

**SUKROZ VE GLUKOZ VARLIĞINDA  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE'DA İLGİLİ  
GEN BÖLGELERİNDE MEYDANA GELEN  
EPIGENETİKSEL DEĞİŞİMLERİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Burak ALAYLAR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Botanik Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE**

**2014**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SUKROZ VE GLUKOZ VARLIĞINDA *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE*'DA İLGİLİ GEN BÖLGELERİNDE MEYDANA  
GELEN EPİGENETİKSEL DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI

Burak ALAYLAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM  
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**SUKROZ VE GLUKOZ VARLIĞINDA SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE'DA İLGİLİ GEN BÖLGELERİNDE MEYDANA GELEN  
EPİGENETİKSEL DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Burak ALAYLAR tarafından hazırlanan bu çalışma 10/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Botanik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özlem BARIŞ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Güzin KABAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **.17. / 07 / 2014.** tarih ve **29 / 905** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **SUKROZ VE GLUKOZ VARLIĞINDA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*'DA İLGİLİ GEN BÖLGELERİNDE MEYDANA GELEN EPİGENETİKSEL DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Burak ALAYLAR

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisia*'da SUC2 ve HXT10 gen bölgelerinde çevresel uyaranlardan biri olan besinin meydana getirdiği epigenetiksel değişimler, kantitatif metilasyon analizlerden biri olan COBRA (Combined Bisülfite Restriction Analysis) yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada SUC2 ve HXT10 gen bölgelerine glukoz, sukroz ve glikoz+sukroz varlığında epigenetiksel değişimler araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda SUC2 ve HXT10 gen bölgeleri için tasarlanan primerlerin bağlanma bölgelerindeki sitozinlerin metilasyon durumlarının *S. cerevisiae*'daki sukroz metabolizmasının düzenlenmesinde rolü olmadığı gösterilmiştir.

**2014, 58 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Epigenetik, DNA metilasyonu, *Saccharomyces cerevisia*, COBRA Analizi.

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETERMINATION OF EPIGENETIC CHANGES DEPENDING ON PRESENCE OF SUCROSE AND GLUCOSE IN RELATED GENE REGIONS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Burak ALAYLAR

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology  
Science of Botany

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In this present study, SUC2 and HXT10 gene regions examined in *Saccharomyces cerevisiae* which are the related with consisting of nutrients epigenetic changes. This changes researched with the one of the quantitative methylation analysis COBRA (Combined Bisulfite Restriction Anaysis). In these study has investigated to presence of glucose, sucrose and glucose + sucrose in the HXT10 and SUC 2 gene regions. As a result of studies primers designed for methylation status of cytosines in the binding region of sucrose metabolism in HXT10 and SUC2 have no role in *Saccharomyces cerevisiae*

**2014, 58 pages**

**Keywords:** Epigenetic, DNA methylation, *Saccharomyces cerevisiae*, COBRA Analysis.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

Araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye ve Biyoloji Bölüm Başkanım Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Mehmet KARADAYI'ya, Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a, DNA izolasyonu aşamasında desteklerinden dolayı Sayın Biyolog Emrullah AKSAKAL'a, Sayın, Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarı ekibine teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında destek ve teşviklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Sayın Kimya Mühendisi Hakan YÜKSELTAN'a, Sayın Kimya Mühendisi Murat BORAN'a, Sayın Gıda Mühendisi Fehmi DAĞDEVİREN'e ve aileme teşekkür ederim.

**Burak ALAYLAR**

**Temmuz, 2014**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Epigenetik Kavramı.....	4
2.2. Histon Modifikasyonları.....	4
2.2.1. Prolin izomerizasyonu .....	6
2.2.2. SUMOylasyon .....	6
2.2.3. Ubikütinasyon .....	7
2.2.4. ADP-ribosilasyonu .....	9
2.2.5. Fosforilasyon .....	10
2.2.6. Asetilasyon .....	11
2.2.7. Metilasyon .....	11
2.3. DNA Metilasyonu .....	13
2.3.1. Memeli DNA metil transferazları.....	15
2.3.2. Dnmt3L <i>de novo</i> DNA metilasyonu için düzenleyici bir faktördür .....	16
2.3.3. CpG adalarının belirlenmesini kapsayan <i>de novo</i> metilasyon için bir model olarak dimerik Dnmt3a .....	17
2.3.4. Dnmt3L ve H3 histon proteininin metillenmemiş 4. lizininin <i>de novo</i> DNA metilasyonu ile ilişkisi.....	18
2.4. Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) ve DNA Metilasyonlarının Araştırılması.....	19
2.4.1. Bisülfid muamelesi.....	20
2.4.2. PCR amplifikasyonu.....	20
2.4.3. Restriksiyon enzimi ile kesim .....	21

2.4.4. Kesim sonucu elde edilen ürünlerin görüntülenmesi .....	21
2.4.5. COBRA tekniğinin olumlu özellikleri .....	21
2.4.6. COBRA tekniğinin kullanımı ve uygulama alanları .....	22
2.5. COBRA İçin Model Organizma Olarak <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
2.5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da SUC gen bölgesi.....	23
2.5.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da HXT gen bölgesi .....	24
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>26</b>
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Çalışmada kullanılan model organizmanın temin edilmesi .....	26
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve besiyerleri.....	26
3.1.3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar .....	26
3.1.4. Çözeltiler ve besiyerleri.....	27
3.2. Yöntem .....	35
3.2.1. <i>In silico</i> uygulamalarla çalışmada kullanılacak gen bölgelerinin seçilmesi, ilgili bölgelere ait PCR primerlerinin tasarlanması ve PCR ürünlerinde restriksiyon bölgelerinin belirlenmesi.....	35
3.2.2. Model organizmanın canlandırılması .....	35
3.2.3. Stok kültürlerin alınması .....	35
3.2.4. Çalışma kültürlerinin hazırlanması .....	36
3.2.5. Genomik DNA izolasyonu .....	36
3.2.6. Genomik DNA için jel elektroforezi ve görüntüleme .....	37
3.2.7. Bisulfit dönüşüm reaksiyonu aşaması .....	38
3.2.8. DNA desülfonasyon ve temizleme (Clean-up) .....	38
3.2.9. PCR Protokolü.....	40
3.2.10. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi İle Kesimi .....	40
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>42</b>
4.1. <i>In Silico</i> Uygulamalarla Çalışmada Kullanılacak Gen Bölgelerinin Seçilmesi, İlgili Bölgelere Ait PCR Primerlerinin Tasarlanması ve PCR Ürünlerinde Restriksiyon Bölgelerinin Belirlenmesi .....	42
4.1.1. Çalışmada kullanılacak gen bölgelerinin seçilmesi.....	42
4.1.2. PCR primerlerinin tasarlanması .....	43
4.1.3. PCR ürünlerinde restriksiyon bölgelerinin belirlenmesi .....	45



4.2. Genomik DNA İzolasyonu .....	46
4.3. SUC2 ve HXT10 Primerleri ile PCR Uygulaması Optimizasyonu.....	46
4.4. SUC2 ve HXT10 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Uygulaması Optimizasyonu ..	47
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>49</b>
KAYNAKLAR .....	53
ÖZGEÇMİŞ .....	59

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece (Sıcaklık)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre (10 <sup>-6</sup> )
µM	Mikromolar
A	Adenin
C	Sitozin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
Dntp	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
g	Gram
G	Guanin
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre (10 <sup>-3</sup> )
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
RNA	Ribonükleik asit
T	Timin
TBE	Tris-EDTA borat tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
U	Urasil

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>S. cerevisiae</i> örneklerinin DNA izolasyonu sonuçları.....	46
Şekil 4.2. SUC2 primeri ile PCR uygulaması optimizasyon sonucu.....	47
Şekil 4.3. HXT10 primeri ile PCR uygulaması optimizasyon sonucu .....	47
Şekil 4.4. SUC2 ve HXT10 PCR ürünleri için TaqI ve HinfI restriksiyon uygulaması optimizasyonu sonucu.....	48

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> SUC2 gen bölgesinin PCR ürününe ait restriksiyon bölgeleri .....	45
<b>Çizelge 4.2.</b> HXT10 gen bölgesinin PCR ürününe ait restriksiyon bölgeleri .....	46

## 1. GİRİŞ

İnsanlığın ortaya çıkışından bu yana canlılar arasındaki benzerlikler, farklılıklar ve bunların ortaya çıkışında rol oynayan etkenler en ilgi çekici konulardan biri olmuştur. Bu alanda yapılan pekçok gözlem ve araştırmanın neticesinde ise önce genetik ve daha sonra da “genetiğin üstü ya da ötesi” manasına gelen epigenetik bilimlerinin temelleri atılmıştır (Gulluce *et al.* 2014).

Epigenetik terimi ilk olarak 1942 yılında Conrad Waddington tarafından genlerin çevreleriyle olan etkileşimlerini ve bu olayın canlıların fenotiplerinin ortaya çıkışındaki rolünü tanımlamak için önerilmiştir. Bu öneri genotipten fenotip oluşumunda çevre etkisinin rolünü de vurgulamaktadır. Şüphesiz günümüzde epigenetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimi inceleyen bilimsel araştırmalar oldukça popülerdir (Choi and Friso 2009; Tollefsbol 2011).

Güncel epigenetik kavramı DNA sekansını harici olarak yöneten genom bilgisini ifade etmektedir. Kelimenin kökeni, aslen Epigenesis ile ilişkili olup Yunan filozof Aristo'ya kadar uzanmaktadır. “Hayvanların Yaratılışı Üzerine” isimli kitabında Aristo, “Epigenesis Teorisi” ile canlı bir organizmanın ileri düzey farklılaşma konusunu açıklamıştır. Bu hipoteze göre tam olarak olgunlaşmış bir organizma farklılaşmamış bir fenotipten ortaya çıkar. Bu anlayış, bir organizmanın gelişmesini açıklamak için kurgulanmış olup, aynı konuda Demokritus ve Leucippus tarafından ortaya konulan preformasyon teorisi ile zıtlıklar göstermektedir. Preformasyon teorisinde yetişkinin minyatür bir kopyasının hali hazırda embriyoda var olduğu ve yetişkinin fenotipik özelliklerinin bu minyatürden köken aldığı öne sürülmüştür. Buna karşın, epigenetiğin modern kavramından oldukça farklı olsa da “Epigenesis” teorisinde ise canlı bir varlığın farklılaşmasının benzer hücreler ile başladığı ve bu farklılaşmanın gelişim süresince kademeli olarak devam ettiği ve nihayetinde farklılaşmış organizmanın ortaya çıktığı vurgulanmaktadır (Choi and Friso 2009).

Günümüzde başlangıçtaki kökeninden çok daha fazla anlamlar yüklenmiş olan epigenetik bilimi yirminci yüzyılın ortasında doğmasına karşın, bu güne kadar önemli gelişmeler göstermiş ve temel bilimler, ziraat, tıp, eczacılık, biyoteknoloji, gıda gibi birçok alanda uygulama olanağı bulmuştur (Egger *et al.* 2004; Tyagi *et al.* 2010; Yang and Oh 2010; Gulluce *et al.* 2014).

Bu alanlarda yapılan güncel araştırmalar neticesinde başta kanser, obezite, diyabet olmak üzere çok çeşitli hastalıklar ile epigenetiğin ilişkili olduğu, hastalıkların ortaya çıkışında rol alan mekanizmaları düzenleyecek doğru diyet ve çevresel uyaranların belirlenmesi sonucunda bu hastalıkların önlenilebileceği, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebileceği, uyku hali, proliferasyon, farklılaşma ya da göç gibi birçok hücrenel sürecin bilinmeyen yönlerinin aydınlatılabileceği ortaya konulmuştur (Lu and Thompson 2012; Gulluce *et al.* 2014).

Yine bu çalışmalar sonucunda adı geçen süreçlerde etkin rol oynayan başlıca epigenetik olaylar doğrudan ve dolaylı olarak etki eden mekanizmalar şeklinde iki alt grupta toplanmış ve bu mekanizmalar içerisinde S-nitrosilasyon, ubiquitinasyon, SUMOylasyon, proline izomerizasyonu, ADP-ribozilasyonu, asetilasyon, fosforilasyon ve metilasyon gibi epigenetiksel süreçler açığa çıkarılmıştır (Herceg and Murr 2011; İzmirli 2013; Gulluce *et al.* 2014).

İlk keşfedilen epigenetiksel modifikasyon olayı olan metilasyon, hem histonlar hem de DNA üzerinde meydana gelerek epigenetik düzenlemelere sebep olduğu için en çok çalışılan konulardan birisi olmuştur. Yapılan araştırmalar, histonların metilasyonun da dahil olduğu çeşitli enzimatik reaksiyonlarla özellikle daha esnek yapıda olan N-Terminal bölgelerinden post translasyonel olarak modifiye olduğunu göstermiştir. Histon metilasyonunun, lizin ya da arjinin kalıntılarında meydana gelebildiği ve hem histon hem de DNA metilasyonu olaylarının S-adenozil-L-metiyonine bağımlı olduğu bilinmektedir (Choi and Friso 2009; Rauch and Pfeifer 2011).

Mevcut literatürde DNA metilasyonunun, histon modifikasyonları ile birlikte epigenetik programları belirlediği öne sürülmüş ve genomik imprinting, gen susturulması, X kromozomu inaktivasyonu, pozisyon etkisi, yeniden programlama ve karsinogenezin ilerlemesi dâhil olmak üzere birçok biyolojik sürecin meydana gelmesinden sorumlu olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bu süreçlerde DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının karmaşık bir şekilde birbirlerine bağlandığı da yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Choi and Friso 2009; Rauch and Pfeifer 2011).

Metilasyon olaylarının birbiri ve diğer hücreyel olaylar arasında meydana gelebilen bu karmaşık ilişkilerinin araştırılması sonucunda canlılardaki birçok aydınlatılmamış metabolik etkinliğin sırrınının açığa çıkarılabileceği, hayat döngülerindeki büyüme, gelişme ve farklılaşma evrelerinin daha iyi anlaşılabilceği ve epigenetiksel kökeni olan birçok hastalık için yeni korunma ve tedavi stratejilerinin geliştirilebileceği açıktır (Allis *et al.* 2007; Esteller 2009).

Benzer ilkeler çerçevesinde kurgulanan mevcut araştırmada, deney organizması olarak epigenetik araştırmalar için model kabul edilen *Saccharomyces cerevisia* seçilmiş ve gelişme ortamında glukoz, sukroz ve glukoz+sukroz varlığında bu canlının ilgili gen bölgelerinde meydana gelen DNA metilasyonu profili değişimlerinin COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Epigenetik Kavramı

Epigenetik terimi ilk olarak Conrad Waddington tarafından 1942 yılında fenotipi ortaya çıkaran çevre ile genlerin etkileşimini tanımlamak için kullanılmıştır. Son yıllarda, kalıtsal olan ve hücre bölünmesinin evrelerinde durağan hale gelen ancak nükleotid zincirini değiştirmeyen kromatin ve DNA modifikasyonları gibi olaylar, bu kavramın içerisine eklenmiştir. Yapılan araştırmalar neticesinde, epigenetik alanına bir çok farklı ürün ve olgu girmiştir. Bunlara; paramutasyon, bookmarking, imprinting, gen susturulması, X kromozomun inaktivasyonu, pozisyon etki çeşitliliği, reprogramming, transveksiyon, prionlar gibi enfeksiyon maddeleri, annelik durumu, RNA müdahalesi, non-coding RNA, small RNA'lar, DNA metilasyonu ve kromatin modifikasyonları örnek olarak verilebilir (Bird 2002; Holliday 2006; Bond and Finnegan 2007; Kocak ve Ertugrul 2012; Dalton *et al.* 2014; Gulluce *et al.* 2014).

Güncel literatürler incelendiğinde, bu olayların ortaya çıkışının ve düzenlenmesinin temelinde çoğunlukla histon veya DNA modifikasyonları içerisinde yer alan epigenetik mekanizmaların rol aldığı görülmektedir (Herceg and Murr 2011; Gulluce *et al.* 2014).

### 2.2. Histon Modifikasyonları

Bütün ökaryotlarda kromatin, transkripsiyon, replikasyon ve DNA onarımı gibi temel nükleer süreçlerin iskeletini yapılandıran oldukça yoğun bir yapıdır. Kromatin, en azından kavramsal olarak iki farklı fonksiyonel yapıda: genellikle DNA regülatör aktivitesinden yoksun heterokromatin denen mitoz ve mayoz sırasında oluşan yoğun yapı ile ökromatin denen DNA regülatör süreçler için ortam oluşturan daha az yoğun bir yapıdan oluşmaktadır. Nükleozomlar, kromatinin yapı taşlarıdır ve H2A, H2B, H3, ve H4 her bir temel histonun iki alt biriminin sekizli yapısına bürünmüş genomik DNA'nın iki sarmalını oluşturur. Temel histon proteinlerinin amino-terminal kısmı esnek ve



oldukça temel değişik türlerde saklı olan ve değişik translasyon sonrası modifikasyona özğü olan kuyruk bölgesini içerir. Kromatinin yapısı sadece DNA'yı yoğunlaştırma ve koruma ile değil aynı zamanda genetik bilgiyi koruyarak ve gen ekspresyonu kontrol ederek temel fonksiyonları yerine getirir. Ancak yoğun yapı dikkate alınırsa, kromatin transkripsiyon, replikasyon ve DNA bozukluklarının bulunup onarılması gibi birçok önemli hücrenel süreçleri saklar. Bu yüzden, kromatin ilk olarak hücrenel düzeneklerin DNA'ya geçişine izin vermek üzere düzenlenmelidir. Bu biyolojide en temel soruların başında gelir."Kromatin nasıl yeniden şekillenir?" Cevabın bir kısmı hücrelerin kromatinin yapısını değiştiren hücrenel mekanizmalara dönüştüğü gerçeğinde yatar. Bu aktiviteler ATP-bağımlı nükleozom mobilizasyonunu (kromatin yeniden yapılanması) ve translasyon sonrası histon modifikasyonunu içermektedir (Strahl and Allis 2000; Fyodorov and Kadonaga 2001; Marmorstein 2001; Loizou *et al.* 2006; Herceg and Murr 2011; Güneş ve Kulaç 2013).

Kromatin modifikasyonlar histonlara yapılan kovalent ekler yoluyla ortaya çıkabilir. Histon amino-terminal uçları modifikasyonların en sık hedefleridir. Modifikasyonların bulunduğu histonlarda en az 60 farklı kalıntı olup bu sayı az görülebilir; şüphesiz yeni tekniklerin ortaya çıkması yeni hedef kalıntıları ve yeni modifikasyonları belirlemede yardımcı olur. Bugüne kadar, tanımlanmış en az sekiz farklı histon modifikasyon türü vardır: asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikütinasyon, sumolasyon, ADP ribosilasyon, deiminasyon ve prolin izomerizasyon. Geleneksel olarak, iki mekanizmanın bu modifikasyonların işlevini yerine getirdiği düşünülür. İlk olarak, bu farklı özellikler nükleozom-nükleozom veya DNA-nükleozom etkileşimini fiziki etkenlerin eklenmesi veya histon yükünü değiştirerek etkileyebilir. İkinci olarak, farklı özellikler farklı hücrenel sonuçları doğuran özel proteinlerin alınması için docking bölgeyi temsil edebilir. Buna ek olarak, çok sayıda rapor bu modifikasyonların tamamının birbirine bağımlı olduğunu ve bu yüzden farklı modifikasyonların kombinasyonu farklı ve tutarlı hücrenel sonuçlara yol açtığı anlamına gelen "histon kodu"nu oluşturma ihtimalini ortaya çıkarmıştır (Strahl and Allis 2000; Kurtuncu ve Eraksoy 2008; Herceg and Murr 2011; Low and Wilkins 2012; Yaykaşlı vd 2012; İzmirli 2013; Gulluce *et al.* 2014).

### 2.2.1. Prolin izomerizasyonu

İzomerizasyon, bir molekülün farklı bir izomere dönüşümü olarak tanımlanır. Proteinlerin izomerizasyonu ilk olarak 1968’de tanımlandı ve polipeptitlerin sekonder yapısını bozarak ciddi şekilde protein uyumunu etkilediği görüldü. *Cis* veya *trans* olmak üzere iki farklı uyumu kapsayabilir. İzomerizasyon kendiliğinden ortaya çıkar ancak prolin izomeraz adında enzimler farklı uyumlar arasında (*cis-trans*) geçişi hızlandırmak için dönüşmüştür. Histonların izomerleşebildiği ilk kanıt Frp4’ün 30 ve 38 prolinlerin histon H3 kuyruğunda histon izomeraz olarak tanımlandığı 2006 yılında rapor edilmiştir. P38’in konformasyonel statüsü H3 histon metilasyonun lizin 36’ın indüksiyonu için gereklidir ve izomerizasyon Set2’nin yeterliliğinin H3K36’yı inhibe ettiği görünür (Herceg and Murr 2011; Gulluce *et al.* 2014).

### 2.2.2. SUMOylasyon

SUMOylasyon yaklaşık 100 amino asit’in “Küçük Ubikutin-Bağlantılı Modifiye Protein” (KUBMP) eklenmesinden oluşur. Ubikitanasyona benzer bir şekilde, KUBMP her zaman kovalent olarak diğer proteinlere enzimatik kaskatın parçalarının aktiviteleri ile bağlıdır. Histon SUMOylasyon Shioo ve arkadaşlarının H4’ün KUBMP ile modifiye edilebildiğini buldukları 2003 yılında rapor edildi ve bu modifikasyon, HDACs’lerin ve HP1 proteinlerin alınmasıyla transkripsiyonel aktivitenin bastırılmasına yol açmıştır. Son yıllarda, bütün dört temel histonun mayada SUMOylaştırıldığı kanıtlandı. Bu varsayımsal SUMOylasyon bölgeleri K6/7 olarak ve az bir oranda H2B’nin K16/17, H2A’nın K126’sı, H4’ün N-ucunda bütün dört lizin olarak belirlenmiştir. Histon SUMOylasyon asetilasyon ve ubikutinasyon gibi diğer aktif özelliklere karşı çıkarak transkripsiyon represyonda bir rol oynar (Shioo and Eisenman 2003; Nathan *et al.* 2006; Yang *et al.* 2007; DeAngelis and Farrington 2008; Herceg and Murr 2011; Segre and Chiocca 2011; İzmirli 2013; Gulluce *et al.* 2014).

### 2.2.3. Ubikütinasyon

Ubikütin, ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş 76 tane amino asit içeren bir proteindir. Ubikütinasyon (veya ubikütinasyon) bir (monoubikütinasyon) veya birçok (poliubikütinasyon) ubikütin monomerlerinin kovalent bağlanmasıyla translasyon sonrası bir lizin kalıntısının  $\epsilon$ -amino grubunun modifikasyonu anlamına gelir. Normalde, poliubikütinasyon 26S proteasome yoluyla bozulan protein iken monoubikütinasyon protein fonksiyonunu değiştirir (Hershko and Ciechanover 1998; Schnitzler 2009; İzmirli 2013; Herceg and Murr 2011; Gulluce *et al.* 2014).

Histon H2A ubikütin eklenen ilk histon molekülü olarak tanımlanmıştır. Daha sonra H2B (K119, K120, K143 ve K123 mayada) H3 ve H1'in de ubikütine olduğu belirtilmiştir. Histonlar çoğunlukla monoubikütinedir halbuki H2A ve H2B poliubikütinedir. Histon olmayan proteinlere gelince, histon ubikütinasyon ubikütinin C-ucu ile E1 aktivesi, E2 bağlantısı ve E3 ligaz enzimlerinin dizisel eylemleri tarafından bir lizin histon zinciri arasında izopeptit bağın oluşumundan meydana gelmiştir. E2 ve E3 ubikütine olan proteini belirlemede önemli bir rol oynar. E3 ligazlar çoğunlukla HECT (E6AP-C ucu ile eş) veya RING (Really Interesting New Gene) protein ailesine aittir. Mayada, H2BK123 özellikli E2, Rad6 bu yüzyılın başında bulunan ilk E2 histonu olmuştur. Rad6 aktivitesi RING finger E3 ligaz, Bre1 ile birleşmiştir. Rad6'nın homoloğu *Drosophila*'da Rhp6, insanlarda HR6A/B, aynı zamanda Bre1'in homoloğu, *Drosophila*'da ve insanlarda RNF20, H2B ubiquitinasyon katıldığı görülmüştür. Histon H2A ubikütinasyon Polycomb represif kompleks 1 (PRC1)'e bağlıdır: PRC2, H2A'yı ve suskun gen ekspresyonu ubikütine eden PRC1 kompleksi tarafından tanınan H3K27me3 özelliklerini oluşturmuştur. En azından, PRC1 kompleksinin iki elemanı RING1b (Rnf2 olarak bilinir) ve BMI1, H2A'yı ubikütine eden bir heterodimeri oluşturduğu bulundu. PRC1 kompleksi, birçok proteinin yanısıra Polycomb, Polyhomeotic, Posterior sex combs (PsC) ve RING gibi PcG proteinleri içeren dört temel proteinden oluşur. PRC1 ve RING1b'nin ortologu PRC1den ayrı yapılar halinde bulunur ve bunlar *D. melanogaster*'de RING bağlantılı faktör (dRAF) ile memelilerde BCL6 corepresör (bCoR)'dür. Bu PRC1 türü kompleksler H2A'yı ubikütine edebilir.

Ubikutin kısmının histonlara eklenmesi, ubikutin C-terminal hidrolaz ve ubikitin-özlü çalışan proteazlardan oluşan ubikitin olmayan enzimlerin aktivitesi ile tersine çevrilebilir. Şu ana kadar 16 UBP mayada tespit edilmiştir. Bu UBP'ler özelliklerini aldıkları amino-terminal kısımlarının uzunlukları sayesinde farklılık gösterirler. En fazla çalışılan UBP'ler, UBP8 ve UBP10 olup H2B'ye özgüdür. UBP8 ise SAGA kompleksine ait olup ortologlar *Drosophila* (Non-stop) ve insanda (USP22) bulunmuştur. Her ikisinde SAGA kompleksi bağlamında H2B deubikitinasyona girmiştir. UBP10 aktivitesi SAGA'dan bağımsız ancak SIR bağımlıdır ve yüksek ökaryotlarda ortologların belirlenmesi gerekmektedir (Geng and Tansey 2008; Zhou *et al.* 2009; Robzyk *et al.* 2011).

K119'da (uH2A) ubikutine H2A transkripsiyonel aktivasyon için önemlidir ve birçok aktif gende yüksek oranda uH2A olduğu görülmüştür. Şaşırtıcı olarak, uH2A transkripsiyon inhibisyon ile bağlantılıdır. Aynı şekilde, H2B'nin ubikutinasyonu transkripsiyonun hem aktivasyonu hem de inhibisyonu ile bağlantılıdır. Transkripsiyon regülasyonda mono-ubikutine H2B'nin rolünde ki karmaşa en fazla spesifik antibodilerin olmamasından kaynaklıdır. Bununla birlikte, bir antijen olarak dallanmış peptitler kullanılarak uygun bir anti-uH2B monoklonal antininin oluşması kısmen bu konuyu aydınlatmış ve u-H2B-K120 ile gen ekspresyonu arasında pozitif bir bağlantı ortaya çıkarmıştır. Aslında, bu antibody dizileri düzene koyma üzerine yapılan CHIP-Chip deneylerinde kullanılmış ve sonuçlar yüksek oranda eksprese olan genlerin transkribe olmuş bölgeleri ile uH2BK120'in öncelikli bağlantısını göstermiştir. Bu özellik distal gen promotörleri ile değil transkripsiyon başlangıç bölümleri ile ve hatta aktif genlerin gen bodileri ile bağlantılı olduğundan, initiationdan ziyade transkripsiyon elongasyon ile bağlantılı olduğu ortaya konmuştur. Aktif transkripsiyon ile uH2B'nin bağlantılı olduğuna dair bir diğer ipucu Tom Muir'in laboratuvarında yapılan detaylı bir biyokimyasal çalışmada çıkmıştır. Bu çalışmada, araştırmacılar iki uçsuz ortogonal eksprese edilmiş protein ligasyon (EPL) reaksiyonları özellikle kimyasal olarak nükleozom olarak tanımlamış ve H2BK120'yi ubikutine etmek üzere kullanmışlardır. Sonuçlar H3-K79 metilasyonun, gen aktivasyonun bir özelliği olan hDot1L aktivasyonu olduğunu göstermiştir (Zhou *et al.* 2009; Herceg and Murr 2011).

Histon ubikütinasyonu diğer histon modifikasyonları etkileyebilir. Örneğin, histon deasetilaz 6 (HDAC6) ubikütine zinc –finger bölgesi (demir-parmak alanı) ile bağlandığını göstermiştir. H3K4 ve H3K79 metilasyonun Rad6-temelli H2BK123 ubikütinasyona bağımlı olduğu ortaya çıkmıştır. Ubikütinasyonun histon metilasyona olan etkisi transkripsiyonun hem aktivasyonu hem de inhibisyonundaki rolünü açıklar. Örneğin, H2B ubikütinasyonu en fazla Sir proteinleri aktif ökromatik bölgelerle bağlantıdan koruyan, böylece susturmayı kontrol etmek için heterokromatik bölgelere kısıtlayarak H3K4 ve H3K79 metilasyona yol açan ökromatide ortaya çıkar. Aynı zamanda, ökromatide, ubikütinasyon H3K4'ü metile ederek ve transkripsiyonel elongasyonu kolaylaştırarak transkripsiyonu aktif hale getirir (Herceg and Murr 2011).

#### **2.2.4. ADP-ribosilasyonu**

ADP-ribosilasyon, ADP-riboz kısmı  $NAD^{+}$ 'ı substrat olarak kullanarak proteine eklenmesi şeklinde tanımlanan bir translasyon sonrası modifikasyondur. Şayet, transfer bir amino-asit alıcı üzerinde olursa, mono- veya poli (ADP-ribosi)lasyon (PARasyon) denir ve asetil grup üzerinde olursa O-asetil-ADP-ribosilasyon olarak adlandırılır. Mono(ADP-ribosil)asyon ADP ribosil transferaz ile sağlanır ve PARasyon için gerekli enzimler poli (ADP-riboz) polimeraz (PARPlar)dır. Bütün temel histon ve bağlayıcı histon H1, ya genotoksik stres veya hücre döngüsü fazına, bölünme aktivitesine ve terminal farklılık derecesine bağlı fizyolojik şartlara mono(ADP-ribosil)asyon maruz kalırlar. PARasyon histon türlerinin birçoğunda görülebilir. Histonlar üzerinde PARP proteinlerinin aktivitesinde bir özellik vardır; örneğin, PARP1 bağlayıcı histon H1'i poli (ADP-riboz)laştırır halbuki PARP2 temel histonları tercih eder. Dizide tek bir kopukluğa cevaben (SSB), PARP1 ve PARP2 H1 ve H2B histonların C- ve N- uçlarını poli(ADP-riboz)laştırırlar. Bu durum tek sarmal kırıklarının onarımını (SSBR)/ baz eksizyon onarım (BER) faktörlerin hasar alanına erişimini kolaylaştıran kromatin yapısının relaksasyonuna yol açar. Bu kısmen şöyle açıklanabilir: histonların PARasyonu kromatinden çıkarılmaları şeklinde açıklanabilir. Histonların çıkarılması kromatin yapısının açılmasına neden olur (aynı mekanizma transkripsiyonel aktivasyona yol açar) ve dahası, PAR, DNA hasarından etkilenen bölgeyi belirlemek

için kullanılır, PAR'ın parçalarının mevcudiyeti ile işaretlenen hasarın boyutuna göre hücrenin yeterli tepkisine yol açar. Diğer yandan, son yapılan çalışmalar DNA hasarına tepki olarak PARP bağımlı ribosilasyon relaksasyondan ziyade lokal kromatin kondansasyonu tetiklediğini göstermiştir. Aslında, PAR parçaları histon değişkeni macroH2A1.1'in makro alanı ile tanınır. Bu geçici kondansasyona veya atlamaya, H2AX'in bölünme alanlarında artan fosforilasyonuna ve değişmiş DNA hasar tepkisine yol açan azalmış Ku70/80'in alınmasına sebep olur. Bunun açık sebebi Poli(ADP-ribosil)asyon DNA'nın daha fazla hasar görmesinin engelleyen kromatinin hızlı ve geçici yoğunlaşmasına yol açar ve bu çok sürmeden DNA onarımının gerçekleşmesini sağlayarak tersine çevirilir. Bu hipotez, Poly(ADP-ribosil)asyon düzeyinde azalmadan sonra kaybolan PAR-macroH2A1.1 etkileşimine bağımlı kromatin yoğunluğunun hızlı ve geçici doğası ile desteklenir (Herceg and Murr 2011; Gulluce *et al.* 2014).

DNA onarımında ve transkripsiyonunda mono-ve poli(ADP-riboz)lasyon'un rolü "histon kodu" bağlamında diğer kromatin modifikasyonları ile etkileşim sayesinde açıklanabilir. Örneğin, H4 üzerinde mono-ADP-ribosilasyon tercihen H4 hiperasetilleştiğinde ve arjinin 33 (R33) üzerinde ki histon H1.3'in mono-ADP-ribosilasyonu Serine 36 (S36)'ın döngüsel AMP-bağımlı fosforilasyonu azalttığında ortaya çıkabilir (Herceg and Murr 2011).

### 2.2.5. Fosforilasyon

Protein fosforilasyon, bir fosfat ( $PO_4$ ) grubunun bir protein molekülüne eklendiğini gösterir. Fosforilasyon belli çeşitlilikte protein kinazlarla katalize edilir halbuki fosfataz fosfat grubun çıkarılmasını sağlar. Histonlarda fosforlanır ve histon fosforilasyonun en fazla çalışılan alanları mitoz sırasında Aurora-B kinazla depolanan H3 (H3S10) histonun serine 10, H2A değişkenin S139 (mayada 129), H2AX, DNA hasarına bağlı ATM ve ATR tarafından yapılan fosforilasyondur. H2AX ayrıca tirozin 142 üzerinde fosforlanabilir. H4 (S1) ve bağlı histon H1 (S18, S173, S189, T11, T138 ve T155) sırasıyla CK2 ve DNA-PK tarafından fosforlandığı görülmüştür (Schnitzler 2007; Herceg and Murr 2011; Lu and Thompson 2012; İzmirli 2013; Gulluce *et al.* 2014).

### 2.2.6. Asetilasyon

Asetilasyon, bir asetil fonksiyon grubunu organik bileşiğe sokan reaksiyon olarak tanımlanır. Hem histonlar hemde histon olmayan proteinler asetilleştirilebilir. Histon asetilasyon asetil grubun transferinde ki asetil-CoA'dan ve histonların N-terminal uçları üzerindeki lizin  $\epsilon$ -amino gruplarından oluşur. Bu enzim aktivitesi histon asetiltransferaz adında enzimlerle katalizlenir (HATs). Asetil-CoA Arg/Gln-X-X-Gly-X-gly/Ala olan AT alanı adında HATs içinde belli bir alanı tanırlar. HAT enzimleri çoğunlukla bir HAT katalitik alt ünite, adaptör proteinler, fonksiyonu bilinmeyen birçok diğer molekül ve çoğu durumda TRRAP adında geniş çaplı proteinlerden oluşan çoklu altüniteli komplekslerde mevcuttur. Asetilasyon dört bütün histonda spesifik lizinlerde (H3, H4, H2B, and H2A) meydana gelir. Histonların hiperasetilasyonu transkripsiyonel olarak aktif bölgelerin bir özelliği gibi düşünülür. Araştırmalar, asetilasyonun rolünün tamamıyla transkripsiyonla bağlantılı olmadığını ancak diğer DNA onarımı ve replikasyonu gibi DNA temelli hücresel süreçleri etkileyebilir (Strahl *et al.* 2000; Loizou *et al.* 2006; Martin and Zhang 2007; Schnitzler 2007; Nott *et al.* 2007; Herceg and Murr 2011; Lu and Thompson 2012; İzmirli 2013; Gulluce *et al.* 2014).

### 2.2.7. Metilasyon

Protein metilasyonu bir metil grubun glutamat, lösin ve izoprenilat sistein veya yan zincirli lizin, arjinin ve histidin kalıntılarının nitrojen atomları üzerinde donör S-adenosilmetionin (SAM)'den alınan eki gösteren kovalant modifikasyondur. Bununla birlikte, histon metilasyon arjinin ve lizinde sadece ortaya çıkar. Arjininler mono veya dimetilleşmişlerdir hâlbuki lizinler mono- di- veya trimetildirler. Arjinin metilasyonu ya simetrik veya asimetriktir (Lu and Thompson 2012).

Histon metilasyondan sorumlu enzimler üç farklı sınıfa ayrılırlar: 1- H3 histonun 4, 9, 27 ve 36 lizinlerin metilasyonuna ve H4 histonun lizin 20'sine girmiş lizin özlü SET alanı içeren histon metiltransferaz, 2- H3 histonun lizin 79'u metilleştirmede kullanılan SET olmayan alan içerikli lizin metiltransferaz, 3- histon H4ün arjinin 3 ün yanısıra

histon H3'ün 2, 17, ve 26 yı metilleştirmede kullanılan arjin metiltransferazlarıdır (Yaykaşlı vd 2012).

Birçok histon modifikasyonu geri dönüşümlü olduğu halde, son zamanlara kadar metil grupların aktif bir şekilde histonlardan çıkarılıp çıkarılmadığı bilinmiyordu. İlk keşfedilen histon demetilaz aslında H3K4'ü demetilleştiren ancak aynı zamanda bir kompleks içinde androjen reseptör ile mevcut olduğunda H3K9'u da demetilleştiren LSD1dir. Diğer ilgili enzimlerin bir kısmı sırasıyla bulunup iki histon lizin demetilaz ailesine gruplandırılır: JMD2 ve JARID1 familyaları, JMD2 (Jumonji C (JmcC) alan içerikli proteinleri) familyası, JHDM3A (Jumonji C (JmjC)-alan içerikli histon demetilaz 3A; JMJD2A olarakta bilinir) hem H3K9 hemde H3K36 demetilleştiren ve H3K9, JHDM1 (JmjC alan içerikli-histon demetilaz 1) (H3K36 demetil hale getirir) ve UTX demetilleştiren JMJD2B ve JMJD2D. JARID1 proteinleri RBP2, PLU1, SMCY/Jarid1ds ve SMCX içerir. Histon arjinin metilasyon belirtileri tersine çevrilebilir. Arjinin demetilasyonu ile ilgili ilk araştırma histon H3 ve H4 üzerinde metilleşen arjininlerin insan "peptidilarjinin deiminaz 4" proteinin Pad4ün aktivitesi yoluyla sitriline dönüştürülür. Bu sürece "demetiliminyasyon veya deiminasyon" denir çünkü metil grubu arjinin imin grubuyla çıkarılır. Pad4 çoklu H3 (R2, R8, R17, ve R26) ve H4 (R3) histonları üzerinde arjin bölgelerini deimine eder. Histon demetilasyon sürecinde aracı olmasının yanısıra, deiminasyon östrojen sinyali yolunda yapar. Diğer yandan, JMJD6 yani direkt histon arjinin demetilaz son zamanlarda bulunmuş ve JMD2 familyasına ait olduğu keşfedilmiştir (Herceg and Murr 2011).

Histonlar üzerinde metilasyon özelliği gen ekspresyonun aktivasyon, elongasyon veya represyonu ile ilgilidir. Örneğin, H3K4me, me2 ve me3 aktif promotörlerde bulunup transkripsiyon başlangıcı ve elongasyon ile ilgilidir hâlbuki HK36me2/me3 transkripsiyon elongasyonu ile bağlantılıdır. Genlerin yanısıra histon metilasyon dağılımı konusunda daha detaylı bilgi edinmek için, ChIP-Chip ve ChIP-seq deneyleri yapılmış ve H3K4me3 5' uçta ve aktif gen tabaklarının promotör proksimal bölgelerinde doruğa çıktığı bulunmuş diğer yandan H3K4me aktif genlerin 5' ucunda zenginleşmiştir. Diğer yandan, H3K36me2/3 belirtileri aktif gen bölgelerinde ve



çoğunlukla 3' ucunda zenginleşir. H3K4me-bağlı transkripsiyon regülasyonunun belli bir mekanizması halen daha net değildir. Taf3 gibi histon modifiye edici kompleksler veya kromatin modelleme faktörlerinin PHD (Plant Homeo Domain) aracılığıyla böylece transkripsiyonu aktive ederek metilasyonu tanıyıp ona bağlanabileceği ihtimali vardır. H3K36 metilasyon belirtiler Rpd3S HDAC nin Eaf3 altbiriminin kromo alanı ile belirlenir. Bu gen topluluklarının deasetilasyonuna neden olur ve böylece gen topluluklarının kriptik bölgelerinde transkripsiyon bağlangıcını korur. H3K79 metilasyonu transkripsiyon aktivasyonuna ve elongasyonunda belirlenmiştir. Bununla birlikte bu dikkatli bir şekilde ele alınmalı çünkü bu belirti HOXA9 aktivasyonu ile alakalı olması ile ilgili olup Sir2 ve Sir3'ü ökromatine yayılmadan koruyarak heterokromatinin yayılmasını önler. Dahası, detaylı genom araştırmaları hem H3K79me2 ve hemde H3K79me3 mayada ve gen topluluklarında zenginleşme olduğunu sadece, *Drosophila* H3K79me2 aktif transkripsiyonu ile ilgili olduğunu göstermiştir (Frommer *et al.* 1992; Lu and Thompson 2012).

### 2.3. DNA Metilasyonu

Başta insan olmak üzere temel araştırmalara konu olan diğer model organizmaların genom dizi şifrelerinin çözülmesi ile yakın gelecekteki çalışmalar özellikle onkogeneze, metastaz ve çeşitli biyosüreçler gibi hücresel fizyolojik ve patolojik olaylarda gen ürünlerinin fonksiyonel rollerini anlama üzerine odaklanmıştır. Günümüz proteomik, epigenetik ve transkripsiyonel düzenleme mekanizmaları biyomedikal araştırmalarda en önemli konu başlıklarını oluşturmaktadır (Cheng *et al.* 2011; Herceg and Murr 2011).

Bütün ökaryotlardaki kromatin materyalinin en temel yapı taşı olan nükleozomlar, bir histon oktomeri etrafına iki tam döngü boyunca sarılan yaklaşık 146 baz çifti uzunluğundaki DNA parçacığından oluşur. Kromatin, genetik bilgiyi depolamak için pasif bir platform olmaktan ziyade, her iki bileşen (DNA ve histonlar) üzerindeki değişikliklere dayalı olarak transkripsiyonel süreçleri düzenler. Memelilerde, DNA metilasyonu çoğunlukla CpG dinükleotid grupları içerisinde yer alan sitozinin C5 pozisyonunda oluşur (Goedecke *et al.* 2009; Herceg and Murr 2011; Lahtz *et al.* 2012).

Histonlar metilasyonun da dahil olduğu çeşitli enzimatik reaksiyonlarla özellikle daha esnek yapıda olan N-Terminal bölgelerinden post translasyonel olarak modifiye olurlar. Bu modifikasyonlar, kromatin yapısının değiştirilmesinde önemli bir rol oynar ve böylelikle gen ekspresyonunun düzenlenmesi, DNA tamiri, DNA rekombinasyonu ve kromatin materyaline bağlı pek çok farklı süreci düzenlerler (Faulk *et al.* 2013).

Histon metilasyonu, lizin ya da arjinin kalıntılarında olabilir. Hem DNA hem de histon metilasyonu S-adenozil-L-metiyonine bağımlıdır. SAdoMet, SAM veya SAM'e olarak da bilinen AdoMet, ATP'den sonra en çok kullanılan ikinci enzimatik kofaktördür ve piyasadaki en pahalı ve popüler gıda katkı maddelerinden birisidir. Ancak, AdoMetin bir besin olarak gerçek faydaları ve riskleri hala belirsizliğini korumaktadır (Herceg and Murr 2011; Hess and Stamler 2012; Kosova vd 2012).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ile birlikte epigenetik programları belirler. Epigenetik mekanizmalar farklı hücre tipleri için gen ifadesi motiflerinin belirlenmesinden sorumludur. Genomik imprinting, gen susturulması, X kromozomu inaktivasyonu, pozisyon etkisi, yeniden programlama ve karsinogenezin ilerlemesi dâhil olmak üzere birçok biyolojik olay, epigenetik süreçlerdir. Bu süreçlerde DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları karmaşık bir şekilde birbirlerine bağlanır. Örneğin, H3 lizin 9 (H3K9) metiltransferazlar olan Suv39h1 ve Suv39h2'den yoksun olan fare ES hücreleri, satellit DNA bölgelerinde belirgin demetilasyon gösterirler. Histon H3 lizin 4 (H3K4) metilasyonunun somatik hücrelerdeki gen promotorlerini, *de novo* DNA metilasyonundan koruduğu gösterilmiştir. Memelilerdeki *de novo* DNA metilasyon mekanizması ise Dnmt3L-Dnmt3a kompleksi yapısındadır ve mitotik olarak kalıtıldığı henüz belirlenememiş histon H3 lizin 4 metilasyon motiflerini, etkilenmiş gen dizilerinin kalıtsal olarak transkripsiyonel yolla sessizleştirilmesine yardımcı olan DNA metilasyon motiflerine dönüşmesine sebep olabilir. Bu mekanizma dişı germ hücrelerindeki işaretleyici kontrol bölgelerinin ve erkek germ hücrelerindeki dağımlık tekrar dizilerinin *de novo* metilasyonuna ihtiyaç duyar (DeAngelis and Farrington 2008; Jia and Cheng 2009).

Günümüzde epigenetik, DNA metilasyonu, histon lizin metilasyonu ve demetilasyonu ile ilgili birçok görüş vardır.

### 2.3.1. Memeli DNA metil transferazları

Memelilerde, DNA metiltransferazlar (Dnmts) dört üyeyi kapsar ve Dnmt1 ile Dnmt3 ailelerini oluşturur. Bunlardan Dnmt3 başlangıçtaki *de novo* metilasyon desenlerinin oluşturulmasından sorumlu olmasına rağmen, Dnmt1 hücre döngüsü sırasında bu desenlerin devamından sorumludur (Jin *et al.* 2010; Oakeley 2010; Herceg and Murr 2011; Yaykaşlı vd 2013).

Dnmt3 ailesi, Dnmt3a ve Dnmt3b adında iki tane aktif *de novo* DNA metil transferazdan ve Dnmt3 benzeri bir protein olan Dnmt3L düzenleyici faktöründen oluşur. Dnmt3a ve Dnmt3b benzer yapı düzenine sahiptirler. Bunlardan her ikisi de N-uç bölgelerinde PWWP yapısı gösteren değişken bölgelere sahiptir, altışar tane CXXC motifinden oluşan sistein yönünden zengin 3-çinko bağlanma bölgeleri vardır ve C-uç bölgelerinde katalitik bir bölge bulunur. Dnmt3L, sistein zengin 3-çinko bağlanma bölgesinin yapısı yönünden Dnmt3a ve Dnmt3b ile yüksek bir dizi benzerliği gösterir ancak C-uç bölgesinde DNA metil transferaz aktivitesini gösterebilecek yapılardan yoksundur. Bilinen DNA metiltransferazlarla yüksek dizi ve yapı benzerliği bakımından yakın akraba olan DNMT2, tRNA<sup>Asp</sup>'nin antikodon kolundaki 38. sitozini metiller (Boland and Christman 2009).

Literatüre göre 2007 yılında Dnmt1'e ait herhangi bir kısım için yapısal bilgi bulunmamasına karşın Dnmt3b'nin PWWP kısmı, histon H3 peptidi ile kompleks halindeki Dnmt3L'nin total uzunluğu ve Dnmt3a ile Dnmt3L'nin C-uç bölgelerindeki oluşumlar hakkında yapısal veriler mevcuttur (DeAngelis and Farrington 2008; Boland and Christman 2009; Jin *et al.* 2010; Cheng *et al.* 2011).

### 2.3.2. Dnmt3L *de novo* DNA metilasyonu için düzenleyici bir faktördür

Dnmt3L nakavt farelerin fenotipleri, erkek ve dişi germ hücrelerindeki DNA dizilerinin cinsiyete bağımlı *de novo* metilasyonu koşulu ile oluşturulan Dnmt3a nakavt farelerinin fenotipi ile ayırt edilemeyecek kadar benzerdir. Bu sonuçlar, Dnmt3a ve Dnmt3L'nin üreme hücrelerindeki baskın lokusların metilasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Dnmt3a ve Dnmt3b ile aynı lokalizasyon ve immünopresipitasyon özelliği gösteren Dnmt3L, bu enzimlerin yapmış olduğu *de novo* metilasyonu teşvik eder. Yapılan çalışmalarla, Dnmt3L ve Dnmt3a (veya Dnmt3b) arasında etkileşimin ortaya çıkması ve aktivasyonun sağlanması için gerekli olan temel yapıların bu proteinlerin C-uç bölgelerinde yer aldığı ve Dnmt3a ile Dnmt3L C-uç bölgelerindeki yapılar arasında kompleks oluşumların bulunduğu gösterilmiştir (DeAngelis and Farrington 2008; Choi and Friso 2009; Lu and Thompson 2012).

Hem Dnmt3a-C hem de Dnmt3L-C bölgeleri, AdoMet bağımlı metiltransferazlar için klasik katlanma kısımlarına sahiptir. Bunlar arasındaki tek fark, reaksiyon ürünü S-adenosil-L-homosistein'in Dnmt3a-C'de bulunmasına karşın Dnmt3L-C'nin yapısında olmamasıdır. Bu durum kompleksin aktif kısmının Dnmt3a-C, inaktif ve kofaktör bağlamada yetersiz kalan kısmının ise Dnmt3L kısmının olması görüşü ile uygunluk göstermektedir. Kompleksin bütünü incelendiğinde şeklinin bir kelebeğe benzediği gözlemlenmiştir. Bu yapı, bir tarafta 3L-3a ara yüzünden ve diğer tarafta 3a-3a ara yüzünden meydana gelen bir tetrameri (3L-3a-3a-3L) oluşturan ikişer tane Dnmt3L-C ve Dnmt3a-C monomerini içerir. Yapılan çalışmalar, Dnmt3a-3L yada Dnmt3a-3a yapılarının kilit noktalarında meydana gelecek olan non-katalitik amino asit değişimlerinin enzimatik aktiviteyi bozacağını, dolayısıyla hem 3a-3L hem de 3a-3a yapılarının katalitik aktiviteden birlikte sorumlu olduklarını göstermiştir. Ayrıca Dnmt3L, Dnmt3a'ya ait aktif bölgenin (anahtar nükleofil Cys706 içeren) C-terminal kısmı ile etkileşime girebilir ve bu bölgenin yapısını kararlı kılabilir. Bu stabilize etkileşimler ile Dnmt3L tarafından Dnmt3a2 aktivitesinin uyarılması da açıklanmaktadır (Boland and Christman 2009; Herceg and Murr 2011; Lu and Thompson 2012).

### 2.3.3. CpG adalarının belirlenmesini kapsayan *de novo* metilasyon için bir model olarak dimerik Dnmt3a

Bilinen aktif DNA metil transferazlar arasında, Dnmt3a ve Dnmt3b enzimleri Dnmt3L'den farklı olarak, bilinen en küçük DNA bağlanma bölgelerine sahiptir. Bu bölgeler yaklaşık olarak 50 amino asit kalıntısından meydana gelir ve bakteriyel GCGC M.HhaI metiltransferaz enziminin 85 amino asitten oluşan bağlanma bölgesinden bile daha küçük olmaları ile karakteristik özellik gösterir. Buna karşın, 3a-3a bağlanma bölgelerinin dimerizasyonu ile iki aktif bölge bir araya gelebilir. Bu olay DNA bağlama yüzeylerinin çoğalması ve aktivitenin etkin bir biçimde artması ile sonuçlanır. Yapılan deneysel araştırmalarda küçük bir oligonükleotide kompleks halindeki M.HhaI enzimi ile Dnmt3a'nın moleküler yapısı birleştirilmiş ve Dnmt3a-DNA kompleksini açıklayıcı bir model elde edilmiştir. Bu modele göre küçük bir DNA parçasığı (duplex) her bir aktif bölge ile bağlanma gösterir. Böylelikle iki aktif bölge 40 Å uzaklığındaki bölgede yerleşir ve iki DNA segmenti komşu noktalardan kolaylıkla birbiri ile bağlanabilir. Bu model ayrıca dimerik yapıdaki Dnmt3a'nın iki ayrı CpG adacığını tek bir bağlanma olayında tek bir helikal dönüş ile metilleyebileceğini göstermektedir. Dnmt3a'nın uzun DNA parçaları üzerinde periyodik aktivite göstermesi metilenmiş CpG adacıklarının 8-10 baz çifti mesafelerle ortaya çıkması ile de korelasyon göstermektedir. Bu durum oligomerizasyon olayının, Dnmt3a'nın DNA'yı periyodik bir şekilde metillemesine sebep olduğunu düşündürmektedir. Farelerde maternal işaret taşıyan 12 gen ile yapılan bir çalışmada, farklı metilasyon bölgelerinde CpG adacıklarının frekansı incelenmiş ve mevcut hipotezi destekler sonuçlar bulunmuştur. Bu sonuçlar ayrıca hem CpG adacıklarını hem de nükleozom modifikasyonlarını içeren işaretlenmiş genlerin farklı tanıma ve metilasyon bölgelerine sahip olabileceğine yönelik temel veriler içermektedir (DeAngelis and Farrington 2008; Jin *et al.* 2010; Cheng *et al.* 2011; Mirbahai and Chipman 2013).

Dnmt3b'nin katalitik bölgesi Dnmt3a ile %80 benzerlik göstermektedir ve bu iki benzer kısım içerisinde boşluk yada insersiyonlar bulunmaz. İnsanlarda ki Dnmt3b'de meydana gelen nokta mutasyonlar ICF (immün yetersizlik, sentromer kararlılığında azalma ve

yüz anormallikleri) sendromu ile sonuçlanır ve hasta bireyler yetişkinliğe ulaşmadan ölür. Yapılan araştırmalarda ICF sendromuna sebep olan mutasyonların çoğunun Dnmt3b'nin C-uç bölgesindeki katalitik kısımda meydana geldiği gösterilmiştir. Dnmt3b monomerinin Dnmt3a ile benzer moleküler yapıya sahip olduğu varsayıldığında ICF mutasyonlarının enzimin aktivitesini birçok alternatif yol ile azaltabileceği öngörülebilir. Bu alternatif yollar: [1] enzim stabilitesinin etkilenmesi (V699G, V728G ve A766P), [2] aktif bölgede konformasyonel değişimlerin meydana gelmesi (G663S ve L664T), [3] AdoMet metil vericisi ile uygunsuz eşleşme (A585V, V606A ve A603T), [4] 3b-3b kompleksinin oluşumunda aksama (3a-3a kompleksi ile analog, V818M, D817G ve H814R) ya da [5] DNA ile etkileşimde meydana gelen aksamalar (R823G) olarak sıralanabilir. İlginç olarak Dnmt3b ve Dnmt3L arasındaki komplekste hiç ICF mutasyonu gözlenmemiştir. Bu durum burada meydana gelebilecek mutasyonların letal olduğunu veya Dnmt3b ile Dnmt3L'nin farklı fonksiyonlara sahip olabileceğini düşündürmektedir. Dnmt3b ile Dnmt3L nakavt insan hücreleri ile yapılan *in vivo* deneyler de ikinci ihtimalin daha doğru olabileceğini gösteren veriler sunmuştur (DeAngelis and Farrington 2008; Lu and Thompson 2012).

#### **2.3.4. Dnmt3L ve H3 histon proteininin metillenmemiş 4. lizininin *de novo* DNA metilasyonu ile ilişkisi**

Dnmt3L gen bölgesi ile yapılan *in vivo* çalışmalar, bu bölgeye ait ürünün Dnmt3a'nın germ hücrelerindeki izoformu olan ve aktivasyon için genomik işaretlere ihtiyaç duyan Dnmt3a2, Dnmt3b ve 4 histon proteini ile ilişkide olduğunu göstermiştir. Peptit etkileşim deneyleri sonucunda Dnmt3L'nin özellikle H3 histon proteininin en uç amino-terminal bölgesi ile etkileşim halinde olduğu gözlemlenmiştir. Yine yapılan deneylerde bu etkileşimin, H3 histon proteininin dördüncü lizininde meydana gelen metilasyonla kuvvetli bir biçimde engellendiği, ancak diğer modifikasyonlara karşı duyarsız olduğu tespit edilmiştir. Dnmt3L ve H3 uzantısının eş zamanlı kristalizasyonu sonucunda ise H3 uzantısının Dnmt3L'nin sistein yönünden zengin 3-çinko bağlanma bölgesine tutunduğu ve bu bölgede meydana gelebilecek değişimlerin H3-Dnmt3L etkileşimini bozabileceği gözlenmiştir. Bu deneyden elde edilen sonuçlar, Dnmt3L'nin H3 histon

proteininin metilasyon taşımayan dördüncü lizin bölgesini tanıdığını ve bu bölgenin *de novo* metilasyonunu sağlayacak Dnmt3a2 enziminin aktivasyonunu sağladığını göstermektedir. Benzer çalışmalar farklı metilasyon bölgelerinde H3K4 metilasyonu ve allele spesifik DNA metilasyonu arasında ters bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuştur. Bu ilişkiye göre allel metilasyonunun olduğu durumlarda H3K4 metilasyonu, H3K4 metilasyonunun olduğu durumlarda ise allel metilasyonu meydana gelmez. Dnmt3L-Dnmt3a kompleksi üzerine yapılan çalışmalar, ayrıca bu kompleksin H3K4 metilasyonu olmayan kısımları sistein aminoasiti yönünden zengin 3-çinko bağlanma bölgesiyle tanıdığını, buna karşın metil transferazların C-ucu kısımlarına benzeyen bölgesiyle de aktif DNA metil transferaz Dnmt3a ile etkileşime girerek kalıtsal DNA metilasyonu motiflerini oluşturduğunu ortaya koyan yeni bir mekanizmanın varlığını göstermiştir. Bunun sonucu olarak H3K4 metilasyonu henüz metillenmemiş farklı metilasyon bölgelerini DNA metilasyonundan Dnmt3a-Dnmt3L kompleksi vasıtasıyla koruyabilir (Cheng *et al.* 2011).

#### **2.4. Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) ve DNA Metilasyonlarının Araştırılması**

COBRA tekniği bisülfid dönüşüm reaksiyonu sonrasında restriksiyon enzimlerinin gen bölgelerini tanıyıp tanımadığı koşuluna dayanmaktadır. Bu teknik CpG zincirinde metilasyon seviyelerini kantitatif olarak araştırmak için uygun görülmektedir (Xiong and Laird 1997; Eads and Laird 2002; Kristensen and Hansen 2009; Warnecke *et al.* 2009; Tiwari *et al.* 2009; Hattori and Ushijima 2011).

Bu yöntem, genomik DNA'da küçük bir örnekte DNA sekansı üzerinde özel bir genomik lokusta, DNA metilasyon seviyelerinin hassas ölçümünü sağlayan bir moleküler biyoloji tekniğidir (Xiong and Laird 1997; Eads and Laird 2002; Fraga 2002; Brena *et al.* 2006; Watanabe *et al.* 2010).

COBRA tekniği bisülfid sekansının bir çeşididir ve restriksiyon enzimi kesimi ile bisülfid dönüşüm muamelesiyle polimeraz zincir reaksiyonu temelli bir uygulamadır

(Xiong and Laird 1997; Taylor *et al.* 2007; Kristensen *et al.* 2009; Chen *et al.* 2012; Paliwal *et al.* 2012; Huang *et al.* 2013).

Başlangıçta güvenilir microdissected parafine gömülü doku örneklerinden elde edilen genomik DNA miktarlarını işlemek için geliştirilmiş bu teknik günümüzde kanser araştırmaları ve epigenetik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tekniğin, DNA izolasyonunun ardından gerçekleştirilen aşamaları aşağıdaki gibi sıralanmıştır (Xiong and Laird 1997; Eads and Laird 2002; Ho and Tang 2007; Mutirangura 2007; Dahl *et al.* 2008; Ushida *et al.* 2011; Karpinski *et al.* 2012).

#### **2.4.1. Bisülfıt muamelesi**

Bisülfıt muamelesi CpG zincirinde yer alan 5-metilsitozin içeren DNA dizisi genlerinin metilasyon derecelerinin analizi için yeni tekniklerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemde DNA'da sodyum bisülfıt davranışı metillenmemiş bütün sitozinleri deamine etmesiyle urasile dönüştürür, ancak metillenmiş sitozin kalıntıları hiçbir değişikliğe uğramadan sitozin olarak kalır. Bisülfıt dönüşümünün ardından özel olarak tasarlanmış olan primer setleri kullanılarak PCR ile çoğaltma yapılır. Bu işlemin ardından bisülfıt muamelesiyle urasile dönüşmüş olan metillenmemiş sitozinler PCR amplifikasyonu ile timine dönüşürler (Xiong and Laird 1997; Eads and Laird 2002; Boyd *et al.* 2006; Kristensen and Hansen 2009; Smirnikhina and Lavron 2009; Tiwari *et al.* 2009; Warnecke *et al.* 2009; Patterson *et al.* 2011; Paliwal *et al.* 2012).

#### **2.4.2. PCR amplifikasyonu**

Bisülfıt ile muamele edilmiş olan DNA'nın PCR reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılır. Bisülfıt reaksiyonu sonucunda urasile dönüşen sitozinler PCR amplifikasyonu ile timine dönüşürler. PCR amplifikasyonu yapılmadan önce amplifikasyonu hedeflenen bölgeler için spesifik primer setleri dizayn edilir. Primer setleri dizayn edilirken primerlerin içerisinde CpG kısımlarının olmayışına dikkat edilemelidir. Aksi takdirde PCR amplifikasyonu esnasında meydana gelmesi beklenen baz değişimleri analiz



edilememektedir (Xiong and Laird 1997; Eads and Laird 2002; Liu and Maekawa 2003; Kristensen and Hansen 2009; Warnecke *et al.* 2009; Tiwari *et al.* 2009; Paliwal *et al.* 2012).

#### **2.4.3. Restriksiyon enzimi ile kesim**

PCR amplifikasyonun sonucunda meydana gelen PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek sadece daha önce metillenmiş olan bölgeleri (CGCG) kesilirken metillenmemiş (TGTG) olan kısımları olduğu gibi kalır. Bütün restriksiyon enzimi ile ilgili reaksiyonlarda en az 4-16 saat arasında uygun koşullarda bekletme yapılmakta ardından tekrar restriksiyon enzim reaksiyonunun durdurulması için uygun sıcaklık ve sürede bekletilmesi gerekmektedir (Xiong and Laird 1997; Eads and Laird 2002; Kristensen and Hansen 2009; Warnecke *et al.* 2009; Tiwari *et al.* 2009; Paliwal *et al.* 2012).

#### **2.4.4. Kesim sonucu elde edilen ürünlerin görüntülenmesi**

Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan fragmentler çeşitli elektroforez ve görüntüleme yöntemleriyle analiz edilir (Xiong and Laird 1997; Eads and Laird 2002; Tiwari *et al.* 2009; Warnecke *et al.* 2009; Yang *et al.* 2010).

#### **2.4.5. COBRA tekniğinin olumlu özellikleri**

**Laboratuvar ortamında kolay, hızlı ve ucuz bir şekilde uygulanabilir:**

DNA metilasyon seviyeleri bisülfid sekansta olduğu gibi zor sub-cloning ve sekans işlemlerine gerek kalmadan kolay bir şekilde ölçülebilir. COBRA deneyi basittir ve standart moleküler biyoloji reaktifleri ile yapılabilir (Xiong and Laird 1997).

**Yüksek uyumluluk:**

PCR ve saflaştırma işlemlerinin ardından bu method sadece küçük genomik DNA miktarlarıyla değil; aynı zamanda parafin ile muamele edilmiş örneklerde de çalışır (Xiong and Laird 1997).

**Kantitatif analiz:**

Bu teknik kalitatif olan Methylation Spesific PCR tekniğine tam zıt olan bir tekniktir. COBRA tekniği ile belirli bir gen lokusundaki DNA metilasyon seviyesinin doğrudan miktarı belirlenebilir ve her bir deney için ürün hakkında daha fazla bilgi edinilebilir (Xiong and Laird 1997; Janitz and Janitz 2011; Paliwal *et al.* 2012).

**Ölçeklenebilirlik ve yüksek verimli ürün işleme:**

Bu teknik ile araştırılan paralel gen bölgeleri aynı restriksiyon enzimi ile kesilebilir (Xiong and Laird 1997).

**Her bir analizde çoklu sorgulama:**

Metilasyonun durumu tek kesim analizinde çok sayıda CpG-ihativa-eden restriksiyon bölgesinin araştırılmasında kullanılabilir (Paliwal *et al.* 2010).

**2.4.6. COBRA tekniğinin kullanımı ve uygulama alanları**

COBRA tekniği, kanser çalışmalarında gen promotör bölgelerinde meydana gelen DNA metilasyon değişikliklerini araştırma tabanlı uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Genomik imprinting mekanizmasında yer alan ve değişikliğe uğramış genleri saptamada rol oynar. Memelilerin gelişimi esnasında genomlarında meydana

gelen metilasyonları tanımlar (Ho and Tang 2007; Mutirangura 2007; Dahl *et al.* 2008; Ushida *et al.* 2011; Karpinski *et al.* 2012).

COBRA tekniği tıpta anormal DNA metilasyonu içeren insan hastalıklarını teŖhis etmede bir araç olarak kullanılmaktadır. AraŖtırmacılar genetik imprinting bozukluğu hastalığı olan Russell-Silver Sendromu'nda imprinte olmuŖ olan H19 geninde meydana gelen hipometilasyonu araŖtırmada COBRA tekniğini kullanmaktadır (Dahl *et al.* 2008; Esteller 2008; Ushida *et al.* 2011; Karpinski *et al.* 2012).

Yine bu teknik temel bilimlerde özellikle model organizmaların yaŖam döngülerinde meydana gelen metilasyon tabanlı epigenetiksel olayların incelenmesi için uygun bir metot olarak dikkat çekmektedir (Xiong and Laird 1997).

## **2.5. COBRA İçin Model Organizma Olarak *Saccharomyces cerevisiae***

Genel olarak ekmek mayası olarak bilinen *S. cerevisiae*, ökaryotik hücre yapısı, geliŖmiŖ gen regülasyon sistemlerine sahip olması, laboratuvar ortamında kontrollü Ŗartlarda kolayca çoğaltılabilir olması ve tüm genom dizi bilgisinin aydınlatılmıŖ olması yönünden COBRA tekniğinin uygulanması için uygun bir model organizmadır. Ayrıca bu organizma için sukroz ve glukoz metabolizmalarında rol oynayan SUC ve HXT gibi eŖitli gen bölgelerinin DNA dizi bilgilerinin de biliniyor olması, ortamda bulunan farklı besin maddelerinin organizmanın gen ifadesini nasıl etkilediğini konu alan alıŖmaların yapılmasına da olanak sağlamaktadır (El-Fiky *et al.* 2012; Voordeckers *et al.* 2012).

### **2.5.1. *Saccharomyces cerevisiae*'da SUC gen bölgesi**

*S.cerevisiae*'nın SUC gen bölgesi invertaz enzimini kodlamaktadır. Bu enzim sukrozu hidrolize ederek glukoz ve frktoza indirger (Lutfiyya and Johnston 1996).

*S. cerevisiae* genomu invertazı kodlamak için 7 farklı bağlantısız gen bölgesi içerir. Bunlar SUC 1, SUC 2, SUC 3, SUC 4, SUC 5, SUC 7, SUC 8 dir. Aynı zamanda bu enzim ‘‘beta–fruktofuranozidaz’’, ‘‘beta-fruktozidaz’’ veya ‘‘sukraz’’ olarak da bilinmektedir ve bu enzim şeker metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. SUC 2 dışındaki tüm invertaz genleri telomer zincirleri içerisinde yer almaktadır. SUC 2 invertazın iç ve dış invertaz olmak üzere iki farklı formunu kodlar. Dış invertaz yüksek glikolize olmuş periplazmik boşluğa salgılanan ve hidrolizin meydana geldiği bir homodimerdir. Reaksiyon ile sukrozun monosakkarit ürünlere dönüşümü sağlanır. İç invertaz da homodimer oluşturur ancak glikolize değildir ve sitoplazmada yer almaktadır. İç invertazın sukroz fermantasyonunda ya da herhangi bir diğer biyolojik işlemde bilinen bir işlevi yoktur. İvertazın iki şekli de iki farklı biçimde mRNA’lar tarafından ucunda translasyona uğrar ki, bu durum sadece 5’ ucundaki farktan kaynaklanmaktadır. İç invertaz, düşük seviyelerde yapısal olarak sentezlenir iken dış invertaz ise glukozun baskılanmasına maruz kalmaktadır (Lutfiyya and Johnston 1996).

İvertaz ayrıca enzimlerin temel fonksiyonlarının araştırılmasında da önemli rol oynamaktadır. Ayrıca invertaz şekerlerden fruktoz üretmek için kullanılan gıda sektöründe önemli bir yeri olan enzimdir (Lutfiyya and Johnston 1996).

### **2.5.2. *Saccharomyces cerevisiae*’da HXT gen bölgesi**

Glukoz doğada en çok bulunan monosakkarittir. Hemen hemen bütün hücreler için karbon ve enerji kaynağıdır. Birçok hücrede glukozun kendi metabolizmasını düzenleyen en temel ajanlardan biri olduğu ve hem transkripsiyonel hem de post translasyonel aşamalarda bu etkisini gösterebildiği bilinmektedir. Bu durum ekmek mayası olarak bilinen *S. cerevisiae*’da en belirgin özelliştir, bilinen veya muhtemel glukozu kodlayan 20 geni vardır ve her biri glukoz için ayrı afiniteye sahiptir. HXT genlerinin çoğunun ifadesi ve fonksiyonu glukozu farklı seviyelerde düzenler (Ozcan *et al.* 1998).

Bu mekanizmanın glukoz seviyesi yüksek olduğunda HXT genlerinin transkripsiyonunu bastıran ve MIG1 transkripsiyonel represör ile çalışır ve bu durum Snf1-Snf4 protein kinaz ile REG1 ve Glc7 protein fosfat tarafından düzenlenir. Diğer bir metabolik yol ise glukoz tepki olarak HXT'nin ifadesini indükler ve RGT1 transkripsiyonunu baskılar, ubiquitin ligaz protein kompleksi (SCF(Grr1) RGT1'in işlevini düzenler ve hücre zarının iki glukoz sensörü (SNF3 ve RGT2) glukozu bağlayan ve RGT1 için oluşan hücre içi sinyallere cevap verir. Bu iki regülatör metabolik yol diğerleri ile iş birliği halindedir. Daha az anlaşılan bu metabolik yollar maya hücreleri için glukoz taşınımındaki en uygun glukoz miktarını ayarlar (Ozcan *et al.* 1997; Ozcan *et al.* 1998).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan model organizmanın temin edilmesi

Bu çalışmada kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* (ATTC® Numarası: 9763) suşu Microbiologics Incorporation–U.S.A. firmasından ticari olarak temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve besiyerleri

Çalışmamızda kullanılan kimyasal ve besiyerleri aşağıdaki gibidir;

MgSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O (A769586 627), C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (K36544437 650), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (A850773 723) ve NaCl (K44555504 332) Merck®’ten, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (09982), C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, (84097) ve Yeast extract (70161) Fluka®’dan, fenol-klorofom-izoamil alkol 25:24:1 (77617), izopropanol (19516), Gliserol (G5516), Etilendiamin tetraasetik asit (E5134), Triton X 100 (T8787), Tris-HCl (T-6066), ve Direct Load™ wide range DNA marker (D7058), Ethanol (32221) Sigma-Aldrich®’ten, Expand high fidelity PCR system (13434038) Roche’den, Taq I (00108322) ve Hinf I (00108322) Thermo scientific’den, Potato Dextrose Agar (CM0139) Oxoid®’ten, bakteriyolojik pepton (057796) LAB M™ den, Agaroz (0000242587) Lonza’den, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (022001) Doğa ilaç hammaddeleri ticaret ltd.şti.’den, Wizard® genomic DNA purification kiti (A1120) ve Methyledge™ bisülfite conversiyon system kiti (N1301) Promega’den temin edilmiştir.

##### 3.1.3. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Buzdolabı : Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF  
Çalkalamalı İnkübatör : Zhicheng, CHINA, ZHWY-200B

Derin Dondurucu	: Nuair, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316 PK
Hassas Terazi	: Mettler Toledo, CHINA, AL204
İnkübatör	: Binder, GERMANY, BD53
Manyetik Karıştırıcı	: Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083
Mikrodalga Fırın	: Arçelik, TÜRKİYE, MD592
Mini Karıştırıcı	: IKA, U.S.A., M51, SN 03017581
Otoklav	: Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Saf Su Cihazı	: GFL, GERMANY, 2004
Sıcak Su Banyosu	: Memmert, GERMANY, 854
Steril Kabin	: Esco, SINGAPORE, AC2-4E1
Spektrofotometre	: Shimadzu, JAPAN, RC 232C
pH Metre	: Hanna, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202
Santrifüj	: Hettich EBA 21, GERMANY
Mikrodalga Fırın	: Beko MD1505, TÜRKİYE
Elektroforez Tankı	: OWL B2, U.S.A.
Elektroforez Akım	: OWL OSP300-2Q, U.S.A.
Sağlayıcı	
Jel Görüntüleme Sistemi	: DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL
Buz Makinesi	: Scotsman AC45, ITALY
QIAxcel Advanced System	: Qiagen, GERMANY
Heat Block	: WiseThem <sup>®</sup> , KOREA
PCR Cihazı	: Sensquest Biomediziniche Elektronik, GERMANY
Vortex	: IKA, U.S.A., MS2

### 3.1.4. Çözeltiler ve besiyerleri

Çalışma süresince kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri aşağıda verilmiştir.

**Potato Dextrose Agar (PDA)**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Potato dextrose agar	39 g

Bu besiyerin hazırlanışında yukarıda belirtilen agar hassas terazide 39 g tartıldıktan sonra erlene aktarılır ve ardından 1000 ml distile su eklenir. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünmesi sağlanır ve 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir.

**Fenol: Kloroform: İzoamil alkol**

25: 24: 1 oranında hazır olarak kullanılmıştır (Sigma, 77617).

**% 70'lik Etil Alkol**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Alkol	700 ml
Distile su	300 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında 700 ml saf etil alkolün hacmi 300 ml steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

**TE Tamponu**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Tris-HCl	1.2g
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	0.372 g



Bu çözeltinin hazırlanışında 1.2 g Tris-HCl ve 0.0372 g etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) 1000 ml distile su içerisinde çözülür ve oluşan çözeltinin pH değeri 8'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve oda sıcaklığında saklanır (Wilson 1997).

### **%10'luk SDS çözeltisi**

#### İçerik

1000 ml için

Sodyum dodasil sülfat

100 g

100 g sodyum dodasil sülfat 1000 ml steril distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir sterilizasyonun oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### **Mikroorganizma Stok Besiyeri**

#### İçerik

1000 ml için

Yeast extract

5 g

Pepton

10 g

Saf su

800 ml

Gliserol

150 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında yukarıdaki maddeler steril bir erlen içerisinde katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülür. pH'sı 5,8 ayarlanır ve daha sonra 150 ml gliserol eklenerek son hacim 1000 ml'ye tamamlanır. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve kriyovial tüplere 1,5 ml hacimlere bölünür.

**Ethidyum Bromür Çözeltisi**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Steril saf su	1000 ml
Ethidium bromür	10 g

1000 ml steril saf su içerisinde 10 g ethidium bromür magnetik karıştırıcı kullanarak iyice çözülür. Hazırlanan çözelti amber şişede, oda sıcaklığında muhafaza edilir (Barış 2009).

**0,5X TBE Tamponu**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
10X TBE Stok Solüsyonu	50 ml
Steril Distile Su	950 ml

Bu tamponun hazırlanışında 50 ml 10X TBE stok solüsyonu üzerine 950 ml steril distile su eklenir. Hazırlanan tampon +4°C’de muhafaza edilir.

**1X TAE Tamponu**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
10X TAE Stok Solüsyonu	100 ml
Steril Distile Su	900 ml

Bu tamponun hazırlanışında 100 ml 10X TAE stok solüsyonu üzerine 900 ml steril distile su eklenir. Hazırlanan tampon +4°C’de muhafaza edilir.

**6X Yükleme Tamponu**

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
Bromfenol blue	0,1 g
Gliserol	40 ml

0,1 g bromfenol blue, 40 ml gliserol içerisinde çözülür. Çözeltinin toplam hacmi 1X TAE ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan tampon amber şişe içerisinde +4°C'de muhafaza edilir.

**Lysis Buffer**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Tris-HCl	1,36 g
EDTA	0,422 g
NaCl	0,664 g
SDS	250 ml
Triton X 100	22,7 ml

Bu buffer hazırlanışında kullanılan 1,36 g Tris-HCl, 0,422 g EDTA 910 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 8'e ayarlanır. pH ayarlaması yapıldıktan sonra üzerine 0,664 g NaCl eklenir ve hacim 1000 ml'ye tamamlanır. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir. Otoklavdan çıkartıldıktan sonra 250 ml %10'luk SDS ve 22,7 ml Triton X 100 eklenir.

**Modified BMC besiyeri için Tuz Solüsyonu**

<u>İçerik</u>	<u>490 ml için</u>
Amonyum sülfat	7,5 g
Potasyum fosfat	3 g

Magnezyum sülfat heptahidrat 0,5 g

Yukarıda belirtilen kimyasallar sırası ile 200 ml distile su içerisinde iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 490 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir.

### **Trace metal solüsyonu (İz metal solüsyonu)**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
EDTA	3 g
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0,9 g
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,9 g
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,6 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,2 g
MnCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0,16 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0,08 g
CoCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0,06 g
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0,06 g
KI	0,02 g

Yukarıda belirtilen kimyasallar sırası ile 500 ml distile su içerisinde iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir. Hazırlanan çözelti +4°C'de muhafaza edilir.

### **Modified BMC Besiyeri için vitamin solüsyonu**

<u>İçerik</u>	<u>490 ml için</u>
<i>p</i> -Aminobenzoic acid (PABA)	0,2 g
Nicotinic acid	1 g
Calcium pantothenate	1 g
Pyridoxine • HCl	1 g

Thiamine • HCl	1 g
d-Biotin	0,05 g
<i>m</i> -Inositol	25 g

Yukarıda belirtilen kimyasallar sırası ile 500 ml distile su içerisinde iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir. Hazırlanan çözelti +4°C'de muhafaza edilir (Tahezadeh 2003).

#### **Modified BMC besiyeri için Glukoz Solüsyonu**

<u>İçerik</u>	<u>490 ml için</u>
Glukoz	10 g

10 g glukoz tartılarak 200 ml distile su içerisinde iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 490 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir (Tahezadeh 2003).

#### **Modified BMC besiyeri için Sukroz Solüsyonu**

<u>İçerik</u>	<u>490 ml için</u>
Sukroz	10 g

10 g sukroz tartılarak 200 ml distile su içerisinde iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 490 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir.

**Modified BMC besiyeri için Glukoz+Sukroz Solüsyonu**

<u>İçerik</u>	<u>490 ml için</u>
Glukoz	10 g
Sukroz	10 g

10 g glukoz ve 10 g sukroz tartılarak 200 ml distile su içerisinde iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 490 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir.

**Modified BMC besiyeri için üreme teşvik solüsyonu**

<u>İçerik</u>	<u>490 ml için</u>
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Yeast extract	2,5 g

0,2 g ZnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O ve 2,5 g yeast extract tartılarak 11,6 ml distile su içerisinde iyice çözülür. Çözeltinin tamamı filtre ile steril edilerek 1000 ml hacimli modified BMC besiyerine eklenir.

**Modified BMC besiyeri**

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Tuz Solüsyonu	490 ml
Şeker Solüsyonu (Glukoz, Sukroz veya Glukoz+Sukroz)	490 ml
Vitamin Solüsyonu	0,7 ml
İz Metal Solüsyonu	6,7 ml
Üreme Teşvik Solüsyonu	11,6 ml

Yukarıda belirtilen solüsyonlar steril kabin içerisinde sırası ile bir araya getirilir. Hazırlanan besiyeri kullanılıncaya kadar +4°C’de muhafaza edilir.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. *In silico* uygulamalarla çalışmada kullanılacak gen bölgelerinin seçilmesi, ilgili bölgelere ait PCR primerlerinin tasarlanması ve PCR ürünlerinde restriksiyon bölgelerinin belirlenmesi**

Bu çalışmada kullanılacak gen bölgeleri *Saccharomyces* Genome Database (Anonymous 2014a)’de yer alan sekans bilgileri ışığında seçilmiş, bu gen bölgelerine ait primerler NCBI primer designing tool (Anonymous 2014b) ile tasarlanmış ve elde edilecek PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri Restriction Mapper (Anonymous 2014c) ile *in silico* olarak bilgisayar ortamında analiz edilmiştir.

#### **3.2.2. Model organizmanın canlandırılması**

Bu çalışma için liyofilize halde temin edilen *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 9763 suşu PDA besiyeri yüzeyine yayma ekim tekniği ile inoküle edilmiştir. Yayma ekimi kontaminasyonları önlemek için steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından organizma kültürleri 28°C’de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından besiyerlerinin yüzeylerinde kolonilerin gözlenmesiyle mayalarda canlandırma işlemi tamamlanmıştır.

#### **3.2.3. Stok kültürlerin alınması**

Stok kültürleri alınmadan önce hazırlanmış olan stok solüsyonlarına Potato Dextrose Agar besiyerinde canlandırılmış olan *Saccharomyces cerevisiae*’dan yaklaşık 2 lüp alınarak steril koşullarda stok solüsyonlarının herbirine aktarılmıştır. Vorteks

yardımıyla organizmalar solüsyon içerisinde homojen bir şekilde dağıtılmıştır. Bu işlemin ardından hazırlanan stok kültürler  $-87^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2.4. Çalışma kültürlerinin hazırlanması

Çalışma kültürlerinin hazırlanmasında stok kültürler oda sıcaklığında çözündürülmüş, daha sonra her bir 40 ml hacimli MBMC-Glukoz, MBMC-Sukroz ve MBMC-Glukoz+Sukroz sıvı besiyerine 30  $\mu\text{l}$  stok kültürden ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan çalışma kültürleri  $28^{\circ}\text{C}$ 'de, 150 rpm hızda çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan kültürlerden 24, 48 ve 72. saatlerde örnekleme yapılarak bu numunelerde DNA izolasyonu, PCR, sodyum bisüfit muamelesi, High Fidelity PCR uygulaması, Restriksiyon enzim kesimi ve görüntüleme işlemleri yapılmıştır.

#### 3.2.5. Genomik DNA izolasyonu

Çalışmamızın bu aşamasında *Saccharomyces cerevisiae*'nin DNA izolasyonu için Barış (2009)'dan uyarlanan protokol uygulanmıştır. DNA izolasyon protokol aşamaları aşağıda verildiği gibidir.

- 1- MBMC'de geliştirilen genç kültürler 10 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 18.000 rpm'de santifürüjlenir.
- 2- Eppendorf tüpü içerisindeki pelet üzerine 0,3 g glass bead eklenir.
- 3- 200  $\mu\text{l}$  Liziz Buffer eklenir ve maksimum hızda en az 2 dakika vortekslenir.
- 4- 200  $\mu\text{l}$  Fenol: Kloroform:İzoamil alkol (25:24:1) eklenerek 5-10 kez alt-üst edilerek iyice karıştırılır.
- 5- 200  $\mu\text{l}$  TE eklenir ve tekrar maksimum hızda en az 2 dakika vortekslenir.
- 6-  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika 16.000 rpm'de santifürüjlenir.
- 7- Santifürüjleme işleminin ardından 400  $\mu\text{l}$ 'lik süpernatant kısmı yeni bir 2 ml'lik steril eppendorf tüpüne aktarılır.
- 8- 1000  $\mu\text{l}$ 'lik % 99,5 saf alkol eppendorf tüplerine eklendikten sonra tüpler birkaç kez alt-üst edilir.



- 9- Yeniden +4°C'de 10 dakika 16.000 rpm'de santifürüj işlemi yapılır.
- 10- Santifürüj işleminden sonra pellet kısmı kalacak şekilde sıvı kısmı eppendorf tüplerinden uzaklaştırılarak 5 dakika kurutma kağıdı üzerinde süzme işlemi yapılır.
- 11- Pelletlerin üzerine 300 µl'lik Nuclei Lysis Solüsyonu (Promega) eklenerek 1-2 kez alt-üst edilir.
- 12- Pelletlerin üzerine 100 µl'lik Protein Precipitation solüsyonu (Promega) eklenerek 1-2 kez alt-üst edilir ve daha sonra 1-2 dakika vortekslenir.
- 13- Örnekler 5 dakika -20°C'de veya buz üzerinde bekletilir ve +4°C'de 16.000 rpm'de 6 dakika santifürüjlenir.
- 14- Santifürüj işleminden sonra süpernatant kısmından 350 µl alınır ve yeni bir steril eppendorf tüpüne aktarılır.
- 15- 300 µl'lik -20°C'de bekletilen izopropanol eklenir ve 5-10 kez alt-üst edilir.
- 16- Süpernatant kısım eppendorf tüplerini sallamadan dikkatli bir şekilde boşaltıldıktan sonra pellet kısmına zarar vermeden kurutma kağıdının üzerinde 1 dakika bekletilir.
- 17- 300 µl'lik %70 'lik ethanol (-20°C'de) eklenerek + 4°C'de 16.000 rpm'de 6 dakika santifürüj edilir.
- 18- Santifürüjden çıkartılan örneklerin pellet kısmındaki ethanolün uçması için 37°C'lik etüvde 90 dakika veya 40°C'lik etüvde 60 dakika tüplerin ağzı açık kalacak şekilde bekletilir.
- 19- Ethanolün uçmasının ardından 50 µl'lik DNA Rehydration solüsyonu (Promega) eppendorf tüplerine eklenir.
- 20- 1,5 µl'lik RNAase (Promega) eklenir ve ardından 15 dakika 37°C'de inkübe edilir.
- 21- İnkübe edilen örnekler 65°C'lik etüve konularak 1 saat bekletilir. Etüvden çıkartıldıktan sonra DNA'lar +4°C'de saklanır.

### **3.2.6. Genomik DNA için jel elektroforezi ve görüntüleme**

1 gr agaroz üzerine 100 ml 1XTBE tamponu ilave edilir. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılır. 50°C'ye kadar soğutulan agarose jele 0,6 µl etidium bromür eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülür. 15-20 dakika beklenerek jelin donması sağlanır. Donan jelden taraklar dikkatlice

çıkarılır ve içerinde 0,5XTBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilir. Jeldeki ilk çukura, DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D7058) 8 µl yüklenir. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu, 8 µl genomik DNA ürünü karıştırılarak yüklenir. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 60 dakika yürütülür. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenir ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edilir.

### **3.2.7. Bisulfit dönüşüm reaksiyonu aşaması**

Bislfit dönüşüm reaksiyonu için Promega firmasından kit temin edilmiş olup uygulama firmanın vermiş olduğu kit protoklne göre yapılmıştır. Bu kit protoklnn aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir:

- 1- 20 µl'lik her bir DNA rneği 200 µl'lik PCR tüplerine aktarılır.
- 2- Her bir DNA rneği için 130 µl bisülfit ME Conversion ajanı eklenir ve hafifçe karışması için dikkatli bir şekilde pipetleme yapılır. rnekleri tüpün alt kısmına çöktürme yapmak için kısa bir santifürüj işlemi uygulanır.
- 3- ktrme işleminin ardından örnekler aşağıda belirtilen sıcaklık ve srelerde sırasıyla inkübasyona bırakılır.
  - 98°C'de 8 dakika
  - 54°C'de 60 dakika
  - 4°C'de tutulur.
- 4- Inkbasyonun ardından örnekler deslfonasyon ve temizleme işlemleri yapılana kadar +4°C'de veya buz üzerinde ışıktan korunacak bir şekilde azami 20 saate kadar muhafaza edilebilir.

### **3.2.8. DNA deslfonasyon ve temizleme (Clean-up)**

Bu işlem Promega firmasından temin edilmiş olan Bislfit dönüşüm kiti içerinde yer alan protokole göre aşağıdaki aşamalar uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

- 1- İşlem görmüş her bir numune Collection tüplerin içerisinde yer alan ME Spin kolonuna yerleştirilir.
- 2- ME Spin kolonuna 600 µl ME Binding Buffer eklenir; kolona bisülfid ile muamale edilen örnekler aktarılır ve collection tüplerin kapakları kapatılır. Daha sonra hafifçe örnekler birkaç kez alt-üst edilir.
- 3- Örnekler maksimum hızda (18.000 rpm'de) santifürüj edildikten sonra sıvı kısım atılır ve aynı Collection tüpe yeniden ME Spin kolon konulur.
- 4- Örneklerin üzerine 100 µl etanollü 1X ME Wash Buffer eklenerek maksimum hızda yaklaşık 30 saniye santifürüjlenir.
- 5- Her bir ME Spin kolonu için 200 µl ME Desulfonasyon Buffer eklendikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılır.
- 6- Örnekler yeniden maksimum hızda (18.000 rpm'de) 30 saniye santifürüj edilir.
- 7- Örneklerle 200 µl etanollü ME Wash Buffer eklendikten sonra maksimum hızda 30 saniye santifürüj edilir ve bu adım bir kez daha tekrarlanır.
- 8- ME Spin kolon, steril 1,5 ml'lik mikrosantifürüj tüplerine yerleştirilir.
- 9- 10 µl Elution buffer eklendikten sonra maksimum hızda (18.000 rpm'de) 30 saniye santifürüjlenir.
- 10- ME Spin kolon çıkarılıp uzaklaştırılır. Tüpler kapatılır ve seyreltilmiş DNA bir hafta 4°C te saklanarak kullanılabilir veya -20°C'de daha uzun bir süre muhafaza edilebilir. Bütün örnekler ışıktan korunması için gerekli önlemler alınmalıdır.

### 3.2.9. PCR Protokolü

#### Reaksiyonun hazırlanması

PCR'ı yapılacak her bir örnek için 25 µl'lik reaksiyon hazırlanır. Bir örnek için hazırlanan reaksiyon; 17,75 µl su, 2,5 µl Expand High Fidelity Buffer (10x concentrated, without MgCl<sub>2</sub>), 1 µl DMSO, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> solüsyonu (25 mM), 0,25 µl F primer, 0,25 µl R primer, 0,5 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 µl Expand High Fidelity Enzyme Mix ve 1 µl bisülfid muamelesi görmüş genomik DNA ilave edilir.

#### PCR programı

Hazırlanan örnekler, 3 dakika 94°C'de denatürasyon, bunu takiben 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 61,5°C'de 1 dakika bağlanma (bu basamak her bir primerin T<sub>m</sub> sıcaklığına uygun olacak şekilde optimize edilmelidir) ve 72°C'de 1,5 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 7 dakika uzama basamağının ardından oluşacak şekilde programlanan PCR cihazına yerleştirilir. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapılır.

### 3.2.10. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi İle Kesimi

PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesim işlemi Hinf I ve Taq I enzimleriyle aşağıdaki aşamalar izlenerek yapılmıştır.

#### Hinf I Restriksiyon Enzimi İle Kesimi

Bir PCR tüpü içerisine sırasıyla aşağıdakiler eklenir.

- 1- 10 µl PCR ürünü, 18 µl distile su, 2 µl 10X buffer R Hinf I ve 2 µl Hinf I enzimi eklenir. Hassas bir şekilde karıştırılır ve 1-16 saat inkübasyona bırakılır.
- 2- Restriksiyon enzimi reaksiyonun durdurulması için 65°C'de 20 dakika ısı bloğunda bekletilir.
- 3- Ürünler +4°C'de muhafaza edilir.

### **Taq I Restriksiyon Enzimi İle Kesimi**

Bir PCR tüpü içerisine sırasıyla aşağıdakiler eklenir.

- 1- 10 µl PCR ürünü, 18 µl distile su, 2 µl 10X buffer R Taq I ve 2 µl Taq I enzimi eklenir. Hassas bir şekilde karıştırılır ve 1-16 saat inkübasyona bırakılır.
- 2- Restriksiyon enzimi reaksiyonun durdurulması için 80°C'de 20 dakika ısı bloğunda bekletilir.
- 3- Ürünler +4°C'de muhafaza edilir.

### **3.2.11. Kesilen PCR Ürünlerinin Analizi**

Kesilen PCR ürünleri QIAxcel Advanced analiz sistemiyle değerlendirilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. *In Silico* Uygulamalarla Çalışmada Kullanılacak Gen Bölgelerinin Seçilmesi, İlgili Bölgelere Ait PCR Primerlerinin Tasarlanması ve PCR Ürünlerinde Restriksiyon Bölgelerinin Belirlenmesi

#### 4.1.1. Çalışmada kullanılacak gen bölgelerinin seçilmesi

Bu çalışmada, sukroz ve glukoz metabolizmasıyla ilişkili iki temel gen bölgesi olan SUC ve HXT gen bölgelerini temsil etmeleri amacıyla sırasıyla SUC2 ve HXT10 gen bölgeleri yapılacak uygulamalar için seçilmiştir. Bu gen bölgelerine ait bilinen sekans bilgileri aşağıdaki gibidir.

#### SUC2 Open Reading Frame

```

ATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGTTTTGTCAGCCAAAATATCTGCATC
AATGACAAACGAAACTAGCGATAGACCTTTGGTCCACTTCACACCCAACAAGGGCTGGA
TGAATGACCCAAATGGGTTGTGGTACGATGAAAAAGATGCCAAATGGCATCTGTACTTT
CAATACAACCCAAATGACACCGTATGGGGTACGCCATTGTTTTGGGGCCATGCTACTTC
CGATGATTTGACTAATTGGGAAGATCAACCCATTGCTATCGCTCCCAAGCGTAACGATT
CAGGTGCTTTTCTCTGGCTCCATGGTGGTTGATTACAACAACACGAGTGGGTTTTTCAAT
GATACTATTGATCCAAGACAAAGATGCGTTGCGATTGGACTTATAACACTCCTGAAAG
TGAAGAGCAATACATTAGCTATTCTCTTGATGGTGGTTACACTTTTACTGAATACCAA
AGAACCCTGTTTTAGCTGCCAACTCCACTCAATTCAGAGATCCAAAGGTGTTCTGGTAT
GAACCTTCTCAAAAATGGATTATGACGGCTGCCAAATCACAAGACTACAAAATTGAAAT
TTACTCCTCTGATGACTTGAAGTCCTGGAAGCTAGAATCTGCATTTGCCAATGAAGGTT
TCTTAGGCTACCAATACGAATGTCCAGGTTTGATTGAAGTCCCAACTGAGCAAGATCCT
TCCAAATCTTATTGGGTCATGTTTATTTCTATCAACCCAGGTGCACCTGCTGGCGGTTT
CTTCAACCAATATTTTGTGGATCCTTCAATGGTACTCATTTTGAAGCGTTTGACAATC
AATCTAGAGTGGTAGATTTTGGTAAGGACTACTATGCCTTGCAAATTTCTTCAACACT
GACCCAACCTACGGTTCAGCATTAGGTATTGCCTGGGCTTCAAATGGGAGTACAGTGC
CTTTGTCCCAACTAACCCATGGAGATCATCCATGTCTTTGGTCCGCAAGTTTTCTTTGA
ACACTGAATATCAAGCTAATCCAGAGACTGAATTGATCAATTTGAAAGCCGAACCAATA
TTGAACATTAGTAATGCTGGTCCCTGGTCTCGTTTTGCTACTAACACAACCTCTAACTAA
GGCCAATTCTTACAATGTTCGATTTGAGCAACTCGACTGGTACCCTAGAGTTTGAGTTGG
TTTACGCTGTTAACACCACACAAACCATATCCAAATCCGTCTTTGCCGACTTATCACTT
TGTTTCAAGGGTTTAGAAGATCCTGAAGAATATTTGAGAATGGGTTTTGAAGTCAGTGC
TTCTTCTTCTTTTTGGACCGTGGTAACTCTAAGGTCAAGTTTGTCAAGGAGAACCCAT

```

ATTTCAAAACAGAATGTCTGTCAACAACCAACCATTTCAAGTCTGAGAACGACCTAAGT  
TACTATAAAGTGTACGGCCTACTGGATCAAAACATCTTGGAAATTGTACTTCAACGATGG  
AGATGTGGTTTTCTACAAATACCTACTTTCATGACCACCGGTAACGCTCTAGGATCTGTGA  
ACATGACCACTGGTGTGATAATTTGTTCTACATTGACAAGTTCCAAGTAAGGGAAGTA  
AAATAG

### **HXT10 Open Reading Frame**

ATGGTTAGTTCAAGTGTTCATTTTGGGGACTAGCGCCAAGGCATCCACTTCTCTAAG  
TAGAAAGGATGAAATTAACCTAACCCTGAAACAAGGGAAGCTAGCTTGGACATTCAT  
ACAAACCCATTATTGCATACTGGACGGTGATGGGTCTCTGTCTGATGATTGCCTTTGGT  
GGATTCATTTTTGGTTGGGATACAGGAACCATTTTCAGGGTTTATTAACCAAACAGATTT  
CAAGAGAAGGTTTGGTGAGTTACAAAGGGACGGCAGTTTTTCAACTATCAGATGTCAGGA  
CAGGGCTAATTGTCGGTATCTTCAACATAGGTTGTGCTTTAGGTGGCCTAACGCTGGGA  
CGCCTGGGCGATATTTATGGGCGTAAAATCGGCTTAATGTGTGTTATACTGGTGTATGT  
TGTTGGTATCGTGATCCAGATTGCTTCCTCTGACAAATGGTATCAATATTTTATTGGTA  
GAATTGTTTCTGGAATGGGTGTTGGAGGTGTTGCTGTGCTGTCGCCAACTTTGATCTCA  
GAAATTTCCCAAAGCACCTAAGAGGCACTTGTGTCTCTTTTTACCAGCTAATGATTAC  
CCTTGGAAATTTCTTGGGCTACTGTACCAATTATGGTACAAAGAAATATTCAAATTCAA  
TACAGTGGCGGGTTCCCTTGGGTTTGTGTTTTGCGTGGGCAATCTTTATGGTGATTGGA  
ATGGTTATGGTTCCGGAATCGCCCAGATATTTAGTAGAAAAAGGTAAGTATGAAGAAGC  
TAGAAGGTCTTTGGCCAAATCAAACAAGGTCACAGTACTGATCCAGGCGTTGTTTTTG  
AGTTTGATACTATAGTTGCAAATATGGAATTAGAAAGGGCTGTTGGAAATGCCAGTTGG  
CACGAACTCTTCTCAAATAAAGGAGCAATTCTACCAAGGGTAATAATGGGAATCGTTAT  
CCAGTCACTGCAACAGCTTACTGGCTGTAATATTTTTTCTACTACGGCAGCACCATTT  
TCAATGCTGTTGGAATGCAAGACTCTTTCGAGACTTCCATTGTCCTTGGGGCTGTTAAT  
TTTGCTTCTACATTTGTTGCACTATAACATTGTGGATAAATTTGGGCGTCGAAAATGTTT  
ATTGTGGGGTCTGCCTCGATGGCAATTTGTTTCGTCATATTCGCCACCGTTGGCGTCA  
CTAGATTATGGCCACAAGGGAAAGACCAACCTTCTTCGCAAAGTGCTGGTAATGTTATG  
ATCGTTTTTACTTGTTCCTTCTCTTTTGGCATTACTTGGGCTCCTATCGCCTA  
TGTCATTGTGGCAGAACTTATCCATTAAGAGTTAAAAATCGTGCCATGGCCATTGCGG  
TTGGTGCGAACTGGATGTGGGGTTTTCTTGATTGGATTTTTTACACCCTTTATCACTAGA  
TCCATAGGATTTTCTTATGGCTATGTTTTTCATGGGTGCTTAATCTTTTCGTACTTCTA  
CGTTTTTCTTCTTTGTTTGCGAAACAAAGGGATTAACCTCTGGAGGAAGTTAATGAAATGT  
ACGAAGAAAGAATAAAGCCATGGAAGTCCGGAGGTTGGATTCCCAGTTCTAGAAGAACA  
CCACAACCAACAAGCAGTACACCATTAGTTATTGTTGATAGTAAATAA

#### **4.1.2. PCR primerlerinin tasarlanması**

NCBI primer designing tool uygulamasına SUC2 ve HXT10 gen bölgelerine ait DNA dizi bilgileri girilmiş ve her iki gen bölgesi için en uygun birer çift primer dizayn edilmiştir. Bu primerlere ait bilgiler aşağıdaki gibidir.

**SUC2 gen bölgesi**

F Primer : CGGCTGCCAAATCACAAGAC  
 R Primer : CTAGAGCGTTACCGGTGGTC  
 Ürün Boyutu : 969 baz çifti

**Ürün DNA dizisi**

CGGCTGCCAAATCACAAGACTACAAAATTGAAATTTACTCCTCTGATGACTTGAAGTCC  
 TGGAAGCTAGAATCTGCATTTGCCAATGAAGGTTTCTTAGGCTACCAATACGAATGTCC  
 AGTTTTGATTGAAGTCCCAACTGAGCAAGATCCTTCAAATCTTATTGGGTCATGTTTA  
 TTTCTATCAACCCAGGTGCACCTGCTGGCGGTTCCCTTCAACCAATATTTTGGTGGATCC  
 TTCAATGGTACTCATTGGAAGCGTTTGACAATCAATCTAGAGTGGTAGATTTTGGTAA  
 GGACTACTATGCCTTGCAAACCTTCTTCAACACTGACCCAACCTACGGTTCAGCATTAG  
 GTATTGCCTGGGCTTCAAACCTGGGAGTACAGTGCCTTTGTCCCAACTAACCCATGGAGA  
 TCATCCATGTCTTTGGTCCGCAAGTTTTCTTTGAACACTGAATATCAAGCTAATCCAGA  
 GACTGAATTGATCAATTTGAAAGCCGAACCAATATTGAACATTAGTAATGCTGGTCCCT  
 GGTCTCGTTTTGCTACTAACAACAACCTCTAACTAAGGCCAATTCTTACAATGTCGATTTG  
 AGCAACTCGACTGGTACCCTAGAGTTTGAGTTGGTTTACGCTGTTAACACCACACAAAC  
 CATATCCAAATCCGTCTTTGCCGACTTATCACTTTGGTTCAAGGGTTTAGAAGATCCTG  
 AAGAATATTTGAGAATGGGTTTTGAAGTCAGTGCTTCTTCCCTTCTTTTTGGACCGTGGT  
 AACTCTAAGGTCAAGTTTGTCAAGGAGAACCATATTTACAAACAGAATGTCTGTCAA  
 CAACCAACCATTCAAGTCTGAGAACGACCTAAGTTACTATAAAGTGTACGGCCTACTGG  
 ATCAAACATCTTGGAATTGTACTTCAACGATGGAGATGTGGTTTTCTACAAATACCTAC  
 TTCATGACCACCGGTAACGCTCTAG

**HXT10 gen bölgesi**

F Primer : GTGTTTTGCGTGGGCAATCT  
 R Primer : CTCCGGACTTCCATGGCTTT  
 Ürün Boyutu : 893 baz çifti

**Ürün DNA dizisi**

GTGTTTTGCGTGGGCAATCTTTATGGTGATTGGAATGGTTATGGTTCGGGAATCGCCCA  
 GATATTTAGTAGAAAAAGGTAAGTATGAAGAAGCTAGAAGGTCTTTGGCCAAATCAAAC  
 AAGGTCACAGTTACTGATCCAGGCGTTGTTTTTGGAGTTTGATACTATAGTTGCAAATAT



GGAATTAGAAAGGGCTGTTGGAAATGCCAGTTGGCACGAACTCTTCTCAAATAAAGGAG  
 CAATTCTACCAAGGGTAATAATGGGAATCGTTATCCAGTCACTGCAACAGCTTACTGGC  
 TGTAAATTATTTTTCTACTACGGCACGACCATTTTCAATGCTGTTGGAATGCAAGACTC  
 TTTCGAGACTTCCATTGTCCTTGGGGCTGTTAATTTGCTTCTACATTTGTTGCACTAT  
 ACATTGTGGATAAATTTGGGCGTCGAAAATGTTTATTGTGGGGGTCTGCCTCGATGGCA  
 ATTTGTTTCGTCATATTCGCCACCGTTGGCGTCACTAGATTATGGCCACAAGGGAAAGA  
 CCAACCTTCTTCGCAAAGTGCTGGTAATGTTATGATCGTTTTTACTTGTTCCTTCATTT  
 TCTCTTTTGGCATTACTTGGGCTCCTATCGCCTATGTCATTGTGGCAGAACTTATCCA  
 TTAAGAGTTAAAAATCGTGCCATGGCCATTGCGGTTGGTGCGAAGTGGATGTGGGGTTT  
 CTTGATTGGATTTTTCACACCCTTTATCACTAGATCCATAGGATTTTCTTATGGCTATG  
 TTTTCATGGGTTGCTTAATCTTTTCGTAAGTCTTACGTTTTCTTCTTTGTTTGCGAAACA  
 AAGGGATTAAGTCTGGAGGAAGTTAATGAAATGTACGAAGAAAGAATAAAGCCATGGAA  
 GTCCGGAG

#### 4.1.3. PCR ürünlerinde restriksiyon bölgelerinin belirlenmesi

SUC2 ve HXT10 gen bölgelerinin ilgili primerlerle çoğaltılmasının ardından elde edilecek olan ürünlerdeki restriksiyon bölgelerinin belirlenmesinde RestrictionMapper programı kullanılmıştır. Bu aşamaya ait bulgular Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** SUC2 gen bölgesinin PCR ürününe ait restriksiyon bölgeleri

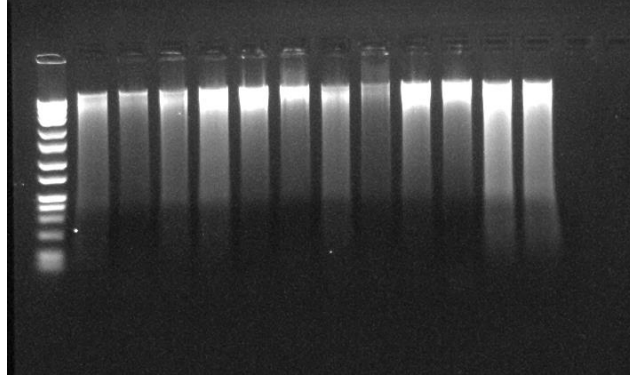
Enzim	Dizi	Frekans	Kesim Pozisyonu
HinfI	GANTC	1	69
TaqI	TCGA	2	583, 597

**Çizelge 4.2.** HXT10 gen bölgesinin PCR ürününe ait restriksiyon bölgeleri

Enzim	Dizi	Frekans	Kesim Pozisyonu
HinfI	GANTC	3	50, 261, 350
TaqI	TCGA	3	357, 436, 464

#### 4.2. Genomik DNA İzolasyonu

MBMC-Glukoz, MBMC-Sukroz ve MBMC-Glukoz+Sukroz besiyerlerinde geliştirilen *S. cerevisiae* örneklerinin DNA izolasyonu çalışmaları “Materyal ve Yöntem” başlığında belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu izolasyon çalışmalarına ait örnek agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

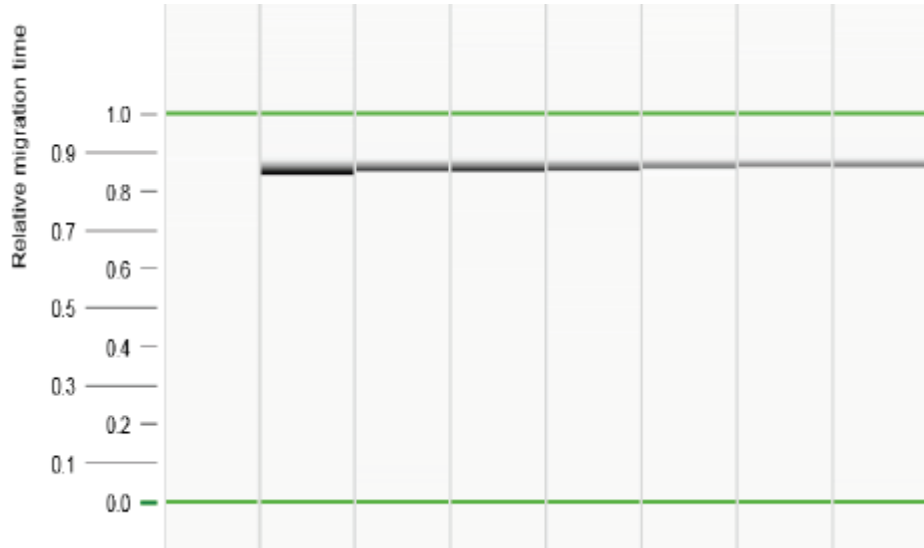
**Şekil 4.1.** *S. cerevisiae* örneklerinin DNA izolasyonu sonuçları

#### 4.3. SUC2 ve HXT10 Primerleri ile PCR Uygulaması Optimizasyonu

MBMC-Glukoz, MBMC-Sukroz ve MBMC-Glukoz+Sukroz besiyerlerinde geliştirilen *S. cerevisiae* örneklerinin DNA izolasyonu çalışmaları yapıldıktan sonra SUC2 ve HXT10 primerlerinin bu DNA örnekleri ile optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda her iki gen bölgesi için de spesifik ürünler elde edilmiştir. Bu çalışmaya ait QIAxcel Advanced analiz görüntüsü Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



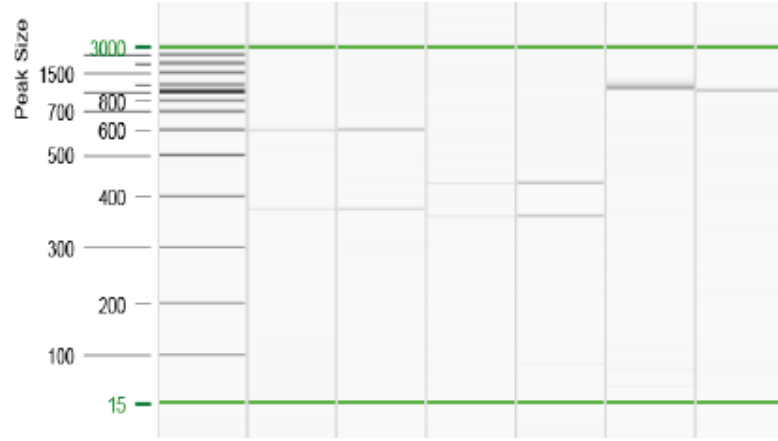
**Şekil 4.2.** SUC2 primeri ile PCR uygulaması optimizasyon sonucu



**Şekil 4.3.** HXT10 primeri ile PCR uygulaması optimizasyon sonucu

#### **4.4. SUC2 ve HXT10 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Uygulaması Optimizasyonu**

SUC2 ve HXT10 PCR ürünleri için TaqI ve HinfI restriksiyon uygulaması optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda her iki gen bölgesi için de spesifik olarak kesilmiş ürünler elde edilmiştir. Bu çalışmaya ait QIAxcel Advanced analiz görüntüsü Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.4.** SUC2 ve HXT10 PCR ürünleri için TaqI ve HinfI restriksiyon uygulaması optimizasyonu sonucu

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Normal hücre içi dengenin devamı karmaşık mekanizmalar tarafından düzenlenir. Epigenetik olaylarla gen ifadesinin düzenlenmesi de bu mekanizmalar arasında yer alır. Günümüzde epigenetiğin gen fonksiyonunun düzenlenmesinde yer alan en önemli mekanizmalardan biri olduğu ve farklı hücre tiplerinde gen ekspresyon farklarının ortaya çıkmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. Her bir hücre veya organizmanın gelişme, yaşlanma hatta hastalık aşamaları yalnızca o organizmanın genomuyla değil aynı zamanda aynı DNA dizisine sahip genlerin aktiflik ya da sessizliğini belirleyen epigenom koduyla da belirlenmektedir. Bu olay için aynı genoma sahip olan tek yumurta ikizlerinin farklı hastalıklara olan yatkınlıkları önemli bir örnek olarak verilebilir. Gen ifadesinin düzenlenmesini etkileyen epigenetik mekanizmalar, genetik fonksiyonlarının tamamlayıcıları olarak düşünülebilir. Yine bu mekanizmalar, spesifik bir hücre ya da dokudaki genomik bilginin özel olarak yorumlanmasından sorumlu yollardan biri olarak da tanımlanabilir. Genetik sapmaların yalnız başına birçok fizyolojik ve patolojik olgunun gelişim sürecini açıklamakta yetersiz kalmasından dolayı günümüzde toplam genom haritalama çalışmalarının gen fonksiyonunu anlamaya yönelik yolda sadece bir başlangıç noktası olduğu tartışılmaz bir gerçektir (Friso and Choi 2009).

Epigenetik yoluyla geliştirilecek olası tedavi stratejilerinin olumlu sonuçları, genetik, epigenetik ve çevresel faktörler arasındaki ilişkilerin detaylı olarak incelenmesini zorunlu hale getirmiştir (Esteller 2008; Choi and Friso 2010).

Güncel çalışmalar bal arılarının işçi ya da kraliçe arı olarak farklılaşmalarında bireylerin arı sütü veya polen ile beslenmelerinin etkili olduğunu göstermiştir. Larva düzeyinde genetik olarak özdeş olmasına rağmen, saf arı sütü ile beslenen bal arıları işçi bal arılarından belirgin şekilde farklılaşmaktadır. Bu farklılaşmanın mekanizmasında beslenme farkından dolayı ortaya çıkan DNA metilasyon motifi değişimlerinin rol oynadığı bilinmektedir. Bu olay aynı genetik yapıya sahip canlılarda diyetle bağlı epigenetiksel değişimler ile ortaya çıkan farklı gelişme tipleri için önemli bir örnektir.

Besin, epigenetik ve fenotip arasındaki ilişkinin bir başka modelsel örneği ise Agouti farelerde görülmektedir. Bu örnekte annenin diyetindeki metil içeriği yavruların post rengini etkilediği gibi obezite veya kanser gibi bazı kronik hastalıklara olan duyarlılıklarında da değişimlere sebep olur. Ayrıca, memelilerdeki diğer çalışmalar farklı beslenme faktörlerine maruz kalma gibi çevresel uyarıcıların DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu motiflerini düzenleyebileceğini göstermiş ve buna bağlı olarak gen regülasyonunun ve bir genin fenotipik ifadesinin etkilenebileceğini ortaya koymuştur (Tollefsbol 2011).

Birçok organizmanın fenotipik esneklik sergileyerek beslenme gibi farklı çevresel faktörlere yanıt verebildiği oldukça iyi bilinmektedir. Yani bu durum organizmaların fenotiplerinde epigenetiksel bir mekanizma olan beslenme modülasyonlarının değişime neden olabileceğini ortaya koymaktadır (Friso and Choi 2009; Gulluce *et al.* 2014).

Çeşitli çalışmalar birçok besleyici ve biyoaktif bileşenin epigenetik mekanizmalar yoluyla gen düzenlenmesini sağlayan süreçleri etkilediğini göstermiş ve DNA metilasyonu üzerine besinlerin rolünü açıklamaya yönelik çeşitli modellemelerin ortaya atılmasına yol açmıştır. Ancak besinlerin epigenetiksel değişimlere sebep olduğu mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu yüzden hastalık patogeneğinde rol oynayan epigenetik olgular ve besinler arasındaki ilişkiyi anlamak, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini amaçlayan çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Epigenetik olguların geri döndürülebilirliği, onları genom motiflerini değiştirmesi muhtemel birçok hastalığın tedavisi için çekici hedefler haline getirir (Boland 2009; Friso and Choi 2009).

Günümüzdeki mevcut bilgiler, besin faktörleri tarafından uyarılan gen ifadesinin epigenetiksel düzenlenmesinde bir karbonlu besinlere ve evrensel metil vericileri için metil kaynağı olarak hizmet eden S-adenozilhomosisteine gibi metabolitlere işaret etmektedir. Günümüze kadar epigenetik mekanizmalarda besinlerin rolü tek karbon metabolizmasının fonksiyonuyla, metil gruplarının DNA'ya aktarılmasıyla ve DNA yada histon metil transferazları tarafından katalizlenen histon uzantılarının metilasyon

reaksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Mevcut bilgiler folat ve B-12 vitamininin DNA metilasyon reaksiyonu için metil gruplarını sağlama fonksiyonunu üstlendiğini göstermiştir. Bununla birlikte diğer mikrobeyinler ya da biyoaktif gıda bileşenlerinin epigenetik mekanizmalarda tek karbon metabolizması ya da doğrudan epigenetik olguyu düzenlemede rol alan enzimleri etkilemek yoluyla etkili olduğu bilinmektedir (Friso and Choi 2009; Gulluce *et al.*2014).

Bu çalışmanın konusu epigenetik mekanizmalarda, özellikle de DNA metilasyonu üzerine besin faktörlerinin rollerine ve bu faktörlerin fizyolojik süreçlere olan etkilerine odaklanacak şekilde belirlenmiştir. Epigenetiğin kalıtsal, geri döndürülebilir ve besinler tarafından değiştirilebilir potansiyele sahip olması bu konuyu ilgi çekici yapmıştır.

Bu ilkeler ile hazırlanan çalışmamızda epigenetik için model bir organizma olan *S. cerevisiae* MBMC-Glukoz, MBMC-Sukroz ve MBMC-Glukoz+Sukroz sıvı besiyerlerinde geliştirilmiş, daha sonra sukroz metabolizmasında önemli rol oynayan SUC2 ve HXT10 gen bölgelerinde meydana gelebilecek metilasyon profili farkları yönünden incelenmiştir.

Çalışmanın bulguları incelendiğinde, bisülfid muamelesi öncesinde MBMC-Glukoz, MBMC-Sukroz ve MBMC-Glukoz+Sukroz gruplarının herbirinde spesifik bağlantı kuran ve öngörülen özelliklerde ürün oluşturan SUC2 ve HXT10 için tasarlanmış primerlerin bisülfid muamelesi sonrasında hiçbir grupta ürün oluşturamadığı gözlenmiştir.

Bu verilerin yorumlanması ile mevcut sonucun ortaya çıkışında ilgili primerlerin genomik DNA üzerindeki bağlanma bölgelerinin de bisülfid muamelesinden etkilenmesi ve bu bölgelerdeki sitozinlerin bisülfid etkisiyle timinlere dönüşmesinin rolünün olduğu savunulmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen araştırmaların bulguları ışığında SUC2 ve HXT10 gen bölgeleri için tasarlanan primerlerin bağlanma bölgelerindeki

sitozinlerin metilasyon durumlarının *S. cerevisiae*'daki sukroz metabolizmasının düzenlenmesinde rolü olmadığı düşünülebilir.

Bununla beraber besin ve epigenetik arasındaki ilişki halen tam olarak belirlenememiştir. Bu noktada, çalışmamızdan elde edilen bulgular, daha fazla gen bölgesi, primer seti ve farklı teknikler kullanılarak yapılacak ileriki çalışmalar ile desteklenebilir.

Ayrıca bu çalışma, *S. cerevisiae*'daki sukroz metabolizmasının düzenlenmesinde epigenetiğin rolünün araştırılmasını hedefleyen yaklaşımların ülkemiz literatürüne kazandırılması açısından önem arz etmektedir.



**KAYNAKLAR**

- Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D. and Caparros, M.L., 2007. Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-491, Newyork.
- Anonymous, 2014a. <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.fpl?locus=suc2> (15.02.2014).
- Anonymous, 2014b. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (22.02.2014)
- Anonymous, 2014c. <http://www.restrictionmapper.org>. (10.03.2014).
- Barış, Ö., 2009. Erzurum ilindeki mağaralarda damlataşı oluşumunda etkili bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanısı. Doktora, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6-21.
- Boland, M.J. and Christman, J.K., 2009. Chapter 3: Mammalian DNA methyltransferases. Nutrients and Epigenetics, Ed: S.W. Choi and S. Friso. CRC Press, New York, 37-66.
- Bond, D.M. and Finnegan, E.J., 2007. Passing the Message on: Inheritance of Epigenetic Traits. Trends Plants Science, 12: 211-216.
- Boyd, V.L., Moody, K.I., Karger, A.E., Livak, K.J., Zon, G. and Burns, J.W., 2006. Methylation-dependent fragment separation: Direct detection of DNA methylation by capillary electrophoresis of PCR products from bisulfite-converted genomic DNA. Analytical Biochemistry, 354: 266-273.
- Brena, R.M., Auer, H., Kornacker, K., Hackanson, B., Raval, A., Byrd, J.C. and Plass, C., 2006. Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyser platform. Nucleic Acid Research, 34(3): 1-8.
- Chen, H., Chang, Y., Chen, S. and Chang, P., 2012. Determination of the heterogeneity of DNA methylation by combined bisulfite restriction analysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. Journal of Chromatography A, 1230: 123-129.
- Cheng, X., Hashimoto, H., Horton, J.R. and Zhang, X., 2011. Chapter 2: Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-CpG Recognition, and Demethylation in Mammals. Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics, Ed: T.O. Tollefsbol. Academic Press, San Diego, 9-19.
- Choi, S.W. and Friso, S., 2010. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. Advances in Nutrition An International Review Journal, 1: 8-16.
- Dahl, J.A., Duggal, S., Coulston, N., Millar, D., Melki, J., Shahdadfar, A., Brinchmann, J.E. and Collas, P., 2008. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. The International Journal Of Developmental Biology, 52: 1033-1042.
- Dalton, V.S., Kolshus, E. and McLoughlin, D.M., 2014. Epigenetics and depression: return of the repressed. Journal of Affective Disorders, 155: 1-12.
- DeAngelis, J.T. and Farrington, W., 2008. An overview Epigenetic Assays. Molecular Biotechnology, 38(2): 179-183.

- Eads, C.A. and Laird, P.W., 2002. Chapter 7: Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA). *Methods in Molecular Biology: DNA Methylation Protocols*, Ed: K.I.Mills and B.H. Ramsahoye. Humana Press Inc., 200: 71-85.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P.A., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429: 457-463.
- El-Fiky, Z.A., Hassan, G.M. and Emam, A.M., 2012. Quality Parameters and RAPD-PCR Differentiation of Commercial Baker's Yeast and Hybrid Strains. *Journal of Food Science*, 77: 312-316.
- Esteller, M., 2009. Chapter 1: An Introduction to Epigenetics. *Epigenetic in Biology and Medicine*, Ed: M. Esteller. CRC Press, New York.
- Faulk, C., Barks, A. and Dolinoy, D.C., 2013. Phylogenetic and DNA methylation analysis reveal novel regions of variable methylation in the mouse IAP class of transposons. *BMC Genomics*, 14(48): 1-11.
- Felsenfeld, G., 2007. Chapter 2: A Brief History of Epigenetic. *Epigenetics*, Ed: C.D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg and M.L. Caparros. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 15-23.
- Fraga, M.F. and Esteller, M., 2002. DNA Methylation: A profile of Methods and Applications. *Biotechniques*, 33: 632-649.
- Friso, S. and Choi, S.W., 2009. Chapter 1: Introduction. *Nutrients and Epigenetics*, Ed: S.W. Choi and S. Friso. CRC Press, New York, 1-6.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. and Paul, C.L., 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 1827-1831.
- Fyodorov, D.V. and Kadonaga, J.T., 2001. The Many Faces of Chromatin Remodeling: Switching beyond Transcription. *Cell*, 106: 523-525.
- Geng, F. and Tansey, W.P., 2008. Polyubiquitylation of Histone H2B. *Molecular Biology of the Cell*, 19: 3616-3624.
- Goedecke, S., Schlosser, S., Mühlisch, J., Hempel, G., Frühwald, M.C. and Wünc, B., 2009. Determination of DNA methylation by COBRA: A comparative study of CGE with LIF detection and conventional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 30: 3063-3070
- Gulluce, M., Alaylar, B., Koc, T.Y. and Karadayi, M., 2014. Epigenetics: An Innovative Approach for Biotechnology and Food Science. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 4(3): 195-199.
- Güneş, S. and Kulaç, T., 2013. The role of epigenetics in spermatogenesis. *Turkish Journal of Urology*, 39(3): 181-187.
- Hattori, N. and Ushijima, T., 2011. Chapter 8: Analysis of Gene-specific DNA Methylation. *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*, Ed: T.O. Tollefsbol. Academic Press, San Diego, 125-134.
- Herceg, Z. and Murr, R., 2011. Chapter 3: Mechanisms of Histone Modifications. *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*, Ed: T.O. Tollefsbol. Academic Press, San Diego, 25-44.
- Hershko, A. and Ciechanover, A., 1998. The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 425-479.
- Hess, D.T. and Stamler, J.S., 2012. Regulation by S- Nitrosylation of Protein Post translational Modification, *J. Biol. Chem.*, 287: 4411-4418.

- Ho, S. and Tang, W., 2007. Techiques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: An emphasis on fetal-based adult diseases. *Reproductive Toxicology*, 23: 267-282.
- Holliday, R., 2006. Epigenetics: A Historical overview. *Epigenetics*, 1: 76-80.
- Huang, Y., Zhan, Z., Sun, Y., Cao, X., Li, M., Wang, J., Lan, X., Lei, C., Zhang, C. and Chen, H., 2013. Intragenic DNA methylation status down-regulate bovine IGF2 gene expression in different developmental stages. *Gene*, 534: 356-361.
- İzmirli, M., 2013. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik yaklaşımlar (Epigenetic Mechanisms and Approaches in Cancer Treatments). *Van Tıp Dergisi*, 20(1): 48-51.
- Janitz, K. and Janitz, M., 2011. Chapter 12: Assessing Epigenetic Information. *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*, Ed: T.O. Tollefsbol. Academic Press, San Diego, 173-181.
- Jia, D. and Cheng, X., 2009. Chapter 2: Methylation on the Nucleosome. *Nutrients and Epigenetics*, Ed: S.W. Choi and S. Friso. CRC Press, New York, 7-36.
- Jin, S., Kadam, S. and Pfeifer, G.P., 2010. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techiques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Research*, 38(11): 1-7.
- Karpinski, P., Szmida, E., Misiak, B., Ramsey, D., Leszczynski, P., Bebenek, M., Sedziak T., Grzebieniak, Z., Jonkisz, A., Lebioda, A. and Sasiadek, M.M., 2012. Assessment of Three Epigenotypes in Colorectal Cancer by Combined Bisulfite Restriction Analysis. *Molecular Carcinogenesis*, 51: 1003-1008.
- Kocak, E.E., Ertugrul, A., 2012. Psikiyatrik bozukluklar ve Epigenetik. *Türk Psikiatri Dergisi*, 23(2): 130-140.
- Kosova, B., Özel, R., Aktan, Ç., 2011. Prostat kanseri tanısında DNA metilasyonun yeri var mı? (Has DNA methylation any impact in prostate cancer diagnosis?). *Üröonkoloji Bülteni*, 2: 33-40.
- Kristensen, L.S. and Hansen, L.L., 2009. PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment. *Clinical Chemistry*, 55(8): 1471-1483.
- Kurtuncu, M. and Eraksoy, M., 2008. Multipl Skleroz: Epigenetik Bir Hastalık olabilir mi? (Multiple Sclerosis: Could it Be an Epigenetic Disease?). *Archives of Neuropsychiatry*, 45: 15-20.
- Lahtz, C., Bates, S.E., Jiang, Y., Li, A.X., Wu, X. and Hahn, M.A., 2012. Gamma Irridiation Does Not Induce Detectable Changes in DNA Methylation following Exposure of Human Cells. *PLOS ONE*, 7(9): 1-8.
- Liu, Z. and Maekawa, M., 2003. Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis. *Analytical Biochemistry*, 317: 259-265.
- Loizou, J.I., Murr, R., Finkbeiner, M.G., Sawan, C., Wang, Z. and Herceg, Z., 2006. Epigenetic Information in Chromatin. *Cell Cycle*, 5(7): 696-701.
- Low, J.K.K. and Wilkins, M.R., 2012. Protein arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal*, 279: 4423-4443.
- Lu, C. and Thomson C.B., 2012. Metabolic Regulation of Epigenetic. *Cell Metabolism*, 16: 9-17.
- Lütfiyya, L.L. and Johnston, M., 1996. Two zinc-finger-containing repressor are responsible for glucose repression of SUC2 expression. *Mol. Cell. Biol* 16(9): 4790-4797.

- Marmorstein, R., 2001. Protein Modules That Manipulate Histone Tails For Chromatin Regulation. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology*, 2: 422-432.
- Martin, C. and Zhang, Y., 2007. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr. Opin Cell Biol.*, 19: 266-272.
- Mirbahai, L. and Chipman, J.K., 2013. Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutation Research*, 1-8.
- Mutirangura, A., 2007. Quantitative PCR analysis for methylation level of genome: clinical implications in cancer. *Asian Biomedicine*, 1(2): 121-128.
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krymanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., Johnson, E.S. and Berger, S.L., 2006. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 20: 966-976.
- Nelson, C.J., Santos-Rosa, H. and Kouzarides, T., 2006. Proline Isomerization of Histone H3 Regulates Lysine Methylation and Gene Expression. *Cell*, 126: 905-916.
- Nott, A., Watson, P.M., Robinson, J.D., Crepaldi, L. and Riccio, A., 2008. S-nitrosylation of histone deacetylase 2 induce chromatin remodelling in neurons. *Nature*, 455: 411-415.
- Oakeley, E.J., 1999. DNA methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacology and Therapeutics*, 84: 389-400.
- Ozcan, S., Dover, J. and Johnston M., 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17(9): 2566-2573.
- Ozcan, S., Vallier, L.G., Flick, J.S., Carlson, M. and Johnston, M., 1997. Expression of the *SUC2* Gene of *Saccharomyces cerevisiae* is Induced by Low Levels of Glucose. *Yeast*, 13: 127-137.
- Paliwal, A., Vaissière, T. and Herceg, Z., 2010. Quantative detection of DNA methylation states in minute amounts of DNA from body fluids. *Methods*, 52: 242-247.
- Patterson, K., Molloy, L., Qu, W. and Clark, S., 2011. DNA Methylation : Bisulphite Modification and Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 56: 1-9.
- Rauch, T.A. and Pfeifer, G.P., 2011. Chapter 9: Methods for Assessing Genome-wide DNA Methylation. *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*, Ed: T.O. Tollefsbol. Academic Press, San Diego, 135-147.
- Robzyk, K., Recht, J. and Osley, M.A., 2000. Rad6-Dependent Ubiquitination of Histone H2B in Yeast. *Science*, 287: 501-504.
- Schnitzler, G., 2009. Chapter 4: Chromatin Remodeling and Histone Modifications. *Nutrients and Epigenetics*, Ed: S.W. Choi and S. Friso. CRC Press, New York, 67-104.
- Segre, C.V. and Chiocca, S., 2011. Regulating the Regulators : The Post-Translational Code of Class 1, HDAC1 and HDAC2. *J. Biomed. Biotech.*, 2011: 1-15.
- Shioo, Y. and Eisenman, R.N., 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *PNAS*, 100(23): 13225-13230.
- Smirnikhina, S.A. and Lavron, A.V., 2009. Common Methods for Cytosine Methylation Analysis in DNA. *Molecular Biology*, 43(3): 387-391.

- Strahl, B.D. and Allis, D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403: 41-45.
- Taherzadeh, M.J., Fox, M., Hjorth, H. and Edebo, L., 2003. Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, 88: 167-177.
- Taylor, K.H., Kramer, R.S., Davis, J.W., Guo, J., Duff, D.J., Xu, D., Caldwell, C.W. and Shi, H., 2007. Ultradeep Bisulfite Sequencing Analysis of DNA Methylation Patterns in Multiple Gene Promoters by 454 Sequencing. *Cancer Research*, 67: 8511-8518.
- Tiwari, S.K., Manoj, G., Prasanth, K., Sivaram, G., Sharma, V.K., Habeeb, M.A., Khan, A.A. and Habibullah, C.M., 2009. Simplified and Versatile Method for Bisulfite-Based DNA Methylation Analysis of small Amounts of DNA. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23: 172-174.
- Tollefsbol, T.O., 2011. Chapter 1:Epigenetics: The New Science of Genetics. *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*, Ed: T.O. Tollefsbol. Academic Press, San Diego, 1-6.
- Tyagi, S., Raghvendra, S. and Tyagi, V., 2010. Potential Medical Applications of Epigenetics: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1): 143-147.
- Ushida, H., Kawakami, T., Minami, K., Chano, T. and Okabe, H., 2011. Methylation Profile of DNA Repetitive Elements in Human Testicular Germ Cell Tumor. *Molecular Carcinogenesis*, 1-12.
- Voordeckers, K., Maeyer, D.D., Zande, E., Vinces, M.D., Meert, W., Cloots, L., Ryan, O., Marchal, K. and Verstrepen, K.J., 2012. Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. *Molecular Biology*, 86: 225-239.
- Warnecke, P.M., Stirzaker, C., Melki, J.R., Millar, D.S., Paul, C.L. and Clark, S.J., 1997. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Research*, 25(21): 4422-4426.
- Watanabe, K., Emoto, N., Sunohara, M., Kawakami, M., Kage, H., Nagase, T., Ohisho, N. and Takai, D., 2010. Treatment of PCR products with exonuclease I and heat-labile alkaline phosphatase improves the visibility of combined bisulfite restriction analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399: 422-424.
- Wilson, M.E. and Sengoku, T., 2013. Developmental regulation of neuronal genes by DNA methylation: Environmental influences. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31: 448-451.
- Xiong, Z. and Laird, P.W., 1997. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Research*, 25(12): 2532-2534.
- Yang, C., Chuang, L., Cheng, Y., Gu, D., Chen, C. and Chang, H., 2010. Methyl-Typing: An improved and visualised COBRA software for epigenomic studies. *Federation of European Biochemical Societies*, 584: 739-744.
- Yang, Y. and Oh, G., 2010. Applications of Epigenetic Technologies in the Understanding of Complex Disease. *Journal of Undergraduate Life Sciences*, 4(1): 90-94.

- Yang, Y., Fu, W., Chen, J., Olashaw, X., Zhang, X., Nicosia, S.V., Bhalla, K. and Bai, W., 2007. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.*, 9: 1253-1262.
- Yaykaslı, K., Hatipoglu, Ö.F., Kaya, E. and Yaykaslı, E., 2012. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser (Epigenetic Mechanisms and Cancer). *Düzece Medical Journal*, 14(3): 58-68.
- Zhou, W., Wang, X. and Rosenfeld, M.G., 2009. Histone H2A ubiquitination in transcriptional regulation and DNA damage repair. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41: 12-15.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Erzurum'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2007 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2011'de biyolog olarak mezun oldu. Bu süre zarfında Fen Fakültesi öğrenci temsilcisi olarak Atatürk Üniversitesi bünyesinde bulunan öğrenci konseyinde ve 25. Dünya Üniversiteler Arası Kış oyunlarında görev aldı. 2012 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı.