T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

"PREMATÜR KROMOZOM KONDENSASYONUYLA ELDE EDİLMİŞ İNTERFAZ KROMOZOMLARI ile MİTOTİK KROMOZOMLARDAKİ HİSTON MODİFİKASYONLARININ İMMÜNFLORESAN YÖNTEMLE İNCELENMESİ"

Cahide KARTAL

DANIŞMAN
Doç. Dr. Yelda Tarkan ARGÜDEN

II. DANIŞMAN
Dr. Rahiye Dilhan KURU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Temmuz, 2025

TEZ KABUL VE ONAYI

Cahide KARTAL tarafından, **Doç. Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN** danışmanlığında hazırlanan **" PREMATÜR KROMOZOM KONDENSASYONUYLA ELDE EDİLMİŞ İNTERFAZ KROMOZOMLARI ile MİTOTİK KROMOZOMLARDAKİ HİSTON MODİFİKASYONLARININ İMMÜNFLORESAN YÖNTEMLE İNCELENMESİ** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Tarih girmek için tıklayın veya dokunun. tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Doç. Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN İstanbul üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI İstanbul üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Çağrı GÜLEÇ İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. İstanbul Üniversitesi ..... Üniversitesi ..... Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Xxxx XXXX ..... Üniversitesi ..... Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Cahide KARTAL

(İmza)

Aileme ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

PREMATÜR KROMOZOM KONDENSASYONUYLA ELDE EDİLMİŞ İNTERFAZ KROMOZOMLARI ile MİTOTİK KROMOZOMLARDAKİ HİSTON MODİFİKASYONLARININ İMMÜNFLORESAN YÖNTEMLE İNCELENMESİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 37897

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle cömertçe paylaşan, sonsuz sabrı ve nezaketiyle yanımda olan Sn. Doç.Dr. Yelda Tarkan ARGÜDEN'e, çalışmamın hem deney kısmında verdiği moral motivasyon hem de analiz ve yazım kısmındaki özverili ve samimi desteklerinden dolayı ikinci danışmanım Sn. Dr. R. Dilhan KURU'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca Ana Bilim Dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e, hocalarım Sn. Doç. Dr. Ayşe ÇIRAKOĞLU'na, Sn. Dr. Şükriye YILMAZ'a, Sn. Dr. Erdal İNCE'ye, Sn. Dr. Çiğdem GÜREL'e, gece gündüz farketmeden tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen arkadaşım Ferdi MAHMUDZADE'ye, laboratuvarda elim ayağım olan ve bitmeyen sorularıma sonsuz sabrıyla cevaplayan Uzm. Bio. Başak ASLANELİ'ye, verdiği teknik ve moral destekleri nedeniyle çalışma arkadaşlarım, sevgili Fidan JAFERZADE'ye, Sabina GULIYEVA'ya, Sarah NASREDDINE'ye, verdiği manevi desteklerinden dolayı arkadaşım Hülya BAĞBARS'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen tüm Sitogenetik ekibine ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarına ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım. Verdiği sonsuz teknik desteklerinden ve manevi katkılarından dolayı oğlum Furkan KARTAL'a ve Yusuf KARTAL'a, manevi desteklerinden dolayı oğlum Yunus Emre KARTAL'a, eğitim hayatım boyunca hem maddi hem manevi olarak beni destekleyen, her zaman yanımda olan sevgili eşim Vural KARTAL'a sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz 2025 **Cahide KARTAL**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BEYAN ..... **iii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **x**
TABLO LİSTESİ ..... **xviii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xix**
ÖZET ..... **xxi**
ABSTRACT ..... **xxiii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **4**
2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ 4
2.1.1. Tarihçe 4
2.1.2. Kromatin Organizasyonu 6
2.1.3. Hücre Döngüsü 8
2.1.3.1. İnterfaz *8*
2.1.3.2. Mitoz Fazı *9*
2.1.4. Hücre Döngüsü Kontrolü 11
2.2. EPİGENETİK 12
2.2.1. Epigenetik Modifikasyonlar 13
2.2.1.1. DNA Metilasyonu *13*
2.2.1.2. Histon Modifikasyonları *14*
2.2.1.3. Kodlamayan RNA'larla Epigenetik Düzenlemeler *18*
2.3. PREMATÜR KROMOZOM KONDENSASYONU (PCC) 19
2.3.1. Biyolojik Yöntem (Füzyon yöntemi) 19
2.3.2. Kimyasal Yöntem (İlaca Bağlı PCC) 20
2.3.3. PCC Kullanım Alanları 22
2.4. İMMÜNFLORESAN YÖNTEMİ 23

2.4.1. Genel uygulama prosedürleri 24
2.4.2. İmmün boyama yöntemlerinin dezavantajları 24
2.4.3. Kromozom Preparatlarında Kullanımı 25
3. YÖNTEM 30
3.1. OLGULAR 30
3.2. GEREÇLER 30
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 30
3.2.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri 31
3.2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 31
3.2.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler 32
3.2.4.1. Hücre Kültürü ve Kültür Çıkış İşlemlerinde Kullanılan Çözeltiler 32
3.2.4.2. İmmunfloresan Yönteminde Kullanılan Çözeltiler 34
3.3. LENFOSİT KÜLTÜRÜ 35
3.3.1. Kan Örneklerinden Lenfosit İzolasyonu 35
3.3.2. İzole Edilen Lenfositlerin Ekim İşlemi 36
3.3.3. Kültür Çıkış İşlemi 36
3.3.3.1. 48 Saatlik PCC Çıkış İşlemi 36
3.3.3.2. PCC Yönteminin Preparat Hazırlığı 36
3.3.3.3. 72 Saatlik Kültür Çıkış İşlemi 37
3.3.3.4. 72 Saatlik Kültür Çıkışı İçin Preparat Hazırlığı 37
3.4. İMMÜNFLORESAN DENEYLERİ 37
3.5. MİKROSKOP ANALİZLERİ 38
4. BULGULAR 39
4.1. OLGULARIN İMMÜNFLORESAN BULGULARI 39
4.1.1. Olgu-I (A.B) 39
4.1.1.1. Olgu I Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları 39
4.1.1.2. Olgu I Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları 45
4.1.2. Olgu-II (B.C.C.) 50
4.1.2.1. Olgu II Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları 50
4.1.2.2. Olgu II Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları 56
4.1.3. Olgu-III (A.G.) 62
4.1.3.1. Olgu III Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları 62
4.1.3.2. Olgu III Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları 68
4.1.4. Olgu IV (Y.T.A.) 72
4.1.4.1. Olgu IV Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları 72
4.1.4.2. Olgu IV Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları 76

4.1.5. Olgu- V (Y.M.)....80
4.1.5.1. Olgu V Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları....80
4.1.5.2. . Olgu V Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları....85
4.1.6. Olgu VI (F.H.)....90
4.1.6.1. Olgu VI Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları....96
4.1.7. Olgu VII (C.K.)....102
4.1.7.1. Olgu VII Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları....102
4.1.7.2. Olgu VII Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları....108
4.1.8. Olgu VIII (C.K.)....114
4.1.8.1. Olgu VIII Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları....114
4.1.8.2. . Olgu VIII Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları....119
4.2. OLGULARIN İNTERFAZ-METAFAZ KARŞILAŞTIRMASI....123
4.2.1. İnterfaz- Metafaz Kromozomlarındaki H3K27me3 Dağılımı....123
4.2.2. İnterfaz-Metafaz Kromozomlarının H3K79me2 Dağılımı....136
4.3. İNTERFAZ ÇEKİRDEKLERİ ile KROMOZOM SAHALARI ARASINDAKİ İMMÜNFLORESAN GÖRÜNTÜLERİNİN KARŞILASTIRILMASI....149
4.4. BAZI OLGULARDAN ELDE EDİLEN G1-PCC VE S-PCC GÖRÜNTÜLERİ....150
5. TARTIŞMA....151
6. SONUÇ VE ÖNERİLER....157
KAYNAKLAR....158
EKLER....165
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI....167
ETİK KURUL İZİN YAZISI....169
KURUM İZNİ YAZILARI....170
ÖZGEÇMİŞ.... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Erken hücre döngüsü araştırmalarının tarihi seyri (Wang, 2021, değiştirilerek) 5

Şekil 2.2: DNA'nın Kromozomlarda Paketlenmesi (Alberts et al., 2018, değiştirilerek) 7

Şekil 2.3: Ökaryotik Hücre Döngüsü (Alberts et al., 2018, değiştirilerek) 8

Şekil 2.4: Mitoz Fazı (http://abacus.bates.edu/acad/depts/biobook/BTlab2.htm, değiştirilerek) 9

Şekil 2.5: Hücre döngüsü ve kontrol noktaları (Matthews et al., 2022, değiştirilerek) 12

Şekil 2.6: Histonlar ve Histon Kuyruklarının Modifikasyonları (Li, Ding and Zheng, 2014) 14

Şekil 2.7: Guppy ve ark.'larının H3K79me2'nin HCT116 hücrelerinde mitoz sırasında artışını gösteren çalışmaları (Guppy and McManus, 2014) 18

Şekil 2.8: Füzyonla indüklenen PCC. 20

Şekil 2.9: Kimyasal PCC yönteminin mekanizması 22

Şekil 2.10: H3K27me3'ün altı farklı metafaz sahasındaki yerleşimi (Terrenoire et al., 2010) 26

Şekil 2.11: H3K27ac, H3K4me3 ve H3K27me3 için immün boyama yapılmış metafaz kromozomları…….. 27

Şekil 2.12: Mayoz bölünme aşamasındaki memeli oositleri ve preimplantasyon embriyolarından elde edilmiş metafaz-1 kromozomlarının immünfloresan görüntüleri (Hodges & Hunt, 2002) 28

Şekil 2.13: Hücre Döngüsü Boyunca Kromozom Bantlama Desenleri (Halsall et al., 2021) 29

Şekil 4.1: Olgu I'den elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri . 40

Şekil 4.2: Olgu I'in iki sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 41

Şekil 4.3: Olgu I'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri 42

Şekil 4.4: Olgu I'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 43

Şekil 4.5: Olgu I'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 44

Şekil 4.6: Olgu I'den elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri 45

Şekil 4.7: Olgu I'in iki sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....46

Şekil 4.8: Olgu I'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri 47

Şekil 4.9: Olgu I'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 48

Şekil 4.10: Olgu I'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y kromozomuna kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 49

Şekil 4.11: Olgu II'den elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri 50

Şekil 4.12: Olgu II'nin yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 51

Şekil 4.13: Olgu II'nin yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y kromozomuna kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 52

Şekil 4.14: Olgu II'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri 53

Şekil 4.15: Olgu II'in beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 54

Şekil 4.16: Olgu II'in beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 ((10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 55

Şekil 4.17: Olgu II'in yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri 56

Şekil 4.18: Olgu II'in yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 57

Şekil 4.19: Olgu II'in yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'de kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 58

Şekil 4.20: Olgu II'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri. 59

Şekil 4.21: Olgu II'in beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 60

Şekil 4.22: Olgu II'in beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüler-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....61

Şekil 4.23: Olgu III'den elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri. 62

Şekil 4.24: Olgu III'ün altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 63

Şekil 4.25: Olgu III'ün altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 64

Şekil 4.26: Olgu III'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri 65

Şekil 4.27: Olgu III'ün dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 66

Şekil 4.28: Olgu III'ün dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 67

Şekil 4.29: Olgu III'ten elde edilen metafaz kromozomlarında H3K79me2 immünfloresan görüntüleri 68

Şekil 4.30: Olgu III'ün altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir). 69

Şekil 4.31: Olgu III'ün altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir). 70

Şekil 4.32: Olgu III'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri 71

Şekil 4.33: Olgu III'in iki sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 71

Şekil 4.34: Olgu IV'ten elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri 72

Şekil 4.35: Olgu IV'ün dokuz sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir). 73

Şekil 4.36: Olgu IV'ün dokuz sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir). 74

Şekil 4.37: Olgu IV'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri. 75

Şekil 4.38: Olgu IV'ün bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 75

Şekil 4.39: Olgu IV'ten elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri 76

Şekil 4.40: Olgu IV'ün dokuz sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir) 77

Şekil 4.41: Olgu IV'ün dokuz sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X 'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir). 78

Şekil 4.42: Olgu IV'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri 79

Şekil 4.43: Olgu IV'ün bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den X 'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....79

Şekil 4.44: Olgu V'ten elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri....80

Şekil 4.45: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir)....81

Şekil 4.46: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....82

Şekil 4.47: Olgu V'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri....83

Şekil 4.48: Olgu V'in bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....84

Şekil 4.49: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri....85

Şekil 4.50: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....86

Şekil 4.51: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....87

Şekil 4.52: Olgu V'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri....88

Şekil 4.53: Olgu V'in bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar olan kromzomlar gösterilmiştir.)....89

Şekil 4.54: Olgu VI'dan elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri....90

Şekil 4.55: Olgu VI'nın altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....91

Şekil 4.56: Olgu VI'nın altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....92

Şekil 4.57: Olgu VI'dan PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri....93

Şekil 4.58: Olgu VI'nın dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....94

Şekil 4.59: Olgu VI'nın dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)....95

Şekil 4.60: Olgu VI'dan elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri....96

Şekil 4.61: Olgu VI'nın altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 97

Şekil 4.62: Olgu VI'nın altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 98

Şekil 4.63: Olgu VI'dan PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri 99

Şekil 4.64: Olgu VI'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 100

Şekil 4.65: Olgu VI'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 101

Şekil 4.66: Olgu VII'den elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri 102

Şekil 4.67: Olgu VII'nin dört sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 103

Şekil 4.68: Olgu VII'nin dört sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 104

Şekil 4.69: Olgu VII'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri 105

Şekil 4.70: Olgu VII'nin beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 106

Şekil 4.71: Olgu VII'nin beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 107

Şekil 4.72: Olgu VII'den elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri 108

Şekil 4.73: Olgu VII'nin dört sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri -1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 109

Şekil 4.74: Olgu VII'nin dört sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 110

Şekil 4.75: Olgu VII'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri 111

Şekil 4.76: Olgu VII'nin beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 112

Şekil 4.77: Olgu VII'nin beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 113

Şekil 4.78: Olgu VIII'den elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri 114

Şekil 4.79: Olgu VIII'in üç sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) 115

Şekil 4.80: Olgu VIII'in üç sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X krozomzomuna kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.) ... 116

Şekil 4.81: Olgu VIII'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri 117

Şekil 4.82: Olgu VIII'in bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar kromozomlar görüntülenmiştir.) 118

Şekil 4.83: Olgu VIII'den elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri 119

Şekil 4.84: Olgu VIII'in üç sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar kromozomlar görüntülenmiştir.) 120

Şekil 4.85: Olgu VIII'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri 121

Şekil 4.86: Olgu VIII'in bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar kromozomlar görüntülenmiştir.) 122

Şekil 4.87: Olguların 1. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 123

Şekil 4.88: Olguların 2. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 124

Şekil 4.89: Olguların 3. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 124

Şekil 4.90: Olguların 4. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 125

Şekil 4.91: Olguların 5. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 125

Şekil 4.92: Olguların 6. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 126

Şekil 4.93: Olguların 7. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 126

Şekil 4.94: Olguların 8. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 127

Şekil 4.95: Olguların 9. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 127

Şekil 4.96: Olguların 10. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 128

Şekil 4.97: Olguların 11. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 128

Şekil 4.98: Olguların 12. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 129

Şekil 4.99: Olguların 13. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 129

Şekil 4.100: Olguların 14. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 130

Şekil 4.101: Olguların 15. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 130

Şekil 4.102: Olguların 16. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 131

Şekil 4.103: Olguların 17. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 131

Şekil 4.104: Olguların 18. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 132

Şekil 4.105: Olguların 19. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 132

Şekil 4.106: Olguların 20. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 133

Şekil 4.107: Olguların 21. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 133

Şekil 4.108: Olguların 22. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 134

Şekil 4.109: Olguların X Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 134

Şekil 4.110: Olguların Y Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3) 135

Şekil 4.111: Olguların 1. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 136

Şekil 4.112: Olguların 2. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 137

Şekil 4.113: Olguların 3. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 137

Şekil 4.114: Olguların 4. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 138

Şekil 4.115: Olguların 5. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 138

Şekil 4.116: Olguların 6. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 139

Şekil 4.117: Olguların 7. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 139

Şekil 4.118: Olguların 8. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 140

Şekil 4.119: Olguların 9. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 140

Şekil 4.120: Olguların 10. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 141

Şekil 4.121: Olguların 11. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 141

Şekil 4.122: Olguların 12. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 142

Şekil 4.123: Olguların 13. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 142

Şekil 4.124: Olguların 14. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 143

Şekil 4.125: Olguların 15. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 143

Şekil 4.126: Olguların 16. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 144

Şekil 4.127: Olguların 17. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 144

Şekil 4.128: Olguların 18. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 145

Şekil 4.129: Olguların 19. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 145

Şekil 4.130: Olguların 20. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 146

Şekil 4.131: Olguların 21. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 146

Şekil 4.132: Olguların 22. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 147

Şekil 4.133: Olguların X Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 147

Şekil 4.134: Olguların Y Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2) 148

Şekil 4.135: İnterfaz çekirdekleri ile kromozom sahalarının floresan yoğunluğu görüntüleri.....149

Şekil 4.136: Farklı fazdaki PCC kromozomlarının immünfloresan görüntüleri.....150

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2-1: Histonlar üzerinde tanımlanmış farklı modifikasyonlar ve işlevleri (Kouzarides, 2007), değiştirilerek).....15

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

μ : mikron

Kısaltmalar **Açıklama**

3B : Üç Boyutlu
APC/CCDC20 : Anaphase Promoting Complex/ Cell Division Cycle 20 (Anafazı teşvik eden komplex)
ATP : Adenozin Trifosfat
BSA : Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
CA : Kalikulin A
CDC : Cell Division Cycle (Hücre Bölünme Döngüsü Genleri)
CDK1 : Cyclin Dependent Kinase I (Siklin Bağımlı Kinaz-I)
CpG : Sitozin- Guanin dinukleotidleri
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DTT : Dithiothreitol
EDTA : Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ENCODE : Encyclopedia of DNA Elements
EZH2 : Enhancer of Zeste 2 polycomb repressive complex 2
FBS : Fetal Bovine Serum
FITC : Floresan İzotiyosiyanat
G1 : Gap I
G2 : Gap II
He3K4me : Histon 3 lizin 4 metilasyonu
H3K9ac : Histon 3 lizin 9 metilasyonu
H3K9me2/3 : Histon lizin 9 di/ trimetilasyonu
H3K27me3 : Histon 3 lizin 27 trimetilasyonu
H3K27ac : Histon 3 lizin 27 asetilasyonu
H3K79me2 : Histon 3 lizin 79 dimetilasyonu
H3Y41P : Histon 3 tirozin 41 fosforilasyonu

H4K20me : Histon 4 lizin 20 monometilasyonu

DNA : Deoksiribonükleik Asit

JAK-2 : Janus Kinaz-2

kb : kilobaz

KCL : Potasyum Klorür

KCM : Kalium Chromosome Medium (Potasyum Kromozom Ortamı)

LCL : Lymphoblastoid Cell Line (Lenfoblastoid Hücre Hattı)

m5C : 5-metil sitozin

m6A **:** N6-metil adenozin

mb : megabaz

M : Mitoz fazı

miRNA : mikro RNA

MPF : M phase promoting factor (M fazı tetikleyici faktör)

NaCl : Sodyum Klorür

ncRNA : Kodlamayan RNA

OA : Okadaik Asit

PEG : Polietilen Glikol

PFA : Paraformaldehit

PTM : Posttranslasyonel Modifikasyon

PCC :Premature Chromosome Condensation (Prematür Kromozom Kondensasyonu)

RNA : Ribonükleik Asit

S : S fazı

SPF : S Phase Promoting Factor (S fazı tetikleyici faktör)

TAD : Topologically Associated Domains (Topolojik ilişkili alanlar)

UCSC : University of California Santa Cruz

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PREMATÜR KROMOZOM KONDENSASYONUYLA ELDE EDİLMİŞ İNTERFAZ KROMOZOMLARI ile MİTOTİK KROMOZOMLARDAKİ HİSTON MODİFİKASYONLARININ İMMÜNFLORESAN YÖNTEMLE İNCELENMESİ

Cahide KARTAL

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman: Doç. Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN

II. Danışman: Dr. Rahiye Dilhan KURU

DNA dizisini değiştirmeden gen ekspresyonunu düzenleyen ve hücre bölünmelerinde kalıtılabilen "Epigenetik" değişimler; DNA metilasyonu, posttranslasyonel histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar aracılığıyla meydana getirilir. Histon modifikasyonları, immünfloresan yöntemlerle spesifik antikorlar kullanılarak kromozomlar üzerinde gösterilebilmektedir. Sitogenetik tekniklerle epigenetik çalışmaları birleştiren, dolayısıyla "Sitoepigenetik" olarak adlandırılabilecek bu yöntemlerle metafaz kromozomları üzerinde yapılan –az sayıda- çalışma bulunmakla birlikte, PCC yöntemiyle elde edilmiş interfaz kromozomlarında henüz bu tür çalışmalar bildirilmemiştir. PCC, kalikulin A gibi fosfataz inhibitörleri kullanılarak interfazda kromozom elde edilebilmesini sağlayan bir yöntemdir. Sağlıklı yetişkin gönüllülerden elde edilen izole lenfositler üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada H3K79me2 ve H3K27me3 histon modifikasyonları spesifik antikorlar kullanılarak hem metafaz, hem de PCC yöntemiyle elde edilmiş interfaz kromozomları üzerinde gösterilmiştir. İnterfaz ve metafaz kromozomları elde etmek için yapılan kültürlerin çıkış aşamasında asitli fiksatifler içermeyen ve histon proteinlerini koruyan yöntemler kullanılarak kromozom yaymaları yapılmıştır. Hazırlanan preparatlara, seçilen histon modifikasyonlarına özgü antikorlarla immunofluoresan yöntem uygulanmış ve preparatlar floresan mikroskobunda incelenmiştir. H3K79me2 ve H3K27me3 modifikasyonlarının hem interfaz, hem de metafaz kromozomları üzerinde özgün bant desenleri sergilediği gösterilmiştir. H3K27me3 ve H3K79me2 modifikasyonlarına özgü bant paternlerinin genel olarak birbirlerine benzer olduğu ve PCC ve metafaz kromozomlarında genellikle değişmediği tespit edilmiştir. Ancak PCC kromozomlarının interfaz kromatininin histon modifikasyon paternini koruyup korumadığını anlamak için farklı modifikasyonları hedef alan çalışmalar yapılması gerekmektedir. Çalışmamız, interfaz kromatininindeki histon

modifikasyonlarını tek hücre düzeyinde ve kromozomlar üzerinde gösteren ilk çalışmadır ve hücre döngüsü ile hücre farklılaşma mekanizmalarının epigenetik altyapısının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Temmuz 2025 , 2 sayfa.
Anahtar kelimeler: Epigenetik, Sitoepigenetik, Histon modifikasyonları, Prematür Kromozom Kondensasyonu (PCC) Yöntemi, İmmünfloresan Yöntemi

ABSTRACT

[M.Sc. THESIS]

[INVESTIGATION OF HISTONE MODIFICATIONS IN INTERPHASE CHROMOSOMES OBTAINED BY PREMATURE CHROMOSOME CONDENSATION AND MITOTIC CHROMOSOMES BY IMMUNOFLUORESCENCE METHOD]

[Cahide Kartal]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology, Master's Programme with Thesis

[Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yelda Tarkan ARGÜDEN

Co-Supervisor: Dr. Rahiye Dilhan KURU]

[“Epigenetic” changes, which regulate gene expression without altering the DNA sequence and can be inherited in cell divisions, are mediated by DNA methylation, posttranslational histone modifications and non-coding RNAs. Histone modifications can be detected on chromosomes by immunofluorescence methods using specific antibodies. Although there have been a limited number of studies on metaphase chromosomes using these methods, which combine cytogenetic techniques with epigenetic studies and can therefore be called “Cytoepigenetics”, such studies have not yet been reported on interphase chromosomes obtained by the PCC method. PCC is a method of obtaining chromosomes in interphase using phosphatase inhibitors such as calyculin A. In this study conducted on isolated lymphocytes obtained from healthy adult volunteers, histone modifications H3K79me2 and H3K27me3 were demonstrated on both metaphase and interphase chromosomes obtained by PCC method using specific antibodies. To obtain interphase and metaphase chromosomes, chromosome spreads were prepared at the harvest stage of cultures using methods that do not contain acidic fixatives and preserve histone proteins. Immunofluorescence was applied to the prepared slides using antibodies specific to the selected histone modifications, and the slides were examined under a fluorescence microscope. The H3K79me2 and H3K27me3 modifications were shown to exhibit distinct band patterns on both interphase and metaphase chromosomes. It has been observed that the band patterns of H3K27me3 and H3K79me2 modifications are generally similar to each other and usually remain unchanged in both PCC and metaphase chromosomes. However, to understand whether PCC chromosomes preserve the histone modification pattern of interphase chromatin, studies targeting different modifications need to

be conducted. Our study is the first to demonstrate histone modifications in interphase chromatin at the single cell level and on chromosomes and will contribute to the elucidation of the epigenetic basis of cell cycle and cell differentiation mechanisms.]
July 2025, [2] pages.
[**Keywords:** Epigenetics, Cytoepigenetics, Histon Modifications, Premature Chromosome Condensation, Immunfluoresence Techniques]

1. GİRİŞ

DNA dizisini değiştirmeden hücre bölünmeleri boyunca kalıtılabilen değişiklikleri inceleyen bilim dalına “Epigenetik” denir. Bu değişiklikler aracılığıyla alternatif kromatin durumları oluştuğu gibi hücre farklılaşmasının ve hücre kimliğinin sürdürülmesinin anlaşılmasında bilim insanlarına kılavuzluk etmektedir. Epigenetik düzenlemeler, DNA düzeyinde metilasyon şeklinde olurken, kromatin düzeyinde ise histon proteinlerinin çeşitli şekillerde modifikasyonları (histon kodu), hücre genomunun üç boyutlu organizasyonu (3B) ve kromatinin yeniden düzenlenmeleri şeklinde olabilmektedir. Epigenetik düzenlemelerin üçüncü bir mekanizması da transkripsiyon sonrası kodlamayan RNA’lar (ncRNA) ve bu RNA’ların çeşitli modifikasyonları ile gerçekleştirilir (Aboud ve d., 2023; Felsenfeld, 2024).

DNA, hücre içerisinde nükleozom adı verilen temel yapısal birimlerde paketlenir. Nükleozomlar hep birlikte dinamik bir yapı olan kromatini oluşturur. Histonlar nükleozomal alt birimin merkezi bileşenidir ve her birinden iki kopya olmak üzere dört çekirdek histon proteinini (H3, H4, H2A, H2B) içeren bir oktamer oluşturur. Bu oktamerin etrafına 147 baz çiftlik bir DNA segmenti sarılır. H1 adı verilen bir histon çeşidi ise bu kor proteinlerini saran DNA’ya dışarıdan bağlanarak yapıyı sabitler. Nukleozomlar ‘linker” DNA (bağlayıcı DNA) ile birbirine bağlanır. Histon proteinlerinin her biri, temel lizin ve arginin aminoasitlerini içeren karakteristik bir kuyruğa sahiptir. Histon kuyrukları, kapsamlı kovalent posttranslasyonel modifikasyonlara (PTM'ler) tabidir ve böylece farklı kromatin durumları elde edilir. Histon modifikasyonları, lizin ve arginin kuyruklarının metilasyonu, asetilasyonu, fosforilasyonu, ubikitinasyonu vb. çeşitli mekanizmalarla gerçekleştirilir. Bu modifikasyonlar sayesinde, açık (ökromatin) ya da kapalı (heterokromatin) kromatin durumları elde edilir. (Li ve diğ., 2014; Aboud ve diğ., 2023). Histonlar aynı anda birkaç farklı PTM taşıyabildiğinden, DNA'nın doğrusal dizisinin ötesinde ek bir bilgi düzeyi sunan "histon kodu" önerilmiştir (Jenuwein ve Allis, 2001). Histon kodunu oluşturan unsurların kombinasyonu, DNA'nın sarmalanma şeklini ve diğer proteinlerin DNA'ya erişimini etkileyerek gen ekspresyonunu kontrol eden karmaşık bir "kod" oluşturur. Histon H3 lizin 27 trimetilasyonu (H3K27me3) genellikle gelişimsel olarak düzenlenen sessiz kromatin olan fakültatif heterokromatin ile ilişkilidir (Kimura ve diğ.,2013). Histon metilasyonu hücre döngüsü boyunca asetilasyon gibi

bazı histon modifikasyonlarına göre daha stabil olmasına ve mitozdan daha az etkilenmesine rağmen, H3K9me2/3, H3K79me2 ve H4K20me gibi bazı metilasyon işaretleri mitoz sırasında artar ve kromozomal stabilite için önemlidir. Mitotik H3K79me2 düzeylerinin azalmasının, kromozom sayısında artış ve mitoz bölünme kusurlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu verilere dayanarak mitoz sırasındaki H3K79me2 dinamiklerinin normalde genom stabilitesini korumak için gerekli olduğu ve ayrıca mitoz sırasında H3K79me2 kaybının, tümörlerin gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunan patojenik bir olay olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Guppy ve McManus, 2014). Aktif ve inaktif kromatin durumlarıyla ilişkilendirilen çok sayıda histon modifikasyonu keşfedilmiş olmasına rağmen bu modifikasyonların birçoğunun hücre döngüsü ve farklılaşma boyunca kalıcılığı ve kalıtımı hala bilinmemektedir. Ökaryotik hücre döngüsü, G1, S ve G2 fazlarından oluşan ve tüm hücre döngüsünün yaklaşık %95'ini oluşturan "interfaz" ve M fazındaki (Mitoz) bölünmeden meydana gelen bir süreçtir. İnterfazın S fazında DNA replikasyonu gerçekleşir. Mitozun metafaz aşaması, profazda yoğunlaşarak görünür hale gelmeye başlayan kromozomların en kısa ve kalın formlarında bulundukları ve sitogenetik olarak incelenebildikleri aşamadır.

Epigenetik modifikasyonlar, hücre farklılaşmasında çok önemlidir. Farklılaşmış bir hücrenin epigenetik işaretlerinin mitoz bölünme sırasında yavru hücrelerde aynı şekilde kopyalanması gerekir; aksi takdirde bu hücre soyu sürdürülemez (Matthews ve diğ., 2022). Kromatinle ilişkili proteinlerin bilinen sitogenetik yöntemlerle metafaz kromozomları üzerindeki dağılımının incelenmesi, söz konusu proteinlerin işleviyle ilgili önemli bilgiler sağlayabilir. İmmünfloresan tekniği, hücre bölünmeleri sırasında kromozomların ayrılmasını düzenleyen histon modifikasyon dinamiklerini ve kromozomla ilişkili proteinleri incelemek için kullanılmaktadır (Jeppesen, 2000; Van De Werken ve diğ., 2013). Bu düzenleyici proteinlerin çoğu, işlevlerini yerine getirmek için doğrudan kromatinle etkileşime girdiğinden dolayı, bu proteinleri eş zamanlı olarak tespit etmek ve uzamsal-zamansal ilişkilerini anlamak, epigenetik düzenleme mekanizmalarını ve hücre farklılaşmasını anlamamıza ve hastalıkta değişen epigenetik paternleri tanımlamamıza katkıda bulunacaktır. Bununla birlikte kromozomlar üzerindeki proteinler, klasik sitogenetik yöntemler uygulanırken asit fiksasyonu (Carnoy fiksatifi) sebebiyle kaybedilebilmektedir. Bu sebeple kromozomları asitli fiksatiflerle fikse etmeyen ve antijenik özelliklerini koruyan yöntemler geliştirilmiştir(Hodges ve Hunt, 2002; Jeppesen, 2000). Bu şekilde kromozomlar üzerindeki histon proteinleri korunabilmekte ve taşıdıkları modifikasyonlar çeşitli spesifik antikorlarla işaretlenebilmektedir.

İmmünofloresan tekniği, kromozom yoğunlaşması, kromatin yapısı ve düzenleyici proteinlerin transkripsiyon sonrası modifikasyonu, sentromerik kromatinde kinetokor oluşumu, iğ mikrotübüllerinin organizasyonu ve bunların kinetokora bağlanması gibi mitozdaki kromozom davranışının düzenleyici mekanizmasını incelemek için kullanılan bir tekniktir (Obara ve diğ., 1974; Chivukula ve Dabbs, 2011)

Primer lenfosit kültürü, diğer birçok in vitro test için ilk adımdır. Kromozom analizi; kalıtım genetiği, mutajenik çalışmalar, onkoloji, radyasyon biyolojisi veya çevre bilimi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulanmakta ve kolsemid kullanılarak mitozun metafaz aşamasında bloke edilen hücrelerde gerçekleştirilmektedir (Obara et al., 1974; Chivukula and Dabbs, 2011). Ancak çok yavaş büyüyen hücrelerde, tümör hücrelerinde ve bazı iyonizan ajanlara maruz kalan hücrelerde mitotik indeks çok düşük olduğu için metafaz kromozomları elde etmenin zorlukları bilinmektedir. Prematür kromozom kondensasyonu (PCC), genetik materyaldeki değişimleri tespit etmek için kullanılan sitogenetik tekniklerden biridir. Bu teknik, interfaz kromatininin biyolojik veya kimyasal yollarla (ilaca bağlı PCC) yoğunlaştırılması ile gerçekleştirilir. En yaygın kullanım alanı, biyodozimetridir. Bununla birlikte, kromozom aberasyonlarını tespitinin hızlı olması, tekniği; kanser teşhisi, ilaca bağlı genotoksisite ve preimplantasyon veya yardımlı üreme teknikleri gibi diğer uygulamalar için yararlı bir teknik haline getirmiştir. Ayrıca PCC, kromatin yoğunlaşması ve kromozom morfolojilerinde yer alan temel hücresel mekanizmaların anlaşılması için de kullanılabilir (Anjali ve Maddaly, 2024). İlaçla indüklenen PCC yönteminde protein serin / treonin fosfatazın spesifik inhibitörleri olan kalikülin A veya okadaik asit kullanılmaktadır. Bu inhibitörler hücre döngüsünün herhangi bir fazındaki memeli hücrelerinde doğrudan erken kromozom yoğunlaşmasını indükler. Kalikülin A ile PCC'nin indüklenmesi kolsemid blokajlı metafaz kromozomu elde etme yöntemine göre oldukça kolay ve kısa sürede sonuç veren bir uygulamadır (30 dakikalık inkübasyon yeterlidir) ve mitotik indeksin de diğer yönteme göre %20 daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Gotoh ve diğ., 1995).

Çalışmamızda H3K79me2 ve H3K27me3 modifikasyonları immünfloresan yöntemi ile interfaz (PCC ile elde edilmiş) ve metafaz kromozomları üzerinde incelenmiştir. Böylece bu histon işaretleri ilk defa "Sitogenetik" ve "Epigenetik"i birleştiren ve "Sitoepigenetik' olarak adlandırılabilecek yeni bir yaklaşımla tek hücre düzeyinde görüntülenebilmiştir.

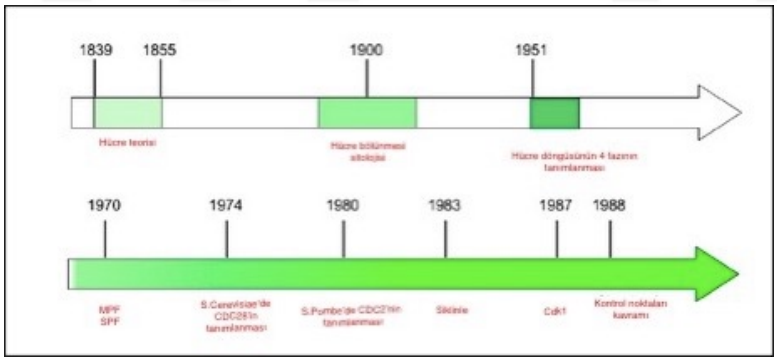
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ

2.1.1. Tarihçe

Canlı organizmalardaki toplam hücre sayısı, hücrelerin bölünerek çoğalması ve ölümü arasındaki hassas bir denge ile belirlenir. Mitotik hücre döngüsü, vücuttaki gerekli somatik hücre sayısını korumaktan sorumlu ana döngüdür ve çeşitli proteinler aracılığıyla düzenlenir (Ravi ve diğ., 2013). Hücre döngüsü, ilk olarak 19.yy. da hücre biyolojisi ile ilgili çalışmalarla bağlantılı olarak ortaya çıkmıştır. 1855 yılında Rudolf Virchow'un ortaya koyduğu "Omnis Cellula e Cellula" (Her hücre başka bir hücreden gelir) ilkesi hücre bölünmesi ve çoğalması ile ilgili anlayışa temel olmuştur. İlk ışık mikroskobu çalışmaları, hücrelerin önce kromozomlarını yoğunlaştırdığı, yoğunlaşan kromozomlarını mikrotübüller ile hücrenin orta hattında hizaladığı ve daha sonra kardeş kromatidleri hücrenin zıt kutuplarına ayırdığı M fazını (mitoz) ortaya çıkarmıştır (Nasmyth, 1996). Birbirini takip eden mitozlar arasında kromozom duplikasyonu keşfedilene kadar hücrelerin hacim olarak büyümesinin dışında bir şey gösterilemiyordu. Daha sonra bu duplikasyonun dar bir zaman aralığında gerçekleştiği ortaya çıkarıldı. Bu, interfazı üç faza ayırdı: Gl, yani mitoz ile DNA replikasyonunun başlangıcı arasındaki boşluk; S fazı, yani DNA sentezi dönemi ve G2, yani S ve M fazları arasındaki boşluk. G1, S, G2 ve M aşamaları giderek başlıca hücre döngüsü aşamaları olarak düşünülmeye başlandı ve bu aşamalar arasındaki geçişleri sağlayan faktörlerin belirlenmesi hücre döngüsü araştırmalarının başlıca hedeflerinden biri haline geldi. Bu faktörler ilk kez döngünün farklı aşamalarında füzyonla birleştirilen hücre deneylerinde ortaya çıkarıldı. Bu ilk olarak, büyük hücreleri kolayca manipüle edilebilen tek hücreli protozoa ve Physarum polycephalum'un büyük sinsisyal hücreleri ile yapıldı. Deney sonuçları, geç G2 veya M fazı hücrelerinin, erken G2 hücrelerinde mitoz başlangıcını hızlandırabilen bir M fazı tetikleyici faktör (M phase promoting factor:MPF) içerdiğini göstermiştir (Howard ve Pelc, 1951; Nasmyth, 1996) Ayrıca S fazı hücrelerinin, çekirdeklerinde S fazını hızlandırabilen bir S fazı destekleyici faktör (S phase promoting factor; SPF) içerdiği gösterildi (Rao ve Johnson, 1970; Johnson ve Rao, 1971). MPF ve SPF'leri incelemek için yeterli biyokimyasal yöntem olmamasına rağmen hücre döngüsüyle ilişkili genlerin genetik çalışmaları o dönemde yapılabilmiştir. 1960 ların sonlarında Leland

Hartwell tomurcuklanan maya Saccharomyces cerevisiae üzerinde yaptığı deneylerle hücre döngüsü kontrol noktalarında görevli pek çok geni tanımlayabildi (Hartwell ve diğ, 1970). Bunlardan MPF ve SPF genlerine hücre bölünme döngüsü genleri (CDC) adını verdi. İlk tanımlanan gen CDC28'dir. 1970'lerin ortasında Paul Nurse fisyon mayasında, G2'den mitoza geçişte bir kontrol noktasında görevli olan cdc2 genini, daha sonra cdc2'nin insan versiyonu olan CDK1'i keşfetti(Nurse ve Thuriaux, 1980). CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1), siklin bağımlı kinaz adı verilen bir proteini kodlar. Memeli CDC2 proteininin (p34Cdc2) fosforilasyon durumunun hücre döngüsü ilerlemesiyle yakından ilişkili olduğu bulundu. 1980'lerde Tim Hunt (1993) deniz kestanelerinde yaptığı çalışmalarda hücre döngüsü boyunca bir proteinin periyodik olarak yok edildiğini buldu. Bu proteinin seviyesi sürekli değişiyordu. Böylece ilk siklin molekülünü keşfetti. İlerleyen yıllarda daha fazla siklin tanımlandı. Aynı zamanlarda radyasyona maruz bırakılmış maya hücrelerinde yapılan deneyler sonucunda Hartwell tarafından hücre döngüsü "kontrol noktası" kavramı geliştirildi (**Şekil 2.1)** DNA hasarlandığında hücre döngüsü duraklatılıyordu. Tüm bu çalışmaların birikimi Tim Hunt'a 2001 Nobel fizyoloji ve Tıp ödülünü kazandırdı (Wang, 2021).



Şekil 2.1: Erken hücre döngüsü araştırmalarının tarihi seyri (Wang, 2021, değiştirilerek)

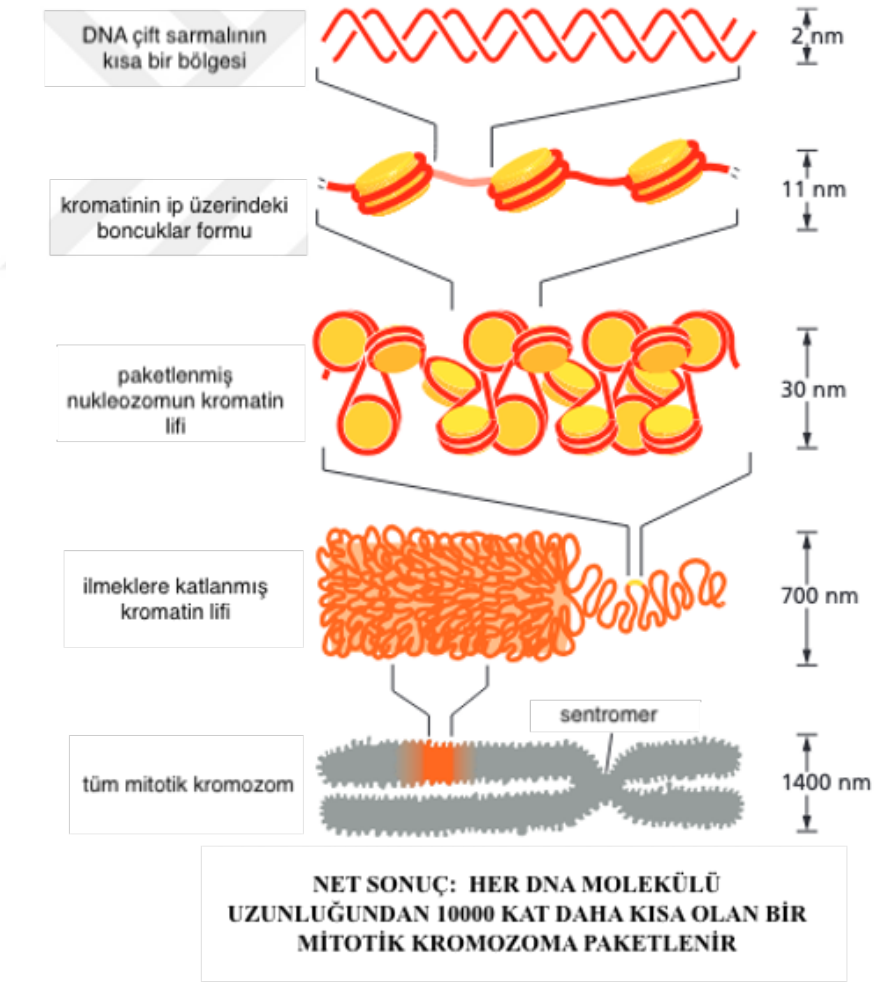
Mitozun temel mekaniği 1920'lerden 1950'lere kadar canlı görüntüleme ile tanımlanmıştır (Inour ve Sato, 1967). Nuklear materyalin boya moleküllerine çok iyi bağlanması sayesinde hücreyle ilgili çalışan bilim insanları tarafından erken dönemlerde kromatin dinamikleri incelenebilmiştir. Böylece kardeş kromatidlerin kromozomlara yoğunlaşması ve anafazda bunların birbirinden ayrılması tanımlanabilmiştir (Flemming, 1882; Wilson, 1925). Kardeş kromatidlerin bir arada tutulmasını sağlayan şeyin ne olduğu ise

maya mitozunda ve mayozunda yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Kardeş kromatid ayrımını teşvik eden bir kohezin kompleksi tanımlanmıştır. Omurgalılarda profaz sırasında kondensin adı verilen başka bir kompleks daha görev yapar. Kohezin ve kondensin komplekslerinin her ikisi de heterodimerik SMC (Structural Maintenance of Polipeptid) polipeptit çiftleri içerdiği için birlikte çalıştıkları düşünülmektedir (Hirano, 2000). Öte yandan mitotik iğ ipliklerinin kromozom hareketine paralel olan filamentlerden oluştuğu bilgisi 1950'lerde yapılan polarizasyon çalışmalarından gelmiştir (Inour ve Sato, 1967). İğ ipliği filamentlerinin bozulmaya karşı hızlı ve geri dönüştürülebilir olması, kromozomların dinamik hareketlerini açıklayan bir fikir geliştirilmesine yol açmıştır. Glutaraldehit fiksasyonunun geliştirilmesiyle birlikte iğsi mikrotübüllerin ve kinetokorların elektron mikroskobu ile görüntülenmesi sağlanmıştır (Bajer ve Molè-Bajer, 1972; Brinkley ve Stubblefield, 1966). Kromozomları hareket ettiren kuvvetlerin nasıl üretildiği sorusuna cevaplar, kas kasılması ve protein polimerizasyonunun keşfiyle birlikte üretilmiştir. 1960'lardan itibaren kromozom hareketlerini açıklamaya çalışan iki ana düşünce hâkim olmuştur. Bunlar polimerizasyon dinamiklerinden ve motor protein aktivitesinden gelen kuvvetlerdir. Ayrıca sitoplazmik dynein proteinlerinin ve birkaç kinesin ailesi proteinlerinin de kinetokorlara ve iğ ipliklerine yerleşerek kromozom hareketine yardımcı olabileceği düşünülmüştür (Rieder ve Salmon, 1998; Sharp ve diğ., 2000).

2.1.2. Kromatin Organizasyonu

Hücre döngüsü sırasında, DNA'nın çoğalması ve yeni oluşan yavru hücrelere aktarılmak üzere kromozomlar halinde paketlenmesi gerekir. Diploid bir insan hücresinde, yaklaşık 2m uzunluğundaki DNA, yoğunlaşıp katlanarak 5-10 μm çapındaki hücre içerisine 23 çift kromozom şeklinde paketlenir (Bak ve diğ, 1977; Koshland ve Strunnikov, 1996; Ravi ve diğ., 2013). Bu paketlenme, her birinden iki kopya olmak üzere H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinin bir "kor" yapısı oluşturmasıyla başlar. Bu yapının etrafına sarılan DNA, H1 histonu ve bağlayıcı DNA ile nukleozom yapısını oluşturur. Boncuk benzeri bu oluşumlar kromatin ipliğini meydana getirir. Nukleozomların genom içindeki konumu gen ekspresyonu ile bağlantılıdır. Çünkü gen ekspresyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin ve çeşitli kromatin düzenleyici elemanların genoma erişimi, nukleozomların pozisyonu ile yakından alakalıdır. Kromatin ipliğinin çapı, 5-24 nm'dir ve daha yüksek yapılar oluşturmak üzere düzensiz bir şekilde katlanarak kromatin ilmekleri (chromatin loops) ile kromatin alanlarını (chromatin domains) oluşturur. Kromatin ilmekleri, gen ekspresyonu

farklılıklarından dolayı hücreden hücreye değişen boyutlarda olabilmektedir. Böylece her hücre kendine özgü gen ekspresyonunu sağlamış olur. Kromatin ilmekleri, bir üst organizasyonu oluşturan ve TAD (Topologically associated domains) adı verilen büyük kromatin alanlarında meydana gelirler. TAD'lar genom içerisindeki işleyişte görevli en temel birimlerdir. TAD'lardan sonraki organizasyon aşaması, kromatin kompartmanlarıdır; Transkripsiyonel olarak aktif olup nuklear beneklerin (nuclear speckles) çevresinde yerleşen A kompartmanları ve nukleolus ile nuklear lamina çevresinde yerleşip transkripsiyonel olarak inaktif olan B kompartmanlarıdır. İnterfaz çekirdeğine bir üst seviyeden bakıldığında, bu kompartmanların bir kombinasyonunu barındıran ve mitoza geçildiğinde kromozom olacak olan "kromozom bölgeleri" yer alır (Argüden, 2023). Kromozomlar farklı işlevler için farklı aşamalarda dinamik olacak şekilde organize olur **(Şekil 2.2).**

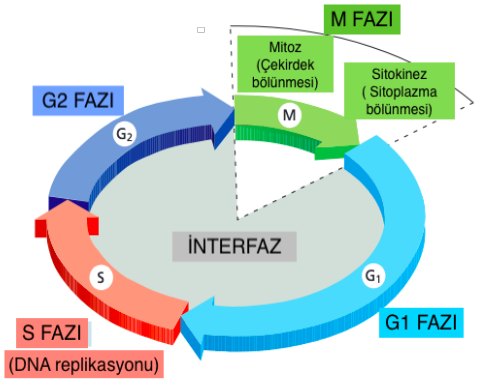


Şekil 2.2: DNA'nın Kromozomlarda Paketlenmesi (Alberts ve diğ., 2018, değiştirilerek)

2.1.3. Hücre Döngüsü

2.1.3.1. İnterfaz

Hücre döngüsünde çekirdek bölünmesi ve ardından sitoplazmanın bölünmesi (sitokinez) ile devam eden mitoz fazı ve iki mitoz fazı arasında kalan interfaz, ana aşamalardır. İnterfaz aşaması kendi içinde üç ayrı fazdan oluşur; Gap1/G1 fazı, Sentez/S fazı ve Gap 2/G2 fazı **(Şekil 2.3)**. İnterfazda hücre boyutu artar ve yeni hücre bölünmesine hazırlık yapılır. S fazı, DNA sentezinin yapılarak DNA miktarının iki katına çıkarıldığı fazdır. S fazından önce ve sonra gap (boşluk) fazları bulunur. Bu fazlarda hücre, büyümeye devam eder ve bölünmeyle ilgili çevresel uyarıları kontrol eder. G1 ve G2'deki belirli noktalarda hücre, bir sonraki aşamaya geçilip geçilmeyeceğine veya hazırlanmak için duraklatılıp duraklatılmayacağına karar verir (Alberts ve diğ., 2018). Bir hücre ayrıca hücre döngüsünden çıkıp G0 fazına, bir durgunluk durumuna girebilir (Panda ve diğ., 2019; Panagopoulos ve Altmeyer, 2021).



Şekil 2.3: Ökaryotik Hücre Döngüsü (Alberts ve diğ., 2018, değiştirilerek)

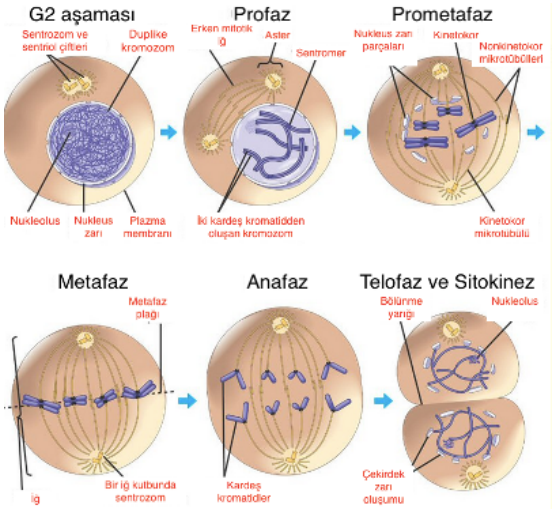
Hücre döngüsü süreci boyunca pek çok olay eş zamanlı gerçekleşir; DNA replikasyonu, RNA transkripsiyonu ve translasyonu, her bir yavru hücre için yeni organellerin sentezi vb. Tüm bu süreçler, hücre döngüsünün farklı aşamalarında gerçekleşir ve duruma göre DNA yoğun ya da daha gevşek formda bulunur (Ravi ve diğ., 2013).

Morfolojik olarak kromatin, hücre döngüsü sırasında DNA miktarına ve bulunduğu faza göre değişiklik gösterir. G1 fazında hücreler, replikasyon için gerekli olan proteinlerin sentezini yapmaya başladıkları için kromatin ağı şeklinde görünür. S fazında DNA iki katına çıkar ve morfolojide bir değişiklik olmaz. G2 fazında ise yoğunlaşma başlar ancak kromozom kolları ayırt edilemez.

2.1.3.2. Mitoz Fazı

Mitoz bölünme, dört ana fazdan (profaz, metafaz, anafaz, telofaz) oluşur. Ardından sitokinez ile birbirinin aynısı olan iki yavru hücre meydana gelir.

Profaz: Kromozomların görünür olmaya başladığı evre profazdır. Bu aşamada kromozomlar kromatin ipliklerinin sıkışması sayesinde kısalır ve kalınlaşır. Bu sıkıştırma olayı ile transkripsiyon faktörleri kısmen yer değiştirdiği için transkripsiyon kapanır (Martínez-Balbás ve diğ., 1995). Ayrıca histonların fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlarının da bu olayda rol alması muhtemeldir. Kromatin yoğunlaştıkça hücrenin içinde birtakım ek olaylar zinciri hücrenin bölünmeye hazırlanmasına yardım eder. Nukleolus parçalanır. Nuklear zarfın iç yüzeyindeki lamin lifleri CDK1 tarafından hiperfosforile edilir ve nuklear zarf dağılmaya başlar. CDK1 e ek olarak pek çok kinaz görev yapar. Bunlardan bazısı hücrenin kutuplarında birikerek sentrozom organelinin boyutunun ve aktivitesinin artmasını sağlar. Bazısı ise kromozomların sentromer adı verilen boğumlarında birikerek mitotik kalite kontrolünde görev yapar. Profaz sırasında protein sentezi yavaşlar. Hem mikrotübüller hem de mikrofilamentler interfaz stabilitesini kaybeder ve artan protein fosforilasyonuna cevaben çözünürler. Bu olay hücrenin yuvarlaklaşmasına sebep olur. Yuvarlaklaşmış hücrede organellerin ve hücre içeriğinin homojen dağılması daha kolay gerçekleşir. Böylece mitozun son aşamasındaki sitokinez sırasında iki yavru hücre içeriğinin eşit dağılması sağlanır (Maller, 1986; McIntosh, 2016)



Şekil 2.4: Mitoz Fazı (http://abacus.bates.edu/acad/depts/biobook/BTlab2.htm, değiştirilerek)

Metafaz: Bu aşamaya hazırlık aşaması olarak sayılabilecek prometafaz sırasında kromozomlar iğ ipliği ile iletişime girer. İğ ipliği bağlantısı için kromozomun en önemli parçaları, her bir kromatid üzerinde bulunan ve yaklaşık 100 farklı polipeptidin oluşturduğu protein kompleksleri olan kinetokor adı verilen yapılardır. Bu yapılar mikrotübülleri bağlayan ve kromozom pozisyonunu belirleyen motor enzimler içerir (Maller, 1986; McIntosh, 2016)

İğ ipliği bağlanmasının ardından, kromozomlar genellikle metafaz plağı oluşturmak için hücrenin ekvatoruna doğru hareket ederler. Kardeş kromatidler kinetokor mikrotübülleri tarafından ileri geri hareket ettirilir. Bu işlem sayesinde kardeş kromatidler anafazda ayrılmadan önce kromozomlar aynı başlangıç çizgisine getirilmiş olur **(Şekil 2.4).** (Rieder ve Salmon, 1994). Bu aşamada genetik materyal en yoğun halindedir ve sitogenetik olarak incelenebilir. Kinetokorlar doğru bir şekilde bağlanıp tüm kromozomlar hizalandığında kardeş kromatidler arasındaki kohezyon çözülür ve hücre anafaza girmeye başlar (McIntosh, 2016).

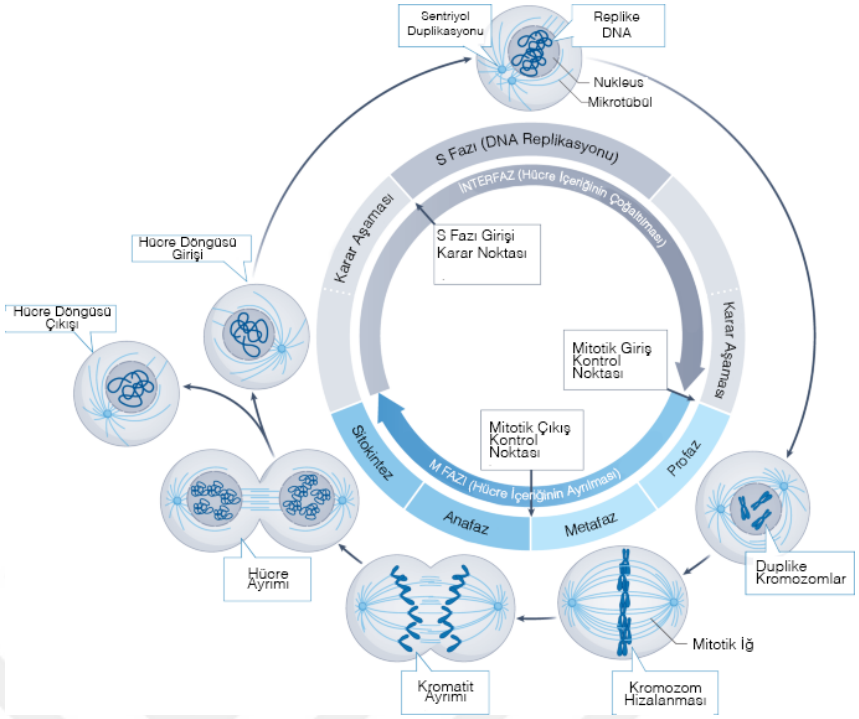
Anafaz: Anafaz aşamasında kinetokor mikrotübüllerinin kısalması (anafaz A) ve orta bölümde iğ uzaması (anafaz B) yoluyla kromozomlar iki eşit parçaya ayrılır ve kardeş kromatidler hücrenin zıt kutuplarına doğru iğ iplikleri ile çekilirler. Bu iki olay bazı organizmalarda eş zamanlı gerçekleşirken bazı organizmalarda zamansal olarak birbirini takip edebilir. İnsan mitotik hücrelerinde anafaz B anafaz A'ya göre 30-50 sn daha geç başlar (McIntosh, 2016).

Telofaz: Mitozun son aşaması olan telofazda ise, hücre bölünmesini tamamlarken kromozomlar tekrar eski yoğunlaşmamış hallerine dönmeye başlar (Ravi ve diğ., 2013).

Sitokinez: Sitokinez, bir hücrenin sitoplazmasının iki yavru hücreye fiziksel olarak ayrılmasıyla sonuçlanır (Fededa ve Gerlich, 2012; Green ve diğ., 2012) Sitokinez, anafazda başlatılır. Bu fazda CDK1 aktivitesinin düşük olması mitotik iğin yeniden düzenlenmesini ve mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlar. Merkezi iğin biraraya gelmesiyle birlikte bir bölünme düzlemi oluşur. Diğer yandan plazma zarında oluşan sitokinetik oluk aktinomisin halkasının kasılmasıyla büyür ve en sonunda kopma gerçekleşir. Kopma sırasında önce hücre korteksi daralır. En sonunda plazma membranı ikiye bölünür (Gromley ve diğ., 2005; Schiel ve diğ., 2011; Mierzwa ve Gerlich, 2014).

2.1.4. Hücre Döngüsü Kontrolü

Hücre döngüsünün tüm evreleri, hasarlı veya eksik kromozomlara sahip hücrelerin çoğalmasını önlemek için birkaç kontrol noktasında düzenlenir. Hücre döngüsünün temel mekanizması tüm ökaryotik hücrelerde oldukça iyi korunmuştur ve bu mekanizmaları anlamak için yapılan deneylerde insandan mayaya aktarılan hücre döngüsü kontrol proteinlerinin kusursuz bir şekilde işlev gördüğü gösterilmiştir. Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücrelerin gerek DNA replikasyon bozuklukları, oksidatif hasar, DNA çift sarmallı kırıklar gibi içsel ya da radyasyon, kemoterapötik ajanlar, kimyasallar gibi dışsal stres faktörlerinin varlığına yanıt verdiği mekanizmalardır. Bu hücre döngüsü kontrol noktalarının işlevi, interfaz sırasında DNA hasarını, S fazı sırasında DNA replikasyon çatalı bütünlüğünün kaybını ve M fazı sırasında eksik iğ ipliği montajını takip etmek ve hataları önlemektir (Matthews ve diğ., 2022). G1 fazında hücreler, DNA replikasyonunu başlatabilir ve hücre döngüsüne girer ya da G1 fazında kalabilirler **(Şekil 2.5).** Ayrıca G1 sırasında hücreler hücre döngüsünden çıkarak durgunluk veya G0 olarak bilinen bölünmedikleri bir duruma da geçebilirler. Yetişkin bir vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğu bu durumdadır ve DNA replikasyonunu başlatıp, hücre döngüsüne girebilmek için G1'e geçmeleri gerekir. S fazına geçildikten sonra ise G2 fazında başka bir karar aşaması vardır. Bu aşamada hücreler kromatinlerini yoğunlaştırıp kromozomların hücrenin merkezinde hizalanmasını başlatarak M fazına girebilirler. M fazı hem replike olmuş DNA'yı mitoz ile doğru bir şekilde ayırarak hem de tüm hücresel içeriği sitokinez ile iki yeni yavru hücreye bölerek ikili bir işlev görür. M fazı sırasında hücreler genetik materyalini ikiye ayırır ve hücre döngüsünü interfaza dönmek üzere sıfırlar. Hücre döngüsü süreçlerinin temel düzenleyicisi siklin bağımlı kinaz (CDK) aktivitesidir. Belirli siklinler hücre döngüsünün farklı aşamalarında birikir. Hücre döngüsü sırasında CDK aktivitesindeki değişiklikler hücre döngüsü girişini, ilerlemesini ve tamamlanmasını sağlar. G1 fazındaki CDK aktivitesi, DNA replikasyonunun başlatılması ve dolayısıyla hücre döngüsü girişi için gereklidir. G2 fazındaki CDK aktivitesi ile yoğunlaşma başlatılıp nuklear zarf geçirgenleştirilir. Ayrıca replike edilen kromozomal DNA’nın hücrenin orta hattında hizalanması sağlanarak kromozom ayrımına hazırlanılır. Anafaz sırasında APC/CCDC20 kompleksi, mitotik siklinleri (özellikle siklin B) yıkarak CDK aktivitesini azaltır. Bu olay hem kromatit ayrımı hem de hücrenin interfaza dönüşüyle eş zamanlı gerçekleşir (Morgan,2007).



Şekil 2.5: Hücre döngüsü ve kontrol noktaları (Matthews ve diğ., 2022, değiştirilerek)

2.2. EPİGENETİK

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik yapmadan kromozomdaki çeşitli modifikasyonlar yoluyla meydana gelen gen ifadesindeki kalıtsal ve kararlı değişikliklerin incelenmesidir (Berger ve diğ., 2009). Epigenetik değişiklikler, DNA üzerinde metilasyon şeklinde gerçekleştirilirken, kromatin düzeyinde ise histon proteinlerinin modifikasyonları (metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon vb) **(Tablo 2-1),** hücre genomunun üç boyutlu organizasyonu (3B) ve kromatinin yeniden düzenlenmeleri şeklinde olabilmektedir. Epigenetik düzenlemelerin üçüncü bir mekanizması da transkripsiyon sonrası ncRNA ve bu RNA'ların m5C (5-metil sitozin), m6A (N6-metil adenozin), pseudoüridin gibi çeşitli modifikasyonları ile gerçekleştirilir (Aboud ve diğ., 2023; Felsenfeld, 2024). Epigenetik mekanizmalar, gen ifadesini ya da genin susturulmasını düzenleyen bir kontrol sistemi oluşturur. Bu kontrol sistemi dokular arasında değişir ve hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynar (Atlasi ve Stunnenberg, 2017; Cheedipudi ve diğ., 2014). Ayrıca, epigenetik modifikasyonlar yoluyla oluşturulan hücreler arasındaki gen ekspresyonundaki farklılıklar, belirli hücre tiplerinin birbirine benzemeyen farklı işleviyle sonuçlanır. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde, farklı hücre tiplerinin hücresel kimliğinin organizmanın yaşamı boyunca

gerçekleşecek çok sayıdaki hücre bölünmesi sırasında korunması gereklidir. DNA dizisinde değişiklik olmadan spesifik gen ifadesi kalıplarının hücre bölünmelerinde kalıtılabilmesine "epigenetik hafıza" denir (Bernstein ve diğ., 2007; Bird, 2002; Rivera ve Ren, 2013). Epigenetik hafıza, hücrelerin diğer hücre kaderlerine yönlendiren uyarıcı sinyallerle karşılaştıklarında bile kimliklerini korumalarını sağlar (Bonasio ve diğ., 2010; Blomen ve Boonstra, 2011; Moazed, 2011). Dolayısıyla hücreler gelişimsel ve çevresel sinyalleri hatırlayarak gen ekspresyonlarını nesiller boyunca koruyabilirler. Bununla birlikte epigenetik hafızanın kanser, nörolojik ve metabolik bozukluklar gibi hastalık süreçlerindeki rolü de önemlidir.

Epigenetik, sadece insan gelişiminin mekanizmalarını anlamak için değil, aynı zamanda populasyonlar arasındaki fenotipik varyasyonları ve birçok hastalığının etiyolojisini incelemek için de kilit öneme sahiptir. Bununla birlikte, insan vücudundaki 200'den fazla farklı hücre tipinin her biri genomun özdeş bir kopyasını içermesine rağmen farklı gen kümesini ifade etmeleri sebebiyle tüm epigenetik düzeni keşfetmek büyük bir zorluk teşkil etmektedir. Her hücre döngüsünün S fazı sırasında tüm genomun doğru bir şekilde kopyalanması gerektiği gibi gen ifadesi profilinin de doğru bir şekilde kopyalanması gerekir; sonuçta, bölünen bir hepatosit, bir nöronla aynı genomu paylaşmasına rağmen tamamen farklılaşmış yeni bir hepatosit oluşturmalıdır (Blomen ve Boonstra, 2011). Epigenetikle bağlantılı olarak türetilen bir terim de "epigenom"dur. Bu terim genellikle bir hücredeki gen ifade kalıplarını düzenleyen diziden bağımsız süreçlerin küresel ve kapsamlı görünümünü tanımlamak için kullanılmaktadır. Epigenom, hücre tipinden hücre tipine farklılık gösterir ve her hücrede gen ifadesi ve kromozomların nuklear mimarisi düzenlenerek, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya erişimi kısıtlanarak veya kolaylaştırılarak ve geçmiş transkripsiyonel faaliyetlerin hafızası korunarak elde edilir. Dolayısıyla, epigenom genomik dizinin ikinci bir boyutunu temsil eder ve hücre tipine özgü gen ifadesi modellerinin sürdürülmesinde çok önemlidir (Bonasio ve diğ., 2010).

2.2.1. Epigenetik Modifikasyonlar

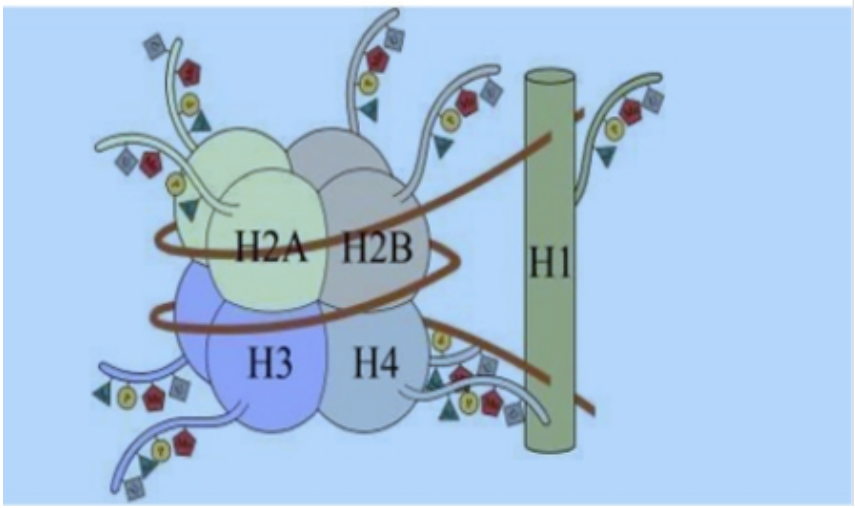
2.2.1.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir ve bir sitozin-guanin dizisi (CpG) içindeki sitozin nükleotidinin pirimidin halkasının 5. karbonuna doğrudan bir metil grubunun eklenmesini içerir. CpG dinükleotidleri genellikle "CpG adaları" oluşturacak şekilde bir arada bulunurlar. Özellikle genlerin promotör bölgelerindeki CpG

adaları epigenetik DNA metilasyonu için yaygın hedeflerdir. Bu da gen promotor bölgelerinin yaklaşık %70 'inin CpG adaları içinde yer aldığı bilgisini doğrular niteliktedir. Metillenen sitozinler gen baskılayıcı proteinlerle iş birliği yaparak genin susturulmasına aracılık ederler. Bu epigenetik mekanizma dokuya özgü gen düzenlemesinde, genomik baskılamada ve X kromozomu inaktivasyonunda önemli bir rol oynar. Ayrıca bu mekanizmalarla tümör baskılayıcı genlerin belirgin hipermetilasyonu ve proto-onkogenlerin hipometilasyonu tümör karsinogenezine katkıda bulunur (Portela ve Esteller, 2010; Saxonov ve diğ., 2006). Yakın zamanlarda CpG dışı sitozinlerde ve diğer (adenin, timin ve sitozin) bazlarda da metilasyon olabildiği anlaşılmışsa da (Jang ve diğ., 2017) halen en iyi anlaşılmış olan CpG metilasyonudur.

2.2.1.2. Histon Modifikasyonları

DNA, hücre içerisinde nükleozom adı verilen temel yapısal birimlerde paketlenir. Bu yapısal birimler hep birlikte dinamik bir yapı olan kromatini oluşturur. Kromatin yapısının başlıca belirleyicileri histon proteinleridir (Blomen ve Boonstra, 2011). Histonlar nükleozomal alt birimin merkezi bileşenidir ve her birinden iki kopya olmak üzere dört çekirdek histon proteinini (H3, H4, H2A, H2B) içeren bir oktamer oluşturur ve bunun etrafına 147 baz çiftlik bir DNA segmenti sarılır (Talbert ve Henikoff, 2010). H1 adı verilen bir histon çeşidi ise bu kor proteinlerini saran DNA'ya dışarıdan bağlanarak yapıyı sabitler. Nukleozomlar 'linker" DNA (bağlayıcı DNA) ile birbirine bağlanır **(Şekil 2.6).**



Şekil 2.6: Histonlar ve Histon Kuyruklarının Modifikasyonları (Li ve diğ., 2014)

Tüm ökaryotik genetik bilgileri depolayan kromatin, büyük ölçüde histon kuyruklarına etki eden ve böylece DNA'ya erişimi düzenleyen çeşitli translasyon sonrası modifikasyonlara tabidir. Bu modifikasyonlar küçük moleküllerin kovalent bağlanması (yani fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon) ve makromoleküller (örneğin ubikitinasyon, SUMOilasyon) ile sağlanabilir (Shilatifard, 2006; Blomen ve Boonstra, 2011). Histonlarda bulunan en az sekiz farklı modifikasyon türü vardır **(Tablo 2.1)** (Kouzarides, 2007). Farklı histon modifikasyonları, kromatinle ilişkili proteinler için sinerjik veya antagonistik etki gösteren afiniteler oluşturabilir ve bu da transkripsiyonel olarak aktif veya inaktif kromatin durumları arasında dinamik geçişleri sağlar. Histon kuyruklarının birlikte çalışması sayesinde genetik kodun bilgi potansiyelini önemli ölçüde genişleten bir "histon kodu" ortaya çıkar (Jenuwein ve Allis, 2001b; Turner, 2000). DNA ve histon modifikasyonlarının genom çapındaki desenleri erken gelişim sırasında belirlenir ve hücre bölünmeleri boyunca korunur (Kazanets ve diğ., 2016)

Tablo 2-1: Histonlar üzerinde tanımlanmış farklı modifikasyonlar ve işlevleri (Kouzarides, 2007, değiştirilerek)

Histon Modifikasyonları	Modifiye edilen kuyruk bölgesi	Düzenleyici İşlev
Asetilasyon	**K**-ac	Transkripsiyon, Onarım, replikasyon, Kondensasyon
Metilasyon	**K**-me1 **K**-me2 **K**-me3	Transkripsiyon, Onarım
Metilasyon	**R**-me1 **R**-me2a **R**-me2s	Transkripsiyon
Fosforilasyon	**S**-ph **T**-ph	Transkripsiyon, Onarım, Kondensasyon
Ubikitilasyon	**K**-ub	Transkripsiyon, Onarım
Sumoylasyon	**K**-su	Transkripsiyon
ADP-ribozilasyon	**E**-ar	Transkripsiyon
Deiminasyon	**R> Cit**	Transkripsiyon
Prolin İzomerizasyon	**P-cis> P-trans**	Transkripsiyon

Histon asetilasyonu ilk rapor edilen ve histon asetiltransferaz ve histondeasetilazlar tarafından regüle edilen bir modifikasyondur. Sıklıkla pozitif yüklü lizin kalıntılarında meydana gelir ve histonun yükünü nötralize eder. Böylece negatif yüklü DNA ile pozitif yüklü histon proteinleri arasındaki etkileşimler zayıflar kromatin açılır ve transkripsiyon kolaylaştırılır.

Histonların fosforilasyonu da asetilasyon gibi oldukça dinamiktir ve serin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin N-terminalinde kinaz ve fosfatazların antagonistik çalışmasıyla gerçekleştirilir.

Histon metilasyonu ise histon metiltransferaz ve histondemetilaz enzimleri ile düzenlenir ve histonun yükünü değiştirmez. Lizin kalıntıları mono-, di- veya tri-metillenmiş olabilirken, argininler mono-, simetrik veya asimetrik olarak di-metillenmiş olabilir. Bu sebeple bu olay oldukça karmaşıktır (Bedford ve Clarke, 2009; Ng ve diğ., 2009; Bannister ve Kouzarides, 2011). Örneğin, histon 3'teki lizin 4'ün metilasyonu (H3K4me), transkripsiyon aktivasyonuyla ilişkiliyken, histon 3'teki lizin 27'nin trimetilasyonu (H3K27me3), transkripsiyon baskılanmasıyla ilişkilidir. Histon lizin kalıntılarının metilasyonu, diğer modifikasyonlara kıyasla nispeten daha uzun yarı ömre sahip olduğu için epigenetik hafıza için önemli bir modifikasyondur (Barth ve Imhof, 2010).

Genom stabilitesinin kaybı, neredeyse tüm tümör tiplerinin gelişimini ve ilerlemesini sağlayan karsinogenezin erken safhalarında gerçekleşen bir olaydır. Histon modifikasyonlarını değiştirici enzimlerin düzensiz işlevinin kanser gelişiminin çeşitli aşamalarıyla ilişkilendirilebileceği birçok araştırmada gösterilmiştir. Örneğin; hematopoietik hücrelerde H3Y41'i fosforile eden bir histon kinaz olarak görev yapan JAK2 proteininin geninde meydana gelen mutasyonların hematolojik kanser gelişimine yol açan bir olay olduğu düşünülmektedir (Campbell ve Green, 2006; Levine ve diğ., 2007).

H3K27me3:

Histon kuyruklarındaki modifikasyonlar genlerin transkripsiyonel durumunu yansıtır ve ifade edilen genlerle korelasyon gösterdiğinde aktif olarak veya sessiz genlerle korelasyon

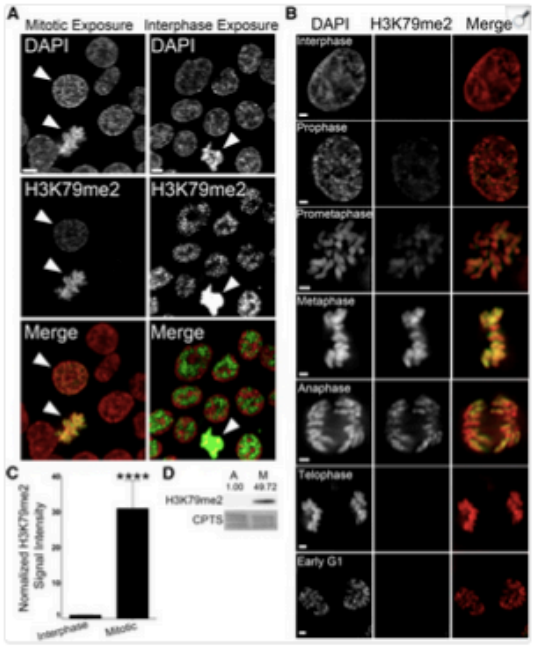
gösterdiğinde baskılayıcı olarak sınıflandırılır. H3K9me3, H4K20me3 ve H3K27me3 gibi baskılayıcı histon modifikasyonları birçok hücre tipinde gen susturulması veya heterokromatin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (Boyer ve diğ., 2006; Martens ve diğ., 2005; Regha ve diğ., 2007). Fare ve insan genomunu haritalayan dört çalışma, H3K27me3'ün, birkaç istisna dışında sessiz gen kümelerinin promotörlerinde zenginleştiğini göstermiştir (Barski ve diğ., 2007; Mikkelsen ve diğ., 2007; Pan ve diğ., 2007; Zhao ve diğ., 2007). H3K27me3, geleneksel olarak Giemsa boyama ile R-bantlama bölgeleri olarak tanımlanan gen açısından zengin bölgelerde öncelikli olarak tespit edilir (Pauler ve diğ., 2009). H3K27me3 modifikasyonunu sağlayan EZH2 enzimini kodlayan genin aşırı ekspresyonundan kaynaklanan gen susturulması ile çeşitli solid tümörlerin (meme, prostat, mesane) ilerlemesinin ilişkilendirilmiştir (Varambally ve diğ., 2002; Kleer ve diğ., 2003; Weikert ve diğ., 2005). Ancak EZH2'nin inaktive edildiği bazı maliniteler de mevcuttur. Bu durum çelişki olarak görülse de H3K27me3 seviyelerinin her iki yönde de bozulmasının kanser gelişimini teşvik edebileceği öngörüsünü desteklemektedir. Hücresel homeostazı sürdürmek için H3K27me3 seviyelerinin dengede tutulması gereklidir (Ernst ve diğ., 2010; Nikoloski ve diğ., 2010).

H3K79me2:

Bu histon metilasyonu tipik olarak transkripsiyonel düzenlemede, telomerik susturmada, hücre döngüsü düzenlemesinde ve DNA hasarı onarımında işlev görür. DOT1L enzimi, H3K79'u di-metilleyen bir enzimdir ve DNA replikasyonunun döngü başına bir kezle sınırlandırılması, hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre çoğalması, transkripsiyon aktivasyonu ve uzaması, telomer susturulması ve DNA onarımı gibi genomik stabilite için gerekli olan hücresel süreçleri düzenler. DOT1L ayrıca embriyonik gelişim için gereklidir. DOT1L aracılı (H3K79me2), kardiyomiyogenez için kritik olan kardiyak hücre kaderini tanımlayan genleri düzenler, intestinal kript progenitör hücre proliferasyonunu ve homeostazını ve ayrıca doğum öncesi, doğum sonrası ve yetişkin hematopoezini korur. DOT1L birçok insan malinitesinde aşırı ifade edilir ve düzensiz H3K79 metilasyonu akut miyeloid lösemide ve bazı solid tümörlerde patojeniktir (Kurani ve Slingerland, 2024).

Yapılan çalışmalar, bazı histon post-translasyonel modifikasyonlarının mitozla eş zamanlı olarak dinamik ve küresel artışlar sergilediğini ve genomik stabilitenin korunmasında önemli roller oynadığını ortaya koymuştur. H3K79me2 mitozda artan bir modifikasyondur.

Mitoz bölünme sırasında H3K79me2 seviyelerindeki kaybın kromozom sayı ve mitotik kusurlardaki artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir(Guppy ve McManus, 2014).



The global abundance of H3K79me2 increases dramatically during mitosis. (A) Representative deconvolved images of HCT116 cells labeled with an anti-H3K79me2 antibody (green) and counterstained with DAPI (red). Arrowheads identify mitotic cells. Bars, 5 μm. Due to the lower levels of H3K79me2 in interphase cells, two images are presented in which the exposure times were independently optimized to display the abundance of H3K79me2 either within mitotic cells (left) or within interphase cells (right). Note that the mitotic cell in the right panel becomes saturated with the prolonged exposure time. (B) High-resolution (63×) deconvolved images depicting the temporal and spatial progression pattern of H3K79me2 (green) throughout the cell cycle (indicated). Bar, 2 μm. (C) Bar graph depicting the statistically significant increase (****P-value <0.0001) in the mean, normalized H3K79me2 signal intensity (±SD) within the mitotic cells as revealed by single-cell, semiquantitative imaging microscopy from asynchronous and untreated cellular populations. (D) Western blot depicting a striking increase in the global abundance of H3K79me2 within the mitotic-enriched (M) population relative to an asynchronous (A) and predominantly interphase population. Semiquantitative analyses were performed and the relative abundance of H3K79me2 following normalization to the respective loading control (CPTS) is shown.

Şekil 2.7: Guppy ve ark.'larının H3K79me2'nin HCT116 hücrelerinde mitoz sırasında artışını gösteren çalışmaları (Guppy ve McManus, 2014)

2.2.1.3. Kodlamayan RNA'larla Epigenetik Düzenlemeler

Kodlamayan RNA (ncRNA), transkripsiyona uğrayan ancak proteinlere çevrilmeyen işlevsel bir RNA molekülüdür. Önemli ncRNA molekülleri arasında 30'dan az nükleotid içeren mikroRNA'lar (miRNA) ve kısa interfering RNA'lar (siRNA) ve 200 nükleotid veya daha uzun olan uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) bulunur. Epigenetikteki rollerinin tam kapsamı hala belirleniyor olsa da ncRNA'ların gen susturulmasına ek olarak DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının düzenlenme mekanizmalarına katıldığını gösteren kanıtlar vardır. siRNA'ların ve lncRNA'ların her ikisinin de heterokromatin oluşumuyla gen ifadesini düzenlediği gösterilmiştir (NM ve diğ., 2024).

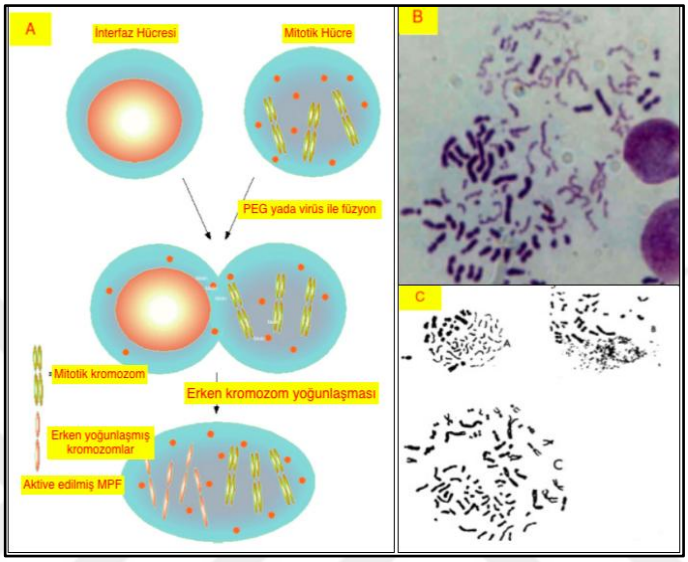
2.3. PREMATÜR KROMOZOM KONDENSASYONU (PCC)

"Erken kromozom yoğunlaşması" (PCC) indüksiyonuyla interfaz kromatinini "kromozoma olabildiğince yakın" bir netlikte görüntülemek mümkündür (Johnson ve Rao, 1970). Bu işlem, hedef hücrelerin mitotik hücrelerle füzyonu, mitotik özütlerin enjeksiyonu ve birkaç kimyasal kromatin yoğunlaşması indükleyicisi ile gerçekleştirilebilir (Obara ve diğ., 1974). Erken kromozom yoğunlaşması bize kromatin yoğunlaşma dinamikleri ve diğer moleküler mekanizmalar hakkında değerli bilgiler sağlar. PCC ile indüklenerek elde edilmiş kromozomların uzunluğu, indükleyici konsantrasyonundan ya da kaynaştırılan mitotik hücre sayısından bağımsızdır. PCC uzunluğu indüksiyon sırasında hedef hücrenin fazına bağlıdır. Buna göre, G1 PCC'ler çok uzun, tek kromatidlerdir, G2'dekiler uzun ve ince çift kromatidlerdir ve S fazındakiler toz haline gelmiş, parçalanmış görünümleriyle karakterize edilirler (Johnson ve Rao, 1970; Sperling ve Rao, 1974; Hanks ve Rao, 1980). PCC tekniği, hücre döngüsü analizi, kanser biyolojisi, mutajenezi ve klinik sitogenetik, biyodozimetri, doğum öncesi tanı, doğurganlık ve üreme tıbbı gibi alanlarda çok yönlü uygulamalara sahiptir (Ravi ve diğ., 2013). Sitogenetik teknikler genetik materyaldeki değişimleri tespit etmek için kullanılan son derece kullanışlı yöntemlerdir. İlaç keşfi, mutajenik maruziyetlerin tespiti gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır. PCC tekniği, uzun süreli kültür gerektirmeden bazı maruziyetlerin (radyasyon, ilaç) DNA üzerindeki olumsuz etkisini hızlı bir şekilde gösterebilmesi açısından değerlidir. Ayrıca bazı kanserlerde mitoza giren hücre sayısı azaldığı için kromozom anomalilerini tespit etmek mümkün olmamaktadır. Bu tür durumlarda PCC yöntemi ile interfazda kromozom elde edilip mevcut olan DNA hasarı gösterilebilmektedir. Bu yöntem, tespit edilebilen gerçek hasarları maskeleme veya azaltmada DNA onarım mekanizmalarının müdahalesini azaltırken, interfaz DNA hasarlarını incelemek için bir fırsat sağlar (Durante ve diğ., 1998). Dolayısıyla bu hasarların erken tespitini sağlamış olur. Ayrıca PCC, kromatin yoğunlaşmasında ve kromozom morfolojilerinde yer alan temel hücresel mekanizmaları aydınlatmak için de kullanılabilir. Prematüre kromozom yoğunlaşmasını oluşturmanın iki ana yöntemi biyolojik ve kimyasal yöntemlerdir.

2.3.1. Biyolojik Yöntem (Füzyon yöntemi)

Geleneksel yöntemde hücreler Sendai virüsü ya da polietilen glikol kullanılarak hücre membranı geçirgenliği arttırılır ve füzyon oluşturularak membranların yeniden düzenlenmesi sağlanır **Şekil 2.8-A.** Bu şekilde mitotik hücrelerdeki mitoz tetikleyici faktörler (MPF) yardımıyla hedef hücrelerdeki kromatin yoğunlaştırılır. Ancak bu yöntem özellikle tümör

hücreleri için zor ve zahmetlidir. PCC verimi de tutarsızdır. Ayrıca en büyük dezavantajlarından biri, yoğunlaştırılmış durumdaki mitotik hücrenin kromozomları ile hedef hücrenin erken yoğunlaşmış kromozomları arasında ayrım yapmanın zorluğudur. İki hücrenin kromozomlarının üst üste gelmesi ve analizi engellemesi de olumsuz yanlarından bir diğeridir (**Şekil 2.8-B)**



Şekil 2.8: Füzyonla indüklenen PCC

A. Füzyonla indüklenen PCC mekanizması. B. PEG ile indüklenmiş insan lenfositlerinden elde edilen G1-PCC kromozomları. (Gotoh & Durante, 2006, değiştirilerek). C. Virüs aracılı füzyonla indüklenen G1, S, G2 fazı insan kemik iliği hücreleri (Hittelman ve diğ., 1979)

2.3.2. Kimyasal Yöntem (İlaca Bağlı PCC)

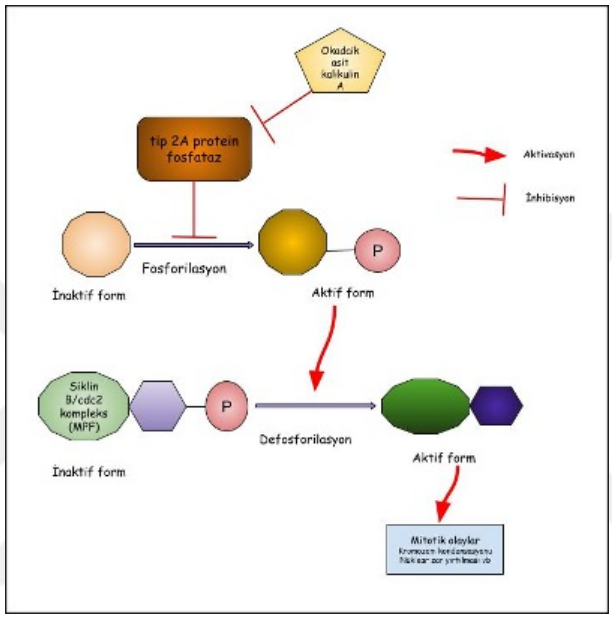
PCC'yi indüklemek için ilk denenen kimyasallar kafein ve okadaik asitdir ve başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ancak bu uygulamada hücrelerin bir DNA sentez inhibitörü (hidroksiüre veya timidin) kullanılarak senkronize edilmesi gerekiyordu. Elde edilen kromozomlar toz haline gelmiş S fazı kromozomları olduğundan analiz için uygun değillerdi. Gotoh ve diğ. (1995) okadaik asit ve kalikulin A kullanarak senkronizasyon gerektirmeden PCC indükleyen metodlarını yayınladılar. Kalikülin A (CA) ilk olarak bir deniz süngeri olan Discodermiacalyx'ten izole edilmiştir. CA'nın Xenopus, kemirgen hücreleri, insan lenfositleri ve fibroblastlar gibi çeşitli hücrelerde PCC'yi indüklediği gösterilmiştir (Steinmann ve diğ., 1991; Gotoh ve diğ., 1995; Kanda ve diğ., 1999). PCC indeksi diğer fosfataz inhibitörlerinden daha yüksektir. Yöntemin kullanımı kolaydır ve metafaz kromozomları eldesi için gerçekleştirilen kolsemid protokolüne göre daha kısa sürede gerçekleşir. Yalnızca 30 dk için PCC inkübasyonu yeterlidir. Ayrıca yeterli sayıda PCC indükleyebilir ve geleneksel kolsemid

protokolünün mitotik indeksine (%1-2) göre PCC indeksi yüzdesi (%20) daha yüksektir (Gotoh ve Durante, 2006).

İlk defa füzyonla gerçekleştirilen PCC deneylerinde kromozomların toz haline gelme sebebinin virüsler olabileceği düşünülmüştü (Kato ve Sandberg, 1967). Ancak daha sonra Rao ve ark. tarafından 1970 yılında PCC mekanizması şu şekilde yorumlandı: Mitotik çekirdeklerde biriken belirli moleküller kromozom yoğunlaşmasını teşvik ediyordu ve füzyon ile mitotik hücrelerdeki söz konusu moleküller interfaz hücre çekirdeklerini de yoğunlaşmaya zorluyordu. Yoğunlaşmayı sağlayan bu moleküllerden MPF'ler ilk defa oositlerdeki mayoz bölünme sırasında gerçekleşen metafaz sırasında keşfedildi (Masui, 1974). Daha sonra mitotik hücrelerde de aynı işlevi olduğu anlaşıldı (Miake-Lye ve Kirschner, 1985). MPF aslında p34cdc2/siklinB'nin bir kompleksidir ve hücre döngüsü düzenlemesinde ve kontrolünde görev yapar (Dunphy ve Kumagai, 1991). Bu kompleksin defosforile edilmiş formu (aktive edilmiş MPF) kromozom yoğunlaşmasını teşvik eder (Moreno ve diğ., 1990). Cdc25, p34cdc2/siklinB ile çalışarak mitozun başlangıcını düzenleyen bir hücre döngüsü kontrol noktası proteinidir (Ducommun ve diğ., 1990). Cdc25 bir tirozin fosfatazdır ve p34cdc2/siklinB kompleksini defosforile ederek aktive eder (Gould ve diğ., 1990; Dunphy ve Kumagai, 1991). Cdc25'in aktivitesi tip 1 ve 2A protein fosfataza duyarlıdır (Dunphy ve Kumagai, 1991; Izumi ve diğ., 1992). Okadaik asit ve kalikulin A, tip 1 ve 2A protein fosfatazların spesifik inhibitörleridir. Dolayısıyla cdc25 ve p34cdc2siklinB aktivitesini etkiler. Aktive olmuş MPF ise erken kromozom yoğunlaşmasına sebep olur. MPF proteini, yoğunlaşmanın başlaması için gereklidir (**Şekil 2.9).** MPF aktivitesi hücredeki siklin B'lerin konsantrasyonuna bağlıdır (Dorée ve Galas, 1994). Siklin B konsantrasyonu ise hücre döngüsü boyunca dalgalanır. G1'de en düşüktür. S'den G2'ye geçerken artar. G2'de maksimuma ulaşır. G0'da ise hiç yoktur (Durante ve diğ., 1998). Bundan dolayı bu durum kimyasal yolla indüklenen PCC yönteminin dezavantajı sayılabilir. Bu dezavantaj sebebiyle araştırmacılar (Prasanna ve diğ., 2000), PCC'yi indükleyecek başka moleküllere yönelmiştir. Bunun için G0 lenfositlerinin kültür ortamına okadaik aside ek olarak siklin kinaz B ve ATP (adenozin trifosfat) eklemişlerdir. Her ne kadar yüksek siklin B konsantrasyonlarında PCC indüklemek için başarılı olsalar da elde ettikleri kromozom morfolojisi, karyotip analizi ve yapısal bozuklukları tespit etmek için pek uygun olmamıştır.

OA ve Kalikülin A, hücre döngüsünün tüm fazlarında protein fosfatazlar tip 1 ve tip 2A'yı (serin/treonin) spesifik olarak inhibe ederek lenfositlerde kromozom yoğunlaşmasını

sağlayan proteinlerin hiperfosforilasyonuna yol açar. PCC'nin morfolojik özellikleri, PCC'nin indüksiyonu sırasında hücre döngüsündeki hücrelerin aşamasını değerlendirmeye olanak tanır. G1 fazında yoğunlaşan kromozomlar tek kromatidlidir **Şekil 2.8-B.** DNA'daki birçok çentik nedeniyle, S fazındaki kromozomlar oldukça parçalanmıştır ve toz haline gelmiş gibi görünür. G2 kromozomları iki kromatidlidir ve kolsemid bloku ile elde edilen metafaz kromozomlarına benzer (**Şekil 2.8-C).**



Şekil 2.9: Kimyasal PCC yönteminin mekanizması

2.3.3. PCC Kullanım Alanları

PCC kullanım alanları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- İnterfaz sırasında meydana gelen çeşitli kromatin olaylarını analiz etme. Örneğin; iyonlaştırıcı radyasyona ya da kimyasal mutajene maruziyet sonrası kromozom kırılmaları ve onarımının araştırıldığı çalışmalar (Hittelman ve Rao, 1974; Cornforth ve Bedford, 1993)
- İyonlaştırıcı radyasyonun biyodozimetresi (Durante ve diğ, 1998)
- Ağır metal iyonlarının etkilerini araştıran çalışmalar (Suzuki ve diğ., 2001)
- Patolojik durumlarda, yaşlılarda ya da stres koşullarında düşük mitotik indekse sahip hücrelerle yapılan çalışmalar (Sommer ve diğ., 2002)

- Çok yüksek radyasyon dozuna maruziyetten dolayı neredeyse hiç mitoz üretmeyen hücrelerde yapılan çalışmalar (Smith ve diğ., 2024)
- Kromozom instabilitesi analizi (Bezrookove ve diğ., 2003)
- Doğum öncesi tanı (Johnson ve diğ., 1999; Ito ve diğ., 2002; Srebniak ve diğ., 2005)

Çok yüksek dozlarda klastojenik ajanlara maruz kalan kişilere uygun tıbbi tedavileri seçmek için doz tahminleri mümkün olduğunca çabuk belirlenmelidir. Bununla birlikte, insan vücudu yüksek dozlarla ışınlandığında, periferik kanda kalan beyaz hücreler yalnızca G2 veya G1 fazında durarak mitoza girmemekle kalmaz aynı zamanda mitotik hücre ölümü veya apoptoz geçirir. Sonuç olarak, analiz için kromozom örnekleri hazırlamak genellikle imkansızdır. Burada PCC ile kromozom elde etmek çok değerli hale gelmektedir.

2.4. İMMÜNFLORESAN YÖNTEMİ

İmmün boyama, antikorlar, florokromlar ya da kolloidal nanogold parçacıklar kullanılarak hücreler ve dokular içerisindeki proteinlerin lokalizasyonunun belirlenmesinde kullanılan en yaygın tekniklerden biridir. Hem klinik hem de temel biyolojik ve histopatolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. Hücre ya da doku kullanılmasına bağlı olarak "sito-" ya da "histo-" önekleri alabilir. Kullanılan etiketin çeşidine göre ise -kimya ya da -floresan son ekleri alabilmektedir. İmmün boyama sırasında etiket olarak florokromların kullanıldığı yöntem immünfloresan olarak adlandırılmaktadır. Floresan etiketler yüksek hassasiyete sahiptir. Çok çeşitli florokrom mevcut olduğu için tek bir deneyde birden fazla etiketleme yapılabilmesine olanak verir. Elde edilen floresan sinyaller ise floresan mikroskobunda değerlendirilir (Piña ve Santos-Díaz, 2022).

Kullanılan etiketin ne olduğuna bakılmaksızın immün boyama, doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Doğrudan yöntemde birincil antikorlar doğrudan etikete bağlanır. Dolaylı yöntemde ise birincil antikorlar, etiketle konjuge edilmiş ikincil antikorlara bağlanır. Her iki yöntemin de avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Doğrudan yöntem, hızlı olması ve arka plan gürültüsünün az olması ile dolaylı yönteme göre daha avantajlıdır. Ancak fazla miktarda antikor gerektirdiği için pahalı bir yöntemdir. Dolaylı yöntem ise, birincil antikorun stabil olması ve birden fazla ikincil antikorun birincil antikora

bağlanabilmesi sebebiyle daha avantajlıdır. Böylece daha gelişmiş bir sinyal verir. İkincil antikorların maliyetinin düşüklüğü de olumlu yanlarındandır. Ancak zaman alıcıdır ve yüksek bir arka plan sinyali verebilir(Chivukula ve Dabbs, 2011; Goodwin ve diğ., 2017)

2.4.1. Genel uygulama prosedürleri

Genel uygulama prosedürleri aşağıdaki gibi sıralanabilir (Rosas-Arellano ve diğ., 2016):

1. Örnek hazırlama: Görselleştirilmek istenen proteinleri içeren hücre ya da dokuların hazırlanması
2. Kanın ya da serum ortamının tuzlu su tamponlarıyla değiştirilmesi
3. Dokuya veya organizma türüne göre değişen uygun bir çözelti ve sıcaklıkla fiksasyon: Doku fiksasyonu, tipik olarak aldehitlerin uygulanmasıyla, immün boyama yönteminin başlangıcında doku yapısının korunması için gerçekleştirilir
4. Antijen geri kazanımı; aldehit fiksasyonunun antijen maskeleme etkilerini tersine çevirmeye yarar. Bitişik proteinler arasında metilen köprüleri, antikorların epitopa erişmesini fiziksel olarak engeller. Bu nedenle bazı antijenler, immünohistokimyasal boyama öncesinde antijen geri kazanımı yapılmazsa çok zayıf bir şekilde boyanır veya hiç boyanmaz
5. Permeabilizasyon (Geçirgenleştirme); bazen bağımsız bir aşama olabilirken bazen de blokaj aşamasında, yıkamalar sırasında, antikor inkubasyonları ya da çekirdek karşıt boyama yapılırken kullanılabilmektedir. Bu işlem, antikorun hücre içi veya organel içi epitoplara erişimini sağlamak için gereklidir. Bunun için Tween 20, Triton X 100 gibi deterjanlar kullanılır.
6. Spesifik olmayan bölgelerin bloke edilmesi
7. Birincil antikorların inkübe edilmesi: Bazen birincil antikorlar doğrudan konjuge edilir (direkt yöntem), bazen de konjuge edilmez (dolaylı yöntem).
8. Yıkama adımları
9. İkincil antikorların inkübasyonu (dolaylı yöntem)
10. Tekrar yıkama adımları
11. Çekirdek karşıt boyama

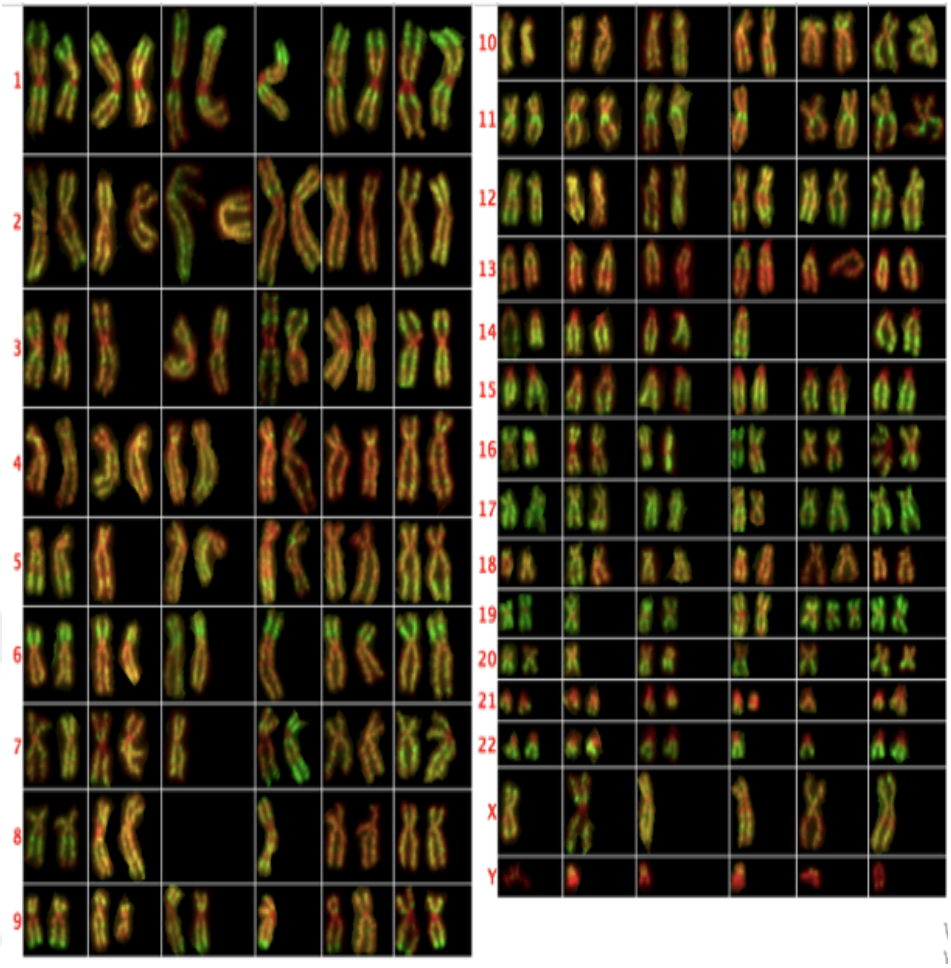
2.4.2. İmmün boyama yöntemlerinin dezavantajları

İmmün boyama yönteminin her aşamasındaki dezavantajlar çok çeşitlidir ve sonuçların yanlış yorumlanmasına sebep olabilir. Bu dezavantajlar;

- Zar hasarı, protein kaybı ya da yer değiştirmesi, doku ya da hücrelerin yapısının bozulması gibi nedenlerle protein lokalizasyonundaki değişimler
- Protein ifadesindeki değişimler
- Hipoksi, fosforilasyon, osmolarite kaybı, biyokimyasal değişiklikler, zar yüzey geriliminin kaybı gibi nedenlerle hasar ve hücre ölümü
- Antijenik bölgelerin modifikasyonları ya da aşırı fiksasyon sebebiyle epitopların maskelenmesi
- Hücre hasarı ve ölümü, antijenik bölgelerin modifikasyonları, otofloresans, düşük sinyal-gürültü oranı, düşük antikor sinyali, spesifik olmayan bağlanma gibi nedenlerle ortaya çıkan arka plan sinyali
- Proteinlerin konformasyonel değişiklikleri ve protein kaybı şeklinde sıralanabilir (Piña ve Santos-Díaz, 2022)

2.4.3. Kromozom Preparatlarında Kullanımı

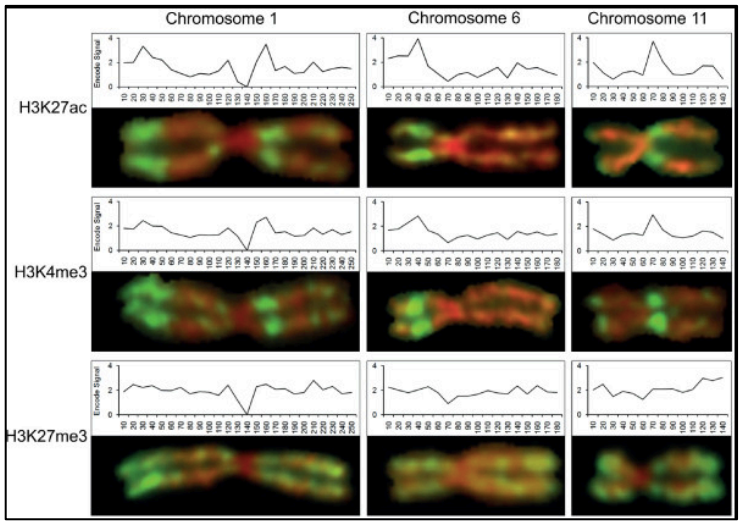
İmmünfloresan mikroskopisi, kromozom yoğunlaşması, histon proteinlerinin transkripsiyon sonrası modifikasyonları, kinetokor oluşumu, iğ mikrotübüllerinin organizasyonu ve kinetokora bağlanması gibi mitozdaki düzenleyici mekanizmaları incelemek için kullanılan bir tekniktir. Terrenoire ve ark. (2010,2015) tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli histon modifikasyonlarının homolog kromozomlar ve kardeş kromatidler arasında tutarlı immünfloresan bantlama desenleri verdiği belirtilmiştir (Terrenoire ve diğ., 2010; Terrenoire ve diğ., 2015). Ayrıca her kromozomun kendine özgü bir bant paternine sahip olduğu ve gen açısından zengin olan kromozom bölgelerinde aktif işaretlerin daha yoğun bulunduğu, sentromerik bölgelerde ise bu işaretlerin tükendiği gözlemlenmiştir. **Şekil 2.10**'da H3K27me3'e karşı immün boyama yapılmış altı adet metafaz sahasından elde edilen kromozomlar gösterilmektedir. Bu çalışmada H3K27ac (Histon 3 lizin 27 asetilasyonu), H3K4me3 (Histon 3 lizin 4 trimetilasyonu) ve H3K9ac (Histon 3 lizin 9 asetilasyonu) modifikasyonları da incelenmiştir ve aktif transkripsiyonla ilişkilendirilen modifikasyonların (H3K27ac, H3K4me3, H3K9ac) birbirine benzer bant paternleri gösterdiği, baskılayıcı modifikasyonların (H3K27me3) ise onlara göre farklı bant paternine sahip olduğu bildirilmiştir. Bant desenleri, aynı tip hücre hatlarında benzerdir (Terrenoire ve diğ., 2010)



Şekil 2.10: H3K27me3'ün altı farklı metafaz sahasındaki yerleşimi (Terrenoire ve diğ., 2010)

Kırmızı renk, DAPI boyalı (pseudocolor red) alanları, yeşil renk (FITC; Fluorescein isothiocyanate) H3K27me3 antikorlarıyla immün boyama yapılmış bölgeleri göstermektedir.

Ekip, 2010 yayınlarında, LCL (Lymphoblastoid Cell Line) hücre hattından elde ettikleri metafaz kromozomlarının immunfloresan görüntüleri ile UCSC (University of California Santa Cruz)'deki ENCODE veri merkezinden aldıkları interfaz epigenomuna ait verileri karşılaştırmışlardır (**Şekil 2.11)**

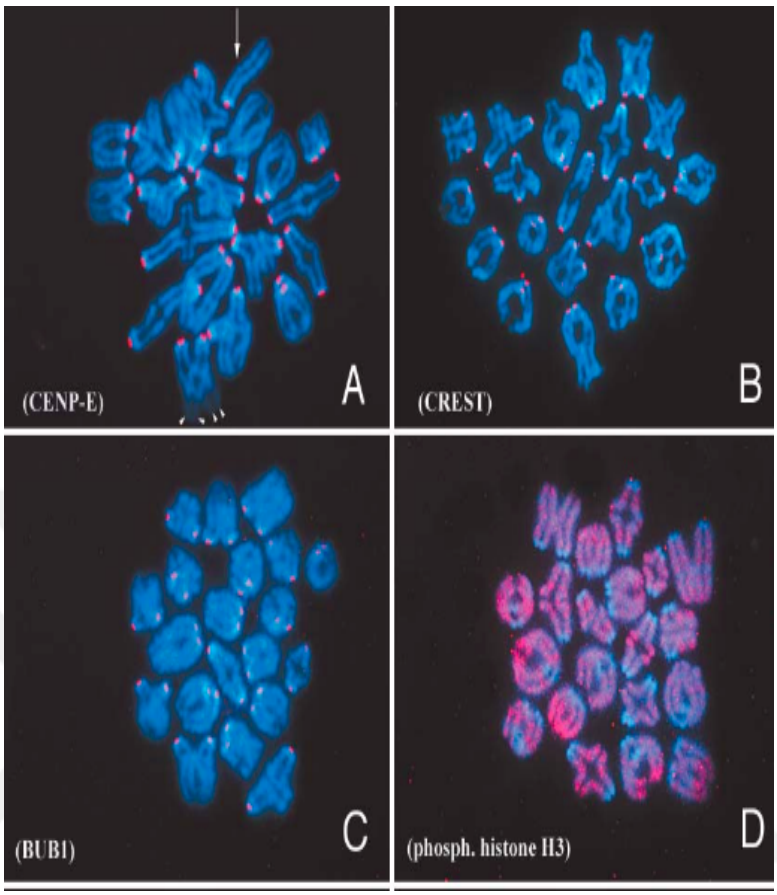


Şekil 2.11: H3K27ac, H3K4me3 ve H3K27me3 için immün boyama yapılmış metafaz kromozomları.

ENCODE ChIP-seq verilerinden derlenen eşdeğer interfaz kromozomu boyunca aynı modifikasyonun dağılımıyla hizalanmıştır (Terrenoire ve diğ., 2010).

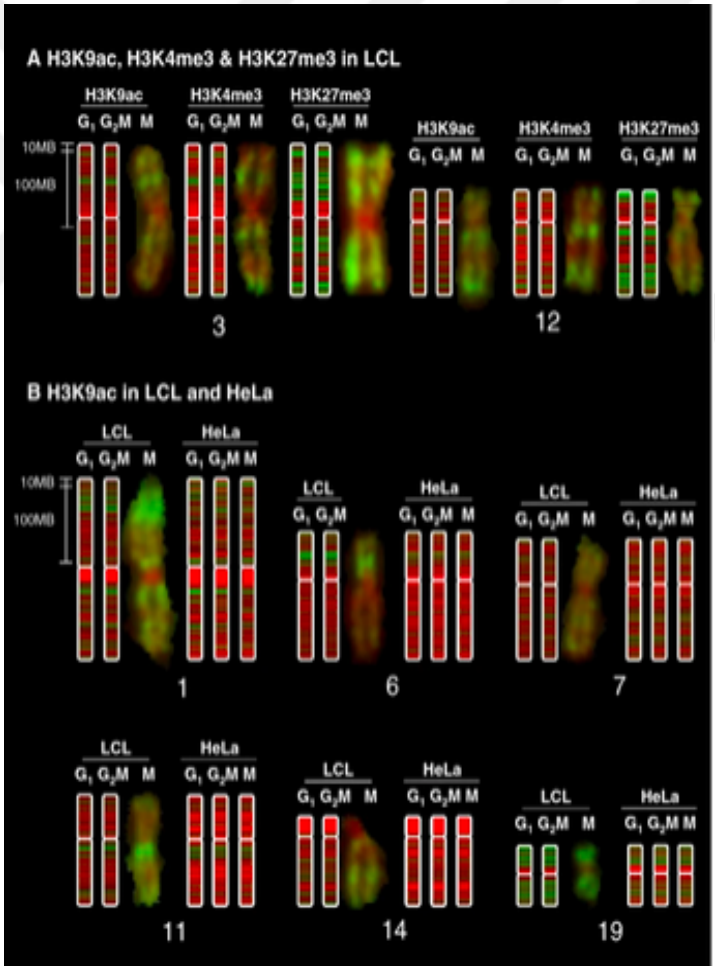
Aktif modifikasyon bantları ile gen/CGI (CPG Island) yoğunluğu ve interfazdaki transkript seviyeleri arasında yakın bir ilişki vardır, ancak bu parametrelerden hiçbiri bantların farklı konumunu ve göreceli boyama yoğunluklarını açıklayamaz (Terrenoire ve diğ., 2010)

Hodges ve Hunt (2002) da hem mitoz hem de mayozdaki metafaz kromozomları üzerindeki histon fosforilasyonunun ve kromozomla ilişkili proteinlerin yerleşimini değerlendirdikleri çalışmalarında immünfloresan yöntemini kullanmışlardır (Hodges ve Hunt, 2002). Metafaz kromozomları üzerindeki histon modifikasyonlarının bu yöntemle incelenmesi, tek hücre düzeyinde bilgi sunması sebebiyle değerlidir. Yöntemin, metafaz kromozomları üzerinde uygulamasında en önemli dezavantajlardan biri; histon proteinlerinin, kromozom yaymaları hazırlanırken carnoy fiksatifi gibi asitli fiksatifler sebebiyle kaybıdır. Bu sorunu çözebilmek için Terrenoire ve ark. (2010, 2015) sitospin yöntemini kullanırken, Hodges ve Hunt (2002) ise özel bir yayma tekniği geliştirmişlerdir. Sitospin yönteminde kromozomlar, carnoy fiksatifi kullanılmaksızın sitosantrifüj adı verilen özel bir santrifüj yardımıyla lam üzerine sabitlenmiştir. Hodges ve ark.'larının tekniğinde ise carnoy fiksatifi yerine PFA (paraformaldehit) kullanılarak ve özel bir kurutma prosedürü geliştirilerek kromozom yaymaları hazırlanmıştır. **Şekil 2.12**'de Hodges ve Hunt (2002)'ın memeli embriyo ve oositlerinden elde ettikleri metafaz kromozomları üzerinde immün boyama yapılmış sahalar görülmektedir (Hodges ve Hunt, 2002).



Şekil 2.12: Mayoz bölünme aşamasındaki memeli oositleri ve preimplantasyon embriyolarından elde edilmiş metafaz-1 kromozomlarının immünfloresan görüntüleri **(**Hodges ve Hunt, 2002)

Halsall ve ark. (2021) H3K9ac, H3K4me3 ve H3K27me3'ün genomdaki dağılımını göstermek için ChIP-seq ve iki hücre tipi HeLa ve LCL kullanmışlardır. Metafaz kromozomlarının immünfloresan mikroskobu ile tespit edilebilen 10-50 Mb'lik kromozom bölgelerinin (bandı), G_1 ve G_2M'de de bulunduğunu (**Şekil 2.13)**, hücre tipleri arasında tespit edilebilen farklılıkların daha alt bant seviyelerinde olduğunu tespit etmişlerdir. Dikkat çekici bir şekilde bu alt bantların hücre döngüsü boyunca değişmediğini, sadece bazı mitoza özgü genlerin olduğu bölgelerde yerel farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 2.13: Hücre Döngüsü Boyunca Kromozom Bantlama Desenleri (Halsall ve diğ., 2021)

3. YÖNTEM

3.1. OLGULAR

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Asım Cenani Sitogenetik Laboratuvarında gerçekleştirilen çalışmaya 18 yaşından büyük herhangi bir kanser öyküsü ve kronik hastalığı bulunmayan 10 sağlıklı birey dahil edildi. Çalışma, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmış (2024/70)) ve çalışmaya dahil olan deney grubunu oluşturan olgulardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

3.2. GEREÇLER

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- -20°C Derin Dondurucu ve +4°C Buzdolabı (Hotpoint Ariston)
- Buzdolabı (4042 T Plus +4°C)
- Çeker Ocak (Tez-San)
- Derin Dondurucu (-20 C) (4042 T Plus)
- Etüv (Memmert BM400)
- Hot plate (Cashtronics)
- Hassas Terazi (Precisa x B 220 A)
- Hibridizasyon Cihazı (ThermoBrite)
- İspirto Ocağı
- Manyetik Karıştırıcı (Are Velp Scientifica)
- Mikropipet (Gilson (10-100µl))
- Mikropipet (Discovery Comport (100-1000µl))
- Mikropipet (Pipetman (1-10 µl))
- Mikroskop (Leica DM 2500) (Olympus BX51)
- Mikroskop (Nikon eclipse E 600)
- Santrifüj (Hettich Rotafix 32A)
- Santrifüj (Hettich EBA 8S)
- Sitosantrifüj (Cytospin 4)
- Su banyosu (Köttermann)

- Ph metre (Milwauke)
- Sitofunel (EZ Double Cytofunel Thermo Scientific)
- Vorteks (SCILOGEX MX-S)

3.2.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri

- 15 ml falkon tüp
- Eldiven (BRP)
- Hidrofobik Pappen (Pat-lab)
- Sitosantrifüj lamı (DoubleCytoslide epredia)
- SuperFrost lam
- Lamel (Pat-lab)
- Mikrosantrifüj tüpü (0.6 ml)
- Mikrosantrifüj tüpü (1.5 ml)
- Pipet Uçları
- Steril Pastör Pipeti
- Vakumlu Kelebek Set- Vacutainer 21 G Yeşil
- Vakumlu Sodyum Heparinli Tüp 9 ml

3.2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Asetik Asit (Merck)
- Bovine serum albumin (BSA) (MedChemExpress)
- Buffer Tablet (Merck)
- Calyculin A
- Colcemid Solution (Gibco)
- DAPI dihydrochloride (Chemodex)
- DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Sigma)
- Dithiothreitol (Bio Basic)
- EDTA (Merck)
- FBS (Fetal Bovine Serum) (Diagnovum)
- Fikol (Capricorn)
- Giemsa (Sigma- Aldrich)
- İmmersiyon Yağı
- KCl (Tekkim)

- Metanol (Merck)
- NaCl (Bio Basic Canada)
- Paraformaldehit (Bio Basic)
- Penicillin/Streptomycin (Diagnovum)
- Photo-Flo (Ilford)
- Phytohemaglutinin (Diagnovum)
- RPMI 1640, with L-glutamine (Diagnovum)
- Tris (Bio Basic)
- Triton-X 100 (Merck)
- Toz Leishman Boya (Merck)
- Tween-20 (Merck)

3.2.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

PBS Çözeltisi;

137 mM NaCl
2.7 mM KCL
10mM Na2HPO4x2H2O
1.8 mM KH2PO4

Hazırlanışı; Tüm kimyasallar tartılıp bir beherin içerisine aktarıldıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı. pH'ı 7.0 olarak ayarlandı.

3.2.4.1. Hücre Kültürü ve Kültür Çıkış İşlemlerinde Kullanılan Çözeltiler

Lenfosit Kültürü İçin Kültür Ortamı

- 90 ml RPMI 1640
- 20 ml Fetal Bovine Serum
- 1 ml Penicillin/Streptomycin
- 1 ml Phytohemaglutinin

Hazırlanışı; Çeker ocak altında 90 ml RPMI 1640 (with L glutamine) ekim medyumu üzerine 20 ml Fetal Bovine Serum (FBS), 1 ml Phytohemaglutinin, 1 ml Penicillin/Streptomycin

eklendi. Elde edilen karışım 5'er ml olacak şekilde 12 ml'lik hücre kültürü tüplerine aktarıldı ve -20 C°'ye kaldırıldı.

Hipotonik Şok Çözeltisi

75 mM KCL için,

- 5.6 gr/lt KCL (M.A: 74.55 g/mol)

Hazırlanışı; Tartılıp bir beher içerisine aktarılan 5.6 gr KCl nin üzerine distile su eklenerek 1 litreye tamamlandı.

%8'lik Paraformaldehit Stok Çözeltisi

- 16 gr/ 200ml paraformaldehit

Hazırlanışı; Tartılıp bir beher içerisine aktarılan 16 gr PFA'nın üzerine distile su eklenerek 200 ml' ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda 60°C' de 2 saat boyunca karıştırıldı. Sıcaklık derecesinin 60°C' yi aşmamasına dikkat edildi. PFA tamamen eriyince 3-5 damla NaOH (pH=10.04) damlatılarak çözeltinin şeffaf hale gelmesi sağlandı ve bir süzgeç kâğıdı yardımıyla süzülüp 10'ar ml olarak tüplere bölündü. -20°C'ye kaldırıldı.

DTT/PFA/Triton X100 Fiksasyon Çözeltisi

- 3 mM Dithiothreitol (DTT)
- %1 Paraformaldehit (PFA)
- % 0,15 Triton X 100

Hazırlanışı; 0,036 gr DTT tartılarak bir beherin içerisine aktarıldı. 10 ml'lik %8'lik PFA, -20°C' den çıkarılıp, oda ısısına getirildikten sonra beherin içerisine aktarıldı. 120 µl tritonX 100 alınıp, 10 ml distile su içerisinde iyice çözünmesi sağlanarak behere eklendi. Son hacim 80 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. PH'ı 9,2 olarak ayarlandı.

Photoflo Çözeltisi (%0.08)

- 80 µl photoflo
- 100 ml'ye tamamlayacak kadar distile su

Hazırlanışı; 100 ml distile su içerisine 80 µl photoflo eklendi.

Calyculin A stok çözeltisi (50 nM)

Hazırlanışı; Katı halde temin edilen 10 µg/ml calyculin A, 200 µl DMSO içerisinde çözündürüldü ve her bir tüpe 5 µl olacak şekilde (50 nM) tüplere bölündü. Her bir deney için bir tüp kullanıldı.

3.2.4.2. İmmunfloresan Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

KCM Buffer (Potassium Chromosome Medium)

- 20 mM KCl
- 20 mM NaCl
- 10 mM Tris HCl
- 0.5 mM EDTA,
- % 0.1 (v/v) Triton X-100)

Hazırlanışı; 90 ml distile su içerisinde 0,894 gr KCL, 0,117 gr NaCl ve 0,121 gr Tris tartılıp pH'ı ölçüldükten ve 8,0'a ayarlandıktan sonra 0,018 gr EDTA ve 100 µl tritonX 100 eklenerek son hacim 100 ml'ye tamamlandı. TritonX 100'ün iyice erimiş olmasına dikkat edildi.

Bloklama Solüsyonu

- %5 BSA
- %95 KCM buffer

Hazırlanışı; 0,125 gr BSA tartılıp KCM buffer ile 2.5 ml'ye tamamlandı.

Primer Antikor Solüsyonu (1:100) (5 preparat için)

- 5 µl TriMethyl-Histone H3-K27 Mouse mAb
- 5 µl DiMethyl-Histone H3-K79 Rabbit mAb

490 µl %1 BSA (%5 BSA'nın seyreltilmesi ile hazırlanmış)

Bir ependorf tüp içerisinde 490 µl %1 BSA'ya primer antikorlar eklendi.

Sekonder Antikor Solüsyonu (1:1000 antimouse ve 1:500 anti-rabbit)

- 1 µl Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568
- 2 µl ABflo® 488-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) 997 µl 1% BSA

Bir ependorf tüp içerisinde 997 µl %1 BSA'ya sekonder antikorlar eklendi.

3.3. LENFOSİT KÜLTÜRÜ

3.3.1. Kan Örneklerinden Lenfosit İzolasyonu

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Asım Cenani Sitogenetik laboratuvarında sağlıklı bireylerden heparin içeren sterilize vakumlu tüplere 10 ml perifer kanı alındı.

1. Kan örnekleri 2 birim kan, 1 birim medyum (RPMI 1640) olacak şekilde steril tüpler içerisinde 5 ml RPMI 1640 ile seyreltildi. Ayrıca kan örnekleri alternatif olarak 1:1 oranında PBS ile de seyreltildi. Seyreltme işlemi için malzeme stok durumuna göre karar verildi.
2. 15 ml'lik tüplere 3 ml fikol eklendi.
3. Seyreltilmiş kan örnekleri, tüpün çeperinden fikolün üzerine sızdırılarak aktarıldı.
4. 2600 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrasında tüp içerisinde oluşan tabakalardan, lenfositleri içeren ortadaki bulutsu tabaka steril pastör pipeti yardımıyla steril bir tüpün içerisine toplandı.
6. Üzerine PBS ya da RPMI 1640 eklenerek 2600 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp peletin üzerine tekrar PBS ya da RPMI 1640 eklenerek bir kez daha 2600 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Toplam iki kez yıkama yapılmış oldu.
8. Süre sonunda pelet miktarı 1 ml kalıncaya kadar süpernatant uzaklaştırıldı.
9. Peletten 10 µl alınıp 90 µl distile su ile seyreltilerek thoma camında hücre sayımı yapıldı.

3.3.2. İzole Edilen Lenfositlerin Ekim İşlemi

Önceden hazırlanmış ve steril kültür tüplerine 5'er ml bölünerek -20 °C'de saklanmış kültür medyumlarından iki adedi oda sıcaklığına getirildi ve tüp başına 5.10^6 hücre olacak şekilde çeker ocak altında ekim işlemi gerçekleştirildi. Tüpler etüve kaldırıldı. Ekim saati not edildi. Birinci Tüp, 48 saatlik PCC yöntemi uygulanacak tüp, ikinci tüp, 72 saatlik tüp olarak belirlendi.

3.3.3. Kültür Çıkış İşlemi

3.3.3.1. 48 Saatlik PCC Çıkış İşlemi

- Ekim yapılan birinci tüpe 48.saatte calyculin (50nM) eklendi.
- 30-60 dk etüvde (37°C) inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda birinci tüp etüvden çıkarılıp 1200 rpm'de 8 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.
- Peletin üzerine 37°C'deki KCL çözeltisinden 5 ml eklendi ve etüve kaldırıldı.
- 10 dk etüvde bekletildikten sonra 1200 rpm'de 8 dk santrifüj edilip pelet 1ml kalıncaya kadar süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelet iyice vortekslendi.
- Preparat hazırlığına geçildi.

3.3.3.2. PCC Yönteminin Preparat Hazırlığı

- Önceden yıkanarak temizlenip kurutulmuş ve soğutulmuş lamlar soğuk fiksasyon çözeltisi içerisine daldırıldı.
- Çözelti içerisinden çıkarılan her bir lam üzerine mikropipet yardımıyla 70 µl pelet eklenerek farklı şekillerde yayma yapıldı. Sırayla; çizerek, 2 cm yüksekten eğik lam üzerine damlatarak ya da 30 cm yüksekten damlatarak yaymalar gerçekleştirildi.
- Yaymalar yatay bir şekilde 2 saat boyunca kurumaya bırakıldı.
- Kuruma sonrasında tüm preparatlar %0,08'lik photoflo çözeltisi ile 3 kez 5'er dk. yıkandı.
- Ardından, preparatlar immünfloresan deneylerinin yapılacağı zamana kadar -20 °C'ye kaldırıldı.

3.3.3.3. 72 Saatlik Kültür Çıkış İşlemi

- Ekim yapılan ikinci tüpe 70.saatte 100 µl colcemid eklendi.
- Etüvde 1,5 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda etüvden alınarak santrifüje konuldu.
- 1200 rpm'de 8 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüpün dibinde kalan peletin üzerine 37°C'de tutulan KCL çözeltisinden 5ml eklendi ve etüve kaldırıldı.
- 10 dk inkübe edildikten sonra tekrar 1200 rpm'de 8 dk santrifüj edildi.
- Pelet 1 ml kalıncaya kadar süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelet, 30-60 dk boyunca $+4^0$ C'ye kaldırıldı ve yayma yapmadan önce buz üzerinde tutularak çalışma alanına getirildi.
- Pelet iyice vortekslendikten sonra preparat hazırlığına geçildi.

3.3.3.4. 72 Saatlik Kültür Çıkışı İçin Preparat Hazırlığı

- Önceden yıkanarak temizlenip kurutulmuş ve soğutulmuş lamlar soğuk fiksasyon çözeltisi içerisine daldırıldı.
- Çözelti içerisinden çıkarılan her bir lam üzerine mikropipet yardımıyla 70 µl pelet eklenerek farklı şekillerde yayma yapıldı. Sırayla; çizerek, 2cm yüksekten eğik lam üzerine damlatarak ya da 30 cm yüksekten damlatarak yaymalar gerçekleştirildi.
- Yaymalar yatay bir şekilde 2 saat boyunca kurumaya bırakıldı.
- Kuruma sonrasında tüm preparatlar %0,08'lik photoflo çözeltisi ile 3 kez 5'er dk. yıkandı.
- Ardından, preparatlar immünfloresan deneylerinin yapılacağı zamana kadar -20 °C'ye kaldırıldı.

3.4. İMMÜNFLORESAN DENEYLERİ

- İmmünfloresan deneyleri yapılacak olan preparatlar seçildikten sonra ilk aşama olarak KCM buffer ile 4 defa 5'er dakikalık yıkamalar yapıldı. Yıkamalar, preparatlar yatay olarak tutulup üzerine KCM buffer uygulanarak gerçekleştirildi.

- Yıkamalar sonunda arka plan gürültüsünü ve spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için her bir lama 100 µl %5 BSA solüsyonu ile 1 saat boyunca bloklama yapıldı. Bloklama adımının ardından her bir preparatın önceden mikroskopta kontrol edilerek belirlenen, antikor uygulanacak bölgeleri pappen aracılığıyla işaretlendi. Daha sonra bu bölgelere primer antikor solüsyonu eklendi. Preparatların kurumasını engellemek için her bir preparatin üzeri parafilmle kapatıldı. Nemli bir kutu içerisinde +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün +4°C'den çıkarılan preparatlar oda sıcaklığına getirildi.
- KCM buffer ile 4 kez 5'er dk yıkandı.
- Yıkamalar sonrasında sekonder antikor solüsyonu eklendi ve yine parafilmle kapatılıp nemli kutu içerisinde ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda tekrar 4 kez 5'er dk KCM buffer ile yıkama yapıldı.
- Karşıt boyama için 20 µl DAPI antifade kullanıldı. Preparat lamelle kapatıldı.

3.5. MİKROSKOP ANALİZLERİ

- Preparatlar Fluoresan mikroskobunda DAPI/FITC/ Texas Red üçlü filtrede incelendi.
- MetaSystems görüntüleme sisteminde değerlendirildi.
- Kromozomlar, morfolojilerine ve ters DAPI görüntülerine göre tanımlandı.
- H3K27me3 için DAPI ve Texas Red filtreleri kullanıldı.
- H3K79me2 için DAPI ve FITC filtreleri kullanıldı.
- PCC preaparatlarında G2 fazı hücreleri değerlendirmeye alındı.

4. BULGULAR

4.1. OLGULARIN İMMÜNFLORESAN BULGULARI

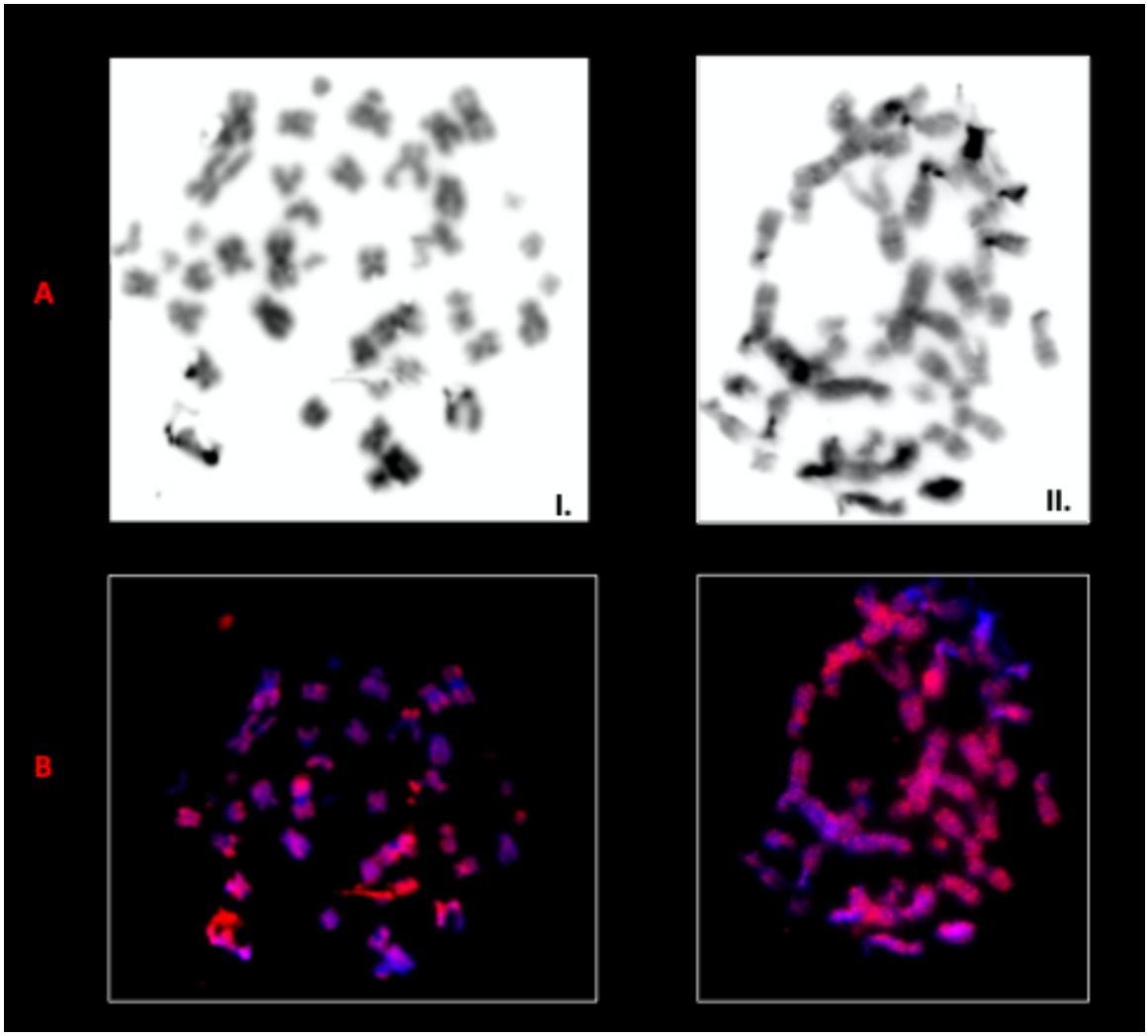
Çalışmada bulguları yer alan 8 Olguya ait metafaz ve interfaz immünfloresan görüntüleri, H3K27me3 ve H3K79me2 histon modifikasyonları için ikili boyama yapılarak aynı sahalardan elde edilmiştir. Kromozomların tanımlanması, klinik tanı çalışmalarında kullanılan standart kromozom tanımlama kriterlerini kullanarak bir G-bantlama deseni veren ters DAPI boyama temel alınarak yapılmıştır.

4.1.1. Olgu-I (A.B)

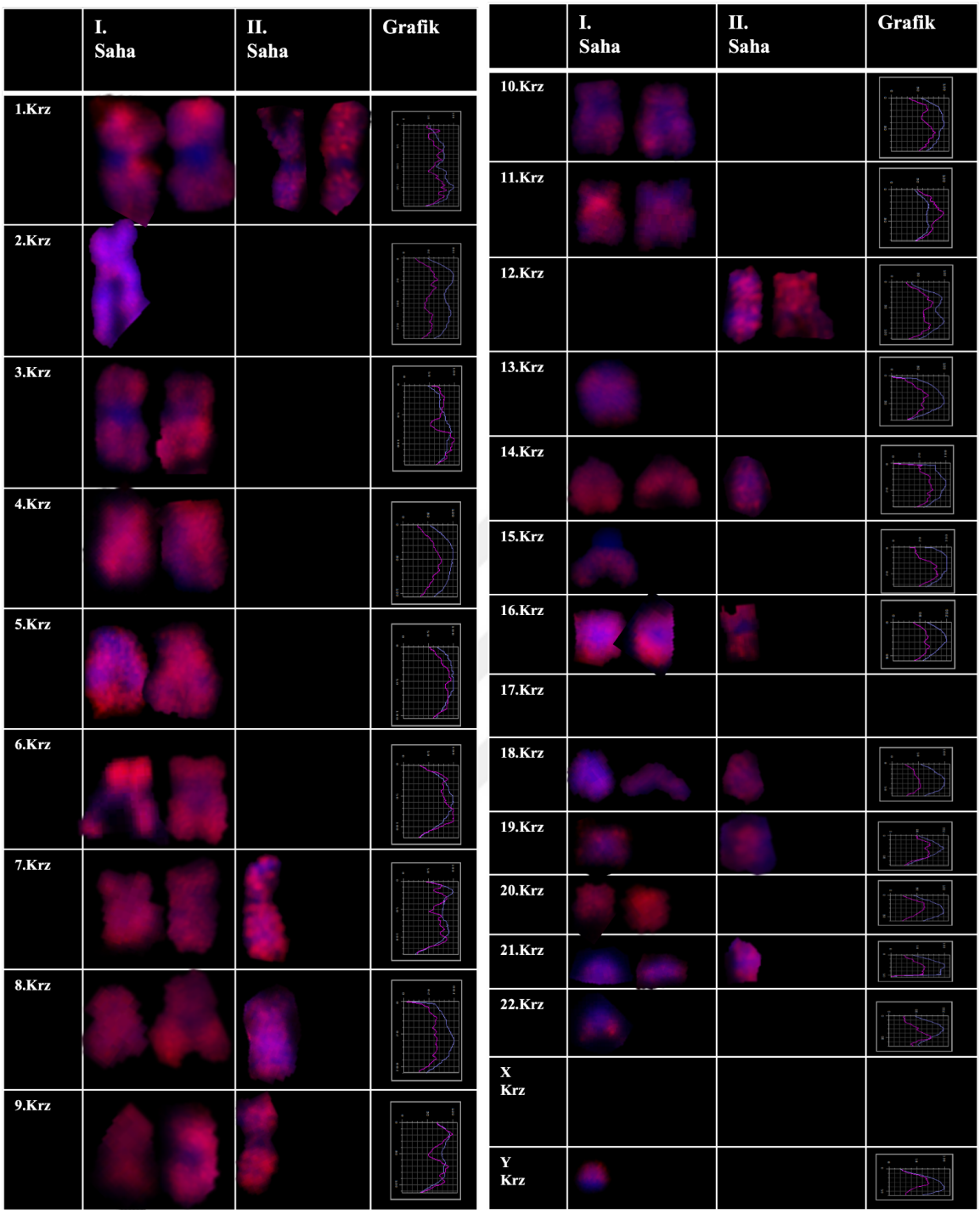
21 yaşındaki erkek gönüllüye ait G15144 No'lu kültürden elde edilen H3K27me3 ve H3K79me2 bulgularının görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

4.1.1.1. Olgu I Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları

Olgu I'den elde edilen metafaz sahalarından yalnızca iki tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.1**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.2'**de gösterilmiştir.

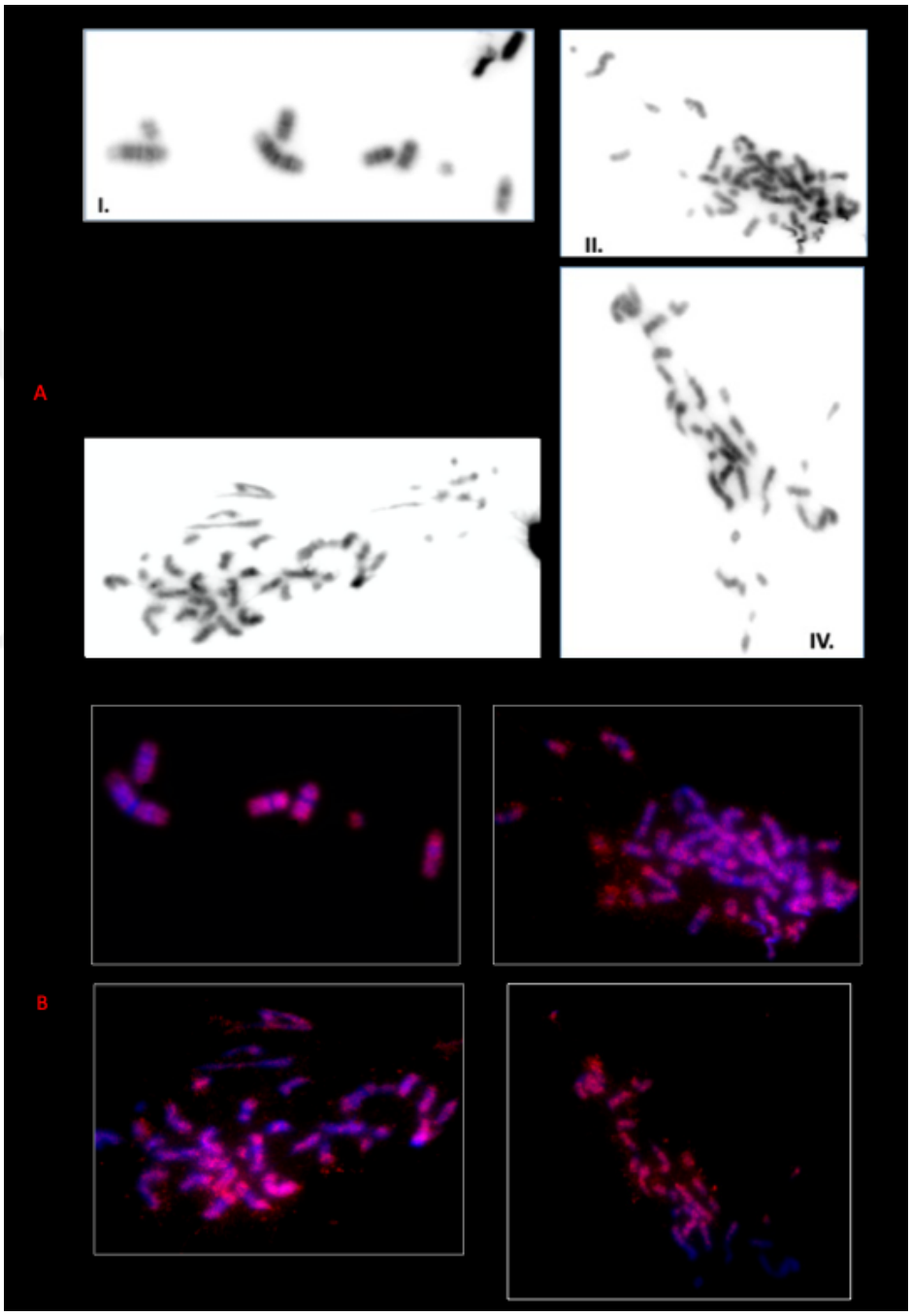


Şekil 4.1: Olgu I'den elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



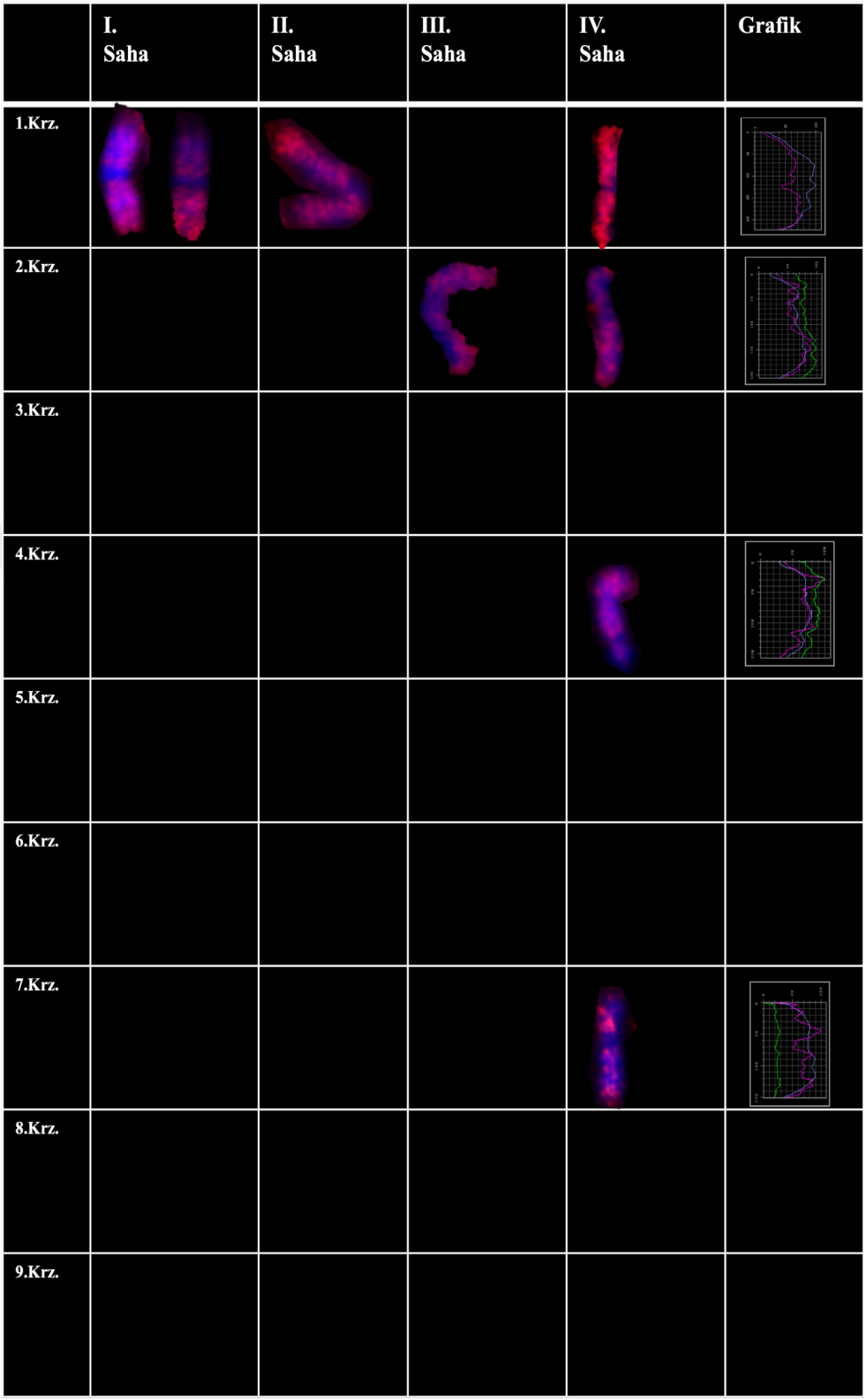
Şekil 4.2: Olgu I'in iki sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu I'den PCC ile elde edilen interfaz sahalarından yalnızca dört tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.3)**. Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.4** ve **Şekil 4.5'**te gösterilmiştir.

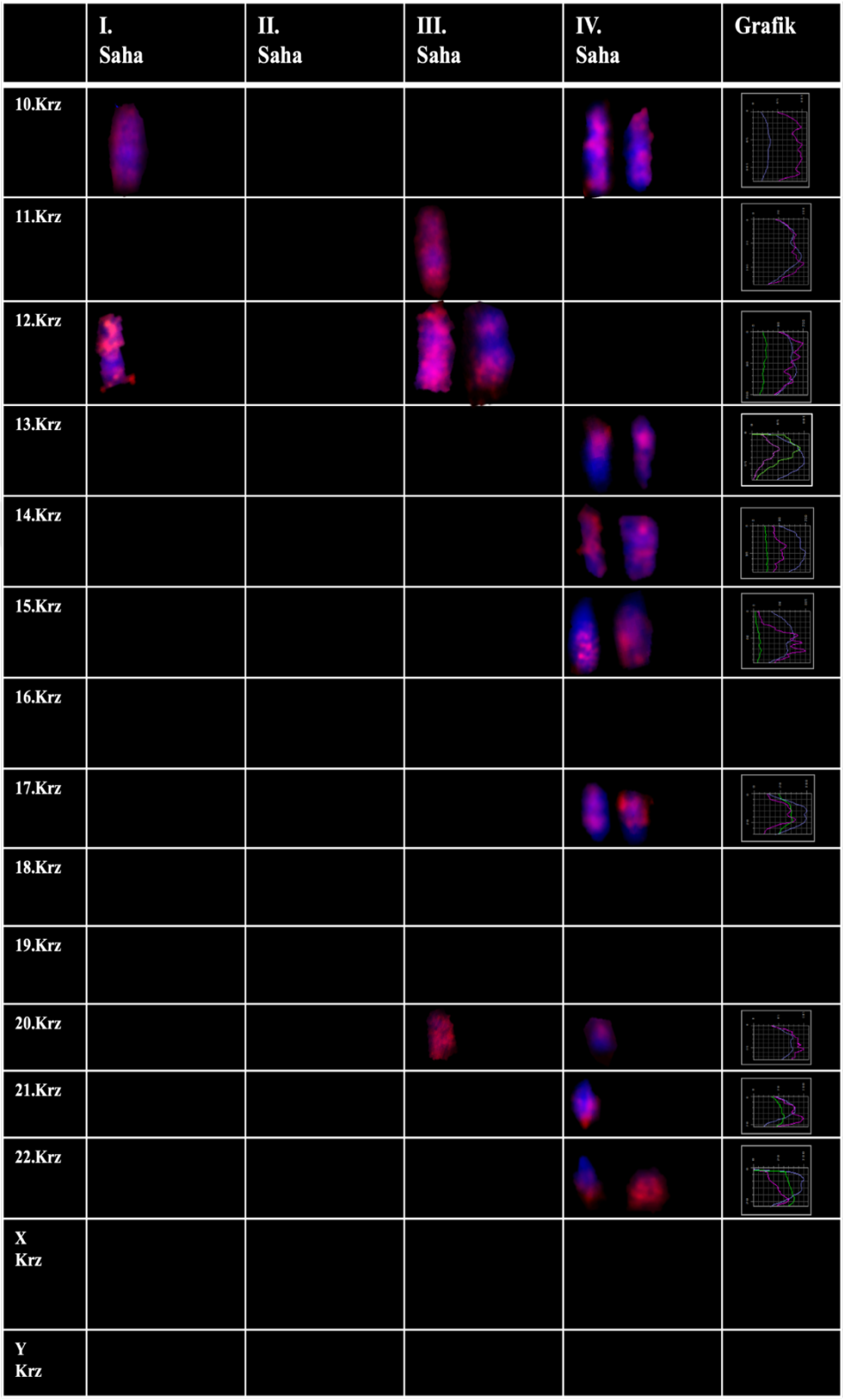


Şekil 4.3: Olgu I'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.4: Olgu I'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

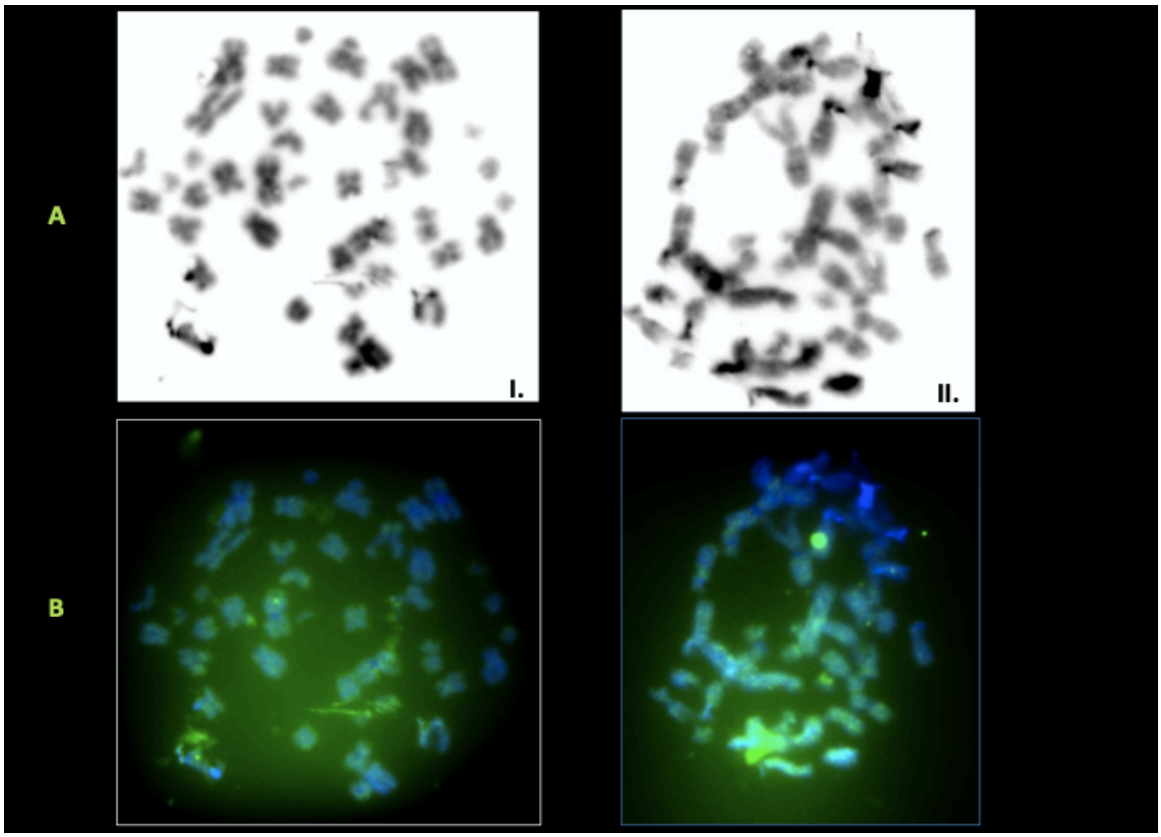


Şekil 4.5: Olgu I'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

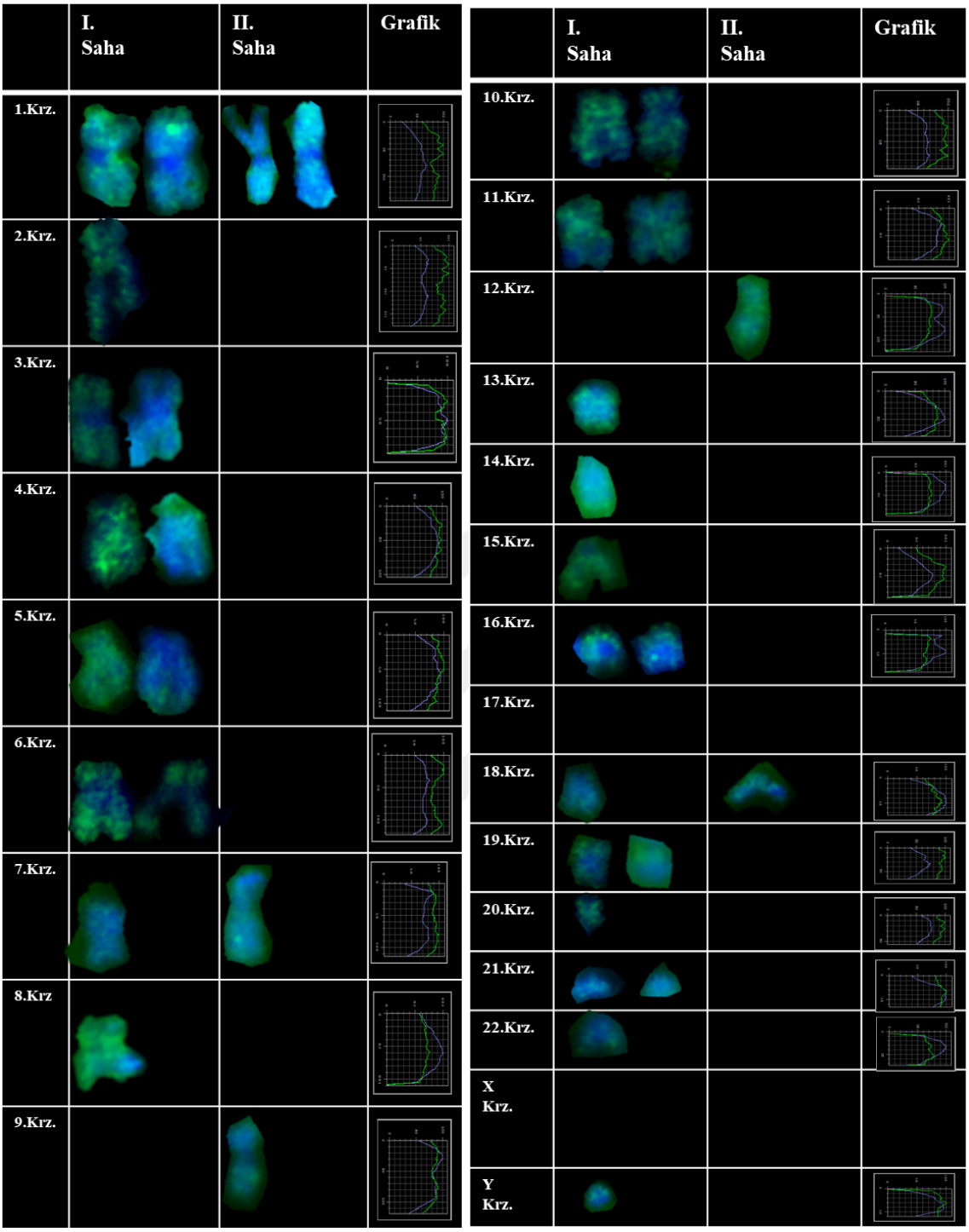
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.1.2. Olgu I Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları

Olgu I'den elde edilen metafaz sahalarından yalnızca iki tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.6).** Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.7**'de gösterilmiştir.

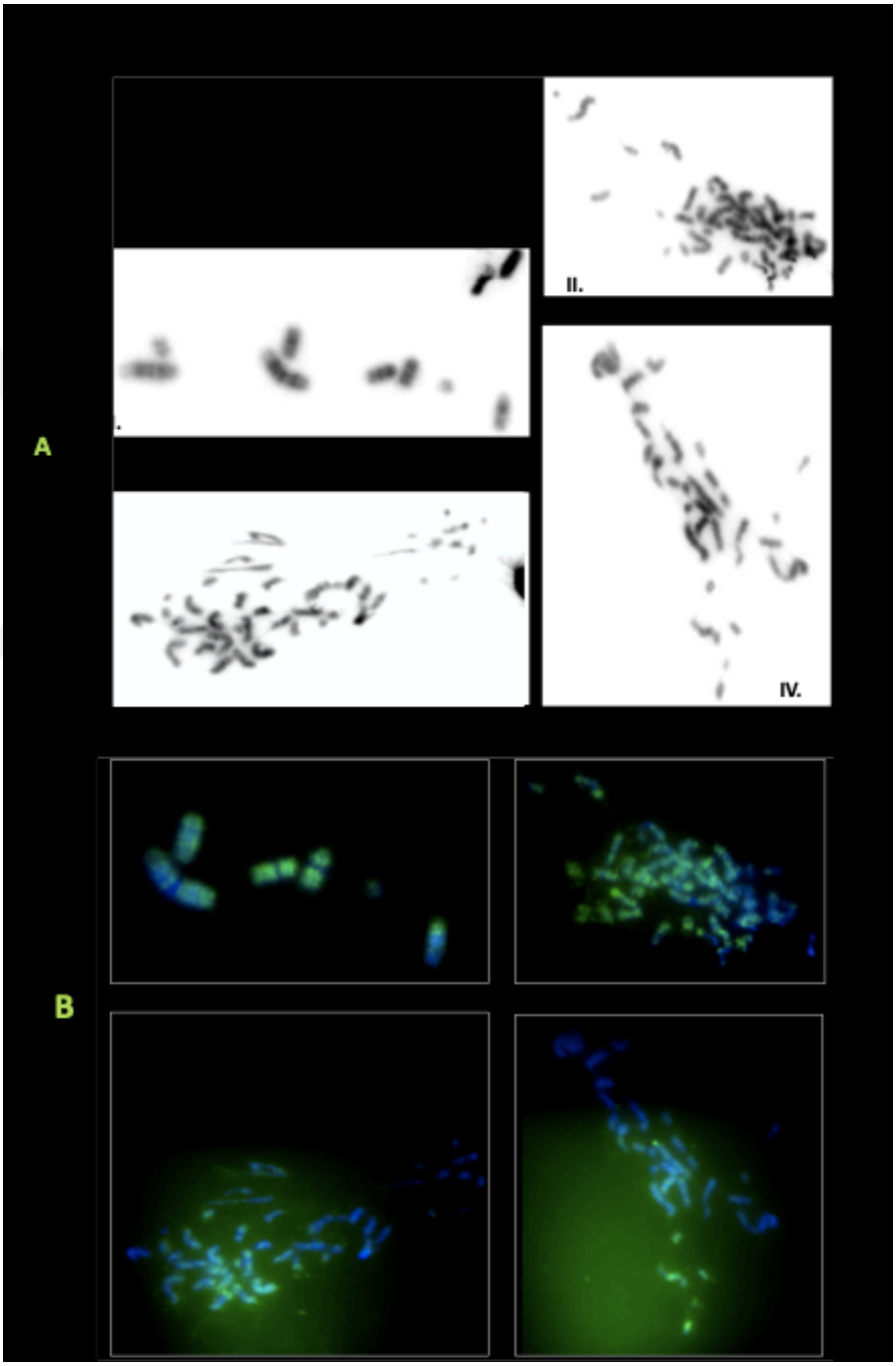


Şekil 4.6: Olgu I'den elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri**.**
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



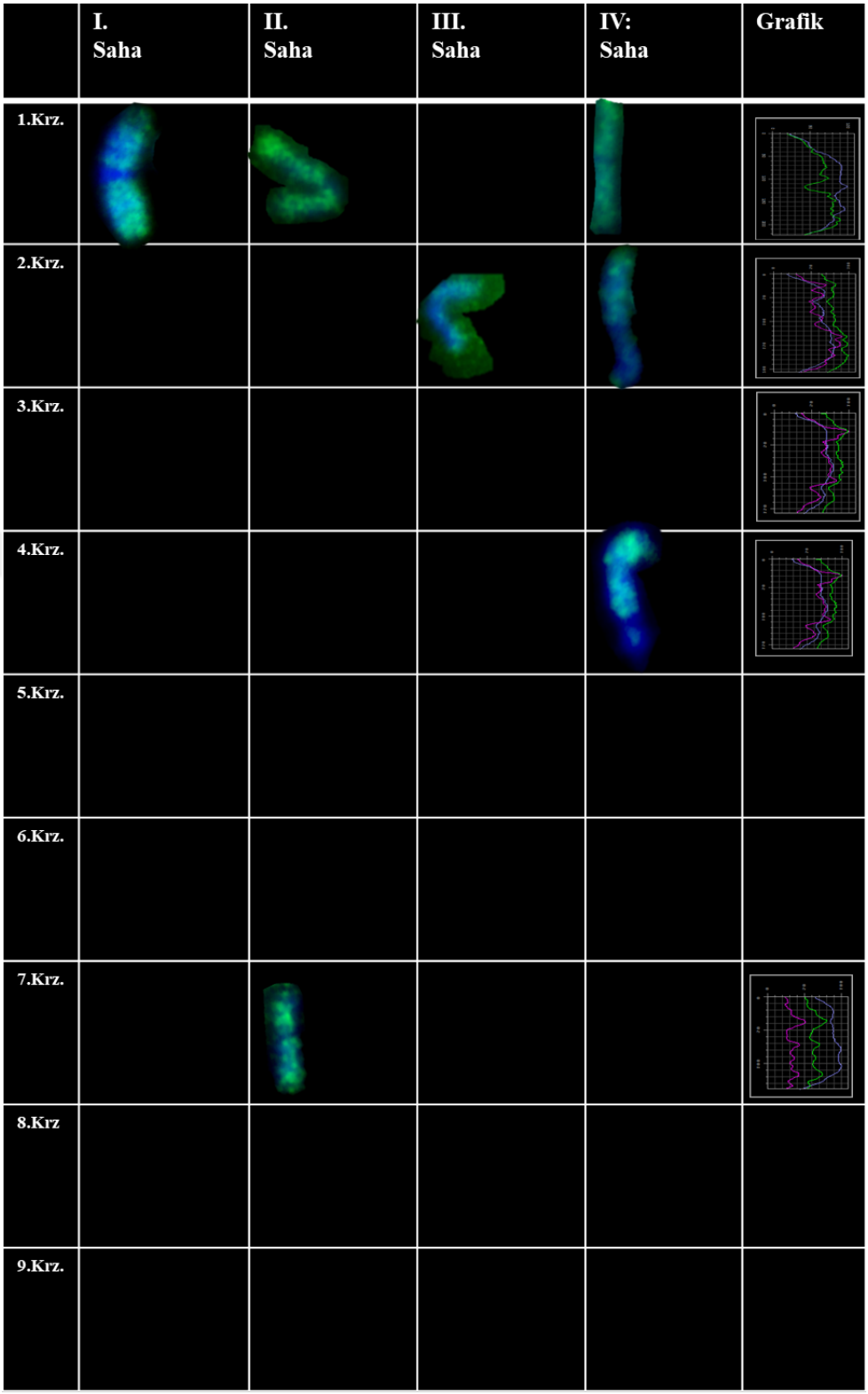
Şekil 4.7: Olgu I'in iki sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu I'den PCC ile elde edilen interfaz sahalarından yalnızca 4 tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.8**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.9** ve **Şekil 4.10'**da gösterilmiştir.

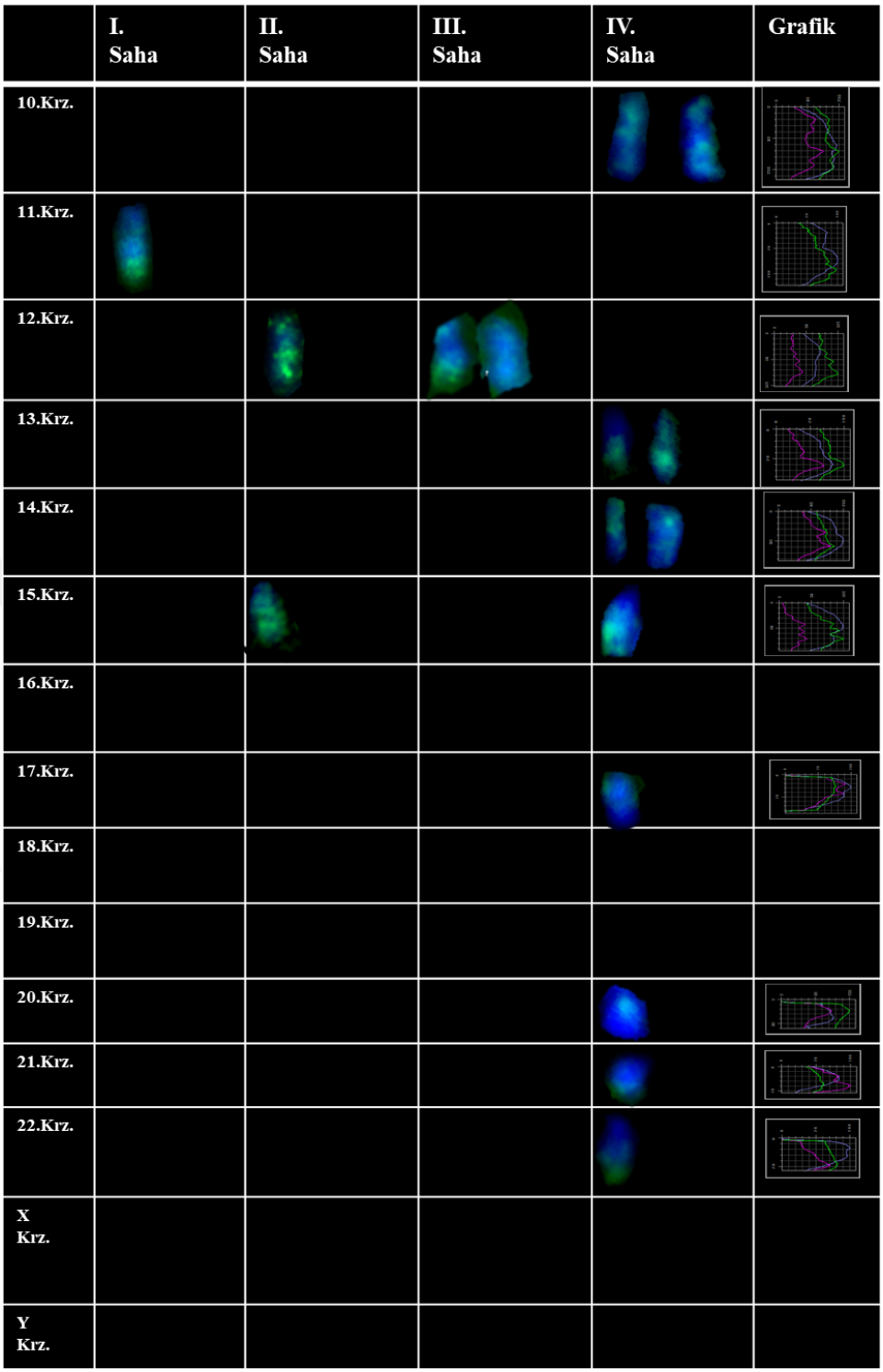


Şekil 4.8: Olgu I'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.9: Olgu I'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafığidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir. Bazı sahalar, üçlü filtre ile alındığı için kırmızı sinyaller (H3K27me3) de görülmektedir.



Şekil 4.10: Olgu I'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y kromozomuna kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

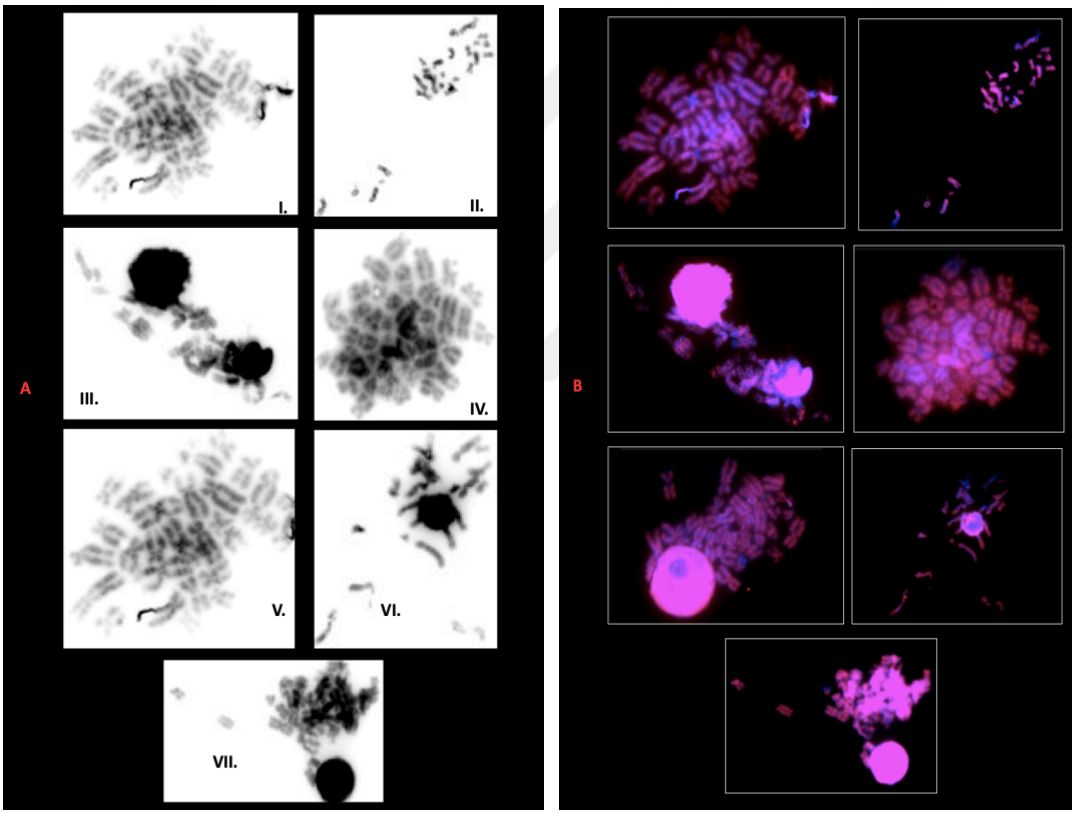
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir (Not: Bazı sahalarda üçlü filtre kullanıldığı için kırmızı sinyaller de(H3K27me3) görülmektedir).

4.1.2. Olgu-II (B.C.C.)

21 yaşındaki erkek gönüllüye ait G15145 No'lu kültürden elde edilen H3K27me3 ve H3K79me2 bulgularının görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

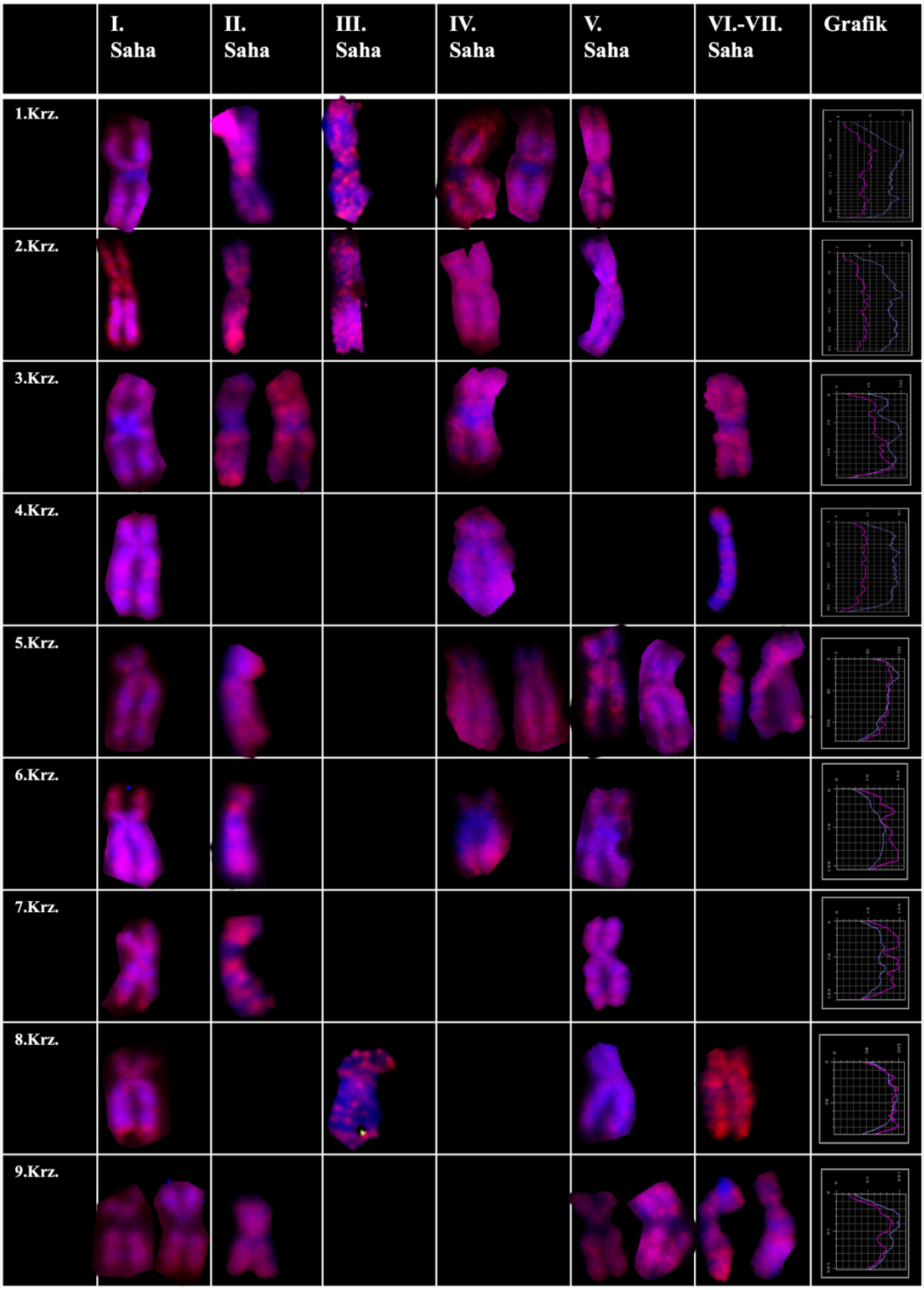
4.1.2.1. Olgu II Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları

Olgu II'den elde edilen metafaz sahalarından yedi tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.11**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.12** ve **Şekil 4.13**' te gösterilmiştir.

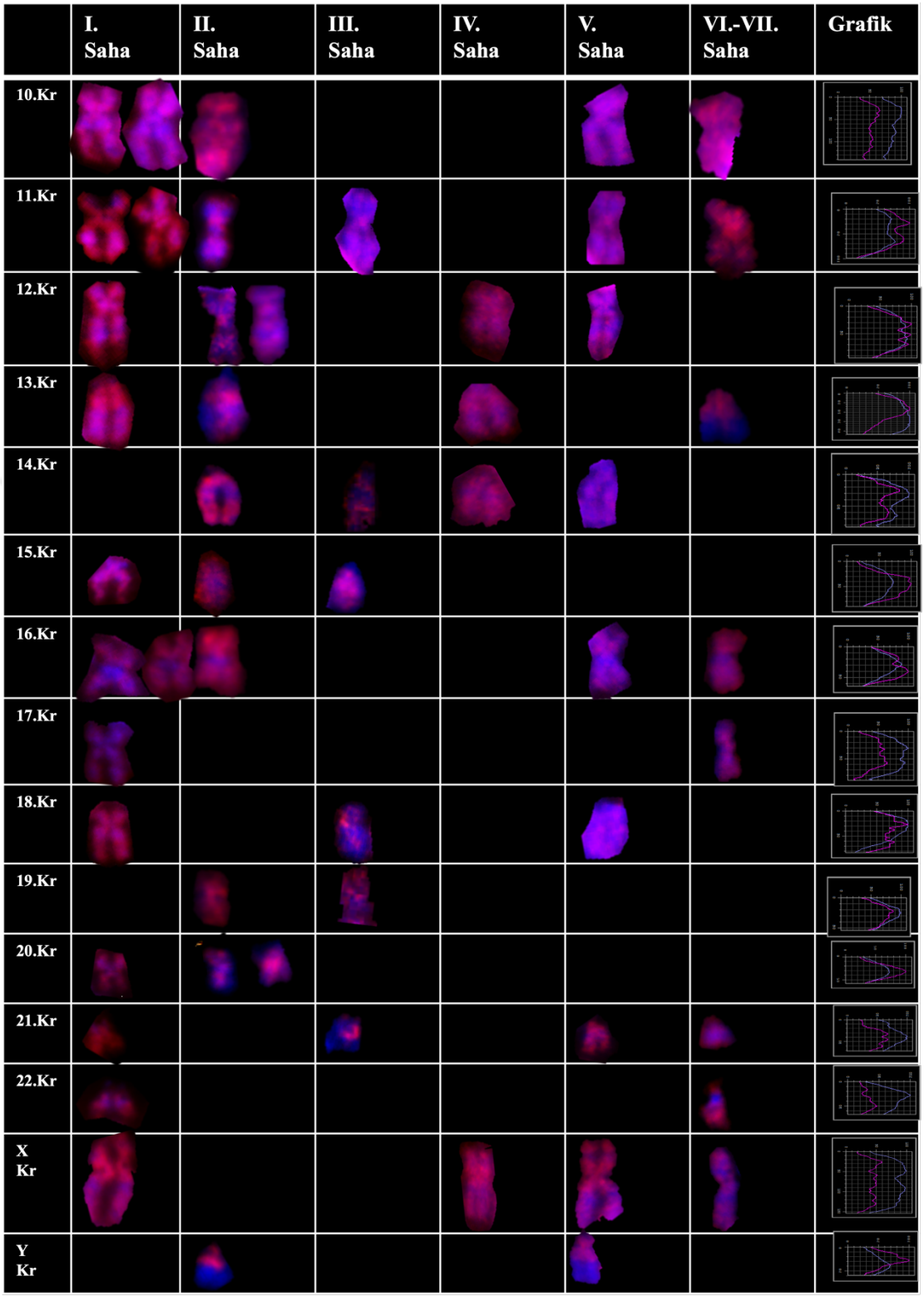


Şekil 4.11: Olgu II'den elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



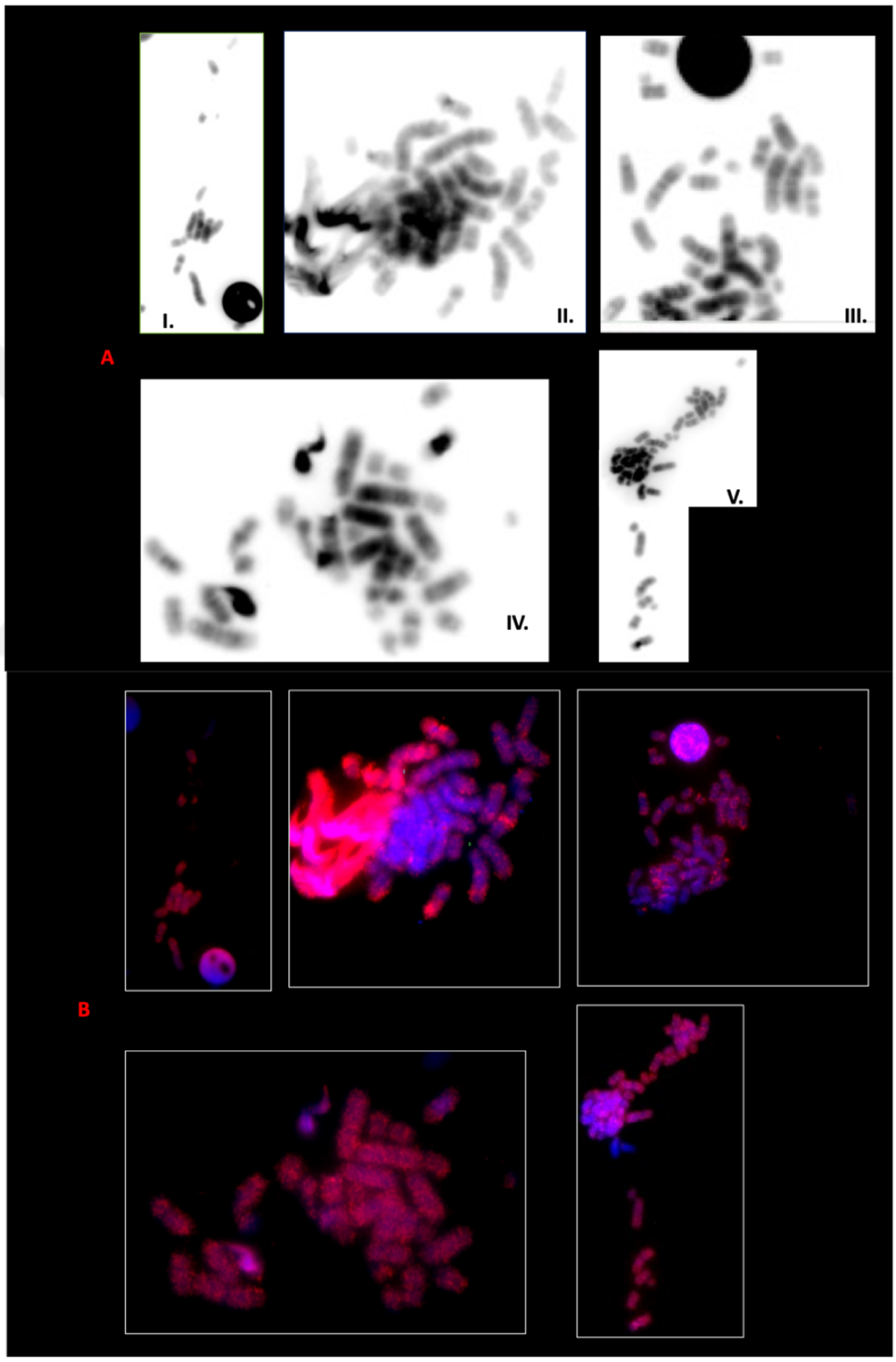
Şekil 4.12: Olgu II'nin yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.



Şekil 4.13: Olgu II'nin yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y kromozomuna kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

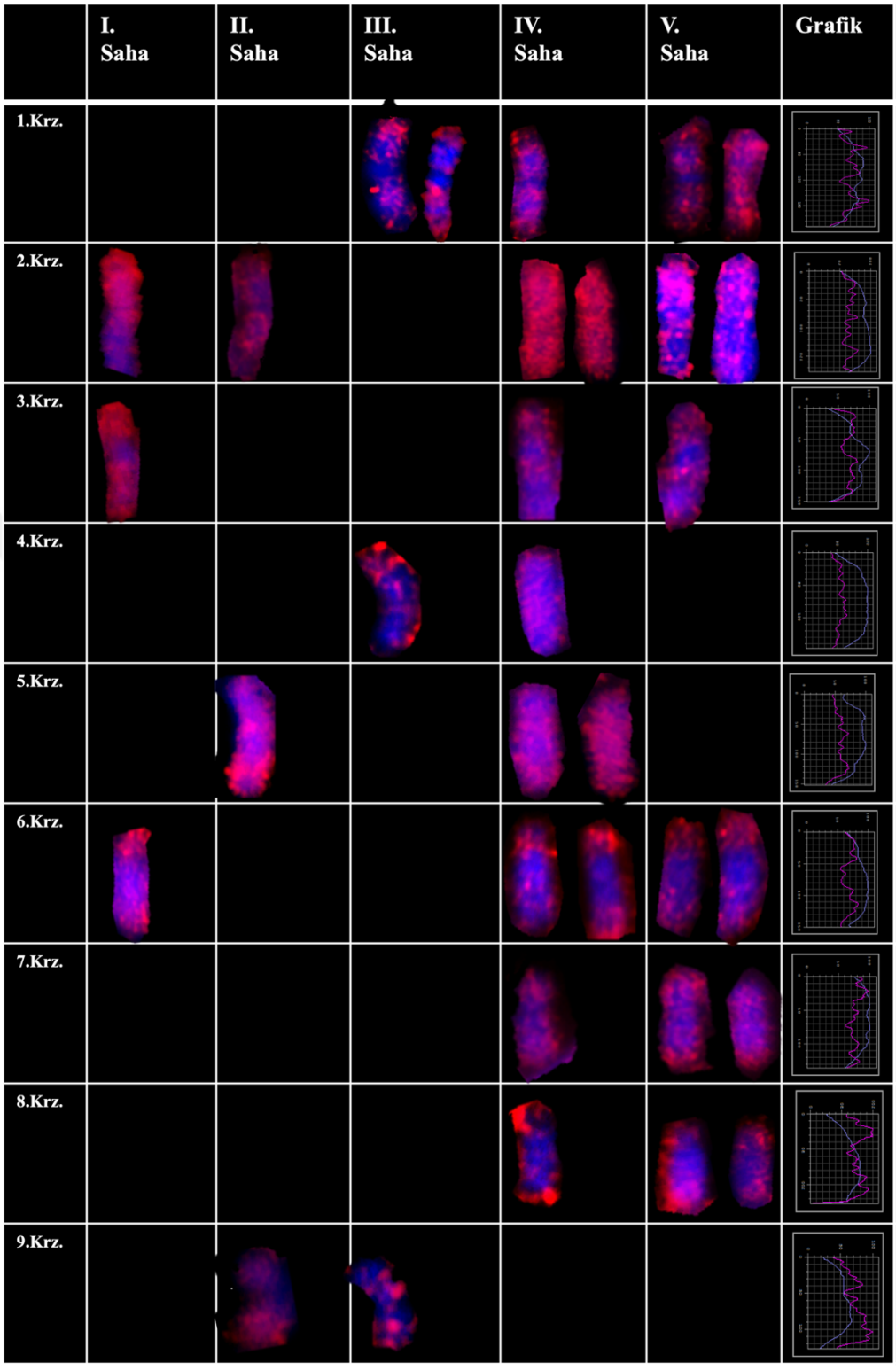
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu II'den PCC ile elde edilen interfaz sahalarından beş tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.14**). Bu sahalara ait bulgular Şekil **Şekil 4.15** ve **Şekil 4.16**'da gösterilmiştir.

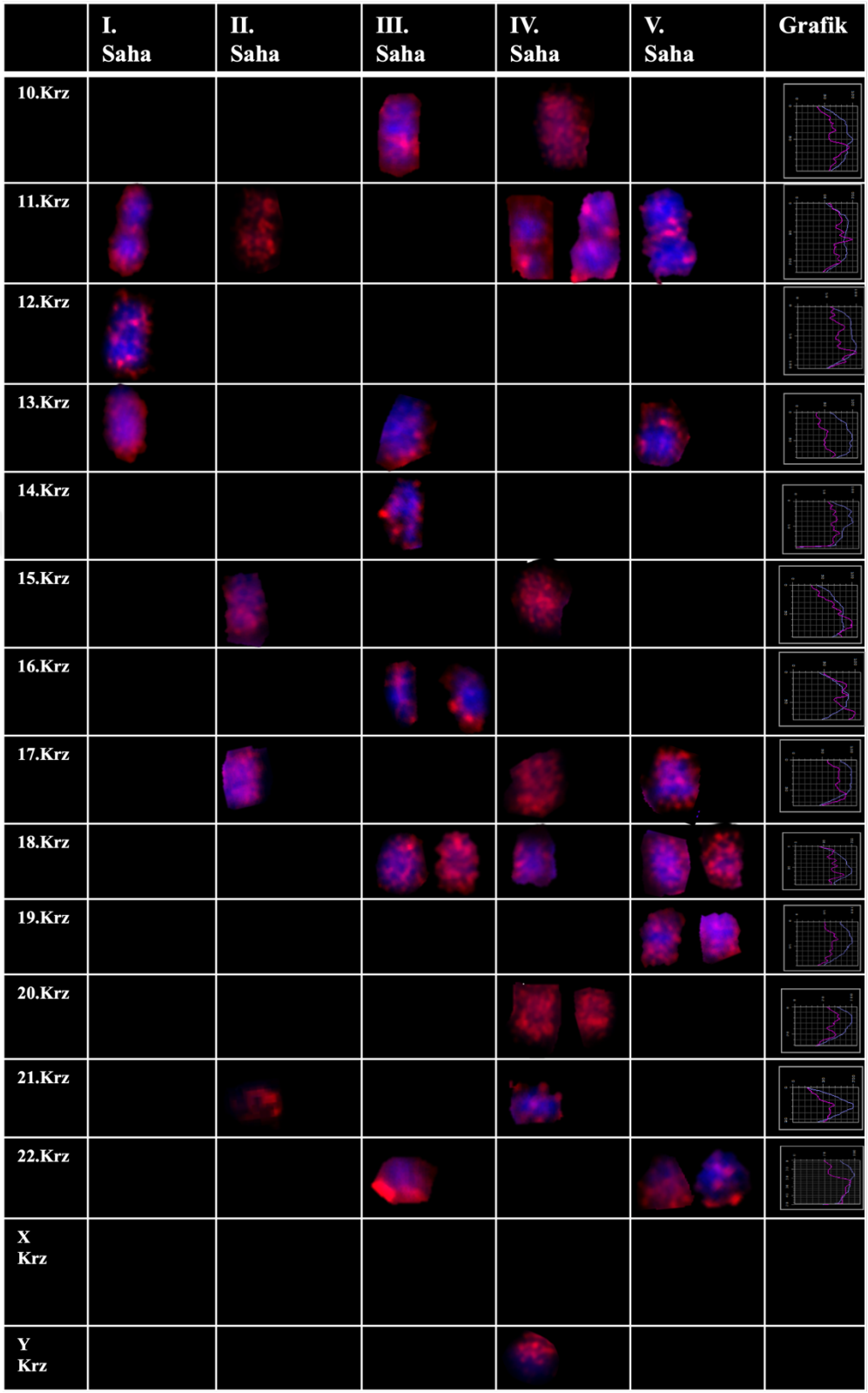


Şekil 4.14: Olgu II'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.15: Olgu II'in beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

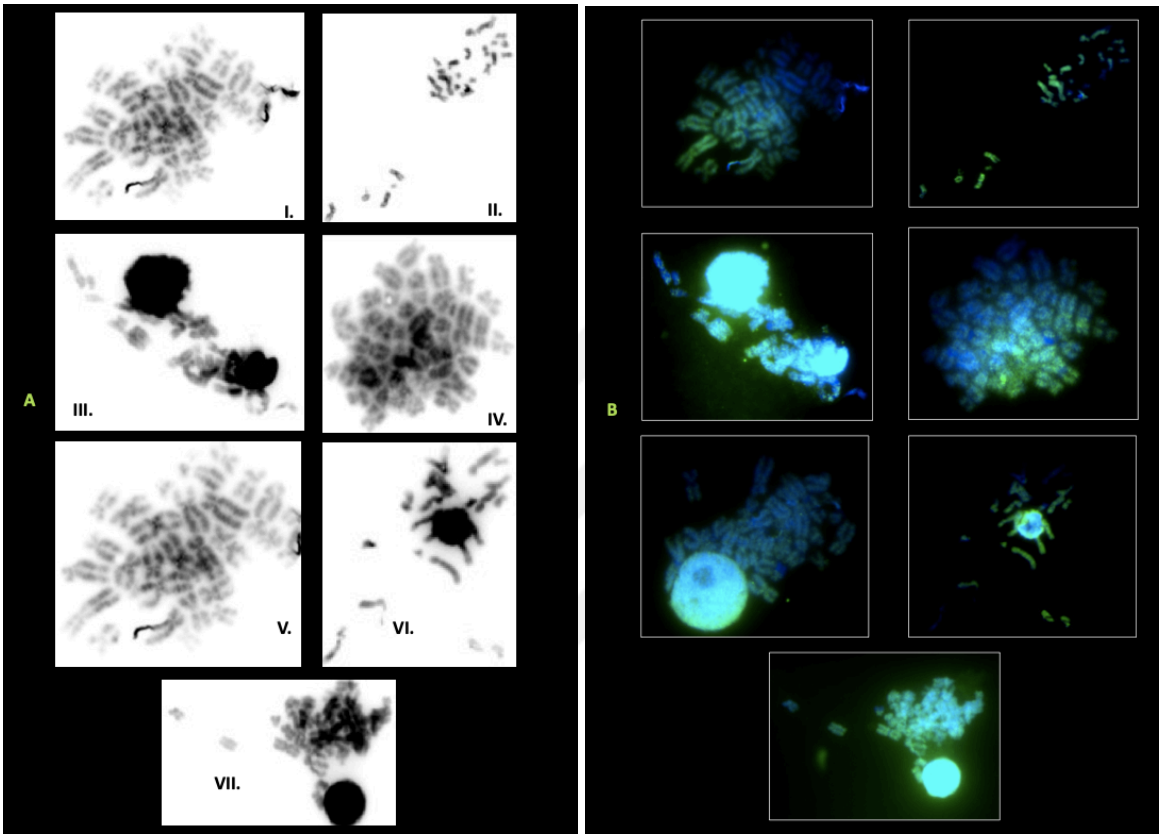


Şekil 4.16: Olgu II'in beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 ((10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

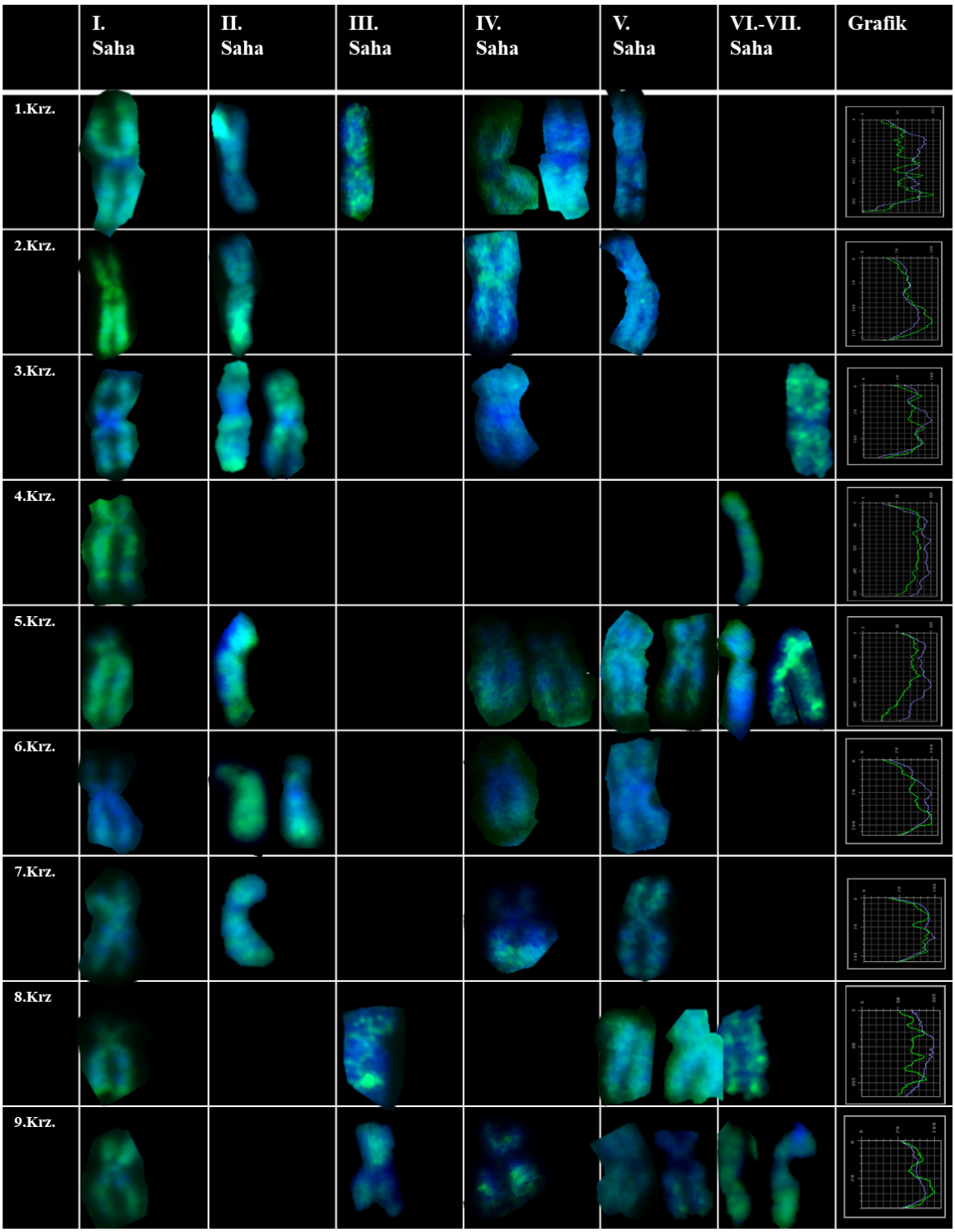
4.1.2.2. Olgu II Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları

Olgu II'den elde edilen metafaz sahalarından yedi tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.17**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.18** ve **Şekil 4.19**'da gösterilmiştir.

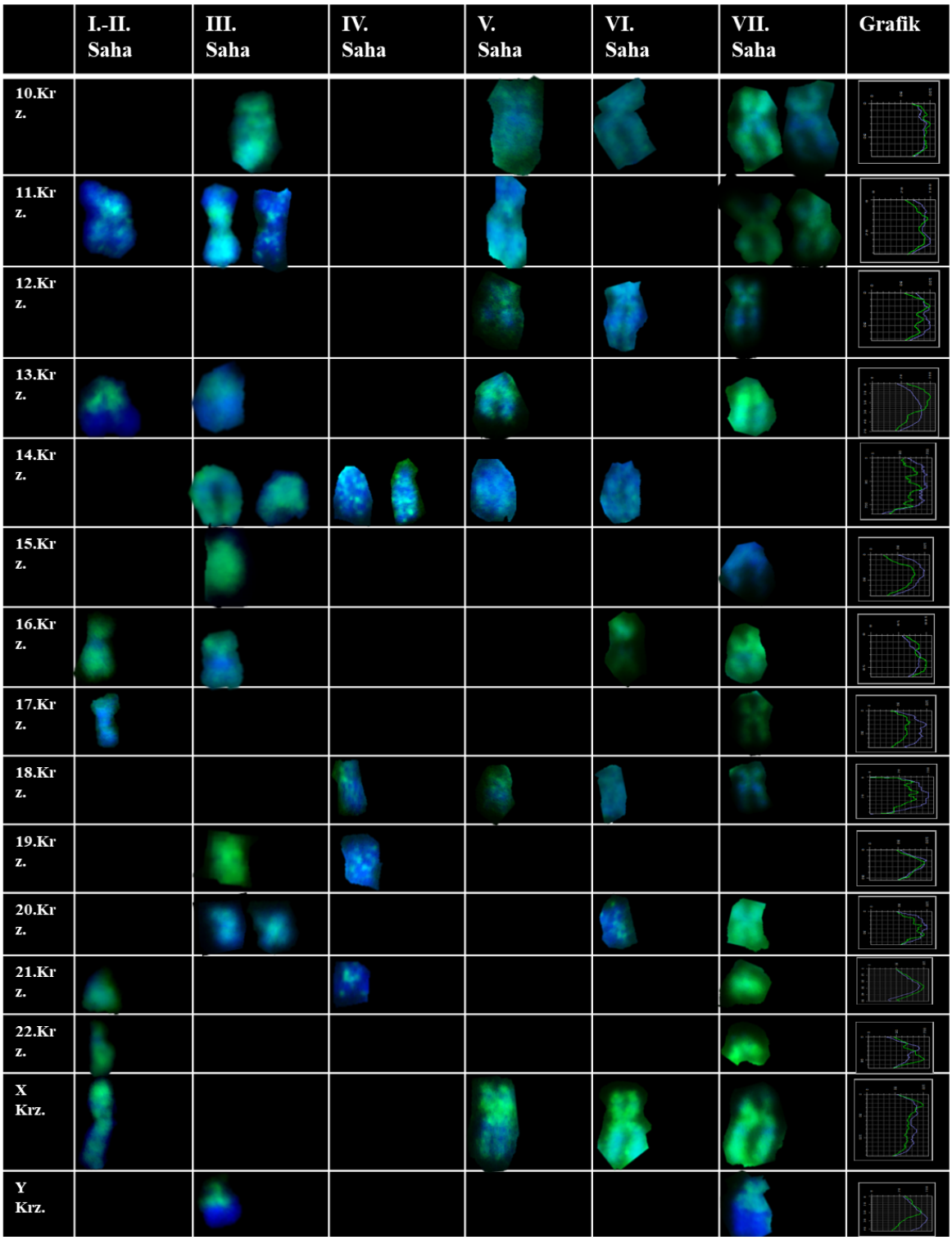


Şekil 4.17: Olgu II'in yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



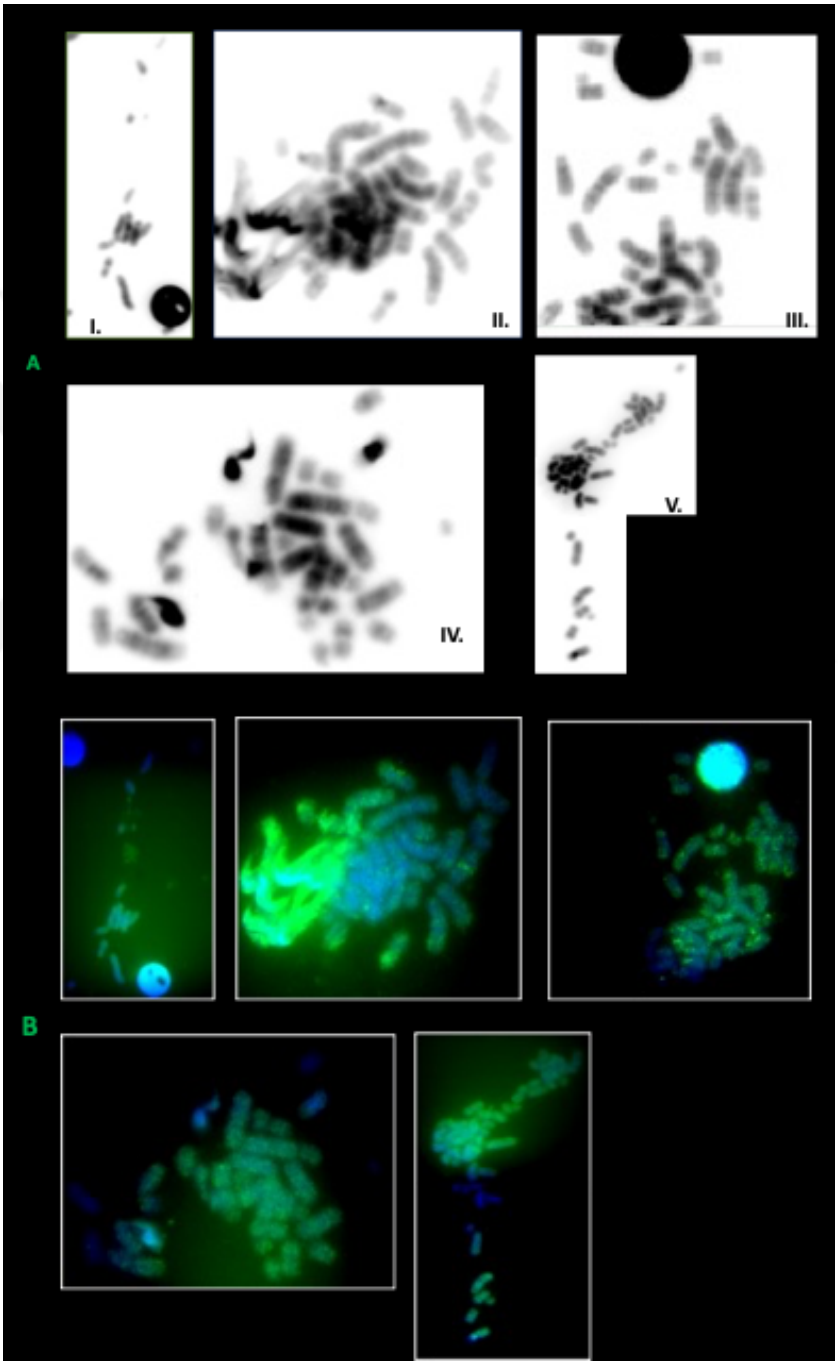
Şekil 4.18: Olgu II'in yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.



Şekil 4.19: Olgu II'in yedi sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'de kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

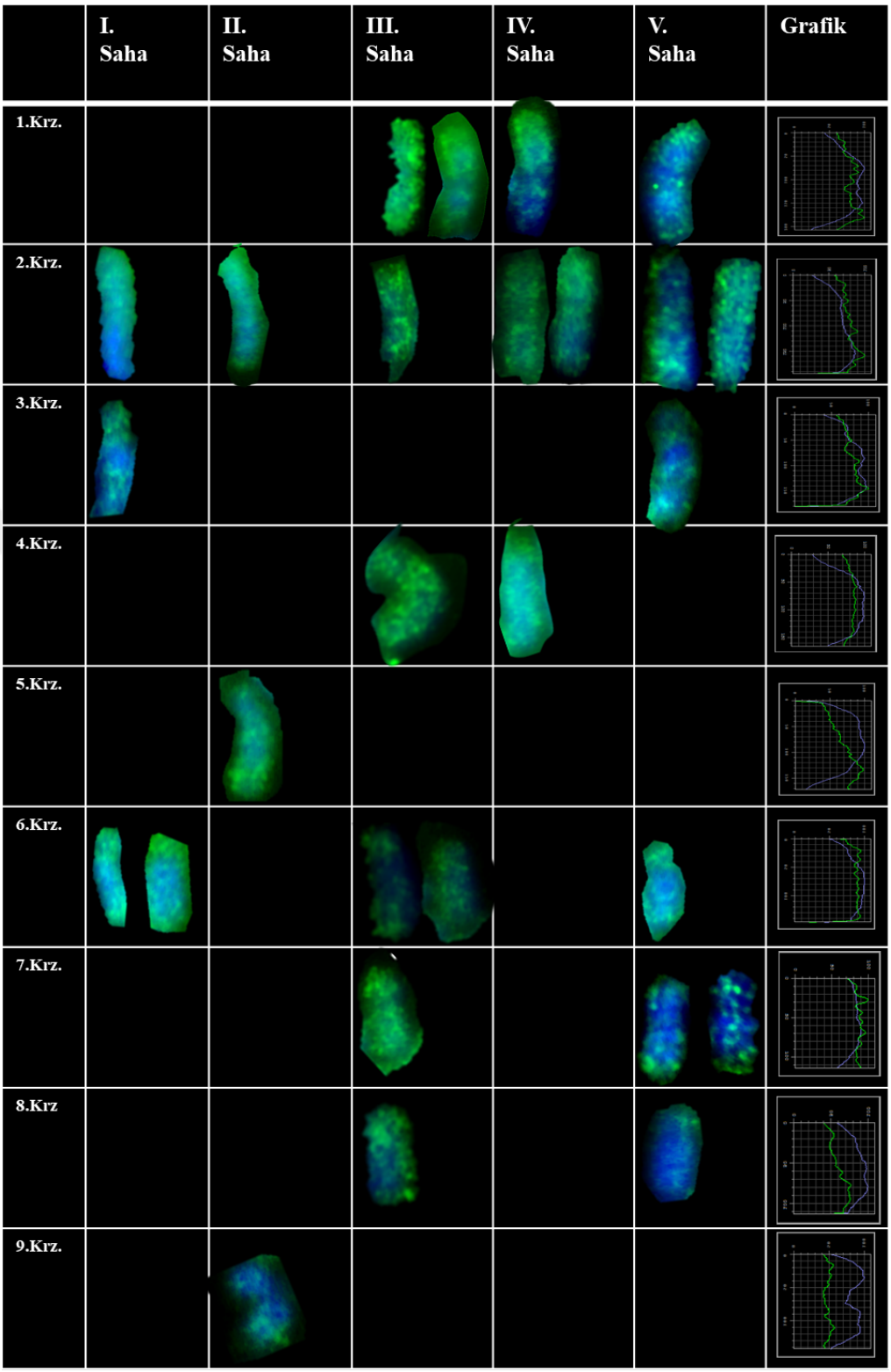
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu II'den PCC ile elde edilen interfaz sahalarından beş tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.20**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.21** ve **Şekil 4.22**'de gösterilmiştir.

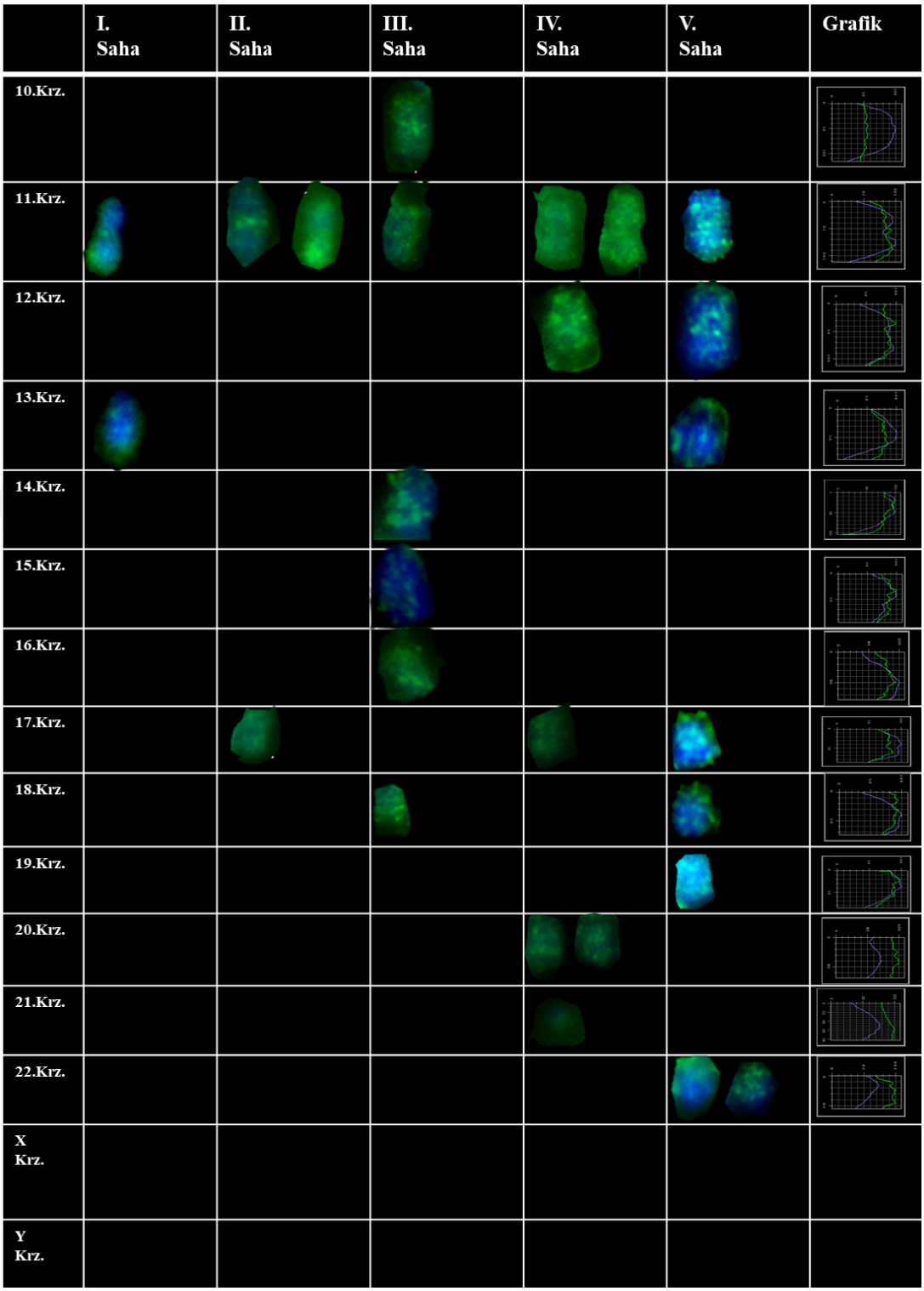


Şekil 4.20: Olgu II'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri**.**

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.21: Olgu II'in beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.



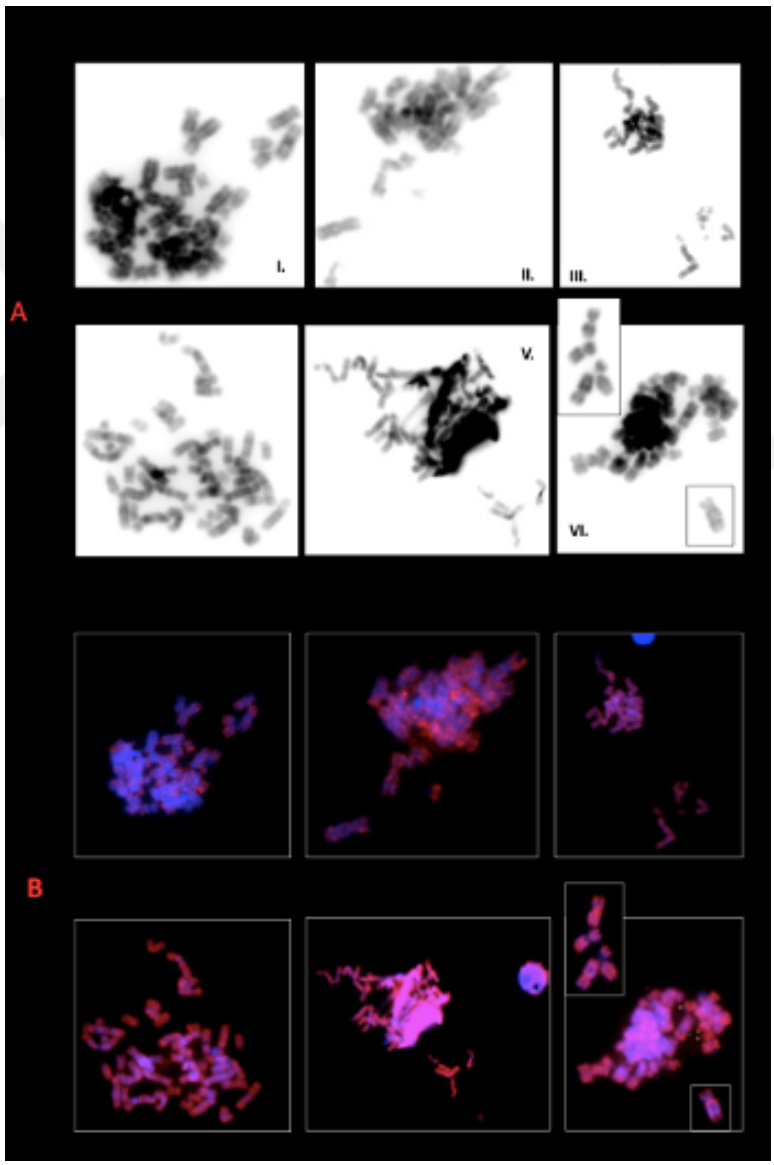
Şekil 4.22: Olgu II'in beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüler-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.3. Olgu-III (A.G.)

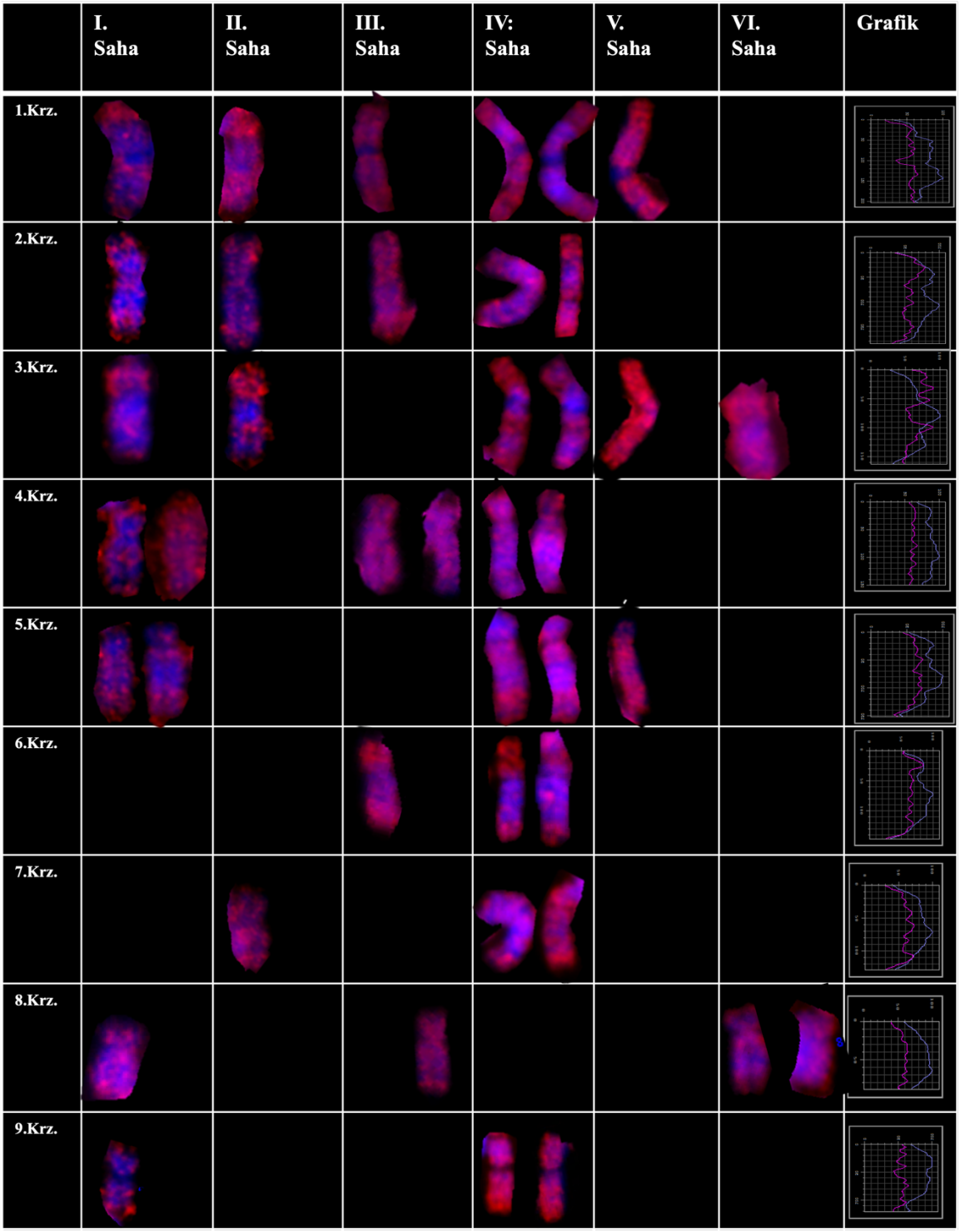
21 yaşındaki erkek gönüllüye ait G15150 No'lu kültürden elde edilen H3K27me3 ve H3K79me2 bulgularının görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

4.1.3.1. Olgu III Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları

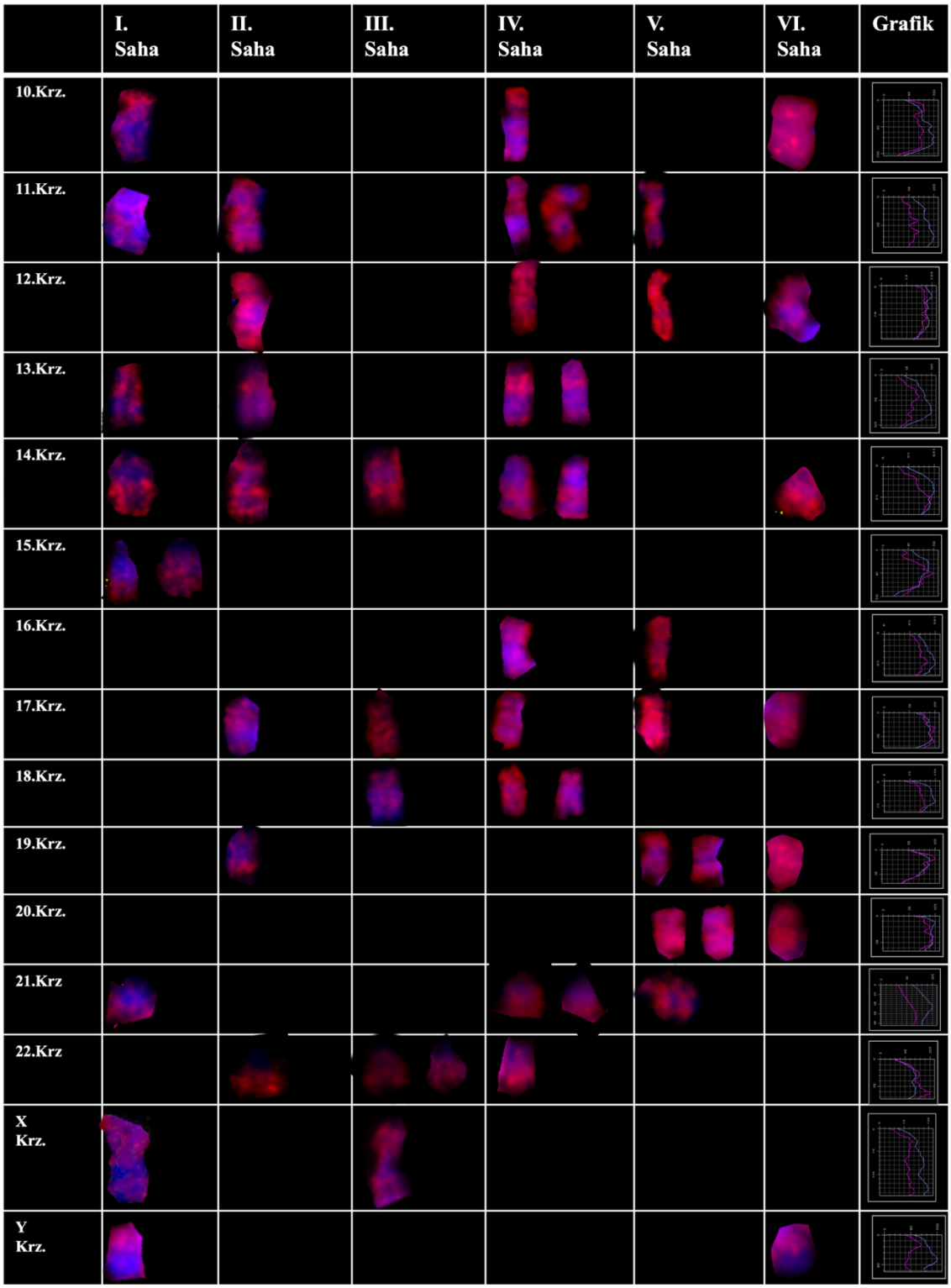
Olgu III'den elde edilen metafaz sahalarından altı tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.23**). Bu sahalara ait bulgular Şekil **Şekil 4.24** ve **Şekil 4.25**' te gösterilmiştir.



Şekil 4.23: Olgu III'den elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri.
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı Texas red ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



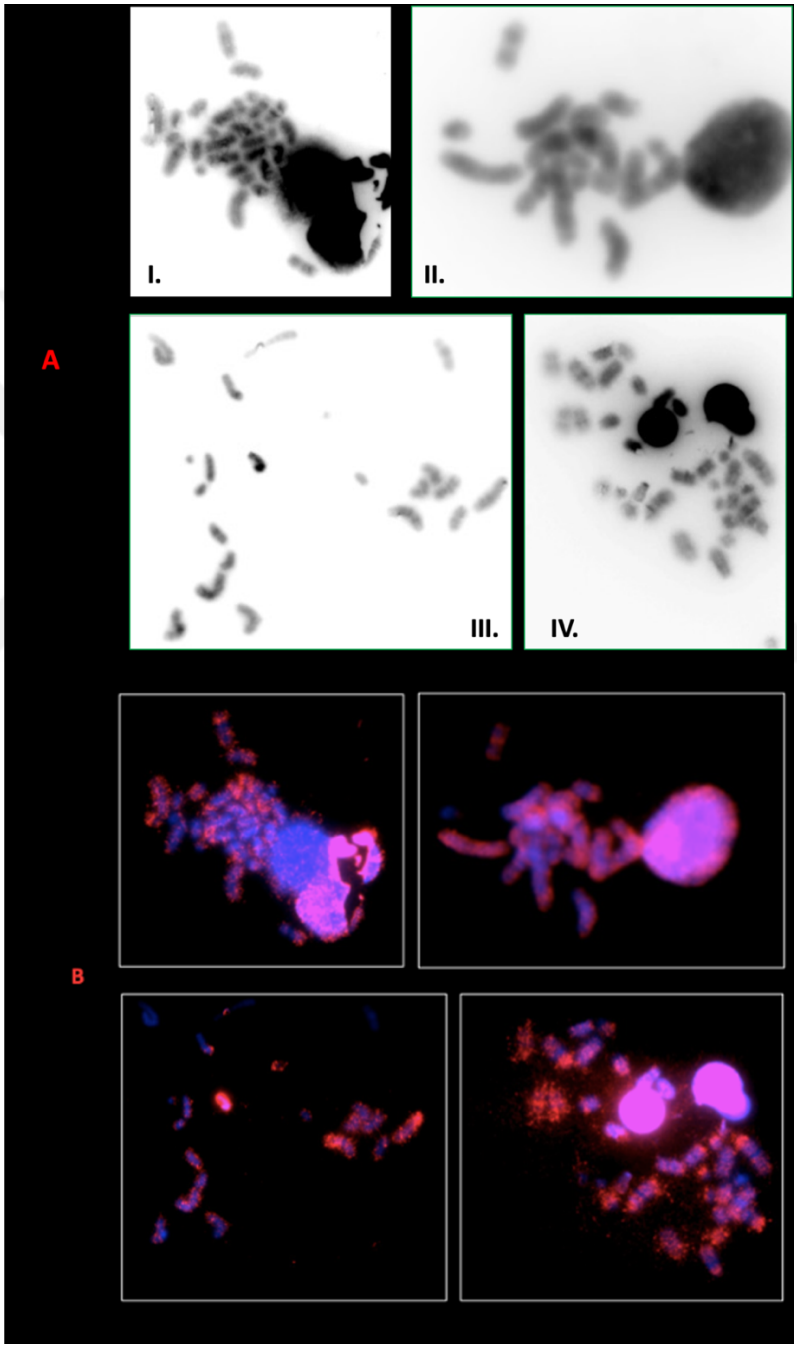
Şekil 4.24: Olgu III'ün altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir (VI. Saha: Üç sahanın toplamından oluşmaktadır).



Şekil 4.25: Olgu III'ün altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

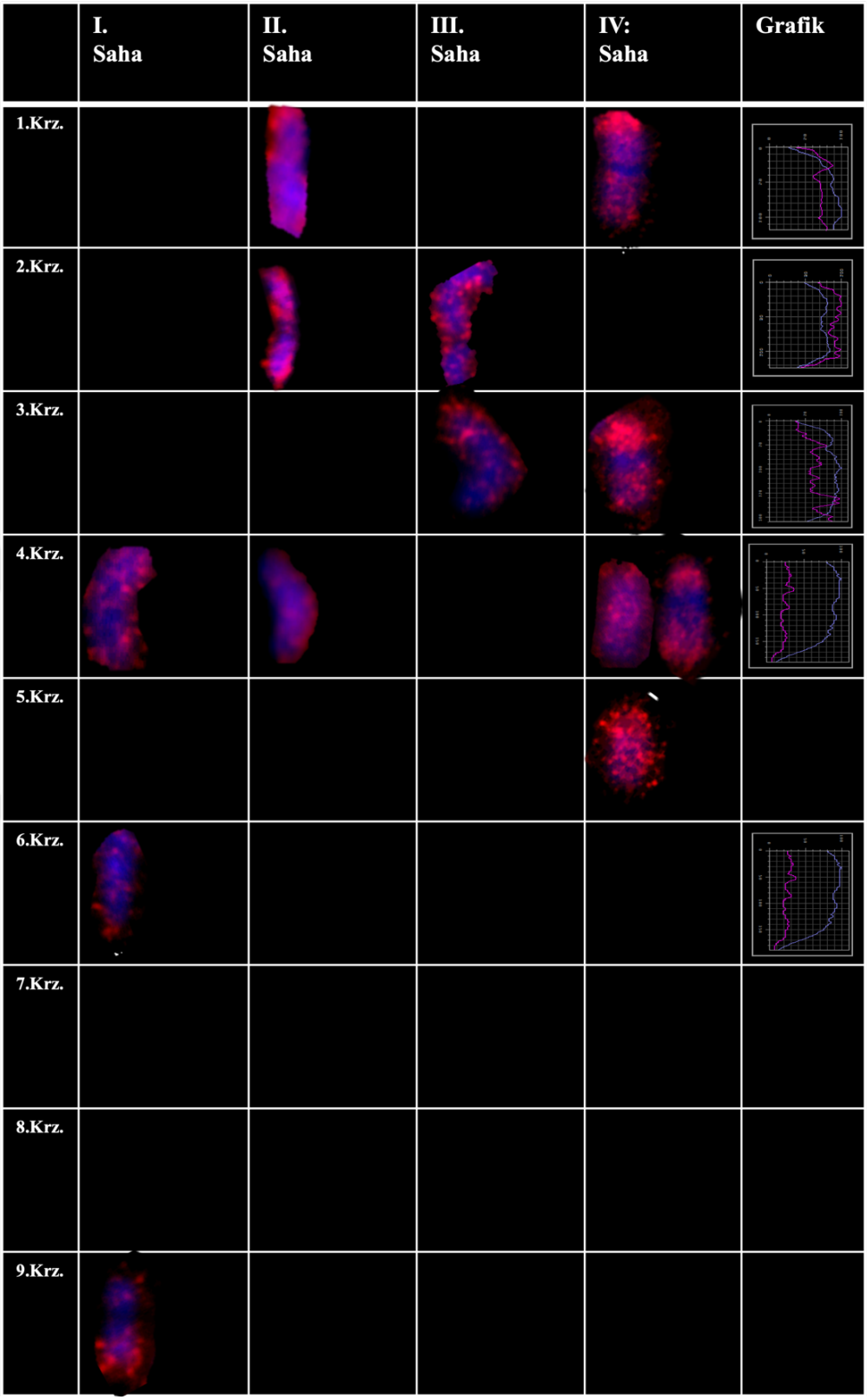
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu III'ten PCC ile elde edilen interfaz sahalarından dört tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.26**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.27** ve **Şekil 4.28**'te gösterilmiştir.

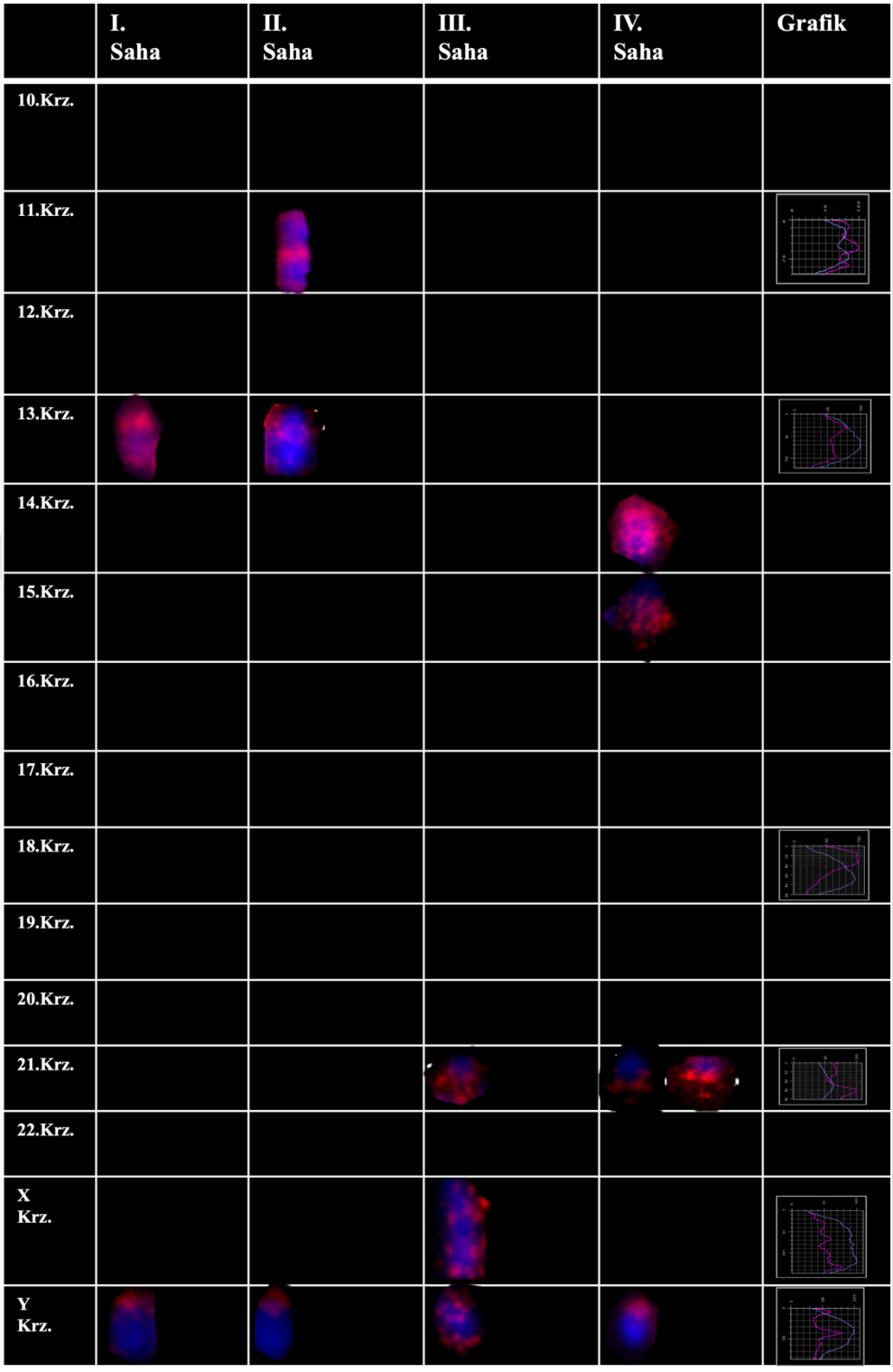


Şekil 4.26: Olgu III'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı Texas red ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.27: Olgu III'ün dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

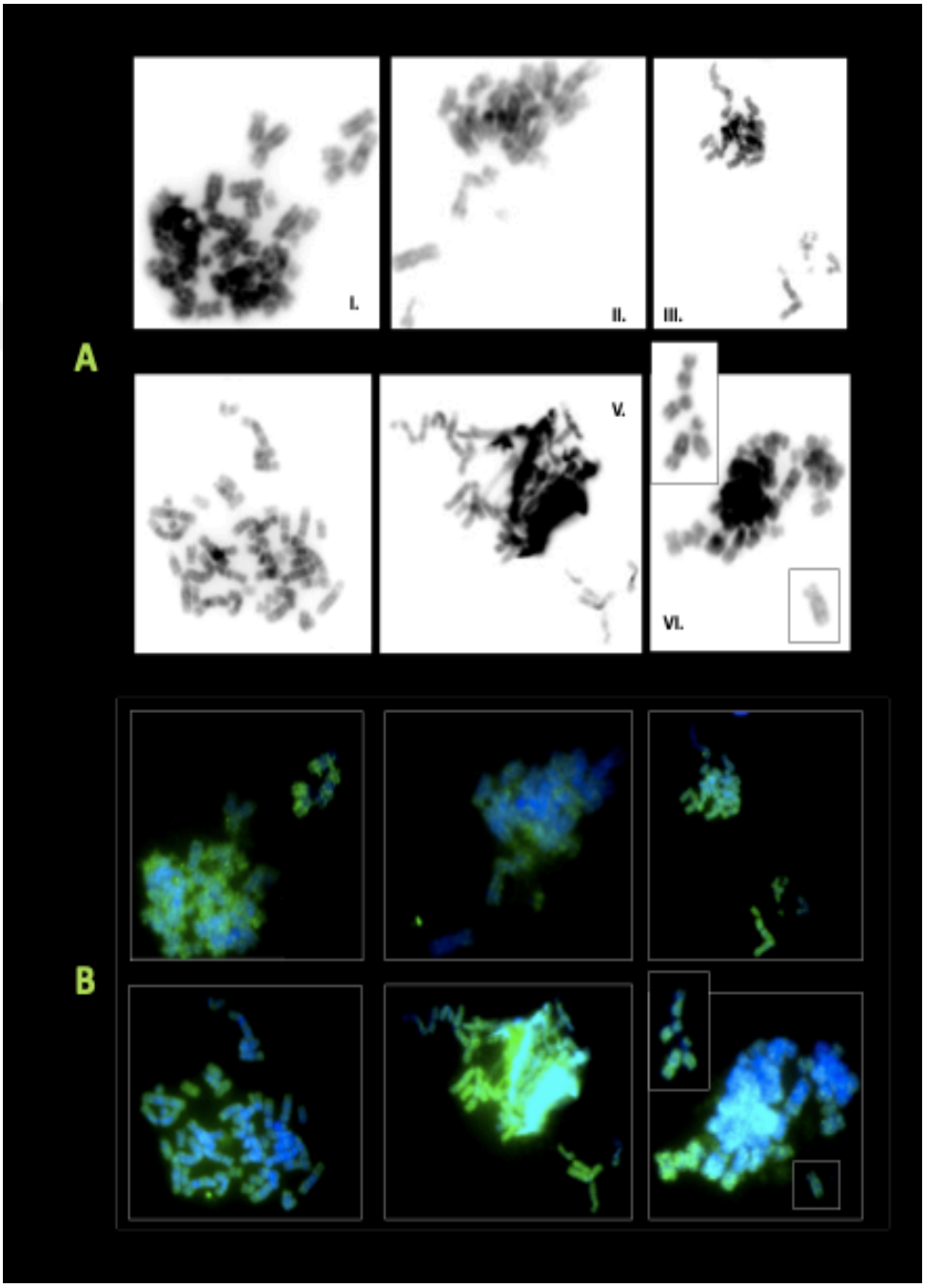


Şekil 4.28: Olgu III'ün dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

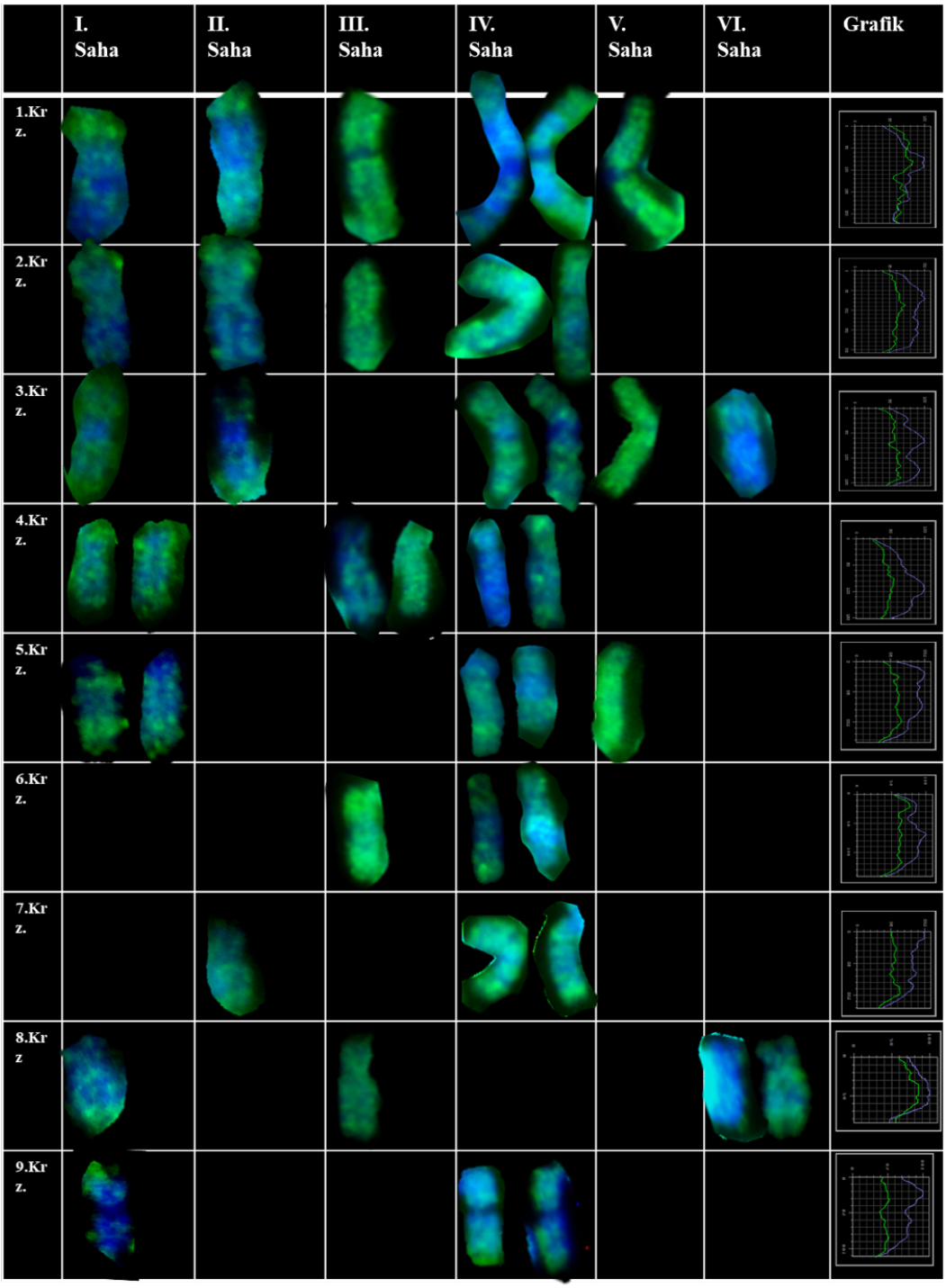
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.3.2. Olgu III Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları

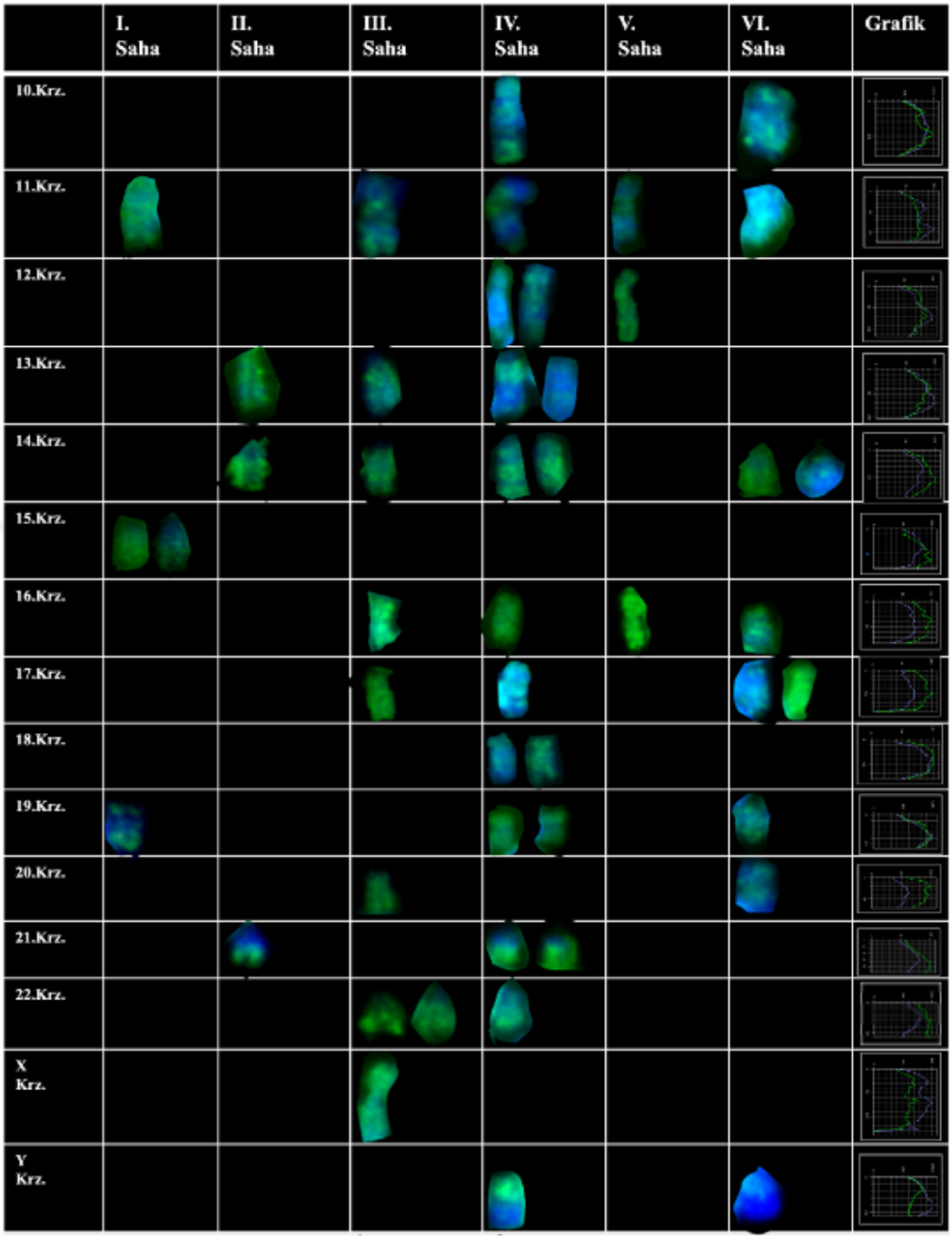
Olgu III'den elde edilen metafaz sahalarından altı tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.29**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.30** ve **Şekil 4.31**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.29: Olgu III'ten elde edilen metafaz kromozomlarında H3K79me2 immünfloresan görüntüleri.
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.

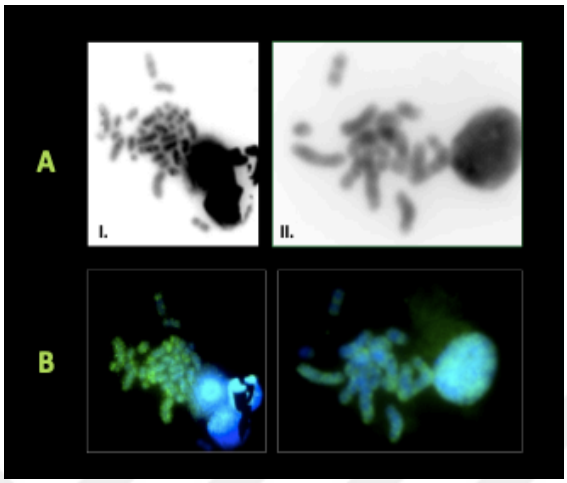


Şekil 4.30: Olgu III'ün altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir).
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

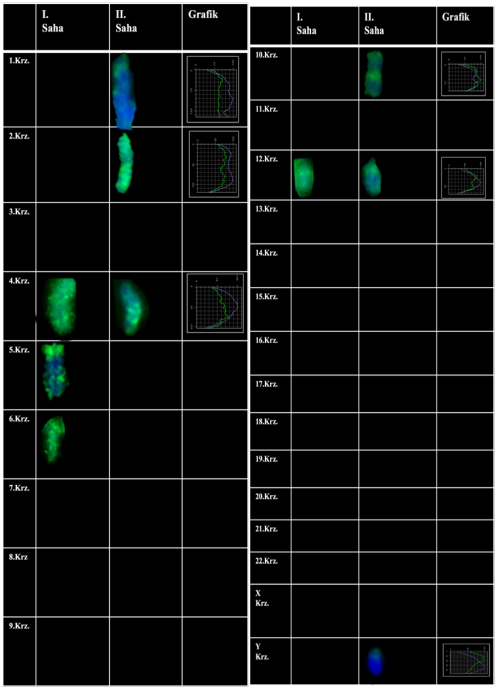


Şekil 4.31: Olgu III'ün altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir).
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu III'ten PCC ile elde edilen interfaz sahalarından yalnızca iki tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.32**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.33**'te gösterilmiştir.



Şekil 4.32: Olgu III'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



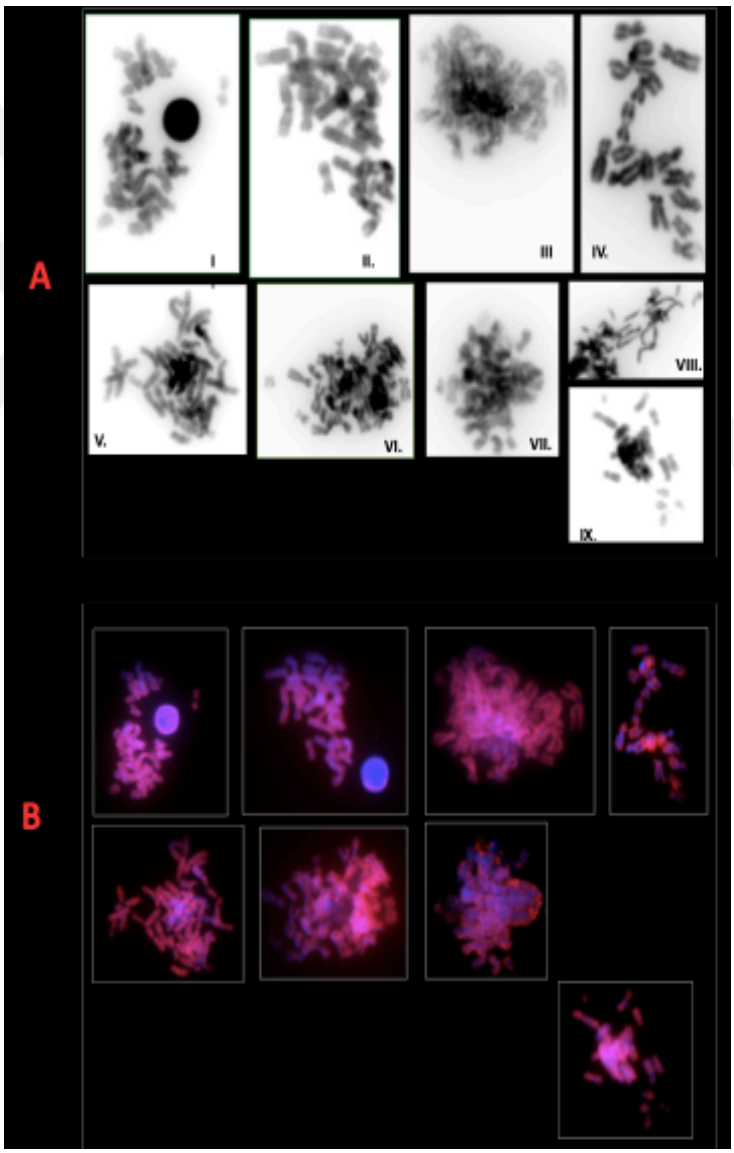
Şekil 4.33: Olgu III'in iki sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.4. Olgu IV (Y.T.A.)

58 yaşındaki kadın gönüllüye ait G15151 No'lu kültürden elde edilen H3K27me3 ve H3K79me2 bulgularının görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

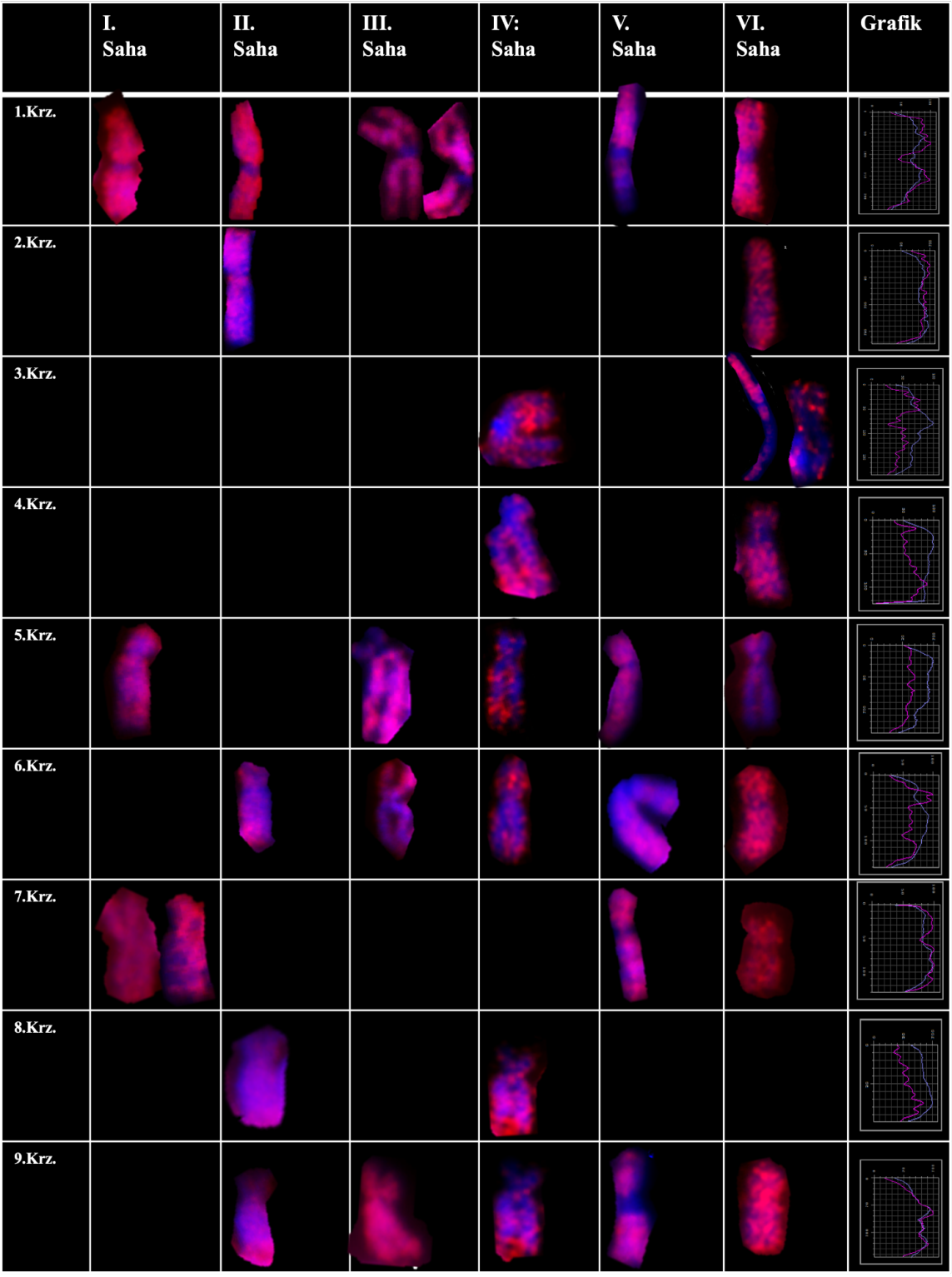
4.1.4.1. Olgu IV Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları

Olgu IV'ten elde edilen metafaz sahalarından dokuz tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.34**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.35** ve **Şekil 4.36**'da gösterilmiştir.



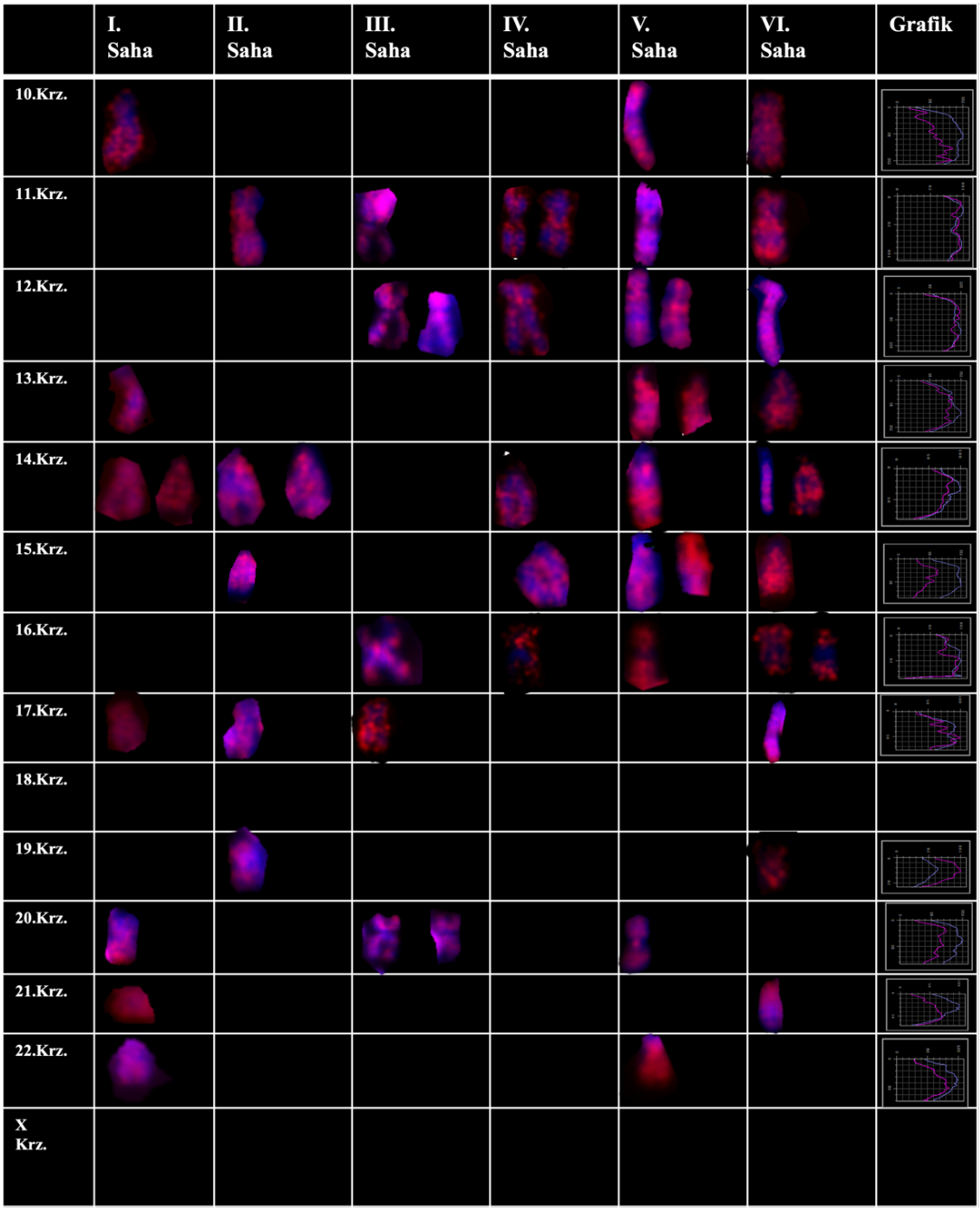
Şekil 4.34: Olgu IV'ten elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.35: Olgu IV'ün dokuz sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir).

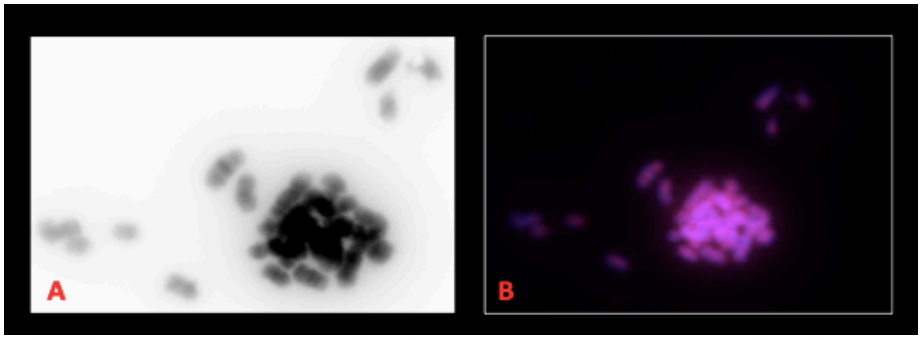
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir. VI. Saha, VI-VII-VIII-IX. Sahadaki kromozomlardan oluşturulmuştur.



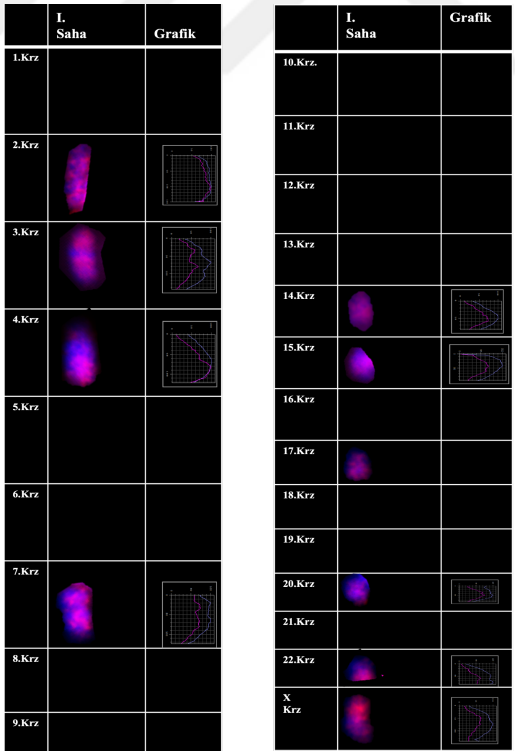
Şekil 4.36: Olgu IV'ün dokuz sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir).

Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir. VI. Saha, VI-VII-VIII-IX. Sahadaki kromozomlardan oluşturulmuştur.

Olgu IV'ten PCC ile elde edilen interfaz sahalarından bir tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.37**). Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.38** gösterilmiştir**.**



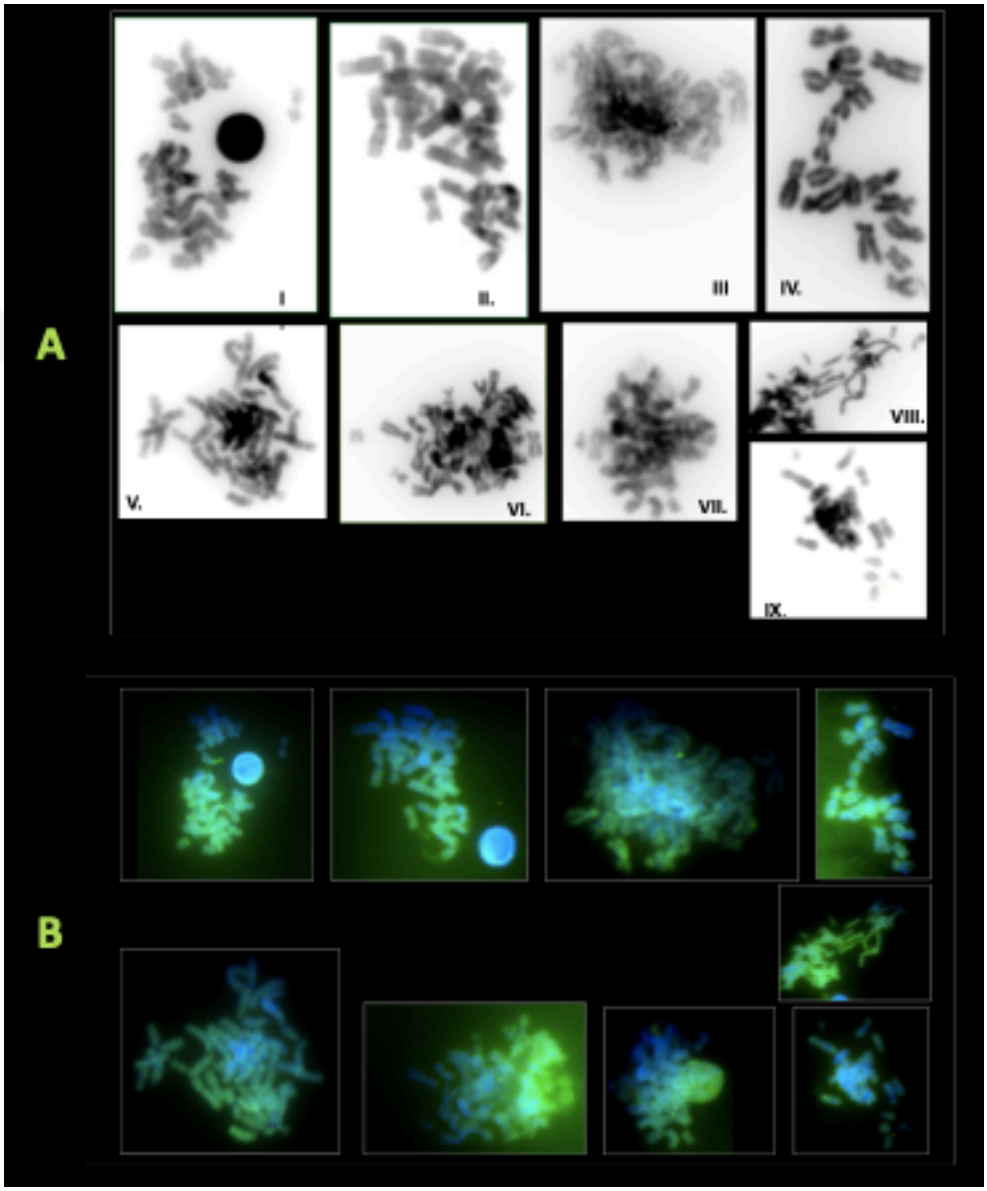
Şekil 4.37: Olgu IV'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri.
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



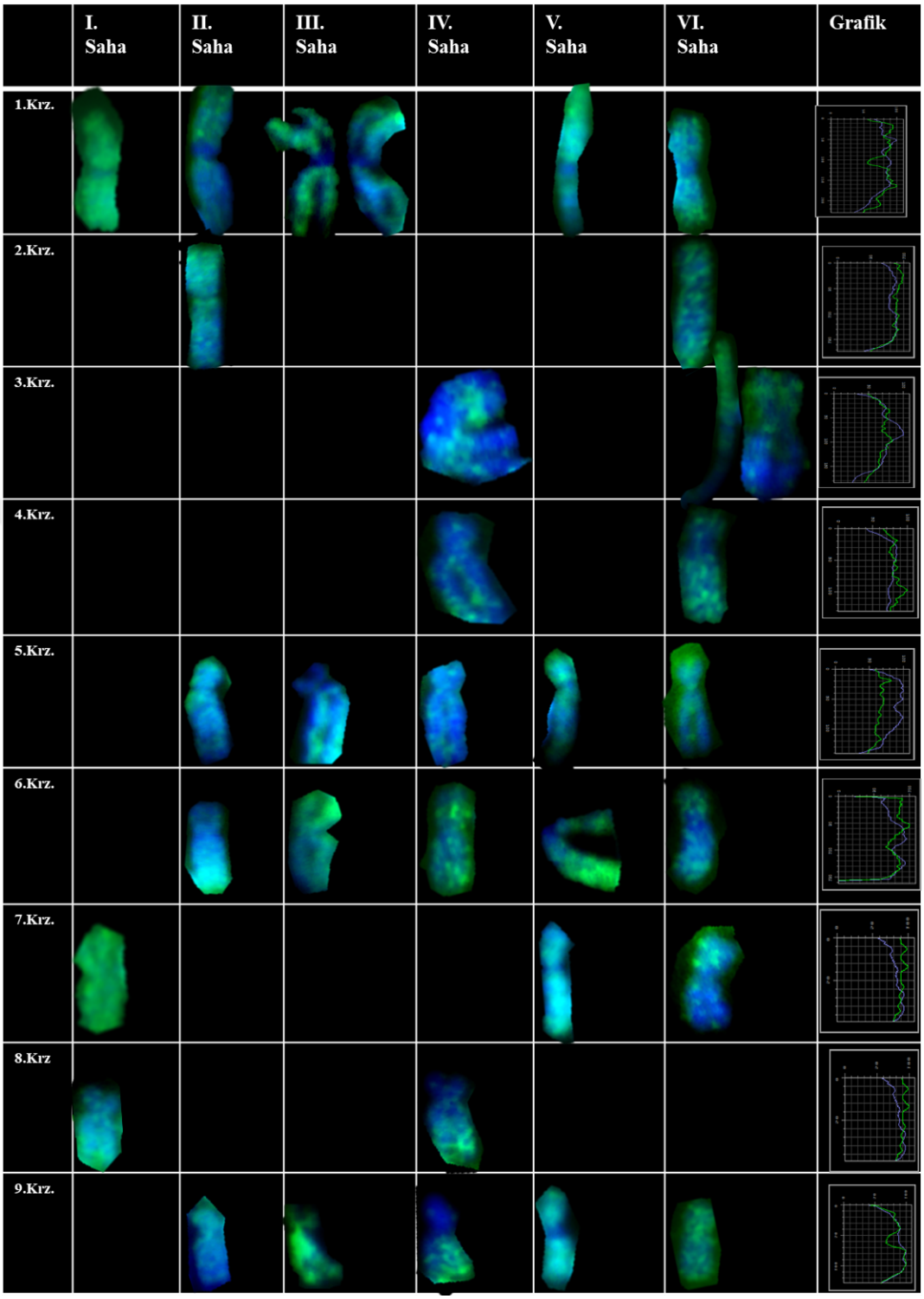
Şekil 4.38: Olgu IV'ün bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.4.2. Olgu IV Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları

Olgu IV'den elde edilen metafaz sahalarından dokuz tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.39).** Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.40** ve **Şekil 4.41**'de gösterilmiştir.

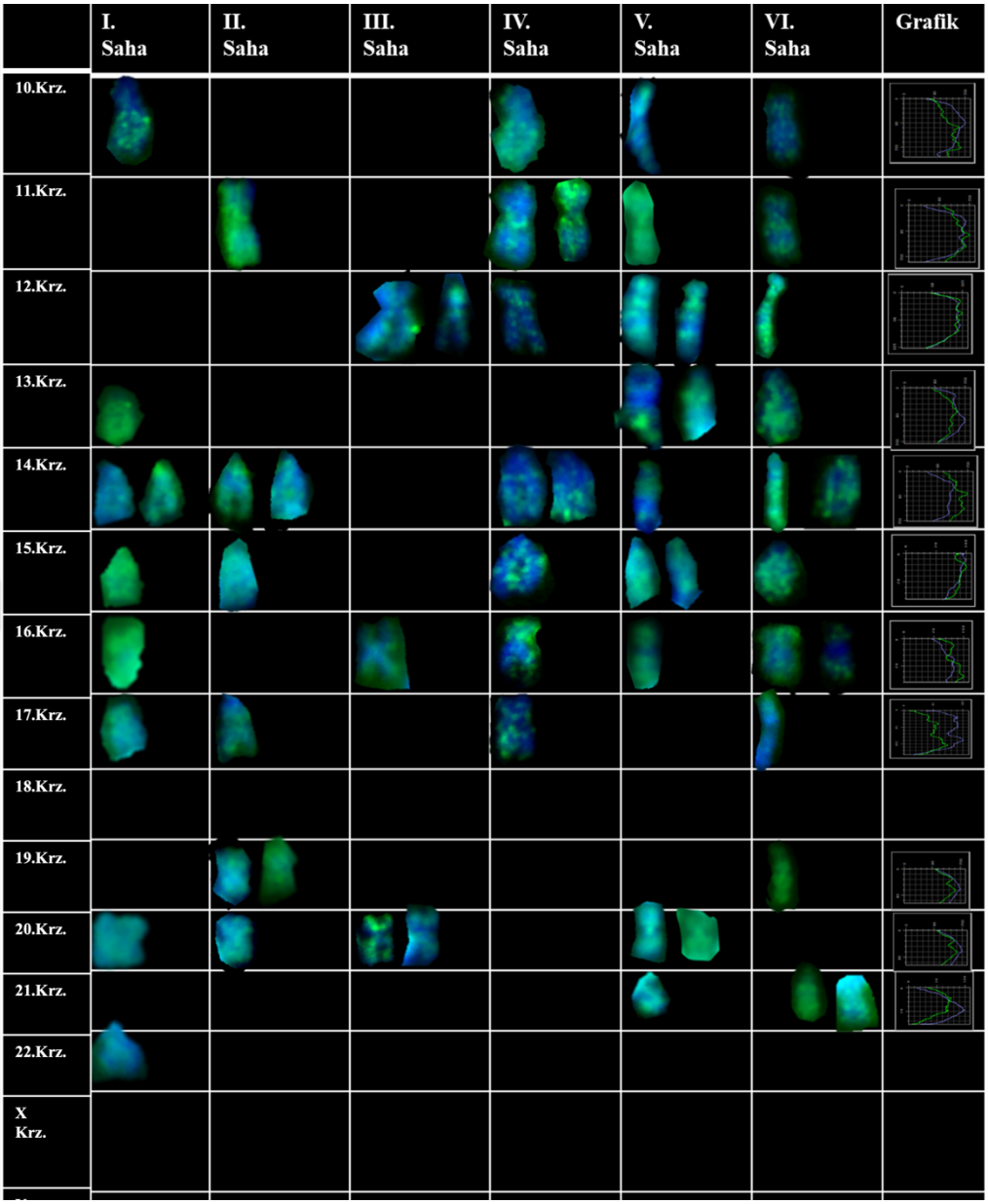


Şekil 4.39: Olgu IV'ten elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri.
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



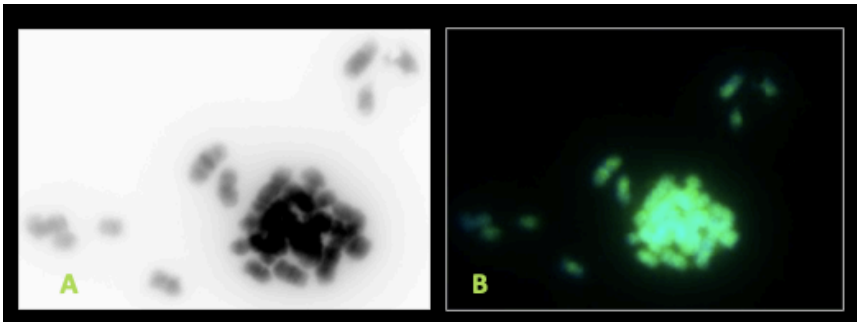
Şekil 4.40: Olgu IV'ün dokuz sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir)

Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir. VI. Saha, VI-VII-VIII-IX. Sahadaki kromozomlardan oluşturulmuştur. Not: 1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.

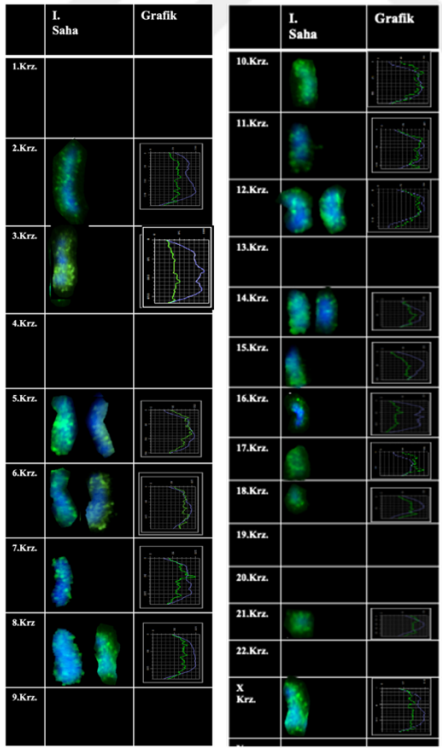


Şekil 4.41: Olgu IV'ün dokuz sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X 'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir).
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir. VI. Saha, VI-VII-VIII-IX. Sahadaki kromozomlardan oluşturulmuştur.

Olgu IV'ten PCC ile elde edilen interfaz sahalarından bir tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.42**). Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.43**'te gösterilmiştir.



Şekil 4.42: Olgu IV'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



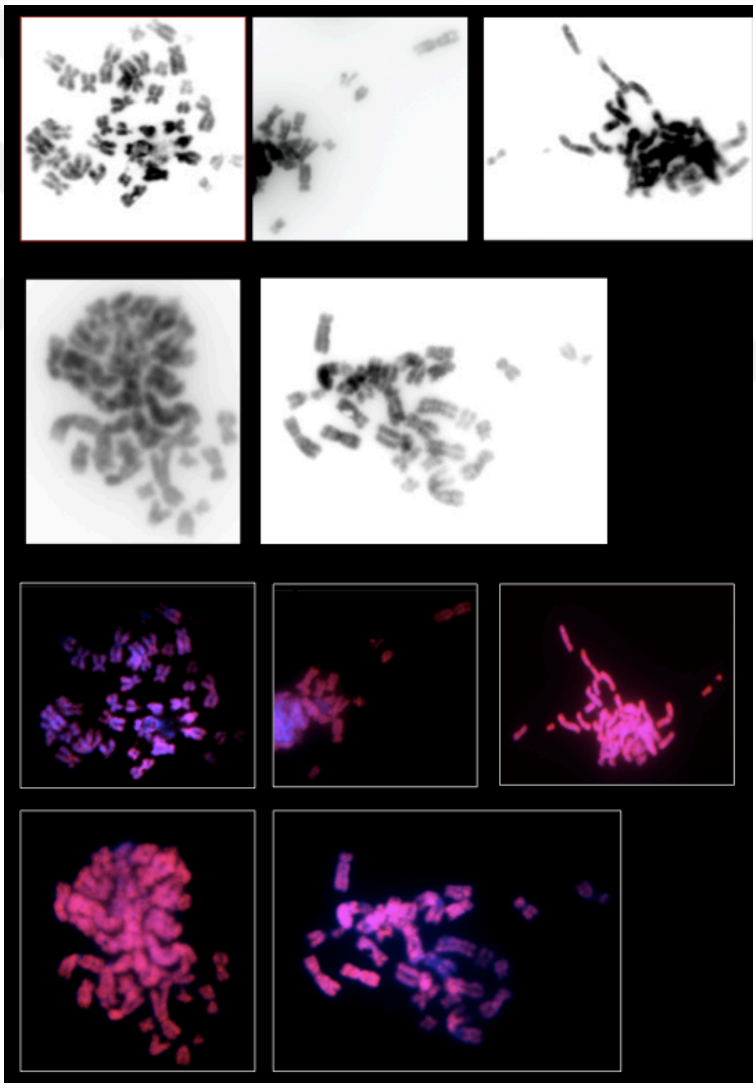
Şekil 4.43: Olgu IV'ün bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den X 'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.5. Olgu- V (Y.M.)

26 yaşındaki kadın gönüllüye ait G15152 No'lu kültürden elde edilen H3K27me3 ve H3K79me2 bulgularının görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

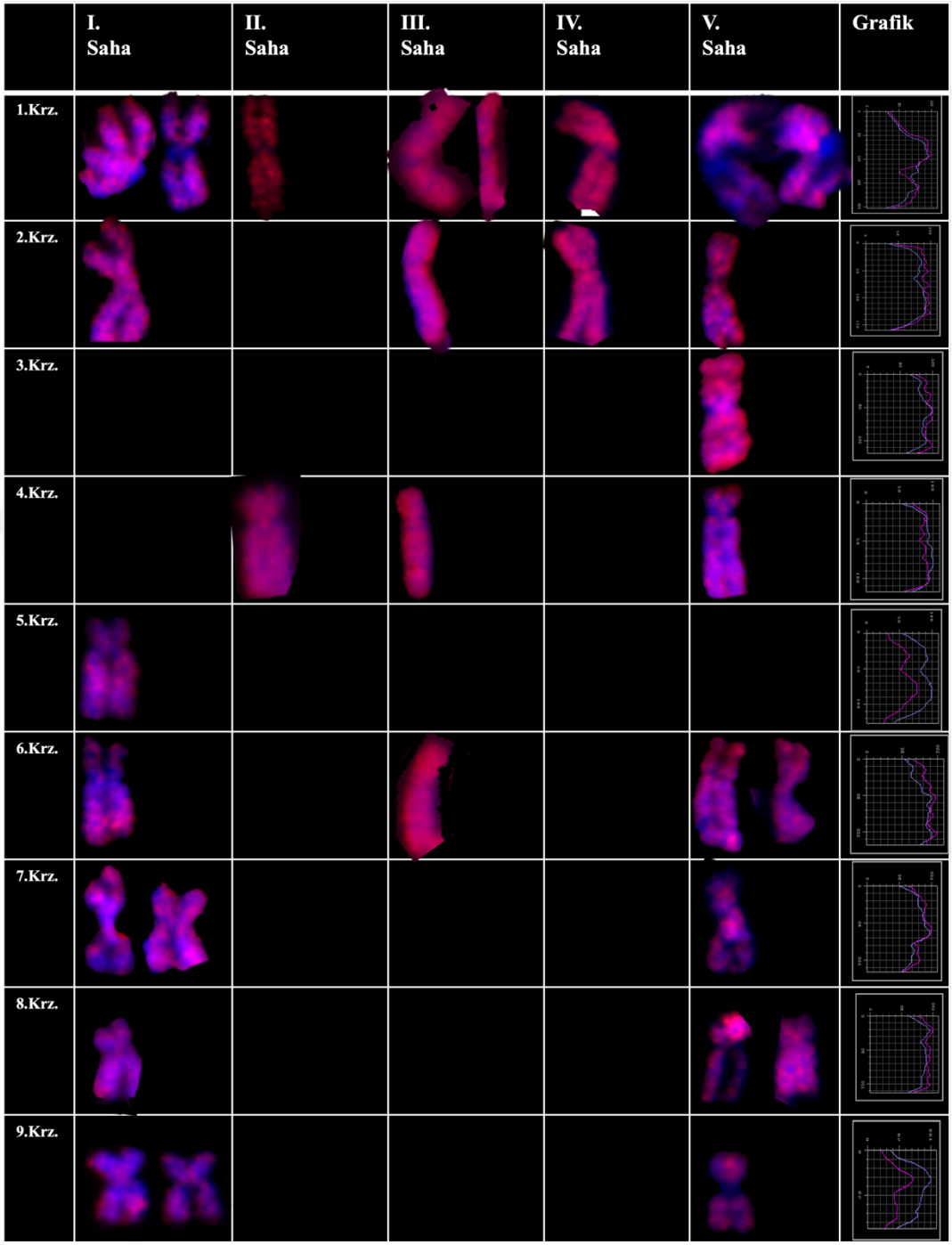
4.1.5.1. Olgu V Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları

Olgu V'ten elde edilen metafaz sahalarından beş tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.44**). Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.45** ve **Şekil 4.46** gösterilmiştir.



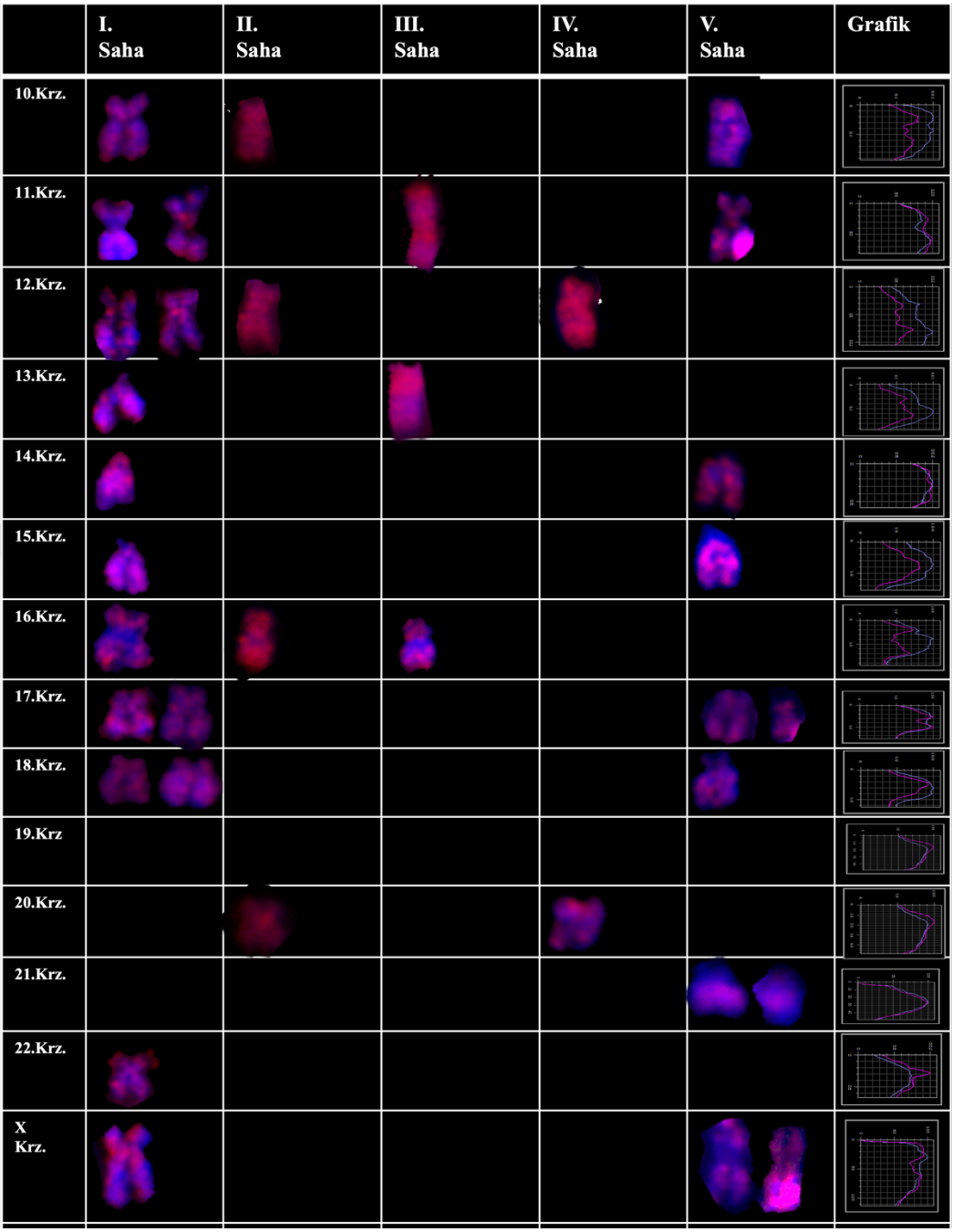
Şekil 4.44: Olgu V'ten elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.45: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1' den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir)

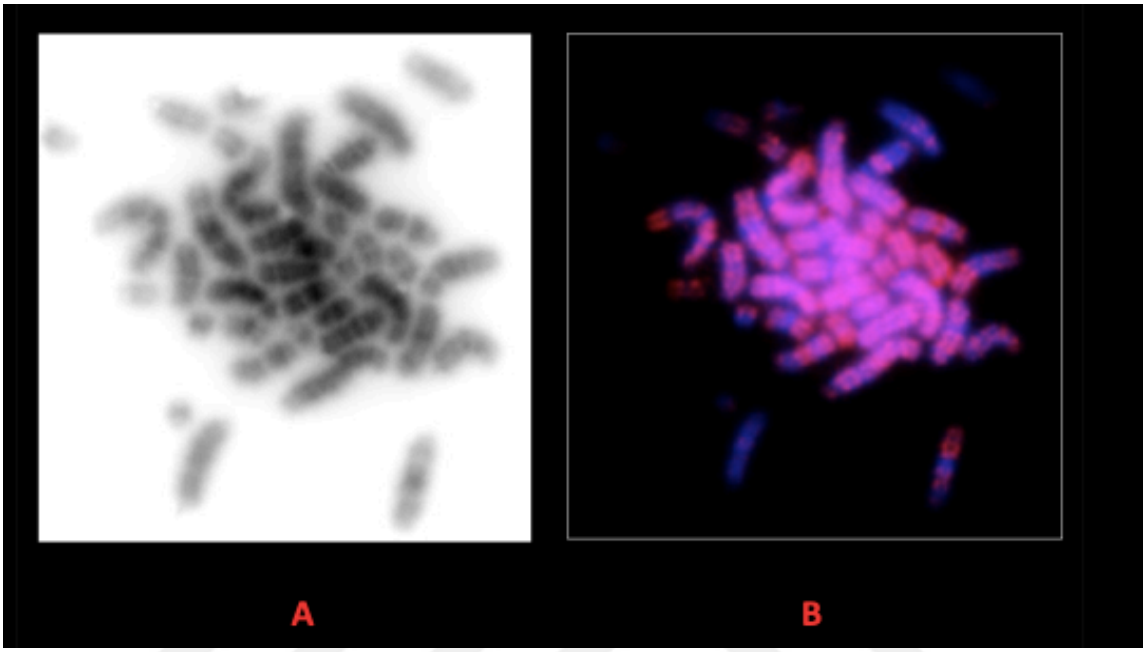
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.



Şekil 4.46: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

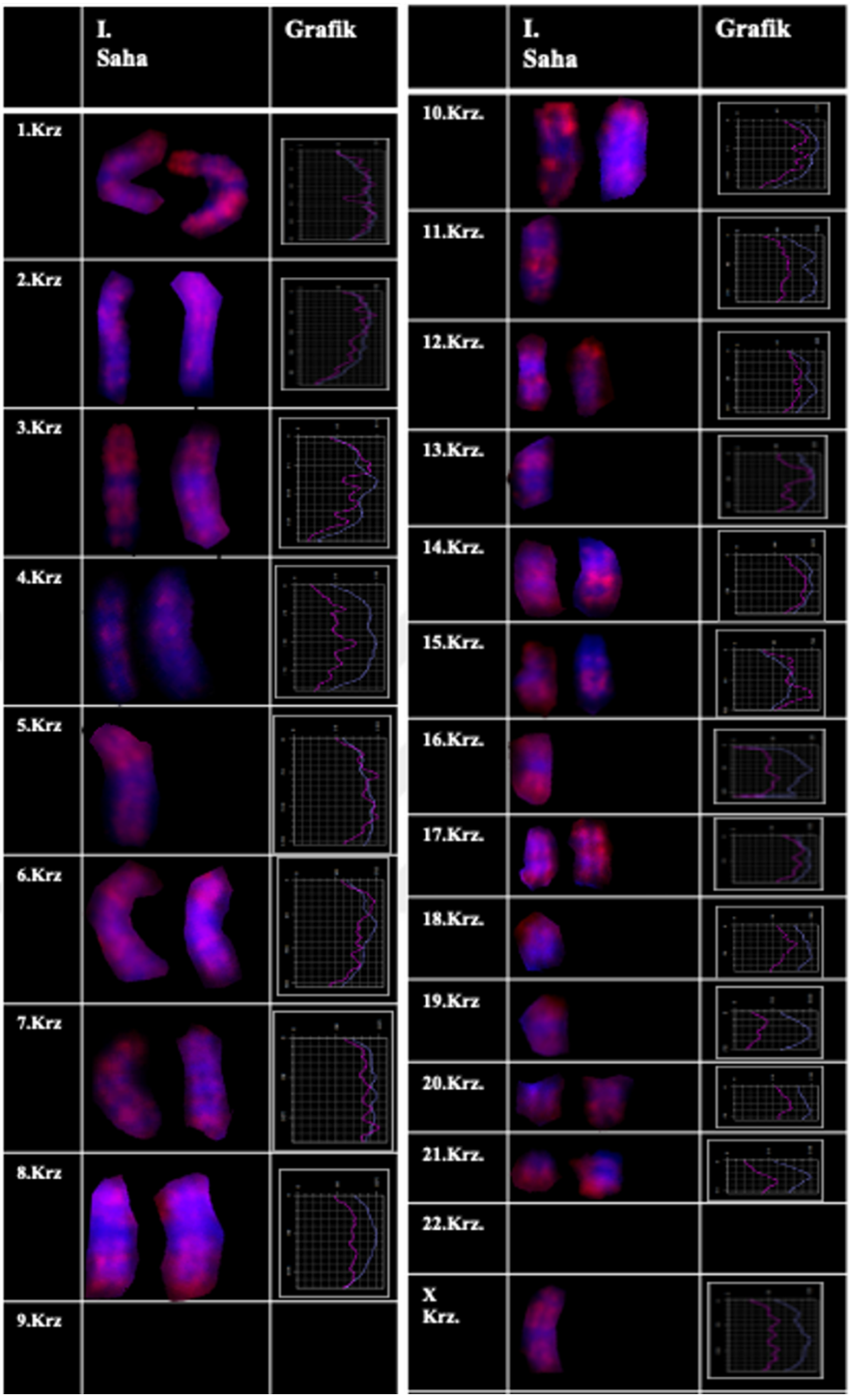
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu V'ten PCC ile elde edilen interfaz sahalarından bir tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.47**). Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.48**'de gösterilmiştir**.**



Şekil 4.47: Olgu V'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri

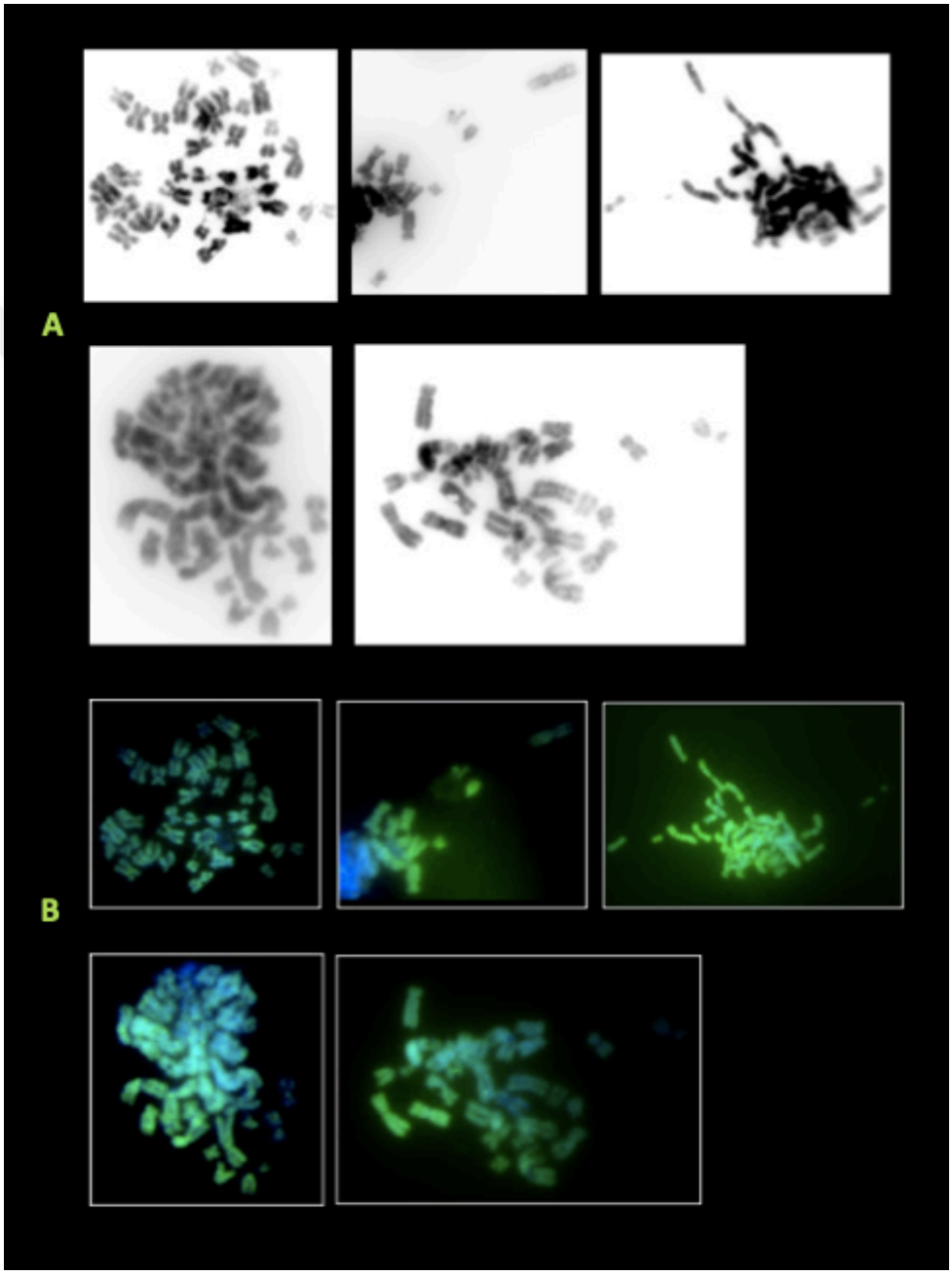
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.48: Olgu V'in bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

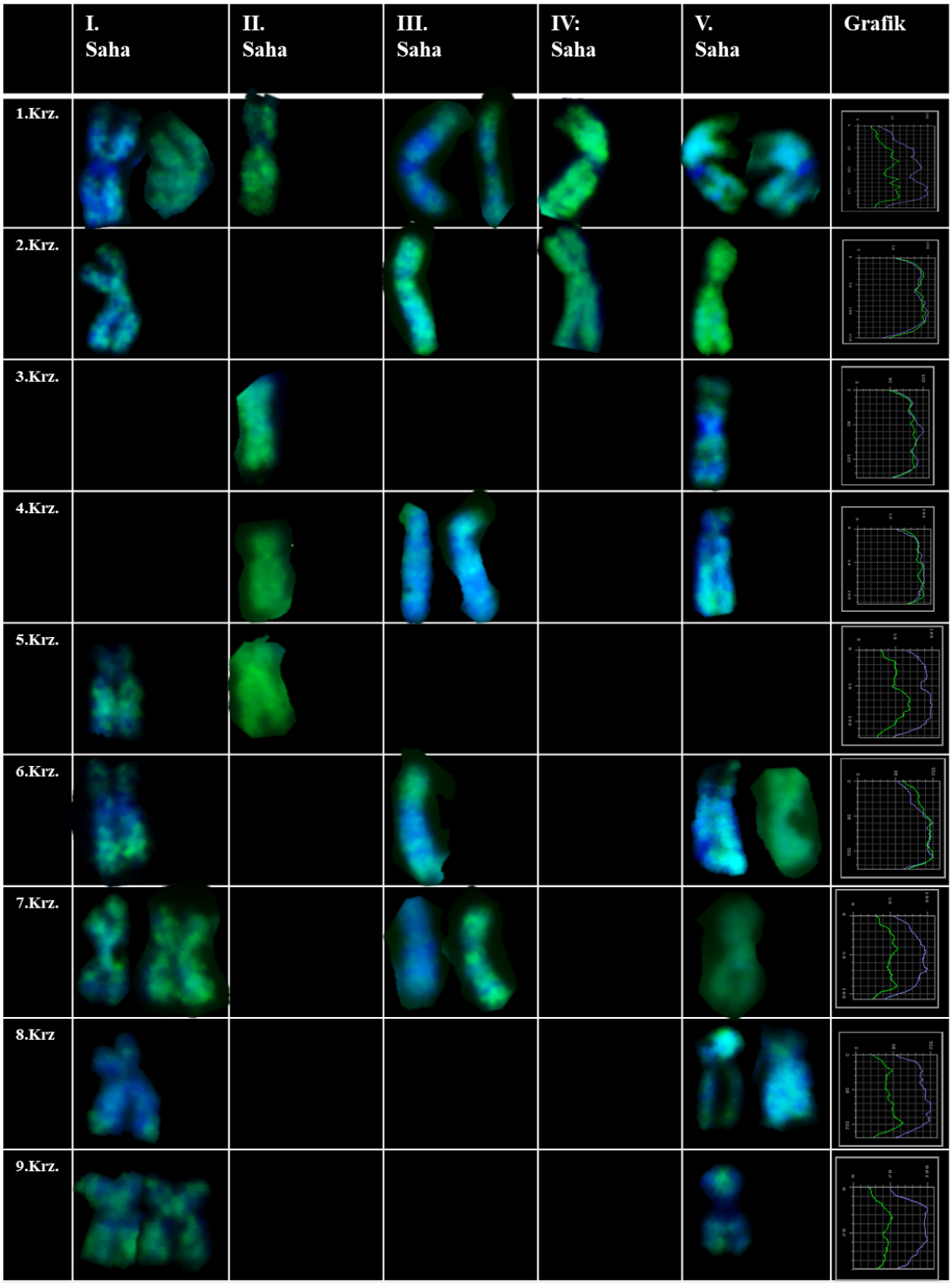
4.1.5.2. . Olgu V Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları

Olgu V'den elde edilen metafaz sahalarından beş tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.49).** Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.50** ve Şekil 4.51'de gösterilmiştir.

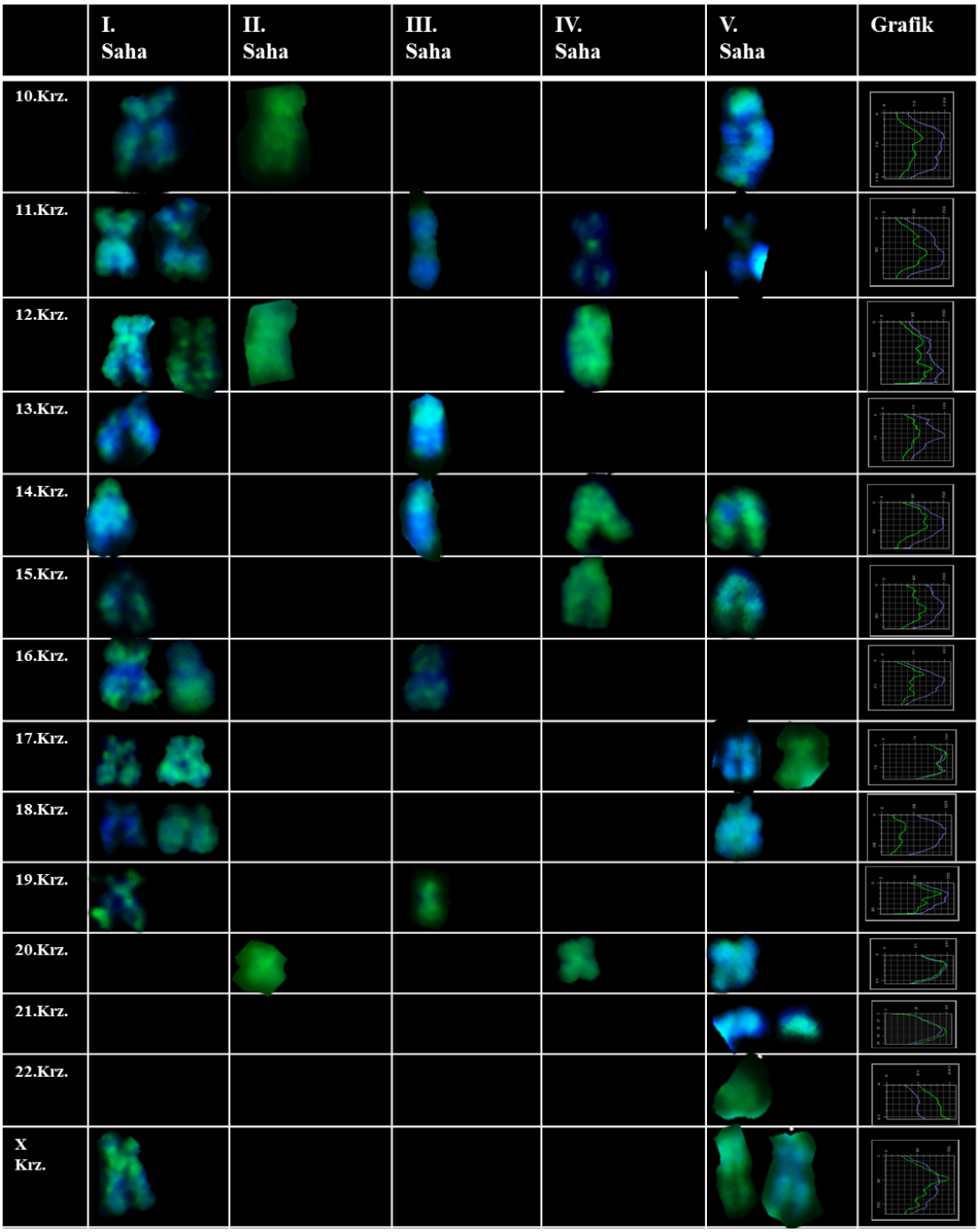


Şekil 4.49: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



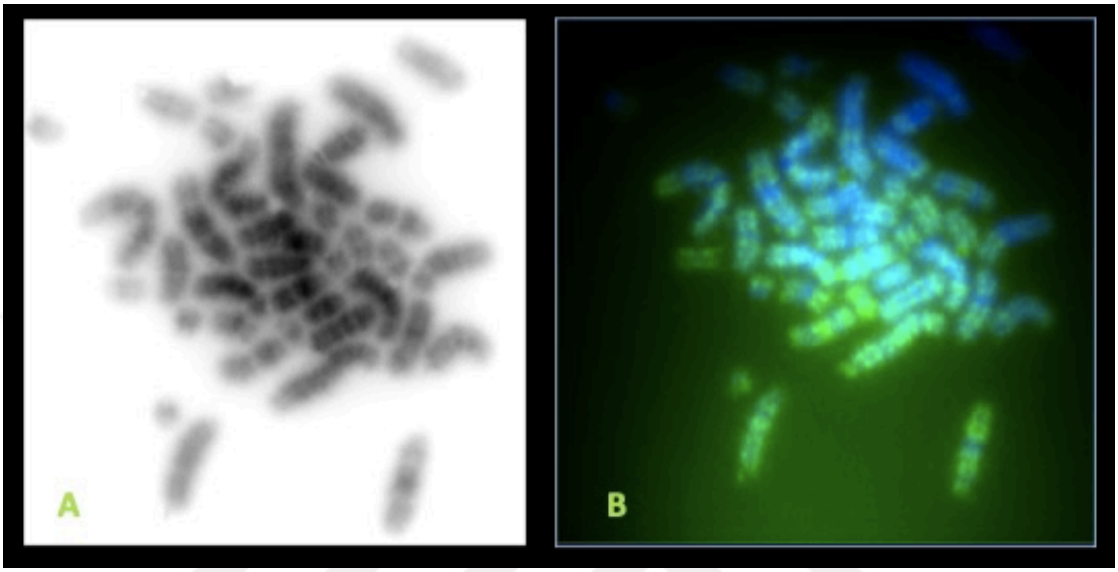
Şekil 4.50: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.



Şekil 4.51: Olgu V'in beş sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

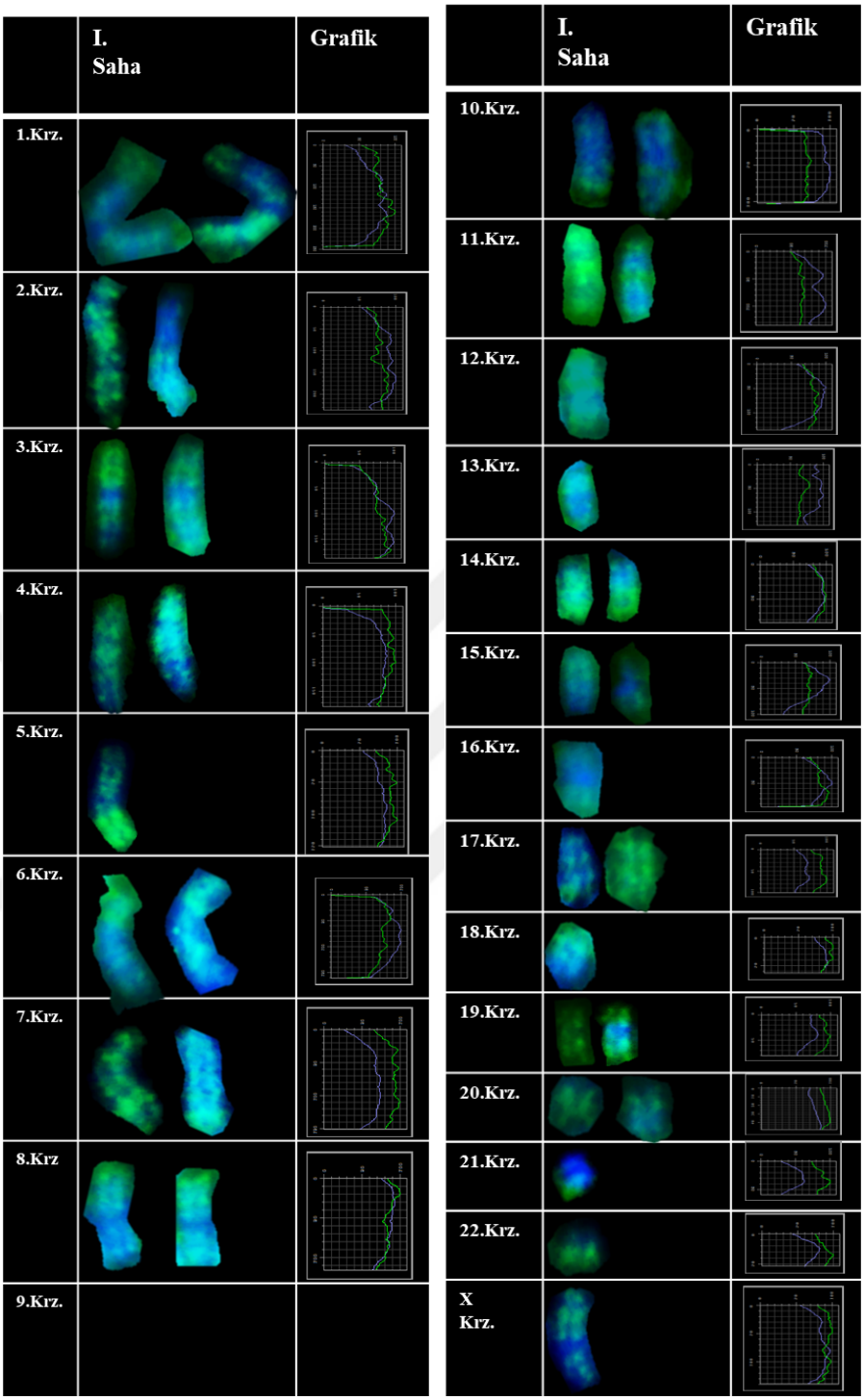
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu V'ten PCC ile elde edilen interfaz sahalarından bir tanesi değerlendirmeye uygun bulundu (**Şekil 4.52**). Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.53'**te gösterilmiştir**.**



Şekil 4.52: Olgu V'ten PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



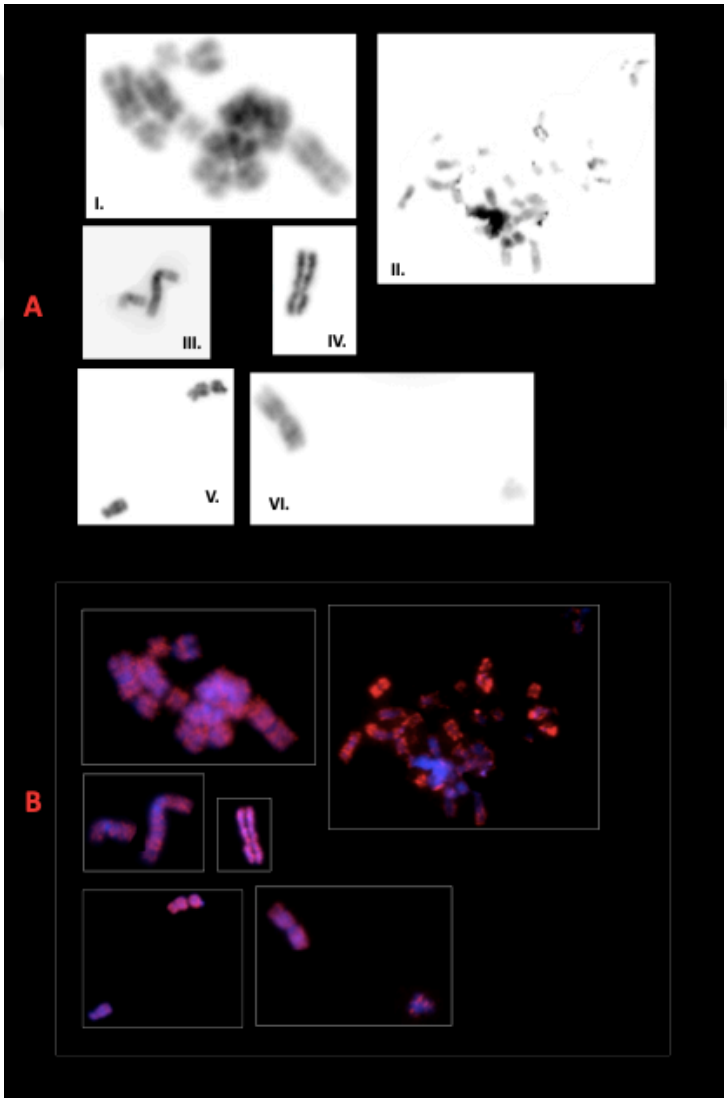
Şekil 4.53: Olgu V'in bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar olan kromzomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.6. Olgu VI (F.H.)

29 yaşındaki kadın gönüllüye ait G15153 No'lu kültürden elde edilen H3K27me3 ve H3K79me2 bulgularının görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

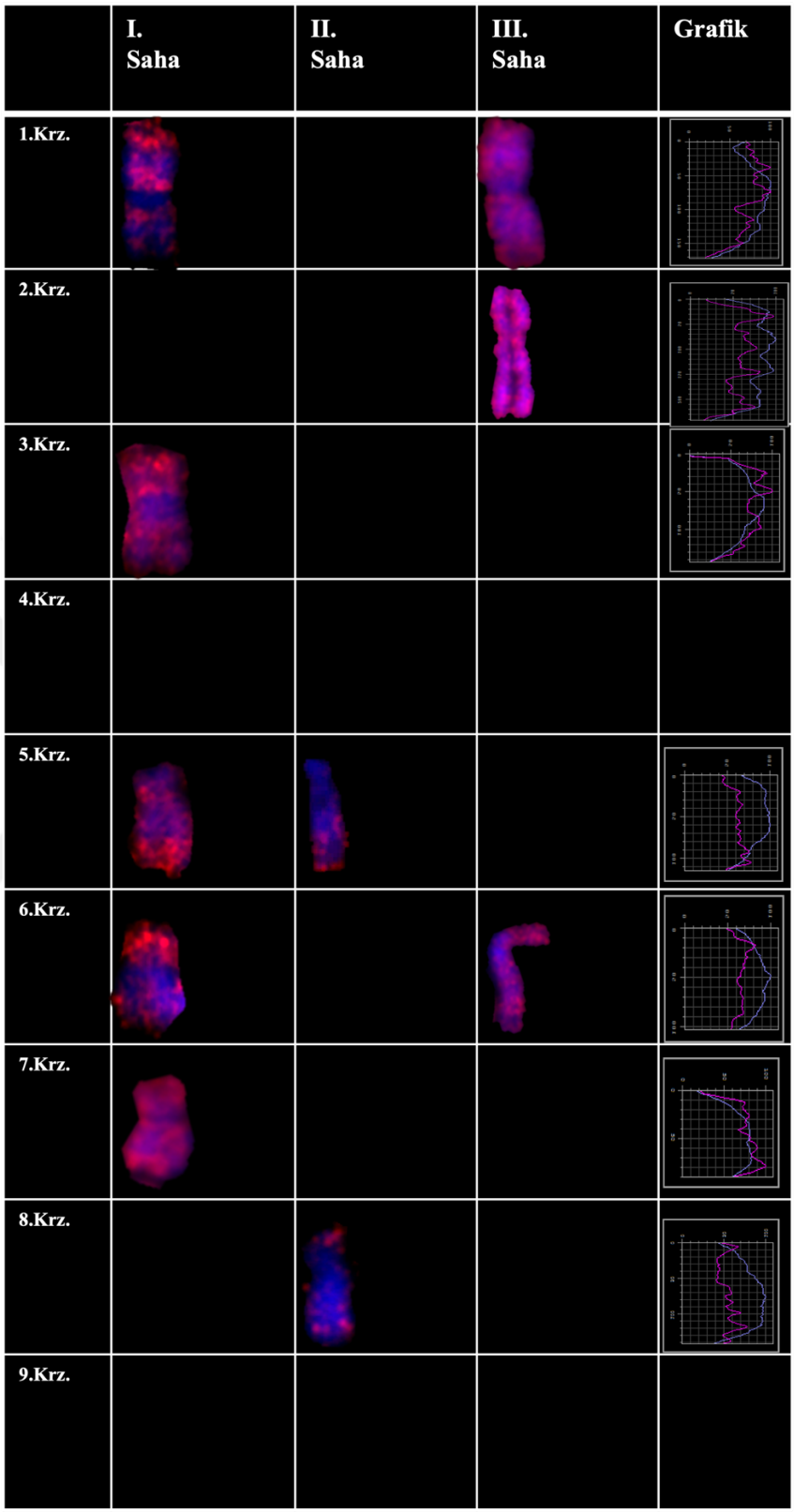
4.1.6.1. Olgu VI Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları

Olgu VI'dan elde edilen metafaz sahalarından altı tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.41).** Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.42**'de gösterilmiştir.

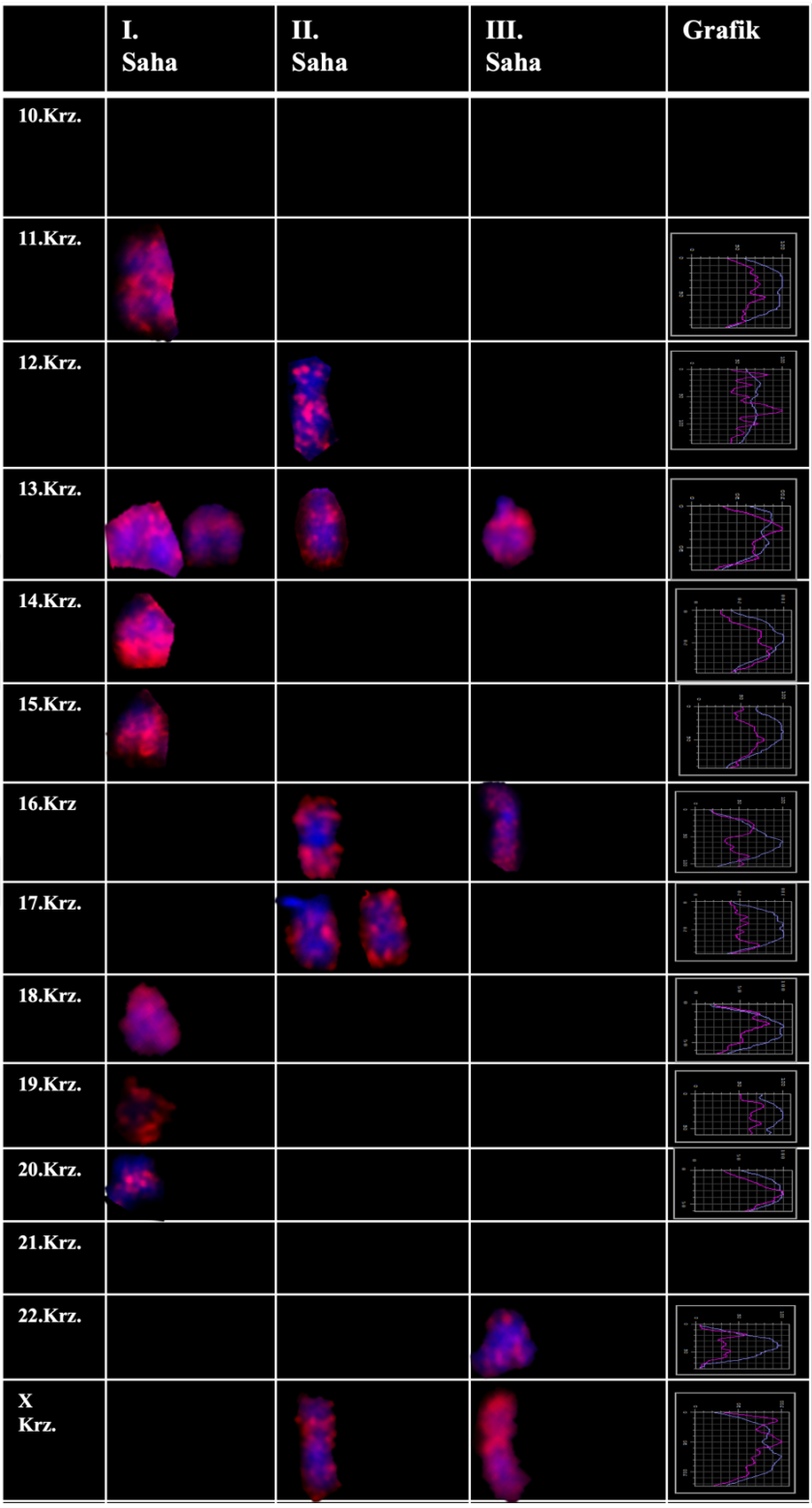


Şekil 4.54: Olgu VI'dan elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.

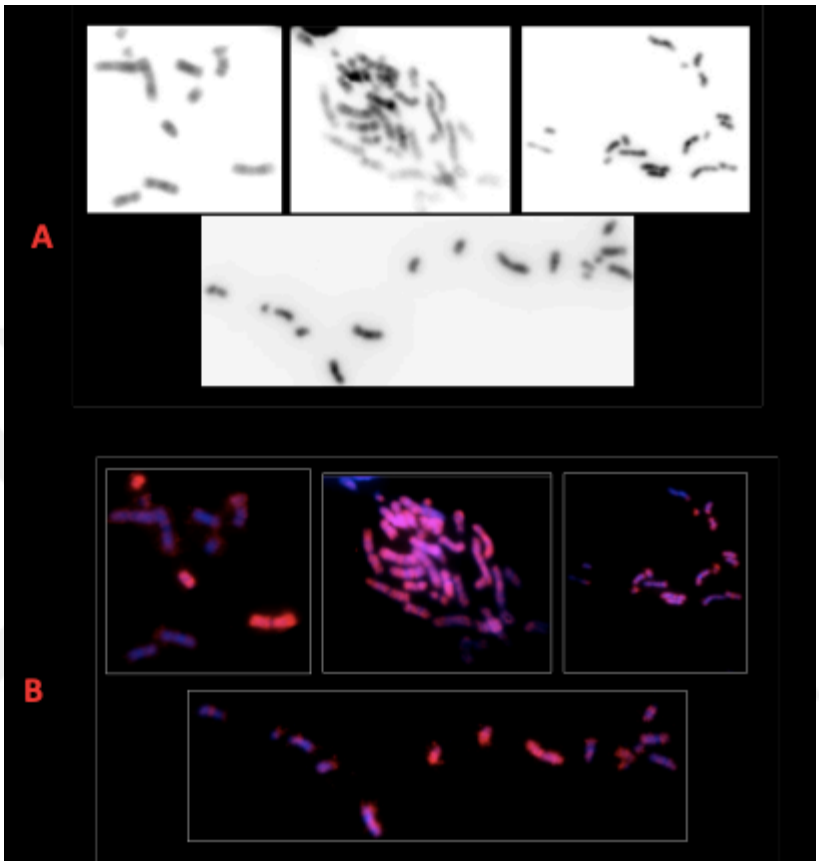


Şekil 4.55: Olgu VI'nın altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir. III.Saha, III-IV-V-VI. Sahadaki kromozomlardan oluşturulmuştur.



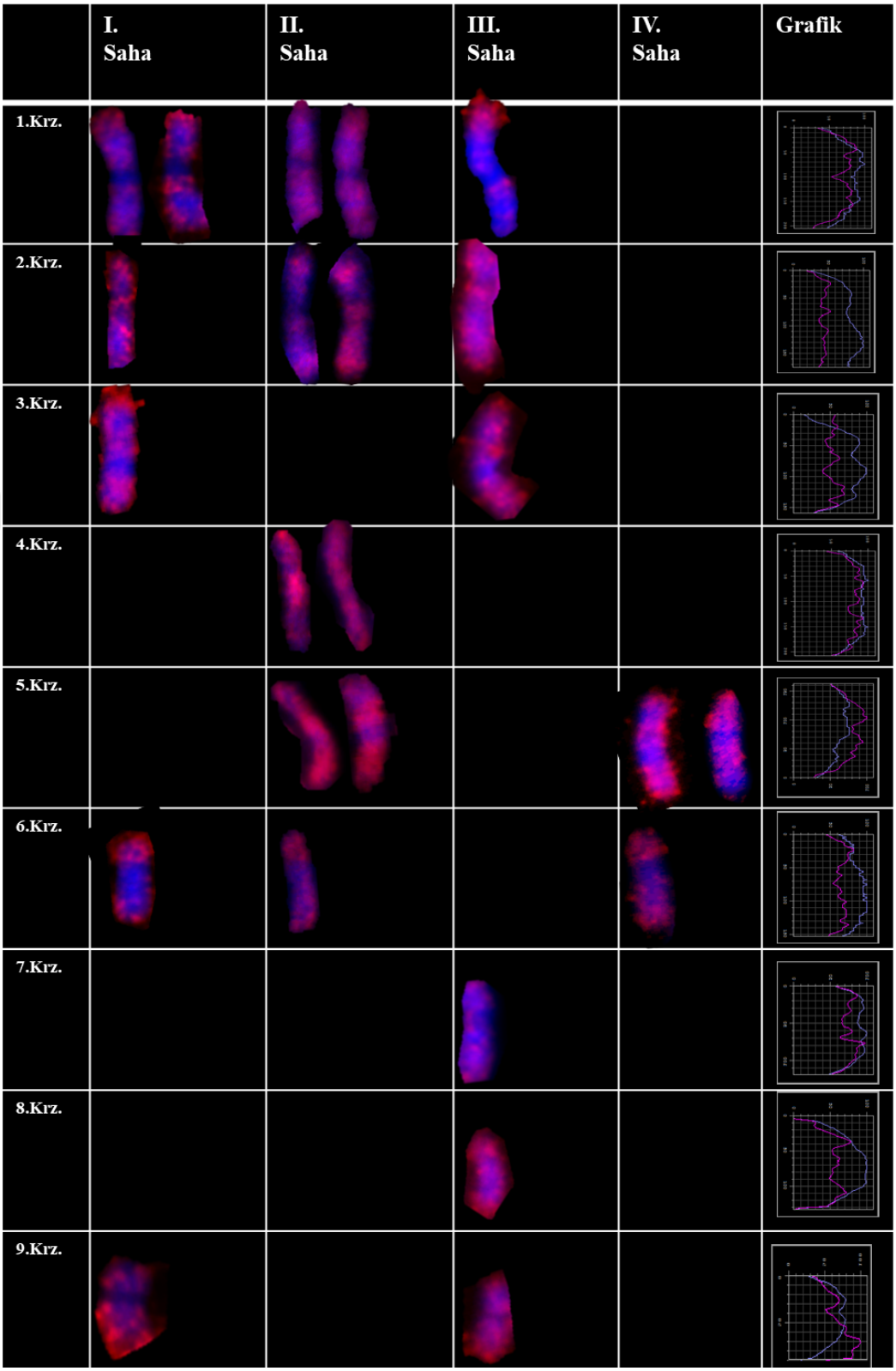
Şekil 4.56: Olgu VI'nın altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir. III.Saha, III-IV-V-VI. Sahadaki kromozomlardan oluşturulmuştur.

Olgu VI'dan PCC ile elde edilen interfaz sahalarından dört tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.57).** Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.58** ve **Şekil 4.59**'da gösterilmiştir.

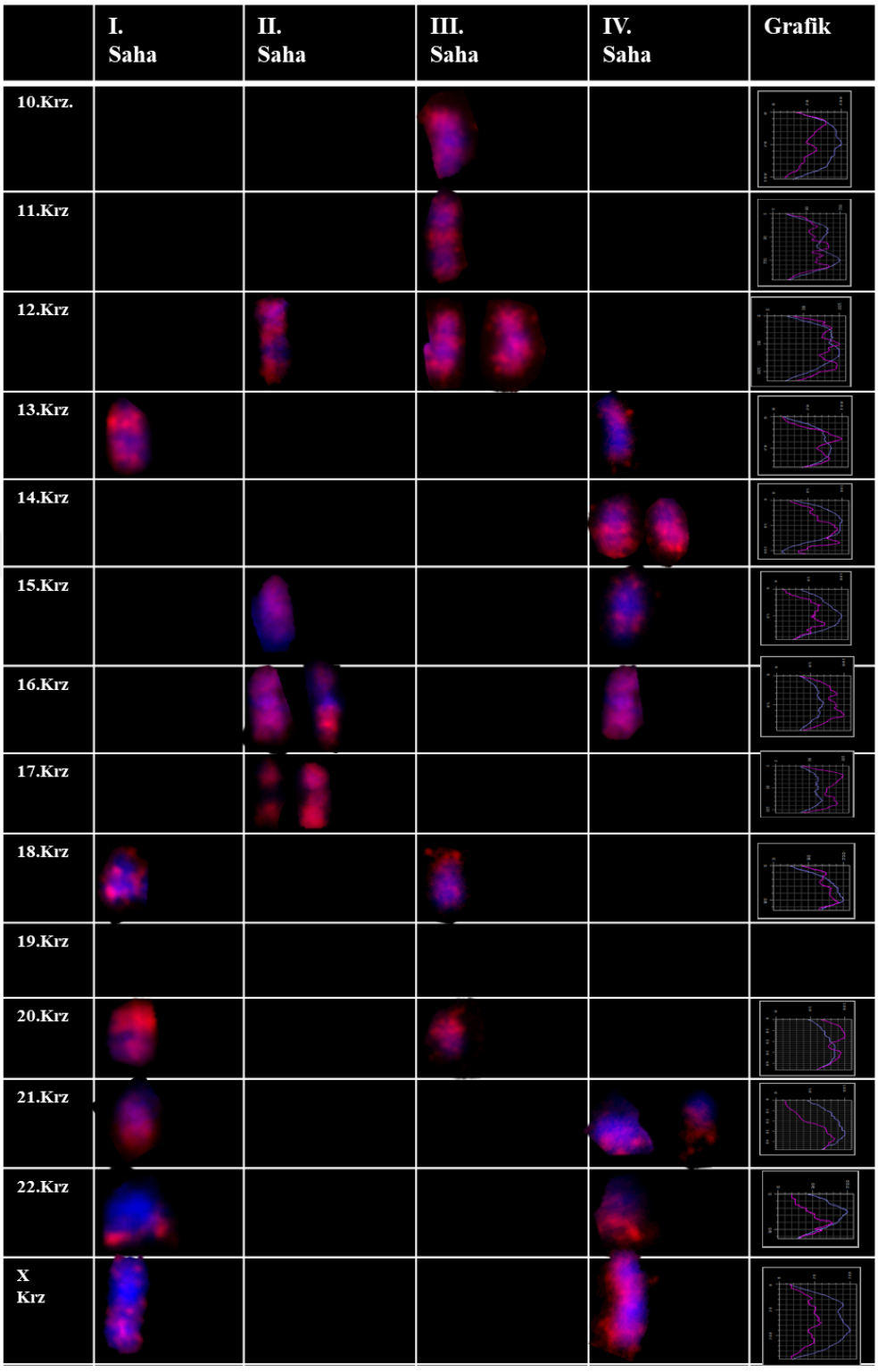


Şekil 4.57: Olgu VI'dan PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



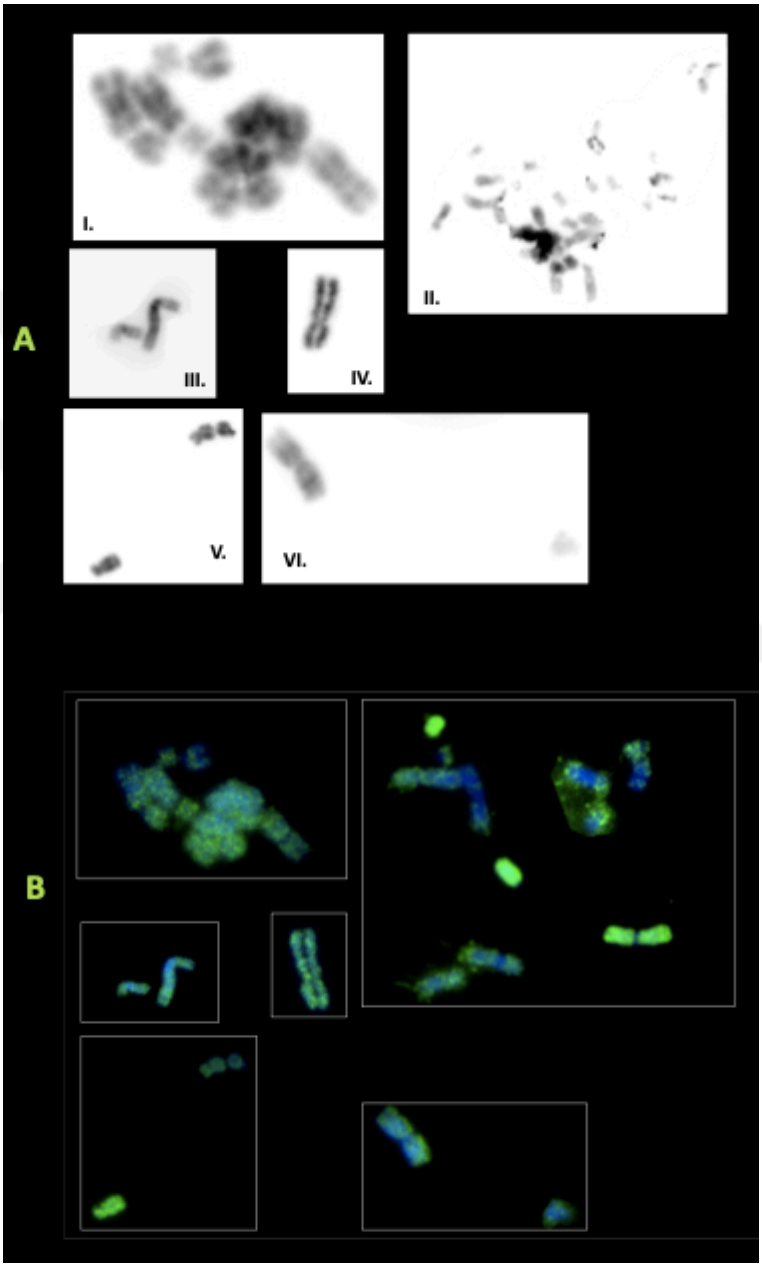
Şekil 4.58: Olgu VI'nın dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.



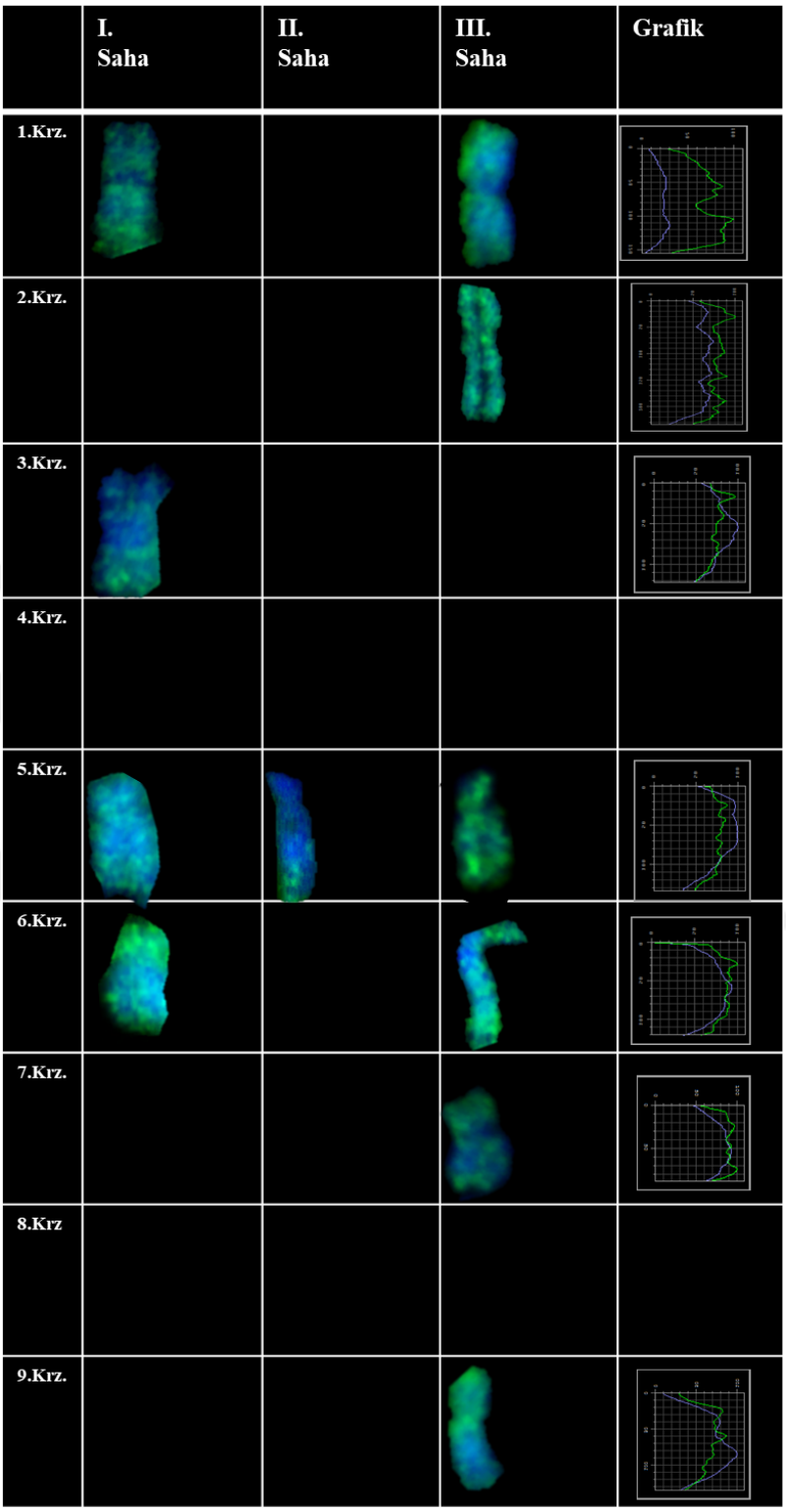
Şekil 4.59: Olgu VI'nın dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.6.1. Olgu VI Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları

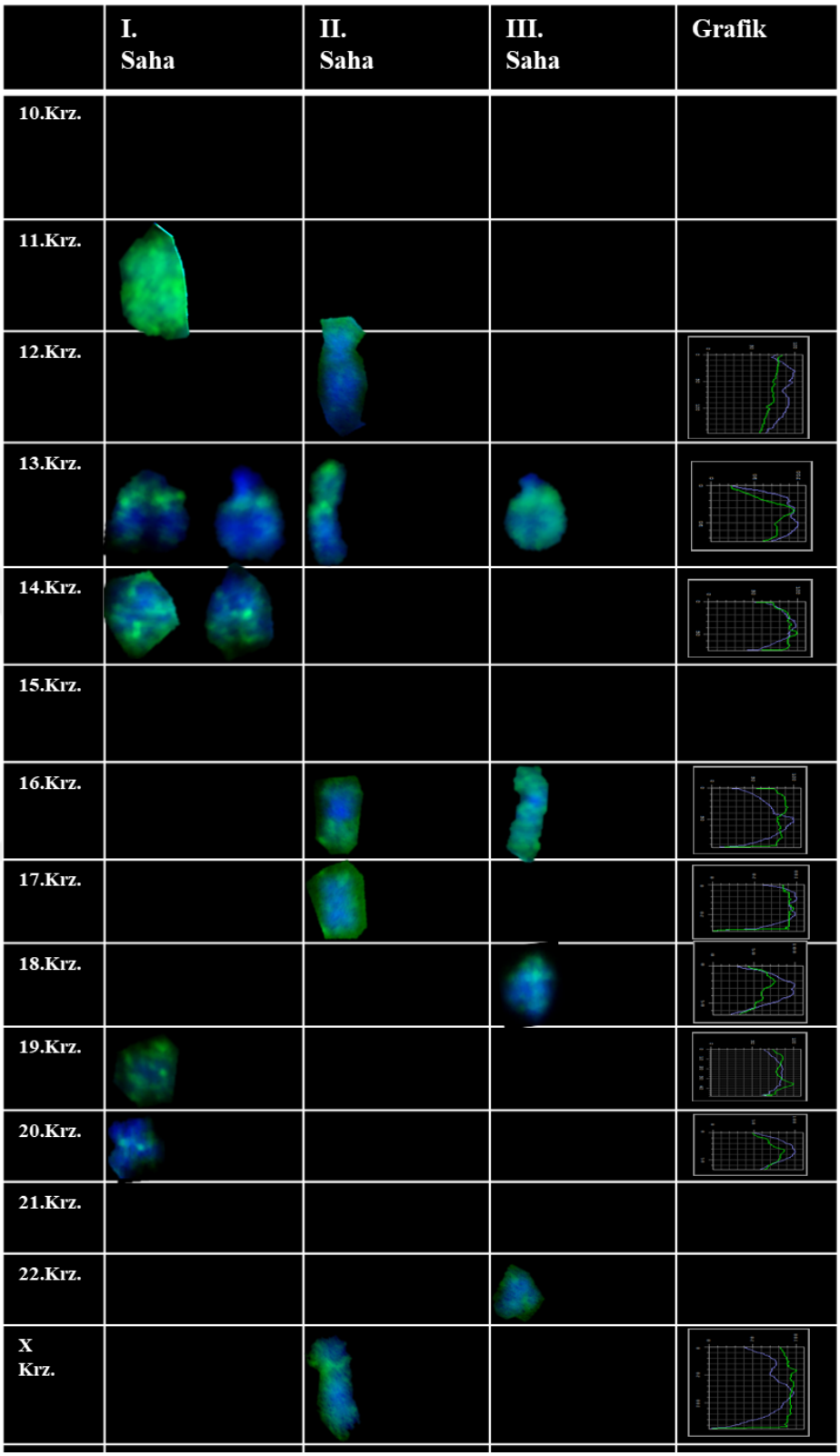
Olgu VI'dan elde edilen metafaz sahalarından altı tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **Şekil 4.60**. Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.61** ve **Şekil 4.62**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.60: Olgu VI'dan elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri.
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.

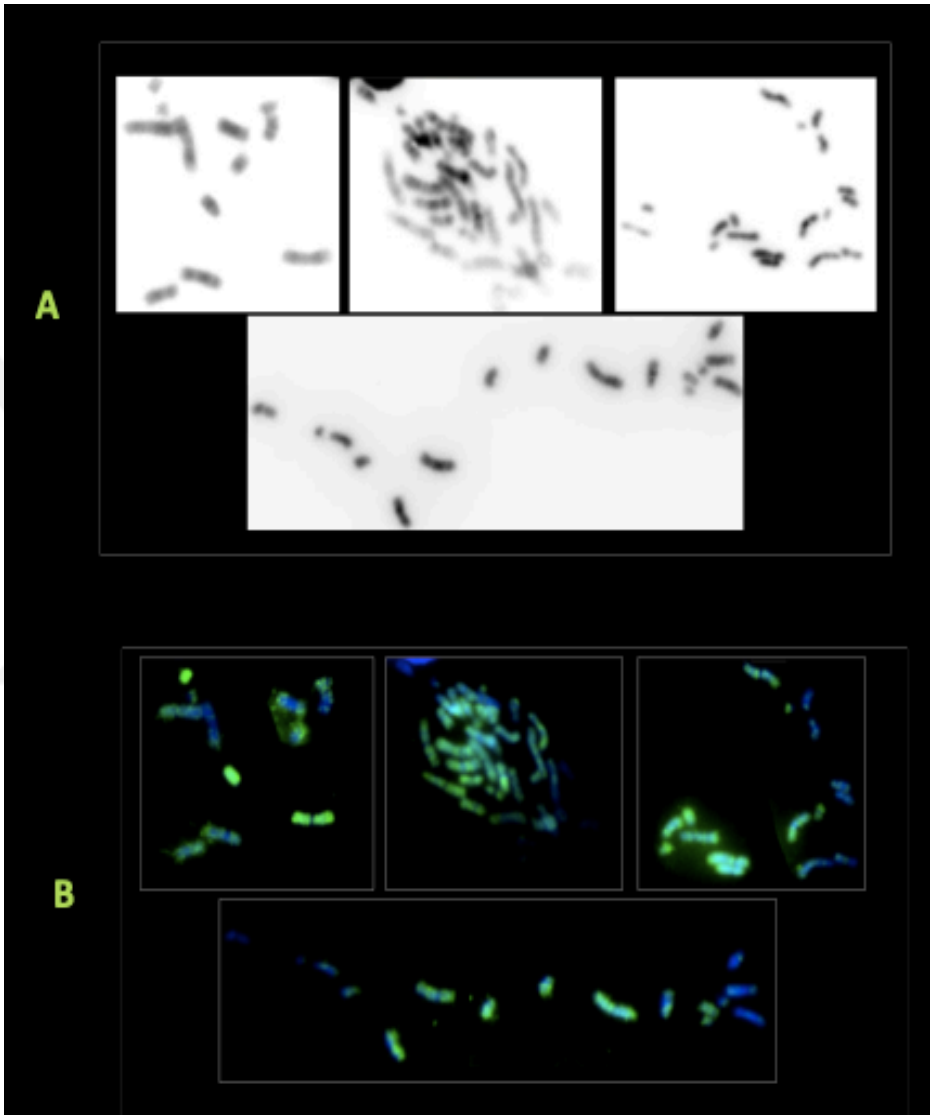


Şekil 4.61: Olgu VI'nın altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir. III.Saha, III-IV-V-VI. Sahadaki kromozomlardan oluşturulmuştur.



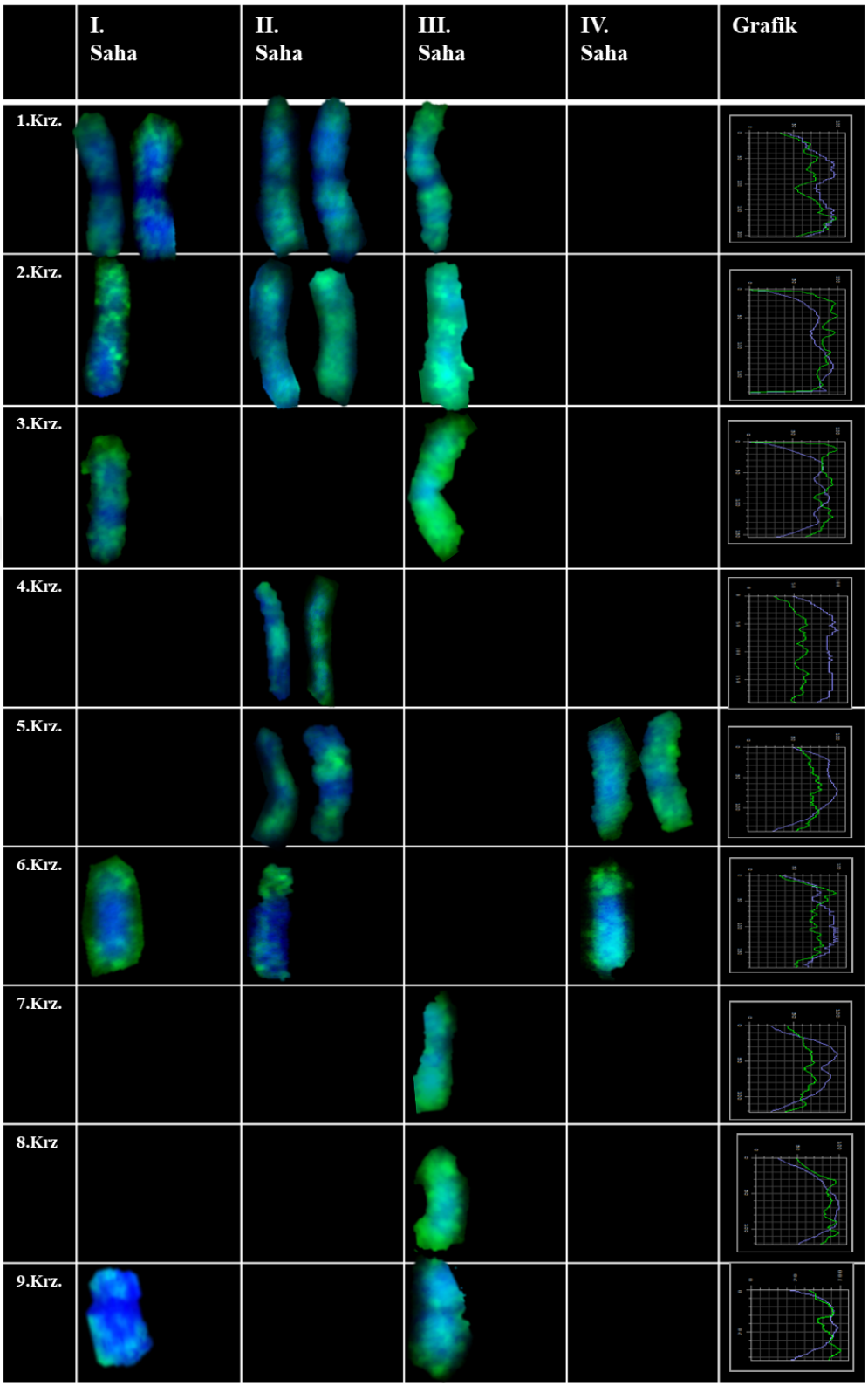
Şekil 4.62: Olgu VI'nın altı sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir. III.Saha, III-IV-V-VI. Sahadaki kromozomlardan oluşturulmuştur.

Olgu VI'dan PCC ile elde edilen interfaz sahalarından dört tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.63).** Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.64** ve **Şekil 4.65**'te gösterilmiştir**.**

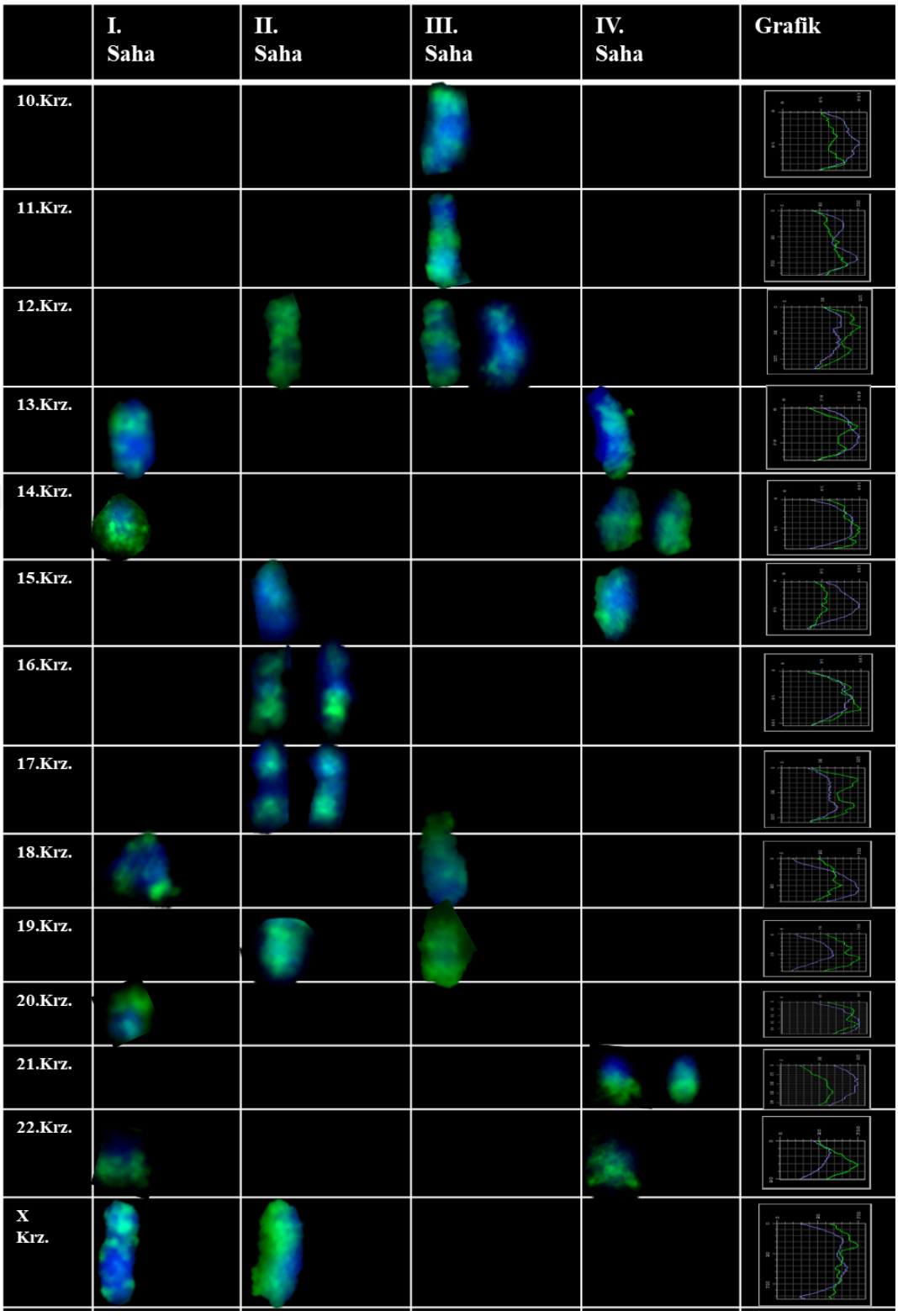


Şekil 4.63: Olgu VI'dan PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.64: Olgu VI'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.



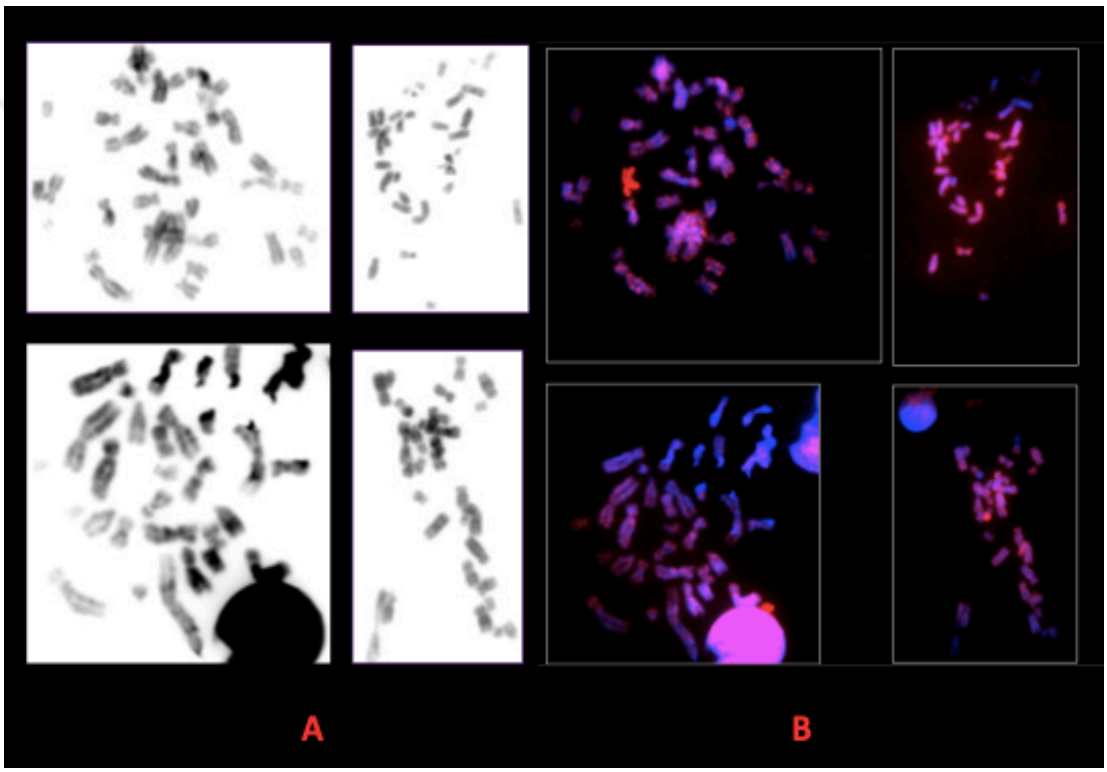
Şekil 4.65: Olgu VI'in dört sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X'e kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.7. Olgu VII (C.K.)

27 yaşındaki erkek gönüllüye ait G15156 No'lu kültürden elde edilen H3K27me3 ve H3K79me2 bulgularının görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

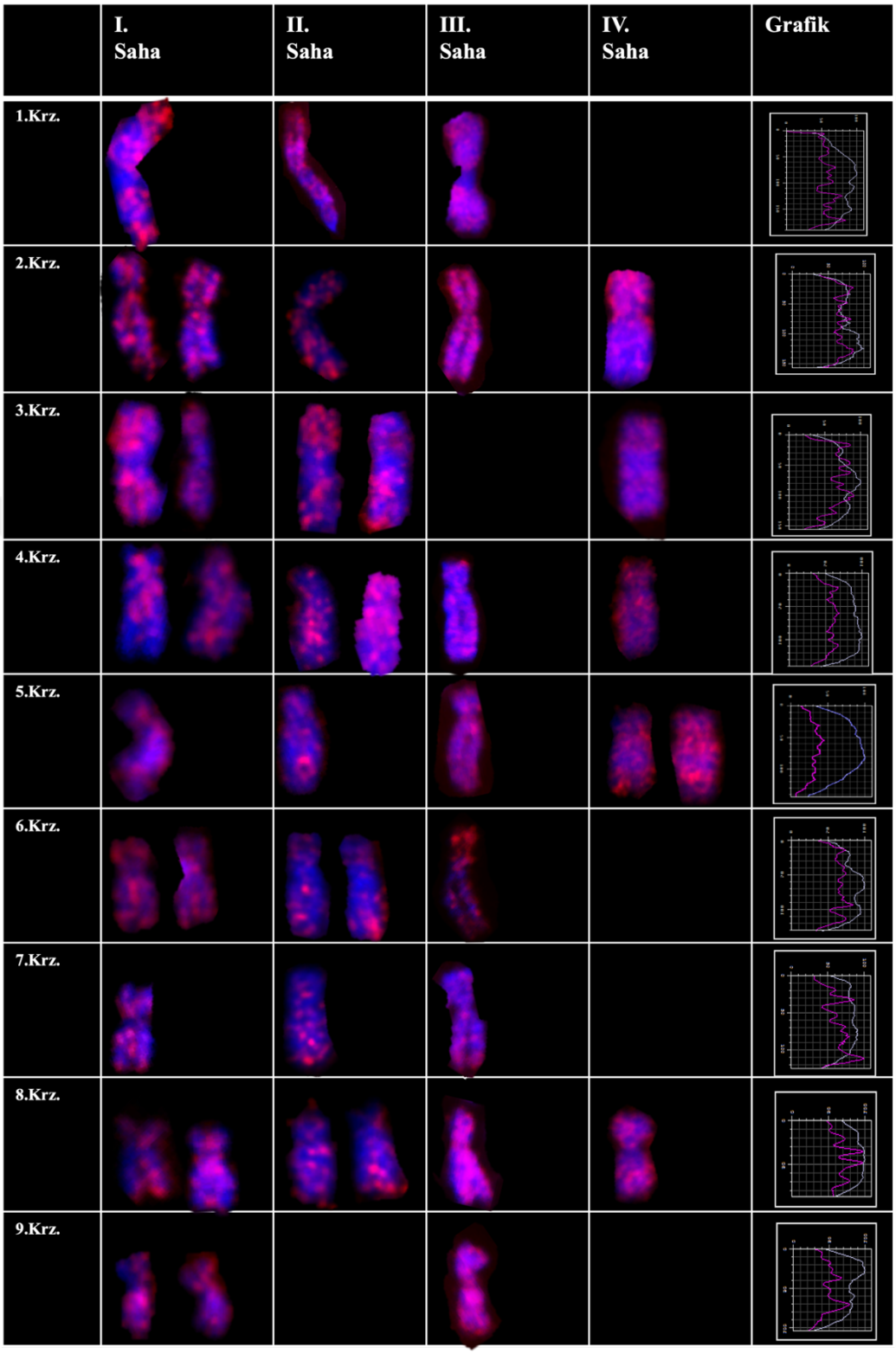
4.1.7.1. Olgu VII Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları

Olgu VII'den elde edilen metafaz sahalarından dört tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.66).** Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.67** ve **Şekil 4.68**'de gösterilmiştir.

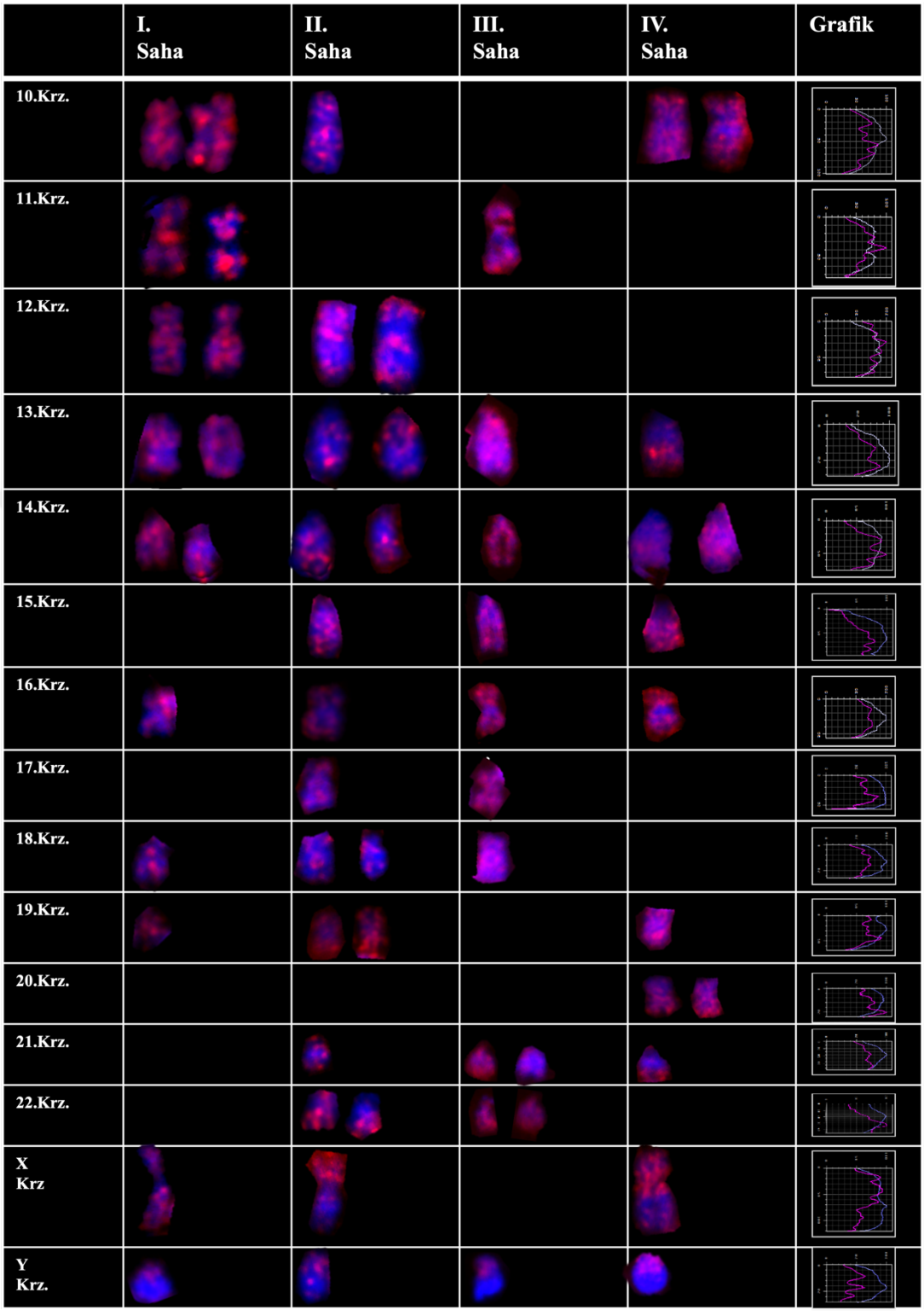


Şekil 4.66: Olgu VII'den elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.

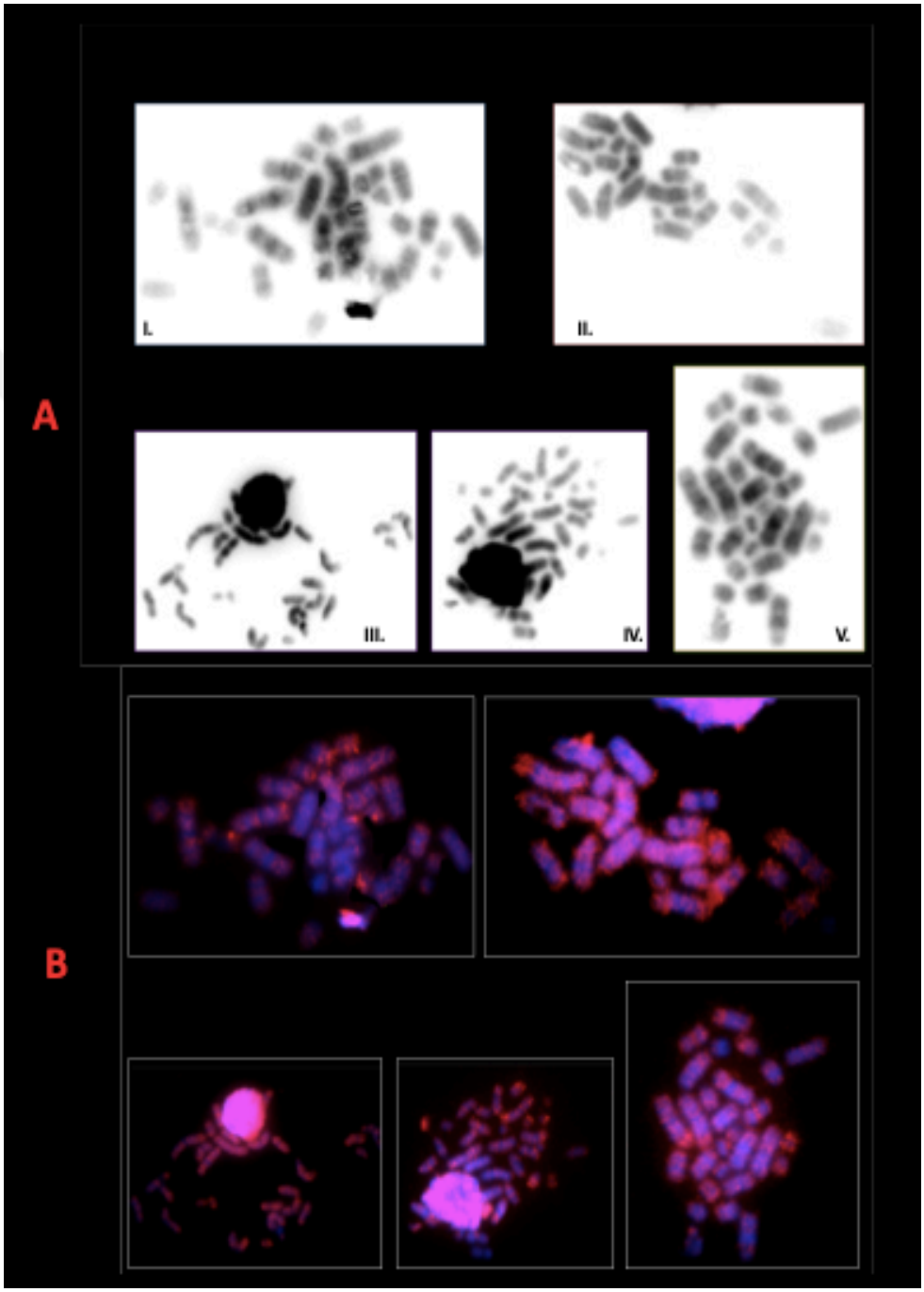


Şekil 4.67: Olgu VII'nin dört sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.



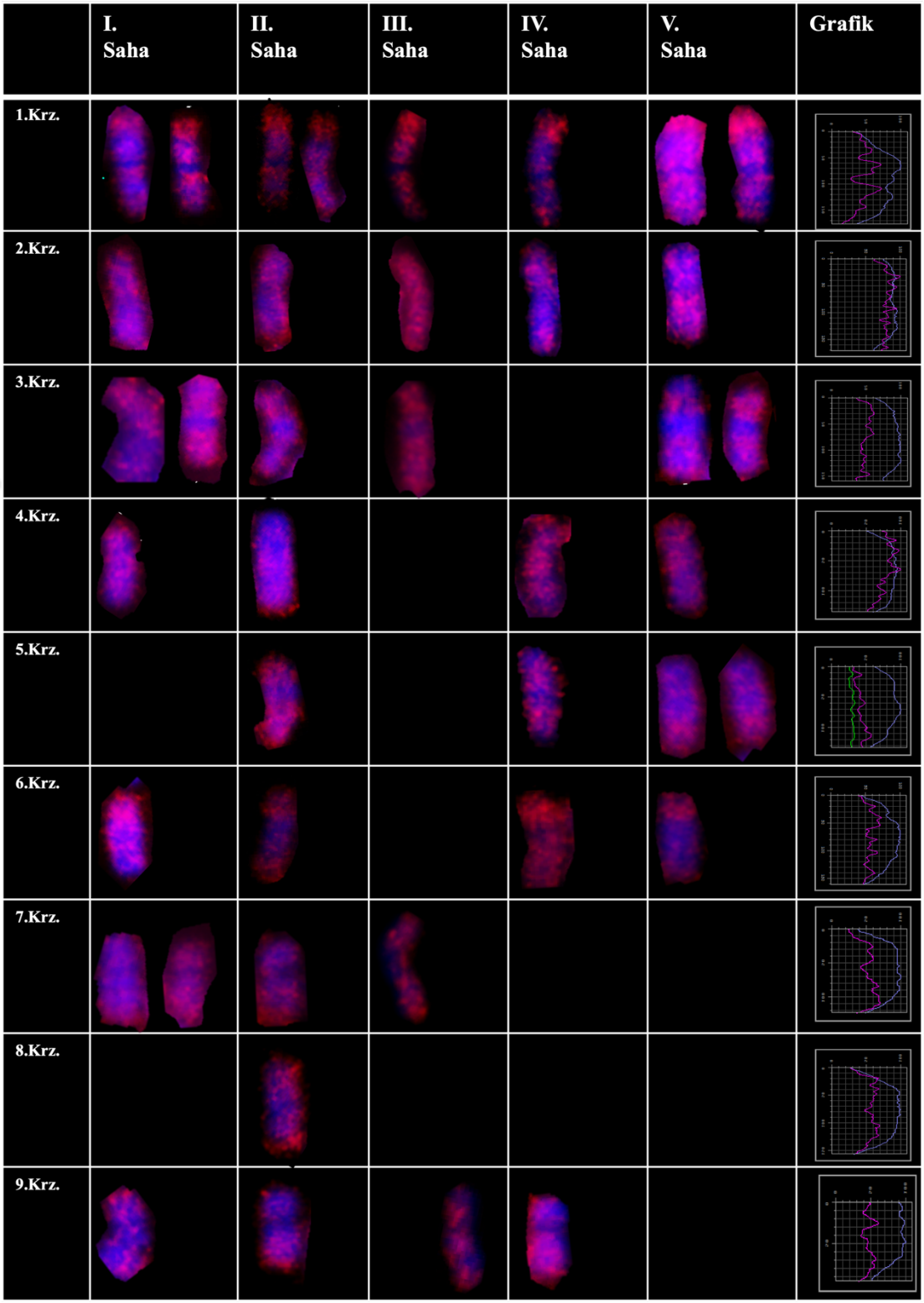
Şekil 4.68: Olgu VII'nin dört sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu VII'den PCC ile elde edilen interfaz sahalarından beş tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.69).** Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.70** ve **Şekil 4.71**'degösterilmiştir**.**

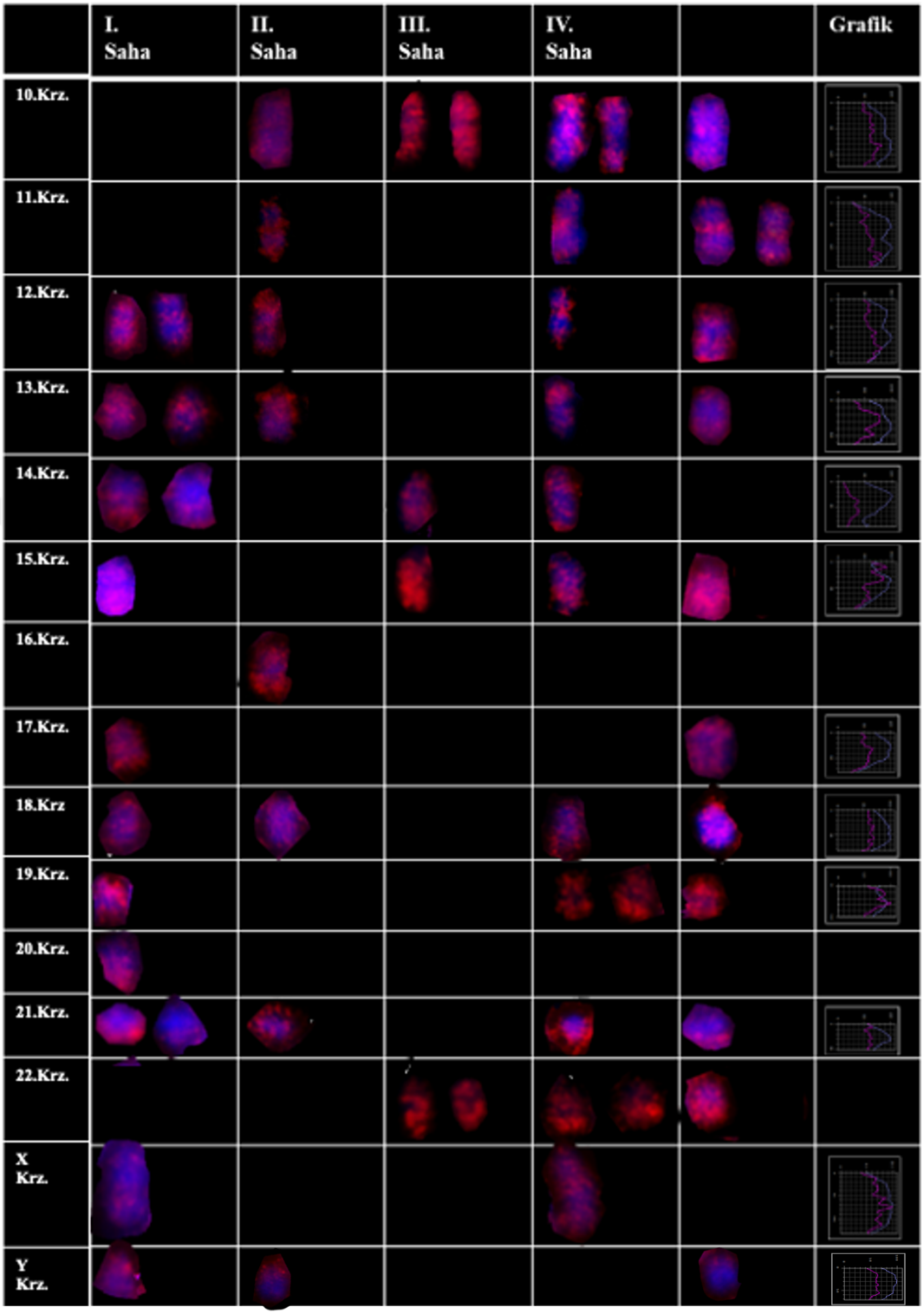


Şekil 4.69: Olgu VII'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları-Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.70: Olgu VII'nin beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

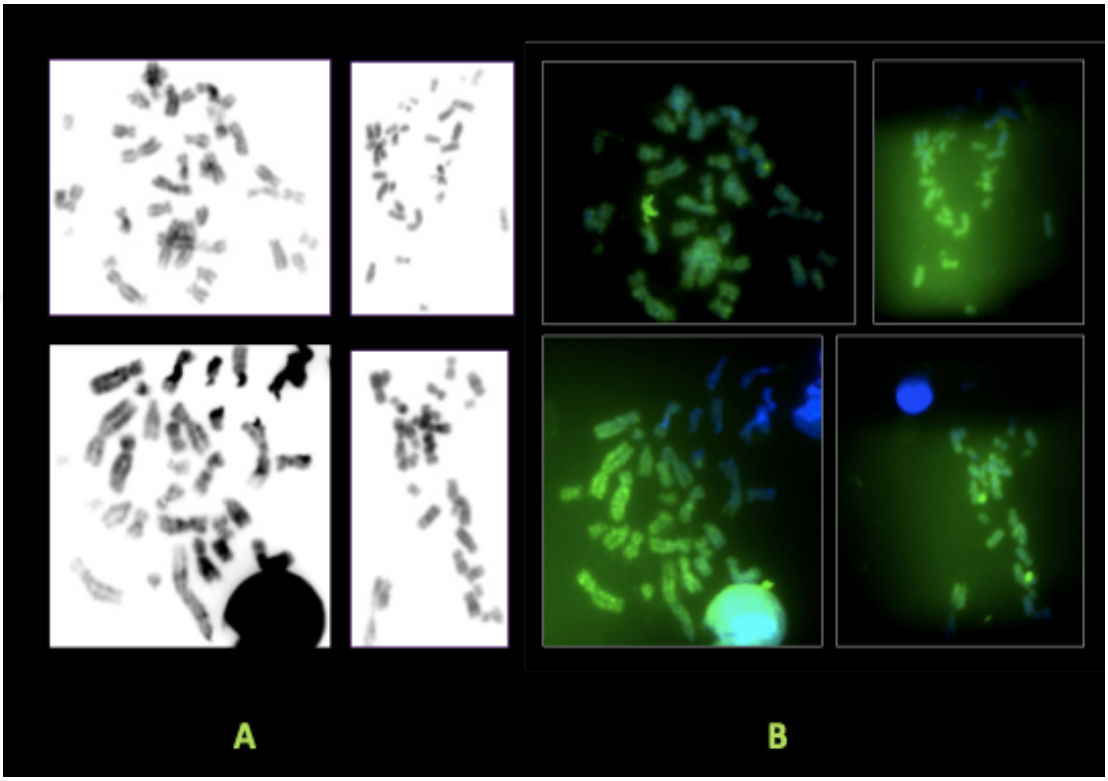


Şekil 4.71: Olgu VII'nin beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

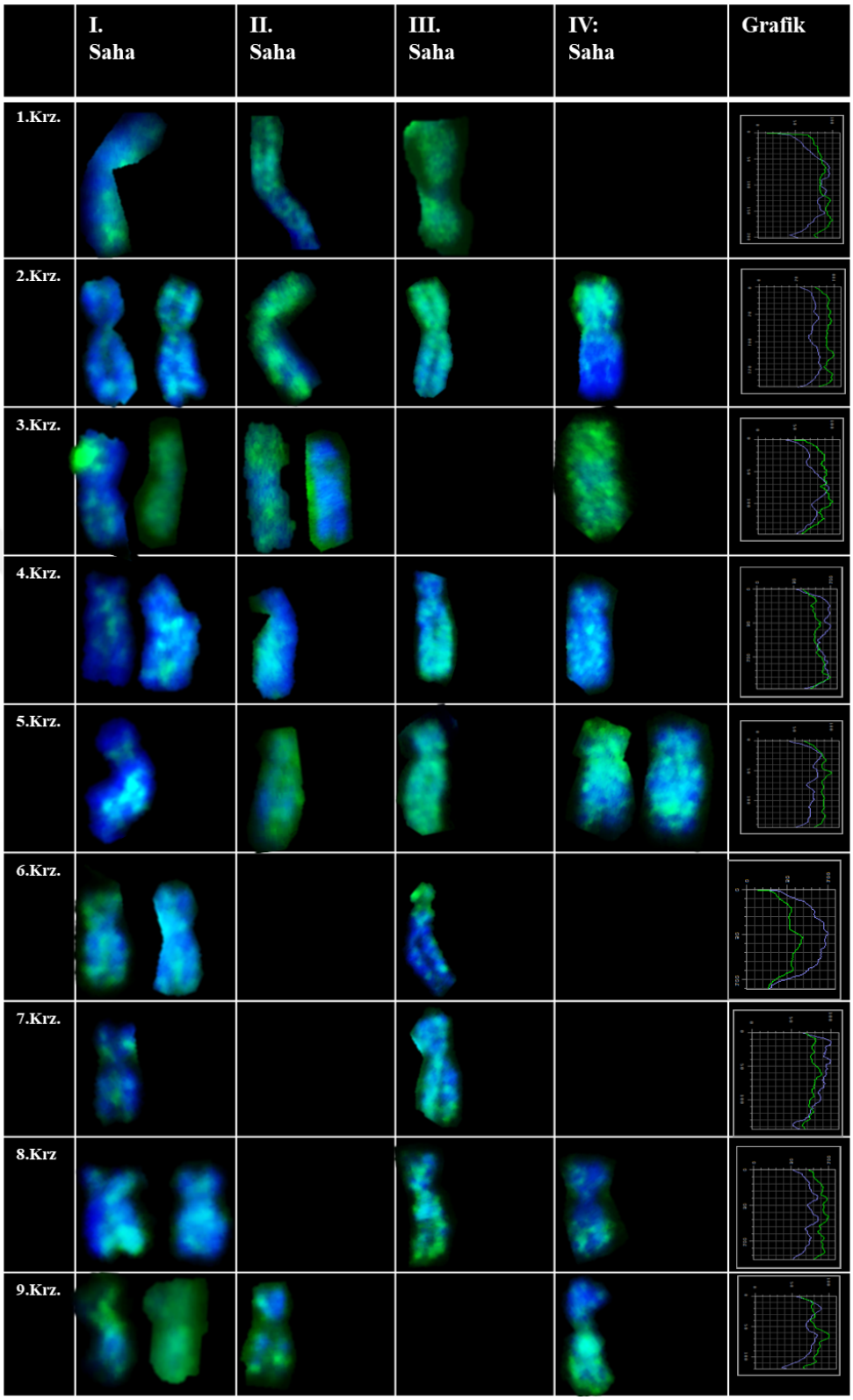
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.7.2. Olgu VII Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları

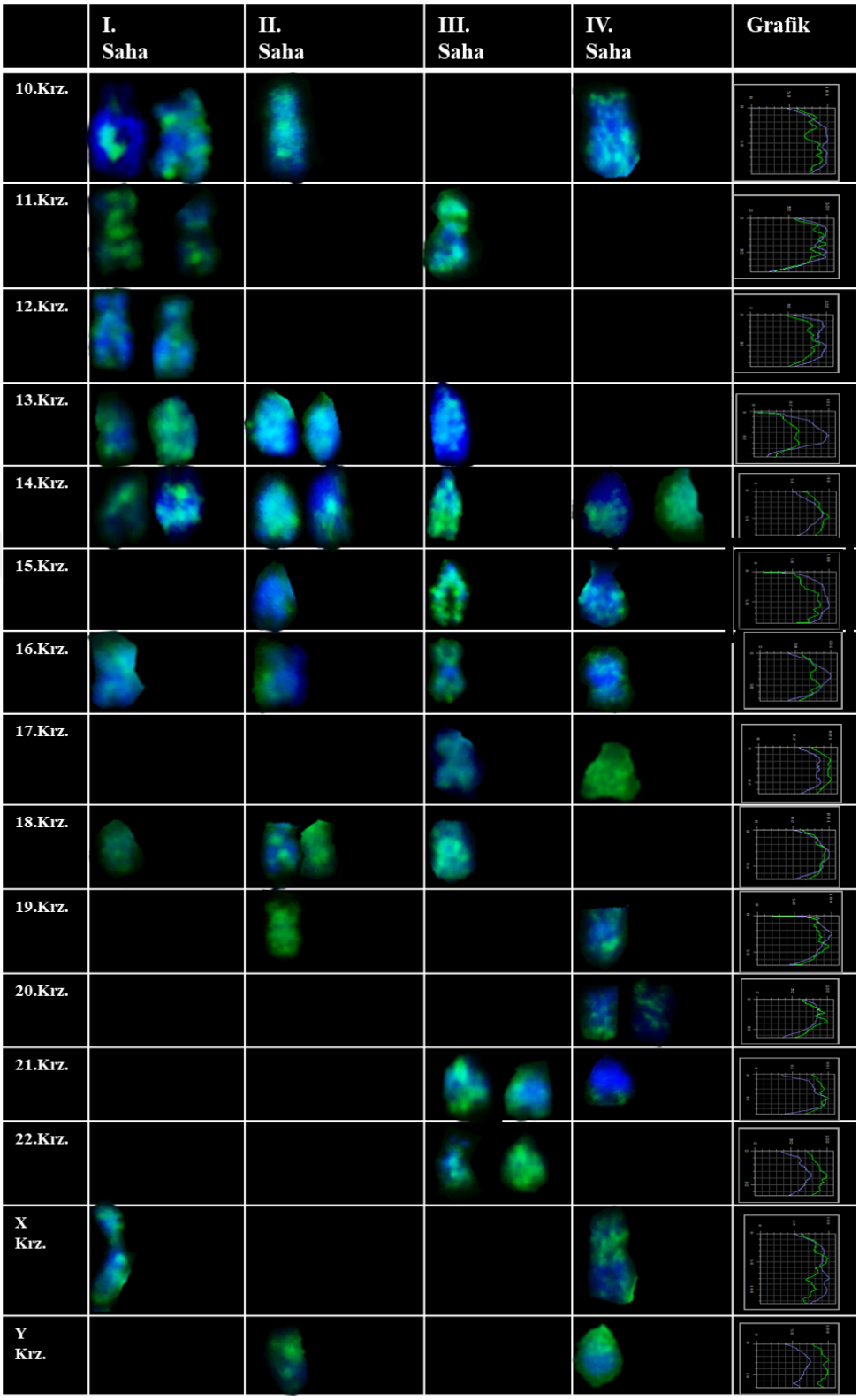
Olgu VII'den elde edilen metafaz sahalarından dört tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.72).** Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.73** ve **Şekil 4.74**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.72: Olgu VII'den elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri.
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.

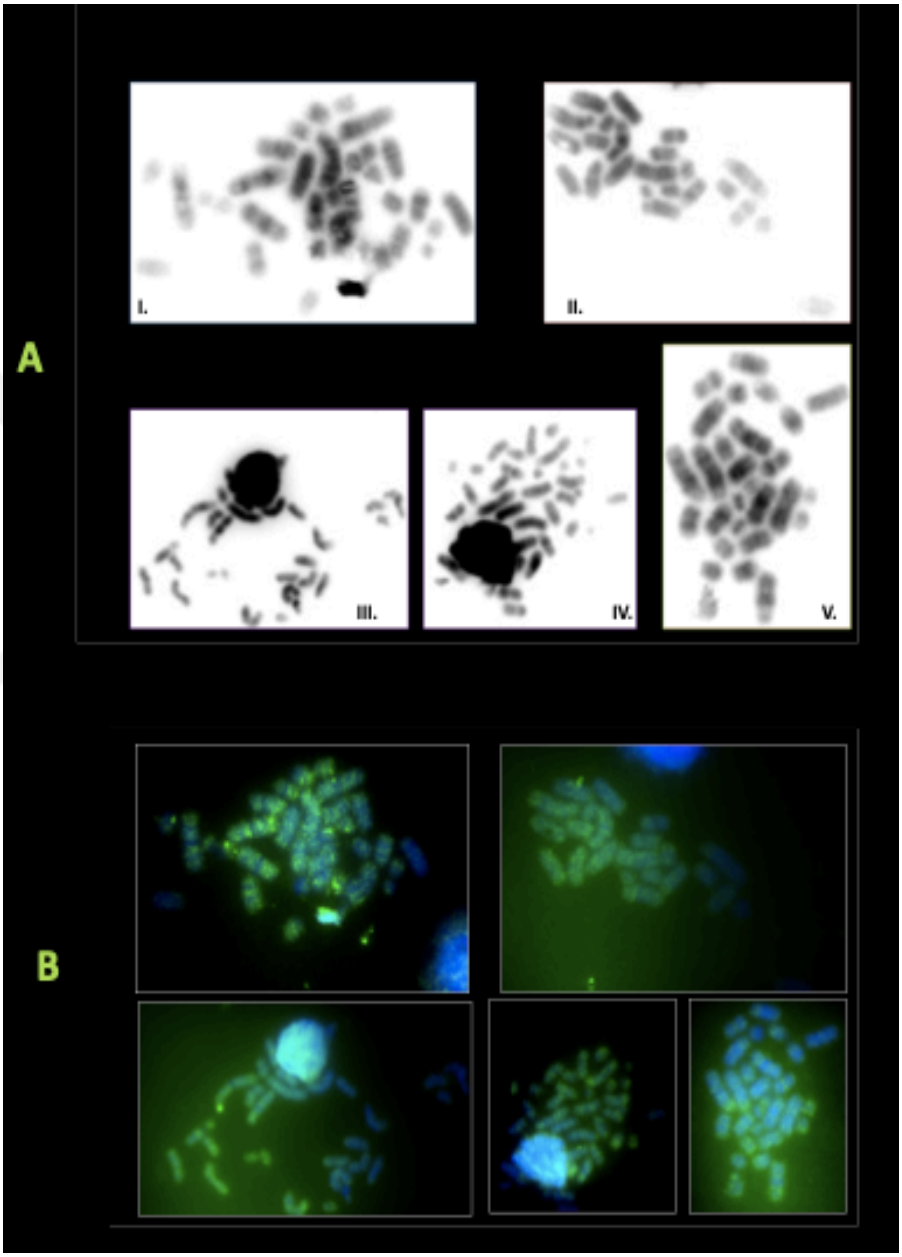


Şekil 4.73: Olgu VII'nin dört sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri -1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.



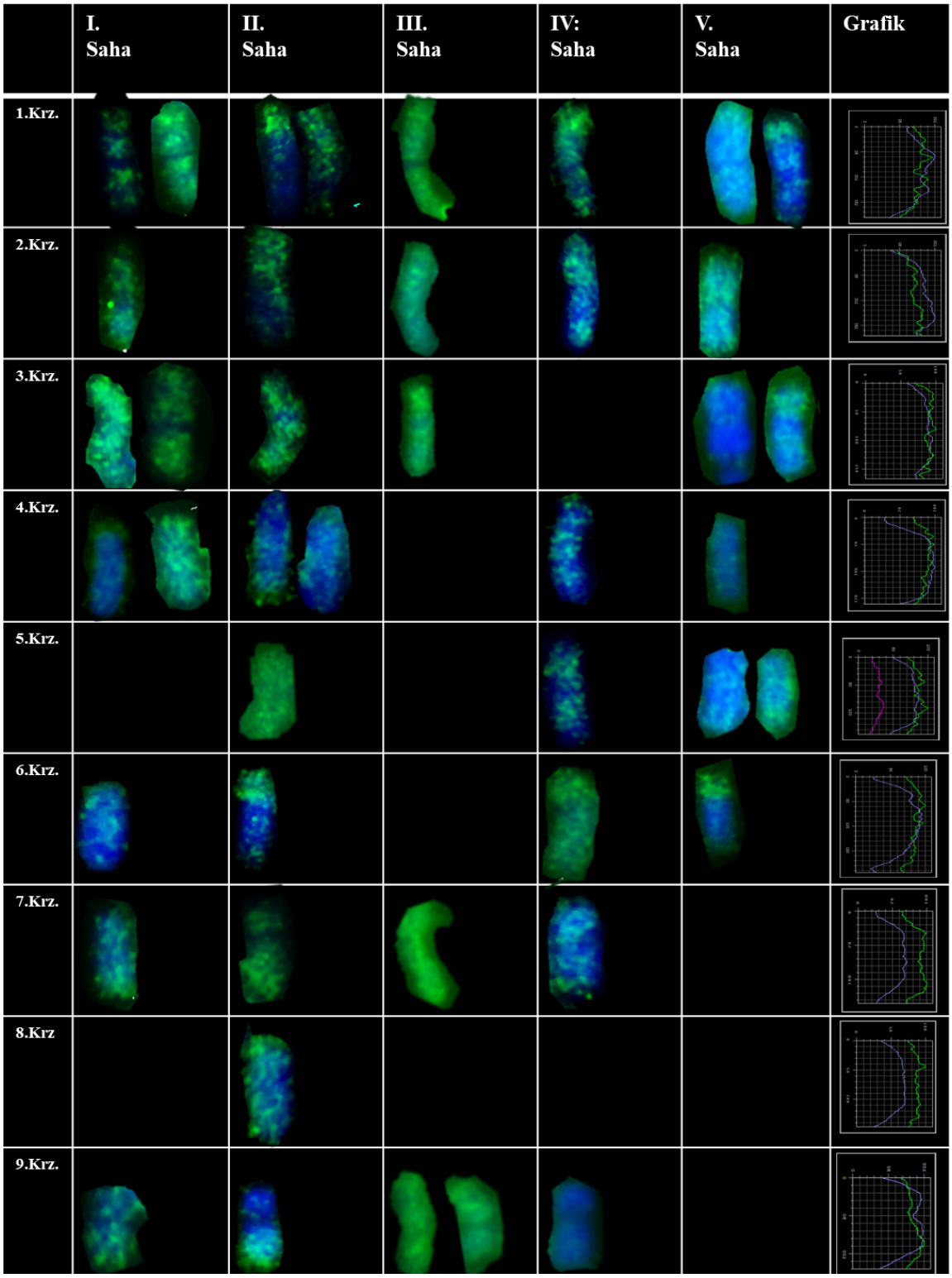
Şekil 4.74: Olgu VII'nin dört sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu VII'den PCC ile elde edilen interfaz sahalarından beş tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.75).** Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.76** ve **Şekil 4.77'**de gösterilmiştir**.**

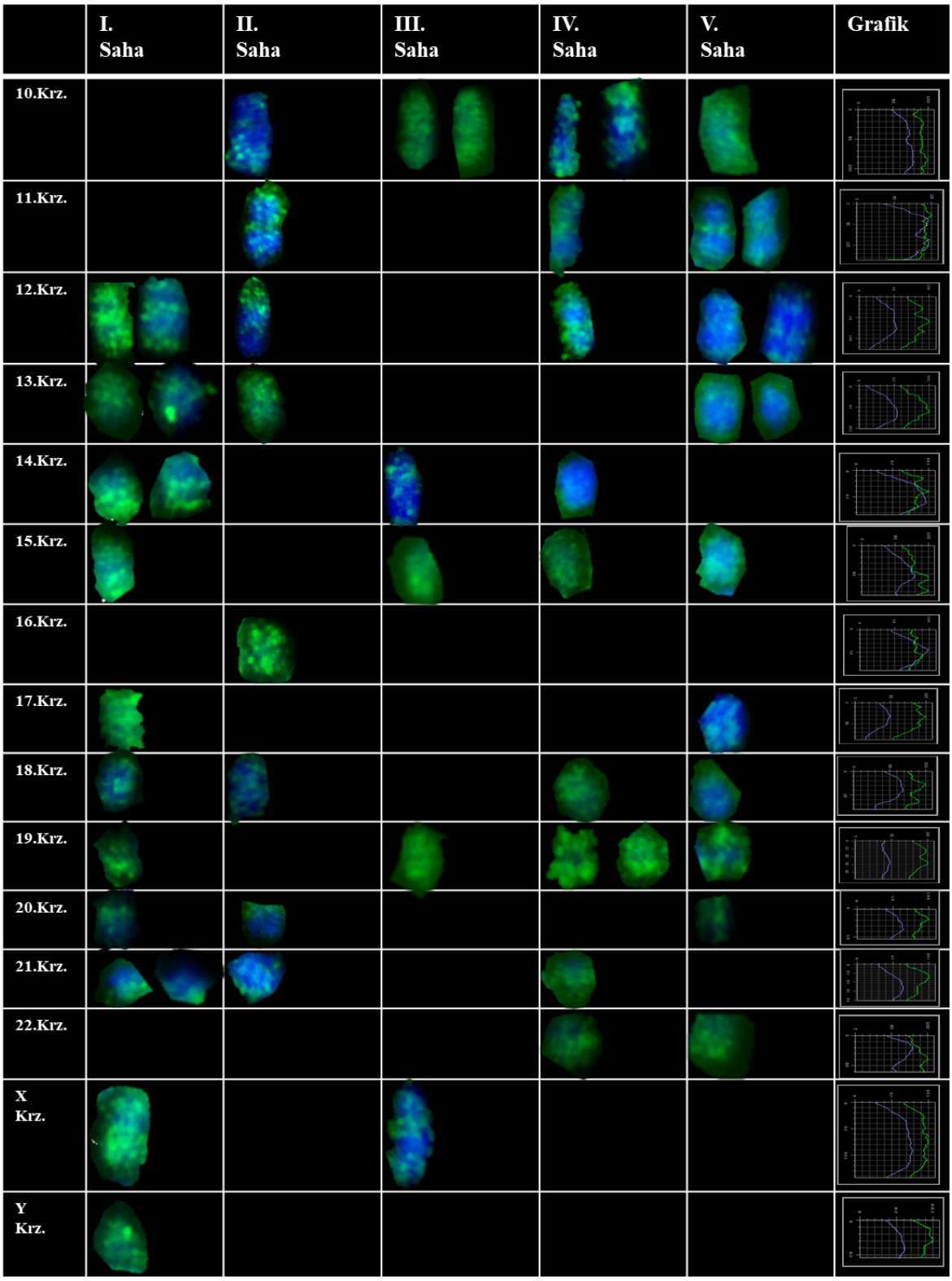


Şekil 4.75: Olgu VII'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.76: Olgu VII'nin beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.



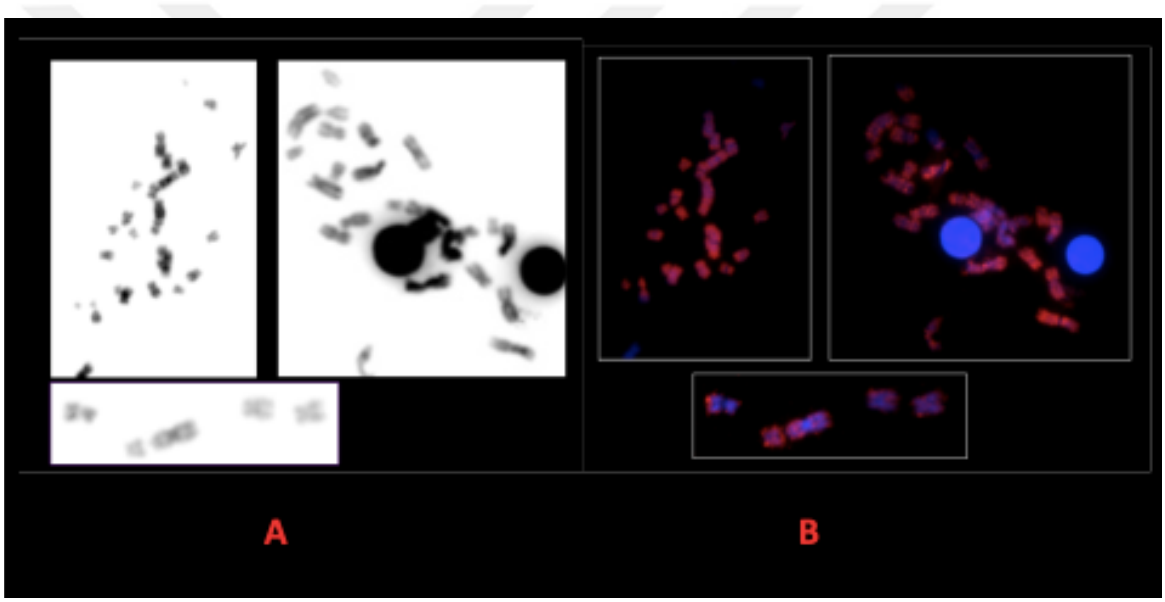
Şekil 4.77: Olgu VII'nin beş sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan Y'ye kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

4.1.8. Olgu VIII (C.K.)

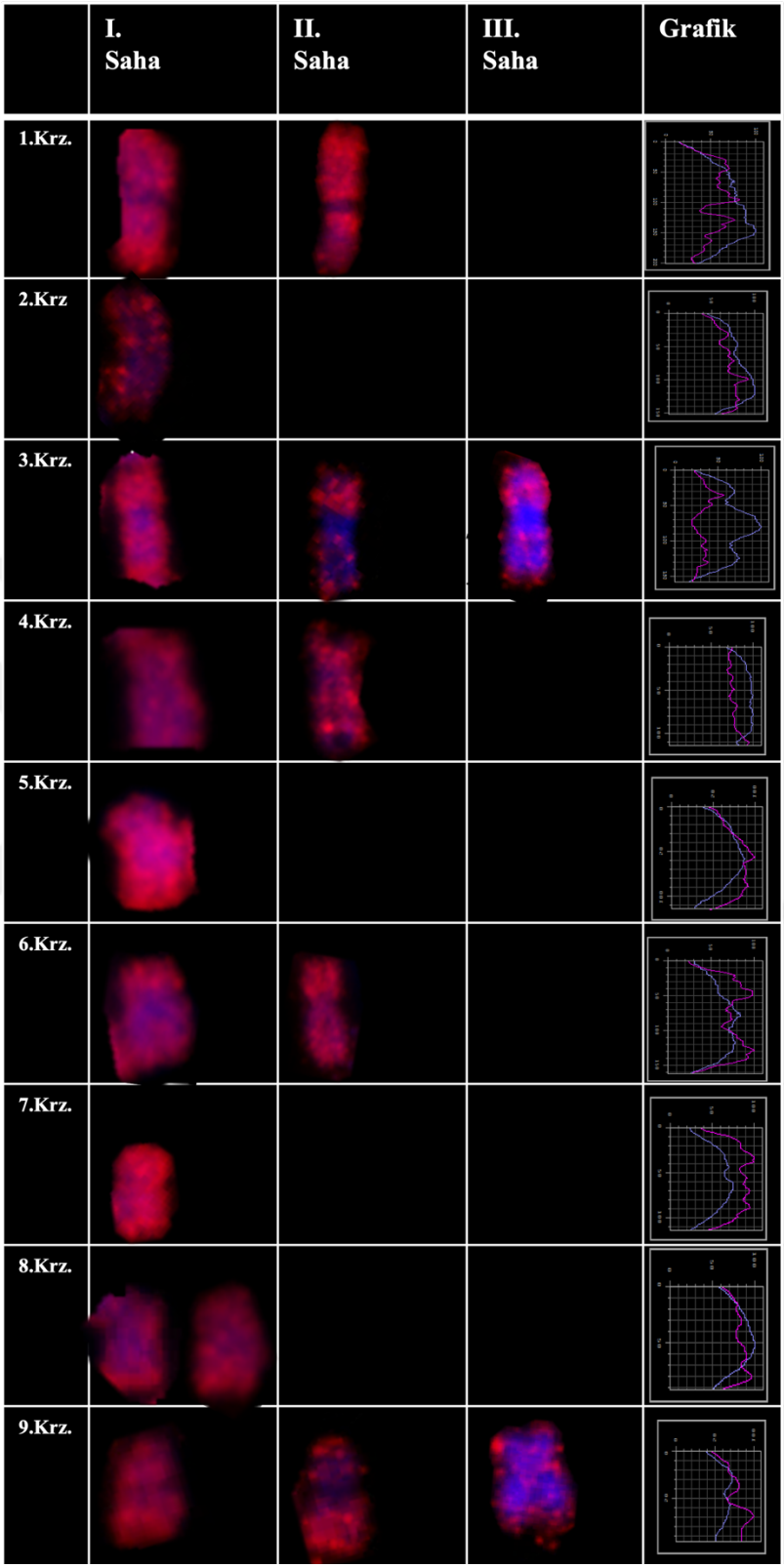
49 yaşındaki kadın gönüllüye ait G15159 No'lu kültürden elde edilen H3K27me3 ve H3K79me2 bulgularının görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

4.1.8.1. Olgu VIII Kromozomlarının H3K27me3 Bulguları

Olgu VIII'den elde edilen metafaz sahalarından üç tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.78).** Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.79** ve **Şekil 4.80**'de gösterilmiştir.

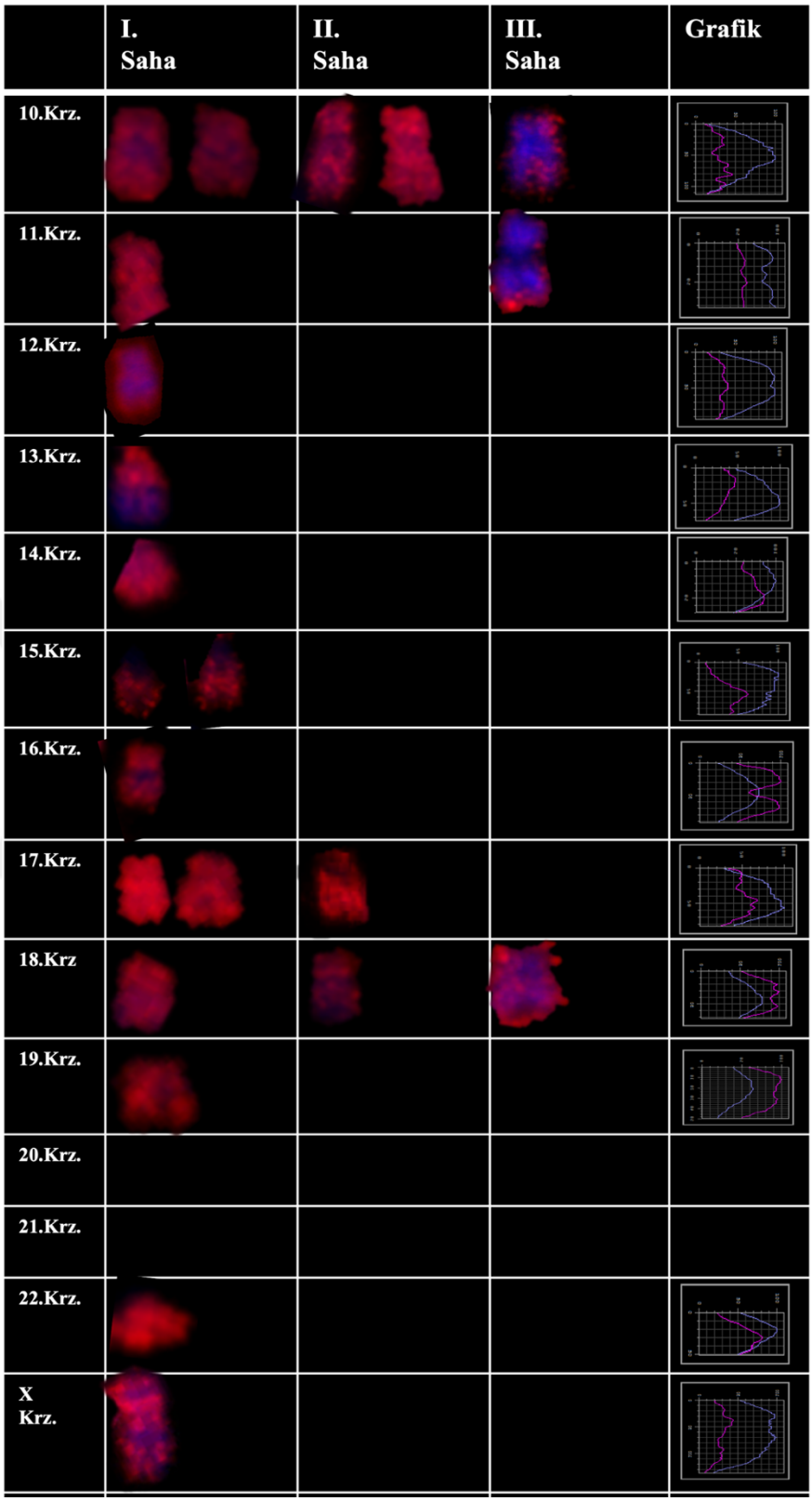


Şekil 4.78: Olgu VIII'den elde edilen metafaz kromozomlarında H3K27me3'ün immünfloresan görüntüleri
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



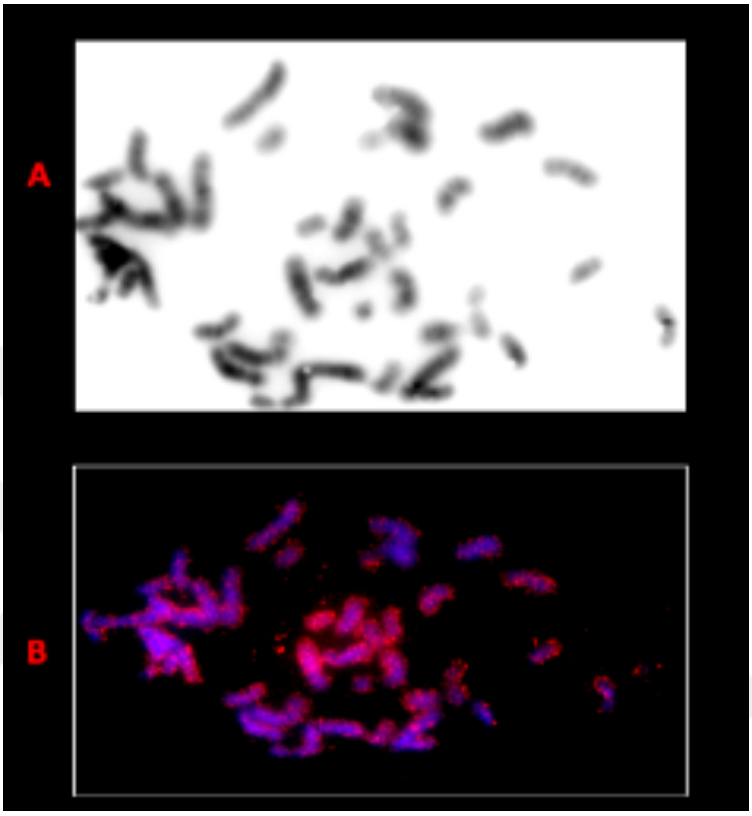
Şekil 4.79: Olgu VIII'in üç sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-1 (1'den 9'a kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)

Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.



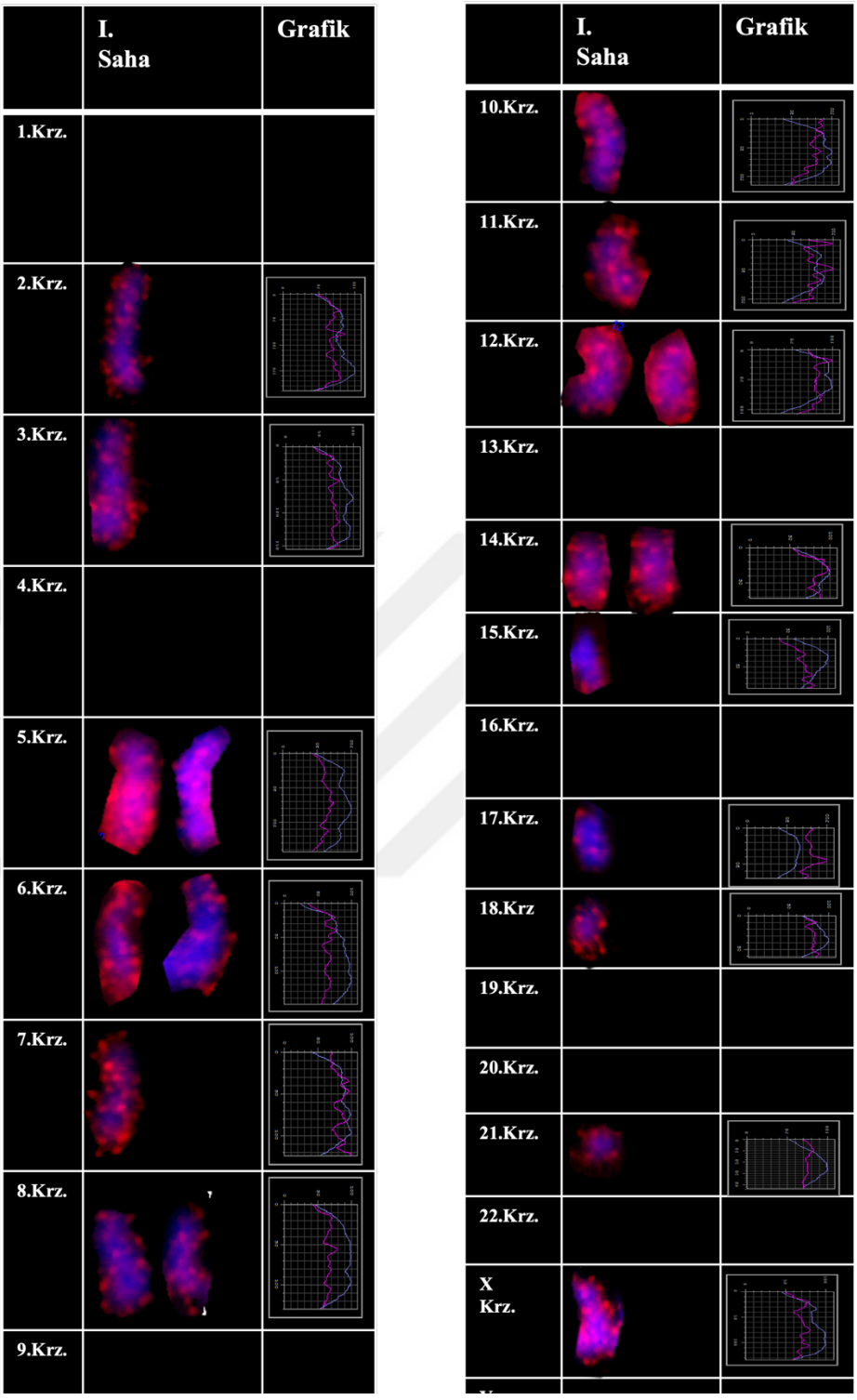
Şekil 4.80: Olgu VIII'in üç sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri-2 (10'dan X krozomzomuna kadar olan kromozomlar gösterilmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu VIII'den PCC ile elde edilen interfaz sahalarından bir tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.81)**. Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.82'**de gösterilmiştir**.**



Şekil 4.81: Olgu VIII'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri

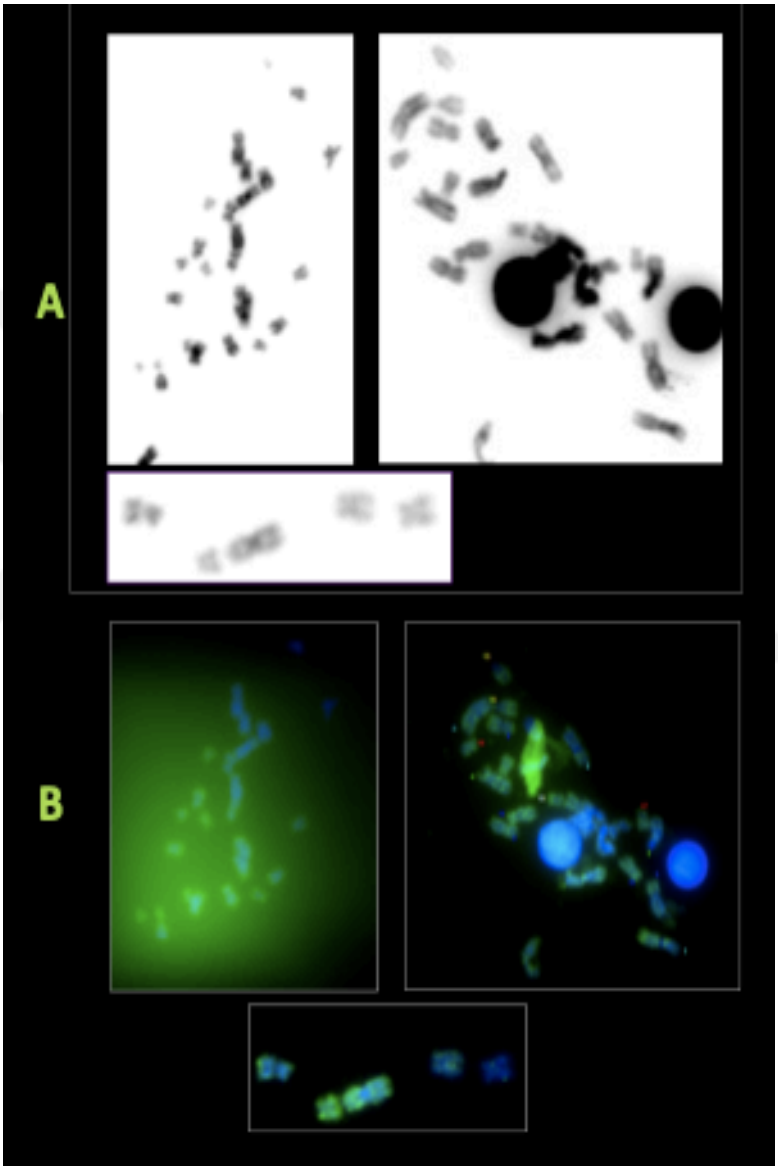
A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Fare antikoru ile H3K27me3'e karşı texas red ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk (Texas red) H3K27me3 bölgelerini göstermektedir.



Şekil 4.82: Olgu VIII'in bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K27me3 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar kromozomlar görüntülenmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, kırmızı renk H3K27me3 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K27me3 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, kırmızı renk H3K27me3 yoğunluğunu göstermektedir.

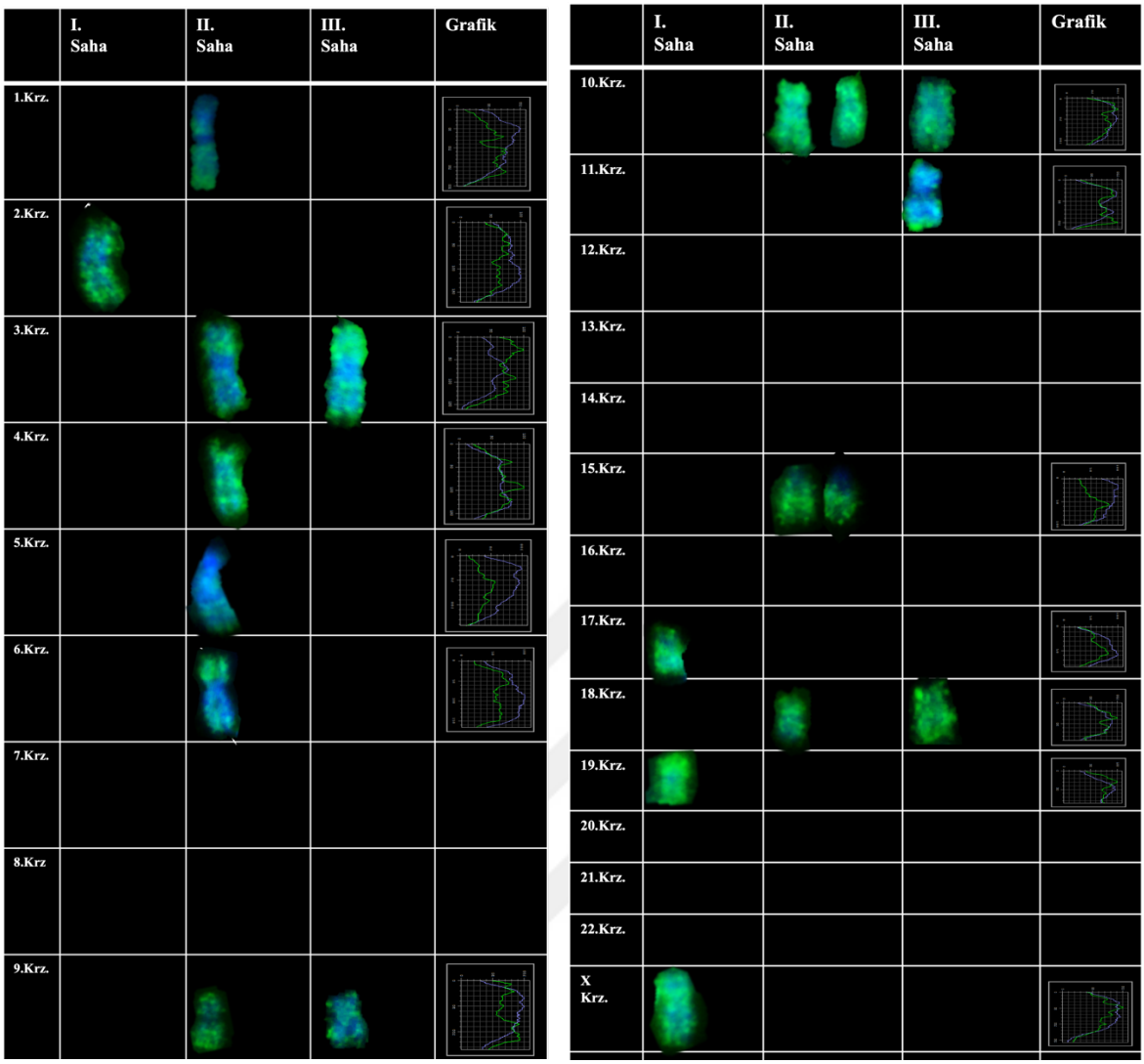
4.1.8.2. . Olgu VIII Kromozomlarının H3K79me2 Bulguları

Olgu VIII'den elde edilen metafaz sahalarından üç tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.83).** Bu sahalara ait bulgular **Şekil 4.84**'de gösterilmiştir.



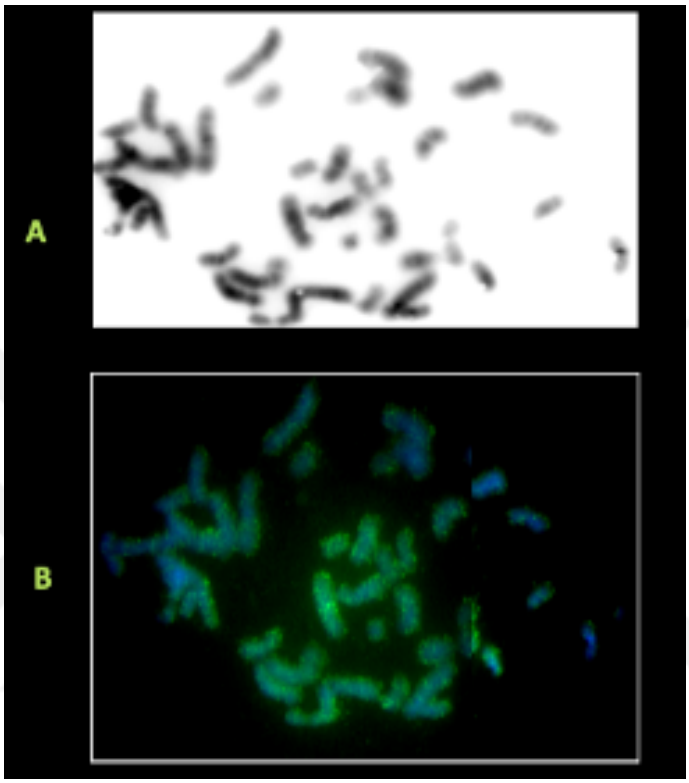
Şekil 4.83: Olgu VIII'den elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış metafaz kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



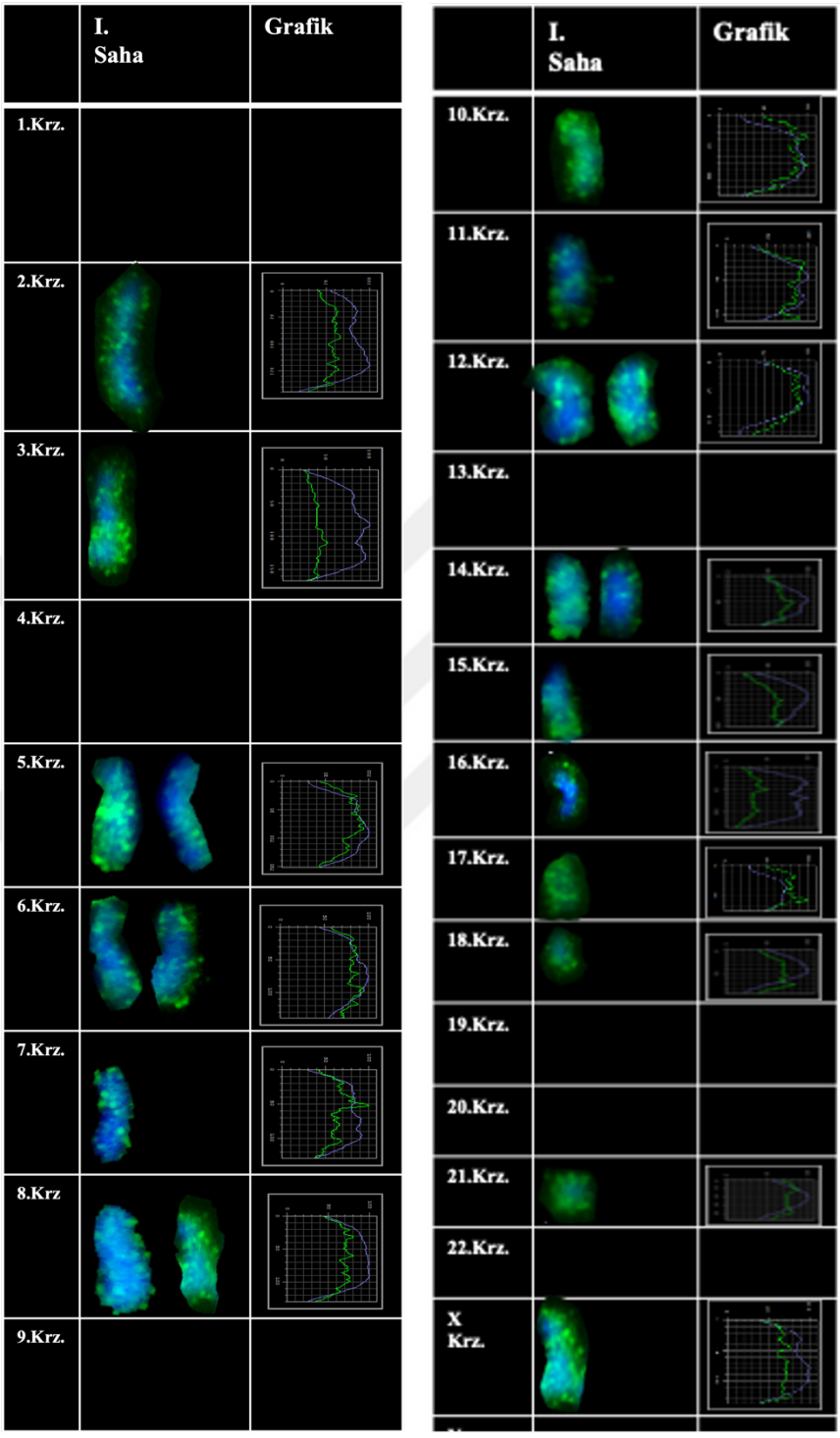
Şekil 4.84: Olgu VIII'in üç sahasından elde edilen metafaz kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar kromozomlar görüntülenmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

Olgu VIII'den PCC ile elde edilen interfaz sahalarından bir tanesi değerlendirmeye uygun bulundu **(Şekil 4.84).** Bu sahaya ait bulgular **Şekil 4.64**'te gösterilmiştir**.**



Şekil 4.85: Olgu VIII'den PCC ile elde edilen interfaz kromozomlarında H3K79me2'nin immünfloresan görüntüleri

A. Sahaların ters DAPI görüntüleri B. Tavşan antikoru ile H3K79me2'ye karşı FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile immün boyama yapılmış PCC kromozom yaymaları- Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk (FITC) H3K79me2 bölgelerini göstermektedir.



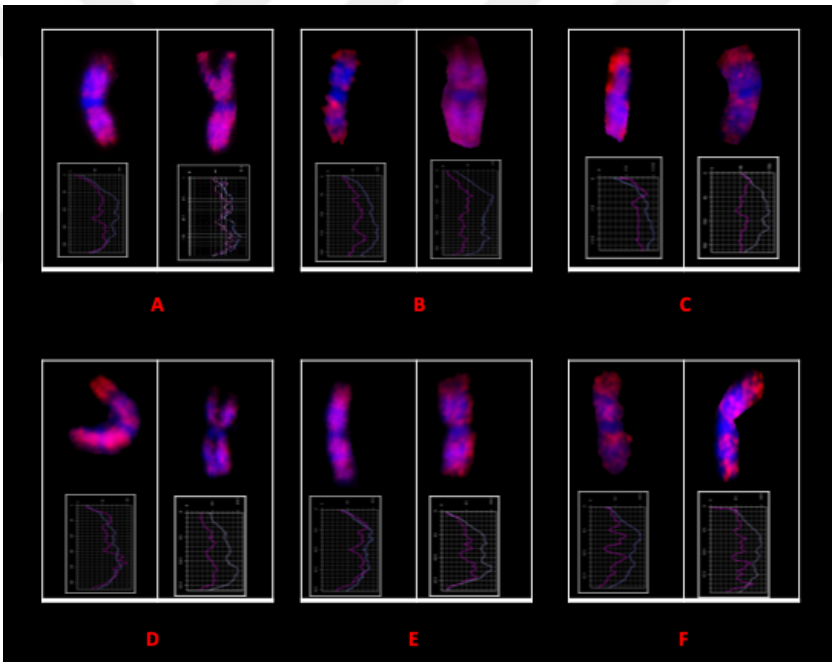
Şekil 4.86: Olgu VIII'in bir sahasından elde edilen PCC kromozomlarının H3K79me2 immünfloresan görüntüleri (1'den X'e kadar kromozomlar görüntülenmiştir.)
Mavi renk DAPI boyalı kromozom alanlarını, yeşil renk H3K79me2 bölgelerini göstermektedir. Grafikler, kromozomun p kolundan q koluna kadar olan H3K79me2 yerleşimlerinin yoğunluk grafiğidir. Mavi çizgiler DAPI yoğunluğunu, yeşil renk H3K79me2 yoğunluğunu göstermektedir.

4.2. OLGULARIN İNTERFAZ-METAFAZ KARŞILAŞTIRMASI

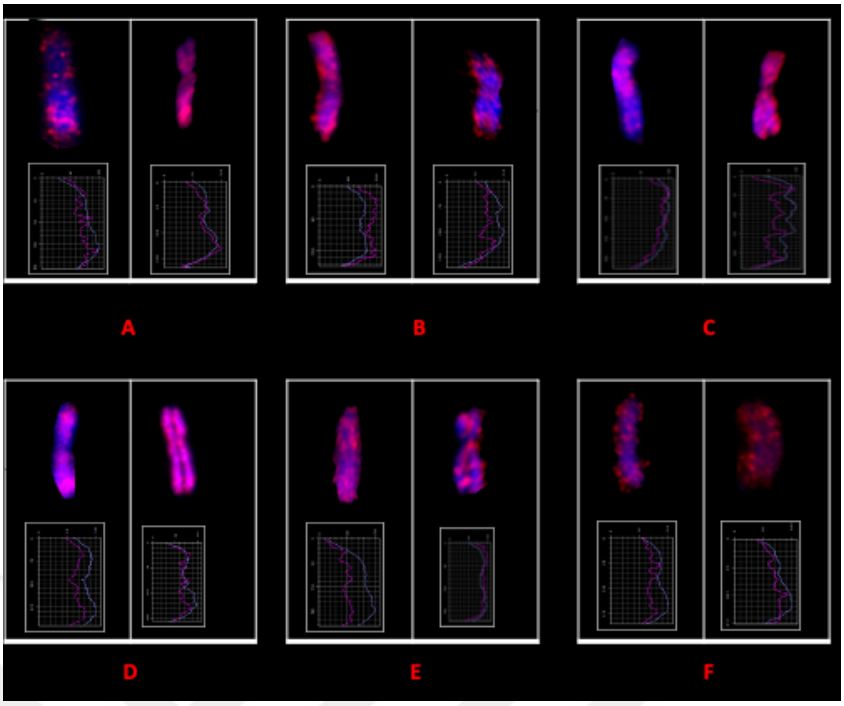
Bu bölümde önce H3K27me3, ardından H3K79me2 bant paternleri interfaz ve matefaz kromozomlarında karşılaştırılmıştır.

4.2.1. İnterfaz- Metafaz Kromozomlarındaki H3K27me3 Dağılımı

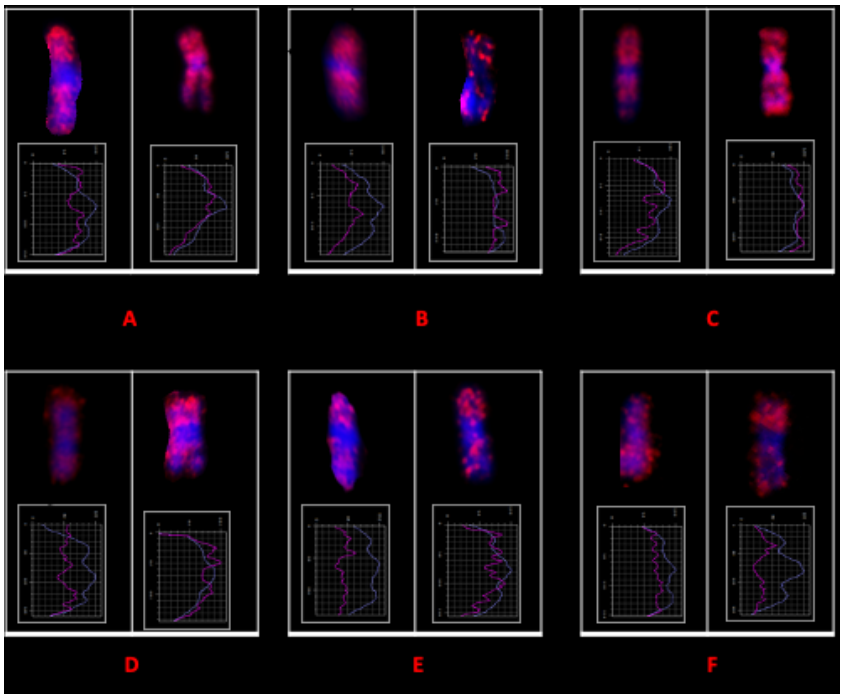
Olguların H3K27me3 açısından interfaz ve metafaz kromozomlarının karşılaştırması **Şekil 4.87- 4.110'da** gösterilmiştir.



Şekil 4.87: Olguların 1. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. I. Olgu, B. II. Olgu, C. III. Olgu, D. V. Olgu, E. VI. Olgu, F. VII. Olgu

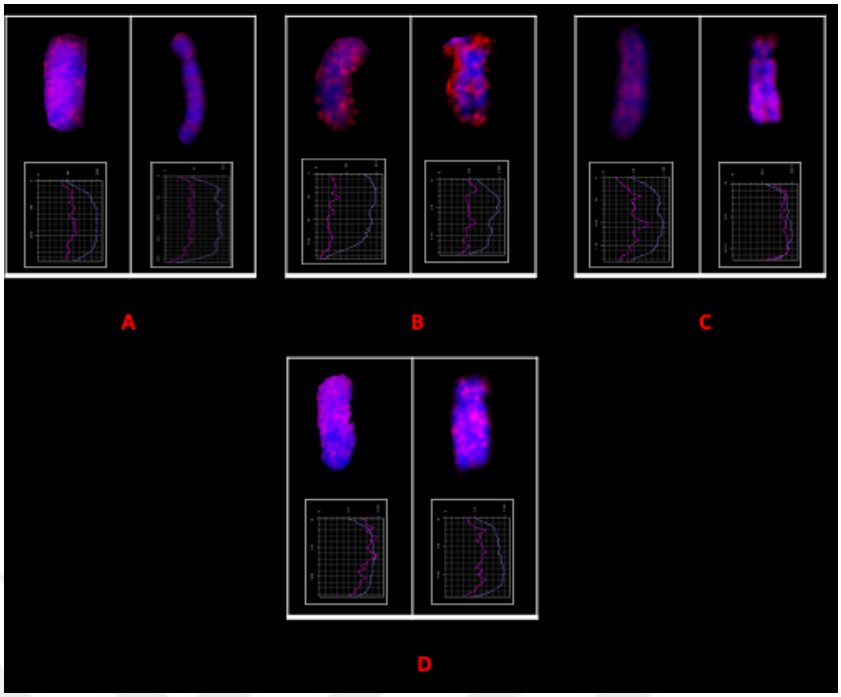


Şekil 4.88: Olguların 2. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II Olgu, B. III. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu, F. VIII. Olgu

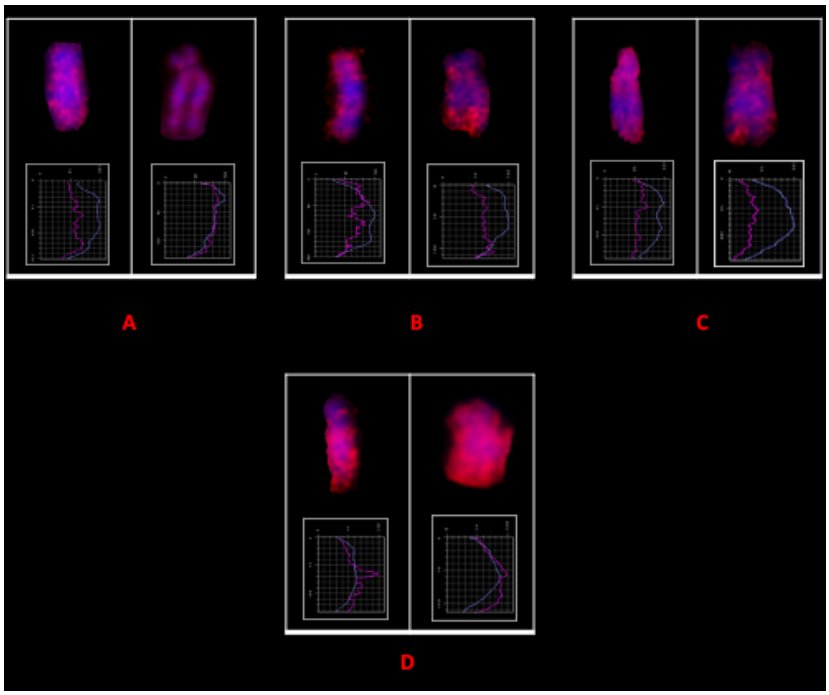


Şekil 4.89: Olguların 3. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)

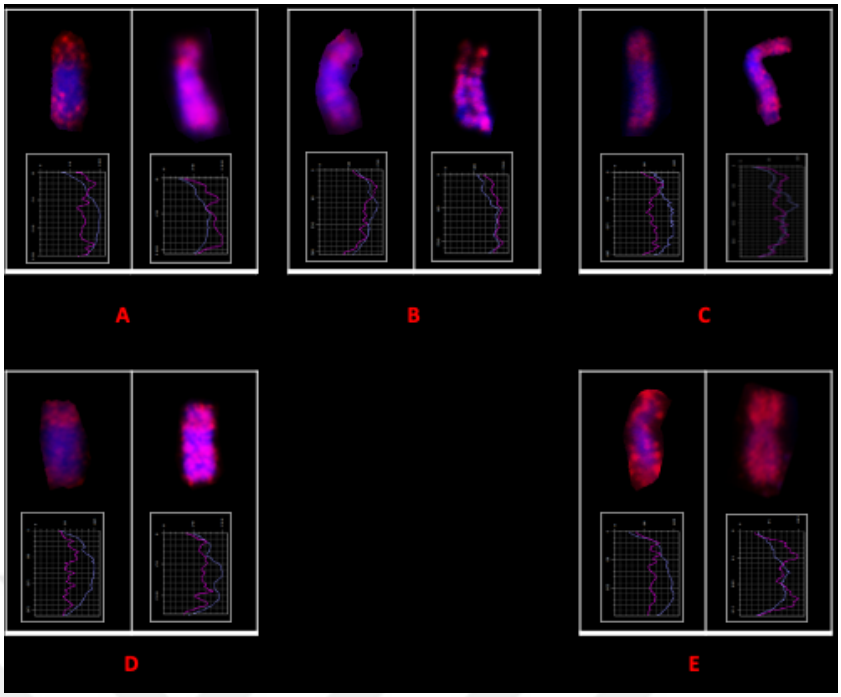
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. IV. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu, F. VIII. Olgu



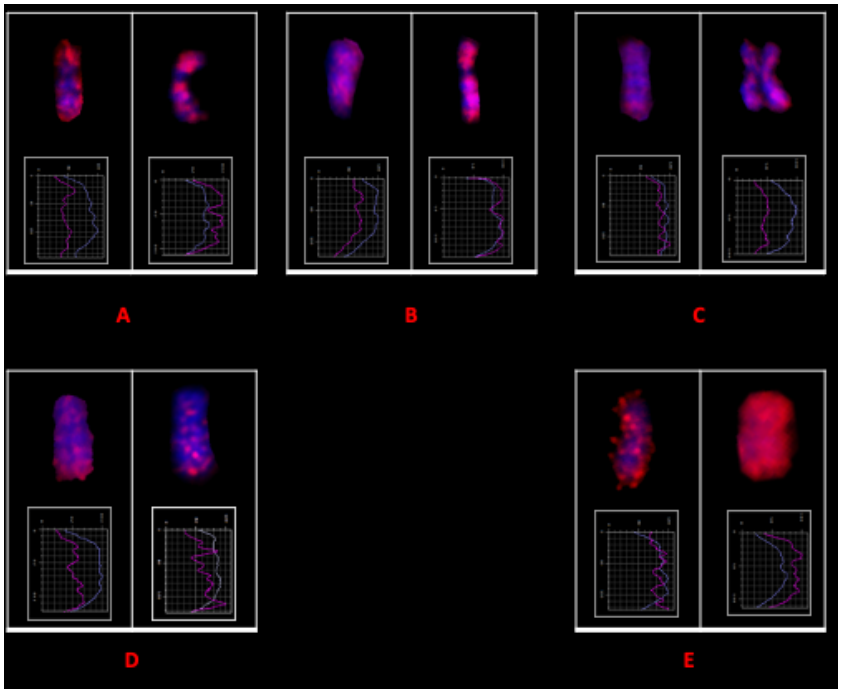
Şekil 4.90: Olguların 4. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II Olgu, B. III. Olgu, C. V. Olgu, D. VII. Olgu



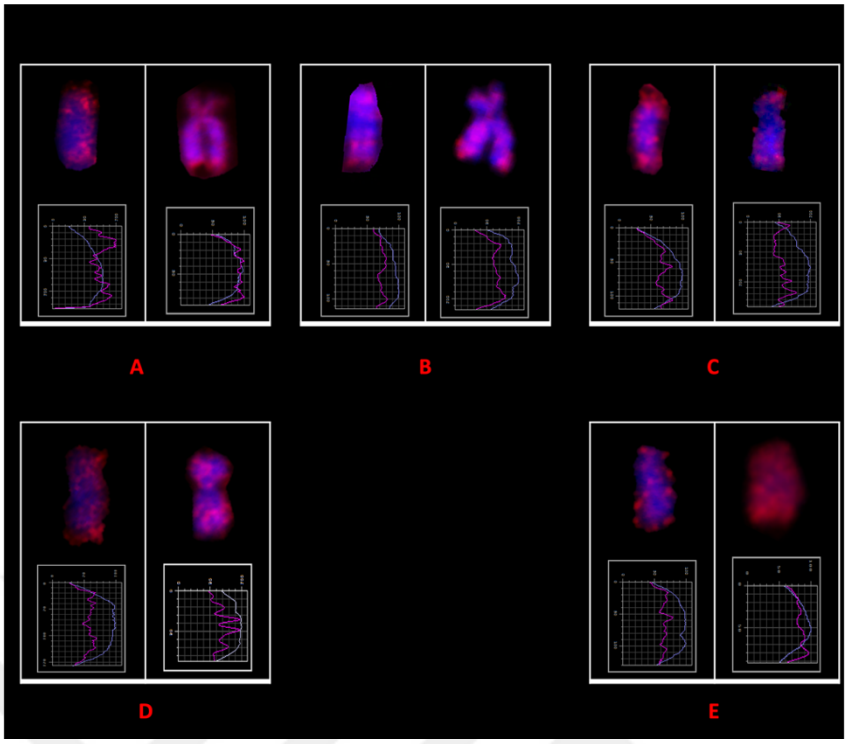
Şekil 4.91: Olguların 5. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. VI. Olgu, C. VII. Olgu, D. VIII. Olgu



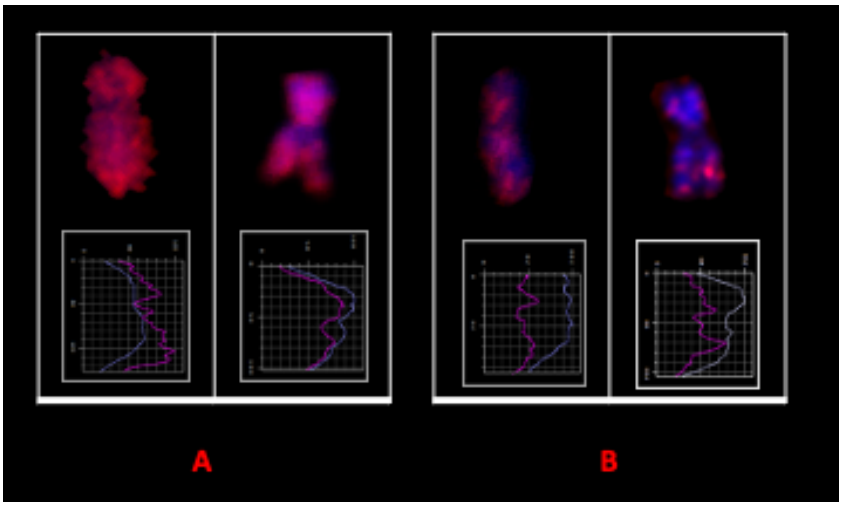
Şekil 4.92: Olguların 6. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II Olgu, B. V. Olgu, C. VI. Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



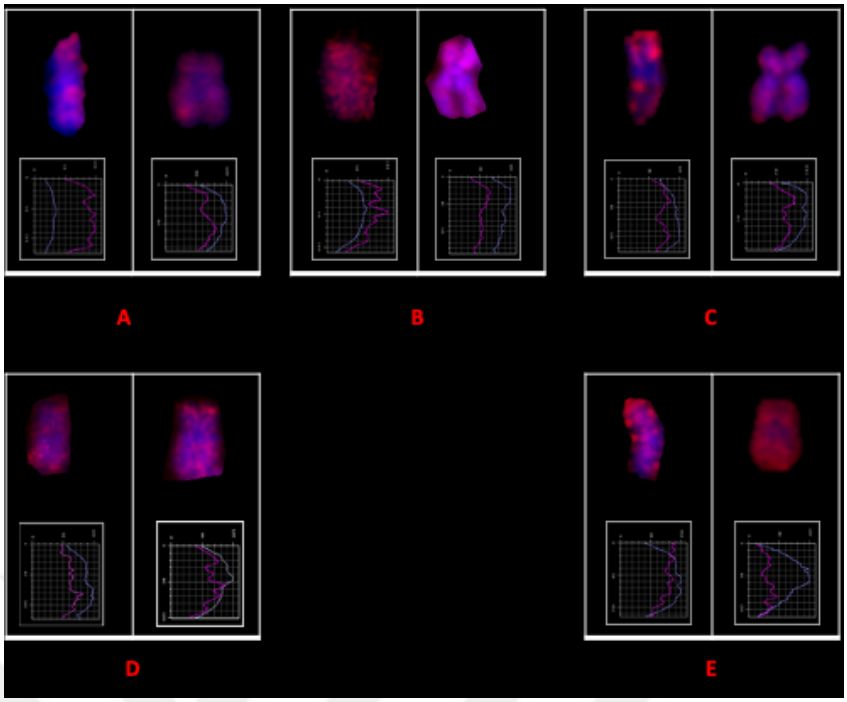
Şekil 4.93: Olguların 7. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. IV. Olgu, C. V. Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



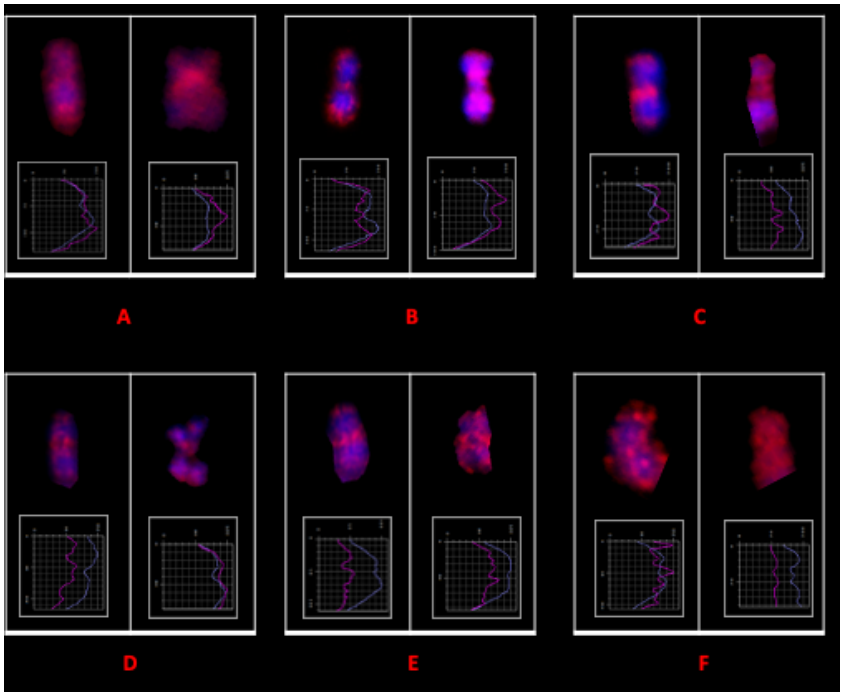
Şekil 4.94: Olguların 8. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. V. Olgu, C. VI. Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



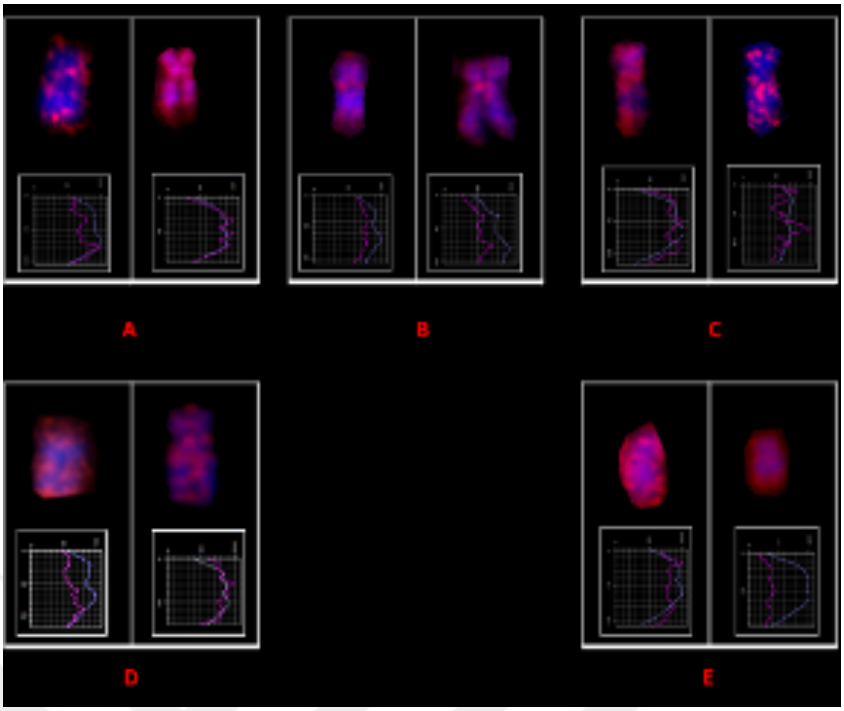
Şekil 4.95: Olguların 9. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II Olgu, B. VII. Olgu



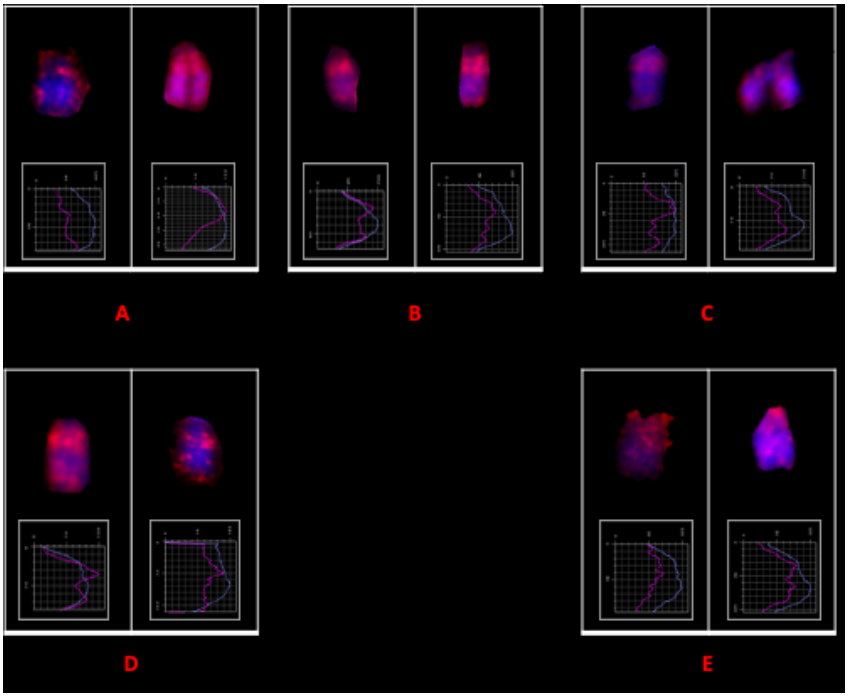
Şekil 4.96: Olguların 10. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. I Olgu, B. II. Olgu, C. V. Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



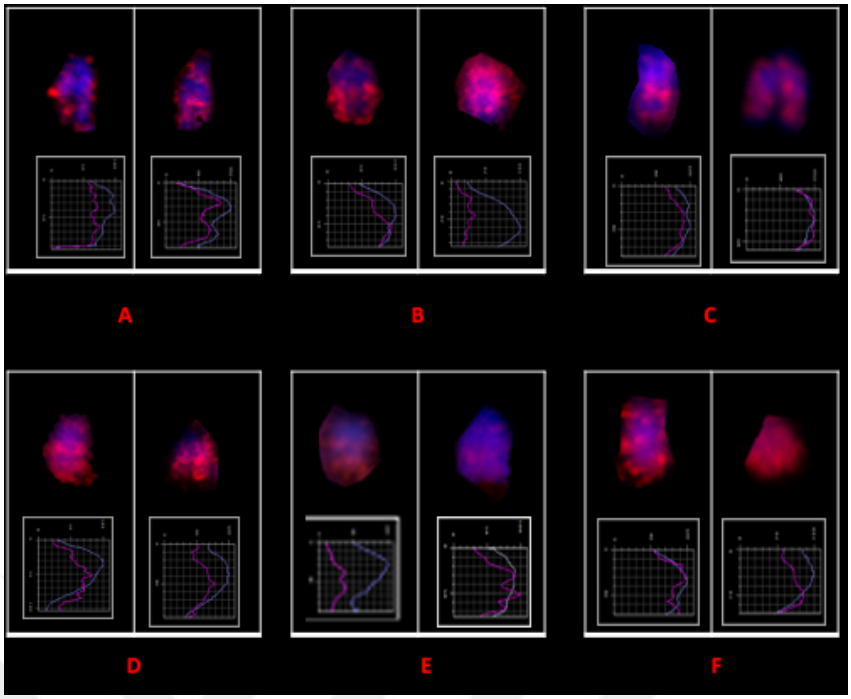
Şekil 4.97: Olguların 11. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. I Olgu, B. II. Olgu, C. III. Olgu, D. V. Olgu, E. VI. Olgu, F. VIII. Olgu



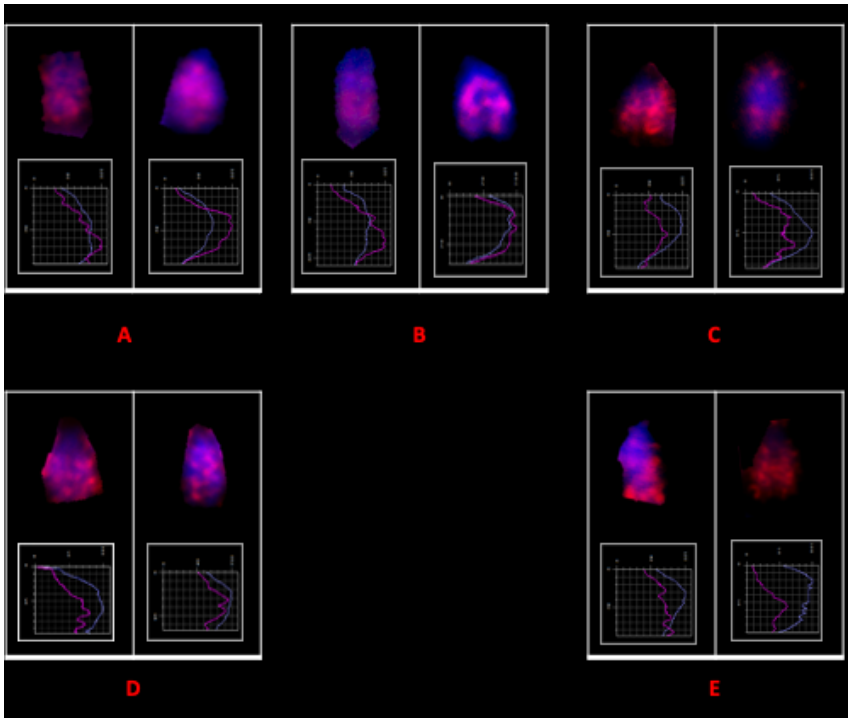
Şekil 4.98: Olguların 12. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. I. Olgu, B. V. Olgu, C. VI. Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



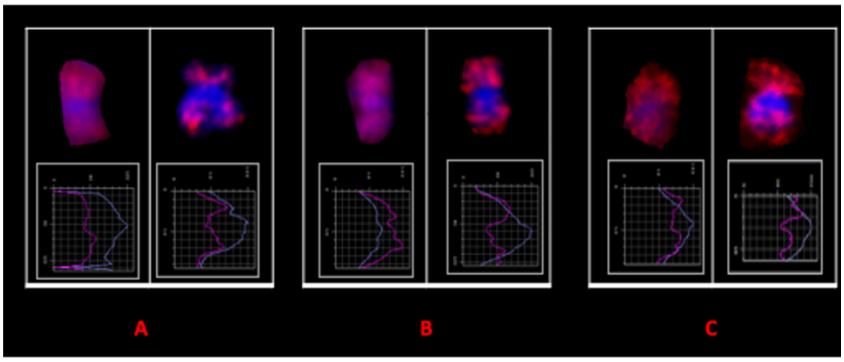
Şekil 4.99: Olguların 13. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. III. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu



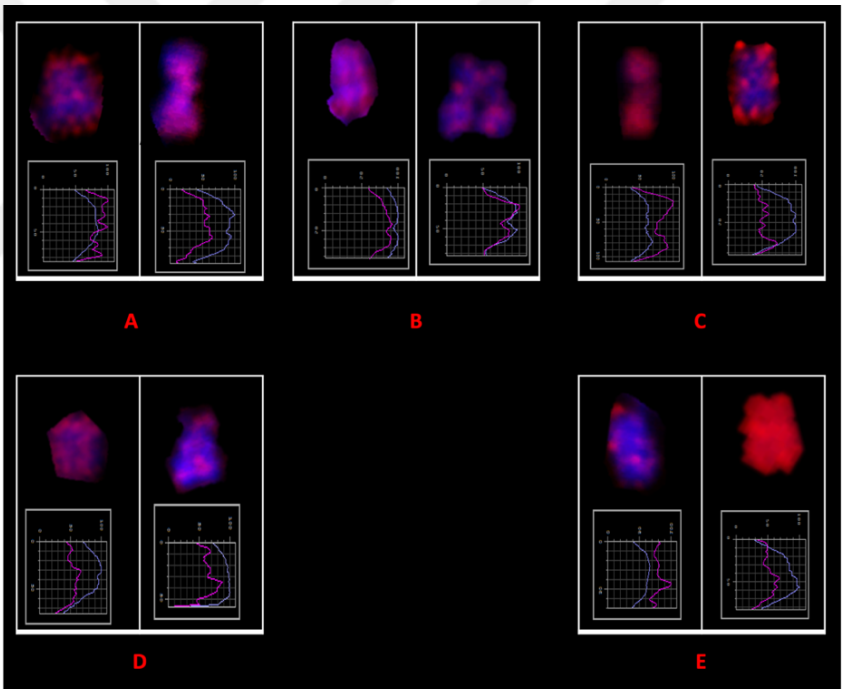
Şekil 4.100: Olguların 14. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. III. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu, F. VIII. Olgu



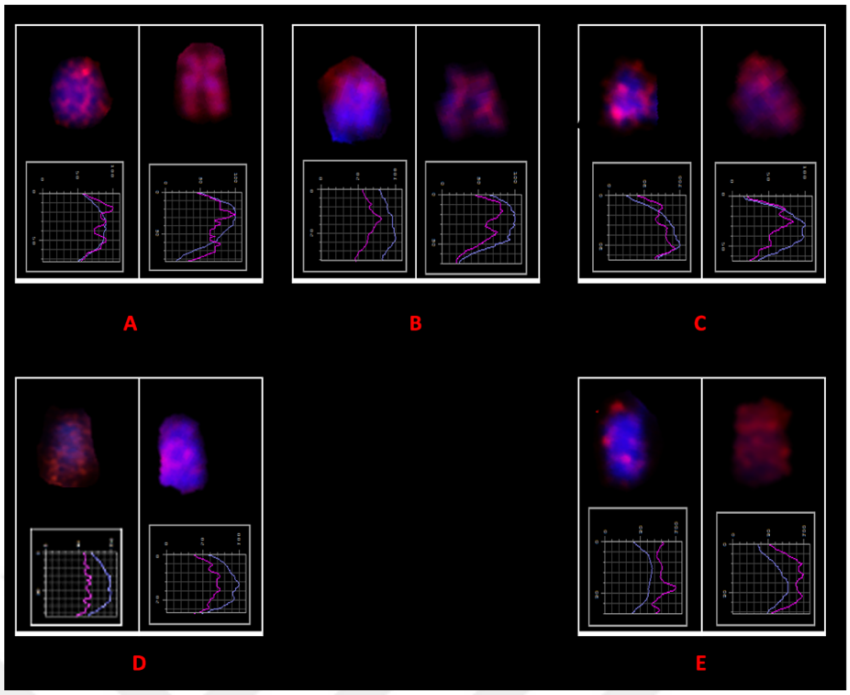
Şekil 4.101: Olguların 15. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. V. Olgu, C. VI. Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



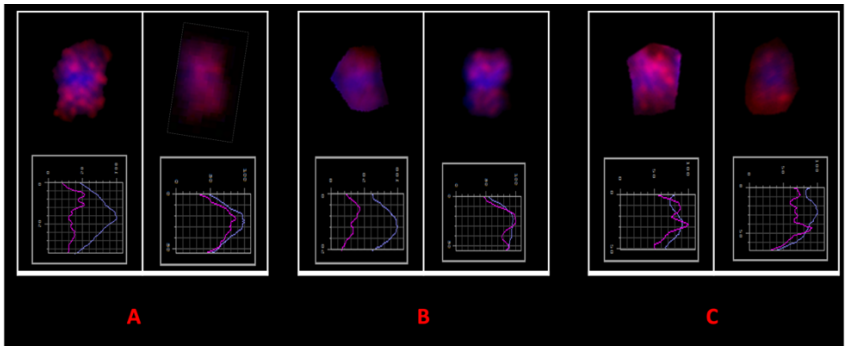
Şekil 4.102: Olguların 16. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. V. Olgu, B. VI. Olgu, C. VII. Olgu



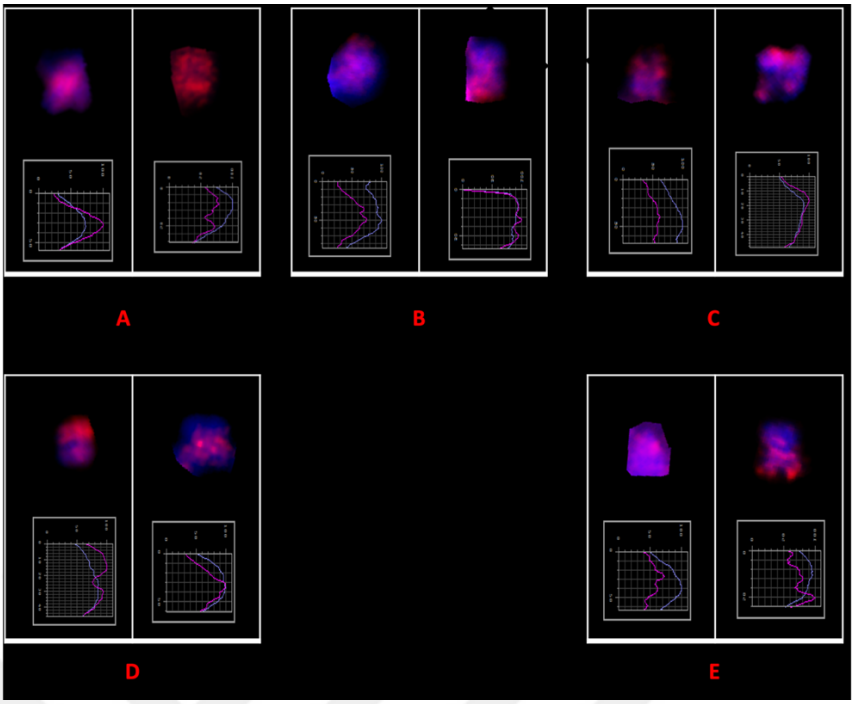
Şekil 4.103: Olguların 17. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. V. Olgu, C. VI. Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



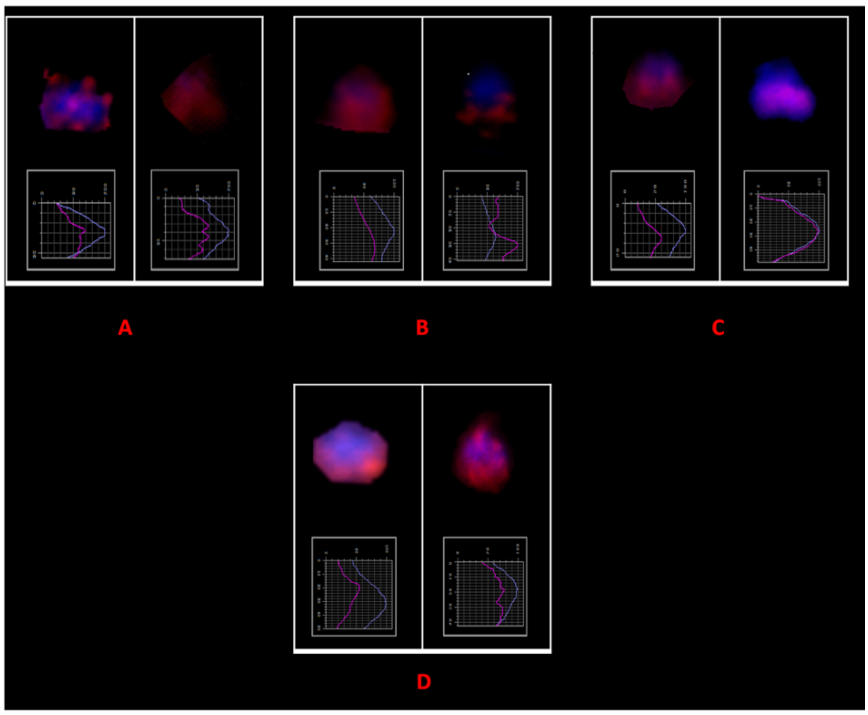
Şekil 4.104: Olguların 18. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. V. Olgu, C. VI. Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



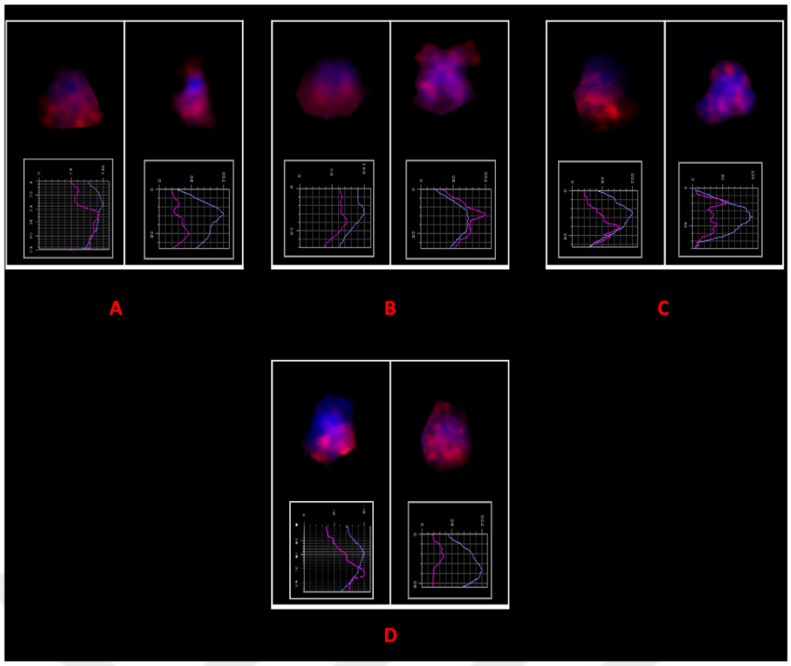
Şekil 4.105: Olguların 19. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. V. Olgu, C. VI. Olgu



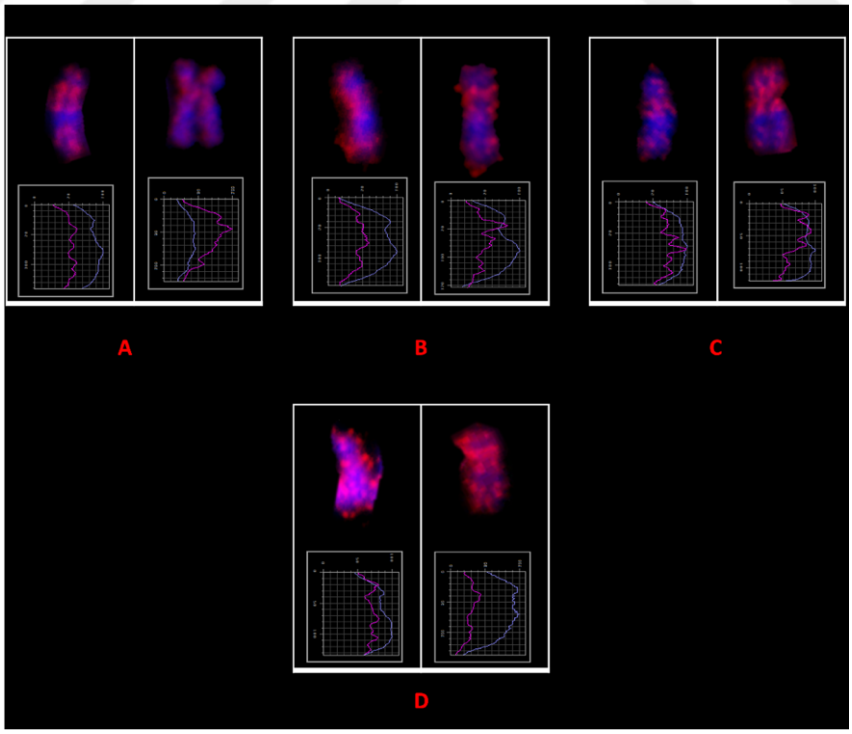
Şekil 4.106: Olguların 20. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. IV. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu



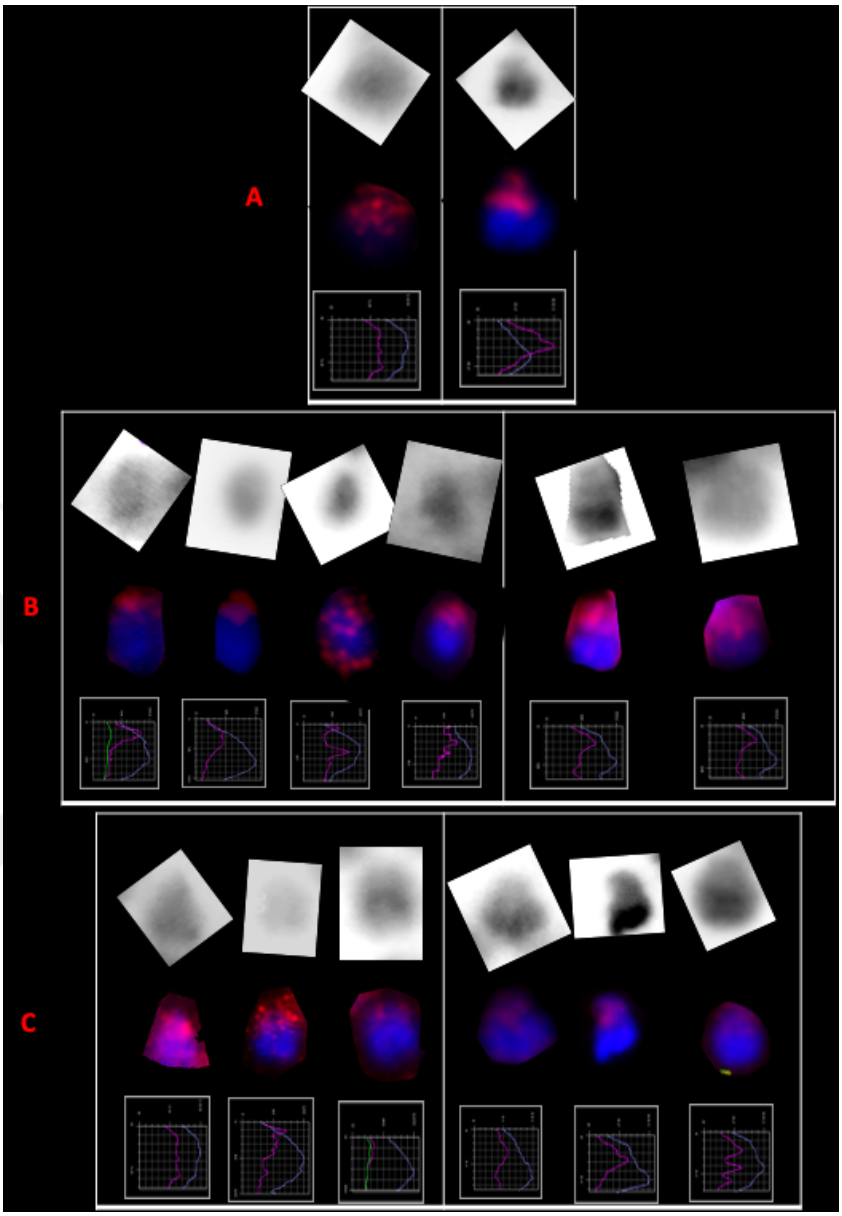
Şekil 4.107: Olguların 21. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. V. Olgu, D. VII. Olgu



Şekil 4.108: Olguların 22. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.V. Olgu, C. VI. Olgu, D. VII. Olgu



Şekil 4.109: Olguların X Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. V. Olgu, B.VI. Olgu, C. VII. Olgu, D. VIII. Olgu

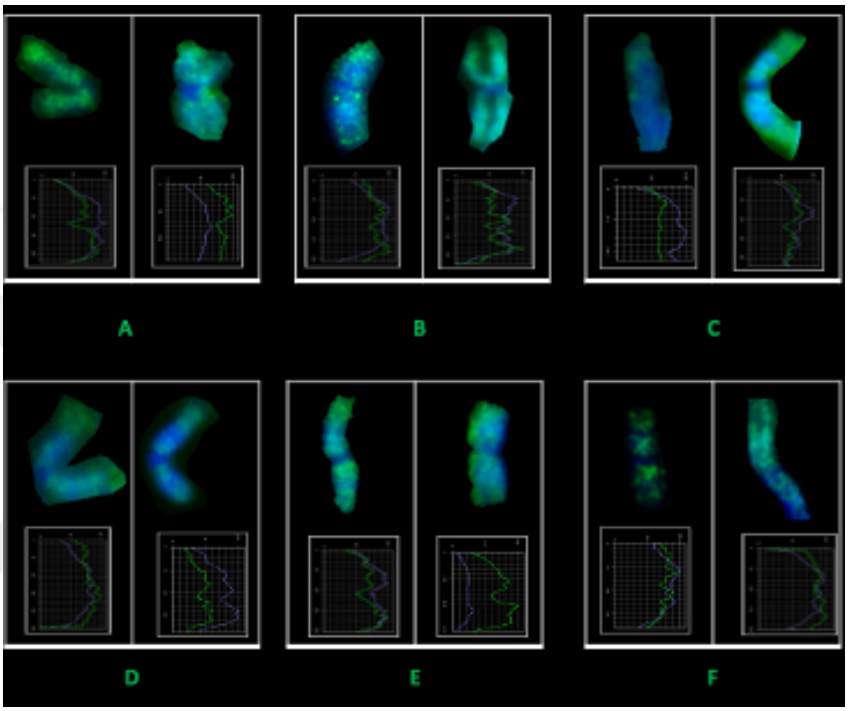


Şekil 4.110: Olguların Y Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K27me3)

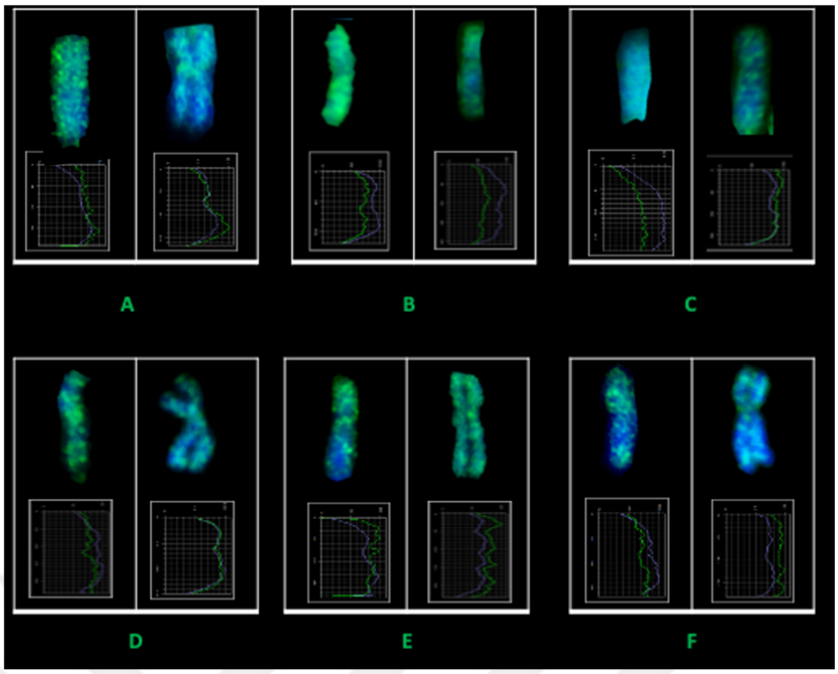
Her kutucuğun solundaki kromozomlar interfaz, sağındaki kromozomlar metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. VII. Olgu

4.2.2. İnterfaz-Metafaz Kromozomlarının H3K79me2 Dağılımı

Olguların H3K79me2 açısından interfaz ve metafaz kromozomlarının karşılaştırması **Şekil 4.111- 4.134'te** gösterilmiştir.

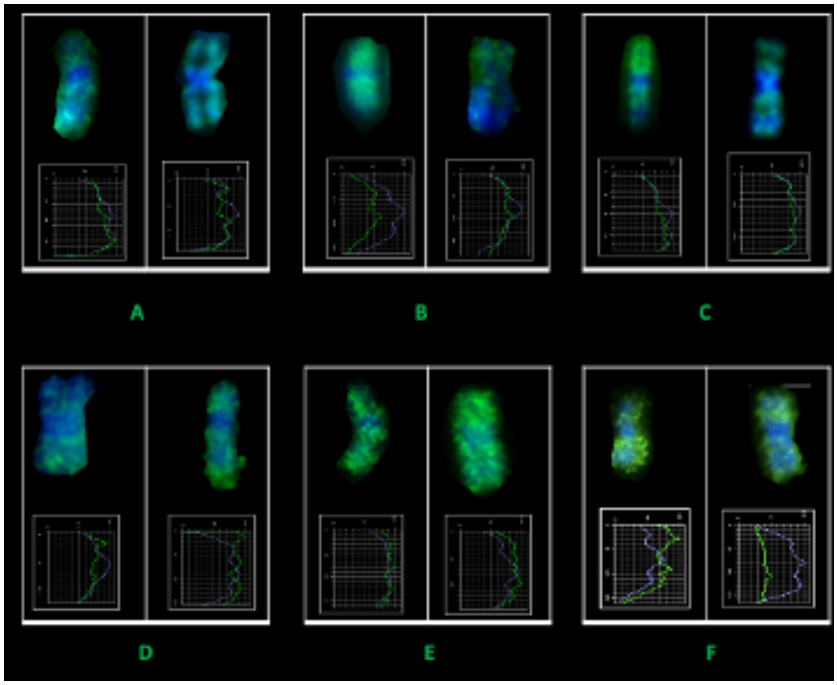


Şekil 4.111: Olguların 1. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. I. Olgu, B.II. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu, F. VIII. Olgu



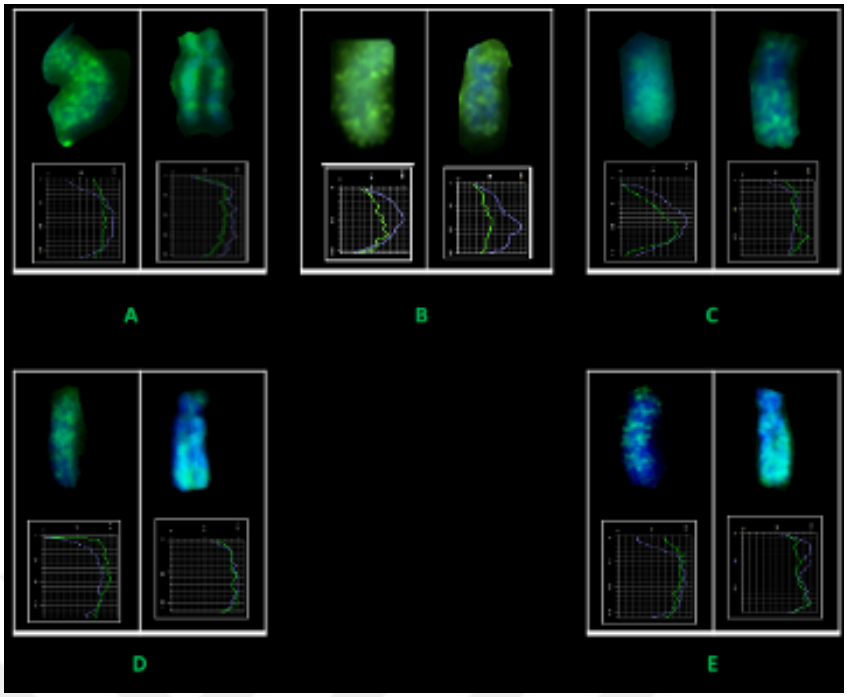
Şekil 4.112: Olguların 2. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)

Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. IV. Olgu, D. V. Olgu, E. VI. Olgu, F. VII. Olgu

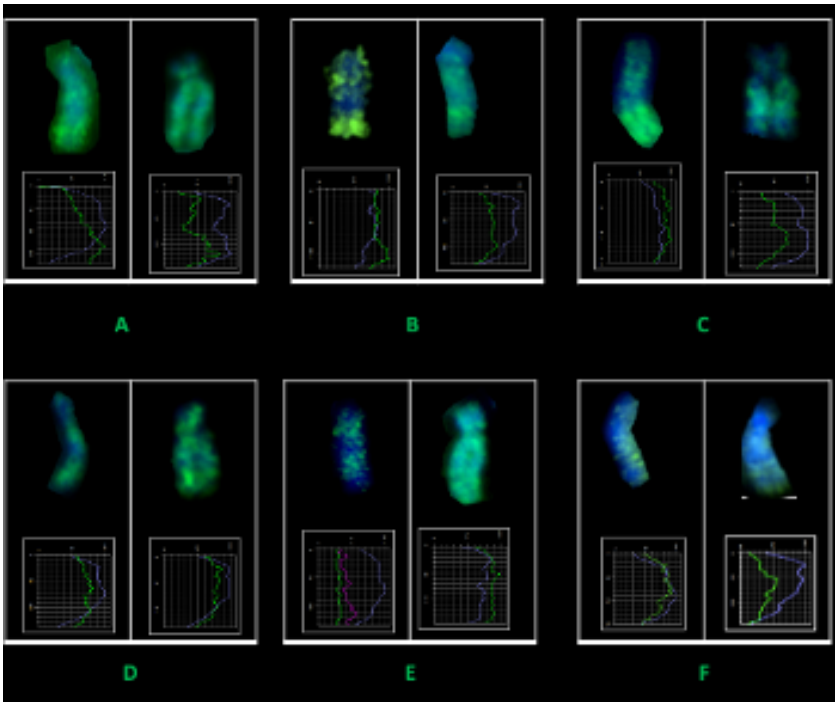


Şekil 4.113: Olguların 3. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)

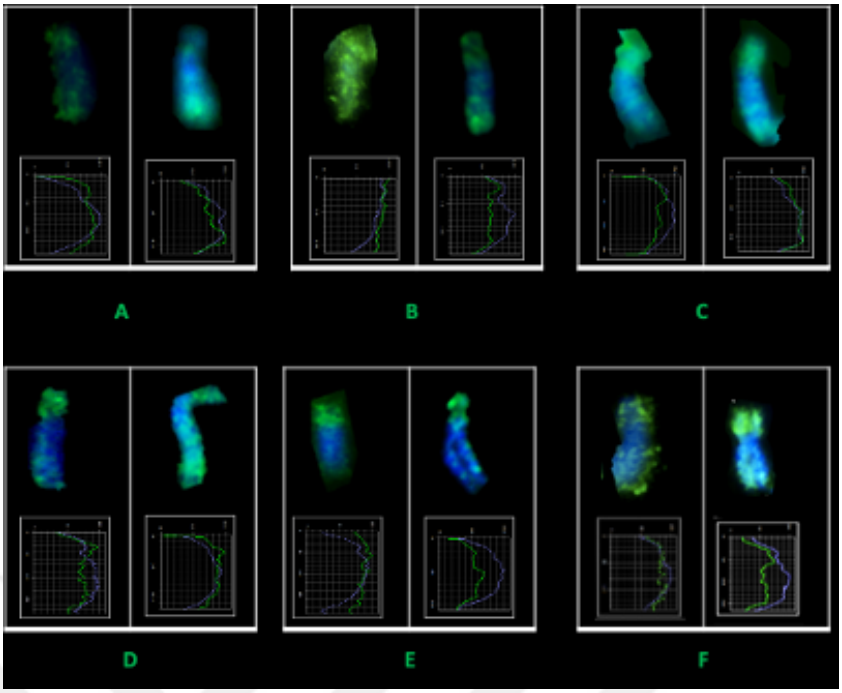
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.IV. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu, F. VIII. Olgu



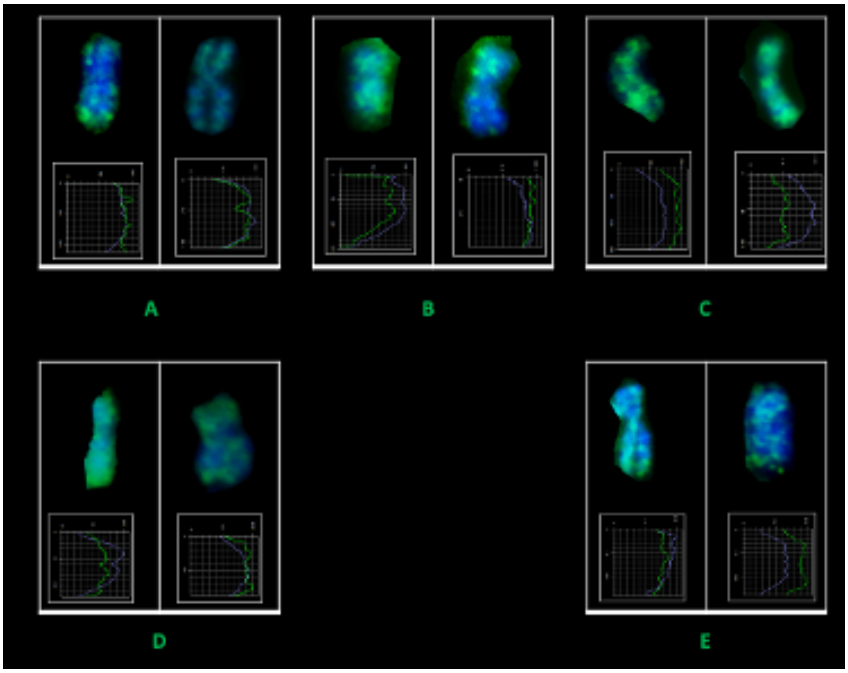
Şekil 4.114: Olguların 4. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. IV. Olgu, D. V. Olgu, E. VII. Olgu



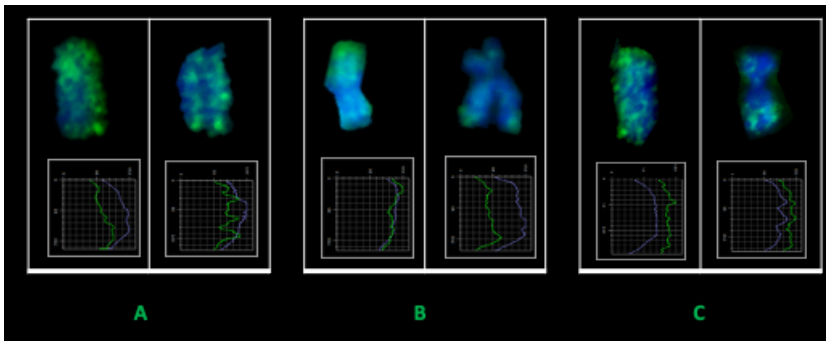
Şekil 4.115: Olguların 5. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu, F. VIII. Olgu



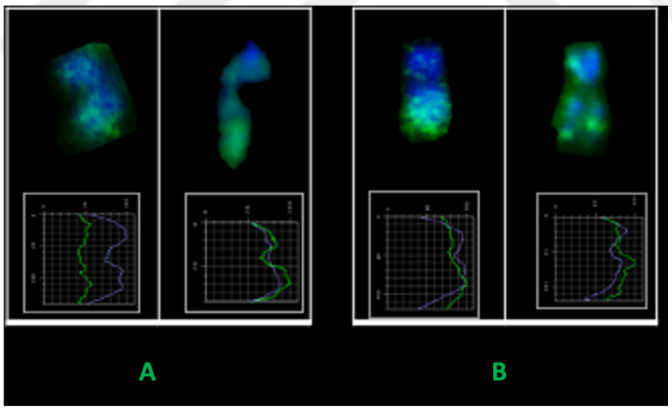
Şekil 4.116: Olguların 6. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu, F. VIII. Olgu



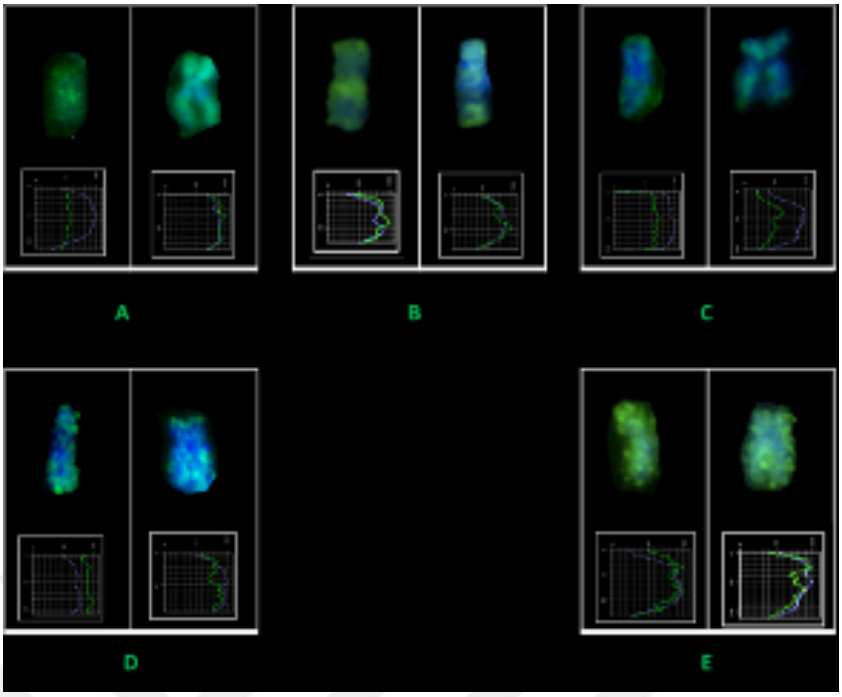
Şekil 4.117: Olguların 7. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu



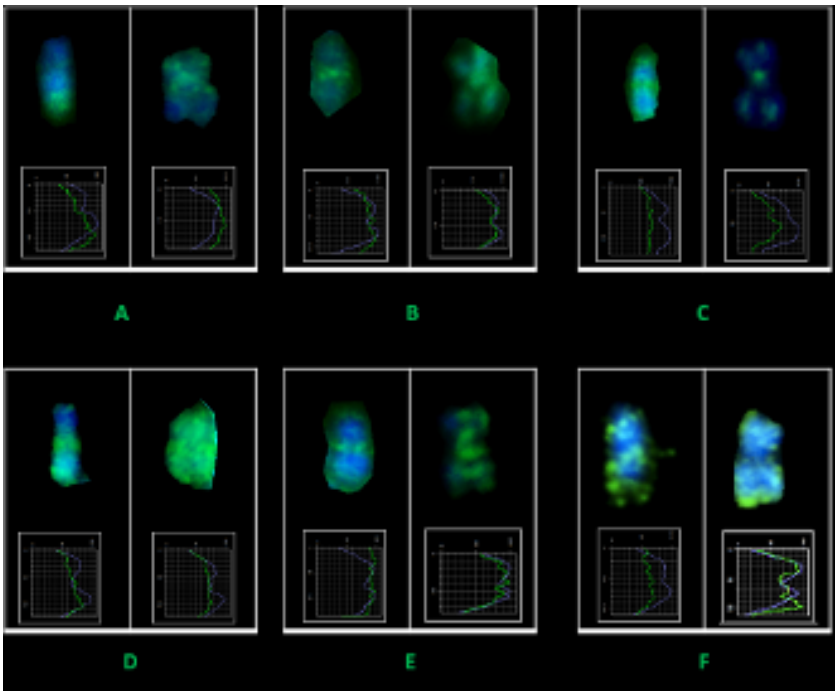
Şekil 4.118: Olguların 8. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.V Olgu, C. VII. Olgu



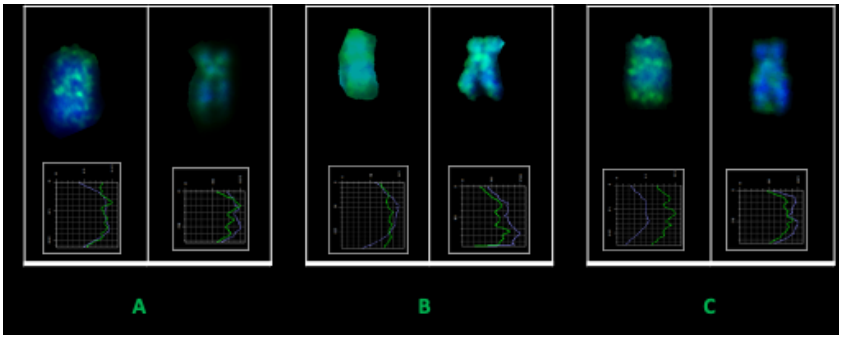
Şekil 4.119: Olguların 9. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.VII. Olgu



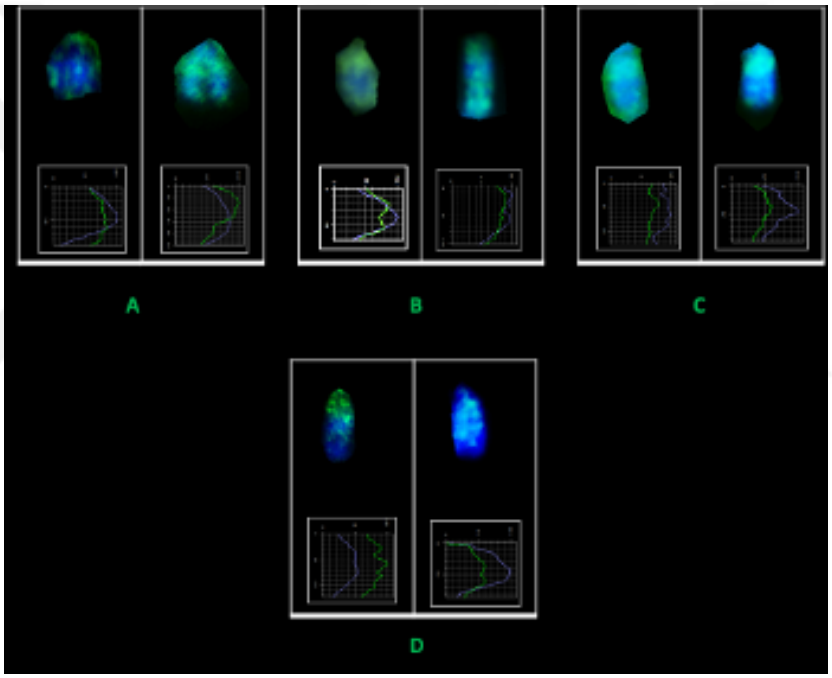
Şekil 4.120: Olguların 10. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. V. Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



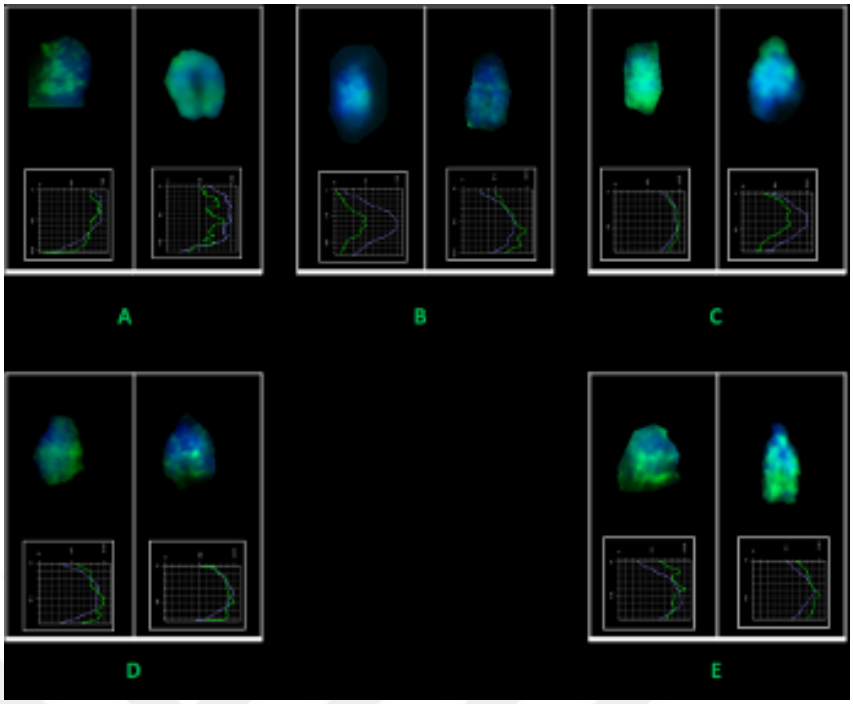
Şekil 4.121: Olguların 11. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. I. Olgu, B.II. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu, F. VIII. Olgu



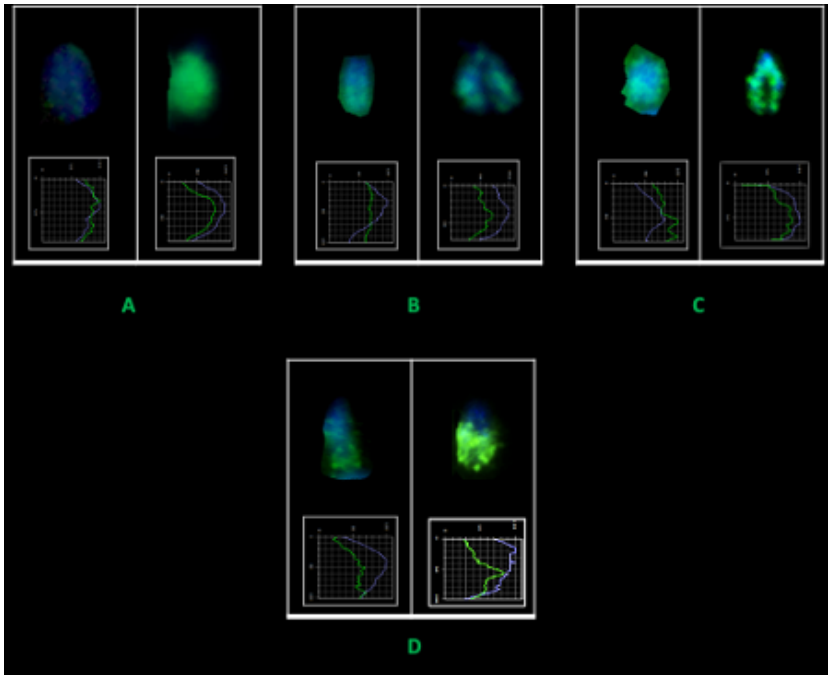
Şekil 4.122: Olguların 12. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.V. Olgu, C. VII. Olgu



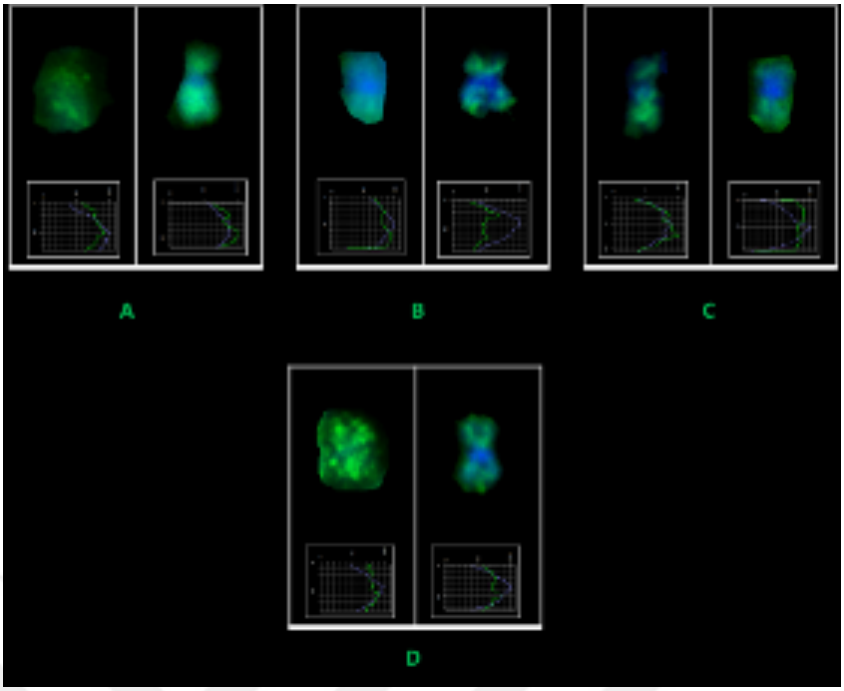
Şekil 4.123: Olguların 13. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. V. Olgu, D. VII. Olgu



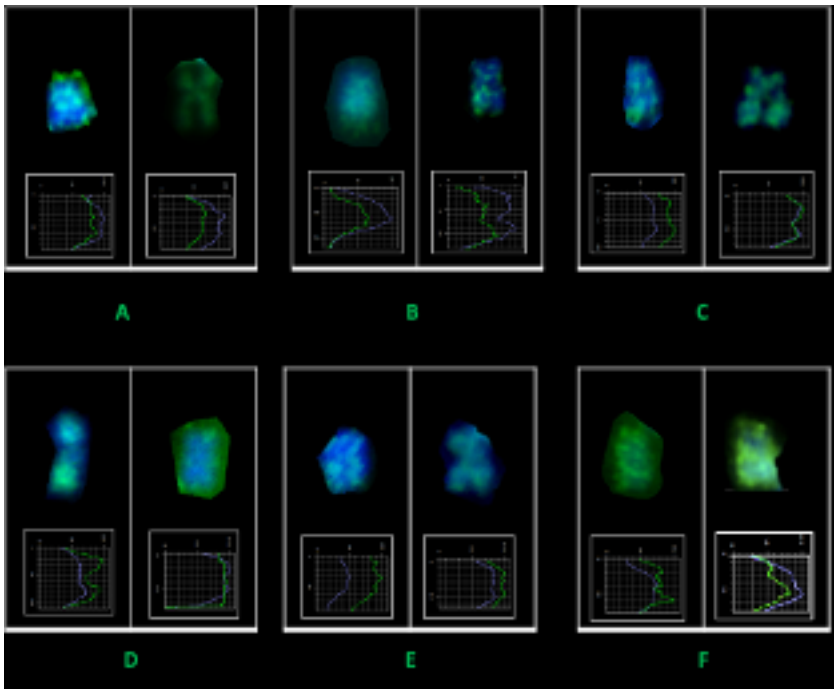
Şekil 4.124: Olguların 14. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. IV. Olgu, D. V. Olgu, E. VII. Olgu



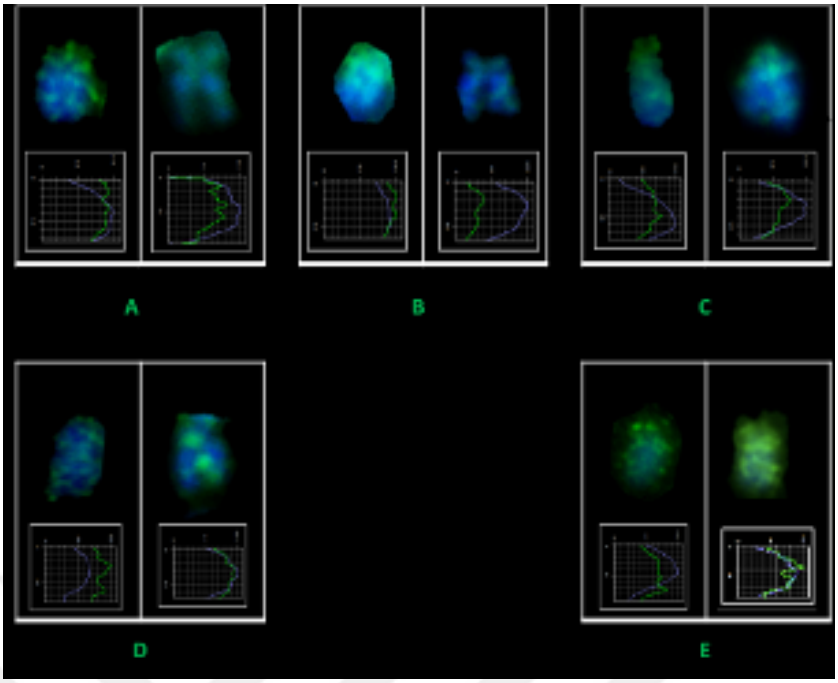
Şekil 4.125: Olguların 15. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.V Olgu, C. VII. Olgu, D. VIII. Olgu



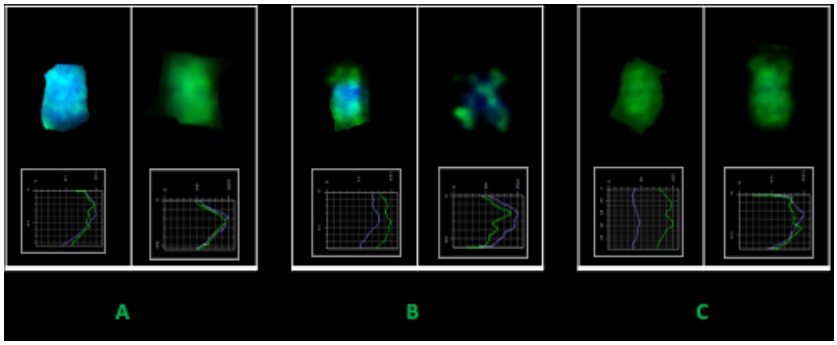
Şekil 4.126: Olguların 16. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.V Olgu, C. VI. Olgu, D. VII. Olgu



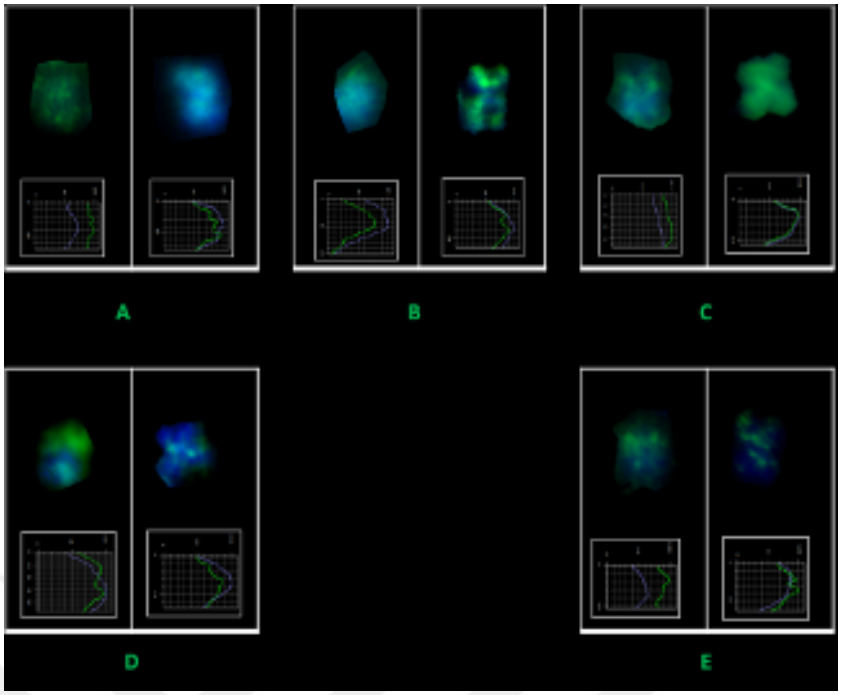
Şekil 4.127: Olguların 17. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. IV. Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu, F. VIII. Olgu



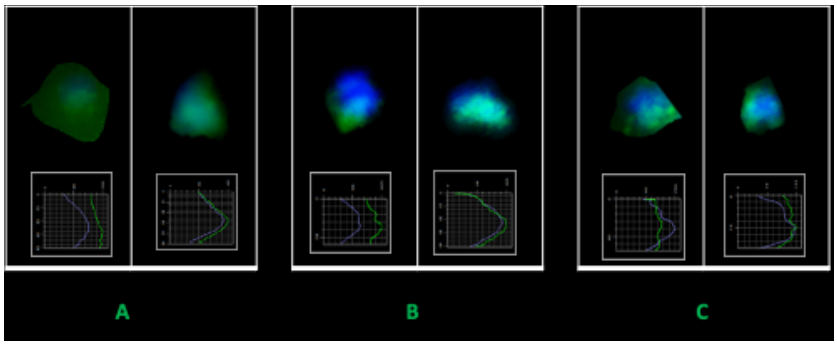
Şekil 4.128: Olguların 18. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B. V. Olgu, C. V.I Olgu, D. VII. Olgu, E. VIII. Olgu



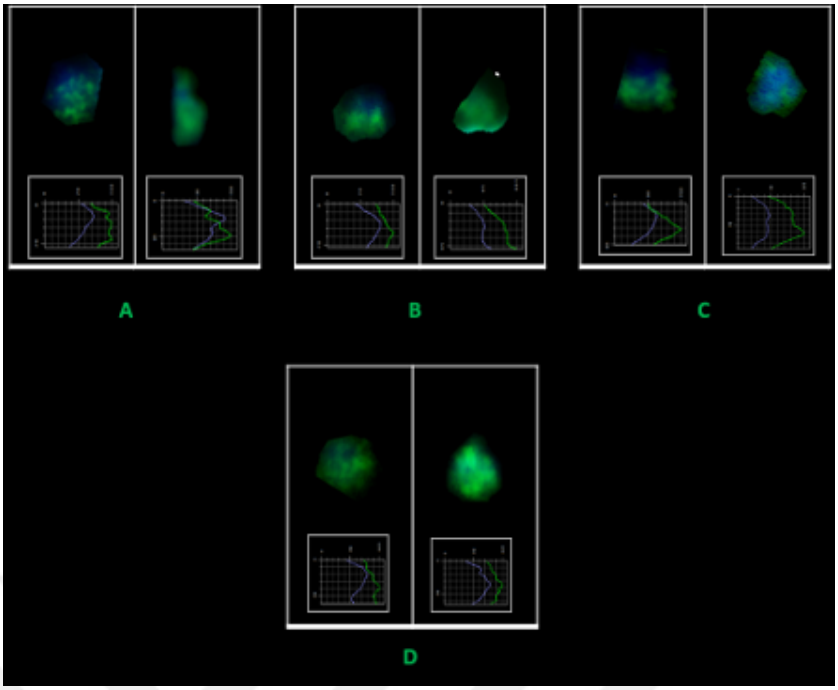
Şekil 4.129: Olguların 19. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.V Olgu, C. VII. Olgu



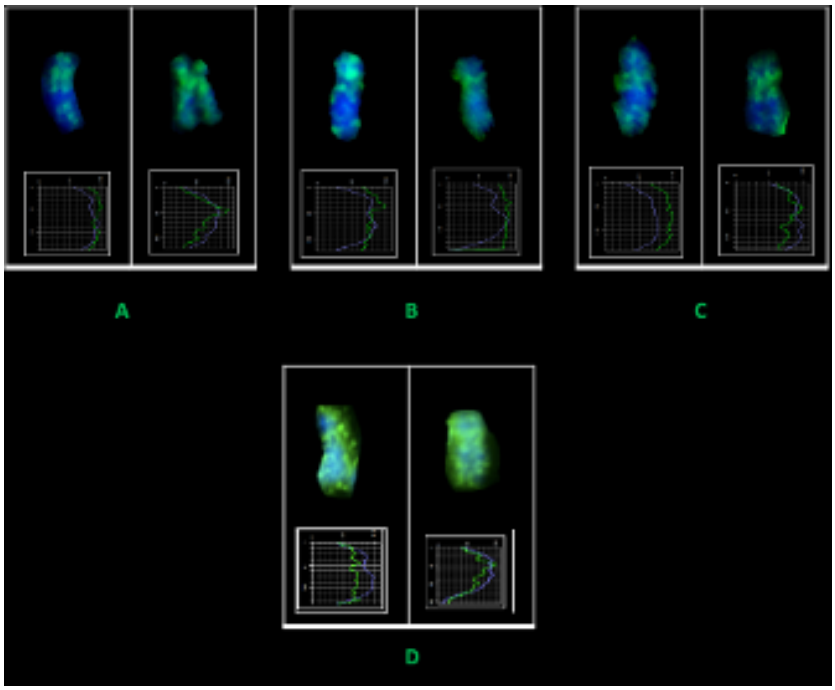
Şekil 4.130: Olguların 20. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.IV Olgu, C. V. Olgu, D. VI. Olgu, E. VII. Olgu



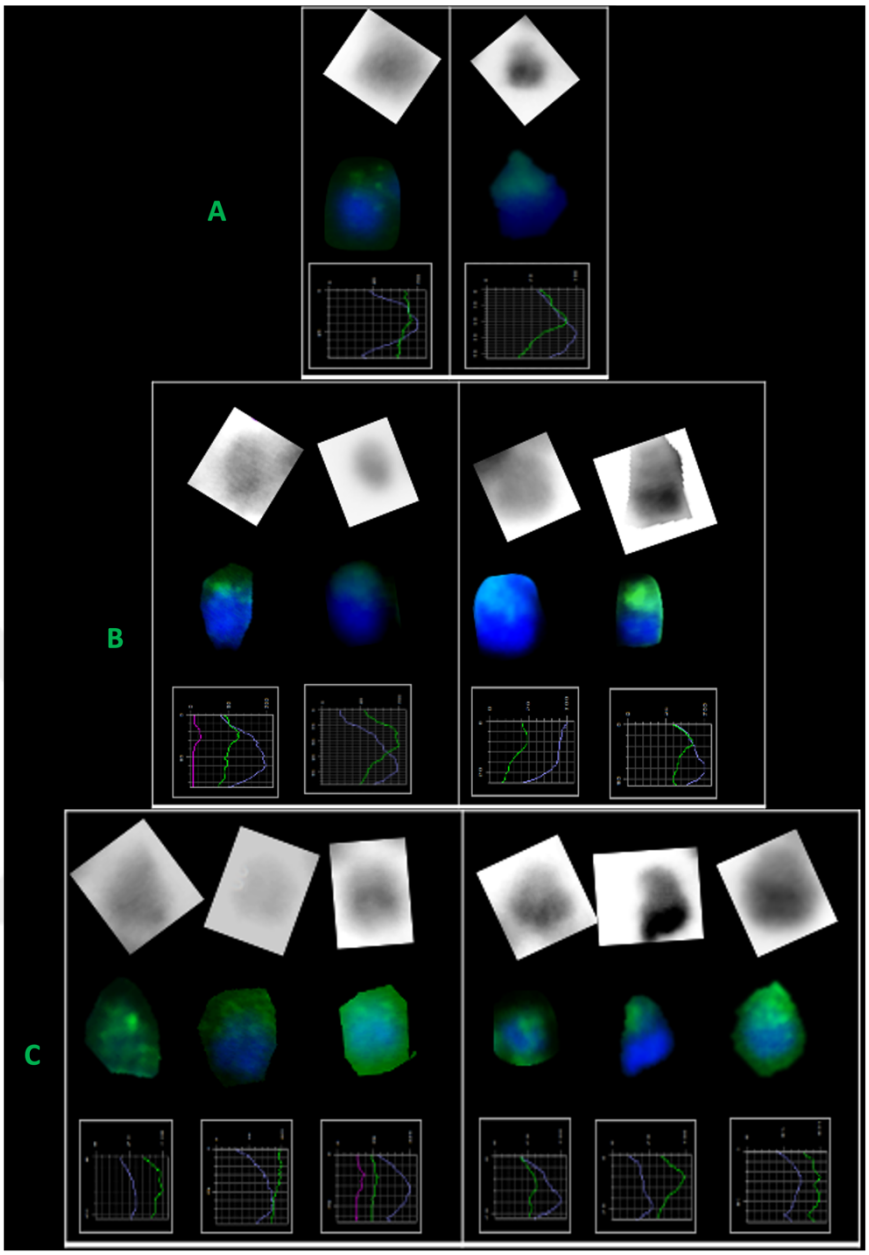
Şekil 4.131: Olguların 21. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.V Olgu, C. VII. Olgu



Şekil 4.132: Olguların 22. Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.V Olgu, C. VI. Olgu, D. VII. Olgu

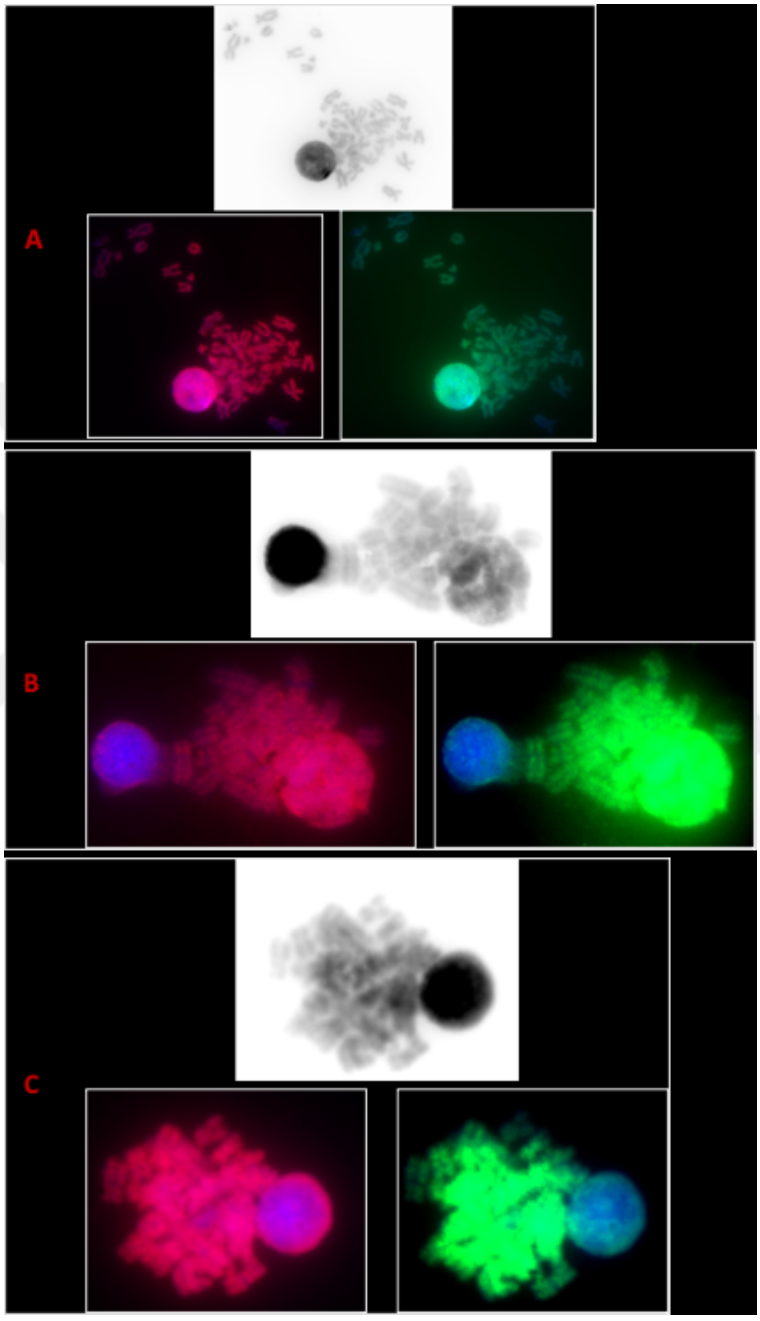


Şekil 4.133: Olguların X Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. V. Olgu, B.VI Olgu, C. VII. Olgu, D. VIII. Olgu



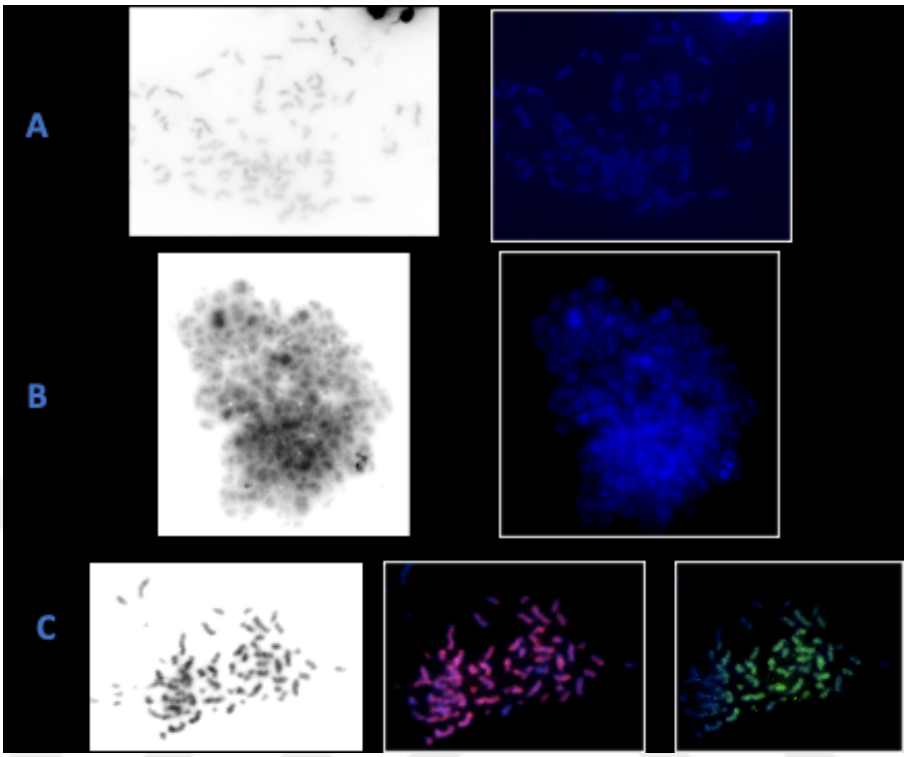
Şekil 4.134: Olguların Y Kromozomlarının interfaz-metafaz karşılaştırması (H3K79me2)
Her kutucuğun solundaki kromozom interfaz, sağındaki kromozom metafaz kromozomunu göstermektedir. A. II. Olgu, B.III. Olgu, C. VII. Olgu

4.3. İNTERFAZ ÇEKİRDEKLERİ ile KROMOZOM SAHALARI ARASINDAKİ İMMÜNFLORESAN GÖRÜNTÜLERİNİN KARŞILASTIRILMASI



Şekil 4.135: İnterfaz çekirdekleri ile kromozom sahalarının floresan yoğunluğu görüntüleri
A. Metafaz kromozomları ile interfaz çekirdeğinin immünfloresan yoğunluğunun karşılaştırılması (Olgu VII). Hem H3K27me3 hem de H3K79me2'nin, interfaz çekirdeklerinde metafaz kromzomlarına göre daha fazla sinyal verdiğine dikkat ediniz**.** B. PCC kromozomları ile interfaz çekirdeğinin immünfloresan yoğunluğunun karşılaştırılması (Olgu I). Hem H3K27me3 hem de H3K79me2'nin, interfaz çekirdeklerinde PCC kromozomlarına göre daha az sinyal verdiğine dikkat ediniz. C. Metafaz kromozomları ile interfaz çekirdeğinin immünfloresan yoğunluğunun karşılaştırılması (Olgu VI). Hem H3K27me3 hem de H3K79me2'nin interfaz çekirdeklerinde metafaz kromozomlarına göre daha az sinyal verdiğine dikkat ediniz
(Üstteki kutu; ters DAPI, sol alttaki kutu; H3K27me3, sağ alttaki kutu H3K79me2 sinyal yoğunluğunu göstermektedir.)

4.4. BAZI OLGULARDAN ELDE EDİLEN G1-PCC VE S-PCC GÖRÜNTÜLERİ



Şekil 4.136: Farklı fazdaki PCC kromozomlarının immünfloresan görüntüleri

Farklı fazdaki PCC kromozomlarının immünfloresan görüntüleri. A. Soldaki, G1-PCC kromozomlarının ters DAPI, sağdaki ise DAPI görüntüleri B. Soldaki, S-PCC kromozomlarının ters DAPI, sağdaki ise DAPI görüntüleri, C. Soldaki erken G2 fazı hücrelerinin ters DAPI, sağdakiler ise aynı hücrelerin sırayla H3K27me3 ve H3K79me2'ye karşı immün boyanmış görüntüleri

5. TARTIŞMA

Histon proteinleri üzerindeki modifikasyonlar, gen ifadesinin düzenlenmesinde ve kromatin organizasyonunda kritik rol oynayan epigenetik mekanizmalardır. Bu bağlamda kromozomlar üzerindeki histon modifikasyonlarının immünfloresan yöntemlerle belirlenmesi ve hücre döngüsü boyunca değişip değişmediğinin tespiti epigenetik mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu çalışmada, hücre döngüsünün iki farklı aşamasındaki (interfaz ve metafaz) histon modifikasyonlarının farklı olup olmadığına odaklanılmıştır ve histon proteinlerindeki modifikasyonların görselleştirilmesini gerektirmektedir. Bunun için H3K27me3 ve H3K79me2 histon modifikasyonlarının interfaz ve metafazda kromozomlar üzerindeki dağılımının immünfloresan yöntemlerle gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışılacak histon modifikasyonları belirlenirken, son çalışmalarda hücre döngüsü boyunca değişmediği belirtilen H3K27me3 (Halsall ve diğ.,2021) ile mitozda kromozomal instabilite için gerekli olduğu, dolayısıyla bu aşamada arttığı ortaya konan H3K79me2 (Guppy ve McManus, 2014) tercih edilmiştir. Böylece artması beklenen modifikasyon (H3K79me2) ile değişmemesi beklenen modifikasyonun (H3K27me3) immunfloresan görüntüleri değerlendirilmiştir. Metafaz kromozomları elde etmek için 72 saatlik standart T lenfosit kültürü, interfaz kromozomları için 48 saatlik PCC yöntemi kullanılmıştır.

PCC yönteminde kullandığımız kalikulin, interfazda MPF'leri uyararak kromozomların erken yoğunlaşmasına neden olmaktadır. Normal durumda hücre mitoza hazırlanırken interfaz kromatinine özgü epigenetik düzen, mitoz kromozomlarına özel bir paterne dönüşebilir. Bununla birlikte, 24 saatlik hücre siklüsünün yaklaşık 22 saatinin interfazda olması ve 30 dakikalık kalikulin uygulamasının histon modifikasyonlarını metafaz düzenine getirmek için yeterli süreyi sağlayamayabileceği, dolayısıyla elde edilen PCC kromozomlarının metafaz kromozomlarından farklı olarak interfaz histon modifikasyon paternine sahip olabilecekleri düşünülmüştür.

Metafaz kromozomları üzerinde çeşitli histon modifikasyonlarının yerleşimi, immünfloresan yöntemlerle daha önce birkaç çalışmada gösterilmiş (Halsall ve diğ., 2021; Hodges ve Hunt, 2002; Jeppesen, 2000; Terrenoire ve diğ., 2010, 2015) olmakla birlikte halen standartlaştırılmış bir yöntem bulunmamaktadır. Preparat hazırlığında, histon proteinlerini korumak amacıyla carnoy fiksatifi gibi asitli fiksatiflerden kaçınmak gereklidir. Bu amaçla, araştırmacılardan bazıları (Halsall ve diğ., 2021; Jeppesen, 2000; Terrenoire ve diğ., 2010; Terrenoire ve diğ., 2015) kültür çıkış işlemlerinde hipotonik şoktan hemen sonra fikse

edilmemiş hücreleri sitosantrifüj ile lama yapıştırarak yayma preparatları hazırlayıp, ardından preparatları PFA ile muamele ederek hücreleri fikse etmişlerdir. Hodges ve ark. ise memeli preimplantasyon embriyoları ve oositlerinde yaptıkları çalışmalarında sitosantrifüj kullanmamışlar ve DTT, PFA ve Triton X100 içeren bir solüsyonun içinde yıkanan lamların üzerine oosit ve preimplantasyon embriyolarını yerleştirerek, nemli bir kutu içerisinde 2 saat boyunca kurutmuşlardır. PFA'yı, kromozomları lama sabitlemek, DTT'yi, immünfloresan yapılırken, antikorların histon proteinlerine ulaşmasını kolaylaştırabilmek için disülfid bağı indirgeyicisi olarak kullanmışlardır. Triton X 100 ise hücre zarlarını geçirgenleştirerek antikorların çekirdeğe ulaşımını sağlayabilmek için kullanılmıştır. Kurutmanın ardından photoflo ile yıkamalar yaparak daha temiz ve lekesiz preparatlar elde etmişlerdir (Hodges ve Hunt, 2002). Bizim çalışmamızda her iki yöntem de denenmiştir. Sitosantrifüj, hücreleri lam üzerinde çok dar bir alana sabitlediğinden dolayı bu yöntemle istenilen kalitede ve sayıda kromozom sahaları elde edilememiştir. Bunun üzerine Hodges ve diğ. (2002)'nin uyguladığı yayma yöntemi primer lenfosit kültürlerine uygulanabilecek şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır. Çalışmamızda onlardan farklı olarak, kültür çıkış işlemlerinde hücrelere hipotonik şok uygulanmış ve hücre peletleri, lamlara yaymadan önce 30-60 dk +4 °C'de bekletilmiştir. Hücreler yayılmadan önce buz üzerinde tutularak çalışma alanına getirilmiştir. Önceden yıkanıp kurutulmuş lamlar DTT-PFA-TritonX 100 içeren solüsyona daldırıldıktan sonra hücreler Yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde yayılmıştır. Ardından nemli bir kutu içerisinde yatay olarak 1-2 saat kurutulduktan sonra, photoflo ile yıkamalar gerçekleştirilmiştir (Hodges ve Hunt, 2002). Bu aşama ile preparatlar daha düzgün ve lekesiz bir şekilde elde edilmiştir.

PCC ile elde edilen interfaz kromozomları G1, S, G2 evrelerinde olabilmektedir **(Şekil 4.136).** Metafaz kromozomlarıyla benzerliği nedeniyle, G2 safhasındaki kromozomlar değerlendirmeye alınmış, G1 ve S fazı hücreleri analize dahil edilmemiştir. Kültür çıkışı ve preparat hazırlığı metafaz kromozomları ile aynı şekilde yapılmıştır.

48 ve 72 saatlik kültürlerden hazırlanan preparatların immünfloresan deneyleri aynı anda gerçekleştirilmiştir. 48 saatlik kültürlerden elde edilen preparatlar ertesi gün immünfloresan yapılıncaya kadar +4 °C' de bekletilmiştir. Ertesi gün yapılamama durumunda -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Jeppesen ve diğ. (1992) ile Terrenoire ve diğ. (2010)'nın kullandığı, hücre zarını çözerek antikorların kromozomlara kolayca erişmesini sağlayan KCM buffer hazırlanmıştır (Jeppesen ve diğ., 1992; Terrenoire ve diğ., 2010; Terrenoire ve diğ., 2015). Onlardan farklı olarak, yayma aşamasında PFA kullanıldığı için PFA fiksasyonu

aşaması yapılmamıştır. Antikor solüsyonları, KCM buffer ile seyreltilen %1 BSA içinde hazırlanmıştır. İmmunfloresan deneylerinin önemli bir aşaması olan spesifik olmayan bağlanmaları azaltmak için yapılan bloklama aşaması, Terrenoire ve ark'larından farklı olarak % 5 BSA içeren KCM buffer ile gerçekleştirilmiştir. Böylece arka plan gürültüsü nispeten az olan immün boyalı preparatlar elde edilmiştir. Yine de bazı preparatlarda spesifik olmayan bağlanmalar önlenememiştir. Bunun sebebi de deneysel program gereği, kültür çıkışı ile antikor inkübasyonlarının aynı gün yapılamaması olabilir. Jeppesen (2000), preparatların saklanması sırasında hücresel proteinlerin kısmi fiksasyona uğrayabileceği ve arka plan gürültüsüne yol açabileceğini bildirmiştir (Jeppesen, 2000).

Mikroskop analizlerinde kromozomları tanımlamak için morfolojik özellikleriyle birlikte ters DAPI bantlarından yararlanılmıştır. Metafaz kromozomlarında olduğu gibi PCC ile elde edilmiş interfaz kromozomlarında da immünfloresan boyama yapılan histon modifikasyonlarının, kardeş kromatidler ve homolog kromozomlar üzerinde tutarlı ve tekrarlanabilir bant paternleri ve grafik desenleri verdiği gözlenmiştir. Farklı olguların, eşdeğer kromozomlarına bakıldığında bu benzerliğin devam ettiği gözlenmiş, hatta her kromozom, karakteristik bantlar sergilediği için, immün boyamasına bakılarak bazı kromozomlar tanınır hale gelmiştir. İnterfaz ve Metafaz karşılaştırması, kaliteli görüntü elde edilemediği için her olgunun her kromozomunda yapılamamıştır. Bazı olgularda (Olgu-2, Olgu-5 ve Olgu-7), neredeyse tüm kromozomlar değerlendirmeye alınırken, diğerlerinde ise en az 10 kromozom değerlendirmeye alınmıştır. İnterfaz ile metafaz karşılaştırıldığında interfaz kromozomlarının daha az keskin bantlar sergilediği, pulverize bir görüntü verdiği gözlenmiştir. Bunun sebebi de erken yoğunlaştırılmış kromozomların kısalıp kalınlaşma işleminin tamamlanmamış olması olabilir.

H3K27me3 ve H3K79me2'nin immün boyama paterninin birbirine benzer olduğu değerlendirilmiştir.

H3K27me3:

H3K27me3, transkripsiyonun düzenlenmesiyle ilgili, fakültatif heterokromatin bölgelerinde yoğun bulunan, gen baskılayıcı bir modifikasyondur ve hücre farklılaşması sırasında gelişim genlerinin kalıcı olarak susturulmasında görev aldığı bildirilmiştir (Bernstein ve diğ., 2006). Bu modifikasyon farklı hücre tiplerine ait metafaz kromozomları üzerinde immünfloresan tekniklerle daha önce çalışılmıştır (Halsall ve diğ., 2021; Terrenoire ve diğ., 2010, 2015). Bu

çalışmalarda, H3K27me3'nin, transkripsiyon düzenlenmesiyle ilgili diğer modifikasyonlardan olup aktif transkripsiyona işaret eden H3K9ac, H3K4me3 için de olduğu gibi, sentromer bölgelerinde bulunmadığı, fakat kromozom kollarında gen içeriği bakımından zengin bölgelerde belirgin karakteristik bantlar halinde bulunduğu bildirilmiştir (**Şekil 2.10** ve **Şekil 2.11).** Bizim çalışmamızda da metafaz kromozomları üzerindeki H3K27me3 bantlarının (Terrenoire ve diğ., 2010)'daki primer lenfositlere ait metafaz bantlarıyla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. PCC ile elde edilmiş interfaz kromozomları üzerinde daha önce yapılmış çalışma yoktur. Olgularımızın metafaz ve interfaz kromozomlarındaki H3K27me3 bant patternlerinin karşılaştırıldığı **Şekil 4.87-4.110'**da görüldüğü gibi, bu iki evre kromozomları arasında H3K27me3 bant patternleri genel olarak benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, özellikle 16 ve 19 numaralı kromozomların **(Şekil 4.102** ve **Şekil 4.105**) sentromer çevresi ve Y kromozomunun distalindeki heterokromatin bölgelerinde interfaz ve metafaz kromozomları arasında bazı sahalarda farklılık görüldüğü dikkat çekmiştir. Bu bölgelerde metafaz kromozomlarında H3K27me3 antikoru ile –beklendiği gibi- sinyal alınmazken, interfaz kromozomlarında sinyallerin bu bölgelere de yayılabildiği gözlenmiştir. Y kromozomunun uzun kolunun distalinde (Yq12 bölgesi), büyüklüğü kişiden kişiye polimorfizm gösteren geniş bir konstitutif heterokromatin bloğu bulunmaktadır. Gen içermeyen bu bölgede H3K27me3 gibi transkripsiyon düzenlemesi ile ilgili histon modifikasyonları gözlenmez. Bununla birlikte, Yq12'nin en uç kısmında yaklaşık 320 kb uzunluğunda PARII (Pseudootozomal Bölge II) yer alır (Helena Mangs ve Morris, 2007). Bu bölge, X kromozomu ile homolog olan genler içerir ve mayoz bölünme sırasında rekombinasyon gerçekleşebilir (*Human hg19 chrY:56669537-59373565 UCSC Genome Browser v482*, t.y.). Az sayıda olmakla birlikte, bu genler transkripsiyonla ilgili histon modifikasyonlarına uğramaktadır. Ancak metafazda distal Yq bölgesi, transkripsiyonla ilgili histon modifikasyonları için immünfloresan boyamalarda sinyal vermemektedir. Bunun sebebi, PAR II bölgesinin çok dar bir alan olması ve kromozomların en yoğun ve kısa formda bulunduğu metafazın bu modifikasyonlar için yeterli çözünürlüğü sağlamaması olabilir. Öte yandan, PCC preparatlarında bazı sahalarda Y kromozomu, metafaza benzer görüntü sergilerken, bazı sahalarda distal Yq bölgesinde sinyal alınmıştır **(Şekil 4.110).** Bu farklılık, PCC uygulanan hücreler senkronize edilmemiş oldukları için, sinyal alınan hücrelerin G2 evresinin görece erken aşamalarında olup kromozomların daha az yoğunlaşmasından kaynaklı olabilir. Geç G2 evresinde yakalanan hücrelerde ise kromozomlar daha fazla yoğunlaşıp metafaza benzer sinyal örüntüsü vermiş olabilir.

H3K27me3 açısından Y kromozomunda gözlenen farklılıklar H3K79me2 için de gözlenmiştir.

H3K79me2:

Guppy ve McManus (2014) çalışmalarında H3K79me2 miktarının mitoz sırasında dramatik bir artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Yöntemin PCC ile elde edilmiş interfaz kromozomlarında ilk kez uygulanacağı bu çalışma için bu modifikasyonu seçme sebebimiz de bu bulgu olmuştur. İnterfaz ve metafaz kromozomları arasında farklı bant paternleri verebilecek bir modifikasyon olduğundan, yöntemi değerlendirmek için uygun olacağı düşünülmüştür. Ancak olguların interfaz metafaz H3K79me2 sonuçlarının karşılaştırıldığı **Şekil 4.111-4.134**'lerde görüldüğü gibi, bizim çalışmamızda bu modifikasyon açısından -bazı sahalarda H3K27me3 bulgularına benzer sinyal veren 16.kromozomun sentromeri **(Şekil 4.126)** ve Yq12 **(Şekil 4.134)** bölgesi dışında- interfaz ve metafaz kromozomları arasında bir fark tespit edilmemiştir. Çalışmamızda bütün olgularda bütün kromozomlar için interfaz ve metafaz kromozomlarında H3K79me2 için benzer bant örnekleri gözlenmiştir. Bunun sebebi, interfaz kromozomları elde edebilmek icin kullandığımız kalikulin A'nın MPF'leri uyararak kromozomları yoğunlaştırması nedeniyle interfazdaki kromozomların, metafaz kromozomlarına benzer karakter kazanmaları olabileceği düşünülmüştür. Bunun üzerine PCC uygulanmış ve uygulanmamış preparatlarda interfaz çekirdekleri ve kromozom sahaları, H3K79me2 floresan sinyal yoğunluğu açısından karşılaştırılmıştır **(Şekil 4.135).** Bu çalışma sırasında pozlama sürelerini optimize etmek için yan yana duran interfaz çekirdeği ve kromozom sahaları birlikte değerlendirilmiştir. Şaşırtıcı şekilde hem PCC hem de metafaz preparatlarında, kimi görüntülerde interfaz çekirdekleri daha yoğun ışıma verirken **(Şekil 4.135-A**, bkz. yeşil sinyaller), kimi görüntülerde kromozomlar **(Şekil 4.135-B, C,** bkz. yeşil sinyaller) daha fazla ışıma vermiştir. Aynı inceleme H3K27me3 sinyalleri için de yapılmış ve benzer sonuçlar alınmıştır **(Şekil 4.135,** bkz. kırmızı sinyaller). Bu durumun anlaşılabilmesi için hücre döngüsünde seviyeleri değiştiği bildirilen diğer histon modifikasyonlarını hedef alan ileri çalışmalar gerekmektedir.

Kromozom seviyesinde, immünfloresan yöntemlerle histon modifikasyonlarının gösterilmesi çözünürlüğü oldukça düşük bir yöntemdir. Bu durum bir dezavantaj olmakla birlikte, genomu tek hücre düzeyinde kuşbakışı inceleyebilen yegâne yöntem olan sitogenetik ile epigenetiği birleştiren ve bu sebeple "Sitoepigenetik" olarak adlandırdığımız bu yöntemle

immün boyalı karyotipler elde edilebilmektedir. Bu yüzden epigenom araştırmalarına değerli katkılar sağlayabilecek bir potansiyel taşımaktadır.

PCC kromozomlarında immünfloresan yöntemle histon modifikasyonları ilk defa bu çalışmada gösterilmiş ve metafaz kromozomlarına benzer bant paternleri elde edilmiştir. Dolayısıyla PCC, metafaz kromozomları elde edilemediği durumlarda immünfloresan karyotipler oluşturmak için kullanılabilir. Ancak, PCC kromozomlarının interfaz kromatininin epigenetik karakterini temsil edip etmediğini anlamak için farklı histon modifikasyonlarının hedeflendiği daha fazla çalışma gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

H3K27me3 ve H3K79me2 histon modifikasyonlarının interfaz ve metafazdaki yerleşimlerini değerlendirdiğimiz bu çalışmada, immünfloresan yöntemle histon modifikasyonları PCC ile elde edilmiş kromozomlarda ilk kez gösterilmiştir. İnterfaz kromozomunu PCC ile elde etmek, kromozom görüntüsünde bu aşamanın değerlendirilmesini sağlamıştır. Primer lenfositler için immünfloresan tekniğine uygun yeni bir yayma yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. H3K27me3 ve H3K79me2 modifikasyonlarına özgü bant paternlerinin genel olarak birbirlerine benzer olduğu ve PCC ve metafaz kromozomlarında genellikle değişmediği tespit edilmiştir. Ancak PCC kromozomlarının interfaz kromatininin histon modifikasyon paternini koruyup korumadığını anlamak için farklı modifikasyonları hedef alan çalışmalar yapılması gerekmektedir.

İmmünfloresan işaretli histon modifikasyonları kromozomlar üzerinde özgün ve tekrarlanabilir bant desenleri oluşturmaktadırlar. Dolayısıyla, tüm genomun tek hücre düzeyinde kuş bakışı görüntülenebilmesini sağlayan yegâne teknik olan sitogenetik bant yöntemleri gibi, epigenomun benzer bir bakış açısıyla değerlendirilmesini sağlayacak "sitoepigenetik" bant yöntemleri yakın gelecekte yaygın bir şekilde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Aboud, N. M., Al, T., Tupper, C., & Jialal, I., 2023, *Genetics, Epigenetic Mechanism.* StatPearls.
- Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A. D., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P., 2018, *Essential cell biology*, Fifth international student edition. WW Norton & Company.
- Anjali, C. H., & Maddaly, R., 2024, Applications of Premature Chromosome Condensation technique for genetic analysis. *Toxicology in Vitro*, 94. Elsevier Ltd.
- ARGÜDEN, Y. T., 2023, Üç Boyutlu Kromatin Yapısı ve Organizasyonu. *Turkiye Klinikleri Medical Genetics-Special Topics*, 8(3), 21–25.
- Atlasi, Y., & Stunnenberg, H. G., 2017, The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*, 18(11), 643–658.
- Bajer, A. S., & Molè-Bajer, J., 1972, *Spindle dynamics and chromosome movements*.
- Bak, A. L., Zeuthen, J., & Crick, F. H., 1977, Higher-order structure of human mitotic chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(4), 1595–1599.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T., 2011, Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395.
- Barth, T. K., & Imhof, A., 2010, Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(11), 618–626.
- Bedford, M. T., & Clarke, S. G., 2009, Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular Cell*, 33(1), 1–13.
- Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., & Shilatifard, A., 2009, An operational definition of epigenetics. *Genes & Development*, 23(7), 781–783.
- Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S., 2007, The mammalian epigenome. *Cell*, 128(4), 669–681.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., & Plath, K., 2006, A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 315–326.
- Bezrookove, V., Smits, R., Moeslein, G., Fodde, R., Tanke, H. J., Raap, A. K., & Darroudi, F., 2003, Premature chromosome condensation revisited: A novel chemical approach permits efficient cytogenetic analysis of cancers. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 38(2), 177–186.
- Bird, A., 2002, DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6–21.
- Blomen, V. A., & Boonstra, J., 2011, Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 27–44.
- Bonasio, R., Tu, S., & Reinberg, D., 2010, Molecular signals of epigenetic states. *Science*, 330(6004), 612–616.
- Brinkley, B. R., & Stubblefield, E., 1966, The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro. *Chromosoma*, 19(1), 28–43.

- Campbell, P. J., & Green, A. R., 2006, The myeloproliferative disorders. *New England Journal of Medicine*, 355(23), 2452–2466.
- Cheedipudi, S., Genolet, O., & Dobreva, G., 2014, Epigenetic inheritance of cell fates during embryonic development. *Frontiers in Genetics*, 5, 19.
- Chivukula, M., & Dabbs, D. J., 2011, Immunohistochemistry and Immunocytochemistry. *Diagnostic Immunohistochemistry*, 890–918.
- Cornforth, M. N., & Bedford, J. S., 1993, Ionizing Radiation Damage and Its Early Development in Chromosomes. 17, 423–496.
- Dorée, M., & Galas, S., 1994, The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *The FASEB Journal*, 8(14), 1114–1121.
- Ducommun, B., Draetta, G., Young, P., & Beach, D., 1990, Fission yeast cdc25 is a cell-cycle regulated protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 167(1), 301–309.
- Dunphy, W. G., & Kumagai, A., 1991, The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, 67(1), 189–196.
- Durante Y. Furusawa E. Gotoh, M., 1998, Technical Report A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry. *International Journal of Radiation Biology*, 74(4), 457–462.
- Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V, Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F. M., & Reiter, A., 2010, Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genetics*, 42(8), 722–726.
- Fededa, J. P., & Gerlich, D. W., 2012, Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nature Cell Biology*, 14(5), 440–447.
- Felsenfeld, G., 2014, A Brief History of Epigenetics.
- Flemming, W., 1882, *Zellsubstanz, kern und zelltheilung*. Vogel.
- Goodwin, P. C., Johnson, B., & Frevert, C. W., 2017, *Microscopy, Immuno-Histochemistry, Digital Imaging, and Quantitative Microscopy.* Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, Second Edition*,* 53–66.
- Gotoh, E., Asakawa, Y., Gotoh, E., & Kosaka, H., 1995, Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells. *Biomedical Research (Japan)*, 16(1), 63–68.
- Gotoh, E., & Durante, M., 2006, Chromosome Condensation Outside of Mitosis: Mechanisms and New Tools. *Journal of Cellular Physiology*, 209, 297–304.
- Gould, K. L., Moreno, S., Tonks, N. K., & Nurse, P., 1990, Complementation of the mitotic activator, p80 cdc25, by a human protein-tyrosine phosphatase. *Science*, 250(4987), 1573–1576.
- Green, R. A., Paluch, E., & Oegema, K., 2012, Cytokinesis in animal cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 29–58.
- Gromley, A., Yeaman, C., Rosa, J., Redick, S., Chen, C.-T., Mirabelle, S., Guha, M., Sillibourne, J., & Doxsey, S. J., 2005, Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell*, 123(1), 75–87.
- Guppy, B. J., & McManus, K. J., 2014, Mitotic accumulation of dimethylated lysine 79 of histone h3 is important for maintaining genome integrity during mitosis in human cells. *Genetics*, 199(2), 423–433.

- Halsall, J. A., Andrews, S., Krueger, F., Rutledge, C. E., Ficz, G., Reik, W., & Turner, B. M., 2021, Histone modifications form a cell-type-specific chromosomal bar code that persists through the cell cycle. *Scientific Reports*, 11(1), 3009.
- Hanks, S. K., & Rao, P. N., 1980, Initiation of DNA synthesis in the prematurely condensed chromosomes of G1 cells. *The Journal of Cell Biology*, 87(1), 285–291.
- Hartwell, L. H., Culotti, J., & Reid, B., 1970, Genetic control of the cell-division cycle in yeast, I. Detection of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(2), 352–359.
- Helena Mangs, A., & Morris, B. J., 2007, The human pseudoautosomal region (PAR): origin, function and future. *Current Genomics*, 8(2), 129–136.
- Hirano, T., 2000, Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 115–144.
- Hittelman, W. N., BrousSard, L. C., & McCredie, K., 1979, Premature chromosome condensation studies in human leukemia. I. Pretreatment characteristics.
- Hittelman, W. N., & Rao, P. N., 1974, Bleomycin-induced damage in prematurely condensed chromosomes and its relationship to cell cycle progression in CHO cells. *Cancer Research*, 34(12), 3433–3439.
- Hodges, C. A., & Hunt, P. A., 2002, Simultaneous analysis of chromosomes and chromosome-associated proteins in mammalian oocytes and embryos. *Chromosoma*, 111(3), 165–169.
- Howard, A., & Pelc, S. R., 1951, Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature*, 167(4250), 599–600.
- Human hg19 chrY:56669537-59373565 UCSC Genome Browser v482., n.d., Retrieved June 12, 2025, from https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chrY%3A56669537%2D59373565&hgsid=2667643488_erboZ5WyEpPfJs0Aj9UvqkJr6QkO [Ziyaret tarihi: 12 Haziran 2025].
- Inour, S., & Sato, H., 1967, Cell motility by labile association of molecules. *J. Gen. Physiol*, 50, 259–292.
- Ito, S., Gotoh, E., Ozawa, S., & Yanagi, K., 2002, Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 is highly colocalized with interphase chromatin and its newly replicated regions in particular. *Journal of General Virology*, 83(10), 2377–2383.
- Izumi, T., Walker, D. H., & Maller, J. L., 1992, Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity. *Molecular Biology of the Cell*, 3(8), 927–939.
- Jang, H. S., Shin, W. J., Lee, J. E., & Do, J. T., 2017, CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes*, 8(6), 148.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D., 2001, Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074–1080.
- Jeppesen, P., 2000, Immunofluorescence in cytogenetic analysis: method and applications. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 1107–1114.
- Johnson, R. T., Gotoh, E., Mullinger, A. M., Ryan, A. J., Shiloh, Y., Ziv, Y., & Squires, S., 1999, Targeting double-strand breaks to replicating DNA identifies a subpathway of DSB repair that is defective in ataxia-telangiectasia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(2), 317–325.
- Johnson, R. T., & Rao, P. N., 1970, Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*, 226(5247).

- Johnson, R. T., & Rao, P. N., 1971, Nucleo-cytoplasmic interactions in the achievement of nuclear synchrony in DNA synthesis and mitosis in multinucleate cells. *Biological Reviews*, 46(1), 97–155.
- Kanda, R., Eguchi-Kasai, K., & Hayata, I., 1999, Phosphatase inhibitors and premature chromosome condensation in human peripheral lymphocytes at different cell-cycle phases. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 25, 1–8.
- Kato, H., & Sandberg, A. A., 1967, Chromosome pulverization in human binucleate cells following colcemid treatment. *The Journal of Cell Biology*, 34(1), 35–45.
- Kazanets, A., Shorstova, T., Hilmi, K., Marques, M., & Witcher, M., 2016, Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1865(2), 275–288.
- Kimura, H., 2013, Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics*, 58(7), 439–445.
- Kleer, C. G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S. A., Ghosh, D., Sewalt, R. G. A. B., Otte, A. P., & Hayes, D. F., 2003, EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11606–11611.
- Koshland, D., & Strunnikov, A., 1996, Mitotic chromosome condensation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12(1), 305–333.
- Kouzarides, T., 2007, Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705.
- Kurani, H. P., & Slingerland, J. M., 2024, DOT1L mediates stem cell maintenance and represents a therapeutic vulnerability in cancer. *Cancer Research*.
- Levine, R. L., Pardanani, A., Tefferi, A., & Gilliland, D. G., 2007, Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), 673–683.
- Li, J., Ding, Y., & Zheng, L., 2014, Histone-Mediated Transgenerational Epigenetics. *Transgenerational Epigenetics*, 87–103.
- Maller, J. L., 1986, Mitogenic signalling and protein phosphorylation in Xenopus oocytes. *Journal of Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*, 11(7), 543–555.
- Martínez-Balbás, M. A., Dey, A., Rabindran, S. K., Ozato, K., & Wu, C., 1995, Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell*, 83(1), 29–38.
- Masui, Y., 1974, A cytostatic factor in amphibian oocytes: its extraction and partial characterization. *Journal of Experimental Zoology*, 187(1), 141–147.
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M., 2022, Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74–88. Nature Research.
- McIntosh, J. R., 2016, Mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9), a023218.
- Miake-Lye, R., & Kirschner, M. W., 1985, Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell*, 41(1), 165–175.
- Mierzwa, B., & Gerlich, D. W., 2014, Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Developmental Cell*, 31(5), 525–538.
- Moazed, D., 2011, Mechanisms for the inheritance of chromatin states. *Cell*, 146(4), 510–518.

- Moreno, S., Nurse, P., & Russell, P., 1990, Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80 cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature*, 344(6266), 549–552.
- Morgan, D. O., 2007, *The cell cycle: principles of control*. New science press.
- Nasmyth, K., 1996, Putting the cell cycle in order. *Science*, 274(5293), 1643–1645.
- Ng, S. S., Yue, W. W., Oppermann, U., & Klose, R. J., 2009, Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 407–422.
- Nikoloski, G., Langemeijer, S. M. C., Kuiper, R. P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E. R., Van der Heijden, A., Scheele, T. N., Vandenberghe, P., & de Witte, T., 2010, Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*, 42(8), 665–667.
- NM, A. A., C, T., & I, J., 2024, Genetics, Epigenetic Mechanism. StatPearls.
- Nurse, P., & Thuriaux, P., 1980, Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Genetics*, 96(3), 627–637.
- Obara, Y., Chai, L. S., Weinfeld, H., & Sandberg, A. A., 1974, Prophasing of interphase nuclei and induction of nuclear envelopes around metaphase chromosomes in HeLa and Chinese hamster homo-and heterokaryons. *The Journal of Cell Biology*, 62(1), 104–113.
- Panagopoulos, A., & Altmeyer, M., 2021, The hammer and the dance of cell cycle control. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(4), 301–314.
- Panda, S. K., Ray, S., Nayak, S., Behera, S., Bhanja, S., & Acharya, V., 2019, A review on cell cycle checkpoints in relation to cancer. *J. Med. Sci*, 5, 88–95.
- Piña, R., & Santos-Díaz, A. I., 2022, Ten Approaches That Improve Immunostaining: A Review of the Latest Advances for the Optimization of Immunofluorescence.
- Portela, A., & Esteller, M., 2010, Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1057–1068.
- Rao, P. N., & Johnson, R. T., 1970, Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature*, 225(5228).
- Ravi, M., Nivedita, K., & Pai, G. M., 2013, Chromatin condensation dynamics and implications of induced premature chromosome condensation. *Biochimie*, 95(2), 124–133.
- Rieder, C. L., & Salmon, E. D., 1994, Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology*, 124(3), 223–233.
- Rieder, C. L., & Salmon, E. D., 1998, The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends in Cell Biology*, 8(8), 310–318.
- Rivera, C. M., & Ren, B., 2013, Mapping human epigenomes. *Cell*, 155(1), 39–55.
- Rosas-Arellano, A., Villalobos-González, J. B., Palma-Tirado, L., Beltrán, F. A., Cárabez-Trejo, A., Missirlis, F., & Castro, M. A., 2016, A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays. *Histochemistry and Cell Biology*, 146, 421–430.
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L., 2006, A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1412–1417.
- Schiel, J. A., Park, K., Morphew, M. K., Reid, E., Hoenger, A., & Prekeris, R., 2011, Endocytic membrane fusion and buckling-induced microtubule severing mediate cell abscission. *Journal of Cell Science*, 124(9), 1411–1424.

- Sharp, D. J., Rogers, G. C., & Scholey, J. M., 2000, Microtubule motors in mitosis. *Nature*, 407(6800), 41–47.
- Shilatifard, A., 2006, Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.*, 75(1), 243–269.

- Silver, K., 1991, The new way to communicate, *9th International online information meeting,* 3-5 December 1990 London*,* Oxford, Learned Information, 323-330.
- Smith, T. L., Ryan, T. L., Escalona, M. B., Shuryak, I. E., & Balajee, A. S., 2024, Application of FISH based G2-PCC assay for the cytogenetic assessment of high radiation dose exposures: Potential implications for rapid triage biodosimetry. *Plos One*, 19(10), e0312564.
- Sommer, S., 2002, Chromosome painting and prematurely condensed chromosomes (PCC)- new methods of biological dosimetry. *Nuclear Techniques in Industry, Medicine, Agriculture and Environmental Protection*, Warsaw (Poland), 17-19 Apr 2002 ss. p. 333-340.
- Sperling, K., & Rao, P. N., 1974, The phenomenon of premature chromosome condensation: its relevance to basic and applied research. *Humangenetik*, 23, 235–258.
- Srebniak, M. I., Trapp, G. G., Wawrzkiewicz, A. K., Kaźmierczak, W., & Wiczkowski, A. K., 2005, The usefulness of calyculin A for cytogenetic prenatal diagnosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(3), 391–394.
- Steinmann, K. E., Belinsky, G. S., Lee, D., & Schlegel, R., 1991, Chemically induced premature mitosis: differential response in rodent and human cells and the relationship to cyclin B synthesis and p34cdc2/cyclin B complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(15), 6843–6847.
- Suzuki, M., Piao, C.-Q., Zhao, Y.-L., & Hei, T. K., 2001, Karyotype analysis of tumorigenic human bronchial epithelial cells transformed by chrysolite asbestos using chemically induced premature chromosome condensation technique. *International Journal of Molecular Medicine*, 8(1), 43–47.
- Talbert, P. B., & Henikoff, S., 2010, Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 264–275.
- Terrenoire, E., Halsall, J. A., & Turner, B. M., 2015, Immunolabelling of human metaphase chromosomes reveals the same banded distribution of histone H3 isoforms methylated at lysine 4 in primary lymphocytes and cultured cell lines. *BMC Genetics*, 16, 1–7.
- Terrenoire, E., McRonald, F., Halsall, J. A., Page, P., Illingworth, R. S., Taylor, A. M. R., Davison, V., O'Neill, L. P., & Turner, B. M., 2010, Immunostaining of modified histones defines high-level features of the human metaphase epigenome. *Genome Biology*, 11, 1–14.
- Turner, B. M., 2000, Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 22(9), 836–845.
- Van De Werken, C., Jahr, H., Avo Santos, M., Eleveld, C., Schuilwerve, J., Laven, J. S. E., & Baart, E. B., 2013, A universal method for sequential immunofluorescent analysis of chromatin and chromatin-associated proteins on chromosome spreads. *Chromosome Research : An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 21(5), 475–489.

- Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G. A. B., & Otte, A. P., 2002, The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419(6907), 624–629.
- Wang, Z., 2021, Regulation of cell cycle progression by growth factor induced cell signaling. *Cells* 2021; 10: 3327

EKLER

Ek.1: Bilgilendirilmiş Onam Formu

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA	**BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU**

Tarih:

"Prematür Kromozom Kondensasyonuyla Elde Edilmiş İnterfaz Kromozomlarıyla Mitotik Kromozomlardaki Histon Modifikasyonlarının İmmünfloresan Yöntemle İncelenmesi" **başlıklı** projenin Gönüllü Onam Formunu okudum. Bana ayrıca İÜ-C, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı merkezindeki çalışma hakkında gerekli bilgiler sözlü olarak açıklanmış olup, açıklamaları tamamen anladım. Yapılacak çalışma ile ilgili soru sorma hakkım anlatıldı. Sorularıma açıklayıcı ve anlaşılır yanıtlar verildi. Bana çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları da açıklandı. Çalışmaya katılmamam halinde hiçbir sorumluluk altına girmeyeceğim ve herhangi bir zamanda çalışmadan ayrılabileceğim açıkça söylendi. Bu koşullar altında projeye kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Çalışmadan elde edilen bilgilerin kimliğim gizli kalmak koşulu ile yayın ve arşivleme dahil bilimsel çalışmalarda kullanımına onay veriyorum.

Gönüllünün Adı- Soyadı
Adresi (varsa telefon no) İmzası

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı – Soyadı
Adresi (varsa telefon no)

İmzası

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı – Soyadı

İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık edenin

Adı- Soyadı Görevi İmzası

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



turnitin Sayfa 1 of 199 - Kapak Sayfası Gönderi Kimliği trn:oid:::1:3278862435

Cahide KARTAL

Cahide KARTAL

Master Tez Taraması

2025 yılı intihal taraması

İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

Belge Ayrıntıları

Gönderi Kimliği
trn:oid:::1:3278862435

Gönderi Tarihi
17 Haz 2025 15:45 GMT+3

İndirme Tarihi
17 Haz 2025 15:58 GMT+3

Dosya Adı
Cahide_Kartal_tez.docx

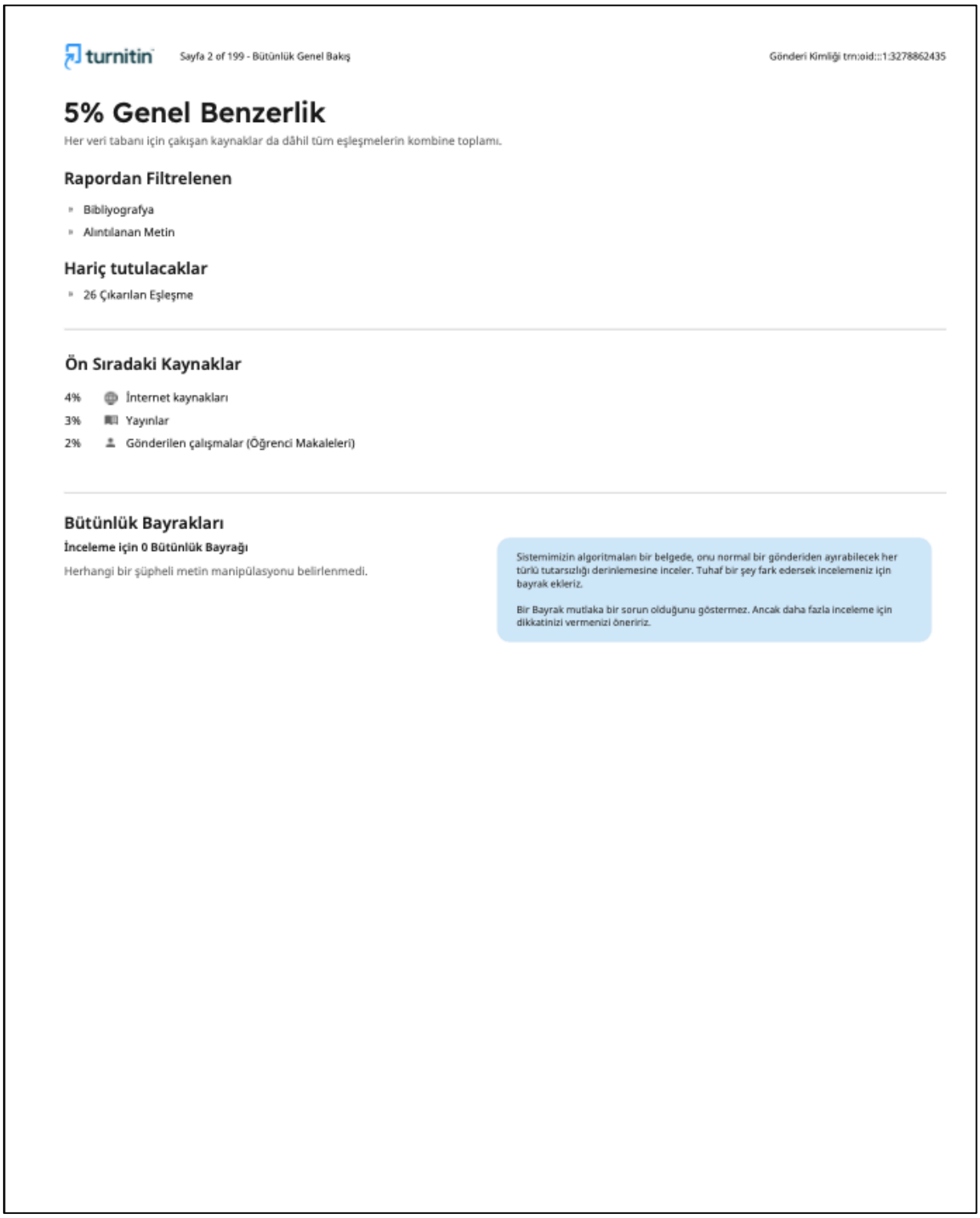
Dosya Boyutu
42.5 MB

194 Sayfa

24.392 Sözcük

169.255 Karakter

turnitin Sayfa 1 of 199 - Kapak Sayfası Gönderi Kimliği trn:oid:::1:3278862435



turnitin Sayfa 2 of 199 - Bütünlük Genel Bakış Gönderi Kimliği trn:oid:::1:3278862435

5% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çakışan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Rapordan Filtrelenen

- Bibliyografya
- Alıntılanan Metin

Hariç tutulacaklar

- 26 Çıkarılan Eşleşme

Ön Sıradaki Kaynaklar

4% İnternet kaynakları
3% Yayınlar
2% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Bütünlük Bayrakları

İnceleme için 0 Bütünlük Bayrağı

Herhangi bir şüpheli metin manipülasyonu belirlenmedi.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırabilecek her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☒ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☐ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Cahide KARTAL

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
REKTÖRLÜĞÜ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-74555795-050.04-1007237 04.06.2024
Konu : Etik Kurul Onayına Gerek Olmadığına İlişkin 2024/70 Sayılı Karar

Sayın Cahide KARTAL
İ.Ü.C Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı Öğrencisi

İlgi : 12.03.2024 tarihli proje başvurunuz.

Danışmanlığını **Doç. Dr. Yelda ARGÜDEN'in** üstlendiği, ***"Prematür Kromozom Kondensasyonuyla Elde Edilmiş İnterfaz Kromozomlarıyla Mitotik Kromozomlardaki Histon Modifikasyonlarının İmmünfloresan Yöntemle İncelenmesi"*** başlıklı **"Yüksek Lisans Tezi"** çalışmanız, Etik Kurulumuzun **17.04.2024** tarihinde gerçekleştirilen toplantısında görüşülmüş olup, **2024/70 No'lu Etik Kurulu Onay Formu** ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerini ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Ayşem KAYA
Başkan

Ek:Onay Formu

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu :BSUSSAFU92 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/istanbul-universitesi-cerrahpasa-ebys
Adres:İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü, 34320 Avcılar-İstanbul
Telefon:0212 404 03 00 Faks:0212 404 07 01
Web:https://www.iuc.edu.tr
Kep Adresi:iuc@hs01.kep.tr
Bilgi için: Secde Nur ATAMTÜRK
Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐ **Kurum izni gerekmektedir.**

☒ **Kurum izni gerekmemektedir.**

Cahide KARTAL