olmaktadır. DNMT1-ilişkili proteinler DNMT1 kararlılığında önemli rol oynuyor

olabilir¹¹². Du ve arkadaşları, bazı DNMT1-ilişkili proteinlerin, DNMT1'i ubiquitine veya deubiquitine ve asetile veya deasetile ettiğini ifade etmişlerdir³⁰. Bu modifikasyonlar DNMT1 kararlılığında birlikte önemli rol oynamaktadır (Şekil 25).



Şekil 25. DNMT1'in kararlılığının posttranslasyonel düzenlenme modeli¹¹³.

Deubiquitinaz olarak tanımlanan HAUSP, DNMT1-ilişkili proteinlerden biridir. HAUSP'nin knockout veya knockdown'ını DNMT1'in ubiquitinasyonunun artışına neden olmaktadır ve HAUSP'nin rekombinant olarak hücrelere verildiğinde DNMT1'in deubiquitinasyonuna yol açtığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte E3 ligaz olan bir diğer DNMT1-ilişkili protein ise UHRF1'in aşırı ifadelenmesi DNMT1'in ubiquitinasyonuna ve bunun neticesinde DNMT1 miktarının azalmasına yol açmaktadır³⁰. Sonuç olarak DNMT1'in kararlılığında HAUSP ve UHRF1 önemli rol oynamaktadır. Ayrıca UHRF1, SRA domaini aracılığıyla yarı metile DNA'ya bağlanarak DNMT1 enziminin yarı metile DNA bölgesinde toplanmasına neden olur. Bu sayede, hücre bölünmesi süresince DNA metilasyon örüntüsünün devamlılığı sağlanmış olur^{114,115}. UHRF1 proteini sadece DNA metilasyonunda değil, histon asetilasyonu, hücre

proliferasyonu ve apoptozis olaylarında önemli rol oynamaktadır¹¹⁴. UHRF1 proteinin, meme, akciğer, kolorektal, prostat ve mesane kanserlerinde aşırı derecede ifadelendiği gösterilmiştir¹¹⁶⁻¹²¹. Tümör hücrelerinde, UHRF1 proteini *Rb*, *hMHL* ve *p21* gibi tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonunu baskılayarak hücre büyümesi ve metastaza yol açmaktadır¹²². Deubiquitinaz HAUSP yalnızca DNMT1'in deubiquitinasyondan korumaz aynı zamanda UHRF1'in SCF ^{β -TrCP} aracılı ubiquitinasyonundan da korumaktadır^{123,124}. Çalışmamızda kullandığımız T24, Caki-2 ve literatürle uyumlu olarak PC3 hücrelerinde UHRF1 ve HAUSP proteinleri ifade edilmektedir¹¹⁹. Literatürde UHRF1'un deregülasyonu mesana, böbrek ve prostat kanserleri için diagnostik ve prognostik bir moleküler belirteç olabileceği vurgulanmaktadır^{119,120}. Sancez-Tillo ve arkadaşlarının beyin korteksi hücre lenfomalarında yaptıkları çalışmada ZEB1'in β -katenin sinyal yolağının hedef genlerinden biri olduğu ve ZEB1 aktivasyonu sonrasında ise aktive olan proliferasyon ilişkili genler arasında UHRF1'de yer almaktadır¹²⁵. Bu bilgiler ışığında denilebilir ki, β -katenin sinyal yolağı dolaylı olarak UHRF1'in ifadenmesinden sorumludur. Çalışmamızda 1 μ M SB216763 ile inkübe edilen T24 hücrelerinde HAUSP protein düzeyinde kontrole göre bir artış saptanmamıştır. Ancak UHRF1 protein düzeyinde kontrole göre yalnızca 4.saatte bir artış belirlenmiştir. Bu zaman aralığında ayrıca β -katenin düzeyinde artış belirlenmiştir. Caki-2 hücrelerinde ise 1 μ M SB216763 inkübasyonunda HAUSP düzeyinde kontrole göre bir artış gözlemlenmiş olup bu artış 10 μ M SB216763 kombinasyonuna göre daha yüksektir. Ayrıca kontrole göre UHRF1 protein düzeyinde de artış belirlenmiştir. Çalışmamızda HAUSP ve UHRF1'in artış gösterdiği zaman aralıklarında hem β -katenin hem de DNMT1 enzimin artış gösterdiği belirlenmiştir. Literatürle uyumlu olarak Caki-2 hücrelerinde β -katenin düzeyinin artışı ile birlikte DNMT1, HAUSP ve UHRF1 genlerinde artış olduğu gözlemlenmektedir^{91,120}. PC3 hücrelerinde ise 1 μ M ve 10 μ M SB216763 inkübasyonu sonrasında HAUSP protein düzeyinde değişim

gözlemlenmesine karşın β -katenin proteinin azalış gösterdikten sonra UHRF1 protein düzeyinde kontrole göre bir artış belirlenmiştir. Bu durum, β -katenin aktivasyonun sağlamak için kullandığımız GSK3 β inhibitöründen kaynaklanıyor olabilir. Bilindiği gibi GSK3 β , çoklu fonksiyona sahip bir proteindir. Bu nedenle UHRF1 ve β -katenin arasındaki ilişkinin ortaya konması için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu artmanın nedeni PC3 hücrelerinin p53 null olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü UHRF1'in negatif düzenleyicilerinden biri p53 tümör baskılayıcı gen olup p53'ün genetik ve/veya epigenetik anomalileri UHRF1'in aşırı ifadenmesine neden olmaktadır¹¹⁴.

Son yıllarda dikkati çeken bir diğer epigenetik mekanizma miRNA (mikroRNA)'lardır. Mikro RNA'lar (miRNA/miR), transkripsiyonel düzeyde gen ifade edilmesini düzenleyen, yaklaşık 22 nükleotit (nt) uzunluğunda, endojen kaynaklı, protein kodlamayan RNA ailesinin bir üyesidir. miRNA'lar gelişim, farklılaşma, hücre proliferasyonu, hematopoezis, anjiyogenezis ve apoptozisinde yer aldığı önemli birçok biyolojik işleve sahiptir. Biyoinformatik verilerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda, miRNA'ların protein kodlayan tüm genlerin üçte birinin ifade edilmesini kontrol ettiği öngörülmektedir. Tek bir miRNA, genomda birden fazla hedefe müdahale edebilir. Örneğin, miR-15a/16-1 gen demetleri, doğrudan veya dolaylı bir biçimde, insan genomunun yaklaşık olarak %14'ünün ifadenmesini kontrol edebilir¹²⁶. Son zamanlarda çeşitli kanser tiplerinde doğrudan veya dolaylı olarak *DNMT1*'i hedefleyen miRNA'lar tanımlanmıştır. Örneğin, miRNA-21 ve miRNA-148, lupus CD4⁺ T hücrelerinde hem doğrudan hem de dolaylı olarak *DNMT1*'i hedeflemek suretiyle global hipometilasyona yol açarlar¹²⁷. Bununla birlikte miRNA-21, β -katenin transkripsiyonel aktivitesini azaltmaktadır¹²⁸. DNMT1 ve β -katenin düzeylerindeki artış GSK3 β aracılı olarak miRNA-21 düzeyinin azalması sonucunda meydana geliyor olabilir.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının antagonistlerinden bir olan WIF-1 antagonisti, mesane, renal ve prostat kanserlerinde sıklıkla hipermetilasyon aracılığıyla baskılanmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız T24, Caki-2 ve PC3 hücre hatlarında *WIF-1* geninin hipermetile olduğu bilinmektedir³⁸. Çalışmamızda DNA metiltransferaz inhibitörü DAC uygulaması sonrasında T24, Caki-2 ve PC3 hücrelerinde *wif* mRNA düzeyince artma gözlemlenmiştir. Caki-2 hücrelerinde aynı miktar ve süre DAC uygulaması sonrasında *WIF-1* geninin promotör bölgesindeki metilasyonun kalktığı belirlendi. Aynı süre ve dozda Caki-2 hücrelerinde DAC ile muamele edilen ve edilmeyen örneklerde DNMT1 proteini tespit edilemezken kontrole göre β -katenin ve UHRF1 düzeyinde azalma belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz bulgular ürogenital kanserlerde β -katenin sinyal yolağının DNA metilasyonundan sorumlu olan DNMT1'in transkripsiyonel düzeyde ifadenmesinden ve DNMT1 kararlılığından sorumlu olan E3 ligaz UHRF1'in da ifadenmesinden sorumlu olabileceğini göstermektedir. Ayrıca DNMT1 kararlılığından önemli olan bir β -katenin düzeyinin artmasına sonucunda HAUSP ve UHRF1'in protein düzeyinin kanser spesifik olarak değiştiği gösterilmiştir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda mesane kanser hücresi T24, renal hücre karsinoma hücresi Caki-2, prostat kanser hücreleri LNCaP ve PC3 hücrelerinde DNA metilasyonunun devam ettirilmesinden sorumlu olan DNMT1 ifadenmesinde ve DNMT1'in proteozom aracılı parçalanmasından sorumlu olan ubiquitine edici enzim UHRF1 ve deubiquitine edici enzim HAUSP'nin ifadenmesinde β -katenin sinyal yolağının rolü araştırılmıştır.

Çalışmamızda GSK3 özgü inhibitör SB216763,T24, Caki-2, LNCaP ve PC3 hücrelerinin zaman ve doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu arttırdığı veya azalttığı belirlendi. Hücre proliferasyonunun arttırdığı 1 μ M konsantrasyonda SB216763 uygulaması sonrasında T24, Caki-2 ve PC3 hücrelerinde β -katenin düzeyinin zamana bağlı olarak arttığı belirlendi ($p<0,05$).

T24 hücrelerinin kontrol ve SB216763 ile muamele edilen örneklerinde pGSK3 β (Ser9) ve β -katenin protein düzeylerinin artışına rağmen DNMT1 proteini tespit edilememiştir. Aynı şartlar altında HAUSP protein düzeyinde kontrole göre GSK3 inhibitörü ile muamele edilen örneklerde bir artış belirlenememesine karşın UHRF1'de kontrole göre bir artış belirlendi.

Caki-2 hücrelerinin kontrol ve SB216763 ile muamele edilen örneklerinde pGSK3 β (Ser9) ve β -katenin protein düzeylerinin artışına paralel olarak DNMT1 proteinin artış gösterdiği belirlendi. Aynı şartlar altında HAUSP ve UHRF1 protein düzeylerinde kontrole göre GSK3 inhibitörü ile muamele edilen örneklerde bir artış gözlemlendi.

PC3 hücrelerinin kontrol ve SB216763 ile muamele edilen örneklerinde pGSK3 β (Ser9) ve β -katenin protein düzeylerinin artışına paralel olarak DNMT1 proteinin artış gösterdiği belirlendi. Aynı şartlar altında HAUSP protein düzeyinde kontrole göre GSK3 inhibitörü ile muamele edilen örneklerde bir artış belirlenememesine karşın UHRF1'de kontrole göre azalış gözlemlenirken yalnızca 24.saatte bir artış belirlendi.

Son olarak, Caki-2 hücrelerinde DNA metiltransferaz inhibitörü DAC uygulanması sonrasında β -katenin sinyal yolağının antagonistlerinden biri olan Wif-1 genin T24, Caki-2 ve PC3 hücrelerinde ifadenmesinin arttığı belirlendi. Bununla birlikte, pGSK3 β (Ser9), β -katenin ve UHRF1 düzeylerinde azalma gözlemlendi.

Elde ettiğimiz bulgulara göre β -katenin sinyal yolağının hedef genleri arasında DNA metilasyonunun sürdürülmesinden sorumlu olan DNMT1 ve bu enzimin proteozom aracılı parçalanmasında rol oynayan UHRF1 ve HAUSP enzimlerinin yer alabileceğini gösterilmiştir. Sonuç olarak, mesane, böbrek ve prostat kanserlerinde sıklıkla artmış ifadenmesi gözlemlenen DNMT1 enziminin ve kararlılığından sorumlu tutulan proteinlerin transkripsiyonel düzeyde ifadenmesinden sorumlu olan sinyal yolaklarının belirlenmesi yalnız bu kanserlerde değil çok çeşitli kanserlerin tedavi yöntemlerine de ışık tutabileceği düşüncesindeyiz.

7. ÖZET

DNMT1 Enziminin Ürogenital Kansерlerde İfadeleme Düzeyi

DNA metilasyonunun en önemli epigenetik mekanizmalardan biri olduğu düşünülmekte ve DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından katalizlenmektedir. Artmış DNMT1 ürogenital sistem tümörlerinde sıklıkla görülmektedir ancak bu artışın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda ürogenital kansерlerinde transkripsiyonel ve protein düzeyde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının DNMT1 aşırı ifadenmesi üzerine etkisi ve DNMT1 stabilitesinden sorumlu olan UHRF1 ve HAUSP enzimlerin değişen ifade düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. SB216763'in sitotoksitesi, mesane, renal hücre karsinoma ve prostat kanser hücrelerinde zamana ve doza bağımlı olarak Wnt1 aracılığıyla, CCND1 (β -katenin) ve WIF-1 hedef genlerin ifadenme değişimleri real-time PCR ve β -katenin, DNMT1, pGSK3 β (Ser9), HAUSP ve UHRF1 protein düzeyleri western blot kullanılarak belirlendi. Bulgularımıza göre, SB216763 düşük dozlarda T24, Caki-2, PC3 hücrelerinde hücre proliferasyonunu arttırırken yüksek dozlarda ise hücre proliferasyonunun inhibisyonuna neden olmaktadır. Her iki durumda da CCND1 mRNA(p<0,001) ve protein düzeyinin arttığı belirlendi. Aynı şartlar altında β -katenin düzeyinde artışına paralel olarak DNMT1 protein düzeyinde artma belirlendi. Ayrıca HAUSP ve UHRF1 ise kanser özgü olarak protein düzeylerinde artma veya azalma gözlemlendi. Bizim sonuçlarımız, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının moleküler etkilerinin DNMT1 üzerine etkilerinin tam olarak belirlenmesine kanserlerinin tedavisi için yeni moleküler hedeflerin tanımlanmasına katkı sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler: DNMT1, HAUSP, UHRF1, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı

8.SUMMARY

DNMT1 Expression Level In Urogenital Cancers

DNA methylation is considered as one of the most important epigenetic mechanisms and is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMT). DNMT1 abundance has been seen frequently in urogenital system tumors but the reasons for these increased are not well understood. We aimed to determinate effect of Wnt/ β -catenin signaling pathway on overexpression of DNMT1 and aberrant expression of UHRF1 and HAUSP responsible for stability of DNMT1 at transcriptional and protein levels in urogenital cancers. Cytotoxic effect of SB216763 in bladder cancer, renal cell carcinoma and prostate cancer cells was detected time and dose dependent manner with WST1, expression aberration of target genes CCND1(β -catenin) and WIF-1 by using real-time PCR and protein levels of β -catenin, DNMT1, pGSK3 β (Ser9), HAUSP and UHRF1 by using western blot. Our results indicated that SB216763 caused an increased cell proliferation at low dose in the meantime high dose caused a decreased cell proliferation in cells. In both cases, SB216273 was increased CCND1 mRNA, pGSK3 β (Ser9) and β -catenin, DNMT1 at protein level. Also, HAUSP and UHRF1 up or down-regulated at the same doses ($p < 0,01$) depending on the types of cancer. Also, we showed that β -catenin and UHRF1 were decreased after reexpression of WIF-1 following treatment with DAC. Our findings may offer a new approach determination of molecular effect of Wnt/ β -catenin signal pathway on DNMT1 would allow us to identify new molecular targets for treatment of the cancer.

Keywords: DNMT1, HAUSP, UHRF1, WNT/ β -catenin signaling pathway

9. KAYNAKLAR

1. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 286-98.
2. Zhang Z, Joh K, Yatsuki H, Zhao W, Soejima H, Higashimoto K, et al. Retinoic acid receptor beta2 is epigenetically silenced either by DNA methylation or repressive histone modifications at the promoter in cervical cancer cells. *Cancer Lett* 2007; 247: 318-27.
3. Turek-Plewa J, Jagodziński PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10: 631-47.
4. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2571-87.
5. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005 2:4-11.
6. Gold M, Hurwitz J. The Enzymatic Methylation Of Ribonucleic Acid And Deoxyribonucleic Acid. VI. Further Studies On The Properties Of The Deoxyribonucleic Acid Methylation Reaction. *J Biol Chem* 1964; 239: 3866-74.
7. Gruenbaum Y, Cedar H, Razin A. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* 1982; 295: 620-2.
8. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089-93.

9. Carlson LL, Page AW, Bestor TH. Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes Dev* 1992; 6: 2536-41.
10. Tamaru H, Selker EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 2001; 414: 277-83.
11. Tariq M, Saze H, Probst AV, Lichota J, Habu Y, Paszkowski J. Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8823-7.
12. Gilbert DM. Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 377-83.
13. Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell* 2001; 104: 829-38.
14. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog *Dnmt2*. *Science* 2006; 311: 395-8.
15. Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, Ariyoshi M, Shirakawa M. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep* 2009; 10: 1235-41.
16. Xie ZH, Huang YN, Chen ZX, Riggs AD, Ding JP, Gowher H, et al. Mutations in DNA methyltransferase DNMT3B in ICF syndrome affect its regulation by DNMT3L. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1375-85.

17. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999; 274: 33002-10.
18. Qin W, Leonhardt H, Pichler G. Regulation of DNA methyltransferase 1 by interactions and modifications. *Nucleus* 2011; 2: 392-402.
19. Georgel PT, Horowitz-Scherer RA, Adkins N, Woodcock CL, Wade PA, Hansen JC. Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 32181-8.
20. Bostick M, Kim JK, Estève PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 2007; 317: 1760-4.
21. Kiskinis E, Hallberg M, Christian M, Olofsson M, Dilworth SM, White R, et al. RIP140 directs histone and DNA methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes. *EMBO J* 2007; 26: 4831-40.
22. Zhou Y, Grummt I. The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing. *Curr Biol* 2005; 15: 1434-8.
23. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; 439: 871-4.
24. Myant K, Stancheva I. LSH cooperates with DNA methyltransferases to repress transcription. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 215-26.

25. Robertson AK, Geiman TM, Sankpal UT, Hager GL, Robertson KD. Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 110-8.
26. Lee GE, Kim JH, Taylor M, Muller MT. DNA methyltransferase 1-associated protein (DMAP1) is a co-repressor that stimulates DNA methylation globally and locally at sites of double strand break repair. *J Biol Chem* 2010; 285: 37630-40.
27. Kimura H, Nakamura T, Ogawa T, Tanaka S, Shiota K. Transcription of mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) is regulated by both E2F-Rb-HDAC-dependent and -independent pathways. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3101-13.
28. Estève PO, Chin HG, Pradhan S. Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1000-5.
29. Lin RK, Wu CY, Chang JW, Juan LJ, Hsu HS, Chen CY, et al. Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer. *Cancer Res* 2010; 70: 5807-17.
30. Du Z, Song J, Wang Y, Zhao Y, Guda K, Yang S, et al. DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci Signal* 2010; 3:ra80.
31. Goyal R, Rathert P, Laser H, Gowher H, Jeltsch A. Phosphorylation of serine-515 activates the Mammalian maintenance methyltransferase Dnmt1. *Epigenetics* 2007; 2: 155-60.

32. Estève PO, Chang Y, Samaranayake M, Upadhyay AK, Horton JR, Feehery GR, et al. A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18: 42-8.
33. Lee B, Muller MT. SUMOylation enhances DNA methyltransferase 1 activity. *Biochem J* 2009; 421: 449-61.
34. Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Tokizane T, Ogishima T, et al. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 383-91.
35. Kawamoto K, Hirata H, Kikuno N, Tanaka Y, Nakagawa M, Dahiya R. DNA methylation and histone modifications cause silencing of Wnt antagonist gene in human renal cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2008; 123: 535-42.
36. Avissar-Whiting M, Koestler DC, Houseman EA, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. Polycomb group genes are targets of aberrant DNA methylation in renal cell carcinoma. *Epigenetics* 2011; 6: 703-9.
37. Negrotto S, Hu Z, Alcazar O, Ng KP, Triozzi P, Lindner D, et al. Noncytotoxic differentiation treatment of renal cell cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 1431-41.
38. Costa VL, Henrique R, Ribeiro FR, Carvalho JR, Oliveira J, Lobo F, et al. Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in urological cancer. *Epigenetics* 2010; 5: 343-51.

39. Konac E, Varol N, Yilmaz A, Menevse S, Sozen S. DNA methyltransferase inhibitor-mediated apoptosis in the Wnt/ β -catenin signal pathway in a renal cell carcinoma cell line. *Exp Biol Med* 2013; 238: 1009-16.
40. Paul S, Dey A. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication. *Neoplasma* 2008; 55: 165-76.
41. Fu Y, Zheng S, An N, Athanasopoulos T, Popplewell L, Liang A, et al. β -catenin as a potential key target for tumor suppression. *Int J Cancer*. 2011; 129: 1541-51.
42. Wu CT, Wu CF, Lu CH, Lin CC, Chen WC, Lin PY, et al. Expression and function role of DNA methyltransferase 1 in human bladder cancer. *Cancer* 2011; 117: 5221-33.
43. Sun L, Zhao H, Xu Z, Liu Q, Liang Y, Wang L, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway stabilizes DNA methyltransferase I protein and maintains DNA methylation. *Cell Signal* 2007; 19: 2255-63.
44. Zhang S, Zeng F, Peng S, Zhu C, Li H, Wang L. Effects on biological behavior of bladder carcinoma T24 cells via silencing DNMT1 and/or DNMT3b with shRNA in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2009; 29: 215-9.
45. Dhawan D, Ramos-Vara JA, Hahn NM, Waddell J, Olbricht GR, Zheng R, et al. DNMT1: An emerging target in the treatment of invasive urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2012, Kasım, Baskıda.

46. Ahmad I, Patel R, Liu Y, Singh LB, Taketo MM, Wu XR, et al. Ras mutation cooperates with β -catenin activation to drive bladder tumorigenesis. *Cell Death Dis* 2011; 2: e124.
47. Sun J, Chen Z, Zhu T, Yu J, Ma K, Zhang H, et al. Hypermethylated SFRP1, but none of other nine genes "informative" for western countries, is valuable for bladder cancer detection in Mainland China. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1717-27.
48. Tang Y, Simoneau AR, Liao WX, Yi G, Hope C, Liu F, et al. WIF1, a Wnt pathway inhibitor, regulates SKP2 and c-myc expression leading to G1 arrest and growth inhibition of human invasive urinary bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 458-68.
49. Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, et al. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* 2010; 29: 2036-46.
50. Gravina GL, Ranieri G, Muzi P, Marampon F, Mancini A, Di Pasquale B, et al. Increased levels of DNA methyltransferases are associated with the tumorigenic capacity of prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 29: 1189-95.
51. Lin HY, Kuo YC, Weng YI, Lai IL, Huang TH, Lin SP, et al. Activation of silenced tumor suppressor genes in prostate cancer cells by a novel energy restriction-mimetic agent. *Prostate* 2012; 72: 1767-78.
52. Yaqinuddin A, Qureshi SA, Qazi R, Farooq S, Abbas F. DNMT1 silencing affects locus specific DNA methylation and increases prostate cancer derived PC3 cell invasiveness. *J Urol* 2009; 182: 756-61.

53. Kinney SR, Moser MT, Pascual M, Greally JM, Foster BA, Karpf AR. Opposing roles of Dnmt1 in early- and late-stage murine prostate cancer. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 4159-74.
54. Perry AS, O'Hurley G, Raheem OA, Brennan K, Wong S, O'Grady A, et al. Gene expression and epigenetic discovery screen reveal methylation of SFRP2 in prostate cancer. *Int J Cancer* 2013; 132: 1771-80.
55. Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 439-52.
56. Shi D, Grossman SR. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 737-47.
57. Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 596-613.
58. Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998; 92: 367-80.
59. Bronner C, Achour M, Arima Y, Chataigneau T, Saya H, Schini-Kerth VB. The UHRF family: oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future? *Pharmacol Ther* 2007; 115: 419-34.
60. Bronner C, Fuhrmann G, Chédin FL, Macaluso M, Dhe-Paganon S. UHRF1 Links the Histone code and DNA Methylation to ensure Faithful Epigenetic Memory Inheritance. *Genet Epigenet* 2010; 2009: 29-36.

61. Arima Y, Hirota T, Bronner C, Mousli M, Fujiwara T, Niwa S, et al. Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G1/S transition. *Genes Cells* 2004; 9: 131-42.
62. Achour M, Fuhrmann G, Alhosin M, Rondé P, Chataigneau T, Mousli M, et al. UHRF1 recruits the histone acetyltransferase Tip60 and controls its expression and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 523-8.
63. Khoronenkova SV, Dianova II, Parsons JL, Dianov GL. USP7/HAUSP stimulates repair of oxidative DNA lesions. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 2604-9.
64. Li M, Brooks CL, Kon N, Gu W. A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell* 2004; 13: 879-86.
65. Meulmeester E, Maurice MM, Boutell C, Teunisse AF, Ovaa H, Abraham TE, et al. Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2. *Mol Cell* 2005; 18: 565-76.
66. Song MS, Salmena L, Carracedo A, Egia A, Lo-Coco F, Teruya-Feldstein J, et al. The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature* 2008; 455: 813-7.
67. Van der Knaap JA, Kumar BR, Moshkin YM, Langenberg K, Krijgsveld J, Heck AJ, et al. GMP synthetase stimulates histone H2B deubiquitylation by the epigenetic silencer USP7. *Mol Cell* 2005; 17: 695-707.

68. Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 276-86.
69. McDonald SL, Silver AR. On target? Strategies and progress in the development of therapies for colorectal cancer targeted against WNT signalling. *Colorectal Dis* 2011; 13: 360-9.
70. Urakami S, Shiina H, Enokida H, Hirata H, Kawamoto K, Kawakami T, Kikuno N, Tanaka Y, Majid S, Nakagawa M, Igawa M, Dahiya R. Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6989-97.
71. Beroukhi R, Brunet JP, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, et al. Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 2009; 69: 4674-81.
72. Furge KA, Chen J, Koeman J, Swiatek P, Dykema K, Lucin K, et al. Detection of DNA copy number changes and oncogenic signaling abnormalities from gene expression data reveals MYC activation in high-grade papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 3171-6.
73. Chakraborty PK, Scharner B, Jurasovic J, Messner B, Bernhard D, Thévenod F. Chronic cadmium exposure induces transcriptional activation of the Wnt pathway and upregulation of epithelial-to-mesenchymal transition markers in mouse kidney. *Toxicol Lett* 2010; 198: 69-76.

74. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; 260: 1317-20.
75. Patel PH, Chadalavada RS, Chaganti RS, Motzer RJ. Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7215-20.
76. Peruzzi B, Athauda G, Bottaro DP. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic beta-catenin signaling in renal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 14531-6.
77. Berndt JD, Moon RT, Major MB. Beta-catenin gets jaded and von Hippel-Lindau is to blame. *Trends Biochem Sci* 2009; 34: 101-4.
78. Thévenod F, Chakraborty PK. The role of Wnt/beta-catenin signaling in renal carcinogenesis: lessons from cadmium toxicity studies. *Curr Mol Med* 2010; 10: 387-404.
79. Janssens N, Andries L, Janicot M, Perera T, Bakker A. Alteration of frizzled expression in renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2004; 25: 161-71.
80. Marsit CJ, McClean MD, Furniss CS, Kelsey KT. Epigenetic inactivation of the SFRP genes is associated with drinking, smoking and HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 1761-6.
81. Guo L, Zhong D, Lau S, Liu X, Dong XY, Sun X, et al. Sox7 is an independent checkpoint for beta-catenin function in prostate and colon epithelial cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1421-30.

82. Hall CL, Daignault SD, Shah RB, Pienta KJ, Keller ET. Dickkopf-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumor to metastasis. *Prostate* 2008; 68: 1396-404.
83. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-28.
84. Laird PW. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet* 2005; 14 :R65-76.
85. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007; 16: R50-9.
86. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003; 300: 489-92.
87. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003; 300: 455.
88. Yang AS, Estecio MR, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Issa JP. Comment on "Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation" and "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation". *Science* 2003; 302: 1153.
89. Biniszkievicz D, Gribnau J, Ramsahoye B, Gaudet F, Eggan K, Humpherys D, et al. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2124-35.

90. Estève PO, Chin HG, Benner J, Feehery GR, Samaranayake M, Horwitz GA, et al. Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5076-81.
91. Campbell PM, Szyf M. Human DNA methyltransferase gene DNMT1 is regulated by the APC pathway. *Carcinogenesis* 2003; 24: 17-24.
92. Majid S, Saini S, Dahiya R. Wnt signaling pathways in urological cancers: past decades and still growing. *Mol Cancer* 2012; 11: 7.
93. Yeh CT, Yao CJ, Yan JL, Chuang SE, Lee LM, Chen CM, et al. Cell Death and Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Human Colon Cancer Cells by an Active Fraction (HS7) from *Taiwanofungus camphoratus*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 750230.
94. Dahmani R, Just PA, Perret C. The Wnt/ β -catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35: 709-13.
95. Li J, Ying J, Fan Y, Wu L, Ying Y, Chan AT, et al. WNT5A antagonizes WNT/ β -catenin signaling and is frequently silenced by promoter CpG methylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 617-24.
96. Yu X, Wang Y, DeGraff DJ, Wills ML, Matusik RJ. Wnt/ β -catenin activation promotes prostate tumor progression in a mouse model. *Oncogene* 2011; 30: 1868-79.
97. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-51.

98. Naito S, Bilim V, Yuuki K, Ugolkov A, Motoyama T, Nagaoka A, et al. Glycogen synthase kinase-3 β : a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5124-32.
99. Luo J. Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 2009; 273: 194-200.
100. Kirby LA, Schott JT, Noble BL, Mendez DC, Caseley PS, Peterson SC, et al. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor, SB-216763, promotes pluripotency in mouse embryonic stem cells. *PLoS One* 2012; 7: e39329.
101. Rubio-Patiño C, Palmeri CM, Pérez-Perarnau A, Cosiàlls AM, Moncunill-Massaguer C, González-Gironès DM, et al. Glycogen synthase kinase-3 β is involved in ligand-dependent activation of transcription and cellular localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 2012; 26: 1508-20.
102. Xie N, Li H, Wei D, LeSage G, Chen L, Wang S, et al. Glycogen synthase kinase-3 and p38 MAPK are required for opioid-induced microglia apoptosis. *Neuropharmacology* 2010; 59: 444-51.
103. Yohn NL, Bingaman CN, DuMont AL, Yoo LI. Phosphatidylinositol 3'-kinase, mTOR, and glycogen synthase kinase-3 β mediated regulation of p21 in human urothelial carcinoma cells. *BMC Urol* 2011; 11: 19.
104. Bilim V, Ougolkov A, Yuuki K, Naito S, Kawazoe H, Muto A, et al. Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2009; 101: 2005-14.

105. Darrington RS, Campa VM, Walker MM, Bengoa-Vergniory N, Gorrondo-Etxebarria I, Uysal-Onganer P, et al. Distinct expression and activity of GSK-3 α and GSK-3 β in prostate cancer. *Int J Cancer* 2012; 131: E872-83.
106. Rinnab L, Schütz SV, Diesch J, Schmid E, Küfer R, Hautmann RE, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 in androgen-responsive prostate cancer cell lines: are GSK inhibitors therapeutically useful? *Neoplasia* 2008; 10: 624-34.
107. Mazor M, Kawano Y, Zhu H, Waxman J, Kypta RM. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene* 2004; 23: 7882-92.
108. Nemoto T, Kanai T, Yanagita T, Satoh S, Maruta T, Yoshikawa N, et al. Regulation of Akt mRNA and protein levels by glycogen synthase kinase-3 β in adrenal chromaffin cells: effects of LiCl and SB216763. *Eur J Pharmacol* 2008; 586: 82-9.
109. Ting AH, Jair KW, Schuebel KE, Baylin SB. Differential requirement for DNA methyltransferase 1 in maintaining human cancer cell gene promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2006; 66: 729-35.
110. Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416: 552-6.
111. Brown KD, Robertson KD. DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability. *Nat Genet* 2007; 39: 289-90.

112. Agoston AT, Argani P, Yegnasubramanian S, De Marzo AM, Ansari-Lari MA, Hicks JL, et al. Increased protein stability causes DNA methyltransferase 1 dysregulation in breast cancer. *J Biol Chem* 2005; 280: 18302-10.
113. Hong Q, Shao ZM. Ubiquitination/deubiquitination and acetylation/deacetylation: making DNMT1 stability more coordinated. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32: 139-40.
114. Alhosin M, Sharif T, Mousli M, Etienne-Selloum N, Fuhrmann G, Schini-Kerth VB, et al. Down-regulation of UHRF1, associated with re-expression of tumor suppressor genes, is a common feature of natural compounds exhibiting anti-cancer properties. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 41.
115. Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, et al. Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature* 2013;502 : 249-53.
116. Macaluso M, Montanari M, Noto PB, Gregorio V, Bronner C, Giordano A. Epigenetic modulation of estrogen receptor-alpha by pRb family proteins: a novel mechanism in breast cancer. *Cancer Res* 2007 67: 7731-7.
117. Unoki M, Daigo Y, Koinuma J, Tsuchiya E, Hamamoto R, Nakamura Y. UHRF1 is a novel diagnostic marker of lung cancer. *Br J Cancer* 2010; 103: 217-22.
118. Wang F, Yang YZ, Shi CZ, Zhang P, Moyer MP, Zhang HZ, et al. UHRF1 promotes cell growth and metastasis through repression of p16(ink⁴a) in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 2753-62.

119. Babbio F, Pistore C, Curti L, Castiglioni I, Kunderfranco P, Brino L, et al. The SRA protein UHRF1 promotes epigenetic crosstalks and is involved in prostate cancer progression. *Oncogene* 2012; 31: 4878-87.
120. Unoki M, Kelly JD, Neal DE, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R. UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 98-105.
121. Yang GL, Zhang LH, Bo JJ, Chen HG, Cao M, Liu DM, et al. UHRF1 is associated with tumor recurrence in non-muscle-invasive bladder cancer. *Med Oncol* 2012; 29: 842-7.
122. Zhou L, Zhao X, Han Y, Lu Y, Shang Y, Liu C, et al. Regulation of UHRF1 by miR-146a/b modulates gastric cancer invasion and metastasis. *FASEB J* 2013, 27 Ağustos, Baskıda.
123. Chen H, Ma H, Inuzuka H, Diao J, Lan F, Shi YG, et al. DNA damage regulates UHRF1 stability via the SCF(β -TrCP) E3 ligase. *Mol Cell Biol* 2013; 33: 1139-48.
124. Felle M, Joppien S, Németh A, Diermeier S, Thalhammer V, Dobner T, et al. The USP7/Dnmt1 complex stimulates the DNA methylation activity of Dnmt1 and regulates the stability of UHRF1. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 8355-65.
125. Sánchez-Tilló E, Fanlo L, Siles L, Montes-Moreno S, Moros A, Chiva-Blanch G, et al. The EMT activator ZEB1 promotes tumor growth and determines differential response to chemotherapy in mantle cell lymphoma. *Cell Death Differ* 2013, 6 Eylül, Baskıda.
126. Varol N., Konac E., Gurocak O. S., Sozen S. The realm of microRNAs in cancers. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 1079-89.

127. Pan W., Zhu S., Yuan M., Cui H., Wang L., Luo X., et al. MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4⁺ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 2010; 184: 6773-8.
128. Huang K, Zhang JX, Han L, You YP, Jiang T, Pu PY, et al. MicroRNA roles in beta-catenin pathway. *Mol Cancer* 2010; 9:252.

10. EKLER

Doktora tez çalışmamın her aşamasında, bilgi ve önerileri ile yardımlarını esirgemeyen, danışmanlığını aldığım süre boyunca özveri ve sevgiyle bize yaklaşan, sabırlı ve güleryüzlü hocam danışmanım Sayın Doç Dr. Ece KONAÇ' a en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden büyük fayda gördüğüm Anabilim Dalı hocalarıma çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimimde desteğini ve bilgisini her zaman hissettiğim, değerli arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Şevin GÜNEY, Dr. Arın TOMRUK, Dr. Gamze TURNA, Dr. Seda Nur AKYOL ve İlker Kılıçcioğlu'na teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmam süresince yardımlarını ve güler yüzünü hiç eksik etmeyen Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gonca AKBULUT'a çok teşekkür ederim.

Ve en önemlisi benim bugünlere gelmemde en büyük emek sahibi olan, benim için değerini kelimelerle ifade edemeyeceğim ailem; annem, babam ve kardeşlerime hayatımda oldukları için, desteklerini, fedakarlıklarını ve sonsuz sevgilerini esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ederim.

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı : Nuray
Soyadı : Varol
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 1979
Telefon : 0312 4278013
0532 6353295
E-mail : nurayv@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce, İspanyolca (Temel)

Eğitim :

2009- : **Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktorası**
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

2007 : **Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisansı**
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

2005 : **Ortaöğretim Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz YL**
Başkent Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü

2002 : **Biyoloji Bölümü, Lisans**
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi

Stajlar:

- **Kanser Epigenetik Laboratuvarı**
Epigenetik ve Kanser Biyolojisi, PEBC, IDIBELL
- **Hücresel ve Moleküler Biyofizik Laboratuvarı**
National Institutes of Health (NIH)

Üyelikler:

- European Association for Cancer Research
- Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

Aldığı Kurslar:

- Proteomiks Kurs Sertifikası, 1. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi, İstanbul, Türkiye
- Enfeksiyon Hastalıklarında Moleküler Teknikler, 1. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi, İstanbul, Türkiye
- 3. Mikroarray Eğitimi ve Data Analizi Kursu, 20-25 Aralık, ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji R&D Merkez, Ankara, Türkiye
- VII. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, 22-30 Kasım, Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye
- İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Kursu, 06-10 Mayıs, Tübitak, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye

Çalıştığı Projeler:

1. Nazal polip dokusunda inflamatuvar ve apoptotik sinyal yolağında etkili genlerin transkriptomik ve protein düzeyindeki ifadenme profilleri [Gazi Üniversitesi BAP, devam ediyor]

2. Proteazom ve Histon Deasetilaz İnhibitörlerinin Prostat Kanserli Hücre Hattındaki Apoptotik Etkileri [Gazi Üniversitesi BAP, devam ediyor]
3. Toksoplazmozis Enfeksiyonunun Şizofreni ve Bipolar bozuklukta yaygınlığı ve sitokin gen polimorfizmi [Gazi Üniversitesi BAP, devam ediyor]
4. Trombositten zengin plazma mezoterapisinin botulinum toksin tip-a ile oluşturulan çizgili kas paralizisine inhibitör etkisi [Gazi Üniversitesi BAP]
5. Konvansiyonel ve Pattern Scan lazer sistemleri ile oluşturulan lazer yanıkları sonrası fare retinasında oluşan VEGF seviyelerinin incelenmesi [Gazi Üniversitesi BAP]
6. Proteazom ve Histon Deasetilaz İnhibitörlerinin Prostat Kanserli Hücre Hattındaki Apoptotik Etkileri [Gazi Üniversitesi BAP, devam ediyor]
7. İnsan Mesane Kanseri Hücre Hattında (T24) Wnt Antagonistlerinin Epigenetik Düzenlenmelerle Apoptoz Yolağındaki Genlerin İfade Edilmesine Olan Etkileri [TUBİTAK, SBAG 1001]
8. Renal Hücre Karsinoma Hücre Hattında Wnt Sinyal Yolağı Antagonistlerinin Metilasyon Aracılığıyla Apoptoz Üzerine Etkileri [Gazi Üniversitesi BAP]
9. Prostat Hücre Hattında JAK/STAT yolağının Anjiyogenezdeki Rolü [Gazi Üniversitesi BAP]
10. İnsan lenfosit hücreleri üzerine Rhenium'un olası genotoksik etkileri: Mikronükleus ve FISH analizi ile değerlendirme [Ankara Üniversitesi BAP]
11. Akut lösemilerde *SOCS-1* geninin metilasyon analizi hastalardaki [Ankara Üniversitesi BAP]

Yayın Listesi:

SCI'de yer alan dergilerdeki yayınlanan tam metinli makaleler:

1. **Varol N**, Konac E, Gurocak OS, Sozen S. The realm of microRNAs in cancers. Mol Biol Rep 2011 Feb;38(2):1079-89.
2. Ozkal-Baydin P, Gümüş-Akay G, **Varol N**, Rüstemoğlu A, Köroğlu R, Yüksel S, Küçük O, Aras G, Ibiş E, Sunguroğlu A. Potential genotoxic effect of 186Re-HEDP on human lymphocyte cells: in-vitro evaluation with micronucleus-FISH analysis. Nucl Med Commun 2012 Apr;33(4):415-21
3. Konac E, **Varol N**, Yilmaz A, Menevse S, Sozen S. DNA methyltransferase inhibitor-mediated apoptosis in the Wnt/ β -catenin signal pathway in a renal cell carcinoma cell line. Exp Biol Med (Maywood) 2013;238(9):1009-16.
4. Gurbuz V, Konac E, **Varol N**, Yilmaz A, Gurocak S, Menevse S, Sozen S. Effects of AG490 and S3I-201 on regulation of JAK/STAT3 signaling pathway in relation to angiogenesis in TRAIL- resistant prostate cancer cells *in vitro*. Spandidos Publications 2013,Baskıda.

Yurt içi hakemli dergilerde yayınlanan tam metinli makaleler

1. Avcı A, Sunguroğlu A, Ergüder İB, Gümüş Akay G, Devrim E, Özkal Baydin P, Varol N, Durak İ. Effects of aqueous garlic extract on oxidant/antioxidant status in 32D and 32Dp210 cell lines. Turk J Med Sci 2010; 40(6): 881-888.