

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MİDE KANSERİNDE VİNCRİSTİNE UYGULAMASININ MİRNA GEN  
METİLASYONLARINA ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Feyza Nur ARGÜÇ**

**Danışman  
Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**

**İstanbul – 2018**

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MİDE KANSERİNDE VİNCRİSTİNE UYGULAMASININ MİRNA GEN  
METİLASYONLARINA ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Feyza Nur ARGÜÇ**

**Danışman ve Tez Jürisi  
Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU (Danışman)  
Prof. Dr. Cengiz YAKICIER (Üye)  
Yrd. Doç. Dr. Ayyub EBRAHİMİ (Üye)**

**İstanbul – 2018**

## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Feyza Nur ARGÜÇ tarafından hazırlanan “**Mide Kanserinde Vincristine Uygulamasının miRNA Gen Metilasyonlarına Etkisi**” adlı tez çalışma jürimizce Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.01.2018

Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu

İmzası

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU  
: Haliç Üniv./Danışmanı

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Cengiz YAKICIER  
: Acıbadem Üniv./ Üye

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Ayyub EBRAHİMİ  
: Haliç Üniv./ Üye

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr Temel SAVAŞKAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Vekil Müdür

## Urkund Analysis Result

Analysed Document: feyza\_nur\_argüç\_tez.pdf (D34241398)  
Submitted: 12/29/2017 11:54:00 AM  
Submitted By: burcuyazicioglu@halic.edu.tr  
Significance: 1 %

### Sources included in the report:

KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)'İN, DNA METİL.pdf (D21235316)  
Sevde Hasanoglu Yüksek Lisans Tez 15.12.2017.pdf (D33989460)

### Instances where selected sources appear:

3

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, 2017-2018 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Lisans eğitimimin yanısıra yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince desteğini, sabrını, anlayışını ve sevgisini esirgemeyen, en zor zamanlarımda yanımda olup sahip çıkan, akademik başarılarını örnek aldığım, tanıdığım en güçlü insan olan çok sevgili danışman hocam Doç. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Hayatım boyunca her zaman müteşekkire kalacağım...

En sıkışık zamanlarında bile bana zaman ayırıp, her türlü bilimsel, teknik ve bitmek bilmeyen sorularımı sabırla dinleyip yanıtlayan, desteğini her zaman hissettiğim, hayatımda tanıdığım en anlayışlı insan olan çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ayyub EBRAHİMİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Her an ve her koşulda yanımda olan, bilimsel çalışmaların yalnız bilimsel gaye için değil aynı zamanda insanlığa fayda için yapılması gerekliliğini bana öğreten, merhametin ve duyarlılığın gücünü keşfetmemi sağlayan, yaşamım boyunca kendimi gerçekleştirmemde her zaman destek olacaklarını bildiğim canım anneme ve babama, dualarını üzerimde sürekli hissettiğim, tontonum ve canım babaanneme gönülden minnettarım.

Doğduğundan bu yana tamamlandığımı hissettiğim, diğer yarım, sırdaşım ve dostum, biricik kardeşim Hüseyin Samet Argüç'e,

Kötülüklerle birlikte dünyanın iyiliklerle de dolu olduğunu, mücadele etmeyi ve asla pes etmemeyi birlikte öğrendiğimiz, en huysuz anlarımda bile yanımda olan, varlığıyla güç bulduğum, bir an bile eksikliğini hissetmediğim ve çalışma disiplinini örnek aldığım birtanecik meslektaşım, kuzenim ve can dostum Sevilay Acar'a,

Tüm sıkıntılı anlarımızda ve tüm güzellikle dolu zamanlarımızda beraber olduğumuz, duygudaşım, arkadaşım, dinlediğimiz her bir müziğin notalarından feyz aldığım sevgili Baran Şen'e,

En çekilmez zamanlarımda bana sabır gösteren, hayata dair nasihatlerini ilgiyle dinlediğim, bilim ortağım, kutsal arkadaşım Sinan Yunak'a,

Üniversite yaşamımız boyunca hep birlikte olduğumuz, her biriyle aramıza mesafeler girse de hep kalbimde yer alan, uzaktan destek veren ve böylesine güzel dostlar biriktirdiğim için kendimle gururlanmamı sağlayan canım arkadaşlarım Fatma Nur Güzelçay'a, Raziye Demir'e, Dila Ünlü'ye, Nesim Gönceer'e, Şafak Şener'e ve Ferhat Erdoğan'a,

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün saygıdeğer öğretim üyelerine,

Sonsuz teşekkürler...

İstanbul, 2018

Feyza Nur Argüç

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
<b>KISALTMALAR</b> .....	V
<b>ŞEKİLLER</b> .....	VI
<b>TABLolar</b> .....	X
<b>ÖZET</b> .....	XI
<b>ABSTRACT</b> .....	XII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Mide Kanseri .....	1
1.1.1. Mide Kanserinin Patolojik Alt Tipleri ve Karakteristiği .....	1
1.1.2. Mide Kanserinin Moleküler Mekanizması .....	2
1.1.3. Mide Kanserinde Terapötik Yaklaşımlar .....	2
1.1.3.1. Vincristine .....	2
1.2. Epigenetik ve Mide Kanseri .....	3
1.2.1. Epigenetik Mekanizmalar .....	3
1.2.2. RNA ile İlişkili Susturma .....	4
1.2.3. Histon Modifikasyonları .....	5
1.2.4. DNA Metilasyonu .....	6
1.2.4.1. DNA Metilasyonunun İşlevi .....	7
1.2.4.2. DNA Metiltransferazlar .....	7
1.2.4.2.1. DNMT1 .....	8
1.2.4.2.2. DNMT2 .....	9
1.2.4.2.3. DNMT3 .....	10
1.2.4.3. DNMT İnhibitörleri .....	10
1.2.4.3.1. Nükleosid Analogları .....	11
1.2.4.3.1.1. Birinci Nesil Nükleosid Analogları .....	11
1.2.4.3.1.2. İkinci Nesil Nükleosid Analogları .....	13
1.2.4.3.1.3. Nükleosid Analogu Olmayan İnhibitörler .....	15
1.2.4.4. DNA Metilasyonundaki Diğer Mekanizmalar .....	16
1.2.4.5. DNA Metilasyonu ile İlgili Patolojiler .....	17
1.2.4.6. Mide Kanserinde DNA Metilasyonu .....	18
1.3. MikroRNA'lar ve Mide Kanseri .....	19
1.3.1. miRNA Biyosentezi .....	20
1.3.2. miRNA Fonksiyonu .....	22
1.3.3. Kanserde miRNA'ların Rolü ve Önemi .....	23
1.3.4. Mide Kanserinde miRNA'ların Rolü .....	24
1.3.5. miRNA Gen Metilasyonları ve Mide Kanseri .....	25
1.3.5.1. miR34a .....	26
1.3.5.2. miR335 .....	28
1.3.5.3. miR9-3 .....	29
<b>2. AMAÇ</b> .....	31
<b>3. GEREÇLER</b> .....	33
3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları .....	33
3.2. Hücre Kültürü için Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar .....	33
3.3. Kullanılan Ticari Kitler .....	34
3.4. Metilasyon Spesifik PZR ve Gerçek-Zamanlı PZR İşlemleri İçin	

Kullanılan Primerler.....	35
3.5. Elektroforez Kimyasalları ve Tamponları.....	36
3.6. Genel Kimyasallar.....	37
3.7. Cihazlar.....	38
<b>4. YÖNTEMLER</b> .....	39
4.1. Kimyasalların Hazırlanması.....	39
4.1.1. Vincristine Stok Solüsyon Hazırlanışı.....	39
4.1.2. Decitabine Stok Solüsyon Hazırlanışı.....	39
4.2. Hücre Kültürü.....	39
4.2.1. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	40
4.2.2. Hücrelerin Pasajı.....	40
4.2.3. Hücrelerin Dondurulması.....	40
4.2.4. Hücrelerin Sayılması.....	40
4.2.5. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-MTT Testi.....	41
4.2.6. AGS ve MKN45 Hücre Hatlarına Vincristine ve Decitabine Uygulaması.....	41
4.2.7. Hücrelerin Toplanması.....	42
4.3. DNA İzolasyonu.....	42
4.4. Bisülfid Uygulaması.....	43
4.5. Metilasyon-Spesifik PZR.....	43
4.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	45
4.7. RNA İzolasyonu.....	45
4.8. cDNA Sentezi.....	46
4.9. Gerçek-Zamanlı PZR.....	47
<b>5. BULGULAR</b> .....	48
5.1. AGS ve MKN45 Hücre Hatlarında Sitotoksosite (MTT Testi) Sonuçları.....	48
5.1.1. AGS Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine'nin Sitotoksosite Etkisi.....	48
5.1.1.1. AGS Hücre Hattında Decitabine'nin Sitotoksosite Sonuçları.....	48
5.1.1.2. AGS Hücre Hattında Vincristine'nin Sitotoksosite Sonuçları.....	50
5.1.2. MKN45 Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine'nin Sitotoksositeye Etkisi.....	52
5.1.2.1. MKN45 Hücre Hattında Decitabine'nin Sitotoksosite Sonuçları.....	52
5.1.2.2. MKN45 Hücre Hattında Vincristine'nin Sitotoksiste Sonuçları.....	54
5.2. Decitabine ve Vincristine Sonucu miRNA Gen Metilasyonu ve pri-miRNA Ekspresyon Sonuçları.....	56
5.2.1. AGS Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine Uygulanması ile Elde Edilen MSPZR Sonuçları.....	56
5.2.1.1. miR335 Gen Metilasyon Seviyesi.....	56
5.2.1.2. miR34a Gen Metilasyon Seviyesi.....	58
5.2.1.3. miR9-3 Gen Metilasyon Seviyesi.....	59
5.2.2. AGS Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine Uygulanması ile Elde Edilen Gerçek-Zamanlı PZR Sonuçları.....	60
5.2.2.1. pri-miR335 Ekspresyon Düzeyi.....	60

5.2.2.2. pri-miR34a Ekspresyon Düzeyi .....	61
5.2.2.3. pri-miR9-3 Ekspresyon Düzeyi.....	62
5.2.3. MKN45 Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine Uygulanması ile Elde Edilen MSPZR Sonuçları .....	63
5.2.3.1. miR335 Gen Metilasyon Seviyesi.....	63
5.2.3.2. miR34a Gen Metilasyon Seviyesi.....	64
5.2.3.3. miR9-3 Gen Metilasyon Seviyesi .....	66
5.2.4. MKN45 Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine Uygulanması ile Elde Edilen Gerçek-Zamanlı PZR Sonuçları .....	67
5.2.4.1. pri-miR335 Ekspresyon Düzeyi.....	67
5.2.4.2. pri-miR34a Ekspresyon Düzeyi .....	68
5.2.4.3. pri-miR9-3 Ekspresyon Düzeyi.....	69
<b>6. TARTIŞMA .....</b>	<b>73</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>80</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>92</b>





## KISALTMALAR

<b>BÇ</b>	: Baz Çifti
<b>C</b>	: Sitozin
<b>cDNA</b>	: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
<b>CGI</b>	: CpG adacıkları
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>COMT</b>	: Katekin O Metiltransferaz
<b>DAC</b>	: Decitabine
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	: Deiyonize Su
<b>DGCR8/Pasha</b>	: DiGeorge Sendromu Kritik Bölge Geni 8
<b>dk</b>	: Dakika
<b>DMEM/F-12</b>	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DNMT</b>	: DNA Metiltransferazlar
<b>dNTPs</b>	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit
<b>EtBr</b>	: Etidyum bromür
<b>FBS</b>	: Fetal Bovin Serum
<b>G</b>	: Guanin
<b>H</b>	: Saat
<b><i>H.pilori</i></b>	: <i>Helicobakter pilori</i>
<b>HAT</b>	: Histon Asetil Transferaz
<b>HDAC</b>	: Histon Deasetilaz
<b>HER2</b>	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>lncRNA</b>	: Uzun Kodlanmayan Ribonükleik Asit
<b>MBP</b>	: Metile-CpG Bağlanma Proteinleri
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum Klorür
<b>miRNA</b>	: Mikroribonükleik Asit
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>MSPZR</b>	: Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
<b>ncRNA</b>	: Kodlama Yapmayan Ribonükleik Asit
<b>NLS</b>	: Nükleer Konum Sinyali
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>nM</b>	: Nanomolar
<b>PBD</b>	: PCNA Bağlanma Domaini
<b>PBS</b>	: Fosfat Buffer Salin
<b>PCNA</b>	: Bölünen Hücre Çekirdeği Antijeni
<b>Pol II</b>	: RNA polimeraz II
<b>pre-miRNA</b>	: Prekürsör Mikroribonükleik Asit
<b>pri-miRNA</b>	: Primer Mikroribonükleik Asit
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RISC</b>	: RNA Tarafından Uyarılmış Susturma Kompleksi

<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RPMI/1640</b>	: Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) Medyum
<b>SAH</b>	: S-Adenozil Homosistein
<b>SAM</b>	: S-Adenozil Metiyonin
<b>sn</b>	: Saniye
<b>snRNA</b>	: Küçük Kodlanmayan Rinonükleik Asit
<b>TBE</b>	: Tris-Borik Asit-EDTA
<b>TRBP</b>	: Transaktive Edici Cevabı Oluşturan RNA Bağlanan Protein
<b>TRDMT1</b>	: tRNA Aspartik Asit Metiltransferaz
<b>TRF</b>	: Replikasyon Odak Hedefi
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>V</b>	: Volt
<b>VCR</b>	: Vincristine
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>3'UTR</b>	: 3' Çevirisi Yapılmayan Bölgeler



## ŞEKİLLER

	<b>Sayfa No.</b>
<b>Şekil 1.1.</b> Epigenetik mekanizmaların toplu gösterimi.....	4
<b>Şekil 1.2.</b> Histon modifikasyonları ile kromatin yapısının düzenlenmesi ve transkripsiyona etkisi .....	6
<b>Şekil 1.3.</b> DNA metilasyonunun mekanizması .....	7
<b>Şekil 1.4.</b> DNMT'lerin yapılarının şematik gösterimi .....	8
<b>Şekil 1.5.</b> DNA inhibitörlerinin çalışma mekanizması .....	11
<b>Şekil 1.6.</b> 5-aza-deoksisitidinin bağlanma mekanizması .....	12
<b>Şekil 1.7.</b> Kanser terapisinde DNA metilasyon inhibitörlerinin mekanizması.....	13
<b>Şekil 1.8.</b> Nükleosid analoglarının gösterimi.....	14
<b>Şekil 1.9.</b> Nükleosid analogu olmayan DNMT inhibitörleri.....	16
<b>Şekil 1.10.</b> DNA metilasyonu ile baskılanmada yer alan diğer mekanizmalar .....	17
<b>Şekil 1.11.</b> DNA metilasyonu ile kanser oluşumu.....	18
<b>Şekil 1.12.</b> miRNA biyosentezi .....	21
<b>Şekil 1.13.</b> miRNA fonksiyonu.....	22
<b>Şekil 1.14.</b> Onkogenik ve tümör baskılayıcı özellikteki miRNA'ların etki mekanizması.....	24
<b>Şekil 1.15.</b> miRNA genlerinin epigenetik modifikasyonu ve kanser hücrelerindeki statüler .....	26
<b>Şekil 5.1.</b> MTT testi ile AGS hücre hattına 24 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	49
<b>Şekil 5.2.</b> MTT testi ile AGS hücre hattına 48 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	50
<b>Şekil 5.3.</b> MTT testi ile AGS hücre hattına 72 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	50
<b>Şekil 5.4.</b> MTT testi ile AGS hücre hattına 24 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	51
<b>Şekil 5.5.</b> MTT testi ile AGS hücre hattına 48 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	51
<b>Şekil 5.6.</b> MTT testi ile AGS hücre hattına 72 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	52
<b>Şekil 5.7.</b> MTT testi ile MKN45 hücre hattına 24 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	53
<b>Şekil 5.8.</b> MTT testi ile MKN45 hücre hattına 48 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	53
<b>Şekil 5.9.</b> MTT testi ile MKN45 hücre hattına 72 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	54
<b>Şekil 5.10.</b> MTT testi ile MKN45 hücre hattına 24 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	55
<b>Şekil 5.11.</b> MTT testi ile MKN45 hücre hattına 48 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	55
<b>Şekil 5.12.</b> MTT testi ile MKN45 hücre hattına 72 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı .....	56
<b>Şekil 5.13.</b> MSPZR ile AGS hücre hattına 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu miR335 metilasyon ürünleri.....	57

<b>Şekil 5.14.</b> MSPZR ile AGS hücre hattına 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu miR335 metilasyon ürünleri.....	57
<b>Şekil 5.15.</b> AGS hücre hattına miR34a 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	58
<b>Şekil 5.16.</b> AGS hücre hattına miR34a geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	59
<b>Şekil 5.17.</b> AGS hücre hattına miR9-3 geninin 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	60
<b>Şekil 5.18.</b> AGS hücre hattına miR9-3 geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	60
<b>Şekil 5.19.</b> Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR335 ekspresyon seviye değişimi.....	61
<b>Şekil 5.20.</b> Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviye değişimi.....	62
<b>Şekil 5.21.</b> Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviye değişimi.....	63
<b>Şekil 5.22.</b> MKN45 hücre hattına miR335 geninin 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	64
<b>Şekil 5.23.</b> MKN45 hücre hattına miR335 geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	64
<b>Şekil 5.24.</b> MKN45 hücre hattına miR34a geninin 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	65
<b>Şekil 5.25.</b> MKN45 hücre hattına miR34a geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	66
<b>Şekil 5.26.</b> MKN45 hücre hattına miR9-3 geninin 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	67
<b>Şekil 5.27.</b> MKN45 hücre hattına miR9-3 geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri.....	67
<b>Şekil 5.28.</b> Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR335 ekspresyon seviye değişimi.....	68
<b>Şekil 5.29.</b> Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviye değişimi.....	69
<b>Şekil 5.30.</b> Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviye değişimi.....	70

## TABLolar

	Sayfa No.
<b>Tablo 3.1.</b> Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan solüsyon ve besiyerleri .....	33
<b>Tablo 3.2.</b> Hücre kültürü çalışmalarında hazırlanan çözeltiler ve besiyerleri .....	34
<b>Tablo 3.3.</b> Çalışmada kullanılan ticari kitler .....	34
<b>Tablo 3.4.</b> Metilasyon Spesifik-PZR işlemlerinde kullanılan miRNA gen primerleri.....	35
<b>Tablo 3.5.</b> Gerçek Zamanlı-PZR işlemlerinde kullanılan miRNA primerleri .....	36
<b>Tablo 3.6.</b> Elektroforez çalışmalarında kullanılan kimyasallar .....	36
<b>Tablo 3.7.</b> Elektroforez çalışmalarında hazırlanan çözeltiler ve miktarları .....	37
<b>Tablo 3.8.</b> Araştırmada kullanılan genel kimyasallar .....	37
<b>Tablo 3.9:</b> Kullanılan cihazlar ve markaları .....	38
<b>Tablo 4.1:</b> Metilasyon-Spesifik PZR işleminde kullanılan reaktif miktarları .....	44
<b>Tablo 4.2:</b> Metilasyon-Spesifik PZR işleminde pri-miR34a reaksiyon koşulları .....	44
<b>Tablo 4.3:</b> Metilasyon-Spesifik PZR işleminde pri-miR335 reaksiyon koşulları .....	44
<b>Tablo 4.4:</b> Metilasyon-Spesifik PZR işleminde pri-miR9-3 reaksiyon koşulları .....	45
<b>Tablo 4.5:</b> Agaroz Jel Yükleme Koşulları .....	45
<b>Tablo 4.6:</b> cDNA sentez reaksiyonu koşulları ve reaksiyon bileşenleri .....	46
<b>Tablo 4.7:</b> Gerçek-zamanlı PZR işleminde kullanılan reaktif miktarları .....	47
<b>Tablo 4.8:</b> Gerçek-Zamanlı PZR işleminde pri-miR34a reaksiyon koşulları .....	47
<b>Tablo 4.9:</b> Gerçek-Zamanlı PZR işleminde pri-miR335-5p reaksiyon koşulları .....	47
<b>Tablo 4.10:</b> Gerçek-Zamanlı PZR işleminde pri-miR9-3reaksiyon koşulları .....	47
<b>Tablo 5.1.</b> Elde edilen 48 saat bulguları .....	71
<b>Tablo 5.2.</b> Elde edilen 72 saat sonuçları.....	72

## GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Feyza Nur Argüç  
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU  
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Ocak 2018

## ÖZET

### MİDE KANSERİNDE VİNCRİSTİN UYGULAMASININ MİRNA GEN METİLASYONLARINA ETKİSİ

Mide kanser dünyada yüksek insidans gösteren agresif bir hastalıktır. Mide kanseri oluşumu ve gelişiminde genetik faktörlerin yanısıra epigenetik faktörler de etkilidir. Epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA interferansını kapsar. Mide kanserinde tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgeleri içindeki CpG adacıklarında yoğun hipermetilasyon görülür. Meydana gelen bu değişiklikler mutasyonlara, kromatin kararsızlığına ve tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel olarak susturulmasına sebep olabilir. Mide kanserinde yüksek veya düşük ekspresyon gösteren miRNA'lar tümöröenez, proliferasyon, invazyon ve metastazda etkilidir. miRNA genlerindeki metilasyon durumu kanser patogenezinde düzensiz ekspresyon gösteren miRNA ürünlerine sebep olmaktadır. Mide kanserinde tümör baskılayıcı özellik gösteren miR335, miR34a ve miR9-3'ün düşük ekspresyon gösterdiği ve bu düşük ekspresyonun miRNA genlerindeki hipermetilasyondan kaynaklı olduğu bildirilmiştir.

Yaptığımız bu çalışmada DNMT inhibe edici ajanı olan decitabine ile kemoterapötik bir ilaç olan vincristine'nin AGS ve MKN45 mide kanseri hücre hatlarında düşük ekspresyon gösteren tümör baskılayıcı özellikteki miR335, miR34a ve miR9-3'ün genlerinde mevcut olan hipermetilasyona olan etkisinin saate bağlı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Kontrol grubu ve decitabine grubu ile yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda, vincristine'nin AGS hücre hattında miR335 geninde metilasyonu arttırdığı, MKN45 hücre hattında metilasyonu azalttığı bulunmuştur. Vincristine'nin miR34a ve miR9-3 genlerinde her iki hücre hattında saate bağlı olarak demetilasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Vincristine uygulaması sonucu pri-miR335 ekspresyon seviyesinin AGS hücre hattında azaldığı, MKN45 hücre hattında arttığı; pri-miR34a ve pri-miR9-3'ün ise her iki hücre hattında ekspresyon seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Elde edilen bulgular miRNA genlerindeki metilasyon statüleri ile ekspresyon seviyelerinin birbiriyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Vincristine'nin mide kanseri hücrelerinde gene özgü olarak metilasyonu etkilediği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Decitabine, vincristine, mide kanseri, DNA metilasyonu, miRNA

## GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Feyza Nur Argüç  
Department : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Program : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Supervisor : Doç. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLU  
Degree Awarded and Date : Master of Science – January 2018

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF VINCRIStINE ON MIRNA GENES METHYLATION IN GASTRIC CANCER

Gastric cancer is an aggressive disease with high incidence in the world. Epigenetic factors as well as genetic factors are also influential in gastric cancer formation and progress. Epigenetic mechanisms include DNA methylation, histone modifications and RNA interference. CpG islands in the promoter region of tumor suppressor genes display intense hypermethylation in gastric cancer. These changes in the genome might lead to mutations, chromatin instability and transcriptional silencing of tumor suppressor genes. High or low expression of miRNAs effect tumorigenesis, proliferation, invasion and metastasis in gastric cancer. The methylation status of miRNAs affect irregular expression of miRNAs in the cancer pathogenesis. It has been reported that low expression miR335, miR34a and miR9-3, which are tumor suppressor in gastric cancer. This low expression has been reported to be due to hypermethylation in miRNA genes.

In this study we aimed to investigate the effect of decitabine, a DNMT inhibitory agent, and vincristine, a chemotherapeutic drug, on the hypermethylation effect of genes; miR335, miR34a and miR9-3, which are tumor suppressor genes with low expression in AGS and MKN45 gastric cancer cell lines. As a result of comparative analysis with control group and decitabine group, it has been found that vincristine increases methylation of miR335 gene in AGS cells and decreases methylation in MKN45 cells. Vincristine has been demonstrated to increase demethylation in the miR34a and miR9-3 genes in both cell lines, depending on the time. As a result of vincristine treatment, the expression level of pri-miR335 decreased in AGS cells and increased in MKN45 cells. In addition, expression levels of pri-miR34a and pri-miR9-3 were determined to enhance in both cell lines. Findings show that there is a relation between the methylation status and expression levels of miRNAs. Therefore, it has been found that vincristine affects gene-specific methylation in gastric cancer.

**Keywords:** Decitabine, vincristine, gastric cancer, DNA methylation, miRNA

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Mide Kanseri

Mide kanseri global ve agresif bir hastalıktır. Son birkaç yıldaki insidansındaki düşüşe rağmen dördüncü en yaygın kanser türüdür ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin ikinci sırasında yer alır. Besinlerin muhafazası, daha iyi beslenme ve korunma, erken teşhis ve tedavi nedeniyle insidansı azalıyor olsa da hala kötü bir prognoz göstermektedir. Teşhisi genellikle gelişmiş aşamalarında tespit edilir. Tedavisinin temelinde çoğunlukla kemoterapi veya radyasyon tedavileri ile birlikte cerrahi müdahale bulunmaktadır (Carcas, 2014).

Mide kanserinin küresel düzlemdeki dağılımında, hastalığın insidansı, sağkalımı ve mortalitesi ile ilişkili faktörlerin çoğu coğrafi bölgeler arasında büyük oranda farklılık gösterir. Avrupa ülkeleri ve Amerika kıtasında düşük insidans gösterirken; Asya ülkelerinin çoğunda yüksek insidans gösterir (Ferlay ve diğ, 2012).

### 1.1.1. Mide Kanserinin Patolojik Alt Tipleri ve Karakteristiği

Mide kanseri üzerine yapılan birçok sınıflandırma sistemi bulunmasına rağmen en çok kullanılanı Lauren sınıflandırmasıdır. Lauren sınıflandırması iki histolojik alt tipi tanımlar; bunlar, intestinal tip ve diffüz tiptir. Her iki alt tip de farklı klinik ve epidemiyolojik karakteristik taşır. İki alt tip arasındaki morfolojik farklılık intersellüler adhezyon molekülleriyle ilişkilidir (Lauren, 1965). Her iki alt tip de human epidermal growth factor receptor 2 (HER2=insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2)'nin ekspresyonu ile tespit edilebilir (Gravalos, 2008).



Gen ekspresyonlarındaki değişiklikler de mide kanserinde markır olarak kullanılmaktadır. Örneğin, VEGF proteinindeki artış birçok mide kanser vakasında rapor edilmiştir. Aynı şekilde FGFR, EGFR gibi büyüme faktör reseptör genlerinde yüksek ekspresyon olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Yoshikawa ve diğ., 2000).

### **1.1.2. Mide Kanserinin Moleküler Mekanizması**

Mide kanseri etiyolojisi multifaktöriyel özellik göstermektedir. Mide karsinomlarının gelişiminde bakteriyel, çevresel, genetik ve epigenetik faktörler etkilidir. Mide karsinogenezinin gelişmesinde onkogenler (c-met, c-erbB2, K-ras) tümör baskılayıcı genler (p53, RUNX gen ailesi, BRCA1, APC), hücre adhezyon molekülleri (E-kaderin,  $\beta$ -katenin, CD44, MMP genleri), hücre döngüsünün düzenlenmesinde etkili olan genler (CDK, Siklin-E), mikroribonükleik asit (miRNA'lar) ve kromatin modifikasyonlarında anormallikler söz konusudur (Smith ve diğ., 2006).

### **1.1.3. Mide Kanserinde Terapötik Yaklaşımlar**

Primer tümörün lokasyonuna ve büyüklüğüne bağlı olarak tercih edilen tedavi yöntemi toplam veya subtotal gastrektomiyle cerrahi rezeksiyondur. Bunun yanısıra kemoterapötik müdahaleler de söz konusudur (Carcas, 2014). Kemoterapötik müdahalelerde antimetabolitlerden olan 5-Florourasil mide karsinomasında en çok kullanılan ajandır. Bunun yanısıra Mitomisin C gibi antibiyotik yaklaşımları da söz konusudur. HER2'nin inhibisyonu da terapi amacıyla kullanılmaktadır. Trastuzumab monoklonal antikor olarak HER2'yi hedef alır ve HER2 bağımlı sinyal yolaklarını inhibe ederek, reseptörün ekstraselüler domainini keser (Hudis, 2007). Ramusirumab ise VEGF'yi hedef alan monoklonal antikordur ve mide kanseri tedavisinde biyolojik terapi amacıyla FDA tarafından onaylanan ilk ilaçtır (Fuchs ve diğ., 2014).

#### **1.1.3.1. Vincristine**

Vincristine sülfat ve vinblastin sülfat dimerik alkaloidler olup, ilk olarak 1962'de *Vinca rosea* bitkisinden izole edilmiştir. Birçok kanser türünde, non-Hodgkin's lenfoma, akut limfoblastik lösemi, akciğer ve meme kanseri gibi, tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Fonksiyon olarak, mitotik iğler içindeki mikrotübülleri engelleyerek tümör büyümesini durdurur. Mitozun metafaz safhasında tübülün

dimerlerine bağlanarak mitozu baskılar (Johnson ve diğ., 1963). Ancak kullanımları nörotoksositeye, sinir ve kas hasarlarına neden olmaktadır. En önemli yan etkisi periferik ve simetrik sensör-motor nöropatidir. Bir diğ. yan etkisi ise, antidiüretik hormon salınımında düzensizliğe sebep olmaktadır (Shelanski ve Wisniewski, 1969).

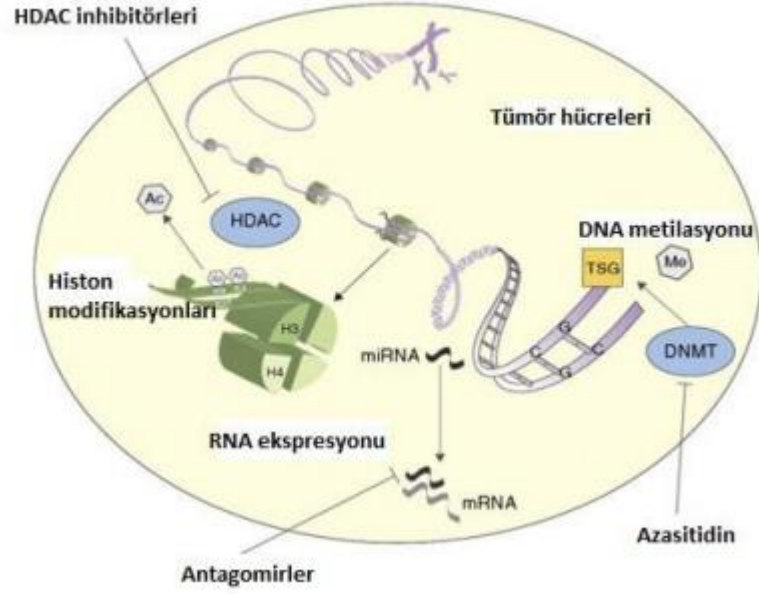
Mide kanserinde vincristine, 5-Flororasil ve Siklofosfamid ile kombinasyon tedavisi uygulanır (Comis ve Carter, 1974). Vincristine'nin düşük konsantrasyonunun, insan akciğ. adenokarsinoma hücrelerinde metillenmiş sitozini düşürdüğü rapor edilmiştir (Nyce, 1989). Ancak, vincristine'nin DNA metilasyonuna dayalı etkileri, mide kanserinde metilasyon markör genler için hala bilinmemektedir.

## **1.2. Epigenetik ve Mide Kanseri**

Epigenetik sistemler ile yapılan düzenlemeyle DNA'da bulunan genetik bilginin ifade edilmesi veya ifade edilmemesi sağlanır. Bu mekanizmalar ile genomik baskılanma, yaşlanma, embriyoda gen aktivasyonu ve inaktivasyon, hücre yenilenmesi, gametogenez gibi olaylar düzenlenmektedir (Egger ve diğ., 2004).

### **1.2.1. Epigenetik Mekanizmalar**

Epigenetik mekanizmalar arasında RNA ile indüklenen gen ifadesinin kontrolü, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu bulunur (Bk: Şekil 1.1). Bu mekanizmalar epigenetik susturmayı başlatmak ve sürdürmek için kullanılır. Üç sistem de DNA ve kromatinde meydana gelen modifikasyonlar ile transkripsiyonu aktive eden veya baskılayan proteinlerin aktivitelerini ve ifadelerini düzenler. Birbiriyle de etkileşen bu mekanizmalardan birinin veya diğ. birinin bozulması, genlerin uygunsuz bir şekilde eksprese edilmesine veya susturulmasına, dolayısıyla hastalıklara neden olabilir (Egger ve diğ., 2004).



**Şekil 1.1.** Epigenetik mekanizmaların toplu gösterimi (Mani ve Herceg, 2010)

### 1.2.2. RNA İle İlişkili Susturma

Memeli genomunda yalnızca %3'lük kısım protein kodlayan mRNA'ları sentezler. Protein kodlamadığı halde sentezlenen RNA'lar da vardır ve kodlama yapmayan RNA (ncRNA=non-coding RNA) olarak adlandırılırlar. ncRNA'ların bir kısmı çekirdekte transkripsiyon aşamasını engellerken; bir kısmı sitoplazmada mRNA'ların kesilip parçalanmasını, dolayısıyla translasyonu durdurarak gen ifadesinin engellenmesine sebep olur (Wang ve Chang 2011; Ponting ve diğ.,2009).

ncRNA'lar genellikle uzunluklarına göre sınıflandırılırlar. 200'den fazla nükleotit içeren ncRNA'lar uzun kodlanmayan RNA (long non-coding RNA=lncRNA) olarak adlandırılırlar (Kapranov, 2007). Bu RNA'lar arasından, Xist RNA X kromozomunun inaktivasyonu, histon deasetilasyonu ve metilasyonundan; Tsix RNA X kromozomu inaktivasyonundan, Linc RNA ise imprinting, transkripsiyonda etkili genlerin düzenlenmesi ve embriyonik pluripotent hücrelerinin, üreme hücrelerine farklılaşmasında görevlidir (Ogawa ve diğ., 2008).

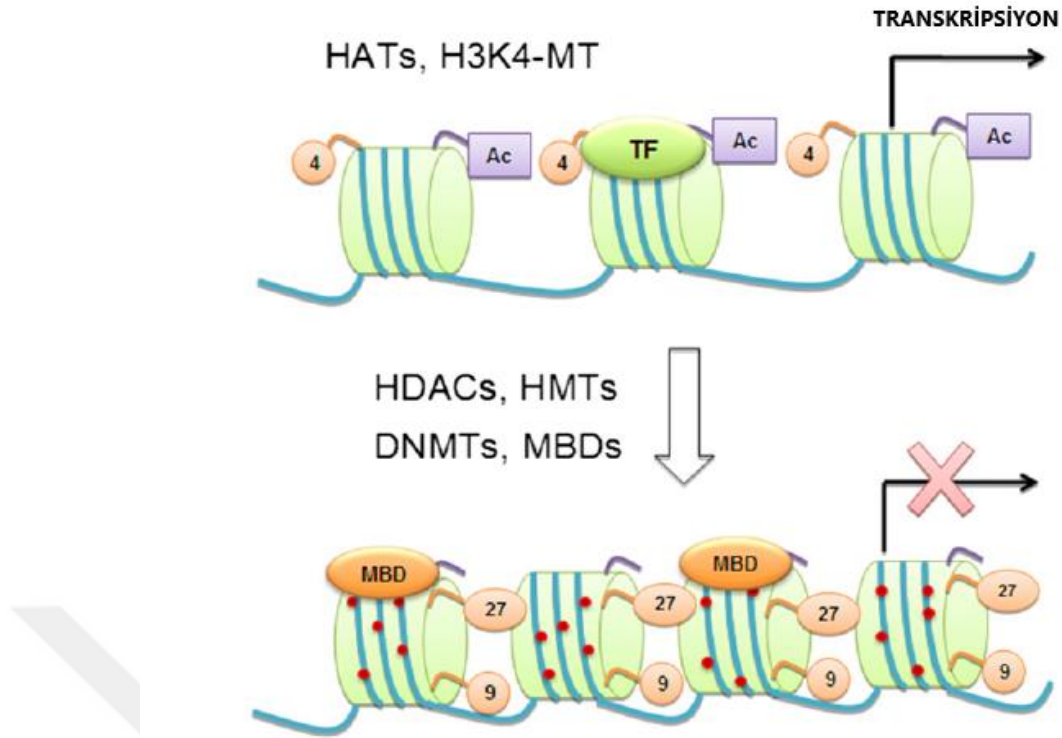
200'den az nükleotit içeren ncRNA'lar kısa kodlanmayan RNA (small non-coding RNA) olarak adlandırılırlar (Kapranov, 2007). Bu RNA'lardan, miRNA translasyonun baskılanması, (Ambros, 2004), DNA metilasyonu ve kromatin modifikasyonunun yanında hücre ölümü, (Xu ve diğ., 2003), farklılaşması, Chen ve diğ. (2004), proliferasyonunda rol oynamaktadır (He ve diğ., 2005). piRNA

memelilerin eşey hücrelerinde transpozon ve Retro elementlerin baskılanmasından ve DNA metilasyonundan sorumludur (Aravin ve diğ., 2007). tiRNA'lar translasyonun baskılanmasından, (Sobala ve Hutvagner, 2013); snoRNA, snRNA ve gRNA ise post-transkripsiyonel modifikasyon ile DNA replikasyonunda görevlidirler (Brameier ve diğ., 2011; Fukuda ve diğ., 2017).

### **1.2.3. Histon Modifikasyonları**

Ökaryotik hücrelerde, DNA nükleozom denilen kromatinin temel ünitesine sarılır. Kromatin yapısındaki değişiklikler gen ifadesini kontrol eder. Nükleozomun, dolayısıyla kromatinin oluşumunda DNA ve DNA-protein kompleksleri bir arada bulunur. Bu proteinler histon proteinleridir ve negatif yüklü DNA'ya kuvvetli bağlanabilmesi için N-terminal bölgeleri pozitif yüklü aminoasitlerce zengindir. Nükleozom içerisindeki DNA sıkı sıkıya paketleniyse transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşması zorlaşır ve dolayısıyla genlerin susturulmasına neden olur (Luger ve diğ., 1997; Kouzarides 2007).

Histonlar çok sayıda post translasyonel modifikasyona uğrarlar ve bu modifikasyonlar kromatin yapısının değişmesine sebep olarak gen ifadesinin düzenlenmesinde etkili olur. Bu modifikasyonlar, histon asetilasyon/deasetilasyonu, histon metilasyonu ve histon fosforilasyonudur (Egger ve diğ., 2004). Histon asetilasyonu, Histon Asetil Transferaz (HAT) enzimleri ile; histon deasetilasyonu ise Histon Deasetilazlar (HDAC) ile gerçekleştirilir (bk: Şekil 1.2) (Kouzarides 2007). HDAC ve HAT'ların düzenli aktivasyonu ile gen ifadesi denge halinde tutulur (Allis ve diğ., 2000: 191-204). HAT'lerin aktivasyonu sonucunda histonların pozitif yükleri maskelenerek DNA ile olan elektrostatik etkileşimi zayıflatılır. Böylece promotör bölgeleri nükleozom yapısıyla daha az ilişkili hale gelerek RNA polimeraz II'nin promotör bölgesine erişimi sağlanır (Kouzarides, 2002).



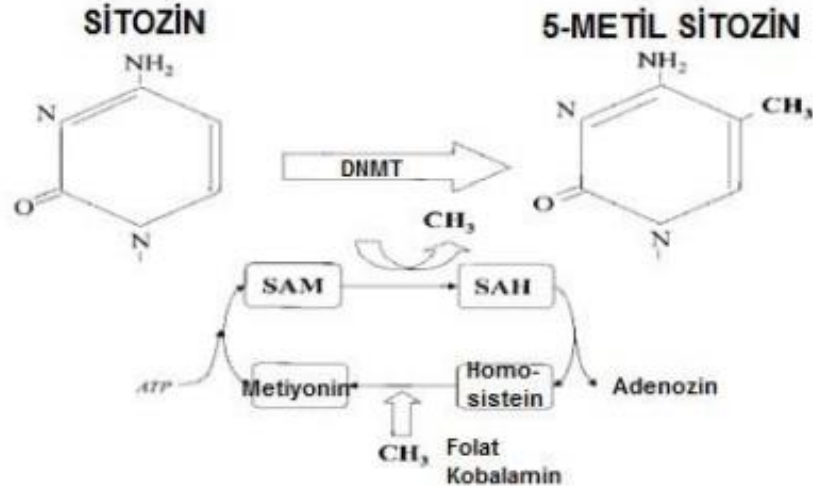
**Şekil 1.2.** Histon modifikasyonları ile kromatin yapısının düzenlenmesi ve transkripsiyona etkisi (Gros ve diğ., 2012). (H3K4-MT=histon 3 lizin 4 metiltransferaz, TF=transkripsiyon faktörleri, MBD=metil-bağlayıcı protein, AC=histon asetillenmesi, 4,9,27= lizin rezidüleri)

#### 1.2.4. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu DNA'nın yapısındaki CpG dinükleotitlerinde bulunan sitozin rezidülerinin 5' karbonuna bir adet metil grubunun kovalent olarak eklenmesiyle meydana gelir (Robertson ve Jones, 2000). Genomdaki guanin ve sitozince zengin olan kümelenmiş CpG dinükleotitlerine CpG adacıkları (CpG islands=CGI) adı verilir ve genellikle gen promotör bölgelerinin 5' ucunda konumlanmıştır. İnsanlarda CpG dinükleotidinin sıklığı çok azdır ve bu CG baskılanması olarak adlandırılır. CpG adacıkları genomun %1'ini oluşturur. Gen promotörlerinde yer alan CpG adacıkları genellikle hipometile haldedir. CpG adacıkları insan gen promotörlerinin %70'inde bulunur (Herman ve Baylin, 2003).

Sitozinlerin metilasyon işlemleri DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından gerçekleştirilir. DNMT enzim ailesinin bu zamana kadar tanımlanmış beş üyesi vardır. Bunlar DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L'dir. Şekil 1.3.'te gösterildiği üzere, metilasyon işlemi için gereken metil grubu S-adenozil metiyonin

(SAM) ile sağlanır. SAM'den metil grubunun transferi ile SAM S-adenozil homosistein'e (SAH) dönüşür. SAH'ın yeniden SAM'e dönüşümü kobalamin ve folat bağımlı bir yolak ile gerçekleşir. Genel olarak promotör bölgesindeki metilasyon artışı gen ekspresyonunu düşürür (Wajed ve diğ., 2001).



Şekil 1.3. DNA metilasyonunun mekanizması (Wajed ve Laird, 2001).

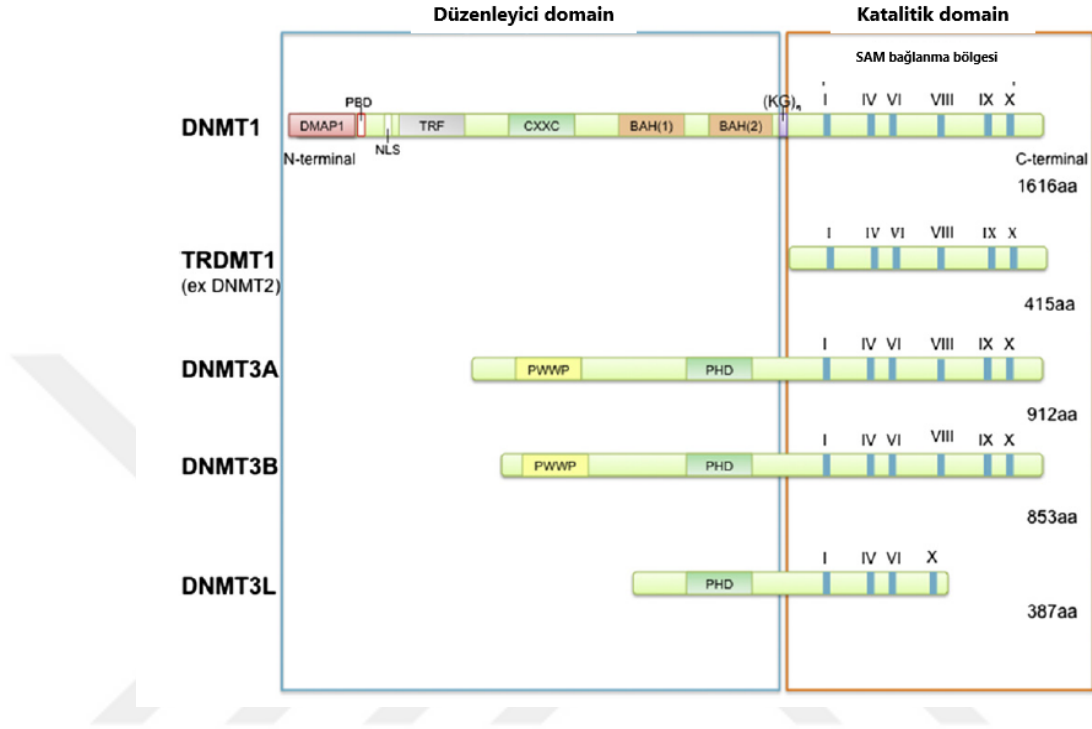
#### 1.2.4.1. DNA Metilasyonunun İşlevi

DNA metilasyonu genellikle, genin susturulması, baskılanması veya heterokromatin yapısı ile ilişkilidir. Ayrıca omurgalılarda genomik imprinting ve X-kromozomu inaktivasyonu ile de ilişkilidir. DNA metilasyonunun gen susturulmasındaki rolü gelişimin erken dönemlerinde görülür ve embriyonun hayatta kalabilmesi için metilasyon olmazsa olmazdır (Reik, 2007; Robertson ve Jones, 2000).

#### 1.2.4.2. DNA Metiltransferazlar

DNMT enzim ailesinin bu zamana kadar tanımlanmış beş üyesi vardır. Bunlar DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L'dir. Katalitik aktif olan DNMT'ler N-terminal domain, sekans motifler, katalitik C-terminal domain gibi ortak yapılar taşırlar. Sekans motifleri kofaktör olan SAM için bağlanma bölgesi oluşturur. Motif IX, sitozin bazı için özel tanıma bölgesi taşıır. Motif VI, sitozinin 5' pozisyonundan metillenmesini sağlayan glutamin rezidüsünü taşıır. N-terminal bölgeleri ise DNA'yı tanıma ve bağlanma işlevinden sorumludur. Bu tanıma bölgeleri ile DNMT'lerin çekirdeğe ve kromatine doğru migrasyonu ve kromatin yapısı ile DNA metilasyonu arasındaki ilişki sağlanır.

Gen knock-out çalışmalarında DNMT1 ve DNMT3A/3B/3L enzimleri hücrenin yaşayabilirliği için elzemdir ancak DNMT2'nin yokluğu herhangi bir anormal fenotipe sebep olmaz (Chen ve Li, 2004; Gros ve diğ., 2012). DNMT'lerin yapıları ve taşıdıkları domainleri Şekil 1.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4. DNMT'lerin yapılarının şematik gösterimi (Gros ve diğ., 2012).

DNMT'ler yalnızca tek başlarına işlev görmezler, aynı zamanda birbirleriyle de etkileşim kurarak işlev gösterebilirler. Örneğin, DNMT1'in N-terminal kısmı DNMT3A/3B'nin N-terminal bölgesine bağlanabilir ve böylece DNMT1 de *de novo* metilasyon aktivitesi gösterebilir. Benzer şekilde, DNMT3 enzimleri DNMT1 eksikliğinde metilasyonun devamlılığını sağlayan metiltransferazlar gibi davranabilir (Gros ve diğ., 2012).

#### 1.2.4.2.1. DNMT1

İlk keşfedilen DNA metiltransferazdır (Bestor ve diğ., 1988). Ökaryotlarda 3 izoform halinde bulunur. Bunlardan DNMT1a somatik hücrelerde, DNMT1o oositlerde ve DNMT1p ise mayoz bölünmenin profaz fazının üçüncü evresinde işlev görür (Chen ve Li, 2004).

DNMT1 DNA replikasyonu esnasında yeni sentezlenen DNA zincirini metilasyona uğratar. DNA replikasyonu sonrası metilasyon özelliklerinin

kopyalanmasından sorumludur. Yarı metile haldeki DNA'ya metile olmamış haldeki DNA'ya kıyasla daha fazla afinite gösterir ve overekspresyonu hücre büyümesi üzerinde etkilidir (Pradhan ve diğ., 1999). Normal hücrelerde knock-out edilen DNMT1 apoptozdan, mitotik hasarlardan sorumludur ve kromozom stabilizasyonunun bozulmasına sebep olur (Takashima ve diğ., 2009; Chen ve diğ., 2007; Gaudet ve diğ., 2003). Bu sebepten kanser hücrelerinde DNMT1'deki işlevsel bozulmalar hücrelerin invazyonunu arttırmadan tümör büyümesini durdurma ve hücrel farklılaşmama safhasını tersine döndürme gibi durumlara sebep olabileceği gibi terapötik bir hedef sağlayabilir (Chik ve Szyf, 2011).

DNMT1 DNA metilasyonunu iki farklı mekanizma ile gerçekleştirir: i) replikasyon çatalı ile doğrudan etkileşim, ii) UHRF1 proteini ile olan etkileşim (Sharif ve Koseki, 2011). Somatik hücrelerin S fazının başında NLS ile (nuclear localization signal=nükleer konum sinyali) ile nukleusa transport edilir. DNMT1 replikasyon lokusuna birkaç farklı domaini ile bağlanır. Replikasyon bölgesindeki spesifik diziyeye N-terminal domainleri olan TRF (Targeting Replication Foci=Replikasyon Odak Hedefi) ve PBD (PCNA (proliferating cell nuclear antigen=bölünen hücre çekirdeği antijeni) binding domain=PCNA bağlanma domaini) ile bağlanır. Böylece DNMT1 hemimetile olan DNA'ya bağlanmış olur. Metile edilecek sitozin katalitik cebe doğru çekilir ve kofaktör SAM'in metil grubu sitozinin 5' pozisyonuna aktarılır. Tamamen metile olan CpG adacığında sonra DNMT1 yeni sentezlenen DNA sarmalındaki bir diğer CpG adacığına doğru hareket eder. İkinci mekanizma ise, DNMT1'in hemimetillenmiş CpG bölgelerine bağlanmasını kolaylaştıran ve bu bölgelere spesifik afinite gösteren UHRF1 ile gerçekleşir (Iida ve diğ., 2002; Lan ve diğ., 2010).

#### **1.2.4.2.2. DNMT2**

Bir diğer ismiyle TRDMT1 (tRNA aspartic acid methyltransferase), DNMT1'in C-terminal domainindeki DNA sekansı ile analoji gösterir. *in vivo* ve *in vitro* şartlarda küçük bir DNA metiltransferaz aktivitesi gösterirken, yüksek oranda RNA metiltransferaz işlevi görür (Hermann ve diğ., 2004). DNMT2'nin gen knock-out çalışmalarında anormal fenotiple ilişkili olmadığı görülmüştür. Bu sebepten embriyonik gelişim gibi durumlardan ziyade türler arasındaki evrimde rol oynadığıyla ilgili hipotezler geliştirilmiştir (Espada ve Esteller, 2010).



### 1.2.4.2.3. DNMT3

DNA metilasyon örüntüleri CpG bölgesi başına ve hücre bölünmesi başına yaklaşık %5'lik bir hata payı ile korunmaya devam eder (Riggs ve diğ., 1998). Bu hata payı aslında hücrelere metilasyon durumlarındaki önemli değişiklikler için esneklik yaratır. Bu durum, replikasyon sırasındaki metilasyon profilini oluşturan DNMT1'e DNMT3A ve DNMT3B'nin yardım etmesi ile dengelenir (Jones ve Liang, 2009).

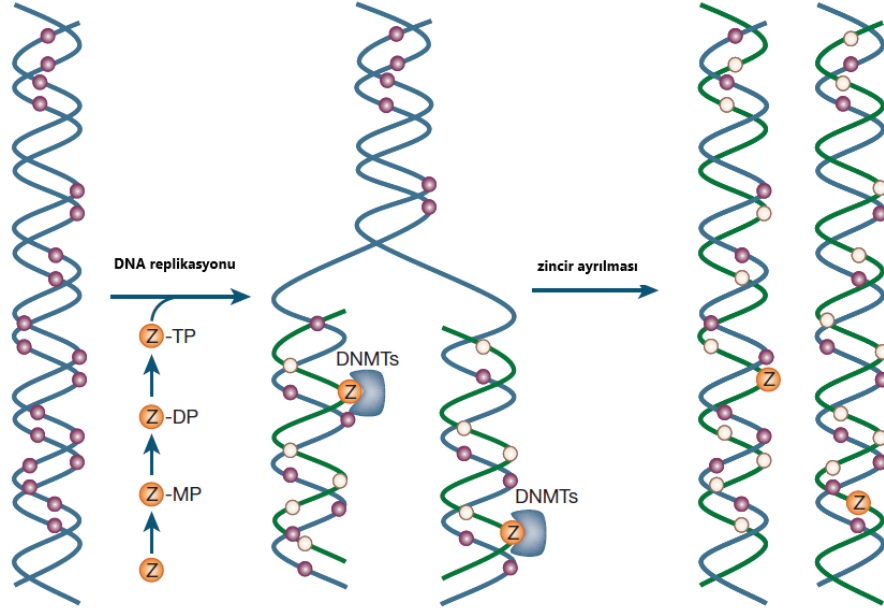
DNMT3A ve DNMT3B somatik hücrelerde DNMT1'e kıyasla daha düşük miktarlarda bulunur ve metile olmayan ile hemimetile CpG bölgelerine aynı affiniteyi gösterir. Yarı metile veya metile olmayan bölgelere aynı affiniteyi göstermelerinden ötürü "*de novo*" metilleyici olarak sınıflandırılırlar (Hansen ve diğ., 1999).

DNMT3A daha çok genomik imprinting ve DNA'nın perisentromerik bölgelerinin metilasyonundan sorumludur. DNMT3B ise sentromerik bölgelerin metilasyonunda görev alır. Bu işlevlerinden ötürü, DNMT3'leri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sentromerik kararsızlık ve immün yetersizlik sendromlarına sebep olur (Okano ve diğ., 1998).

DNMT3L diğer enzimlerden farklı olarak, katalitik motifi olmadığından dolayı doğal bir enzimatik aktiviteye sahip değildir ancak gen ifadesini dolaylı yoldan düzenler. DNMT3A için kofaktör işlevi görerek onun uyarılmasını, histon deasetilaz 1 ile etkileşim kurarak transkripsiyonel baskılamayı sağlamanın yanında, maternal genomik imprinting sürecinde de etkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Jia ve diğ., 2007).

### 1.2.4.3. DNMT İnhibitörleri

Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu kansere sebep olmaktadır. DNA metilasyonu geri-dönüşümlü bir mekanizma olduğu için, DNA demetilasyonunun sağlanması ilginç bir terapötik strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu zamana kadar birçok DNMT inhibitörleri tanımlanmıştır ve bunlar iki aileye ayrılır; i) nükleosid analogları, ii) nükleosid analogu olmayan inhibitörler (Yoo ve Jones, 2006). DNMT inhibitörlerinin mekanizması Şekil 1.5.'te gösterilmektedir.



Şekil 1.5. DNA inhibitörlerinin çalışma mekanizması (Egger ve diğ., 2004). (Z= DNMT inhibitörü)

#### 1.2.4.3.1. Nükleosid Analogları

Nükleosid analogları birinci nesil ve ikinci nesil analoglar olmak üzere ikiye ayrılır.

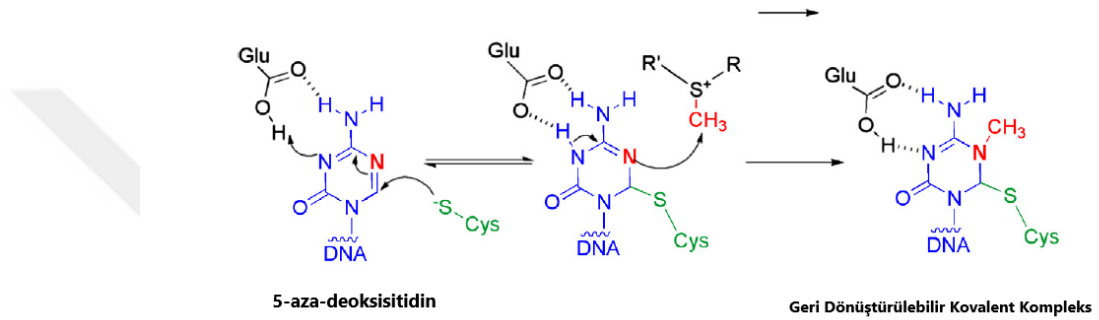
##### 1.2.4.3.1.1. Birinci Nesil Nükleosid Analogları

İlk tanımlanan DNMT inhibitörleri, lösemi kemoterapisinde kullanılan antimetabolit ve sitotoksik ajan olarak kullanılan inhibitörlerdir (Sorm ve Vesely, 1968).

Bu inhibitörler arasında 5-azacytidine (azacitidine), 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) ve zebularine yer almaktadır. Azacitidine ve decitabine, iki sitidin analogu olmakla birlikte, 5. pozisyondaki karbon atomunun bir nitrojen atomu ile yer değiştirdiği ve riboz veya deoksiriboza bağlandığı bir yapı gösterir (Constantinides ve diğ., 1977). Bu keşfin ardından 5,6-dihydro-5-azacytidine ve 5-fluoro-2'-deoxycytidine analogları sentezlenmiştir (Jones ve Taylor, 1980).

Bu analoglar hücre içerisine hCNT1 (human concentrative nucleoside transporter=insan konsentratif nükleosid transport edici) ile transport edildikten sonra fosforilasyona uğrayarak trifosforile olan aktif formlarına dönüştürülür. Riboz analogları (deoksi analoglar) hem RNA hem de DNA'ya katılırken, deoksiriboz

analogları yalnızca DNA'ya katılır. Analogların işlev göstermeleri için, hücre döngüsünün S fazında genom ile bütünleşmesi gerekir. Bu durum hızlı çoğalma gösteren kanser hücreleri için özgül bir durum sağlar. Analoglar genoma entegre olduktan sonra DNMT'ler tarafından tanınır ve DNMT'lerin sitozinlere bağlanma reaksiyonunun aynısı gerçekleşir. Enzimin katalitik sisteini ile sitozin analoglarının 6. pozisyonları arasında kovalent bir kompleks form oluşur ve bu form sitozindeki reaksiyondan farklı olarak geri-dönüşümsüzdür. Geri-dönüşümsüz formun oluşmasının sebebi, 5. pozisyonda bulunan nitrojen atomundan kaynaklanır (Momparler, 2005; Santi ve diğ., 1984). İlgili mekanizma Şekil 1.6'da gösterilmiştir.

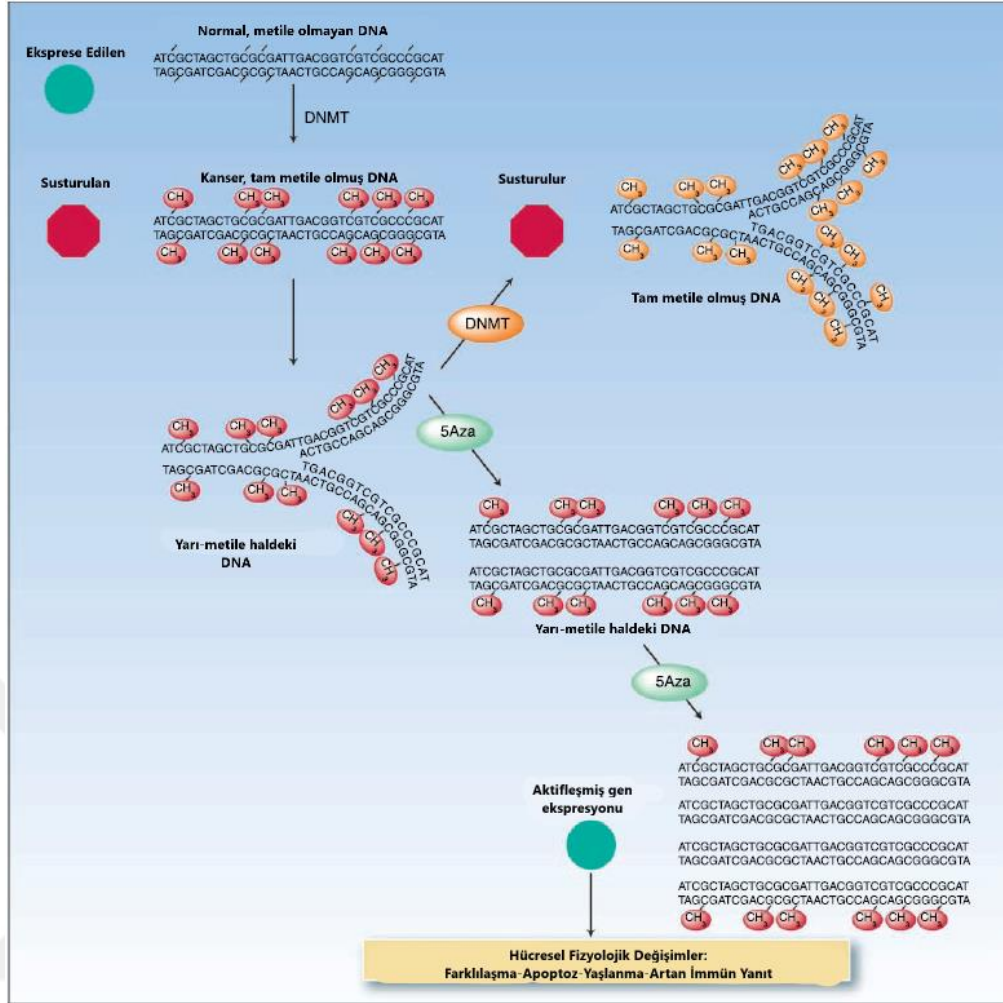


**Şekil 1.6.** 5-aza-deoksitidin bağlanma mekanizması (Gros ve diğ., 2012).

Yüksek dozlarında bu bileşikler sitotoksiktir ve bu nedenle daha az sitotoksikite için yalnızca demetilasyon etkisini elde etmek adına daha düşük dozlarda kullanılır (Qin ve diğ., 2009).

DNMT inhibisyonunun yanısıra riboz analogları RNA'ya entegre olarak protein sentezini bozuntuya uğratar. Bu sebepten decitabine azacitidinden daha efektif bir analogdur (Hollenbach ve diğ., 2010). Ayrıca RNA analogları yalnızca hücrenin bölünme evresinde değil, sessiz evresinde de aktivite gösterir (Gravina ve diğ., 2010).

Son çalışmalar göstermektedir ki, kullanılan nükleosid analoguna bağlı olarak tümör baskılayıcı genlerin promotörlerindeki demetilasyon kalıpları farklılık gösterir. Etki mekanizmaları Şekil 1.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Kanser terapisinde DNA metilasyon inhibitörlerinin mekanizması (Issa, 2006)

FDA tarafından azacitidine'nin 2004'te, decitabine'nin ise 2006'da onaylanmasından sonra akut miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom hastalıklarında tedavi edici ajanlar olarak klinikte kullanıma sunulmuşlardır (Piekarz ve Bates, 2009). Daha ileri klinik çalışmalarda ise antikanser ilaçları ile kombinasyon halinde yapılan testler devam etmektedir. Azacitidine ve decitabine Faz II solid tümörlerinde (melanoma, rahim ve prostat kanseri gibi) kullanılırken; metastatik melanomada histon deasetilaz inhibitörleri ile kombinasyon şeklinde kullanılmaktadır. Ne yazık ki yüksek verimliliklerinin yanında düşük biyokullanılabilirlik gösterirler. Bu sebepten, fizyolojik ortamdaki kararsızlığı ve yüksek toksisitesi kullanımlarını kısıtlar (Kristensen ve diğ., 2009).

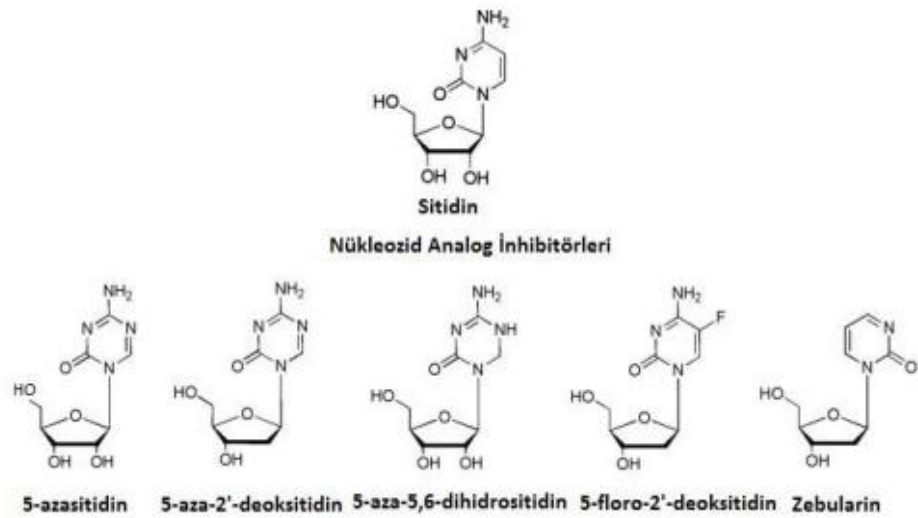
#### 1.2.4.3.1.2. İkinci Nesil Nükleosid Analogları

Birinci nesil DNMT inhibitörlerinin kemoterapide gösterdiği verimlilikten ötürü araştırmacılar daha iyi farmakokinetik profil gösteren yeni bileşikleri

tanımlamışlardır. Bunlar içerisinde CP-4200 bileşiği azacitidine'nin elaidik asit esteri olarak ilacın hücre alımını iyileştirmek amacıyla sentezlenmiştir. Birçok hücre çalışması CP-4200'ün DNA demetilasyonu üzerindeki pozitif etkisinin yanı sıra nükleosid transportuna bağlı olarak hücre alım profili azacitidine ile karşılaştırılmıştır ve azacitidine'den önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Bunun sonucunda CP-4200'ün azacitidine'nin bir ön-ilacı olduğu ve böylece kimyasal olarak stabil olmayan azacitidine'nin hücre içine alımındaki gecikmenin önleniği gösterilmiştir. Bütün fare modellerinde *in vivo* antitümör aktivitesinin terapötik verimlilik açısından azacitidine'den daha etkili olduğu belirtilmiştir (Brueckner ve diğ., 2010).

SGI-110 ise decitabine'nin ön-ilacı olarak sentezlenmiştir. Sulu çözelti içinde decitabine ile aynı stabilizasyon profilini sergiler. *in vivo* olarak bu enzim decitabine'nin deaminasyon reaksiyonu ile inaktif 5-azadeoxyuridine'e dönüşmesini sağlar. SGI-110'un farmakolojik profili decitabine ile karşılaştırılmıştır ve tümör sahibi olmayan farelerde *in vivo* toksisitesinin düşük olduğu, daha iyi stabilite gösterdiği vurgulanmıştır (Yoo ve diğ., 2007; Chuang ve diğ., 2010).

Birinci nesil ve ikinci nesil nükleosid analoglarının yapıları Şekil 1.8.'de gösterilmekle birlikte, çeşitli klinik çalışmalarda olumlu sonuçlar vermiştir, ancak özgüllüklerinin olmaması ve güçlü yan etkileri sebebiyle yeni ve daha seçici DNMT inhibitörlerine ihtiyaç duyulmaktadır.



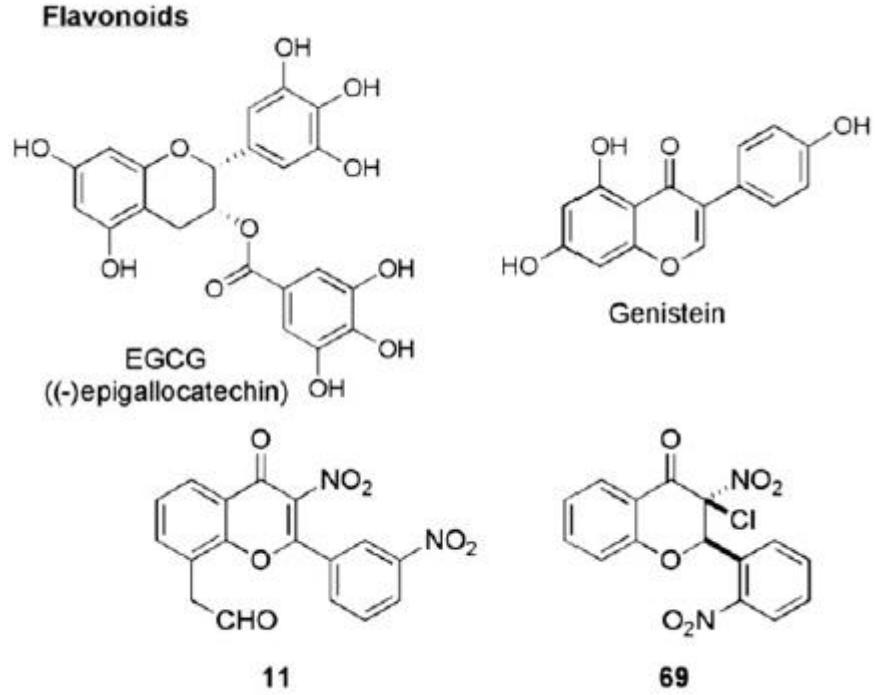
Şekil 1.8. Nükleosid analoglarının gösterimi (Gros ve diğ., 2012).

### 1.2.4.3.1.3. Nükleosid Analöğü Olmayan İnhibitörler

Yakın zamanda DNA'ya entegre olmayan ve nükleosid olmayan moleküller tanımlanmıştır. Bu moleküllerin çoğu DNMT'lerden başka hedeflere karşı biyolojik aktivite gösterirler. Nükleosid analöğü olmayan bu inhibitörler arasında, flavonoidler, hidralazine, procaine, oxazoline, psammaplin A gibi bileşikler yer alır ve Şekil 1.9.'da gösterilmiştir (Yang ve diğ., 2010).

Flavonoidler, bitkilerden elde edilen organik bileşiklerdir (Galeotti ve diğ., 2008). Genistein soya fasülyesinde bulunan başlıca izoflavondur ve potensiyel antikanser ajan olarak düşünülmektedir (Biggers ve Curnow, 1954). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, genistein'in enzimatik ve hücresele DNMT inhibitörü gibi işlev gördüğü ve demetilasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Flavonoidlerin varsayılan etki mekanizmasının DNMT'lerin dolaylı yoldan inhibisyonunu sağlaması olarak düşünülmektedir (Fang ve diğ., 2005). Bu mekanizma, SAM ve SAH üzerinden gerçekleşir. Flavonoidler SAM'in SAH'a dönüşümünü katalizleyen bir enzim olan COMT (Catechin\_OMethyltransferase) enziminin substratlarıdır. SAM-bağımlı enzim olan COMT, SAM'den aldığı metil grubunu flavonoidlere aktarır ve onların metillenmesini sağlar ve dolayısıyla hücre içinde SAH konsantrasyonu artar. Normal koşullarda hücre içerisinde SAM:SAH dengesi yerinde tutulduğundan ve SAH güçlü bir DNMT inhibitörü olduğundan, DNMT'ler artık metilasyon yapamazlar (Lee ve diğ., 2005).

Ancak flavonoidlerin DNMT inhibisyon aktiviteleri hala sorgulanmaktadır ve son çalışmalar sitotoksik olduklarını ve apoptozu genomik demetilasyon olmadan arttırdıklarını göstermektedir.



**Şekil 1.9.** Nükleosid analogu olmayan DNMT inhibitörleri (Gros ve diğ., 2012).

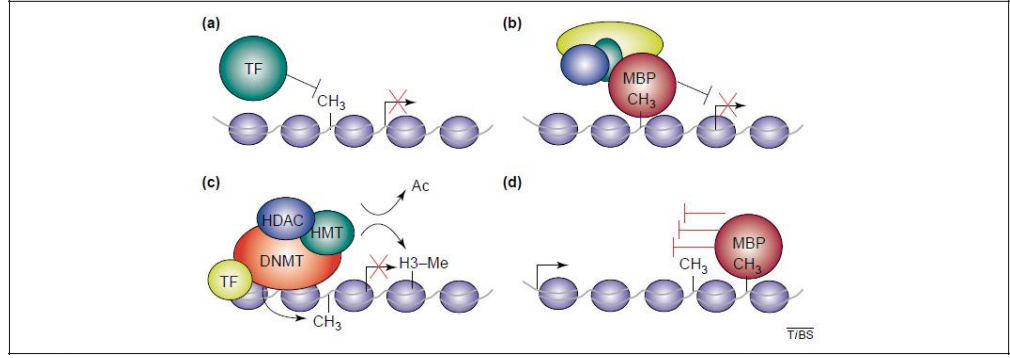
#### 1.2.4.4. DNA Metilasyonundaki Diğer Mekanizmalar

DNA metilasyonu ile gen ekspresyonunun inhibisyonu iki temel mekanizma ile gerçekleşir. Bunlardan birincisi DNA bağlanma faktörlerinin inhibisyonudur (Watt ve Molloy, 1988). İkincisi ise Metile-CpG Bağlanma Proteinleri (MBP=methyl-CpG Binding Proteins) ile gerçekleşir (Nan ve diğ., 1998).

Birinci mekanizmada, ortak DNA tanıma dizilerine sahip olan DNA bağlanma proteinlerinin, promotör bölgede bulunan ve metilasyona uğrayan sitozin bazıları sebebiyle DNA'ya bağlanması engellenir. Aktivatörlerin hedef bölgelere bağlanması alıkonularak doğrudan transkripsiyonel aktivasyon engellenmiş olur (Watt ve Molloy, 1988).

İkinci mekanizmada ise; metile-CpG'ler MBP'ler ile tanınır. Bu tanıma ile MBP'ler histon modifikasyonunu sağlayacak olan enzimleri ortama çağırır. Histon modifikasyonu ile kromatin yapısı değişikliğe uğrar ve nükleozomların pozisyonları değişir. Gen susturulmasındaki aktif komponent kromatin modifikasyonu olduğundan, DNMT-aracılı susturma işlemi kromatin modifikasyonunu gerçekleştirme içindir (Nan ve diğ., 1998). Her iki mekanizmanın özeti Şekil 1.10.'da gösterilmiştir.

Bu zamana kadar metile-CpG bölgelerine bağlanan üç protein sınıfı tanımlanmıştır. Bunlar SRA domain proteinleri, Kaiso ailesi proteinleri ve MBD ailesi proteinleridir. Her bir protein ailesindeki enzimler farklı bağlanma motifi içerirler (Hendrich ve Bird, 1998).



Şekil 1.10. DNA metilasyonu ile baskılanmada yer alan diğer mekanizmalar (Klose ve Bird, 2006).

#### 1.2.4.5. DNA Metilasyonu İle İlgili Patolojiler

DNA metilasyonunun embriyonik gelişim ve farklılaşma için elzem olduğu göz önüne alındığında, kanser, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, psikiyatrik hastalıklar gibi pek çok patolojik durum ile ilişkilidir. DNA metilasyonunun tespiti için genom çapında geliştirilen tekniklerle birlikte, epigenetik mekanizmalardaki bozulmalar ile çevresel etkenlerden etkilenen pek çok patolojik hastalıklar arasında ilgi olduğu görülmüştür.

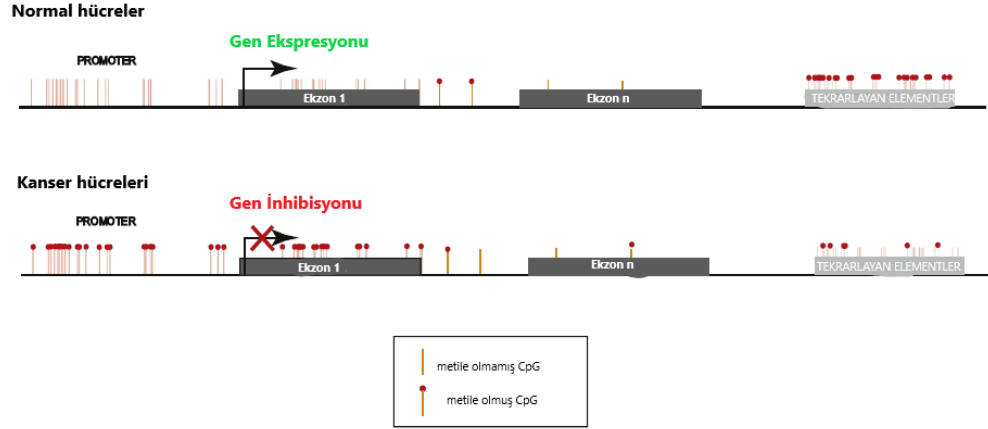
Anormal DNA metilasyon paternleri birçok kanser türünde tanımlanmıştır. Kanser hücrelerinin global hipometilasyon göstermesinin yanısıra, aynı zamanda bazı gen promotörlerinde hipermetilasyon paternlerinin olduğu da gösterilmiştir (Herman ve Baylin, 2003). Şekil 1.11'de DNA metilasyonu ile kanser oluşum mekanizması gösterilmektedir.

LINE (Long interspersed nuclear elements) ve SINE (Short Interspersed Nuclear Elements) gibi tekrarlanan dizlerdeki hipometilasyon kromozom düzensizliği ile bağlantılıdır. Aynı şekilde CDH1, EXT1, P15, P16 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki hipermetilasyon da kanser ile ilişkilidir (Chim ve diğ., 2003).

DNA metilasyonunun geri-dönüştürülebilir olması, onkolojik çalışmalarda stratejik bir öneme sahiptir. Dolayısıyla, DNMT'lere spesifik inhibitörlerin kullanılması, tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktifleşmesini sağlayarak kanser hücrelerinin yeniden



programlanmasına ve proliferasyonun durdurularak hücre döngülerinin bastırılmasına veya ölümlerine neden olabilir (Daskalakis ve diğ., 2002; Issa ve diğ., 2004; Gore ve diğ., 2006).



Şekil 1.11. DNA metilasyonu ile kanser oluşumu (Gros ve diğ., 2012).

#### 1.2.4.6. Mide Kanserinde DNA Metilasyonu

Mide kanserinde, DNMT ekspresyonu ve klinik önemi ile ilgili çok az şey bilinmektedir. Çin popülasyonunda, DNMT3A'nın işlevsel bir polimorfizminin, kendisinin aktivitesini arttırmasında ve dolayısıyla mide kanseri hassasiyetinde etkili olduğu gösterilmiştir (Fan ve diğ., 2010). Yine Çin popülasyonunda DNMT3B'nin bir polimorfizminin, mide kanseri riskinde azalma ile ilişkili olduğu tanımlanmıştır (Hu ve diğ., 2010).

DNMT3A tümör evrelerinde ve lenf nod metastazlarında etkili olmakla birlikte, tümörögenез sürecinde anormal promotör metilasyonlarında özellikle etkilidir. DNMT3B düzeyleri ise lenf nod metastazlarında yüksek seviyelerdedir. DNMT1 düzeyleri ise histopatolojik açıdan düşük seviyede seyrederek (Kanai ve diğ., 2001). Yang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin mide neoplastik dokularında yüksek ekspresyon gösterdiği bulunmuştur (Yang ve diğ., 2011).

*H. pylori* ile kokültür edilen mide kanseri hücre hatlarında DNMT1 ve DNMT3A ekspresyonlarının yükseldiği ve tümör baskılayıcı bir gen olan WWOX'un promotör bölgesinde hipermetilasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Yan ve diğ., 2011). Ancak, Oue ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, DNMT ailesi ile hMLH1, p16 (INK4a) ve CDH1 genlerinin DNA metilasyon statüleri arasında

herhangi bir korelasyon bulunamamıştır (Oue ve diğ., 2001). Bu sebepten, DNMT ailesi farklı evreler ve farklı mekanizmalar ile karsinogeneze katılmaktadır.

Gittikçe artan çalışmalarda, mide kanserinde DNA metilasyonunun işaretleyici olarak belirlendiği gösterilmiştir. hMLM1, CDH1, COX-2, RUNX3, SOX2 gibi hücre döngüsünde, apoptozda, hücre adhezyonu ve invazyonunda etkili olan tümör baskılayıcı genlerin metilasyon ile inaktive edildiği belirlenmiştir (Hu ve He, 2011). Aynı şekilde *H. Pylori* enfeksiyonu ile ilişkili genlerin (DNA tamir genleri, p14, p16, E-cadherin) anormal DNA metilasyon paterni gösterdiği bildirilmiştir (Shin ve diğ., 2012).

### 1.3. MikroRNA'lar ve Mide Kanseri

mikroRNA'lar (miRNA) DNA'dan transkribe edilen ancak protein translasyonuna katılmayan fonksiyonel RNA molekülleridir. Genomumuzda yüzlerce gen miRNA'ları kodlar (Shenouda ve Alahari, 2009). İlk olarak *C. elegans* genomunda lin-4 miRNA ailesinin keşfiyle (Lee ve diğ., 1993) başlayan süreçte birçok miRNA bitkilerde, hayvanlarda ve virüslerde moleküler klonlama ve biyoinformatik araçların kullanılmasıyla tespit edilmiştir (Lau ve diğ., 2001; Lagos-Quintana ve diğ., 2001). miRNA'lar hücre proliferasyonunda (Brennecke ve diğ., 2003), programlanmış hücre ölümünde (Xu ve diğ., 2003) ve hücre farklılaşmasında (Chen ve diğ., 2004) başta olmak üzere embriyogenezde (Stark ve diğ., 2003), organogenezde (Chen ve diğ., 2004) ve insan hastalıklarının (He ve diğ., 2005) birçok biyolojik sürecinde rol oynamaktadır.

miRNA'lar fonksiyonel olarak transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunun düzenlenmesinde negatif düzenleyici rol oynayan 20-24 nükleotid uzunluğundaki tek zincirli RNA molekülleridir (Ambros, 2004). miRNA'lar gen düzenleyici işlevlerini, mRNA'ların transkripsiyona uğramayan 3' çeviri yapılmayan bölgeler (3'UTR=3' un-translated regions) bölgesindeki bazlarla baz eşleşmesi yapması sonucu mRNA'nın translasyona uğramasını engelleyerek gerçekleştirir (Lewis ve diğ., 2003). Bu 2-9 baz uzunluğundaki eşleşme miRNA'ların 5' ucundaki bazlar ile hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesindeki bazların bağlanması ile meydana gelir. Bir mRNA'yı hedefleyen birden fazla miRNA olabileceği gibi, bir miRNA'nın da birden fazla mRNA hedefi olabilir (Lim ve diğ., 2005). miRNA'ların mRNA'ların translasyonunu, dolayısıyla protein sentezini engelleyerek gösterdikleri

bu düzenleyici etki; miRNA'ların kodlandıkları genlerdeki varyasyonlardan veya epigenetik değişikliklerden ötürü farklılık gösterebilir. Bu farklılıkların ise kanser gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olduğu, böylece miRNA'ların hastalıkların erken tanısında biyobelirteç olarak kullanılmasını sağladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir (Etheridge ve diğ., 2011; Montuenga ve diğ., 2008; Weber ve diğ., 2007).

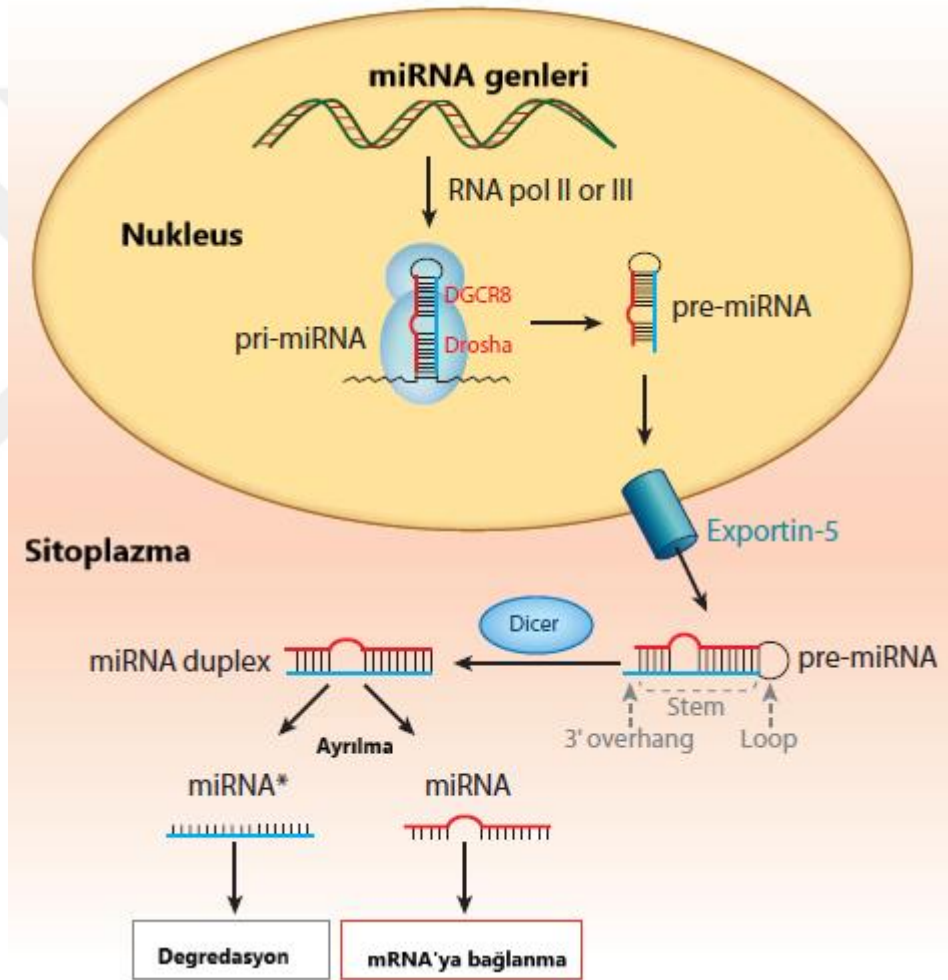
### **1.3.1. miRNA Biyosentezi**

Birçok miRNA geni RNA polimeraz II (Pol II) tarafından sap-ilmik şekilde ve yüzlerce baz uzunluğunda primer miRNA (pri-miRNA) olarak transkribe edilir (Cai ve diğ., 2004). İstisna olarak Alu-tekrar bölgeleri içeren bazı miRNA genleri RNA polimeraz III tarafından transkribe edilir (Borchert ve diğ., 2006). mRNA'lara benzer şekilde Pol II tarafından transkribe edilen pri-miRNA'lar 5' Cap ve 3' Poli A kuyruğuna sahiptir (Cai ve diğ., 2004). Çoğu memeli miRNA'larının intronlarda yer aldığı ve miRNA işlenmesinin alternatif kırılmadan önce gerçekleştiği gösterilmektedir (Kim ve Kim, 2007).

Çekirdek içindeki mikroşlemci kompleks denilen bir multiprotein kompleksi yardımıyla pri-miRNA, 70-90 nükleotid uzunluğunda hairpin yapıdaki fragmentlere bölünerek precursor miRNA'ya (pre-miRNA) dönüştürülür. Mikroşlemci kompleksin merkezinde Drosha denilen RNaz III kesim enzimi ve çift-zincirli RNA bağlanma domain proteini olan DiGeorge Sendromu Kritik bölge Geni 8 (DGCR8/Pasha =DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) bulunur (Denli ve diğ., 2004; Han ve diğ., 2004).

Çekirdek içinde oluşan pre-miRNA'lar Exportin 5 tarafından tanınır ve Ran-GTP-bağımlı mekanizma yardımıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır (Yi ve diğ., 2003; Bohnsack ve diğ., 2004). Ardından, pre-miRNA, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğundaki olgun miRNA:miRNA dupleksini oluşturmak üzere kesilir. Bu işlemi başka bir RNaz III enzimi olan Dicer, dsRBD proteinlerinden olan TRBP/Loquacious (Transaktive edici cevabı oluşturan RNA bağlanan protein= Transaktivating Response RNA Binding Protein) ile etkileşime girerek gerçekleştirir (Hutvagner ve diğ., 2001; Chendrimada ve diğ., 2005; Förstemann ve Zamore, 2005). miRNA:miRNA duplexi içerisinden fonksiyon gösterecek olan tek zincirli miRNA'nın seçilimi için, TRBP, bir Argonaute proteini olan Ago2 ve Dicer ile biraraya gelerek trimerik bir

ribonukleoprotein kompleksi olan RISC (RNA Tarafından Uyarılmış Susturma Kompleksi=RNA-induced silencing complex) kompleksi oluşturulur (Gregory ve diğ., 2005). Fonksiyon gösterecek miRNA'nın seçilimi, mRNA ile olacak baz eşleşmesinde daha yüksek stabilitesi olan miRNA zincirinin seçilmesiyle olur. Bu aktif miRNA'lar RISC kompleksi ile birlikte kendi mRNA hedefine yönelir. Daha düşük stabiliteye sahip olan miRNA zinciri ise degrade edilir (Schwarz ve diğ., 2003; Du ve Zamore, 2005). Stem loop pozisyonu ve termodinamik stabilitenin hangi ipliğin aktif olacağını belirleyen faktörler arasındadır (Krol ve Krzyzosiak, 2004). miRNA biyosentezini özetleyen mekanizma Şekil 1.12'de gösterilmiştir.



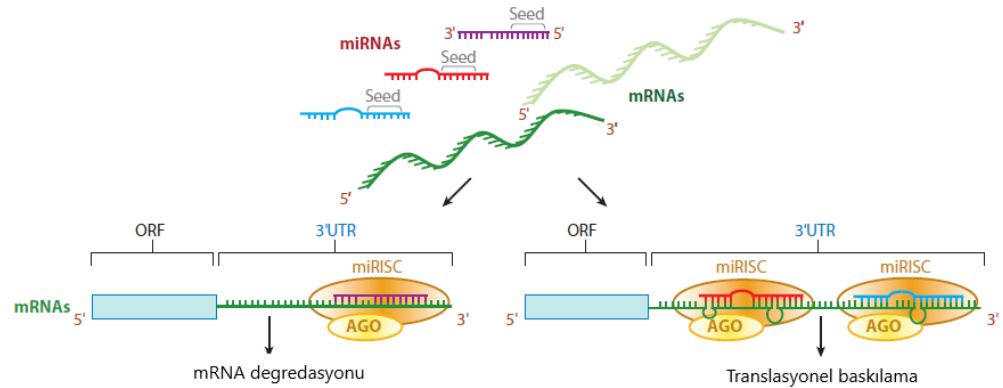
Şekil 1.12. miRNA biyosentezi (Sun ve diğ., 2010).

Her bir miRNA'nın transkribe olduğu bir gen mevcuttur. Bazı miRNA'lar intergenik özellikte olup uzun kodlanmayan RNA (lincRNA) şeklinde transkripsiyona uğrar ve kendilerine ait promotör bölgesine sahiptir. lincRNA'ların genleri içerisinde de ekzon bölgeleri mevcuttur ve pri-miRNA farklı ekzonlardan ancak olgun miRNA dizileri aynı olacak şekilde sentezlenirler (Slaby ve diğ., 2017). Bir diğer sınıf

miRNA'lar ise intronik miRNA'lardır. Bu miRNA'lar konakçı bir gen içerisinde bulunur. Konakçı genin intronunda yer alırlar ve alternatif kesilmeye uğrayarak olgun miRNA'ya dönüştürülürler. Dolayısıyla transkripsiyonları konakçı genin transkripsiyonuna bağlıdır ve aynı promotör bölgelerini paylaşırlar. Ancak yapılan bazı çalışmalarda intronik miRNA'ların konakçı geninin transkripsiyonundan bağımsız olarak da farklı transkripsiyon ünitelerinden üretilebildiğini göstermektedir (Ramalingam ve diğ., 2014).

### 1.3.2. miRNA Fonksiyonu

miRNA'lar hedef mRNA'larına yüksek oranda korunmuş ve 6-8 nükleotidten oluşan ve bağlanma bölgesi (seed site) denilen bir bölgeye bağlanarak etkileşim gösterir (Lewis ve diğ., 2005). Bu bağlanma kısmi veya tam eşleşme olarak kendini gösterir. Şekil 1.13'te gösterildiği gibi, miRNA'nın hedefini ne kadar ve nasıl baskılayacağını belirlemenin, hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3' UTR bölgesi ile miRNA seed dizisi arasındaki eşleşmenin seviyesine bağlıdır. Gen ifadesinin baskılanması miRNA, hedef mRNA'ya bağlandıktan sonra, translasyonun baskılanması veya mRNA hedeflerinin yıkılmasıyla gerçekleşir. Eğer miRNA:mRNA eşleşmesi çok yüksek seviyede ise RISC içerisindeki RNaz aktiviteli Ago, hedef mRNA'yı degrade eder. Translasyonun baskılanması direkt veya dolaylı şekillerde olabilir. Direkt etkiler, translasyonun başlamasının engellenmesi ve 5' Cap'ın inaktive edilmesiyle gerçekleşir. Dolaylı etkiler ise, miRISC kompleksinin Poli A kuyruğunun deadenilasyonunu sağlaması ve böylece mRNA'nın degrade olup hücre içi enzimlerce kesilmesiyle gerçekleşir (Yekta ve diğ., 2004; Hutvagner ve Zamore, 2002; Brennecke ve diğ., 2005).

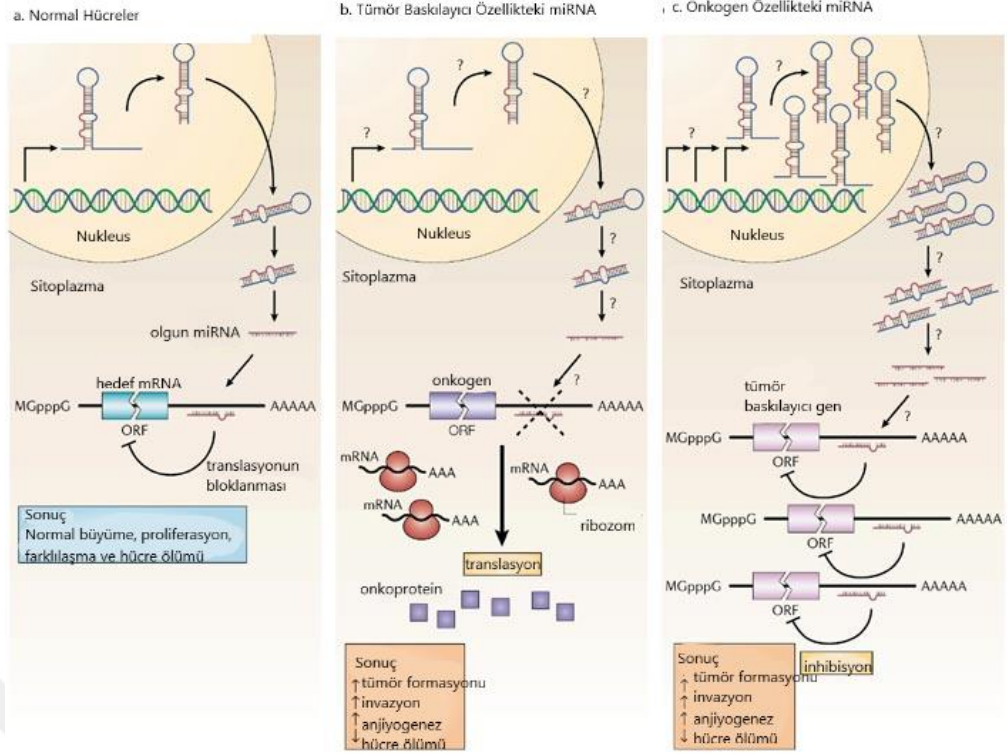


Şekil 1.13. miRNA fonksiyonu (Sun ve diğ., 2010).

### 1.3.3. Kanserde miRNA'ların Rolü ve Önemi

miRNA'ların gen düzenlemesine direkt olarak katılmasından ötürü, birçok miRNA kanserle ilişkilendirilmiştir. Lu ve arkadaşlarının 2005'te yaptıkları çalışmada ilk defa, kanserin gelişiminde ve farklı sınıflarında rol oynayan sistematik miRNA profillemesi gerçekleştirilmiştir (Lu ve diğ., 2005). O zamandan günümüze genome-wide profillemeye çalışmaları ile spesifik kanser tiplerinde ifadeleri azalmış veya artmış miRNA'ların biyomarkör olarak belirlenmesi çalışmaları hız kazanmıştır.

miRNA'lar, mRNA'nın hedef yolağındaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özelliği kazanırlar. Şekil 1.14.'te ilgili özelliklerinin mekanizması gösterilmiştir. Normal dokularda miRNA'ların bazılarının protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak isimlendirilir ve fonksiyonları onkogenlerin ekspresyonunu kontrol etmektedir. Dolayısıyla, tümör baskılayıcı miRNA ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun aksi halinde, onkogenik miRNA denilen miRNA'ların ise kanser gelişimini arttırdığı gösterilmiştir. Bu miRNA'lar bir tümör baskılayıcı genin ifadesinin baskılanmasını sağlayarak yine tümör oluşumuna ve metastaza katılabilir (Cowland ve diğ., 2007).



**Şekil 1.14.** Onkogenik ve tümör baskılayıcı özellikteki miRNA'ların etki mekanizması (Costa ve Pedrosa de Lima, 2013).

### 1.3.4. Mide Kanserinde miRNA'ların Rolü

Mide kanserinde yüksek veya düşük ekspresyon gösteren miRNA'lar tümöröenez, proliferasyon, invazyon ve metastazda etkili olduğundan, biyomarkır olarak tanıda ve prognozda kullanılmaktadır. Giderek artan çalışmalarda, mide kanseri gelişiminde ve tümör ilerlemesinde birçok miRNA'nın düzensiz eksprese olduğu gösterilmiştir. Örneğin, miR-17-5p/20a'nın mide kanserinde yüksek ekspresyon göstermektedir. Normal şartlarda tümör baskılayıcı proteinlerden olan TP53INP1 ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörü p21'in post-transkripsiyonel düzenlenmesini sağlamakta ve böylelikle hücre döngüsünün ilerleyişini ve hücre apoptozunu inhibe etmektedir (Wang ve diğ., 2013). Bir başka miRNA olan miR-204 ise mide kanserinde düşük ekspresyon göstermekte ve normal şartlarda Bcl-2 mRNA'sını hedef alarak koloni formasyonu ve migrasyonu engellemektedir (Sacconi ve diğ., 2012). Binlerce miRNA'nın mide kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiş olsa da, aynı kanser türüne sahip farklı hastalar arasında değişkenlik göstermesi, ilgili kanser tipinin saptanması açısından güvenilir bir yöntem olmayabilir. Bu nedenle birkaç miRNA'nın kombinasyonu tanıda etkili olabilir (Liu ve Xiao, 2014).

### 1.3.5. miRNA Gen Metilasyonları ve Mide Kanseri

Mide kanseri patogeneğinde, protein kodlayıcı genlerin yanısıra, miRNA'ların anormal ekspresyonunun da patogeneğinde rolü olduğu kesindir. Bu anormal ekspresyonun DNA metilasyonu yoluyla susturulma ve DNA demetilasyonu yoluyla açılma sebebiyle olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Ando ve diğ., 2009). Örneğin, miR124a, miR137, miR127 gibi miRNA'ların anormal DNA metilasyonu gösterdiği rapor edilmiştir (Lujambio ve diğ., 2007; Kozaki ve diğ., 2008; Saito ve diğ., 2006).

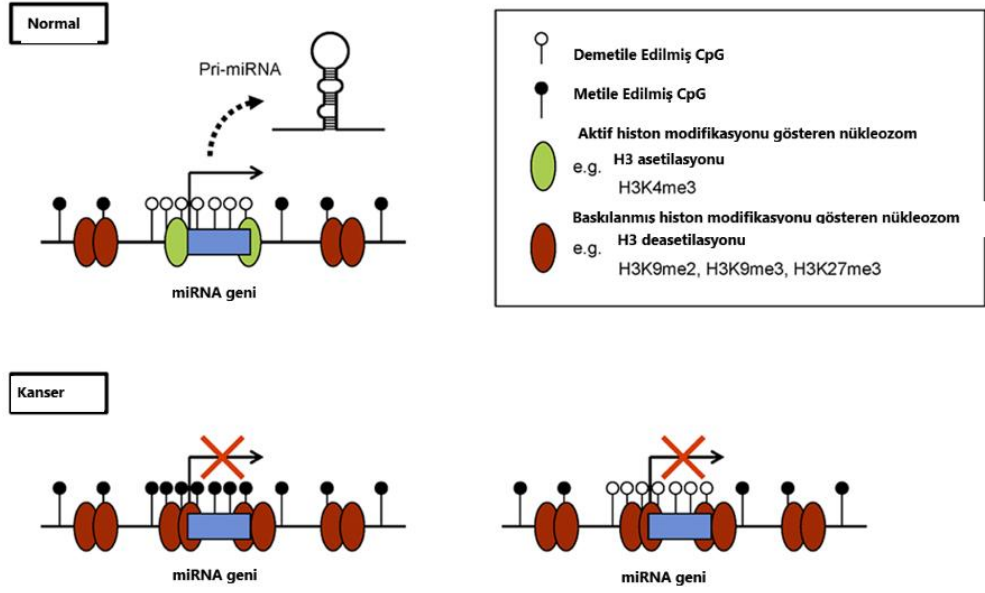
Sağlıklı bireyler ile mide kanseri hastalarının mukozaları karşılaştırıldığında *H. pylori* enfeksiyonunun miR124a'nın metilasyon durumunu etkilediği gösterilmiştir. Üstelik, mide kanseri hastalarının kanserli olmayan mide mukozalarındaki miRNA genlerinin metilasyon seviyeleri; *H. Pylori* negatif sağlıklı bireylerin mide mukozaları ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum, mide kanserinde miRNA susturulmasında DNA metilasyonunun işlevi olduğunu ortaya koymaktadır (Ando ve diğ., 2009).

Yin ve arkadaşlarının mide kanseri hücre hatlarında ve mide kanseri hastalarında yaptıkları çalışmada, c-Myc'i hedef alan miR33b'nin düşük ekspresyon gösterdiği ve bu durumun anormal DNA metilasyonu ile karakterize olduğu belirlenmiştir (Yin ve diğ., 2016). Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, DNMT1 ve DNMT3B'yi hedef alan miR148a'nın düşük ekspresyon gösterdiği ve hipermetilasyona uğradığı bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2010).

Bu tez kapsamında bakılmış olan miR34a, miR335 ve miR9-3'ün tümör baskılayıcı özelliklerinden ötürü, mide kanserinde düşük ekspresyon gösterdikleri ve anormal DNA metilasyonuna uğradıkları gösterilmiştir (Tang ve diğ., 2015; Zhang ve diğ., 2015; Tsai ve diğ., 2011).

Şekil 1.15.'te miRNA genlerindeki epigenetik değişikliklerin ekspresyonlarına etkisi ve kanserli ile normal hücrelerdeki farklılıkları gösterilmiştir.





**Şekil 1.15.** miRNA genlerinin epigenetik modifikasyonu ve kanser hücrelerindeki statüleri (Suzuki ve diğ., 2013).

### 1.3.5.1.miR34a

miR34a geni 1. kromozomun p36.22 kolunda yer almaktadır ve ters zincirden (reverse strand) transkribe edilir (Genecards, 2017). Uzun intergenik kodlanmayan RNA (LincRNA=Long intergenic noncoding RNA) olarak üç farklı ekzon tarafından kodlandığından intergenik miRNA sınıfındandır. Promotör bölgesindeki CpG adacıklarının içerisinde p53 bağlanma bölgesi içerir ve p53 tarafından transkripsiyonu kontrol edilir. DNA hasarı ve onkogenik stres p53'ü aktive eder ve p53 miR34a'nın promotörüne bağlanarak ekspresyonlarını transkripsiyonel seviyede indükler. miR34a Cdk4, Cdk6, Siklin E gibi genleri hedef alarak p53 aktivasyonu üzerinden apoptoz ve hücre döngüsü arrestine neden olmaktadır (Sun ve diğ., 2008). miR34a'nın knock-down edildiği çalışmalarda, p53 ile indüklenmiş hücre ölümünün azaldığı saptanmıştır (Tivnan ve diğ., 2011).

Pri-miR34a kodlayan gen, p53'ün direkt transkripsiyonel hedefidir ve pozitif regülasyonu sağlar. miR34a'nın ekspresyonu genotoksik strese yanıt olarak p53 tarafından arttırılmaktadır. Yüksek ekspresyonu ise antiproliferatif etki gösterir ve hafif de olsa apoptozu indükleyerek p53'e bağımlı hücre ölümü için kritik katkıda bulunur. Endojen miR34a'nın inaktivasyonu p53'e bağılı apoptozu etkili bir şekilde inhibe ederken, ektojik miR34a apoptozda sadece hafif bir artışa neden olur ve bu durum apoptoz için miR34a'nın gerekli olduğunu ancak yeterli olmadığını göstermektedir. Muhtemel olarak miR34a apoptozu kolaylaştırmak için diğer

miRNA'lar veya diğer p53 ile düzenlenen genler gibi ilave modulatorler ile birlikte çalışmaktadır (Raver-Shapira ve diğ., 2007).

miR34a birçok kanser türünde anti-onkogenik aktivite göstermektedir. Ektopik ekspresyonu G1 fazında hücre döngüsü arrestine neden olmaktadır (Tarasov ve diğ., 2007).

Mide kanserinde tümör baskılayıcı özelliğiyle birlikte önemli ölçüde düşük ekspresyon gösterdiği ve metastazda etkili olduğu bildirilmiştir (Peng ve diğ., 2014). Mide kanser patogenezinde etkili olan PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinde bulunan PDGFR ve MET ile survivin genlerini hedef alarak mide kanser tümörogenezini inhibe eder (Cao ve diğ., 2014; Peng ve diğ., 2014).

Onkogen kaynaklı yaşlanma, kanserde önemli bir engel teşkil eder ancak altında yatan mekanizmalar hala net değildir ve muhtemelen hücre türleri arasında farklılık gösterir. miR34a, insan fibroblastlarında yaşlanmaya yol açan ELK1'i transkripsiyonel olarak aktive eder ve alt yolağında yer alan B-RAF onkogeninin aktivasyonunu sağlar. Bu yolak, miR34a'nın p53 tarafından transkripsiyonel aktivasyonundan bağımsız olarak ilerler. Bu yolak üzerindeki MYC ise miR34a'nın bir diğer hedefidir. Onkogen kaynaklı yaşlanma sırasında proliferatif rolü ile uyumlu olarak MYC bastırılır ve bu inhibisyonda kısmen miR34a etkilidir. Böylece miR34a etkisi sayesinde, B-RAF onkogeninin aktivasyonu ve yaşlanma mekanizması ile MYC ve MYC'nin transkripsiyonel hedefleri olan mitotik genlerin bastırılması arasında ilişki vardır (Christoffersen ve diğ., 2010).

Sirt7'nin mide kanseri dokularında ekspresyon seviyesi artırılır ve Sirt7'nin yüksek ekspresyonu zayıf sağkalım ile mide kanser hücrelerinin büyümesini indükler. Ayrıca tümör boyutu, metastaz, hastalığın seyri ile ilişkilidir. Mide kanseri hücrelerinde Sirt7'nin knock-down edilmesi apoptozu indükler ve miR34a'nın ekspresyonunu artırır. Bu sebepten, Sirt7 seviyesi negatif yönde miR34a seviyesi ile korelasyon gösterir. Bu mekanizmada, Sirt7'nin H3K18 histonunun deasetilasyonunu sağlayarak miR34a'nın ifadesini azaltır ve miR34a'nın sessizleştirilmesi Sirt7'nin etkilerini bloke eder (Zhang ve diğ., 2015).

### 1.3.5.2. miR335

miR335 geni 7. kromozomun q32.2 kolunda yer almaktadır (Genecard, 2017). Protein kodlayan MEST geninin intronunda yer alır ve intronik miRNA özelliği gösterir. Bu sebepten, konakçı geni ile aynı promotörü paylaşırlar. miR335-5p birçok kanser türünde tümör baskılayıcı özellik göstermektedir. Hücre proliferasyonunu, malign hücrelerin büyümesi ve invazyonunu kontrol etmektedir. Hedef genleri arasında Bcl-2 ve SP1 mRNA'ları bulunmakla birlikte; MAPK, TGF- $\beta$ , Wnt, ER $\beta$ , mTOR gibi onkogenik sinyal yollarını düzenlemektedir (Xu ve diğ., 2012; Shu ve diğ., 2011).

Mide kanserinde tümör baskılayıcı özelliğiyle birlikte, etki gösterdiği sinyal yolağına bağlı olarak önemli ölçüde hem düşük hem de yüksek ekspresyon gösterdiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Li ve diğ., 2014; Yang ve diğ., 2016; Yan ve diğ., 2012).

Örneğin Rb1 tümör baskılayıcı geni G1/S fazına geçişi düzenler ve E2F ile ilişki kurar. Rb1'in fonksiyonunun kaybı tümörögenezi artırır. Birçok çalışmada Rb'in miR335'in direkt hedefi olduğu gösterilmektedir. Ancak bu, miR335'e onkogenik bir özellik kazandırmaz. miR335-aracılı Rb1 susturulmasının sonucu olarak p53 sinyal yolağının aktivasyonu gerçekleşir ve bu sayede hücre proliferasyonu durdurulur. Bu sebepten miR335, p53 ve Rb tümör baskılayıcı yolda denge görevi görür. Yapılan çalışmalarda DNA hasarı sonucu p53'ün aktivasyonu ile pri-miR335'in transkripti olan MEST-002'nin transkripsiyonel aktivasyon gösterdiği ve olgun miR335'in seviyesinin de arttığı bildirilmiştir. Rb1'in miR335-aracılı redüksiyonunun p53 yolağının aktivasyonuna yönlendirmesi, DNA hasarı sırasında miR335 yüksek ekspresyonunun bir fonksiyonunun da Rb yolağının aktivasyonunu azaltmak ve p53-aracılı hücre döngüsünün baskılanmasını zorlamak olduğuna işaret eder. Bu sebepten miR335, p53-aracılı hücre döngüsü bastırılmasının teşvik ettirilmesini, geri-dönüşümsüz olarak hücre büyümesinin durdurulması ile antagonize eder (Scarola ve diğ., 2010).

Mide kanserinde miR335 genindeki hipermetilasyon, miR335'in düşük ekspresyon profili çizmesinde ve bu durum metastaz, proliferasyon, tümör boyutu ve invazyonda etkilidir. Fonksiyonel çalışmalar miR335 restorasyonunun hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu azalttığını; hücre döngüsünü

baskıladığını ve mide kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermektedir (Zhang ve diğ., 2017).

Mide kanserinde miR335'in metastatik baskılayıcı işlevi, Bcl-2 ve SP1'i hedef alması ile gerçekleşir. p53, MAPK, TGF-b, Wnt, ERbB, mTOR, fokal adezyon gibi onkogenik sinyal yollarının çoğunda yer alması sebebiyle, bu çoklu sinyal yollarındaki değişiklikler, özellikle p53 yolağı, mide kanserinin tekrarlama riski de dahil olmak üzere klinik sonucu etkilemektedir (Yan ve diğ., 2012).

### 1.3.5.3. miR9-3

miR9-3 geni 15. kromozomun q26.1 kolunda yer almaktadır ve düz zincirden (forward strand) transkribe edilir (Genecards, 2017). LincRNA olarak kodlandığından intergenik miRNA sınıfındadır. MYC ve MYCN onkoproteinleri miR9-3 lokusunda fonksiyon göstererek miR9-3 ekspresyonunu artırır. MiR-9-3, karsinoma hücresi hareketliliğini ve invazivliğini artırmak ve  $\beta$ -katenin sinyalizasyonunu etkinleştirmek için, E-cadherin ekspresyonunu baskılayabilir; böylece, VEGFA'nın artmış ekspresyonuna katkıda bulunur ve bu da tümör ile ilişkili anjiyogenezin uyarılmasına neden olur. Nihayetinde hem artmış hücre hareketliliği hem de invazivlik, aynı zamanda gelişmiş anjiyogenez metastaz oluşumuna katkıda bulunur. miR9-3'ün onkoproteinler tarafından regülasyonunun arttırılması çelişkili gibi görünse de, miR9-3 ekspresyon artışının tümör ilerlemesinin erken aşamalarında gerçekleştiği, tümörün aktif invaziv ve metastatik hale geldiği evrelerde ise gerçekleşmediği gösterilmiştir (Khew-Goodall, Goodall, 2010).

miR9-3 birçok kanser türünde tümör baskılayıcı özellik göstermektedir. Mide kanserde düşük ekspresyon profili sergilemekle birlikte (Luo ve diğ., 2009), CDX2 ve NF-kappa B genlerini hedef alır (Rotkrua ve diğ., 2011; Wan ve diğ., 2010). Bunun yanısıra artan ekspresyonu cyclin D1 genini direkt hedef alarak proliferasyonu, invazyonu ve metastazı baskılar (Zheng ve diğ., 2013).

RAB34 ve GRB2'nin miR9-3 tarafından ekspresyonları azaltılır. RAB34 RAS onkogen ailesinin bir üyesidir ve GTPaz özelliği göstererek hücre tomurcuklanmasında, hücrelerarası bağlantıda ve veziküllerin endositoz ve ekzositosundan sorumludur. Mide kanserinde miR9-3'ün düşük ekspresyonu bu genlerin seviyeleri ile ilişkilidir. miR9-3'ün yüksek ekspresyonu *in vivo* ve *in vitro*

mide adenokarsinoma hücre hatlarında büyümeyi inhibe eder ve bunu NF-KB'nin post-transkripsiyonel seviyesini baskılayarak yapar (Tsai ve diğ., 2011).



## 2. AMAÇ

Mide kanseri dünyada yüksek insidans gösteren agresif bir hastalıktır. Proliferatif sinyal yollarının oldukça aktif durumda bulunması ile kontrolsüz hücre büyümesi ile tümör baskılayıcı sinyal yollarının inaktif durumda bulunması ve apoptozdan kaçma gibi hücre içi mekanizmalarla karakterizedir (Carcas, 2014).

Kanser oluşumu ve gelişiminde genetik faktörlerin yanısıra epigenetik faktörler de etkilidir. Epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA ile ilişkili susturmayı kapsar. Kanser patogenezinde etkili olan bu mekanizmalar, spesifik kanser türlerinde çeşitli genler açısından belirteç olarak kullanılmaktadır (Egger ve diğ., 2004).

Normal hücrelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlayan bu epigenetik mekanizmalar hücresel dengeyi devam ettirecek şekilde güvenli biçimde korunur. Fakat bu koruma kanser hücrelerinde bozulur ve bu hücrelerde genel bir hipometilasyonun yanında, ilgili kanser tipine özgü olarak, genlerin promotör bölgeleri içindeki CpG adacıklarında yoğun hipermetilasyon görülür. Meydana gelen bu değişiklikler mutasyonlara, kromatin kararsızlığına, onkogenlerin transkripsiyonel olarak aktifleşmesine ve tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel olarak susturulmasına sebep olabilir (Gros ve diğ., 2012).

Epigenetik modifikasyonların içerisinde RNA müdahalesi ile susturma da yer alır. Bu epigenetik değişiklikler içerisinde rol oynayan RNA'lar protein kodlama yapmayan RNA özelliğindedirler. Bir kısmı çekirdekte mRNA'nın transkripsiyonel olarak sentezlenmesini engellerken, bir kısmı sitoplazmada mRNA'ların degradasyonunu post-transkripsiyonel olarak sağlarken, diğer bir kısmı da translasyonu inhibe ederek mRNA'nın proteine çevrimini engelleyerek, gen ifadesini negatif yönde düzenlerler (Wang ve Chang 2011). Kodlamayan RNA'lar üzerinde en çok çalışılan miRNA'lardır. (Cai ve diğ., 2004).

miRNA'ların gen düzenlemesine direkt olarak katılmasından ötürü, birçok miRNA kanserle ilişkilendirilmiştir. MiRNA'lar, mRNA'nın hedef yolağındaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özelliği kazanırlar. Normal dokularda miRNA'ların bazılarının protoonkogenleri post-transkripsiyonel düzeyde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak isimlendirilir ve fonksiyonları onkogenlerin ekspresyonunu kontrol etmektir. Dolayısıyla, tümör baskılayıcı miRNA ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur.

Mide kanseri patogeneğinde, protein kodlayıcı genlerin yanısıra, miRNA'ların kontrolsüz ekspresyonunun da patogeneşte rolü olduğu bilinmektedir (Yazicioglu, 2016). miRNA genlerinin metilasyonu ve demetilasyonu miRNA genlerinin düzensiz ifadesine sebep olur. Bu sebeple miRNA genlerinin kontrolsüz ifadesi mide karsinogeneğinde önemli bir rol oynadığı literatürde gösterilmiştir (Ando ve diğ., 2009).

Birçok kanser türünde tedavi amaçlı kullanılan vincristine fonksiyonel olarak, mitotik iğler içindeki mikrotübülleri engelleyerek tümör büyümesini durdurur (Johnson ve diğ., 1963). Vincristine'nin terapötik olarak kullanılması bu ajanın tümör baskılayıcı genleri aktive ettiğini, protoonkogenleri ise inhibe ettiğini düşündürebilir. Ancak bu konuyla ilgili herhangi bir yayın yoktur. Vincristine'nin akciğer adenokarsinomlarında metilasyonu arttırdığı gösterilmiştir (Nyce, 1989) fakat, mide kanserinde DNA metilasyonuna etkisiyle ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca vincristine'nin DNA metilasyonu üzerindeki etkisinin gene özgü olup olmadığı bilinmemektedir. Yapılan bu çalışma ile ilk defa vincristine'nin mide kanseri hücre hatları olan AGS ve MKN45 hücrelerinde miR335, miR34a ve miR9-3'ün gen metilasyonları ve gen ekspresyonları üzerine etkisi incelenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede, literatürde mide kanserinde vincristine'nin seçilen miRNA'ların epigenetik değişiklikleri üzerine etkisi ilk defa gösterilerek terapötik kullanımının hücre içi moleküler mekanizmalara olan etkisinin aydınlatılarak ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

AGS ve MKN45 mide kanseri hücre hatları, American Type Culture Collection (ATCC)'den elde edilmiştir ve bu çalışmada kullanılmıştır.

#### 3.2. Hücre Kültürü İçin Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar

Hücre kültürü için kullanılan kültür besiyerleri, kimyasalları ve solüsyonları Tablo 3.1'de listelenmiştir.

**Tablo 3.1.** Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan solüsyon ve besiyerleri

Solüsyonlar	Marka
Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) Medyum (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Fetal Bovin Serum (FBS) (%10) (South America) (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Penisilin/Streptomisin (%1) (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
DMSO	Sigma-Aldrich
(Fosfat Buffer Saline) PBS (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco
Tripsin-EDTA (%0,05)	Thermo Fisher Scientific, Gibco



**Tablo 3.2.** Hücre kültürü çalışmalarında hazırlanan çözeltiler ve besiyerleri

Çözeltiler	İçerik ve Miktarları
Zenginleştirilmiş RPMI 1640 büyütme besiyeri	%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri
Zenginleştirilmiş DMEM/F-12 büyütme besiyeri	% 10 FBS, % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F-12 besiyeri
RPMI 1640 Dondurma Besiyeri	%25 FBS, % 10 DMSO, %65 RPMI 1640 besiyeri
DMEM/F-12 Dondurma Besiyeri	%25 FBS, % 10 DMSO, %65 RPMI 1640 besiyeri
Tripsin-EDTA	%0.05 (1X)
PBS	1X

### 3.3. Kullanılan Ticari Kitler

Çalışmada kullanılan DNA izolasyonu, DNA bisülfid modifikasyonu, RNA izolasyonu, cDNA sentezi, Metilasyon-Spesifik PZR işlemleri ve Gerçek-Zamanlı PZR işlemleri için kullanılan ticari kitler Tablo 3.3'te listelenmiştir.

**Tablo 3.3.** Çalışmada kullanılan ticari kitler

Kit	Marka
NucleoSpin RNA İzolasyon Kit	Macherey-Nagel
PureLink Genomik DNA Mini İzolasyon Kit	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen
EpiJET Bisülfid Konversiyon Kit	Thermo Fisher Scientific
ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit	NEB
Amplitaq Gold 360 DNA Polimeraz	Thermo Fisher Scientific
SensiFAST SYBR No-ROX Kit	Bioline
Hücre Proliferasyon Kit (MTT)	Roche

### 3.4. Metilasyon Spesifik PZR ve Gerçek-Zamanlı PZR İşlemleri İçin Kullanılan Primerler

Metilasyon Spesifik PZR için kullanılan primer dizileri, miR9-3 geni için Loginov ve arkadaşlarının çalışmalarından; miR34a geni için Lodygin ve arkadaşlarının çalışmalarından; miR335 geni için Zhang ve arkadaşlarının çalışmalarından referans alınmıştır (Loginov ve diğ., 2016; Lodygin ve diğ., 2008; Zhang ve diğ., 2017). Gerçek-Zamanlı PZR için kullanılan primerler tasarlanırken NCBI Fasta Sekans'tan ve Ensembl Genom Veritabanı'ndan yararlanılmıştır. Metilasyon spesifik PZR işlemleri için kullanılan primerler Tablo 3.4'te, Gerçek-Zamanlı PZR işlemleri için kullanılan primerler Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.4.** Metilasyon Spesifik-PZR işlemlerinde kullanılan miRNA gen primerleri

Primer Adı	Metilasyon Spesifliği	Primer Dizisi (5'→ 3')
MIR-335-5p İleri Primer	Metilasyon Spesifik	GGTTTTAAAAGTCGGTGTATTTC
MIR-335-5p Geri Primer	Metilasyon Spesifik	AACTACAACCACTCCGACGTA
MIR-335-5p İleri Primer	Un-Metilasyon Spesifik	GGTTTTAAAAGTTGGTGTATTTC
MIR-335-5p Geri Primer	Un-Metilasyon Spesifik	AACAACCTACAACCACTCCAACATA
MIR-34a İleri Primer	Metilasyon Spesifik	GGTTTTGGGTAGGCGCGTTTC
MIR-34a Geri Primer	Metilasyon Spesifik	TCCTCATCCCCTTCACCGCCG
MIR-34a İleri Primer	Un-Metilasyon Spesifik	GGTTTTGGGTAGGTGTGTTTT
MIR-34a Geri Primer	Un-Metilasyon Spesifik	AATCCTCATCCCCTTCACCACCA
MIR-9-3 İleri Primer	Metilasyon Spesifik	GAGGTAGGTTCGGTAGCGTCGGTG
MIR-9-3 Geri Primer	Metilasyon Spesifik	ACCTAAACGAACGCCGTACCCG
MIR-9-3 İleri Primer	Un-Metilasyon Spesifik	AGAAATGTGTTGGGAGGGTGAGG
MIR-9-3 Geri Primer	Un-Metilasyon Spesifik	ACCACTACCACACCATAAACTCCACAT

**Tablo 3.5.** Gerçek Zamanlı-PZR işlemlerinde kullanılan miRNA primerleri

Primer Adı	Primer Dizisi (5'→ 3')
MIR-335-5p İleri Primer	GGAAATGATTTGTTTTGAGCGGG
MIR-335-5p Geri Primer	TGAATATAGCAAATGAGAGGAGGTC
MIR-34a İleri Primer	CGTCACCTCTTAGGCTTGA
MIR-34a Geri Primer	CATTGGTGTCGTTGTGCTCT
MIR-9-3 İleri Primer	GAGGCCCGTTTCTCTTTG
MIR-9-3 Geri Primer	AGCTTTATGACGGCTCTGTG

### 3.5. Elektroforez Kimyasalları ve Tamponları

Metilasyon Spesifik-PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi için kullanılan kimyasallar ve markaları Tablo 3.6'da; hazırlanan çözeltiler ve miktarları ise Tablo 3.7'de listelenmiştir.

**Tablo 3.6.** Elektroforez çalışmalarında kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Marka
Tris Baz (445mM)	AppliChem GmbH
Borik Asit (445mM)	Sigma-Aldrich
EDTA (10mM)	Sigma-Aldrich
Agaroz	Sigma-Aldrich
Etidyum Bromür (EtBr) 10 mg/ml	Thermo Fisher Scientific
DNA Büyüklük Markörü (50bp)	Thermo Fisher Scientific
6X DNA Yükleme Boyası	New England Biolabs

**Tablo 3.7.** Elektroforez çalışmalarında hazırlanan çözeltiler ve miktarları

Çözeltiler	İçerik ve Miktarları
5X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) (pH 8,3)	54g Tris Baz, 27g Borik Asit, 20mL EDTA, distile su (son hacim:1000ml)
%3 Agaroz Jel	0,5X TBE Tamponunda 1,5g Agaroz (son hacim: 50ml)
50 bp DNA Büyüklük Markırı	6X DNA yükleme boyası: 50bp DNA Büyüklük Markırı: Distile Su (1:1:4) (h/h)

### 3.6. Genel Kimyasallar

Yapılan araştırmada kullanılan genel kimyasallar Tablo 3.8’de listelenmiştir.

**Tablo 3.8.** Araştırmada kullanılan genel kimyasallar

Kimyasal	Marka
Etanol (absolüt)	Merck
$\beta$ -Merkaptoetanol	Merck
Vincristine	Sigma-Aldrich
5-Aza-2'-deoksisitidin	Sigma-Aldrich
Nukleaz İçermeyen Su	Thermo Fisher Scientific
DMSO	Sigma-Aldrich
PBS	Thermo Fisher Scientific
DEPC	Sigma-Aldrich

### 3.7. Cihazlar

Yapılan araştırmada kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 3.9’da listelenmiştir.

**Tablo 3.9:** Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	Marka
Laminar Flow Kabin	FASTER, SafeFAST Classic
Pipetler (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Corning, Axygen
Elektronik Pipet	Thermo Scientific, S1 pipet filler
Mikropipet Seti (0,2-2, 2-20, 20-200, 100-1000µl)	Thermo Scientific, Finnpiette
Santrifüjler	Hettich, Universal 320R
CO <sub>2</sub> İnkübatörü	Memmert
Multiskan Go Mikroplate Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific
BioRad Real Time Sistem	Bio-Rad, CFX Connect Realtime System
96-well Real-time PCR Plate	Corning, Axygen
Seals	Corning, Axygen
Vorteks	Stuart
Işık Mikroskobu	Zeiss, Axio Vert. A1
Isı Bloğu	Bio-Techne
Su Banyosu	Memmert
pH Metre	ISOLAB
Görüntüleme Sistemleri	ER Biyotek, GEN-Box ImagER Fx
Manyetik Karıştırıcılar	Heidolph, MR3001
Minispin	Four E’s Scientific
Güç Kaynakları	Amersham Pharmacia Biotech
Elektroforez Sistemleri	Cleaver Scientific LTD.
Thermo Cyclers	Bio-Rad T100 Thermal Cyclers
Otoklav	BES Dik Tip Otoklav
Tartılar	Precia XB220A
Mikrodalga	SAMSUNG ME711K
Su Arıtma Sistemi	Thermo Scientific SMART2PURE
Buzdolapları	Arçelik, BEKO, Haier Biomedical
Buz Makinesi	Scotsman AF80
Sıvı Nitrojen Tankı	Thermo Scientific
Eldiven	Beybi
Hücre Kültür Flaskaları ve Dishleri (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 150mm x 25mm)	Corning, Axygen
Erlenler	ISOLAB
Mezürler	ISOLAB
Falkonlar (15ml, 50ml)	Corning
Thoma Lamı ve Lameli	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
6-well ve 96-well Plate	Corning, Axygen
Serolojik Pipetler (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Corning, Axygen
Eppendorf Tüpleri (0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2ml)	ISOLAB
Karyotüp (2ml)	Corning, Axygen
Filtreler (0,22µm)	Millipore Corporation SCIOLOGEX
Aspirasyon	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Cam Pastör Pipeti	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG

## 4. YÖNTEM

### 4.1. Kimyasalların Hazırlanması

#### 4.1.1. Vincristine Stok Solüsyon Hazırlanışı

1 mg vincristine son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde 1.08 ml deiyonize otoklavlanmış H<sub>2</sub>O içerisinde çözdürüldü. 0,22 µl'lik filtreden geçirildikten sonra 5 µl ve 10 µl olacak şekilde 0,2 ml'lik eppendorf tüplere stoklandı. pH'ının ölçülmesi için 10 µl'lik solüsyon alınarak 10 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde homojenize edildi ve pH metrede pH=3.5-4.5 arasında olacak şekilde ölçüldü. Aliquotlanmış tüpler alimünyum folyoya sarılı halde -80°C'de muhafaza edildi. Stok solüsyonlar yalnızca bir kere ve karanlıkta uygulama yapılacak şekilde kullanıldı. Uygulama yapılacak konsantrasyon için, 1mM stok vincristine çözeltisi kültür besiyerinde dilüe edildi.

#### 4.1.2. Decitabine (5-Aza-2'-deoksisitidin) Stok Solüsyon Hazırlanışı

1 mg decitabine son konsantrasyonu 20mM olacak şekilde 219,1 µl DMSO içerisinde çözdürüldü. 0,22 µl'lik filtreden geçirildikten sonra 5 µl ve 10 µl olacak şekilde 0,2 ml'lik eppendorf tüplere stoklandı. Tüpler alimünyum folyoya sarılı halde -80°C'de muhafaza edildi. Stok solüsyonlar yalnızca bir kere ve karanlıkta uygulama yapılacak şekilde kullanıldı. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Uygulama yapılacak konsantrasyon için 20mM decitabine kültür besiyerinde dilüe edildi.

### 4.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada iki mide kanseri hücre hattı olan AGS ve MKN45 kullanıldı. AGS hücre hattı %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin ile zenginleştirilmiş DMEM/F-12 besiyerinde; MKN45 hücre hattı %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin ile zenginleştirilmiş RPMI 1640 besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş atmosfer ortamında 37°C'de inkübe edildi.

#### **4.2.1. Hücrelerin Çözdürülmesi**

5 ml RPMI 1640/DMEM/F-12 besiyeri 15 ml falkon tüpüne eklendi. Sıvı nitrojen tankından çıkarılan hücreler aseptik koşullara dikkat edilerek 37°C su banyosuna alındı ve çözdürüldü. 5 ml besiyeri içeren falkon içerisine hücreler eklendi ve 1000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek DMSO'nun uzaklaştırılması sağlandı. Supernatant atılarak pelet halindeki hücrelerin üzerine 15 ml taze besiyeri eklendi ve hücreler çözülerek T75 flask içerisine ekildi. Hücrelerin yoğunlukları ve yaşayabilirlikleri ışık mikroskopunda kontrol edilerek 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş atmosfer koşullarındaki inkübatöre kaldırıldı.

#### **4.2.2. Hücrelerin Pasajı**

Hücrelerin yoğunlukları inverted mikroskopunda gözlemlendi. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücrelerden kültür besiyeri uzaklaştırıldı. 5 ml 1X PBS ile iki kez yıkandı ve üzerlerine 1,5 ml %0.05 tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 5 dakika 37°C'de inkübe edildi. Yapıştıkları flask tabanından tripsin-EDTA yardımıyla kalkan hücrelerin üzerine 4-5 ml kültür besiyeri eklendi ve tripsinin etkisi inaktive edildi. Çözelti 15 ml falkon tüpüne alınarak 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılarak pelet halindeki hücrelerin üzerine 5 ml kültür besiyeri eklendi ve hücreler çözdürüldü. T75 flask için  $2 \times 10^6$ , 150 mm kültür tabağı için  $5 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hücreler ekildi ve üzerleri T75 flask için 15 ml, 150 mm kültür tabağı için 25 ml olacak şekilde kültür besiyeri ile tamamlandı.

#### **4.2.3. Hücrelerin Dondurulması**

Yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerden kültür besiyeri uzaklaştırıldı. 5 ml PBS ile iki kere yıkandı ve üzerlerine 1,5 ml tripsin eklenerek 5 dakika 37°C'de inkübe edildi. Flask tabanından kalkan hücrelerin üzerine 5-6 ml kültür besiyeri eklenerek tripsin inaktive edildi. Çözelti 15 ml falkon tüpüne alınarak 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pelet üzerine 1 ml dondurma besiyeri (%65 büyütme besiyeri, %25 FBS, %10 DMSO) eklenerek çözdürüldü. Karyotüpe aktarılan hücreler ( $\sim 5 \times 10^6$  hücre) bir gece boyunca -80°C'de muhafaza edilerek ertesi gün sıvı azota kaldırıldı.

#### **4.2.4. Hücrelerin Sayılması**

Yapıştıkları flask tabanından tripsin-EDTA yardımıyla kalkan ve santrifüj sonrası 5 ml zenginleştirilmiş kültür besiyeri ile pelet halindeki hücreler çözülerek

homojenize hale getirildi. Hücre çözeltisinden 10 µl alınarak Thoma lamına aktarıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak hücreler 4X objektifte ışık mikroskopunda sayıldı.

#### **4.2.5. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-MTT Testi**

Vincristine ve Decitabine'nin uygun dozlarının belirlenmesi için sitotoksitelerinin hücre yaşayabilirliğine olan etkisi incelendi. MTT testi için ticari firmanın kit protokolü izlendi. Kültür besiyerinde tam büyüme gösteren hücreler tripsin ile kaldırılıp kültür besiyerinde çözdürüldükten sonra sayıldı ve 96 kuyucuklu kültür tabağı içerisine, kuyucuk başına son hacim 200 µl ve  $3 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekildi. Uygulama öncesi hücrelerin kültür tabağına yapışması ve stabilize olmaları için 24 saat beklenildi. 24 saat sonrasında kültür besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 3 tekrarlı olacak şekilde kültür besiyerinde dilüe edilen 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM vincristine son hacmi 100 µl olacak şekilde 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandı. Yine 24 saat sonrasında kültür besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 3 tekrarlı olacak şekilde DMSO'da ve kültür besiyerinde dilüe edilen 2,5 µM, 5.0 µM, 7,5 µM, 10.0 µM, 20.0 µM decitabine son hacmi 100 µl olacak şekilde 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandı. 24, 48. ve 72. saatlerin sonunda kuyucuk başına 10 µl 1X 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum (MTT) reaktifi uygulandı. 96 kuyucuklu kültür tabağı 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'de 4 saat boyunca inkübe edildi. 4. saatin sonunda reaksiyonun durdurulması için kuyucukların üzerine çözünürleştirme solüsyonu eklenerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Sarı renkli formazan kristallerinin (MTT) tamamen çözünmesi için mor renge dönüşmesi kontrol edildikten sonra 550-600 nm arasında ELISA okuyucuda kuyucukların absorbans değerleri ölçüldü.

#### **4.2.6. AGS ve MKN45 Hücre Hatlarına Vincristine ve Decitabine Uygulaması**

Kültür besiyerinde tam büyüme gösteren hücreler tripsin ile kaldırılıp kültür besiyerinde çözdürüldükten sonra sayıldı ve 6 kuyucuklu kültür tabağı içerisine kuyucuk başına son hacim 2 ml ve  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekildi. Kültür edilmiş hücreler 5 deney grubuna ayrıldı. Gruplar sırasıyla; 1) Yalnızca vincristine uygulanmış grup, 2) Yalnızca decitabine uygulanmış grup, 3) Vincristine ve decitabine uygulanmış grup, 4) DMSO grubu (toplam hacim içerisinde son konsantrasyonu %0.01 olacak şekilde), 5) Hiçbir uygulama yapılmamış grup. uygulanan DMSO miktarı hücreye



minimum toksik etki oluşturması amaçlanacak şekilde gerçekteştirildi. Uygulama öncesi hücrelerin kültür tabağına yapışması ve stabilize olmaları için 24 saat beklenildi. 24 saat sonrasında kültür besiyeri uzaklaştırılarak; 1. deney grubuna her bir kuyucuğa 300 nM vincristine, 2. deney grubuna 2,5 µM decitabine, 3. deney grubuna 300 nM vincristine ve 2,5 µM decitabine, 4. deney grubuna 2 µl DMSO son hacim 2 ml olacak şekilde eklendi. Hücreler 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi.

#### **4.2.7. Hücrelerin Toplanması**

Hücreler belirlenen saat boyunca inkübe edildikten sonra toplandı. Her bir gruptaki kuyucuklardan kültür besiyeri uzaklaştırdıktan sonra, kuyucuklar 1X PBS ile (0,5-1 ml/kuyucuk) 2 kere yıkandı. Yıkama sonrası, 300 µl tripsin-EDTA eklendi ve 6 kuyucuklu kültür tabağı 37°C'de 4-5 dakika inkübe edildi. Hücreler kültür tabağından kalktıktan sonra üzerlerine 1 ml kültür besiyeri eklenerek tripsin inhibe edildi. Her bir kuyucuktan elde edilen ve 2 ml'lik eppendorf tüpüne alınan hücreler 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve hücre peleti sonraki aşamalarda kullanılmak üzere ilk önce sıvı azotta şoklandı ve -80°C'de muhafaza edildi.

#### **4.3. DNA İzolasyonu**

miRNA genlerinin metilasyon statülerinin ölçülmesi için DNA izolasyonu gerçekteştirildi.  $\leq 5 \times 10^6$  hücre olacak şekilde elde edilen pelet 200 µl PBS içinde çözüldü. Üzerine hücrelerin parçalanmasının verimliliğini arttırmak için 20 µl Proteinaz K eklendi. RNA kontaminasyonunu minimize etmek için 20 µl RNase A eklenerek tüp karıştırıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası çözelti üzerine 200 µl PureLink Genomik Liziz/Bağlama Tampon çözeltisi eklenerek homojen çözelti elde edilene kadar tüp iyice vortekslendi. 55°C'de 10 dakika ısı bloğunda inkübe edilerek protein kesimi hızlandırıldı. İnkübasyon sonrası 200 µl %96-100 etanol lizat üzerine eklendi ve homojen çözelti elde edinceye kadar iyice vortekslendi. Lizat PureLink Spin kolon içerisine birkaç kere pipetlenerek konuldu. 10,000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir tüpe konularak üzerine 500 µl Yıkama Tamponu 1 eklendi. 10,000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Kolon üzerine 500 µl Yıkama Tamponu 2 eklendi. Maksimum hızda oda sıcaklığında 3 dakika santrifüj edildi. Kolon steril 1,5 ml santrifüj tüpüne alınarak üzerine 100 µl PureLink Genomik Elüsyon Tamponu eklendi.

Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra maksimum hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Kolon atıldı ve 1,5 ml santrifüj tüpü içerisinde DNA toplandı. Elde edilen genomik DNA'nın konsantrasyonu  $\mu$ Drop ile ölçüldü. İzole edilen DNA'lar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

#### **4.4. Bisülfid Uygulaması**

Bisülfid muamelesi ile metil grubu taşıyan sitozin metile halde kalırken, metil grubu taşımayan sitozin urasile dönüşmektedir. Mide kanseri hücre hatlarına uygulanmış olan ilaçların DNA'daki promotör bölgelerinde bulunan sitozinlerin metilasyon statülerinin ölçülebilmesi için bisülfid uygulaması yapıldı. 900  $\mu\text{l}$  DEPC, 200  $\mu\text{l}$  Modifikasyon Solüsyonu I, 60  $\mu\text{l}$  Modifikasyon Solüsyonu II ile hazırlanan Modifikasyon Reaktifi hazırlandı. Her bir deney grubundan elde edilen DNA'lardan 500 ng alınarak son hacim 20  $\mu\text{l}$  olacak şekilde 0,2 ml'lik PZR tüpünde ilgili hacimde DEPC içerisine konuldu. Üzerine 120  $\mu\text{l}$  Modifikasyon Reaktifi eklendi. PZR tüpü PZR cihazında  $98^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika,  $60^{\circ}\text{C}$ 'de 150 dakika inkübe edilerek modifikasyon işleminin gerçekleştirilmesi sağlandı. DNA pürifikasyon mikro kolon üzerine 400  $\mu\text{l}$  bağlama tamponu eklendi. Dönüştürülmüş DNA örneği bağlama tamponu üzerine eklendi, homojen solüsyon elde edene kadar pipetajlandı ve 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Tüpte toplanan sıvı atıldı ve kolon yeniden tüpe yerleştirildi. Üzerine 200  $\mu\text{l}$  yıkama tamponu eklendi ve 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Tüpte toplanan sıvı atıldı ve kolon yeniden tüpe yerleştirildi. 200  $\mu\text{l}$  desülfitleme tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi ve toplanan sıvı uzaklaştırıldı. Kolon üzerine 200  $\mu\text{l}$  yıkama tamponu eklendi ve 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolon üzerine tekrardan 200  $\mu\text{l}$  yıkama tamponu eklendi ve 12.000 rpm'de 60 saniye santrifüj edildi. Kolon 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 20  $\mu\text{l}$  elüsyon tamponu eklendi. 12.000 rpm'de 60 saniye santrifüj edildi ve kolon atıldı. Tüpte toplanan dönüştürülmüş DNA  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

#### **4.5. Metilasyon-Spesifik PZR**

Çalışmada pri-miR34a, pri-miR335-5p, pri-miR9-3 genlerinin promotor bölgelerindeki metilasyon statülerinin görülebilmesi için dönüştürülmüş DNA ile Metilasyon-Spesifik PZR (MSPZR) işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde, metil

grubu taşıyan sitozin içeren ve metilasyona uğrayan bölgeye özgü olan metilasyon primerleri ile; metil grubu taşımayan ve bisülfid uygulaması sonucu urasile dönüşen sitozin içeren demetilasyon bölgesine özgü demetilasyon primerleri kullanılmıştır. Metilasyon-Spesifik PZR işlemlerinde kullanılan reaktif miktarları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Pri-miR34a için gerçekleştirilen reaksiyon koşulları Tablo 4.2’de; pri-miR335 için gerçekleştirilen reaksiyon koşulları Tablo 4.3’te, pri-miR9-3 için gerçekleştirilen reaksiyon koşulları Tablo 4.4’te gösterilmiştir.

**Tablo 4.1:** Metilasyon-Spesifik PZR işleminde kullanılan reaktif miktarları

Reaktif miktarları			
Reaktifler	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Çalışma Konsantrasyonu
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,0 µl	2,0 mM
AmpliTaq 360 DNA polimeraz	5 U/ml	0,125 µl	1,25U
İleri primer	10 µM	0,5 µl	0,2 µM
Geri primer	10 µM	0,5 µl	0,2 µM
dNTP karışımı	10 mM	2,0 µl	0,8 µM
10X Tampon	10X	2,5 µl	1X
Son Hacim	-	25 µl	-

**Tablo 4.2:** Metilasyon-Spesifik PZR işleminde pri-miR34a reaksiyon koşulları

PZR koşulları		
İlk denatürasyon	94°C, 5 dk	Döngü Sayısı: 40
Denatürasyon	95 °C, 30 sn	
Bağlanma	56 °C, 30 sn	
Uzama	72°C, 30 sn	
Son uzama	72°C, 10 dk	

**Tablo 4.3:** Metilasyon-Spesifik PZR işleminde pri-miR335 reaksiyon koşulları

PZR koşulları		
İlk denatürasyon	94°C, 5 dk	Döngü Sayısı: 40
Denatürasyon	95 °C, 30 sn	
Bağlanma	58 °C, 30 sn	
Uzama	72°C, 30 sn	
Son uzama	72°C, 10 dk	

**Tablo 4.4:** Gerçek-Zamanlı PZR işleminde pri-miR9-3 reaksiyon koşulları

PZR koşulları		
İlk denatürasyon	94°C, 5 dk	
Denatürasyon	95 °C, 30 sn	Döngü Sayısı: 40
Bağlanma	61 °C, 30 sn	
Uzama	72°C, 30 sn	
Son uzama	72°C, 10 dk	

#### 4.6. Agaroz Jel Elektroforezi

%3'lük agaroz jel için, 1,5 g agaroz tartıldıktan sonra 50 ml 0,5X TBE solüsyonuna konuldu ve mikrodalga fırında agaroz çözülene kadar ısıtılıp karıştırıldı. Çözelti jel kasetine döküldükten sonra kuruyana kadar beklenildi. 6X yükleme boyası ile hazırlanmış olan 50 bp'lik DNA büyüklük markırı 3,5 µl olarak jelin her zaman ilk kuyucuğuna yüklenerek PZR ürünlerinin uzunluklarının değerlendirilmesi için kullanıldı. 5 µl PZR ürünleri 1 µl 6X yükleme boyası ile karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklendi. Jel 0,5X TBE içeren tanklar içerisinde, 100V'da 30 dakika yürütüldü. Yürütme sonrası bantların tayini, GEN-Box Imager Fx cihazında UV altında, imager Eyes yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Yükleme koşulları Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.5:** Agaroz Jel Yükleme Koşulları

Yükleme koşulları	
Agaroz jel	%3
PZR ürünü	5µl
Yükleme boyası	1µl
Markır	50bç
V	100
mA	300
Dk	30

#### 4.7. RNA İzolasyonu

miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi için RNA izolasyonu gerçekleştirildi.  $\leq 5 \times 10^6$  hücre olacak şekilde elde edilen pelet 350 µl RA1 ve 3,5 µl β-merkaptoetanol çözeltisi içinde çözülerek vortekslendi. Elde edilen lizat koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş NucleoSpin Filtre (mor renkli) içerisine konuldu ve 11,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde toplanan lizat 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne alındı ve üzerine 350 µl %70'lik etanol eklendi. Lizat homojen hale gelinceye kadar vortekslendi ve NucleoSpin RNA Kolon (mavi renkli) içerisine konuldu. Lizatın

kolona yüklenmesi için birkaç kere pipetaj yapıldı. 11,000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi ve kolon yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Kolon üzerine rDNaz'ın kesim verimliliğini arttırması için, 350 µl MDB (membrane desalting buffer=membran tuz uzaklaştırma tamponu) eklenerek 11,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. DNA'nın parçalanması için 90µl rDNaz reaksiyon tamponu ve 10 µl rDNaz 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. Elde edilen solüsyondan 95 µl alınarak kolona eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. rDNazın inaktive edilmesi için 200 µl RAW2 tamponu kolona eklendi ve 11,000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolon içerisindeki silika membranın yıkanması için 600 µl RA3 tamponu kolona eklendi ve 11,000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi. Kolon yeni bir koleksiyon tüpüne alınarak üzerine 250 µl RA3 tamponu eklendi ve 11,000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon kit içerisindeki 1,5 ml nükleaz içermeyen koleksiyon tüpüne yerleştirildi ve RNA'nın kolondan uzaklaştırılıp toplanması için, kolon üzerine 60 µl RNaz- içermeyen H<sub>2</sub>O eklendi ve 11,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. 1,5 ml koleksiyon tüpünde toplanmış halde olan RNA'nın konsantrasyonu µDrop ile ölçüldü. İzole edilen RNA'lar -80°C'de muhafaza edildi.

#### 4.8. cDNA Sentezi

cDNA sentezi üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Sentezde kullanılan reaksiyon koşulları ve reaksiyon bileşenleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.6:** cDNA sentez reaksiyonu koşulları ve reaksiyon bileşenleri

cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları			
İlk denatürasyon	94°C, 5 dk		
İnkübasyon	42°C, 60 dk		
Enzim İnaktivasyonu	80°C, 5 dk		
Reaktif miktarları			
Reaktifler	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Çalışma Konsantrasyonu
Oligo d(T) <sub>23</sub> VN	50 µM	2,0 µl	5 µM
Nükleaz içermeyen su	-	-	-
M-MuLV enzim karışımı	10X	2,0 µl	1X
M-MuLV reaksiyon karışımı	2X	10 µl	1X
Son Hacim	-	20 µl	-

#### 4.9. Gerçek Zamanlı PZR

B-actin, pri-miR34a, pri-miR335-5p ve pri-miR9-3'ün relatif ekspresyonları gerçek-zamanlı PZR işlemi ile analiz edildi. Gerçek-zamanlı PZR işleminde kullanılan reaktif miktarları Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Pri-miR34a için gerçekleştirilen reaksiyon koşulları Tablo 4.8'de; pri-miR335-5p için gerçekleştirilen reaksiyon koşulları Tablo 4.9'da, pri-miR9-3 için gerçekleştirilen reaksiyon koşulları Tablo 4.10'da gösterilmiştir. Ekspresyon seviyelerinin normalizasyonu  $\beta$ -aktin internal kontrolüne delta delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) metodu ile gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 4.7:** Gerçek-zamanlı PZR işleminde kullanılan reaktif miktarları

Gerçek-zamanlı PZR Reaktif miktarları			
Reaktifler	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Çalışma Konsantrasyonu
SensFAST SYBR No-ROX karışımı	2X	10 $\mu$ l	1X
İleri primer	10 $\mu$ M	0,8 $\mu$ l	400 nM
Geri Primer	10 $\mu$ M	0,8 $\mu$ l	400 nM
Son Hacim	-	20 $\mu$ l	-

**Tablo 4.8:** Gerçek-Zamanlı PZR işleminde pri-miR34a reaksiyon koşulları

Gerçek-zamanlı PZR koşulları		
Polimeraz enzim aktivasyonu	95°C, 2 dk	
Denatürasyon	95 °C, 5 sn	Döngü Sayısı: 40
Bağlanma	61 °C, 10 sn	
Uzama	72°C, 15 sn	
Erime Eğrisi Analizi	65°C-95°C, 5 sn	

**Tablo 4.9:** Gerçek-Zamanlı PZR işleminde pri-miR335-5p reaksiyon koşulları

Gerçek-zamanlı PZR koşulları		
Polimeraz enzim aktivasyonu	95°C, 2 dk	
Denatürasyon	95 °C, 5 sn	Döngü Sayısı: 40
Bağlanma	63 °C, 10 sn	
Uzama	72°C, 15 sn	
Erime Eğrisi Analizi	65°C-95°C, 5 sn	

**Tablo 4.10:** Gerçek-Zamanlı PZR işleminde pri-miR9-3reaksiyon koşulları

Gerçek-zamanlı PZR koşulları		
Polimeraz enzim aktivasyonu	95°C, 2 dk	
Denatürasyon	95 °C, 5 sn	Döngü Sayısı: 40
Bağlanma	58 °C, 10 sn	
Uzama	72°C, 15 sn	
Erime Eğrisi Analizi	65°C-95°C, 5 sn	

## **5. BULGULAR**

### **5.1. AGS ve MKN45 Hücre Hatlarında Sitotoksisite MTT Testi Sonuçları**

Bu sebeple kullandığımız DNMT indüksiyon ajanının, kemoterapötik ilacın ve DMSO'nun hücrelerde sitotoksik bir etki oluşturup oluşturmadığı belirlenmeye çalışıldı. Buradan yola çıkarak AGS ve MKN45 hücre hatlarına MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi uygulandı. Uygulama öncesinde her bir hücre hattına 2,5 µM, 5,0 µM, 7,5 µM, 10,0 µM ve 20 µM DAC; 100 nM-800 nM arasında VCR muamelesi gerçekleştirildi. DAC'ın DMSO'da çözülmesi sebebiyle, son konsantrasyonu %0,01 olacak şekilde DMSO uygulaması yapıldı. DAC, VCR ve DMSO uygulanan hücreler 24, 48 ve 72 saatleri boyunca inkübasyonda bırakıldı ve hücre yaşayabilirliği ölçüldü.

Böylece elde edilen bulgularda, AGS ve MKN45 hücre hatlarında 2,5 µM Decitabine (DAC) ve 300 nM vincristine (VCR) dozlarının uygulanmasına karar verildi. AGS hücre hattının kendini eşleme süresi 20 saat, MKN45 hücre hattının ise kendini eşleme süresi 30 saat olduğundan, deneyler arasında eşit koşullar olması için, 48 ve 72 saat boyunca ilaç uygulamasının gerçekleştirilmesine karar verildi. Aynı zamanda bu doz ve zaman aralığında DNA demetilasyonunun gerçekleştirilmesi hedeflendi.

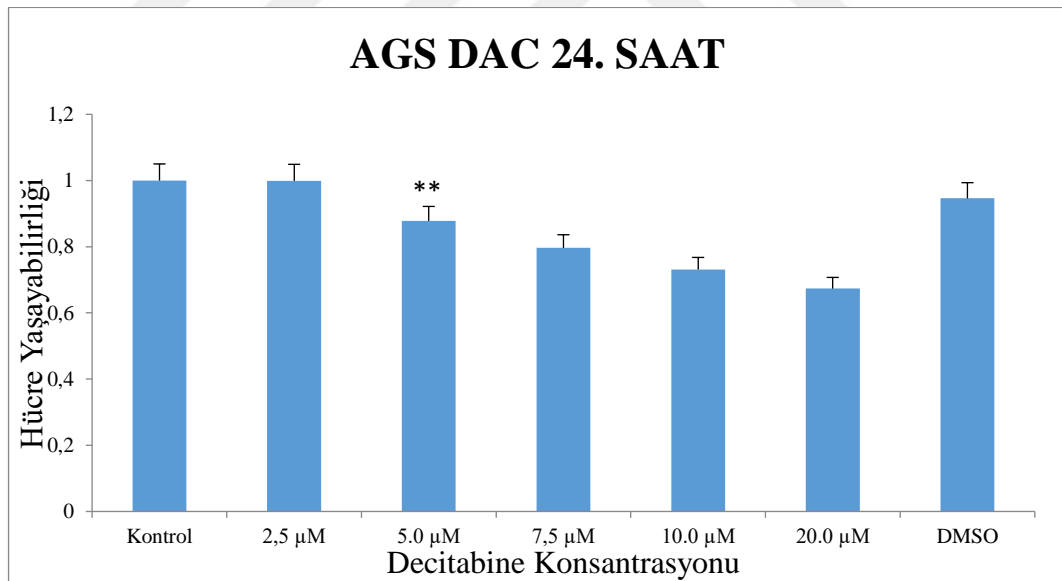
#### **5.1.1. AGS Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine'in Sitotoksisiteye Etkisi**

##### **5.1.1.1. AGS Hücre Hattında Decitabine'in Sitotoksisite Sonuçları**

Elde edilen bulgulara göre, decitabine'nin belirlenen konsantrasyonlarda ve saatlerde AGS hücre hattına uygulanması neticesinde, 24. saatte 2,5 µM

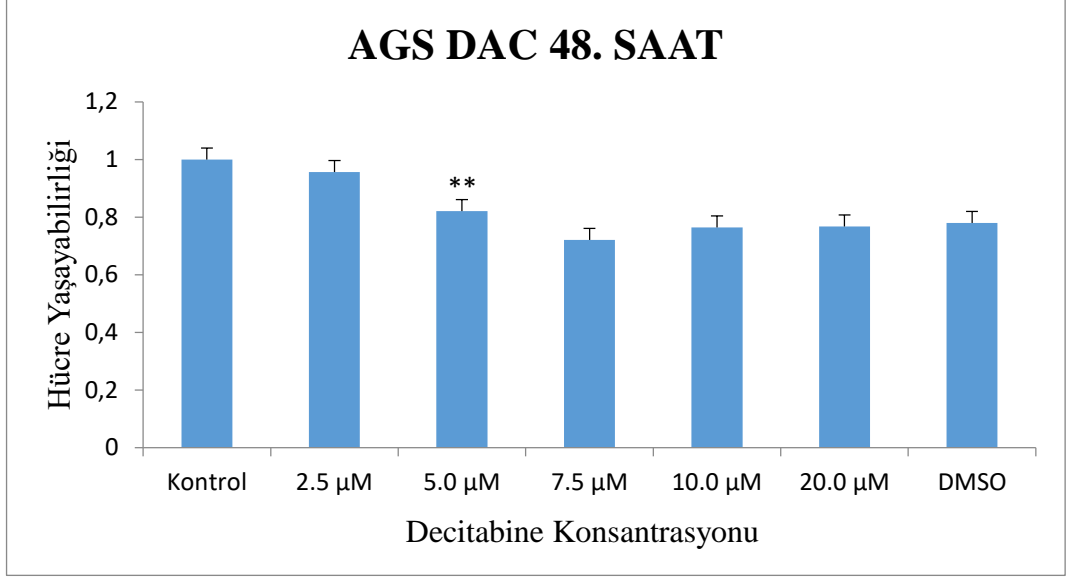
konsantrasyonunda hücre yaşayabilirliğinde artış görülmüş ve 5 µM konsantrasyonunda istatistiki olarak anlamlı ( $p<0.005$ ) bir düşüş görülmüştür. 48. saatte 5 µM decitabine konsantrasyonunda istatistiki olarak anlamlı ( $p<0.005$ ) bir düşüş görülmüştür. 72. saatte ise hücre yaşayabilirliğinde 5 µM konsantrasyonunda istatistiki olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) azalma görülmüştür. Dolayısıyla decitabine'nin hücre yaşayabilirliğine minimum toksik etki göstermesi için 2,5 µM olan konsantrasyonu seçilmiştir. Uygulanan DMSO konsantrasyonunun ise yaşayabilirliğe olumsuz yönde bir etkisi olmamıştır. Muamele edilmemiş hücrelere göre belirlenen yaşayabilirlik düzeyleri saat ve konsantrasyonlara göre Şekil 5.1, Şekil 5.2 ve Şekil 5.3'te gösterilmiştir. MTT testi, üç teknik ve iki biyolojik tekrar olmak üzere gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizde t-test kullanılmıştır.

AGS ve MKN45 hücre hatlarında 2,5 µM Decitabine (DAC) ve 300 nM vincristine'nin (VCR) 48 ve 72 saat boyunca uygulanmasıyla DNA demetilasyonunun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

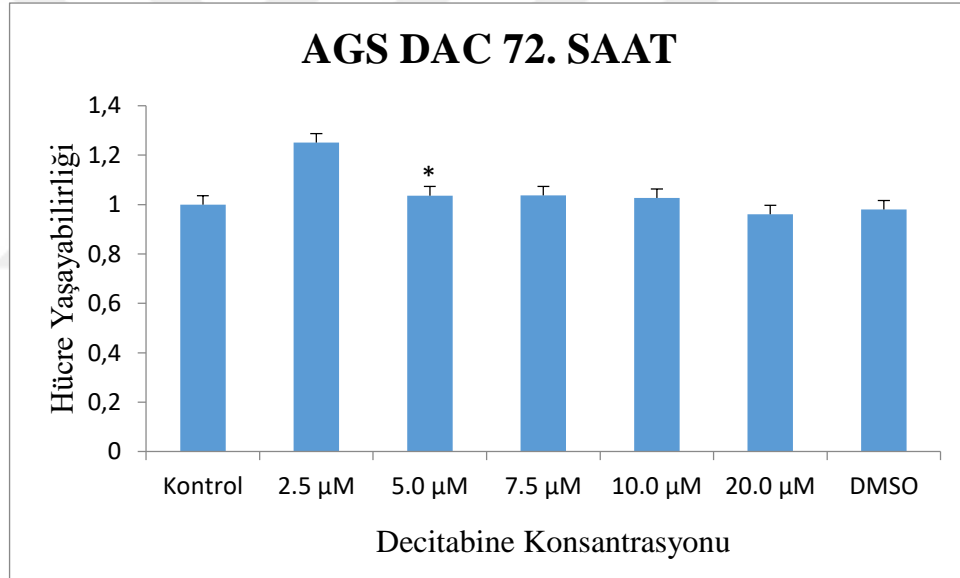


Şekil 5.1. MTT testi ile AGS hücre hattına 24 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\* $p<0.005$ )





Şekil 5.2. MTT testi ile AGS hücre hattına 48 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)

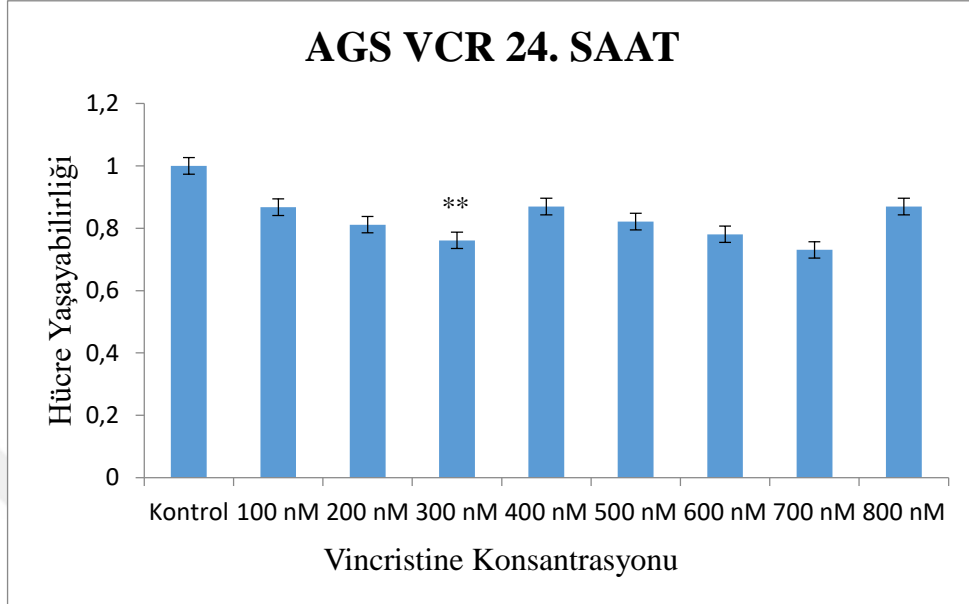


Şekil 5.3. MTT testi ile AGS hücre hattına 72 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*p<0.05)

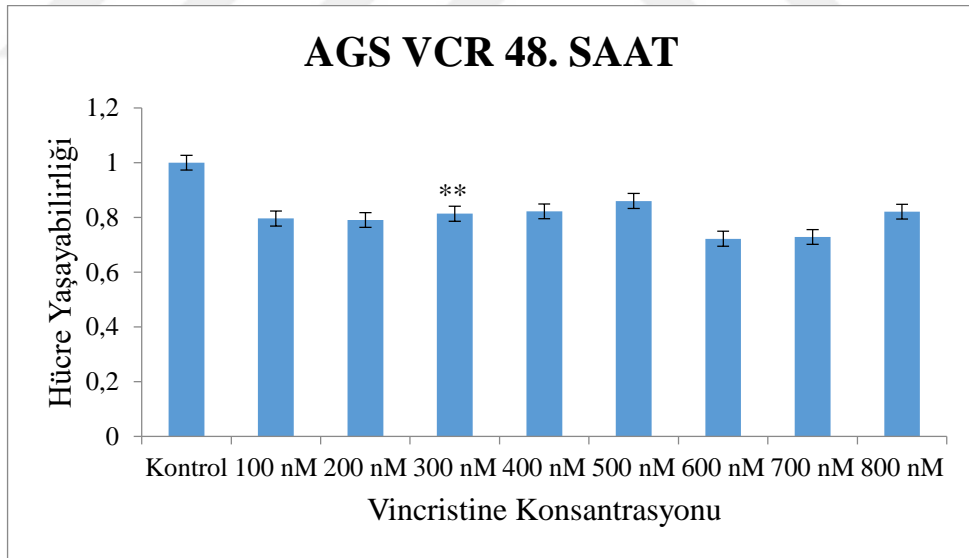
### 5.1.1.2. AGS Hücre Hattında Vincristine'in Sitotoksosite Sonuçları

Elde edilen bulgulara göre, vincristine'nin belirlenen konsantrasyonları ve saatlerinin hepsinde hücre yaşayabilirliğinde düşüş gözlemlenmiştir. 24. saatte 300 nM konsantrasyonunda istatistiki olarak anlamlı ( $p<0.005$ ) hücre ölümü gerçekleşmiştir. Ancak 48. ve 72. saatlerde 300 nM vincristine konsantrasyonunda hücre yaşayabilirliği daha düşük konsantrasyonlara kıyasla kurtarılmıştır ve bu istatistiki olarak anlamlıdır ( $p<0.005$ ). Hücre ölümünün istatistiki olarak anlamlı şekilde kurtarıldığı konsantrasyon olan 300 nM vincristine dozu seçilmiştir. Bulgular kontrole

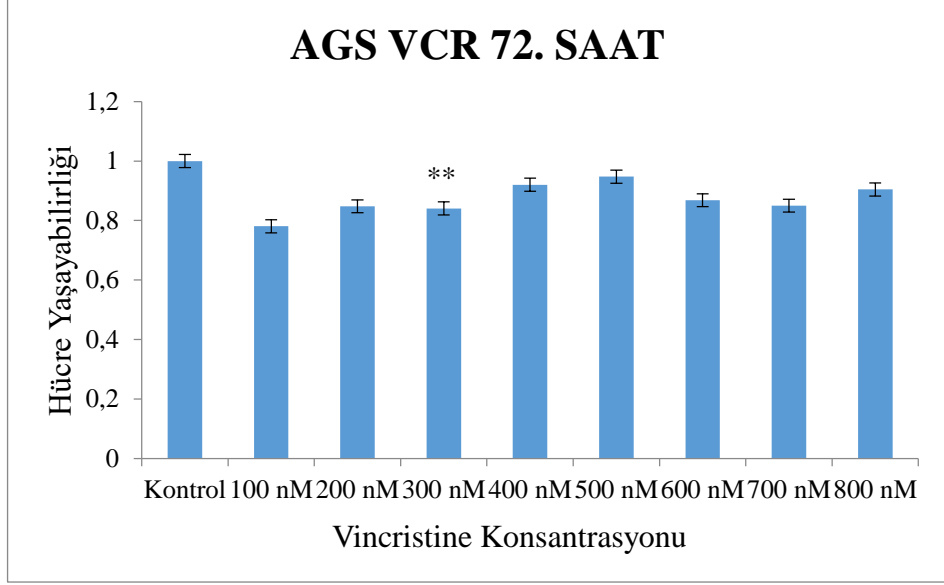
göre hücre yaşayabilirliği oranı olarak Şekil 5.4, Şekil 5.5 ve Şekil 5.6'da gösterilmiştir. MTT testi, üç teknik ve iki biyolojik tekrar olmak üzere gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizde t-test kullanılmıştır.



Şekil 5.4. MTT testi ile AGS hücre hattına 24 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)



Şekil 5.5. MTT testi ile AGS hücre hattına 48 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)

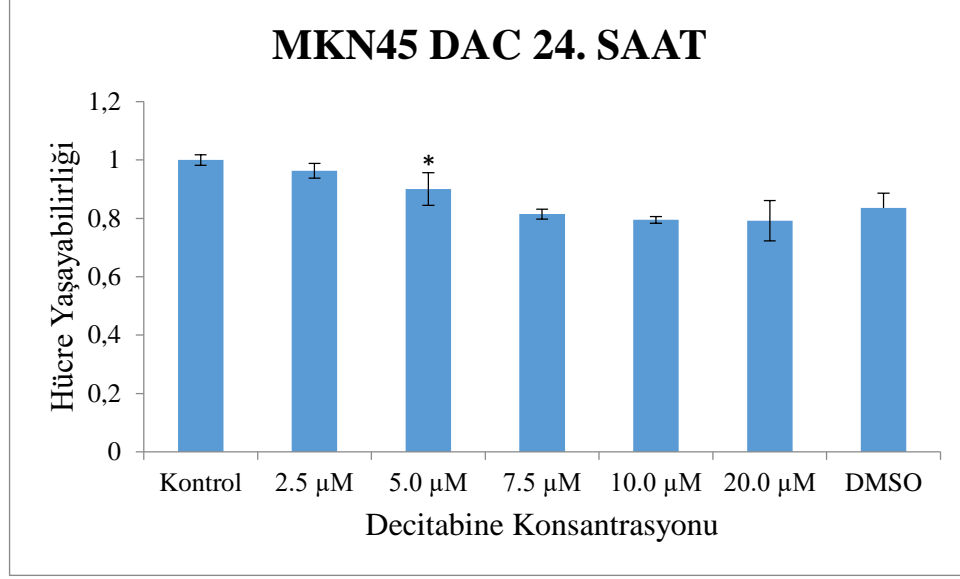


**Şekil 5.6.** MTT testi ile AGS hücre hattına 72 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)

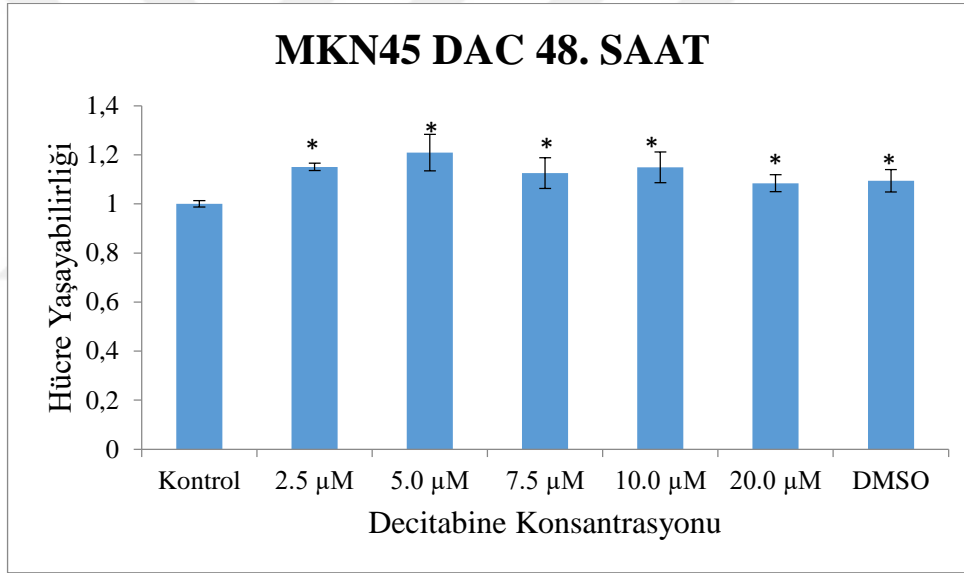
### **5.1.2. MKN45 Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine'in Sitotoksisiteye Etkisi**

#### **5.1.2.1. MKN45 Hücre Hattında Decitabine'in Sitotoksisite Sonuçları**

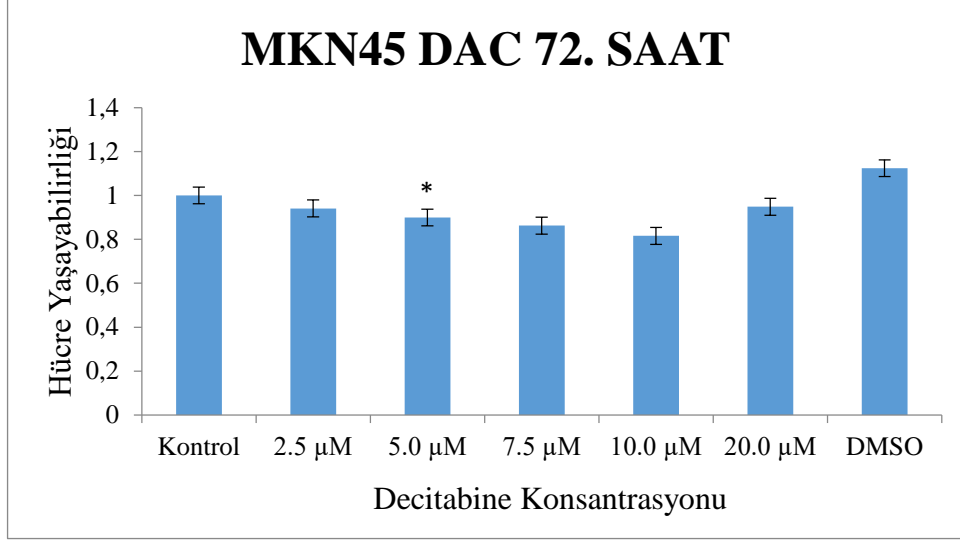
Elde edilen bulgulara göre, decitabine'nin belirlenen konsantrasyonlarda ve saatlerde MKN45 hücre hattına uygulanması neticesinde, 24. saatte 5 µM konsantrasyonunda hücre yaşayabilirliğinde istatistiki olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir (p<0.05). İlginç olarak, 48. saatte decitabine'nin bütün dozlarında hücre yaşayabilirliğinde artış görülmüştür ve bu durum her bir doz için istatistiki olarak anlamlıdır. 72. saatte ise, 5 µM konsantrasyonunda hücre yaşayabilirliğinde istatistiki olarak anlamlı (p<0.05) bir azalma görülmüştür. Dolayısıyla decitabine'nin hücre yaşayabilirliğine minimum toksik etki göstermesi için 2,5 µM olan konsantrasyonu seçilmiştir. Uygulanan DMSO konsantrasyonunun ise yaşayabilirliğe olumsuz yönde bir etkisi olmamıştır. Yaşayabilirlik oranları Şekil 5.7, Şekil 5.8 ve Şekil 5.9'da gösterilmiştir. MTT testi, üç teknik ve iki biyolojik tekrar olmak üzere gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizde t-test kullanılmıştır.



**Şekil 5.7.** MTT testi ile MKN45 hücre hattına 24 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*p<0.05)



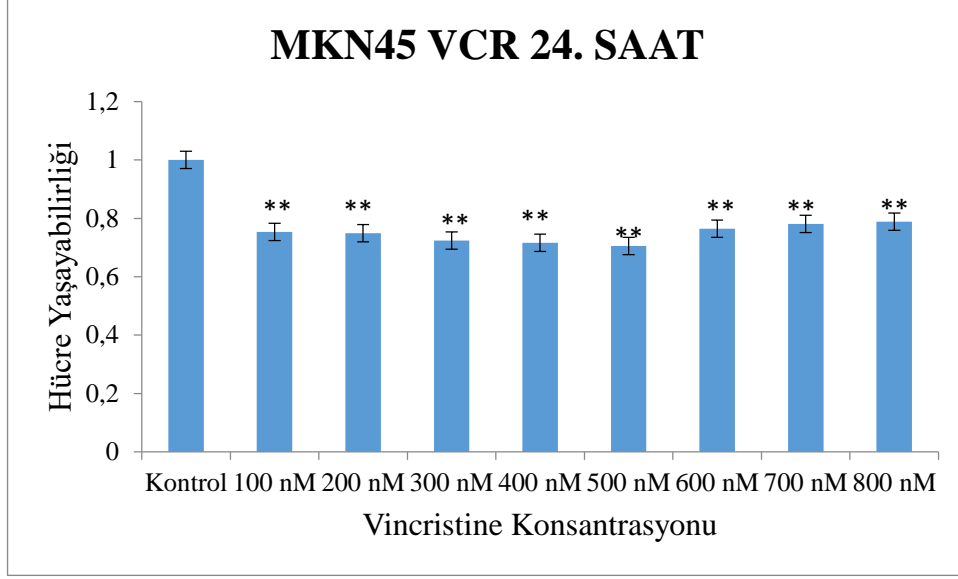
**Şekil 5.8.** MTT testi ile MKN45 hücre hattına 48 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*p<0.05)



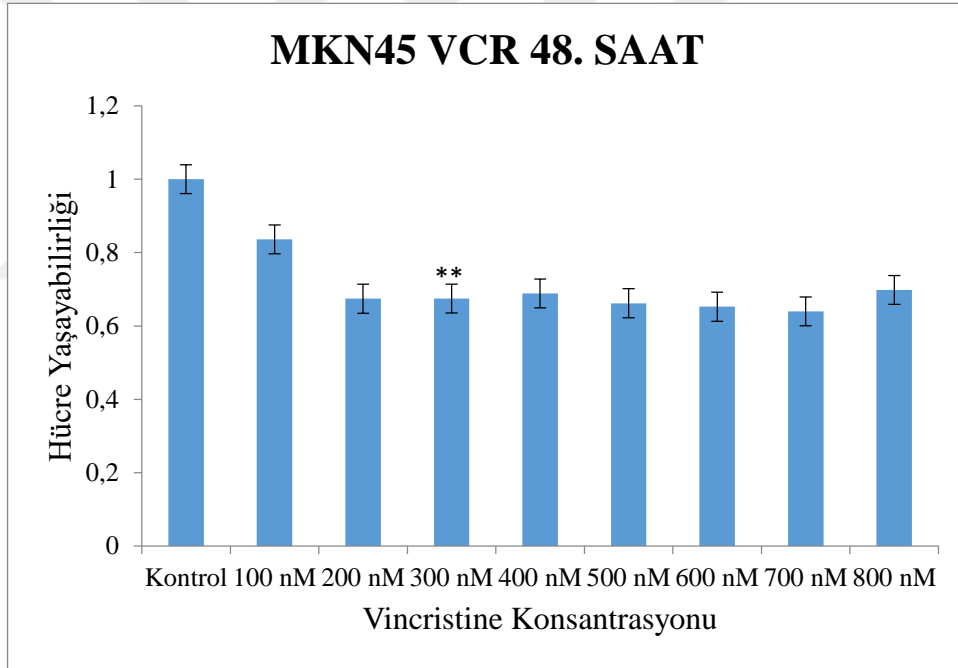
**Şekil 5.9.** MTT testi ile MKN45 hücre hattına 72 saat decitabine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\* $p < 0.05$ )

#### 5.1.2.2. MKN45 Hücre Hattında Vincristine'in Sitotoksisite Sonuçları

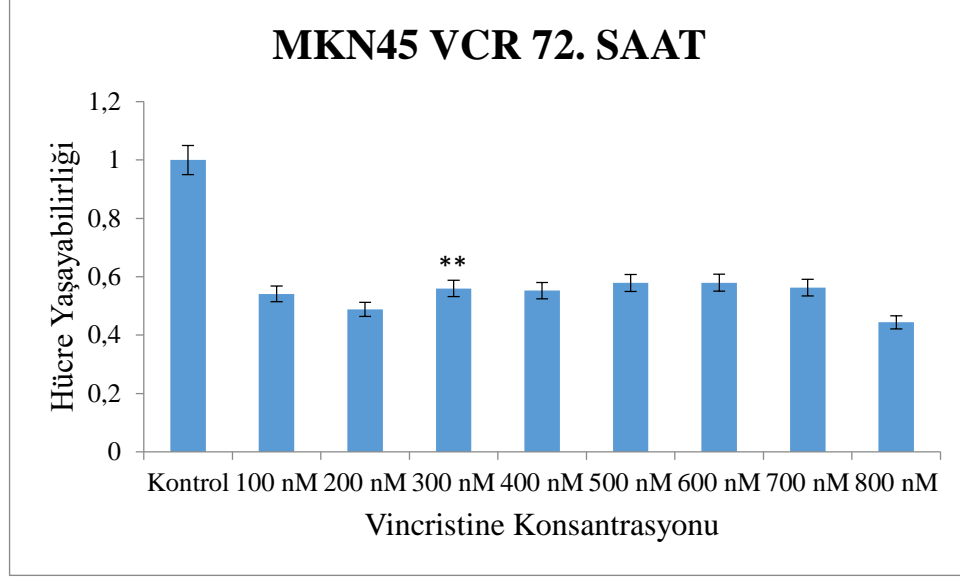
Elde edilen bulgulara göre, vincristine'nin belirlenen konsantrasyonların ve saatlerin hepsinde MKN45 hücre yaşayabilirliğinde düşüş gözlemlenmiştir. 24. saatte uygulanan bütün dozlardaki hücre ölümü istatistiki olarak anlamlıdır ( $p < 0.005$ ). Ancak 48. ve 72. saatlerde 300 nM vincristine konsantrasyonunda hücre yaşayabilirliği daha düşük konsantrasyonlara kıyasla kurtarılmıştır ve bu istatistiki olarak anlamlıdır ( $p < 0.005$ ). Hücre ölümünün istatistiki olarak anlamlı şekilde kurtarıldığı konsantrasyon olan 300 nM vincristine dozu seçilmiştir. Bulgular, kontrole göre kıyaslanarak Şekil 5.10, Şekil 5.11 ve Şekil 5.12'de gösterilmiştir. MTT testi, üç teknik ve iki biyolojik tekrar olmak üzere gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizde t-test kullanılmıştır.



**Şekil 5.10.** MTT testi ile MKN45 hücre hattına 24 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)



**Şekil 5.11.** MTT testi ile MKN45 hücre hattına 48 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)



**Şekil 5.12.** MTT testi ile MKN45 hücre hattına 72 saat vincristine maruziyeti sonrası hücre yaşayabilirlik oranı (\*\*p<0.005)

## 5.2. Decitabine ve Vincristine Sonucu miRNA Gen Metilasyonu ve pri-miRNA Ekspresyon Sonuçları

### 5.2.1. AGS Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine Uygulanması ile Elde Edilen MSPZR Sonuçları

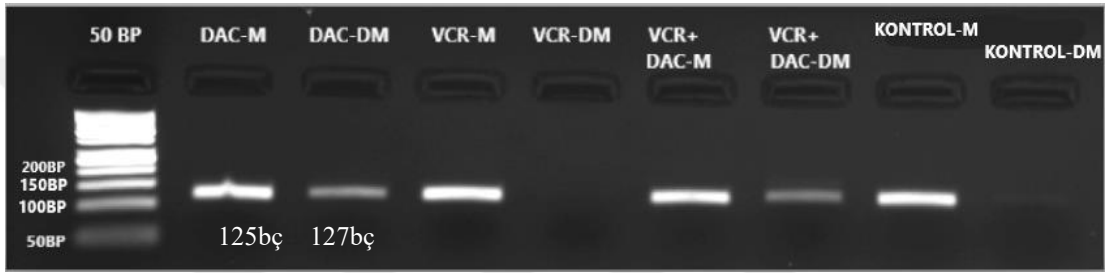
#### 5.2.1.1. miR335 Gen Metilasyon Seviyesi

AGS hücrelerine decitabine uygulanması sonrası miR335 geninin promotör bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen metilasyon düzeylerinin nasıl değiştiğine bakıldı. Decitabine uygulanmamış kontrolde demetilasyon bandına rastlanmamış olup spesifik olarak bakılan CpG adacıklarının tamamen metile durumda olduğu gözlemlendi. Kontrole göre, 48. saatte demetilasyonun gerçekleştiği agaroz jel üzerinde gözlemlendi. Aynı şekilde 72. saatte de demetilasyonun gerçekleştiği, ancak 48. saatteki demetilasyon sonucuna kıyasla demetilasyonun daha az meydana geldiği görüldü.

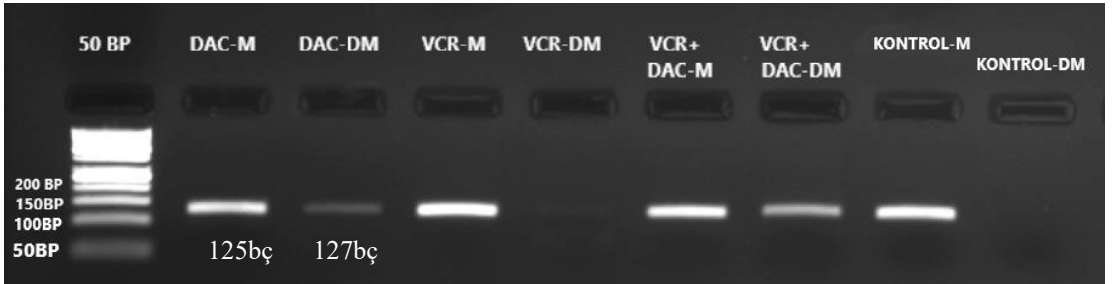
AGS hücrelerine vincristine uygulanması sonrası miR335 geninin promotör bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen metilasyon düzeylerinin nasıl değiştiğine bakıldı. Vincristine uygulanmamış olan kontrolde metilasyonun olduğu ancak demetilasyonun olmadığı görüldü. Kontrole kıyasla 48. saatte 72. saatte demetilasyon bandı gözlemlenmedi.

AGS hücrelerine decitabine ve vincristine aynı anda uygulandıktan sonra miR335 genindeki metilasyon durumuna bakıldı. Elde edilen bulgulara göre, 48. saatte demetilasyon görülmeyen kontrole kıyasla demetilasyonun olduğu görüldü. Decitabine uygulaması ile elde edilen demetilasyon bandına kıyaslandığında parlaklığın aynı olduğu gözlemlendi. 72. saatte yalnızca decitabine uygulanmış hücrelere kıyasla ise, demetilasyon bandının daha parlak olduğu görüldü.

Elde edilen 48. saat jel görüntüsü Şekil 5.13'te, 72. saat jel görüntüsü Şekil 5.14'te gösterilmiştir.



**Şekil 5.13.** MSPZR ile AGS hücre hattına 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu miR335 metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)



**Şekil 5.14.** MSPZR ile AGS hücre hattına 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu miR335 metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)



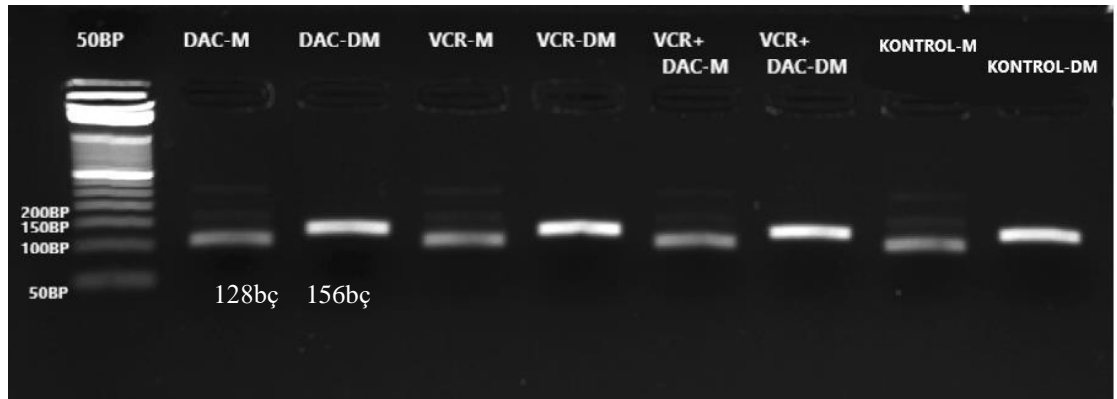
### 5.2.1.2. miR34a Gen Metilasyon Seviyesi

AGS hücrelerine decitabine uygulanması sonrası miR34a geninin promotör bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen metilasyon düzeylerinin nasıl değiştiğine bakıldı. Decitabine uygulanmamış olan kontrolde metilasyon ve demetilasyon durumlarının birlikte olduğu görüldü. Kontrole kıyasla 48. saatte demetilasyon bandının değişmediği gözlemlendi. 72. saatte de kontrole kıyasla demetilasyon bandının daha parlak olduğu görüldü.

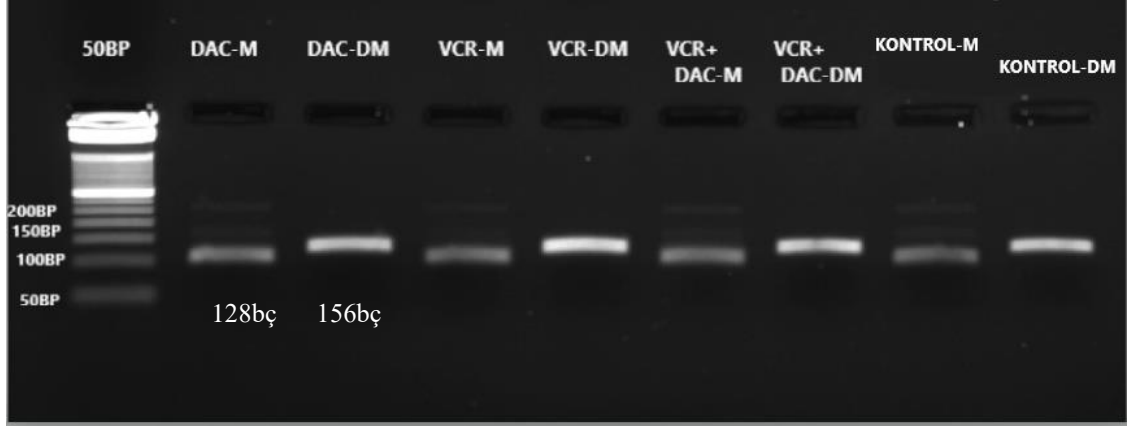
AGS hücrelerine vincristine uygulanması sonrası miR34a geninin promotör bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen metilasyon düzeylerinin nasıl değiştiğine bakıldı. Vincristine uygulanmamış olan kontrolde metilasyon ve demetilasyon durumlarının birlikte olduğu görüldü.

AGS hücrelerine decitabine ve vincristine aynı anda uygulandıktan sonra miR34a genindeki metilasyon durumuna bakıldı. Elde edilen bulgulara göre, yalnızca decitabine uygulanan hücrelere kıyasla 48. ve 72. saatlerdeki demetilasyon ürünlerinin aynı olduğu görüldü. Kontrole kıyasla her iki saat dilimi açısından bir fark görülmedi.

Elde edilen 48. saat jel görüntüsü Şekil 5.15'te, 72. saat jel görüntüsü Şekil 5.16'da gösterilmiştir.



**Şekil 5.15.** AGS hücre hattına miR34a 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)



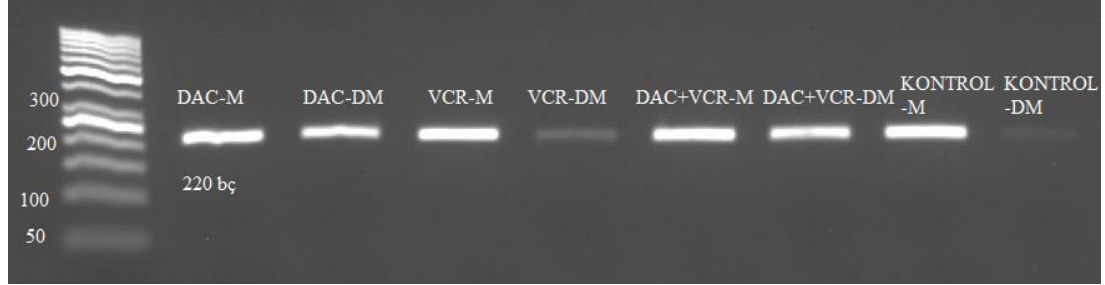
**Şekil 5.16.** AGS hücre hattına miR34a geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)

### 5.2.1.3. miR9-3 Gen Metilasyon Seviyesi ve Ekspresyon Düzeyi

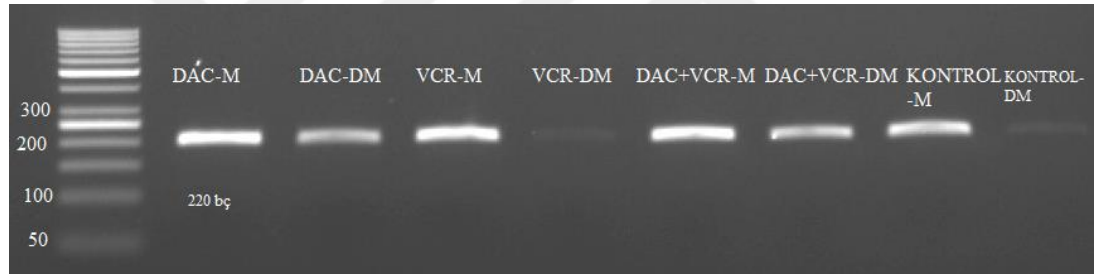
AGS hücrelerine decitabine uygulanması sonrası miR9-3 geninin promotör bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen metilasyon düzeylerinin nasıl değiştiğine bakıldı. Decitabine uygulanmamış olan kontrolde metilasyon ve demetilasyon durumlarının birlikte olduğu görüldü, ancak metilasyon bandına kıyasla daha silik olduğu sonucuna varıldı. AGS hücrelerine birlikte uygulanan decitabine ve vincristine sonrasında miR9-3 geninin metilasyon durumuna bakıldığında; hem 48 hem de 72. saatlerde demetilasyonun gerçekleştiği görüldü. Kontrol hücrelerindeki demetilasyon bandıyla yalnızca DAC uygulanan bant karşılaştırılınca demetilasyon bandının daha yoğun olduğu görüldü.

AGS hücrelerine vincristine uygulanması sonrası miR9-3 geninin promotör bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen metilasyon düzeylerinin nasıl değiştiğine bakıldı. Vincristine uygulanmamış olan kontrolde metilasyon ve demetilasyon durumlarının birlikte olduğu görüldü, ancak metilasyon bandına kıyasla demetilasyon bandının çok silik olduğu sonucuna varıldı. Kontrole kıyasla vincristine uygulanan hücrelerde 48. saatte demetilasyon bandı yakalandı. Kontrole kıyasla daha parlak bir bant ürünü görülse de, decitabine uygulanması sonucunda oluşan demetilasyon bandı kadar parlak olmadığı görüldü. Aynı şekilde 72. saatte de kontrole kıyasla demetilasyonun gerçekleştiği, ancak 48. saatteki demetilasyon sonucuna kıyasla demetilasyonun çok daha az meydana geldiği görüldü.

Elde edilen 48. saat jel görüntüsü Şekil 5.17’de, 72. saat jel görüntüsü Şekil 5.18’de gösterilmiştir.



**Şekil 5.17.** AGS hücre hattına miR9-3 geninin 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)



**Şekil 5.18.** AGS hücre hattına miR9-3 geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)

## 5.2.2. AGS Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine Uygulanması ile Elde Edilen Gerçek-Zamanlı PZR Sonuçları

Elde edilen bulguların, iki biyolojik ve üç teknik tekrarı yapılmıştır.

### 5.2.2.1. pri-miR335 Ekspresyon Düzeyi

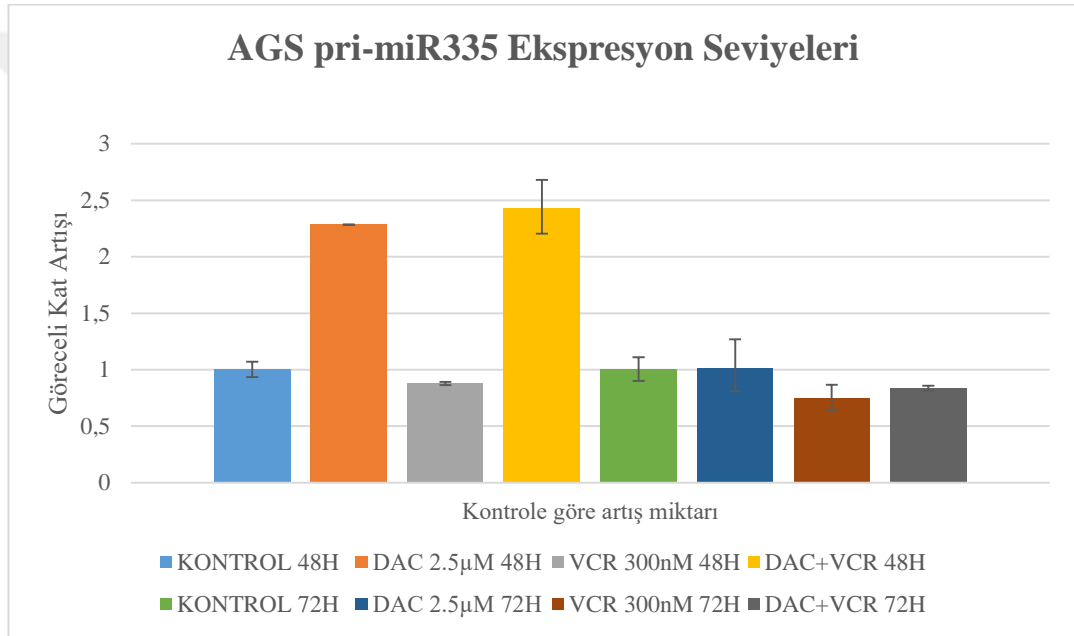
AGS hücrelerine uygulanan 2,5  $\mu$ M decitabine uygulaması sonucunda,  $\beta$ -aktin ile  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu uygulanarak normalize edilen ve ekspresyon seviyesi ölçülen pri-miR335’in ekspresyon seviyesi 48. ve 72. saat için Şekil 5.19’da gösterilmiştir.

48. saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 2,2 kat artış meydana gelmiştir. 72 saat boyunca decitabine uygulanması

neticesinde pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 1,01 katlık bir artış meydana gelmiştir.

48. saat boyunca vincristine uygulanması neticesinde pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 0,8 katlık bir düşüş meydana gelmiştir. 72 saat boyunca vincristine uygulanması sonrasında ise pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 0,7 katlık bir düşüş görülmüştür.

Yine 48 saat boyunca VCR ve DAC birlikte uygulanması sonucunda pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 2,4 katlık bir artış görülmüştür. 72 saat boyunca VCR+DAC uygulaması ile pri-miR335 ekspresyon seviyesinde ilginç olarak 0,8 katlık bir düşüş yakalanmıştır.



Şekil 5.19. Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR335 ekspresyon seviye değişimi

### 5.2.2.2. pri-miR34a Ekspresyon Düzeyi

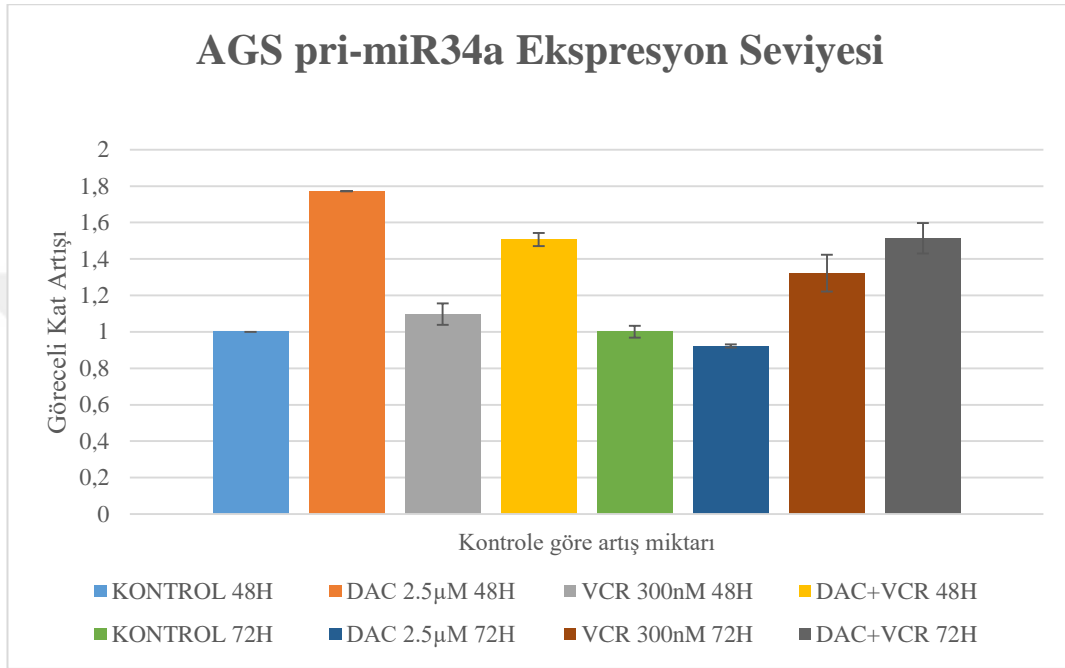
AGS hücrelerine uygulanan 2,5 µM decitabine uygulaması sonucunda, β-aktin ile  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu uygulanarak normalize edilen ve ekspresyon seviyesi ölçülen pri-miR34a'nın ekspresyon seviyesi 48. ve 72. saat için Şekil 5.20'de gösterilmiştir.

48. saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 1,7 kat artış meydana gelmiştir. 72. saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 0,9 katlık bir düşüş meydana gelmiştir.

48. saat boyunca vincristine uygulanması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 1,09 katlık bir artış meydana gelmiştir. 72 saat boyunca vincristine

uygulanması sonrasında ise pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 1,3 katlık bir artış görülmüştür.

Yine 48 saat boyunca VCR ve DAC birlikte uygulanması sonucunda pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 1,5 katlık bir artış görülmüştür. 72 saat boyunca VCR+DAC uygulaması ile pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 1,5 katlık bir artış yakalanmıştır.



Şekil 5.20. Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviye değişimi

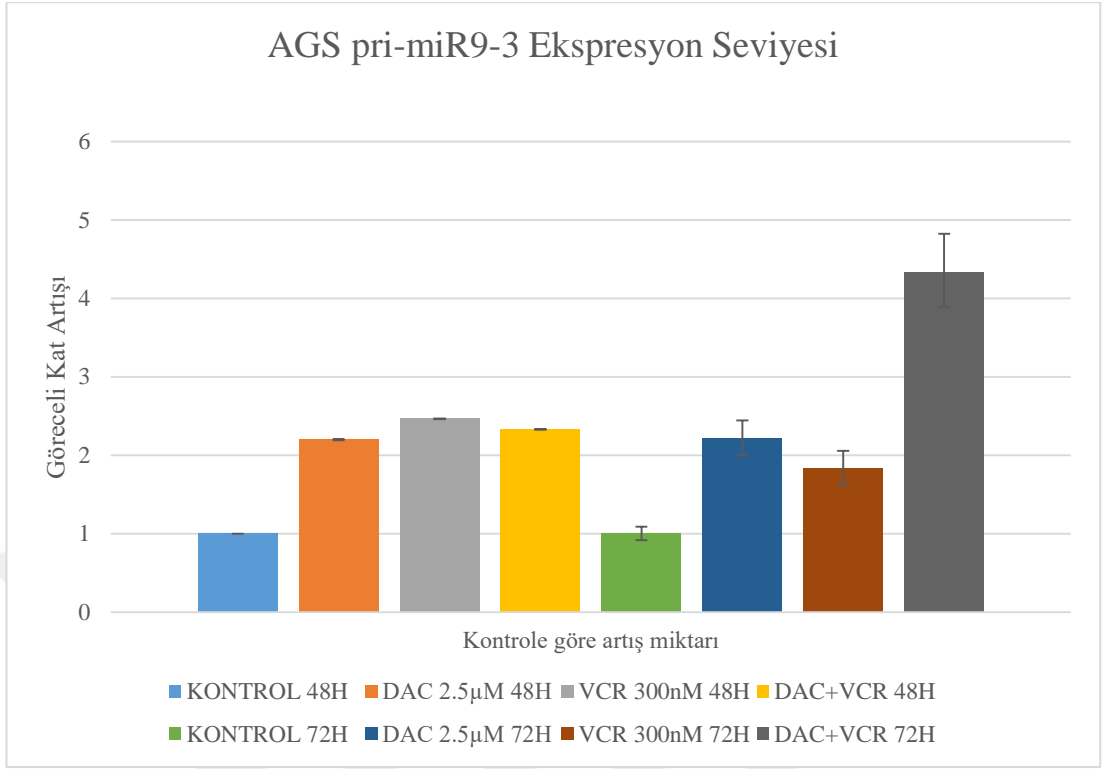
### 5.2.2.3. pri-miR9-3 Ekspresyon Düzeyi

AGS hücrelerine uygulanan 2,5 µM decitabine uygulaması sonucunda,  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu uygulanarak normalize edilen ve ekspresyon seviyesi ölçülen pri-miR9-3'ün ekspresyon seviyesi 48. ve 72. saat için Şekil 5.21'de gösterilmiştir.

48. saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 2,1 kat artış meydana gelmiştir. 72. saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 2,2 katlık bir artış meydana gelmiştir.

48. saat boyunca vincristine uygulanması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 2,4 katlık bir artış meydana gelmiştir. 72 saat boyunca vincristine uygulanması sonrasında ise pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 1,8 katlık bir artış görülmüştür.

Yine 48 saat boyunca VCR ve DAC birlikte uygulanması sonucunda pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 2,3 katlık bir artış görülmüştür. 72 saat boyunca VCR+DAC uygulaması ile pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 4,3 katlık bir artış yakalanmıştır.



**Şekil 5.21.** Gerçek zamanlı PZR ile AGS hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviye değişimi

### 5.2.3. MKN45 Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine Uygulanması ile Elde Edilen MSPZR Sonuçları

#### 5.2.3.1. miR335 Gen Metilasyon Seviyesi

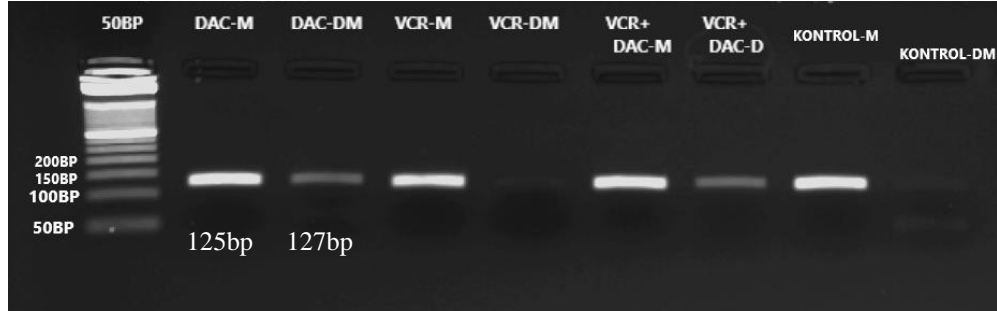
Uygulama yapılmamış MKN45 kontrol hücrelerinde miR335 geninde metilasyon ürünü görülürken, demetilasyon ürünü görülmedi. DAC uygulaması sonrasında, 48. ve 72. saatlerde demetilasyon bandı olmayan kontrole kıyasla demetilasyon bandının olduğu görüldü. 48 ve 72. saatler arasında bant parlaklıkları arasında bir fark gözlemlenmedi.

Vincristine uygulaması sonrasında miR335 genindeki metilasyon durumuna bakıldığında, kontrole kıyasla 48. saatte demetilasyonun gerçekleşmediği, ancak 72. saatte demetilasyonun olduğu görüldü. Decitabine'nin her iki saat dilimine kıyasla ise bandın daha az parlak olduğu gözlemlendi.

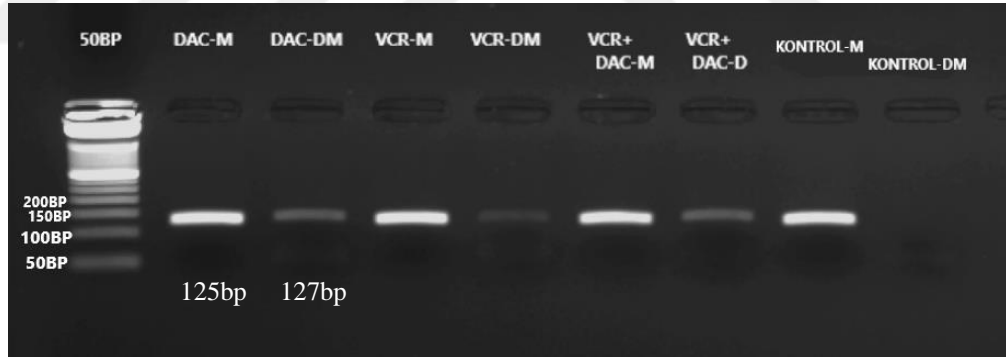
Vincristine ve decitabine'nin birlikte uygulandığı MKN45 hücrelerinde miR335 geninde, hem 48 hem de 72. saatlerde demetilasyonun olduğu görüldü.

Yalnızca vincristine uygulanan hücelere kıyasla demetilasyon bandının daha parlak olduğu ancak yalnızca decitabine uygulanan hücelere kıyasla demetilasyon bantlarının aynı seviyede olduğu görüldü.

Elde edilen 48. saat jel görüntüsü Şekil 5.22’de, 72. saat jel görüntüsü Şekil 5.23’te gösterilmiştir.



**Şekil 5.22.** MKN45 hücre hattına miR335 geninin 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)



**Şekil 5.23.** MKN45 hücre hattına miR335 geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)

### 5.2.3.2. miR34a Gen Metilasyon Seviyesi

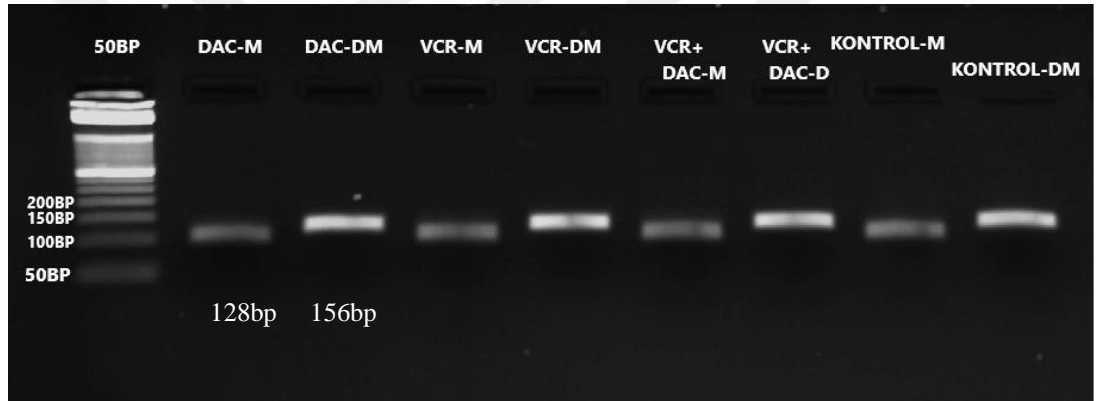
Uygulama yapılmamış MKN45 kontrol hücrelerinde 34a geninde demetilasyon ve metilasyon ürünleri birlikte gözlemlendi. Decitabine uygulanmış

hücrelerde kontrole kıyasla 48. ve 72. saatlerde hem metilasyon hem de demetilasyon bantlarının aynı parlaklık ve kalınlığa sahip olduğu görüldü.

Vincristine uygulaması sonrasında miR34a genindeki metilasyon durumuna bakıldığında, kontrole kıyasla hem 48 hem de 72. saatlerde demetilasyonda herhangi bir değişiklik görülmedi.

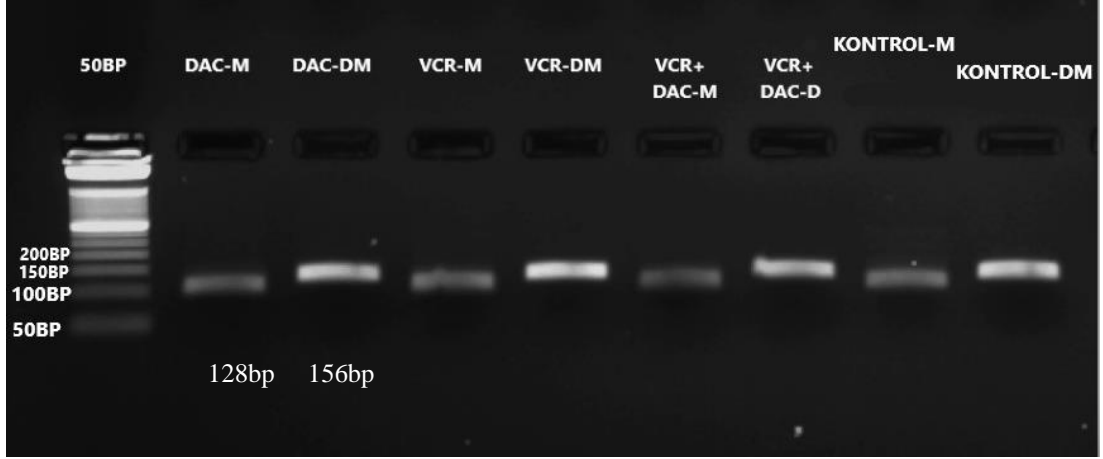
Vincristine ve decitabine'nin birlikte uygulanması sonrasında miR34a genindeki metilasyon durumuna bakıldığında, kontrole kıyasla hem 48 hem de 72. saatlerde demetilasyonda herhangi bir değişiklik görülmedi. Aynı şekilde decitabine'e kıyasla da demetilasyonda değişiklik gözlemlenmedi.

Elde edilen 48. saat jel görüntüsü Şekil 5.24'te, 72. saat jel görüntüsü Şekil 5.25'te gösterilmiştir.



**Şekil 5.24.** MKN45 hücre hattına miR34a geninin 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)





**Şekil 5.25.** MKN45 hücre hattına miR34a geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)

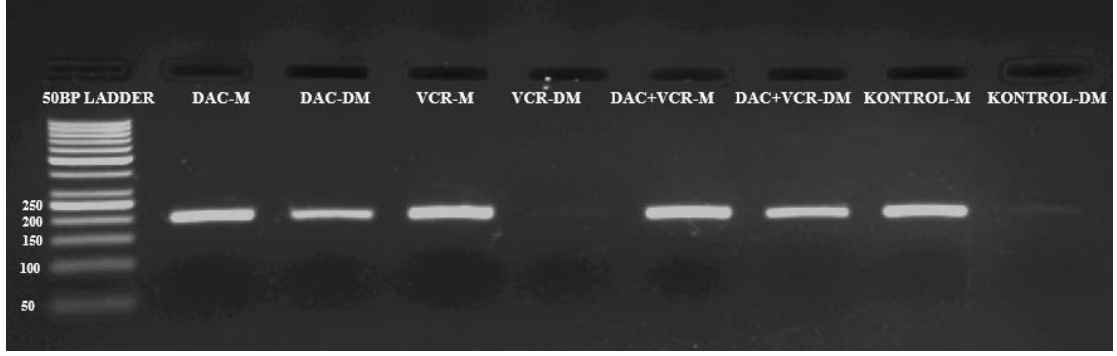
### 5.2.3.3. miR9-3 Gen Metilasyon Seviyesi

Uygulama yapılmamış MKN45 kontrol hücrelerinde miR9-3 geninin tamamen metile olduğu görüldü. Demetilasyon bandı görülmedi. Decitabine uygulaması sonucunda hem 48 hem de 72. saatlerde demetilasyon bandı görüldü. 48. saatte 72. saate kıyasla daha kalın ve parlak bant ürünü gözlemlendi.

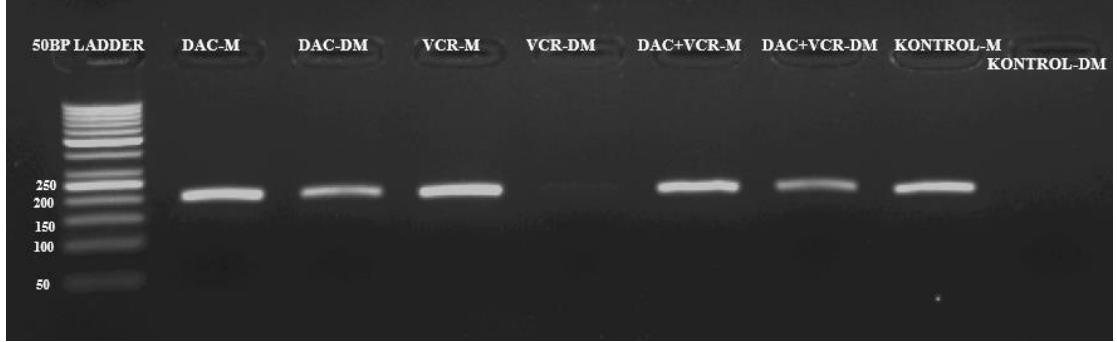
Vincristine uygulaması sonrasında miR9-3 genindeki metilasyon durumuna bakıldığında, kontrole kıyasla hem 48 hem de 72. saatlerde demetilasyonda çok silik bantlar yakalandı. 72. saate kıyasla 48. Saatte daha kalın ve parlak bir bant elde edildi. Her iki saat dilimi için, decitabinee kıyasla demetilasyonun daha az olduğu görüldü.

Vincristine ve decitabine'nin birlikte uygulanması sonrasında miR9-3 genindeki metilasyon durumuna bakıldığında, kontrole kıyasla hem 48 hem de 72. saatlerde demetilasyonda parlak bantlar yakalandı. 72. saate kıyasla 48. Saatte daha kalın ve parlak bir bant elde edildi. 48. saatte yalnızca decitabine uygulanmış hücrelere kıyasla demetilasyon bandının daha parlak olduğu görüldü. 72. saatte ise, yalnızca decitabine uygulanan hücrelerin 72. saatteki demetilasyon bandı ile aynı parlaklık ve kalınlığa sahip olduğu gözlemlendi.

Elde edilen 48. saat jel görüntüsü Şekil 5.26'da, 72. saat jel görüntüsü Şekil 5.27'de gösterilmiştir.



**Şekil 5.26.** MKN45 hücre hattına miR9-3 geninin 48 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)



**Şekil 5.27.** MKN45 hücre hattına miR9-3 geninin 72 saat boyunca decitabine ve vincristine uygulaması sonucu metilasyon ürünleri (DAC-M: decitabine metilasyon bandı, DAC-DM: decitabine demetilasyon bandı, VCR-M: vincristine metilasyon bandı, VCR-DM: vincristine demetilasyon bandı, VCR+DAC-M: vincristine+decitabine metilasyon bandı, VCR+DAC-DM: vincristine+decitabine demetilasyon bandı, KONTROL-M: kontrol metilasyon bandı, KONTROL-DM: kontrol demetilasyon bandı)

## 5.2.4. MKN45 Hücre Hattında Decitabine ve Vincristine Uygulanması ile Elde Edilen Gerçek-Zamanlı PZR Sonuçları

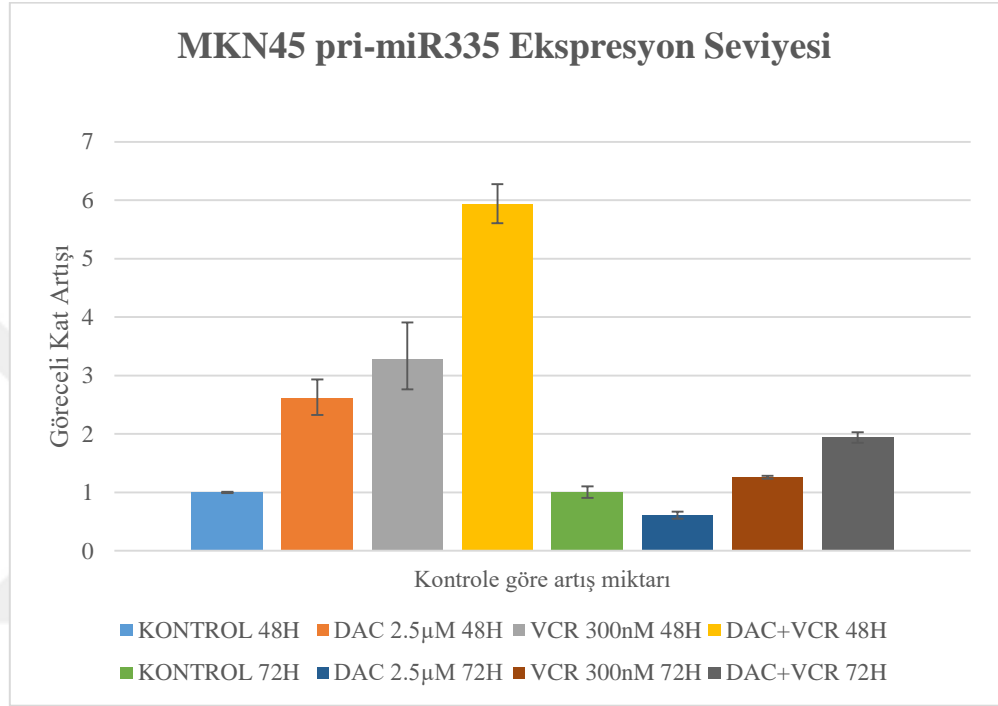
### 5.2.4.1. pri-miR335 Ekspresyon Düzeyi

MKN45 hücrelerine uygulanan 2,5  $\mu$ M decitabine uygulaması sonucunda,  $\beta$ -aktin ile  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu uygulanarak normalize edilen ve ekspresyon seviyesi ölçülen pri-miR335'in ekspresyon seviyesi 48. ve 72. saat için Şekil 5.28'de gösterilmiştir.

Elde edilen ve iki biyolojik ile üç teknik tekrarı yapılan bulgulara göre, 48. saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 2,6 kat artış meydana gelmiştir. 72 saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde ilginç olarak pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 0,6 katlık bir düşüş meydana gelmiştir.

48. saat boyunca vincristine uygulanması neticesinde pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 3,2 katlık bir artış meydana gelmiştir. 72 saat boyunca vincristine uygulanması sonrasında ise pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 1,2 katlık bir artış görülmüştür.

Yine 48 saat boyunca VCR ve DAC birlikte uygulanması sonucunda pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 5,9 katlık bir artış görülmüştür. 72 saat boyunca VCR+DAC uygulaması ile pri-miR335 ekspresyon seviyesinde 1,9 katlık bir artış yakalanmıştır.



Şekil 5.28. Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR335 ekspresyon seviye değişimi

#### 5.2.4.2. pri-miR34a Ekspresyon Düzeyi

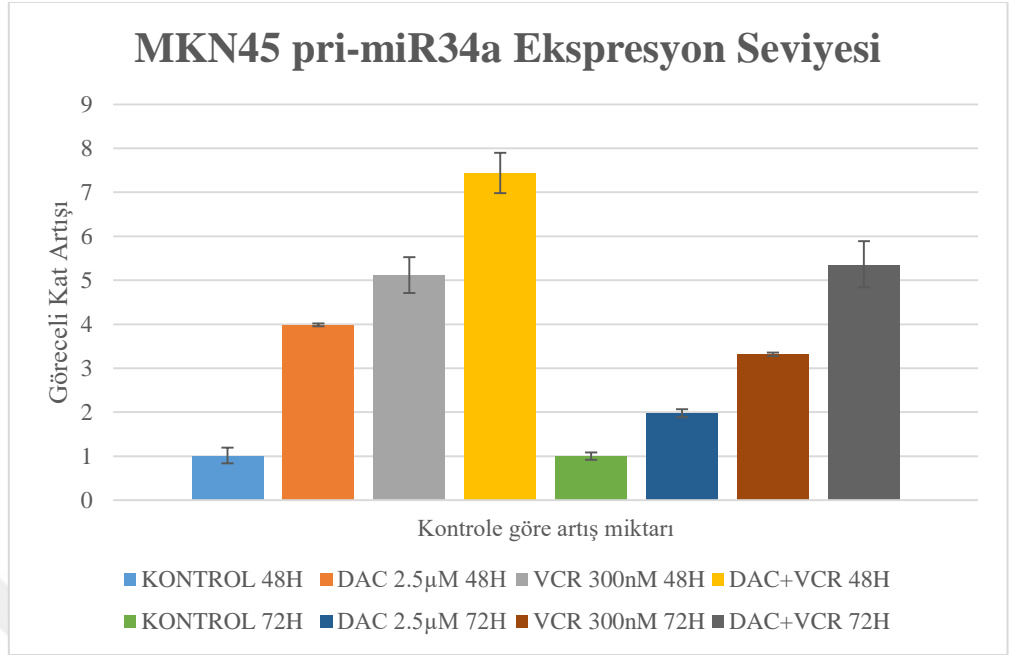
MKN45 hücrelerine uygulanan 2,5 µM decitabine uygulaması sonucunda, β-aktin ile  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu uygulanarak normalize edilen ve ekspresyon seviyesi ölçülen pri-miR34a'nın ekspresyon seviyesi 48. ve 72. saat için Şekil 5.29'da gösterilmiştir.

Elde edilen ve iki biyolojik ile üç teknik tekrarı yapılan bulgulara göre, 48. saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 4 kat artış meydana gelmiştir. 72 saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 2 katlık bir artış meydana gelmiştir.

48. saat boyunca vincristine uygulanması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 5,1 katlık bir artış meydana gelmiştir. 72 saat boyunca vincristine uygulanması sonrasında ise pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 3,3 katlık bir artış görülmüştür.

Yine 48 saat boyunca VCR ve DAC birlikte uygulanması sonucunda pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 7,4 katlık bir artış görülmüştür. 72 saat boyunca

VCR+DAC uygulaması ile pri-miR34a ekspresyon seviyesinde 5,3 katlık bir artış yakalanmıştır.



Şekil 5.29. Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR34a ekspresyon seviye değişimi

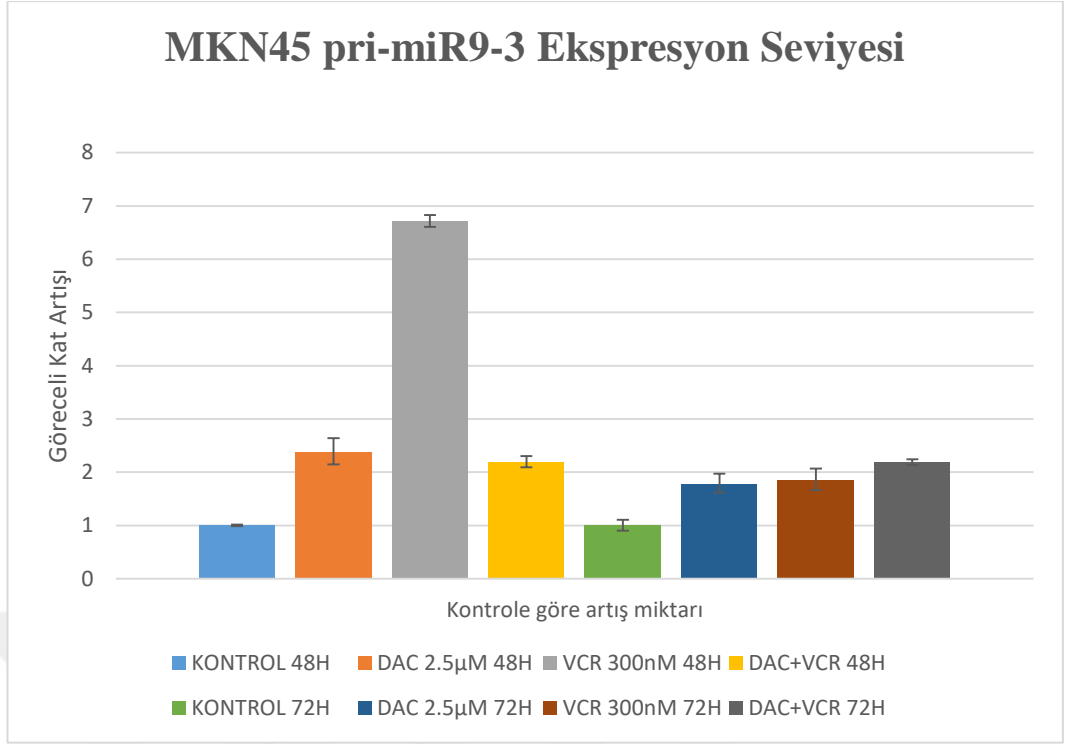
#### 5.2.4.3. pri-miR9-3 Ekspresyon Düzeyi

. AGS hücrelerine uygulanan 2,5 µM decitabine uygulaması sonucunda, β-aktin ile  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu uygulanarak normalize edilen ve ekspresyon seviyesi ölçülen pri-miR9-3'ün ekspresyon seviyesi 48. ve 72. saat için Şekil 5.30'da gösterilmiştir.

Elde edilen ve iki biyolojik ile üç teknik tekrarı yapılan bulgulara göre, 48. saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 2,3 kat artış meydana gelmiştir. 72 saat boyunca decitabine uygulanması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 1,7 katlık bir artış meydana gelmiştir.

48. saat boyunca vincristine uygulanması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 6,7 katlık bir artış meydana gelmiştir. 72 saat boyunca vincristine uygulanması sonrasında ise pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 1,8 katlık bir artış görülmüştür.

Yine 48 saat boyunca VCR ve DAC birlikte uygulanması sonucunda pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 2,1 katlık bir artış görülmüştür. 72 saat boyunca VCR+DAC uygulaması ile pri-miR9-3 ekspresyon seviyesinde 2,1 katlık bir artış yakalanmıştır.



**Şekil 5.30.** Gerçek zamanlı PZR ile MKN45 hücre hattına 48 ve 72 saat boyunca DAC ve VCR uygulaması neticesinde pri-miR9-3 ekspresyon seviye değişimi

Bulguların özeti, 48. saat için Tablo 5.1’de ve 72. saat için Tablo 5.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.1.** Elde edilen 48 saat bulguları

			AGS	MKN45
VCR	GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ	Pri-miR335	0,8 kat azalma	3,2 kat artma
		Pri-miR34a	1,09 kat artma	5,1 kat artma
		Pri-miR9-3	2,4 kat artma	6,7 kat artma
	METİLASYON SPESİFİK PZR İLE METİLASYON DURUMU	miR335	Demetilasyon yok Metilasyon var	Demetilasyon yok Metilasyon var
		miR34a	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR9-3	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon yok Metilasyon var
			AGS	MKN45
DAC	GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ	Pri-miR335	2-3 kat artma	2,6 kat artma
		Pri-miR34a	1,7 kat artma	4 kat artma
		Pri-miR9-3	2,1 kat artma	2,3 kat artma
	METİLASYON SPESİFİK PZR İLE DEMETİLASYON DURUMU	miR335	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR34a	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR9-3	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
			AGS	MKN45
DAC+VCR	GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ	Pri-miR335	2,4 kat artma	5,9 kat artma
		Pri-miR34a	1,5 kat artma	7,4 kat artma
		Pri-miR9-3	2,3 kat artma	6,7 kat artma
	METİLASYON SPESİFİK PZR İLE DEMETİLASYON DURUMU	miR335	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR34a	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR9-3	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var

**Tablo 5.2.** Elde edilen 72 saat sonuçları

			AGS	MKN45
VCR	GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ	Pri-miR335	0,7 kat azalma	1,2 kat artma
		Pri-miR34a	1,3 kat artma	3,3 kat artma
		Pri-miR9-3	1,8 kat artma	1,8 kat artma
	METİLASYON SPESİFİK PZR İLE METİLASYON DURUMU	miR335	Demetilasyon yok Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR34a	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR9-3	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon yok Metilasyon var
			AGS	MKN45
DAC	GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ	Pri-miR335	1,01 kat artma	0,6 kat azalma
		Pri-miR34a	0,9 kat azalma	2 kat artma
		Pri-miR9-3	2,2 kat artma	1,7 kat artma
	METİLASYON SPESİFİK PZR İLE DEMETİLASYON DURUMU	miR335	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR34a	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR9-3	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
			AGS	MKN45
DAC+VCR	GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLE GÖRE EKSPRESYON DEĞİŞİMİ	Pri-miR335	0,8 kat azalma	1,9 kat artma
		Pri-miR34a	1,5 kat artma	5,3 kat artma
		Pri-miR9-3	4,3 kat artma	2,1 kat artma
	METİLASYON SPESİFİK PZR İLE DEMETİLASYON DURUMU	miR335	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR34a	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var
		miR9-3	Demetilasyon var Metilasyon var	Demetilasyon var Metilasyon var

## 6. TARTIŞMA

Mide kanseri dünyada yüksek insidans gösteren agresif bir hastalıktır. Kanser oluşumu ve gelişiminde genetik faktörlerin yanısıra epigenetik faktörler de etkilidir. Epigenetik değişiklikler DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA müdahalesi ile susturmayı kapsar (Egger ve diğ., 2004).

Kanserde mevcut kalıcı genetik değişikliklerin aksine, epigenetik mekanizmaların geri-dönüştürülebilir özellik taşıması nedeniyle, klinikte epigenetik terapi denilen yeni bir kavram öne sürülmüştür. Bu terapiye göre, hipermetilasyonla susturulan tümör baskılayıcı genlerin demetile edilmesi ve yeniden ekspresyonlarının sağlanması hedeflenmektedir (Szyf, 2005).

miRNA'ların gen düzenlemesine direkt olarak katılmasından ötürü, birçok miRNA mide kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Cowland ve diğ., 2007). Bu miRNA'lardan miR335, miR34a ve miR9-3 tümör baskılayıcı özelliği gösterir ve hipermetilasyon yoluyla mide kanserinde susturulduğu literatürde gösterilmiştir ve bu sebepten bu çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir (Loginov ve diğ., 2016; Lodygin ve diğ., 2008; Zhang ve diğ., 2017).

Mide kanseri patogeneğinde, bu anormal ekspresyonun DNA metilasyonu yoluyla susturulma ve DNA demetilasyonu yoluyla açılma sebebiyle olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Ando ve diğ., 2009). Bu sebeple, mide kanserinde tümör baskılayıcı özellik gösteren miRNA'ların genlerinin metilasyon statüleri önem göstermektedir ve bu tez kapsamında mide kanser patogeneğinde etkili olan miRNA'ların metilasyon statüleri incelenmiştir.

Mide kanserinde kombinasyon tedavisi içerisinde kullanılan vincristine fonksiyonel olarak, mitotik iğler içindeki mikrotübülleri engelleyerek tümör



büyümesini durdurur (Johnson ve diğ., 1963). Vincristine'nin düşük konsantrasyonunun, insan akciğer adenokarsinoma hücrelerinde metillenmiş sitozini düşürdüğü rapor edilmiştir (Nyce, 1989). Ayrıca bu kemoterapötik ilacın mide kanserinde DNA metilasyonuna etkisiyle ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca vincristine'nin DNA metilasyonu üzerindeki etkisinin gene özgü olup olmadığı bilinmemektedir.

Çalışmamızda kullanılmak üzere mide adenokarsinoma hücreleri olan AGS ve MKN45 hücreleri seçilmiştir. Her iki hücre hattı da epitel morfolojiye sahiptir. MKN45 hücreleri zayıf olarak farklılaşmış mide adenokarsinomlarından üretilmiştir. AGS hücrelerinin kendini çoğaltma süresi 20 saatken, MKN45 hücrelerinin 30-33 saattir. Her iki hücre hattı da CD44 hücre yüzey markörüne sahiptirler ve kanser kök hücresi profili çizerek farklılaşma sürecine girerek tümörögenezi artırırlar (Takaishi ve diğ., 2009).

Bu bağlamda yapılan çalışmada, mide adenokarsinoma hücre hatlarına global demetilasyon ajanı olan decitabine ve kemoterapötik bir ilaç olan vincristine'in tek başına veya kombine şekilde maruziyetlerini takiben; mide kanserinde hipermetile halde olan, düşük ekspresyon gösteren ve tümör baskılayıcı özellikte olan miR335, miR34a ve miR9-3 genlerinin metilasyon durumları saate bağlı olarak incelenmiş ve ekspresyon profillerindeki değişim kantitatif olarak gösterilmiştir.

AGS ve MKN45 hücre hatlarına uygulanan vincristine ve decitabine'nin sitotoksik etkisinin belirlenmesi için, yapılan MTT testinde, MKN45 hücre hattında 48. saatte decitabine'nin bütün dozlarında hücre yaşayabilirliğinde artış görülmüştür. MKN45 hücrelerinin kendilerini eşleme süreleri 30-33 saat olduğundan, ve decitabine etkisini hücrenin S fazında gösterdiğinden, nükleosid analogunun DNA'ya dahil olduktan sonra, ilave decitabine ürünlerinin proteozom tarafından bozunması gerçekleşir ve bundan sonra DNA tekrar eski haline dönerek DNMT yokluğunda DNA sentezini sürdürmüş olur. Bu sebepten, 48. saatteki uygulanan bütün dozlarda decitabine sitotoksik bir etki göstermemiş olabilir ve stabilizasyonunu kaybeden bu ajan proteozom tarafından degrade edilmiş ve hücre toksik etkiden kurtulmuş olabilir. Bu bağlamda, seçilen 2,5 µM konsantrasyonu hem AGS hem de MKN45 hücreleri için sitotoksisite açısından uygundur ve literatür bilgisiyle de desteklenmektedir (Loginov ve diğ., 2016; Lodygin ve diğ., 2008; Zhang ve diğ., 2017).

Hem AGS hem de MKN45 hücrelerinde 48. ve 72. saatlerinde 300 nM vincristine konsantrasyonunda hücre yaşayabilirliği daha düşük konsantrasyonlara kıyasla kurtarılmıştır, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda yaşayabilirlikte daha fazla düşüş görülmüştür ve bu istatistiki olarak anlamlıdır. Bu sebepten 100, 200 ve 300 nM vincristine uygulanmış AGS ve MKN45 hücrelerindeki miRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve 300 nM konsantrasyonunda diğerlerine kıyasla daha yüksek ekspresyon düzeyi görülmüştür (data burada gösterilmemiştir). Ekspresyon düzeyleri incelenen miRNA'ların tümör baskılayıcı özellikleri, hücrenin yaşlanmaya yönlendirilmesi ve hücre döngüsünün bastırılması yönünde özellikle etki gösterdiğinden, hücrelerin kendilerini kurtarma yönüne gittikleri doz ve saat aralığı seçilmiştir.

Bu tez kapsamında bakılmış olan miR34a, miR335 ve miR9-3'ün tümör baskılayıcı özelliklerinden ötürü, mide kanserinde düşük ekspresyon gösterdikleri ve anormal DNA metilasyonuna uğradıkları gösterilmiştir (Tang ve diğ., 2015; Zhang ve diğ., 2015; Tsai ve diğ., 2011). Elde ettiğimiz bulgulara göre miR335 ve miR9-3 normal koşullarda hipermetile haldedir. miR34a'da ise hem metilasyon hem de demetilasyonun görülmektedir.

AGS hücre hattında, decitabine uygulanan hücrelerde miR335 geninde demetilasyon gerçekleşmiştir. 72. saatte gerçekleşen demetilasyonun 48. saatteki demetilasyon sonucuna kıyasla daha az olduğundan, decitabine'nin düşük stabilizasyonundan ötürü, zaman geçtikçe stabilizasyon kaybı yaşanmasından kaynaklı olabilir. Ayrıca hücreler deney başında senkronize edilmediği için hücrelerin tamamının S fazında olamayacağından, uygulanan decitabine bütün hücrelere aynı etkiyi göstermemiş olabilir. AGS hücre hattına 48 ve 72 saatleri boyunca vincristine uygulanması neticesinde vincristine'nin AGS hücrelerinde, miR335 geninde metilasyonu indüklediği ve böylece pri-mir335 ekspresyonunu düşürdüğü, hem metilasyon analizi hem de ekspresyon analizinde görülmektedir. Bu durum akciğer adenokarsinomlarında vincristine'nin metilasyonu arttırdığı bulgusunu desteklemektedir (Nyce, 1989). AGS hücre hattına 48 ve 72 saatleri boyunca decitabine ve vincristine birlikte uygulanması ile alınan sonuçlarda, metilasyon veya demetilasyonun indüklenmesinde VCR ve DAC'ın yarışmalı metilasyon paterni ortaya çıkarttığını düşündürmektedir. Literatürde bununla ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır.

AGS hücre hattında miR34a geninde hiçbir şey uygulanmamış kontrol hücrelerinde metilasyon ve demetilasyon durumları birlikte görülmektedir. AGS hücre hattına 48 ve 72 saatleri boyunca DAC, VCR, DAC+VCR uygulanması neticesinde her iki saat diliminde miR34a geninde metilasyon ve demetilasyon birlikte görülmüştür. Bu sebepten, deney grupları arasındaki demetilasyon patern farklılıklarının analizi ancak gerçek-zamanlı metilasyon spesifik PZR yapılarak kantitatif olarak gösterilebilir.

Yalnız DAC uygulanan AGS hücrelerinde 48. saatte kontrole kıyasla pri-miR34a ekspresyonunda artış meydana gelirken, 72. saatte ekspresyonda azalma görülmüştür. Bu durum yine DAC'ın stabilizasyonunun kaybıyla ve bütün hücrelerin S fazında olamamasıyla açıklanabilir. Bu durum, pri-miR34a ekspresyonunu indükleyen p53 ve p53 sinyal yollarıyla ilişkili de olabilir. Bu anlamda, ekspresyonu etkileyebilecek diğer epigenetik değişikliklerle birlikte, transkripsiyonun düzenlenmesini sağlayan sinyal yollarına bakılmalıdır. Yalnız VCR uygulanan AGS hücrelerinde hem 48 hem de 72. saatlerde kontrole kıyasla pri-miR34a ekspresyonunda artış meydana gelmiştir. Ancak metilasyon spesifik PZR sonuçlarına göre kantitatif olarak kıyaslamak ne yazık ki mümkün olmadığından, VCR'nin bu ekspresyon artışını demetilasyon yolu ile mi yoksa diğer hücre içi mekanizmaların VCR uygulaması neticesinde değişerek ilgili genin ekspresyonunu etkileyerek mi yaptığı ile ilgili yorum yapılamamaktadır. Hem DAC hem de VCR uygulanan AGS hücrelerinde hem 48 hem de 72. saatlerde elde edilen pri-miR34a ekspresyon sonuçları hem kontrole, hem yalnız DAC ve yalnız VCR uygulanan gruplarla kıyaslandığında uyumludur.

AGS hücre hattında miR9-3 geninde, 48 ve 72 saatleri boyunca DAC uygulanması neticesinde her iki saat diliminde hiçbir şey uygulanmamış kontrole kıyasla miR9-3 geninde demetilasyon gerçekleşmiştir. Ancak 72. saatte gerçekleşen demetilasyon, 48. saattekine kıyasla daha az parlak bir bant paterni vermiştir. Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına bakıldığında pri-miR9-3 ekspresyonu kontrol hücrelerine kıyasla her iki saat diliminde artış göstermiştir. Bu durum literatür ile uyumludur (Tsai ve diğ., 2011).

AGS hücre hattına yalnızca VCR uygulandığında, VCR'nin miR9-3 geni üzerinde demetilasyonu indüklediği gösterilmiştir. Bu demetilasyon vincristine

etkisiyle direkt olarak gerçekleşmiş olabileceği gibi (örneğin DNMT'lerin vincristine sonucu inhibisyonu veya histon modifiye edici proteinlerin inhibisyonu gibi), direkt olmayan hücre içi mekanizmalarla (örneğin miR9-3 ekspresyonunu indükleyen MYC onkoproteinlerinin miR9-3 gen lokusunda etki göstermesi ile) da gerçekleşmiş olabilir. AGS hücre hattına hem VCR hem de DAC birlikte uygulandığında, her iki saat diliminde metilasyon spesifik PZR işlemiyle demetilasyon bantlarına rastlanmıştır. Gerçek zamanlı PZR işlemlerine bakıldığında, 48. saatteki pri-miR9-3 ekspresyon artışı, 72. saatteki ekspresyon artışına kıyasla daha azdır ve bu sonuçlar deney grupları kendi aralarında kıyaslandığında birbiriyle uyumludur.

MKN45 hücre hattına 48 ve 72 saatleri boyunca DAC uygulanması neticesinde her iki saat diliminde hiçbir şey uygulanmamış kontrole kıyasla miR335 geninde demetilasyon gerçekleşmiştir. Demetilasyon olmasına rağmen, 72. saatte gerçekleşen ekspresyon düşüşü, gen üzerinde farklı modifikasyonların gerçekleştiğini işaret edebilir. Dolayısıyla ileriki çalışmalarda bu saat diliminde gerçekleşen bu ekspresyon azalmasının sebepleri araştırılabilir. Yalnız VCR uygulanması neticesinde her iki saat diliminde hiçbir şey uygulanmamış kontrole kıyasla, 48. saatte miR335 geninde demetilasyon gerçekleşmezken, 72. saatte demetilasyon gerçekleşmiştir. Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına bakıldığında 48. saatte pri-miR335 ekspresyonu kontrole kıyasla ve 72. saate kıyasla daha fazla artmıştır. 48 ve 72. saatler kendi aralarında kıyaslandığında demetilasyon bandı 72. saatte olmasına rağmen ekspresyon artışı 48. saate kıyasla daha az gerçekleşmiştir. Dolayısıyla pri-miR335'in ilerleyen zamanda vincristine indüklenmesiyle farklı hücre içi moleküler mekanizmalarla ekspresyonunun azaltılmış olabileceği düşünülmektedir. DAC ve VCR birlikte uygulanması neticesinde her iki saat diliminde hiçbir şey uygulanmamış kontrole kıyasla miR335 geninde demetilasyon gerçekleşmiştir. Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına bakıldığında ise, her iki saat diliminde pri-miR335 ekspresyonunda artış görülmesi yalnız VCR uygulanmış deney grubuyla karşılaştırıldığında uyumluluk gösterir.

AGS hücrelerinde olduğu gibi, MKN45 hücre hattında da, miR34a geni üzerinde, hiçbir şey uygulanmamış kontrol hücrelerinde metilasyon ve demetilasyon durumları birlikte görülmektedir. Bu sebepten, deney grupları arasındaki demetilasyon patern farklılıklarının analizi ancak gerçek-zamanlı metilasyon spesifik PZR yapılarak kantitatif olarak gösterilebilir. DAC, VCR, DAC+VCR uygulanması neticesinde her

iki saat diliminde ve her bir ilaç uygulamasında pri-miR34a ekspresyonunda artış görülmüştür. Bu sonuca göre, MKN45 hücre hattına uygulanan VCR demetilasyonu sağlamış ve neticesinde gen ekspresyonu artmıştır. Global DNA metilasyon inhibitörü olan DAC, MKN45 hücrelerinin kendilerini katlama zamanına uygun olarak her iki saat diliminde de demetilasyonu sağlayarak ekspresyonu arttırma yönüne gitmiştir.

MKN45 hücre hattında miR9-3 geninde, hiçbir şey uygulanmamış kontrol hücrelerinde metilasyon durumu görülürken; demetilasyon durumu görülmemektedir. Yalnız DAC uygulanması neticesinde elde edilen verilerde, demetilasyon paternleri ile ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki birbirleriyle uyumludur. Yalnız VCR uygulaması sonrasında her iki saat dilimi için, decitabine'e kıyasla demetilasyonun daha az olduğu görülmüştür. Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına bakıldığında pri-miR9-3 ekspresyonu kontrol hücrelerine kıyasla her iki saat diliminde artış göstermekle birlikte, 48. saatte 72. saate kıyasla pri-mir9-3 ekspresyonu daha fazla artmıştır. Bu sonuçlar demetilasyon paternleriyle uyumludur. DAC ve VCR birlikte uygulanması neticesinde her iki saat diliminde hiçbir şey uygulanmamış kontrole kıyasla miR9-3 geninde demetilasyon gerçekleşmiştir ve bant parlaklıkları aynıdır. Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına bakıldığında pri-miR9-3 ekspresyonu kontrol hücrelerine kıyasla her iki saat diliminde aynı artış miktarını göstermiştir. Bu veriler demetilasyon paternleriyle uyumludur.

Özetle, MKN45 ve AGS mide kanser hücre hattında yapılan bu çalışma ile epigenetik mekanizma içerisine dahil olup gen ifadesinin susturulmasında görev alan miRNA'ların ve genlerinin nasıl epigenetik modifikasyona uğradığı gösterilmiştir. Bunun yanısıra mide kanser tedavisinde kullanılan vincristine'nin, bu epigenetik değişikliklere nasıl etki ettiğinin incelemesi yapılmıştır. Her iki hücre hattında da bakılan miRNA genlerinin demetilasyon paternleri birbirlerinden farklılık göstermektedir. Demetilasyon tayini için kullanılan geleneksel PZR yerine, metilasyon statülerinin miktarını görebilmek adına gerçek-zamanlı PZR kullanılarak metilasyon inhibisyonu kantitatif olarak ölçülebilir. Demetilasyonun görüldüğü ancak, ekspresyonun azaldığı zaman aralıklarında, ilgili genlerin susturulmasına sebep olabilecek diğer hücre içi mekanizmalar ve epigenetik değişiklikler incelenmelidir.

Gen susturma, DNA metiltransferazlar kadar; histon deasetilazlar, metile CpG adalarına bağlanan proteinler ve kromatini yeniden düzenleyen moleküller gibi pek

çok farklı mekanizmanın bir arada çalışmasıyla gerçekleşen bir epigenetik değişimdir. Dolayısıyla DNMT'lerin inhibe edilmesine bağlı olarak DNA'da hipometilasyon gerçekleşse bile, bu hipometilasyon kendini her zaman genin ekspresyonunda artış şeklinde göstermez. Çünkü gen ekspresyonu için DNA'nın metilasyon durumu kadar, DNA'nın bulunduğu kromatin yapısının da transkripsiyon faktörlerinin rahatça ulaşabileceği bir konumda olması gerekir.

DNA demetilasyonu çalışmaları ile ilgili önemli konulardan biri de uygun yöntemin seçilmesidir. 5-Aza dC gibi bir demetilasyon ajanı hücreye verildiğinde global demetilasyon yapabilir. Dolayısıyla istenilen bölgede demetilasyon yapıp yapmadığını görmek için sadece ekspresyon düzeylerine bakılması doğru bir yaklaşım olmaz. Promotör bölgelerinde bulunan CpG adacıklarının bölgede tek bir bölgede toplanmamış olması, birden fazla CpG adacıklarında görülen metilasyonların ve demetilasyonların genin açılıp kapanmasına etkisi ekspresyon düzleminde farklı olabilir. Çalışmada kullanılan metilasyon spesifik PZR işlemi, belirli bir CpG adacığını hedef almıştır ve demetilasyona kıyasla ters bir orantı gösteren ekspresyon değişiklikleri, aynı promotör bölgesindeki farklı CpG adacıklarındaki metilasyon paternleriyle ilintili olabilir. Bu nedenle bisülfid reaksiyonu sonrası sekanslama, metilasyona spesifik restriksiyon enzimlerini kullanma gibi direkt olarak DNA'yı hedef alan tekniklerle çalışmak, demetilasyon sonuçlarını doğru yorumlama yönünde daha faydalı olabilir. Ayrıca ilgili miRNA'ların ekspresyonlarını düzenleyen protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonları incelenerek, bu miRNA'ların ekspresyon profillerinin gen metilasyonu yoluyla mı yoksa ekspresyonu indükleyen veya inhibe eden bu genler tarafından mı yapıldığı belirlenebilir. Bunun yanısıra, bakılan pri-miRNA'ların olgun miRNA ekspresyon profilleri incelenerek gen susturulmasına olan etkisi, hedef mRNA'ların ekspresyon seviyelerinin de incelenmesiyle gerçekleştirilebilir.

## 7. KAYNAKLAR

Allis David C., Jenuwein Thomas, Reinberg Danny. (2007). Epigenetics (1. baskı) içinde 191-204. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Ambros V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*. Sep 16;431(7006):350-5.

Ando T, Yoshida T, Enomoto S. (2009) DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int. J. Cancer* 124(10), 2367–2374.

Aravin A.A., Sachidanandam R., Girard A., Fejes-Toth K., Hannon GJ. (2007) Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*. May 4;316(5825):744-7.

Baylin SB. (2005) DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. Dec;2 Suppl 1:S4-11.

Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. (1988) Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol*. Oct 20;203(4):971-83.

Biggers J.D., Curnow D.H.. (1954) Oestrogenic activity of subterranean clover. I. The oestrogenic activity of genistein, *Biochem. J*. 58. 278-282.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. Feb;10(2):185-91.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. (2006) RNA polymerase III transcribes human

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1097-101.

Brameier, M., Herwig, A., Reinhardt, R., Walter, L., & Gruber, J. (2011). Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic Acids Research*, 39(2), 675–686.

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*. Apr 4;113(1):25-36.

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005) Principles of microRNA-target

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. Mar;3(3):e85.

Brueckner B., Rius M., Markelova M. R., Fichtner I., Hals P.A., Sandvold M.L., Lyko F. (2010) Delivery of 5-azacytidine to human cancer cells by elaidic acid esterification increases therapeutic drug efficacy, *Mol. Cancer Ther.* 9. 1256-1264.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* Dec;10(12):1957-66. Epub 2004 Nov 3.

Cao W, Yang W, Fan R, Li H, Jiang J, Geng M, Jin Y, Wu Y. (2014) miR-34a regulates cisplatin-induced gastric cancer cell death by modulating PI3K/AKT/survivin pathway. *Tumour Biol.* Feb;35(2):1287-95.

Carcas, L. P. (2014). Gastric cancer review. *Journal of Carcinogenesis*, 13, 14.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* Jan 2;303(5654):83-6.

Chen T. ve Li E. (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol.* 60:55-89.

Chen T., Hevi S., Gay F., Tsujimoto N., He T., Zhang B., Ueda Y., Li E.. (2007) Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells, *Nat. Genet.* 39, 391-396.

Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, Liu Z. (2010) Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg.* Jul;14(7):1170-9.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* Aug 4;436(7051):740-4.

Chik F., Szyf M.. (2011) Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors, *Carcinogenesis* 32, 224-232.

Chim C.S., Wong A.S., Kwong Y.L.. (2003) Epigenetic inactivation of INK4/CDK/RB cell cycle pathway in acute leukemias, *Ann. Hematol.* 82, 738-742.

Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, Lund AH. (2010) p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ.* Feb;17(2):236-45.

Chuang J.C., Warner S.L., Vollmer D., Vankayalapati H., Redkar S., Bearss D.J., Qiu X., Yoo C.B., Jones P.A. (2010) S110, a 5-Aza-20-deoxycytidine-containing dinucleotide, is an effective DNA methylation inhibitor in vivo and can reduce tumor growth, *Mol. Cancer Ther.* 9. 1443-1450.

Comis RL, Carter SK. (1974) A review of chemotherapy in gastric cancer. *Cancer.* Nov;34(5):1576-86.

Constantinides P.G., Jones P.A., Gevers W. (1977) Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment, *Nature* 267. 364-366.



- Costa, P. M., & Pedroso de Lima, M. C. (2013). MicroRNAs as Molecular Targets for Cancer Therapy: On the Modulation of MicroRNA Expression. *Pharmaceuticals*, 6(10), 1195–1220.
- Cowland JB, Hother C, Grønbaek K. (2007) MicroRNAs and cancer. *APMIS*. Oct;115(10):1090-106. Review.
- Daskalakis M., T.T. Nguyen, C. Nguyen, P. Guldborg, G. Kohler, P. Wijermans, P.A. Jones, M. Lubbert. (2002) Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-20-deoxycytidine (decitabine) treatment, *Blood* 100, 2957-2964.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. Nov 11;432(7014):231-5.
- Derissen, E. J. B., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2013). Concise Drug Review: Azacitidine and Decitabine. *The Oncologist*, 18(5), 619–624.
- Du T, Zamore PD. (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*. Nov;132(21):4645-52.
- Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R. (2008) miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*. May;14(5):872-7.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. May 27;429(6990):457-63.
- Enecards, 2017. Erişim Tarihi: 03.12.2017; <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR9-3>.
- Espada J., Esteller M.. (2010) DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment, *Semin. Cell Dev. Biol.* 21. 238-246.
- Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. (2011) Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res*. Dec 1;717(1-2):85-90.
- Fan H, Liu D, Qiu X. (2010). A functional polymorphism in the DNA methyltransferase-3A promoter modifies the susceptibility in gastric cancer but not in esophageal carcinoma. *BMC Med.* 8, 12.
- Fang M.Z., Chen D., Sun Y., Jin Z., Christman J.K., Yang C.S.. (2005) Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy, *Clin. Cancer Res.* 11, 7033-7041.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H (2012). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in. *Eur J Cancer*. 2013;49:1374–403.
- Förstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, Klattenhoff C, Theurkauf WE, Zamore PD. (2005) Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol*. Jul;3(7):e236. Epub 2005 May 24.
- Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, (2014) Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-

oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): An international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 383:31–9.

Fukuda, M., Umeno, H., Nose, K., Nishitarumizu, A., Noguchi, R., & Nakagawa, H. (2017). Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing. *Scientific Reports*, 7, 41478.

Galeotti F., Barile E., Curir P., Dolci M., Lanzotti V. (2008) Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity, *Phytochem. Lett.* 1. 44-48.

Gaudet F., Hodgson J.G., Eden A., Jackson-Grusby L., Dausman J., Gray J.W., Leonhardt H., Jaenisch R.. (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation, *Science* 300, 489-492.

Genecards, 2017. Erişim Tarihi: 01.12.2017; <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR148A#function>.

Genecards, 2017. Erişim Tarihi: 03.12.2017; <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR335>.

Genecards. (2017). Erişim Tarihi: 03.12.2017, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR34A>.

Gore S.D., Baylin S., Sugar E., Carraway H., Miller C.B., Carducci M., Grever M., Galm O.. (2006) Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms, *Cancer Res.* 66, 6361-6369.

Gravalos C, Jimeno A. (2008) HER2 in gastric cancer: A new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol.* 19:1523–9.

Gravina G.L., Festuccia C., Marampon F., Popov V.M., Pestell R.G., Zani B.M., Tombolini V. (2010) Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation, *Mol. Cancer* 9. 305.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* Nov 18;123(4):631-40.

Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdmann A, Gregoire JM, Ausseil F, Vispé S, Arimondo PB. (2012) DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie.* Nov;94(11):2280-96.

Guo, S.-L., Peng, Z., Yang, X., Fan, K.-J., Ye, H., Li, Z.-H., ... Yang, X. (2011) miR-148a Promoted Cell Proliferation by Targeting p27 in Gastric Cancer Cells. *International Journal of Biological Sciences*, 7(5), 567–574.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* Dec 15;18(24):3016-27.

Hangauer MJ, Vaughn IW, McManus MT. (2013) Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genet.* Jun;9(6):e1003569.

Hansen R.S., Wijmenga C., Luo P., Stanek A.M., Canfield T.K., Weemaes C.M., Gartler S.M.. (1999) The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96. 14412-14417.

He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. Jun 9;435(7043):828-33.

Hendrich, B. ve Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6538–6547.

Herman JG, Baylin SB. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. Nov 20;349(21):2042-54.

Hermann A., Gowher H., Jeltsch A. (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases, *Cell. Mol. Life Sci.* 61. 2571-2587.

Hollenbach P.W., Nguyen A.N., Brady H., Williams M., Ning Y., Richard N., Krushel L., Aukerman S.L., Heise C., MacBeth K.J.. (2010) A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines, *PLoS One* 5, 9001.

Hu J, Fan H, Liu D, Zhang S, Zhang F, Xu H. (2010) DNMT3B promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* 55(4), 1011–1016.

Hu XT, He C. (2011) Recent progress in the study of methylated tumor suppressor genes in gastric cancer. *Chin. J. Cancer*.

Hudis CA. (2007) Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med.* 357:39–51.

Hummel R, Watson DI, Smith C, Kist J, Michael MZ, Haier J, Hussey DJ. (2011) Mir-148a improves response to chemotherapy in sensitive and resistant oesophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cells. *J Gastrointest Surg.* Mar;15(3):429-38.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. Aug 3;293(5531):834-8.

Hutvagner G, Zamore PD. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. Sep 20;297(5589):2056-60. Epub 2002 Aug 1.

Iida T., Suetake I., Tajima S., Morioka H., Ohta S., Obuse C., Tsurimoto T.. (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA, *Genes Cells* 7, 997-1007.

Irmak-Yazicioglu MB. (2016) Mechanisms of MicroRNA Deregulation and MicroRNA Targets in Gastric Cancer. *Oncol Res Treat.* 39(3):136-9.

Issa J.P., Garcia-Manero G., Giles F.J., Mannari R., Thomas D., Faderl S., Bayar E.. (2004) Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-20-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies, *Blood* 103, 1635-1640.

Jia D., Jurkowska R.Z., Zhang X., Jeltsch A., Cheng X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation, *Nature* 449. 248-251.

Johnson Is, Armstrong Jg, Gorman M, Burnett Jp Jr. (1963) The Vinca Alkaloids: A New Class Of Oncolytic Agents. *Cancer Res.* Sep;23:1390-427.

- Jones P.A., Liang G. (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained, *Nat. Rev. Genet.* 10. 805-811.
- Jones P.A., Taylor S.M. (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation, *Cell* 20. 85-93.
- Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S. (2001) DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and pericentromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int. J. Cancer* 91(2), 205–212.
- Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Gingeras TR. (2007) RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*. Jun 8;316(5830):1484-8.
- Khew-Goodall Y, Goodall GJ. (2010) Myc-modulated miR-9 makes more metastases. *Nat Cell Biol.* Mar;12(3):209-11.
- Kim YK, Kim VN. (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* Feb 7;26(3):775-83. Epub 2007 Jan 25.
- Kouzarides T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev.* Apr;12(2):198-209. Review. Erratum in: *Curr Opin Genet Dev* 2002 Jun;12(3):371.
- Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4):693-705.
- Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. (2008) Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*; 68:2094–105.
- Kristensen L.S., Nielsen H.M., Hansen L.L.. (2009) Epigenetics and cancer treatment, *Eur. J. Pharmacol.* 625. 131-142.
- Krol J, Krzyzosiak WJ. (2004) Structural aspects of microRNA biogenesis *IUBMB Life*; 56(2):95-100.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) Identification of novel Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8.
- Lan J., Hua S., He X., Zhang Y.. (2010) DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 42, 243-252.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. Oct 26;294(5543):858-62.
- Lauren P. (1965) The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.*64:31–49.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. Dec 3;75(5):843-54.

- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. Jan 14;120(1):15-20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. Dec 26;115(7):787-98.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):787-98.
- Li H, Xie S, Liu M, Chen Z, Liu X, Wang L, Li D, Zhou Y. (2014) The clinical significance of downregulation of mir-124-3p, mir-146a-5p, mir-155-5p and mir-335-5p in gastric cancer tumorigenesis. *Int J Oncol*. Jul;45(1):197-208.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. Feb 17;433(7027):769-73.
- Liu HS, Xiao HS. (2014) MicroRNAs as potential biomarkers for gastric cancer. *World J Gastroenterol*. Sep 14;20(34):12007-17.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. Jun 9;435(7043):834-8.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389(6648):251-60.
- Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M. (2008) A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 9;105(36):13556-61.
- Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, Casado S. (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced micro-RNA in human cancer cells. *Cancer Res*;67:1424-9.
- Luo H, Zhang H, Zhang Z, Zhang X, Ning B, Guo J, Nie N, Liu B, Wu X. (2009) Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. Jun 16;28:82.
- Mani S. ve Herceg Z. (2010) DNA Demethylating Agents and Epigenetic Therapy of Cancer. *Advances in Genetics*, 70:327-340
- Momparler R.L.. (2005) Pharmacology of 5-Aza-20-deoxycytidine (decitabine), *Semin. Hematol*. 42. S9-16.
- Nan, X. ve diğ.. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpGbinding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
- Nyce J. (1989) Drug-induced DNA hypermethylation and drug resistance in human tumors. *Can Res*, 49:5829-5836.
- Ogawa, Y., Sun, B. K. & Lee, J. T. (2008) Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* 320, 1336-1341.

- Okano M., Xie S., Li E.. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases, *Nat. Genet.* 19. 219-220.
- Oue N, Kuraoka K, Kuniyasu H. (2001) DNA methylation status of hMLH1, p16(INK4a), and CDH1 is not associated with mRNA expression levels of DNA methyltransferase and DNA demethylase in gastric carcinomas. *Oncol. Rep.* 8(5), 1085–1089.
- Peng Y, Guo JJ, Liu YM, Wu XL. (2014) MicroRNA-34A inhibits the growth, invasion and metastasis of gastric cancer by targeting PDGFR and MET expression. *Biosci Rep.* Jun 25;34(3).
- Peng Y, Guo JJ, Liu YM, Wu XL. (2014) MicroRNA-34A inhibits the growth, invasion and metastasis of gastric cancer by targeting PDGFR and MET expression. *Biosci Rep.* Jun 25;34(3).
- Piekarz R.L., Bates S.E.. (2009) Epigenetic modifiers: basic understanding and clinical development, *Clin. Cancer Res.* 15. 3918-3926.
- Ponting C.P, Oliver P.L, Reik W. (2009) Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs, *Cell* 136 629-641.
- Pradhan S., Bacolla A., Wells R.D., Roberts R.J.. (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation, *J. Biol. Chem.* 274, 33002-33010.
- Qin T., Jelinek J., Si J., Shu J., Issa J.P.. (2009) Mechanisms of resistance to 5-aza-20-deoxycytidine in human cancer cell lines, *Blood* 113. 659-667.
- Ramalingam P, Palanichamy JK, Singh A, Das P, Bhagat M, Kassab MA, Sinha S, Chattopadhyay P. (2014) Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *RNA.* Jan;20(1):76-87.
- Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, Bentwich Z, Oren M. (2007) Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell.* Jun 8;26(5):731-43.
- Riggs A.D., Xiong Z., Wang L., LeBon J.M. (1998) Methylation dynamics, epigenetic fidelity and X chromosome structure, *Novartis. Found. Symp.* 214. 214-225.
- Robertson K.D., Jones P.A. (2000) DNA methylation: past, present and future directions, *Carcinogenesis* 21, 461-467.
- Rotkrua P, Akiyama Y, Hashimoto Y, Otsubo T, Yuasa Y. (2011) MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells. *Int J Cancer.* Dec 1;129(11):2611-20.
- Sacconi A, Biagioni F, Canu V, Mori F, Di Benedetto A, Lorenzon L, Ercolani C, Di Agostino S, Cambria AM, Germoni S, Grasso G, Blandino R, Panebianco V, Ziparo V, Federici O, Muti P, Strano S, Carboni F, Mottolise M, Diodoro M, Pescarmona E, Garofalo A, Blandino G. (2012) miR-204 targets Bcl-2 expression and enhances responsiveness of gastric cancer. *Cell Death Dis.* Nov 15;3:e423.
- Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell;* 9:435–43.

- Santi D.V., Norment A., Garrett C.E. (1984) Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81. 6993-6997.
- Scarola M, Schoeftner S, Schneider C, Benetti R. (2010) miR-335 directly targets Rb1 (pRb/p105) in a proximal connection to p53-dependent stress response. *Cancer Res.* Sep 1;70(17):6925-33.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* Oct 17;115(2):199-208.
- Sharif J., Koseki H.. (2011) Recruitment of Dnmt1 roles of the SRA protein Np95 (Uhrf1) and other factors, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 101, 289-310.
- Shelanski ML, Wiśniewski H. (1969) Neurofibrillary Degeneration Induced by Vincristine Therapy. *Arch Neurol.* 20(2):199–206.
- Shenouda SK, Alahari SK. (2009) MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* Dec;28(3-4):369-78.
- Shin CM, Kim N, Park JH. (2012) Prediction of the risk for gastric cancer using candidate methylation markers in the non-neoplastic gastric mucosae. *J. Pathol.* 226(4), 654–665.
- Shu, M. Zheng, X. Wu, S. Lu, H. Leng, T. Zhu, W. Yan, G. (2011). Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells. *Molecular Cancer*, 10, 59.
- Slaby O, Laga R, Sedlacek O. (2017) Therapeutic targeting of non-coding RNAs in cancer. *Biochem J.* Dec 14;474(24):4219-4251.
- Smith, M. G., Hold, G. L., Tahara, E., & El-Omar, E. M. (2006). Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 12(19), 2979–2990.
- Sobala, A., & Hutvagner, G. (2013). Small RNAs derived from the 5' end of tRNA can inhibit protein translation in human cells. *RNA Biology*, 10(4), 553–563.
- Sorm F., Vesely J.. (1968) Effect of 5-aza-20-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice, *Neoplasma* 15. 339-343.
- Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. (2003) Identification of Drosophila  
Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of Drosophila MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2003 Dec;1(3):E60. Epub 2003 Oct 13.
- Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X. (2008) Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett*;582:1564–1568.
- Szyf M. (2005) DNA Methylation and Cancer Therapy. Medical Intelligence Unit, Landes Bioscience.

Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S. S. W., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Wang, T. C. (2009). Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 27(5), 1006–1020.

Takashima S., Takehashi M., Lee J., Chuma S., Okano M., Hata K., Suetake I., Nakatsuji N., (2009) Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects, *Biol. Reprod.* 81, 155-164.

Tang, T, Su R, Wang B, Zhang Y. (2015). An integrated approach of predicted miR-34a targets identifies a signature for gastric cancer. *Oncology Letters*, 10(2), 653–660.

Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A and Menses A et al. (2007) Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*; 6: 1586–1593.

Tivnan A, Tracey L, Buckley PG, Alcock LC, Davidoff AM, Stallings RL. (2011) MicroRNA-34a is a potent tumor suppressor molecule in vivo in neuroblastoma. *BMC Cancer*;11:33.

Tobin WE, Sandler G. (1966) Depression of muscle spindle function with vincristine. *Nature*, 212:90–91.

Tsai KW, Liao YL, Wu CW, Hu LY, Li SC, Chan WC, Ho MR, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Huang KH, Lin WC. (2011) Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer. *Epigenetics*. Oct 1;6(10):1189-97.

W.J. Lee, J.Y. Shim, B.T. Zhu. (2005) Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids, *Mol. Pharmacol.* 68, 1018-1030

Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. (2001) DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg*. Jul;234(1):10-20.

Wan HY, Guo LM, Liu T, Liu M, Li X, Tang H. (2010) Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma. *Mol Cancer*. Jan 26;9:16.

Wang K.C, Chang H.Y. (2011) Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs, *Molecular Cell* 43 904-914

Wang M, Gu H, Qian H, Zhu W, Zhao C, Zhang X, Tao Y, Zhang L, Xu W. (2013) miR-17-5p/20a are important markers for gastric cancer and murine double minute 2 participates in their functional regulation. *Eur J Cancer*. May;49(8):2010-21.

Watt, F., Molloy, P.L. (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 2, 1136–1143.

Weber B, Stresmann C, Brueckner B, Lyko F. (2007) Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*. May 2;6(9):1001-5.

X. Yang, F. Lay, H. Han, P.A. Jones. (2010) Targeting DNA methylation for epigenetic therapy, *Trends Pharmacol. Sci.* 31. 536-546.



- Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. (2003) The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol.* Apr 29;13(9):790-5.
- Xu Y, Zhao F, Wang Z, Song Y, Luo Y, Zhang X, Jiang L, Sun Z, Miao Z, Xu H. (2012) MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1. *Oncogene.* Mar 15;31(11):1398-407.
- Yan J, Zhang M, Zhang J, Chen X, Zhang X. (2011) *Helicobacter pylori* infection promotes methylation of *WWOX* gene in human gastric cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408(1), 99–102.
- Yan Z, Xiong Y, Xu W, Gao J, Cheng Y, Wang Z, Chen F, Zheng G. (2012) Identification of hsa-miR-335 as a prognostic signature in gastric cancer. *PLoS One.*;7(7):e40037.
- Yang B, Huang J, Liu H, Guo W, Li G. (2016) miR-335 directly, while miR-34a indirectly modulate survivin expression and regulate growth, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells. *Tumour Biol.* Feb;37(2):1771-9.
- Yang J, Wei X, Wu Q. (2011) Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. *Mol. Med. Report* 4(6), 1139–1143.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*; 304: 594-596
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* Dec 15;17(24):3011-6.
- Yin H, Song P, Su R, Yang G, Dong L, Luo M, Wang B, Gong B, Liu C, Song W, Wang F, Ma Y, Zhang J, Wang W, Yu J. (2016) DNA Methylation mediated down-regulating of MicroRNA-33b and its role in gastric cancer. *Sci Rep.* Jan 5;6:18824.
- Yoo C.B., Jeong S., Egger G., Liang G., Phiasivongsa P., Tang C., Redkar S., Jones P.A. (2007) Delivery of 5-aza-20-deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides, *Cancer Res.* 67. 6400-6408.
- Yoo C.B., Jones P.A. (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5. 37-50.
- Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Yanoma S. (2000) Plasma concentrations of VEGF and bFGF in patients with gastric carcinoma. *Cancer Lett.*153:7–12.
- Zhang JK, Li YS, Zhang CD, Dai DQ. (2017) Up-regulation of CRKL by microRNA-335 methylation is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Cancer Cell Int.* Feb 16;17:28.
- Zhang S, Chen P, Huang Z, Hu X, Chen M, Hu S, Hu Y, Cai T. (2015) Sirt7 promotes gastric cancer growth and inhibits apoptosis by epigenetically inhibiting miR-34a. *Sci Rep.* Apr 10;5:9787.
- Zheng L, Qi T, Yang D, Qi M, Li D, Xiang X, Huang K, Tong Q. (2013) microRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1. *PLoS One.* 8(1):e55719.

Zhu A, Xia J, Zuo J, Jin S, Zhou H, Yao L, Huang H, Han Z. (2012) MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in gastric cancer. *Med Oncol.* Dec;29(4):2701-9.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

FEYZA NUR ARGÜÇ

Telefon: +90 (543) 680 85 47.

E-posta: fnarguc@gmail.com

### **Kişisel Bilgiler**

Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Tarihi: 01.11.1992

Doğum Yeri: Ankara, Türkiye

### **Eğitim Bilgileri**

Yüksek Lisans: 2014-2018 Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Haliç Üniversitesi

(GNO: 3,50/4,00)

Lisans: 2010-2014 Moleküler Biyoloji ve Genetik, Haliç Üniversitesi

(GNO: 3,40/4,00)