

ŞEYDA ÖMERUSTAOĞLU
BAYOĞLU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2020



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**FUMONİSİN B1'İN KANSER İLE İLİŞKİLİ
YOLAKLARDA ROL OYNAYAN GENLER ÜZERİNE
ETKİLERİNİN HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

ŞEYDA ÖMERUSTAOĞLU BAYOĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. SİBEL ÖZDEN**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

BEYAN

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

ŞEYDA ÖMERUSTAOĞLU BAYOĞLU



İTHAF

Aileme (henüz dünyaya gelmemiş oğlum da dahil olmak üzere) ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bana olan bitmek tükenmek bilmez sabrı ve ilgisi için hakkını, emeğini asla ödeyemeyeceğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Sibel Özden'e teşekkürü borç bilirim.

Her konuda bana yardımcı olan, güler yüzünü ve bilgisini benden esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ecem Fatma Karaman'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Farmasötik toksikoloji bölümünün saygıdeğer hocaları ve asistanlarına da ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan babam Prof. Dr. Adnan Ömerustaoğlu'na, bana karşı sonsuz sevgisi olan annem Havva Ömerustaoğlu'na, beni motive etmekte üstüne olmayan kardeşim Furkan Ömerustaoğlu'na, beni her zaman cesaretlendiren eşim Etem Bayoğlu'na ve ailemize katılmasına günler kalan, bu süreçte çok uslu durup çalışmama imkan sağlayan oğlum Oğuz Efe Bayoğlu'na teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-31564

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	2
İTHAF.....	3
TEŞEKKÜR.....	4
İÇİNDEKİLER	5
TABLolar LİSTESİ.....	8
ŞEKİLLER LİSTESİ	9
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	11
ÖZET	14
ABSTRACT.....	16
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	18
2. GENEL BİLGİLER	20
2.1. Epigenetik	20
2.1.1. DNA Metilasyonu	21
2.1.2. Histon Modifikasyonları	25
2.2. Mikotoksinler.....	28
2.3. Fumonisinler	29
2.3.1. Fumonisin B1'in Toksikokinetiği	31
2.3.2. FB1'in Toksisite Mekanizması ve Toksik Etkileri	31
2.3.3. FB1'in Karaciğer Üzerine Toksik Etkileri.....	32
2.3.4. FB1'in Böbrek Üzerine Toksik Etkileri.....	33
2.3.5. FB1'in Epigenetik Mekanizmalar ile İlişkisi	33
2.3.6. Fumonisinler ile İlgili Limitler ve Yasal Düzenlemeler	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	36
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	36
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	38
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	39
3.4.1. Hücre Dizilerinin Temini	39
3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	39
3.4.3. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması	39
3.4.4. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)	40

3.4.5. Hücrelerin Sayılması.....	40
3.5. Sitotoksikite Testleri.....	41
3.5.1. 96 Kuyucuklu Mikropalakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	41
3.5.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması.....	42
3.5.3. FB1'in Hücre Kültürüne Maruziyeti.....	43
3.5.4. MTT Testi	44
3.5.4.1. MTT Testinin Esası.....	44
3.5.4.2. MTT Testi Protokolü.....	45
3.5.5. NRU Testi	45
3.5.5.1. NRU Testinin Esası.....	45
3.5.5.2. NRU Testi Protokolü.....	46
3.5.6. Sonuçların Değerlendirilmesi	47
3.6. Hücre Çoğalması (BrdU) Testi	48
3.6.1. BrdU Testi Esası	48
3.6.2. BrdU Testi Protokolü.....	49
3.6.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	50
3.7. FB1'in Hücre Dizilerine Maruziyeti.....	50
3.7.1. FB1 Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanışı	50
3.7.2. FB1 Maruziyet Flasklarının Hazırlanışı.....	50
3.8. DNA Metilasyonunun Analizi	51
3.8.1. DNA İzolasyonu	51
3.8.2. DNA'nın Saflık ve Miktar Tayini.....	52
3.8.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini.....	53
3.8.3.1. Deneyin Esası.....	53
3.8.3.2. Deney Protokolü.....	54
3.8.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	55
3.8.4. Tümör Baskılayıcı Genlerin Metilasyon Analizi	55
3.8.4.1. Deneyin Esası.....	55
3.8.4.3. Veri Analizi ve Sonuçların Değerlendirilmesi	60
3.9. Gen Ekspresyonlarının Tayini	61
3.9.1. Total RNA İzolasyonu	61
3.9.2. RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini	62
3.9.3. cDNA Sentezi	62

3.9.4. Gen Ekspresyonlarının RT-PCR ile Tayini	64
3.9.4.1. Deney Protokolü.....	65
3.10. İstatistiksel Değerlendirme	66
4. BULGULAR.....	67
4.1. Sitotoksosite Sonuçları	67
4.2. BrdU Hücre Proliferasyonu Testi Sonuçları	68
4.3. Global DNA Metilasyonu Sonuçları.....	69
4.3.1. DNA metiltransferaz Genlerinin Ekspresyon Sonuçları.....	70
4.4. Tümör Baskılayıcı Genlerin Panel Array'ler ile Metilasyon Sonuçları.....	73
4.5. Metilasyonda Değişiklik Gözlenen Genlerin Ekspresyon Sonuçları.....	76
5. TARTIŞMA	80
KAYNAKLAR	87
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	100
ÖZGEÇMİŞ	101

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Türk Gıda Kodeksi tarafından gıdalarda belirlenen maksimum fumonisın limitleri*	35
Tablo 3-1: Global DNA metilasyonunda rol oynayan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyon analizlerinde kullanılan primer dizileri.....	64
Tablo 3-2: Metilasyon array sonuçlarına göre seçilen genlerin ekspresyon analizlerinde kullanılan primer dizileri.	64
Tablo 3-3: RT-PCR protokolü.	66
Tablo 4-1: 24 saat 3,125- 200 μ M konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri % ölüm ve standart sapma değerleri.	67
Tablo 4-2: 24 saat 0-100 μ M konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde % hücre proliferasyonu ve standart sapma değerleri.	68
Tablo 4-3: 24 saat 0-100 μ M konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde relatif %5-mC ve standart sapma değerleri.....	70
Tablo 4-4: FB1'in tümör baskılayıcı genlerin % metilasyon seviyeleri üzerine etkileri	73
Tablo 4-5: 94 tümör baskılayıcı genden FB1 maruziyeti sonrası metilasyon seviyesinde değişiklik gözlenen genler	75

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Başlıca epigenetik mekanizmalar (Yan ve ark., 2010).	21
Şekil 2-2: Memeli genomunda sitozinin metilasyonu (Herman ve Baylin, 2003).	21
Şekil 2-3: DNA metilasyonu ile genin sessizleşmesinde iki mekanizma (Güler ve Peynircioğlu, 2016; McGowen ve Szyf, 2010).....	23
Şekil 2-4: Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi (Esteller ve Herman, 2002; Gonzalgo ve Jones, 1997).	25
Şekil 2-5: Nükleozom yapısı ve etrafına sarılı DNA	26
Şekil 2-6: Histonlardaki değişiklikler ile genin aktif ve inaktif olma durumları (Margolis, 2005).	26
Şekil 2-7: Aktif ve inaktif kromatin yapısı ve rol oynayan histon modifikasyonları (Sun ve ark., 2016-modifiye edildi).	27
Şekil 2-8: Lizin rezidülerine metil gruplarının eklenmesi	28
Şekil 2-9: FB1, sfinganin ve sfingozinin kimyasal yapıları (Stocjmann-Juvala ve Savolainen, 2008)	32
Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimi.	41
Şekil 3-2: FB1'in 1/2 oranında seyreltilmesi.	43
Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikropalaka düzeni.	43
Şekil 3-4: 5-mC DNA ELISA kitinin esası.	53
Şekil 3-5: Tumor Supressor Gen (TSG) 'EpiTect Methyl II PCR Array'lerin deney protokol şeması	58
Şekil 4-1: 24 saat 3,125-200 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri sonuçları.	68
Şekil 4-2: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde % hücre proliferasyonu (kontrole göre kıyasla) üzerine etkisi.	69
Şekil 4-3: 5-mC standardına ait kalibrasyon eğrisi.	69
Şekil 4-4: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde % 5-mC seviyeleri.	70
Şekil 4-5: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>DNMT1</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	71
Şekil 4-6: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>DNM3a1</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	71

Şekil 4-7: 24 saat 0-100 μ M konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>DNMT3b</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	72
Şekil 4-8: 24 saat 0-100 μ M konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>MGMT1</i> genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.....	73
Şekil 4-9: 24 saat 0-100 μ M konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde <i>CD44</i> (a), <i>CDKN1A</i> (b), <i>CDKN2B</i> (c), <i>CTNNB1</i> (d), <i>MYC</i> (e), <i>P16</i> (f), <i>PTEN</i> (g) ve <i>RASSF1</i> (h) genlerine ait relatif ekspresyon seviyeleri.	79



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	Adenozin difosfat
AFB1	Aflotoksin B1
Asetil-koA	Asetil koenzim A
ATCC	American Type Cell Culture
BPE	Sığır hipofiz bezi özü
BrDU	Bromodeoksiüridin
CD44	<i>Cd44</i> molecule
CDKN1A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitör 1A</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitör 2A</i>
CDKN2B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitör 2B</i>
Clone 9	Sıçan karaciğer epitel hücresi
CO ₂	Karbondioksit
CpG	Sitozin-fosfat-guanin
CTNNB1	<i>Catenin (cadherin-associated protein) beta 1</i>
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	<i>DNA metil transferaz</i>
EC	Avrupa birliği komisyon direktifi (European Commission Regulation)
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EHC	Çevresel sağlık kriteri (Environmental Health Criteria)
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
FB1	Fumonisin B1
FBS	Fetal sıgır serumu
GC	Guanin sitozin
HAT	Histon asetil transferaz
HCl	Hidroklorik asit
HDAC	Histon deasetilaz
HDM	Histon demetilaz
HepG2	İnsan hepatoselüler karsinoma hücreleri

HK-2	Human kidney cells, İnsan böbrek hücreleri
HMT	Histon metiltransferaz
IC ₅₀	%50 inhibisyon sağlayan konsantrasyon
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
<i>IL</i>	<i>İnterlökin</i>
ISO	Uluslararası Kalite Değerlendirme Sistemi
JEFCA	Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Uzman Komitesi (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
kg	Kilogram
KSFM	Keratinosit serum içermeyen besiyeri
LD ₅₀	Medyan letal doz
LDH	Laktat dehidrojenaz
M	Molar
MBD	Metil bağlayıcı protein
MSP	Metilasyona-özgü polimeraz zincir reaksiyonu
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
miRNA	MikroRNA
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M.Ö.	Milattan önce
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<i>MYC</i>	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NaCl	Sodyum klorür
NH ₂	Amino
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NOAEL	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen değer (No observed adverse effect level)
NRK-52E	Sıçan böbrek epitel hücresi

NRU	Nötral kırmızı
NTP	Ulusal Toksikoloji Programı (National Toxicology Program)
OD	Optik dansite
<i>PARP</i>	<i>ADP-riboz polimeraz</i>
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PBGD	İnsan porfobilinojen deaminaz
PC	Pozitif kontrol
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMTDI	Kesin olmayan maksimum tolare edilebilir günlük değer (Provisional maximum tolerable daily intake)
POD	Peroksidaz
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki dönüş
SA	Sfinganin
SAM	S-adenozil metiyonin
SC	Çözücü kontrol
SD	Standart sapma
SO	Sfingozin SCF: Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi (Scientific Committee on Food)
TDI	Tolare edilebilir günlük değeri (Tolerable daily intake)
TNF	Tümör nekroz faktörü
XTT	2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid
WHO	Dünya sağlık örgütü (World Health Organization)
5-mdC	5-metil-2-deoksisitidin
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre

ÖZET

Ömerustaoğlu Bayoğlu Ş. (2020). Fumonisin B1'in Kanser ile İlişkili Yolaklarda Rol Oynayan Genler Üzerine Etkilerinin Hücre Kültürlerinde Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Mısır ve benzeri ürünlerin *Fusarium* türleri tarafından kontamine olmasıyla karşımıza çıkan Fumonisin (FB1) insan ve hayvan sağlığı açısından yüksek risk oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda, FB1'in hepatotoksik, nefrotoksik, nörotoksik, immunotoksik ve teratojenik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Kanser gelişiminde rol oynadığı bilinen FB1'in sfinganın birikmesine sebep olarak sfingolipid biyosentezine yol açmakta ve böylelikle kanserde rol oynayan hücre çoğalması, apoptoz gibi yolaklarda rol oynadığı belirtilmektedir. Ayrıca, FB'in genotoksik özellikte olmadığı karsinogenez sürecinde epigenetik mekanizmalar üzerinden de etkisini gösterebileceği öne sürülmektedir. Tez çalışmasında, FB1'in toksisitesinde epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonunun rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, insan böbrek hücrelerinde (HK-2) FB1'in global DNA metilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin DNA metilasyonu ve değişiklik gözlenen genlerin ekspresyonu araştırılmıştır. FB1, MTT ve NRU testleri ile sırasıyla %34 ve %38 oranında hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiş olup, FB1'in %50'lik inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) hesaplanamamıştır. HK-2 hücrelerinde 10; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda 24 saat FB1 maruziyeti gerçekleştirildi. 100 µM konsantrasyonda FB1 maruziyetinin global DNA metilasyonunu 2,23 kat arttırdığı gözlenirken, bu durumun DNMT enzimlerindeki değişiklikler ile ilişkili olmadığı gözlemlendi. FB1'in tümör baskılayıcı genlerde metilasyon üzerine etkileri panel arrayler kullanılarak araştırılmış olup, FB1'in birçok gende 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda metilasyon seviyelerinde anlamlı derecede artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Metilasyonda değişiklik gözlenen genlerden bazıları seçilmiş olup (*CD44*, *CDKN1A*, *CDKN2B*, *CTNNB1*, *MYC*, *PTEN*, *RASSF* ve *p16*), FB1 maruziyetinin bu genlerin de ekspresyonlarında artan metilasyon ile uyumlu anlamlı derece azalmalara sebep olduğu gösterilmiştir. Tez çalışmasının, FB1'in kanser yolaklarında rol oynayan mekanizmalar üzerine yapılan çalışmalara katkı sağlanması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fumonisin B1, Sitotoksisite, Epigentik mekanizmalar, Metil array, Histon modifikasyonları

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-31564



ABSTRACT

Omerustaoglu Bayoğlu, Ş. (2020). Investigation of the Effects of Fumonisin B1 on Genes Playing Role in Cancer-Related Pathways in Cell Cultures. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctorate Thesis. Istanbul.

Fumonisin B1 (FB1), which is emerged by contamination of corn and similar products with *Fusarium* species, causes a high risk for human and animal health. In the studies, it has been reported that FB1 shows hepatotoxic, nephrotoxic, neurotoxic, immunotoxic and teratogenic effects. In addition, FB1 is known to play a role in cancer development. The reason of this effect is the accumulation of sphinganine, which plays an important role in the cell proliferation pathway and apoptic modulation, and the impairment in sphingolipid biosynthesis. In addition, it is suggested that FB1 is not genotoxic and can act through epigenetic mechanisms in the carcinogenesis process. In the thesis study, it has been aimed to investigate the role of DNA methylation, one of the epigenetic mechanisms, in the toxicity of FB1. So that, global DNA methylation of FB1, DNA methylation of tumor suppressor genes and expression of altered genes in human kidney cells (HK-2) has been investigated. When the cytotoxicity of FB1 was examined, for 24 h with 200 μ M concentration, the death rates were observed 34% in MTT test and 38% in NRU test. Therefore, it could not be reached to an inhibition concentration rate of 50%. IC₅₀ could not be calculated. It was observed that FB1 exposure at 100 μ M concentration increased global DNA methylation by 2,23 fold, but this was not related to changes in DNMT enzymes. The effect of 24 hour FB1 exposure at 10, 50 and 100 μ M concentrations on methylation in tumor suppressor genes were investigated by studying panel arrays. Significant increases in methylation levels at 50 and 100 μ M concentrations have been observed in most of the genes. These results have been shown to be consistent with the expression results during the study. Significant decreases in the expression of selected genes *CD44*, *CDKN1A*, *CDKN2B*, *CTNNB1*, *MYC* and *p16*. It has been expected that the thesis study will contribute to the studies on the mechanisms that play a role in FB1 cancer pathways.

Key words: Fumonisin B1, Cytotoxicity, Epigenetic mechanisms, Methyl array, Histone modifications

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TDK-2018-31564



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser kavramı karşımıza çok eski zamanlardan beri çıkmaktadır. Malign tümörlerle ilgili tanımlara ilk olarak Mısır papirüslerinde, Babil çivi yazısı tabletlerinde ve eski Hint yazmalarında rastlanmaktadır. Terim olarak kanser ilk kez M.Ö. 460-377 yılları arasında yaşayan Hipokrat tarafından kullanılmıştır. Hipokrat ‘karkinos’ yada ‘karkinoma’ sözcüklerini iyileşmeyen, ülserle sebep olan, kırmızı, sıcak, ağrılı ve yavaş büyüyen şişlikler için kullanmıştır. Galen ise görünümünü yengece benzettiği için ‘kanser’ adını vermiştir (Sigerist, 1960). 2011 yılına kadar kansere neden olan en az 250 gen tanımlanmış olup bir çok gen de kanser için aday gösterilmiş durumdadır ve bu sayı yapılan araştırmalarla artmaya devam etmektedir (Pazarbaşı ve ark., 2011). Kanser en basit biçimde büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin yayılımı olarak tanımlanabilmektedir (Futreal ve ark., 2001). Hücrelerin büyüme kontrolleri de genlerin yönetimi altında olduğu için, kanser temelde genlerle ilişkili bir hastalıktır. Genlerde meydana gelen değişiklikler, bazı karsinojenlerle doğrudan DNA dizisinde değişikliğe sebep olabilir veya DNA dizisini değiştirmeden gen ifadesini değiştirmek şeklinde olabilir. Bu değişiklikler genetik ve epigenetik değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Genetik değişiklikler gende bir değişiklik olması sonucu meydana gelen, kalıtsal ve değiştirilemeyen değişikliklerdir. Epigenetik değişiklikler ise genin yapısında bir değişikliğe sebep olmaksızın, genin ifadesinde bir değişikliğe sebep olan, kalıtsal olmayan ve geri dönüşümlü olabilen değişikliklerdir. Günümüzde karsinojenler de bu iki etki mekanizmasına göre genotoksik ve non-genotoksik (epigenetik) karsinojenler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

Fumonisinler non-genotoksik karsinojenler grubunda sınıflandırılmış olup, mısır ve mısır benzeri ürünlerin *Fusarium verticillioides* ve *Fusarium proliferatum* tarafından kontamine olmasıyla oluşan mikotoksinlerdir (Gelderblom ve ark., 1996b; SCF. 2000). Bugüne kadar 7 farklı türü belirlenmiştir. Ancak bunlar içinde doğada en çok rastlanılan fumonisin B1 (FB1)’dir ve çalışmalar genellikle bu FB1’e yoğunlaşmaktadır (Smith ve Thakur, 1996). Mısır tüketiminin yoğun olduğu bölgelerde FB1’in etkileri de oldukça fazla görülmektedir. FB1 hem organlara ciddi derecede zarar veren, hem de akut toksisite, subakut toksisite, kronik toksisite/karsinojenite, üreme ve gelişimsel toksisiteye sebep olan bir mikotoksindir (Food Safety Commission of Japan, 2018). Pek çok ülkede FB1 ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar yapılmaktadır. Güney Afrika ve Çin’in bazı mısır

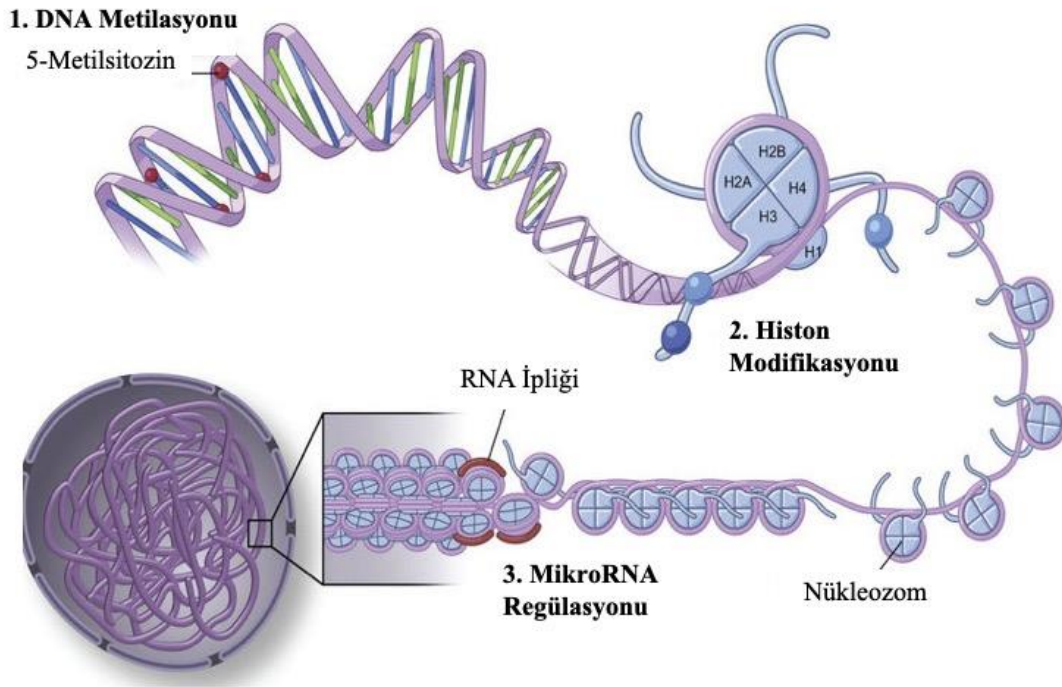
yetişen bölgelerinde özofagus kanseri daha fazla gözlenmiş olup (Sydenham ve ark., 1990; Chu ve ark., 1994), Amerika’da küflü mısır tarlalarında beslenen sığır ve atlarda tırnak düşmesi, domuzlarda tüy dökülmesi, bazı hayvanlarda yüksek oranda ölüm görülmüştür ve bu olaylarda fumonisinlerin rolünün olabileceği düşünülmüştür (Nelson ve ark. 1993). FB1’in yapısı sfingozine benzemektedir. Bu özelliğinden dolayı hücre membranının önemli bileşenlerinden olan sfingolipidlerin yapısını bozarak, hücre büyümesi, farklılaşması ve davranışında değişikliklere sebep olabileceği düşünülmektedir (Turner ve ark. 1999). FB1’in non-genotoksik bir karsinojen olduğu ileri sürülmektedir (Gelderblom ve ark., 1996b). Pellanda ve ark. (2012) tarafından sıçan fetüslerinde yapılan çalışmada, FB1’in global DNA metilasyonuna, histon modifikasyonuna ve kromatin stabilitesini sağlayan enzimlerin regülasyonunda değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (Pellanda ve ark., 2012). Chuturgoon ve ark. (2014)’ları tarafından yapılan çalışmada ise; FB1’in DNA metiltransferaz aktivitesini ve özellikle DNA demetilazın ekspresyonunu azalttığı; insan hepatoselüler karsinomada DNA hipometilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Chuturgoon ve ark., 2014). Arumugam ve ark. (2020)’larının yılında yaptığı bir çalışmada da FB1’in miR-30c aracılığıyla PTEN ekspresyonunu epigenetik olarak downregule ettiğini göstermişlerdir (Arumugam ve ark., 2020). Chuturgoon ve ark.’larının 2013 yılında HepG2 hücreleri üzerine yaptığı çalışmada FB1’in kromatin kararsızlığına ve karaciğer tümör oluşumuna sebep olabilen histon demetilasyonunu ve global DNA metilasyonunu indüklediğini gözlemiştir (Chuturgoon ve ark., 2013). Ancak henüz epigenetik mekanizmaların FB1’in karsinojenik etkisindeki rolü hakkında yeterli bir bilgiye ulaşılamamıştır. Prof. Dr. Sibel Özden’in yürüttüğü çalışmalarda FB1’in karaciğer ve böbrek üzerinde DNA metilasyonunda (Demirel ve Ozden, 2015) ve böbrek hücrelerinde global histon modifikasyonlarında değişikliklere sebep olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkarak tez çalışmasında kanser ile ilişkili yolaklarda FB1’in epigenetik değişikliklerinin rolü üzerinde çalışılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, insan böbrek hücrelerinde (HK-2) FB1’in global DNA metilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin DNA metilasyonu ve değişiklik gözlenen genlerin ekspresyonu araştırılmıştır. Böylelikle, FB1’in kanser yolaklarında rol oynayan mekanizmalar üzerine yapılan çalışmalara katkı sağlanması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik

Epigenetik; DNA dizisinde bir değişme olmaksızın fenotipte meydana gelen, kalıtsal olarak aktarılabilen, geri dönüşümlü, çevre ile modifiye edilebilen değişiklikleri inceleyen bilim dalıdır. Epigenetik terimi 1940'ların başında bir biyolog olan Conrad Waddington tarafından kullanılmıştır. Waddington bu tanımı yaparken 'genotipin fenotipi nasıl oluşturduğunu inceleyen bilim dalı' ifadesini kullanmıştır (Waddington 1940; Dolinoy ve ark., 2007). 1970'lerde, Holliday ve Pogh'un önerisiyle, sitozin-guanin dinükleotitlerinin (CpG) metilasyonunu içeren DNA modifikasyonları hipotezin moleküler mekanizmasını açıklamak için kullanılmıştır (Holliday ve Pugh 1975, Dolinoy ve ark., 2007). Takip eden yıllarda yeni keşiflerle gen modifikasyonlarının kalıtsal olduğu belirlenmiş ve 1990'larda epigenetiğin tanımı bugünkü kullandığımız halini almıştır (Dolinoy ve ark., 2007).

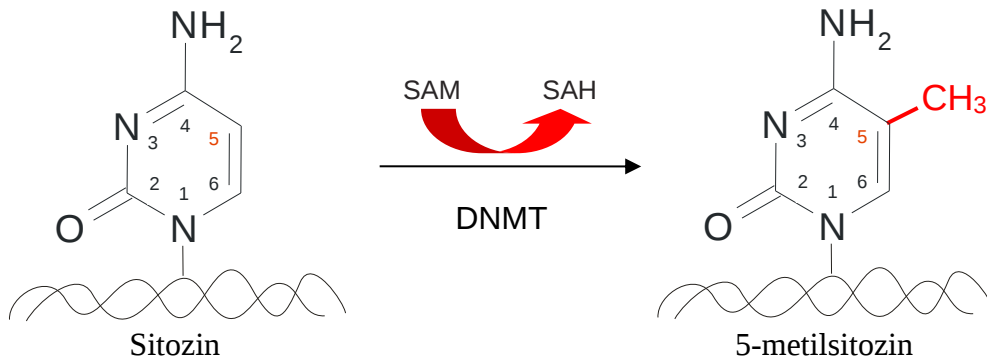
Epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA'ların (miRNA) regülasyonu olmak üzere başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır (Şekil 2-1) (Yan ve ark., 2010). Bu mekanizmalardaki herhangi bir hata genin susturulmasına veya ifadesinde aşırı artışa sebep olarak epigenetik hasar meydana getirebilmekte ve bu değişiklikler nesilden nesile mitoz veya mayoz bölünme yoluyla aktarılmaktadır.



Şekil 2-1: Başlıca epigenetik mekanizmalar (Yan ve ark., 2010).

2.1.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz (*DNMT*) ailesindeki bir enzim tarafından S-adenozil metiyonin (SAM)'den bir metil grubunun ($-CH_3$) alınıp, CpG dinükleotidinde bulunan sitozinin 5. konumundaki karbonuna bağlanması ile gerçekleşir. Bu işlemin sonucunda 5-metildeoksisitidin (5-mdC) oluşur (Şekil 2-2) (Herman ve Baylin, 2003). Memeli genomunda tüm sitozinlerin yaklaşık %2-5'i metillenmiş durumdadır ve guanin ile baz çifti oluşturmuştur (Bombail ve ark., 2004).



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

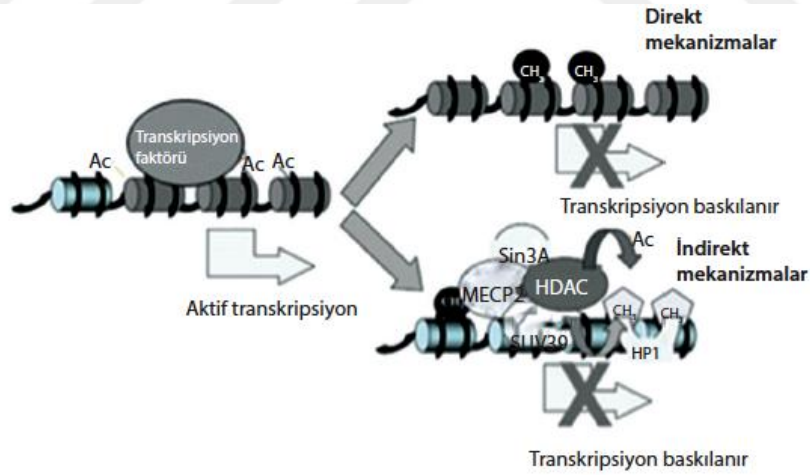
DNA metilasyonu DNA metiltransferazlar tarafından katalizlenir. Memelilerde saptanan 5 tip *DNMT* vardır; bunlar *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3a*, *DNMT3b* ve *DNMT3L*'dir (Robertson, 2002). İçlerinde en önemliler; *DNMT1*, *DNMT3a* ve *DNMT3b*'dir. *DNMT1*, gerçek metiltransferazlardır ve metilasyonun yeni zincirlere aktarılmasından, daha önce metillenmiş halde bulunan sitozinlerin tanınmasından sorumludur. *DNMT3a* ve *DNMT3b* ise de novo metiltransferazlardır ve ilk gelişim döneminde metilasyonun oluşmasından sorumludurlar (Das ve Singal, 2004; Szyf, 2011). DNA metilasyonunda metil grupları, birçok metilasyon reaksiyonunda metil verici olan SAM'den temin edilir. SAM, esansiyel bir amino asit olan metiyoninden meydana gelir. Homosistein metabolizmasının ilk basamağıdır. SAM'in artması durumunda metiltransferazlar aktif hale gelir, hipermetilasyonu tetikler ve global hipometilasyona karşı genomu korur (Caudill ve ark., 2001; Choumenkovitch ve ark., 2002).

Sitozin ve guaninin birbirini takip eder halde bulunduğu bölgeler CpG dinükleotidi olarak adlandırılır. İnsan genomunda yaklaşık olarak 28 milyon CpG dinükleotitidi bulunmaktadır. Bu dizilerin %10'undan azı CpG adacıklarıdır. CpG adacıkları genellikle genlerin promotor bölgelerinde bulunurlar. CpG adacıkları, 1000 baz çifti uzunluğundaki DNA'nın, genomun diğer bölgelerinden daha çok CpG yoğunluğuna sahip olduğu alanlardır ve genellikle metillenmemiş haldedir (Bird ve ark., 1985). Organizmanın hayatta kalabilmesi için sürekli aktif olması gereken housekeeping ve düzenleyici genlerdeki CpG adacıkları metilasyona karşı dirençlidir. Ancak tekrar dizileri ve transpozonlar gibi heterokromatin bölgelerdeki CpG adacıkları metilasyon yönünden zengindir. Bu şekilde gen ifadesi baskılanmış durumdadır (Smith ve Meissner, 2013; Takai ve Jones, 2002). Bununla beraber baskı altında tutulması gereken imprinting genler, inaktif X kromozom genleri, gametler ve bazı dokuya özgü genlerde de metilasyon gözlenmektedir (Robertson, 2005). Metillenmemiş durumdaki CpG adacıklarının yeniden metillenmesi yaşlanma süreci ve kanser gibi bazı hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynar.

DNA metilasyonu, kromatin yapısının durumunda ve dolayısıyla gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynar. Aktif kromatin yapısında transkripsiyon faktörleri ve diğer kofaktörler promotore bağlanabilir. Bu kromatin yapısı metillenmemiş CpG dinükleotitleri içerir. İnaktif kromatin yapısında ise promotere bağlanma gerçekleşmez.

Bu durumda ise kromatin yapısında metillenmiş CpG dinükleotitleri vardır (Esteller, 2007). Bir genin ifadesi metillenme derecesine bağlıdır ve aralarında ters ilişki vardır. Yani, metilasyonun az olması genin ifadesinde artışa; metilasyonun fazla olması ise genin ifadesinde azalmaya sebep olur ve bu metilasyon bir kere gerçekleşince o dokunun bütün hücrelerine aktarılır.

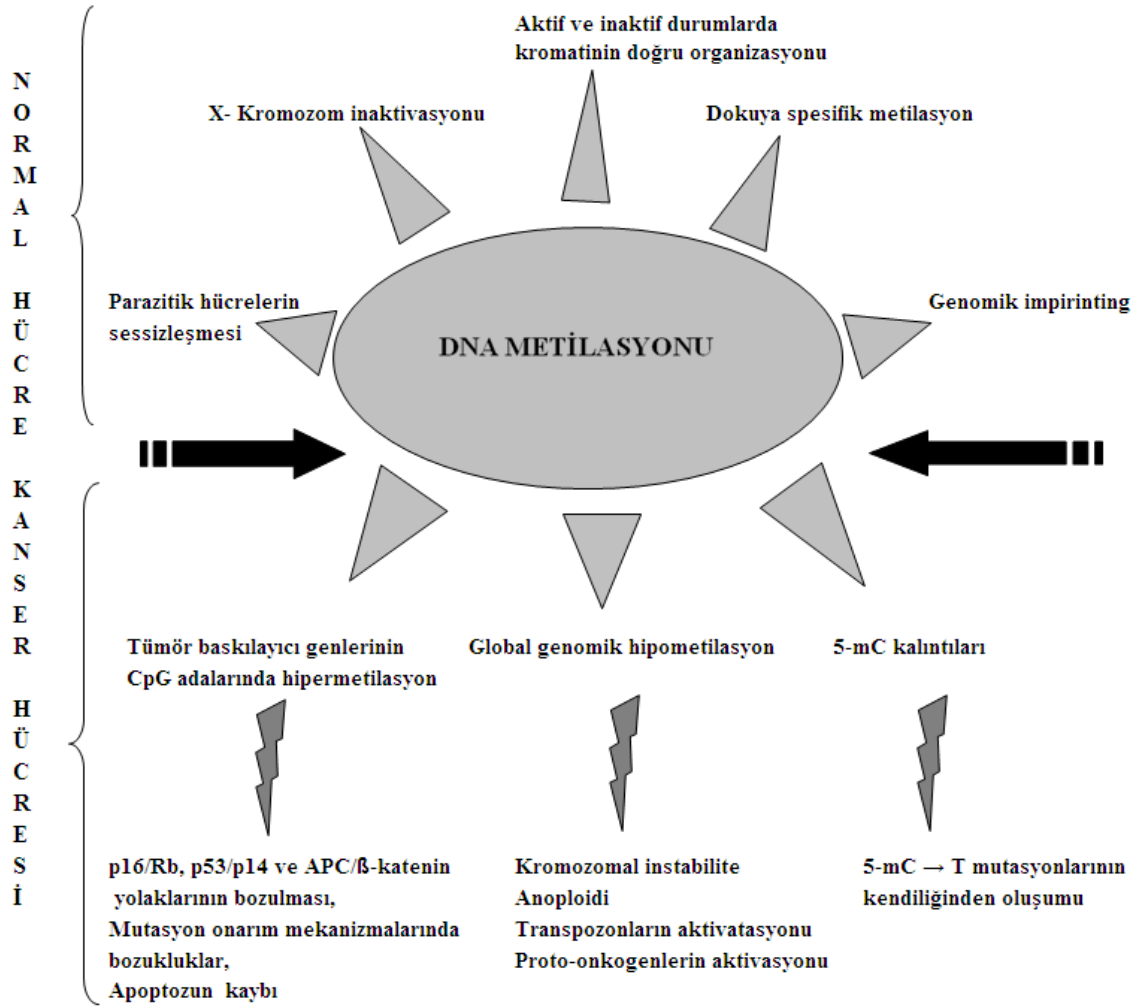
DNA metilasyonu ile genin sessizleşmesinde iki mekanizma öne sürülmüştür; direkt mekanizmalar ve indirekt mekanizmalar (Şekil 2-3) (Nan ve ark., 1997). Direkt mekanizma, metillenmiş CpG'lere transkripsiyon faktörlerinin ve diğer kofaktörlerin fiziksel bağlanmasının engellenmesiyle olan baskılamadır. İndirekt mekanizma ise, metillenmiş CpG'ler metil bağlanma proteinlerini (MBD) tetikler. Bu proteinlerin en iyi tanınmış örnekleri MeCP2, MBD2 ve MBD3'tür. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanacağı bölgelerin, MBD tarafından maskelenmesi sayesinde bu faktörler bağlanamaz. MBD, histon deasetilazlar ile ve kromatin yeniden modelleme aktiviteleri ile birlikte çalışırlar. Oluşan bu kompleks yapı inaktif bir kromatin yapısı meydana getirerek genin transkribe olmasını engeller ve gen susturulur (McGowen ve Szyf, 2010; Das ve Singal, 2004).



Şekil 2-3: DNA metilasyonu ile genin sessizleşmesinde iki mekanizma (Güler ve Peynircioğlu, 2016; McGowen ve Szyf, 2010).

Yıllardır süregelen çalışmalar, kanserde erken safhalarda ve en fazla gözlenen olayların DNA metilasyonundaki değişiklikler olduğunu göstermektedir. Bu konudaki ilk görüş, 1983 yılında kanser hücre genomlarının normal hücrelere göre hipometile olduğunu bulunmasıyla ortaya konmuştur (Feinberg ve Tycko, 2004). Kanserli hücrelerde gelişen DNA metilasyonu 3 farklı mekanizma ile açıklanmaktadır; 5-

metilsitozinin deaminasyonu sonucu mutasyon oluşması, genomun global hipometilasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarında hipermetilasyon ile baskılanmasıdır (Şekil 2-4) (Esteller ve Herman, 2002; Gonzalgo ve Jones, 1997). Bu mekanizmalardan ilki; normal bir DNA'da en sık görülen mutasyon çeşidi deaminasyon ile sitozinin urasile dönüşmesidir. Urasil bir RNA bazı olduğu için onarım mekanizmaları tarafından kolayca tanınır ve onarılır. Fakat 5-metilsitozin deaminasyon sonucu timine dönüşür. Timin de bir DNA bazı olduğu için farkedilemez ve onarılamaz (Esteller ve Herman, 2002; Gonzalgo ve Jones, 1997). Genomun global hipometilasyonunda ise, genom boyunca CpG dinükleotidleri metile durumdadır ve global hipometilasyona uğrayabilir ve bu durum da kromozomal instabiliteye, retrotranspozon aktivasyonu ve bazı protoonkogenlerin ekspresyonunda artışa sebep olmaktadır. Kanserin erken evrelerinde CpG dinükleotidlerinde sitozin metilasyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (Das ve Singal, 2004). Tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarında hipermetilasyon ise, normalde metillenmemiş halde bulunan tümör baskılayıcı genler hipermetilasyon ile sessizleşerek etki gösteremezler (Esteller ve Herman, 2002; Gonzalgo ve Jones, 1997).

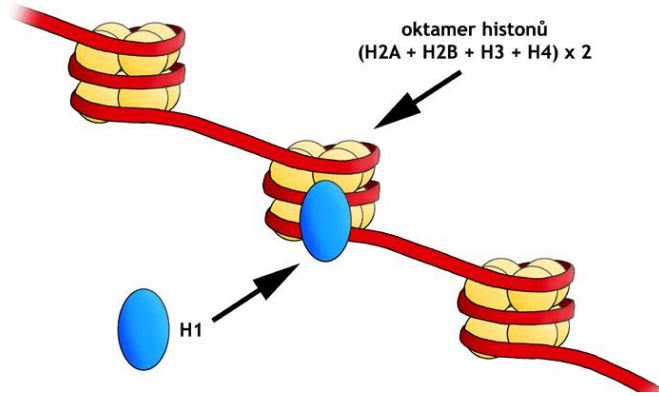


Şekil 2-4: Normal ve kanserli hücrelerin DNA metilasyonu ile ilişkisi (Esteller ve Herman, 2002; Gonzalgo ve Jones, 1997).

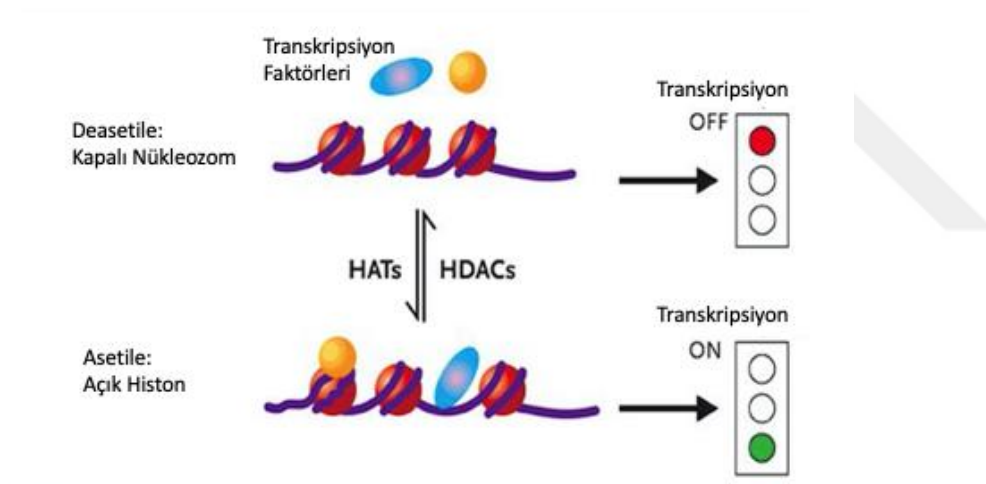
2.1.2. Histon Modifikasyonları

Histonlar, kromatinin temel yapısı olan nükleozomları oluşturarak DNA'nın etrafına sarılıp paketlenmesini sağlayan, lizin ve arjinine zengin proteinlerdir. 5 ana histon tipi vardır: H2A, H2B, H3, H4 ve H1'dir. H1 dışındaki diğer 4 histon 2'şerli olarak birleşir, etraflarına DNA sarılır. H1 histonu ise DNA sarılı olan bu oktetleri birbirine bağlayarak dıştan eklenir, (Şekil 2-5) (Jones ve Baylin, 2002). Histonlar üzerinde gerçekleşen modifikasyonlar kromatin yapısına, gen fonksiyonuna ve ekspresyonuna etki ederler (Kouzarides, 2007). Kromatinin sıkılaşması veya gevşemesi gen ifadesinin değişmesine sebep olur. Sıkılaşmış kromatin heterokromatin olarak adlandırılır ve bu durumda transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlanamaz ve gen inaktif olur. Kromatinin

gevşek hali ise ökromatin olarak adlandırılır ve bu durumda transkripsiyon faktörleri ve diğer proteinler rahatça DNA'ya bağlanır ve gen aktif olur (Şekil 2-6) (Margolis, 2005).



Şekil 2-5: Nükleozom yapısı ve etrafına sarılı DNA

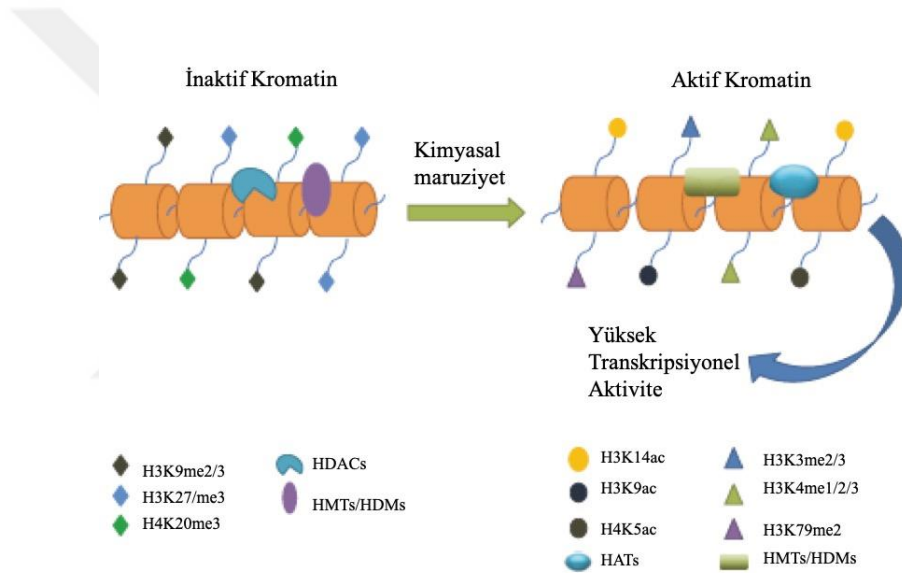


Şekil 2-6: Histonlardaki değişiklikler ile genin aktif ve inaktif olma durumları (Margolis, 2005).

Histon modifikasyonları, enzimler aracılığıyla histona başka grupların bağlanması veya ayrılması ile olur. Bu modifikasyonlar histonların bazik NH_2 (-amino) gruplarında gerçekleşen ve post-translasyonel modifikasyonlardır. Şu ana kadar keşfedilen histon modifikasyonları; asetilasyon, metilasyon, ubiquitinasyon, fosforilasyon, glikolizasyon, sumolasyon, ADP-ribozilasyondur (Herceg , 2007).

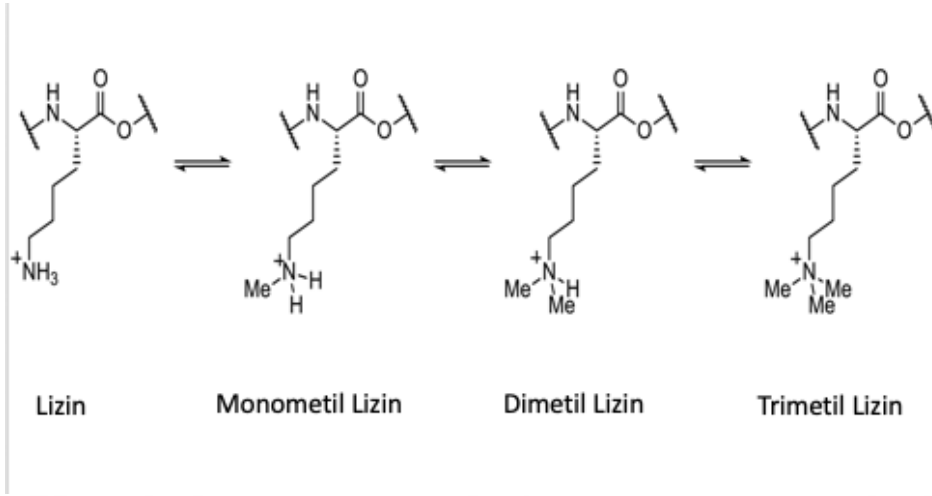
Histon asetilasyonu, H3K ve H4K kuyruklarındaki N-terminallerinin asetillenmesiyle meydana gelen bir olaydır. Genellikle gen promoterlerinin lizin

rezidülerinde, transkripsiyonel aktivasyonu stimüle ederek gen ifadesini artırır (Reddy ve Natarajan, 2011). Bu transkripsiyonel aktivasyonu, histonlardaki pozitif yüklü amin gruplarını nötral amid bağlarına dönüştürerek gerçekleştirir. Asetilasyon sonucu negatif yüklü DNA ile pozitif yüklü amino grubunun yaptığı bağ zayıflar ve DNA transkripsiyon faktörleri tarafından kolay ulaşılabilir hale gelir. DNA'nın açılmasıyla gen ifadesi başlar. Deasetilasyon ise, kapalı kromatin yapısına neden olarak inaktif gen ifadesine sebep olur. Bu reaksiyonları katalizleyen iki enzim, histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC)'dır. Bu enzimler asetil-koA'dan alınan asetil grubunun eklenmesini ve çıkarılmasını sağlar (Şekil 2-6; Şekil 2-7) (Kouzarides, 2007; Sun ve ark., 2016).



Şekil 2-7: Aktif ve inaktif kromatin yapısı ve rol oynayan histon modifikasyonları (Sun ve ark., 2016-modifiye edildi).

Histon metilasyonu, asetilasyonun aksine devamlı ve uzun sürelidir. Arjinin ve lizin rezidülerinde meydana gelen, mono, di veya tri metil grubunun eklenmesiyle gerçekleşen post-translasyonel kovalent bir modifikasyondur (Şekil 2-8) (Villeneuve ve Natarajan, 2010). Histon metiltransferazlar (HMT) ve histon demetilaz (HDM) enzimleri aracılığıyla gerçekleşir. Histon metilasyonu, modifiye edildiği rezidüye göre gen ifadesinin artmasına yada baskılanmasına sebep olabilir. Genel olarak H3K36me2/3, H3K4me1/2/3, H3K79me2 transkripsiyonel aktivasyona sebep olurken; H3K9me2/3, H3K27me3, ve H4K20me3 kromatinin kapalı olmasına ve gen ifadesinin baskılanmasına sebep olur (Şekil 2-7) (Sun ve ark., 2014).



Şekil 2-8: Lizin rezidülerine metil gruplarının eklenmesi

Histon fosforilasyonu, mitoz bölünme esnasında, histon H3'ün –amino terminalinde bulunan 10. pozisyonundaki serinin fosforillenmesi ile gerçekleşen modifikasyondur. Kromozomun yoğunlaşmasının başlaması ile ilişkilidir (Santos-Rosa ve Caldas, 2005). Histon ubiquitinasyonu ve sumolasyonu, lizin rezidülerinin ubiquitin ve sumo yoluyla modifiye edilmesidir. Histon ubiquitinasyonu gen ifadesinin artmasıyla ilişkilidir (Santos-Rosa ve Cldas, 2005). ADP ribozilasyonu, negatif yüklü poli-ADP-riboz zincirinin, DNA ile histonlar arasındaki etkileşimi azalmasıyla gerçekleşen modifikasyondur. Kromatinde açılmaları sebep olur (Morin ve Ark., 1999).

2.2. Mikotoksinler

Mikotoksin terimi mantar anlamındaki 'myco' ve zehir anlamındaki 'toxin' kelimelerinin birleşimiyle türemiştir. Mikotoksinler çoğunlukla *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türleri tarafından sentezlenen ikincil, düşük molekül ağırlıklı (yaklaşık 700 dalton), son derece zararlı maddelerdir (Liew ve Redzwan, 2018). Fakat bütün mikotoksinler bu şekilde sınıflandırılmaz. Örneğin penisilin günümüzde yaygın olarak kullanılan antibiyotiktir (Speight, 2012). Mikotoksinin hayatımıza girişi 10.000 yıl önce insanoğlunun ekinleri yetiştirmesi ve depolamasıyla başlamıştır. Tahıllar en önemli besin kaynaklarımızdan biri olmuştur (Pitt ve Miller, 2016). Ancak, halen daha insanların ve hayvanların ana besin kaynağı olan tahılların %25'inin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO)'nuna göre mikotoksinler tarafından kontamine olduğu bildirilmektedir. (Pandya ve Arade, 2016). Kontamine

gıdalara maruziyet sonucu alınan mikotoksinlerin sebep oldukları zehirlenmeler “mikotoksikozis” olarak adlandırılmaktadır. Bu maruziyet genellikle oral yol ile olsa da inhalasyon ve dermal yol ile de olabilmektedir. Mikotoksikozis doza, maruziyet süresine ve türe bağlı olarak farklı etkiler gösterebilmektedir. Ayrıca, diğer kimyasallarla beraber maruziyet durumunda sinerjik etkiye sebep olabildikleri de bildirilmiştir (Gajicka ve ark., 2013).

Bugün 300’den fazla mikotoksinin varlığını bilmekteyiz. Çeşitli hayvanlar ve hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmalar, farklı organların mikotoksinler tarafından etkilenebildiğini göstermiştir. Bu etkiler, mutajenik, karsinojenik, teratojenik olabilmekte; hatta bazı türlerde bu etkilerin bir kaçı birlikte de görülebilmektedir (Bennett ve Klich; Creppy, 2002). Mikotoksinler içinde en çok araştırılan ve en çok aydınlatılan hepatotoksik ve karsinojenik özellikteki aflatoksin B1’dir. Afrika ve Güneydoğu Asya’da yapılan çalışmalarda aflotoksin B1 ve karaciğer kanseri sıklığı arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır (Yurdun, 1996; Williams ve ark., 2004). Son yıllarda diğer mikotoksin grupları olan okratoksinler, patulin, trikotesen, zearalenon ve fumonisinler de araştırmacıların önemli araştırma konuları olmuştur.

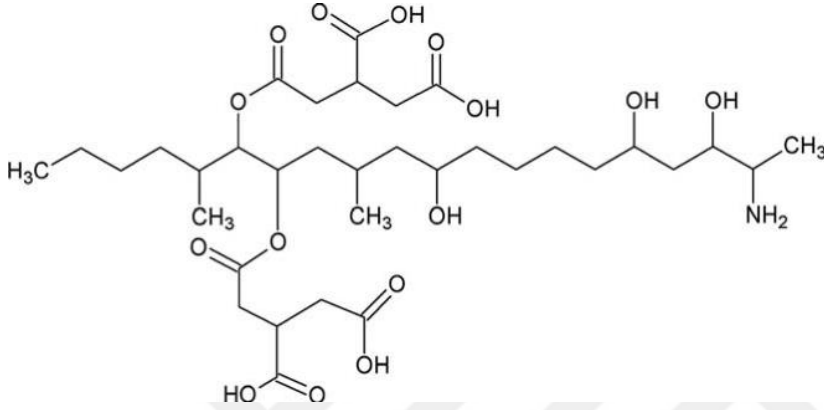
2.3. Fumonisinler

Fumonisinler, mısır ve mısır benzeri ürünlerin *Fusarium verticillioides* ve *Fusarium proliferatum* tarafından kontamine olmasıyla oluşan mikotoksinlerdir. Bu türlerin yanı sıra *F. napiforme*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, ve *F. nygamai* gibi türler de fumonisinleri üretebilir (SCF, 2000). Nem, sıcaklık, tohum çeşidi, tarımsal uygulamalar, bitki stresi vb. durumların varlığı fumonisinlerin üreme hızlarını etkiler (Jackson ve Jablonski, 2004; Soriano ve Dragacci, 2004).

Fumonisinler ilk olarak 1988 yılında *Fusarium moniliforme*’nin metaboliti olarak izole edilmiştir (Marasas ve ark., 1988). Bugüne kadar 7 farklı tipi belirlenmiştir. Fumonisin B1 (FB1) ve FB2 major toksinler, FB3, FB4, FA1, FA2, FC1 minör toksinlerdir. Bunlar arasında FB1’in en toksik özellikte olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, doğada en çok rastlanan tür de FB1’dir (Smith ve Thakur, 1996). Bu sebeple üzerinde en çok çalışılan ve araştırılan fumonisindir.

Mısırdaki FB1 oluşumu 10-37°C’de gerçekleşmektedir, 7°C’de FB1 varlığı tespit edilememiştir. *F. Verticillioide*s suşları optimum 20-30°C’de fumonisin üretirken, *F. profileratum* için bu değer 15°C’dir (Marin ve ark., 1999). 2-amino-12,16-dimetil

polihidroksieikosan iskeletinin C14 ve C15 konumlarından propan-1,2,3-trikarboksilik asit ile esterleşmesiyle oluşmuştur (Steyn ve ark., 1999). FB1 de propan diester, 1,2,3 trikarboksilik asit ve 2-amino 12. 16 dimetil, 3,5,10,14,15 pentadihidroksikosan, terminal asit grubu asitleşip 14. ve 15. hidroksil gruplarının da esterleştiği görülmektedir (Nelson ve ark., 1993) (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: FB1'in kimyasal yapısı

WHO raporlarında dünyada mısır ve mısır ürünlerinin %59'unun FB1 ile kontamine olduğu bildirilmiştir (WHO,2000). Fumonisinin, gıdaların işlenmesinde kullanılan yöntemlere karşı oldukça dayanıklı olması da bu oranın yüksek olmasının sebeplerinden biridir. Örneğin 150°C'nin altındaki değerlerde sadece kısmi parçalanmanın görüldüğü bildirilmiştir (Arranz ve ark., 2004). Mısırın kuru değirmenlerde öğütülmesi durumunda FB1'in kepek, tohum ve una dağıldığı gözlenirken; nemli değirmende öğütülmesi durumunda suda çözünme özelliğinden dolayı FB1 miktarında azalma olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, gıdalardan FB1 uzaklaştırılması pek çok değişkene bağlıdır (EHC, 2000).

FB1 dünya çapında pek çok ülkede epidemiyolojik çalışmaları yapılan bir toksindir. Güney Afrika ve Çin'in bazı mısır yetişen bölgelerinde, düşük gelir sınıfından olan ve diyetlerinde mısır tüketimi yüksek olan popülasyonlarda özofagus kanserinin daha sık gözlemlendiği (Sydenham ve ark., 1990; Chu ve ark., 1994), Amerika'da küflü mısır tarlalarında beslenen sığır ve atlarda tırnak düşmesi, domuzlarda tüy dökülmesi, bazı hayvanlarda yüksek oranda ölüm gözlemlendiği rapor edilmiş olup, bu olaylarda fumonisinlerin rolünün olabileceği düşünülmüştür (Nelson ve ark. 1993). Ayrıca FB1

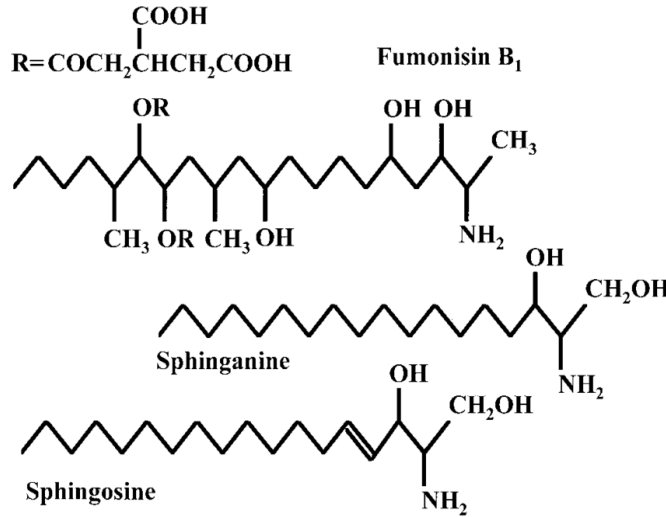
içeren mısır ya da mısır içeren yem tüketen atlarda beyin zarı iltihabı (Marasas ve ark., 1988), domuzlarda akciğer ödemi (Haschek ve ark., 2001) ve farelerde böbrek hastalıkları ve erkek sıçanlarda sıçanın türüne göre karaciğer ve böbrek kanseri (Stockmann ve ark., 2008) geliştiği gösterilmiştir.

2.3.1. Fumonisin B1'in Toksikokinetiği

FB1, yüksek oranda hidrofilik bir bileşiktir. Üzerinde çalışılan bütün hayvan türlerinde gastrointestinal emiliminin çok zayıf olduğu görülmüştür (Dutton, 1996). Büyük oranda ve hızlı bir şekilde feçesle vücuttan atılır (Shephard ve ark., 1992,1994). Sıçanlar ile yapılan çalışmalarda küçük bir kısmının safra ile atıldığı ve enterohepatik siklusa az miktarda geçebildiğini göstermiştir (Shephard ve ark., 1994). İdrarda, karaciğerde, böbrekte ve kırmızı kan hücrelerinde FB1'e rastlanırken; plazma, plesanta, kalp ve beyinde rastlanılmamıştır (Voss ve ark., 1996). Kan beyin bariyerini geçtiğine dair kanıtlar ise çok azdır (Dragan ve ark., 2001). İnsan dışındaki tüm memeli türlerinde de FB1'in kinetiğinin benzer olduğu belirtilmiştir (Dutton, 1996; NTP Technical Report, 2001). İnsanlar da ise, safra yoluyla atıldığı ve az miktarda idrar ile atıldığı gösterilmiştir. FB1'in özellikle karaciğer ve böbrekte biriktiği belirtilmiştir (EHC, 2000).

2.3.2. FB1'in Toksisite Mekanizması ve Toksik Etkileri

FB1 kimyasal yapısı ile sfingozin (SO) ve sfinganine (SA) benzemesi (Şekil 2-10) Stocjmann-Juvala ve Savolainen, 2008) dolayısıyla, sfingolipidlerin sentezinde onların yerine geçerek seramid sentetaz (N-açıl transferaz) enzimini ve sfinganinin N-açilsfinganinlere dönüşümünü inhibe eder. Sfingolipidlerin görevi membran ve lipoprotein yapısını korumak, hücrelerarası iletişimi ve hücreler ile ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimi sağlamak, büyüme faktör reseptörlerini dengelemek, sinyal iletiminde ikinci mesajcı olarak etki etmektir. Bütün bunların sonucunda sfingolipidler hücre büyümesi, farklılaşması ve ölümünde aracılık yapar (Turner ve ark. 1999). Sfinganinin N-açilsfinganinlere dönüşümünün inhibe olmasıyla serbest sfinganin birikir ve dokularda SA/SO oranını artır. (Merril ve ark., 1996; Wang ve ark., 1999). Bu durumun kanser gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir.



Şekil 2-9: FB1, sfinganin ve sfingozinin kimyasal yapıları (Stocjmann-Juvala ve Savolainen, 2008)

FB1'in sfingolipid sentezi dışında hücresel lipid sentezini etkilediği de gözlenmektedir. Sıçanlarda yapılan deneylerde n-6 yağ asitlerinde değişiklikler olduğu kaydedilmiş olup, membran kaynaklı kolesterol düzeyinde düşme olduğu gözlenmiştir. Bu düşüş fosfodilkolin:kolesterol oranının artmasına ve membranın katılaşmasına sebep olmuştur. Bu özelliğinden dolayı FB1'in membran yapısının bütünlüğünü bozduğu ve hücre ölümünü gerçekleştirdiği bildirilmiştir. (Steyn ve Stander, 1999). Üzerinde en çok çalışılan ve önemli görülen mekanizmalardan biri de budur.

2.3.3. FB1'in Karaciğer Üzerine Toksik Etkileri

FB1'in karaciğer hücrelerinde lipid peroksidasyonu ile sonuçlanan, hücrelerin oksidatif durumunu da bozabildiği bildirilmiştir (Abel ve Gelderblom, 1998). Gelderblom tarafından yapılan bir çalışmada; FB1'in membran fosfolipidlerinin yapısını bozmasının yanında, fosfolipidler ve trigliseridlerin yağ asidi yapısını da etkilediği gösterilmiştir. Bu değişiklikler çoklu-doymamış yağ asitlerinin birikmesinin yanı sıra normal ve kanser hücrelerinin her ikisinde de lipid peroksidasyonunun artmasına da sebep olmuştur. (Gelderblom ve ark., 1996a-b; Gavino, 1981). Bir başka çalışmada, fare karaciğerinde FB1 maruziyeti sonrasında TNF- α , interlökin-1 β (IL-1 β), IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-12 ekspresyonlarında artış meydana geldiği gözlenmiştir (Bhandari ve Sharma, 2002a-b; Sharma ve ark., 2006). İn vivo FB1 maruziyetinin BALB/c farelerin böbrek ve karaciğerinde kaspas-8 ve TNF α 'nın ekspresyonunu arttırabildiği gösterilmiştir (Dugyala ve ark. 1998; Sharma ve ark., 2006).

2.3.4. FB1'in Böbrek Üzerine Toksik Etkileri

Maymun böbrek hücrelerinde yapılan bir çalışmada; FB1-indüklü lipid peroksidasyonu, DNA, protein ve makromolekül sentezini inhibe etmiştir (Abado-Becagnee ve ark., 1998). FB1'in hücre ölümü üzerine etkisi serbest radikallerin artışının çok fazla olması veya antioksidan koruma mekanizmalarının tükenmesinden dolayı oksidatif stres görülmesiyle ilişkili olduğu da bildirilmiştir. Domuz böbrek hücrelerinde yapılan bir çalışmada glutatyon redoks siklusunda, glutatyon seviyelerinin azalmasıyla sonuçlanan değişiklikler gözlenmiş ve dolayısıyla FB1'e karşı koruyucu rolün azaldığı gösterilmiştir (Kang ve Alexander, 1996).

Bir başka çalışmada FB1 maruziyeti sonucunda idrar osmolalitesinin azaldığı, idrar konsantre etme kabiliyetinin bozulduğu ve idrarla protein atılımının arttığı görülmüştür. Total protein, laktat dehidrogenaz, γ -glutamil transpeptidaz ve N-asetil- β -D-glukozaminidaz aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Bondy ve ark., 1995; 1996). Yapılan çalışmalarda FB1 maruziyeti ile erkek farelerin böbreklerinde organik anyon ve katyon alımının azaldığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 1999). Bir başka çalışmada, 90 gün boyunca belirli dozlarda FB1'e maruz bırakılan sıçanlarda en hassas organın böbrek olduğu görülmüştür. Böbrekte, dış medullanın dış şeridinde nefropati bulunmuş ve bu da tekli hücre dejenerasyonu, eozinofilik sitoplazma ve tübül epitelyal hücrelerinde çamurlaşma ile karakterize edilmiştir (Voss ve ark., 1995).

2.3.5. FB1'in Epigenetik Mekanizmalar ile İlişkisi

Epigenetik mekanizmaların FB1'in toksisitesinden sorumlu önemli mekanizmalardan biri olduğu düşünülmekte olup, Chuturgoon ve ark. (2014)'ları tarafından yapılan çalışmada FB1'in non-genotoksik karsinojen olduğu öne sürülmüştür (Chuturgoon ve ark., 2014). Bu çalışmada, FB1'in DNA metiltransferaz aktivitesini ve özellikle DNA demetilazın regülasyonunu azalttığı; insan hepatoselüler karsinoma hücrelerinde (HepG2) DNA hipometilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Chuturgoon ve ark., 2014).

CpG promoter bölgelerinde DNA metilasyonunun FB1 toksisitesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Laboratuvarında daha önce yürütülen araştırmalarda FB1, global DNA hipometilasyonunu, tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinde ise DNA hipermetilasyonunu indüklediği ve histon modifikasyonlarında değişikliklere sebep

olduğu gösterilmiştir (Demirel ve ark., 2015, Sancak ve Özden, 2015). Demirel ve ark. (2015) 'ları tarafından sıçan böbrek (NRK-52E) ve karaciğer (Clone-9) hücrelerinde p15, p16, VHL, e-cadherin ve c-myc gibi önemli tümör baskılayıcı genlerinde gen spesifik DNA metilasyonu analizi yapılmış ve bu genlerin promotör bölgelerinde metilasyon değişiklikleri bildirilmiştir (Demirel ve ark., 2015). Yapılan diğer bir çalışmada ise NRK-52E hücrelerinde transkripsiyonel baskılanma ile ilişkili histon H3K9, H3K27 ve H4K20 metilasyonlarında ve transkripsiyonel aktivasyonla ilişkili H3K4, H3K36 metilasyonlarında FB1'in değişikliklere sebep olabileceği belirtilmiştir (Sancak ve Özden, 2015). Ayrıca, FB1'in histon metil transferaz (H3K9-HMT) aktivitesinde de önemli artışlara sebep olduğu gösterilmiştir (Sancak ve Özden, 2015). Histon fosforilasyonunun da FB1 toksisitesinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda bulunmuştur. 200 µM FB1 maruziyeti yapılan HepG2 hücrelerinde FB1'in histon fosforilasyonunda değişikliklere sebep olduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre fosforillenmiş γ-H2AX ve bölünmüş poli ADP-riboz polimeraz (PARP) seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (Chuturgoon ve ark., 2015). Fosforillenmiş γ-H2AX seviyelerindeki azalmaların DNA hasar cevaplarını aktivite eden ve genomik stabiliteyi sağlayan hücrelerin görevlerini engellediği ve bu durumun da gen mutasyonuna ve tümör oluşumuna sebep olduğu rapor edilmiştir (Matthaios ve ark., 2013).

2.3.6. Fumonisinler ile İlgili Limitler ve Yasal Düzenlemeler

Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi'nin ('The Scientific Committee on Food', SCF) 2000 yılında paylaştığı verilere göre; sıçan çalışmalarından elde edilmiş tüm veriler değerlendirmiş ve sadece FB1 maruziyeti için hiçbir advers etkinin gözlenmediği en yüksek doz ('No Observed Adverse Effect Level', NOAEL) 0,2-0,25 mg/kg bw/gün olarak bildirilmiştir. Güvenlik faktörü 100 alınarak, tolare edilebilir günlük değer ('Tolerable Daily Intake', TDI) 2 µg/kg bw olarak belirlemiştir (SCF, 2000). Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Uzman Komitesi ('Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives', JECFA) de FB1, FB2 ve FB3 için tek başına ya da kombinasyonları halinde Fischer sıçanlardaki böbrek toksisitesi çalışmalarını değerlendirmiş; NOEL değerini 0,2 mg/kg bw/gün ve güvenlik faktörünü de 100 kabul ederek, geçici maksimum tolare edilebilir günlük değerini ('provisional maximum tolerable daily intake', PMTDI) ise 2 µg/kg bw olarak belirlemiştir (JECFA, 2001).

Avrupa Birliği'nin Komisyon Direktifinde ('European Commission Regulation') Avrupa Birliği ülkeleri için *Fusarium* toksinlerinin maksimum seviyeleri 1 Ekim 2006 tarihinde belirlenmiştir (EC Regulation, 2006). Türkiye'de ise fumonisinlerin (FB1+FB2) mısır ve ürünleri için maksimum limitlerine ilişkin sınırlamalar 17 Mayıs 2008 tarihli ve 26879 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan 'Türk Gıda Kodeksi-Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ' (Tebliğ No: 2008/26) ile belirlenmiştir (26879 sayılı Resmi Gazete). Daha sonra, bu tebliğ yürürlükten kaldırılmış ve 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan 'Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği' geçerli olmuştur (28157 sayılı Resmi Gazete) (Tablo 2-1). Yapılan kıyaslamalarda 2011 yılında yayımlanan yönetmelikte fumonisinlerin maksimum limitlerinde bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Tablo 2-1: Türk Gıda Kodeksi tarafından gıdalarda belirlenen maksimum fumonisin limitleri*

2.6.	Fumonisinler	FB ₁ + FB ₂ (µg/g)
2.6.1.	İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	4,0
2.6.2.	Mısır ve mısır bazlı ürünler (doğrudan insan tüketimine sunulan) (Bölüm 2.6.3 ve 2.6.4'de belirtilenler hariç)	1,0
2.6.3.	Mısır bazlı kahvaltılık tahıllar ve mısır bazlı çerezler	0,8
2.6.4.	İşlenmiş mısır bazlı bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,2
2.6.5.	500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelleter (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	1,4
2.6.6.	500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	2,0

*29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan 'Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Biomatik A3338
Absolu alkol	Sigma-Aldrich 32221
Bromodeoksiüridin (BrdU) ELISA Tayin Kiti	Roche Life Science 11647229001
cDNA sentez kiti	Roche Life Science 05091284001
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Biomatik A2424
DNA izolasyon kiti	Roche Life Science 11796828001
Etilendiamin tetra asetik asid (EDTA)	Sigma E5134
epiTect Methyl II PCR array kiti	335222
Fetal sığır serumu (FBS)	Wisent-Multicell 080110
Fumonisin B1 (%99)	Sigma-Aldrich F1147
Gen ekspresyonu primerleri	Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti.
Syber green master karışımı	Bioline BIO-98020
Glasiyel asetik asit	Riedel-de Haen 27225
Keratinosit serum içermeyen besiyeri (KSFM) kiti	Thermo Scientific™ 17005042
Nötral kırmızı boyası	Sigma-Aldrich N7005
Penisilin / streptomisin çözeltisi (100x)	Wisent-Multicell 450201EL
RNA izolasyon kiti	Roche Life Science 11828665001
Tripan mavisi	Fluka 93595
Tripsin (1:250)	Biomatik A4027
Tris hidroklorür (Tris HCl)	Applichem A3452

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; Eppendorf 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)

Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet	Eppendorf
(0,5-10 µL)	
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet	Eppendorf
(30-300 µL)	
Blok ısıtıcı (5 mL tüpler için)	Stuart SBH130D
Blok ısıtıcı (0,5µL mikrotüpler için)	Techne Dri-Block DB-2D
Blok ısıtıcı (96 kuyucuklu mikrolaka)	EuroClone Dry Bath EMK20
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik 5231 NFY
CO ₂ 'li inkübatör	Thermo-Scientific Heracell 150i
Çalkalamalı blok ısıtıcı (2 mL tüp)	Biosan TS-100C
Çalkalamalı blok ısıtıcı (96 kuyucuklu mikrolaka)	EuroClone T-Shaker EMS100
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2041 D
Derin dondurucu (-80 °C)	Daihan-Scientific Wisecry
Elektronik hassas terazi	Precisa XB 220 A
Etüv	Nüve
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus CKX4
Gerçek zamanlı termal döngü cihazı	(‘Real- Roche Life Science
time PCR’, RT-PCR)	Lightcycler 480-II
Hassas terazi	Mettler H20
Laminar kabin (Biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan
Mikrolaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek Epoch
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 120
Mini orbital çalkalayıcı	Stuart SSMI
Otomatik pipetör	Eppendorf
Otomatik hücre sayımı cihazı	Luna Automated Cell Counter (Logos model: L10001)
Otoklav	Hirayama HV-50L
pH metre	Hanna HI 1131 B
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich Micro 200R
Soğutmalı santrifüj	Hettich Micro Universal 32R
Spin santrifüj	Labnet C1301B

Su banyosu	Memmert WB14
Termal döngü cihazı-Altın blok	Applied Biosystems 9700
Termal döngü cihazı-Gradient	Axygen Therm-1000
Vorteks	NC 28405-Ika

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

DNA saklama kutusu	Greiner Bio-One
Enjektör (10 mL; 50 mL)	Set inject
Enjektör ucu steril filtre (0,22 µm naylon)	Sartorius-Minisart
Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner Bio-One
Filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Hücre kültürü flaskı (25 cm ² ; 75 cm ²)	Nest
İnce duvarlı PCR tüpü (0,2 mL)	Greiner Bio-One
Kriyo vial (2 mL)	Greiner Bio-One
Lateks eldiven	Broche
Mikroplaka (6; 24; 96 kuyucuklu)	Nest
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner Bio-One
Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner Bio-One
Nitril eldiven	Broche
Otoklav bandı	Sussex
Otoklavlanabilir schott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Pastör pipeti (2 mL)	Greiner Bio-One
Pipet ucu (0,1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Nest
Serolojik pipet (10 mL; 50 mL)	Greiner Bio-One

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. Hücre Dizilerinin Temini

İnsan böbrek hücreleri (HK-2) Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri kriyo vialler içerisinde -196°C’de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Tripsin/EDTA çözeltisi (%0,2 / %0,04): 0,2 g tripsin ve 0,04 g EDTA tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü. 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi. 15 mL’lik falkonlara bölünerek -20 °C’de saklandı.

Antibiyotik çözeltisi (100x) Penisilin / streptomisin çözeltisi 100 kat konsantrasyonda olacak şekilde hazır temin edildi ve besiyerine ortamda %1 olacak şekilde eklendi.

Hücre dondurma çözeltisi: 5 mL DMSO (%5, v/v), 9,5 mL FBS ve 0,95 mL %1’lik antibiyotik çözeltisi hücreler için uygun besiyeri ile 100 mL’ye tamamlanarak hazırlandı.

HK-2 hücresi için besiyeri: Keratinosit serum içermeyen besiyerine (KSFM) kitine 0,05 mg/mL sığır hipofiz bezi özü (‘bovine pituitary extract’, BPE) ve 5 ng/mL epidermal büyüme faktörü (‘epidermal growth factor’, EGF) eklenerek besiyeri hazırlandı. Ayrıca, 100 mL KSFM besiyerine son konsantrasyonu %1 olacak şekilde 1 mL antibiyotik çözeltisinden eklendi. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

3.4.3. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması

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

hücreler süspande edildi ve 7-10 mL besiyeri içeren 25 cm²'lik ya da 75 cm²'lik flasklara ekildi. Flasklar 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.4.4. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)

Hücre kültür flasklarının tüm yüzeyini kaplamış halde bulunan yoğunlaşmış hücreler için 'konfluent durumda' ifadesi kullanılır. Hücreler konfluent duruma geldiğinde pasajlandı. Pasajlama için flask inkübatörden alındı, laminar kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Hücrelerin yüzeyi 2 mL CMF-PBS çözeltisi ile yıkandı. Bu adım, tripsin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntılarını uzaklaştırmak amaçlı yapılır. Yıkama işleminden sonra CMF-PBS döküldü ve 2 mL tripsin/EDTA çözeltisi ilave edildi, flask 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 5-10 dk. bekletildi. Tripsin ile hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlandı. Tripsin aktivasyonunu durdurmak amacıyla flaska 2-3 mL serumlu besiyeri eklendi, pipetleme yapıldı ve hücreler 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet 2 mL besiyeri ile süspande edildi. Hücreler hemasitometrede sayılarak, yaklaşık 10⁵ hücre/mL olacak şekilde içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekildi. Flasklar, %90 bağıl nem, 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Hücre dizisinin devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi ortalama haftada 2-3 kez yapıldı.

3.4.5. Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımı tripan mavisi testi ile yapıldı. Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, ölü hücrelerin bozulmuş hücre membranlarından boyayı hücre içerisine alabilmeleri esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

Hücre sayımı otomatik hücre sayım cihazı (Luna Automated Cell Counter, L10001) ile gerçekleştirildi. Ayrıca, kontrol etme amacıyla hücre sayımı Thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4×16 küçük kareden oluşan özel sayım lamaları (Thoma lamı) kullanılarak da ışık mikroskobunda gerçekleştirildi. 4×16 küçük kareye düşen tüm hücreler sayıldı. Hücre süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Formül 3-1):

$$\text{Toplam hücre sayısı/mL} = (\text{Hücre sayısı}/4) \times 10^4 \times \text{Seyreltme faktörü} \quad (\text{Formül 3-1})$$

3.5. Sitotoksosite Testleri

FB1'e maruz bırakılan hücrelerin canlılığının tespiti MTT ve Nötral kırmızı (NRU) testi uygulanarak gerçekleştirildi.

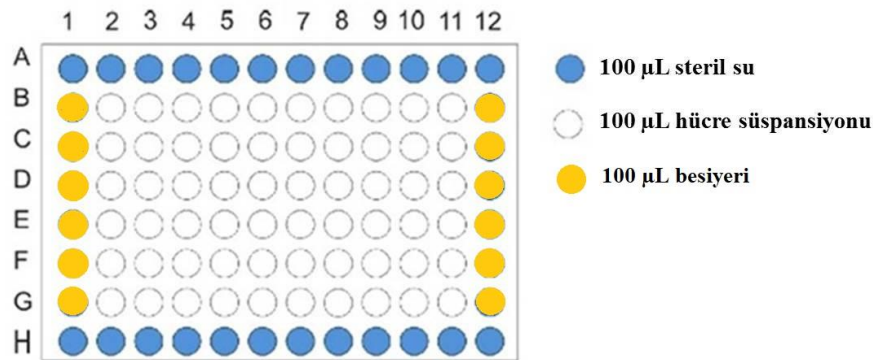
3.5.1. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

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

1. Bir rezervuar içerisine steril bidistile su konuldu ve inkübasyon sırasında kültür besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla 96 kuyucuklu mikroplakanın A ve H sıralarındaki her bir kuyucuğa 100 µL su dağıtıldı. 96 kuyucuklu mikroplakanın 1 ve 12. sütununun B-G sıralarındaki her bir kuyucuğuna ise 100 µL besiyeri dağıtıldı (Şekil 3-1).

2. Her bir kuyucukta 1×10^4 hücre 100 µL besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakanın diğer kuyucuklarına hücreler şu şekilde dağıtıldı: $6,5 \times 10^5$ hücre 6,5 mL besiyerinde süspande edildi ve steril rezervuar içerisine hücre süspansiyonu konuldu. 96 kuyucuklu mikroplakalara Şekil 3-1: 'de gösterildiği şekilde 100 µL hücre süspansiyonu dağıtıldı.

3. 96 kuyucuklu mikroplakadaki hücre süspansiyonu 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi.



Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikroplakaya hücre ekimi.

3.5.2. Test Maddesinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Sitotoksite testleri için FB1 stok çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 72,183 mg FB1 1 mL DMSO'da çözülerek ana stok çözelti hazırlandı.

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

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

%0,1'lik SDS çalışma çözeltisinin hazırlanışı: %1'lik SDS ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek hücrelere 0,1 mg/mL konsantrasyonunda SDS (~IC₅₀) pozitif kontrol olarak uygulandı (ISO-10993-5) ve çözelti içindeki PBS konsantrasyonunun da %1 olması sağlandı.

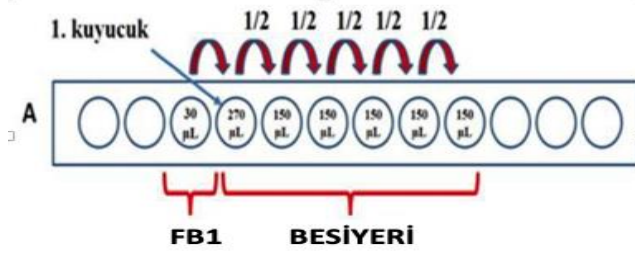
FB1'in çözündürüldüğü DMSO'nun hücrelere maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1'i geçmemesi gerektiğinden dolayı 100 katı konsantrasyonda stok çözeltisi halinde DMSO içerisinde hazırlandı. Daha sonra FB1 çözeltisinin farklı konsantrasyonları besiyerinde seyreltilerek aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

FB1 çözeltisinin seyreltilmesi: Stok çözeltiler 96 kuyucuklu mikrolakada 1/10 oranında besiyeri ile seyreltildi. Daha sonra hazırlanan bu çözeltilerden 1/2 oranında seyreltme yapılarak toplam 6 konsantrasyonda standart çözeltileri hazırlandı. Basamaklar her iki madde için de ayrı ayrı yapıldı. Seyreltme işlemi için uygulanan plaka düzeni Şekil 3-2'de gösterildi:

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

2. A sırasındaki 1. kuyucuğa FB1'in DMSO içinde hazırlanan çözeltisinden 30 µL konuldu ve iyice karıştırıldı.

3. 1. kuyucuktan 150 µL alınarak 2. kuyucuğa aktarıldı (1/2 oranında seyreltme), iyice karıştırıldı ve bu kuyucuktan 150 µL alınarak 3. kuyucuğa aktarıldı. Bu işlem 5. kuyucuk da dahil olmak üzere yapıldı. En son 6. kuyucuktaki fazla olan 150 µL atıldı. Bu şekilde toplam 6 konsantrasyonda olmak üzere FB1 seyreltmeleri hazırlanmış oldu.



Şekil 3-2: FB1'in 1/2 oranında seyreltilmesi.

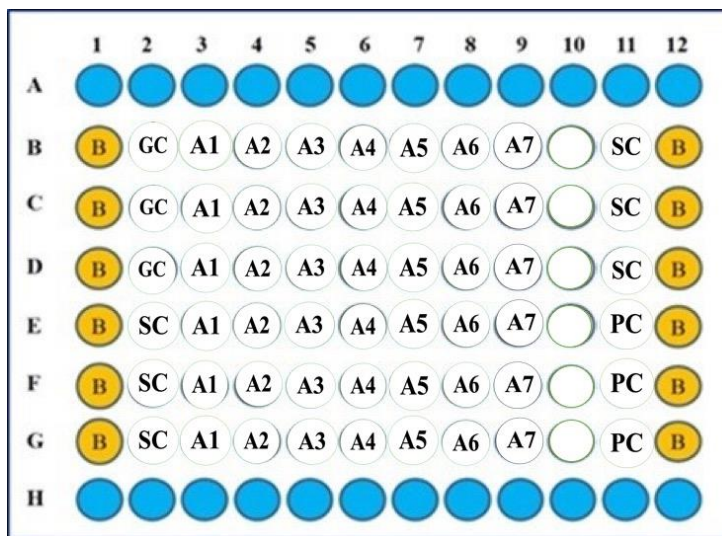
3.5.3. FB1'in Hücre Kültürüne Maruziyeti

1. Bölüm 3.6.1'de belirtilen 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücre kültür mikropalakasındaki kuyucuklardan (A ve H sırası hariç) 8 kanallı pipet kullanılarak kültür besiyeri uzaklaştırıldı.

2. Bu kuyucuklara 50 µL PBS (1x) ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi (kuyucuk yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin kazınmamasına, zarar görmemesine dikkat edilmelidir).

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

4. Maruziyet mikropalası Şekil 3-3'te gösterildiği şekilde düzenlendi:



Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikropalaka düzeni.

- A + H sıraları: Steril bidistile su
 B: Kültür besiyeri + hücre yok (blank, negatif kontrol)
 GC: Kültür besiyeri + hücre (hücre büyüme kontrolü)
 SC: Kültür besiyeri + hücre + DMSO (%1) (çözücü kontrolü)
 PC: Kültür besiyeri + hücre + SDS (0,1 mg/mL) (pozitif kontrol)
 A1, A2,,A7: Kültür besiyeri + hücre + FB1'in 7 farklı konsantrasyonu

5. 1 ve 12. Sütunların B-G kuyucuklarına 10 µL besiyeri konuldu (toplam 100 µL) (blank, negatif kontrol).
6. B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 10 µL hücre kültürü içeren besiyeri konuldu (hücre büyümesi kontrolü, GC).
7. B11, C11, D11, E2, F2 ve G2 kuyucuklarına 10 µL %10'luk DMSO çözeltisi konuldu (çözücü kontrolü, SC).
8. E11, F11 ve G11 kuyucuklarına 10 µL %0,1'lik SDS çözeltisi konuldu (pozitif kontrol, PC).

B3-G3, B4-G4, B5-G5, B6-G6, B7-G7, B8-G8, B9-G9 kuyucuklarına (A1-A7 şeklinde yazılmış kuyucuklara) Bölüm 3.6.2'de belirtildiği üzere seyreltmeleri yapılmış FB1 standart çözeltilerinden 10 µL tatbik edildi (7 konsantrasyon, her konsantrasyon için 6 tekrar yapıldı). Her test 1 mikropalakada 24 saatlik maruziyet için hazırlandı. Aynı düzende 2. farklı bir günde çalışılmak üzere toplam her konsantrasyon için 12 tekrar yapıldı.

96 kuyucuklu mikropalaka 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. MTT testi ve NRU testleri için, FB1 maruziyeti yukarda belirtildiği şekilde ayrı plakalar halinde hazırlandı.

3.5.4. MTT Testi

3.5.4.1. MTT Testinin Esası

MTT bileşiğinin tetrazolyum halkasının hücredeki (canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış) mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır (Mosmann, 1983; Alley ve ark., 1988). Canlı hücrede soluk sarı renkli MTT, enzim ile tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu koyu mavi-mor renkli çözünmeyen formazan ürününe dönüşür. Böylece canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Hücreler organik çözücü (örn. isopropanol, DMSO) ile çözündürüldükten sonra, oluşan formazan çözeltisine ait rengin

şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm’de (670 nm referans dalga boyuna karşı) ölçülür. MTT’nin redüksiyonu sadece metabolik olarak aktif olan hücrelerde meydana gelir ve bu aktivitenin seviyesi hücrelerin canlılıklarıyla ölçülür (Mosmann, 1983; Alley ve ark., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Van Meerloo ve ark., 2011).

3.5.4.2. MTT Testi Protokolü

MTT çözeltisinin hazırlanışı: 5 mg MTT, 1 mL CMF-PBS (1x) içinde çözündürüldü. Çözelti +4 °C’de karanlıkta saklandı.

Deney protokolü

1. Bölüm 3.6.3’te anlatıldığı gibi FB1 ile maruz bırakılan hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikropakanın her kuyucuğuna 20 µL MTT çözeltisi eklendi.
2. 150 rpm’de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.
3. 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 3 saat inkübe edildi.
4. Kuyucuklardaki üstteki sıvı atıldı ve kuyucuklara 100 µL %100’lük DMSO ilave edildi.
5. 150 rpm’de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.
6. Oluşan rengin şiddeti 590 nm’de (670 nm referans dalga boyuna karşı) mikropaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.5.5. NRU Testi

3.5.5.1. NRU Testinin Esası

Canlı hücreler lizozomlarında nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesine sahiptir. Böylece, hücre canlılığı nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesi ile ölçülür. Nötral kırmızı boyası zayıf katyonik bir boya olduğundan kolaylıkla hücre membranına penetre olur ve lizozomlarda intraselüler olarak birikir (lizozomal pH < sitoplazmik pH) ve oradaki anyonik bölgelerle lizozomal matrikse bağlanır. Hücre yüzeyinde ya da duyarlı lizozomal membrandaki değişiklikler nötral kırmızı boyasının alınmasını ve bağlanmasını azaltır. Böylelikle canlı hücreler boyayı tutarken, zarar görmüş ya da ölü hücreler tutamazlar. Boyanın nüfuz ettiği hücrelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 540 nm’de (690 nm referans dalga boyuna karşı) ölçülür (Fotakis ve Timbrell, 2006; Repetto ve ark., 2008).

3.5.5.2. NRU Testi Protokolü

NRU testi için çözeltilerin hazırlanışı

Nötral kırmızı boyası ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg nötral kırmızı boyası 10 mL hücre kültürü besiyerinde çözöldü. Çözelti steril 0,22 µm naylon enjektör ucu filtreden geçirildi. 1,5 mL'lik tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı. Boya kristallerinin iyi çözöndürölmesi için çözelti çalışma gününden önce 37 °C'de 1 gece inkübe edildi.

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

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

Deney protokolü

1. Bölüm 3.6.3'te anlatıldığı gibi FB1 ile maruz bırakılan hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikropłakanın kuyucuklarındaki besiyeri atıldı ve kuyucuklar 150 µL PBS (1x) ile yıkandı.
2. Her kuyucuğa 100 µL nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisi eklendi ve 37 °C'de 3 saat inkübe edildi.
3. Mikropłakanın kuyucuklarındaki boya çözeltisi atıldı ve 150 µL PBS (1x) ile dikkatlice yıkandı (nötral kırmızı boyası çalışma çözeltisinden kaynaklanabilecek boya kristallerinin kalmamasına dikkat edildi).
4. Her kuyucuğa 150 µL nötral kırmızı çözöndürme çözeltisi eklendi.
5. 150 rpm'de 10 dk. inkübatör dışında orbital çalkalayıcıda bekletildi.
6. Oluşan rengin şiddeti 540 nm'de (690 nm referans dalga boyuna karşı) mikropłaka okuyucu spektrofotometrede ölçöldü.

3.5.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

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

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

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

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

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

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

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

$$\% \text{ Relatif inhibisyon} = 100 - (\text{düzeltilmiş ort. OD}_{\text{Örnek}} \times 100 / \text{düzeltilmiş ort. OD}_{\text{SC}})$$

(Formül 3-2)

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

9. Eğriden %50 inhibisyona (hücre ölümüne) karşılık gelen konsantrasyon hesaplanarak çalışılan maddelerin IC₅₀ (%50 oranında hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon) değeri belirlendi.

3.6. Hücre Çoğalması (BrdU) Testi

3.6.1. BrdU Testi Esası

Hücrelerde proliferasyon düzeylerinin tespit edilmesi amacıyla, kolorimetrik ‘Bromodeoksiüridin (BrdU) ELISA Tayin Kiti’ (Roche) kullanılmıştır. Bu yöntem, çoğalan hücrelerde genomik DNA içerisine bir timidin analogu olarak dahil olan BrdU’nun antikor probolar kullanılarak işaretlenmesi ve S fazındaki hücrelerin tespit edilmesi prensibine dayanmaktadır (Russmann ve ark., 1993). BrdU testi üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi. BrdU-işaretli hücreler, 370 nm’de (492 nm referans dalga boyuna karşı) mikropılaka okuyuculu spektrofotometrede ölçülerek değerlendirilmiştir.

Kit içeriği

BrdU etiketleme reaktifi (1 mL; 1000x) (Vial 1): 10 mM 5-bromo-2'-deoksi üridin PBS’te, pH 7,4. 0,2 µm enjektör ucu filtreden geçirildi.

FixDenat (2×100 mL) (Vial 2):

Anti-BrdU-POD (Stabilize edilmiş liyofilizat) (Vial 3): Peroksidaz (POD) ile konjuge edilmiş fare-fare hibrid hücrelerinden elde edilen (klon BMG 6H8, Fab fragmanları) monoklonal antikor.

Antikor seyreltme çözeltisi (100 mL) (Vial 4)

Yıkama tamponu (100 mL, PBS 10x) (Vial 5)

Substrat çözeltisi (100 mL TMB, tetrametil-benzidin) (Vial 6)

BrdU testi için çözeltilerin hazırlanışı

BrdU etiketleme reaktifi çözeltisi: BrdU etiketleme reaktifi (Vial 1) 1: 100 kültür ortamı ile seyreltildi (konsantrasyon: 100 µM BrdU).

FixDenat çözeltisi: Kullanıma hazır halde bulunur.

Anti-BrdU-POD stok çözeltisi: Anti-BrdU-POD (Vial 3) 1,1 mL bidistilde suda çözüldü, 10 dk. boyunca çalkalanarak iyice karıştırıldı.

Anti-BrdU-POD çalışma çözeltisi: Anti-BrdU-POD stok çözeltisi 1: 100 oranında antikor seyreltme çözeltisi (Vial 4) ile seyreltildi. 96 kuyucuklu mikropılaka için

100 μ L Anti-BrdU-POD stok çözeltisi 10 mL antikor seyreltme çözeltisinde (Vial 4) seyreltili.

Yıkama tamponu: Konsantre yıkama çözeltisi (Vial 5) 1: 10 oranında bidistile su ile seyreltili. 96 kuyucuklu mikrolakaya için 10 mL konsantre yıkama çözeltisi (Vial 5) 90 mL distile su ile seyreltili.

Substrat çözeltisi: Kullanıma hazır halde bulunur.

Test maddeleri: Bölüm 3.5'te bahsedildiği şekilde FB1 için hazırlanan ana stok çözeltileri, son maruziyet konsantrasyonları 1, 10, 50 μ M olacak şekilde mikrolakaya uygulandı.

3.6.2. BrdU Testi Protokolü

1. Proliferasyon testi için çoğaltılan hücreler 96 kuyucuklu mikrolakaya her bir kuyucukta 1×10^4 hücre/100 μ L besiyeri olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelere son hacim 100 μ L olacak şekilde 1, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti yapılarak tekrar 24 saat inkübe edildi. 'Background' kontrol ve blank için de mikrolakada yer ayrıldı.

2. 'Background' kontrol hariç her bir kuyucuğa 10 μ L BrdU etiketleme çözeltisi eklendi (son konsantrasyon: 10 μ M BrdU) ve 37 °C'de 2,5 saat süreyle hücreler inkübe edildi. 'Background' kontrol, non-spesifik bağlanmaları kontrol etmek amacıyla kullanılır.

3. Inkübasyon sonrasında üst faz (besiyeri karışımı) döküldü.

4. Her bir kuyucuğa 200 μ L FixDenat (Vial 2) eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi.

5. Mikrolakadan FixDenat çözeltisi uzaklaştırıldı.

6. Her bir kuyucuğa 100 μ L anti-BrdU-POD çalışma çözeltisi ilave edildi. Yaklaşık 90 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

7. Mikrolakadan antikor konjugatı uzaklaştırıldı ve kuyucuklar üç kez 200 μ L yıkama çözeltisi (PBS, 1x) ile yıkandı.

8. Son yıkama çözeltisi de uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 μ L substrat çözeltisi eklendi. Fotometrik ölçüm için renk değişimi yeterli oluncaya kadar (5-30 dk.) oda sıcaklığında inkübe edildi.

9. Oluşan rengin şiddeti 370 nm’de (492 nm referans dalga boyuna karşı) mikropłaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.6.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Proliferasyon indeksini hesaplamak için önce kontrol ve maruziyet gruplarından blank değerlerinin ortalaması çıkarıldı. Maruziyet grubunun değerleri kontrol grubuna göre kıyaslanarak relatif BrdU hücre proleferasyonu % olarak hesaplandı.

3.7. FB1’in Hücre Dizilerine Maruziyeti

3.7.1. FB1 Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanışı

100 mM FB1 çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 72,183 mg FB1 1 mL DMSO’da çözülerek ana stok çözelti hazırlandı.

50 mM FB1 çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 100 mM FB1 çözeltisinden 500 µL alınarak PBS ile 1000 µL’ye tamamlandı.

10 mM FB1 çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 50 mM FB1 çözeltisinden 100 µL alındı ve PBS ile 500 µL’ye tamamlandı.

1 mM FB1 çözeltisinin hazırlanışı: Cam vial içinde 50 mM FB1 çözeltisinden 10 µL alındı ve PBS ile 500 µL’ye tamamlandı.

3.7.2. FB1 Maruziyet Flasklarının Hazırlanışı

Her bir 25cm²’lik flaska 1×10⁶ hücre 5 mL besiyeri içinde ekildi. CO₂’li inkübatörde 24 saat bekletildi. Flaskın içindeki besiyeri döküldü ve tekrar 5 mL taze besiyeri konuldu. Aşağıda belirtildiği şekilde FB1 maruziyetleri gerçekleştirildi:

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

1 µM FB1 maruziyeti: 5 µL 1 mM FB1 çözeltisi, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

10 µM FB1 maruziyeti: 5 µL 10 mM FB1 çözeltisi, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

50 µM FB1 maruziyeti: 5 µL 50 mM FB1 çözeltisi, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan flaska konuldu.

Bu şekilde FB1 1, 10, 50 μM konsantrasyonlarda olacak şekilde HK-2 hücrelerine uygulandı ve 24 saat boyunca 37°C 'lik %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. Aynı ortam koşullarında kontrol grupları da oluşturuldu. Her bir maruziyet konsantrasyonu için 5'er adet flaska ekim yapıldı ve deneyler 2. farklı bir günde tekrar edildi. En son maruziyet süreleri tamamlandıktan sonra FB1'e maruz bırakılan hücreler pasajlandı ve sayıldı. Besiyeri içindeki hücreler 4°C 'de $1000 \times \text{g}$ 'de 5 dk. santrifüj edildi, üstteki besiyeri atıldı ve hücreler PBS (1x) ile yıkanarak 4°C 'de $1000 \times \text{g}$ 'de 5 dk. tekrar santrifüj edildi. Hücreler PBS (1x)'te süspande edildi ve DNA ve RNA izolasyonunu yapabilmek amacıyla yaklaşık 1×10^6 sayıda hücre 200 μL PBS (1x) içinde olacak şekilde kısımlara ayrıldı.

3.8. DNA Metilasyonunun Analizi

3.8.1. DNA İzolasyonu

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

Kit içeriği

Bağlama tamponu: 6 M Guanidin HCl / 10 mM üre / 10 mM Tris HCl / %20 Triton-X 100 (v/v) (pH 4,4).

Proteinaz K: Liyofilize proteinaz K, 4,5 mL bidistile su ile çözündürüldü. - 20°C 'de saklandı.

İnhibitör temizleme: 5 M Guanidin HCl / 20 mM Tris HCl / alkol (pH 6,6).

Yıkama tamponu: 2 mM Tris HCl / alkol (pH 7,5).

Elüsyon tamponu: 4 M üre / 200 mM Tris / 20 mM NaCl / 200 mM EDTA (pH 7,4).

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1. Bölüm 3.7.2'de belirtildiği üzere FB1 maruziyeti yapılan 1×10^6 hücre 200 μL PBS içinde süspande edildi.

2. Üzerine 200 μ L bağlama tamponu, 40 μ L proteinaz K eklendi. Hemen karıştırıldı ve 70 °C’de 10 dk. inkübe edildi.
3. Üzerine 100 μ L isoproponal eklendi ve iyice karıştırıldı.
4. Kitin içerisinden çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.
5. Yukarıda hazırlanan çözelti filtreli tüpe konuldu ve 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
6. Filtreli tüpe 500 μ L inhibitör temizleme tamponu eklendi ve 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
7. Filtreli tüpe 500 μ L yıkama tamponu eklendi ve 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
8. Yıkama tamponunun kalıntılarını temizlemek üzere bir kez daha 10 sn. santrifüj edildi.
9. Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp 1,5 mL’lik mikrotüp içine yerleştirildi.
10. Önceden 70 °C’ye getirilmiş elüsyon tamponundan 100 μ L filtreli tüpe eklendi. 8000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi.
11. Elde edilen DNA’lar daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C’de buzdolabında saklandı.

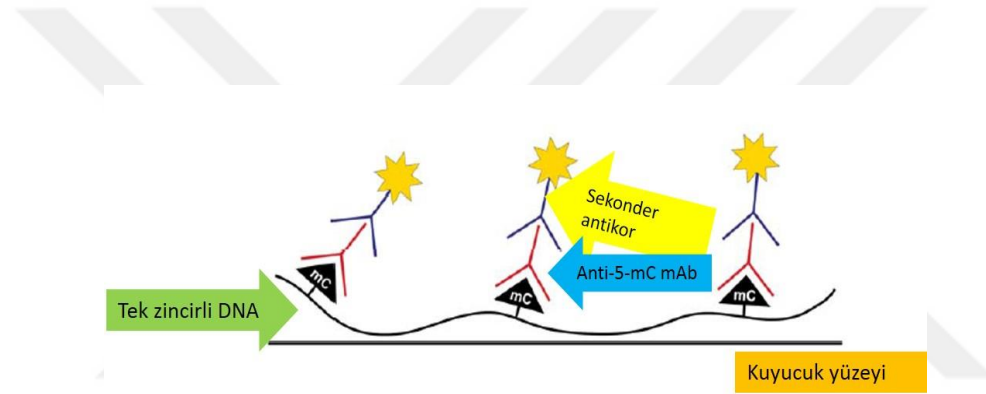
3.8.2. DNA’nın Saflık ve Miktar Tayini

1, 10, 50 μ M konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrasında HK-2 hücrelerinden izole edilen DNA’ların miktarı ve saflığı ‘Take-3 Plate’ kullanılarak mikropilaka okuyucu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm’de ölçülen absorbans değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng ya da μ g düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. 260 nm dalga boyunda okunan değer ile 280 nm ve 230 nm dalga boylarında ölçülen değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi verir. Saflaştırılmış DNA’da A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranı yaklaşık 1,75-1,8 üzerinde olmalıdır.

3.8.3. Global DNA Metilasyonunun Tayini

3.8.3.1. Deneyin Esası

5-metilsitozin (5-mC) içeriğinin tayini, global olarak DNA metilasyonundaki değişiklikleri tayin etmede hızlı ve kullanışlı bir parametredir (Christman, 1982; Ramsahoye, 2002; Fuke ve ark. 2004). DNA'nın metillenmiş fraksiyonu, yakalama ve saptama antikorları kullanılarak saptanır ve daha sonra mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede absorbansı ölçülerek kolorimetrik olarak incelenir. Metillenmiş DNA miktarı ölçülen optik dansite (OD) ile orantılıdır (Şekil 3-4). Bu amaçla, DNA'da 5-mC'nin tayini '5-mC DNA ELISA Kit' (Epigentek) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.



Şekil 3-4: 5-mC DNA ELISA kitinin esası.

Kit içeriği

ME1: 10x Yıkama tamponu: 4 °C'de saklanmalı.

ME2: Bağlama çözeltisi: Oda sıcaklığında saklanmalı

ME3: Negatif kontrol (20 µg/mL)*: -20 °C'de saklanmalı.

ME4: Pozitif kontrol (20 µg/mL)*: -20 °C'de saklanmalı.

ME5: Yakalama antikor (1000 µg/mL)*: 4 °C'de saklanmalı.

ME6: Dedeksiyon antikor (400 µg/mL)*: -20 °C'de saklanmalı.

ME7: Güçlendirici çözelti: -20 °C'de saklanmalı.

ME8: Developer çözelti: 4 °C'de saklanmalı.

ME9: Durdurucu çözelti: Oda sıcaklığında saklanmalı

*Kullanmadan önce spin attırıldı.

3.8.3.2. Deney Protokolü

1. Yıkama tamponu hazırlanışı: 26 mL ME1, 234 mL distile su içine eklendi.

2. Pozitif kontrol (ME4) standart çözeltileri aşağıdaki gösterildiği şekilde hazırlandı:

Tüp	ME4 (10 ng/μL)	1x TE	ME4 (Son konsantrasyonu)
1	0,5 μL	9,5 μL	0,5 ng/μL
2	0,5 μL	4,5 μL	1,0 ng/μL
3	0,5 μL	2 μL	2,0 ng/μL
4	1,25 μL	1,25 μL	5,0 ng/μL
5	2 μL	0,0 μL	10,0 ng/μL

DNA bağlama

3. Kullanılacak sayıda kuyucuk plaka çerçevesinden dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

4. Her kuyucuğa 80 μL ME2 bağlama çözeltisi eklendi.

5. 1 μL ME3, 1 μL ME4 standart çözeltileri ve 100 ng örnek DNA'sı belirlenmiş kuyucuklara eklendi.

6. Plaka parafilm ile kaplandı ve 37 °C'de 90 dk. inkübe edildi. Her kuyu üç defa 150 μL dilüe ME1 ile yıkandı.

Metillenmiş DNA'yı yakalama

7. ME5, (1: 1000) oranında dilüe ME1 ile seyreltildi.

8. Her kuyucuğa 50 μL dilüe ME5 eklendi ve oda sıcaklığında 60 dk. inkübe edildi.

9. Dilüe ME5 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 μL dilüe ME1 ile 3 kez yıkandı.

10. ME6, (1: 2000) oranında dilüe ME1 ile seyreltildi.

11. Her kuyucuğa 50 μL dilüe ME6 eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi.

12. Dilüe ME6 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 µL dilüe ME1 ile 4 kez yıkandı.

13. ME7, (1: 5000) oranında dilüe ME1 ile seyreltildi.

14. Her kuyucuğa 50 µL dilüe ME7 eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi.

15. Dilüe ME7 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 µL dilüe ME1 ile 5 kez yıkandı.

Sinyal tayini

16. Her kuyucuğa 100 µL ME8 ilave edildi ve 1-10 dk. ışıktan uzakta oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnek kuyularda ve kontrol kuyularında renk değişimi izlendi. Yeterli miktarda metile DNA bulunduğu ME8 çözeltisinin rengi maviye döner.

17. Pozitif kontrol kuyularındaki renk maviye döndüğünde, enzim reaksiyonunu durdurmak için her bir kuyucuğa 100 µL ME9 ilave edildi. Mikrokuyucukların bulunduğu çerçeve hafifçe sallanarak çözelti karıştırıldı ve renk reaksiyonunun tamamen durdurulmasını sağlamak için 1-2 dk. beklendi. ME9 ilave edildikten sonra renk sarı renge dönüştü ve oluşan rengin şiddeti 450 nm’de mikropilaka okuyucu spektrometrede ölçüldü.

3.8.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Pozitif kontrol standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisi yardımıyla DNA örneklerindeki metilasyon oranı % olarak belirlendi.

3.8.4. Tümör Baskılayıcı Genlerin Metilasyon Analizi

3.8.4.1. Deneyin Esası

Tümör baskılayıcı genleri (94 adet) kapsayan ‘Tumor Suppressor Gen (TSG) EpiTect Methyl II PCR Array’ (SABioscience, Qiagen; Frederick, MD) panel arrayler kullanıldı. DNA örnekleri restriksiyon enzimleriyle inkübe edildi. Restriksiyon endonükleazları tarafından kesime uğrayan DNA’lar SYBR Green qPCR master karışımı ile muamele edildikten sonra, DNA metilasyon panel arrayleri kullanılarak eş-zamanlı PCR ile analiz edildi. Bu sistem, seçilmiş panellerde yer alan 94 farklı tümör baskılayıcı gene-özgü DNA metilasyon düzeylerinin kantitatif olarak tespitine olanak sağlamaktadır. Yöntemde kullanılan ‘Tumor Suppressor Gen (TSG) EpiTect Methyl II PCR Array’

panelinde yer alan fonksiyonel gen grupları; epigenetik, apoptoz, hücre siklusu, DNA hasarı ve onarımı, sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyon faktörleri ile ilişkili olanlardır. Bu panelde aşağıda belirtilen genlerdeki DNA metilasyonlarının tespiti yapılmıştır (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: ‘Tumor Suppressor Gen (TSG) ‘EpiTect Methyl II PCR Array’ Paneli’nde yer alan genlerin adı ve fonksiyonları.

Fonksiyonu	Gen isimleri
Anjiyogenez	<i>AKT1, CAV1, CDH13, CDX2, CTNNB1, ERBB2, LOX, NF1, PTEN, VEGFA</i>
Apoptoz	<i>AKT1, BCL2, BIRC5, BRAF, BRCA1, CADM1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, DAPK1, DLC1, E2F1, FAS, GSTP1, MDM2, MEN1, MGMT, NF1, NFKB1, NME1, PTEN, PYCARD, RUNX3, SFN, SFRP1, SLC5A8, TGFB1, TIMP3, TP53, TP73, VEGFA, VHL</i>
Hücre adhezyonu	<i>ABL1, APC, CADM1, CD44, CDH1, CDH13, CDKN2A, CTNNB1, EGFR, ERBB2, NF1, NF2, OPCML, RET, SPARC, THBS1, VEGFA</i>
Hücre siklusu	<i>ABL1, APC, ATM, BIRC5, BRCA1, BRCA2, CADM1, CCND1, CCND2, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN3, CHFR, DIRAS3, E2F1, EGFR, FHIT, HIC1, ING1, MDM2, MEN1, MLH1, MYC, NEUROG1, NF1, NF2, NME1, PTCH1, PTEN, PYCARD, RASSF1, RB1, RUNX3, SFN, SLC5A8, SMARCB1, SPARC, TERT, TGFB1, TP53, TP73, TSC1, TSC2, VHL, WT1, WWOX</i>
Kemotaksis, hücre migrasyonu ve motilitesi	<i>CDH13, CDKN1B, DLC1, EGFR, HRAS, NF1, NF2, PTEN, PTGS2, TSC2, VEGFA</i>
Hücre iskeleti	<i>ABL1, APC, BIRC5, BRCA2, CDH13, CDKN1B, DLC1, EGFR, NF1, NF2, PTEN, TSC1</i>
DNA hasarı ve onarımı	<i>ABL1, APC, ATM, BRCA1, BRCA2, CDKN1A, MGMT, MLH1, SFN, TERT, TP53, TP73, XRCC1</i>
Epigenetik	<i>BRCA2, DIRAS3, FOS, MGMT, RB1, SMARCB1</i>
Epitel-mezenkimal geçiş	<i>BRCA2, CAV1, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2B, CTNNB1, EGFR, ERBB2, NME1, RUNX3, TGFB1</i>
Oksidatif stres	<i>LOX, PTGS2, WWOX</i>
Sinyal iletimi	<i>AKT / PI3K sinyal yolağı: AKT1, ERBB2, NF1, PTEN, SH3PXD2A, TSC2. EGF sinyal yolağı: EGFR, ERBB2. Estrogen sinyal yolağı: BRCA1, BRCA2, ESR1. Hedgehog sinyal yolağı: PTCH1. Insulin sinyal yolağı: AKT1, IGF2R, SOCS1, TSC2. JAK / STAT sinyal yolağı: SOCS1. PDGF sinyal yolağı: PTEN, VEGFA. Small GTPase sinyal yolağı: BCR, BRAF, CDH13, DIRAS3, DLC1, HRAS, NF1, RASSF1, TSC1, TSC2. TGFb / BMP sinyal yolağı: SMAD4, TGFB1, TGFB2. TNF sinyal yolağı: PYCARD. VEGF sinyal yolağı: AKT1, VEGFA. WNT sinyal yolağı: APC, CTNNB1, DKK3, SFRP1, SFRP2, WIF1.</i>

Transkripsiyon faktörleri	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, CDX2, CTNNB1, E2F1, ESR1, FOS, HIC1, HOXA1, JUN, MYC, MYCN, NEUROG1, NFKB1, PRDM2, RARB, RB1, RUNX3, SMAD4, TGFB1, TP53, TP73, VHL, WT1</i>
Diğerleri	<i>PDLIM4, SCGB3A1, ZMYND10</i>

Kit içeriği

Restriksiyon parçalama tamponu

RNaz-DNaz içermeyen su

Reaksiyon karışımı

Metilasyona duyarlı enzim A

Metilasyona bağlı enzim B

SYBR Green qPCR master karışımı

Mo restriksiyon enzim karışımı

Ms restriksiyon enzim karışımı

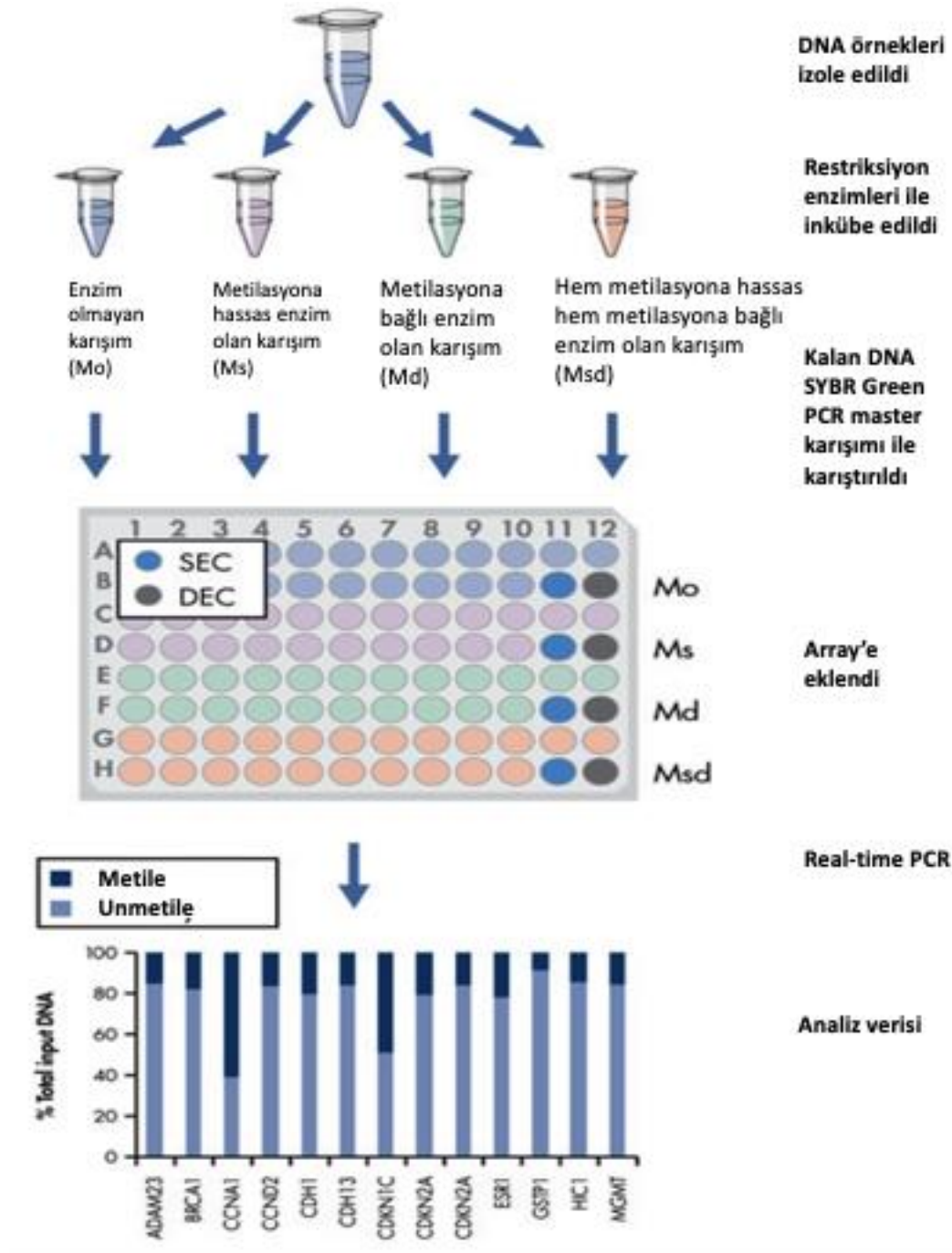
Md restriksiyon enzim karışımı

Msd restriksiyon enzim karışımı

4 adet plaka

3.8.4.2. Deney Protokolü

Deney protokolü Şekil 3-5’de gösterilmiştir.



Şekil 3-5: Tumor Supressor Gen (TSG) 'EpiTect Methyl II PCR Array'lerin deney protokol şeması

Restriksiyon enzimleri ile kesim

EpiTect Methyl II DNA Restriction Kit kullanılarak genomik DNA, metilasyona duyarlı ve/veya metilasyona bağımlı restriksiyon enzimleri ile kesildi.

1. Bu amaçla, öncelikle her bir DNA örneği için toplam hacim 470 µL olacak şekilde 100 µL 5x restriksiyon parçalama tampon ve su ile enzim içermeyen reaksiyon karışımı hazırlandı.

Madde	Hacim
Genomik DNA (2 µg)	Değişebilir
5x Restriksiyon parçalama tamponu	100 µL
RNaz-DNaz içermeyen su	Değişebilir
Toplam Hacim	470 µL

2. Aşağıda gösterildiği şekilde 4 farklı restriksiyon enzim karışımı hazırlandı:

Bileşen	Mo (µL)	Ms (µL)	Md (µL)	Msd (µL)
Reaksiyon karışımı	116	116	116	116
Metilasyona duyarlı enzim A	-	2	-	2
Metilasyona bağlı enzim B	-	-	2	2
RNaz-DNaz içermeyen su	4	2	2	-
Toplam hacim (µL)	120	120	120	120

Mo: enzim olmayan karışım

Ms: metilasyona hassas enzim olan karışım

Md: metilasyona bağlı enzim olan karışım

Msd: hem metilasyona hassas, hem metilasyona bağlı enzim olan karışım

3. Hazırlanan karışımlar 6 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 20 dk. 65°C’de inkübasyon ile reaksiyon durduruldu. Her bir restriksiyon enzimi ile kesim için reaksiyon karışımı aşağıdaki gösterildiği gibi hazırlandı:

Bileşen	Mo (µL)	Ms (µL)	Md (µL)	Msd (µL)
SYBR Green qPCR master karışımı	590	590	590	590
Mo restriksiyon enzim karışımı	120	-	-	-
Ms restriksiyon enzim karışımı	-	120	-	-
Md restriksiyon enzim karışımı	-	-	120	-
Msd restriksiyon enzim karışımı	-	-	-	120
RNaz-DNaz içermeyen su	470	470	470	470
Total hacim (µL)	1180	1180	1180	1180

Eş-zamanlı PCR Analizi

4. ‘Tumor Supressor Gen (TSG) EpiTect Methyl II PCR Array’lere Mo, Ms, Md, Msd restriksiyon enzim karışımlarından 10 µL 384 kuyucuklu mikrolakada ilgili kuyucuklara eklendi. 384 kuyucuklu mikrolaka düzeni aşağıdaki gibidir:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms
B	G01		G02		G03		G04		G05		G06		G07		G08		G09		G10		G11		G12	
C	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd
D	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms
E	G13		G14		G15		G16		G17		G18		G19		G20		G21		G22		G23		G24	
F	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd
G	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms
H	G25		G26		G27		G28		G29		G30		G31		G32		G33		G34		G35		G36	
I	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd
J	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms
K	G37		G38		G39		G40		G41		G42		G43		G44		G45		G46		G47		G48	
L	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd
M	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms
N	G49		G50		G51		G52		G53		G54		G55		G56		G57		G58		G59		G60	
O	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd
P	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms
	G61		G62		G63		G64		G65		G66		G67		G68		G69		G70		G71		G72	
	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd
	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms
	G73		G74		G75		G76		G77		G78		G79		G80		G81		G82		G83		G84	
	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd
	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms	Mo	Ms
	G85		G86		G87		G88		G89		G90		G91		G92		G93		G94		SEC		DEC	
	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd	Md	Msd

5. Mikrolakanın kuyucuklarının üstü jelatin ile kapatıldı. Hava kabarcığı kalmasını engellemek için 2000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Mikrolaka eşzamanlı PCR cihazına konularak analiz gerçekleştirildi. Eşzamanlı PCR çalışma protokolü aşağıda gösterilmiştir:

Siklus	Sıcaklık °C	Süre
1	95	10 dk.
3	99	30 sn.
	72	1 dk.
40	97	15 sn.
	72	1 dk.

3.8.4.3. Veri Analizi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Eş-zamanlı PCR analizi sonucu elde edilen Ct değerleri SABiosciences web sayfasından indirilen EpiTect Metil II Array excel dosyasına girildi (www.sabiosciences.com/dna_methylation_data_analysis.php). Sonuçlar, excel şablonunda otomatik olarak hesaplandı. Excel formatında genlerin metilasyon seviyeleri ‘%’ değerler olarak alındı. Tüm örnekler üç tekrarlı olarak çalışıldı ve hesaplama ortalama değerler göz önünde bulundurularak kontrole kıyasla ‘%’ değişimlerle yapıldı.

3.9. Gen Ekspresyonlarının Tayini

3.9.1. Total RNA İzolasyonu

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

Kit içeriği

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

DNaz I (rekombinant, liyofilize): 10 KU liyofilize DNaz I. Çözündürüldükten sonra 500 µL’lik tüplere bölünerek -20 °C’de saklandı.

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

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

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

Elüsyon tamponu: PCR kalitede su.

Filtreli tüp, toplama tüpü

Deney protokolü

1. Bölüm 3.7.2’de belirtildiği üzere FB1 maruziyeti yapılan 1×10^6 hücre 200 µL PBS (1x) içinde süspande edildi.

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

3. Kitin içerisinde çıkan toplama tüpüne filtreli tüp yerleştirildi.

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

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

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

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

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

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

10. Filtreli tüp 1,5 mL’lik mikrotüp içine yerleştirildi.

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

12. Elde edilen RNA’lar, cDNA sentezi için -80 °C’de saklandı.

3.9.2. RNA’nın Saflık ve Miktar Tayini

1, 10, 50 µM konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonrasında HK-2 hücrelerinden izole edilen RNA’ların miktarı ve saflığı ‘Take-3 Plate’ kullanılarak mikropilaya okuyucu spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm’deki ölçümler RNA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. RNA’nın saflığının belirlenmesinde kullanılan A_{260}/A_{280} oranı ise yaklaşık $1,95 \pm 0,1$ olmalıdır.

3.9.3. cDNA Sentezi

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

Ölçüm sonucunda elde edilen RNA’lardan cDNA sentezi için total 500 ng olacak şekilde ‘Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit’ (Roche Life Science) ile üretici firmanın vermiş olduğu kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirildi.

Kit içeriği

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

Transkriptör ters transkriptaz reaksiyon tamponu (x5): 1 mL; 250 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂ (pH 8,5)

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

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

Anchored-oligo (dT)₁₈ primer: 100 µL

Random heksamer primer: 100 µL

Kontrol RNA: 20 µL

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

PCR kalitede su

Deney protokolü

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

Toplam RNA: 500 ng

Anchored-oligo(dT)₁₈ primer (vial 5): 1 µL

Random heksamer primer (vial 6): 1 µL

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

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

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

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

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

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

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

7. Tüp buz üstüne alınarak reaksiyon durduruldu.

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

3.9.4. Gen Ekspresyonlarının RT-PCR ile Tayini

Global DNA metilasyonunda rol oynayan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyon tayini Tablo 3-2’deki primer dizileri kullanılarak RT-PCR ile gerçekleştirildi. Metil array sonuçlarına göre en fazla değişiklik gözlenen genlerin ekspresyon analizinde kullanılan primerler Tablo 3-3’te verilmiş olup, bu genlerin ekspresyonları RT-PCR ile gerçekleştirildi.

Kullanılan malzemeler

‘SYBR® Green PCR Master Mix’ karışımı,

Gene özgün primerler (Tablo 3-2, Tablo 3-3)

PCR kalitede su.

Tablo 3-1: Global DNA metilasyonunda rol oynayan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyon analizlerinde kullanılan primer dizileri.

Gen adı	Primer dizisi (5’-3’)	Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>DNMT1</i>	F: CCTCCAAAAACCCAGCCAAC R: TCCAGGACCCTGGGGATTTC	60	Ahmadnejad ve ark., 2017
<i>DNMT3a</i>	F: GGTCACGCAAAACAGAACCC R: CCTTGGTGAAACCCTTTGCG	59	Gu ve ark., 2017
<i>DNMT3b</i>	F: CTCTTCCTCAGCTGTGTGGG R: CTGTCGGCACTGTGGTTTTG	59	Gu ve ark., 2017
<i>MGMT</i>	F:TGCACAGCCTGGCTGAATG R: GGTGAACGACTCTTGCTGGAA	58	Lai ve ark., 2008
<i>β-Aktin</i>	F:AACTACCTTCAACTCCAT R: TGATCTTGATCTTCATTGTG	48	Rosa ve ark., 2009

Tablo 3-2: Metilasyon array sonuçlarına göre seçilen genlerin ekspresyon analizlerinde kullanılan primer dizileri.

Gen adı	Primer dizisi (5’-3’)	Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>CD44</i>	F: AGCCCATGTTGTAGCAAACCC3 R: TGAGGTACAGGCCTCTGAT	57	Hooshmand ve ark., 2016
<i>CDKN1A</i>	F: TAGCAGCGGAACAAGGAG R: AAACGGGAACCAGGACAC	55	Chen ve ark., 2015

<i>CDKN2B</i>	F: CCCTCGACACTCACCATGAA R: CGACCCCTGGAATGTCACAC	60	Aveyard ve Knowles, 2004
<i>CTNNB1</i>	F: AGCCACAAGATTACAAGAAC R: AGGCTAGGGTTTGCTAAATTC	55	Roth ve ark., 2005
<i>MYC</i>	F: CAGCTGCTTAGACGCTGGATT R: GTAGAAATACGGCTGCACCGA	60	Jacobs ve ark., 2013
<i>PTEN</i>	F: CGACGGGAAGACAAGTTCAT R: AGGTTTCCTCTGGTCCTGGT	58	Ling- Li ve ark., 2015
<i>CDKN2A</i> <i>/P16</i>	F: CACCAGCGTGTCCAGGAA R: CCCTGGCTCTGACCATTCTGT	65	Padhi ve ark., 2017

3.9.4.1. Deney Protokolü

1. Aşağıdaki gösterildiği gibi uygun miktarlarda bileşenler ilave edilerek RT-PCR karışımı hazırlandı ve dikkatlice pipetleme yapıldı:

‘SYBR® Green PCR Master Mix’ karışımı:	10 µL
10 µM forward primer:	1 µL
10 µM reverse primer:	1 µL
PCR kalitede su:	3 µL
Toplam hacim:	15 µL

2. Hazırlanan PCR karışımından 15 µL mikrolakanın her kuyucuğuna ilave edildi.

3. cDNA örnekleri steril su ile 1:5 oranında seyreltilti.

4. Hazırlanan cDNA örneklerinden 5 µL her bir kuyucuğa eklendi ve mikrolakanın üzeri mikrolaka filmi ile kapatıldı.

5. Mikrolaka 1500 x g’de 2 dk. santrifüj edildi.

6. Mikrolaka LightCycler 480 RT-PCR cihazına konularak ölçüm yapıldı. RT-PCR protokolü Tablo 3-3’te gösterilmiştir.

Tablo 3-3: RT-PCR protokolü.

Program adı	Siklus	Sıcaklık °C	Süre
Polimeraz aktivasyonu	1	95	2 dk.
Denatürasyon	40	95	5 sn.
Primerlerin hedef DNA' ya bağlanması	40	48-64	10 sn.
Uzama	40	72	5-20 sn.
Uzama	1	72	1 dk.

Sonuçların değerlendirilmesi

Tablo 3-3'te primer dizileri verilen genler ve referans gen olarak kullanılan β -*aktin* için spesifik RT-PCR kantitatif Ct değerleri belirlendi. Genlerin relatif ekspresyonu kontrol grubuna göre karşılaştırmalı Ct yöntemi ile değerlendirildi.

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

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

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksikite Sonuçları

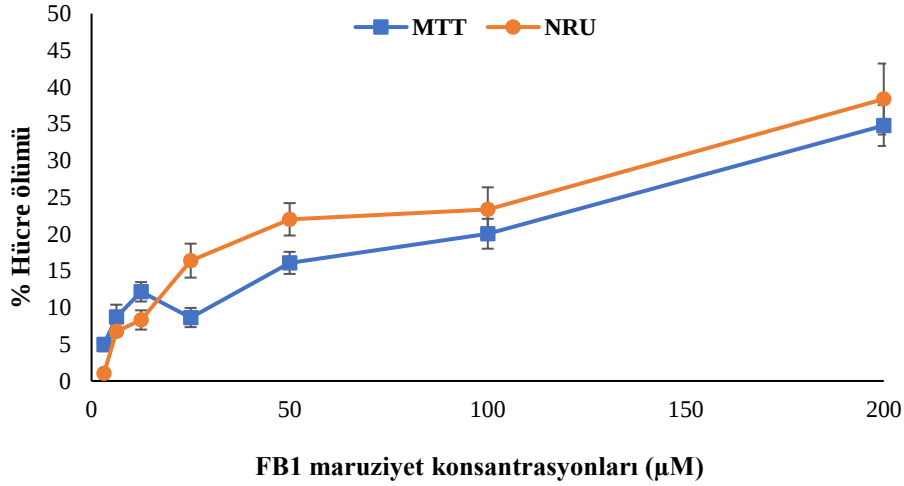
FB1'in HK-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, hücre canlılığının kantitatif ölçümüne dayanan MTT ve NRU testleri ile yapıldı. MTT ve NRU testleri için hücreler, FB1 ile 7 farklı konsantrasyonda ve 6'şar tekrarlı olacak şekilde maruz bırakıldı. Aynı zamanda, testler farklı günlerde 2 kez tekrarlandı.

Tablo 4-1'de 3,125-200 μ M konsantrasyon aralığında 7 konsantrasyonda FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri % ölüm ve standart sapma değerleri gösterilmiştir. MTT ve NRU testleri ile HK-2 hücrelerinde 24 saatlik, 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarındaki FB1 maruziyetinin konsantrasyona karşı % hücre ölümü grafikleri Şekil 4-1'de gösterilmiştir. 200 μ M maruziyet konsantrasyonunda MTT testi ile %34,76 ve NRU testi %38,40 oranında ölüm görülmüştür. Dolayısıyla %50'lik inhibisyon konsantrasyonuna ulaşamamıştır. IC₅₀ hesaplanamamıştır. Daha önceki çalışmalardan (Demiel ve ark., 2015; Sancak ve Ozden, 2015) elde edilen verilere göre FB1'in sitotoksitesinin değerlendirilmesinde ve maruziyet konsantrasyonlarının belirlenmesinde daha yüksek konsantrasyonların çalışılmasına gerek duyulmamıştır.

Tablo 4-1: 24 saat 3,125- 200 μ M konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri % ölüm ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları	FB1	
	MTT	NRU
	% Ölüm $\pm$ SD	% Ölüm $\pm$ SD
3,125 μ M	4,95 $\pm$ 0,92	1,01 $\pm$ 0,28
6, 25 μ M	8,68 $\pm$ 1,70	6,74 $\pm$ 0,56
12,5 μ M	12,14 $\pm$ 1,32	8,30 $\pm$ 1,31
25 μ M	8,64 $\pm$ 1,30	16,38 $\pm$ 2,31
50 μ M	16,10 $\pm$ 1,50	22 $\pm$ 2,20
100 μ M	20,04 $\pm$ 2,03	23,40 $\pm$ 3
200 μ M	34,76 $\pm$ 2,78	38,40 $\pm$ 4,83

SD: Standart sapma ('standard deviation').



Şekil 4-1: 24 saat 3,125-200 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde MTT ve NRU testleri sonuçları.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4.2. BrdU Hücre Proliferasyonu Testi Sonuçları

24 saat 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde BrdU testi ile kontrole kıyasla hücre proliferasyonunda 50 ve 100 µM FB1 konsantrasyonlarında sırasıyla 1,25 kat ($p<0,05$) ve 2,24 kat ($p<0,001$) oranlarında anlamlı artış tespit edildi (Tablo 4-2 ve Şekil 4-2).

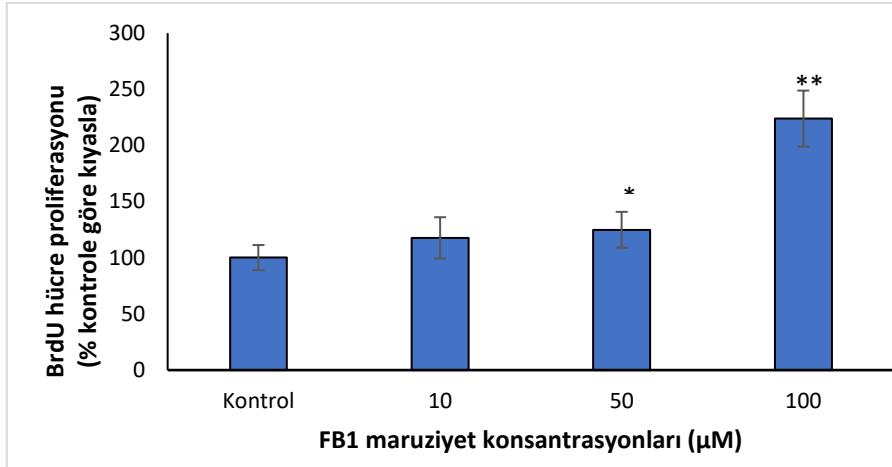
Tablo 4-2: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde % hücre proliferasyonu ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları	FB1 % Hücre proliferasyonu $\pm$ SD
Kontrol	100,15 $\pm$ 11,18
10 µM	117,72 $\pm$ 18,40
50 µM	125,00* $\pm$ 16,00
100 µM	224,00** $\pm$ 25,00

SD: Standart sapma ('standard deviation').

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$;

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).



Şekil 4-2: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde % hücre proliferasyonu (kontrole göre kıyasla) üzerine etkisi.

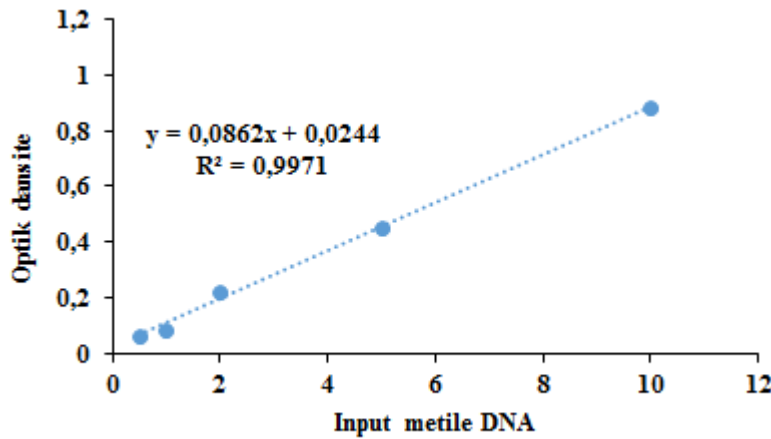
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,05;

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,001 (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.3. Global DNA Metilasyonu Sonuçları

Global 5-mC içeriğinin kantitatif tayini 5-mC Eliza kit ile gerçekleştirildi. Bölüm 3.10.3'te anlatıldığı şekilde %5-mC miktarı kit ile temin edilen standartlar ile hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplandı (Şekil 4-3).



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

24 saat 10, 50 ve 100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde %5-mC seviyeleri Tablo 4-3 ve Şekil 4-4'de gösterilmiştir. %5-mC seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla 100 µM FB1 maruziyeti yapılan hücrelerde 2,23 (p<0,001) kat anlamlı artış olarak belirlenirken; 10 µM FB1 ve 50 µM FB1 maruziyeti

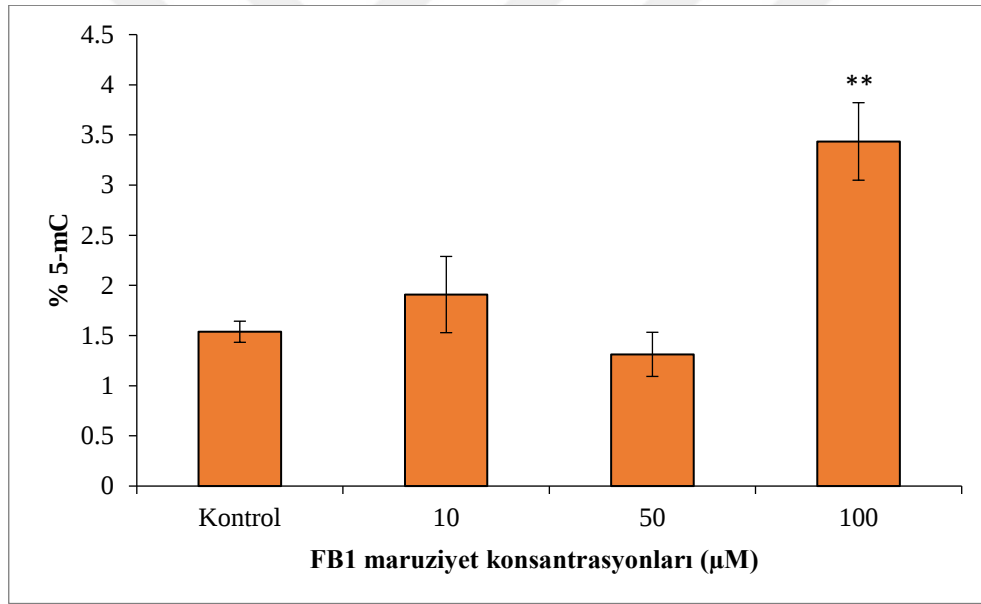
yapılan hücrelerde anlamlı olmayan sırasıyla 1,33 kat artış ve %15 oranında azalma gözlemlendi.

Tablo 4-3: 24 saat 0-100 μ M konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde relatif %5-mC ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonları	FB1
	%5-mC $\pm$ SD
Kontrol	1,54 $\pm$ 0,10
10 μ M	2 $\pm$ 0,38
50 μ M	1,31 $\pm$ 0,22
100 μ M	3,43** $\pm$ 0.39

SD: Standart sapma ('standard deviation').

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,001$; (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).



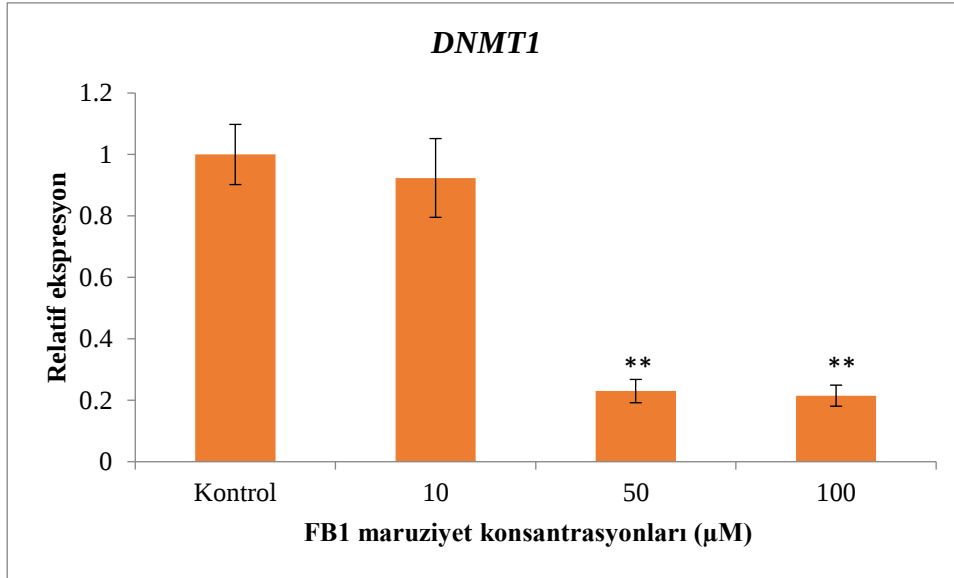
Şekil 4-4: 24 saat 0-100 μ M konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde % 5-mC seviyeleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,001$; (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.3.1. DNA metiltransferaz Genlerinin Ekspresyon Sonuçları

24 saat 10, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *DNMT1* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda sırasıyla 4,35 ve 4,65 kat anlamlı azalmalar tespit edildi. (Şekil 4-5).

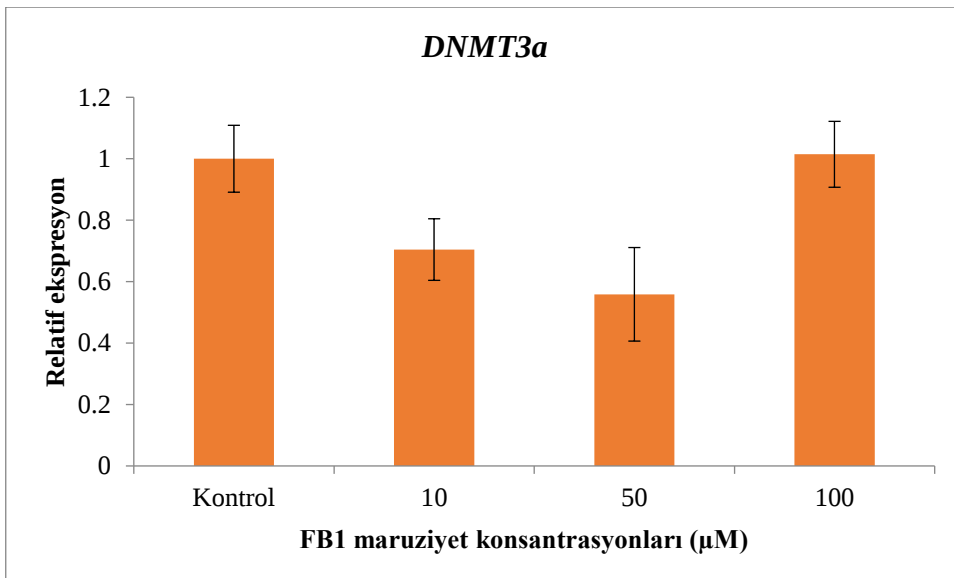


Şekil 4-5: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *DNMT1* genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).

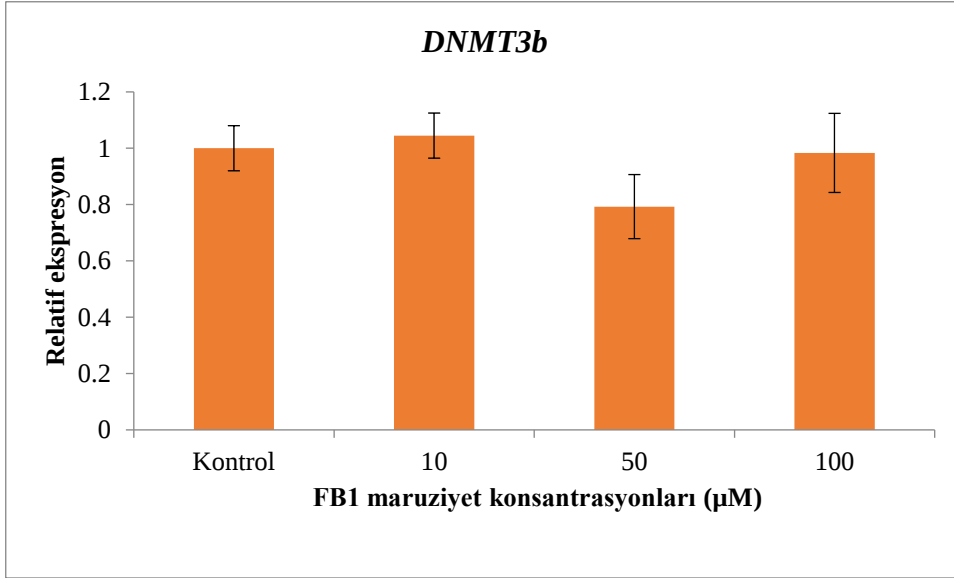
** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı p<0,001; (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

24 saat 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *DNMT3a* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla 10 ve 50 µM konsantrasyonlarda anlamlı olmayan azalmalar tespit edilirken; 100 µM'da değişiklik gözlenmedi (Şekil4-6).



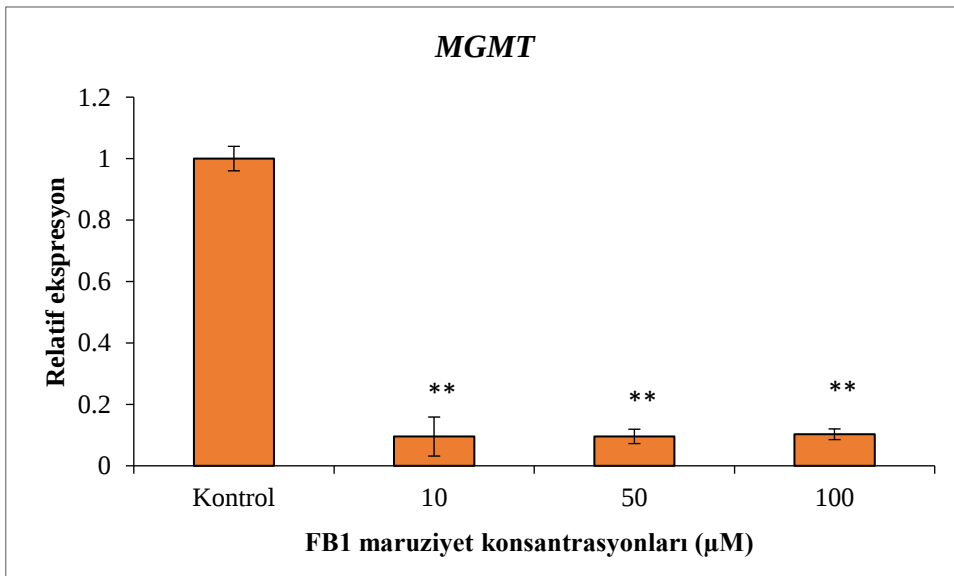
Şekil 4-6: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *DNMT3a* genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.

24 saat 10, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *DNMT3b* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 50 μM konsantrasyonlarda anlamlı olmayan azalma tespit edilirken, 10 ve 100 μM konsantrasyonlarda değişiklik gözlenmedi (Şekil 4-7)



Şekil 4-7: 24 saat 0-100 μM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *DNMT3b* genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.

24 saat 10, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *MGMT* geni ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla; 10, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda sırasıyla, 10,5; 10,5 ve 9,8. kat anlamlı ($p < 0,001$) azalmalar tespit edildi (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde MGMT1 genine ait relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p < 0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).

4.4. Tümör Baskılayıcı Genlerin Panel Array'ler ile Metilasyon Sonuçları

HK-2 hücrelerinde 10; 50 ve 100 µM konsantrasyonda 24 saat FB1 maruziyetinin tümör baskılayıcı genlerde metilasyon üzerine etkileri panel arrayler ile çalışılarak araştırıldı. FB1'in tümör baskılayıcı genlerin % metilasyon seviyeleri üzerine etkileri Tablo 4-4'de gösterilmiştir.

50 ve 100 µM konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonucu; *ABL1*, *APC*, *ATM*, *BCR*, *BIRC5*, *BRAF*, *BRCA1*, *CAV1*, *CD44*, *CDH1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN3*, *CDX2*, *CTNNB1*, *DAPK1*, *DIRAS3*, *EGFR*, *ERBB2*, *FAS*, *FHIT*, *GSTP1*, *HOXA1*, *HRAS*, *IGF2R*, *ING1*, *JUN*, *MDM2*, *MEN1*, *MGMT*, *MLH1*, *MYC*, *NF1*, *NF2*, *NFKB1*, *NME1*, *PRDM2*, *PTCH1*, *PTEN*, *PTGS2*, *RASSF1*, *RB1*, *RET*, *SFN*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SOCS1*, *TGFB1*, *TGFB2*, *THBS1*, *TP53*, *TSC1*, *TSC2*, *VEGFA*, *VHL*, *XRCC1*, *ZMYND10* genlerinde, metilasyon seviyelerinde anlamlı derecede artış gözlenmiştir. 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda FB1 maruziyeti sonucu; *BCL2*, *CADM1*, *CCND1*, *CCND2*, *CDH13*, *CHFR*, *DKK3*, *DLC1*, *ESR1*, *HIC1*, *LOX*, *MYCN*, *NEUROG1*, *OPCML*, *PDLIM4*, *PYCARD*, *RARB*, *RUNX3*, *SCGB3A1*, *SFRP1*, *SFRP2*, *SH3PXD2A*, *SLC5A8*, *SPARC*, *TERT*, *TIMP3*, *TP73*, *WIF1*, *WT1*, *SEC* ve *DEC* genlerinde metilasyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Tablo 4-4: FB1'in tümör baskılayıcı genlerin % metilasyon seviyeleri üzerine etkileri

Metilasyon seviyeleri (%)					Metilasyon seviyeleri (%)				
FB1 maruziyeti (µM)					FB1 maruziyeti (µM)				
Genler	K	10	50	100	Genler	K	10	50	100
ABL1	3,29	2,16	1,11	51,40	MLH1	0,55	0,19	0,09	72,48
AKT1	1,81	1,56	0,39	0,17	MYC	1,10	0,38	0,12	62,90
APC	1,63	0,13	0,04	39,59	MYCN	99,72	99,41	99,86	99,81
ATM	1,88	0,65	0,45	69,53	NEUROG1	99,84	99,99	99,88	99,97
BCL2	99,78	100,0	99,95	99,96	NF1	1,31	0,39	0,29	50,80
BCR	0,54	0,24	0,10	76,17	NF2	0,17	0,05	0,04	55,18
BIRC5	0,91	0,39	0,20	57,32	NFKB1	0,10	0,05	33,25	57,74
BRAF	0,01	0,01	0,02	8,79	NME1	0,83	0,20	0,06	60,68
BRCA1	1,75	1,14	0,64	60,92	OPCML	98,97	99,36	99,36	99,55
BRCA2	1,71	0,24	0,08	0,001	PDLIM4	99,91	99,91	99,84	99,97
CADM1	99,85	99,94	99,84	99,94	PRDM2	52,03	53,04	63,86	76,26
CAV1	1,14	0,51	36,33	58,61	PTCH1	0,38	0,13	0,13	64,69
CCND1	0,00	0,00	16,75	18,93	PTEN	0,21	0,02	0,00	59,30

CCND2	99,34	99,65	99,72	99,78	PTGS2	33,33	0,00	0,004	63,40
CD44	3,02	0,97	0,40	58,64	PYCARD	99,86	99,91	100,0	99,89
CDH1	66,76	1,02	49,12	49,46	RARB	99,47	99,31	99,61	99,89
CDH13	99,94	99,85	99,98	99,98	RASSF1	0,11	0,05	0,08	58,28
CDKN1A	0,85	0,12	0,15	59,57	RB1	0,13	0,05	0,14	77,68
CDKN1B	1,30	0,86	0,13	54,10	RET	0,02	0,10	0,02	63,98
CDKN1C	37,60	31,78	65,10	79,64	RUNX3	98,80	99,03	99,27	99,17
CDKN2A	55,09	55,19	63,37	79,19	SCGB3A1	99,21	99,79	99,86	99,78
CDKN2B	0,16	0,06	0,02	60,12	SFN	1,34	0,75	0,22	62,18
CDKN3	0,29	0,14	0,07	67,41	SFRP1	99,89	99,70	99,87	99,88
CDX2	1,31	0,67	0,12	63,55	SFRP2	99,52	99,45	99,55	99,75
CHFR	99,93	99,87	99,92	99,87	SH3PXD2A	99,82	99,62	99,88	99,88
CTNNB1	0,11	0,05	0,03	68,78	SLC5A8	99,95	99,82	99,95	99,70
DAPK1	68,90	78,05	83,92	90,89	SMAD4	0,02	33,36	0,15	63,47
DIRAS3	53,49	55,49	61,83	79,95	SMARCB1	0,00	0,03	0,10	51,54
DKK3	99,70	99,61	99,84	99,63	SOCS1	60,96	66,87	71,31	81,94
DLC1	99,80	99,41	99,83	99,99	SPARC	99,63	99,45	99,64	99,95
E2F1	0,28	0,12	13,08	19,37	TERT	99,68	99,71	99,87	99,72
EGFR	0,15	0,05	0,02	58,52	TGFB1	0,64	0,33	0,16	63,47
ERBB2	1,32	0,20	0,09	57,70	TGFB2	0,23	0,02	0,01	68,00
ESR1	99,62	99,81	99,95	100,0	THBS1	0,20	0,00	0,001	65,96
FAS	0,43	0,12	0,03	65,40	TIMP3	98,18	98,94	98,89	99,07
FHIT	0,11	0,02	0,12	43,99	TP53	3,30	2,81	1,77	62,68
FOS	0,35	0,05	14,33	16,89	TP73	99,97	99,86	99,97	99,96
GSTP1	1,44	0,15	0,03	54,75	TSC1	2,33	0,20	0,08	53,07
HIC1	99,71	99,55	99,86	99,73	TSC2	0,56	0,10	0,05	60,97
HOXA1	0,29	0,04	0,001	82,67	VEGFA	0,19	0,00	0,02	53,14
HRAS	1,00	16,77	0,12	28,04	VHL	0,07	0,00	15,16	56,51
IGF2R	0,28	0,02	0,11	70,83	WIF1	99,03	99,57	99,79	99,88
ING1	0,86	0,50	0,46	77,26	WT1	100,0	99,97	99,91	99,93
JUN	0,64	0,26	0,11	64,18	WWOX	0,30	0,03	16,79	21,65
LOX	99,97	99,87	99,89	99,84	XRCC1	33,34	0,00	0,01	58,72
MDM2	0,32	0,23	0,21	30,72	ZMYND10	59,11	60,97	74,49	80,54
MEN1	0,22	0,06	0,04	66,58	SEC	0,20	28,25	0,21	62,09
MGMT	59,28	58,14	75,89	79,48	DEC	99,44	99,98	99,88	99,78

94 tümör baskılayıcı genden FB1 maruziyeti sonrası metilasyon seviyesinde anlamlı düzeyde değişiklik gözlenen genler Tablo 4-5 'te verilmiştir.

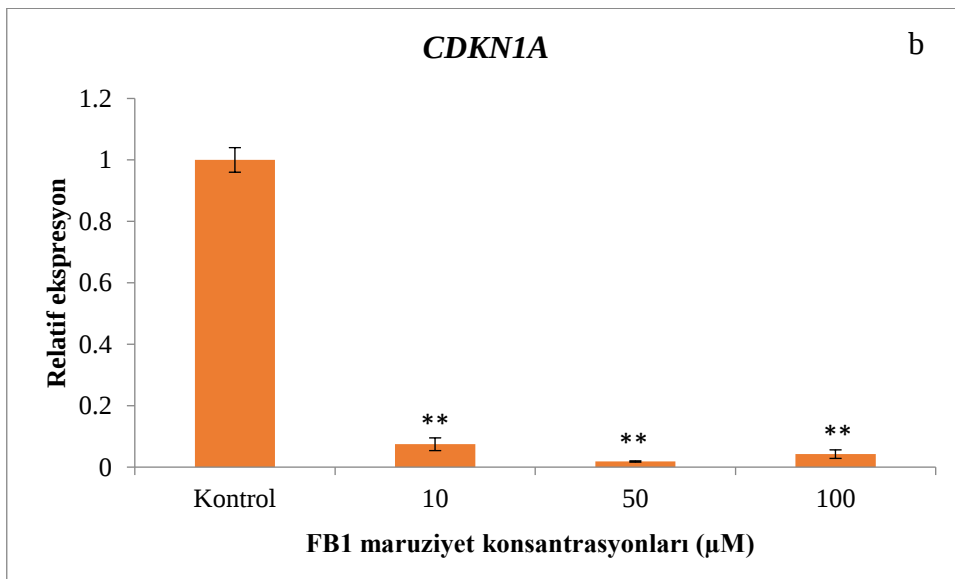
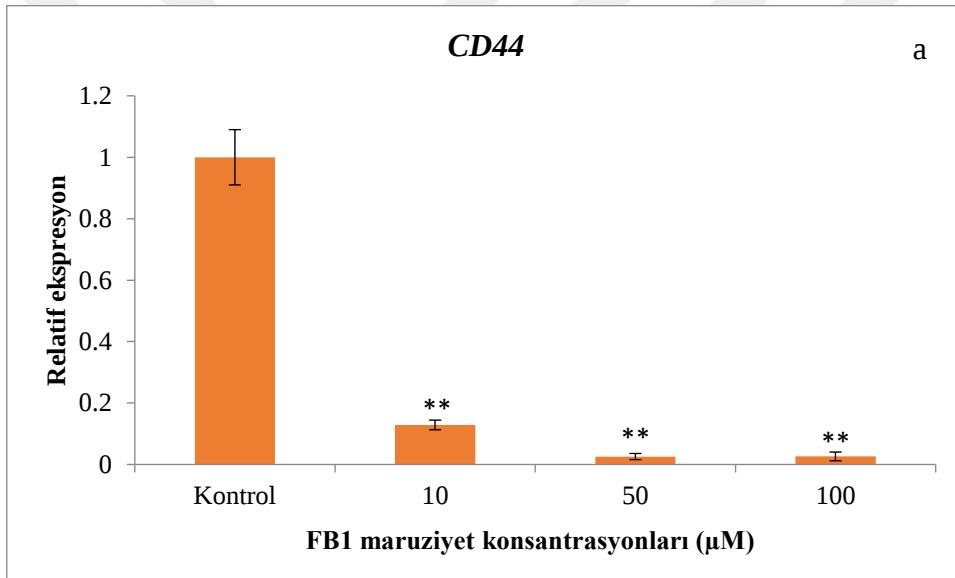
Tablo 4-5: 94 tümör baskılayıcı genden FB1 maruziyeti sonrası metilasyon seviyesinde değişiklik gözlenen genler

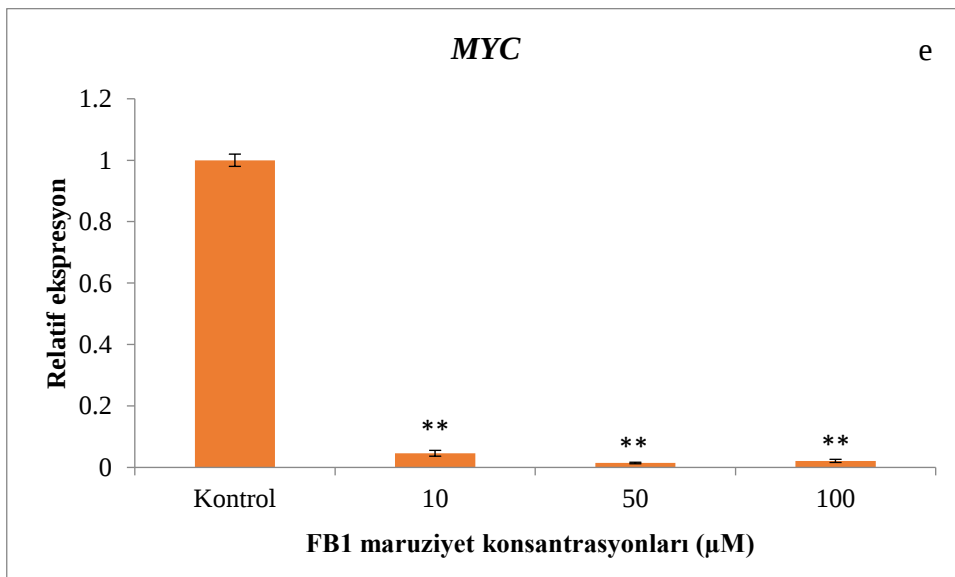
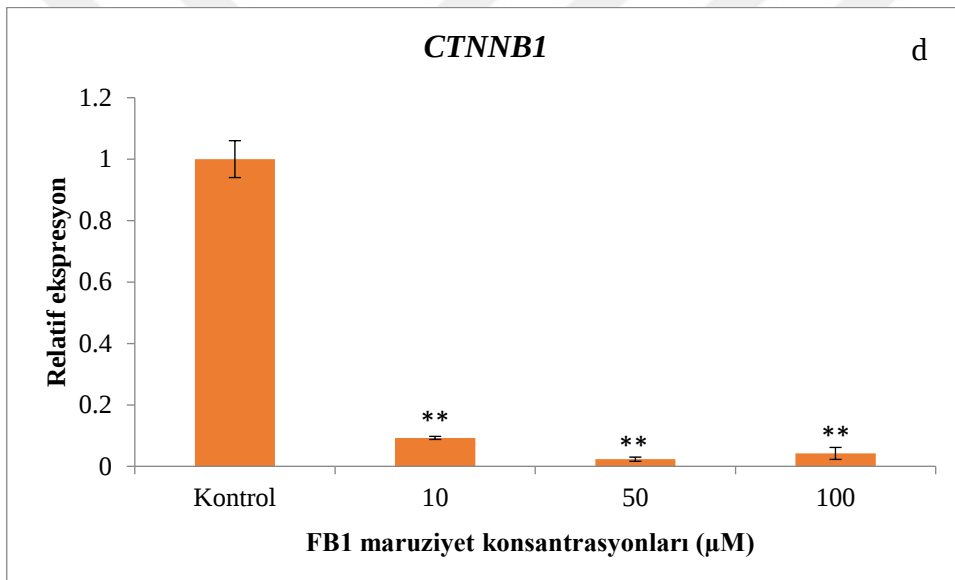
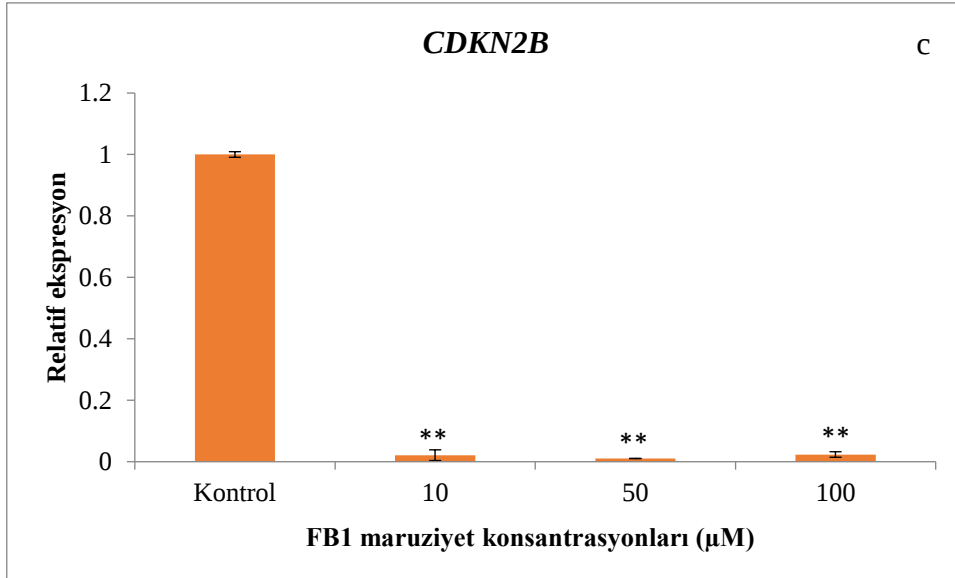
Genler	Metilasyon seviyeleri (%)		
	Kontrol	100 µM	P değeri
ABL1	3,29 ± 0,37	51,40 ± 1,83	<0,001
APC	1,63 ± 2,70	39,59 ± 7,4	<0,001
ATM	1,88 ± 2,64	69,53 ± 10,2	<0,001
BCR	0,54 ± 0,6	76,17 ± 15,4	<0,001
BIRC5	0,91 ± 1,3	57,32 ± 8,77	<0,001
BRAF	0,01 ± 0,000	63,22 ± 8,79	<0,001
BRCA1	1,75 ± 1,9	60,92 ± 9,96	<0,001
CAV1	1,14 ± 1,7	58,61 ± 6,73	<0,001
CD44	3,02 ± 4,70	58,64 ± 12,17	<0,001
CDH1	66,76 ± 57,56	49,46 ± 5,2	<0,001
CDKN1A	0,85 ± 0,7	59,57 ± 3,52	<0,001
CDKN1B	1,3 ± 1,97	54,07 ± 3,35	<0,001
CDKN1C	37,6 ± 11,44	79,64 ± 7,07	0,001
CDKN2A	55,09 ± 7,33	79,19 ± 7,77	0,007
CDKN2B	0,16 ± 0,25	60,12 ± 6,27	<0,001
CDKN3	0,29 ± 0,45	67,42 ± 1,88	<0,001
CDX2	1,31 ± 2,00	63,55 ± 8,80	<0,001
CTNNB1	0,11 ± 0,13	68,78 ± 13,83	<0,001
DAPK1	68,9 ± 11,70	90,89 ± 6,10	0,009
DIRAS3	53,49 ± 7,50	79,95 ± 8,16	0,016
EGFR	0,15 ± 0,22	58,52 ± 6,72	<0,001
ERBB2	1,32 ± 2,08	57,70 ± 8,09	<0,001
FAS	0,43 ± 0,70	65,40 ± 12,60	<0,001
FHIT	0,11 ± 0,14	43,99 ± 3,82	<0,001
GSTP1	1,44 ± 2,43	54,75 ± 5,75	<0,001
HOXA1	0,29 ± 0,50	82,67 ± 15,04	<0,001
HRAS	1 ± 1,22	28,04 ± 3,25	<0,001
IGF2R	0,28 ± 0,44	70,83 ± 17,51	<0,001
ING1	0,86 ± 1,08	77,26 ± 19,80	<0,001
JUN	0,64 ± 0,84	63,18 ± 4,39	<0,001
MDM2	0,32 ± 0,55	30,72 ± 5,70	<0,001
MEN1	0,22 ± 0,22	66,58 ± 7,10	<0,001
MGMT	59,28 ± 8,40	79,48 ± 13,37	<0,001
MLH1	0,55 ± 0,91	72,47 ± 16,54	<0,001
MYC	1,1 ± 1,77	62,90 ± 8,97	<0,001
NF1	1,31 ± 2,24	50,80 ± 0,80	<0,001
NF2	0,17 ± 0,09	55,18 ± 1,36	<0,001
NFKB1	0,1 ± 0,10	57,74 ± 5,80	<0,001
NME1	0,83 ± 1,42	60,70 ± 8,50	<0,001
PRDM2	52,03 ± 7,49	76,26 ± 5,45	<0,001
PTCH1	0,38 ± 0,54	64,69 ± 16,38	<0,001
PTEN	0,21 ± 0,36	59,31 ± 2,61	<0,001
PTGS2	33,33 ± 57,73	63,40 ± 7,12	<0,001
RASSF1	0,11 ± 0,18	58,28 ± 3,99	<0,001
RB1	0,13 ± 0,23	77,70 ± 18	<0,001
RET	0,02 ± 0,02	63,98 ± 1,24	<0,001
SFN	1,34 ± 2,16	62,18 ± 9,74	<0,001
SMAD4	0,02 ± 0,03	63,47 ± 0,96	<0,001
SMARCB1	0 ± 0,000	51,54 ± 10	<0,001
SOCS1	60,96 ± 9,89	81,94 ± 12,91	<0,001
TGFB1	0,64 ± 1,10	63,47 ± 10,13	<0,001
TGFBR2	0,23 ± 0,23	68,00 ± 13,60	<0,001
THBS1	0,2 ± 0,33	65,96 ± 15,20	<0,001
TP53	3,3 ± 3,61	62,70 ± 11,57	<0,001
TSC1	2,33 ± 0,031	53,07 ± 3,51	<0,001
TSC2	0,56 ± 0,78	60,97 ± 1,48	<0,001
VEGFA	0,19 ± 0,29	53,14 ± 11,20	<0,001
VHL	0,075 ± 0,10	56,51 ± 4,07	<0,001
XRCC1	33,34 ± 57,73	58,72 ± 9,77	<0,001
ZMYND10	59,11 ± 8,18	80,54 ± 4,11	<0,001

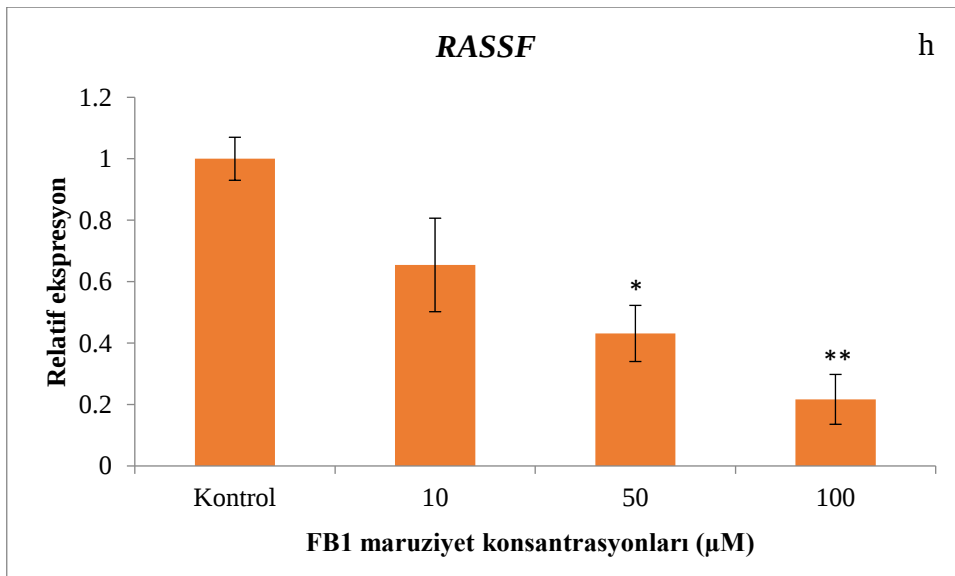
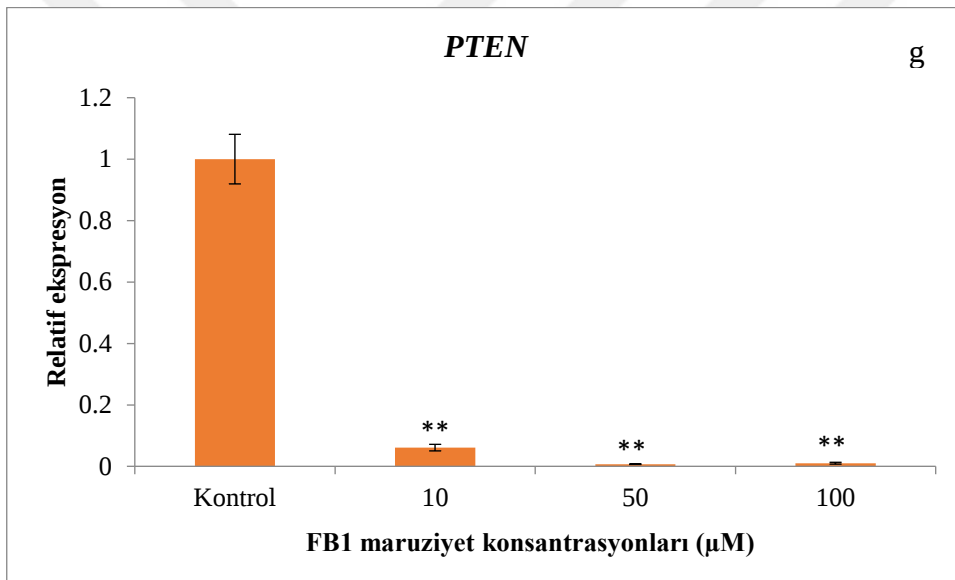
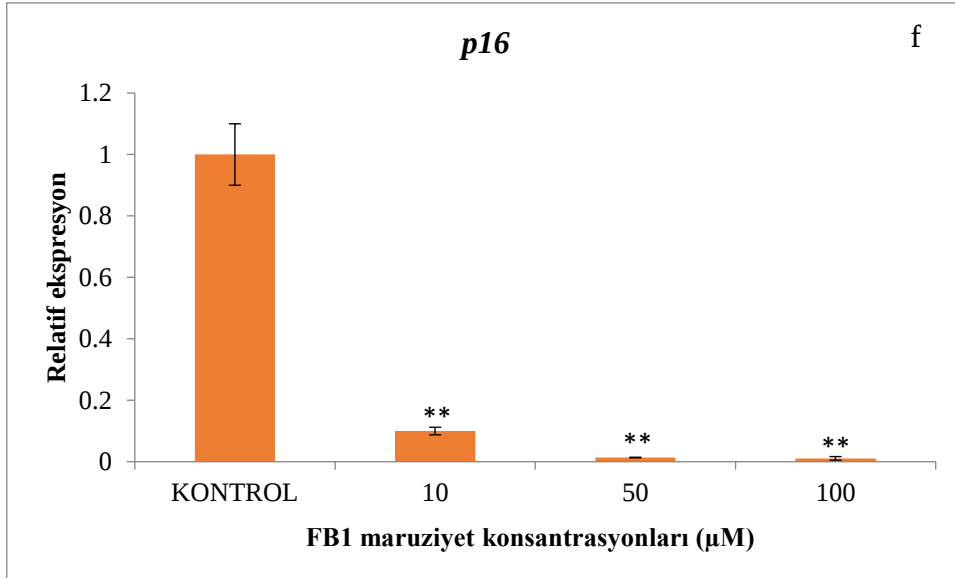
Yapılan FB1 ile ilgili toksisite araştırmaları incelendiğinde metilasyonda değişiklik gözlenen genler arasında FB1 toksisitesi ile ilişkili olabilecek genlerin (*CD44*, *CDKN1A*, *CDKN2B*, *CTNNB1*, *MYC*, *PTEN*, *RASSF* ve *p16*) ekspresyon analizleri de amacıyla gerçekleştirildi.

4.5. Metilasyonda Değişiklik Gözlenen Genlerin Ekspresyon Sonuçları

FB1 toksisitesi ile ilişki olan seçilen genlerin ekspresyon analizlerinin sonucu Şekil 4-9 (a-h)'de gösterilmiştir. Metilasyon sonucu ile uyumlu olarak *CD44*, *CDKN1A*, *CDKN2B*, *CTNNB1*, *MYC*, *PTEN*, *RASSF* ve *p16* genlerinin ekspresyonunda kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm maruziyet konsantrasyonlarında 7,77 kattan daha fazla ($p<0,001$) anlamlı derecede azalma gözlenmiştir.







Şekil 4-9: 24 saat 0-100 µM konsantrasyon aralığında FB1 maruziyeti yapılan HK-2 hücrelerinde *CD44* (a), *CDKN1A* (b), *CDKN2B* (c), *CTNNB1* (d), *MYC* (e), *P16* (f), *PTEN* (g) ve *RASSF1* (h) genlerine ait relatif ekspresyon seviyeleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (n=3).

* kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,05$;

** kontrol grubundan önemli ölçüde farklı $p<0,001$ (ANOVA-Post Hoc Dunnet testi).



5. TARTIŞMA

Mikotoksinler küf mantarları tarafından üretilen ve yaygın olarak tarımsal ürünleri kontamine eden sekonder toksik metabolitlerdir. Bu toksinler tarımsal dekontaminasyon proseslerine dayanabilen, stabil, uzun süre yaşayabilen, kimyasal olarak farklı yapıları olan bileşiklerdir. Bu bileşikler besin zincirine girebilmekte ve ‘mikotoksikozis’ olarak bilinen zehirlenmelere sebep olabilmektedirler (Wentzel ve ark., 2017). İnsan ve hayvan sağlığı açısından oldukça fazla toksik etkileri gözlenmektedir. Gıda ve Tarım Örgütü’ne göre küresel yem ve gıdaların yaklaşık %25’i mikotoksinler tarafından kontamine durumdadır (Goossens ve ark., 2012). *Fusarium* türleri de ekonomik açıdan en önemli mikotoksinlerdendir (Moretti ve ark., 2017). Pekçok alt tipe sahip olan Fumonisin türlerinden içlerinde en çok rastlanılanı FB1’dir. En çok mısır kaynaklı olduğu bilinen fakat çeşitli tahıllar ile insan ve hayvanların maruz kaldığı FB1’in gıdalar ile birlikte alınması durumunda farklı organlarda ciddi zararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Uluslararası Kanseri Araştırma Merkezi (IARC), hayvan deneylerine ve insanlarda özofagus kanserine sebep olmasına dayanarak FB1’i insanlar için muhtemel karsinojen (Grup 2B) grubunda sınıflandırmıştır (IARC, 1993).

FB1 yapısal olarak sfingozin ve sfinganine benzer özelliği dolayısıyla sfingolipidler ile yer değiştirmekte ve seramid sentaz enzimini inhibe etmektedir. Böylelikle, sfinganin N-açılsfinganine dönüşmemekte ve serbest sfinganin birikmekte ve SA/SO oranı artmaktadır (Merril ve ark.; Wang ve ark., 1999). Sfingolipidlerin durumlarındaki bu değişiklikler, ana görevleri olan, membran ve lipoprotein yapısını korumak, hücre içi ve hücreler arası iletişimi sağlamak gibi hayati görevlerinin aksamasına sebep olmaktadır (Turner ve ark., 1999). Bu değişikliklerin kanser gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ancak FB1’in karsinojenik etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. 1995 yılında Gelderblom ve ark. (1995)’ları tarafından yapılan çeşitli in vitro genotoksisite test sistemlerinde FB1’in genotoksik özelliklerinin olmadığı gösterilmiştir (Gelderblom ve ark., 1995). Gelderblom ve ark. (1996)’ları tarafından non-genotoksik bir karsinojen olduğu ileri sürülmüştür (Gelderblom ve ark., 1996).

Epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA’ların regülasyonu olmak üzere sınıflandırılabilir. (Yan ve ark. 2010) Bu mekanizmaların herhangi birinde meydana gelen hata genin sessizleşmesine veya aktifleşmesine sebep olarak epigenetik hasar meydana getirebilmektedir. Pek çok

çalışmada aflatoksinlerin gen spesifik DNA metilasyon seviyelerinde değişikliklerine neden olduğu gösterilmektedir. Zhang ve ark. (2002; 2003)'ları, aflatoksin B1'e maruz kalmış insan hepatoselüler karsinoma hastalarında tümör DNA'sında promotor hipermetilasyon sonucu *RASSF1*, *MGMT* ve *p16* tümör baskılayıcı genlerinin inaktive olduğunu göstermiştir (Zhang ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2003). Bir başka çalışmada ise; mikotoksinle beslenen farelerin oositlerinde transkripsiyonel aktivasyonla ilişkili olan H3K9me3 ve H4K20me3 seviyeleri artarken; sırasıyla transkripsiyonel baskılama ve transkripsiyonel aktivasyonla ilişkili olan H3K27me3 ve H4K20me2 seviyeleri azalmıştır (Zhu ve ark., 2014). Bu değişikliklerin AFB1 ile beslenen farelerin oositlerinin gelişimsel yeterliliklerinin azalmasında rol oynayabileceği ve bunun da artmış global DNA hipermetilasyonu ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Zhu ve ark., 2014). Liu ve ark. (2015)'ları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 4 hafta boyunca AFB1'e maruz bırakılmış sıçan karaciğerinde p53-aracılı DNA hasar onarımında rol oynayan miR-34a-5p ile bazı miRNA'ların egülasyonlarında değişiklikler olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2015).

CpG promoter bölgelerinde DNA metilasyonunun FB1 toksisitesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Laboratuvarında daha önce yürütülen araştırmalarda FB1'in, global DNA hipometilasyonunu, tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerinde ise DNA hipermetilasyonunu indüklediği ve histon modifikasyonlarında değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (Demirel ve ark., 2015, Sancak ve Özden, 2015). Demirel ve ark. (2015)'ları tarafından sıçan böbrek ve karaciğer hücrelerinde *p15*, *p16*, *VHL*, *e-cadherin* ve *c-myc* gibi önemli tümör baskılayıcı genlerde gen spesifik DNA metilasyonu analizi yapılmış ve bu genlerin promotör bölgelerinde metilasyon değişiklikleri bildirilmiştir (Demirel ve ark., 2015). Yapılan diğer bir çalışmada ise; transkripsiyonel baskılanma ile ilişkili histon H3K9, H3K27 ve H4K20 metilasyonlarında ve transkripsiyonel aktivasyonla ilişkili H3K4, H3K36 metilasyonlarında FB1'in değişikliklere sebep olabileceği bulunmuştur (Sancak ve Özden, 2015). FB1'in 25, 50 ve 100 µM NRK-52 hücrelerine maruziyetinde H3K9me2 ve H3K9me3'da önemli artışlar olduğu gözlenmiş olup, sadece yüksek doz FB1 maruziyetinin H3K9-HMT enzim aktivitesinde önemli artışlara sebep olduğu gösterilmiştir (Sancak ve Özden, 2015). Bu çalışmalardan yola çıkarak, tez çalışmasında kanser ile ilişkili yolaklarda FB1'in yaptığı epigenetik değişikliklerinin rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, HK-2 hücrelerinde

belirli konsantrasyonlarda FB1'in global DNA hipometilasyonu, tümör baskılayıcı genlerde DNA metilasyonu ve değişiklik gözlenen genlerin ekspresyonundaki değişiklikler araştırılmıştır.

FB1'in HK-2 hücre dizisinde hücre canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmek için 24 saat süreyle, 3,125- 200 μ M konsantrasyon aralığında, MTT ve NRU testleri yapılmıştır. En yüksek doz olan 200 μ M maruziyet konsantrasyonunda dahi MTT testi ile %34,76 ve NRU testi %38,40 oranında ölüm gözlenmiş olup, dolayısı ile daha yüksek konsantrasyonlara çıkılmadığı için IC_{50} değeri belirlenememiştir. Ancak, Chuturgoon ve ark. (2015)'lerinin HepG2 hücre dizisinde yaptığı 24 saatlik maruziyet sonucunda IC_{50} değerini 200 μ M olarak belirtmişlerdir (Chuturgoon ve ark., 2015). Cetin ve Bullerman (2005)'in gerçekleştirdiği çalışmada ise; Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde (CHO-K1) 48 saat maruziyet sonucunda FB1'in IC_{50} değeri 85,5 μ M/mL olarak bulunmuştur (Cetin ve Bullerman, 2005). McKean ve ark. (2006)'ları yaptıkları bir çalışmada ise; FB1'in 24 saat maruziyeti sonucunda IC_{50} değerini HepG2 hücrelerinde 399,2 μ M; immortalize insan bronşiyal epitel hücrelerinde (BEAS-2B) ise 355,1 μ M olarak bildirmişlerdir (McKean ve ark., 2006). FB1'in sitotoksik etkileri olduğunu gösteren pek çok çalışma olmasına rağmen, FB1 sitotoksitesinin hücre tipine ve maruziyet süresine bağlı olarak değişiklik gösterdiği sonucuna varılmaktadır.

FB1'in hücre proliferasyonu üzerine etkilerini incelemek amacıyla, 0, 1, 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında 24 saat FB1 maruziyet yapılarak BrdU testi uygulanmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarında sırasıyla 1,25 ve 2,24 kat anlamlı derecede artışlar gözlenmiştir. FB1'in hücre proliferasyonunu tetikleyebileceği gösterilmiştir. Benzer bir şekilde, normal insan özofagus epitel hücrelerinde (HEECs) 5, 10, 20 ve 40 μ mol/L konsantrasyonlarında 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca FB1 maruziyeti sonucunda sırasıyla $105.0 \pm 3.3\%$, $109.0 \pm 2.9\%$, $115.4 \pm 2.2\%$ ve $123.4 \pm 3.4\%$ oranlarında anlamlı artışlar bulunmuştur (Wang ve ark. 2013a). Wang ve ark. (2013) 'larının yaptığı bir başka çalışma da ise, normal insan karaciğer hücre dizisi (HL-7702) üzerinde 0,1, 1, 10 ve 100 μ mol/L konsantrasyonlarında 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca FB1 maruziyeti sonucu, sadece 96 saatlik maruziyet sonucunda kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunda anlamlı artışlar olduğu, diğer maruziyet süreleri içinde ise azalmalar olduğu gözlenmiştir (Wang ve ark., 2013b).

Global DNA metilasyonu seviyelerini incelemek için 10, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda 24 saat FB1 maruziyeti gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla sadece 100 μM konsantrasyonda FB1 maruziyeti sonucu global DNA metilasyonunda 2,23 kat anlamlı artış gözlenmiştir. Kouadio ve ark. (2007)'ları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, insan intestinal Caco-2 hücrelerinde 10, 20 ve 40 μM konsantrasyonlarda 24 saat FB1 maruziyeti sonucu %5-mC oranında %4,5'den %9'a anlamlı derecede artış olduğu gösterilmiştir (Kouadio ve ark., 2007). Bir başka çalışmada ise, sıçan C6 glioma hücrelerinde 9 ve 18 μM FB1 konsantrasyonlarında 24 saat FB1 maruziyetinde DNA hipermetilasyonunun önemli derecede indüklendiği bildirilmiştir (Mobio ve ark., 2000). Çalışmamızda DNA metilasyonunda rol oynayan enzimleri (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* ve *MGMT*) kodlayan genlerinin ekspresyonları da incelenmiş olup bu genlerin ekspresyon seviyelerinde değişiklikler gözlenmiş; fakat bu değişikliklerin global DNA metilasyonu sonuçları ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Benzer olarak, Chuturgoon ve ark. (2014)'larının yaptığı çalışmaya göre, HepG2 hücrelerine 200 μM 24 saat FB1'in maruz bırakılması ile global DNA hipometilasyonunun önemli derecede arttığı gösterilmiş olup, *DNMT1*, *DNMT3a* ve *DNMT3b*'nin aktiviteleri ve gen ekspresyonlarının ise önemli derecede azaldığı ve *MBD2* demetilazın aktivitesinin ve ekspresyonunun ise arttığı rapor edilmiştir (Chuturgoon ve ark., 2014).

FB1'in HK-2 hücrelerine 24 saat 10, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda maruziyeti sonucunda panel arrayler ile tümör baskılayıcı genlerde % metilasyon seviyeleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; genlerin çoğunda % metilasyon seviyelerinin anlamlı derecede arttığı görülmüştür. 100 μM konsantrasyonda FB1 maruziyeti sonucu; *ABL1*, *AKT1*, *APC*, *ATM*, *BCR*, *BIRC5*, *BRAF*, *BRCA1*, *CAV1*, *CD44*, *CDH1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN3*, *CDX2*, *CTNNB1*, *DAPK1*, *DIRAS3*, *EGFR*, *ERBB2*, *FAS*, *FHIT*, *GSTP1*, *HOXA1*, *HRAS*, *IGF2R*, *ING1*, *JUN*, *MDM2*, *MEN1*, *MGMT*, *MLH1*, *MYC*, *NF1*, *NF2*, *NFKB1*, *NME1*, *PRDM2*, *PTCH1*, *PTEN*, *PTGS2*, *RASSF1*, *RB1*, *RET*, *SFN*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SOC1*, *TGFB1*, *TGFBR2*, *THBS1*, *TP53*, *TSC1*, *TSC2*, *VEGFA*, *VHL*, *XRCC1*, *ZMYND10* genlerinde metilasyon seviyelerinde anlamlı derecede artış gözlenmiştir. Aynı zamanda metilasyonda değişiklik gösteren genlerin ekspresyon sonuçlarının da metilasyon ile uyumlu olduğu gösterilmiş olup, seçilen *CD44*, *CDKN1A*, *CDKN2B*, *CTNNB1*, *MYC*, *PTEN*, *RASSF1* ve *p16* genlerinin ekspresyonlarında anlamlı derecede azalma

görülmüştür. Demirel ve ark. (2015)'lerinin yaptığı çalışmada sıçan karaciğer (Clone9) ve sıçan böbrek (NRK-52E) hücrelerine 24 saat, 1-50 μ M konsantrasyonlarda yapılan maruziyet sonucunda; Clone9 hücrelerinde 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarda bir onkogen olan c-myc geninin promotor bölgelerinde %33'den daha fazla metilasyon gözlenmişken, NRK-52E hücrelerinde bu genin metile olmadığı gözlenmiştir (Demirel ve ark., 2015). Yine aynı çalışmada *p16* geni NRK-52E hücrelerinde hem kontrol grubunda hem de 5-50 μ M konsantrasyonlarda metile iken, Clone9 hücrelerinde her iki grupta da metile olmadığı gözlenmiştir. *VHL* geni ise FB1 maruziyet gruplarında her iki hücre dizisinde de metile olduğu görülmüştür (Demirel ve ark., 2015). Bir çok çalışmada metilasyon değişikliklerinin *p16* geninin aktivasyonunu engellediği ve karaciğer, akciğer ve böbrek kanserlerinin erken aşamalarında bu değişikliklerin gözlenebildiği rapor edilmiştir (Belinsky ve ark., 1998; Kaneto ve ark., 2001; Tannapfel ve Wittekind, 2002). Ayrıca gene aynı çalışmada (Demirel ve ark., 2015) *c-MYC* geninin clone9 hücrelerinde metile halde, NRK-52E hücrelerinde unmetile olduğu bulunmuştur. Bu değişikliklerin bir proto-onkogen olan ve apoptoz, hücre çoğalması ve farklılaşmasını regüle eden transkripsiyon faktörlerinin kodlanmasında görevli olan *c-MYC* geninin ifadesinde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Demirel ve ark., 2015). Arumugam ve ark. (2020), HepG2 hücrelerinde 200 μ M FB1 maruziyetinin miR-30c aracılığıyla *PTEN* ekspresyonunda azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir. *PTEN* geninin ekspresyonunun azalması, oksidatif DNA lezyonlarının tamirini önleyen PI3K/AKT sinyal ağı ile DNA hasar noktalarının düzenlenmesini inhibe etmektedir. Bu durumun da sitotoksikite ve karsinojenitenin gelişmesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Arumugam ve ark., 2020). 2010 yılında Costa ve ark.'ları yapmış olduğu bir çalışmada bazı renal kanser hücre hatları üzerine Wnt antagonist geni ve *CTNNB1* geninin epigenetik regülasyonu incelenmiş olup, *CTNNB1* geninin J82, T24, Caki-1 ve PC-3 dizilerinde metile olmadığı fakat ekspresyonunda bir artış olduğu; 5637, TCCSUP, 769-P, 786-O, ACHN, 22Rv1, DU145, LNCaP dizilerinde ise ekspresyonunda azalma olduğu tespit edilmiş ve kanser gelişiminde epigenetik regülasyonların önemi vurgulanmıştır (Costa ve ark., 2010). Başka bir çalışmada ise; sıçanlarda nikel indüklü kanser modelinde akciğer ve kas tümörlerinde *RASSF1A* ve *p16 (CDKN2A)* genlerinin ifadesinde azalma gösterilmiştir (Jun ve ark., 2011). 2014 yılında Yu ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada elde ettikleri bulgulara göre böbrek kanserinde kanser hücrelerinin büyümesi, göçü ve istilasını kontrol eden ve önemli rol oynayan *CD44* geninin miR-34a ile baskılandığını belirtilmiştir (Yu

ve ark., 2014). İncelenen bu çalışmalara göre tez çalışmasında gen ekspresyonunun analizinde *CD44*, *CDKN1A*, *CDKN2B*, *CTNNB1*, *MYC*, *PTEN*, *RASSF1* ve *p16* genleri seçilmiş olup, hem FB1 toksisitesindeki hem de böbrekler üzerine toksik etkilerde rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

HepG2 hücre dizisine FB1 maruziyetinin miRNA baskılamasına ve bunun sitokrom P450 enzimleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada; CYP1B1'in FB1 maruziyetinden sonra miR-27b tarafından posttranskripsiyonel olarak regüle edildiği gösterilmiştir (Chuturgoon ve ark., 2014). Transformasyona uğramış hücreler ve tümörler genellikle 'gap junction' hücreler arası iletişim yeteneğini kaybeder ve *Connexin* genlerinin yokluğu kendiliğinden veya kimyasal indüklü tümörlerin gelişim riskini artırır (Krutovskikh ve ark., 1995; Ruch ve ark., 2001). Başka çalışmalarda ise; fare karaciğerinde FB1 maruziyeti sonrasında TNF- α , interlökin-1 β (IL-1 β), IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-12 ekspresyonlarında artış meydana geldiği gösterilmiştir (Bhandari ve Sharma, 2002a-b; Sharma ve ark., 2006).

Sonuç olarak, FB1'in epigenetik etkilerinin rolünün anlaşılabilmesi için global DNA metilasyonu ve DNA metilasyonunda rol oynayan enzimleri (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* ve *MGMT*) kodlayan genlerinin ekspresyonları ve tümör baskılayıcı genlerin metilasyon düzeyi ve ekspresyonları incelenmiştir. Tez çalışmasından elde edilen veriler değerlendirildiğinde; FB1'in hücre proliferasyonunda ve global DNA metilasyon düzeyinde değişikliklere sebep olabileceği; kanser ile ilişkili önemli tümör baskılayıcı genlerin metilasyon seviyelerinde artışa sebep olurken, ekspresyon seviyelerinde ise metilasyon seviyeleri ile ilişkili azalmaya neden olabileceği gösterilmektedir. Bu verilere dayanarak, FB1'in karsinojenik etkisinde hücre proliferasyonunda rol oynayan mekanizmaların ve tümör baskılayıcı genlerin regülasyonunun rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Özellikle, tez çalışmasından elde edilen verilere ve literatür taramalarına dayanarak *PTEN* genindeki değişikliklerin FB1'in karsinojenez mekanizmalarında önemli rol oynayabileceği ve FB1'in 'gap-junction' hücreler arası iletişim üzerine etkilerinin olabileceği ileri sürülmektedir. Tez çalışmasından elde edilen bu veriler ile FB1'in henüz tam olarak aydınlatılamamış olan karsinojenik etki mekanizmalarında epigenetik değişikliklerin rolü konusunda hücreler arası iletişim literatüre önemli katkı sağlaması beklenmektedir.



KAYNAKLAR

- Abbès, S., Ben Salah-Abbès, J., Jebali, R., Younes, R.B. ve Oueslati, R. (2016). Interaction of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in mice causes immunotoxicity and oxidative stress: Possible protective role using lactic acid bacteria. *J. Immunotoxicol*, 13, 46–54.
- Abel, S. ve Gelderblom, W.C. (1998). Oxidative damage and fumonisin B1-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo. *Toxicology*, 16, 131(2-3):121-31.
- Abado-Becognee, K., Mobio, T.E., Ennamany, R., Fleurat- Lessard, F., Shier, W.T., Badria, F., Creppy, E.E. (1998). Cytotoxicity of fumonisin B1: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA syntheses. *Arch Toxicol*, 72(4):233-6.
- Ahmadnejad, M., Amirizadeh, N., Mehrasa, R., Karkhah, A., Nikougoftar, M. ve Oodi, A. (2017). Elevated expression of DNMT1 is associated with increased expansion and proliferation of hematopoietic stem cells co-cultured with human MSCs. *Blood Research*, 52(1), 25-30.
- Arranz, I., Baeyens, W. R. G., Van Der Weken, G., De Saeger, S., Van Peteghem, C. (2004). Review: HPLC determination of fumonisin mycotoxins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 195-203.
- Arumugam, T., Ghazi, T. ve Chuturgoon, A. (2020). Fumonisin B1 epigenetically regulates PTEN expression and modulates DNA damage checkpoint regulation in HepG2 liver Cells. *Toxins*, 30; 12(10):625.
- Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. Cilt: 5, Sayı:3.
- Belinsky, S.A., Nikula, K.J., Palmisano, W.A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E. ve ark. (1998). Aberrant methylation of p16 (INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 11891-11896.
- Bennett, J.W. ve Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.

Bhandari, N. ve Sharma, R. P. (2002). Fumonisin B 1-induced alterations in cytokine expression and apoptosis signaling genes in mouse liver and kidney after an acute exposure. *Toxicology*, 172(2), 81-92.

Bhandari, N. ve Raghubir, P. (2002). Modulation of selected cell signaling genes in mouse liver by fumonisin B1. *Chemico-biological interactions*, 139(3), 317-331.

Bird, A.P., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J. ve Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40: 91–99.

Bombail, V., Moggs, J.G. ve Orphanides, G. (2004). Perturbation of epigenetic status by toxicants. *Toxicology Letters*, 149(1-3), 51-58.

Bondy, G., Barker, M., Mueller, R., Fernie, S., Miller, J. D., Armstrong, C. ve ark. (1996). Fumonisin B1 toxicity in male Sprague-Dawley rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 392: 251–264.

Bondy, G., Suzuki, C., Barker, M., Armstrong, C., Fernie, S., Hierlihy, L. ve ark. (1995). Toxicity of fumonisin B1 administered intraperitoneally to male Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* 33: 653–665.

Caudill, M.A., Wang, J.G., Melnyk, S., Pogribny, I.P., Jernigan, S., Collins, M.D. ve ark. (2001). Adenosylhomocysteine concentratinos predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine Beta-synthase heterozygous mice. *Journal of Nutrition*, 131(11), 2811-2818.

Cetin, Y. ve Bullerman, L. B. (2005). Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, 43(5), 755–764.

Choumenkovitch, S.F., Selhub, J., Bagley, P.J., Maeda, N., Nadeau, M.R., Smith, D.E. ve ark. (2002). In the cystathionine beta-synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific. *Journal of Nutrition*, 132(8), 2157-2160.

Chu, F.S. ve Li, G.Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with

high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 847–852.

Chuturgoon, A., Phulukdaree, A. ve Moodley, D. (2014). Fumonisin B 1 induces global DNA hypomethylation in HepG2 cells – an alternative mechanism of action. *Toxicology*, 315, 65–69.

Chuturgoon, A. A., Phulukdaree, A. ve Moodley, D. (2015). Fumonisin B1 inhibits apoptosis in HepG2 cells by inducing Birc-8/ILP-2. *Toxicology Letters*, 235(2), 67–74.

Costa, V. L., Henrique, R., Ribeiro, F. R., Carvalho, J.R., Oliveira, J., Lobo, F. ve ark. (2010). Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in urological cancer. *Epigenetics*, 5:4, 343-351.

Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.

Das, P.M. ve Singal, R. (2004). DNA Methylation and Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 4632-4642.

Demirel, G., Alpertunga, B. ve Ozden, S. (2015). Role of fumonisin B1 on DNA methylation changes in rat kidney and liver cells. *Pharm Biol*, 53(9), 1302-10.

Denis, H., Ndlovu, M. N. ve Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports*, 12: 647-56.

Dolinoy, D.C., Weidman, J.R. ve Jirtle, R.L. (2007). Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease. *Reprod. Toxicol.*, 23: 297-307.

Dragan, Y. P., Bidlack, W. R., Cohen, S. M., Goldsworthy, T. L., Hard, G. C., Howard, P. C. ve ark. (2001). Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and risk assessment: Fumonisin B1 as an example. *Toxicological Sciences*, 61, 6-17.

Dugyala, R. R., Sharma, R. P., Tsunoda, M. ve Riley, R. T. (1998). Tumor necrosis factor- α as a contributor in fumonisin B1 toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285: 317/324.

EC. (2006). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union. Commission Regulation (EC)*. No 1881/2006 of 19 December 2006. L 364/18.

EHC. (2000). Fumonisin B1. Environmental Health Criteria International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva. 219, 1-150.

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 286-298.

FDA. (2001). Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance. 9.

Feinberg, A.P. (2004). The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biology*, 14(6), 427-432.

Feinberg, A.P. ve Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4: 1-11.

Food Safety. (2018) 6(4)160–161. doi: 10.14252/foodsafetyfscj.2018006s <http://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20170926001&fileId=001>. Suggested citation: Food Safety Commission of JAPAN. Fumonisin (Natural Toxins and Mycotoxins).

Futreal, P.A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J.C., Wooster, R. ve Stratton, M. (2001). Cancer and genomics. *Nature* 6822: 850-2.

Gajecka, M., Stopa, E., Tarasiuk, M., Zielonka, Ł. ve Gajecki, M. (2013). The expression of type-1 and type-2 nitric oxide synthase in selected tissues of the gastrointestinal tract during mixed mycotoxicosis. *Toxins*, 5 :2281–2292.

Gelderblom, W.C.A., Smuts, C.M., Abel, S., Snyman, S.D., Cawood, M.E., Van der Westhuizen, L. ve ark. (1996a). Effect of fumonisin B1 on protein and lipid synthesis in primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 34: 361– 369.

Gelderblom, W.C.A., Snyman, S.D., Abel, S. ve ark. (1996b). Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats: A review regarding mechanistic implications for establishing risk in humans. In: Jackson, L., De Vries, J.W., Bullerman, L.B. (Eds.), *Fumonisin in Food*. Plenum Press, New York, pp. 279–296.

Gonzalgo, M.L. ve Jones, P.A. (1997). Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Research*, 25(12), 2529-2531.

Goossens, J., Pasmans, F., Verbrugghe, E. ve ark. (2012) Porcine intestinal epithelial barrier disruption by the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and T-2 toxin promotes transepithelial passage of doxycycline and paromomycin. *BMC Vet Res* 8:245.

Gu, H., Gao, J., Guo, W., Zhou, Y. ve Kong, Q. (2017). The expression of DNA methyltransferases 3A is specifically downregulated in chorionic villi of early embryo growth arrest cases. *Molecular medicine reports*, 16(1), 591-596.

Güler, C. ve Peynircioğlu, B. B. (2016). DNA metilasyonu ve hastalıklarla ilişkisi. *ACU Sağlık Bil. Derg*, 2: 61-68.

Harel, R. ve Futerman, A. H. (1993). Inhibition of sphingolipid synthesis affects axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem.*, 268, 14476-81.

Haschek, W. M., Gumprecht, L. A., Smith, G., Tumbleson, M. E. ve Constable, P. D. (2001). Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environmental Health Perspectives*, 109: 251–257.

Herceg, Z. (2007). Epigenetics and cancer: towards and evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* (2):91-103.

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

Holliday, R. ve Pugh, J. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187: 226-232.

Huang, H., Hu, G., Cai, J., Xia B., Liu, J., Li, X. ve ark. (2014). Role of poly (ADP-ribose) glycohydrolase silencing in DNA hypomethylation induced by benzo(a)pyrene, *Biochem Biophys Res Commun*, 452: 708-714.

IARC, 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol: 56, Lyon, France.

Izmirli, M., Tufan, T. ve Alptekin, D. (2012). DNA Metilasyonu. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 21(4):274-282.

Jackson, L. ve Jablonski, J. (2004). Fumonisin, in Magan, N. ve Olsen, M., eds, *Mycotoxins in Food Detection and Control*, 367-405, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC.

JECFA. (2001). In: Fumonisin B1, B2 and B3, in “Safety evaluations of specific mycotoxins”. Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, Switzerland.

Jones, P. A. ve Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3:415–428.

Jun, Z., Jing, Z., MengJie, L., YouJun, W., YingYing, F., Yang, Z. ve ark. (2011). Methylation of *RAR-β2*, *RASSF1A*, and *CDKN2A* genes induced by nickel subsulfide and nickel-carcinogenesis in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 24(2),163-171.

Kabesch, M., Michel, S. ve Tost, J. (2010). Epigenetic Mechanisms and the Relationship to Childhood Asthma. *European Respiratory Journal*, 36: 950-961.

Kaneto, H., Sasaki, S., Yamamoto, H., Itoh, F., Toyota, M., Suzuki, H. ve ark. (2001). Detection of hypermethylation of the p16 (INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut*, 48, 372-377.

Kang, Y. J. ve Alexander, J. M. (1996). Alterations of the glutathione redox cycle status in fumonisin B1-treated pig kidney cells. *J. Biochem. Toxicol*, 11: 121–126.

Kouadio, J. H., Dano, S. D., Moukha, S., Mobio, T.A. ve Creppy, E.E. (2007). Effects of combinations of Fusarium mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. *Toxicon*, 49: 306-317.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*: 128:693–705.

Krutovskikh, V. A., Mesnil, M., Mazzoleni, G. ve Yamasaki, H. (1995). Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumorpromoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins. *Lab. Invest*, 72: 571–577.

Lai, J. C., Cheng, Y. W., Goan, Y. G., Chang, J. T., Wu, T. C., Chen, C. Y. ve ark. (2008). Promoter methylation of O 6-methylguanine-DNA-methyltransferase in lung cancer is regulated by p53. *DNA Repair*, 7(8), 1352-1363.

Liew, W. ve Mohd-Redzwan, S. (2018). Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8: 60.

Liu, C., Yu, H., Zhang, Y., Li, D., Xing, X., Chen, L. ve ark. (2015). Upregulation of miR-34a-5p antagonizes AFB1-induced genotoxicity in F344 rat liver, *Toxicol*, 106: 46-56.

Liu, H., Lo, C. R. ve Czaja, M. J. (2002). NF- κ B inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun, *Hepatology*, 35: 772/778.

Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A. ve ark.. (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res*, 55: 197–203.

Margolis, D. (2005). Depletion of Latent HIV Infection and Goal of Eradication. *Physicians' Research Network*.

Marín, S., Magan, N., Belli, N., Ramos, A. J., Canela, R. ve Sanchis, V. (1999). Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *Int. J. Food Microbiol*, 51:159–167.

Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J. ve Sanchis, V. (2004). Fumonisin producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. *Journal of Food Protection*, 67, 1792-1805.

Matthaios, D., Hountis, P., Karakitsos, P., Bouros, D. ve Kakolyris, S. (2013). H2AX a Promising Biomarker for Lung Cancer: A Review. *Cancer Invest*, 31: 582-599.

McGowen, P. O. ve Szyf, M. (2010). The epigenetics of social adversity in early life: Implications for mental health outcomes. *Neurobiol Dis*, 39 (1): 66-72.

McKean, C., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C. W. ve ark. (2006). Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. *Food Chem Toxicol*, 44(6):868-76.

Merrill, A.H. Jr., Wang, E., Vales, T.R., Smith, E.R., Schroeder, J.J., Menaldino, D.S. ve ark. (1996). Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. *Advances in experimental Medicine and Biology*, 392, 297-306.

Mobio, T.A., Anane, R., Baudrimont, I., Carratu, M.R., Shier, T.W., Dano, S.D. ve ark., (2000). Epigenetic properties of fumonisin B-1: Cell cycle arrest and DNA base modification in C6 glioma cells. *Toxicol Appl Pharm*, 164: 91-96.

Monnet-Tschudi, F., Zurich, M. G. , Sorg, O., Matthieu, J. M., Honegger, P. ve Schilter, B. (1999). The naturally occurring food mycotoxin fumonisin B1 impairs myelin formation in aggregating brain cell culture. *Neurotoxicology*, 20: 41- 8.

Moretti, A., Logrieco, A. F. ve Susca, A. (2017). Mycotoxins: An underhand food problem. *Methods Mol Biol*, 1542: 3-12.

Morin, V., Diaz, F., Montecino, M., Fothergill-Gilmore, L., Puchi, M. ve Imschenetzky, M. (1999). Poly(ADP-ribosylation) protects maternally derived histones from proteolysis after fertilization. *Biochemical Journal*, 343 :1:95-8.

Nan, X., Campoy, F.J. ve Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, 88: 471–481.

National Toxicology Program. (NTP). (2001). Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Fumonisin B1 in F344/N Rats and B6C3F1 Mice.

Nelson, P. E., Desjardins, A. E. ve Plattner, R. D. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by fusarium species: biology, chemistry, and significance. *Annu Rev Phytopathol*.31:233-52.

Padji, S. S., Roy, S., Kar, M., Saha, A., Roy, S., Adhya, A. ve ark. (2017). Role of CDKN2A/p16 expression in the prognostication of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 73:27-35.

Pandya, J. P. ve Arade, P. C. (2016). Mycotoxin: a devil of human, animal and crop health. *Adv. Life Sci*, 5: 3937–3941.

Pazarbaşı, A., Kasap, M. ve Kasap, H. (2011). Kanser Yolakları. *Dergipark*, 20: 187.

Pellanda, H., Forges, T., Bressenot, A., Chango, A., Bronowicki, J.P., Guéant, J.L. ve ark. (2012). Fumonisin FB1 treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3-and H4- histone methylation patterns in fetuses. *Mol. Nutr. Food Re.*, 56: (6), 976–985.

Pereira, M.A., Wang, W., Kramer, P.M. ve Tao, L. (2004). DNA hypomethylation induced by non genotoxic carcinogens in mouse and rat colon. *Cancer Letters*, 212: (2), 145-151.

Pitt, J. I. ve Miller, D. J. (2016). A concise history of mycotoxin research, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33):7021-7033.

Reddy, M. A. ve Natarajan, R. (2011). Epigenetics in diabetic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22: (12) 2182–2185.

Robertson, K. D. (2002). DNA methylation and chromatin: unraveling the tangled web. *Oncogene*, 21: 5361-5379.

Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*; 6: 597-610.

Rosa, S. C., Gonçalves, J., Judas, F., Mobasheri, A., Lopes, C. ve Mendes, A. F. (2009). Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human cartilage. *Arthritis Research & Therapy*, 11:(3) 80.

Ruch, R. J., Trosko, J. E. ve Madhukar, B. V. (2001). Inhibition of connexin43 gap junctional intercellular communication by TPA requires ERK activation. *Journal of cellular biochemistry*, 83:(1)163-169.

Sancak, D. (2014). Fumonisin B1 Toksisitesinde Global Histon Modifikasyonlarının Rolü, Yüksek Lisans tezi.

Sancak, D. ve Ozden, S. (2015). Global histone modifications in Fumonisin B1 exposure in rat kidney epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 29:(7), 1809-1815.

Santos-Rosa, H. ve Caldas, C. (2005). Chromatin Modifier Enzymes, the Histone Code and Cancer. *European Journal of Cancer*, 41:2381-2402.

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

SCF, Scientific Committee on Food, European Commission (2000). Opinion of the scientific committee on food on fusarium toxinspart 3: Fumonisin B1 (FB1).

SCF. (2000). Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins Part 3: Fumonisin B1, 17 October 2000, SCF/Cs/CNTM/myc/24 Final, European Commission, Brussels.

Sharma, N., Suzuki, H., He, Q. ve Sharma, R. P. (2006). Tumor necrosis factor α -mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase as a mechanism for fumonisin B1 induced apoptosis in murine primary hepatocytes. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 19:(6), 359-367.

Sigerist, H. E. (1960). The historical development of the pathology and therapy of cancer. In: Marti-Ibanez F, editor. On the history of medicine. New York: *MD Publications Inc*; p. 59-65.

Smith, J.S. ve Thakur, R.A. (1996). Occurance and fate of fumonisins in beef. In: Jackson L, ed. Fumonisin in Food. *New York: Plenum Press*, 39-55.

Smith, Z.D. ve Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 14: 204-20.

Soriano, J.M. ve Dragacci, S. (2004). Occurrence of fumonisins in foods, *Food Research International*, 37: 985-1000.

Speight, N. (2012). "Mycotoxin-related illness," in advancing medicine with food and nutrients, 2nd Edn., ed I. Kohlstadt (Boca Raton, FL: CRC Press; Taylor & Francis Group), 821–850.

Steyn, P.S. ve Stander, M.A. (1999). Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisin. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM, eds. General and Applied Toxicology. 2nd Edition. *United Kingdom: Macmillan Reference Ltd*, 2145-2176.

Stockmann-Juvala, H. ve Savolainen, K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human and Experimental Toxicology*, 27: 799-809.

Sun, G. D., Cui, W. P., Guo, Q. Y. ve Miao, L. N. (2014). Histone lysine methylation in diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Research*. Article ID 654148, 9.

Sun, J., Wang, Y., Cui, W., Lou, Y., Sun, G., Zhang, D. ve ark. (2016). Role of Epigenetic Histone Modifications in Diabetic Kidney Disease Involving Renal Fibrosis. *Journal of Diabetes Research*. Vol: 2017, Article ID 7242384, 11 sayfa.

Sydenham, E.W., Theil, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Van Schalkwyk, D. J. ve Koch, K.R. (1990). Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1900-1903.

Szyf, F.M. (2011). The implications of DNA methylation for toxicology: toward toxicomethylomics, the toxicology of DNA methylation, *Toxicological Sciences*, 120:(2), 235-255.

Takai, D. ve Jones P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: (6)3740-5.

Tannapfel, A. ve Wittekind, C. (2002). Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Archiv*, 440:345-352.

Turner, P.C., Nikiema, P. ve Wi1d, C. R. (1999). Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutat Res*, 443: 81-93.

Waddington, C. (1940). Organisers and genes. UK Cambridge University Press, Cambridge.

Wang, E., Riley, R.T., Meredith, F.I. ve Merrill, A.H. Jr. (1999). Fumonisin B1 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *Journal of Nutrition*, 129:214 – 20.

Wang, S.K., Wang, T. T., Huang, G. L., Shi, R. F., Yang, L. G. ve Sun, G. J. (2013a). Stimulation of the proliferation of human normal esophageal epithelial cells by fumonisin B1 and its mechanism. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7: 55-60.

Wang, S. K., Liu, S., Yang, L. G., Shi, R. F. ve Sun, G. J. (2013b). Effect of fumonisin B1 on the cell cycle of normal human liver cells. *Molecular Medicine Reports*, 7:(6), 1970–1976.

Wentzel, J. F., Lombard, M. J., Plessis, L. H. D. ve Zandberg, L. (2017). Evaluation of the cytotoxic properties, gene expression profiles and secondary signalling

responses of cultured cells exposed to fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone mycotoxins. *Arch Toxicol.* 91(5):2265-2282

WHO. 2000. The world health report, Health systems.

Williams, J. H., Philips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M. ve Aggarwal, D. (2004). Human Aflatoxicosis in Developing Countries: a Review of Toxicology, Exposure, Potential Health Consequences, and Interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80:1106-1122.

Villeneuve, L. M. ve Natarajan, R. (2010). The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications, *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 299:1. F14–F25.

Voss, K. A., Chamberlain, W. J., Bacon, C. W., Herbert, R. A., Walters, D. B. ve Norred, W.P. (1995). Subchronic feeding study of the mycotoxin fumonisin B1 in B6C3F1 mice and Fischer 344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 24:(1), 102–110.

Voss, K. A., Bacon, C., Norred, W., Chapin, R., Chamberlain, W., Plattner, R. ve Meredith, F. (1996). Studies on the reproductive effects of fusarium moniliforme culture material in rats and the biodistribution of (14C) fumonisin B1 in pregnant rats. *Nat. Toxins*, 4: 24-33.

Yan, M.S., Matouk, C.C. ve Marsden, P. A. (2010). Epigenetics of the Vascular Endothelium. *J Appl Physiol*, 109: 916–926.

Yu, G., Li, H., Wang, J., Gumireddy, K., Li, A., Yao, W. ve ark. (2014). MicroRNA-34a suppresses cell proliferation and metastasis by targeting CD44 in human renal carcinoma cell. *The Journal of Urology*. 5347(14)03687-8.

Yurdun, T. (1996). Aflatoksinler üzerine kısa açıklama. *Marmara Üniversitesi. Eczacılık Derneği*, 12: (1), 1-8.

Zhang, Y. J., Ahsan, H., Chen, Y., Lunn, R. M., Wang, L. Y., Chen, S. Y., Lee, P.H., Chen, C. J. ve Santella R. M. (2002a). High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A and p16 and its relationship to aflatoxin B1-DNA adduct levels in human hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*, 35:85-92.

Zhang, Y. J., Chen, Y., Ahsan, H., Lunn, R. M. , Lee, P. H., Chen, C. J. ve Santella, R. M. (2003b). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA

methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to aflatoxin B1-DNA adducts and p53 mutation in hepatocellular carcinoma, *Int J Cancer*, 103: 440-444.

Zhu, C. C., Hou, Y. J., Han, J., Liu, H. L., Cui, X. S., Kim, N. H. ve Sun, S. C. (2014). Effect of mycotoxincontaining diets on epigenetic modifications of mouse oocytes by fluorescence microscopy analysis. *Microsc Microanal*, 20: 1158-1166.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FUMONİSİN B1'İN KANSER İLE İLİŞKİLİ YOLAKLARDA ROL
OYNAYAN GENLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN HÜCRE KÜLTÜ

ORIJINALLIK RAPORU

% 10	% 9	% 3	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
2	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	% 1
3	vskn.tarimorman.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	earsiv.etu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	kefirtanesi.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
7	ejfm.trakya.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şeyda	Soyadı	Ömerustaoğlu Bayoğlu
Doğ.Yeri	Erzurum	Doğ.Tar.	07.04.1990
Email	omerustaogluseyda@gmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2013
Lise	Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesi	2008

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Eczacı	Safir Eczanesi	2013-halen
2.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		YDS-75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Omerustaoglu-Bayoglu S, Karaman EF, Şenyıldız M, **Ozden S.** Effects of Fumonisin B1 on Global DNA Methylationin HK-2 Cells. 53th Congress of the European Societies of Toxicology, 10-13 Eylül 2017, Bratislava, Slovakia.
2. Karaman EF, Omerustaoglu-Bayoglu S, **Ozden S.** Effects of fumonisin B1 on the promoter methylation of tumor suppressor genes and their relation with histone modifications in HK-2 kidney cells. Society of Toxicology 58th Annual Meeting and ToxExpo 2019. 10-14 Mart 2019, Baltimore, Amerika Birleşik Devletleri.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Okumak, flüt çalmak, seyahat etmek, mali konularla ilgilenmek.