T.C.
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

ALX3 GEN PROMOTOR METİLASYONUNUN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA POTANSİYEL BİOMARKER OLARAK İNCELENMESİ

Tuğçe CUYA

Yüksek Lisans Tezi

ALX3 GEN PROMOTOR METİLASYONUNUN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA POTANSİYEL BİOMARKER OLARAK İNCELENMESİ

Tuğçe CUYA

T.C.
BURSAULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

ALX3 GEN PROMOTOR METİLASYONUNUN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA POTANSİYEL BİOMARKER OLARAK İNCELENMESİ

Tuğçe CUYA

0000-0002-1030-6439

Dr.Öğr.Üyesi Elif
UZ YILDIRIM

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA– 2023

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ALX3 GEN PROMOTOR METİLASYONUNUN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA POTANSİYEL BİOMARKER OLARAK İNCELENMESİ

Tuğçe CUYA

BURSAULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM

ALX (Aristeless like homeobox domain) genleri homeobox tipi transkripsiyon faktör ailesi olup ilk kez Drosophila melanogaster'de keşfedilmiştir. ALX3 geninin ekspresyonu, kanser gelişimi ve metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, ALX3 geninin metilasyonu, birçok kanser türünde artmış olarak rapor edilmiştir. DNA metilasyonu, birçok kanser türünde yaygın olarak görülen epigenetik bir değişikliktir ve genlerin ifade edilmesini düzenleyebilir. Birçok kanser türünde, DNA metilasyonunun artması, gen ifadesinde azalmaya neden olur ve kanser gelişimine katkıda bulunabilir. Yapılan kanser çalışmalarından pankreas, meme ve kolon kanseri gibi kanser türlerinde ALX3 ekspresyon düzeyleri azalırken prostat kanserinde böyle bir çalışmaya literatürde henüz rastlanmamıştır.

Prostat kanseri tam adıyla 'prostat adenokarsinoma', prostat bezi salgı hücrelerinin kontrolsüz büyümesi başta olmak üzere prostatın her bölgesinden gelişebilen kanser çeşididir. Amerikalı erkeklerde en yaygın görülen kanser çeşididir. Kansere bağlı ölümlerde ise ikinci sırada yer alır. Bu çalışma, ALX3 geninin metilasyon ve ekspresyon düzeylerinin prostat kanseriyle ilişkisini araştırıp bir biyobelirteç olup olamayacağının tespit edilmesini amaçlamaktadır.

Yapılan deney ve analizler sonucu prostat kanseri hücre hatlarında normal prostat dokusu hücre hattına göre ALX3 geninin ifadesinde artış gözlenmiştir. İlerleyen çalışmalarda hücre hatlarında ALX3 gen promotor metilasyon seviyesi de arastirilacaktır. Böylece metilasyon ve ekspresyon seviyeleri arasındaki korelasyon gözlemlenerek prostat kanseri hücre hatlarında ALX3 geninin metilasyonu potansiyel biyobelirteç olarak kullanılması yönünde umut vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, gen ifadesi, metilasyon, biomarker, *ALX3*
2023, ix +60 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF ALX3 GENE PROMOTOR METHYLATION AS A POTENTIAL BIOMARKER IN PROSTATE CANCER CELL LINES

Tuğçe CUYA

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied SciencesDepartment of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Dr.Elif UZ YILDIRIM

ALX (Aristeless like homeobox domain) genes are a homeobox type transcription factor family and were first discovered in Drosophila melanogaster. Expression of the ALX3 gene has been associated with cancer development and metastasis. Additionally, methylation of the ALX3 gene has been reported to be increased in many types of cancer. DNA methylation is an epigenetic change common in many types of cancer and can regulate the expression of genes. In many types of cancer, increased DNA methylation causes decreased gene expression and may contribute to cancer development. While ALX3 expression levels decrease in cancer types such as pancreatic, breast and colon cancer, such a study in prostate cancer has not yet been found in the literature.

Prostate cancer, full name 'prostate adenocarcinoma', is a type of cancer that can develop in any part of the prostate, especially the uncontrolled growth of prostate gland secretory cells. It is the most common type of cancer in American men. It ranks second in cancer-related deaths. This study aims to investigate the relationship between methylation and expression levels of the ALX3 gene and prostate cancer and to determine whether it can be a biomarker.

As a result of the experiments and analyses, an increase in the expression of the ALX3 gene was observed in prostate cancer cell lines compared to normal prostate tissue cell lines. In future studies, the ALX3 gene promoter methylation level will also be investigated in cell lines. Thus, by observing the correlation between methylation and expression levels, methylation of the ALX3 gene in prostate cancer cell lines is promising for use as a potential biomarker.

Key words: Prostate cancer, gene expression, methylation, biomarker, *ALX3*
2023, ix +60 pages.

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi yüksek lisans eğitimimde tüm desteğini, fikirlerini, bilgi ve birikimini bana aktaran ve anlayışıyla yardımlarıyla her zaman yanımda olan danışman hocam Doktor Öğretim Üyesi Elif UZ YILDIRIM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm deney sürecimde her türlü imkanı sağlayan sayın Doc.Dr.Burcu Erbaykent'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimiz için bize imkanlarını ve laboratuvarını açan sayın Doc.Dr.Figen ERSOY hocama teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı'na tüm yüksek lisans eğitimim boyunca destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca FYL-2022-1292 nolu projemi destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi BAP birimine teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte benim her zaman yanımda olan, varlıkları ve sevgileriyle her zaman elimi tutan sevgili annem Demet CUYA ile babam Bünyamin CUYA başta olmak üzere kız kardeşlerim Yaren CUYA, Hayrunnisa CUYA, Rumeysa CUYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TUĞÇE CUYA
17/09/2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..... i
ABSTRACT…… ii
TEŞEKKÜR…… iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ……..... vi
ŞEKİLLER DİZİNİ …..... viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ……..... ix
1.GİRİŞ …… 1
2.KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI…….. 3
2.1. Kanser ……..... 3
2.2. Kansere Neden Olan Genler ve Epigenetik Faktörler……. 3
2.2.1. Metilasyon……. 5
2.3.Metilasyon ve mRNA Analizinde Kullanılan Yöntemler …… 7
2.3.1. Metilasyon Analizinde Kullanılan Yöntemler ……. 7
2.3.2. mRNA Analizinde Kullanılan Yöntemler ……. 10
2.4. Kanser Çeşitleri …… 14
2.5. Kanser Hücreleri ve Normal Hücreler Arasındaki Farklar……... 15
2.6. Prostat Kanseri…….. 15
2.7. Prostat Kanseri Gelişiminin Moleküler Mekanizması……. 17
2.7.1.Androjen Reseptörü…… 17
2.8. Prostat Kanserinin Sınıflandırılması……. 17
2.9. *ALX3*…….. 18
2.10. Kanser ve ALX3 ilişkisi……. 19
3. MATERYAL ve YÖNTEM…… 21
3.1. Materyal……. 21
3.1.1. Kullanılan sarf malzemeler…… 21
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler…… 21
3.1.3. Kullanılan cihazlar…….…… 23
3.2. Yöntemler……. 24
3.2.1. Hücre kültürü…… 24
3.2.2.Hücre kültüründe kullanılan besiyerinin hazırlanması……. 24
3.2.3.Hücrelerin açılması……. 24
3.2.4.DNA izolasyonu……. 25
3.2.5.Cobra Assay ve Bisülfit modifikasyonu…… 26
3.2.6.Bisülfit modifiye DNA örneklerine PCR yapılması…… 27
3.2.7.PCR ürünlerine nested PCR yapılması……. 30
3.2.8.Nested PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi…….. 31
3.2.9.Hücre hatlarından RNA izolasyonu……. 32
3.2.10.RNA örneklerinden ilk zincir cDNA sentezi……. 33
3.2.11.cDNA örneklerine Gerçek Zamanlı PCR yapılması……. 34
4.BULGULAR……. 36
4.1.Prostat Kanseri ve Normal Prostat Dokusu Hücre Hatlarının

Mikroskop Görüntüleri…… 36
4.2.DNA Örneklerinin Nanodrop Ölçüm Sonuçları…… 38
4.3.RNA Örneklerinin Nanodrop Ölçüm Sonuçları…… 39
4.4. DNA'ların Bisülfit ile Muamelesi……. 40
4.5.Nested PCR Ürünlerinin Jel Görüntüleri…… 40
4.6. Gerçek-Zamanlı PCR Sonuçları…… 42
5. SONUÇ ve TARTIŞMA…….. 48
KAYNAKLAR……. 51
EKLER……. 55
ÖZGEÇMİŞ…….. 60

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

Simgeler	Açıklama
Δ	delta
°C	santigrat derece
%	yüzde
bp	baz çifti
dk	dakika
M	molar
mg	miligram
ml	mililitre
mM	milimolar
ng	nanogram
pmol	pikomol
sn	saniye
µl	mikrolitre
µM	mikromolar
U	ünite

Kısaltmalar	Açıklama
ALX	Aristaless-Benzeri Homeobox Domaini (Aristaless-Like Homeobox Domain)
ALX1	*ALX* Homeobox 1
ALX3	*ALX* Homeobox 3
ALX4	*ALX* Homeobox 4
BPH	İnsan Prostat Normal Epitel Hücreleri (Human Prostate Normal Epithelium Cells)
cDNA	Komplementer DNA (Complementary DNA)
CO_2	Karbondioksit (Corbondioxide)
COBRA	Kombine Bisülfit Restriksiyon Analizi (Combined Bisulfite Restriction Analysis)
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit (Deoxyribo Nucleic Acid)
DNMT	DNA Metiltransferaz (DNA Methyltransferase)
Du145	İnsan Prostat Epitel Karsinom Hücreleri (Human Prostate Carcinoma Epithelium Cells)
FBS	Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
FND	Frontanazal Displazi (Frontanatal Dysplasia)

GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase)
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LnCaP	Androjene Hassas İnsan Prostat Adenokarsinom Hücreleri (Androgen-Sensitive Human Prostate Adenocarcinoma Cells)
mRNA	Mesajcı RNA(Messenger RNA)
miRNA	Mikro RNA (Micro RNA)
MSDK	Metilasyona Özgü Dijital Karyotipleme(Methylatin-Specific Digital Karyotyping)
MSP	Metilasyon-Spesifik PCR (Methylation-Specific PCR)
PBS	Fosfat Tuz Tamponu (Phosphate Salt Buffer)
PC3	İnsan Prostat Epitel Karsinom Hücreleri (Human Prostate Epithelium Carcinoma Cells)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RLGS	Restriksiyon Bölgesi Genomik Tarama (Restriction Landmark Genomic Screening)
RNA	Ribo Nükleik Asit (Ribo Nucleic Acid)
RP-HPLC	Ters Fazlı Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-qPCR	Gerçek-Zamanlı Kinetik PCR (Real-Time Kinetic PCR)
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tm	Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)
UV	Ultraviyole (Ultraviolet

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Epigenetik modifikasyonların şematik diyagramı……	4
Şekil 2.2.	Metilasyon paternlerinin kanserdeki rolü……..	6
Şekil 2.3.	Metilasyon analiz yöntemleri diyagramı……...	8
Şekil 2.4.	COBRA protokolünün ana hatları…….....	10
Şekil 2.5.	Real Time-qPCR'da floresan sinyali üretmek için kullanılan yöntemler….....	12
Şekil 2.6.	Real Time-qPCR varsayımsal bir amplifikasyon grafiği……...	13
Şekil 2.7.	Northern blot genel şeması……	14
Şekil 2.8.	Prostat şematik gösterim…….……..	16
Şekil 2.9.	*ALX3* geninin kromozomdaki yeri…….....	19
Şekil 3.1.	UCSC genom tarayıcısından alınan görsel……	27
Şekil 3.2.	ALX3 geninin promotor bölgesine denk gelen CpG adalarının MethPrimer programı ile detaylı incelenmesi…….	28
Şekil 4.1.	PC3 mikroskop görüntüsü……...	36
Şekil 4.2.	Du145 mikroskop görüntüsü…….....	37
Şekil 4.3.	LnCap mikroskop görüntüsü…….....	37
Şekil 4.4.	BPH mikroskop görüntüsü…….	38
Şekil 4.5.	Nested PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü……..	41
Şekil 4.6.	Gerçek-Zamanlı PCR sonucunda ALX3 ve GAPDH primerleri kullanılan örneklerin agaroz jeldeki görüntüsü …….....	43
Şekil 4.7.	Prostat kanseri hücre hatlarında *ALX3* geni göreceli ifadesi …….....	44
Ek Şekil 1.	Hedeflenen promotor bölge ve primerler…….....	57
Ek Şekil 2.	Prostat kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre *ALX3* geninin ifade düzeyi……	58
Ek Şekil 3.	Prostat kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre *ALX3* geninin metilasyon düzeyi……	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1.	PCR reaksiyonu mix bileşenleri…….	29
Çizelge 3.2.	PCR reaksiyonuna eklenen bisülfit modifiye DNA miktarları……..	29
Çizelge 3.3.	Nested PCR reaksiyonunun mix bileşenleri…….....	30
Çizelge 3.4.	Nested PCR reaksiyonuna eklenen PCR ürün miktarları……...	31
Çizelge 3.5.	cDNA sentezi komponent miktarları……..	34
Çizelge 3.6.	Gerçek-Zamanlı PCR reaksiyonu mix bileşenleri……..	35
Çizelge 4.1.	DNA örneklerinin nanodrop ölçüm sonuçları……	39
Çizelge 4.2.	RNA örneklerinin nanodrop ölçüm sonuçları…….....	40
Çizelge 4.3.	Gerçek-Zamanlı PCR sonucu BPH, BPH aza, PC3 ve PC3 aza hücre hatlarında *ALX3* ve GAPDH genleri için elde edilen Ct değerleri…….	45
Çizelge 4.4.	Gerçek-Zamanlı PCR sonucu Du145, Du145aza,LnCap ve LnCap aza hücre hatlarında *ALX3* ve GAPDH genleri için elde edilen Ct değerleri...	46
Ek Çizelge 1.	PCR ve COBRA reaksiyonlarındaki primerler…….....	56
Ek Çizelge 2.	Gerçek-Zamanlı PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler…….....	56

1.GİRİŞ

Kanser hücrelerinde ifadesi değişen gen gruplarının içinde hücre döngüsünde rol oynayan genlerin yanı sıra transkripsiyon faktörleri de önemli yer tutmaktadır. Özellikle genlerin metilasyon durumları yakın zamanda çeşitli kanser türlerinde biyobelirteç olarak kullanılmak üzere yaygınlaşmaya başlamıştır (Park, 2015, Rasmussen 2016, Martin-Sanchez 2017, Xia, 2017). Epigenetik değişiklikler, özellikle de kanserli dokulardaki promotor metilasyonundaki modifikasyonlar artık pek çok kanser çeşidinde biyobelirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır (Yamashita, 2018) Günümüzde artan bu çalışmalardan çıkan sonuçlar ışığında başta metilasyon statüleri olmak üzere epigenetik değişimler kanser tanı ve tedavisinde kullanılma aşamasına gelmiştir (Azad, 2013, Rezapour, 2019).

ALX (aristaless like homeobox domain) genleri de gelişim döneminde önemli rol oynayan homeobox tipi transkripsiyon faktör ailelerinden biridir (Twigg, 2009, Kayserili, 2009, Uz, 2010). Evrim sürecinde oldukça korunmuş olan homeobox domaini ile DNA'daki çeşitli genlerin promotor bölgesine bağlanarak ifadelerini değiştirdiği bilinmektedir. Son yıllarda yayınlanan çalışmalarda ALX ailesindeki her üç genin (*ALX1*, *ALX3* ve *ALX4*) promotor metilasyon statüleri pek çok araştırmacı tarafından farklı kanser türlerinde biyobelirteç olarak işaret edilmektedir. *ALX1* promotor bölgesinin metilasyon durumu ve bunun sonucu ifadesindeki değişim kontrol grubu ile kıyaslanmış ve biomarker genler arasında en önemli gen bölgelerinden biri olarak küçük hücreli olmayan akciğer (Sandoval, 2013), over (Yuan, 2013), meme (de Groot, 2014), osteosarkom (Yang, 2015), akciğer (Yao, 2015) ve glioblastom (Zhao, 2019) kanserlerinde gösterilmiştir. Benzer farklılıklar *ALX4* geni için de kolorektal (Tanzer, 2010, Kim 2011, Salehi 2015), over (Yuan 2015), akciğer (Liu 2014), karaciğer (Zhao 2019b), pankreas (Henriksen 2017) ve meme (Yang 2017) kanserlerinde gösterilmiştir.

Tez çalışmamıza konu olan *ALX3* geninin kanserde metilasyon statüsü ve ifadesinin değişimi ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı diğer iki paralog genine kıyasla daha azdır. Literatür taramasında günümüze kadar *ALX3* geninin nöroblastom (Wimmer, 2002),

kolorektal (Mori, 2011), rabdomayosarkom (Mahoney, 2012) ve hepatoselüler karsinom (Sun 2018) vakalarında kontrol grubuna göre promotor hipermetilasyonu ve buna bağlı olarak ifadesinde azalma rapor edilmiştir.

Ancak günümüze kadar yapılan çalışmalarda prostat kanserinde *ALX3* geninin ifadesi ya da promotor bölgesinin metilasyon paterni ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu sebepten dolayı çalışmadaki amacımız bir homeobox transkripsiyon faktör üyesi olan *ALX3* geninin prostat kanserinin patogenezi üzerindeki rolünü promotor metilasyon paterni açısından araştırmaktır. Bu haliyle *ALX3* geninin prostat kanser tanısında ya da ilaca cevap yanıtında bir biyobelirteç olup olamayacağının tespit edilmesi hedeflenmektedir.

Tezimize konu olan *ALX3* geni aristaless like homebox ailesinin bir üyesi olup bu gen ailesi insanda toplam 3 paralog olarak bulunmaktadır; *ALX1*, *ALX3*, ve *ALX4*. Her üç genin de embryonik döneminde kraniyofasiyel ve nöral tüp gelişiminde rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Günümüze kadar her üç genin de kanserde biyobelirteç olarak promotor metilasyon seviyeleri pek çok çeşitte çalışılmış olup henüz prostat kanserinde yapılmış bir çalışma bulunmamamktadır. Ayrıca embryonik dönemde ifadesi açık olan *ALX3* geni erişkin farelerde sadece pankreas ve testislerde az da olsa ifade edildiği saptanmıştır.

Bu sebeple bizim hipotezimiz de *ALX3* gen promotor bölgesindeki metillenme statüsünün ve gen ifadesinin prostat kanserli hücrelerde kontrol grubuna göre değişiklik göstereceği ve bu genin kanser tanısı ya da prognozunda biyobelirteç olarak kullanılabileceği yönündedir.

2.KURAMSALTEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1.Kanser

Organizmada değişikliğe uğramış hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ile sonuçlanan hastalık grubuna **kanser** adı verilmektedir. Kanser hücrelerinde çoğalma, farklılaşma gibi genel gereksinimleri düzenleyen mekanizma ortadan kalktığında hücre kontrolsüz çoğalmaya başlar, bu olayın ileri aşamasında lenf veya kan yoluyla kanser hücreleri dokulara ve organlara ulaşır. Doku ve organların normal çalışmasını etkiler böylece organizma sistemi çöker.

Diyet, radyasyon, sigara, ilaçlar gibi çevresel faktörler ve hormonlar, mutasyonlar gibi genetik faktörler kanser gelişiminde etkilidir. Dünyada her sene 11 milyona yakın kişi herhangi bir çeşit kanser hastalığına yakalanmaktadır. Bu kanser hastalarının 7 milyon civarı aynı sene içerisinde ölmektedir (Bilir, 2008).

Yaş verilerine göre analiz yapıldığında, 1999 yılından beri kanser 85 yaşından küçük bireyler için birincil ölüm nedeni olan kalp krizini geride bırakarak ilk sıraya yerleşti. Kanserlerin yarısından fazlasını prostat, akciğer, meme ve barsak/rektum kanserleri oluşturur. Erkeklerde barsak/rektum, prostat ve akciğer kanserleri ve kadınlarda barsak/rektum, akciğer ve meme kanserleri en sık ölümle sonuçlanan kanserler olmayı sürdürmektedir (Jemal ve ark. 2006).

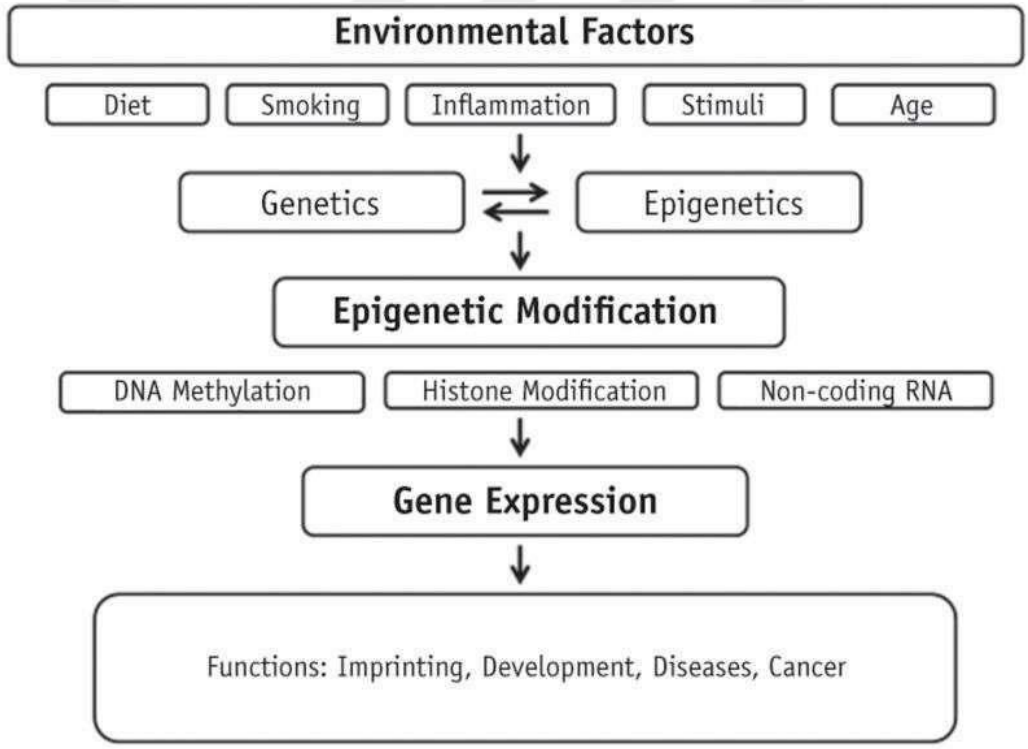
2.2.Kansere Neden Olan Genler ve Epigenetik Faktörler

Genetik değişiklikler, Tümör baskılayıcı genler ve Proto-onkogenler olmak üzere 2 grup gen tipini etkiler ve böylece kanser gelişmesine neden olur.

Tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenler hücre büyümesi ve bölünmesinin kontrol edilmesinde görev alır. Proto-onkogenler, aşırı ekspresyonları ve mutasyonları sonucu onkogenlere dönüşebilirler. Bunun sonucunda hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olurlar. Onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genler, hücrelerin kontrolsüz

çoğalmasını engelleyen proteinleri kodlar. Bu proteinlerdeki mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler sonrasında hücreler kansere karşı koyamaz (Guo ve ark. 2014).

Kansere bu genlerde gerçekleşen fonksiyonel değişiklikler ile birlikte epigenetik değişiklikler de neden olmaktadır. Epigenetik mekanizmalarda oluşan hatalar kanser ve çok sayıda hastalıkla bağlantılıdır. Bu mekanizmalarda oluşan bir hata, genlerin ekspresyonunda baskılanma veya aşırı artmaya sebep olarak hastalıkların oluşmasına yol açmaktadır. Son yıllarda insan kanser türlerinde yapılan çalışmalarda, ekzon dizilerindeki epigenomu kontrol eden genlerin çok sayıda mutasyona uğradığı gösterilerek kanser ve epigenetik ilişkisi kanıtlanmıştır (Ayaz ve ark. 2019).



Şekil 2.1. Epigenetik Modifikasyonların şematik Diyagramı (Seo ve ark.2014)

Genetik biliminde yapılan araştırmalar ve gelişmeler neticesinde, organizmalarda genlerin yeri bilinse de bu bilgi fenotipin ya da hastalığın gelişim sürecinin belirlenmesinde yeterli olmamıştır. Bu durum epigenetik mekanizmaların da fenotipin oluşmasında görev aldığı sonucu ile aydınlatılmaktadır. Epigenetik mekanizmalar, organizmanın fenotipini DNA dizisinde bir değişiklik yapmadan değiştirebilen kimyasal

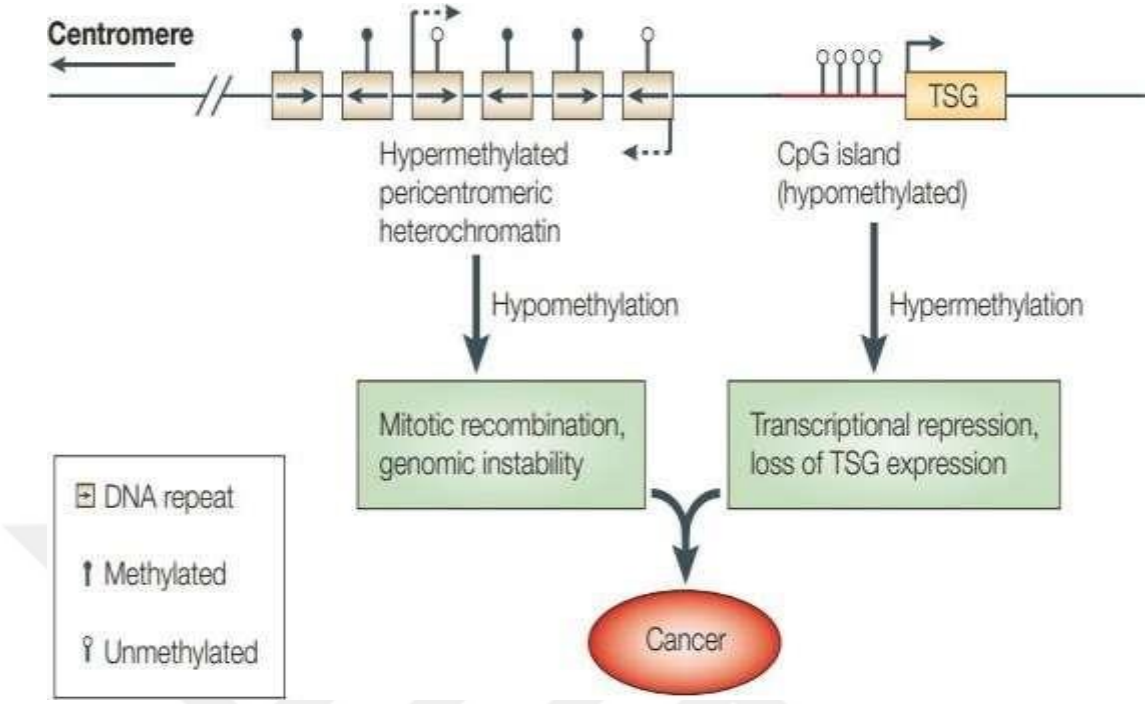
modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar, DNA'da gerçekleştiği gibi DNA ile etkileşimde olan proteinlerde de gerçekleşir (Hirsch ve ark. 2012).

Epigenetik değişikliklere Şekil 2.1.'de görüldüğü gibi çevre koşullarının değişimleri de sebep olabilir. Nesiller boyu epigenetik bilgi aktarılır ve çevresel strese karşı hafıza oluşturur. Epigenetik mekanizmaların en fazla çalışılan tipleri Histon modifikasyonu, DNA metilasyonu ve kodlamayan RNA'lar tarafından gen regülasyonudur (Gravitol ve ark. 2012).

2.2.1. Metilasyon

İlk kez 1983 yılında, kanser ve metilasyon arasındaki bağlantı kanser hücrelerinin genomlarının normale hücrelere göre hipometile olduğu gösterildiğinde ortaya çıkmıştır. Hipometilasyon öncelikli olarak genom dizisinin tekrar eden bölgelerindeki metilasyon kaybından kaynaklanır.

Hipometilasyon sonucu genomik istikrarsızlık ortaya çıkar ve bu kanser hücrelerinin ayırt edici özelliğidir. Kanserde anormal hipermetilasyon çoğunlukla metillenmemiş CpG adalarında meydana gelir ve sonucunda kromatin yapısında oluşan değişiklikler transkripsiyonu susturur. DNA onarımı, kromatin yeniden modellemesi, apoptoz ve büyüme düzenlenmesi ile ilgili genlerin, neredeyse her kanser hücresi tipinde anormal derecede hipermetile olduğu ve susturulduğu bilinmektedir. Metilasyondaki bu değişiklikler Şekil 2.2.'de görüldüğü gibi tümörijenezin erken olaylarıdır (Robertson, 2005).



Şekil 2.2. Metilasyon paternlerinin kanserdeki rolü (Robertson, 2005).

Metillenmenin en çok çalışılan ve en önemli çeşidi DNA'nın bazı bölgelerinde sitozinin metillenerek 5-metilsitozine (5-mC) dönüşümüdür. Metilasyon transkripsiyon faktörünün bağlanmasına engel olur ve ilgili genin ifadesini durdurur. Bu metilasyon genellikle CpG adaları denilen ve 5'-sitozin-fosfat-guanozin-3' dinükleotidlerinin sıklıkla yer aldığı 500-2000 baz çifti uzunluğundaki DNA bölgelerinde yer alır. Gen promotör bölgelerinin önemli bir bölümü CpG adalarını içermektedir. DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b izoformlarından oluşan ve DNA metil transferaz (DNMT) adı verilen enzimler, DNA'daki bu bölgelere metil grubu takılmasını gerçekleştirir (Eser ve ark. 2016). Anormal metilasyon modelleri meme, hepatoselüler, karaciğer, pankreas, kolorektal, servikal, mide ve prostat kanserleriyle ilişkilendirilmiştir (Aldawsari ve ark. 2015).

DNMT'nin inhibisyonu, hipermetilasyonu engelleyerek hipermetilasyonun tersine çevrilmesine ve susturulmuş genlerin yeniden ifade edilmesine sebep olmaktadır. Bu durum, DNMT inhibitörleri zebularin ve 5-aza-2-deoksisitidin ile yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu inhibitörlerin farelerde kanser hücresi apoptozunu indüklediği,

kanser hücresi büyümesini engellediği ve tümör hacmini azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Fang ve ark. 2003).

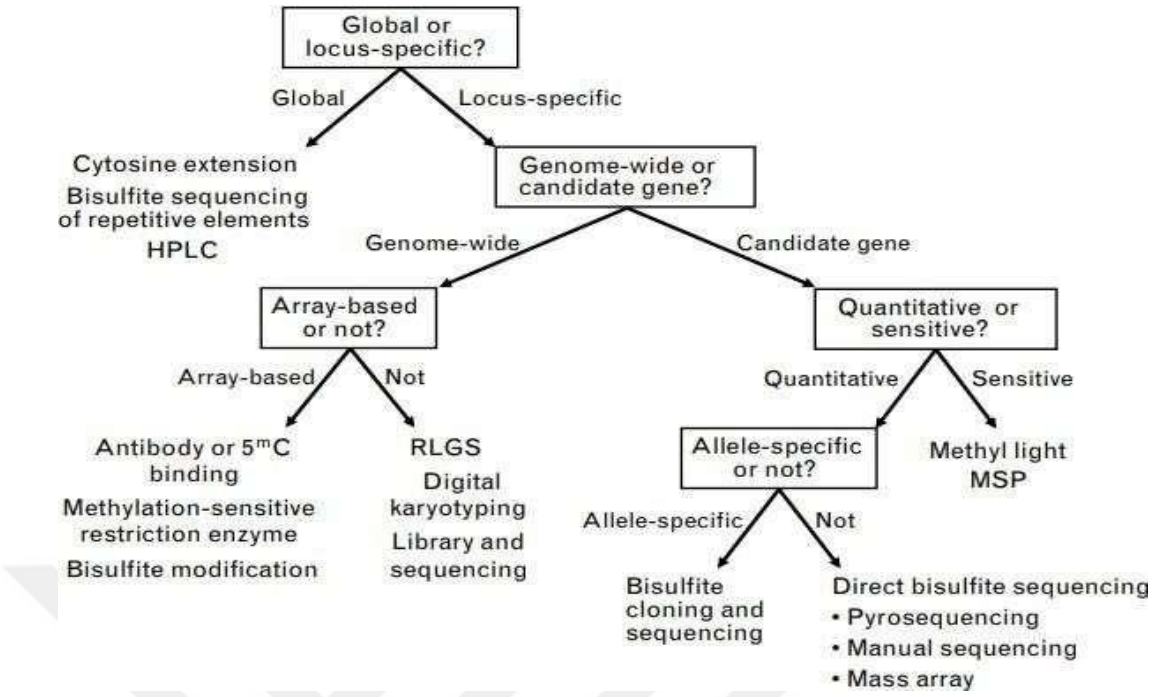
5-aza-2-deoksisitidin (DAC), sitozin nükleozid analogları gibi dengeleyici nükleozid taşıyıcıları kullanarak hücrelere girer. 5-aza-2-deoksisitidin (DAC), hücrenin içine girdikten sonra deoksisitidin kinaz (dCK) tarafından monofosforile edilmiş türevi 5-aza-dCMP'ye fosforile edilir. Daha sonra 5-aza-dCMP, 5-aza-dCTP'ye fosforile edilir. 5- aza-dCTP, DNA'ya dahil edilerek demetilasyona neden olan aktif formudur (Qin ve ark. 2009).

2.3. Metilasyon ve mRNA Analizinde Kullanılan Yöntemler

2.3.1.Metilasyon Analizinde Kullanılan Yöntemler

Metilasyon analizindeki büyük ilerleme, metillenmiş sitozinleri değiştirmeden bırakarak metillenmemiş sitozinleri urasile dönüştürmeye dayanan DNA'nın sodyum bisülfit ile muamalesi yönteminin geliştirilmesiydi. Bu, PCR amplifikasyonu ve PCR ürünlerinin analizi yoluyla metillenmiş DNA'nın metillenmemiş DNA'dan ayırt edilmesini sağlar. PCR amplifikasyonu sırasında, metillenmiş sitozinler sitozin olarak çoğalırken metillenmemiş sitozinler ise timin olarak çoğalır (Clark ve ark. 1994)

Global DNA metilasyonu analiz yöntemi olan Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), tekrarlanabilir ve yüksek oranda niceldir. Fakat HPLC yöntemi, yüksek verimli analizlere uygun olmamakla birlikte yüksek kaliteli büyük miktarlarda genomik DNA gerektirir. Bu sorunları aşmak için, birkaç bisülfit bazlı PCR yöntemi geliştirilmiştir. Global DNA metilasyon analizleri, metilasyonun değiştiği genomik pozisyonlar hakkında yeterli bilgi vermemektedir. Bu nedenle bu değişiklikleri işlevsel sonuçlarla ilişkilendirmek zordur (Ehrlich ve ark. 1982).



Şekil 2.3. Metilasyon analiz yöntemleri diyagramı (Shen & Waterland 2007)

Gen spesifik metilasyon analiz yöntemleri ise 'aday gen' veya 'genom çapında' yaklaşımlar olarak karakterize edilebilir. Aday gen yaklaşımları 'duyarlı' ve 'kantitatif' yaklaşımlara ayrılmaktadır. Duyarlı yöntemlerde, metillenmiş veya metillenmemiş aleller primerler tasarlanarak tespit edilir. Kantitatif yöntemlerde, hem metillenmiş hem de metillenmemiş alelleri eşit etkinlikle çoğaltmak için primerler tasarlandığı gibi metilasyon seviyesi de çeşitli yaklaşımlarla analiz edilir (Herman ve ark. 1996).

a) Duyarlı yöntemler; Metilasyona duyarlı PCR (MSP), metilasyonun analizi için duyarlı ve çok hızlı bir yöntemdir. Bisülfit modifikasyonunu takiben PCR, metillenmiş veya metillenmemiş alelleri çoğaltmak amacıyla tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirilir. MSP, sınırlı kalitede ve miktarda DNA numunelerinde kullanılabildiği gibi fazlasıyla hassastır. Fakat MSP kantitatif değildir (Herman ve ark. 1996).

b) Kantitatif yöntemler; Alel spesifik olan Bisülfit klonlama ve sekanslama yöntemi (Frommer ve ark.1992) ve Alel spesifik olmayan yöntemlerden; Bisülfit modifikasyonunu takiben PCR ürünlerinin, doğrudan fosfor-görüntüleme ile

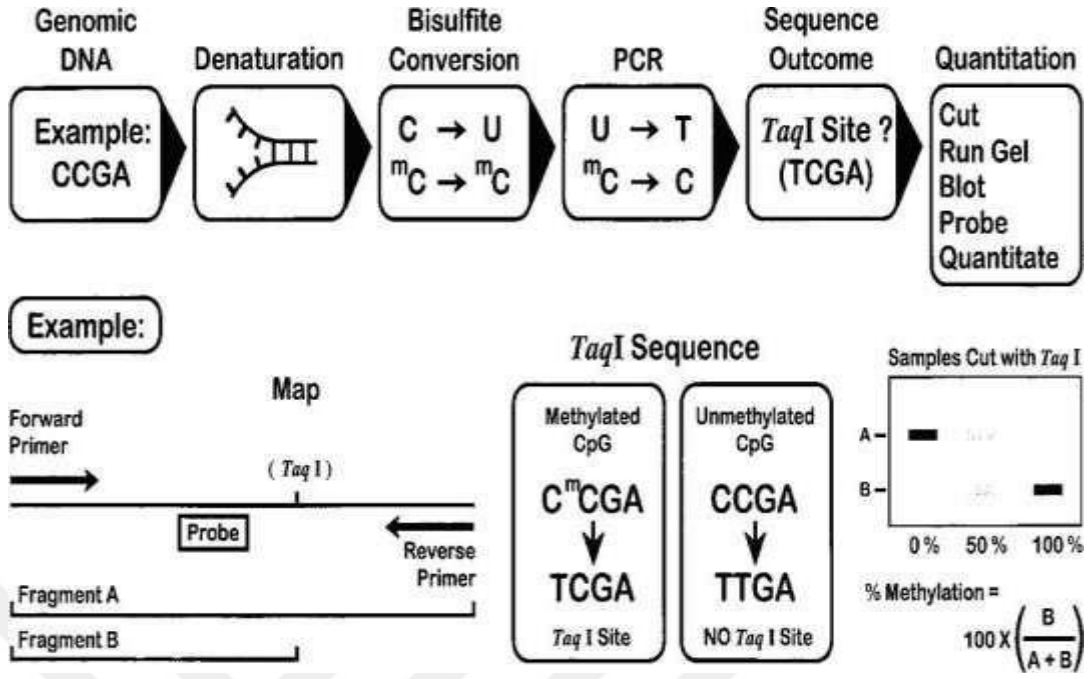
kantitasyonunu kullanan yeni bir yaklaşım (Waterland ve ark.2006), restriksiyon enzimiyle kesim yapılıp jel elektroforeziyle nicelendirilmesi esasına dayanan COBRA yöntemi (Xiong & Laird 1997), kısa ve orta uzunluktaki DNA sekanslarının analizi amacıyla bir primer uzatma tekniği olan Bisülfit-pyrosekanslama (Colella ve ark.2003) ve nükleik asitlerin baza özgü bölünmesi kullanılarak kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) analizine dayanan (Ehrich ve ark.2005) yöntemler kullanılmaktadır.

Genom çapında metilasyon analizi ikiye ayrılır;

Mikroarray tabanlı olmayan DNA metilasyon analizinde Restriksiyon Bölgesi Genomik Tarama (RLGS) (Costello ve ark.2002) , Metilasyona Özgü Dijital Karyotipleme (MSDK) (Hu ve ark.2005) ve McrBC veya diğer restriksiyon endonükleazları kullanarak metilli/metilsiz alanlar oluşturmaya (Rollins ve ark.2006) dayanan yöntemler kullanılmaktadır.

Mikroarray tabanlı DNA metilasyon analizinde ise 5mC veya metil bağlayıcı proteinlere spesifik antikor kullanan yöntemler, metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri kullanılan yöntemler ve bisülfit modifikasyonuna dayanan yöntemler kullanılmaktadır (Shen & Waterland, 2007)

Güvenilir, ucuz ve tek gen metilasyonunu analiz edeceğimiz için Şekil 2.4.'de şeması gösterilen COBRA yöntemini analiz yöntemi olarak tercih ettik. DNA'ya Bisülfitle muamele edilir. Ardından PCR yapılır ve uygun restriksiyon enzimleriyle istenen gen bölgesi kesime uğratılır. Sonrasında jel elektroforeziyle nicelendirilmesi yapılır (Eads & Laird, 2002).



Şekil 2.4. COBRA protokolünün ana hatları (Eads & Laird, 2002).

2.3.2. mRNAAnalizinde Kullanılan Yöntemler

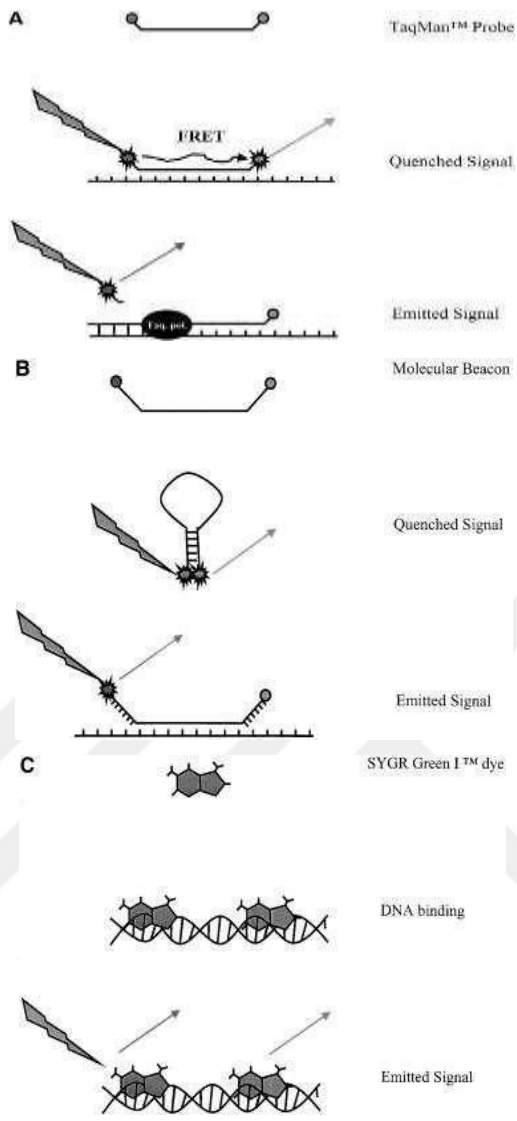
Real-Time PCR; Tek bir tüpte DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini belirlemeyi mümkün kılan bir yöntemdir (Gibson ve ark.1996). Gerçek zamanlı PCR (Real Time PZR, RT-PCR), niceliksel gen ifadesi analizleri için tercih edilen, geniş dinamik aralık ve yüksek hassasiyet ile karakterize bir yöntemdir. Bu yöntemde gerekli biyolojik materyal miktarı, geleneksel yöntemlerle yapılan analizlere göre çok daha düşüktür (Ståhlberg ve ark.2005).

Bu yöntem RNA'nın transkripsiyonunun takibinde cDNA'yı uzatarak oluştururarak bir DNA numunesindeki spesifik diziyi saptamaya ve DNA kopya sayısını ölçmeye yarar. Bu tespit için, primerler DNA kopyalarının başlangıç noktası olarak kullanılır. DNA polimeraz enziminin yardımıyla hedef dizi çoğaltılarak tespit edilebilir duruma getirilir (Beuselinck ve ark. 2005).

Real Time-PCR'da ilk adım, RNA'nın tek sarmallı komplementeri DNA kopyası (cDNA)'nın ters transkriptaz yardımıyla üretilmesidir. cDNA sentezininin başlatılmsı için oligonükleotid primeri gereklidir. Primer RNA'ya bağlanarak, ters transkriptaz enziminin RNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesiyle cDNA mRNA'nın 5' ucuna doğru uzatılır. Rastgele heksamer primerler, tüm olası heksamer dizilerinin nükleotit kombinasyonlarını içerir ve tüm mevcut RNA'lara bağlanmaktadır. Benzer şekilde, Oligo dT primer çoğu mRNA'nın 3' ucunda bulunan Poli(A) (poliadenile edilmiş) kuyruğa tavlanır. Başka bir seçenek olarak gene özgü primer kullanılabilir. Böylece özgüllük artırılarak sahte transktriptler ortadan kaldırılır. cDNA, daha sonra PCR ile amplifiye edilir (Freeman ve ark.1999).

Özellikle Beta-actin ve GAPDH housekeeping genleri, ekspresyonu analiz etmek için referans gen olarak kullanılmaktadır. Bu genlerin kullanılmasının sebebi gen ifadelerinin tutarlı olmasıdır (Greer ve ark. 2010).

Real Time-PCR'da sonraki adım, amplifikasyon ürünlerinin saptanması ve ölçülmesidir. Probların verdiği sinyal ve reaksiyon süresince oluşan ürün miktarıyla orantılı artan floresan boyanın izlenmesiyle oluşan ürün miktarı anlaşılır. Belirli miktardaki DNA moleküllerinin eldesi için amplifikasyonun devir sayısı da gereklidir. "SYBR-Green I" floresan boya DNA'ya bağlanan işlevsel bir metotdur fakat reaksiyon ortamında hedef dizi dışında herhangi bir çift zincirli DNA'ya da bağlanıp floresan ışıma yapabilir. Bu durum primer-dimer oluşumundan da kaynaklanabilir (Günel, 2007).



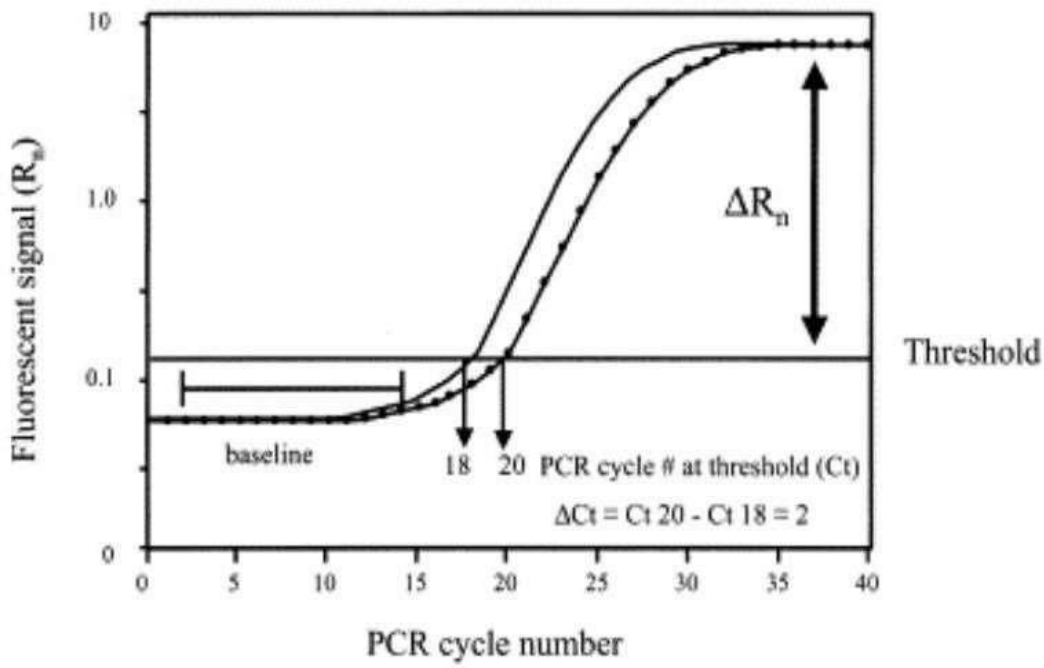
Şekil 2.5. Real Time-qPCR'da floresan sinyali üretmek için kullanılan yöntemler (Ginzinger, 2002).

Erime eğrisi analizi yaparak istenilen hedef dizinin çoğaltılıp çoğaltılmadığına bakılmalıdır. Bu analiz için PCR tüplerini cihaz yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA ayrılmaya başladığında (TM=melting temperature) floresan boya serbest kalarak okunan floresan miktarı düşer. Her DNA'nın belirli bir Tm (erime sıcaklığı) derecesi vardır. Çoğalan DNA parçalarının içerdiği GC/AT oranına ve uzunluğuna bağlı olarak bu erime sıcaklığı da değişmektedir. Hedef DNA parçası ile spesifik olmayan ürünlerin Tm derecesi arasında farklılık olacaktır (Ririe ve ark. 1997)

Ayrıca güvenilir şekilde kullanılan ışıma yapabilen işaretli problar bulunmaktadır. Şekil 2.5.'de verildiği gibi "Molecular beacon", "TaqMan" prob, hibridizasyon prob, "Light-

up" prob ve "Scorpion" primer gibi floresan işaretli problar kullanılarak diğer bir kantitatif yöntem de uygulanabilir (Günel, 2007).

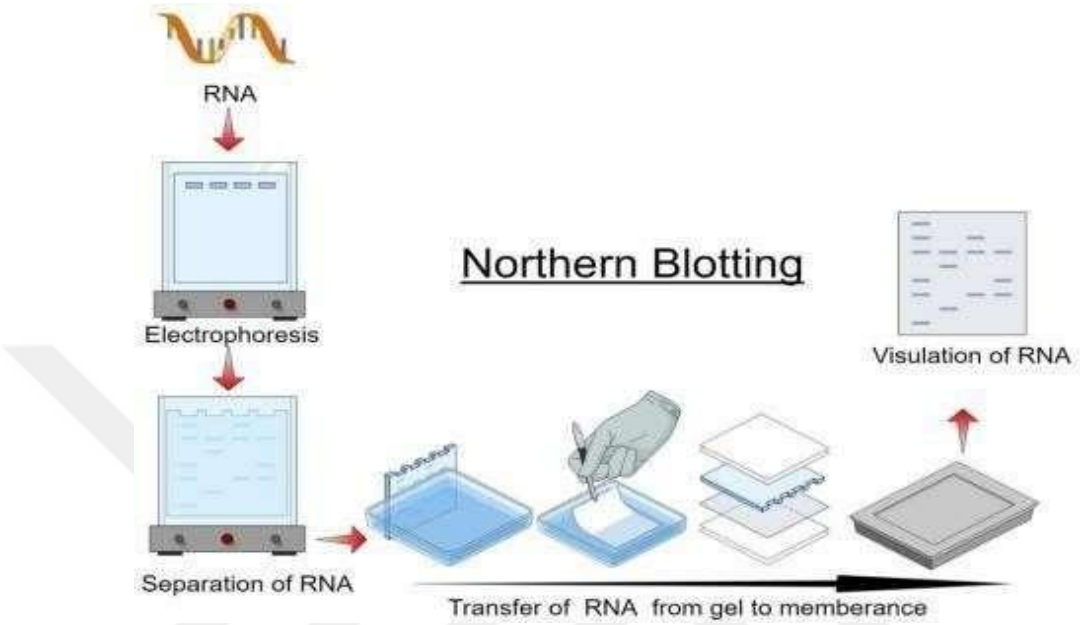
Real Time-PCR'da ölçüm Şekil 2.6.' de görüldüğü üzere Ct (eşik döngüsü)'e göre nispi karşılaştırma olarak yapılır. Ct (eşik döngüsü) floresan değerlerin eşik değerini geçtiği noktadır. Numunedeki nükleik asit miktarı ile Ct değeri ters orantılıdır ve bu nedenle Ct değerinin düşük olması hedeflenen nükleik asit miktarının yüksek olduğunu gösterir. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi miktar tayini için kullanılmaktadır. Hedeflenen her genin Ct değeri, house-keeping genin Ct değerinden çıkartılarak "ΔCt" değeri bulunur. Daha sonra kontrol grubunun "ΔCt" değerlerinden, deney gurubunun "ΔCt" değerleri sırasıyla çıkartılarak "ΔΔCt" değerleri bulunur. Her bir replikasyon döngüsündeki artan/azalan kat sayısını tespit etmek için bu değerlerin 2 üzeri negatif kuvveti alınarak hesaplama yapılmaktadır (Bustin ve ark. 2009, Livak & Schmittgen, 2001).



Şekil 2.6. Real Time-qPCR varsayımsal bir amplifikasyon grafiği (Ginzinger, 2002)

Northern Blot; RNA dizilerinin analizi için Northern blot tekniği geliştirildi. Bu teknik uygun koşullar altında komplementer tek zincirli nükleik asit moleküllerinin hibritleşmesine dayanır. Öncelikle Şekil 2.7.'de şemasının gösterildiği gibi nükleik

asitler agaroz jel elektroforezinde boyutlarına göre ayrılır. Daha sonra membran üzerine aktarılır ve komplementer radyoaktif etiketli nükleik asit dizilerine hibritleşir. Membran tamponla yıkanarak hibridize edilmemiş problar çıkarılır. Sonrasında otoradyografiyle ölçüm yapılır (Hamad ve ark.2017)



Şekil 2.7. Northern blot genel şeması (Hamad ve ark.2017)

2.4.Kanser Çeşitleri

Çevresindeki dokuya veya vücudun başka yerine yayılmadan oluştuğu yerde kalan iyi huylu tümörler ve hem çevredeki dokuya hem de lenf veya kan yoluyla vücudun başka yerine yayılan kötü huylu tümörler olmak üzere tümörler iki gruba ayrılır.

İyi ve kötü huylu tümörler geliştikleri hücreye göre de 3'e ayrılır;

Karsinomlar: İnsan kanserlerinin % 90'ını oluşturan ve epitel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir.

Sarkomlar: Az miktarda görülen bu tümörler kemik, kas, kıkırdak ve fibroz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid doku tümörleridir.

Lösemi veya lenfomalar: İnsan kanserlerinin yaklaşık olarak %7'sini oluşturan ve kan ya da immun sistem hücrelerinden gelişen tümörlerdir (Topaktaş, 2014).

2.5.Kanser Hücreleri ve Normal Hücreler Arasındaki Farklar

Genomik istikrarsızlık, metastaz, kontrolsüz proliferasyon kanser hücrelerine özgü özelliklerdir. Kanser hücrelerini diğer hücrelerden ayıran en önemli özellik normal ölçülerine göre çok daha fazla büyüme göstermeleridir. Kanser hücreleri büyümeyi engelleyen sinyallere çok az duyarlılık gösterirken, büyümeyi teşvik edici sinyallere duyarlılığı fazladır (Schulz, 2005).

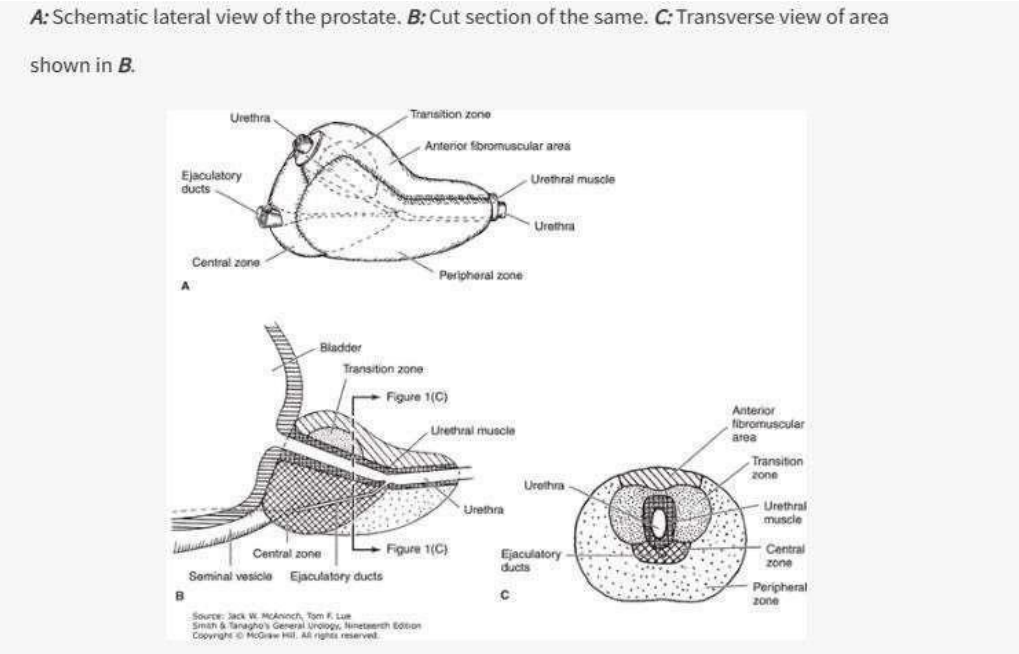
Normal şartlarda hasarlı hücreleri bağışıklık sistemi ortadan kaldırırken, kanser hücreleri bağışıklık sisteminden saklanmaktadır. Bazı kanser hücreleri bağışıklık sistemini kandırarak tümörün büyümesine yardımcı olmasına ve onu korumasına ikna eder. Hücre bölünmelerini durdurma ve hücrelerin ölümünü tetikleyen sinyalleri yok sayarak apoptozdan kaçmaları kanser hücrelerinin bir diğer özelliğidir. Kanser hücrelerinin ihtiyacı olan oksijen ve besin maddelerini kan damarları sağlar. Kanser hücreleri enerji üretimini bu besinlerden farklı bir şekilde sağlayarak normal hücrelere göre daha hızlı büyür (National Cancer Institute).

2.6.Prostat Kanseri

Prostat kanseri tam adıyla 'prostat adenokarsinoma', prostat bezi salgı hücrelerinin kontrolsüz büyümesi başta olmak üzere Şekil 2.8.'de gösterildiği gibi prostatın her bölgesinden gelişebilen kanser çeşididir. Prostat kanseri, Amerikalı erkeklerde en yaygın görülen kanser çeşididir. Kansere bağlı ölümlerde ise ikinci sırada yer alır (Siegel ve ark. 2019).

Prostat kanseri tüm kanser çeşitleri arasında, yaş ile orantılı olarak prevalansı en çok artan kanser çeşididir. Ayrıca çoğu kanser pik insidans yaşına sahipken, prostat kanserinin insidansı yaş ilerledikçe artış gösterir. Yıllık prostat kanseri tanı sayısı, prostat kanseri ölümlerine göre çok daha az kalmaktadır. Bununla birlikte prostat kanseri teşhisi koyulan erkeklerin çoğu, daha çok kardiyovasküler hastalık başta olmak üzere diğer sebeplerden ötürü hayatını kaybetmektedir. Tanı koyulan prostat kanseri insidansı % 15 iken ölüm oranı % 2,9'dur. Bu oranlardan ötürü çoğu prostat kanseri

hasta için göz ardı edilirken, diğerleri tedavi edilmezse büyük oranda morbidite ve ölüme sebep olabilir (Cooperberg ve ark. 2020).



Şekil 2.8. Prostat şematik gösterim (Cooperberg ve ark. 2020)

Kanserli hücrelerin proliferasyon ve yayılma döneminde lenf sistemine, yakın organlara ve kan dolaşımıyla vücudun diğer bölgelerine sıçrayabilir. Prostat kanseri başlarda yavaş seyirli ilerlerken daha sonrasında ağresif karakter gösterip kemiklere ve diğer organlara sıçrayabilir. Prostat kanseri sinsi karaktere sahip olup kanserin erken dönemlerinde hastada hiç belirti görülmeyebilir. Şikayet ve belirtiler, hastalığın ilerlemesiyle ortaya çıkabilir bu sebeple idrar şikâyetleri hastayı kanserin daha geç döneminde rahatsız eder (Dearnaley, 1994).

2.7.Prostat Kanseri Gelişiminin Moleküler Mekanizması

2.7.1.Androjen Reseptörü

Prostat kanseri hormonla ilişkili kanser çeşitlerinden biridir ve oluşum mekanizmasında androjen rol oynamaktadır. Androjenler prostat bezinin gelişimi, olgunlaşması ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesinde rol oynayan erkeklik hormonlarıdır. Prostat

kanser hücreleri androjenlere aşırı derecede duyarlıdır ve yaşamlarını sürdürebilmek için normal prostat hücreleri gibi androjenlere ihtiyaç duyarlar.

Testosteron, bir steroid hormon olup testislerde üretilen en önemli androjendir. 5-alfa-redüktaz enzimi aracılığıyla prostatta dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. Androjen reseptörü, prostat bezinin fizyolojik işleyişi için gerekli moleküler bir sinyal yoludur. X kromozomunda bulunan AR geni tarafından Androjen reseptörü kodlanmaktadır. AR geni X kromozomunda bulunmasından dolayı erkeklerde tek bir alelden oluşur (Kumagai ve ark.2007, Trapman, 2001).

Erkeklerde prostat bezinin büyümesi, gelişmesi ve prostat büyümesi hastalıklarının androjenik steroidlere bağlı olduğu belirlenmiştir. Cerrahi ya da medikal kastrasyon sonucu "androjen bağımlı tümörler" androjen yokluğunda normal prostat epiteli gibi gerilerler. Cerrahi ya da medikal kastrasyon uygulamasına rağmen büyümesini sürdüren tümörler "androjen bağımsız tümörler" olarak adlandırılmaktadır (Terry ve ark. 2006, Oh, 2000).

2.8.Prostat Kanserinin Sınıflandırılması

Prostat kanseri iki sınıfta incelenir;

Herediter prostat kanser: Prostat kanserinin yaklaşık olarak %10'u genetik geçişlidir. Herediter prostat kanseri riski taşıyan bireyler; 55 yaşın altında en az iki akrabasını etkilemesi, paternal veya maternal geçişli üç kuşakta prostat kanserinin görülmesi ve birinci kuşak akrabaları arasında en az üç kişide prostat kanserinin görülmesi gibi özelliklere sahiptir. (Carter ve ark.1993).

Sporadik prostat kanser: Prostat kanserlerinin yaklaşık olarak %85'inden sorumlu olan sınıfıdır. Aile öyküsünde prostat kanseri olmayan olgularda meydana gelen prostat kanserine 'sporadik prostat kanser' denir. Bu sınıf prostat kanserlerinin, genellikle çevresel faktörlerden ve düşük penetransa sahip gen polimorfizmlerinden dolayı meydana geldikleri düşünülmektedir (Carter ve ark.1992).

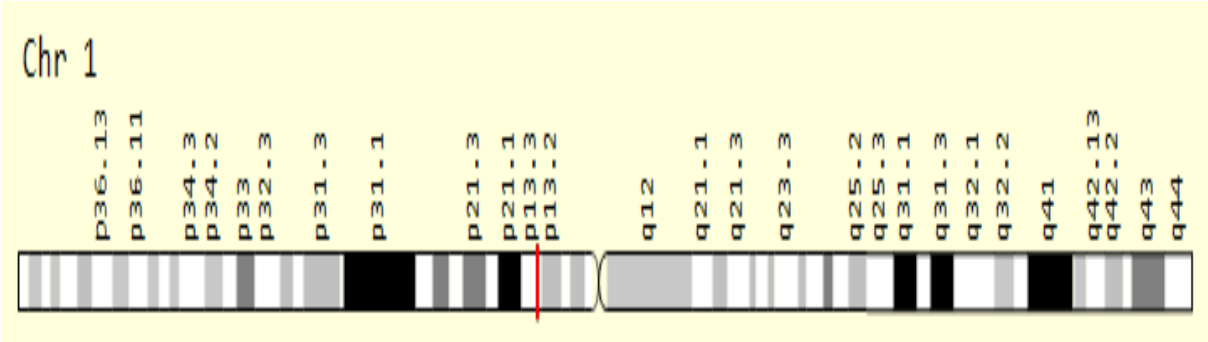
2.9.*ALX3*

ALX (Aristeless like homeobox domain) genleri homeobox tipi transkripsiyon faktör ailesi olup ilk kez Drosophila melanogaster'de keşfedilmiştir. Homeobox genleri ortak bir DNA dizisine sahiptir ve gelişim düzenlenmesinde görev alır. Bu genler, DNA üzerine bağlanarak diğer genlerin ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. Yaklaşık 180 nükleotid uzunluğunda olan homeobox dizisi, 60 amino asitlik homeodomain protein kodlar ve bu homeodomain protein türler arası oldukça korunmuştur (Bürglin, 2011, Beverdam & Meijlink, 2001, Zhong ve ark. 2008).

Bu gen ailesinin üyeleri nöral krest kaynaklı mezenkimal hücrelerde embriyogenez sırasında ifade edilen transkripsiyon faktörlerini kodlar**.** Nöral krest hücreleri, nöral katlantının en dış sınırında bulunan hücrelerdir ve alttaki mezodermin içine göç ederek yüz ile ağız boşluğunun biçimlendirilmesine katkıda bulunmaktadırlar. Alx1(Cart1) , Alx3 ve Alx4 bu gen ailesine dahildir. ALX genleri özellikle burun yapısının oluşumunda önemli rol oynamakla birlikte baş ve yüz bölgesinin ideal gelişiminin sağlanması için gereklidir. İnsanda bu üç genin fonksiyonlarında meydana gelen bozukluk craniyofasiyel dismorfizm ve frontonazal displazi ile sonuçlanmaktadır (Meijlink ve ark.1999, Kayserili ve ark.2009).

ALX3 genindeki mutasyonlarla Frontonazal displazi tip 1, ALX4 genindeki mutasyonlarla Frontonazal displazi tip 2 ve ALX1 genindeki mutasyonlarla Frontonazal displazi tip 3 ilişkilendirilmiştir. Frontonazal displazi tip 1 en hafif yüz malformasyonlarının görüldüğü grup iken Frontonazal displazi tip 3 en ağır yüz malformasyonlarının görüldüğü gruptur. Frontonazal displazi tip 2'de ek olarak saç, deri ve genital bulgular gözlenmiştir (Uz ve ark. 2010, Kayserili ve ark. 2009, Twigg ve ark. 2009)

İnsanlarda *ALX3* geni Şekil 2.9'de gösterildiği gibi kromozom 1p13 bölgesinde yerleşik durumdadır.



Şekil 2.9. *ALX3* geninin kromozomdaki yeri

2.10.Kanser ve *ALX3* ilişkisi

Yapılan çalışmalar sonucunda farklı kanserlerde *ALX3*'ün farklı ekspresyon ve metilasyon profili sergilediği gözlenmiştir. Rahim ağzı kanserinde *ALX3* ifadesinin arttığı gözlenirken Rabdomayosarko'da *ALX3*'ün metilasyon seviyesinde artış olduğu analiz edilmiştir. (Mahoney ve ark. 2012, Qi ve ark. 2021).

Nöroblastom kanser hücre hatlarında *ALX3* geninde hipermetilasyonu gözlenirken gen ifadesinde baskılanma gözlenirken kolorektal kanser hücre hatlarında *ALX3*'ün hipermetile olduğu gözlenmiştir (Mori ve ark. 2011, Wimmer ve ark. 2002). Farklı çalışmalarda ise hepatoselüler karsinomda hipermetilasyon gözlenip farklı gen ifadesi sergilenirken akciğer kanseri hücre hatlarında ise *ALX3*'ün hipermetile olduğu gözlenmiştir (Kartaloğlu 2021, Sun ve ark. 2018).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Sarf malzemeler

- Parafilm, PARAFILM
- 1,5 ml Nüclease-free mikrofüj tüpleri (Ependorf) , Isolab
- 2 ml pastör pipet, Isolab
- 1000 µL pipet ucu, Isolab
- 200 µL pipet ucu, Vertex
- 10 µL pipet ucu, Isolab
- 100 µL pipet ucu, Isolab
- Erlen 250 ml, S&H labware
- 0,2 ml PCR tüpleri, ThermoFisher

3.1.2.Kimyasal maddeler

- EpiJET Bisülfite Conversion Kit (2635797), ThermoFisher Scientific

- BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix, NEB

-Marker, N3231S NEB

-DMEM, Diagnovum

- Primerler-(*ALX3)* , sentebiolab

-cDNASynthesis Kit K1622, ThermoFisher

-TaqI-v2 R0149S, NEB

-Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA

-Monarch T2010S Total RNA Miniprep Kit, NEB

-RPMI, Gibco

- Genomic DNA Mini Kit K1820-01, ThermoFisher

-Etanol (%96-100), Merck

-Etidyum Bromür, Merck

-Agaroz, Prona Basica Le

-DNA yükleme boyası, abm G030

-HeLa Genomic DNA (Serviks Adenokarsinoma) N4006S, NEB

-Methylated Human Control DNA N1231, Promega

-dNTP mix N0447S, NEB

-Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco

-NaOH (Sodyum Hidroksit), Fisher Scientific, UK

-Tris Base, Fisher Scientific

3.1.3.Cihazlar

-Gerçek-Zamanlı PCR, Bio-Rad Cfx Connect

-1000 µl mikropipet, RAININ

-100 µl mikropipet, RAININ

-Steril Kabin, Fagus

- -20 °C Dondurucu, Arçelik

- -80 °C Dondurucu, HARRIS

-Santrifüj, NÜVE- NF-800R

-10 µl mikropipet, JENCONS SEALPETTE

-10 µl mikropipet, Nichipet EX-Plus II

-Distile su cihazı, MILLIPAK 20 MILLIPORE

-CO_2 inkübatörü (%5 CO_2 ; 37 °C), Panasonic

-Inverted mikroskop, Euromex, CMEX PRO 5

-Jel elektroforez sistemi, ThermoFisher Scientific OWL EASYCAST B1-BP

-Etüv, nüve FN-500

-PCR Cihazı, MJ RESEARCH, INC. PTC-100

-Güç kaynağı, Tescom Neoline 2000

-Nanodrop, ThermoFisher NANODROP 2000

-Termal döngüleyici PCR Cihazı, MJ RESEARCH ,INC. PTC-100

-Buz makinası, Biobase FIM20

-Vortex, Vortex-Genie2, Scientific Industries

-Isı bloğu, Thermo Block TDB-120- Biosan

-Ultraviyole (UV) görüntüleme cihazı, Major Science UVDI

-Hassas terazi, Radwag AS220/C/2

-Elektroforez güç kaynağı, life technologies PowerEase 90W

-Mikrodalga, Arçelik MD564

-Güç kaynağı, Tescom Neoline 2000

3.2.Yöntem

3.2.1.Hücre kültürü

Bu tez çalışması kapsamında Uludağ Üniversitesi'nde Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doc.Dr.Burcu Erbaykent'den PC3, Du145, LnCap ve BPH hücre hatları temin edildi.

Bu hücre hatları -80°C dolaplarda saklanmıştır. PC3 (İnsan Prostat Epitel Karsinom Hücreleri), LnCap (Androjene Hassas İnsan Prostat Adenokarsinom Hücreleri) ve Du145 (İnsan Prostat Epitel Karsinom Hücreleri) prostat kanser hücre hatları olup BPH (İnsan Prostat Sağlıklı Epitel Hücreleri) sağlıklı prostat hücre hattıdır.

3.2.2.Besiyerlerin hazırlanması

PC3 hücre hattı için %1 Penisilin-Streptomisin, %10 FBS ve %1 DMEM solüsyonu kullanıldı.

Du145 hücre hattı için %1 Penisilin-Streptomisin, %10 FBS ve %1 DMEM solüsyonu kullanıldı.

LnCap hücre hattı için %1 Penisilin-Streptomisin, %10 FBS ve %1 RPMI (1640, Gibco) solüsyonu kullanıldı.

BPH hücre hattı için %1 Penisilin-Streptomisin, %10 FBS ve %1 RPMI (1640, Gibco) kullanıldı.

3.2.3.Hücre hatlarının açılması

Hücre hatları -80°C'den çıkartılıp su banyosunda oda sıcaklığında çözdürüldü. Hazırlanan besiyerler içerisine hücre süspansiyonları konuldu. %5 CO 2 içeren 37°C ortamda bir gece inkübe edildi. Besiyerler aspire edilerek tekrar 5 ml besiyer eklendi. İki günde bir besiyer değiştirildi.

Metilasyonu ortadan kaldırmak için 5-aza-2-deoksisitidin uygulaması yapıldı. Bunun için BPH normal prostat hücre hattına sadece DMSO uygulanırken prostat kanser hücre hatları PC3, Du145, LnCap için DMSO içerisinde 5-aza-2-deoksisitidin çözdürülerek uygulandı. 48 saatte bir ortam değiştirilerek madde uygulaması yapıldı. Normal doku hücreleri daha yavaş çoğalma eğiliminde iken invazif tümörler daha hızlı çoğalma eğilimindedirler. Bu nedenle PC3, Du145 ve LnCap hücre hatlarına 2 hafta inkübasyon yapıldığı halde BPH hücre hattına yaklaşık 4 hafta inkübasyon yapıldı.

3.2.4.DNA izolasyonu

- Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kiti (K1820-01) kullanılarak PC3, Du145, LnCap ve BPH hücre hatlarından DNA izolasyonu yapıldı.
- Kit talimatlarına göre Yıkama Tamponu solüsyonlarına etanol eklenerek iyice karıştırıldı.
- Petri kaplarındaki hücreler PBS (Fosfat-Tuz Tamponu) ile iki kez yıkandı. Daha sonra Tripsin ile kaldırıldı ve 10000 rpm'de 1 dakika olmak üzere 3 kez santrifüj edildi.
- Ependorftaki hücre süspansiyonuna 20 µl RNaz A ve 20 µl proteinaz K eklendi. Kısa süreli bir vorteks yapılır ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Sonrasında 200 µl Lysis / Binding Tamponu eklenerek kısa bir vorteks yapılır ve ısı bloğunda 10 dakika boyunca 55 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tüplere %96-100 etanol'dan 200 µl eklenerek 5 saniye pipetleme yapıldı.
- Spin kolonlarına Solüsyon (yaklaşık 640 µl) aktarıldıktan sonra 1 dakika 10.000 g'de oda sıcaklığında santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı. Sonrasında temiz toplama tüpüne spin kolon alındı.
- Yıkama Tamponu 1'den 500 µl eklendi ve sonra 1 dakika 10.000 g'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Spin kolon kitten çıkan temiz bir toplama tüpüne alınarak Yıkama Tamponu 2'den 500 µl eklendi.
- Maksimum hızda 3 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı. Eppendorf tüpe spin kolon aktarıldı ve Elüsyon Tamponundan ve 100 µl eklendi. Oda sıcaklığında 60 saniye inkübe edildikten sonra 1 dakika maksimum hızda oda sıcaklığında santrifüj edildi.

- ❖ Kolondan DNA'nın tam ayrılması için iki adımda elüsyon yaptırıldı. Elüsyon Tamponundan 100 µl daha eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Daha sonra oda sıcaklığında maksimum hızda 90 saniye santrifüj edildi.
- ❖ Ardından nanodropla ölçüm yapıldı.

***DNA İzolasyonu Sonrası Nanodrop Ölçümü**

- ❖ Ölçümden önce bilgisayardaki nanodrobun programına kullanılan DNA örneğinin adı girildi.
- ❖ İzolasyon sırasında elüsyon adımında Elüsyon Tamponu kullanılması nedeniyle Elüsyon Tamponundan 1 µl blank olarak okutuldu.
- ❖ Daha sonrasında her hücre hattından 1 µl DNA alınarak ölçüm yapıldı.

3.2.5. Cobra Assay ve Bisülfit modifikasyonu

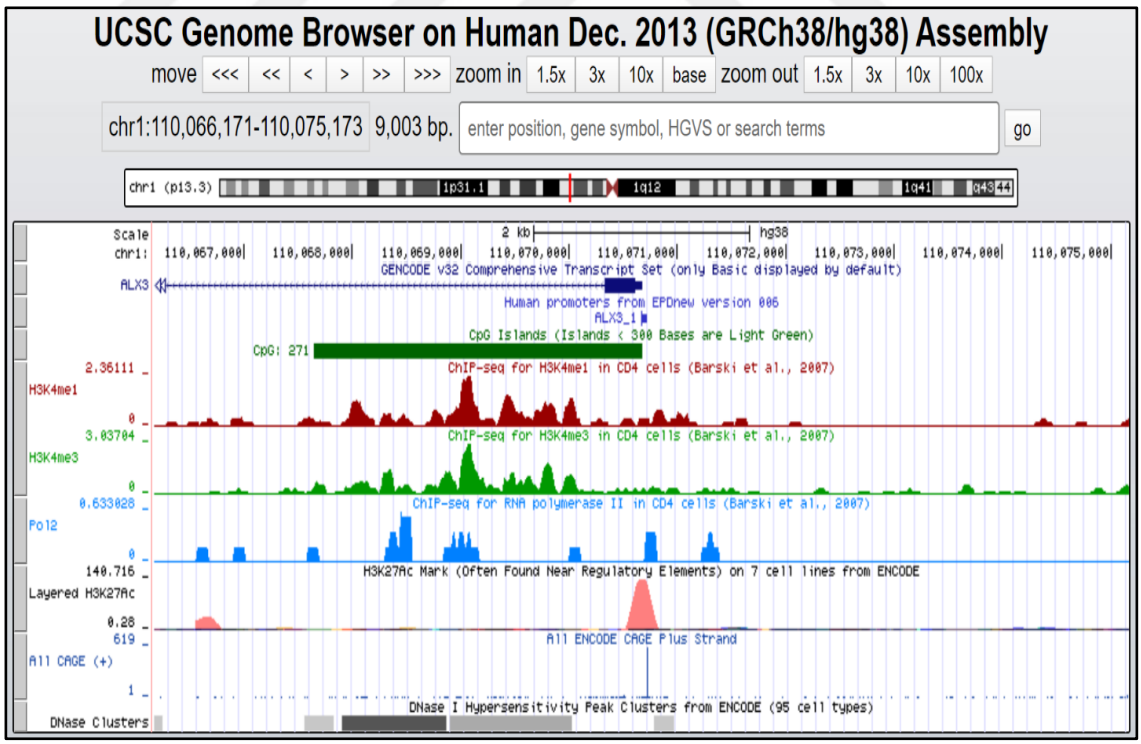
Metilasyon analizi için Cobra Assay yöntemini tercih ettik. Bunun için öncelikle DNA örneklerine bisülfit modifikasyonu sonrasında PCR yapıldı. Ardından tasarlanan farklı primerlerle Nested PCR yapılarak PCR ürünlerine enzim kesimi uygulandı. Daha sonra bu ürünler jelde yürütülerek metilasyon analizi yapıldı. PC3, Du145, LnCap ve BPH DNA örnekleri ve HeLa Genomik DNA (NEB N4006S) kontrol olarak kullanılmıştır. Bu örneklere Thermo Scientific EpiJET Bisülfite Conversion Kit (2635797) kullanılarak bisülfit dönüşümü yapıldı. Öncelikle kullanılacak solüsyonlar hazırlandı. Modıfıcatıon Reagent kullanımdan önce çözdürüldü. Her şişedeki Modıfıcatıon Reagent'a 0,9 ml dH_2O, 200 µl Modıfıcatıon Solutıon I ve 60 µl Modıfıcatıon Solutıon II eklendi. Modıfıcatıon Reagent yaklaşık 10 dk ters-düz edilerek çözüldü.9 ml Wash Buffer üzerine 25 ml %96-100'lük EtOH eklendi ve şişe etiketlendi. 3,5 ml Desulfonatıon Buffer üzerıne 10 ml %96-100'lük EtOH eklendi ve şişe etiketlendi. Deney buz üzerinde başlandı ve bir PCR tüpüne 200-500 ng saflaştırılmış genomik DNA içeren 20µl DNA örneği eklendi. DNA örneğinin hacmi 20µl den az ise dH_2O ile tamamlandı. DNA örneğinin üzerine 120µl Modıfıcatıon Reagent solüsyonu eklendi ve pipetaj yapılarak spin attırıldı. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi.

98°C 10 dakika

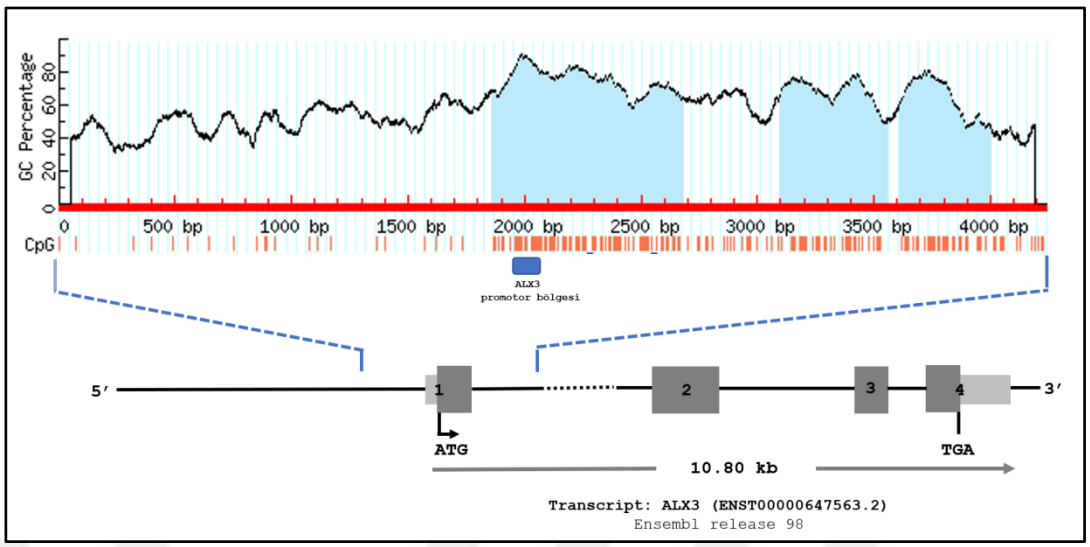
60°C 150 dakika

Sonrasında toplama tüpüne yerleştirilen DNA Purificition Micro Column'a 400 µl Binding Buffer eklendi. Converted DNA örneği kolondaki Binding Buffer'a yüklendi ve pipetaj yapılarak tamamen karıştırıldı. 12.000 rpm'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Akış atıldı ve mikro kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildi.Kolona önceden EtOH ile hazırlanmış 200µl Wash Buffer eklendi. 12.000 rpm de 30 saniye santrifuj edildi. Akış atıldı ve kolon tüpüne yerleştirildi. Kolona önceden EtOH ile hazırlanan 200 µl Desulfonation Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. Ardından 12.000 rpm'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi ve akış atıldı. 200µL Wash Buffer eklenerek 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve akış atıldı. 200µl Wash Buffer eklenerek 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi ve akış atıldı. 1,5 mL'lik nuclease free eppendorf tüpe kolon yerleştirildi üzerine 10µl Elution Buffer eklendi.12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. 10µl Elution Buffer eklenerek tekrar 12.000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi.

ALX3 geninin promotor bölgesine denk gelen CpG adaları Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de detaylı bir şekilde gösterildiği gibidir.



Şekil 3.1. UCSC genom tarayıcısından alınan görsel (yeşil çizgi: *ALX3* geninin promotor bölgesine denk gelen CpG adası)



Şekil 3.2. *ALX3* geninin promotor bölgesine denk gelen CpG adalarının MethPrimer programı ile detaylı incelenmesi

3.2.6.Bisülfit modifiye DNA örneklerine PCR yapılması

PC3, Du145, LnCap, BPH ve HeLa Genomik DNA bisülfit modifiye DNA örnekleri PCR ile çoğaltıldı. PCR için bileşenler hesaplanarak buz üzerinde mix hazırlandı. Gerekli bileşenler Çizelge 3.1.'de belirtildiği gibidir. Çizelge 3.2.'e göre converted DNA miktarları tüplere eklenerek PCR cihazına yerleştirildi.

95°C'de 5dk

95 °C'de 30 sn

50 °C'de 30 sn

72 °C'de 40 sn

35 döngü

72 °C'de 5 dk

4 °C'de hold

Çizelge 3.1. PCR mix bileşenleri

PCR bileşenleri	**Final Konsantrasyon**	**1 rxn**
$MgCI_2$ **(**25 mM)	1,5 mM	1,5 µl
dNTP (10 mM)	0.2 mM	0.5 µl
Reaction Buffer (10X)	1X	2.5 µl
Taq Polymerase (5U/µl)	1U	0.2 µl
Forward Primer (*ALX3*C(F)) – (10 pmol/µl)	10 pmol/ µl	1.0 µl
Reverse Primer (*ALX3*C3(R)) - (10 pmol/µl)	10 pmol/ µl	1.0 µl
Total Hacim	-	6,7 µl

Çizelge 3.2. PCR reaksiyonuna eklenen bisülfit modifiye DNA miktarları

	PC3	Du145	LnCap	BPH	HeLa Control	Negatif Control
Bisülfit modifiyeDNA	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	0 µl
Nükleaz-free su	13,3 µl	13,3 µl	13,3 µl	13,3 µl	14.8 µl	18,3 µl
PCR mix	6,7 µl	6,7 µl	6,7 µl	6,7 µl	6,7 µl	6,7 µl
Total Hacim	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

3.2.7.PCR ürünlerine nested PCR yapılması

PCR ürünlerine nested PCR yapılması için farklı bir primer çifti kullanıldı. Böylece nested PCR ile tekrar çoğaltıldı. PCR ürünlerinin 1:3 oranında dilüe edilmesi sağlanarak tüplere koyuldu. Nested PCR'ın yapılması için bileşenler hesaplanarak buz üzerinde mix hazırlandı. Reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.4'te verilmiştir. Sonrasında 1:3 oranında dilüe edilen PCR ürünleri her tüpe eklendi. Çizelge 3.5.'e göre 1:3 oranında dilüe edilen PCR ürün miktarları kulanıldı. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi.

95°C 5 dk

95 °C'de 30 sn

57 °C'de 30 sn — 35 döngü

72 °C'de 40 sn

72 °C'de 5 dk

4 °C'de hold

Çizelge 3.3. Nested PCR reaksiyonunun mix bileşenleri

PCR bileşenleri	**Final Konsantrasyon**	**1 rxn**
$MgCl_2$ **(**25 mM)	1,5 mM	1,5 µl
dNTP (10 mM)	0.2 mM	0.5 µl
Reaction Buffer (10X)	1X	2.5 µl
Taq Polymerase (5U/µl)	1U	0.2 µl
Forward Primer (*ALX3*C2(F)) – (10 pmol/µl)	10 pmol/ µl	1.0 µl
Reverse Primer (*ALX3*C(R)) - (10 pmol/µl)	10 pmol/ µl	1.0 µl
Total Hacim	-	6,7 µl

Çizelge 3.4. Nested PCR reaksiyonuna eklenen PCR ürün miktarları

	PC3	Du145	LnCap	BPH	HeLa Control	Negatif Control
1:3 oranında sulandırılan PCR ürünleri	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl	0 µl
Nükleaz-free su	13,3 µl	13,3 µl	13,3 µl	13,3 µl	14.8 µl	18,3 µl
PCR mix	6,7 µl	6,7 µl	6,7 µl	6,7 µl	6,7 µl	6,7 µl
Total Hacim	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Kullanılan primerler Ek Çizelge 1.'de belirtildiği gibidir. Bu primerler ve çoğaltılmak istenen hedef promotor bölgesi Ek Şekil 1.'de gösterilmiştir.

3.2.8.Nested PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

Nested PCR ürünleri 1X TBE kullanılarak, %1'lik agarozda (1 µl etidyum bromür içeren) 120 voltta 90 dakika yürütüldü. Yükleme sırasında 1 µl yükleme boyası ile 5 µl nested PCR ürünü karıştırıldı. Marker yüklenirken ise 2 µl Marker (New England Biolabs, N3233S), 1 µl yükleme boyası ve 3 µl su karıştırıldı. Sonrasında UV sisteminde görüntülendi.

3.2.11.Hücre hatlarından RNA izolasyonu

RNA Monarch NEB Total RNA Miniprep Kiti (T2010S) kullanılarak PC3, Du145, LnCap ve BPH hücre hatlarından RNA izolasyonu yapıldı. Kit talimatlarına göre deney öncesinde Yıkama Tamponu solüsyonuna etanol eklenerek iyice karıştırılması sağlandı ve DNaz I distile su ile çözdürüldü. DNaz I Reaction Tamponu'ndan 75 µl ve DNaz I'den 5 µl olmak üzere her hücre için birleştirildi. Petrilerdeki hücreler iki kez Fosfat-Tuz Tamponu (PBS) ile yıkandı ve Tripsin kullanılarak kaldırıldı. 10000 rpm' de 1 dakika olmak üzere 3 kez santrifüj edildi. Süpernatan atıldıktan sonra pelletin üzerine RNA Lysis Tamponu'ndan 300 µl eklendi.

Köpürmeyecek şekilde pipetaj yapıldı ve gDNA Removal kolonuna hücre lizatı (yaklaşık 600 µl) aktarıldı. 30 saniye maksimum hızda spin edilerek gDNA Removal kolonlar atıldı. Lizata eşit hacimde etanol eklendi ve girdap oluşmayacak şekilde pipetaj yapıldı. Lizat kitten çıkan RNA Purification kolonuna aktarıldı ve 30 saniye maksimum hızda spin edilerek toplama tüpleri boşaltıldı.

Spin kolon üzerine RNA Yıkama Tamponu'ndan 500 µl eklenerek 30 saniye maksimum hızda spin edildi. Toplama tüpleri atılarak RNaz-free mikrofüj tüplerine spin kolon alındı. Lizatın üzerine DNaz I Reaction Tamponu ve DNaz I'den oluşan karışımdan 80 µl eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra RNA Priming Tamponu'ndan 500 µl eklendi. 30 saniye maksimum hızda spin edildi ve toplama tüpü boşaltıldı. 500 µl RNA Yıkama Tamponu eklenerek 30 saniye maksimum hızda santrifüj edildi.

Toplama tüpü boşaltılarak 500 µl daha RNA Yıkama Tamponu eklendi. 2 dakika maksimum hızda santrifüj yapıldı. Sonrasında toplama tüpleri atıldı. RNaz-free mikrofüj tüpüne spin kolon yerleştirilerek 35 µl nükleaz-free su eklendi. 30 saniye maksimum

hızda spin edildi. RNA'nın kolondan tam anlamıyla ayrılmasını sağlamak amacıyla iki adımlı elüsyon yapıldı. 35 µl daha nükleaz-free su eklenerek maksimum hızda 30 saniye spin edildi. Toplama tüpleri etiketlenerek ardından nanodropla ölçüm yapıldı. Elde edilen örnekler -80 °C'de saklandı.

***RNA örneklerinin nanodrop ölçümü**

Ölçümden önce bilgisayardaki nanodrobun programı açıldı ve RNA örnek adı vb. bilgiler girildi. RNA izolasyonu sırasında elüsyon adımı için nükleaz-free su kullanılması sebebiyle blank olarak 1 µl nükleaz-free su okutuldu. Daha sonrasında her RNA örneğinden 1 µl alınarak ölçüm yapıldı.

3.2.12.RNA örneklerinden ilk zincir cDNA sentezi

Pc3, Pc3 aza, BPH, BPH aza, Du145, Du145 aza, LnCap ve LnCaP aza RNA örneklerinden cDNA sentezi ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit New England Biolabs (E6300) kullanılarak yapıldı. Öncelikle cDNA sentez kiti oda sıcaklığında çözdürüldü ve kullanılan solüsyonlar kısaca vortekslendi.

RNA örnekleri buz aküsü üzerine yerleştirildi ve nükleaz-free PCR tüpleri etiketlendi. RNA konsantrasyonları ve kit talimatlarına göre komponentler eklendi. Kısaca spin attırıldı. Sonrasında kit talimatlarına göre 42°C'de 60 dakika ardından 80°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından cDNA örnekleri -80°C'ye kaldırıldı.

Çizelge 3.5. cDNA sentezi komponent miktarları

örnek	Total RNA miktarı (1 µg)	oligod T primer	Su	Reaction Buffer	Enzim mix	TOPLAM HACİM
PC3	2,60 µl	2 µl	3,40 µl	10 µl	2 µl	20µl
PC3 aza	5,9 µl	2 µl	0,1 µl	10 µl	2 µl	20µl
Du145	2,60 µl	2 µl	3,40 µl	10 µl	2 µl	20µl
Du145 aza	1,40 µl	2 µl	4,60 µl	10 µl	2 µl	20 µl
LnCap	8,81 µl	2 µl	-	10 µl	2 µl	20 µl
LnCap aza	10,5 µl	2 µl	-	10 µl	2 µl	20 µl
BPH	15,15 µl	2 µl	-	10 µl	2 µl	20 µl
BPH aza	7,9 µl	2 µl	-	10 µl	2 µl	20 µl

3.2.13.cDNA örneklerine Gerçek Zamanlı PCR yapılması

cDNA örneklerininin sentezinden sonra bu örneklere gerçek zamanlı PCR yapılmasında BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix kiti ve Bio-Rad Cfx Connect cihazı kullanıldı. Öncelikle cDNA dışındaki bileşenler kullanılarak mix hazırlandı. Bu mix içinhücre hattı sayısına bağlı olarak her örnek için üçlü tekrar olacak şekilde hesaplama yapıldı. Her stripe 19 µl mix dağıtıldı ve her stripe 1 µl cDNA eklendi. Spin down santrifüjleme yapılarak örnekler cihaza yüklendi.

Gerçek-Zamanlı PCR programı;

95 °C 60 sn

95 °C 15 sn

55 °C 30 sn

(60 °C 30 sn GAPDH)

60-95 °C erime eğrisi analizi

Gerçek-Zamanlı PCR deneyi sonucu elde edilen erime eğrisi, gen ifadesi değişikliği ve relatif kantitasyon verilerinin GAPDH referans geni ile normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemiyle hesaplaması yapıldı.

PCR'da mix için kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.9.'de gösterilirken kullanılan primerler ise Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Kullanılan primerler Ek Çizelge 2.'de belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.6. Gerçek-Zamanlı PCR reaksiyonu mix bileşenleri

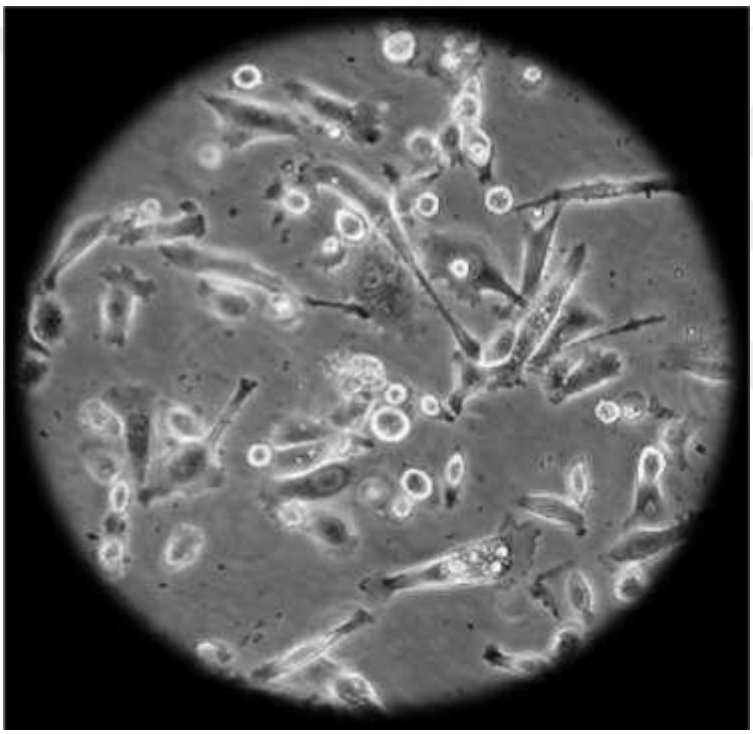
GAPDH mix	**20 µl rxn (1 tüp)**	**Final Konsantrasyon**	**25 rxn**
BlasTaq™ qPCR Master Mix (2X)	10 µl	1X	250 µl
Forward Primer (10 pmol/ µl)	1 µl	0.5 pmol/ µl	25 µl
Reverse Primer (10 pmol/ µl)	1 µl	0.5 pmol/ µl	25 µl
cDNA	1 µl	< 100 ng	-
Nükleaz-free su	7 µl	-	175 µl
Total Hacim	20 µl	-	475 µl

***ALX3* mix**	**20 µl rxn (1 tüp)**	**Final Konsantrasyon**	**25 rxn**
BlasTaq™ qPCR Master Mix (2X)	10 µl	1X	250 µl
Forward Primer (10 pmol/ µl)	0.5 µl	0.25 pmol/ µl	12,5 µl
Reverse Primer (10 pmol/ µl)	0.5 µl	0.25 pmol/ µl	12,5 µl
cDNA	1 µl	< 100 ng	-
Nükleaz-free su	8 µl	-	200 µl
Total Hacim	20 µl	-	475 µl

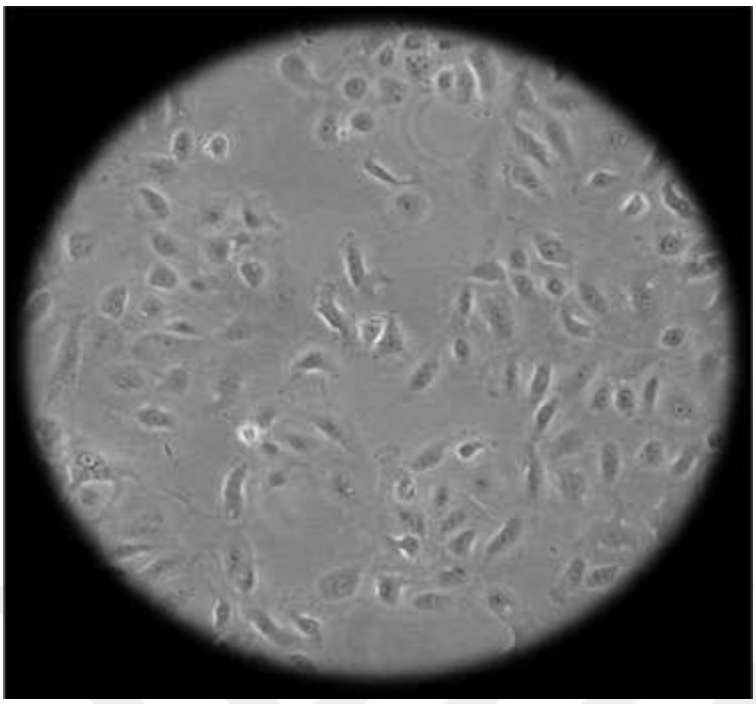
4.BULGULAR

4.1. Prostat Kanseri ve Normal Prostat Dokusu Hücre Hatlarının Mikroskop Görüntüleri

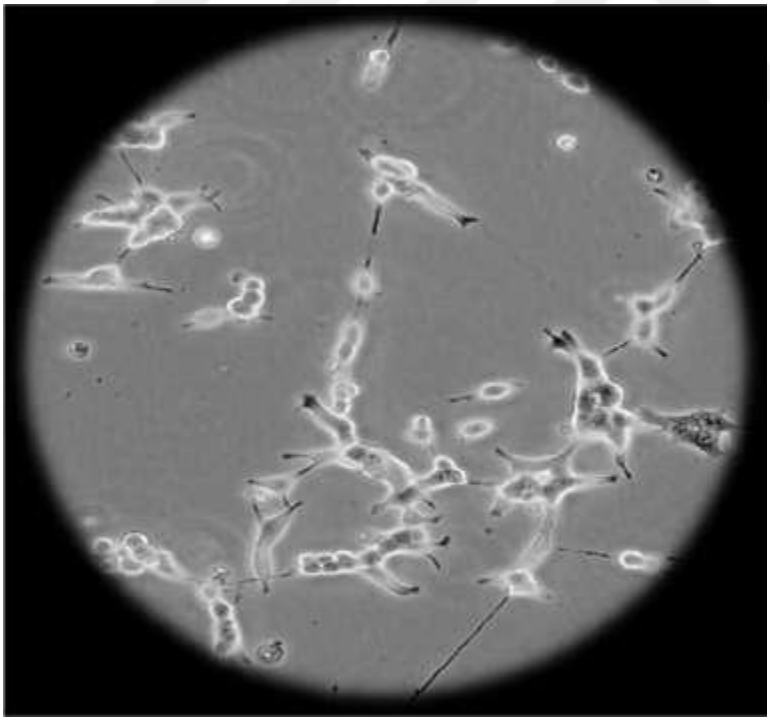
Tez kapsamında BPH normal prostat dokusu hücre hattı ile PC3, Du145, LnCap prostat kanseri hücre hatları temin edilmiştir. Bu hücre hatlarından PC3 hücre hattının şekil 4.1. 'de, Du145 hücre hattının şekil 4.2.'de, LnCap hücre hattının şekil 4.3.'de ve normal prostat dokusu olan BPH hücre hattının Şekil 4.4.'te görüntüsü verilmektedir.



Şekil 4.1. PC3 mikroskop görüntüsü



Şekil 4.2. Du145 mikroskop görüntüsü



Şekil 4.3. LnCap mikroskop görüntüsü



Şekil 4.4. BPH mikroskop görüntüsü

4.2.DNA Örneklerinin Nanodrop Ölçüm Sonuçları

Normal prostat dokusu ve prostat kanseri hücre hatlarından izole edilen DNA örnekleri ThermoFisher Scientific NANODROP 2000 ile ölçüldü. Ölçüm sırasında DNA örneklerinden 1 µl ve blank olarak DNA izolasyonunda kullanılan Elüsyon Tamponundan 1 µl kullanıldı. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.1.'de belirtildiği gibidir.

Çizelge 4.1. DNAörneklerinin nanodrop ölçüm sonuçları

ÖRNEK	DNA Konsantrasyonu (ng/ µl)	A260/280	A260/230
BPH	52,4	1,90	2,09
PC3	85,9	1,93	2,05
Du145	134,7	1,91	2,18
LnCaP	258,0	1,91	2,14

4.3.RNA Örneklerinin Nanodrop Ölçüm Sonuçları

Normal prostat dokusu ve prostat kanseri hücre hatlarından izole edilen RNA örnekleri ThermoFisher Scientific NANODROP 2000 ile ölçüldü. Ölçüm sırasında RNA örneklerinden 1 µl ve blank olarak 1 µl nükleaz-free su kullanıldı. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.2.'de belirtildiği gibidir.

Çizelge 4.2. RNA örneklerinin nanodrop ölçüm sonuçları

ÖRNEK	RNA Konsantrasyonu (ng/ µl)	A260/280	A260/230
BPH	33,0	2,08	2,12
BPH aza	63,3	1,99	2,35
PC3	191,9	2,01	1,96
PC3 aza	84,7	2,04	1,89
Du145	194,9	2,01	2,09
Du145 aza	355,3	2,01	1,85
LnCaP	56,7	2,04	1,33
LnCaP aza	47,3	2,05	1,94

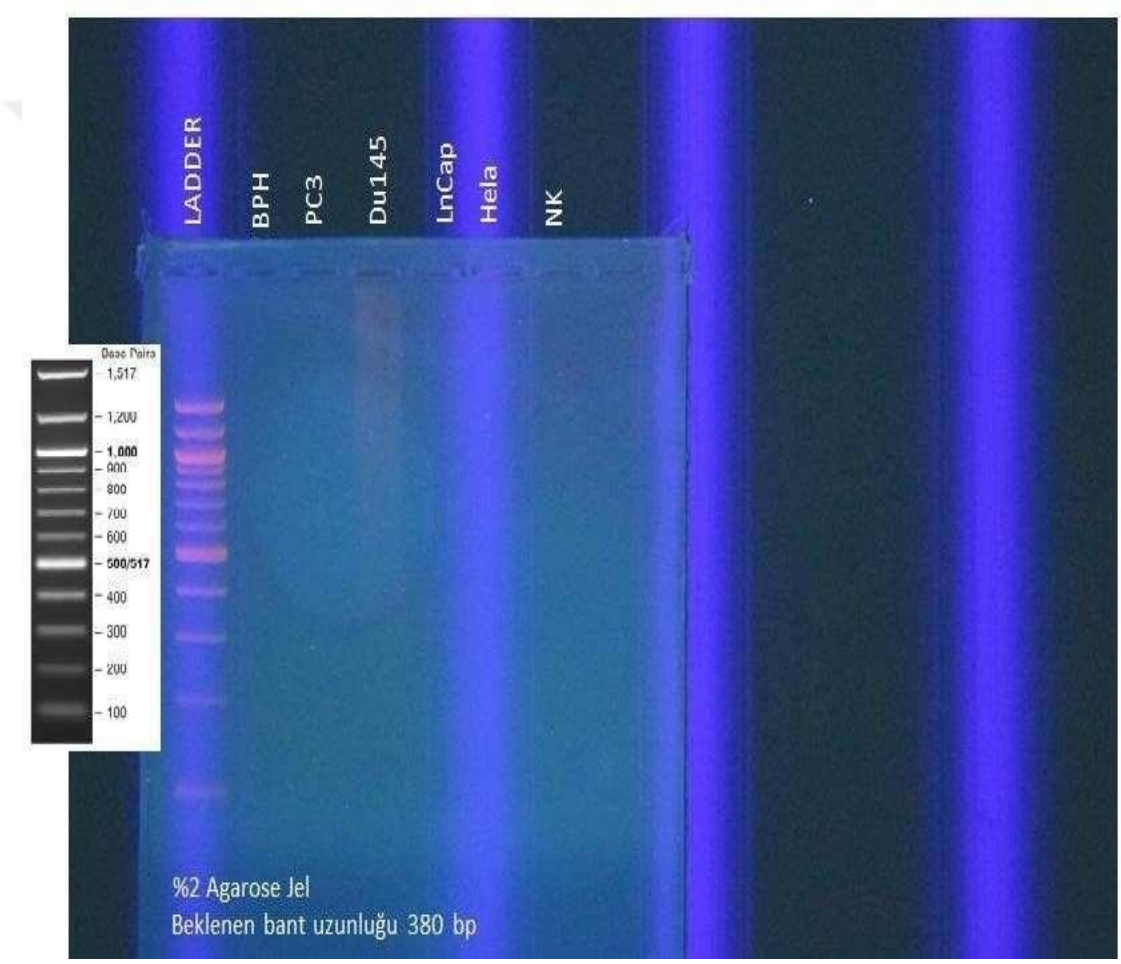
4.4.DNA'ların Bisülfit ile Muamelesi

PC3, Du145, LnCap ve BPH hücre hatlarından izole edilen DNA'lara Thermo Scientific EpiJET Bisülfite Conversion Kit (2635797) kullanılarak bisülfit modifikasyonu yapıldı. Deney sonucunda elde edilen ürünler PCR için hazırlandı.

4.5.Nested PCR ürünlerinin Jel Görüntüleri

PCR için bisülfit modifiye DNA'lardan 500 ng olacak şekilde alınıp primer olarak ALX3C3(R) (CAC ACT AAC CTT TAC CTAACC C) ve ALX3C(F) (TTT GAG TTG TTT GGG ATT GG) kullanıldı. PCR sonucunda elde edilen ürünler 1:3 oranında dilüe edildi. Nested PCR için her bir örnekten 5 µl kullanıldı. Bu templateleri Nested PCR'da çoğaltmak için primer olarak ALX3C(R) (CAC ACT AAC CTT TAC CTA ACC C) ve ALX3C2(F) (TGG ATG GTT TTA GTA TTA AGT TAG A) kullanıldı. Aynı zamanda Nested PCR'da PC3, Du145, LnCap ve BPH hücre hatlarının haricinde bisülfit ile

muamele edilmiş HeLa kontrol DNA da aynı primerlerle çoğaltıldı. Nested PCR sonucunda beklenen ürün boyutu 380 bp olup deneylerimiz boyunca PC3, Du145, LnCap, BPH ve HeLa kontrol DNA'sında uzun bir süre boyunca bant elde edilememiştir. Yürütmede marker NEB N3233S kullanıldı. Sonuç olarak şekil 4.5.'da görüldüğü üzere PC3, Du145, LnCap, BPH ve HeLa kontrol DNA örneklerinde 380 bp civarında bant elde edilememiştir. Bu nedenle Cobra Assay yöntemindeki bir sonraki aşama olan enzim kesimi yapılmadı.



Şekil 4.5. Nested PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

4.6.Gerçek-Zamanlı PCR Sonuçları

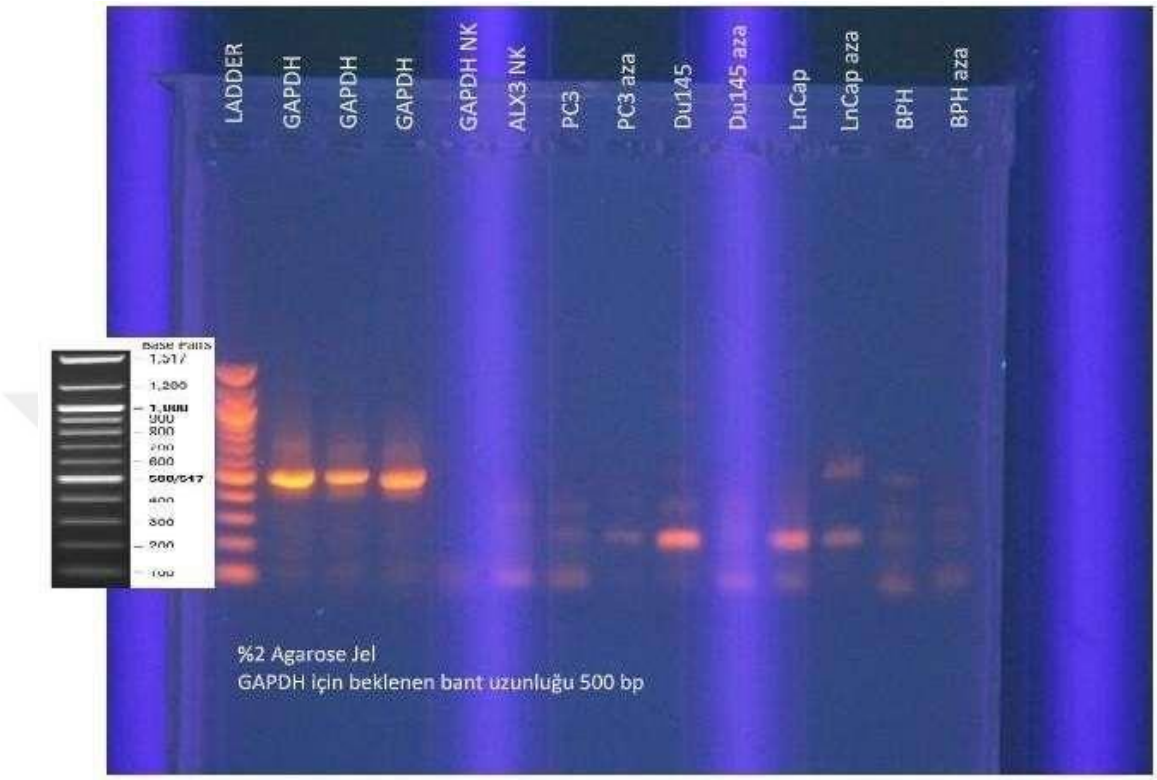
Metilasyon profili ile ALX3 geninin ifadesi arasındaki ilişkinin incelenmesi için Gerçek-Zamanlı PCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntem BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla housekeeping gen olarak GAPDH geni kullanıldı. Normal prostat dokusu hücre hattı BPH ile prostat kanseri hücre hatları PC3, Du145, LnCap hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirildi. Ardından hedef genimizi çoğaltmak için uygun primer çifti kullanılarak Gerçek-Zamanlı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen Ct değerleri Çizelge 4.4.'te gösterildiği şekildedir. Bu değerlerle ALX3 gen ekspresyonunu analiz etmek amaçlandı. İfade değişikliklerini ölçebilmek için referans olarak kullanılan GAPDH geni ile relatif kantitasyon testi gerçekleştirildi. Elde edilen veriler şekil 4.8.'deki grafiğe aktarıldı.

Grafiğe bakıldığında prostat kanseri hücre hatlarında ALX3 ifadesi belli oranlarda artmıştır. Ct değerlerine bakıldığında prostat kanseri ve normal prostat dokusu arasında ifade bakımından farklılıklar görülmektedir. Referans olarak kullandığımız GAPDH genimizin ifadesi ise normal seviyelerdedir.

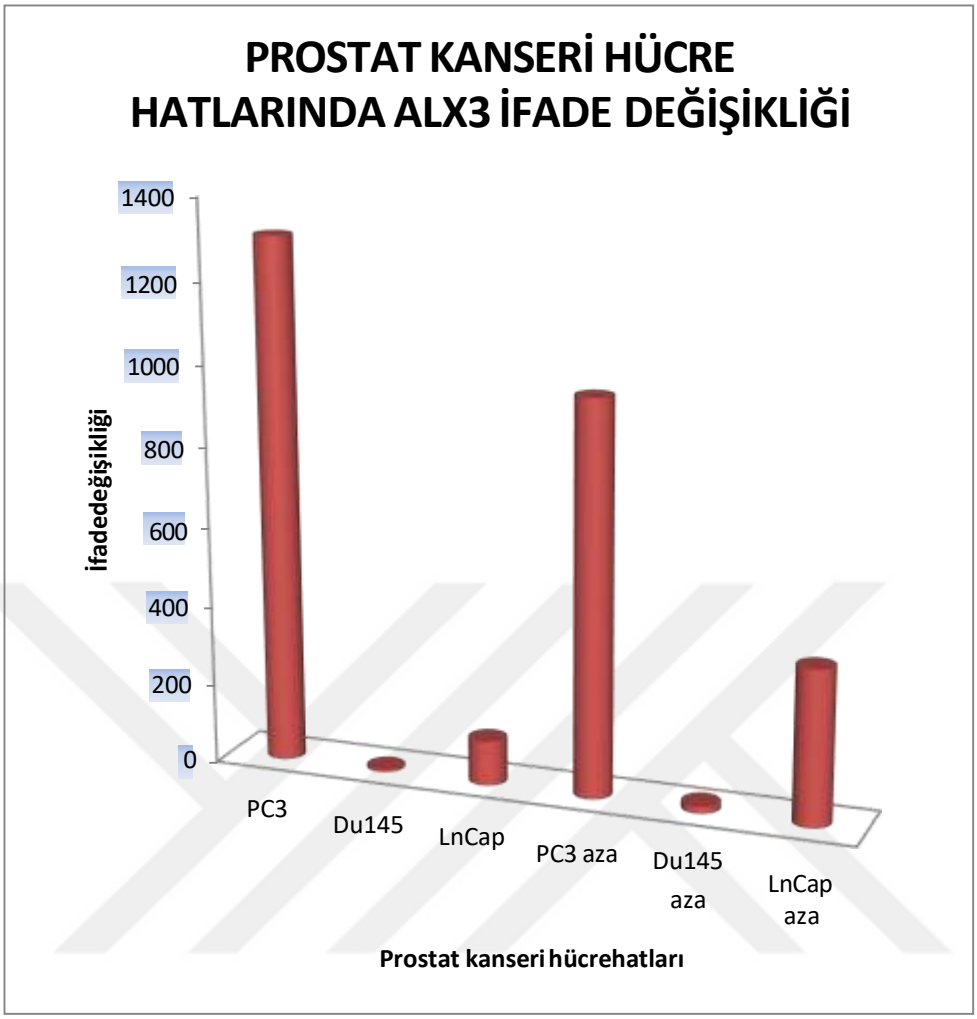
Bunu doğrulamak için Gerçek-Zamanlı PCR reaksiyonu sonrası ürünler 1 µl etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde yürütülerek fotoğraflandı. Şekil 4.7.'de görüldüğü gibi ALX3 primerleri kullanılan ürünlerde ve GAPDH primerleri kullanılan ürünlerde bant gözlenmektedir.

Şekil 4.8.'da gösterildiği gibi ifade değişimlerinde normal prostat dokusu BPH'a göre hesaplanan relatif kantitasyon sonucunda PC3'te yaklaşık 1305,15 katlık bir artış, Du145'te 5,93 katlık bir artış ve LnCaP'te 111,43 katlık bir artış gözlenmiştir. Metilasyonu ortadan kaldırmak için 5-aza-2-deoksisitidin uygulaması gerçekleştirilen hücre hatlarına bakıldığında ise normal prostat dokusu BPH aza'ya göre hesaplanan

relatif kantitasyon sonucunda PC3 aza'da yaklaşık 975,50 katlık bir artış, Du145 aza'da 17,75 katlık bir artış ve LnCaP aza'da 385,34 katlık bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.6. Gerçek-Zamanlı PCR sonucunda *ALX3* ve GAPDH primerleri kullanılan örneklerin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 4.7. Prostat kanseri hücre hatlarında *ALX3* geni göreceli ifadesi

HÜCRE HATTI	GEN	TÜP	CT	CT ORTALAMASI
BPH	ALX3	1	31,40	31,01
		2	31,28	
		3	30,37	
	GAPDH	1	18,89	18,55
		2	18,95	
		3	17,82	
BPH aza	ALX3	1	31,95	31,99
		2	31,45	
		3	32,59	
	GAPDH	1	17,84	18,17
		2	17,88	
		3	18,81	
PC3	ALX3	1	23,55	23,39
		2	23,19	
		3	23,45	
	GAPDH	1	20,76	21,28
		2	21,78	
		3	21,31	
PC3 aza	ALX3	1	24,76	24,58
		2	24,50	
		3	24,48	
	GAPDH	1	20,64	20,69
		2	20,90	
		3	20,54	

Çizelge 4.3. Gerçek-Zamanlı PCR sonucu BPH, BPH aza, PC3 ve PC3 aza hücre hatlarında *ALX3* ve GAPDH genleri için elde edilen Ct değerleri

HÜCRE HATTI	GEN	TÜP	CT	CT ORTALAMASI
Du145	ALX3	1	32,93	33,19
		2	33,85	
		3	32,81	
	GAPDH	1	17,69	18,16
		2	17,98	
		3	18,82	
Du145 aza	ALX3	1	33,30	34,10
		2	34,98	
		3	34,04	
	GAPDH	1	16,74	16,13
		2	15,99	
		3	15,66	
LnCaP	ALX3	1	34,13	34,33
		2	34,09	
		3	35,79	
	GAPDH	1	14,70	15,07
		2	15,91	
		3	14,60	
LnCaP aza	ALX3	1	36,45	35,68
		2	35,16	
		3	35,45	
	GAPDH	1	13,53	13,27
		2	12,93	
		3	13,35	

Çizelge 4.4. Gerçek-Zamanlı PCR sonucu Du145, Du145aza, LnCap ve LnCap aza hücre hatlarında *ALX3* ve GAPDH genleri için elde edilen Ct değerleri

5.SONUÇ ve TARTIŞMA

Farklılaşma ve çoğalma mekanizmaları işlevini görmediğinde hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu kanser oluşur. Kanser gelişiminde mutasyonlar, hormonlar, sigara, diyet, ilaç ve radyasyon gibi faktörler etkilidir (Bilir, 2008). Tümörler çevresindeki dokuya veya vücudun başka bir yerine yayılma durumuna göre iyi huylu tümörler ve kötü huylu tümörler olmak üzere ikiye ayrılır. İyi huylu tümörler herhangi bir yayılma göstermezken kötü huylu tümörler yayılma göstermektedir (Topaktaş, 2014).

Kanser hücreleri büyümeyi uyaran sinyallere karşı duyarlı iken büyümeyi engelleyen sinyallere fazla duyarlılık göstermezler(Schulz,2005).Prostat kanseri prostatın tüm bölgelerinden gelişebilen ve kanser nedenli bağlı ölümlerde dünya genelinde ikinci sırada yer alan kanser çeşididir.(Siegel ve ark. 2019). Prostat kanseri yayılma hızı yaş ile orantılı olarak artar. Prostat kanseri olan erkeklerin büyük çoğunluğu kanser dışında farklı sebeplerden hayatını kaybetmektedir (Cooperberg ve ark. 2020).

Homeobox genleri ortak bir DNA dizisine sahiptir ve gelişim düzenlenmesinde görev alır. Bu genler, DNA üzerine bağlanarak diğer genlerin ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. ALX genleri homeobox ailesine dahil olup metilasyonu ve ekspresyonu kanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Bir epigenetik değişiklik olan DNA metilasyonu genlerin ifade edilmesine etki eder ve kanser gelişimi ile ilişkilendirilir.

Kanserde anormal hipermetilasyon çoğunlukla metillenmemiş CpG adalarında meydana gelir ve sonucunda kromatin yapısında oluşan değişiklikler transkripsiyonu susturur. Metillenmenin en çok çalışılan ve en önemli çeşidi DNA'nın bazı bölgelerinde sitozinin metillenerek 5-metilsitozine(5-mC) dönüşümüdür. Metilasyon transkripsiyon faktörünün bağlanmasına engel olur ve ilgili genin ifadesini durdurur. Bazı kanser çalışmalarında ALX genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda ALX gen ailesine ait ALX1 ve ALX4 genlerinin bazı kanser türlerinde biyobelirteç olabileceği ile ilgili bulgular vardır. Bazı kanser çalışmalarından özellikle meme kanseri, pankreas kanseri ve kolon kanseri gibi kanser türlerinde ALX3 ekspresyon düzeyleri azalmıştır.

Yapılan kanser çalışmalarında ALX3 gen ifadesi seviyelerinde değişiklikler olduğu görülmüştür ancak literatürde prostat kanseriyle ilgili böyle bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu tezimizde hipotezimiz prostat kanseri hücre hatlarında *ALX3* geninin metilasyon ve ifadesinin kontrol grubuna göre farklı seviyelerde olup olmadığını araştırmak ve buna doğrultuda biyoteknolojik ilaç geliştirilerek kanserleşmeyi tersine çevirmenin sağlanabileceği üzerinedir.

Tez çalışmasının asıl amacı, normal prostat dokusu hücre hattı ve prostat kanseri hücre hatlarında *ALX3* gen ifadesini ve buna bağlı promotor metilasyonu arasında herhangibir ilişki olup olmadığını incelemektir. Bu korelasyonu inceleyebilmek için gen ifadesi ve metilasyon analizi yapıldı. Bu amaç doğrultusunda promotor metilasyon seviyelerinin analizi için COBRA yöntemi ve gen ifadelerinin seviye analizi için Gerçek-Zamanlı PCR yöntemi kullanıldı. Gerçek-Zamanlı PCR analizi sonuçlarımıza göre PC3, Du145, LnCap prostat kanseri hücre hatlarında normal prostat dokusu BPH hücre hattına göre *ALX3* gen ifadesinde farklı seviyelerde ve genel bir artış gözlenmiştir. Bu da *ALX3* geninin prostat kanserinde farklı ekspresyon profiline sahip olması bakımından bu yönüyle biyobelirteçolabileceğini göstermektedir.

Ayrıca ALX3 geninin üç farklı prostat kanseri hücre hattında ekspresyon seviyelerinin birbirlerinden çok farklı olması hücre hatlarının özelliklerinden kaynaklanabilir. Bu üç hücre hattının metastatik özellikleri, birbirlerinden ayıran en büyük farklılıktır. Örneğin PC3 yüksek metastaz, Du145 orta metastaz, ve LnCap düşük metastaz aktivitesine sahiptir. ALX3 geninin ekspresyon farkı bu hücrelerin metaztazla ilişkisini düzenleyen faktörlerden biri olabilir.

Ancak metilasyon analizi sonuçlarına göre prostat kanseri hücre hatları PC3, Du145 ve LnCap'de BPH hücre hattına kıyasla herhangi bir metilasyon gözlenememiştir. Yani yaptığımız analizler sonucunda prostat kanseri hücre hatlarında normal prostat dokusu hücre hattına kıyasla gen ifadesinde artış görülürken hücre hatlarının hiçbirinde metilasyon gözlenmemiştir. Bunun nedeni bisülfit dönüşümü sırasında izole edilen DNA'nın degrade olması ile açıklanabilir. Yaptığımız analizler sonucu teorikte bilinen hücre hatlarındaki hipermetilasyonun gen ifadesini baskılaması gerektiğinin beklenmesi yönündeki yaklaşım ile uyuşan herhangi bir veri elde edilememiştir.

Literatür taramasında ALX3 geninin kolorektal (Mori 2011), hepatoselüler karsinom (Sun 2018), nöroblastom (Wimmer 2002) ve rabdomayosarkom (Mahoney 2012) örneklerinde promotor hipermetilasyonu ve buna bağlı gen ifadesinde azalma rapor edilmiştir. Promotor metilasyon durumu gen ifadesini artırıcı yönde de etki edebilirken, gen ifadesinde bir etkisinin olmadığı veya farklı yönlerde etkileyebildiği farklı çalışmalar mevcuttur (Lee ve ark. 1987, Moarii, 2015, Carrington ve ark. 1987, Lan, 1984, Spainhour ve ark. 2019, Lambert ve ark. 1990,J. Lu ve ark. 2020). Ayrıca yapılan farklı bir yayında ALX3 promotor metilasyonunun biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Kartaloğlu 2021).

Buradan anlaşılacağı üzere farklı çalışmalarda metilasyon ve ekspresyon arasındaki korelasyon farklı şekillerde gözlenmiştir. Rahim ağzı kanseri hücre hatlarında *ALX3* gen ifade artışı gözlendiği gibi (Qi ve ark. 2021) bizim yaptığımız çalışmalarda da prostat kanseri hücre hatlarında kontrol grubuna göre *ALX3* gen ifadesinde artış gözlenmiştir. Bunun nedeni prostat kanseri hücre hatlarında bilinmeyen metilasyon profilinin *ALX3* gen ifadesinde artışa sebep olması olabilir.

Ayrıca UALCAN veritabanındaki verilere baktığımızda Ek Şekil 2.'de gösterildiği gibi *ALX3* gen ifadesi kontrol grubuna göre prostat kanseri hücre hatlarında artış göstermiştir. Sonuçlarımız bu verileri destekler niteliktedir. Aynı şekilde bu veritabanında metilasyon seviyelerine bakıldığında Ek Şekil 3.'de görüldüğü gibi prostat kanseri hücre hatlarında kontrol grubuna göre hipermetile olduğu gözlenmiştir. Bu verilerde de görüldüğü gibi sonuçlarımızda elde ettiğimiz prostat kanser hücre hatlarındaki gen ifadesindeki artış, hipermetilasyon kaynaklı olabilmektedir.

Yapılan araştırmalarda bazı histon demetilazların spesifik genlerin ifade düzeyini etkilediği belirtilmiştir. Bunun yanısıra bir tümör baskılayıcı gen olan p53 gibi histon olmayan proteinlerin gen ifade seviyesini düzenlediği ve global DNA metilasyonundan da sorumlu olduğu bildirilmiştir. Böylece histon demetilazların prostat kanserinde etkin rol oynadığı belirtilmiştir.

Transkripsiyon sonrası düzenleyiciler olan miRNA'lar 20-24 nükleotit uzunluğundadır. Spesifik olarak mRNA'lara bağlanarak genellikle gen ifadesini baskılar veya mRNA'yı yıkıma uğratır. miRNA'ların bazıları onkogen, bazıları ise tümör baskılayıcı gen özelliği gösterir ve miRNA'ların ifade profilinin değişmesi kanser başlangıcına veya ilerlemesine sebep olabilmektedir. Değişmiş miRNA profili, prostat kanserinde rapor edilmiştir.

Tümör hücrelerinde miRNA profilinin değişme sebepleri arasında epigenetik mekanizmalar da gösterilmektedir. Tümör baskılayıcı miRNA'ların ifade düzeyi, DNA metilasyonuyla azalabildiği gibi onkogenik miRNA'ların ifade düzeyi histon asetilasyonuyla artması kanserde görülebilen olaylardır. Bu durumda elde ettiğimiz gen ifade düzeyleri ile histon deasetilasyonu arasında bir korelasyon olabilir. Bu noktada elde edilecek metilasyon seviyesinin miRNA'ların ifade düzeyiyle ilişkisi saptanarak yada TSA gibi histon deasetilasyon inhibitörleri kullanılarak bu epigenetik mekanizma daha çok aydınlatılacaktır.

Bu sonuçlardan yola çıkarak *ALX3* geni prostat kanserinde farklı ekspresyon seviyeleri sergilemesi yönüyle prostat kanseri için potansiyel bir biyobelirteçtir. Fakat bu alanda yapılacak farklı *in vivo* çalışmalar *ALX3* geninin bu potansiyel biyobelirteç olarak kullanılmasının kesinleştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu şekilde *ALX3* geninin overekspresyonunu tersine çevirecek yeni biyoteknolojik ilaçların geliştirilmesi için yapılacak çalışmalara temel oluşturmuş olacaktır. Böylece geliştirilecek biyoteknolojik ilaç prostat kanserinin gelişmesine engel olacaktır.

KAYNAKLAR

Ahmedin Jemal, Rebecca Siegel, Elizabeth Ward, Taylor Murray, Jiaquan Xu, Carol. (2006). Cancer İstatistics, 2006. CA Cancer J Clin. 56;106–130

Aldawsari, F.S., Ortiz, R.A., Kapilashrami, K., Yoo, J., Luo, M., MedinaFranco, J.L., Velázquez-Martínez, C.A., "Resveratrol-salicylate derivatives as selective DNMT3 inhibitors and anticancer agents", Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 1475-6366 (Print) 1475-6374, (2015).

Ayaz, G., Şahin, Ö., Ayaz, U., ve Özdemir, S.,M., "Epigenetik ve kanser", İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü, (2019).

Beuselinck, K., van Ranst, M., van Eldere, J., 2005, Automated extraction of viralpathogen RNA and DNA for high-throughput quantitative real-time PCR, J. Clin. Microbiol. 43 (11), 5541-5546.

Beverdam, A., & Meijlink, F. (2001). Expression patterns of group-I aristaless-related genes during craniofacial and limb development. Mechanisms of Development, 107(1–2), 163–167. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00450-6

Bilir, N., 2008, Sigara ve Kanser, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.B.D

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R,T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitive real-time PCR experiments. Clin Chem 2009; 55(4): 611-22

Bürglin TR. Homeodomain subtypes and functional diversity. Subcell Biochem. 2011;52:95-122.

Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. J Urol. 1993 Sep;150(3):797-802. doi: 10.1016/s0022-5347(17)35617-3. PMID: 8345587.

Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 15;89(8):3367-71. doi: 10.1073/pnas.89.8.3367. PMID: 1565627; PMCID: PMC48868.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. Nucleic Acids Res 1994; 22:2990–2997

Colella S, Shen L, Baggerly KA, et al. Sensitive and quantitative universal pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. Biotechniques 2003; 35:146–150.

Cooperberg M.R., & Washington III S.L., & Carroll P.R. (2020). Cancer of the prostate gland. McAninch J.W., & Lue T.F.(Eds.), Smith & Tanagho's General Urology, 19e.

Costello JF, Plass C, Cavenee WK. Restriction landmark genome scanning. Methods Mol Biol 2002; 200:53–70.

McGrawHill.https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2840&sectionid=241661741

Dearnaley, D.P. (1994). Cancer of the prostate. BMJ, 308(6931): 780–784.

Eads, C.A., Laird, P.W. (2002). Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA). In: Mills, K.I., Ramsahoye, B.H. (eds) DNA Methylation Protocols. Methods in Molecular Biology™, vol 200. Springer, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1385/1-59259-182-5:071

Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res 1982; 10:2709–2721.

Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P, et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:15785–15790.

Eser, B. E., Yazgan, Ü.C., Gürses, S.A., Aydın, M., "Diabetes Mellitus ve Epigenetik Mekanizmalar", Dicle Tıp Dergisi, 43 (2): 375-382, (2016).

Fang, M.Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W., Yang, C.S., "Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines", Cancer Res. 63: 7563-7570, (2003).

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques. 1999 Jan;26(1):112-22, 124-5. doi: 10.2144/99261rv01. PMID: 9894600.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:1827–1831

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 1996;6:995-1001.

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol. 2002 Jun;30(6):503-12. doi: 10.1016/s0301-472x(02)00806-8. PMID: 12063017.

Gravitol, C., Hemerly, AS., Ferreira, PC., 2012, Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations, Biochimica et Biophysica Acta, 1819 (2), 176-185.

Greer, S., Honeywell, R., Geletu, M., Arulanandam, R., Raptis, L., 2010, Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells, J. Immunol. Methods, 355 (1–2), 76–79.

Guo, X., Ngo, B., Modrek, A., & Lee, W.-H. (2014). Targeting Tumor Suppressor Networks for Cancer Therapeutics. Current Drug Targets, 15(1), 2–16. https://doi.org/10.2174/1389450114666140106095151

Günel, T., 2007, Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR", Bilimsel Mektup, 27 (5), İstanbul.

Hamad, A. F., Jeong, H. Y., Han, J. H., & Rather, I. A. (2017). Detection of cytosolic tRNA in mammal by Northern blot analysis. Bangladesh Journal of Pharmacology, 12(3).

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:9821–9826

Hirsch, S., Baumberger, R., Grossniklaus, U., 2012, Epigenetic variation, inheritance and selection in plant populations, Cold Spring Harbour Symposi on Quantitaive Biology, 77, 97-104.

Hu M, Yao J, Cai L, et al. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. Nat Genet 2005; 37:899–905.

Kayserili H, Uz E, Niessen C, Vargel I, Alanay Y, Tuncbilek G, et al. ALX4 dysfunction disrupts craniofacial and epidermal development. Hum Mol Genet. 2009;18(22):4357-66.

Kumagai J, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Blumberg B, Inoue S. Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer. Prostate. 2007 Jul 1;67(10):1029-37. doi: 10.1002/pros.20597. PMID: 17455229.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods, 25(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Meijlink F, Beverdam A, Brouwer A, Oosterveen TC, Berge DT. Vertebrate aristaless-related genes. Int J Dev Biol. 1999;43(7):651-63.

Oh WK. Chemotherapy for patients with advanced prostate carcinoma: a new option for therapy. Cancer, 88:3015-3021, 2000.

Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ. (2014). Genetik. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık

Qi, J., Zhou, L., Li, D., Yang, J., Wang, H., Cao, H., … Yuan, Y. (2021). Oncogenic role of ALX3 in cervical cancer cells through KDM2B-mediated histone demethylation of CDC25A. BMC Cancer, 21(1). https://doi.org/10.1186/S12885-021-08552-7

Qin, T., Jelinek, J., Si, J., Shu, J., & Issa, J. P. J. (2009). Mechanisms of resistance to 5-aza-2′-deoxycytidine in human cancer cell lines. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 113(3), 659-667.

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry, 245(2), 154–160. https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916

Robertson, D.K., "DNA methylation and human disease", Nature Reviews Genetics, 6:597-610 (2005).

Rollins RA, Haghighi F, Edwards JR, et al. Large-scale structure of genomic methylation patterns. Genome Res 2006; 16:157–16

Seo, J.Y., Park, Y.J., Yi, Y.A., Hwang, J.Y., Lee, I.B., Choo, B.H., Son, H.H., Seo, D.G., "Epigenetics: general characteristics and implications for oral health", Restor Dent Endod, (2014).

Shen, L., & Waterland, R. A. (2007). Methods of DNA methylation analysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *10*(5), 576-581.

Ståhlberg, A., Zoric, N., Åman, P., & Kubista, M. (2005). Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. *Expert review of molecular diagnostics*, *5*(2), 221-230. doi: 10.1586/14737159.5.2.221. PMID: 15833051.

Terry S., Yang X., Chen M., Vacherot F., ve Buttyan R. (2006) Multifaceted Interaction Between the Androgen and Wnt Signaling Pathways and the Implication for Prostate Cancer. Journal of Cellular Biochemistry 99, 401-410.

Trapman, J. (2001). Molecular mechanisms of prostate cancer. Department of Pathology, Erasmus University, Rotterdtrm, The Netherlands, 37 (7): 119–125.

Twigg SR, Versnel SL, Nurnberg G, Lees MM, Bhat M, Hammond P, et al. Frontorhiny, a distinctive presentation of frontonasal dysplasia caused by recessive mutations in the ALX3 homeobox gene. Am J Hum Genet. 2009;84(5):698-705.

Uz E, Alanay Y, Aktas D, Vargel I, Gucer S, Tuncbilek G, et al. Disruption of ALX1 causes extreme microphthalmia and severe facial clefting: expanding the spectrum of autosomal-recessive ALX-related frontonasal dysplasia. Am J Hum Genet. 2010;86(5):789-96.

Waterland RA, Lin JR, Smith CA, Jirtle RL. Postweaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (Igf2) locus. Hum Mol Genet 2006; 15:705–716.

Wolfgang Schulz. (2005). Molecular Biology of Human Cancers An Advanced Student's Textbook. The Netherlands: Springer

Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res 1997; 25:2532–2534.

Zhong YF, Butts T, Holland PW. HomeoDB: a database of homeobox gene diversity. Evol Dev. 2008;10(5):516-8.

EKLER

EK 1. PCR, COBRA ve Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler
EK 2. Hedeflenen Promotor Bölge ve Primerler
EK 3. Prostat Kanseri Hücre Hattında Kontrol Grubuna Göre *ALX3* Geninin İfade Düzeyi
EK 4. Prostat Kanseri Hücre Hattında Kontrol Grubuna Göre *ALX3* Geninin Metilasyon Düzeyi

EK 1. PCR, COBRA ve Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler

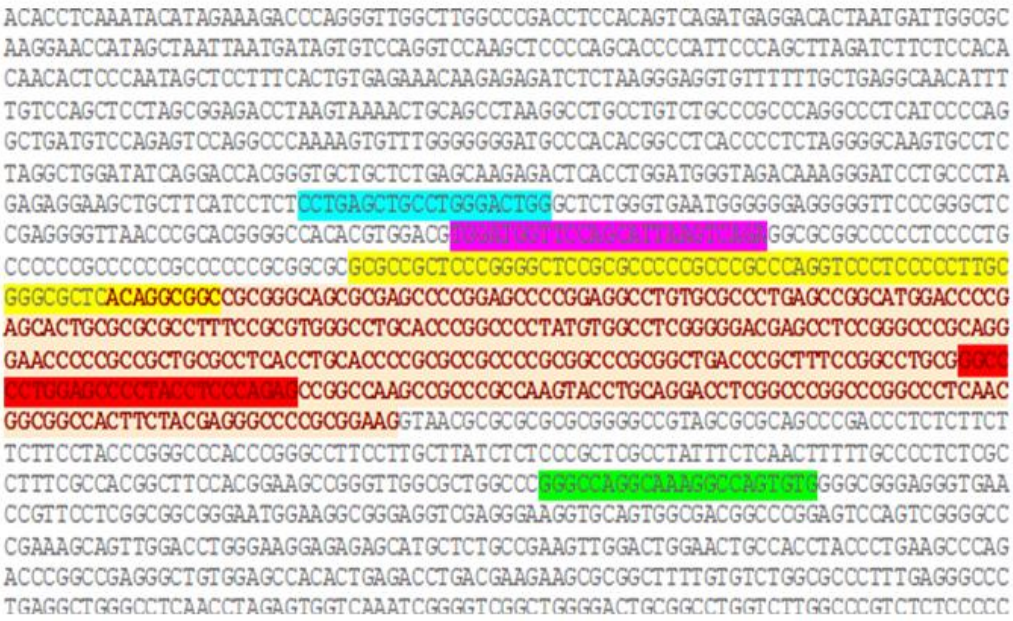
Primer	**Sekans (5'-3')**	**Skala**	**Tm (°C)**
*ALX3*C(R)	CTC TAA AAA ATA AAA CTC CAA AAA CC	200 nmol	50.08 °C
*ALX3*C(F)	TTT GAG TTG TTT GGG ATT GG	200 nmol	47.68 °C
*ALX3*C3(R)	CAC ACT AAC CTT TAC CTA ACC C	200 nmol	58.4 °C
*ALX3*C2(F)	TGG ATG GTT TTA GTA TTA AGT TAG A	200 nmol	54.8 °C

Ek Çizelge 1. PCR ve COBRA reaksiyonlarındaki primerler

Primer Adı	**Sekans (5'-3')**
*ALX3*RT-(F)	ATC CTG ATG TGT ATG CCC GG
*ALX3*RT-(R)	AGG GAG TTC TGC AGC TGA G
GAPDH- (F)	AAC AGC CTC AAG ATC ATC AGC
GAPDH- (R)	GCG TCA AAG GTG GAG GAG TG

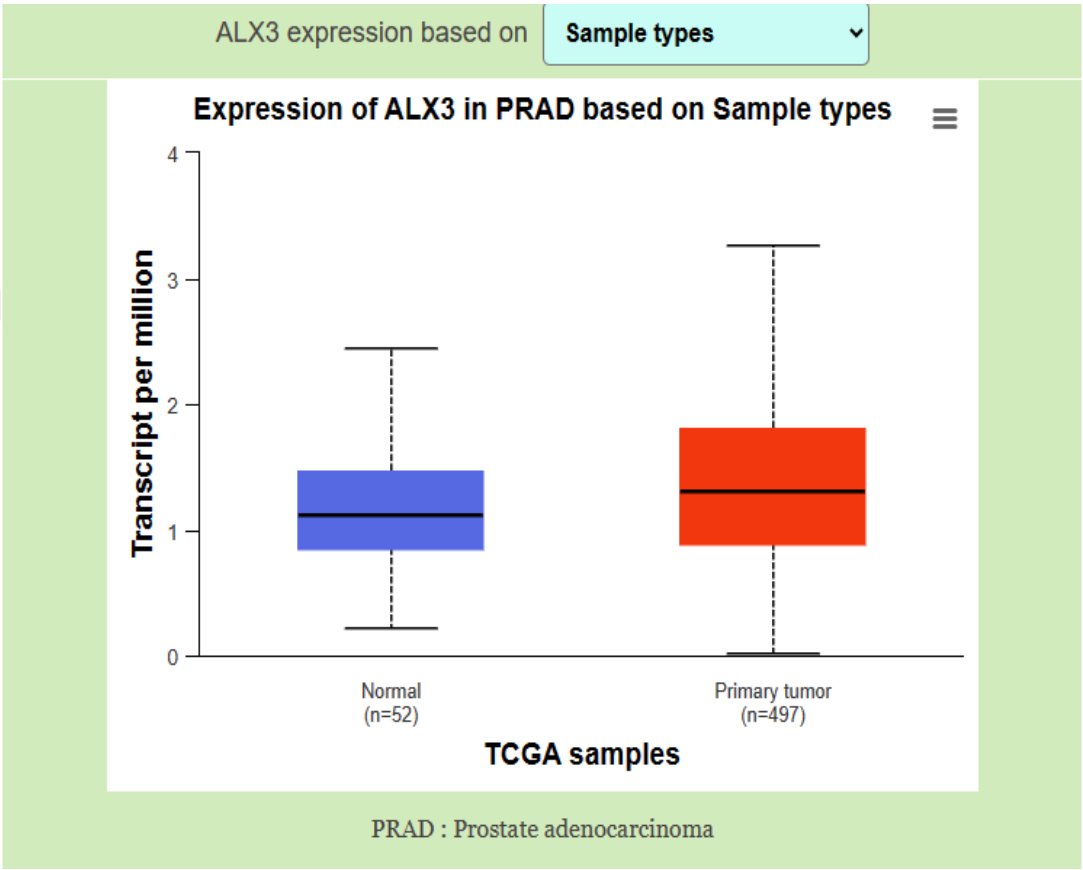
Ek Çizelge 2. Gerçek Zamanlı PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

EK 2. Hedeflenen Promotor Bölge ve Primerler



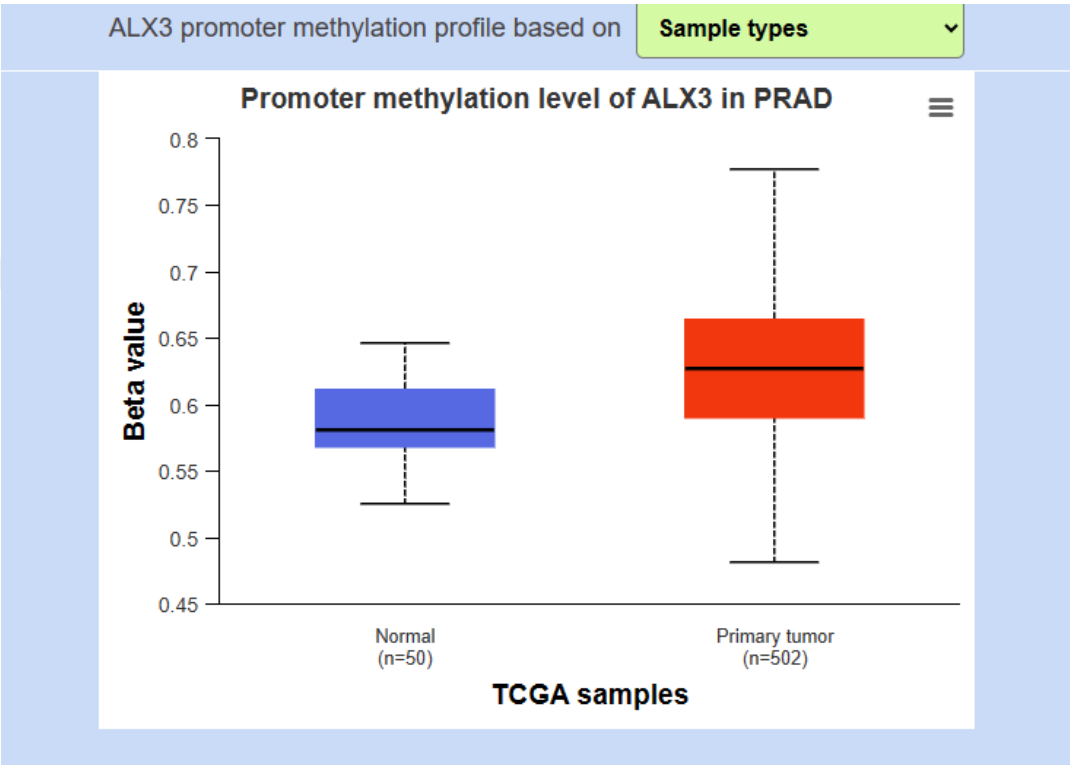
Ek Şekil 1. Hedeflenen promotor bölge ve primerler (sarı: promotor bölgesi, pembe: C2(F), kırmızı: C(R), yeşil: C3(R), mavi:C(F))

EK 3. Prostat Kanseri Hücre Hattında Kontrol Grubuna Göre *ALX3* Geninin İfade Düzeyi



Ek Şekil 2. Prostat kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre *ALX3* geninin ifade düzeyi

EK 4. Prostat Kanseri Hücre Hattında Kontrol Grubuna Göre *ALX3* Geninin Metilasyon Düzeyi



Ek Şekil 3. Prostat kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre *ALX3* geninin metilasyon düzeyi