T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALORİ KISITLAMASI İLE BESLENEN FARE MEME TÜMÖRÜ VİRÜSÜ - TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-ALFA FARELERİN TİMUS DOKUSUNDAN RNA SEKANSLAMA ANALİZİ

ZEHRA ÖMEROĞLU ULU

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. NEHİR ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

İSTANBUL, 2018

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALORİ KISITLAMASI İLE BESLENEN FARE MEME TÜMÖRÜ VİRÜSÜ - TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-ALFA FARELERİN TİMUS DOKUSUNDAN RNA SEKANSLAMA ANALİZİ

Zehra ÖMEROĞLU ULU tarafından hazırlanan tez çalışması 22.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Cemal ÜN

Ege Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Semiha ERİŞEN

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Kemal Ö. ÖZTABAK

İstanbul Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2016-01-07-DOP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

"Kalori Kısıtlaması İle Beslenen Fare Meme Tümörü Virüsü-Transforme Edici Büyüme Faktörü-alfa (MMTV-TGF-α) Farelerin Timus Dokusundan RNA-Sekanslama (RNA-seq) Analizi" adlı bu çalışma Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora Tezi olarak sunulmuştur.

Doktora tez aşamamda, beni 2211 'Yurtiçi Doktora Burs Programı' ile destekleyen TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın gerçekleşmesinde emeği geçen ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Soner DOĞAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Bilge GÜVENÇ TUNA'ya çok teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim boyunca ve tez çalışmamda ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam ve danışmanım, Sayın Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde çok büyük pay sahibi olan ve eğitim hayatımın her adımında desteklerini hep yanıbaşımda hissettiğim annem Necibe ÖMEROĞLU ve babam Namık ÖMEROĞLU'na, hayatıma girdiğinden beri her zaman beni yüreklendiren sevgili eşim Salih ULU'ya ve bu süreç boyunca motivasyonumu artıran, neşe kaynağım oğlum Melih ULU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2018

Zehra ÖMEROĞLU ULU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ x

ÇİZELGE LİSTESİ xiii

ÖZET xv

ABSTRACT xvii

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 2

BÖLÜM 2

TEORİK BİLGİLER 3

2.1 Kalori Kısıtlaması ve Etkileri 3
2.1.1 Kalori Kısıtlamasının Yaşam Süresine ve Yaşlanmaya Etkileri 5
2.1.2 Kalori Kısıtlamasının İmmün Sisteme Etkileri 6
2.1.3 Kalori Kısıtlamasının Kansere Etkileri 9
2.1.4 Kalori Kısıtlamasının Oksidatif Strese Etkileri 10
2.1.5 Kalori Kısıtlaması ve Sirtuin Proteinleri 12
2.1.6 Kalori Kısıtlaması ve mTOR Yolağı 13
2.1.7 Kalori Kısıtlamasının Bazı Hormonlara Etkileri 15
2.2 Transgenik Fareler ve Kullanımı 15
2.2.1 MMTV-TGF-α Transgenik Fareler ve Özellikleri 16
2.3 İmmün Sistem 17

2.3.1 İmmün Sistem Hücreleri 19
2.3.1.1 Lenfositler 20
2.3.1.2 Doğal Öldürücü (NK=Natural Killer) Hücreler 21
2.3.2 İmmün Sistem Organları 21
2.3.3 Doğal ve Edinsel İmmünite 22
2.3.4 Sitokinler 23
2.3.5 Timus 23
2.4 RNA-seq 25
2.4.1 RNA İzolasyonu, cDNA Kütüphanesi Kurulması ve Transkriptom için Sekanslama Platformları 29
2.4.2 Transkriptom Analizleri 31
2.4.2.1 Kalite Değerlendirmesi 33
2.4.2.2 Okumaların Hizalanması 33
2.4.2.3 Transkript birleştirme ve Miktar Belirleme 34
2.4.2.4 Diferansiyel Gen Ekspresyonu 34

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD 36

3.1 Materyal 36
3.1.1 MMTV-TGF- α Farelerinin *Ad libitum* (AL), Kronik Kalori Kısıtlaması (KKK) ve Aralıklı Kalori Kısıtlaması (AKK) Şeklinde Beslenmesi 36
3.1.2 Timus Dokusunun Alımı 38
3.2 Metod 39
3.2.1 Total RNA İzolasyonları 39
3.2.1.1 Trizol ile RNA İzolasyonu 39
3.2.1.2 Qiagen RNAeasy Mini Kit ile RNA İzolasyonu 40
3.2.2 Qiagen RNAeasy Cleanup MinElute ile RNA Pürifikasyonu 41
3.2.3 İzole Edilen RNA'ların Karakterizasyonu 42
3.2.4 RNA Sekanslanması 42
3.2.5 RNA-seq Analizleri 42
3.2.5.1 Biyoinformatik Analizler için Hazırlık 42
3.2.5.2 FastQC ile RNA-seq Veri Kalite Kontrolü 43
3.2.5.3 RNA-seq verisindeki okumaların TopHat programı ile Hizalanması 44
3.2.5.4 Cufflinks ile Transkriptlerin Birleştirilmesi 44
3.2.5.5 Cuffmerge ile Farklı Verilerin Birleştirilmesi 45
3.2.5.6 Cuffdiff ile Diferansiyel Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi 45
3.2.5.7 R ile Veri Görüntüleme 46
3.2.5.8 Gen Ontoloji (GO) Analizleri 47
3.2.5.9 Gen Ağ ve KEGG Yolak Analizleri 47
3.2.5.10 Diferansiyel Eksprese Olmuş Genlerin Kat Değişimine (Fold change) Göre Analizleri 48
3.2.5.11 İmmün Sistem İlişkili Genlerinin Belirlenmesi ve Analizleri 48
3.2.5.12 Yaşlanma ve Oksidatif Stres ile İlgili Genlerinin Belirlenmesi 49

3.2.5.13 Sirtuin Proteinleri ve mTOR yolak Genlerinin Belirlenmesi ... 49
3.2.5.14 NCBI GEO Veritabanına Verinin Yüklenmesi ... 49
3.2.6 Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) ile RNA-seq Verisinin Validasyonu ... 49

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE ÖNERİLER ... 51

4.1 RNA İzolasyon Sonuçları ve Karakterizasyonu ... 51
4.2 RNA-seq Sonuçları ... 53
4.3 FastQC ile Verilerin Kontrolü ... 54
4.4 Tuxedo Protokolüne Göre RNA-seq Analiz Sonuçları ... 57
4.5 Diferansiyel Eksprese Olmuş Genler (DEGs) Analizleri ... 62
4.6 Gen Ontoloji (GO) Analizleri ... 64
4.7 Diferansiyel Eksprese Olmuş Genler (DEGs)'in Kat Değişikliğine göre Gen Ağ, GO ve KEGG Yolak Analizleri ... 66
4.7.1 AL-KKK'da Anlamlı Diferansiyel Eksprese Olmuş Genlerin Artan ve Azalan Kat Değişikliğine göre Gen Ağ, GO ve KEGG Yolak Analizleri ... 67
4.7.2 AL-AKK'da Anlamlı Diferansiyel Eksprese Olmuş Genlerin Artan ve Azalan Kat Değişikliğine göre Gen Ağ, GO ve KEGG Yolak Analizleri ... 71
4.7.3 KKK-AKK'da Anlamlı Diferansiyel Eksprese Olmuş Genlerin Artan ve Azalan Kat Değişikliğine göre Gen Ağ, GO ve KEGG Yolak Analizleri ... 75
4.8 İmmün Sistem İlişkili Genlerinin Belirlenmesi, KEGG Yolak ve Gen Ağ Analizi ... 79
4.9 Yaşlanma ile İlgili Genlerinin Belirlenmesi ... 85
4.10 Oksidatif Stresle İlgili Genlerinin Belirlenmesi ... 87
4.11 Sirtuin Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin AL, KKK ve AKK RNA-seq Verilerinde Belirlenmesi ... 89
4.12 mTOR Yolağı Genlerinden Rps6kb1, mTOR, Rac1, Rac2, Rac3, Eif4ebp2 ve Egfr'nin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi ... 90
4.13 Leptin (Lep), Ghrelin (Ghr), İnsülin büyüme faktörü 1 (Igf1), Adinopektin (Adipoq), Kaspaz 3 (Casp3), Timosit antijeni (Thy-1), interlökin-16 (IL-16) ve CD4 Genlerinin qPCR Validasyonları ve RNA-seq Verisindeki Ekspresyon Seviyeleri ... 91
4.14 Tartışma ve Öneriler ... 94

KAYNAKLAR ... 100

EK-A

ETİK KURUL ONAYI ... 122

ÖZGEÇMİŞ ... 123

SİMGE LİSTESİ

^{o}C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
ng	Nanogram
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
sn	Saniye

KISALTMA LİSTESİ

AKK	Aralıklı kalori kısıtlaması
BGI	Beijing Genomics Institute
cDNA	Komplementer DNA
FDR	False Discovery Rate
FPKM	Fragments Per Kilobase Million
GO	Gene Expression Omnibus
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KK	Kalori kısıtlaması
KKK	Kronik kalori kısıtlaması
MGI	Mouse Genome Informatics
MMTV-TGF-α	Fare meme tümörü virüsü-Transforme edici büyüme faktörü-alfa
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIN	RNA Intakt Numarası
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RNA-seq	RNA sekanslama
TGF-α	Transforme edici büyüme faktörü-alfa
YNS	Yeni Nesil Sekanslama

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Oksidatif stres etkisinin hücre içindeki sinyal yolağı 11
Şekil 2.2 mTOR komplekslerinin hedef proteinleri; substratları..... 14
Şekil 2.3 İmmün sistem hücreleri 20
Şekil 2.4 Doğal ve edinsel immünitenin mekanizması..... 23
Şekil 2.5 Timusun Yapısı 24
Şekil 2.6 YNS için hazırlık (RNA izolasyonu ve cDNA kütüphanesinin kurulması) 28
Şekil 2.7 RNA-seq analiz basamakları 32
Şekil 3.1 Yeditepe Üniversitesi'de MMTV-TGF-α farelerinin beslendiği kafesler..... 38
Şekil 3.2 MMTV-TGF-α (C57/BL6) farelerin sakrifiye edilmesi..... 39
Şekil 4.1 A- T139, T152 ve T154 farelerin timusundan yapılan RNA izolasyonunun jel elektroforezi görüntüsü. B- T150, T155, T142, T151, T161 ve T143 farelerinin timuslarından yapılan RNA izolasyonunun jel elektroforezi görüntüsü..... 52
Şekil 4.2 FastQC programından elde edilen temel istatistik grafiğinden bir örnek 54
Şekil 4.3 A- AL temiz okumalarının FastQC ile kontrolü, B- KKK temiz okumalarının FastQC ile kontrolü, C- AKK temiz okumalarının FastQC ile kontrolü..... 54
Şekil 4.4 AL, KKK (CCR) ve AKK (ICR) RNA-seq verisinin gen ekspresyon seviyesi dağılım grafiği 59
Şekil 4.5 A- AL-KKK , B- AL-AKK, C- KKK-AKK arasındaki gen ekspresyon dağılımlarının kat artışına (fold change) ve p-değerine göre "Volcano Plot" şeklinde gösterimi..... 60
Şekil 4.6 AL, KKK ve AKK verilerinin log10 FPKM değerine göre gen ekspresyonlarının "Scatter Plot" grafiği şeklinde karşılaştırılması 60
Şekil 4.7 AL, KKK ve AKK'nın benzer genlerine göre ağaç şeklinde grafiklendirilmesi..... 61
Şekil 4.8 AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında anlamlı diferansiyel eksprese olmuş gen sayıları..... 62

Şekil 4.9 log2 kat değişikliğine (log2 Fold change) göre AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AK verilerindeki anlamlı olarak eksprese olmuş diferansiyel genlerin sayıları 63
Şekil 4.10 AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK'da diferansiyel eksprese olmuş genlerin GO kategorilerine göre sınıflandırılması ve sayısı 65
Şekil 4.11 String veritabanında nokta (node) ve kenarların (edges) renklendirilmeleri ve biçimlerine göre anlamlandırılması..... 67
Şekil 4.12 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. 68
Şekil 4.13 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. 70
Şekil 4.14 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. 72
Şekil 4.15 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. 74
Şekil 4.16 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. 76
Şekil 4.17 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. 78
Şekil 4.18 AL, KKK ve AKK'da anlamlı eksprese olmuş genlerin "İmmün Sistem Proses" (GO:0002376) GO teriminin içerdiği genlerin gen ekspresyon düzeylerinin heatmap grafiği ile gösterimi..... 80
Şekil 4.19 AL-KKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin analizi sonucu 82
Şekil 4.20 AL-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin analizi sonucu 83
Şekil 4.21 KKK-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin analizi sonucu 84
Şekil 4.22 MGI veritabanında GO:0021700 teriminin alt terimleri ve içerdiği gen sayısını içeren görüntü 85
Şekil 4.23 GO:0021700-Aging GO teriminin AL, KKK ve AKK verilerindeki genlerin gen ekspresyon düzeylerinin heatmap grafiği ile gösterimi... 86
Şekil 4.24 MGI veritabanında GO:0006979 teriminin alt terimleri ve içerdiği gen sayısını içeren görüntü 87
Şekil 4.25 GO:0006979-Response to oxidative stress GO teriminin AL, KKK ve AKK verilerindeki genlerin gen ekspresyon düzeylerinin heatmap grafiği ile gösterimi..... 88
Şekil 4.26 AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde bulunan Sirtuin genlerinin $\log_{10}$ FPKM değerlerine göre oluşturulmuş heatmap grafiği..... 89
Şekil 4.27 AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde bulunan bazı mTOR yolak genlerinin $\log_{10}$ FPKM değerlerine göre oluşturulmuş heatmap grafiği 90
Şekil 4.28 Lep, Ghr, Igf1 ve Adipoq genlerinin FPKM değerlerine göre oluşturulmuş heatmap grafiği 91
Şekil 4.29 Thy1, IL-16, CD4 ve Casp3 genlerinin FPKM değerlerine göre oluşturulmuş heatmap grafiği 92

Şekil 4.30 Lep, Ghr, Igf1 ve Adipoq genlerinin 2^{-dCt} metoduna göre hesaplanmış qPCR sonuç grafiği.....93
Şekil 4.31 Casp3, Thy1, IL-16 ve CD4 genlerinin 2^{-dCt} metoduna göre hesaplanmış qPCR sonuç grafiği.....93

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 A) Altromin TPF1414 diyeti kompozisyonu B) Protein, yağ ve karbonhidratlardan elde edilen enerji oranları....37
Çizelge 3.2 qPCR'da validasyonu yapılan genler ve primer sekansları....50
Çizelge 4.1 Nanodrop spektrofotometre ölçüm sonuçları....52
Çizelge 4.2 Agilent 2100 Bioanalyzer ile yapılan ölçüm sonuçları....53
Çizelge 4.3 AL, KKK ve AKK gruplarının RNA sekans gruplarının istatiksel sonuçları....53
Çizelge 4.4 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri....68
Çizelge 4.5 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları....69
Çizelge 4.6 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri....69
Çizelge 4.7 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları....71
Çizelge 4.8 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri....71
Çizelge 4.9 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları....73
Çizelge 4.10 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri....73
Çizelge 4.11 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses,

Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorilerindeki sayıları 75
Çizelge 4.12 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri 75
Çizelge 4.13 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları 77
Çizelge 4.14 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri 77
Çizelge 4.15 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları 79
Çizelge 4.16 AL-KKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri 81
Çizelge 4.17 AL-KKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin KEGG yolak analizi sonuçları 82
Çizelge 4.18 AL-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri 83
Çizelge 4.19 AL-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin KEGG yolak analizi sonuçları 83
Çizelge 4.20 KKK-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri 84
Çizelge 4.21 KKK-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin KEGG yolak analizi sonuçları 84

ÖZET

KALORİ KISITLAMASI İLE BESLENEN FARE MEME TÜMÖRÜ VİRÜSÜ - TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-ALFA FARELERİN TİMUS DOKUSUNDAN RNA SEKANSLAMA ANALİZİ

Zehra ÖMEROĞLU ULU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Kalori kısıtlaması, yetersiz beslenmeye yol açmadan gerekli besin maddelerinin azaltılmasıdır. Kalori kısıtlaması uygulamalarının kanser oluşumunda, immün cevapta, yaşlanma ve ömrün uzaması üzerinde etkileri gösterilmiştir. Besin kısıtlamasına hızlı cevap veren bir lenfoid organ olan timus ise immün sistemin gelişiminde önemli rol oynamaktadır.

Bu çalışmada kullanılan RNA-seq uygulaması, yeni nesil sekanlama ile transkriptom profili oluşturma için kullanılan yeni geliştirilmiş bir yaklaşımdır. Çalışmada, *ad libitum* (AL), kronik kalori kısıtlaması (KKK) ve aralıklı kalori kısıtlaması (AKK) şeklinde beslenen MMTV-TGF-α farelerin timusundan RNA-seq temelli transkriptom sekanslaması yapılmıştır. Illumina HiSeq 4000 teknolojisi kullanılarak çift uçlu okuma yapılmış, 100 bazlık yaklaşık 105 milyon temiz okuma elde edilmiştir. Okumalar Ensembl veritabanında kullanıma açık GRCm38 fare referans genomu kullanılarak TopHat2 programı ile haritalanmıştır. Cufflinks programı ile üç RNA-seq verisinde total olarak 6091 anlamlı diferansiyel eksprese olmuş gen (p-değeri<0.05) tanımlanmıştır. Anlamlı diferansiyel eksprese olmuş genler, Gene Ontoloji (GO) veritabanında moleküler fonksiyon, biyolojik süreç ve hücresel içerik GO ana kategorilerine göre kategorize edilmiştir. AL ile KKK, AL ile AKK ve KKK ile AKK arasında anlamlı diferansiyel eksprese

olmuş genlerden, GO kategorilerinden İmmun Sistem Proses (GO:0002376) kategorisinde bulunan immün sistemle ilgili genler belirlenmiştir.

Bununla beraber, çalışmada elde edilen RNA-seq datalarında yaşlanma, oksidatif stres, sirtuin proteinleri, bazı hormonlar ve bazı metabolik yolakların genleri belirlenmiş ve üç data kendi arasında karşılaştırılmıştır. String veritabanı kullanılarak gen ağ ve KEGG yolak analizleri yapılmıştır. Kalori kıstlaması çalışmaları ve immün sistemde önemli olan leptin (Lep), ghrelin (Ghr), insülin benzeri büyüme faktörü (Igf1), adinopektin (Adipoq), CD4, Thy-1, Il-16 ve Casp3 genleri kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile değişen expresyon seviyeleri validiye edilmiştir. Oluşturulan RNA-seq verileri NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) veritabanına GSE95371 erişim numarası altında yüklenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen transkriptom analiz sonuçları ile beslenmenin özellikle immün sistem olmak üzere, yaşlanma, kanser ve oksidatif stres gibi gibi birçok sistem genlerinin ekspresyonunda etkili olduğu görülmüştür ve elde edilen verilerin kalori kısıtlaması çalışmalarına önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: RNA-seq, timus, kalori kısıtlaması, transkriptom analizi

ABSTRACT

RNA-Seq ANALYSIS OF THYMUS TISSUES CALORIE RESTRICTED MMTV-TGF- α MICE

Zehra ÖMEROĞLU ULU

Department of Molecular Biology and Genetics

PhD Thesis

Adviser: Assoc.Prof.Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Calorie restriction (CR), a reduction in essential nutrients without inducing malnutrition, which is an effective in cancer development, immune response and expanding lifespan. Thymus, is a lympohoid organ, which plays an important role in development of the immune system and reacts to nutritional deficiency quickly.

RNA-seq is recently develop approach to transcriptome profiling using next generation sequencing. RNA-seq based transcriptome sequencing was performed to thymus tissues of MMTV-TGF- α mice in *ad libitum* (AL), chronic calorie restriction (CCR) and intermittent calorie restriction (ICR) fed in this study. Three RNA-seq data were obtained using Illumina HiSeq 4000 to produce approximately 105 million clean readings of 100 base pair-end. These clean reads were mapped to GRCm38 mouse reference genome by TopHat2. In total 6091 significant differential expressed genes (DEGs) were identified with Cufflinks ($p<0.05$). These DEGs were clustered into three main gene ontology (GO) categories; moleculer function, biological process and cellular component. The expression of the significant immun system related genes in immun system process (GO:0002376) GO category were identified in AL-CCR, AL-ICR CCR-ICR differential experession genes (DEGs).

However, the expression of aging, oxidative stress, sirtuin proteins, some hormones and some metabolic pathways related genes in our three RNA-seq data have been

identified and compared. Gene network and KEGG pathway analysis were done using String database. The expression pattern revealed by RNA-seq was validated by quantitative real-time PCR (qPCR) analysis of four important genes for calorie restriction, leptin (Lep), ghrelin (Ghr), insulin like growth factor (Igf1), adinopectin (Adipoq), CD4, Thy-1, Il-16 and Casp3. RNA-seq data has been deposited in NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (GSE95371).

The results have been shown that feeding is very effective for gene expression. The results of this study will provide an important source for nutrition, calorie restriction, immune system, aging, cancer and oxidative stress researches.

Keywords: RNA-seq, thymus, calorie restriction, transcriptome analysis

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kalori kısıtlaması (KK), yetersiz beslenmeye yol açmadan kalori alımının kısıtlanmasıdır [1, 2]. Kalori kısıtlaması uygulamalarının iki ana tipi vardır; kronik kalori kısıtlaması (KKK) ve aralıklı kalori kısıtlaması (AKK). Kronik kalori kısıtlamalarında beslenme devamlı aynı kaloride olurken, aralıklı kalori kısıtlamalarında kalori kısıtlaması belirli aralıklarda olmaktadır [3-6]. Araştırmalar kalori kısıtlamasının baskılayıcı tümör gelişiminde [7, 8], otoimmünite baskılanmasında [9, 10] ve ömrün uzamasında [11] etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, kalori kısıtlamasının insülin resistansı, oksidatif stres, metabolik birçok hormon (Leptin, Adinopektin, Ghrelin, İnsülin) ve bazı sinyal yolakları gibi bir çok metabolik süreç üzerine etkileri bulunmaktadır [12]. Genetik mühendisliği kullanılarak geliştirilen hayvan modellerinde yapılan bazı çalışmalarda AKK'nın, KKK'ya kıyasla kanser önleme gelişimi için daha etkili olduğu [4], [13-16], bazı çalışmalarda ise KKK'nın AKK'ya göre daha etkili olduğu [17-22] görülmüştür.

Timus, immün sistem gelişiminde önemli rol oynayan lenfoid bir organdır. T hücrelerinin farklılaştığı ve olgunlaştığı yerdir [23, 24]. Timus ve diğer lenfoid organlar beslenme eksikliğine diğer organların çoğundan daha hızlı tepki vermektedir [25, 26]. Birçok çalışma KK'nın timik fonksiyonu [2] güçlendirdiği ve timik adipoziteyi [27] düzenleyebildiği için KK, spesifik olarak yaşlanan timustaki adipogenik transkripsiyonunu inhibe eder [28]. KK'nın immün sisteme olumlu yönde etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. KK, T hücrelerinin yanıtları, doğal öldürücü hücre aktivitesi ve mononükleer hücrelerin pro-inflamatuvar sitokinler üretme

kabiliyeti gibi immün yanıtların birçok parametresini geliştirdiğini ortaya koymaktadır [2], [28-31].

RNA sekanslama (RNA-seq), gen ekspresyon düzeyinin ölçüldüğü yeni nesil sekanslamanın bir uygulamasıdır [32-37]. RNA-seq, organizmalarda gen keşfi için kullanılan hassas, hızlı ve etkili bir yöntemdir. Ayrıca RNA-seq ile gen anotasyonu (annotation), transkript profillemesi, gen füzyonlarının tespit edilmesi, tek nükleotid polimorfizm (SNP) keşfi ve alternatif birleştirme (splicing) analizleri mümkündür [33-38]. Kalori kısıtlaması ile ilgili çeşitli dokulardan RNA-seq çalışmaları mevcuttur [39]. Fakat kısa dönem AL, KKK ve AKK beslenme şekillerinin timusa etkisi RNA-seq kullanılarak araştırılmamıştır.

1.2 Tezin Amacı

RNA-seq ile *Ad libitum* (AL), kronik kalori kısıtlaması (KKK) ve aralıklı kalori kısıtlaması (AKK) şeklinde kısa dönem beslenen meme kanseri oluşumu beklenen farelerin timusundaki gen ekspresyon farklılıklarının profilinin çıkarılmasıyla, beslenmenin özellikle immün sisteme etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Kalori kısıtlaması ile beslenme; kanser oluşumunu geciktirmede etkili olduğu gibi, bununla birlikte *ad libitum* beslenmeye göre, özellikle immün sistem gen ekspresyon seviyelerine önemli derecede etkisi olduğu da RNA-seq analiz sonuçlarıyla gösterilmektedir.

BÖLÜM 2

TEORİK BİLGİLER

2.1 Kalori Kısıtlaması ve Etkileri

Yetersiz beslenmeye neden olmadan kalori alımındaki azalmaya kalori kısıtlaması (KK) denir [1, 2]. Genellikle KK hakkındaki makalelerde, gıda tüketiminin kısıtlanmasının yaşam süresi üzerindeki etkisi 1935 yılında Cornell Üniversitesi'ndeki McCay ve arkadaşları tarafından keşfedildiğini belirtilmektedir [40]. Bununla birlikte, gıda alımını kısıtlamanın sağlık yararlarına ve dolayısıyla ömrün uzamasına yol açan bir fikir olduğu eskidir. Bununla ilgili ilk rapor, 1464'te doğan Cornaro'nun 'mümkün olandan az' yeme reçetesi ile Avrupa'da ortalama ömür beklentisinin 30'dan az olduğu bir dönemde 102 yaşına kadar yaşamasıdır [41, 42]. Ancak, gıda kısıtlamasının hayvanlar üzerindeki etkilerine ilişkin deneysel çalışmalar 1900'lü yılların başında başlamıştır. Örneğin, Osbourne ve arkadaşları, 1917'de sıçanların da gıdanın alımını kısıtlamanın, yaşam süreleri ve üreme performansları üzerinde olumlu etkisi olduğu gösteilrmiştir [43]. Bununla birlikte, McCay ve arkadaşları, önce balıkta kısıtlamanın etkileri üzerine araştırmalar yaparak (*Salvelinus fontinalis*) [44] ve daha sonra sıçanlarda % 40 oranında kısıtlama ile yaşam süresinin uzadığını göstermiştir [40]. Bu çalışmanın ardından, KK'nın diğer türlerde de benzer etkilere sahip olduğu gösterildi. Bunlar; tek hücreli organizma olan maya Saccharomyces *cerevisiae* [45], nematod Caenorhabditis *elegans* [46, 47] ve meyve sineği olan Drosophila *melanogaster* [48] gibi model omurgasız organizmalar ve model organizma olmayan örümcek Frontinella *pyramitela* [49], birkaç rotifer türü [50] ve Gerris türleri [51] dir. Ancak, KK'nın omurgasız hayvanlar üzerinde yaşam süresine olan etkisi her zaman olumlu olmamıştır. Örneğin,

ev sineklerinin (Musca *domestica*) yaşam süresini arttırmaz [52] ve bazı rotiferlerde ve su tutucularında olumsuz bir etkiye sahiptir [50, 51]. Omurgalıların arasında KK'nın farelerde (Mus *musculus*) [53], ineklerde (Bos *taurus*) [54] ve köpeklerde (Canis *domesticus*) [55-57] orta ve maksimum düzeyde yaşam süresi üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Kalori kısıtlamasının bu kadar farklı türlerde olumlu etki göstermesi araştırmacıları mekanizmaların anlaşılması için kapsamlı çalışmalara itmiştir. Çalışmalar fareler, sıçanlar, köpekler ve insan olmayan primatlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Çünkü bu organizmalarla yapılan çalışmalar, insana filogenetik açıdan daha yakındır ve daha iyi karşılaştırma sağlamaktadır. Ayrıca, omurgasız hayvanlarda yapılan gıda kısıtlamasında, kısıtlanan kalorinin ölçülmesi problem oluşturduğu için bu araştırmaların omurgalılarda yapılması daha sağlıklı görülmüştür [12].

Kalori kısıtlaması deneysel çalışma protokollerinde genel olarak, *ad libitum* olarak beslenen bir grup ve bu beslenmenin belirli bir yüzdesi kısıtlanarak beslenen başka bir grup vardır. Bu protokollerde sadece kalori değil, makro ve mikro besin öğeleri de aynı oranda kısıtlanmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmalara diyet kısıtlaması (dietary restriction) da denilmektedir [12].

İki temel kalori kısıtlaması (KK) türü vardır; kronik kalori kısıtlaması (KKK) ve aralıklı kalori kısıtlaması (AKK). AKK, "açık" ve "kapalı" periyotlarında kalori kısıtlamasının uygulanmasını ifade etmektedir [3-6]. AKK , bazı kişilere daha iyi uyabilecek kilo kaybı için alternatif bir yaklaşım olarak sunularak, kilo kaybı için KKK'dan daha iyi olmasa bile, ona eşdeğer olduğu gösterilmiştir [58]. Birçok araştırmada, AKK'nın kronik hastalıkların göstergesi olan insülin duyarlılığı, yüksek yoğun lipoprotein kolesterolü ve yağ oksidasyonu gibi durumları iyileştirdiği gösterilmiştir [59], [60], [61]. Genetik olarak tasarlanmış hayvan modellerinde yapılan kalori kısıtlaması çalışmalarında, AKK'nın KKK'ya kıyasla kanser gelişimini önlemede daha etkili olduğu birçok çalışmada mevcuttur [4], [13-16]. Bunun tersini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [17-22].

Kalori kısıtlamasının yaşam süresi, yaşlanma, immün sistem, kanser, insülin resistansı, oksidatif stres, metabolik birçok hormon (Leptin, Adinopektin, Ghrelin, İnsülin) ve bazı sinyal yolakları gibi bir çok metabolik süreç üzerine etkileri bulunmaktadır [12].

2.1.1 Kalori Kısıtlamasının Yaşam Süresine ve Yaşlanmaya Etkileri

Kalori kısıtlamasının yapılan çalışmalar sonucu yaşam süresi üzerine olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir. Küçük rodentlerde yapılan çalışmalar, kalori kısıtlamasının yaşam süresi ve ölüm üzerindeki etkileri, kısıtlamanın derecesi ile ortalama ömrün maksimumu ve maksimum ömrün ne derece arttığını arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiştir [62-65]. Yaşamın ilerleyen zamanlarında KK'nın başlatılması, yaşam süresi üzerinde yine önemli etkilere sahiptir fakat bunlar, erken dönemde kısıtlama başlatıldığında gözlemlenen etkiye göre azdır [66, 67]. Ayrıca kalori kısıtlaması arttıkça yaşam süresi süresiz uzamamaktadır. Maksimum etki, %55-60 kalori kısıtlaması ile ortaya çıkmaktadır. Bu orandan daha fazla kısıtlama yaşam süresini olumsuz etkilemektedir.

Bununla ilgili araştırmalarda, Yu ve arkadaşları %40'lık kalori kısıtlamasının 6 aylık Fischer-344 (F344) sıçanlarının yaşam sürelerinde önemli artış bildirmiştir [68]. Benzer şekilde, Weindruch ve Walford, 12 aylık fare suşunda (C57BL/6 ve B10C310) %40 oranındaki kalori kısıtlamasının yaşam süresini önemli ölçüde artışlar gözlemlendiği bildirmiştir [67]. Pugh ve arkadaşları ise, 12 aylık dönemde tedavi edilen erkek C57BL/6 (B6) farelerde KK'nın yaşam süresini uzatma etkisini teyit etmiş ve aynı zamanda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, KK grubundaki farelerin lenfoid kanserinin ilerlemesinde önemli azalmalar olduğunu bildirilmiştir [69]. Dhahbi ve arkdaşları, 19 aylık erkek C3B6F1 farelerde yaklaşık %40 KK başlatarak azalmış tümör oluşma oranlarının yanı sıra yaşam süresinde önemli artışlar bildirmiştir [70]. Lee ve arkadaşları, 14 aylık erkek B6C3F1 farelerinde başlatılan KK'nın (%40) yavaş yaşlanmayı belirleyen bir gen ekspresyon profili ortaya çıktığını doğrulamıştır [71]. Bununla beraber, fareler arasında genotiplerin aynı KK seviyesine farklı oranda tepki verdiği görülmüştür. Örneğin, Harbison ve arkadaşları erken yaştan itibaren %40 oranında KK'da farelerde yaşa bağlı lezyonların artışı hakkındaki kapsamlı araştırmasında, erkek ve dişi C57BL/6N farelerinin DBA/6N farelerine göre, KK'ya yanıt olarak çok daha fazla hastalık redüksiyonu yaşadığını gözlemlemiştir [72].

2.1.2 Kalori Kısıtlamasının İmmün Sisteme Etkileri

KK'nın bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri üzerine yapılan çalışmalar, öncelikle, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olan adaptif immün yanıtın ya da doğal öldürücü hücrelerin (Natural Killer-NK hücreleri) bileşenleri olan T-lenfosit ve makrofaj popülasyonları üzerindeki etkilerine odaklıdır. T-lenfositler, kemik iliğinden köken alan kök hücrelerden türemiştir. Bu kök hücreler timusta ya CD4 ya da CD8 reseptörü pozitif T-lenfositlerine dönüşmektedir. Bu hücreler, aktive olduklarında timustan çevreye göçerler ve farklı şekillerde gelişirler. CD8 hücreleri öncelikle interlökin-2 (IL-2), interferon gama (IFNc) ve TNF-α üretir ve hücre içi organizmalar (virüsler) ve tümör hücreleri tarafından enfekte olmuş hücreleri yok etmek için gerekli olan sitotoksik yanıtlarda önemli bir rol oynamaktadırlar. Bazı CD4 T-lenfositleri, CD8 T-lenfositlerine benzer bir sitokin profili ile Th-1 hücrelerine (yardımcı T hücreleri) ayrılır ve benzer bir işlevi görür. Bununla birlikte, diğer CD4 hücreleri öncelikle interlökin 4, 6 ve 10 üreten Th-2 yardımcı T hücrelerine dönüşür. Bu hücreler, immünoglobulinlerin (veya antikorların) üretiminde anahtar rol oynayan B-lenfositleri uyarabilir. Memelilerde IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM olmak üzere 5 çeşit immunoglobulin bulunur. Üretimleri humoral yanıt olarak adlandırılır ve bu, bakteriler gibi hücre dışı patojenlere karşı savunma için kritik bir rol oynar. Bu hücrelerin bir dezavantajı, aynı zamanda yaşlanma sırasında karakteristik olarak yükselmiş otoimmün yanıtlar ve otoimmün hastalık üretebilmeleridir. Makrofajlar, antijenlerin T-hücrelerine sunumunu koordine ederek bu sistemde hayati bir rol oynamaktadır. Timusta yeni bir T-hücresi üretme kapasitesinde erken yaştan itibaren yaşa bağlı olarak bir azalma görülür (immunosenesens). Timik involüsyonun nedeni tam olarak bilinmemektedir ancak bir hipoteze göre, bağışıklık sisteminin kullanılması ile yaşa bağlı olarak timusta involüsyon görüldüğü düşünülmektedir [73]. Rodentlerde yaşa bağlı olarak T hücresi fonksiyonlarının in vitro ölçümlerinde [74-77], mitojenik ajanlar için proliferatif cevaplar Concancavalin-A (con-A) ve fitohemaglutinin (PHA) içermektedir. Bu değişiklikler, Il-2 üretiminin azalmasıyla yansıtılmaktadır. Bu azalmalara kısmen, bir T hücresi baskılayıcı faktör olan prostaglandin E2 (PGE2) üretimindeki yaşa bağlı bir artışın aracılık ettiği görülmektedir [78, 79].

KK, farelerde timik involüsyonu geciktirmektedir [28], [80-82] ve aynı zamanda PGE2 üretimini de azaltmaktadır [83]. Bu durumda KK, ömrün ilerleyen zamanlarında daha çok T lenfosit üretimine ve aktivitesine ve farelerde IL-2 üretiminin yaşa bağlı azalmasının tersine dönmesine yol açar. Bu değişiklikler, KK ile farelerinin kansere karşı direnci ve rodentlerin de yaşla birlikte otoimmün hastalığın belirgin bir azalması ile uyuşmaktadır [84, 85]. Yapılan çalışmalarla da otoimmün hastalıklara duyarlı olan rodentlerde otoimmün hastalıkların geciktiği görülmüştür [86-89]. Daha önce aşılanmış oldukları bir virüs enfeksiyonuna karşı KK ile beslenen farelerden alınan hücreler ile yapılan bir araştırmada, farelerin daha yüksek bağışıklık kapasitesine sahip oldukları görülmüştür [90]. Köpeklerde de KK'nın hücresel bağışıklık sistemi üzerindeki pozitif etkileri olduğu bildirilmiştir [91]. Bununla birlikte, insan haricindeki primatlarda KK ile beslenme durumunda immün yanıtta farklılıklar vardır. Roecker ve arkadaşlarının 2-4 yıl boyunca Rhesus maymunlarında uyguladıkları KK sonrasında, bağışıklık işlevinin birkaç işaretçisinin, PHA'ya tepki olarak lenfosit proliferasyonuna karşı NK aktivitesi ve immünoglobülin üretiminin azaldığını keşfetmişlerdir [92]. Bu proliferasyon yanıtının benzer şekilde, 7 yıl uygulanan KK sonrasında AL'ye göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir [93]. Ayrıca, PHA'ya cevaben INF-gama üretimindeki yaşa bağlı düşüşün KK uygulandığında azaldığı görülmüştür [94]. Aynı zamanda farelerde uzun süreli KK uygulanmasının farelerde bağışıklık sistemi üzerine olumlu etkileri olduğu düşünülmektedir [95, 96].

KK'nın immün sistemle ilişkisinin dolaşımdaki artan ghrelin ve azalan leptin düzeylerinin olduğu düşünülmektedir [97-99]. Ghrelin infüzyonunun, yaşa bağlı timik involüsyonunu kısmen tersine çevirdiği bilinmektedir [100]. Ghrelin, T hücrelerinde proinflammatuvar sitokinlerin üretimini, büyüme hormonu salgılatıcı reseptör GHS-R'ye bağlı bir şekilde inhibe eder [101]. Hamsterlarda yapılan bir çalışmada, yağ dokusunun cerrahi olarak çıkarılması ile hümoral immün yanıtın bozulduğu görülmüştür [102]. Hayvanlara leptin hormonu eklendiğinde normale döndüğü bildirilmiştir [98]. Leptinin yanı sıra ghrelinin de KK ile beslenmede immün yanıtta önemli rol oynadığını düşündürmektedir [12].

KK'nın immün sistem üzerine olan olumlu etkilerini destekleyen bir potansiyel mekanizma da, KK'nın T-lenfositlere zarar verebilecek radikal oksijen türlerinin

üretimini azaltmasıdır [103]. T-lenfositlerin in vitro deneylerine dayanan immün fonksiyon ölçümlerinde, bağışıklık sisteminin KK tarafından arttırıldığını ve bu şekilde kanser riskinin ve otoimmün hastalık insidansının azaldığı görülmüştür [12]. Ayrıca, KK'nın makrofaj fonksiyonu üzerinde de büyük etkisi vardır. 8-12 hafta boyunca %50'lik KK'ya maruz bırakılan sıçanlarda, kan monositlerinin H_2O_2 üretiminde %75'lik oranında bir azalma görülmüştür. Prostaglandin üretiminde periton makrofajları tarafından da önemli bir artış olmuştur [104]. Azalan oksidatif stresin bu etkisi, immün sistemin bir etkisi olduğunu düşündürmektedir [12].

KK uygulanan farelerin patojenlere maruz bırakıldığı çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmaların tümünde, AL ve KK'ya maruz bırakılan hayvanlar karşılaştırılmış ve önemli farklılıklar belirlenmiştir. AL ve KK ile beslenen farelerin influenza virüsüne maruz bırakıldığı bir araştırmada KK grubundaki farelerin daha fazla yaşadığı gözlemlenmiştir [105]. %40'lık KK uygulanan peritonitis model farelerde ise KK uygulanan farelerin AL'ye göre %40'nın daha az hayatta kaldığı görülmüştür [106] . Bu çalışmaların her ikisinde de klasik hücresel esaslı bağışıklık testleri, bağışıklık fonksiyonunun KK ile geliştiğini ortaya koymuştur [105]. KK farelerinin immün yanıtının güçlü olmasının bir nedeni olarak organizmalarında daha az yağa sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [107]. Bundan dolayı, leptin ve ghrelinin immün yanıtta önemli rol oynadığı bilinmektedir.

Genel olarak, KK'nın immün sistem üzerindeki farklı etkileri, KK'nın bu süreç üzerindeki birkaç durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Öncelikle, ghrelin stimülasyonu ve leptin sirkülasyonundaki azalma T hücre proliferasyonu üzerinde önemli etkileri vardır. Ayrıca, KK'nın oksidatif stres üzerindeki etkileri de immün yanıtı olumlu ya da olumsuz etkilediği yapılan araştırmalar sonucu görülmüştür. Bir yandan indirgenmiş oksidatif stres T hücrelerini koruyabilir, tümör hücreleriyle savaşma kabiliyetlerini arttırabilir ve böylelikle KK'nın kanser ve otoimmün hastalıklara karşı sağladığı korumayı kolaylaştırabilir. CR'nin çoğu kemirgen çalışmalarını tanımlayan, patojen barındırmayan ortamda, bu etki egemen olacaktır. Diğer yandan radikal oksijen türleri (ROT), patojenlerle mücadelenin bir parçasıdır ve ROS üretme kapasitesinin düşürülmesini takiben, KK ile beslenme enfeksiyonlara karşı direnç gösterme kapasiteleri bakımından immün sistem üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir [12].

2.1.3 Kalori Kısıtlamasının Kansere Etkileri

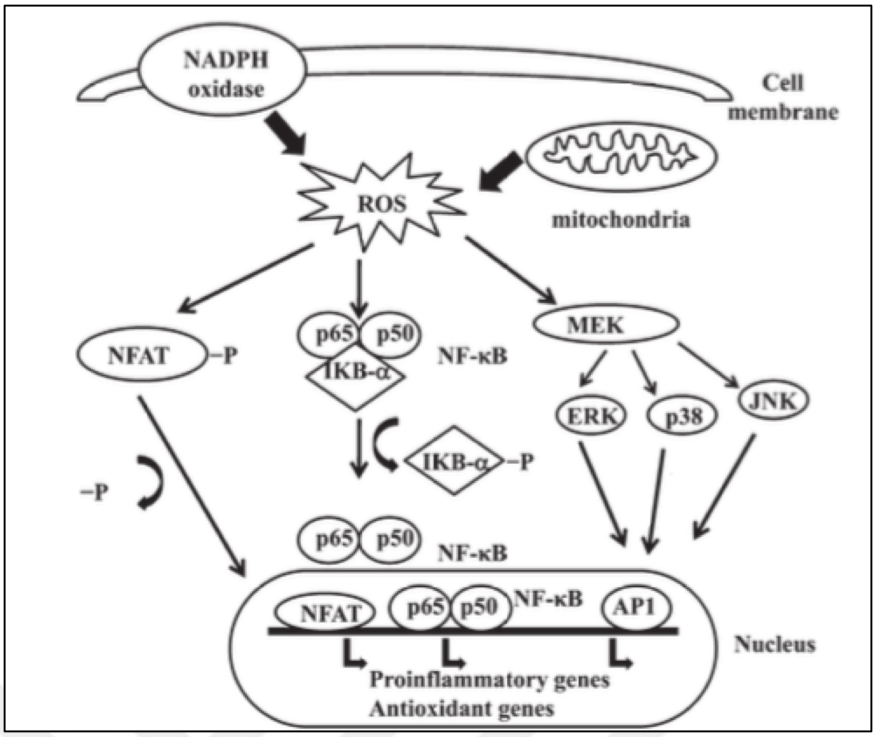
Kalori kısıtlamasının tümör gelişimi üzerinde etkili olduğu yönündeki ilk çalışma 1909 yılında Moreschi tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada KK ile beslenen sıçanlara nakledilen tümörlerin, AL olarak beslenen sıçanlara nakledilenlere göre tümörün büyümediğini görülmüştür [108]. KK'nın koruyucu etkisi 1940'larda Tannenbaum'un yaptığı çalışmalarla doğrulanmıştır [109]. Küçük kemirgenlerde yapılan çalışmalarla KK'nın kansere yatkınlığı azalttığı gösterilmiştir [53], [108], [110]. Bu koruyucu etki, çeşitli dokulardaki spontan tümörlerin başlamasında ve ilerlemesinde azalmayı içermektedir [111], [53]. Örneğin, bir çalışmada, AL olarak beslenen farelerde tümörlerin yaşam boyu oluşma oranı sırasıyla erkeklerde %89, dişilerde ise %86 iken KK uygulanan farelerde ise her iki cinsiyette bu oran %64 olarak belirlenmiştir. KK ile beslenen dişi farelerde, lenfomada %29'dan %9'a kadar azalmalar, hipofiz tümörlerinde %37'den %1'e düşüş ve tiroid tümörlerinde ise %8'den %0,8'e düşme görülmüştür. KK uygulanmış erkek farelerde ise hepatoselüler tümörler %10'dan %1'e kadar düşmüştür. KK uygulanan hayvanlarda tümör oluşumunu geciktirmiştir; erkeklerde tüm neoplazmların %87'si ve kadınlarda %95'i AL olarak beslenen hayvanlarda 24 aylıkken meydana gelmişken, KK uygulanmış bu yaştaki hayvanlarda neoplazmların görülme oranı sadece %52 ve %39'dur [112]. Ayrıca, spontan ve indüklenebilir tümörlere daha duyarlı p53 geni indüklenmiş farelerde yapılan bir çalışmada, 10 aydan itibaren haftada bir gün %40'lık KK uygulandığında tümör oluşumunun azaldığı görülmüştür [113].

KK'nın kanser üzerindeki etkileri üzerine yapılan çalışmaların çoğu, KK'nın meme kanseri üzerindeki koruyucu rolüyle ilgilidir. Dirx ve arkadaşlarının yaptığı 14 çalışmanın meta analizinde, KK uygulanmış hayvanların kontrol grubuna göre %41 ila %69 arasında daha az meme tümörü geliştirdiği görülmüştür. KK'nın başlatıldığı farelerin yaşı, KK uygulama süresi, farelerin doğurganlığı ve enerji sağlayan besleyici maddelerin türü (yağ, karbonhidrat veya protein) temel alındığında sonuçlar üzerinde herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir. Bu meta-analiz, KK'nın farelerde meme tümörlerinin gelişimine karşı koruma sağladığını doğrulamıştır [114]. Meme tümörlerine duyarlı bir suş olan MMTV-Neu, Pape-Ansorge ve arkadaşlarının yaptığı %16'lık bir KK uygulaması ile, AL olarak beslenen farelerde bildirilen meme tümörlerinin oranını seviyenin önemli

ölçüde azaltmamıştır. Bununla birlikte, ortalama sadece %10 oranında AKK uygulanmış kısıtlanmış fareler, şaşırtıcı bir şekilde KKK uygulanmış farelere göre tümör gelişiminden daha fazla korunmuştur [115]. Doğan ve arkadaşlarının MMTV-TGF-α transgenik farelerde yaptığı çalışmada ise, %25 KK uygulanan KKK grubu, üç hafta AL bir hafta %50 kısıtlama ile beslenen AKK grubu ve AL grupları arasında KKK ve AKK gruplarında meme kanseri tümörünün gelişmesinin geciktiği görülmüştür. Bu çalışma ile özellikle AKK'nın KKK'dan daha etkili olduğu kanıtlanmıştır [15].

2.1.4 Kalori Kısıtlamasının Oksidatif Strese Etkileri

Oksidatif stres, serbest radikaller olarak bilinen reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ile antioksidan savunmalar arasındaki dengede bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır [116]. ROT, normal hücresel metabolizmanın bir sonucu olarak canlı organizmalar tarafından üretilir [117]. Düşük ve orta konsantrasyonlarda, fizyolojik hücre süreçlerinde çalışırlar. Ancak yüksek konsantrasyonlarda; lipidler, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerine olumsuz modifikasyonlar oluştururlar [117-121]. Oksidan/antioksidanlar arasındaki dengede oksidanlar lehine kaymalar "oksidatif stres" olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif stres; kanser, nörolojik bozukluklar [117], [122-125] ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi/perfüzyon [117], [126-129], diyabet, akut solunum sıkıntısı sendromu, idiopatik pulmoner fibrozis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi birçok patolojik duruma katkıda bulunmaktadır [117], [130]. Şekil 1'de oksidatif stres etkisinin hücre içindeki sinyal yolağı gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Oksidatif stres etkisinin hücre içindeki sinyal yolağı [117]

Kalori kısıtlamasının başlıca hücresel etkilerinden biri oksidatif stresi azaltmaktır [131-134]. Örneğin, uzun süreli KK'daki sıçanlar yüzme egzersizi ile indüklenmiş oksidatif strese karşı, beyin, akciğer, karaciğer, böbrek ve kalp de dahil olmak üzere birçok dokuda korunmaktadır [135, 136]. Yaşlanma ve KK'nın kreatin kinaz (CK), glutamin sentetaz (GS) ve erkek ve dişi sıçanların serebellum, hipokampüs ve korteks bölgelerinde protein karbonil oluşumu üzerindeki etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, CK aktivitesinin beynin üç bölgesinde de yaklaşık olarak %30 azaldığı gösterilmiştir. Ancak GS aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olamadığı görülmüştür. Protein karbonil seviyeleri, tüm 3 beyin bölgesinde yaşla birlikte önemli ölçüde artmıştır. KK, protein oksidasyonunda ve CK aktivitesini yaşla ilişkili azalmayı düşürmüştür. Üstelik GS'nin KK ile beslenen sıçanların beynindeki aktivitesi AL ile beslenen genç hayvanların beyinlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. KK bu nedenle yaşa bağlı oksidatif stres düzeylerini hafifletir ve beyindeki protein hasarını azaltmaktadır [137].

Azaltılmış oksidatif stres birkaç farklı mekanizma ile sağlanabilmektedir. Bunlardan biri, oksijen serbest radyallerin oluşturulmasında bir azalma ve radikal oksijen türlerinin (ROT) detoksifiye edildiği oranda bir artış ve dolayısı ile hasarda bir azalma şeklinde olabilir. Bozulma ve onarım işlemlerinde, hasarın etkisinin ortadan kalkması için bir

düzenlemeye neden olurlar. KK'nın oksidatif streste genel bir azalmayı etkilemek için bu farklı bileşenlerin üçünü modüle ettiğini gösteren kanıtlar vardır [12].

2.1.5 Kalori Kısıtlaması ve Sirtuin Proteinleri

Sirtuin ailesi proteinleri (SIRT1 - SIRT 7), tip II diyabet, obezite, kanser, yaşlanma, uzun ömürlülükte ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda önemli rol oynadığı bilinen ve birçok proteinin aktivitesini düzenleyen NAD+ bağımlı deasetilazlardır [138, 139]. Alt organizmalarda sirtuinlerin DNA onarımını ve rekombinasyonu, kromozomal stabiliteyi ve gen transkripsiyonunu düzenlemektedir [140]. SIRT1 geni ortoloğu SIR-2'nin yüksek aktivitesi maya, solucan ve sineklerde yaşam süresini uzatmaktadır [141]. KK, birçok dokuda SIRT1'in ekspresyonunu artırmaktadır [142, 143]. Bununla birlikte, bu etki tüm dokularda veya farklı çalışmalarda tekdüze görünmemektedir. Örneğin, bir çalışmada SIRT1 aktivitesi, karaciğerde KK ile azalmış ve yüksek kalorili bir diyetle aktive edilmiştir [141]. Ancak başka bir çalışmada KK, SIRT1 ekspresyonunu hem pankreasta hem de karaciğerde arttırırken, yüksek yağlı diyetle tedavide azalma görülmüştür [144]. SIRT1 mRNA'sında bir artıştan ziyade SIRT1 proteininin stabilizasyonu nedeniyle kültür hücrelerinde besin yoksunluğuna yanıt olarak SIRT1 artmıştır [142].

SIRT1, transkripsiyonel koaktivatör PGC-1a ile etkileşime girerek açlığa yanıt olarak karaciğerdeki glukoneojenik/glikolitik yolları kontrol eder. Piruvat seviyelerinin aracılık ettiği bir besin sinyali tepkisi açlık sırasında karaciğerde SIRT1 proteinini indükler. SIRT1 indüklendikten sonra PGC-1a'yı deasetile edilir. SIRT1 indüksiyonu, glukoneojenik gen ekspresyonunu ve hepatik glukoz çıkışını indükler ve PGC-1a yoluyla glikolitik genleri bastırır [145, 146]. SIRT1 eksikliği, yüksek mTOR sinyalleşmesiyle sonuçlanmaktadır [147]. KK ile sirtuin aktivasyonu, bağışıklık sistemindeki değişikliklerde de rol oynamıştır [148].

SIRT2, oksidatif stresi modüle etmede önemli rollere sahiptir [149] ve yağ hücresi proliferasyonunu inhibe etmektedir [150].

SIRT3 geni ise mitokondriyal eksprese edilen ve mitokondriyal internal membranda yer alan ve aynı zamanda KK'ya cevap veren sirtuin ailesinin bir üyesidir [151]. İskelet kasında SIRT3 protein düzeyleri KK ile artmış ve yüksek yağlı diyetle beslenerek azalmıştır [151]. SIRT3, KK altında oksidatif strese karşı savunma mekanizmalarının

aktivasyonunu düzenleyen önemli bir bileşen olabilmektedir [152]. Yaşa bağlı işitme kaybı çalışmalarında, KK'nın yabani tip farelerde yaşa bağlı işitme kaybını önlediğini, fakat SIRT3 içermeyen farelerde bu fenotipi değiştiremediğini göstermektedir. Bu nedenle SIRT3, KK'ya yanıt olarak mitokondriyal glutatyon antioksidan savunma sistemini geliştirdiği düşünülmektedir [152].

Ayrıca bazı meme kanseri çalışmalarında SIRT1 ve SIRT7 gen ifadelerinin normal dokuya göre tümörlü dokuda arttığı görülmüştür [153].

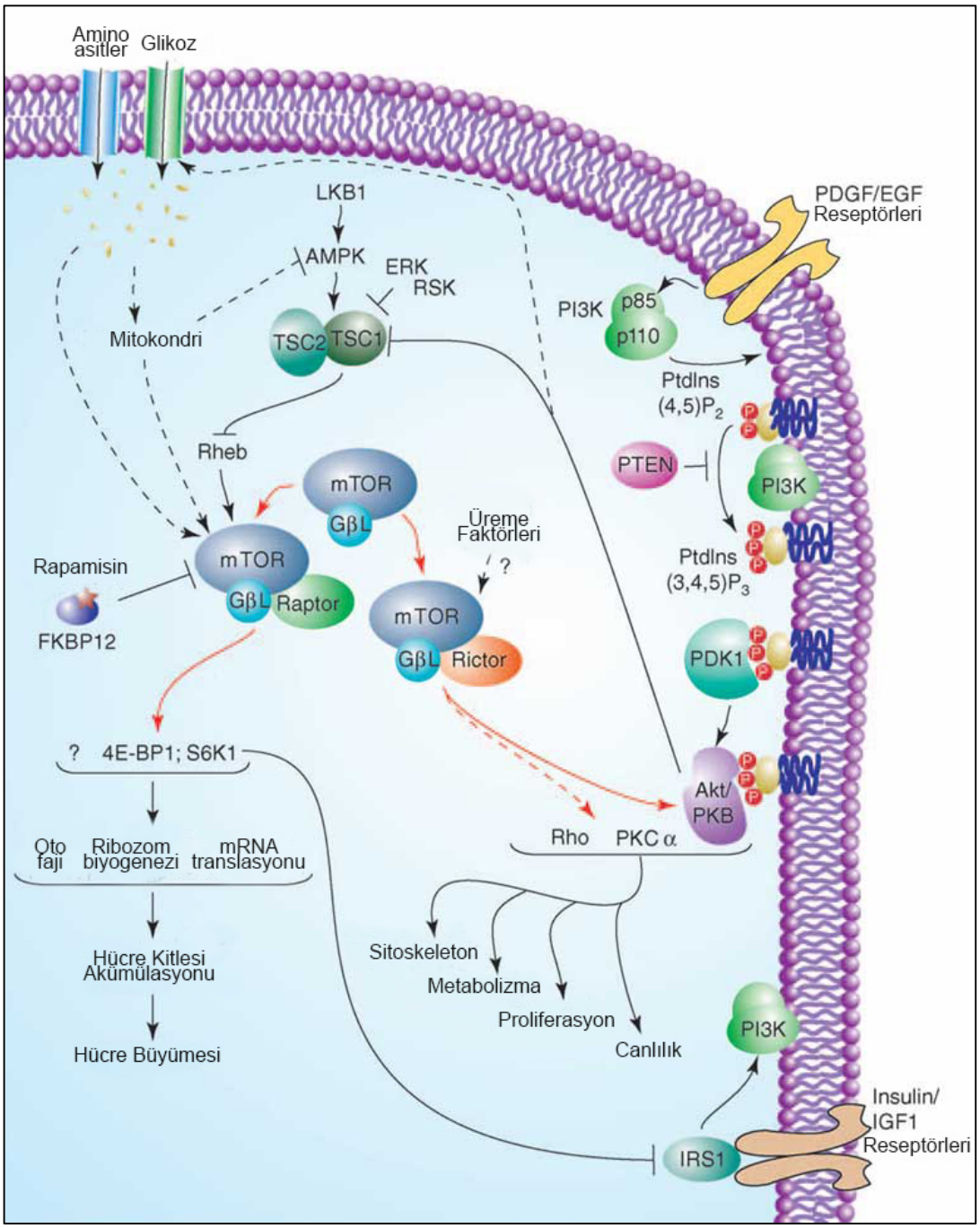
2.1.6 Kalori Kısıtlaması ve mTOR Yolağı

mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), Memeli Rapamisin Hedefi Protein olarak bilinen Fosfoinositid-3-Kinaz İlişkili Kinaz Ailesi'nin (PIKK) üyesidir [154]. Maya ve memelilerde yapılan genetik çalışmalar; bir toprak bakterisi tarafından üretilen ve bir makrolid olan, klinikte immün baskılayıcı olarak kullanılan Rapamisinin hedefi olarak TOR'un keşfini sağlamıştır [155]. mTOR; büyüme faktörleri, değişen besin şartları ve enerji dalgalanmaları gibi çevresel olaylara karşı geniş spektrumlu bir cevap oluşturmaktadır [155, 156].

mTOR, fonksiyonel ve yapısal olarak farklı multiprotein komplekslerinden oluşan iki kompleksin (mTOR Kompleks1 (mTORC1) ve mTOR Kompleks2 (mTORC2)) katalitik alt ünitesidir [155].

mTORC1, besinler özellikle glikoz, büyüme faktörleri, stres ve enerji ile düzenlenirken; mTORC2 için sadece büyüme faktörlerinin doğrudan etkisi görülmüştür. mTORC1 esas olarak protein sentezinden sorumludur. mTORC1 substratları olan S6K1 (S6 Kinaz1) ve 4E-BP1 (eIF4E Bağlayıcı Protein 1) mRNA translasyonu ile ilişkilidir. Bir dizi fosforilasyon mekanizmasının ardından S6K1 ve 4EBP1 aktive olarak translasyonun başlamasını ve devamlılığını sağlamaktadır [155], [157].

mTORC2 ise daha çok hücre iskeleti düzenlenmesinde ve hücre polarizasyonunda görevlidir. mTORC2 çok sayıda hücre iskeleti düzenleyicisini kontrol eder [155], [158, 159]. Son yıllardaki veriler mTORC2'nin AGC kinaz ailesi üyeleri olan Akt (Protein Kinaz B), SGK (serum ve glukokortikoid ile regüle olan kinazlar) ve PKC (Protein Kinaz C)'yi de fosforillediğini göstermektedir [155], [160-163]. Bu proteinler, hücre canlılığı, hücre döngüsünün ilerlemesi ve anabolizma ile ilişkilidir [155], [164].



Şekil 2.2 mTOR komplekslerinin hedef proteinleri; substratları [155], [165].

Kalori kısıtlamasının mTOR sinyal yolağına etkisinin araştırıldığı çalışmalar vardır [166, 167]. Jiang ve arkadaşlarının kalori kısıtlaması uygulanan hem sıçan meme karsinomu hem de meme bezleri üzerindeki çalışmasında Akt aktivasyonu, mTOR protein ekspresyon düzeyleri ve yolak proteinleri olan p70S6K ve p4EBP1 düzeylerinin azalması yönünde çalışmaları vardır. Buna ek olarak, AMPK aktivasyonu, meme bezlerinde %20 ve %40 kalori kısıtlaması ile önemli ölçüde artmıştır [166]. Ayrıca Moore ve arkadaşları 15-17 hafta boyunca hem erkek hem dişi farelerde %30 kalori kısıtlaması uygulayarak

mTOR, p70S6K, EGFR, IGF-IR ve Akt aktivasyonunun epidermal, karaciğer ve prostat dokularında azaldığını bildirmişlerdir [168]. Doğan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, MMTV-TGF-α farelerinde 10. haftadan 37/38. haftaya kadar KKK (%25 oranında kısıtlama) ve AKK (3 hafta AL, 1 hafta %50 kısıtlama) kısıtlama uygulandığında, mTOR sinyal yolağı ile ilişkili proteinlerin (p70S6K, HIF-1, Akt ve pErk1/2 aktivasyonu) ekspresyon seviyelerinin KKK ve AKK'da *ad libitum* beslenmeye göre önemli ölçüde azalmış, p4EBP1'nin ise artmış olduğu görülmüştür [169].

2.1.7 Kalori Kısıtlamasının Bazı Hormonlara Etkileri

Adinopektin (Adipoq), Leptin (Lep), Ghrelin (Ghr) ve İnsülin benzeri büyüme faktörü (Igf1) gibi hormonların kanser gelişimi ve immünitede önemli rol oynadığı bildirilmiştir [15], [170], [97]. Adinopektin, insülin duyarlılığını başlatmak için önemli bir hormondur, KK sırasında ekspresyonu artar [171, 172]. Leptin, stres hormonu düzeyini azaltır, tiroid aktivitesini ve tiroid hormon düzeylerini yükseltir [173]. KK, stres hormonlarının sekresyonunu artırdığı ve tiroid hormonlarının da sekresyonunu azalttığı için KK'da leptin ekspresyon düzeyleri azalmaktadır [173, 174]. Ghrelin, proinflamatuar sitokinleri azaltarak bağışıklık fonksiyonunu düzenlemektedir [171]. Ghrelinin KK ile beraber sekresyonu artmaktadır [175]. Igf1'in KK ile ilişkisine bakıldığında, birçok literatür KK'nın Igf1 düzeyini düşürdüğünü bildirmesine rağmen [176-178], KK'nın Igf1 ekspresyon düzeylerinde herhangi bir arttırma ya da azaltma gibi bir etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [179, 180].

2.2 Transgenik Fareler ve Kullanımı

Transgenik hayvanlar, genomlarında "transgen" olarak adlandırılan başka bir organizmanın DNA parçasını taşıyan hayvanlardır. İlk transgenik rodent 1980 yıllında mikroenjeksiyon tekniği ile Gordon ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [181]. 1985 yılında ilk transgenik tavşan, koyun, domuz ve inekler elde edilmiştir. Yapılan ilk deneysel transgenik çalışma ise, 1980'li yıllarda sıçan büyüme hormonu geni kullanılarak gerçekleştirilmiştir [182]. Mikroenjeksiyon tekniği ile üretilen ve daha çok hastalık modellemesi amacıyla gelistirilen transgenik farelerin ilki 1980 yılında yayınlanmıştır. Transgenik hayvanların üretimi biyoloji, tıp ve veteriner hekimlik alanındaki araştırmalar için oldukça önemli olmuştur. Rekombinant DNA teknolojisinin

kullanılmasıyla üretilen transgenik hayvanlar, transgen olarak adlandırılan aktarılmış bir gen, bir genin kontrol elementleri olan enhancer element ve promotor ve bir genin protein kodlayan DNA baz dizisini (cDNA veya genomik DNA) içerebilir. Transgenik hayvanların üretiminde kullanılan en yaygın teknik pronükler DNA mikroenjeksiyondur [183]. DNA mikroenjeksiyonu yönteminde gen transferi, bir hücreli dönemde döllenmiş yumurtaların pronükleuslarına yapılmaktadır [182]. Bu teknoloji sayesinde, farklı türler arasında gen transferi yapılabilmektedir. Örneğin; bazı insan genlerinin ekspresyonunu yapabilecek hayvan modellerinin üretilebilmesi için, ekspresyonu yapılması istenen geni rodent genomu içerisine entegre edilebilmektedir [183]. Transgenik çalışmalarda rodentler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun sebebi, diğer türlerle karşılaştırıldığında maliyetlerinin az olması, biyolojilerinin fazlasıyla bilinmesi, yavru sayısının fazla olması, doğumun 19-21 gün gibi kısa sürede gerçekleşmesi ve östrus siklusunun yaklaşık 4 gün olmasıdır. Bunlara ek olarak, transgenik rodentler, genlerin fonksiyonlarının ve gen regülasyonlarının canlı hayvanda çalışılmasına olanak sağlamaları bakımından diğer sistemlere göre daha üstün avantajlar sunmaktadırlar [184].

2.2.1 MMTV-TGF-α Transgenik Fareler ve Özellikleri

Karsinogenezis çok adımlı olarak kabul edilmektedir. Genetik hasar karsinogenezisin ayrılmaz bir bileşeni olarak düşünülse de, kanserojen ajanların tümü genotoksik değildir. Non-genotoksik ajanların etki şekli, önemli bir bileşen olarak proliferasyonu içerir. Hücre proliferasyonu, tümör promotörleri olarak sınıflandırılan ajanların etkisinde kritik bir rol oynar. Bu ajanlar, genetik hataların yayılmasına neden olan hücrelerin çoğalmasını artırarak etki yapabilirler [185-188].

Transforme edici büyüme faktörü-α (TGF-α), bir mitojenik polipeptiddir [189, 190]. Olgun peptit, 160 amino asitli bir prekürsörden türetilen 50 amino asitten oluşur. Pro-TGF-α membrana bağlıdır ve olgun peptid, proteolitik bölünme ile üretilmektedir [191]. TGF-α, epidermal büyüme faktörü (EGF) ile yaklaşık olarak % 35'lik homoloji gösterir ve EGF gibi EGFR reseptörü ile bağlanma yoluyla etki etmektedir [192]. TGF-α orijinal olarak transforme hücrelerde bulunmasına rağmen, çok çeşitli normal hücreler ve embriyonik dokular da dahil olmak üzere birçok hücre tipinde tanımlanmıştır. Hücre

çoğalması, farklılaşması ve gelişimini uyarmaktadır. Ayrıca meme bezinin normal ve neoplastik aşamalarda gelişmesinde önemli bir büyüme faktörüdür. EGFR reseptörüne bağlanarak kanser hücrelerinde çok sayıda ifade edilerek kanser hücrelerinin çoğalmasını uyarmaktadır [193-195].

Halter ve arkadaşları, fare meme tümörü virüsü (MMTV) promotor/güçlendirici bölgesini içeren, insan TGF-α'yı eksprese eden transgenik fareler geliştirmiştir. Bu fareler yaşamlarının ikinci yarısında meme tümörü oluşturmaktadır. MMTV farelerde bazı meme kanseri tümörlerinin oluşumuna sebep olan bir retrovirüstür. MMTV'nin aktarıldığı MMTV-Cox2 ve MMTV-Neu gibi farklı organizmalar da vardır. Bu virüsünün aktarıldığı MMTV- TGF-α farelerden sekiz hat oluşturulmuştur. Altı hat incelenmiş ve üç farklı fenotip ile çalışılmıştır. Dişilerdeki bu hatların ikisinde meme bezi patolojisi görülmüştür. 29 ve 254 hatlarında dişi farelerin meme bezleri, beş farklı desen halinde sınıflandırılabilen epitelyumun proliferasyonları ile karakterize edilmektedir. Karsinoma, bu iki hatta dişi farelerin hepsinde gelişmektedir [196].

2.3 İmmün Sistem

Yabancı ve zararlı olan maddelere karşı organizmanın verdiği reaksiyon immünite olarak tanımlanmaktadır. Bu yabancı maddeler mikroorganizma, protein ve polisakkarid olabilir. İmmün yanıt, organizmanın yabancı madde ile karşılaştığında immün sistem hücre ve moleküllerinin karşılıklı ve düzenli etkileşimleriyle ortaya çıkardığı savunmadır. İmmün yanıtı başlatan yabancı maddeler antijen veya immünojen olarak adlandırılmaktadır. İmmunojen, immün yanıt oluşturma yeteneğindeki herhangi bir maddedir. Antijen ise, spesifik immün yanıtın ürünleri ile reaksiyona girebilme yeteneğindeki moleküldür ve her zaman spesifik immüniteyi oluşturmaz. Bütün immünojenler antijendir, fakat bütün antijenler immünojen olarak ifade edilemez [197].

Antijenler özgül moleküllerdir ve kendisine özgül olan antikorlarla birleşmektedir. Antkorlara immunglobulin adı da verilmektedir. Antijenlerin antikorlarla birleşmesini sağlayan kimyasal gruplara epitop adı verilmektedir. Bir antijenin birden fazla epitopu bulunmaktadır. Antijenin immünojenitesini belirleyen pekçok özellik vardır; kimyasal yapı ve heterojenite, konak için yabancı olma, konakta kalıcı olma, moleküler ağırlık,

elektriki yük, antijenin dozu ve giriş yolu gibi. Konak organizmanın ise immünojenitesini belirleyen özellikler ise genetik ve yaş olarak bilinmektedir. Antijenler, protein, karbonhidrat, lipid ya da nükleik asit yapısında olabilmektedir. Normal şartlarda otoantijenler denilen vücudun kendine ait antijenleri immün yanıt oluşturmaz. Fakat bazı patolojik durumlarda otoantijenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişiklikler meydana gelir ve immün yanıt gelişir. Bunun sonucunda da otoimmmün hastalıklar gelişebilmektedir [197].

İmmün yanıt, organizmayı enfeksiyonlardan ve yabancı olan maddelerden korumaktadır. İmmün sistem, vücutta karşılaştığı yabancı antijenlere karşı savunma yapmak zorundadır. Bundan dolayı immün sistem hücrelerinin kan, lenf ve dokular arasında dolaşabilme ve gerekli bölgelerde yerleşebilme özellikleri savunmada oldukça önemlidir. Antijenin vücuda giriş yeri, oluşacak immün yanıtı etkilemektedir. Deri yoluyla alınan antijenler dokudaki makrofajlar ile tanınır ve lenfatik yoldan bölgesel lenf düğümlerine taşınır ve immün yanıt hem antijenin giriş yerinde hemde ilişkili lenf bezinde başlar. Kan dolaşımı ile giren antijenler dalaktaki makrofajlarca tanınır. Solunum yolu, gastrointestinal kanal mukozasından giren antijenler ise bölgedeki mukoza ilişkili lenfoid doku ile temas etmektedir ve burada gerekli immün yanıt gelişir. İmmün yanıt nerede başlamışsa kan ve lenf yolu ile diğer bölgelere ulaşmaktadır [197].

Spesifik bir antijen ile karşılaşmamış bir organizmada her türlü antijeni tanıyıp reaksiyon verebilecek, antijene spesifik lenfosit klonları bulunmaktadır. Yabancı antijen organizmaya girdiğinde kendine özgü yüzey reseptörünü taşıyan lenfosit klonunu seçer ve aktive olur, çoğalır. Bu klonların bir kısmı uzun ömürlü bellek hücresi, bir kısmı hafıza hücresi olarak farklılaşır. Bu olaya primer immün yanıt denilmektedir. Aynı antijen ile organizma tekrar karşılaştığında önceki immünizasyon sonucu, antijen spesifik lenfositlerin klonal olarak genişlemesi ile immün yanıt daha erken ve daha kuvvetli gelişir. Buna olaya da sekonder immün yanıt adı verilmektedir [197].

İmmün yanıtın amacı zararlı maddeyi ve onu taşıyan hücreyi yok etmektir. Bu amacına ulaştığında antijenik uyarı ortadan kalkar ve immün yanıt tamamlanmış olur [197].

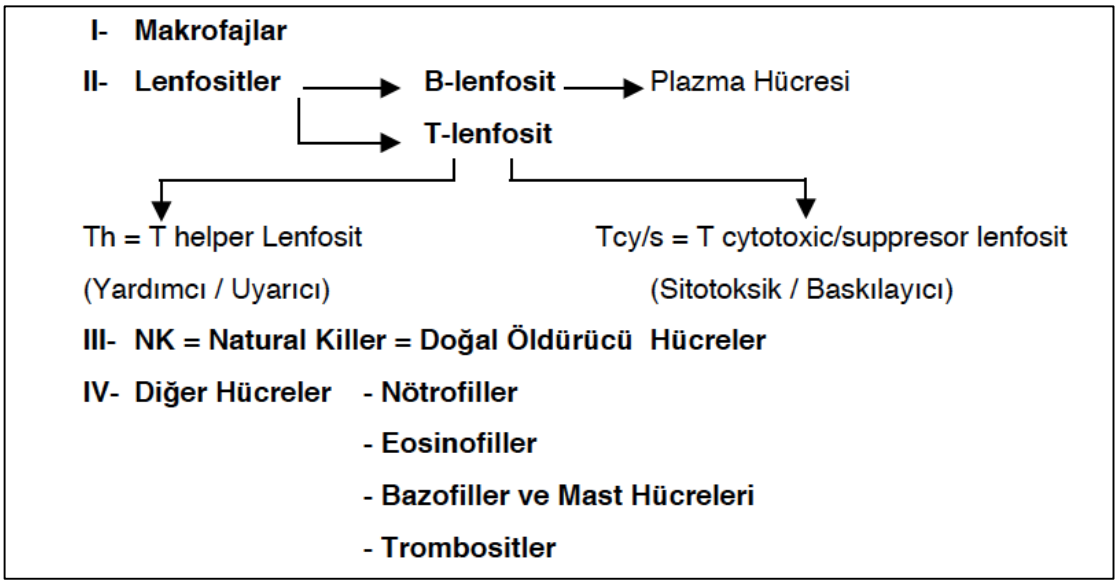
Memelilerin immün sisteminde Lenfosit Repertuarı olarak bilinen 10^9 farklı antijeni tanıma kapasitesi bulunduğu düşünülmektedir. Bir klondaki lenfositlerin antijeni tanıyan reseptörleri aynıdır. Her lenfosit klonunun antijen reseptöründe antijen

bağlanma yerinin farklı olması repertuarın ne kadar geniş olabileceğini göstermektedir [197].

İmmün sistem kendine ait olan antijenleri yabancılardan ayırt etme özelliğini lenfositlerin gelişme sürecinde primer lenfoid organlarda kazanır. Kendine ait yapılara karşı immün yanıt vermez. Bu duruma self tolerans veya immün tolerans denmektedir. Self toleransın bozulması ile otoimmün hastalıklar gelişmektedir [197].

2.3.1 İmmün Sistem Hücreleri

Spesifik immün sistem hücreleri olan lenfositlerin, mononükleer fagositlerin ve diğer yardımcı hücrelerin yabancı antijenlerle karşılaştıkları doku ve organlar lenfoid sistem denilmektedir. Bu hücrelerin ile kan, lenfatik sistem ve lenfoid organlar arasındaki sirkülasyon immün yanıtın oluşmasında önemli rol oynamaktadır. İmmün sistem hücreleri olan makrofajlar dokulara giren mikroorganizmaları tanır, fagosite eder ve öldürür. Makrofajlar, dokularda sürekli bulunan fagositik hücrelerdir. Nötrofiller ve makrofajların öncül hücresi olan monositler kanda bulunur ve mikropların girmesinden sonra saatler içinde enfeksiyon bölgesine göç ederler. Periferik lenfoid organlar olarak isimlendirilen özelleşmiş dokular, deri, gastrointestinal ve solunum yolları ile vücuda giren mikrobiyal antijenlerin yoğun bulunduğu yerlerdir. Antijenin yakalanması ve lenfoid organlara transportu edinsel immün yanıtı başlatmaktadır. Antijenlerin yakalanması ve lenfositlere sunulması antijen sunucu hücrelerin (ASH) görevidir. ASH'ler, lenfositlerin farklılaşması ve proliferasyonu için gerekli sinyali sağlayan hücre populasyonudur. ASH'ler doğal ve edinsel immün sistem arasında bağlantı sağlayan her iki sistemin bir komponenti olarak görev yapan hücrelerdir. Mast hücreleri, bazofiller ve eozinofiller de doğal ve edinsel immünitede önemli rolleri bulunan immün sistem hücreleridir [198, 199]. Şekil 2.3'te immün sistem hücreleri özetlenmiştir.



Şekil 2.3 İmmün sistem hücreleri [200]

2.3.1.1 Lenfositler

İmmün sistemin en önemli hücreleri olan lenfositler, kemik iliğindeki kök hücrelerden farklılaşarak gelişmektedirler. Timusta olgunlaşmaktadırlar. Kan yolu ile periferik doku ve organlara yerleşmektedirler. Lenfositlerin iki tipi vardır; T ve B lenfositler. Görünüm olarak birbirine çok benzeyen bu immün sistem hücrelerinin olgunlaşmaları, işlevleri ve antijen yapıları birbirinden farklıdır [200].

T-Lenfositler, hücresel immün yanıttan sorumludurlar ve timusta olgunlaştıktan sonra yüzeyine birçok reseptör yerleşmektedir. Bu reseptörlerin kan hücreleri ile ilgili olanları CD ile ifade edilir ve numaralandırılır. T hücre yüzeyinde antijenleri özgül olarak tanıyan T hücre reseptörü (TCR) bulunmaktadır ve onbinlerce antijeni tanıyabilen T-lenfosit vardır. T-lenfositlerin yapı ve fonksiyon özelliği farklı olan alt grupları vardır. Tüm T-lenfositlerde bulunan ortak yüzey molekülleri yanında (CD2, CD5 gibi) bu alt gruplardaki farklı yüzey molekülleri, onların ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. T-lenfositleri başlıca iki alt gruba ayrılmaktadırlar: Th lenfosit (= T helper = yardımcı T lenfosit) ve Tc/s lenfosit (= T cytotoxic / supressor = sitotoksik / baskılayıcı T lenfosit). TH lenfositler yardımcı ve uyarıcı rolleri vardır, CD4 yüzey molekülü taşırlar. Th lenfositler; B lenfositlerini ve Tc/s lenfositlerinin aktivitelerini şiddetlendirirler. Th hücre azlığında B ve T hücrelerinin antijene karşı yanıtı zayıflar, bozulur. Ayrıca çeşitli sitokinler salgılayarak T hücresi, monosit-makrofaj ve diğer bazı hücrelerin sayıca ve

aktivite olarak güçlenmelerini sağlamaktadırlar. Tc/s lenfositler ise, CD8 yüzey molekülü taşımaktadırlar ve öldürücü ve baskılayıcı rolü olan lenfositlerdir. T sitotoksik olanlar mikroplar ile infekte hücreler ve tümör hücreleri, gibi organizmaya zararlı veya yabancı hücrelere saldırarak öldüren hücrelerdir. T baskılayıcı olanlar ise sitotoksik ve yardımcı T-hücre etkinliğini baskılayarak immün yanıtın dengede kalmasını sağlamaktadırlar [200].

B-Lenfositler ise, hümoral (antikora dayalı) immüniteden sorumludurlar. Memelilerde kemik iliğinde olgunlaşırlar. B lenfositler sentezledikleri immünglobulin moleküllerini hücre yüzeylerinde taşırlar ve bu molekül antijene karşı özgül reseptördür. Bir B lenfosit sadece tek bir epitopa bağlanabilen yüzey immünglobulin reseptör taşır. Bu nedenle immün sistemde, zaman içinde karşılaşma ihtimali olan onbinlerce çeşit antijene karşı özgül reseptör taşıyan onbinlerce B-lenfosit çeşidi hazırdır. Organizmaya antijen girdiğinde, yüzeyinde bu antijene özgül reseptör taşıyan B-lenfositlerini bulur ve uyarır. Uyarılan B-lenfositler başkalaşıma uğrar ve plazma hücresine dönüşürler. Plazma hücresi de uyaran antijene özgül olan çok miktarda antikor (immunglobulin) sentezlemektedirler [200].

2.3.1.2 Doğal Öldürücü (NK=Natural Killer) Hücreler

Doğal öldürücü hücreler (NK), çeşitli tümörleri ve virüsle enfekte hücreleri öldürme yeteneğine sahip kemik iliğinden köken almış büyük granüllü hücrelerdir. NK hücreleri sitotoksik etkilerinin yanısıra IFN-γ, TNF-α, IL-5, IL-8, IL-10, IL-4, IL-17 gibi çeşitli sitokinler ve kemokinler salgılayarak immün yanıtın düzenlenmesinde kritik rolleri vardır [199].

2.3.2 İmmün Sistem Organları

İmmün hücreler kemik iliğindeki kök hücreden farklılaşarak gelişmektedirler. Kemik iliği kök hücrelerinin immünolojik olarak etkin hücre haline gelebilmesi için önce santral lenfoid organlarda olgunlaşması gerekir. Gelişimi tamamlanan, olgun T ve B lenfositler daha sonra periferik lenfoid organlara gidip yerleşerek antijenle karşılaşmayı bekler ve immün yanıtı oluştururlar. Santral (primer) lenfoid organlar, kemik iliği ve timustur.

Periferik lenfoid organlar ise lenf nodu, dalak, kutanöz immün sistem ve mukozal immün sistemden oluşmaktadır [199, 200].

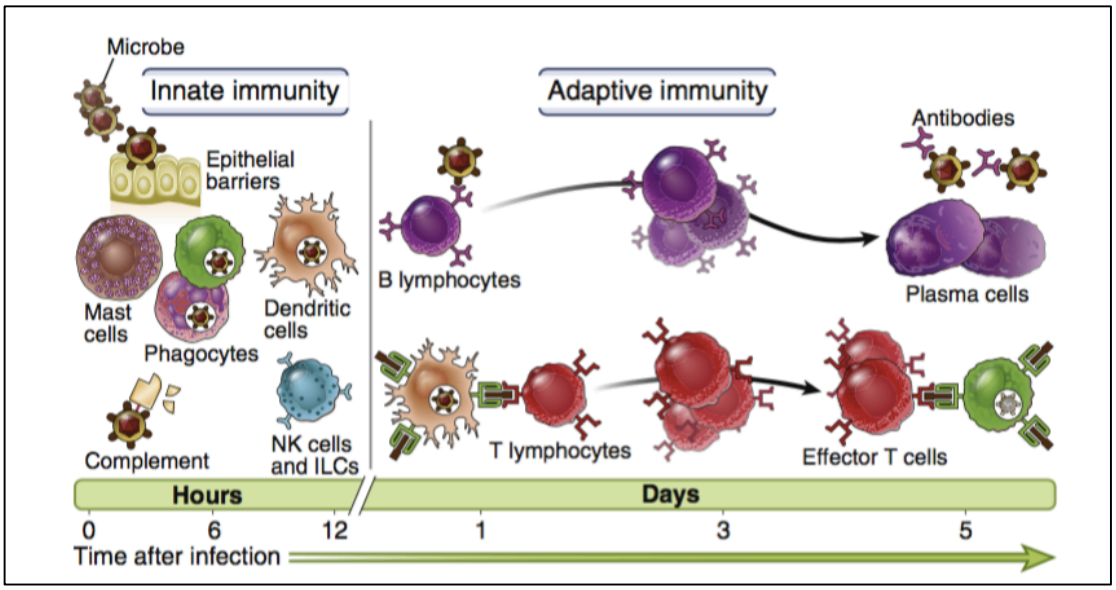
Lenf nodları, lenfoid dokuların bir araya gelmesinden oluşur ve tüm vücuda yayılan lenfatik kanalların etrafında yer almaktadır. Lenf sıvısı, lenf düğümlerinden geçerken lenf düğümünde bulunan ASH'ler epitelden dokulara geçen mikrobiyal antijenleri yakalayabilir. B ve T lenfositleri lenf nodu içinde farklı yerlerde bulunmaktadır. ASH'ler mikrobiyal antijenleri yakalayıp lenf nodlarına taşımaktadır. Hem antijenlerin yakalanması, hem de lenf nodlarına taşınması ile antijenler lenf nodlarında yoğunlaşır. İmmün yanıt bu şekilde başlamaktadır. Dalak, kan kaynaklı yabancı maddelere karşı immün yanıtın oluştuğu karın boşluğunda yer alan bir organdır. Kan kaynaklı antijenler, dalakta ASH ve makrofajlar tarafından tutulur ve yok edilirler [200].

Kutanöz ve mukozal lenfoid sistemler de epitel dokuyu aşan antijenlere karşı oluşan immün yanıttan sorumludur, lenf ve kan yoluyla giren antijenlere karşı immün yanıt çoğu zaman lenf nodları ve dalakta oluşmaktadır [200].

2.3.3 Doğal ve Edinsel İmmünite

Organizma yabancı mikroorganizmayı tanıyıp yıkıma uğratmak için organizmada hazır bulunan doğal immün yanıtı verecektir. Epitel tabakası, NK hücreleri, kompleman sistemi, fagositik hücreler ve sitokinlerden oluşan doğal immünite, etkene özgüllük göstermeyen ve uyarı sonucu hemen harekete geçen erken savunma sistemidir [199, 200].

Herhangi bir patojenle karşılaştıktan sonra doğal immüniteyi takiben daha etkili savumanın gelişmesi ise "edinsel immünite" olarak tanımlanmaktadır. Edinsel immünite etkene özgüldür ve etkin hale geçmesi için günlerce süren belirli bir hazırlık süresi gerektirir. Edinsel immünitenin yapıtaşları, B ve T lenfositleridir [199, 200]. Şekil 2.4'de doğal ve edinsel immünitenin mekanizması yer almaktadır.



Şekil 2.4 Doğal ve edinsel immünitenin mekanizması [201]

2.3.4 Sitokinler

Sitokinler, hücreler arasında mediatör olarak davranan protein yapısındaki moleküllerdir. İmmün sistem hücrelerinin gelişmesi, farklılaşması ve aktivasyonunda, immün yanıtta ve inflamasyonda, hücre ölümünde ve yara iyileşmesi gibi birçok olaylarda hücreler arasındaki ilişkileri düzenleyen proteinlerdir. Th hücreleri ve makrofajlar olmak üzere hem spesifik, hem de doğal immün sistem hücreleri tarafından salgılanırlar. Sitokinler başlangıçta mediatör olarak davranan ve immünite süreçlerini regüle eden immün sistem hücrelerinin ürünleri olarak tanımlanmışsa da artık birçok sitokinin immün sistem dışındaki hücreler tarafından da üretildiği ve immün sistem dışı hücreleri de etkileyebileceği bilinmektedir. Sitokin terimi büyük bir protein grubunu tanımlayan genel bir terimdir. Monokinler, lenfokinler, interlökinler ve kemokinler olmak üzere fonksiyonel olarak sınıflandırılmıştır [202, 203].

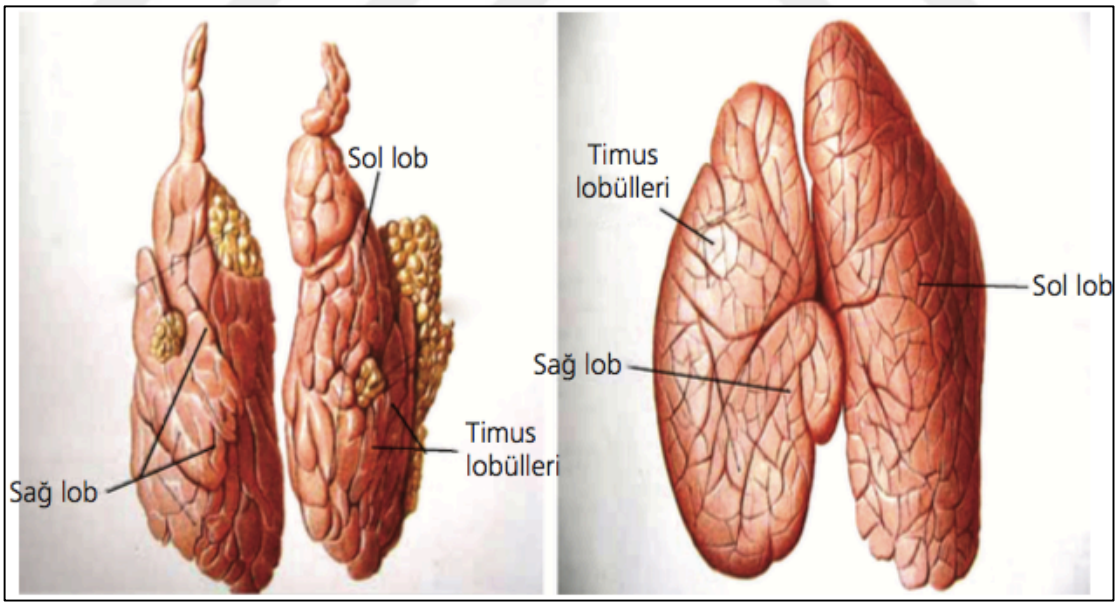
Doğal immün sistemde rol oynayan sitokinler; TNF-α, IL-1, IL-10, IL-12, tip I interferonlar (IFN-α ve IFN-β), IFN-γ, ve kemokinlerdir. Edinsel immün sistemde rol oynayan sitokinler ise; IL-2, IL-4, IL-5, TGF-β, IL-10 ve IFN-γ'dır [202].

2.3.5 Timus

Timus, Yunanca bir kelime olan ve kalp ya da ruh anlamına gelen "thymos" tan türetilmiştir. Eski Yunanlılar kurban ettikleri hayvanlarda, kalbin üst kısmında, göğsün

boynuna kadar uzanan geniş bir doku kitlesine dikkat çektiler ve buradaki yapının ruhun koltuğu olması gerektiği sonucuna vardılar. Galen ilk olarak bezin morfolojisini tanımladı ve birçok ortaçağ öğrencisi timusu iyi bir sağlığın kalbi olarak görüyordu [204]. 1950'lerde yapılan çalışmalarda, timusun lenfosit üretim yeri olarak belirlenmiş [205] ve timusa olan ilgi artmaya başlamıştır [206]. Bununla birlikte, immünologlar, hastalıklardaki periferik lenfositlerin kökenini ve işlevini anlamaya çalıştıklarında timusun fonksiyonu açıkça ortaya konulmuştur [204].

İmmün sistemin en önemli organlarından biri olan timus gelişen ilk lenfoid organdır. Timus, hem mezenkimal hem de endodermal kökenlidir. Lenfositler, mezenkimal kökenli kemik iliği hücrelerinden oluşmaktadır. Timusun büyüklüğü yaşla beraber değişkenlik göstermektedir, doğumdan itibaren gelişmeye başlar, pubertede en büyük şeklini alır. Daha sonra atrofiye olarak yerini yağ dokusuna bırakır, yaş ilerledikçe de yağ miktarı artar. Timus eşit büyüklükte olmayan iki lobdan (lobus dexter ve lobus sinister) oluşur. İki lobu birbirine gevşek yağ dokusu bağlar. Loblar daha küçük lobüllere ayrılırlar. Her lobül korteks (kabuk) ve medulla (ortada iliksi bölge) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır [200], [207]. Timus yapısı Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Timusun Yapısı [208]

Korteks yoğun bir öncü T hücresi popülasyonundan, epitel hücreler ve makrofajlardan oluşmaktadır. Medullada ise daha seyrek olmak üzere olgun lenfositler bulunur [207]. Lenfositlerin timusta nasıl olgunlaştığı tam olarak bilinmemekle beraber, epitel

hücreleri ve makrofajlar ile timulin, timozin, timopoietin gibi bazı timus hormonlarının T- lenfosit gelişimine etkili olduğu kabul edilmektedir [200].

Yapılan çalışmalarla timusun çıkarılması (timektomi) ile lenfatik dokuda gelişim gerilediği ve bu dokuda lenf, kanda T-lenfositler kaybolduğu ve dolayısıyla antikorlar üretilemediği görülmüştür [200].

Son yıllarda immün sistemle ilgili transkriptom çalışmalarında timus, transkriptom analizi çalışmaları için kullanılan önemli bir organdır.

2.4 RNA-seq

Santral dogma, DNA olarak depolanan genetik bilginin RNA'ya kopyalanmasını ve sonunda proteinlere çevrilmesini özetleyen bilginin akışıdır [209], [210]. Çevresel faktörler tarafından değiştirilebilen bu genetik bilginin nihai ifadesi, bir organizmanın fenotipini karakterize etmektedir. RNA moleküllerinin transkripsiyonu bir hücrenin kimliğini belirlemektedir ve hücre içindeki biyolojik aktiviteleri düzenlemektedir. Transkriptom olarak tanımlanan bu RNA molekülleri, genomun fonksiyonel unsurlarının yorumlanması ve gelişimin ve hastalığın anlaşılması için gereklidir [211]. Diğer bir deyişle transkriptom, belirli bir gelişme aşaması ya da fizyolojik koşulda hücredeki transkriptlerin kümesi ve miktarıdır [212].

Transkriptom çok sayıda kodlayan ve kodlamayan RNA türlerini kapsadığı için karmaşıktır. Tarih boyunca, RNA molekülleri santral dogma için genler ve proteinler arasındaki basit bir ara madde olarak görüldü. Bu nedenle şimdilerde genetik kod vasıtasıyla proteinleri kodladığı için, haberci RNA (mRNA) molekülleri en sık çalışılan RNA çeşididir. Protein kodlayan mRNA'ya ek olarak, işlevsel olan çeşitli kodlamayan RNA (ncRNA) molekülleri vardır. Daha önce bilinen birçok ncRNA, mRNA translasyonu ile ilişkili rRNA'lar ve tRNA'lar, rRNA'ların modifikasyonunda yer alan küçük nukleolar RNA'lar (snoRNA'lar), splicingde görevi olan küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) gibi temel hücre işlevlerini yerine getiren RNA'lardır [213]. Son yıllarda, birçok yeni RNA çeşitleri keşfedildi ve bu keşiflerle ncRNA sınıfı genişlemiştir. Örneğin, mikroRNA (miRNA) ve piwi-etkileşen RNA (piRNA) post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen küçük kodlmayan RNA'lardır [214]. Bir diğer kayda değer ncRNA'lar, kodlanmayan uzun RNA'lardır (lncRNA'lar). Fonksiyonel bir sınıf olarak

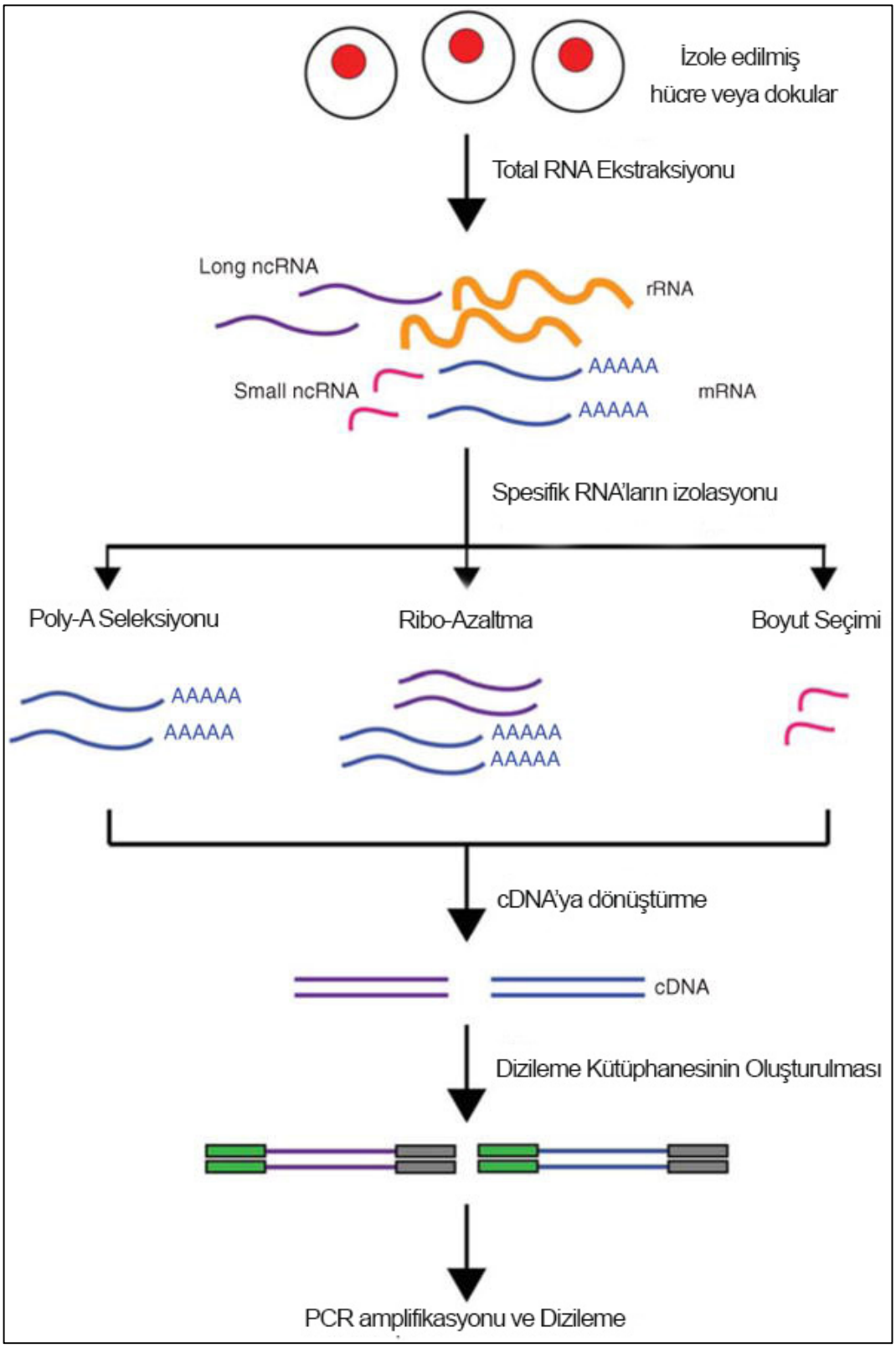
lncRNA'lar, cDNA kütüphanelerinin sekanslanması sırasında ilk kez farelerde tanımlanmıştır [215]. Büyük çoğunluğu tam olarak karakterize edilmemiş olmasına rağmen, lncRNA'lar için kromatin yeniden modelleme (remodelling), transkripsiyonel kontrol ve post-transkripsiyon işlemleri gibi sayısız moleküler fonksiyonlar keşfedilmiştir [216, 217].

İlk gen ekspresyon çalışmaları, tekli transkriptlerin ölçümü ile sınırlı olan, northern blot ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) gibi düşük verimlilik gösteren yöntemlere dayanmaktaydı. Son yıllarda, genom çapında gen ekspresyonunun ölçülmesi yani transkriptom için yöntemler geliştirildi. İlk transkriptomik çalışmalar, nispeten düşük maliyetle yüksek verimli bir seçenek sunan hibridizasyon tabanlı mikroarray teknolojileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir [218]. Bununla birlikte, bu yöntemlerde sorgulanan sekansların bilgisi için gereklilik, oldukça benzer sekansların analizinde problemli çapraz hibridizasyon artifaktları ve çok düşük ya da çok yüksek oranda eksprese olan genleri sınırlı şekilde ölçüm yapabilmek gibi bazı sınırlamalar vardı [219]. Hibridizasyona dayalı metotların aksine, sekanslama temelli yaklaşımlar, transkript serisini doğrudan belirleyerek transkriptomu aydınlatmak için geliştirilmiştir. Başlangıçta gen ekspresyon çalışmaları için, komplementer DNA'nın (cDNA) Sanger sekanslamasıyla EST kütüphaneleri (cDNA kütüphaneleri) oluşturulmuştur. Ancak bu yaklaşım, nispeten düşük-çıktılı ve transkriptlerin nicelleştirilmesi için ideal olmadığı görülmüştür [220, 221]. Bu teknikteki kısıtlamaların üstesinden gelmek için, gen ekspresyonunun seri analizi (SAGE- Serial Analysis of Gene Expression) ve gen ekspresyonunun başlık analizi (CAGE- Cap Analysis of Gene Expression) gibi etikete dayalı yöntemler, ekspresyon düzeylerinin daha yüksek verimlilik ve daha kesin şekilde kantitatif hale getirmek için geliştirilmiştir. Doğrudan mRNA transkript sayısına karşılık gelen etiketlenmiş dizilerin sayısı belirlenerek, bu etiketleme bazlı yöntemler sekanslama bazlı yöntemlerde olduğu gibi analog tarzı yoğunlukları ölçmekte daha belirgin bir avantaj sağlamaktadır [222, 223]. Bununla birlikte, bu yöntemler izoformların ekspresyon seviyelerinin ölçülmesine duyarsızdır ve yeni gen keşfi için kullanılamaz. Buna ek olarak, sekans etiketlerinin (tag) klonlanmasının zor oluşu, otomatik Sanger sekanslamanın maliyetinin yüksek oluşu ve başlangıçta çok miktarda RNA gereksinimi bu yöntemlerin kullanımını büyük ölçüde kısıtlamıştır [211].

Yüksek çıktılı yeni nesil sekanslama (YNS) gelişimi, cDNA sekanslama yoluyla RNA analizini etkinleştirerek transkriptomik için devrim yaratmıştır [212]. RNA sekanslama (RNA-Seq) olarak adlandırılan bu yöntem, önceki yaklaşımlara göre belirgin avantajlara sahiptir. RNA-Seq, kantitatif gen ekspresyonu, alternatif splicing ve allele özgü ekspresyon hakkında daha detaylıdır. RNA-seq'deki son gelişmeler, örnek hazırlamadan dizinleme platformlarına, biyoinformatik veri analizine kadar, transkriptomun derin profillemesini ve farklı fizyolojik ve patolojik koşulların aydınlatılmasına imkan vermiştir [211].

Yüksek çıktılı yeni nesil sekanlama (YNS) teknolojilerinin kullanılması ile birlikte daha önce gen ifadesinin ölçülmesi için kullanılan hibridizasyon tabanlı mikroarraylar ve Sanger sekanslama tabanlı yaklaşımlar tarafından ortaya konan birçok zorluk ortadan kalkmıştır.

Bir RNA-Seq deneyi; total RNA'yı izole etmek, onu cDNA'ya dönüştürerek kütüphane hazırlamak ve YNS ile sekanslamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 YNS için hazırlık (RNA izolasyonu ve cDNA kütüphanesinin kurulması) [211]

2.4.1 RNA İzolasyonu, cDNA Kütüphanesi Kurulması ve Transkriptom için Sekanslama Platformları

Transkriptom sekanslama çalışmalarında ilk adım biyolojik bir örnekten RNA izolasyonudur. Başarılı bir RNA-seq için RNA kalitesinin iyi olması gerekmektedir. RNA kalitesi tipik olarak 1 ila 10 arasında bir RNA İntakt Numarasını (RNA Integrity Number (RIN) gösteren Agilent Bioanalyzer cihazı kullanılarak ölçülür ve en düşük bozulmayı gösteren en yüksek kaliteli örneklerin RNA İntakt Numarası 10'dur. RIN, jel elektroforezi ve 28S -18S ribozomal bantların oranlarının analizi kullanılarak numunenin bütünlüğünü tahmin etmektedir. Düşük kaliteli RNA (RIN <6), sekanslama sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilir, düzensiz gen kapsamı (uneven gene coverage), 3'-5' transkript eğilimi (3’–5’ transcript bias) gibi. Ya da hatalı biyolojik sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle, yüksek kaliteli RNA, başarılı RNA-seq deneyleri için gerekmektedir [224, 225].

RNA izolasyonundan bir sonraki adım, RNA-seq için sekanslama kütüphanesinin kurulmasıdır. Sekanslama kütüphanelerinin kurulması esas olarak, RNA moleküllerinin izole edilmesini, RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesini, cDNA moleküllerinin parçalanması ya da çoğaltılmasını ve adaptörlerinin bağlanmasını içermektedir. RNA-seq kütüphanelerini hazırlamadan önce, belirli RNA türleri için total RNA örneğini zenginleştirecek veya yok edecek uygun bir kütüphane hazırlama protokolünü seçmek gerekmektedir. Total RNA havuzu, ribozomal RNA (rRNA), öncü haberci RNA (pre-mRNA), mRNA ve kodlamayan RNA'nın çeşitli sınıflarını (ncRNA) içerir. Çoğu hücre tipinde, RNA moleküllerinin çoğunluğu rRNA, tipik olarak toplam hücresel RNA'nın %95'inden fazlasını oluşturmaktadır. Eğer rRNA transkriptleri kütüphane yapımı öncesinde kaldırılmazsa, sekans okumalarının büyük bir bölümünü tüketir ve sekans kapsamının derinliğini azaltır ve böylece diğer daha az miktarda RNA'nın algılanmasını sınırlar. Başarılı transkriptom profillemesi için rRNA'nın verimli bir şekilde uzaklaştırılması kritiktir. Bu yüzden birçok protokol, poli-A RNA'lar seçerek kütüphane yapımından önce mRNA moleküllerini zenginleştirmeye odaklanmaktadır [226].

cDNA sentezi için çoğu protokol, her bir cDNA iplikçiğinden homojen olarak türetilen ve böylece ana mRNA iplikçiğini ve tamamlayıcısını temsil eden kütüphaneler oluşturmaktadır. İplikçik bilgisini korumak için, adaptörler tek iplikli RNA'ya veya

cDNA'nın ilk dizisine önceden belirlenen doğrultularda bağlanmaktadır [227]. Bu yaklaşımda, cDNA moleküllerinin hem 5 'hem de 3' uçlarının birbiri ile örtüşme eğilimi ile sonuçlanabilir. Örtüşmenin olmaması için tercih edilen strateji, enzimatik kesme ile spesifik olarak çıkarılabilen ikinci iplik cDNA'nın sentezi sırasında deoksi-UTP (dUTP) gibi bir kimyasal etiketin dahil edilmesidir [228]. Bu, ikinci iplikçik cDNA'yı birinci iplikten ayırt etmeyi kolaylaştırır. Daha sonra cDNA'lar bir plazmit DNA'ya aktarılır, ardından uygun bir vektöre insört edilir.

RNA-Seq deneyi tasarlarken, bir sekanslama platformunun seçimi önemlidir ve deneysel hedeflere bağlıdır. Halen birkaç YNS platformu ticari olarak mevcuttur ve diğer platformlar aktif teknolojik olarak gelişmektedir [229]. Yüksek çıktılı sekanslama platformlarının çoğunluğu, paralel olarak on milyonlarca sekans kümesini dizilemek için bir sekanslama-sentez yöntemi kullanır. YNS platformları genellikle ya grup temelli yani bir DNA molekülünün birçok özdeş kopyasının sekanslanması ya da tek molekül tabanlı, yani tek bir DNA molekülünün dizilenmesi olarak kategorize edilebilir. Bu sekanslama teknikleri ve platformlar arasındaki farklar, aşağı yönlü (downstream) analizi ve sekanslanan datanın yorumlanmasını etkileyebilir.

Son yıllarda, sıralama endüstrisi, bir grup temelli sekanslama-sentez yaklaşımı uygulayan Illumina tarafından yönetilmektedir [230]. Floresan etiketli tersinir terminatör nükleotidleri kullanarak, DNA molekülleri, bir cam akış hücresinin yüzeyi üzerinde hareketsiz kılındığında klonal olarak çoğaltılır. Moleküller klonal olarak yükseltildiğinden, bu yaklaşım genlerin nispi RNA ekspresyon seviyelerini sağlar. Potansiyel PCR-amplifikasyon ön yargılarını gidermek için PCR kontrolleri ve aşağı akışlı hesaplama analizinde spesifik adımlar gereklidir. Grup tabanlı platformların önemli bir faydası, düşük sekanslama hata oranlarıdır (<% 1). Halen, Illumina HiSeq platformu, RNA-Seq için en yaygın olarak uygulanan yeni nesil sekanslama teknolojisidir ve YNS için standardı bellidir.

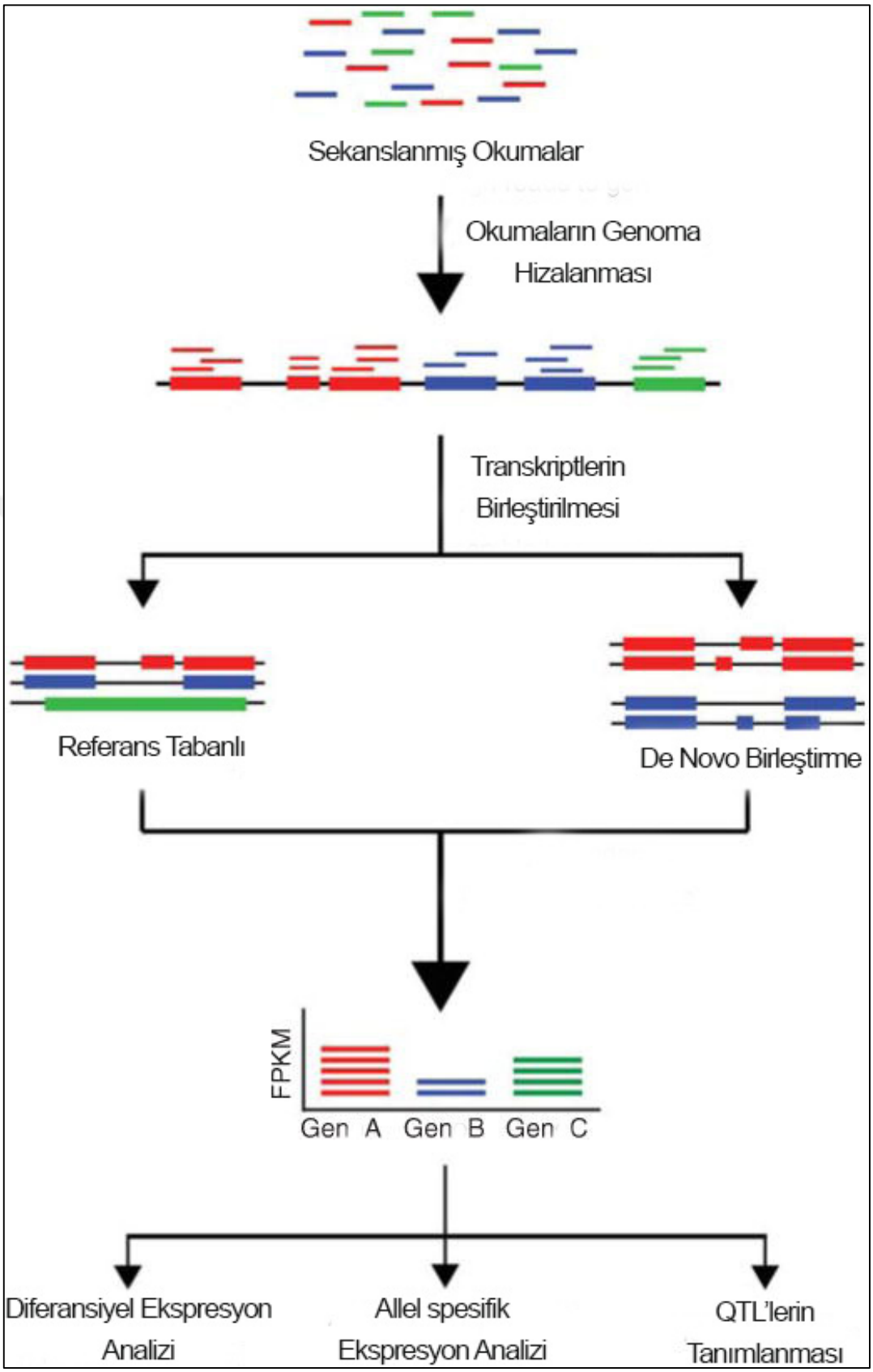
Sekanslama platformunun seçilmesi için bir başka önemli nokta, transkript birleştirmedir. Kısa okumaların koleksiyonunu tam uzunluktaki bir transkript setine dönüştürmek için gereklidir. Genel olarak, daha uzun sekans okumaları, doğru ve kesin bir şekilde transkriptleri birleştirmeyi kolaylaştırır. Özellikle de novo transkriptom birleştirme için idealdir.

Ayrıca orta ila yüksek miktarda transkriptleri tespit edebilmek ve gen ifadesini doğru bir şekilde ölçebilmek için bir RNA-seq deneyinde yaklaşık 30–40 milyon okuma gereklidir [231].

2.4.2 Transkriptom Analizleri

RNA-Seq ile oluşan gen ekspresyon profili, yüksek çözünürlüklü görülmemiş transkripsiyonel görünüm sağlar. Sekanslama teknolojileri ve protokoller geliştikçe, yeni informatik zorluklar ve uygulamalar da beraberinde gelişmektedir. Transkriptom analizi ile, gen ekspresyon seviyelerini araştırmanın ötesinde, yeni gen yapılarını, alternatif izoformları ve alele özgü ekspresyonu keşfetmek için de gerekli olabilir [232, 233].

RNA-Seq verisi için analiz işlemleri özetle, bir YNS platformundan sekanslanan okumaları içeren FASTQ formatındaki dosyaların oluşturulmasını, bu okumaların açıklamalı bir referans genomuna hizalanmasını ve genlerin ekspresyonunu nicelleştirmeyi içerir (Şekil 2.7). Temel sekanslama analiz araçlarının her zamankinden daha erişilebilir olmasına rağmen, RNA-Seq analizi, diğer sekanslama tabanlı analizlerde karşılaşılmayan benzersiz hesaplama zorluklarını ortaya koymakta ve ekspresyon datalarının içerdiği sapmalara özel olarak dikkat etmeyi gerektirmektedir.



Şekil 2.7 RNA-seq analiz basamakları [211]

2.4.2.1 Kalite Değerlendirmesi

RNA-Seq analizlerinin her aşamasında bir sonraki adımın daha sağlıklı olabilmesi için dikkatli olunmalıdır. Örnek hazırlama, RNA ekstraksiyonu, kütüphane kurulması, sekanslama ve okumaların haritalanması sırasında RNA-Seq deneysel ve bilgisayar analizlerinde herhangi bir hata diğer adım içinde hata oluşturabilir [234]. İlk olarak, sekanslama yapıldıktan sonra FASTQ formatındaki dosyalarda ham sekans verilerinin kalitesi, yüksek kaliteli okumalar sağlamak için değerlendirilmelidir. Kalite kontrolünü sağlamak için tasarlanmış FASTX-toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit) ve FastQC yazılımları (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) kullanıcı dostudur. Bu yazılımlarla okumaların çeşitliliği, adaptör kontaminasyonu, baz nitelikleri, nükleotid bileşimi ve sekanlardaki bazların yüzdesi gibi değerlendirilmesi gereken birkaç önemli parametre içermektedir [234].

2.4.2.2 Okumaların Hizalanması

RNA-Seq okumalarının genoma haritalanması, DNA sekanslarının haritalanmasından çok daha zordur çünkü birçok okuma birleşme yerlerinin (splice junctions) karşısındadır. Aslında, Bowtie [235] ve BWA [236] gibi geleneksel okumaları haritalama algoritmaları, RNA-Seq okumalarının referans genoma eşlenmesi için eklenmiş transkriptlerin yetersizliği nedeniyle önerilmemektedir. Bu problemin çözülmesine yönelik bir yaklaşım, referans genomu, bilinen gen anotasyonlarından elde edilen ekson-ekson birleşme yerlerinden (splice junctions) türetilen dizilerle tamamlamaktır [33]. Yeni nesil sekanslama sonucu elde edilen RNA-Seq datalarında transkriptom verilerinin hizalanması için haritalama araçları geliştirilmiştir. Yaygın olarak kullanılan RNA-Seq hizalama araçları arasında GSNAP [237], MapSplice [238], RUM [239], STAR [240] ve TopHat [241] bulunmaktadır. Her bir hizalama programı, performans, hız ve bellek kullanımı açısından farklı avantajlara sahiptir. Kullanılacak en iyi hizalayıcıyı seçmek, bu metriklere ve RNA-Seq çalışmasının genel hedeflerine bağlıdır. RNA-Seq hizalayıcılarının performansını sistematik olarak, hizalama verimi, doğruluk ve uyumsuzluk olmak üzere çok sayıda kriter üzerine değerlendirilir.

2.4.2.3 Transkript Birleştirme ve Miktar Belirleme

RNA-Seq okumaları hizalandıktan sonra, haritalanmış okumalar transkriptler halinde birleştirilebilir. Bilgisayar programların çoğunluğu, transkript modellerini, okuma sekanslarının referans genoma haritalananlardan çıkarmaktadır [242, 243]. Transkript birleştirme için alternatif bir yaklaşım da, bitişik transkript sekanslarının bir referans genom veya anotasyonlarının kullanılmasıyla birleştirildiği de novo modelidir [244]. Kısa okumalardan transkriptlerin yeniden yapılandırılması önemli bir sorundur ve transkript birleştirme için standart bir yöntem mevcut değildir. Transkriptomun doğası (kompleks gen varlığı, polimorfizm, alternative splicing gibi), teknolojik zorluklar (sekanslama hataları) ve biyoinformatik iş akışının özellikleri (Gen anotasyonu, izoformların çıkarımı vs.) transkript birleştirme kalitesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir.

Gen ekspresyon seviyelerinin tahmini Cufflinks [242], FluxCapacitor [245] ve MISO [246] gibi programlarla, tam uzunluktaki transkripte haritalanan okumaların sayısı hesaplanarak ifadeyi nicelleştirmektedir. HTSeq gibi alternatif yaklaşımlar, bir ekson ile eşleştirilen okumaların sayısını hesaplayarak transkriptleri birleştirmeden ekspresyonu nicelleştirebilir [247]. Gen ekspresyonunu doğru bir şekilde tahmin etmek için, okuma sayıları, kütüphane fragmanı boyutu, sekans kompozisyonu ve okuma derinliği gibi sistematik değişkenlikleri düzeltmek için normalizasyon yapılmalıdır [248]. RNA-seq datalarında normalizasyon tek-uçlu okumalarda, her bir milyon haritalanmış okuma başına transkriptlerin kilobaz başına okumaları (RPKM), bir transkript okuma sayısını hem gen uzunluğu hem de örnek içindeki haritalanmış okumaların toplam sayısı ile normalleştirir. Çift-uçlu okumalarda ise, milyon haritalanmış okumalar transkriptlerin kilobaz başına (FPKM) eşleştirilmesidir [242].

2.4.2.4 Diferansiyel Gen Ekspresyonu

Birçok gen ekspresyon profili çıkarma hedefi olan deneylerin birincil amacı, çeşitli koşullar altında diferansiyel ekspresyonu gösteren transkriptleri tespit etmektir. Mikroarray verilerle diferansiyel ekspresyonu belirlemek için kapsamlı istatistiksel yaklaşımlar geliştirilmiştir [249, 250]. Bu yaklaşımlar RNA-Seq datasına uygulansa da,

normal bir dağılıma uymayan farklı okuma sayıları için farklı istatistiksel yöntemler tasarlanmıştır.

Diferansiyel gen ekspresyonunu saptamak için kullanılan popüler bir araç olan ve RNA-Seq verilerini analiz etmek için geliştirilen Cuffdiff, Tuxedo protokolünün (Bowtie, Tophat ve Cufflinks) bir parçasıdır [251]. Cuffdiff yazılımına ek olarak, DESeq [252], DEGseq [253] ve edgeR [254] gibi yazılımlar da diferansiyel gen ekspresyonunu analiz etmektedir. Bu yazılımlar farklı şekilde ifade edilmiş transkriptleri istatistiksel olarak doğru şekilde analiz etmesinin yanında biyolojik gözlemlerde anlamlı ve doğru biyolojik sonuçların çizilmesi için de kritik öneme sahiptir [255]. Her deney koşulunda her örnek için en az üç replika önerilmiştir [256]. Bu şekilde, biyolojik varyasyondan teknik varyasyonu ayırt etmek için diferansiyel gen ekspresyonunun ölçümlerinin doğruluğu daha da geliştirilebilmektedir ve deney tasarımının sağlamlığı büyük ölçüde geliştirecektir [257].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

Deneyler, Yeditepe Üniversitesi'nde 10. haftalarından itibaren *ad libitum* (AL), kronik kalori kısıtlaması (KKK) ve aralıklı kalori kısıtlaması (AKK) şeklinde üç farklı tipte beslenen MMTV-TGF-α farelerin AL ve KKK grubundaki farelerin 18. hafta sonunda, AKK şeklinde beslenen farelerin ise 18. hafta başında timuslarının alınması ile başlamıştır. Timus dokuları alındıktan sonra total RNA izolasyonları Yıldız Teknik Üniversitesi'nde yapılmıştır. Daha sonra kalite ölçümleri yapılan örnekler sekanslama için Beijing Genomics Institute (BGI)'ye gönderilmiştir. Gelen verilerin biyoinformatik analizleri yapılarak beslenme farklılıkları olan bu farelerdeki gen expresyon farklılıları raporlanmıştır. Literatürdeki çalışmalarda önemi olan sekiz farklı genin gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR) ile validasyonu yapılmıştır.

3.1 Materyal

3.1.1 MMTV-TGF- α Farelerinin *Ad libitum* (AL), Kronik Kalori Kısıtlaması (KKK) ve Aralıklı Kalori Kısıtlaması (AKK) Şeklinde Beslenmesi

Deney için Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde ıslah ve genotipleme protokolüne uygun olarak hazırlanan [13] ve Yürütücüsünün Doç. Dr. Soner DOĞAN'nın olduğu "MMTV-TGF-α Farelerinde Meme Tümörü Gelişiminin Aralıklı Kalori Kısıtlaması ile Önlenmesinde Adipokinlerin Epigenetik Modifikasyonunun ve mikroRNA'ların Rollerinin Belirlenmesi" adlı bilimsel çalışmada kullanılan ve Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 390 no.'lu kararı ile onayı alınan MMTV-TGF-α (C57/BL6) dişi fareler kullanılmıştır. Etik kurul onayı Ek-A'da verilmiştir.

MMTV-TGF-α (C57/BL6) dişi fareler, insan meme kanserlerinin gelişiminde rol oynadığı bilinen epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)/ErbB kaskadının bir parçası olan insan TGF-α' yı aşırı eksprese etmektedir [258-261].

Deneyde kullanılan MMTV-TGF-α (C57/BL6) fareler Yeditepe Üniversitesi'nde 10. Haftadan itibaren üç farklı tipte beslenmeye başlamışlardır. Fare diyeti olarak Altromin TPF1414 diyeti satın alınarak kullanılmıştır. Tüm fareler istedikleri kadar su içebilmektedirler. Ayrıca farelerin hepsi standart şartlar altında 21-24 °C ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tek tek muhafaza edilmiş ve günlük olarak veteriner kontrolü yapılmıştır.

Ad libitum (AL) beslenme kompozisyonu ve enerji çizelgeleri Çizelge 3.1A ve 3.1B'de gösterilmiştir. Kronik kalori kısıtlaması uygulanan gruptaki fareler AL beslenen farelerin diyet kompozisyonunun %85'i ile beslenmişlerdir. Diğer bir deyişle AL grubunun günlük tüketiminden %15 kısıtlama gerçekleştirilmiştir. AKK şeklinde beslenen grup ise 10. Haftadan sonra 3 hafta boyunca AL olarak, bir hafta boyunca AL diyetinin %40'ı ile beslenmişlerdir. Bu gruba ardından tekrar üç hafta boyunca AL diyet kompozisyonu uygulanmıştır.

Çizelge 3.1 A) Altromin TPF1414 diyeti kompozisyonu B) Protein, yağ ve karbonhidratlardan elde edilen enerji oranları

A)

İçerik	**TPF1414**
Nem (%)	11
Protein (%)	25
Yağ /%)	9
Lif (%)	2.5
Ash (%)	6.5
Karbohidrat (%)	47

Çizelge 3.1 A) Altromin TPF1414 diyeti kompozisyonu B) Protein, yağ ve karbonhidratlardan elde edilen enerji oranları (Devamı)

B)

Metabolize edilebilir enerji	**3154 kcal/kg**
Protein Kalorisi	%27
Yağ Kalorisi	%22
Karbohidrat Kalorisi	%51

Farelerin yaşam ortamları Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Yeditepe Üniversitesi'de MMTV-TGF-α farelerinin beslendiği kafesler.

3.1.2 Timus Dokusunun Alımı

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 10. Haftadan itibaren üç farklı tipte beslenen farelerden T150, T151, T152, T154, T155 ve T161 isimli AL ve KKK beslenme grubundaki fareler 18. hafta sonunda sakrifiye edilmiştir. T150, T151 ve T152 isimli AL beslenen gruptaki fareler 05/04/2016 tarihinde sakrifiye edilmiştir. T154, T155 ve T161 isimli KKK beslenme grubundaki fareler ise sırasıyla 22/04/2016, 27/04/2016, 31/05/2016 tarihlerinde sakrifiye edilmiştir. T139, T142 ve T143 isimli AKK beslenme grubundaki fareler ise üç hafta AL beslenme, bir hafta %60 kalori kısıtlamalı beslenme ve tekrar üç hafta AL beslenme uygulanarak 18. hafta başında sakrifiye edilmiştir. Bu gruptaki fareler sırasıyla 14/03/2016, 15/03/2016, 16/03/2016 tarihlerinde sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen farelerin timusları alınmış ve sıvı azot içinde -80°C'de saklanmıştır. Şekil 3.2'de farelerin sakrifiye edilmesi esnasındaki bir fotoğraf gösterilmiştir. Alınan

timuslar kuru buz ile paketlenerek uygun koşullarde Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı'na getirilmiştir ve -80°C'de saklanmaya devam edilmiştir.



Şekil 3.2 MMTV-TGF-α (C57/BL6) farelerin sakrifiye edilmesi

3.2 Metod

3.2.1 Total RNA İzolasyonları

T150, T151, T152, T139, T142, T143, T154, T155 ve T161 isimli farelerin timuslarının ağırlık ölçümü yapılmıştır. Sırasıyla farelerin timus ağırlıkları 70, 74, 66, 50, 64, 74, 28, 26.6 ve 84 mg'dır. Total RNA izolasyonları Trizol (Invitrogen, CA, USA) kimyasalı ve RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak iki farklı yöntemle yapılmıştır. Ayrıca RNeasy Mini Kit (Qiagen) total RNA izolasyonundan sonra total RNA'lar RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) ile pürifiye edilmiştir.

3.2.1.1 Trizol ile RNA İzolasyonu

AL beslenen farelerden T150 ve T151'den, KKK şeklinde beslenen farelerden T155 ve T161'den, AKK beslenen gruptan ise T142 ve T143 isimli farelerden Trizol ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon aşamaları şu şekildedir:

1. Dokular tartılarak tüplere aktarılmış ve hızlıca 1'er mL Trizol (100 mg dokuya kadar 1mL Trizol) eklenmiştir. Rotor-stator tipindeki MICCRA D-1 marka homojenizatörle dokunun parçalanması sağlanarak örnekler homojenize edilmiştir.

2. Homojenizasyondan sonra örnekler 12.000 rpm'de 10 dk. +4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır.

3. Örnekler oda sıcaklığında nükleoprotein kompleksinin ayrılması için 5 dk. bekletilmiştir.

4. 1 mL Trizol için 0.2 mL kloroform tüplere ilave edilmiştir. Tüplerin kapakları iyice kapatılmıştır. 15 sn. boyunca elle kuvetlice çalkalanıp, karıştırılmıştır. 2-3 dk. oda sıcaklığında bekletilip, 15 dk. 4°C'de 12.000 rpm'de tüpler santrifüj edilmiştir.

5. Üstteki sıvı faz yeni tüplere aktarılmıştır. RNA presipitasyonu için 0.5 mL izopropil alkolle karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir. 12.000 rpm'de oda sıcaklığında +4°C'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant atılmıştır.

6. Çöken RNA pelleti %75'lik etanolle 1 kez yıkanmış ve kullanılan Trizol (1 mL) reaktifi kadar etanol (1 mL) eklenmiştir. Örnekler vorteks ile karıştırılarak 5 dk. 7500 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılmış ve RNA pelleti kurumaya bırakılmıştır.

7. 25 µl ddH_2O ile RNA pelletleri pipetlenerek çözülüp, 15 dk 55°C'de inkübe edilmiştir. RNA örnekleri -80 °C'ye kaldırılmıştır.

3.2.1.2 Qiagen RNAeasy Mini Kit ile RNA İzolasyonu

AL, KKK ve AKK beslenme gruplarındaki farelerden sırasıyla T152, T154 ve T139 isimli farelerden Qiagen RNAeasy Mini Kit ile ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon aşamaları şu şekildedir:

1. Öncelikle timus dokuları tüplere alınmıştır ve doku ağırlıklarına göre Buffer RLT (1 ml Buffer RLT'ye 10 µL B-ME eklendi) volümü ayarlanarak tüplere eklenmiştir. Rotor-stator tipindeki MICCRA D-1 marka homojenizatörle örnekler homojenize edilmiştir. Lizat maximum hızda 3 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatant dikkatlice ependorf tüplere alınmıştır.

2. Lizata 1 hacim %70'lik etanol eklenmiş ve pipetle karıştırılmıştır.

3. Örneklerin 700 µL'si yeni 2 mL'lik RNeasy spin kolon içeren tüplere aktarılmıştır ve 15 sn 8000 rpm'de santrifüjlenmiş, filtreden geçen sıvı faz uzaklaştırılmıştır.

4. RNeasy spin kolona 700 µL Buffer RW1 eklenmiş ve 15 sn 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Filtreden geçen sıvı faz uzaklaştırılmıştır.

5. RNeasy spin kolona 700 µL Buffer RPE (4 hacim %100 Etanol eklenmiş) eklenmiş ve 15 sn 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Filtreden geçen sıvı faz uzaklaştırılmıştır.

6. RNeasy spin kolona 500 µL Buffer RPE (4 hacim %100 Etanol eklenmiş) eklenmiş ve 2 dk 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Filtreden geçen sıvı faz uzaklaştırılmıştır.

7. RNeasy spin kolonu yeni 2 mL'lik özel tüplere yerleştirilmiştir ve membranın kuruması için max hızda santrifüjlenmiştir.

8. Elüsyon aşaması için RNeasy spin kolonu yeni 1.5 mL'lik özel tüplere yerleştirilmiştir ve membrana 25 µL nükleazsız su eklenmiştir. 1 dk. 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

3.2.2 Qiagen RNAeasy Cleanup MinElute ile RNA Pürifikasyonu

AL, KKK ve AKK beslenme gruplarındaki farelerden sırasıyla T152, T154 ve T139 isimli farelerden Qiagen RNAeasy Mini Kit ile ekstrakte edilen total RNA'lar RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) ile pürifiye edilmiştir. İzolasyon aşamaları şu şekildedir:

1. Örneklerin hacmi µL' ye nükleazsız su ile ayarlanmıştır. 350 µL Buffer RLT eklenmiştir ve pipetle karıştırılmıştır.

2. RNA'nın dilüe olması için 250 µL %100 etanol eklenmiştir ve pipetle karıştırılmıştır.

3. Örnekler 2 mL'lik özel tüpteki RNeasy MinElute spin kolonlarına aktarılmıştır ve 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Filtreden geçen sıvı kısım atılmıştır.

4. RNeasy MinElute spin kolonları yeni 2 mL'lik özel tüplere yerleştirilmiştir. Spin kolonlara 500 µL Buffer RPE (4 hacim %100 Etanol eklenmiş) eklenmiştir ve spin kolon membranını yıkamak için 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

5. RNeasy MinElute spin kolonları yeni 2 mL'lik özel tüplere yerleştirilmiştir. Membranın kuruması için kapakları açık bir şekilde 5 dk max hızda santrifüj edilmiştir**.** Filtreden geçen sıvı kısım atılmıştır.

6. RNeasy MinElute spin kolonları yeni 1.5 mL'lik özel tüplere yerleştirilmiştir. 14 µL nükleazsız su direkt olarak spin kolonlara uygulanmıştır ve RNA'nın elüe olması için max hızda 1 dk santrifüj edilmiştir.

3.2.3 İzole Edilen RNA'ların Karakterizasyonu

RNA'ların kalitesi NanoDrop ölçümü ve jel elektroforezi ile teyit edilmiştir. Nanodrop (Bio-spec-nano UV-VIS Specthrophometer) spektrometresinde (Shimadzu, Kyoto, Japan) 230, 260 ve 280 dalga boylarında ölçüm yapılmıştır. A260/A230 oranının 2,0-2,2 ve A260/A280 oranının 1,8-2,1 arasında olması, saf RNA izole edildiği anlamına gelmektedir. İzole edilen RNA'ların bütünlüğü Formaldehit jele 1,25 µL örnek yüklenerek ve 60 volt enerjiyle 1,5 saat yürütüldükten sonra görülmüştür. RNA Formaldehit jel elektroforezinde yürütme tamponu olarak 1X MOPS buffer kullanılmıştır. İntakt RNA'lar Agilent 2100 Bioanalyzer yardımıyla yeni nesil sekanslamanın yapıldığı Beijing Genomics Institute (BGI)'de ayrıca analiz edilip kalitesi onaylanmıştır**.**

3.2.4 RNA Sekanslanması

İzole edilen ve karakterizasyonu yapılan total RNA'lar üç beslenme grubundan birer örnek şeklinde kuru buz ile muhafazalı olarak Beijing Genomics Institute (BGI)'ye (Hong Kong) yeni nesil sekanslama (YNS) için gönderilmiştir. Üç farklı örnekten RNA-seq için cDNA kütüphanesi TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA) ile protokolüne uygun olarak kurulmuştur. Sekanslama çift uçlu (pair-end) (2 x 100 bp) olarak ve iki tekrarlı olarak Illumina HiSeq 4000^{TM} Sequencing System (Illumina) ile BGI'de yapılmıştır.

3.2.5 RNA-seq Analizleri

Yeni nesil sekanslamadan sonra RNA-seq verisi, ham veri (raw data) ve adaptör sekanslarından ve düşük kaliteli okumalardan ayrılmış temiz veri (clean data) şeklinde BGI tarafından gönderilmiştir. Üç farklı RNA-seq verisinin (AL, KKK ve AKK) biyoinformatik analizleri; FastQC programı ile kalite kontrolünün yapılması, Tuxedo protokolünün uygulanması ve Gen Ontoloji (GO) analizleri şeklinde devam etmiştir.

3.2.5.1 Biyoinformatik Analizler için Hazırlık

Analizler için Linux-Ubuntu işletim sistemi kullanılmıştır. Öncelikle sekanslama sonucu gelen verilerin kontrolü için FastQC programı ardından Tuxedo protokolünde

yararlanılan programlar protokol akışına uygun olarak kurulmuştur. Protokolde kullanılan programlar;

- Samtools 0.1.19
- Bowtie2 2.2.4-2
- TopHat 2.0.13
- Cufflinks 2.2.1
- R 3.1.2 (2014-10-31)
- CummeRbund programlarıdır.

Ayrıca fare referans genomu olarak Ensembl veritabanındaki GRCm38 fare genom verisi kullanılmıştır.

3.2.5.2 FastQC ile RNA-seq Veri Kalite Kontrolü

YNS sonucu BGI'den gelen ham veri ve temiz verinin kalite kontolü FastQC programı ile yapılmıştır.

FastQC programı, Babraham Enstitüsü tarafından geliştirilmiş yüksek çıktılı sekanslama (high-throughput sequencing) sonrası oluşan milyonlarca verinin analizlere başlamadan önce kalite açısından kontrolünü sağlayan bir programdır [241]. FastQC ile;

1. Temel istatistikler; dosya adı, dosya türü, dosyadaki sekans sayısı, sekansların uzunlukları ve sekanslardaki GC bazlarının bulunma oranı

2. Her dizinin içerisinde yer alan bazların kalite puanları

3. Her bir dizinin ortalama kalite puanı

4. Tüm dizilerin baz içeriği oranı,

5. Tüm dizilerin ortalama GC oranı,

6. Tüm dizilerdeki tahmin edilememiş bazların (N) pozisyonları,

7. Dizilerin uzunlukları,

8. Dizilerdeki duplikasyon seviyeleri,

9. Aşırı miktarda tekrarlanan dizilerin baz dizilimleri ve tekrar sayıları,

10. Adaptör ve K-mer içerikleri görüntülenebilmektedir.

3.2.5.3 RNA-seq verisindeki okumaların TopHat programı ile Hizalanması

RNA-seq verilerimizdeki okumaların hizalanması TopHat versiyonu ile Trapnell ve arkadaşlarının hazırladığı Tuxedo protokolüne göre yapılmıştır [262].

TopHat, RNA-seq çalışmalarında kullanılan popüler bir hizalama programıdır [262]. TopHat programı esas olarak Bowtie programından faydalanmaktadır. Bowtie, kısa DNA okumalarını hızlı şekilde hizalayan bir programdır (http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml) [262]. TopHat ile**,** Bowtie programındaki uzun okumaların referans genoma hizalayamaması gibi sınırlayıcı durumlar giderilerek son sekanslama teknolojileri tarafından üretilen çeşitli boyutlardaki okumalar hizalanabilmektedir [262].

Üç RNA-seq verisi okumaları ayrı ayrı GRCm38 fare referans genomuna TopHat 2.0.13 ile haritalanmıştır. TopHat komut şablonu aşağıdaki gibidir [262].

```
$ tophat –p 4 –G genes.gtf –o C1_R1_thout genome C1_R1_1.fq C1_R1_2.fq
$ tophat –p 4 –G genes.gtf –o C1_R2_thout genome C1_R2_1.fq C1_R2_2.fq
$ tophat –p 4 –G genes.gtf –o C1_R3_thout genome C2_R1_1.fq C2_R1_2.fq
$ tophat –p 4 –G genes.gtf –o C1_R3_thout genome C2_R2_1.fq C2_R2_2.fq
$ tophat –p 4 –G genes.gtf –o C1_R3_thout genome C3_R1_1.fq C3_R2_2.fq
$ tophat –p 4 –G genes.gtf –o C1_R3_thout genome C3_R2_1.fq C3_R2_2.fq
```

3.2.5.4 Cufflinks ile Transkriptlerin Birleştirilmesi

RNA-seq verilerindeki transkriptlerin kendi aralarında birleştirilmesi için Tuxedo protokolünde bulunan Cufflinks programı kullanılmıştır [262].

Cufflinks programı, TopHat programı ile referans genoma hizalanmış RNA-seq okumalarını kullanmakta ve bunları birleştirmektedir. Daha sonra bu transkriptlerin her birinin kaç okuma ile şekillendiğini tahmin etmektedir. Ayrıca bir örnek bir gen için çoklu birleştirme (multiple splice) varyantlardan oluşan okumalar içerebilmesinden dolayı Cufflinks programı her genin splicing yapısını ve onların çoklu alternatif birleştirme (multiple alternative splicing) yapılarını ortaya çıkarmakta da başarılıdır. Transkriptleri birleştirme aşamasından sonra, Cufflinks verideki her transkriptin ifade seviyesini belirler [262].

TopHat ile hizalanmış okumaların birleştirilmesi ve birleştirilmiş transkriptlerin listesini oluşturmak için Cufflinks programı kullanılmıştır. Cufflinks için TopHat programının çıktısı kullanılmıştır ve aşağıdaki şablon komutlarla program çalıştırılmıştır:

```
$ cufflinks –p 4 –G genes.gtf –o C1_R1_thout/accepted_hits.bam
./C1_R1_clout/transcripts.gtf

$ cufflinks –p 4 –G genes.gtf –o C1_R2_thout/accepted_hits.bam
./C1_R2_clout/transcripts.gtf

$ cufflinks –p 4 –G genes.gtf –o C2_R1_thout/accepted_hits.bam
./C2_R1_clout/transcripts.gtf

$ cufflinks –p 4 –G genes.gtf –o C2_R2_thout/accepted_hits.bam
./C2_R2_clout/transcripts.gtf

$ cufflinks –p 4 –G genes.gtf –o C3_R1_thout/accepted_hits.bam
./C3_R1_clout/transcripts.gtf

$ cufflinks –p 4 –G genes.gtf –o C3_R2_thout/accepted_hits.bam

./C3_R2_clout/transcripts.gtf
```

3.2.5.5 Cuffmerge ile Farklı Verilerin Birleştirilmesi

Cuffmerge ile Cufflinks'ten üretilen transkriptler karşılaştırılabilmek için birleştirilmektedir. Ayrıca bir referans genom mevcut ise Cuffmerge ile birleştirilen transkriptler referans genoma entegre edilmektedir. Farklı kondüsyondaki veriler kendi içinde Cufflinks ile birleştirme yapıldığında ve tüm farklı durumdaki veriler Cuffmerge ile biraraya getirildiğinde örnekler arasındaki farklı eksprese olmuş veya regüle olmuş genler ve transkriptler ortaya çıkarılabilmektedir [262].

Cuffmerge ile üç RNA-seq verisi birleştirilerek referans genoma entegre olmuş tek bir transkriptom oluşturulmuştur. Cuffmerge için komut aşağıdaki gibidir:

```
cuffmerge –g genes.gtf –s genome.fa –p 4 assemblies.txt
```

3.2.5.6 Cuffdiff ile Diferansiyel Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Cuffdiff programı ile iki veya daha fazla farklı RNA-seq verisindeki diferansiyel genlerin ekspresyon seviyeleri ölçülmektedir [262].

AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerindeki genlerin ekspresyon düzeyindeki farklılıklar Cuffdiff programı ile belirlenmiştir. TopHat programından elde edilen her bir çıktı ile

Cuffmerge programından elde edilen tek transkriptom ile program çalışmaktadır. Şablon komut şu şekildedir:

```
$ cuffdiff –o diff_out –b genome.fa –p 4 –L C1,C2,C3 –u
merged_asm/merged.gtf ./C1_R1_thout/accepted_hits.bam,
./C1_R2_thout/accepted_hits.bam, ./C1_R1_thout/accepted_hits.bam,
./C2_R1_thout/accepted_hits.bam, ./C2_R2_thout/accepted_hits.bam,
./C3_R1_thout/accepted_hits.bam, ./C3_R2_thout/accepted_hits.bam
```

3.2.5.7 R ile Veri Görüntüleme

Cuffdiff analizlerinden elde edilen verilerin görüntülenmesi R programı içinde CummeRbund ile yapılmıştır.

R, istatiksel hesaplama ve üst düzey grafikleme için yazılmış bir programlama dilidir [263]. CummeRbund ise R programlama paketi içinde bulunan, Cufflink programı yüksek çıktılı verileri için düzenlenmiş bir görselleştirme paketidir. Cuffdiff diferensiyel ekspresyon analizinden üretilen büyük miktarda RNA-seq veri analizlerini görselleştirmek için tasarlanmıştır. Bu analizin sonuçları çok sayıda birbiriyle ilişkili dosyaları içermektedir. CummeRbund, RNA-Seq verilerinin birbiri arasındaki ilişkileri göz önüne alarak verilerin kolayca toplanmasını ve indekslenmesini sağlar ve RNA-seq verilerinin hızlı analiz etmeye yardımcı olur (http://www.bioconductor.org/). R ve CummeRbund programlarında kullanılan kodlar şu şekildedir:

```
$ R
```

Bu komutla R program diline giriş yapılır.

```
library(cummRbund)
```

komutu ile R içindeki CummRbund paketine ulaşılır.

```
cuff_data < - readCufflinks('diff_out')
```

Cuffdiff çıktısından bir CummeRbund veritabanı oluşturulur

```
csDensity(genes(cuff_data))
```

Her örneğin gen ekspresyon seviyesi dağılımlarını görüntülemektedir.

```
csScatter(genes(cuff_data), 'C1', 'C2', 'C3')
```

Birkaç kondüsyonda her genin ekspresyonunun scatter şeması ile karşılaştırılması

```
mygene<- getGene(cuff_data, 'Gen')
expressionBarplot(mygene)
```

İstenilen bir genin farklı verilerdeki ekspresyon seviyesi görüntülenir.

```
expressionBarplot(isoforms(mygene))
```

İstenilen genin farklı izoformlarının ekspresyon seviyeleri farklı verilerde görüntülenir.

```
dend<-csDendro(genes(cuff_data)
```

Tüm genlerin kütüphaneler bazında ilişkisi ağaç ile belirtilir.

```
mySigMat <-sigMatrix(cuff,level. = 'genes', alpha=0.05)
mySigMat
```

Anlamlı genlerin ($p<0.05$) RNA-seq verilerindeki sayısını bir tablo ile şekillendirir.

3.2.5.8 Gen Ontoloji (GO) Analizleri

AL, KKK ve AKK arasında diferansiyel eksprese olmuş genler (DEGs), zenginleştirilmiş gen ontoloji (GO) kategorilerine göre sınıflandırılmıştır.

Gen Ontoloji (GO), genlerin fonksiyonuna göre sınıflandırıldığı uluslararası standartlaşmış bir sistemdir [264]. Gen ontoloji çalışması, genlerin moleküler biyoloji çalışmalarında birbiriyle örtüşmeyen üç ontoloji teriminde kalifiye eder; moleküler fonksiyon (molecular function), biyolojik proses (biological process) ve hücresel bileşen (cellular component). Moleküler fonksiyon, moleküler düzeydeki aktiviteleri tanımlar (katalitik, bağlanma aktivitesi gibi). Biyolojik proses, moleküler fonksiyonun gerçekleştiği yerlerdeki biyolojik hedefleri açıklamaktadır (hücre ölümü, apoptozis gibi). Gen ontolojide hücresel bileşen terimi ise, makromoleküler komplekslerin ve hücre altı yapıların aşamalarındaki lokasyonları tanımlamaktadır (nükleer iç membran, ubiquitin ligaz kompleks gibi) [265].

3.2.5.9 Gen Ağ ve KEGG Yolak Analizleri

Gen ağ (gene network) ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) yolak (pathway) analizleri String veritabanı [266] ile yapılmıştır. RNA-seq verilerinin analizi için String veritabanının 10.5 versiyonu kullanılmıştır.

Moleküler biyolojide String (search tool for retrieval of interacting genes/proteins) bilinen ve tahmin edilmiş protein ilişkilerinin ve etkileşimlerinin incelendiği biyolojik bir veritabanı ve internet kaynağıdır. Veri aktarımının bağlantılar sayesinde sağlandığı iletişim sistemine ağ (network) denilmektedir. Genellikle bilgisayar etkileşimlerini göstermek için kullanılır. Ağ; nokta (node) ve kenarlardan (edges) oluşur. Noktalar proteinleri; kenarlar ise, noktalarla olan ilişkileri betimlemektedir. String veritabanı, KEGG kaynağına dayalı ağ analizlerinin yanında GO analizleri de yapılabilmektedir. Bu veritabanında birçok değişik kaynaktan gelen deneysel veri dahil bilgisayar dayanaklı tahminler ve açık yazılı bilgiler de bulunmaktadır. Bu bilgilerin güvenilirliği hesaplanır, düzenli olarak güncellenir ve yine açık bir şekilde sunulmaktadır. Gen ağ analizlerinde protein etkileşimleri proteinlerin GO, KEGG yolak ve protein domaini gibi özelliklerine göre görselleştirilebilmektedir. [265].

3.2.5.10 Diferansiyel Eksprese Olmuş Genlerin Kat Değişimine (Fold change) Göre Analizleri

AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında anlamlı diferansiyel eksprese olmuş genler (DEGs), Excel programında kat artışı ve azalışına göre sınıflandırılmıştır. Ayrıca AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında belirli kat değişimine sahip diferansiyel genler için gen ağ (gene network), GO ve KEGG yolak analizleri String veritabanında yapılmıştır [266].

3.2.5.11 İmmün Sistem İlişkili Genlerinin Belirlenmesi ve Analizleri

AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında anlamlı diferansiyel eksprese olmuş genler, zenginleştirilmiş gen ontoloji (GO) kategorilerine göre Gen Ontoloji (GO) veritabanında Panther GO-Slim ile yapılmıştır [266]. AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında diferansiyel eksprese olmuş genler sınıflandırıldığında (GO:0002376) immün sistem proses fonksiyonel zenginleştirme kategorisindeki genler belirlenmiştir. Ardından belirlenen genlerin AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerindeki ekspresyon seviyelerine heatmap grafiği ile şu komutlarla bakılmıştır:

```
myGeneIds< c("gen1,"gen2,"gen3,"gen4","gen5")
myGenes<-getGenes(cuff_data,myGeneIds)
```

```
pdf(file="heatmap.pdf")
csHeatmap(myGenes,rescaling='none',clustering='none',labCol=T,labRow=T
,logMode=T)
```

3.2.5.12 Yaşlanma ve Oksidatif Stres ile İlgili Genlerinin Belirlenmesi

GO kategorilerinden yaşlanma (GO:0007568 - Aging) ve oksidatif strese cevap (GO:0006979 - response to oxidative stress) kategorilerindeki genler, fare genom bilgilerini içeren Mouse Genome Informatics (MGI) veritabanından elde edilmiştir. AL, KKK ve AKK verilerinde bu genler CummerBund programı ile aranmış ve ekspresyon düzeyleri heatmap grafiği ile görüntülenmiştir.

3.2.5.13 Sirtuin Proteinleri ve mTOR yolak Genlerinin Belirlenmesi

Literatürde belirtilmiş ve kalori kısıtlaması çalışmalarında önemli sirtuin genleri ve mTOR yolağındaki genlerinin ekspresyon düzeyleri AL, KKK ve AKK verilerinde CummeRbund programı ile bakılarak görüntülenmiştir.

3.2.5.14 NCBI GEO Veritabanına Verinin Yüklenmesi

GEO (Gene Expression Omnibus), NCBI da bulunan sekanslanmış veri ve dizi temelli yüksek çıktılı fonksiyonel verilerin depolandığı bir veri tabanıdır. Verileri arşivlemek için üç dosya gerekmektedir:

1. Sekanslama bilgilerini ve RNA-seq verisini tanımlayan bilgileri içeren form,

2. Ham veri

3. İşlenmiş bir veri örneği (Cufflinks, Cuffdiff ya da R sonuçları)

AL, KKK ve AKK RNA-seq verileri GSE95371 erişim numarası altında GEO arşive yüklenmiştir.

3.2.6 Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) ile RNA-seq Verisinin Validasyonu

AL, KKK ve AKK beslenme gruplarına ait elde edilen üç RNA-seq verisinden kalori kısıtlaması ve immün sistem çalışmalarında önemli sekiz genin validasyonu yapılmıştır. Bu çalışmalarda önemli bu genler; leptin (Lep), ghrelin (Ghrl), insülin büyüme faktörü 1 (Igf1) adinopektin (adipoq), timosit antijeni (Thy-1), interlökin-16 (IL-16), CD4 ve kaspaz

3 (Casp3)'tür [170], [15], [267-269]. Üç gruba ait 1'er µg RNA'dan High-Capasity cDNA Revers Transcription Kit protokolüne uygun olarak cDNA sentezi yapılmıştır. Primer çiftleri IDT ve Primerblast programları kullanılarak hazırlanmıştır. Primer sekansları ve uzunlukları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Kontrol olarak Gapdh geni kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 qPCR'da validasyonu yapılan genler ve primer sekansları

Gen ismi	**Primer sekans bilgisi**
Lep	5'GGT TGT CCA GGG TTG ATC TC 3' 5'GTG GGA GAC AGG GTT CTA CT3'
Ghrl	5'GCT GTC TTC AGG CAC CAT CT3' 5'TTC TCT GCT GGG CTT TCT GG5'
Igf1	5'CAA GTC CAG AGA GGA AGC TAT G3' 5'CCG AGA GGT GGA GTG ATT TG3'
Adipoq	5'GCA CGA GGG ATG CTA CTG TT3' 5'CAC AAG TTC CCT TGG GTG GA3'
Thy-1	5'TCTCAGGCACCCTTGGGATA 3' 5'GTAGTCGCCCTCATCCTTGG 3'
IL-16	5'ATGGTGCTCCCAGAGTTTAC 3' 5'CTGAATGGCTGAGGCTACTT 3'
CD4	5'TGGATCAAAGGGCAGTGTATAG 3' 5'GCAGCCTCTCAGTCTTCA TT 3'
Casp3	5'AGCTTGGAACGGTACGCT 3' 5'AGA TCCCAGAGTCCACTGAC 3'
Gapdh	5'ACT CCA CTC ACG GCA AAT TC3' 5'CAG TAG ACT CCA CGA CAT ACT C3'

GM SYBR Green qPCR Kit protokolü uygulanarak LightCycler Nano Real-Time System (Roche, Switzerland) ile denatürasyon 95°C'de 2 dk ve ardından 45 döngü amplifikasyon (95°C'de 20 sn, 58°C'de 30 sn, 72°C'de 45 sn) PCR koşullarında real-time kantitatif PCR işlemi gerçekleşmiştir. Bütün örnekler dublike çalışılmıştır. Gen ekspresyon seviyesinin ölçülmesi $2^{-\Delta CT}$ metodu ile hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

4.1 RNA İzolasyon Sonuçları ve Karakterizasyonu

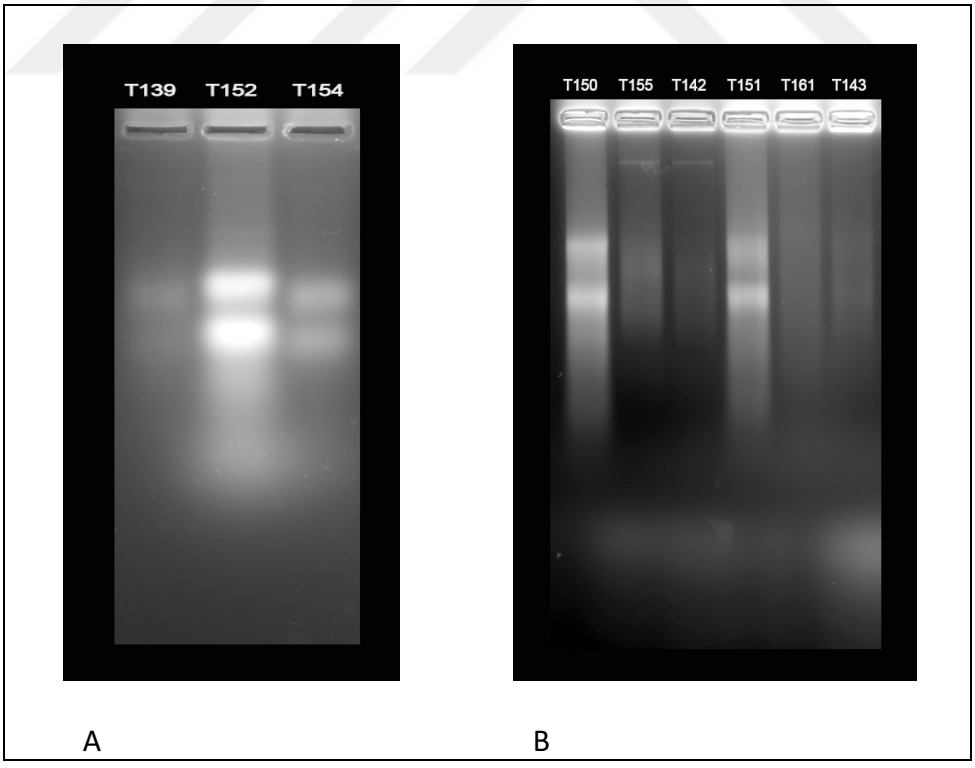
AL, KKK ve AKK beslenme gruplarındaki sırasıyla T152, T154 ve T139 isimli farelerden Qiagen RNAeasy Mini Kit ile total RNA izolasyonu ardından MinElute Cleanup Kit ile RNA'lar pürifiye edilmiştir. AL şeklinde beslenen farelerden T150 ve T151'den, KKK şeklinde beslenen farelerden T155 ve T161'den, AKK beslenen gruptan ise T142 ve T143 isimli farelerden Trizol ile total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Total RNA izolasyon sonucu jel elektroforezi görüntüleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Şekil 4.1.A'da T139, T152 ve T154 farelerin timusundan yapılan total RNA izolasyonunun MOPS jeldeki görüntüsü, Şekil 4.1.B'de ise sırasıyla T150, T155, T142, T151, T161 ve T143 farelerinin timuslarından yapılan total RNA izolasyonunun MOPS jeldeki görüntüsüdür.

Total RNA'ların kalitesini belirlemek için Nanodrop (Bio-spec-nano UV-VIS Specthrophometer) spektrofotometresinde (Shimadzu, Kyoto, Japan) ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Nanodrop spektrofotometre ölçüm sonuçları

Örnek İsmi	**Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µL)**	**OD 260/280**	**OD 260/230**
T150	3290,22	1,00	1,00
T151	3319,69	1,00	1,00
T152	1038,57	1,93	1,85
T154	923,55	1,97	1,33
T155	2307,20	2,05	1,75
T161	2670,96	2,04	1,80
T139	740,38	2,13	1,48
T142	3119, 21	1,01	1,00
T143	2144	1,00	1,00



Şekil 4.1 A- T139, T152 ve T154 farelerin timusundan yapılan RNA izolasyonunun jel elektroforezi görüntüsü. B- T150, T155, T142, T151, T161 ve T143 farelerinin timuslarından yapılan RNA izolasyonunun jel elektroforezi görüntüsü

Ayrıca BGI'de Agilent 2100 Bioanalyzer ile yapılan ölçümler ve sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Agilent 2100 Bioanalyzer ile yapılan ölçüm sonuçları

Örnekler	**Konsantrasyon (ng/µL)**	**İntakt No. (RIN)**	**28S/ 18S**
AL	1809	9.6	2.0
KKK	2056	9.1	1.4
AKK	2144	8.1	1.8

4.2 RNA-seq Sonuçları

AL, KKK, AKK gruplarındaki farelerin timuslarından elde edilen mRNA'lar Illumina HiSeq 4000^{TM} Sequencing System (Illumina) kullanılarak BGI'de yeni nesil sekanslama ile sekanslama yapılmıştır. Yeni nesil sekanslamadan sonra sonuçlar, üç klasörde ham veri ve üç klasörde de adaptör ve kalitesiz sekanslardan ayrılmış halde temiz veri bulunan altı sıkıştırılmış klasör halinde gönderilmiştir. Her bir klasörün içinde 4 farklı dosya bulunmaktadır. Bunlar çift uçlu (pair-end) okuma sonucu oluşan iki dosya ve sekanslamanın tekrarlanarak yapıldığı diğer iki dosyadan oluşmaktadır. Elde edilen sekanslar FASTQ formatındadır. Ham olarak gelen okuma sayısı yaklaşık 127 milyondur, adaptör ve kalitesiz sekanslardan ayrılmış haldeki temiz okuma sayısı ise yaklaşık olarak 105 milyondur. Ayrıca her okuma 100 bp uzunluğundadır (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3 AL, KKK ve AKK gruplarının RNA sekans gruplarının istatiksel sonuçları

Beslenme Grupları	**Ham Okumalar**	**Temiz Okumalar**	**Okuma Uzunluğu(bp)**	**Temiz baz sayısı**	**GC(%)**
AL	39760624	34926546	100	3492654600	49,63
KKK	39760624	34991272	100	3499127200	48,4
AKK	47826710	35113458	100	3511345800	47,91

4.3 FastQC ile Verilerin Kontrolü

Yeni nesil sekanslama sonucu BGI'den gelen verilerin kalite kontolü FastQC programı ile yapılmıştır. Temiz verinin kalite kontrolünden sonra temiz veri ile RNA-seq veri analizlerine devam edilmiştir. Öncelikle FastQC programı ile temel istatistiklerin verildiği bir tablo sonuç olarak alınmıştır (Şekil 4.2). Bu tabloda dosya ismi, dosya tipi, sekanslamanın yapıldığı sistem, sekans sayısı, sekans uzunluğu ve sekanslardaki GC baz oranı gibi temel bilgiler yer almaktadır.

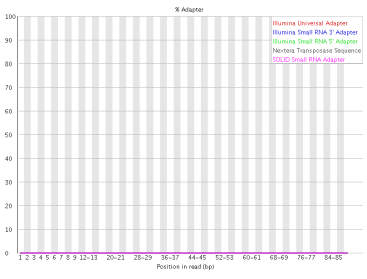
Basic Statistics

Measure	Value
Filename	FCH7YHHBBXX-HKMOUcxwEAABRAAPEI-223_L5_1.fq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	8781011
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	100
%GC	47

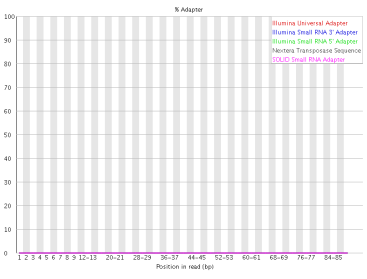
Şekil 4.2 FastQC programından elde edilen temel istatistik grafiğinden bir örnek

Daha sonra Şekil 4.3'te gösterildiği gibi AL, KKK ve AKK RNA-seq adaptör ve düşük kaliteli sekanslardan temizlenmiş hali olan temiz verinin FastQC programı rapor sonuçları verilmiştir.

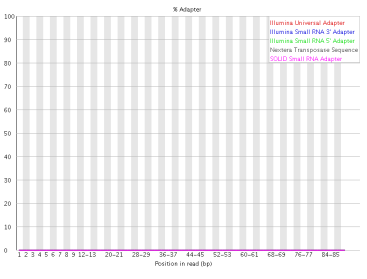
A-AL



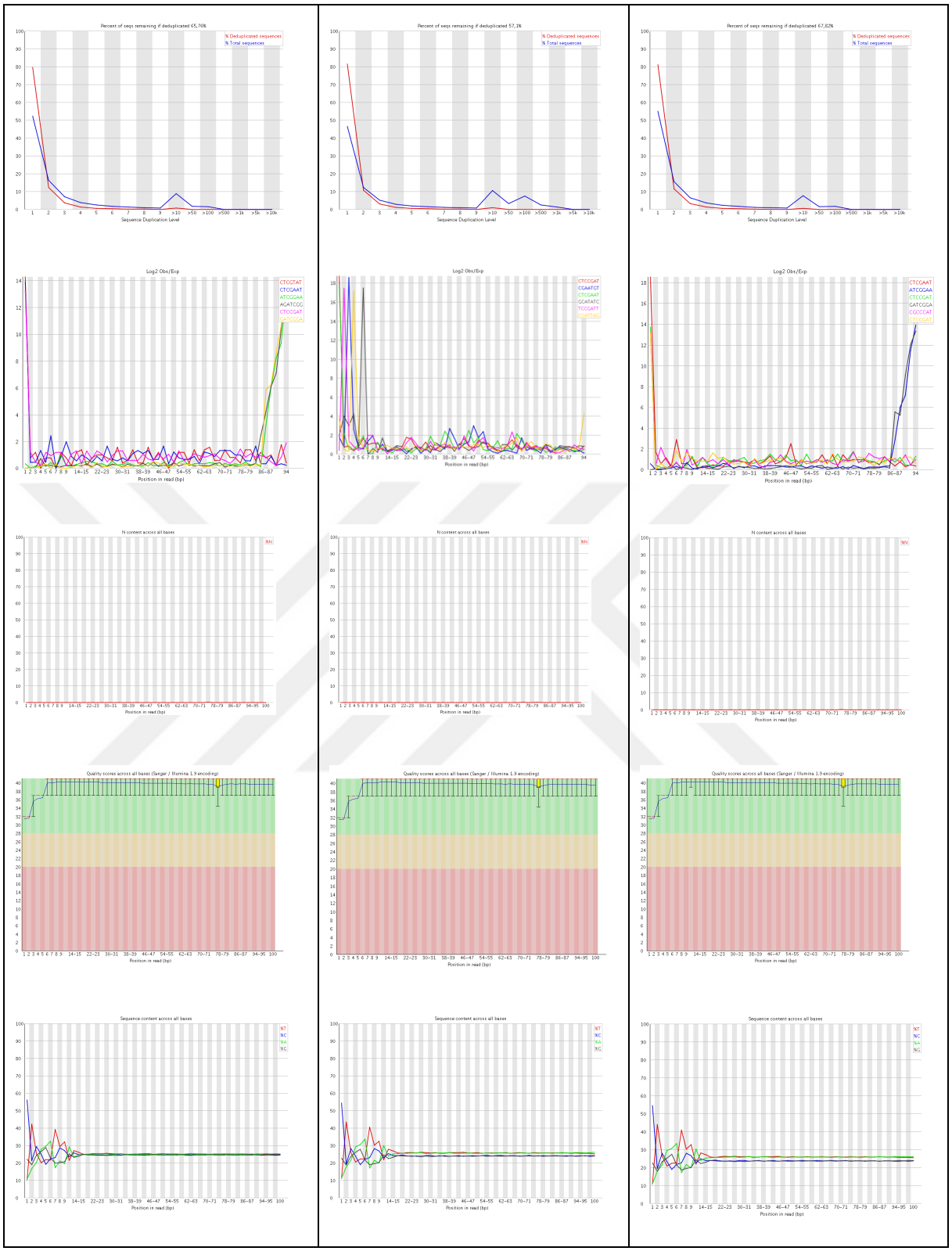
B-KKK



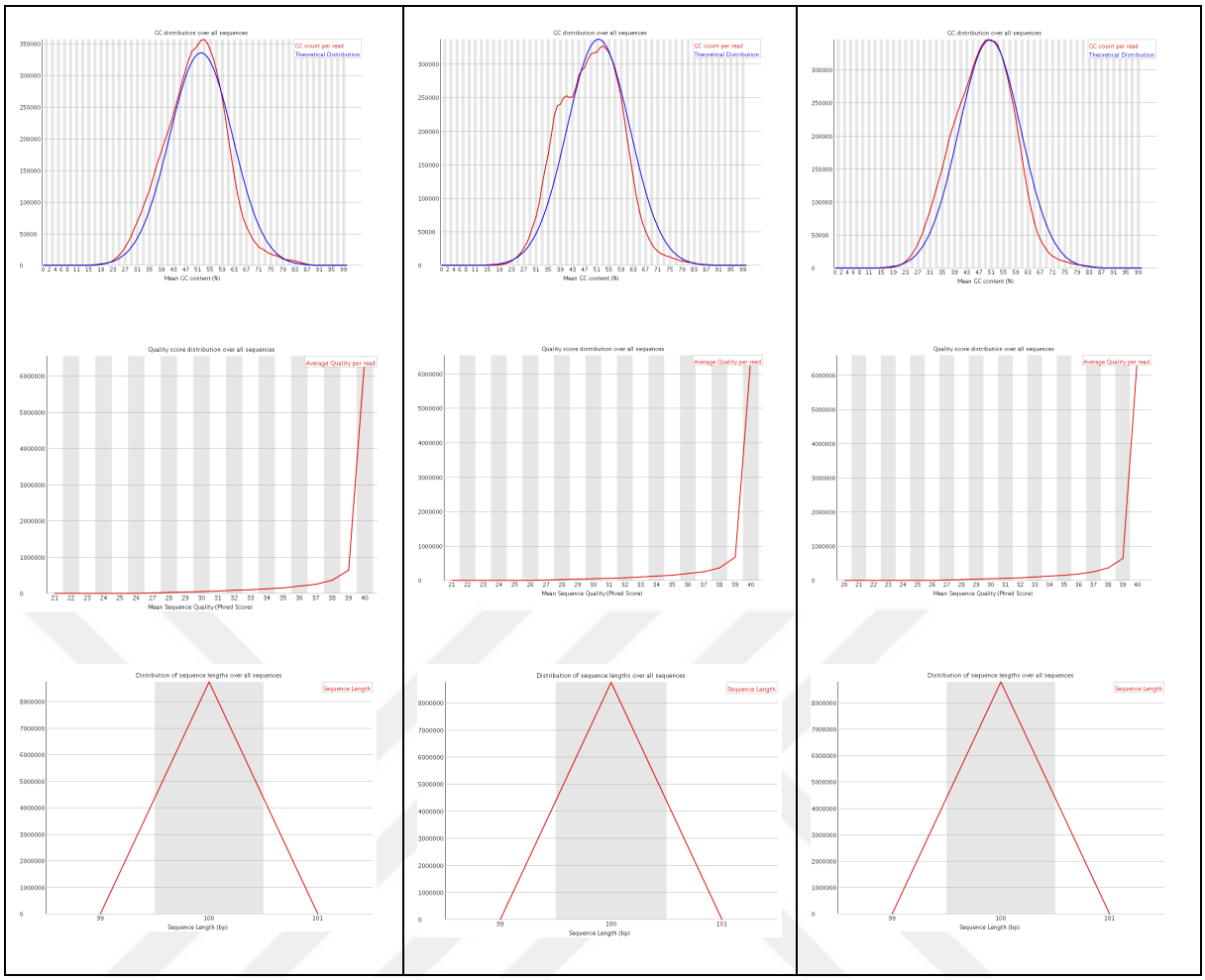
C-AKK



Şekil 4.3 A- AL temiz okumalarının FastQC ile kontrolü, B- KKK temiz okumalarının FastQC ile kontrolü, C- AKK temiz okumalarının FastQC ile kontrolü



Şekil 4.3 A- AL temiz okumalarının FastQC ile kontrolü, B- KKK temiz okumalarının FastQC ile kontrolü, C- AKK temiz okumalarının FastQC ile kontrolü (devamı)



Şekil 4.3 A- AL temiz okumalarının FastQC ile kontrolü, B- KKK temiz okumalarının FastQC ile kontrolü, C- AKK temiz okumalarının FastQC ile kontrolü (devamı)

Sonuçlardan ilki adaptör içeriği ile ilgilidir. Bu grafiklerde bilinen adaptörlerin veride yer alıp almadığının bilgisi verilmektedir. Herhangi bir adaptör ile karşılaşıldığında, bu veri içerisinde adaptör “var” olarak gösterilir ve miktarı grafikte gösterilir. Ancak üç veride de bilinen bir adaptörün izine rastlanmamıştır.

Kütüphane içerisindeki her dizinin duplikasyon seviyelerini ölçen grafikte, özellikle kütüphane oluşturma sırasında PCR aşamasında bir sapma olup olmadığının görülmesini sağlamaktadır. Sekanslardaki duplikasyonun olmadığı durum kırmızı çizgi ile gösterilmektedir. Bu sonuçlarda kırmızı çizgiye yakın olarak en düşük seviyede duplikasyonu gösteren verilerin AL ve AKK verileri olduğu görülmektedir.

K-mer içeriği gösteren grafiklerde, kütüphane içerisinde her pozisyondaki K-merlerin sayısını ölçmektedir. Pozisyonel olarak sapma gösteren bütün K-merler raporlanır ve

tablo oluşturulur. En çok sapma gösteren altı adet K-mer'in dağılımlarını gösteren grafik çizilir. AL ve AKK verilerinde KKK'ya göre daha az K-mer varlığı görülmüştür.

Bazlara göre 'N' içeriğini gösteren grafiklerde, her üç veride de N miktarı kabul edilebilir seviyededir.

Bazlara göre sekansların kalitesini gösteren grafiklerde ise, sekansların içerdiği bazların her bir pozisyonunu kapsayan, ortalama kalite değerini gösteren bir "BoxWhisker" grafiği verilmektedir. Bu grafik, kalite değerlerine göre üç renge ayrılmıştır. Yeşil renkli olan bölge kalite değerinin en yüksek olduğu kısımdır. Üç RNA-seq verisinde de okumaların kalitesinin iyi olduğu görülmektedir.

FastQC'nin sekansların baz içeriğini gösteren grafikte, dört tane DNA bazı için dosyadaki her bir sekansın baz pozisyonlarının oransal grafiği verilmektedir. Her bir bazın bağıl miktarı, genomdaki ya da transkriptomdaki bazların toplam miktarını yansıtmaktadır.

Her sekanstaki GC içeriğini gösteren grafikte, veri içerisindeki sekansların GC dağılımı ile beklenen GC dağılımı ile karşılaştırılmıştır. Teorik dağılıma en yakın dağılım üç RNA-seq verisinden AKK verisidir.

Her bir sekansın kalite skor grafiği, sekansların evrensel olarak düşük kaliteli değerlere sahip olup olmadığının görülmesini sağlamaktadır. Phred skoruna göre hesaplanan bu grafikte 20'nin altında olması kalite değerinin düşük olduğunu göstermektedir. Üç veride de sekansların kalite skorunun yüksek olduğu görülmüştür.

Son olarak, okumaların uzunluğunu gösteren grafik FastQC programı tarafından rapor edilmektedir. Buna göre okumaların hepsi 100 bp uzunluğundadır.

4.4 Tuxedo Protokolüne Göre RNA-seq Analiz Sonuçları

FastQC ile temiz verilerin kalite kontrolünden sonra AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerine Tuxedo protokol uygulanmıştır. Tuxedo protokolüne göre, TopHat ile RNA-seq verilerindeki okumaların referans GRCm38 fare genomuna haritalanması, Cufflinks programı ile okumaların birleştirilmesi, Cuflinks programının bir paketi olan Cuffmerge programı ile üç RNA-seq verisinin tek transkript haline getirilmesi ve yine Cufflinks programının bir diğer paketi olan Cuffdiff ile üç veri arasındaki genlerin ekspresyon

seviye farklılıklarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Sonuçların görüntülenmesi R programının paketi olan CummeRbund ile yapılmıştır. RNA-seq çalışmaları genellikle iki veya fazla durumdaki farklılıkların ortaya çıkarılması önemlidir ve sonuçlar bu farklılıklara göre analiz edilmektedir. Bu yüzden RNA-seq verilerinin görselleştirilmesinde Cuffdiff sonuçları kullanılmaktadır. Sonuçlar analiz edilip değerlendirilirken genellikle FPKM (Fragments Per Kilobase Million), p-değeri (p-value) ve kat değişiklik (fold change) ifadelerinden faydalanılır.

FPKM, her milyon kilobazdaki fragment sayısını ifade etmektedir. Çift uçlu okumalar bu değerle normalize edilmektedir. FPKM, eksprese olan genlerin ekspresyon düzeyi hakkında bilgi vermektedir [270].

P değeri (p-value), bir karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığının kararının verildiği olası hata miktarını göstermektedir. Ünlü bir istatistikçi olan Fisher tarafından bu hatanın maksimum kabul edilebilir düzeyi 0,05 olarak önerilmiş ve kabul görmüştür. Bir analiz sonucunda bulunan p değeri 0,05'in altında ise karşılaştırma sonucunda anlamlı bir farklılık bulunduğu anlamına gelmektedir. P değeri küçüldükçe istatiksel olarak anlamlılık artmaktadır:

- p değeri 0,05 - 0,01 ise; istatiksel olarak anlamlı fark vardır.
- p değeri 0,01 - 0,001 ise; yüksek düzeyde anlamlı fark vardır.
- p değeri 0,001’ den daha küçük ise; çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

P değeri 0,10 - 0,05 ise sınırda anlamlılık vardır anlamına gelmektedir [271].

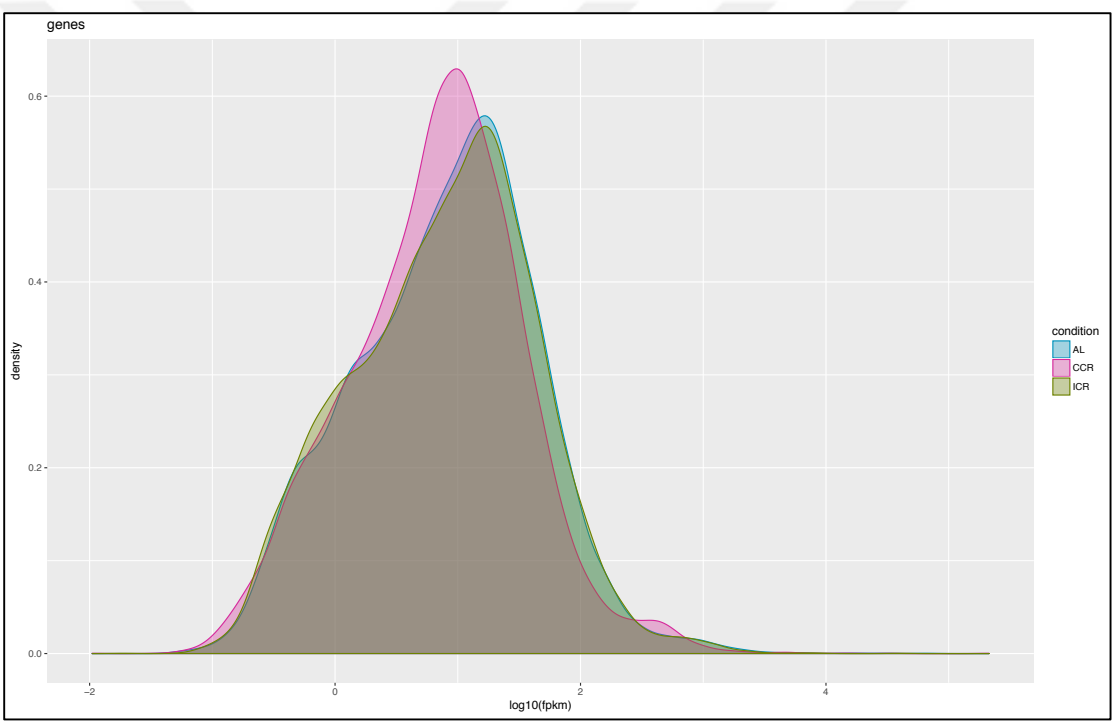
Kat değişiklik (Fold change), bir miktarın başlangıçtaki değerden nihai değere ne kadar çıktığını açıklayan bir değerdir [272]. RNA-seq çalışmalarında ekspresyon kat değişikliğini göstermektedir. Genellikle logaritmik olarak hesaplanmaktadır.

Yanlış bulgu oranı (False Discovery Rate (FDR)), çoklu karşılaştırma yaparken yapılan hatanın yüzdesidir [273]. Düşük olması hata yüzdesinin az olduğunu göstermektedir.

RNA-seq verilerindeki okumaların FastQC ile kalite kontrolü yapıldıktan sonra, temiz okumalar TopHat ile Ensemble veritabanından elde edilen GRCm38 fare genomuna haritalanmıştır. Üç RNA-seq verisindeki tüm okumaların haritalanma oranı (haritalanmış okumalar/tüm okumalar) %91.9-%94.9 olarak belirlenmiştir.

Cufflinks programı ile okumaların birleştirilmesi, Cuffmerge programı ile üç RNA-seq verisinin tek transkript haline getirimesi ve yine Cuffdiff ile üç veri arasındaki genlerin ekspresyon seviye farklılıklarının belirlenmesi ile Tuxedo protokolü uygulanmıştır. FPKM değeri ile normalizasyon yapılmıştır. Sonuçların görüntülenmesi ise R programının paketi olan CummeRbund ile gerçekleştirilmiştir. CummeRbund, Cuffdiff sonuçlarından yola çıkarak sonuçları görselleştirmektedir.

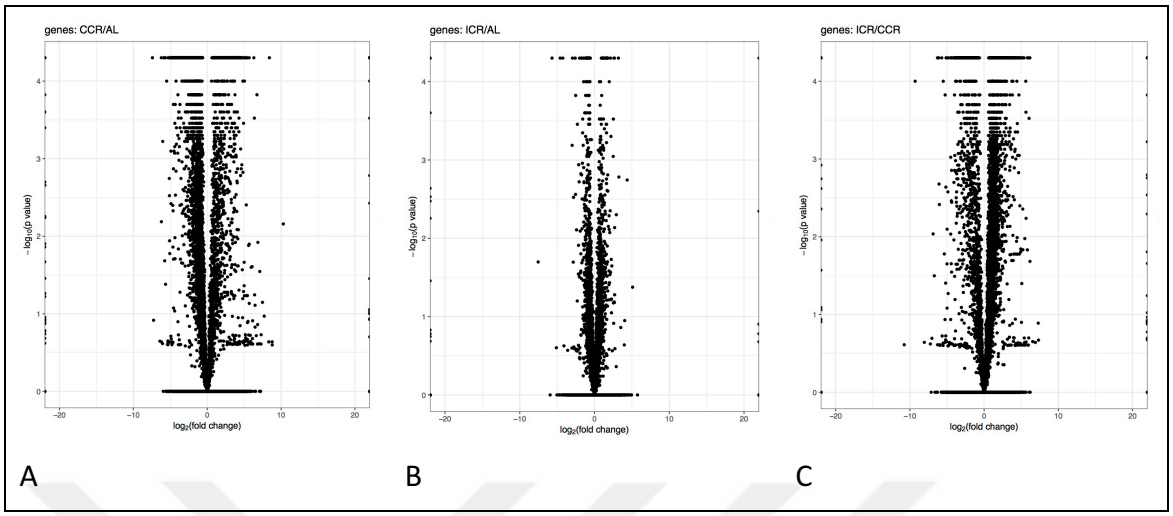
AL, KKK (CCR) ve AKK (ICR) RNA-seq verisinin gen ekspresyon seviyesi dağılımı Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Bu grafiğe göre AL, KKK (CCR) ve AKK (ICR)'nın gen ekspresyon dağılımına bakıldığında AL ve AKK'nın birbirine benzer olduğu, KKK'nın ise AL ve AKK' dan daha yoğun ve onlara göre daha farklı olduğu görülmektedir.



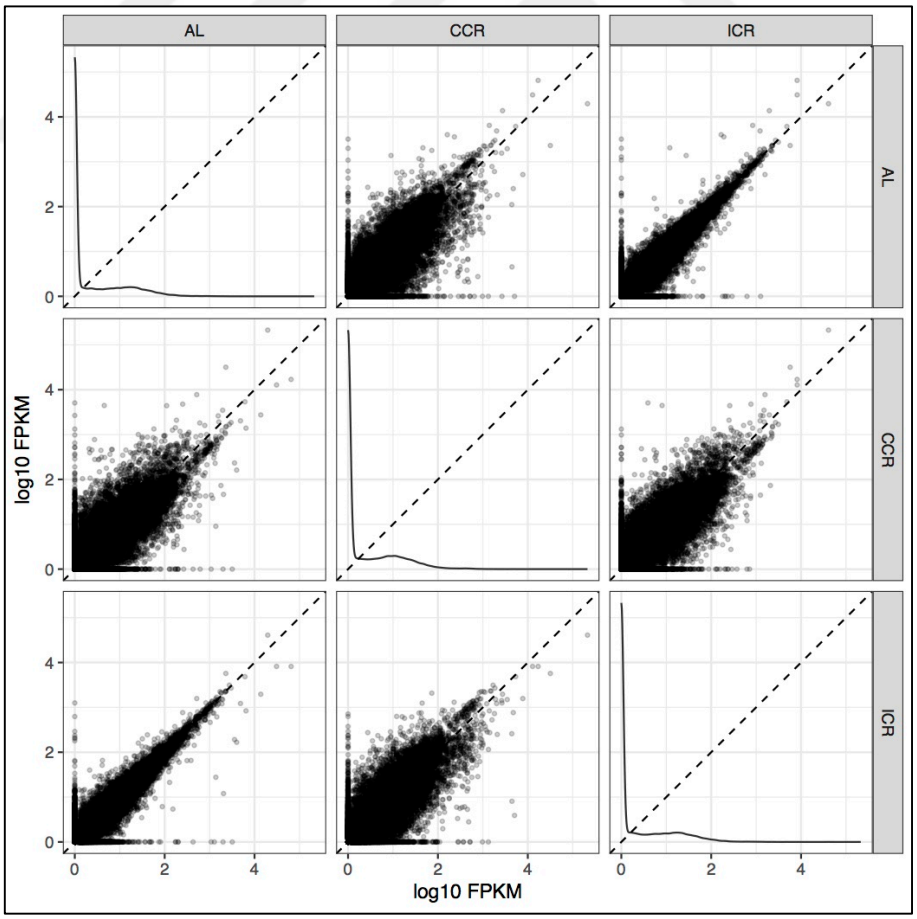
Şekil 4.4 AL, KKK (CCR) ve AKK (ICR) RNA-seq verisinin gen ekspresyon seviyesi dağılım grafiği

İki RNA-seq verisi arasında her genin ekspresyonunun karşılaştırılarak verildiği grafikler Şekil 4.5'da "Volcano Plot" olarak, Şekil 4.6'de ise "Scatter Plot" olarak gösterilmiştir. 4.5.A'da AL-KKK, 4.5.B'de AL-AKK, 4.5.C'de KKK-AKK arasındaki gen ekspresyon dağılımları kat artışına göre düzenlenmiştir. Şekil 4.6'da ise tüm verilerin FPKM değeri ile karşılaştırıldığı bir grafikle gösterilmiştir. Şekil 4.5 incelendiğinde, AL- KKK ve KKK-AKK arasındaki gen ekspresyonunun kat artışı bakımından farklılıklar olduğu görülmektedir. AL-AKK arasında ise genlerin benzer oranda eksprese oldukları

anlaşılmaktadır. Şekil 4.6'da ise tek bir grafikte üç RNA-seq verisinin karşılaştırılması yapılmaktadır. FPKM değeri esas alındığında da, aynı sonuçla karşılaşılmıştır.

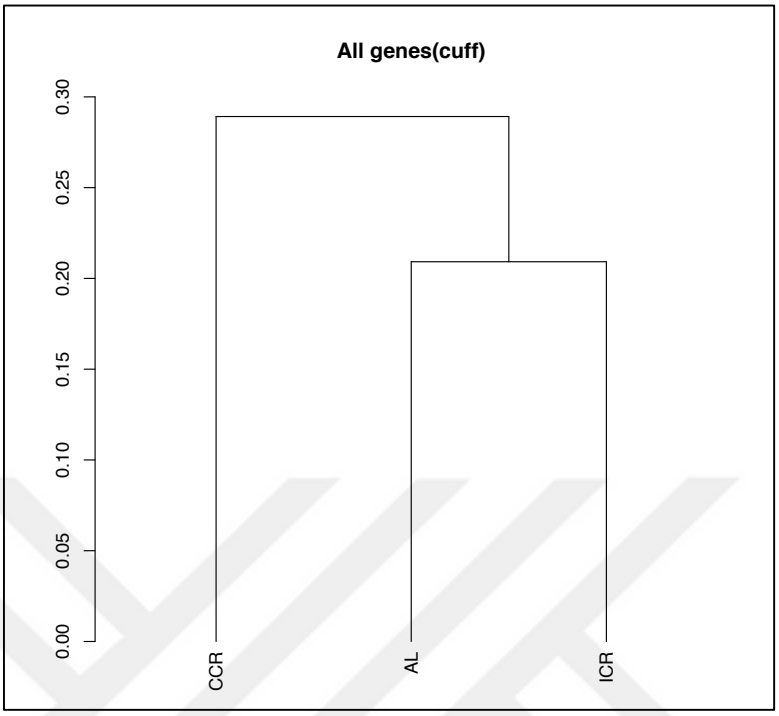


Şekil 4.5 A- AL-KKK , B- AL-AKK, C- KKK-AKK arasındaki gen ekspresyon dağılımlarının kat artışına (fold change) ve p-değerine göre "Volcano Plot" şeklinde gösterimi



Şekil 4.6 AL, KKK ve AKK verilerinin log10 FPKM değerine göre gen ekspresyonlarının "Scatter Plot" grafiği şeklinde karşılaştırılması

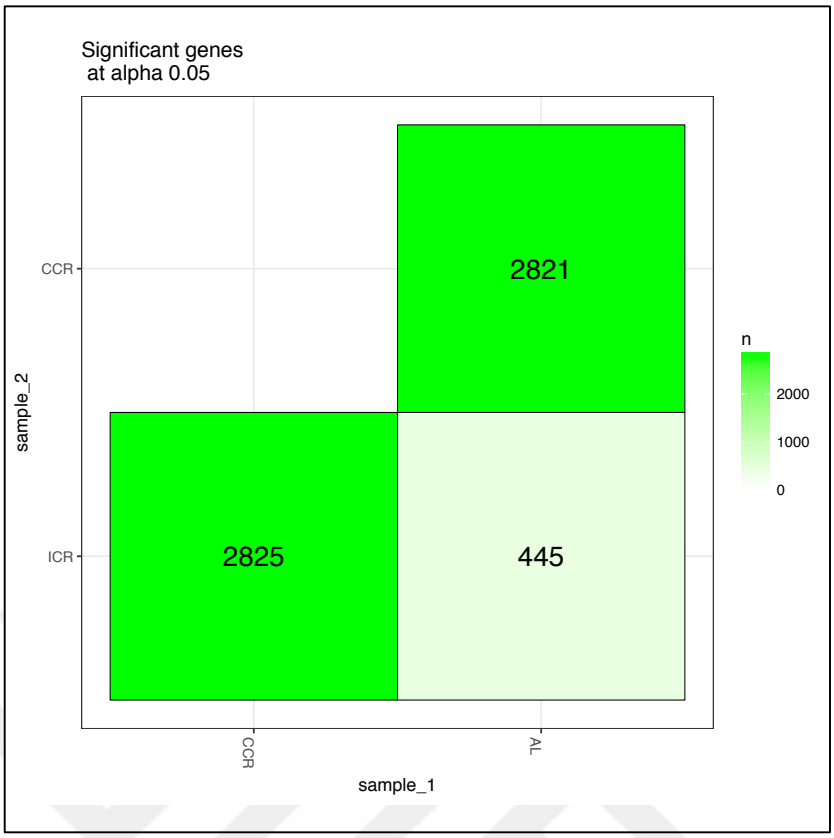
Ayrıca tüm genlerin kütüphaneler bazında birbiri ile ilişkisi Şekil 4.7'de ağaç şeklinde CummeRbund ile görüntülenmiştir.



Şekil 4.7 AL, KKK ve AKK'nın benzer genlerine göre ağaç şeklinde grafiklendirilmesi

Cufflinks'ten elde edilen CuffSet sonucuna göre; üç RNA-seq verisinde toplam 44426 gen, 138066 izoform, 80392 transkripsiyon başlangıç bölgesi (TSS), 48900 kodlanmış DNA sekansı (CDS), 133278 promotor ve 241176 birleştirme (splicing) olduğu görülmektedir.

Cuffdiff programının önemli sonuçlarından biri de veriler arasında farklı eksprese olan genleri belirlemektir. Bu genlerin listesi ".diff" dosyası halinde verilmiştir. Bu sonuçlara göre AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde toplamda 6091 anlamlı diferansiyel eksprese olmuş gen (DEGs) ($p<0,05$) vardır. AL-KKK arasında 2821, AL-AKK arasında 445, KKK-AKK arasında ise 2825 anlamlı diferansiyel eksprese olmuş gen (DEGs) ($p<0,05$) bulunmaktadır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında anlamlı diferansiyel eksprese olmuş gen sayıları

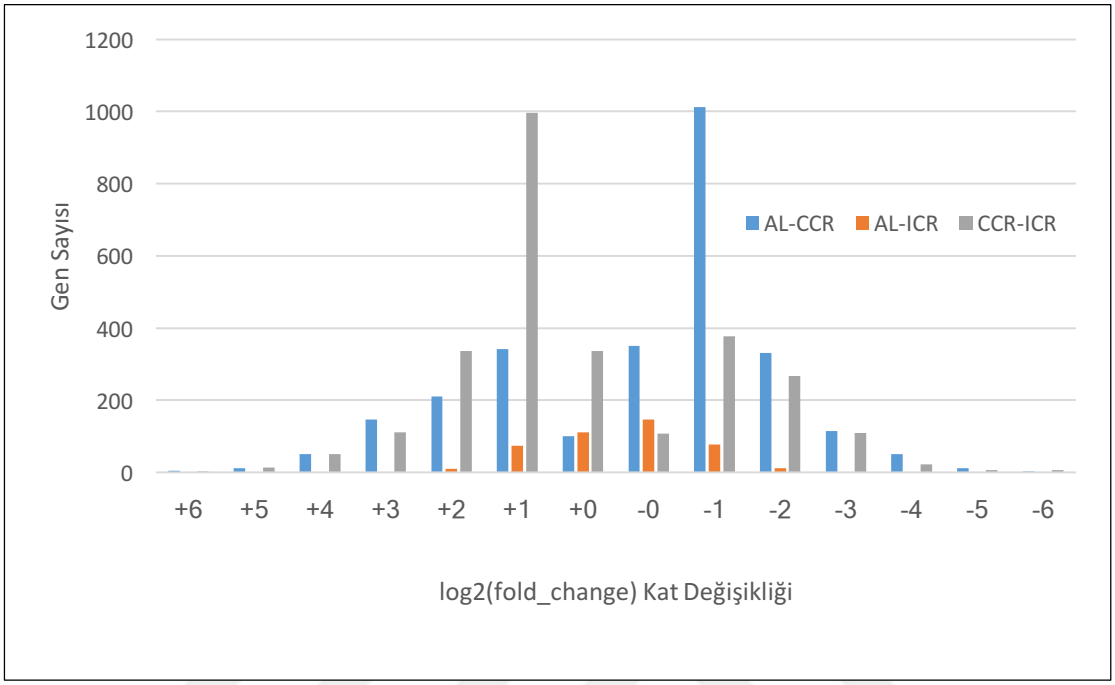
4.5 Diferansiyel Eksprese Olmuş Genler (DEGs) Analizleri

Şekil 4.8'de belirtildiği gibi Cuffdiff program sonuçlarına göre, AL-KKK arasında 2821, AL-AKK arasında 445, KKK-AKK arasında ise 2825 anlamlı diferansiyel eksprese olmuş gen (DEGs) ($p<0,05$) bulunmaktadır. Anlamlı diferansiyel eksprese olmuş genler Cuffdiff programında, Ficher's Exact Test ve False Discovery Rate (FDR) düzeltmesi yapılarak, kat değişimi 1.0'dan büyük (Fold change (FC)>1) p değeri ise 0.05'ten küçük (P-değeri <0.05) olarak filtrelenmiştir.

Excel ile yapılan analizlere göre, AL-KKK, AL-AKK, KKK-AKK arasında anlamlı diferansiyel eksprese olmuş genlerin sırasıyla 916, 200 ve 1877 tane genin ekspresyonu artmıştır; 1905, 245 ve 948 tane genin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür.

AL-KKK arasında 2821, AL-AKK arasında 445, KKK-AKK arasında ise 2825 anlamlı diferansiyel eksprese olmuş genlerin Cuffdiff sonuç raporunda kat değişimi (fold change (FC)) log2 olarak hesaplanmıştır. Kat değişimi hesaplamasından iki veri arasında

gen ekspresyonunun ne kadar arttığı ya da azaldığı anlaşılmaktadır. Şekil 4.9'da kat değişimine göre AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK verilerindeki gen sayısı verilmiştir.



Şekil 4.9 log2 kat değişikliğine (log2 Fold change) göre AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AK verilerindeki anlamlı olarak eksprese olmuş diferansiyel genlerin sayıları

AL verisine göre KKK'da kat değişikliği olarak 2,00-3,99 kat artış olan genlerin sayısı 341, 4,00-7,99 kat artan gen sayısı 240, 8,00-15,99 kat artan gen sayısı 146, 16,00-31,99 kat artışı olan gen sayısı 50, 32,00-63,99 kat artan gen sayısı ise 11'dir. AL-KKK arasında ekspresyonu azalan gen sayısı analiz edildiğinde, 2,00-3,99 kat azalan gen sayısı 1013, 4,00-7,99 kat azalan gen sayısı 332, 8,00-15,99 kat azalan gen sayısı 115, 16,00-31,99 kat azalan gen sayısı 50, 32,00-63,99 kat azalan gen sayısı ise 11 olduğu görülmüştür.

AL ile AKK arasındaki anlamlı olarak eksprese olmuş diferansiyel genlerin kat değişikliklerine bakıldığında, 2,00-3,99 kat artış olan genlerin sayısı 74, 4,00-7,99 kat artan gen sayısı 10, 8,00-15,99 kat artan gen sayısı 2, 16,00-31,99 kat azalan gen sayısı ise 1 tanedir. AL-AKK'da azalan gen sayıları incelendiğinde, 2,00-3,99 kat azalan gen sayısı 77, 8,00-15,99 kat azalan gen sayısı 2 ve 16,00-31,99 kat azalan gen sayısı ise 1'dir. AL-AKK'da 4,00-7,99 kat azalan gen yoktur.

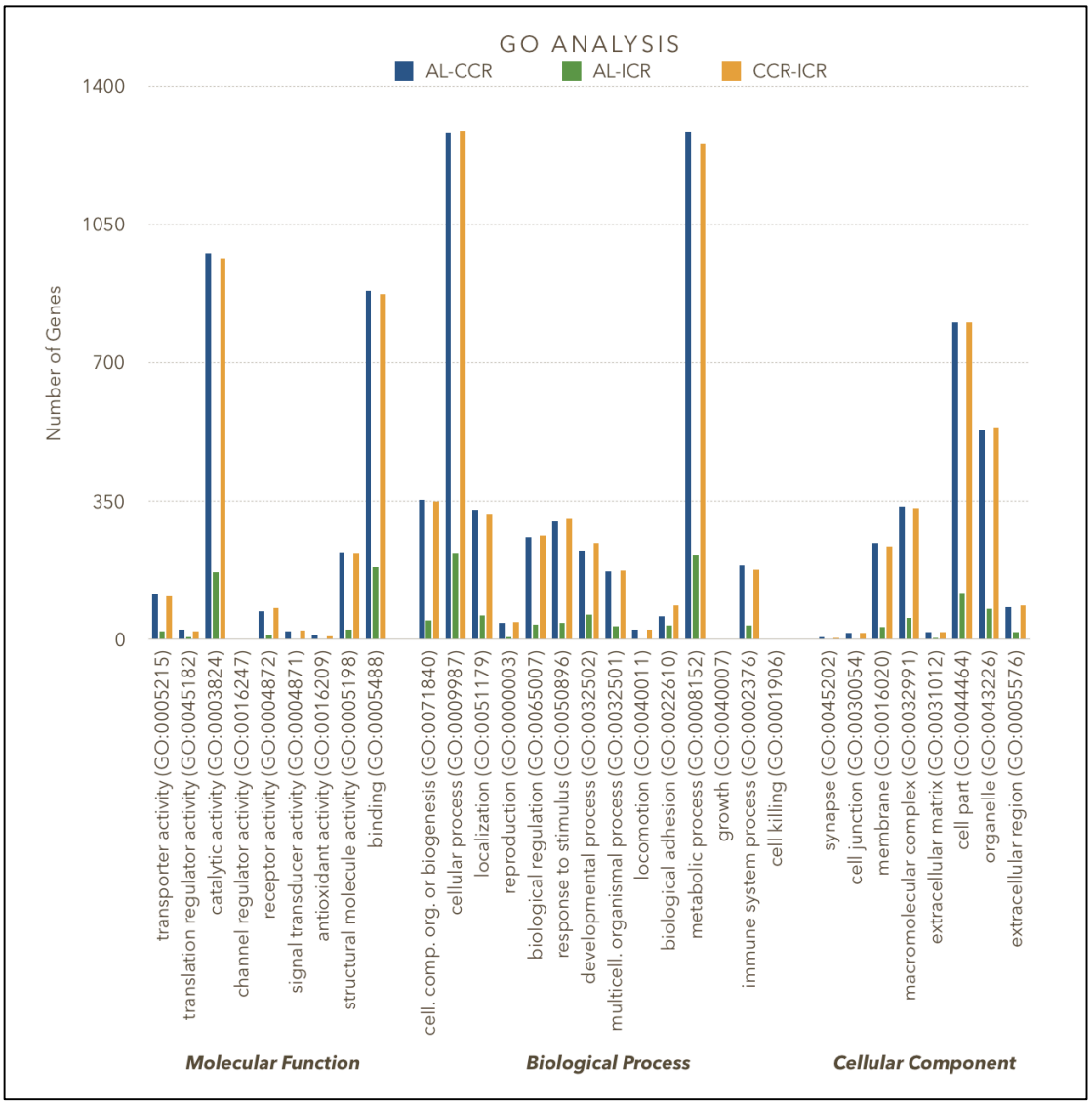
KKK verisine göre AKK'da kat değişikliği olarak 2,00-3,99 kat artış olan genlerin sayısı 997, 4,00-7,99 kat artan gen sayısı 336, 8,00-15,99 kat artan gen sayısı 112, 16,00-31,99 kat artışı olan gen sayısı 50, 32,00-63,99 kat artan gen sayısı 14'dir. AL-KKK arasında ekspresyonu azalan gen sayısı analiz edildiğinde, 2,00-3,99 kat azalan gen sayısı 378, 4,00-7,99 kat azalan gen sayısı 267, 8,00-15,99 kat azalan gen sayısı 110, 16,00-31,99 kat azalan gen sayısı 22, 32,00-63,99 kat azalan gen sayısı ise 7 olduğu görülmüştür.

4.6 Gen Ontoloji (GO) Analizleri

Cuffdiff programı sonuçlarına göre AL-KKK arasında 2821, AL-AKK arasında 445 KKK-AKK arasında ise 2825 anlamlı farklı eksprese olmuş genlerin ($p<0,05$) gen ontoloji analizleri Gen Ontoloji (GO) veritabanında Panther GO-Slim ile yapılmıştır.

Zenginleştirilmiş GO analizleri, üç ana kategori olan "Moleküler Fonksiyon", "Biyolojik Proses" ve "Hücresel Bileşen" kategorilerine göre AL-KKK arasında 2821, AL-AKK arasında 445 KKK-AKK arasında ise 2825 anlamlı farklı eksprese olmuş genlerin sınıflandırılmasıyla yapılmıştır.

Şekil 4.10'da AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında anlamlı farklı eksprese olmuş genlerin Moleküler Fonksiyon, Biyolojik Proses ve Hücresel Bileşenler kategorilerindeki zenginleştirilmiş GO terimlerine olan dağılımı terim başı düşen gen sayısına göre şekillendirilmiştir.



Şekil 4.10 AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK'da diferansiyel eksprese olmuş genlerin GO kategorilerine göre sınıflandırılması ve sayısı

GO analizlerine göre, AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında anlamlı farklı eksprese olmuş genler moleküler fonksiyon ana kategorisinde; taşıyıcı aktivite (GO:0005215), translasyon regülatör aktivite (GO:0045182), katalitik aktivite (GO:0003824), kanal regülatör aktivite (GO:0016247), reseptör aktivite (GO:0004872), sinyal dönüştürücü aktivite (GO:0004871), antioksidan aktivite (GO:0016209), yapısal molekül aktivite (GO:0005198), bağlanma (GO:0005488) zenginleştirilmiş gen ontoloji kategorilerinde haritalanmıştır. Bu genler biyolojik proses ana kategorisinde; hücresel komponent organizasyonu veya biyogenesis (GO:0071840), hücresel proses (GO: 0009987), lokalizasyon (GO:0051179), üreme (GO:0000003), biyolojik regülasyon (GO:0065007), uyarıya cevap (GO:0050896), gelişimsel proses (GO:0032502), çok hücreli organizmal

proses (GO:0032501), taşıma (GO:0040011), biyolojik adhezyon (GO:0022610), metabolik proses (GO:0008152), büyüme (GO:0040007), immün sistem proses (GO:0002376) ve hücre ölümü (GO:0001906) zenginleştirilmiş gen ontoloji kategorilerinde haritalanmıştır. Bu genler hücresel bileşenler ana kategorisinde ise; sinaps (GO:0045202), hücre bağlantısı (GO: 0030054), membran (GO:0016020), makromoleküler kompleks (GO:0032991), hücre dışı matriks (GO:0031012) ve hücre bölümü (GO:0044464), organel (GO:0043226) ve hücre dışı bölge (GO:0005576) zenginleştirilmiş gen ontoloji kategorilerinde haritalanmıştır.

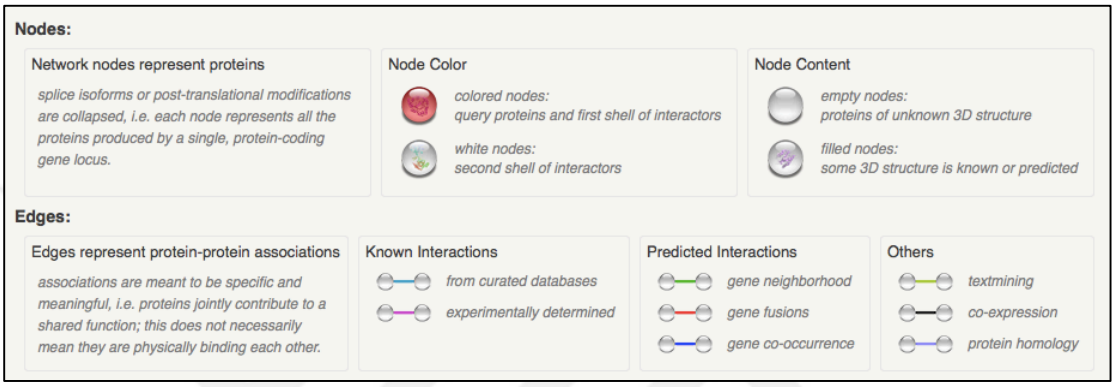
Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, bu sonuçlar AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında anlamlı farklı eksprese olmuş genlerin moleküler fonksiyon kategorisinde en çok dağılımın görüldüğü iki GO terimi katalitik aktivite (GO: 0003824) ve bağlanma (GO: 0005488)'dır. Bu GO terimlerinde; AL ve KKK arasında anlamlı farklı eksprese olmuş gen sayısı 978 (%34,6) ve 882 (%31,2), AL ve AKK arasında anlamlı farklı eksprese olmuş gen sayısı 170 (%38) ve 183 (%41,1), KKK ve AKK arasında anlamlı farklı eksprese olmuş gen sayısı 966 (%34,1) ve 875 (%34)'dür. Biyolojik proses kategorisinde en çok dağılımın olduğu iki GO terimi hücresel süreç (GO: 0009987) ve metabolik süreç (GO: 0008152)'tir. Hücresel süreçte AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında sırasıyla 1283 (45,4%), 216 (48,5%) ve 1288 (45,5%) gen, metabolik proseste ise, 1285 (45,5%), 212 (47,6%) ve 1255 (44,4%) gen bulunmaktadır. Hücresel bileşen ana kategorisinde ise AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında sırasıyla 802, 119 ve 802 gen hücre bölümü (GO:0044464), 531, 78 ve 537 gen ise organel (GO:0043226) GO teriminde bulunmaktadır.

4.7 Diferansiyel Eksprese Olmuş Genler (DEGs)'in Kat Değişikliğine göre Gen Ağ, GO ve KEGG Yolak Analizleri

AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasındaki belirli kat değişimindeki anlamlı diferansiyel genlerin gen ağ (gene network), GO ve KEGG yolak analizleri String veritabanında yapılmıştır.

Ağ analizinde nokta ve kenar renklendirmeleri String veritabanında otomatik olarak yapılmaktadır. Veritabanının renklendirmeleri yaparken kullandığı kriterler Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Buna göre noktalara sunulan veritabanına yüklenen

proteinleri/genleri, kenarlar ise protein-protein birleşmelerini ifade etmektedir. Noktaların renklendirilmesi belirli kategorilere göre yapılabilmektedir. İsteğe bağlı renlendirilmediğinde proteinler beyaz nokta halinde gösterilmektedir. Noktaların içi boş ise, o proteinin 3 boyutlu yapısının bilinmediğini belirtmektedir. Kenarların açık mavi ve pembe renkte olması bilinen bir protein-protein etkileşimi olduğunu göstermektedir. Yeşil, kırmızı ve koyu mavi olması ise, tahmin edilen bir etkileşim olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 4.11 String veritabanında nokta (node) ve kenarların (edges) renklendirilmeleri ve biçimlerine göre anlamlandırılması

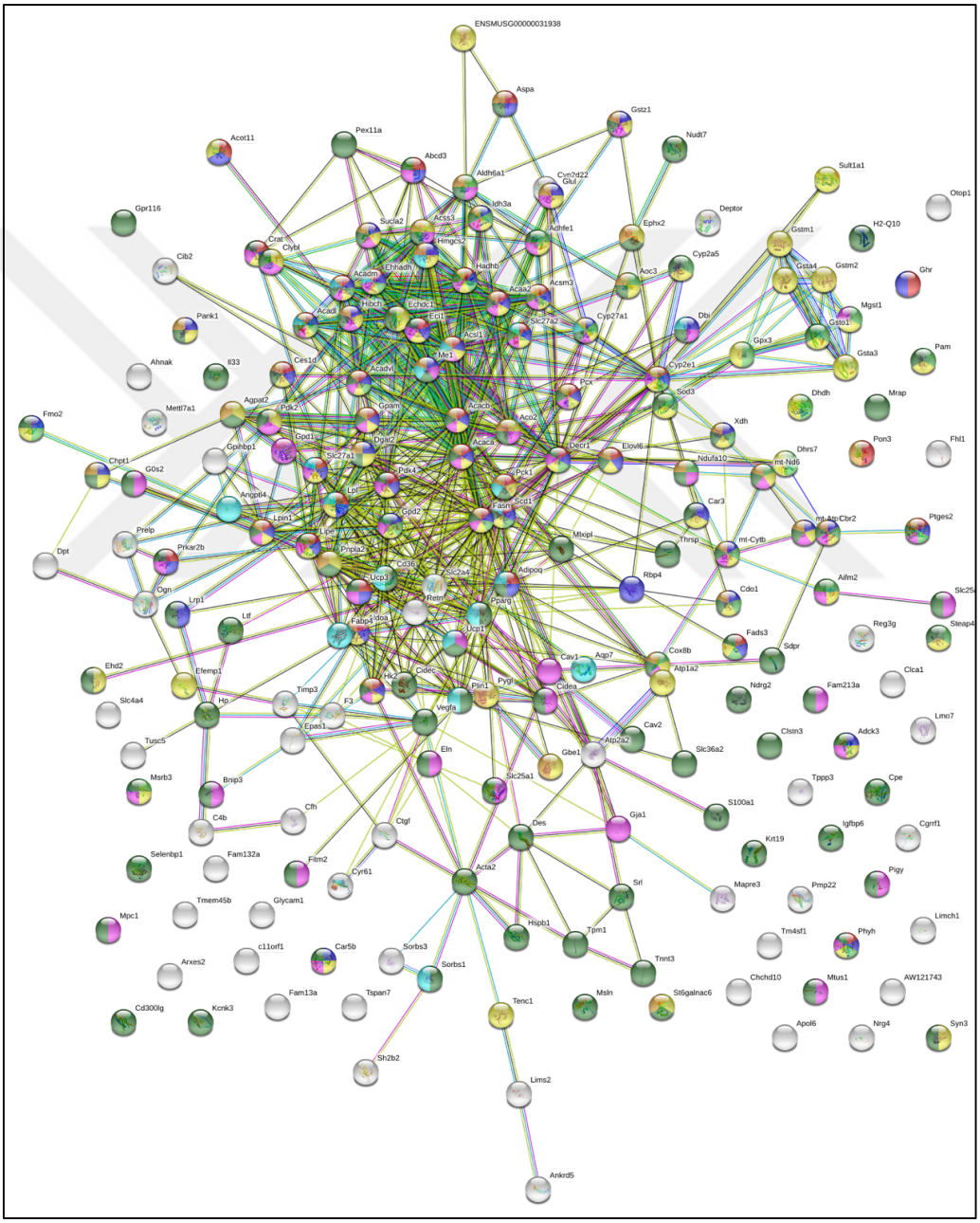
Ayrıca 9 farklı renkte kullanıcı verisine göre ağ üzerinde renklendirme yapabilmektedir. Bizim sonuçlarımızda GO üç ana kategoriden ve KEGG yolak sonuçlarında ilk ikisi renklendirilmiştir. Kırmızı ve mavi renkler GO Biyolojik proses kategorisinde, pembe ve koyu yeşil GO hücresel bileşen kategorisinde, açık yeşil ve sarı GO moleküler fonksiyon kategorisinde, açık mavi ve açık kahverengi ise KEGG yolaklarının ilk ikisinde gösterilmiştir.

4.7.1 AL-KKK'da Anlamlı Diferansiyel Eksprese Olmuş Genlerin Artan ve Azalan Kat Değişikliğine göre Gen Ağ, GO ve KEGG Yolak Analizleri

AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan toplam 207 anlamlı diferansiyel genin String veritabanında yapılan analizleri Çizelge 4.4'de verilmiştir. Buna göre, 207 genden 203 tanesi veritabanında tanımlıdır ve birbirleri ile bağlantısını ifade eden kenar sayısı 712'dir. Şekil 4.12'de gen ağ analizi, Çizelge 4.5'te ise bu genlerin GO ve KEGG yolak analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.4 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri

Ağ Analizi İstatistikleri			
Nokta (node) sayısı:	203	Beklenen kenar sayısı:	121
Kenar (edge) sayısı:	712	PPI enrichment p-value:	< 1.0e-16
Ortalama nokta sayısı:	7.01	Ortalama bölgesel kümeleme katsayısı :	0.423



Şekil 4.12 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. (Kırmızı renk: GO:0032787, Mavi: GO:0044281, Pembe: GO:0005739, Koyu Yeşil: GO:0044444, Açık Yeşil: GO:0016491, Sarı: GO:0003824, Açık Mavi: PPAR Sinyal Yolağı, Açık Kahverengi: Metabolik Yolaklar)

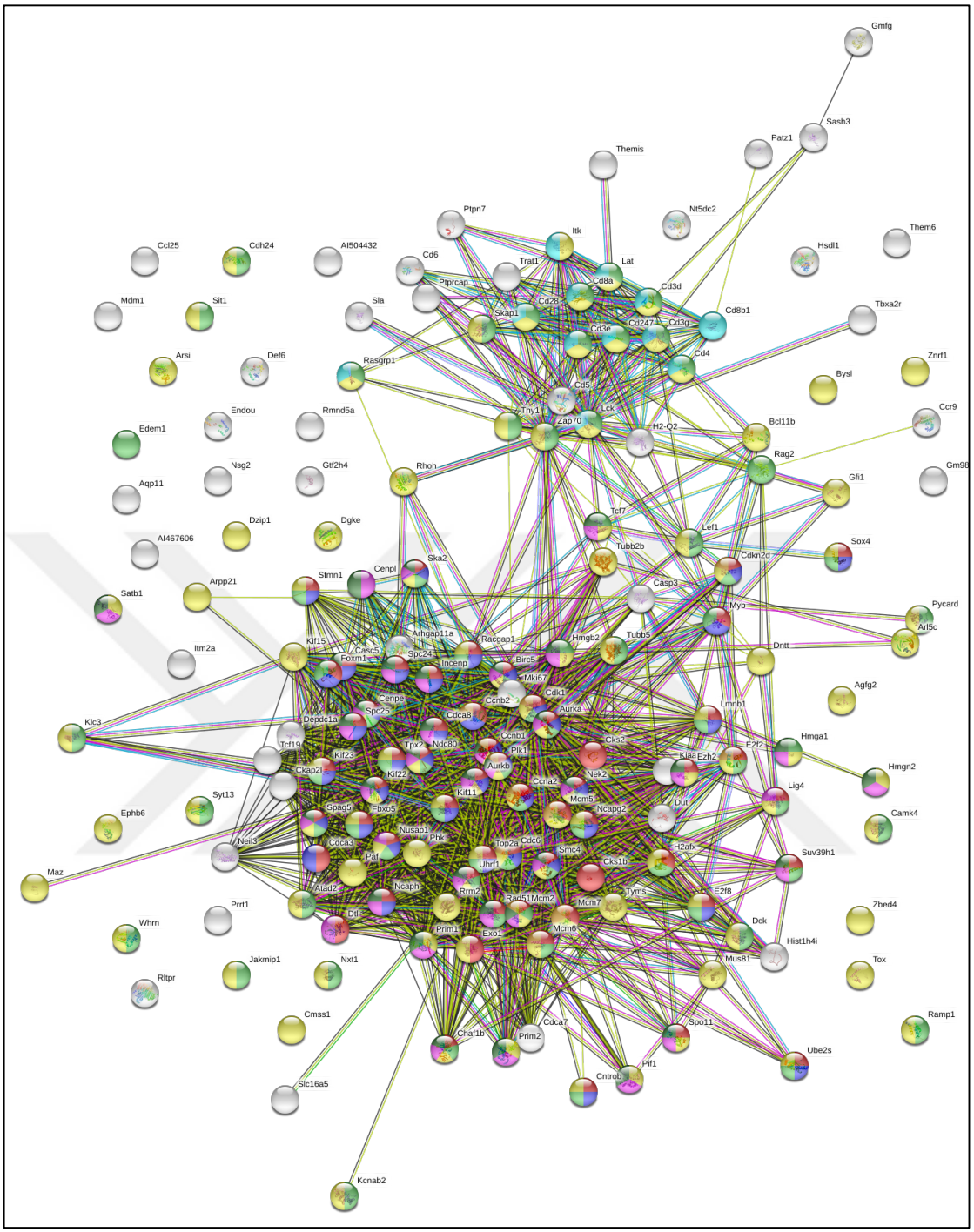
Çizelge 4.5 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları

Biological Process (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	40	5.07e-27
GO:0044281	small molecule metabolic process	62	2.54e-26
GO:0006629	lipid metabolic process	52	5.92e-26
GO:0044710	single-organism metabolic process	94	5.92e-26
GO:0006631	fatty acid metabolic process	33	1.62e-25
Cellular Component (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0005739	mitochondrion	69	1.63e-27
GO:0044444	cytoplasmic part	125	2.47e-24
GO:0005737	cytoplasm	142	9.91e-18
GO:0044421	extracellular region part	81	6.16e-17
GO:0005740	mitochondrial envelope	32	7.9e-15
Molecular Function (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0016491	oxidoreductase activity	37	3.9e-16
GO:0003824	catalytic activity	89	1.22e-10
GO:0005488	binding	121	2.58e-07
GO:1901681	sulfur compound binding	14	2.58e-07
GO:0043167	ion binding	83	4.93e-07
KEGG Pathways			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
03320	PPAR signaling pathway	22	7.17e-25
01100	Metabolic pathways	52	1.52e-19
01120	Microbial metabolism in diverse environments	18	1.23e-12
01212	Fatty acid metabolism	12	1.23e-12
00640	Propanoate metabolism	9	2.99e-10

AL-KKK arasında anlamlı olarak KKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan toplam 176 anlamlı diferansiyel genin String veritabanında yapılan analizleri Çizelge 4.6'de verilmiştir. Çizelge 4.6'ya göre, 164 tanesi gen bulunmuştur ve kenar sayısı 1970'dir. Şekil 4.13'de gen ağ analizi, Çizelge 4.7'de ise bu genlerin GO ve KEGG yolak analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.6 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri

Ağ Analizi İstatistikleri			
Nokta (node) sayısı:	164	Beklenen kenar sayısı:	272
Kenar (edge) sayısı:	1970	PPI enrichment p-value:	< 1.0e-16
Ortalama nokta sayısı:	24	Ortalama bölgesel kümeleme katsayısı :	0.61



Şekil 4.13 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. (Kırmızı renk: GO:0007049, Mavi: GO:0000278, Pembe: GO:0005694, Koyu Yeşil: GO:0044427, Açık Yeşil: GO:0005515, Sarı: GO:0005488, Açık Mavi: T hücre reseptörü sinyal yolağı, Açık Kahverengi: Hücre döngüsü)

Çizelge 4.7 AL-KKK arasında KKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları

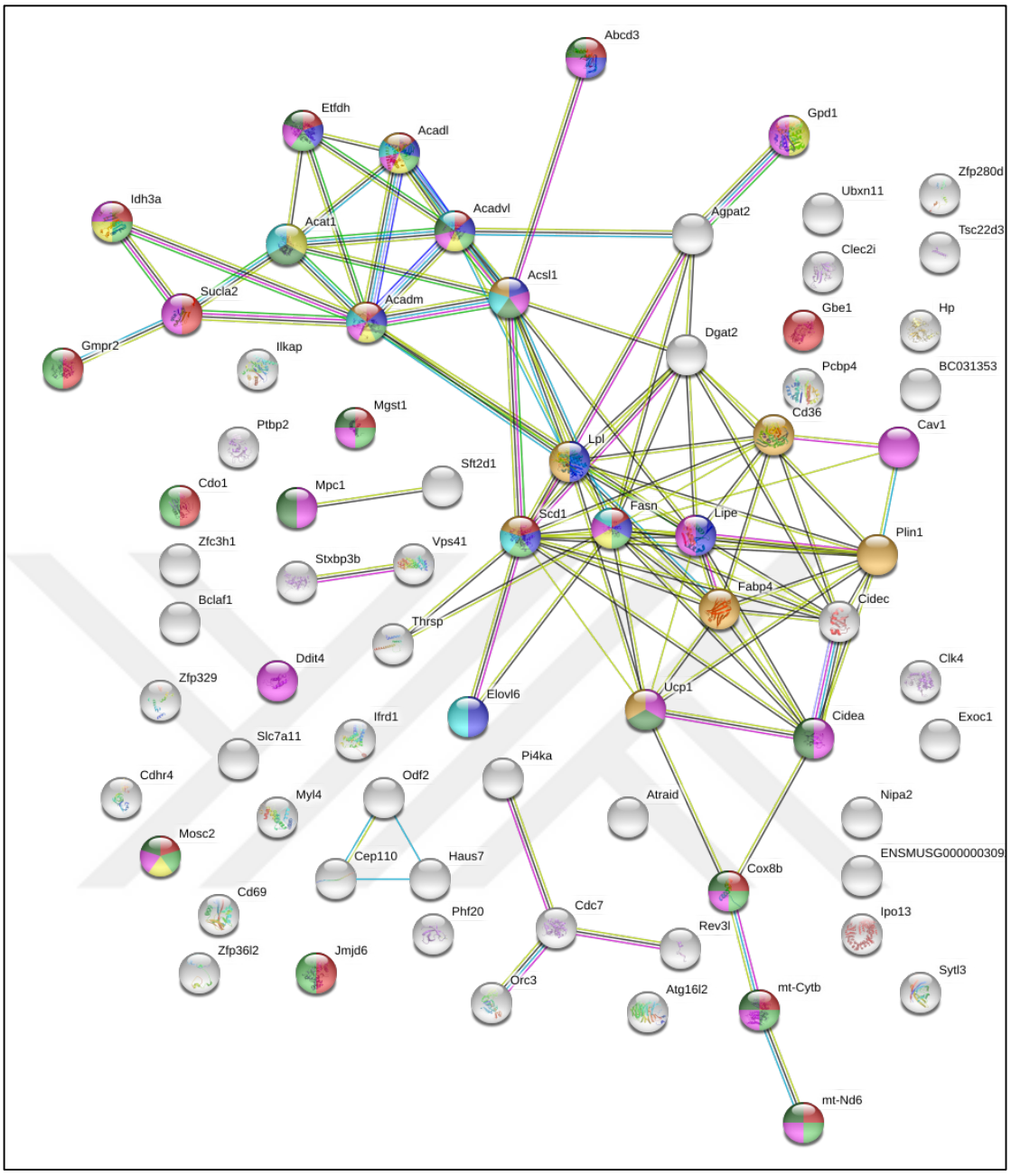
Biological Process (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0007049	cell cycle	57	2.41e-32
GO:0000278	mitotic cell cycle	40	2.19e-26
GO:1903047	mitotic cell cycle process	39	5.19e-26
GO:0022402	cell cycle process	44	1.11e-24
GO:0051301	cell division	36	1.27e-24
Cellular Component (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0005694	chromosome	37	1.62e-18
GO:0044427	chromosomal part	34	1.69e-17
GO:0000793	condensed chromosome	21	7.94e-17
GO:0098687	chromosomal region	20	3.77e-14
GO:0031981	nuclear lumen	60	1.5e-13
Molecular Function (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0005515	protein binding	72	2.79e-09
GO:0005488	binding	103	1.35e-07
GO:0019900	kinase binding	19	1.01e-06
GO:0019901	protein kinase binding	17	2.51e-06
GO:0032550	purine ribonucleoside binding	35	2.51e-06
KEGG Pathways			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
04660	T cell receptor signaling pathway	12	3.79e-09
04110	Cell cycle	12	1.15e-08
05340	Primary immunodeficiency	7	3.94e-07
03030	DNA replication	6	1.01e-05
04640	Hematopoietic cell lineage	8	1.01e-05

4.7.2 AL-AKK'da Anlamlı Diferansiyel Eksprese Olmuş Genlerin Artan ve Azalan Kat Değişikliğine göre Gen Ağ, GO ve KEGG Yolak Analizleri

AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat artan toplam 87 anlamlı diferansiyel genin Gen Ağ, GO ve KEGG yolak analizleri String veritabanında yapılmıştır. Buna sonuçlara göre, 73 gen ve 98 tane genlerin birbirleri ile bağlantısını ifade eden kenar sayısı bulunmuştur (Çizelge 4.8). Şekil 4.14'de gen ağ analizi, Çizelge 4.9'da ise bu genlerin GO ve KEGG yolak analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.8 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri

Ağ Analizi İstatistikleri			
Nokta (node) sayısı:	73	Beklenen kenar sayısı:	13
Kenar (edge) sayısı:	98	PPI enrichment p-value:	< 1.0e-16
Ortalama nokta sayısı:	2.68	Ortalama bölgesel kümeleme katsayısı :	0.411



Şekil 4.14 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. (Kırmızı renk: GO:0055114, Mavi: GO:0006631, Pembe: GO:0005739, Koyu Yeşil: GO:0005740, Açık Yeşil: GO:0016491, Sarı: GO:0050662, Açık Mavi: Yağ asidi metabolizma yolağı, Açık Kahverengi: PPAR sinyal yolağı)

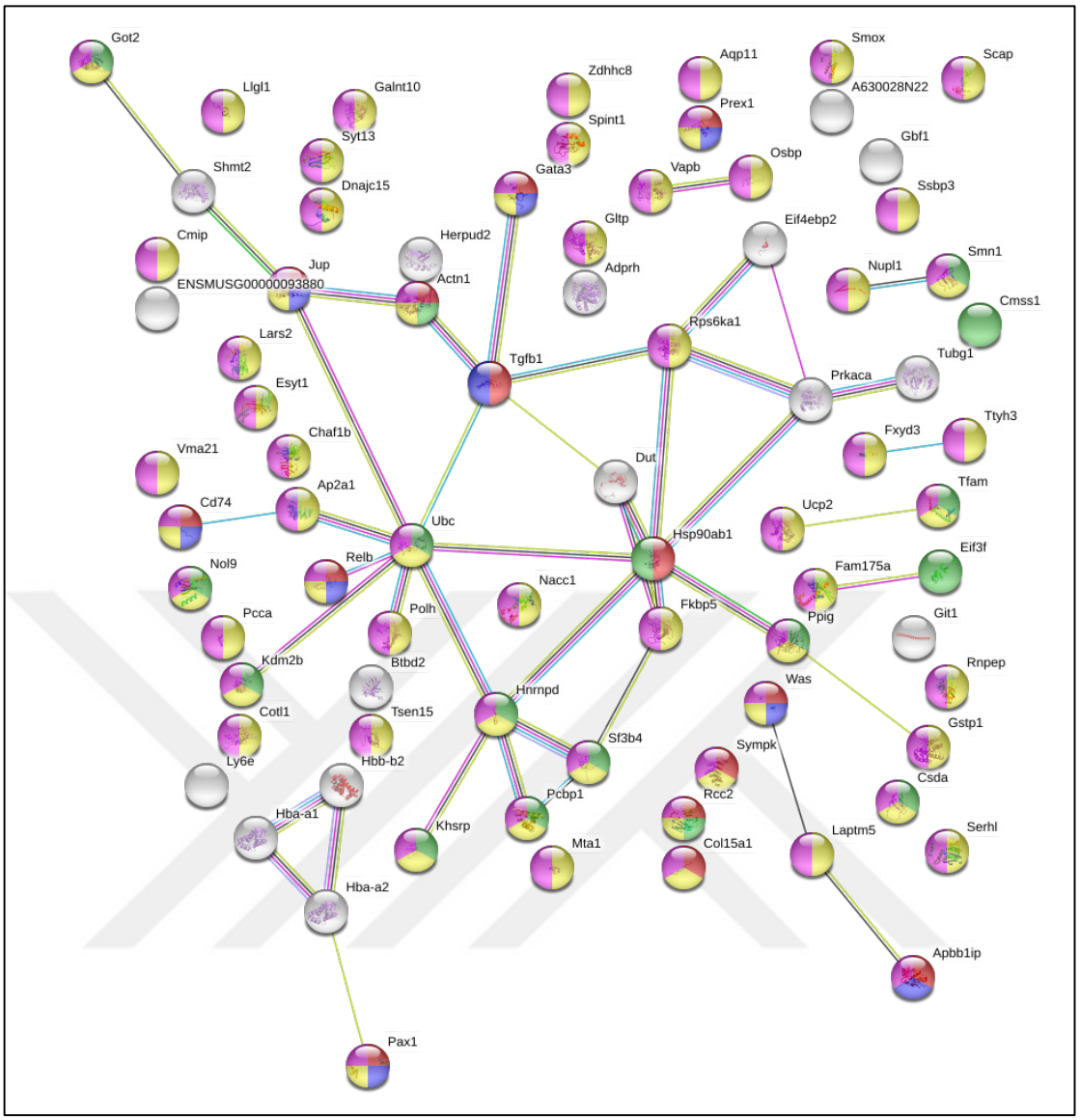
Çizelge 4.9 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları

Biological Process (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0055114	oxidation-reduction process	18	6.79e-07
GO:0006631	fatty acid metabolic process	11	3.12e-06
GO:0006629	lipid metabolic process	17	3.35e-06
GO:0033539	fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase	4	5.02e-06
GO:0043436	oxoacid metabolic process	15	1.03e-05
Cellular Component (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0005739	mitochondrion	21	6.8e-06
GO:0005740	mitochondrial envelope	13	6.8e-06
GO:0005811	lipid particle	6	6.8e-06
GO:0043229	intracellular organelle	54	6.8e-06
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	51	1.04e-05
Molecular Function (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0016491	oxidoreductase activity	15	5.96e-06
GO:0050662	coenzyme binding	8	0.000153
GO:0048037	cofactor binding	8	0.00175
GO:0003995	acyl-CoA dehydrogenase activity	3	0.0144
GO:0005488	binding	45	0.0176
KEGG Pathways			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
01212	Fatty acid metabolism	8	5.33e-10
03320	PPAR signaling pathway	9	5.33e-10
01100	Metabolic pathways	18	3.69e-06
00071	Fatty acid degradation	5	2.36e-05
00640	Propanoate metabolism	3	0.00767

AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat azalan toplam 80 anlamlı diferansiyel genin gen ağ, GO ve KEGG yolak analizleri String veritabanında yapılmıştır. Analizlere göre, 80 gen ve 44 tane genlerin birbirleri ile bağlantısını ifade eden kenar sayısı bulunmuştur (Çizelge 4.10). AL-AKK'da 4,00-7,99 kat azalan gen yoktur. Şekil 4.15'de gen ağ analizi, Çizelge 4.11'de ise bu genlerin GO ve KEGG yolak analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.10 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri

Ağ Analizi İstatistikleri			
Nokta (node) sayısı:	80	Beklenen kenar sayısı:	42
Kenar (edge) sayısı:	44	PPI enrichment p-value:	0.404
Ortalama nokta sayısı:	1.1	Ortalama bölgesel kümeleme katsayısı :	0.355



Şekil 4.15 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. (Kırmızı renk: GO:0022610, Mavi: GO:0034109, Pembe: GO:0043226, Açık Yeşil: GO:0003723, Sarı: GO:0043227)

Çizelge 4.11 AL-AKK arasında AKK'da 2,00 ile 31,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorilerindeki sayıları

Biological Process (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0022610	biological adhesion	14	0.00232
GO:0034109	homotypic cell-cell adhesion	9	0.00232
GO:0042110	T cell activation	8	0.00232
GO:0046649	lymphocyte activation	9	0.00336
GO:0065003	macromolecular complex assembly	14	0.00482
Molecular Function (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0003723	RNA binding	17	0.0173
Cellular Component (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0043227	membrane-bounded organelle	59	1.72e-05
GO:0043226	organelle	60	3.62e-05
GO:0044422	organelle part	45	4.51e-05
GO:0044446	intracellular organelle part	44	4.67e-05
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	53	8.79e-05

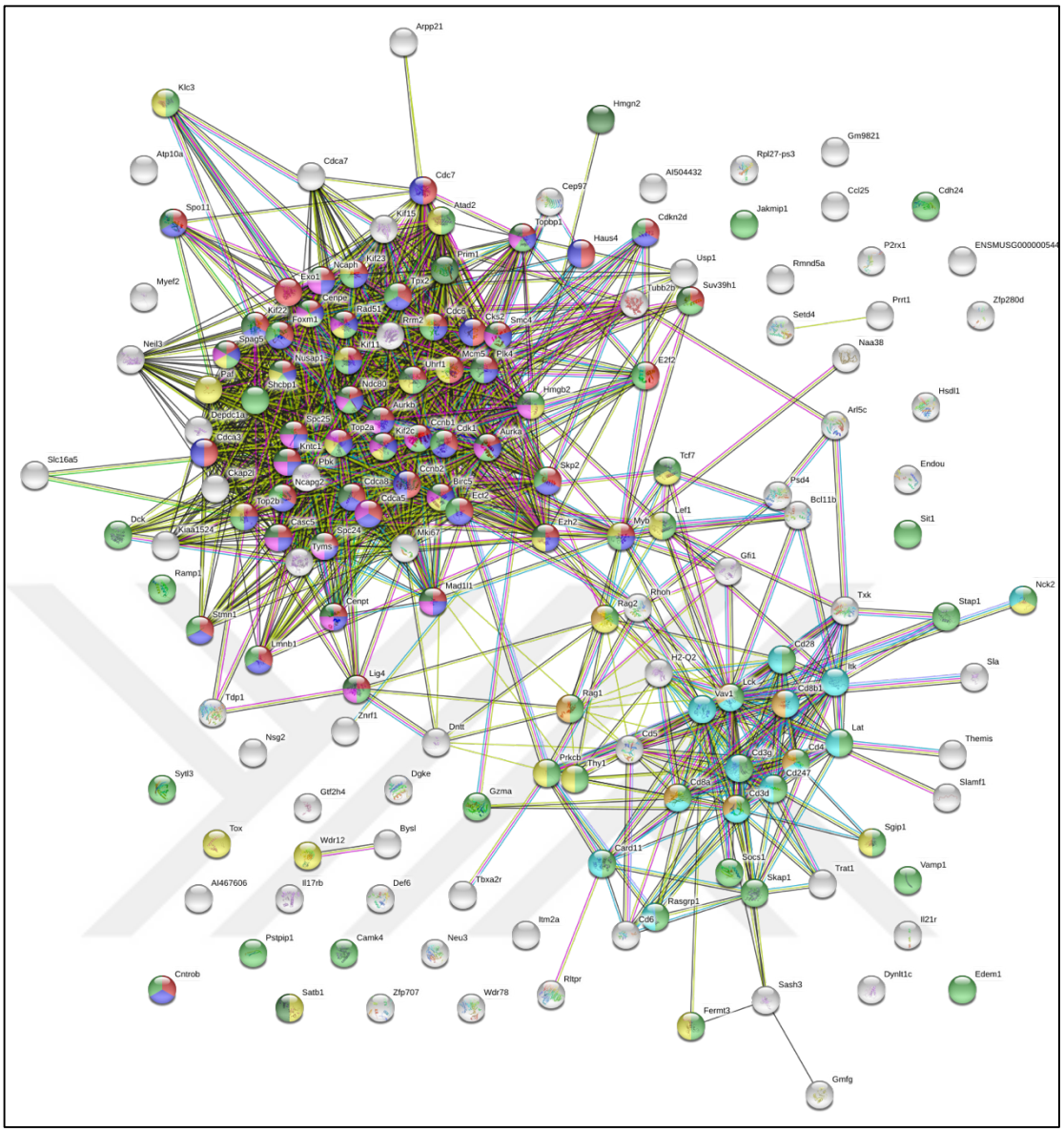
AL-AKK arasında AKK'da azalan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında herhangi bir KEGG yolağında gen içermediği görülmüştür.

4.7.3 KKK-AKK'da Anlamlı Diferansiyel Eksprese Olmuş Genlerin Artan ve Azalan Kat Değişikliğine göre Gen Ağ, GO ve KEGG Yolak Analizleri

KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan toplam 176 anlamlı diferansiyel genin String veritabanında yapılan ağ analizi istatistiksel sonucu 161 gen ve 1588 kenar sayısı görülmüştür (Çizelge 4.12). Şekil 4.16'da gen ağ analizi, Çizelge 4.13'de ise bu genlerin GO ve KEGG yolak analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.12 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri

Ağ Analizi İstatistikleri			
Nokta (node) sayısı:	161	Beklenen kenar sayısı:	257
Kenar (edge) sayısı:	1588	PPI enrichment p-value:	< 1.0e-16
Ortalama nokta sayısı:	19.7	Ortalama bölgesel kümeleme katsayısı :	0.605



Şekil 4.16 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. (Kırmızı renk: GO:0007049, Mavi: GO:00022402, Pembe: GO:0000793, Koyu Yeşil: GO:0005694, Açık Yeşil: GO:0005515, Sarı: GO:004877, Açık Mavi: T hücre reseptörü sinyal yolağı, Açık Kahverengi: Primer immünodefens)

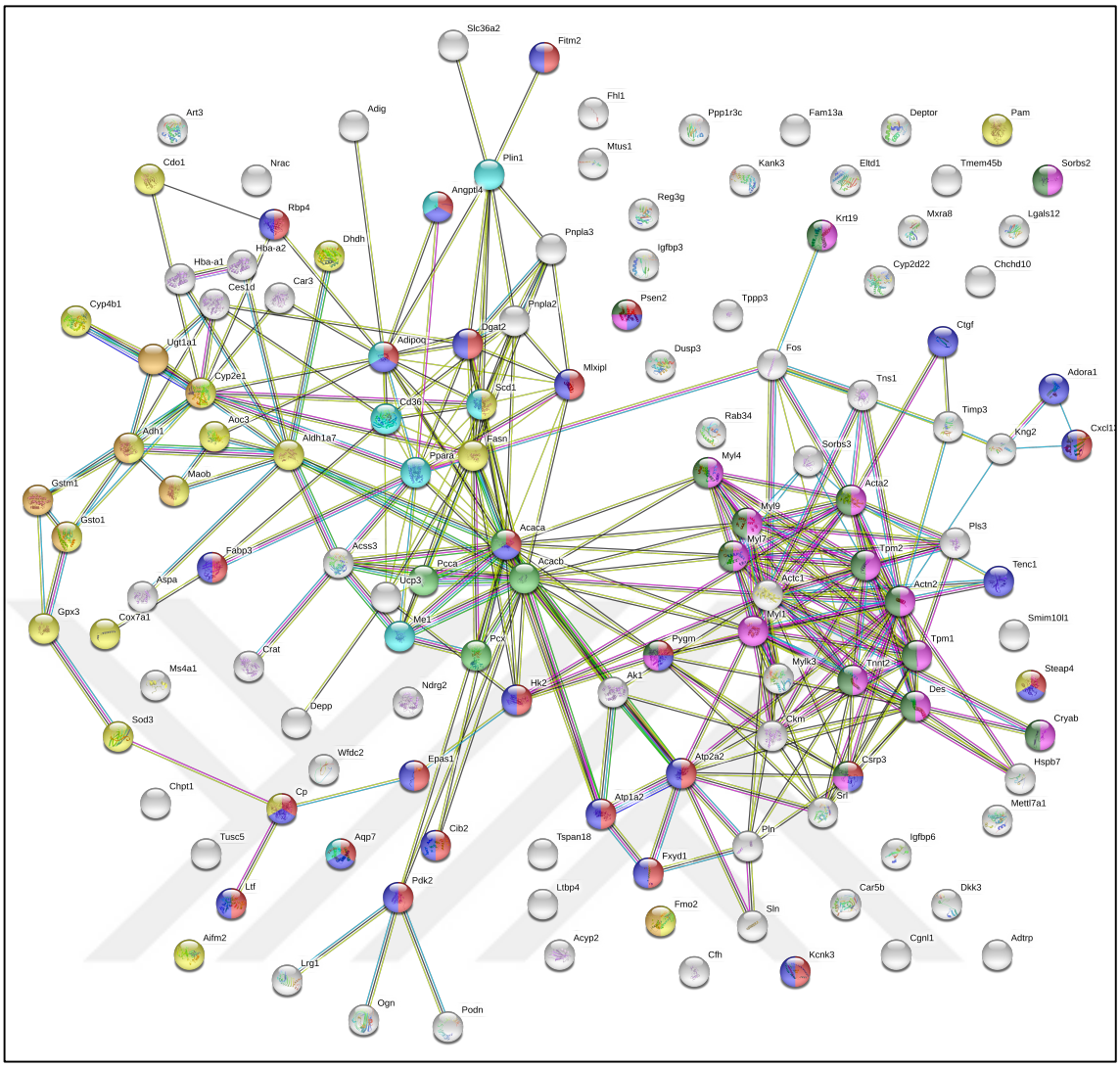
Çizelge 4.13 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat artan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları

Biological Process (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0007049	cell cycle	52	1.97e-27
GO:0022402	cell cycle process	46	6.08e-27
GO:1903047	mitotic cell cycle process	38	3.81e-25
GO:0000278	mitotic cell cycle	38	1.18e-24
GO:0000280	nuclear division	35	2.15e-24
Cellular Component (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0000793	condensed chromosome	22	7.26e-18
GO:0005694	chromosome	32	2.51e-14
GO:0015630	microtubule cytoskeleton	35	1.74e-13
GO:0005819	spindle	20	6.29e-13
GO:0044427	chromosomal part	28	1.87e-12
Molecular Function (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0005515	protein binding	69	3.28e-08
GO:0044877	macromolecular complex binding	30	2.18e-07
GO:0019900	kinase binding	19	7.33e-07
GO:0005488	binding	99	8.56e-07
GO:0019901	protein kinase binding	17	3.68e-06
KEGG Pathways			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
04660	T cell receptor signaling pathway	14	6.1e-12
05340	Primary immunodeficiency	7	5.2e-07
04110	Cell cycle	10	1.5e-06
04640	Hematopoietic cell lineage	7	0.000138
04068	FoxO signaling pathway	7	0.00267

KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan toplam 139 anlamlı diferansiyel genin String veritabanında yapılan ağ analizi istatistiksel sonucu 131 gen ve 298 kenar sayısı görülmüştür (Çizelge 4.14). Şekil 4.17'de gen ağ analizi, Çizelge 4.15'de ise bu genlerin GO ve KEGG yolak analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.14 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri

Ağ Analizi İstatistikleri			
Nokta (node) sayısı:	131	Beklenen kenar sayısı:	78
Kenar (edge) sayısı:	298	PPI enrichment p-value:	< 1.0e-16
Ortalama nokta sayısı:	4.55	Ortalama bölgesel kümeleme katsayısı :	0.441



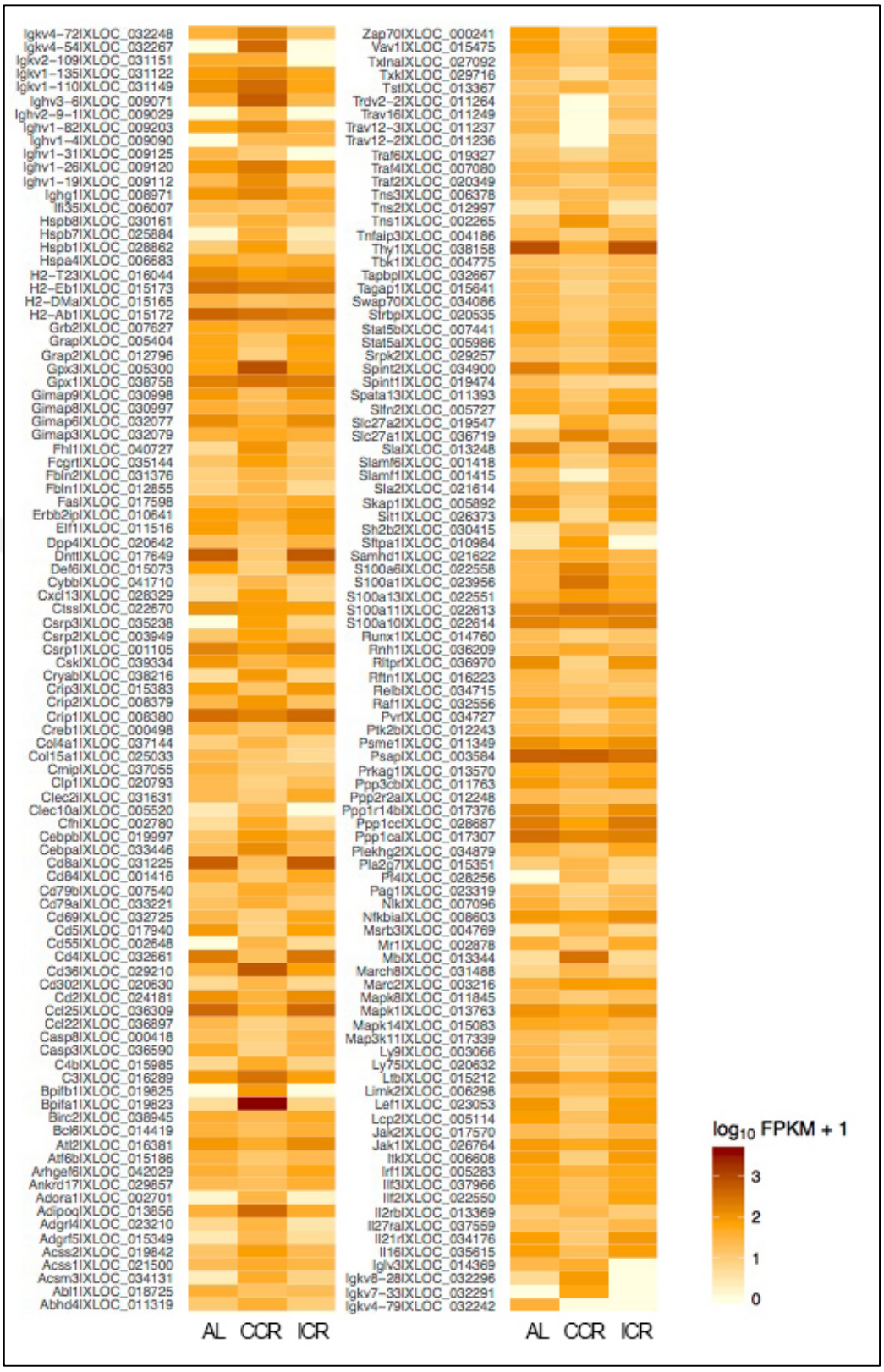
Şekil 4.17 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin ağ analizi. (Kırmızı renk: GO:0048878, Mavi: GO:0042592, Pembe: GO:0043292, Koyu Yeşil: GO:0044449, Açık Yeşil: GO:0004075, Sarı: GO:0016491, Açık Mavi: PPAR sinyal yolağı, Açık Kahverengi: İlaç metabolizması)

Çizelge 4.15 KKK-AKK arasında AKK'da 8,00 ile 63,99 kat azalan anlamlı diferansiyel genlerin FDR değerlerine göre GO Biyolojik Proses, Hücresel Bileşen ve Moleküler Fonksiyon kategorileri ve KEGG yolak analizlerindeki sayıları

Biological Process (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0048878	chemical homeostasis	24	3.61e-08
GO:0042592	homeostatic process	27	1.04e-06
GO:0044710	single-organism metabolic process	46	2.15e-06
GO:0050801	ion homeostasis	17	2.95e-06
GO:0055114	oxidation-reduction process	22	2.95e-06
Cellular Component (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0043292	contractile fiber	16	1.64e-11
GO:0044449	contractile fiber part	15	2.48e-11
GO:0030016	myofibril	15	5.2e-11
GO:0030017	sarcomere	14	9.58e-11
GO:0044444	cytoplasmic part	73	9.58e-11
Molecular Function (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0004075	biotin carboxylase activity	4	1.07e-05
GO:0016491	oxidoreductase activity	19	1.07e-05
GO:0016885	ligase activity, forming carbon-carbon bonds	4	4.97e-05
GO:0043167	ion binding	56	5.91e-05
GO:0005515	protein binding	49	0.001
KEGG Pathways			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
03320	PPAR signaling pathway	8	4.76e-06
00982	Drug metabolism - cytochrome P450	7	1.07e-05
01100	Metabolic pathways	24	1.07e-05
04260	Cardiac muscle contraction	7	1.86e-05
00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	6	9.78e-05

4.8 İmmün Sistem İlişkili Genlerinin Belirlenmesi , KEGG Yolak ve Gen Ağ Analizi

GO sonuçlarına göre AL-KKK arasında 2821, AL-AKK arasında 445 KKK-AKK arasında 2825 anlamlı farklı eksprese olmuş genlerden sırasıyla 188, 36 ve 176'sı immün sistem proses (GO:0002376) fonksiyonel zenginleştirme kategorisinde olduğu belirlenmiştir. GO:0002376 kategorisinde bulunan genlerin isimlerine Panther GO-Slim sonuç raporundan ulaşılıp listelenmiştir. Bu genlerin RNA-seq verilerinde ekspresyon seviyelerine bakıldı ve CummeRbund ile heatmap grafiği olarak görüntülenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 AL, KKK ve AKK'da anlamlı eksprese olmuş genlerin "İmmün Sistem Proses" (GO:0002376) GO teriminin içerdiği genlerin gen ekspresyon düzeylerinin heatmap grafiği ile gösterimi

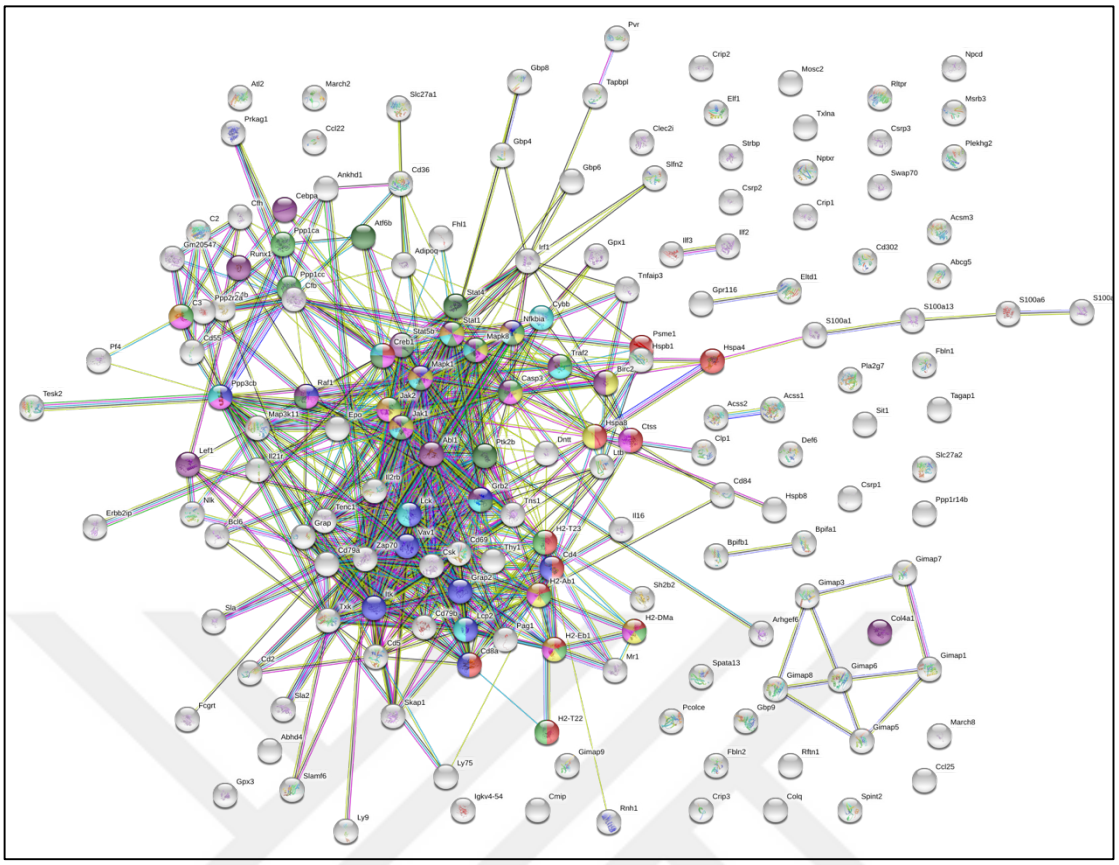
Bu grafikte gen ekspresyon düzeyleri logaritmik olarak FPKM düzeyinde renk tonlarına göre verilmektedir. İmmün sistemle ilişkili genlerin RNA-seq verilerindeki ekspresyon seviye farklılıkları da $\log_{10}$ FPKM değeri ile verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında AL ve KKK arasında gen ekspresyon seviye farklılılarının oldukça belirgin düzeyde olduğu görülmektedir. Aynı şekide KKK ve AKK arasındaki ekspresyon farkı da belirgindir. Ancak AL ve AKK arasında bu farkın önemli ölçüde az olduğu görülmektedir. Excel programı ile analiz yapıldığında AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında sırasıyla bu genlerin 67, 17 ve 92'sinin ekspresyonu artmış, 121, 84 ve 19'unun ise ekspresyonu azalmıştır.

AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında immün sistemle ilişkili anlamlı diferansiyel eksprese olmuş genlerin KEGG yolak ve gen ağ analizleri String veritabanında yapılmıştır. FDR değeri ile filtrelenmiştir.

AL-KKK arasında bulunan immün sistem ilişkili genlerden 166 tanesi String veritabanında ağ olarak görüntülenmiş ve KEGG yolak analizine göre gen ağı renklendirilmiştir (Çizelge 4.16, Şekil 4.19, Çizelge 4.17).

Çizelge 4.16 AL-KKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri

Ağ Analizi İstatistikleri			
Nokta (node) sayısı:	166	Beklenen kenar sayısı:	150
Kenar (edge) sayısı:	593	PPI enrichment p-value:	< 1.0e-16
Ortalama nokta sayısı:	7.14	Ortalama bölgesel kümeleme katsayısı :	0.444



Şekil 4.19 AL-KKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin analizi sonucu (KEGG yolak analiz sonuçlarına göre renklendirilmiştir.)

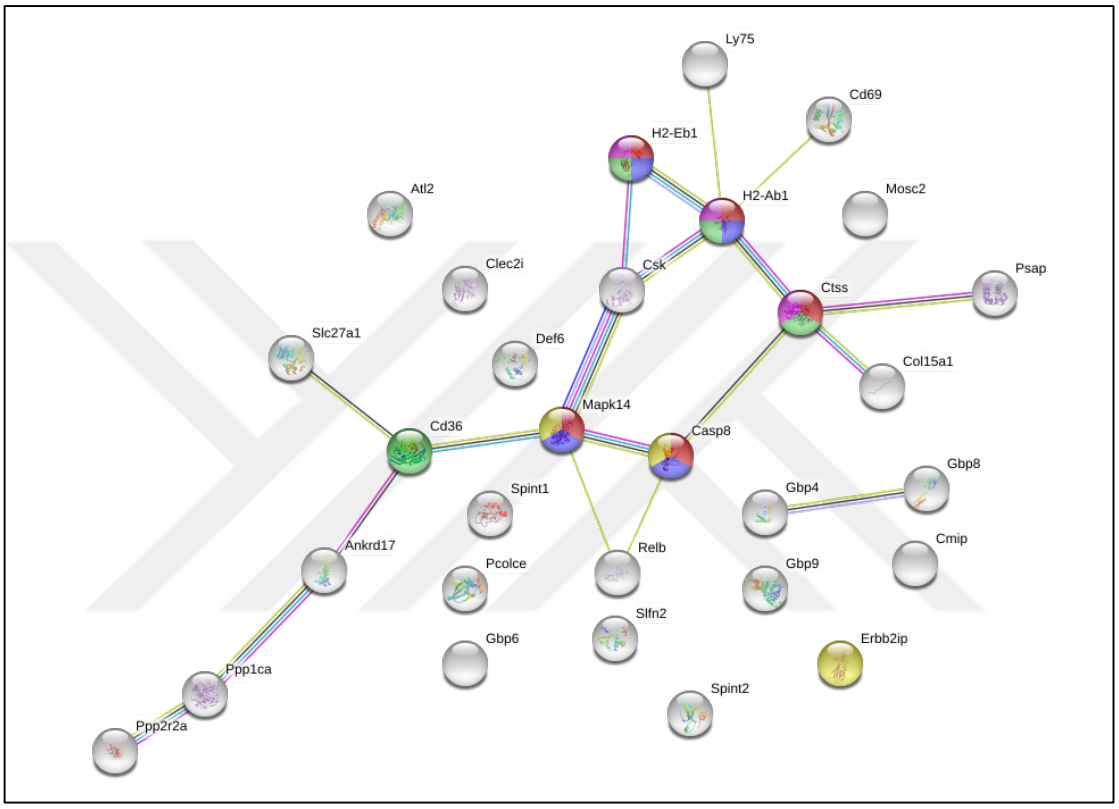
Çizelge 4.17 AL-KKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin KEGG yolak analizi sonuçları

KEGG Pathways			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
04612	Antigen processing and presentation	12	4.75e-11
04660	T cell receptor signaling pathway	12	1.59e-09
05168	Herpes simplex infection	15	1.59e-09
05145	Toxoplasmosis	12	2.12e-09
05152	Tuberculosis	14	2.12e-09
05161	Hepatitis B	13	2.16e-09
04380	Osteoclast differentiation	12	4.18e-09
05140	Leishmaniasis	9	3.37e-08
05200	Pathways in cancer	16	5.77e-08

AL-AKK arasında bulunan immün sistem ilişkili genlerin 30 tanesi String veritabanında ağ olarak görüntülenmiş ve KEGG yolak analizine göre gen ağı renklendirilmiştir (Çizelge 4.18, Şekil 4.20, Çizelge 4.19).

Çizelge 4.18 AL-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri

Ağ Analizi İstatistikleri			
Nokta (node) sayısı:	30	Beklenen kenar sayısı:	4
Kenar (edge) sayısı:	19	PPI enrichment p-value:	2.32e-07
Ortalama nokta sayısı:	1.27	Ortalama bölgesel kümeleme katsayısı :	0.364



Şekil 4.20 AL-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin analizi sonucu (KEGG yolak analiz sonuçlarına göre renklendirilmiştir.)

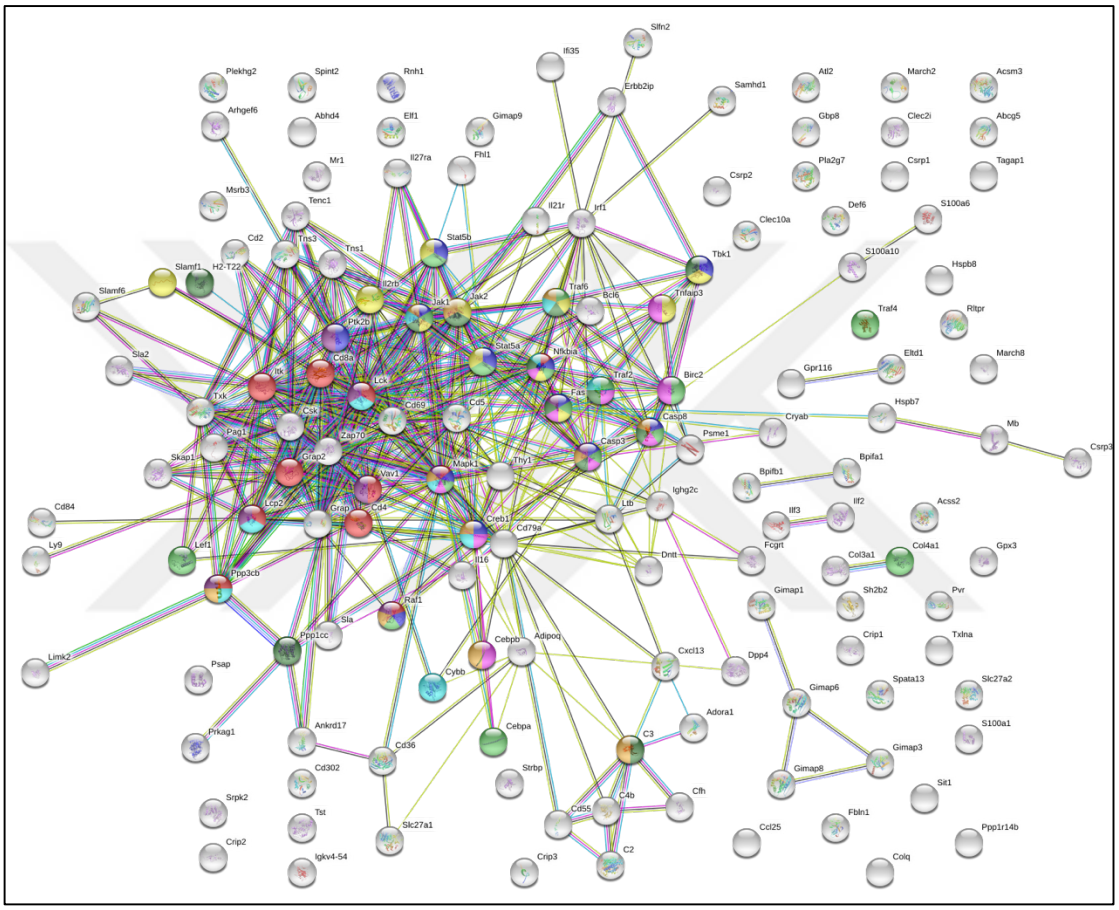
Çizelge 4.19 AL-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin KEGG yolak analizi sonuçları

KEGG Pathways			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
05152	Tuberculosis	5	0.000778
05145	Toxoplasmosis	4	0.00199
04145	Phagosome	4	0.00414
04621	NOD-like receptor signaling pathway	3	0.00414
04612	Antigen processing and presentation	3	0.00442

KKK-AKK arasında bulunan immün sistem ilişkili genlerden 146 tanesi String veritabanında ağ olarak görüntülenmiş ve KEGG yolak analizine göre gen ağı renklendirilmiştir (Çizelge 4.20, Şekil 4.21, Çizelge 4.21).

Çizelge 4.20 KKK-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin String veritabanında ağ analizi sonucu istatistikleri

Ağ Analizi İstatistikleri			
Nokta (node) sayısı:	146	Beklenen kenar sayısı:	99
Kenar (edge) sayısı:	419	PPI enrichment p-value:	< 1.0e-16
Ortalama nokta sayısı:	5.74	Ortalama bölgesel kümeleme katsayısı :	0.434



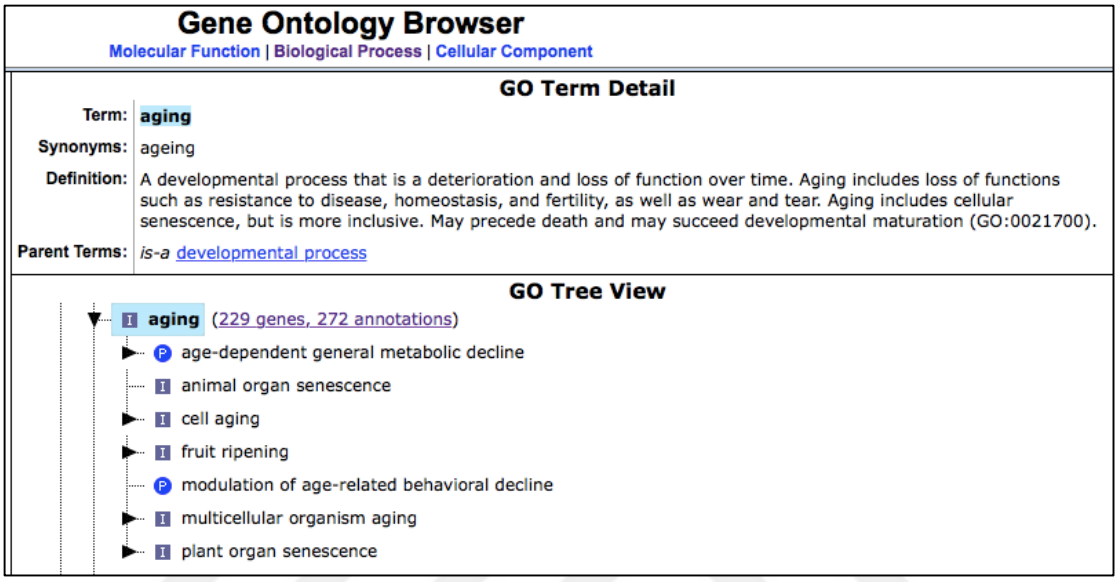
Şekil 4.21 KKK-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin analizi sonucu (KEGG yolak analiz sonuçlarına göre renklendirilmiştir.)

Çizelge 4.21 KKK-AKK arasında immün sistem ilişkili anlamlı diferansiyel genlerin KEGG yolak analizi sonuçları

KEGG Pathways			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
04660	T cell receptor signaling pathway	11	2.05e-08
05161	Hepatitis B	12	2.11e-08
05200	Pathways in cancer	16	2.57e-08
05162	Measles	11	1.02e-07
04668	TNF signaling pathway	10	1.16e-07
05168	Herpes simplex infection	12	2.64e-07
04380	Osteoclast differentiation	10	2.72e-07
05152	Tuberculosis	11	4.94e-07
04650	Natural killer cell mediated cytotoxicity	9	1.59e-06

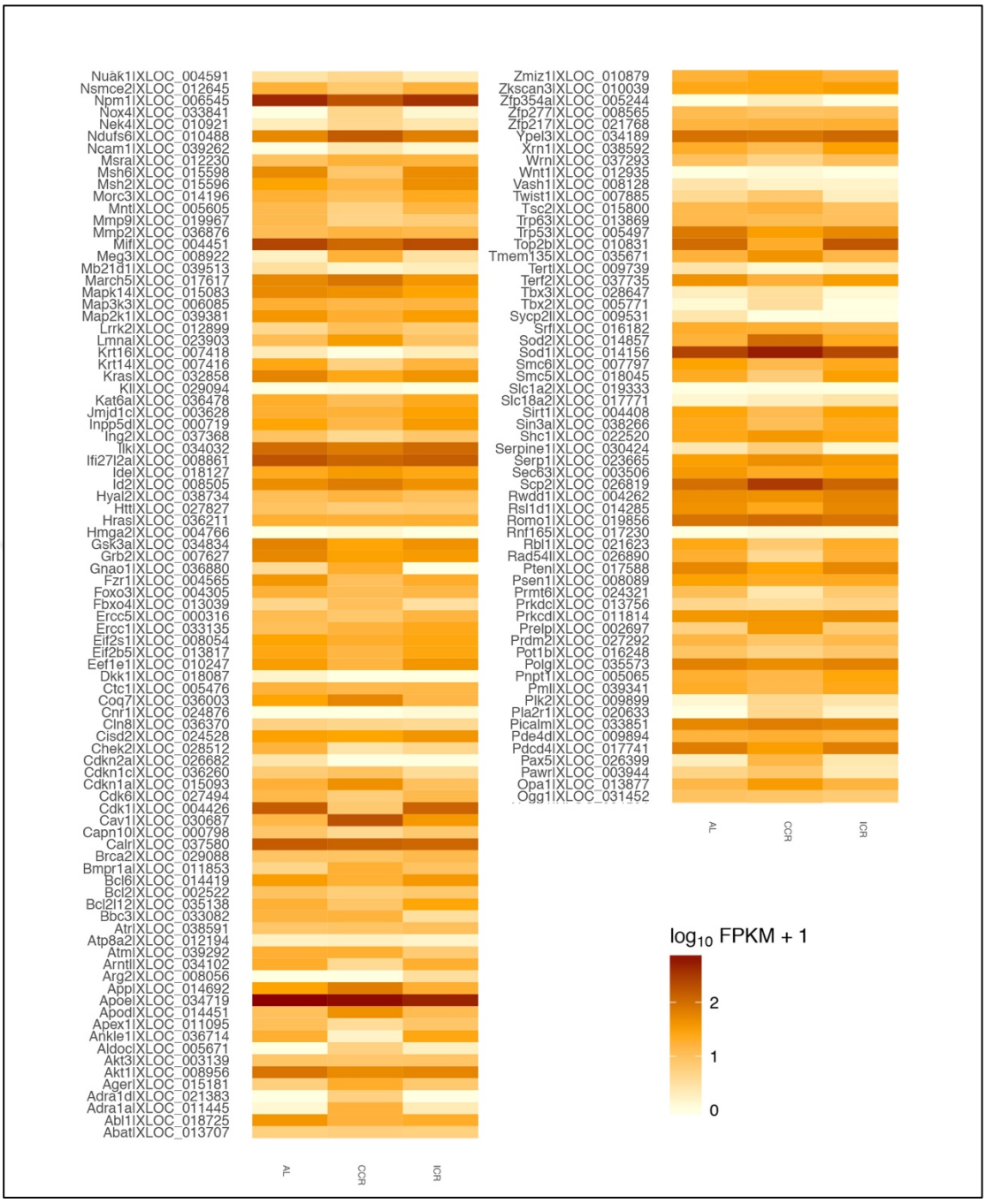
4.9 Yaşlanma ile İlgili Genlerinin Belirlenmesi

Mouse Genome Informatics (MGI) veritabanında yaşlanma (aging) ile ilgili GO:0021700 terimi için MGI GO Browser aracından arama yapılmıştır. Veritabanında GO:0021700–Aging teriminin alt kategorilerini gösteren GO Tree View ile GO:0021700 teriminin 5 alt terinden ve 292 genden oluştuğu Şekil 4.22'ta gösterilmiştir.



Şekil 4.22 MGI veritabanında GO:0021700 teriminin alt terimleri ve içerdiği gen sayısını içeren görüntü

Bu genler fare genomunda bulunan genlerdir. Genler belirlenerek AL, KKK ve AKK verilerinde aranmış, CummeRbund ile heatmap grafiği şeklinde $\log_{10}$ FPKM değerine göre görüntülenmiştir (Şekil 4.23).

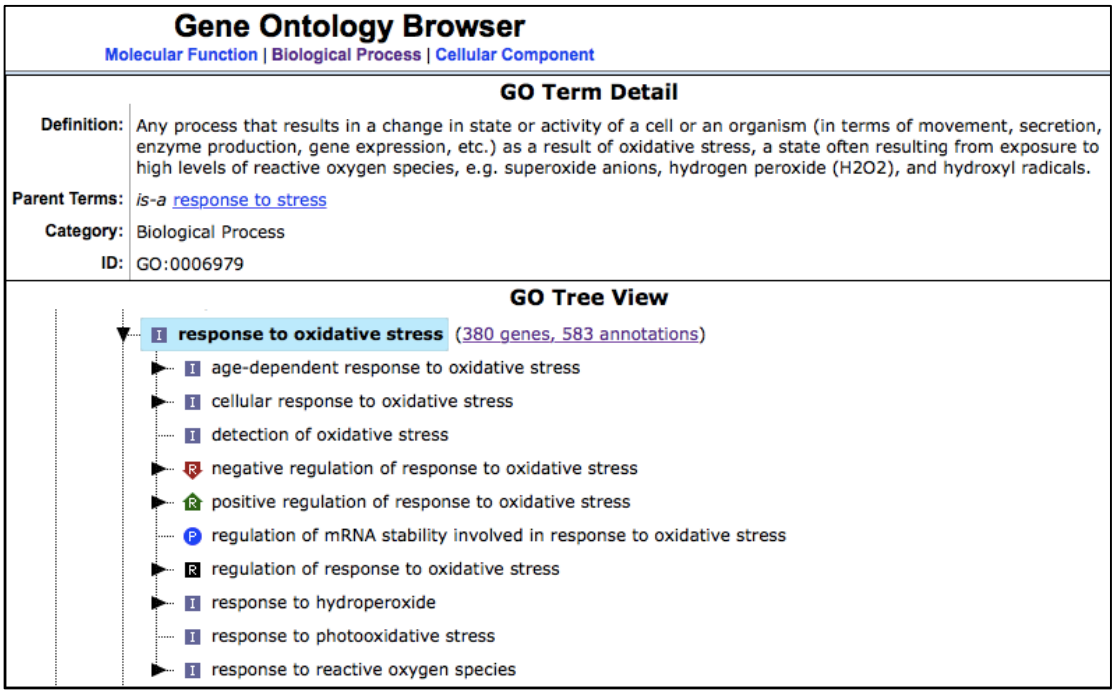


Şekil 4.23 GO:0021700-Aging GO teriminin AL, KKK ve AKK verilerindeki genlerin gen ekspresyon düzeylerinin heatmap grafiği ile gösterimi

Yaşlanma ile ilgili 292 genden AL, KKK ve AKK RNA-seq verimizde 150 genin ekspresyon düzeyinde karşılaştırıldığı görülmüştür. Şekil 4.23'e göre, yaşlanma ile ilgili genlerin AL ile KKK ve KKK ile AKK arasında ekpresyon seviyelerinin oldukça farklı olduğu fakat AL ile AKK arasında ise benzer olduğu farkedilmiştir.

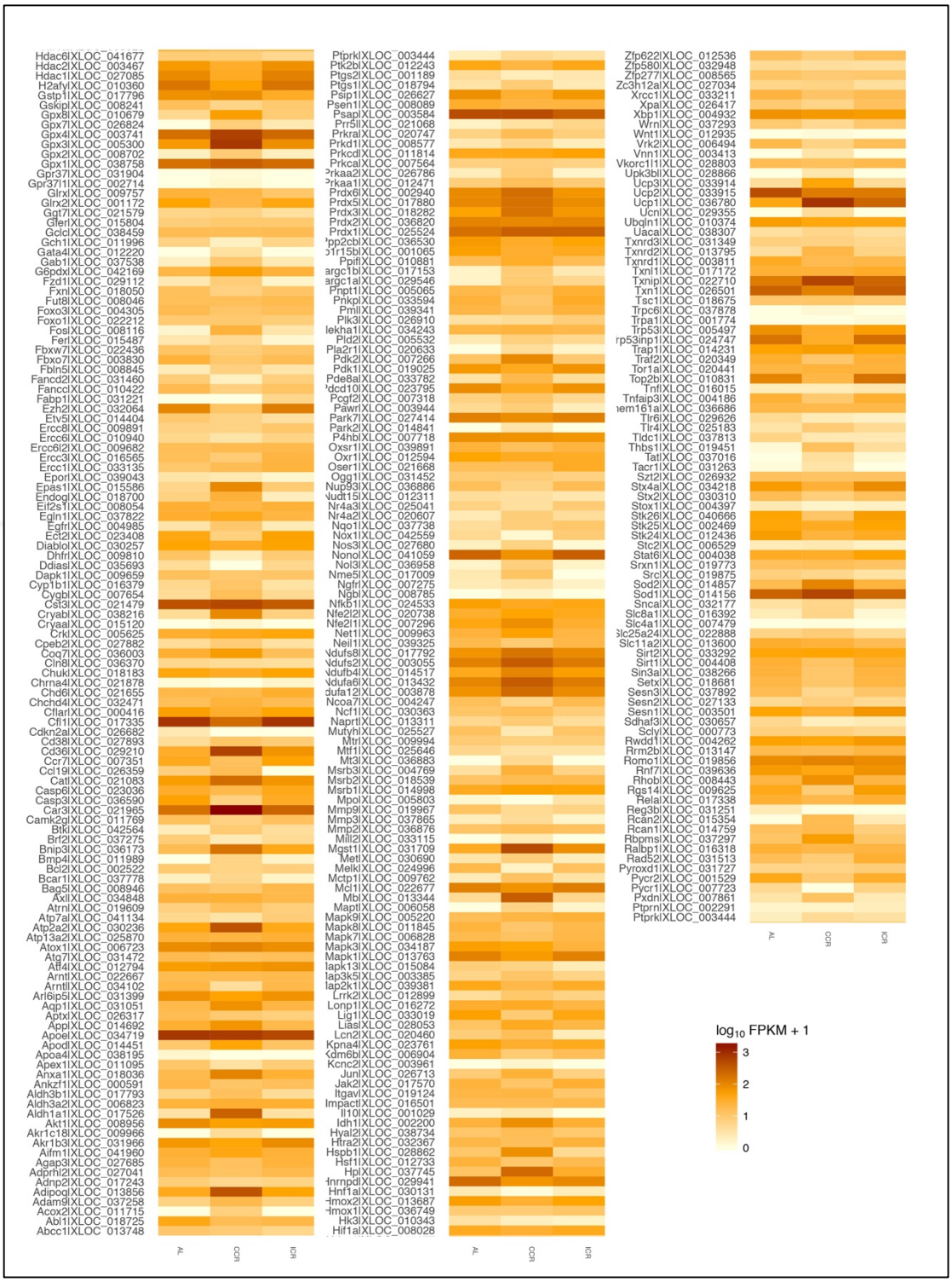
4.10 Oksidatif Stresle İlgili Genlerinin Belirlenmesi

Mouse Genome Informatics (MGI) veritabanında oksidatif stresle ilişkili genleri kapsayan, oksidatif strese cevap olarak değişen genleri içeren GO:0006979 (response to oxidative stress) terim için MGI GO Browser aracında arama yapılmıştır. MGI veritabanında fare genomunda GO:0006979 teriminin 7 alt terimden ve 380 genden oluştuğu GO Tree View ile Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



Şekil 4.24 MGI veritabanında GO:0006979 teriminin alt terimleri ve içerdiği gen sayısını içeren görüntü

Genler belirlenerek bu genler AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde aranmış ve $\log_{10}$ FPKM değerlerine göre heatmap grafiği şeklinde görüntülenmiştir (Şekil 4.25).

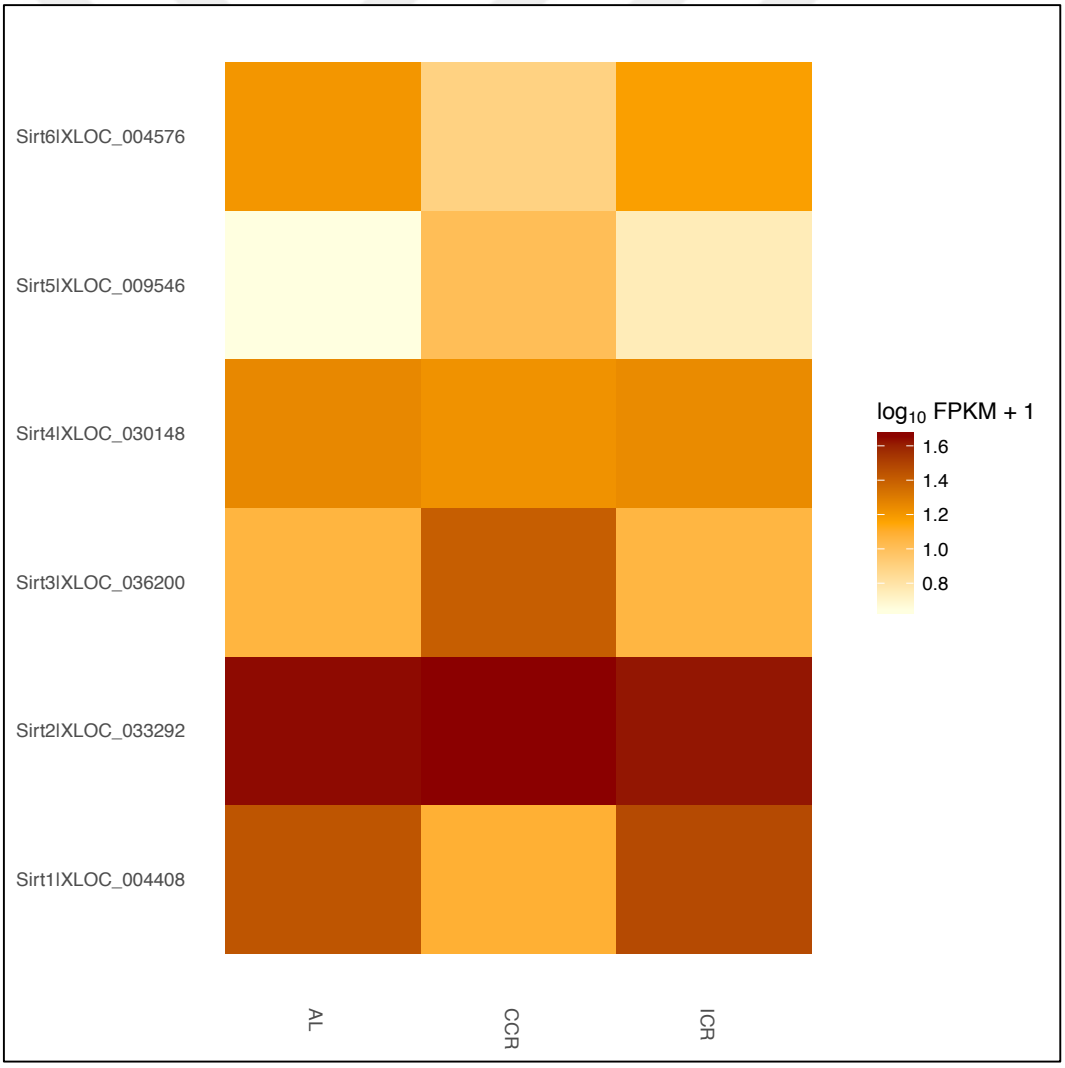


Şekil 4.25 GO:0006979-Response to oxidative stress GO teriminin AL, KKK ve AKK verilerindeki genlerin gen ekspresyon düzeylerinin heatmap grafiği ile gösterimi

Oksidatif stres ile ilgili 380 genden AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde 300 genin ekspresyonunun karşılaştırıldığı görülmüştür. Grafik incelendiğinde, oksidatif stres ile ilgili genlerin KKK verisindeki gen ekspresyonunun çoğunlukla AL ve AKK verilerindeki gen ekspresyonuna göre farklı olduğu gözlenmiştir.

4.11 Sirtuin Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin AL, KKK ve AKK RNA-seq Verilerinde Belirlenmesi

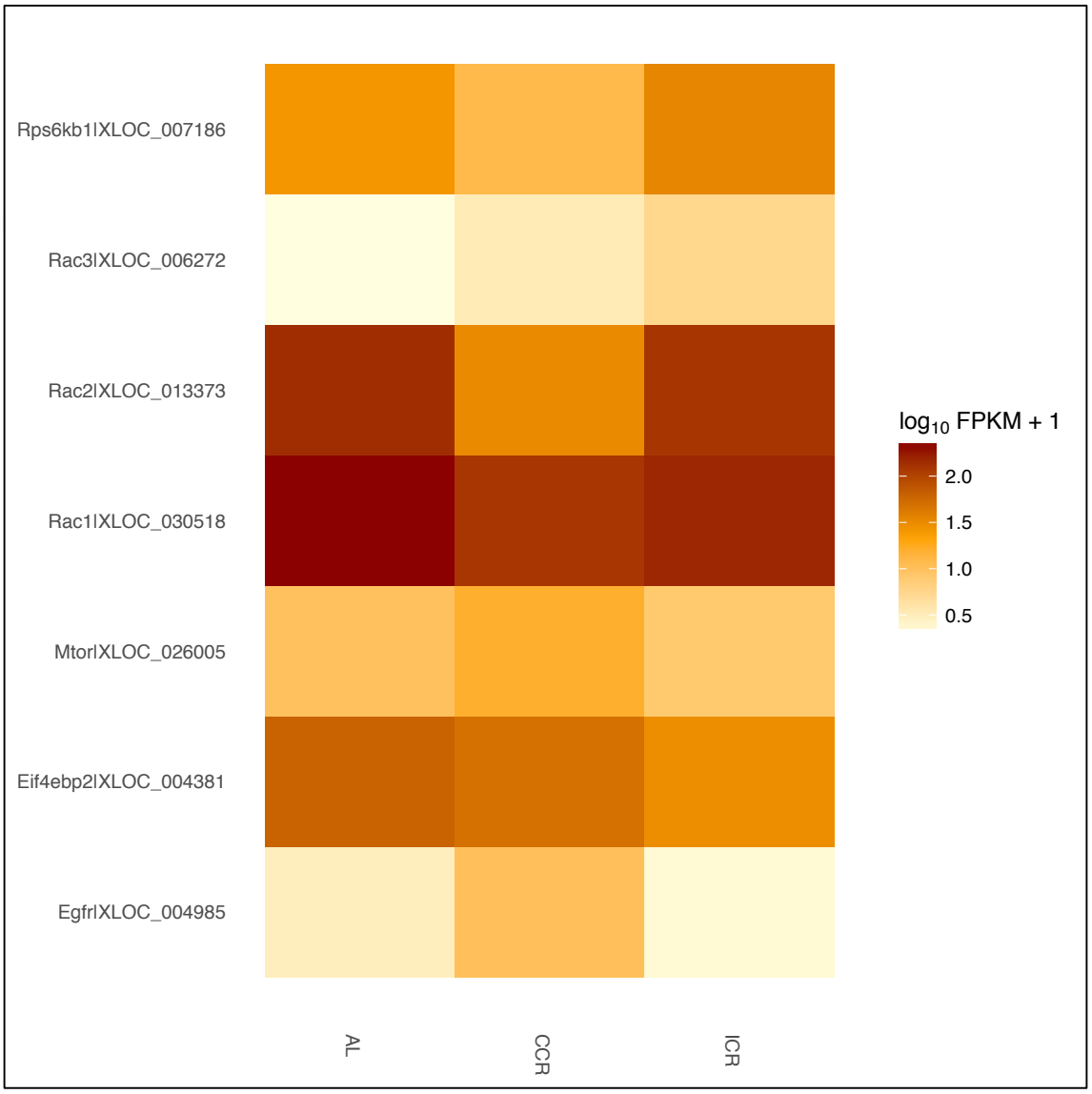
Sirtuin genlerinin AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde belirlenebilmesi için Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt4, Sirt5, Sirt6 ve Sirt7 genleri için CummeRbund programında veriler içinde arama yapılmıştır ve ekspresyon seviyeleri $\log_{10}$ FPKM değerine göre heatmap grafiği ile görüntülenmiştir (Şekil 4.26). Alınan sonuçlara göre Sirtuin genlerinden Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt4, Sirt5 ve Sirt6'nın verilerde bulunduğu belirlenmiştir. Sirt1, Sirt4 ve Sirt6 genlerinin AL ve AKK'da ekspresyonu artarken KKK'da azaldığı görülmüştür. Tam tersine Sirt3 ve Sirt5'in AL ve AKK'da ekspresyonu azaldığı KKK'da ise arttığı görülmüştür. Sirt2 geninin ekspresyon seviyesinin üç veride de benzer olduğu farkedilmiştir.



Şekil 4.26 AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde bulunan Sirtuin genlerinin $\log_{10}$ FPKM değerlerine göre oluşturulmuş heatmap grafiği

4.12 mTOR Yolağı Genlerinden Rps6kb1, mTOR, Rac1, Rac2, Rac3, Eif4ebp2 ve Egfr'nin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

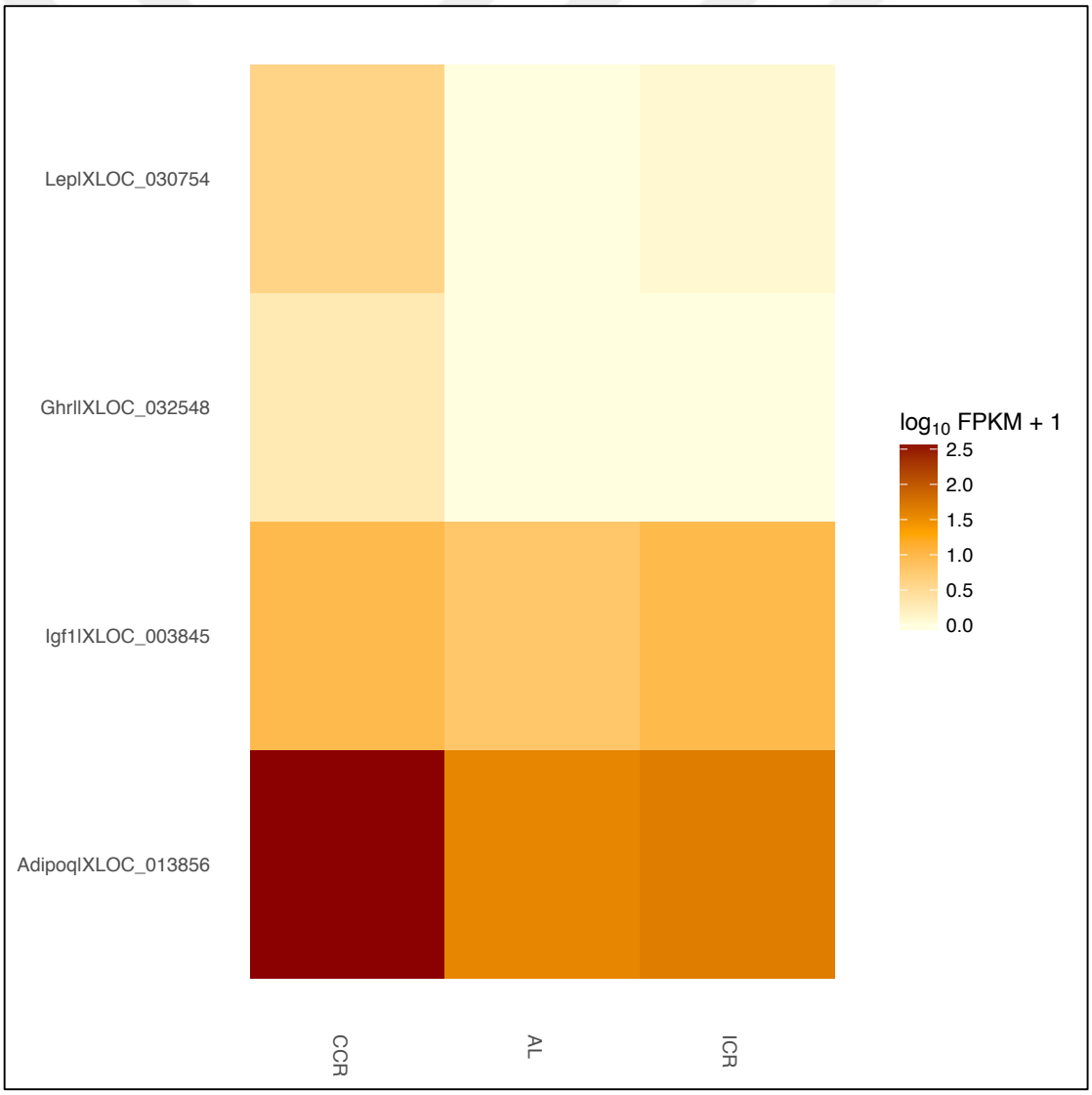
mTOR yolak genlerinden Rps6kb1, mTOR, Rac1, Rac2, Rac3, Eif4ebp2 ve Egfr için AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde CummeRbund programı ile arama yapılmıştır ve ekspresyon seviyeleri $\log_{10}$ FPKM değerine göre heatmap grafiği ile görüntülenmiştir (Şekil 4.27).



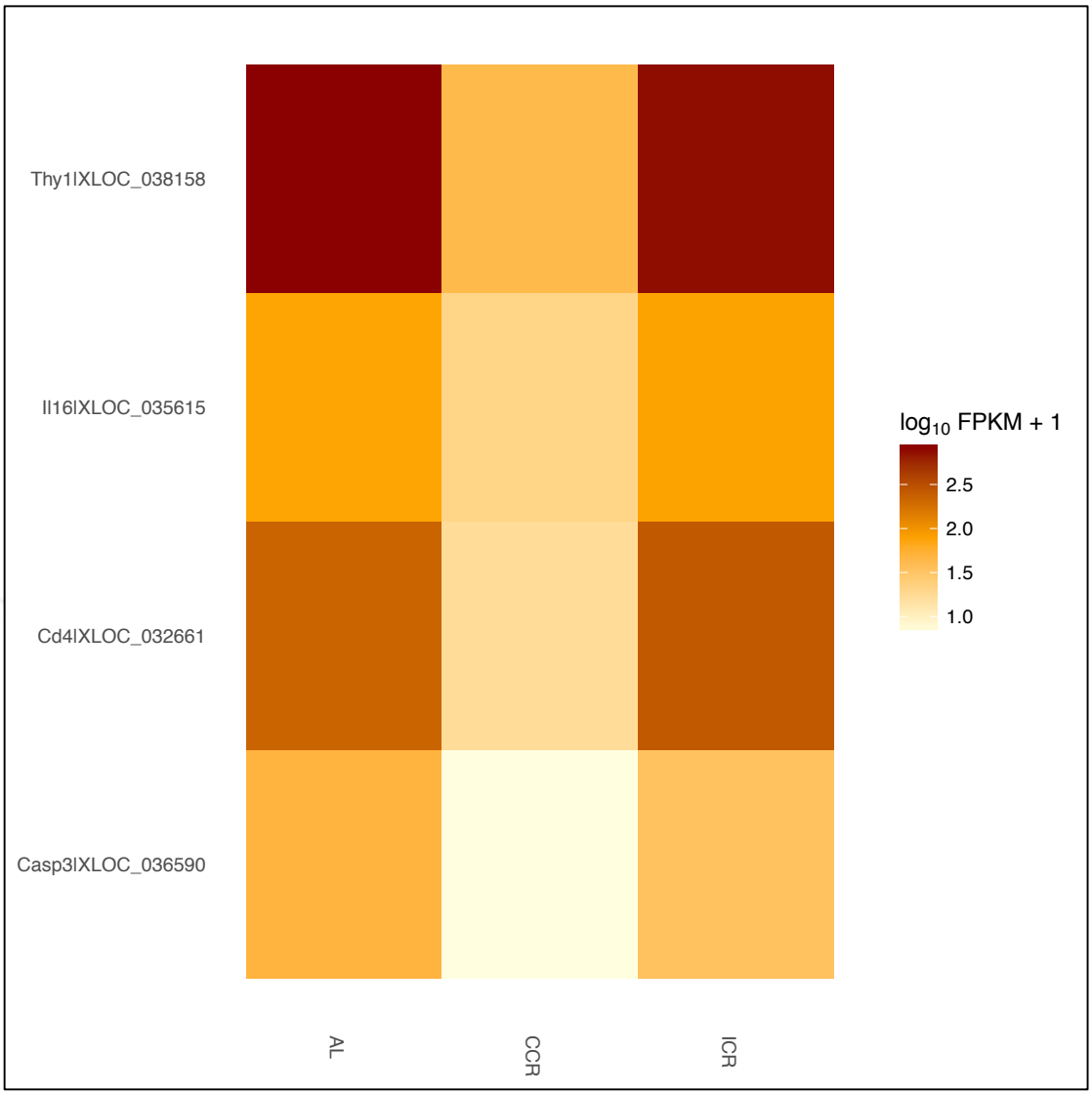
Şekil 4.27 AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde bulunan bazı mTOR yolak genlerinin $\log_{10}$ FPKM değerlerine göre oluşturulmuş heatmap grafiği

4.13 Leptin (Lep), Ghrelin (Ghr), İnsülin büyüme faktörü 1 (Igf1), Adinopektin (Adipoq), Kaspaz 3 (Casp3), Timosit antijeni (Thy-1), interlökin-16 (IL-16) ve CD4 Genlerinin qPCR Validasyonları ve RNA-seq Verisindeki Ekspresyon Seviyeleri

AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerinde farklı eksprese olan genleri validiye etmek için leptin (Lep), ghrelin (Ghr), insülin büyüme faktörü 1 (Igf1), adinopektin (adipoq), timosit antijeni (Thy-1), interlökin-16 (IL-16), CD4 ve kaspaz 3 (Casp3) genleri seçilmiştir. Öncelikle, her genin AL, KKK ve AKK RNA-seq verisindeki ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Şekil 4.28'de Lep, Ghr, Igf1 ve Adipoq genlerinin, Şekil 4.29'da ise Thy-1, IL-16, CD4 ve Casp3 genleri için FPKM değerlerine göre heatmap grafiği oluşturulmuştur.

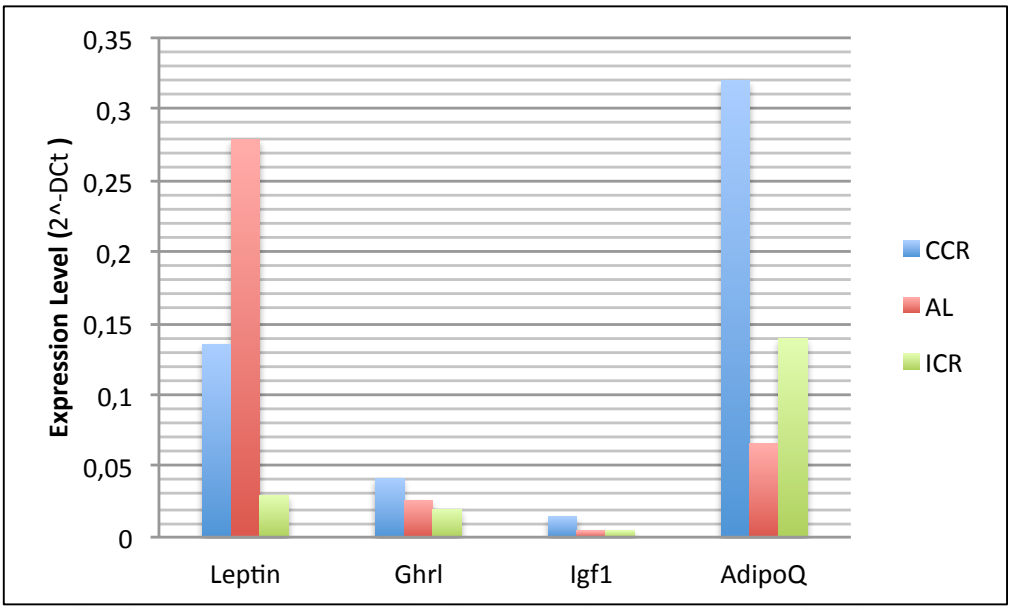


Şekil 4.28 Lep, Ghr, Igf1 ve Adipoq genlerinin FPKM değerlerine göre oluşturulmuş heatmap grafiği [274]

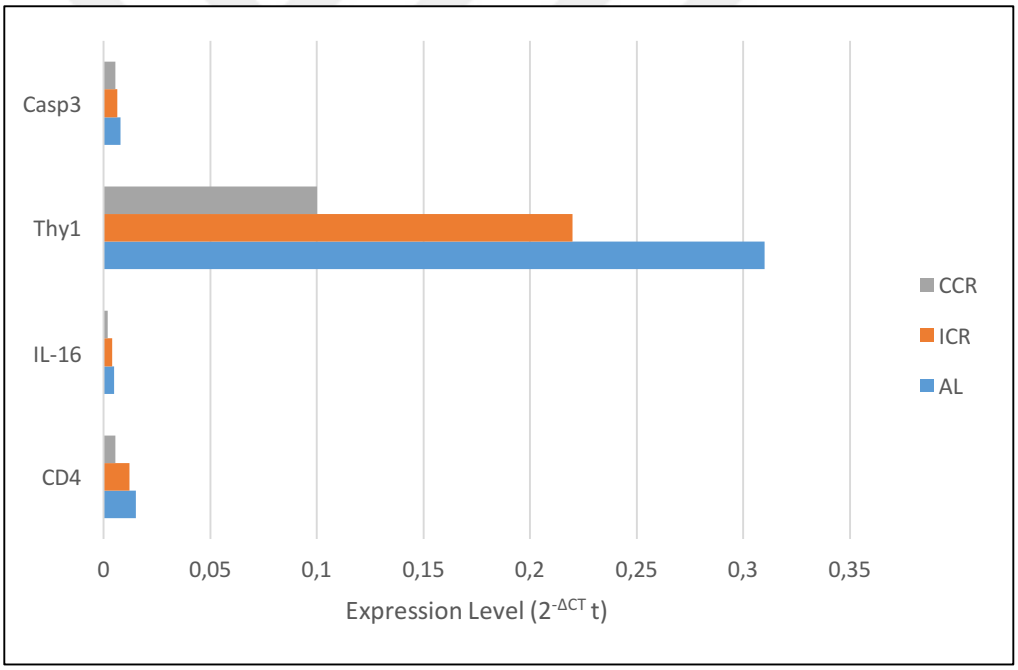


Şekil 4.29 Thy1, IL-16, CD4 ve Casp3 genlerinin FPKM değerlerine göre oluşturulmuş heatmap grafiği

Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de ise bu genlerin qPCR sonucuna göre bu genlerin gen ekspresyon seviyeleri 2^{-dCt} metodu ile hesaplanmış şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.30 Lep, Ghr, Igf1 ve Adipoq genlerinin 2^{-dCt} metoduna göre hesaplanmış qPCR sonuç grafiği [274]



Şekil 4.31 Casp3, Thy1, IL-16 ve CD4 genlerinin 2^{-dCt} metoduna göre hesaplanmış qPCR sonuç grafiği

RNA-seq ve qPCR sonuçlarına bakıldığında, sadece leptin gen ekspresyon seviyesinin RNA-seq ve qPCR sonuçları arasında farklılık olduğu görülmüştür. Diğer genlerin RNA-seq ve qPCR sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

4.14 Tartışma ve Öneriler

Kalori kısıtlaması (KK), negatif enerji dengesini uyandıran ve deney hayvanlarında ortalama ve maksimal ömrü önemli ölçüde arttıran güçlü bir metabolik müdahaledir [275, 276]. Deneysel hayvan modellerinde kalori kısıtlamasının bağışıklık sisteminin çeşitli kollarında önemli bir etkisi olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların çoğu, kalori kısıtlamasının birçok immün sistem yanıt parametrelerini geliştirdiğini ortaya koymaktadır [2], [28, 29].

İki farklı kalori kısıtlaması uygulaması bulunmaktadır; Kronik kalori kısıtlaması (KKK) ve aralıklı kalori kısıtlaması (AKK). KKK'da bir periyot boyunca kalori kısıtlaması uygunlanırken, AKK'da ise bir periyotta belirlenen bir zamanda kalori kısıtlanmasının uygulanması şeklindedir [3-6]. KKK yöntemi çoğu çalışmada yaygın olarak uygulanmasına rağmen, AKK uygulaması sınırlı sayıda çalışılmıştır. Birçok deneysel hayvan çalışmasında, KKK ve AKK'nın kanser önleyici etkileri olduğu bildirilmiştir. Çalışmaların bazıları AL grubuna kıyasla KKK'nın daha etkili olduğunu gösterirken, diğerleri AKK'nın daha etkili olduğunu göstermiştir [277].

Timus, immün sistemdeki en önemli lenfoid organlarından biridir KK'nın timik fonksiyonu güçlendirdiğini gösteren birçok çalışma vardır [2], [28], [278].

Bu çalışmada kısa dönem *ad libitum* (AL), kronik kalori kısıtlaması (KKK) ve aralıklı kalori kısıtlanması (AKK) beslenme şekilleri uygulanan MMTV-TGF-α farelerin timusundan izole edilen total RNA ile yeni nesil sekanslama teknolojisiyle RNA-seq yapılarak üç beslenme durumunda eksprese olan genlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma için öncelikle MMTV-TGF-α fareleri 10. haftadan itibaren AL, KKK (*ad libitum* beslenmenin %85'i) ve AKK (üç hafta *ad libitum,* bir hafta *adlibitum* beslenmenin %60 ve tekrar üç hafta *ad libitum)* şeklinde beslenmişlerdir. AL ve KKK beslenme grubundaki farelerden 18. hafta sonunda, AKK şeklinde beslenen gruptaki farelerden 18. hafta başında timusları alınmıştır. Yani AL ve KKK beslenme grubundaki fareler 8 hafta boyunca *ad libitum* ve %15 kalori kısıtlaması uygulanmış, AKK beslenme grubundakilere ise 10. haftadan sonra 3 hafta *ad libitum,* bir hafta %60 kalori kısıtlaması ve 3 hafta *ad libitum* beslenme uygulanmıştır. Timuslardan total RNA izolasyonu ve RNA kalite ölçümü yapıldıktan sonra BGI'ye RNA-seq için gönderilmiştir. Çift uçlu sekanslama sonucu üç RNA-seq verisinden 100 bp'lık okumaların bulunduğu yaklaşık 105 milyon

temiz okuma elde edilmiştir. TopHat ve Cufflinks programları ile yapılan analizler ile yaklaşık 95 milyon okuma GRCm38 fare genomuna haritalanmıştır ve Cuffdiff programı sonucuna göre toplam 6091 anlamlı diferansiyel eksprese gen (DEGs) ($p<0,05$) elde edilmiştir. Bu genler gen ontoloji (GO) sınıflandırmasına göre moleküler fonksiyon, biyolojik süreç ve hücresel bileşen GO kategorilerine göre sınıflandırılmıştır. KEGG yolak ve gen ağ analizleri de String veritabanında belli kat değişimi olan üç verideki diferansiyel eksprese genler ve immün sistem ilişkili genler için yapılmıştır. Ayrıca immün sistem, beslenme metabolizması ve tümör oluşumu için kalori kısıtlaması çalışmalarında önemli rol oynayan leptin (Lep), ghrelin (Ghrl), insülin büyüme faktörü 1 (Igf1) adinopektin (adipoq), timosit antijeni (Thy-1), interlökin-16 (IL-16), CD4 ve kaspaz 3 (Casp3) genlerinin [170], [15], [267-269] qPCR ile validasyonu yapılmıştır.

Cuffdiff programı analizlerine göre, AL-KKK beslenme grupları arasında 2821, AL-AKK beslenme grupları arasında 445, KKK-AKK beslenme grupları arasında ise 2825 anlamlı diferensiyel eksprese olmuş gen (DEGs) ($p<0,05$) bulunmaktadır. Bu sonuçlar farklı beslenme tiplerinin timusdaki gen ekspresyonunu etkilediğini göstermektedir. AL ve KKK beslenme arasındaki gen ekspresyon farkı ve aynı şekilde KKK ve AKK arasındaki gen ekspresyon farkı oldukça yüksektir. AKK'da sadece bir hafta kalori kısıtlaması uygulanmasına rağmen AL ve AKK arasında 445 gende ekspresyon farkının olması bir haftalık kalori kısıtlamasının bile gen ekspresyon düzeyi farklılıklarına oldukça etkili olduğunun göstergesidir.

Gen ontoloji sonuçlarına göre, AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK beslenme grupları arasında anlamlı diferansiyel eksprese olmuş genlerin Moleküler Fonksiyon kategorisindeki en çok bulunduğu iki GO terimi, katalitik aktivite (GO: 0003824) ve bağlanma (GO: 0005488)'dır (Şekil 4.10). Katalitik aktivite (GO: 0003824) terimi, biyokimyasal reaksiyonlarda rol alan enzimlerden bahsetmaktedir [279]. Bağlanma (GO: 0005488) terimi ise, bir veya daha fazla molekülle etkileşime geçen ligand proteinlerini tanımlamaktadır [280]. AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK beslenme grupları arasında anlamlı diferansiyel eksprese olmuş genlerin biyolojik süreç kategorisindeki en çok bulunduğu iki GO terimi, hücresel süreç (GO: 0009987) ve metabolik süreç (GO: 0008152)'tir. Hücresel süreç (GO: 0009987) terimi, hücrede gerçekleşen fakat tek bir hücre ile sınırlı olmayan işlemleri kapsayan süreçtir [281]. Metabolik süreç (GO: 0008152) terimi,

metabolik ve anabolik kimyasal reaksiyonlardaki küçük moleküler işlemleri içerdiği gibi aynı zamanda DNA onarımı ve replikasyonu, protein sentezi ve parçalanması gibi makromoleküler işlemleri de içerir [282].

AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK beslenme grupları arasında anlamlı farklı eksprese olmuş genlerin hücresel bileşen kategorisindeki en çok bulunduğu iki GO terimi ise, hücre bölümü (GO: 0044464) ve organel (GO: 0043226) olduğu görülmektedir. Hücre bölümü (GO: 0044464) terimi, hücrede yapısal ve fonksiyonel oluşturan parçaları ifade etmektedir [283]. Organel (GO: 0043226) terimi ise, organel yapısını nitelemektedir [284].

GO analizlerinden yola çıkılarak öncelikle immün sistemle ilişkili genler tespit edilmiştir. Ayrıca GO analizleri ile KK ile önemli ölçüde ekspresyon düzeyleri değişen yaşlanma ve oksidatif stres ile ilişkili genler de tespit edilerek, bu genlerin AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerindeki ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

AL, KKK ve AKK RNA-seq verilerindeki immün sistemle ilişkili genleri belirleyebilmek için GO kategorisi olan immün sistem proses (GO:0002376) kategorisindeki genler incelenmiştir. GO sonuçlarına göre AL-KKK arasında 2821, AL-AKK arasında 445 KKK-AKK arasında 2825 anlamlı farklı eksprese olmuş genlerden sırasıyla 188, 36 ve 176'sı GO zenginleştirme kategorilerinden immün sistem proses (GO:0002376) kategorisinde olduğu belirlenmiştir. GO analiz sonuçlarına göre, immün sistem sürecindeki genlerinin sayısı, AL-AKK arasında diferansiyel eksprese olmuş genlere kıyasla, AL-KKK ve KKK-AKK grupları arasındaki diferansiyel eksprese olmuş genlerin sayısı yüksek oranda gözlemlenmiştir. Bu sonuç da, immün sistem genlerinin ekspresyonunun beslenme etkileri ile ekspresyon farklılıkları oluşturdurduğu yönündedir.

Kalori kısıtlaması ve immün sistem arasındaki ilişkinin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar, KK'nın T hücrelerinin yanıtları, doğal öldürücü hücre aktivitesi ve mononükleer hücrelerin pro-inflamatuvar sitokinler üretme kabiliyeti gibi immün yanıtların birçok parametresini geliştirdiğini ortaya koymaktadır [2], [28-31].

Bilimsel araştırmalar, leptin (Lep), ghrelin (Ghr), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (Igf1) ve adinopektin (Adipoq) genlerinin kanser gelişiminde ve immünitede önemli rol oynadığını göstermektedir. Çalışmamızda Lep, Ghr, Igf1 ve Adipoq genlerinin yanı sıra

özellikle immün cevapta rol oynayan Thy1, IL-16, CD4 ve Casp3 genlerinin [170], [15], [267], [268], [269] qPCR ile ekspresyon seviyelerine bakılıp RNA-seq veri sonuçlarımız validiye edilmiştir. Leptin, stres hormonlarının seviyesini düşürür ve tiroid aktivitesini ve tiroid hormon seviyelerini yükseltir [173]. KK, stres hormonlarının ekspresyonunu arttırdığından ve tiroid hormonlarının ekspresyonunu azaltır, bu yüzden leptin seviyeleri KK'da azalır [173, 174]. Ghrelin, pro-inflamatuar sitokinleri azaltarak bağışıklık fonksiyonunu düzenlemektedir [29]. Birçok kalori kısıtlaması ile ilgili çalışma Igf1 ekspresyon seviyesinin azaldığını bildirmiş olsa da [176-178] bazı çalışmalarda kalori kısıtlaması uygulanan organizmalarda Igf1 düzeyinde bir değişiklik veya artış bildirilmemiştir [179, 180]. Adinopektin, insülin duyarlılığını başlatmak için önemli bir hormondur ve KK sırasında seviyeleri yükselir [171, 172]. Bu çalışmada; RNA-seq sonuçlarına göre, leptin gen ekspresyon seviyesi KKK şeklinde beslenen grupta daha fazladır (Şekil 4.46), ancak qPCR sonuçlarına göre AL şeklinde beslenmiş grupta diğer gruplara göre daha yüksektir (Şekil 4.48). KKK'da leptin ekspresyonunun fazla olması, kısa dönem kalori kısıtlaması uygulanmasının sonucu olarak düşünülmektedir. Ghrelin ekspresyonu KKK'da artmıştır (Şekil 4.46) bu da KKK'nın bağışıklık fonksiyonunu geliştirme üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir [29]. Aynı şekilde Igf1 ekspresyonuna bakıldığında KKK ve AKK'da ekspresyon seviyesinin AL'ye göre fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.46). Bu bağlamda mevcut sonuçlar, aynı fare modeli kullanılarak yapılan daha önceki bulgularına da destek vermektedir [169]. Önceki çalışmalarda KKK ve AKK gruplarından farelerin meme yağ doku dokusunda, 37. haftada AL gruplarına kıyasla Igf1 ve IGFBP3 protein ekspresyonu seviyeleri artmış olarak görülmüştür [169]. Buna ek olarak, Igf1 geni ekspresyon seviyeleri, AL, KKK ve AKK şeklinde beslenen gruplar arasında benzer olarak görülmüştür. Ayrıca 18 haftalık bir fare modeli için genç olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, daha fazla büyüme faktörüne ihtiyaç duyan kalori kısıtlı grupta daha yüksek Igf1 geni ekspresyon seviyesinin görülmesi beklenmemektedir. RNA-seq ve qPCR sonuçlarına göre, KKK şeklinde beslenen grupta adinopektin gen ekspresyon seviyesi artmaktadır. Bu da kalori kısıtlamasının insülin duyarlılığını artırdığının göstergesidir. İmmün yanıtta önemli rol oynayan Thy1, IL-16, CD4 ve Casp3 genlerinin RNA-seq verilerinde ve qPCR'de ekspresyon düzeyleri paralel olarak artıp azalmıştır. Bu genlerin ekspresyon seviyeleri beslenen KKK'da azalır. Birçok çalışmada KK ile Thy1, IL-16, CD4 ve Casp3

düzeylerinin azaldığını bildirmiştir [267-269]. KK, yağ kütlesini önemli ölçüde azaltan, yaşla beraber oluşan hastalıkların önlenmesine yardımcı olan ve yaşam süresini uzatan bir uygulamadır [285], timus dokusunda Thy1, IL-16 ve CD4 ve Casp3 ekspresyonunu azaltmıştır. Bu sonuçlar kısa süreli KK'nın gelişmekte olan bağışıklık fonksiyonunu olumlu yönde etkilediğini göstermektedir.

GO analizlerinden yola çıkarak yaşlanma ve oksidatif stres ile ilişkili genler belirlenip AL, KKK ve AKK verilerinde bu genler aranarak verilerdeki gen ekspresyon profillerine bakılmıştır. Veriler arasındaki gen ekspresyon farkı önemli düzeyde olduğu görülmüştür. Yapılan birçok araştırma KK'nın oksidatif stres ve yaşlanma ile ilgili birçok genin ekspresyon düzeyini etkilemiştir [12], [71]. Bizim çalışmamızda da kısa süreli KK uygulanmış olmasına rağmen AL ile KKK arasında gen ekspresyon seviyesi farklılıkları oldukça belirgindir. Ayrıca AL ile AKK arasında sadece bir haftalık kalori kısıtlaması uygulanmasına rağmen gen ekspresyon seviyelerinde farklılıklar saptanmıştır.

Bunlara ek olarak, KK'nın etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda Sirtuin proteinleri ve mTOR yolak çalışmaları önemli bir yere sahiptir. Üç RNA-seq verisinde de bu proteinlerin önemli bir kısmına ekpresyon düzeyinde bakılmış ve üç veri arasında farklılıklar olduğu saptanmıştır. Bu sonuç da kısa süreli KKK ve AKK şeklinde beslenme ile timusta bu proteinlerin gen ekspresyon düzeyine etki edebildiğini göstermektedir.

Ayrıca AL-KKK, AL-AKK ve KKK-AKK arasında anlamlı diferansiyel genlerin kat değişimi gözetilerek belirli kat artışında ya da azalışındaki genlerin profili çıkarılmış ve bu genlerin GO, gen ağ ve KEGG yolak analizleri yapılmıştır. Gen ağ analizleri ile bu genlerin birbirleri arasındaki etkileşim ve belirli bir ağda kümelenen genler tanımlanmıştır. KEGG yolak analizleri ile çeşitli sistemlere ait yolaklarda bulunan genler belirlenmiştir. Bu analizlerin yanında GO analizleriyle de bu genlerin GO bakımından anotasyonları belirlenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar RNA-seq çalışmalarının gen ekspresyon profilini incelemek ve farklı koşullardaki gen ekspresyonunu karşılaştırarak transkriptom analizi yapmak için güçlü bir araç olduğunu ortaya koymaktadır. Bulgularımıza göre, AL, KKK ve AKK şeklinde beslenen farelerin timuslarında belirgin bir şekilde gen ekspresyon farklılıkları meydana gelmiştir. Bu sonuçlar kalori kısıtlaması çalışmalarında, bağışıklık sistemi, oksidatif stres, yaşlanma ve kanser gelişim araştırmaları için yeni ipuçları

sağlayacaktır. Çalışmamızın devamı olarak bu RNA-seq verilerinden kalori kısıtlamasını etkileyen genlerin ileri analizi, tek polimorfizm analizleri ve lncRNA analizleri planlanmaktadır. Ayrıca AL, KKK ve AKK şeklinde daha uzun süreli beslenen farelerin gen ekspresyon profilleri çıkarılarak kendi aralarında karşılaştırma ve zamana bağlı değişimleri analiz edilerek bu çalışmalara katkı sağlamak planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

[1] Nozad, A., Safari, M.B., Saboory, E., Derafshpoor, L., Mohseni Moghaddam, P., Ghaffari, F. ve Naseri, M., (2015). "Caloric Restriction and Formalin-Induced In ammation: An Experimental Study in Rat Model", Iran Red, Crescent Med. J., 17(7):22590.

[2] Nikolich-Zugich, J. ve Messaoudi, I., (2005). "Mice and flies and monkeys too: Caloric restriction rejuvenates the aging immune system of non-human primates", Experimental Gerontology, 40:884–893.

[3] Hursting, S.D., Lavigne, J.A., Berrigan, D., Perkins, S.N. ve Barrett, J.C., (2003). "Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans", Annu Rev Med., 54:131-152.

[4] Cleary, M.P., Hu X., Grossmann, M.E., Juneja, S.C., Dogan, S., Grande, J.P. ve Maihle, N.J., (2007). "Prevention of mammary tumorigenesis by intermittent caloric restriction: does caloric intake during refeeding modulate the response?", Exp. Biol. Med. (Maywood), 232(1):70-80.

[5] Dogan, S., Hu, X., Zhang, Y., Maihle, N.J., Grande, J.P. ve Cleary, M.P., (2007). "Effects of high fat diet and/or body weight on mammary tumor leptin and apoptosis signaling pathways in MMTV-TGF-alpha mice", Breast Cancer Res., 9(6):91.

[6] Jiang, W., Zhu, Z. ve Thompson, H.J., (2009). "Effects of physical activity and restricted energy intake on chemically induced mammary carcinogenesis", Cancer Prev. Res. (Phila Pa), 2(4):338-344.

[7] Weindruch, R.H. ve Walford, R.L., (1988). "The retardation of aging and disease by dietary restriction", Toxicologic Pathology, 24(6):742-745.

[8] Hursting, S.D. ve Kari, F.W., (1999), "The anti-carcinogenic effects of dietary restriction: mechanisms and future directions", Mutat Res., 443(1-2):235-49.

[9] Luan, X., Zhao, W., Chandrasekar, B. ve Fernandes, G., (1995). "Calorie restriction modulates lymphocyte subset phenotype and increases apoptosis in MRL/lpr mice", Immunology Letter, 47:181-186.

[10] Troyer, D.A., Chandrasekar, B., Barnes, J.L. ve Fernandes, G., (1997). “Calorie restriction decreases platelet-derived growh factor (PDGF)-A and thrombin receptor mRNA expression in autoimmune murine lupus nephiritis”, Clin. Exp. Immunol., 108(1):58-62.

[11] Ogura, M., Ogura, H., Ikehara, S., Dao, M.L., Good, R.A., (1989). “Decrease by chronic energy intake restriction of cellular proliferation in the intestina epithelium and lymphoid organs in autoimmunity-prone mice”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5918-5922.

[12] Speakman, J.R. ve Mitchell, S.E., (2011). “Caloric restriction”, Molecular Aspects of Medicine, 32(3):159–221.

[13] Cleary, M.P., Jacobson, M.K., Phillips, F.C., Getzin, S.C., Grande, J.P. ve Maihle, N.J., (2002). “Weight-cycling decreases incidence and increases latency of mammary tumors to a greater extent than does chronic caloric restriction in mouse mammary tumor virus-transforming growth factor-alpha female mice”, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 11:836-843.

[14] Rogozina, O.P., Bonorden, M.J., Grande, J.P ve Cleary, M.P., (2009). “Serum insulin-like growth factor-I and mammary tumor development in ad libitum-fed, chronic calorie-restricted, and intermittent calorie-restricted MMTV-TGF-alpha mice”, Cancer Prev Res (Phila). 2:712–719.

[15] Dogan, S., Rogozina, O.P., Lokshin, A.E., Grande, J.P. ve Cleary, M.P., (2010). “Effects of chronic vs. intermittent calorie restriction on mammary tumor incidence and serum adiponectin and leptin levels in MMTV-TGF-alpha mice at different ages”, Oncol Lett., 1:167–176.

[16] Rogozina, O.P., Nkhata, K.J., Nagle, E.J., Grande, J.P. ve Cleary, M.P., (2013). “The protective effect of intermittent calorie restriction on mammary tumorigenesis is not compromised by consumption of a high fat diet during refeeding”, Breast Cancer Res Treat., 138(2):395-406.

[17] Berrigan, D., Perkins, S.N., Haines, D.C. ve Hursting, S.D., (2002). “Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-de cient mice”, Carcinogenesis, 23:817–822.

[18] Bonorden, M.J., Rogozina, O.P., Kluczny, C.M., Grossmann, M.E., Grambsch, P.L., Grande, J.P., Perkins, S., Lokshin, A. ve Cleary, M.P., (2009). “Intermittent calorie restriction delays prostate tumor detection and increases survival time in TRAMP mice”, Nutr Cancer, 61:265–275.

[19] Cleary, M.P. ve Grossmann, M.E., (2011). “The manner in which calories are restricted impacts mammary tumor cancer prevention”, J. Carcinogenesis, 10:21.

[20] Lanza-Jacoby, S., Yan, G., Radice, G., LePhong, C., Baliff, J. ve Hess, R., (2013). “Calorie restriction delays the progression of lesions to pancreatic cancer in the LSL-KrasG12D; Pdx-1/Cre mouse model of pancreatic cancer”, Exp. Biol. Med. (Maywood), 238:787–797.

[21] Mizuno, N.K., Rogozina, O.P., Seppanen, C.M., Liao, D.J., Cleary, M.P. ve Grossmann, M.E., (2013). "Combination of intermittent calorie restriction and eicosapentaenoic acid for inhibition of mammary tumors", Cancer Prev Res (Phila), 6:540–547.

[22] Pape-Ansorge, K.A., Grande, J.P., Christensen, T.A., Maihle, N.J. ve Cleary, M.P., (2002). "Effect of moderate caloric restriction and/or weight cycling on mammary tumor incidence and latency in MMTV-Neu female mice", Nutr. Cancer, 44:162–168.

[23] Wong, S.E., Papenfuss, T.A., Heger, A., Hsu, A.L., Ponting, C.P., Miller, R.D., Fenelon, J.C., Renfree, M.B., Gibbs, R.A. ve Belov, K., (2011), "Transcriptomic analysis supports similar functional roles for the two thymuses of the tammar wallaby", BMC Genomics, 12:420.

[24] Ribatti, D., Crivellato, E. ve Vacca, A., (2006). "Miller's seminal studies on the role of thymus in immunity", Clinical and Experimental Immunology, 144(3):371-375.

[25] Keusch, G.T., Wilson, C.S. ve Waksal, S.D., (1983). "Nutrition, host defenses and the lymphoid system", Raven Press New York, 2:275.

[26] Gartner, A., Castellon, W.T., Gallon, G. ve Simondon, F., (1992). "Total dietary restriction and thymus, spleen, and phenotype and function of splenocytes in growing mice", Nutrition, 8(4):258-65.

[27] Youm, Y.H., Yang, H., Sun, Y., Smith, R.G., Manley, N.R., Vandanmagsar, B. ve Dixit, V.D., (2009). "Deficient ghrelin receptor mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity", J Biol Chemistry, 284:7068–7077.

[28] Yang, H., Youm, Y.H. ve Dixit, V.D., (2009). "Inhibition of Thymic Adipogenesis by Caloric Restriction Is Coupled with Reduction in Age-Related Thymic Involution", J Immunology, 183(5):3040–3052.

[29] Dixit, V.D., (2008). "Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span", J. Leukocyte Biology, 84:882–892.

[30] Fabbiano, S., Sua´rez-Zamorano, N., Rigo, D., Veyrat-Durebex, C., Dokic, A.S., Colin, D.J. ve Trajkovski, M., (2016). "Caloric Restriction Leads to Browning of White Adipose Tissue through Type 2 Immune Signaling", Cell Metabolism, 24:434-446.

[31] Trott, D.W., Hensonb, G.D., Hoa, M.H., Allisona, S.A., Lesniewskia, L.A. ve Donatoa, A.J., (2016). "Age-related arterial immune cell infiltration in mice is attenuated by caloric restriction or voluntary exercise", Exp. Gerontology, 5565(16):30348-5.

[32] Benjamini, Y. ve Yekutieli, D., (2001). "The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency", The Annals of Statistics, 29(4):1165–1118.

[33] Mortazavi, A., Williams, B.A., Mccue, K., Schaeffer, L. ve Wold, B., (2008). "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq" Nature Methods, 5:621–628.

[34] Wang, Z.Y., Fang, B.P., Chen, J.Y., Zhang, X., Luo, Z.X., Huang, L.F., Chen, X.L. ve Li ,Y.J., (2010). "De novo assembly and characterization of root transcriptome using lllumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweet potato", BMC Genomics, 11:726.

[35] Zenoni, S., Ferrarini, A., Giacomelli, E., Xumerle, L., Fasoli, M., Malerba, G., Bellin, D., Pezzotti, M. ve Delledonne, M., (2010). "Characterization of transcriptional complexity during berry development in vitis vinifera using RNA-Seq", Journal of Plant Physiology, 152:1787–1795.

[36] Tang, Q., Ma, X.J., Mo, C.M., Wilson, I.W., Song, C., Zhao, H., Yang, Y.F., Fu, W. ve Qiu, D.Y., (2011). "An efficient approach to finding Siraitia grosvenorii triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis", BMC Genomics 12:343.

[37] Yang, S.S., Tu, Z.J., Cheung, F., Xu, W.W., Lamb, J.F, Jung, H.J.G., Vance, C.P. ve Gronwald, J.W., (2011). "Using RNA-Seq for gene identification, polymorphism detection and transcript profiling in two alfalfa genotypes with divergent cell wall composition in stems", BMC Genomics 12:199.

[38] Ozsolak, F. ve Milos, P.M., (2011). "RNA sequencing: advances, challenges and opportunities", Nat Rev Genetics, 12:87-98.

[39] Schafer, M.J., Dolgalev, I, Alldred, M.J., Heguy, A. ve Ginsberg, S.D., (2015). "Calorie Restriction Suppresses Age-Dependent Hippocampal Transcriptional Signatures", Plos One, 10(7):0133923.

[40] McCay, C.M., Crowell, M.F. ve Maynard, L.A., (1935). "The effect of retarded growth upon the length of life and upon the ultimate body size", Journal of Nutrition, 10:63–79.

[41] Cornaro, L., (1917). "The Art of Living Long", A New and Improved English Version of the Treatise by the Celebrated Venetian Centenarian Luigi Cornaro Bulter, New York.

[42] Leon, D.A., (2011). "Trends in European life expectancy: a salutary view", International Journal of Epidemiology, 40:271–277.

[43] Osborne, T.B., Mendel, L.B. ve Ferry, E.L., (1917). "The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life of rats", Science, 45:294–295.

[44] McCay, C.M., Dilley, W.E. ve Crowell, M.F., (1929). "Growth rates of brook trout reared upon purified rations, upon dry skim milk diets,and upon feed combinations of cereal grains", Journal of Nutrition, 1:233–246.

[45] Fabrizio, P. ve Longo, V.D., (2003). "The chronological life span of Saccharomyces cerevisiae", Aging Cell, 2:73–81.

[46] Klass, M.R., (1977). “Aging in nematode caenorhabditis-elegans – major biological and environmental-factors influencing life-span”, Mechanisms of Ageing and Development, 6:413–429.

[47] Braeckman, B.P., Demetrius, L. ve Vanfleteren, J.R., (2006). “The dietary restriction effect in C-elegans and humans: is the worm a one-millimeter human?”, Biogerontology, 7:127–133.

[48] Bross, T.G., Rogina, B. ve Helfand, S.L., (2005). “Behavioral, physical, and demographic changes in Drosophila populations through dietary restriction”, Aging Cell, 4:309–317.

[49] Austad, S.N., (1989). “Life extension by dietary restriction in the bowl and doily spider, Frontinella–Pyramitela”, Experimental Gerontology, 24:83–92.

[50] Kirk, K.L., (2001). “Dietary restriction and aging: comparative tests of evolutionary hypotheses”, Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences, 56:123–129.

[51] Kaitala, A., (1991). “Phenotypic plasticity in reproductive-behavior of waterstriders trade-offs between reproduction and longevity during food stress”, Functional Ecology, 5:12–18.

[52] Cooper, T.M., Mockett, R.J., Sohal, B.H., Sohal, R.S. ve Orr, W.C., (2004). “Effect of caloric restriction on life span of the housefly, Musca domestica”, Faseb Journal, 18(13):1591-3.

[53] Weindruch, R., (1992). “Effect of caloric restriction on age-associated cancers”, Experimental Gerontology, 27:575–581.

[54] Pinney, D.O., Pope, L.S., Stephens ve D.F., (1972). “Lifetime effects of winter supplemental feed level and age at first parturition on range beef cows”, Journal of Animal Science, 34(6):1067-74.

[55] Lawler, D.E., Evans, R.H., Larson, B.T., Spitznagel, E.L., Ellersieck, M.R. ve Kealy, R.D., (2005). “Influence of lifetime food restriction on causes, time, and predictors of death in dogs”, Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association, 226:225–231.

[56] Lawler, D.F., Larson, B.T., Ballam, J.M., Smith, G.K., Biery, D.N., Evans, R.H., Greeley, E.H., Segre, M., Stowe, H.D. ve Kealy, R.D., (2008). “Diet restriction and ageing in the dog: major observations over two decades”, British Journal of Nutrition, 99:793–805.

[57] Kealy, R.D., Lawler, D.F., Ballam, J.M., Mantz, S.L., Biery, D.N., Greeley, E.H., Lust, G., Segre, M., Smith, G.K. ve Stowe, H.D. (2002). “Effects of diet restriction on lifespan and age-related changes in dogs”, Journal of the American Veterinary Medical Association, 220:1315–1320.

[58] Harvie, M. ve Howell, A., (2012). “Energy restriction and the prevention of breast cancer”, Proc. Nutr. Soc., 71:263–275.

[59] Heilbronn, L. K., Smith, S. R., Martin, C. K., Anton, S. D. ve Ravussin, E., (2012). “Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism”, Am. J. Clin. Nutr, 81:69–73.

[60] Halberg, N., Henriksen M., Söderhamn N., Stallknecht B., Ploug T., Schjerling P., ve Dela F., (2005). “Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men”, J.Appl. Physiol., 99(6):2128-36.

[61] Heilbronn, L. K., Civitarese A.E., Bogacka I., Smith S.R., Hulver M. ve Ravussin E., (2005). “Glucose tolerance and skeletal muscle gene expression in response to alternate day fasting”, Obes Res., 13(3):574-81.

[62] Weindruch, R., (1996). “The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates”, Toxicologic Pathology, 24:742–745.

[63] Speakman, J.R. ve Hambly, C., (2007). “Starving for life: what animal studies can and cannot tell us about the use of caloric restriction to prolong human lifespan”, Journal of Nutrition, 137:1078–1086.

[64] Merry, B.J., (2002). “Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity”, International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 34:1340–1354.

[65] Merry, B.J., (2005). “Dietary restriction in rodents delayed or retarded ageing?” Mechanisms of Ageing and Development, 126:951–959.

[66] Pugh, T.D., Oberley, T.D. ve Weindruch, R., (1999). “Dietary intervention at middle age: caloric restriction but not dehydroepiandrosterone sulfate increases lifespan and lifetime cancer incidence in mice”, Cancer Research, 59:1642–1648.

[67] Weindruch, R. ve Walford, R.L., (1982). “Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age effect on life-span and spontaneous cancer incidence”, Science, 215:1415–1418.

[68] Yu, B.P., Chen, J.J., Kang, C.M., Choe, M., Maeng, Y.S. ve Kristal, B.S., (1996). “Mitochodrial aging and lipoperoxidative products”, Ann. NY. Acad. Sci., 786:44–56.

[69] Pugh, T.D., Klopp, R.G. ve Weindruch, R., (1999). “Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys”, Neurobiology of Aging, 20:157–165.

[70] Dhahbi, J.M., Kim, H.J., Mote, P.L., Beaver, R.J. ve Spindler, S.R., (2004). “Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101:5524–5529.

[71] Lee, C.K., Allison, D.B., Brand, J., Weindruch, R. ve Prolla, T.A., (2002). “Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99:14988–14993.

[72] Harbison, C.E., Lipman, R.D. ve Bronson, R.T., (2016). “Strain- and diet-related lesion variability in aging DBA/2, C57BL/6, and DBA/2xC57BL/6 F1 mice”, Vet. Pathol., 53:468–476.

[73] Shanley, D.P., Aw, D., Manley, N.R. ve Palmer, D.B., (2009). “An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence”, Trends in Immunology, 30:374–381.

[74] Thoman, M.L. ve Weigle, W.O., (1982). “Cell-mediated-immunity in aged mice an underlying lesion in Il-2 synthesis”, Journal of Immunology, 128:2358–2361.

[75] Miller, R.A., (1991). “Aging and Immune Function”, International Review of Cytology-A Survey of Cell Biology, 124:187–215.

[76] Miller, R.A., (1994). “Aging and immune function cellular and biochemical analyses”, Experimental Gerontology, 29:21–35.

[77] Miller, R.A., Berger, S.B., Burke, D.T., Galecki, A., Garcia, G.G., Harper, J.M. ve Akha, A.A.S., (2005). “T cells in aging mice: genetic, developmental, and biochemical Analyses”, Immunological Reviews, 205:94–103.

[78] Bartocci, A., Papademetriou, V., Schlick, E., Nisula, B.C. ve Chirigos, M.A., (1982). “Effect of crude and purified human chorionic-gonadotropin on murine delayed- type hypersensitivity a role for prostaglandins”, Cellular Immunology, 71:326–333.

[79] Beharka, A.A., Wu, D.Y., Han, S.N. ve Meydani, S.N., (1997). “Macrophage prostaglandin production contributes to the age-associated decrease in T cell function which is reversed by the dietary antioxidant vitamin E”, Mechanisms of Ageing and Development, 93:59–77.

[80] Jolly, C.A., (2004). “Dietary restriction and immune function”, Journal of Nutrition, 134:1853–1856.

[81] Dooley, J. ve Liston, A., (2012).” Molecular control over thymic involution: From cytokines and microRNA to aging and adipose tissue”, Eur. J. Immunol., 42: 1073–1079.

[82] Lustig, A., Weeraratna, A.T., Wood, W.W., Teichberg D., Bertak D., Carter, A., Poosala, S., Firman, S., Becker K., Zonderman A.B., Longo D.L. ve Tauba, D.D., (2007). “Transcriptome analysis of age-, gender- and diet-associated changes in murine thymus”, Cellular Immunology, 245:42–61.

[83] Meydani, S.N., Barklund, M.P., Liu, S., Meydani, M., Miller R.A., Cannon J.G., Morrow F.D., Rocklin R. ve Blumberg J.B., (1990). “Vitamin-e supplementation enhances cell-mediated-immunity in healthy elderly subjects”, American Journal of Clinical Nutrition, 52:557–63.

[84] Moore W.A., Davey V.A., Weindruch R., Walford R. ve Ivy G.O., (1995). “The effect of caloric restriction on lipofuscin accumulation in mouse brain with age”, Gerontology 2:173–85.

[85] Abe, T., Nakajima, A., Satoh, N., Ohkoshi, M., Sakuragi, S. ve Koizumi, A., (2001).”Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by dietary calorie restriction”, Japanese Journal of Ophthalmology, 45:46–52.

[86] Fernandes, G., Yunis, E.J. ve Good, R.A., (1976). “Influence of diet on survival of mice”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73:1279–1283.

[87] Friend, P.S., Fernandes, G., Good, R.A., Michael, A.F. ve Yunis, E.J., (1978). “Dietary Restrictions early and late effects on nephropathy of Nzbxnzw mouse”, Laboratory Investigation, 38:629–632.

[88] Kubo, C., Gajjar, A., Johnson, B.C. ve Good, R.A., (1992). “The effects of dietary restriction on immune function and development of autoimmune disease in Bxsb Mice”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89:3145–3149.

[89] Kubo, C., Johnson, B.C., Day, N.K. ve Good, R.A., (1992). “Effects of calorie restriction on immunological functions and development of autoimmune-disease in Nzb mice”, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 201, 192–199.

[90] Effros, R.B., Walford, R.L., Weindruch, R. ve Mitcheltree, C., (1991). “Influences of dietary restriction on immunity to influenza in aged mice”, Journals of Gerontology, 46:142–147.

[91] Greeley, E.H., Spitznagel, E., Lawler, D.F., Kealy, R.D. ve Segre, M., (2006). “Modulation of canine immunosenescence by life long caloric restriction”, Veterinary Immunology and Immunopathology, 111:287–299.

[92] Roecker, E.B., Kemnitz, J.W., Ershler, W.B. ve Weindruch, R., (1996). “Reduced immune responses in rhesus monkeys subjected to dietary restriction”, Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences, 51: 276–279.

[93] Weindruch, R., Lane, M.A., Ingram, D.K., Ershler, W.B. ve Roth, G.S., (1997). “Dietary restriction in Rhesus monkeys: lymphopenia and reduced mitogen-induced proliferation in peripheral blood mononuclear cells”, Aging-Clinical and Experimental Research, 9:304–308.

[94] Mascarucci, P., Taub, D., Saccani, S., Paloma, M.A., Dawson, H., Roth, G.S., Lane, M.A. ve Ingram, D.K., (2002). “Cytokine responses in young and old rhesus monkeys: effect of caloric restriction”, Journal of Interferon and Cytokine Research, 22:565–571.

[95] Walford, R.L., Liu, R.K., Gerbased, M., Mathies, M. ve Smith, G.S., (1973). “Long term dietary restriction and immune function in mice response to sheep red blood cells and to mitogenic agents”, Mechanisms of Ageing and Development, 2:447–454.

[96] Messaoudi, I., Warner, J., Fischer, M., Park, B., Hill, B., Mattison, J., Lane, M.A., Roth, G.S., Ingram, D.K., Picker, L.J., Douek, D.C., Mori, M. ve Nikolich-Zugich, J., (2006). “Delay of T cell senescence by caloric restriction in aged long-lived nonhuman primates”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103:19448–19453.

[97] Dixit, V.D., (2008). “Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span”, Journal of Leukocyte Biology, 84:882–892.

[98] Demas, G.E. ve Sakaria, S., (2005). “Leptin regulates energetic tradeoffs between body fat and humoural immunity”, Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 272:1845–1850.

[99] Demas, G.E., (2004). “The energetics of immunity: a neuroendocrine link between energy balance and immune function”, Hormones and Behavior, 45:173–180.

[100] Dixit, V.D., Yang, H.W., Sun, Y.X., Weeraratna, A.T., Youm, Y.H., Smith, R.G. ve Taub, D.D., (2007). “Ghrelin promotes thymopoiesis during aging”, Journal of Clinical Investigation, 117:2778–2790.

[101] Dixit, V.D., Schaffer, E.M., Pyle, R.S., Collins, G.D., Sakthivel, S.K., Palaniappan, R., Lillard, J.W. ve Taub, D.D., (2004). “Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells”, Journal of Clinical Investigation, 114:57–66.

[102] Demas, G.E., Drazen, D.L. ve Nelson, R.J., (2003). “Reductions in total body fat decrease humoral immunity”, Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 270:905–911.

[103] Tian, L.Q., Cai, Q.Y., Bowen, R. ve Wei, H.C., (1995). “Effects of caloric restriction on age-related oxidative modifications of macromolecules and lymphocyte proliferation in rats”, Free Radical Biology and Medicine, 19:859–865.

[104] Demas, G.E., (2010). “In vivo but not in vitro leptin enhances lymphocyte proliferation in Siberian hamsters (Phodopus sungorus)”, General and Comparative Endocrinology, 166:314–319.

[105] Gardner, E.M., (2005). “Caloric restriction decreases survival of aged mice in response to primary influenza infection”, Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences, 60:688–694.

[106] Sun, D.X., Muthukumar, A.R., Lawrence, R.A. ve Fernandes, G., (2001). “Effects of calorie restriction on polymicrobial peritonitis induced by cecum ligation and puncture in young C57BL/6 mice”, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 8:1003–1011.

[107] Kristan, D.M., (2007). “Chronic caloric restriction increases susceptibility of laboratory mice to intestinal nematode infection”, Aging Cell, 6(6):817-25.

[108] Kritchevsky, D., (2001). “Caloric restriction and cancer”, Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 47:13–19.

[109] Tannenbaum, A., (1945). “The dependence of tumour formation on the degree of caloric restriction”, Cancer Research, 5:609–615.

[110] Hart, R.W. ve Turturro, A., (1997). “Dietary restrictions and cancer”, Environmental Health Perspectives, 105:989–992.

[111] Longo, V.D. ve Fontana, L., (2010). “Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms”, Trends in Pharmacological Sciences, 31:89–98.

[112] Manjgaladze, M., Chen, S., Frame, L.T., Seng, J.E., Duffy, P.H., Feuers, R.J., Hart, R.W. ve Leakey, J.E.A., (1993). “Effects of caloric restriction on rodent drug and carcinogen metabolizing enzymes implications for mutagenesis and cancer”, Mutation Research, 295:201–22.

[113] Berrigan, D., Lavigne, J.A., Perkins, S.N., Nagy, T.R., Barrett, J.C. ve Hursting, S.D., (2005). “Phenotypic effects of calorie restriction and insulin-like growth factor-1 treatment on body composition and bone mineral density of C57BL/6 mice: implications for cancer prevention”, In Vivo (Athens, Greece), 19:667–674.

[114] Dirx, M.J.M., Zeegers, M.P.A., Dagnelie, P.C., Bogaard, T. ve Brandt, P.A., (2003). “Energy restriction and the risk of spontaneous mammary tumors in mice: a meta-analysis”, International Journal of Cancer, 106(5):766–770.

[115] Pape-Ansorge, K.A., Grande, J.P., Christensen, T.A., Maihle, N.J. ve Cleary, M.P., (2002). “Effect of moderate caloric restriction and/or weight cycling on mammary tumor incidence and latency in MMTV-Neu female mice”, Nutrition and Cancer-An International Journal, 44:161–168.

[116] Betteridge, D.J., (2000). “What is oxidative stress?”, Metabolism, 49:3-8.

[117] Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. ve Kalayci, O., (2012). “Oxidative Stress and Antioxidant Defense”, WAO Journal, 5:9–19.

[118] Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. ve Mazur, M., (2006). “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer”, Chem. Biol. Interact, 160:1–40.

[119] Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., (1999). “Free Radicals in Biology and Medicine”, 3rd editon, New York: Oxford University Press.

[120] Marnett, L.J., (1999). “Lipid peroxidation dDNA damage by malondialdehyde”, Mutat Res., 424:83–95.

[121] Stadtman, E.R., (2004). “Role of oxidant species in aging”, Curr. Med. Chem., 11:1105–1112.

[122] Jenner, P., (2003). “Oxidative stress in Parkinson’s disease”, Ann. Neurol., 53:26–36.

[123] Lyras, L., Cairns, N.J., Jenner, A., Jenner, P. ve Halliwell, B., (1997). “An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer’s disease”, J. Neurochem., 68:2061–2069.

[124] Sayre, L.M., Smith, M.A. ve Perry, G., (2001). “Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease”, Curr. Med. Chem., 8:721–738.

[125] Toshniwal, P.K. ve Zarling, E.J., (1992). “Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis”, Neurochem Res., 17:205–207.

[126] Dhalla, N.S., Temsah, R.M. ve Netticadan T., (2000). “Role of oxidative stress in cardiovascular diseases”, J. Hypertens., 18:655–673.

[127] Kasparova, S., Brezova, V., Valko, M., Horecky, J., Mlynarik, V., Liptaj, T., Vancova, O., Ulicna, O. ve Dobrota, D., (2005). “Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion”, Neurochem Int., 46:601–611.

[128] Kerr, S., Brosnan, M.J., McIntyre, M., Reid, J.L., Dominiczak, A.F. ve Hamilton, C.A., (1999). “Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium”, Hypertension, 33:1353–1358.

[129] Kukreja, R.C. ve Hess, M.L., (1992). “The oxygen free-radical system: from equations through membrane–protein interactions to cardiovascular injury and protection”, Cardiovascular Res., 26:641–655.

[130] Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., Itoh, H. ve Kasai, H., (1997). “Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung”, Carcinogenesis, 18:1763–1766.

[131] Merry, B.J., (2000). “Calorie restriction and age-related oxidative stress”, Molecular and Cellular Gerontology, 908:180–198.

[132] Merry, B.J., (2004). “Oxidative stress and mitochondrial function with aging the effects of calorie restriction”, Aging Cell, 3:7–12.

[133] Yu, B.P., (1996). “Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction”, Free Radical Biology and Medicine, 21:651–668.

[134] Ash, C.E. ve Merry, B.J. (2011). “The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation”, Mechanisms of Ageing and Development, 132:43–54.

[135] Aydin, C., Ince, E., Koparan, S., Cangul, I.T., Naziroglu, M. ve Ak, F., (2007). “Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat”, Cell Biochemistry and Function, 25:129–137.

[136] Aydin, C., Sonat, F., Sahin, S.K., Cangul, I.T. ve Ozkaya, G., (2009). “Long term dietary restriction ameliorates swimming exercise-induced oxidative stress in brain and lung of middle-aged rat”, Indian Journal of Experimental Biology, 47:24–31.

[137] Aksenova, M.V., Aksenov, M.Y., Carney, J.M. ve Butterfield, D.A., (1998). “Protein oxidation and enzyme activity decline in old brown Norway rats are reduced by dietary restriction”, Mechanisms of Ageing and Development, 100:157–168.

[138] Michan, S. ve Sinclair, D., (2007). “Sirtuins in mammals: insights into their biological function”, Biochemical Journal, 404:1–13.

[139] Bayram, A. ve İğci, M., (2013). “Sirtuin Genleri ve İşlevleri”, Fırat Tıp Dergisi, 18(3):136-140.

[140] Hao, C.M. ve Haase, V.H., (2010). “Sirtuins and their relevance to the kidney”, Journal of the American Society of Nephrology, 21:1620–1627.

[141] Chen, D., Bruno, J., Easlon, E., Lin, S.J., Cheng, H.L., Alt, F.W. ve Guarente, L., (2008). "Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction", Genes and Development, 22:1753–1757

[142] Kan, Y., Peshti, V., Gozlan, Y.M., Rathaus, M., Gil, R. ve Cohen, H.Y., (2008). "Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability", Febs Letters, 582:2417–2423.

[143] Masoro, E.J., (2004). "Role of sirtuin proteins in life extension by caloric restriction", Mechanisms of Ageing and Development, 125:591–594.

[144] Chen, Y.R., Fang, S.R., Fu, Y.C., Zhou, X.H., Xu, M.Y. ve Xu, W.C., (2010). "Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats", Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire, 88:715–722.

[145] Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M. ve Puigserver, P., (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 alpha and SIRT1", Nature, 434:113–118.

[146] Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J.T., Bare, O., Kim, C.L.S.H., Kim, S.H., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Wu, Z.D. ve Puigserver, P., (2007). "Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 alpha", Embo Journal, 26:1913–1923.

[147] Ghosh, H.S., McBurney, M. ve Robbins, P.D., (2010). "SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin", Plos One, 5:9199.

[148] Gillum, M.P., Erion, D.M. ve Shulman, G.I., (2011). "Sirtuin-1 regulation of mammalian metabolism", Trends in Molecular Medicine, 17:8–13.

[149] Wang, F., Nguyen, M., Qin, F.X.F. ve Tong, Q., (2007). "SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction", Aging Cell, 6:505– 514.

[150] Wang, F. ve Tong, Q., (2009). "SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPAR gamma", Molecular Biology of the Cell, 20:801–808.

[151] Shi, T., Wang, F., Stieren, E. ve Tong, Q., (2005). "SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes". Journal of Biological Chemistry, 280:13560–13567.

[152] Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J.Z., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J.M. ve Prolla, T.A., (2010). "Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction", Cell, 143:802–812.

[153] Ashraf, N., Zino, S., Macintyre, A., Kingsmore, D., Payne, A.P., George, W.D. ve Shiels, P.G., (2006). "Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer", Br. J. Cancer, 95:1056–61.

[154] Wang, X. ve. Proud, C.G., (2006). "The mTOR pathway in the control of protein synthesis", Physiology, 21:362-9.

[155] Özmen, A., (2015). “Hiperglisemik Koşullarda ve Diyabetik Plasentalarda mTOR Sinyal Yolağının Anjiyogenez Mekanizmasına Etkisi”, Akdeniz Ün. Sağlık Bilimleri Ens., Bap, Antalya.

[156] Sengupta, S., Peterson T.R., ve Sabatini, D.M., (2010). “Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress”, Mol. Cell, 40(2):310-22.

[157] Ma, X.M. ve Blenis, J., (2009). “Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control”, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 10(5):307-18.

[158] Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N., Inagaki F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N. ve Ohsumi, Y., (2005). “Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization”, Mol. Cell Biol., 25(16):7239-48.

[159] Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T. ve Hall, M.N., (1997). “The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2”, Cell, 88(4):531-42.

[160] Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. ve Sabatini, D.M., (2005). “Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor mTOR complex”, Science, 307(5712):1098-101.

[161] Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A.C., Mao, Y., Miao, R.Q., Sessa,W.C, Qin, J., Zhang, P., Su, B. ve Jacinto, E., (2008). “The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C”, EMBO J., 27(14):1932-43.

[162] Garcia-Martinez, J.M. ve Alessi, D.R., (2008). “mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid- induced protein kinase 1 (SGK1)”, Biochem J., 416(3):375-85.

[163] Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X. ve Guan, K.L., (2008). “Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling”, EMBO J., 27(14):1919-31.

[164] Zoncu, R., Efeyan, A., ve Sabatini, D.M., (2011). “mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing”, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 12(1):21-35.

[165] Sarbassov, D.D., Ali, S.M. ve Sabatini, D.M., (2005). “Growing roles for the mTOR pathway”, Curr. Opin. Cell Biol., 17(6):596-603.

[166] Jiang, W., Zhu, Z. ve Thompson, H.J., (2008). “Dietary energy restriction modulates the activity of AMP-activated protein kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin in mammary carcinomas, mammary gland, and liver”, Cancer Res., 68:5492–5499.

[167] Sharp, Z.D., (2011). “Aging and TOR: interwoven in the fabric of life”, Cellular and Molecular Life Sciences, 68:587–597.

[168] Moore, T., Beltran, L., Carbajal, S., Strom, S., Traag, J., Hursting, S.D. ve DiGiovanni, J., (2006). “Dietary energy bal- ance modulates signaling through

the Akt/mammalian target of rapamycin pathways in multiple epithelial tissues", Cancer Prev. Res., 1:65–76.

[169] Dogan, S., Johannsen, A.C., Grande, J.P. ve Cleary, M.P., (2011). "Effects of intermittent and chronic calorie restriction on mammalian target of rapamycin (mTOR) and IGF-I signaling pathways in mammary fat pad tissues and mammary tumors", Nutr. Cancer, 63(3):389-401.

[170] Delort, L., Rossary, A., Farges, M., Vasson, M. ve Caldefie-Chézet, F., (2015). "Leptin, adipocytes and breast cancer: focus on inflammation and anti-tumor immunity", Life Science, 3205(15):00232-5.

[171] Meier, U. ve Gressner, A.M., (2004). "Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin", Clin. Chem., 50:1511–1525.

[172] Pajvani, U.B. ve Scherer, P.E., (2003). "Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity", Curr. Diab. Rep., 3:207–213.

[173] Barzilai, N. ve Gupta, G., (1999). "Revisiting the role of fat mass in the life extension induced by caloric restriction", J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci., 54:89-96. .

[174] Légrádi, G., Emerson, C.H., Ahima, R.S., Flier, J.S. ve Lechan, R.M., (1997). "Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus", Endocrinology, 138(6):2569-76.

[175] Yang, H., Youm, Y.H., Nakata, C. ve Dixit, V.D., (2007). "Chronic caloric restriction induces forestomach hypertrophy with enhanced ghrelin levels during aging", Peptides, 28:1931–1936.

[176] Breese, C.R., Ingram, R.L. ve Sonntag, W.E., (1991). "Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins", J. Gerontol., 46:180–187.

[177] Dunn, S.E., Kari, F.W., French, J., Leininger, J.R., Travlos, G., Wilson, R. ve Barrett, J.C., (1997). "Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53 deficient mice", Cancer Res., 57:4667–4672.

[178] Klement, R.J. ve Fink, M.K., (2016). "Dietary and pharmacological modification of the insulin/IGF-1 system:exploiting the full repertoire against cancer", Oncogenesis, 5:193.

[179] Fontana, L., Villareal, D.T. ve Das, S.K., (2016). "Effects of 2-year calorie restriction on circulating levels of IGF-1, IGF-binding proteins and cortisol in nonobese men and women: a randomized clinical trial", Aging Cell, 15(1):22–27.

[180] Fontana, L., Weiss, E.P, Villareal, D.T, Klein, S., Holloszy, J.O., (2008). "Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans", Aging Cell, 7:681–687.

[181] Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. ve Ruddle, F.H., (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA", Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 77:7380-7384.

[182] Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K. ve Palmiter, R.D., (1985). "Factors a ecting the e ciency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs", Proc. Natl. Acad. Sci., 82:4438-4442.

[183] Hogan, B., Beddigton, R., Costantini, F. ve Lacy, E., (1994). "Manipulating the mouse embryo:A laboratory manual" Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[184] Bağış, H., "Transgenik Rodent Üretimi", Journal of Clinical and Analytical Medicine, Adıyaman, 80-85.

[185] Farber, E. ve Cameron, R., (1980). "The sequential analysis of cancer development", Adv.Cancer Res., 31:125-226.

[186] Pitot, H. ve Dragan, Y.P., (1991). "Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis" , FASEB J., 5:2280- 2286

[187] Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A. ve Henderson, B.E., (1990) "Increased celdivisionas a cause of human cancer", Cancer Res., 50:7415-7421.

[188] Ames, B.N. ve Gold, E.S., (1990). "Too many rodent carcinogens: Mito- genesis increases mutagenesis", Science, 249:970- 971.

[189] Derynck, R., Roberts, A.B., Winkler, M.E., Chen, E.Y. ve Goeddel, D.V., (1989). "Human transforming growth factor-a: precursor structure and expression in E.coli". Cell, 34:287-297.

[190] Burgess, A.W., (1989). "Epidermal growth factor and transforming growth factor "Br. Med. Bul., 45:401-424.

[191] Massague, J., (1990). "Transforming growth factor-a. A model for membrane-anchored growth factors", J. Biol. Chem., 265:21393-2139.

[192] Todaro, G.J., Fryling, C. ve DeLarco, J.E., (1980). "Transforming growth factors produced by certain human tumor cells polypeptides that interact with epidermal growth factor a receptors", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5258-5262.

[193] Derynck, R., (1988). "Transforming growth factor a", Cell, 54:593-595.

[194] Twardzik, D.R., Ranchalis, J.E. ve Todaro, G.J. (1982). "Mouse embryonic transforming growth factors related to those isolated from tumor cells", Cancer Res., 42:590-593.

[195] Rappolee, D.A., Brenner, C.A., Schultz, R., Mark, D. ve Werb, Z., (1988). "De-velopmental expression of PDGF, TGF-a and TGF-1 genes in preimplantation mouse embryos", Science, 241:1823-1825.

[196] Halter, S.A., Dempsey, P., Matsui, Y., Stokes, M.K., Graves-Deal, R., Hogan, B.L. ve Coffey R.J., (1992). "Distinctive Patterns of Hyperplasiain Transgenic Mice with Mouse Mammary Tumor Virus Transforming Growth Factor (alpha)", Am. J. Pathol., 40:1131-1146.

[197] Nurşen, D., (2014)., İmmün sistem tanıtımı, http://ichastaliklariromatoloji.medicine.ankara.edu.tr/files/2014/02/İmmünSisteminTanıtımı.html,15 Nisan 2018.

[198] Abbas, A., Lictman, A. ve Pillai, S. (2012). "Cellular and molecular immunology", 7th ed., Elsevier Saunders.

[199] Çetin Aktaş, E., (2013). "Bağışıklık Sistemi ve Yetersizlikleri", İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi, No:80.

[200] Nevşehir Üniversitesi, İmmün Sistemin Yapısı, http://bizdosyalar.nevsehir.edu.tr/.../2-sinif-immun-sistemin-yapisi, 15 Nisan 2018.

[201] Abbas, A., (2016). "Basic Immunology: Functions and Disorders Of the Immune System", Fifth Edition, Elsevier.

[202] Yula E., Sitokinler ve İmmünoregülasyon, http://www.microbiologybook.org/Turkishimmunol/immunolchapter13turk.htm, 15 Nisan 2018.

[203] Badur, S. , (2013). "Bağışıklık Sistemi ve Yetersizlikleri", İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi No: 80

[204] Ribatti, D., Crivellato, E. ve Vacca, A., (2006). "Miller's seminal studies on the role of thymus in immunity", Clinical and Experimental Immunology, 144:371–375

[205] Billingham, R.E., Brent, L. ve Medawar, P.B., (1956). "Quantitative studies on tis- sue transplantation immunity III Actively acquired tolerance", Philos Trans. R. Soc. Lond., 239:357–412.

[206] Gowans, I.L., Gesner, B.M. ve McGregor, D.D., (1961). "The immunological activ- ities of lymphocytes", Biological activity of leucocyte, Ciba Foundation Study Group. London: Churchill, 1961:32–4.

[207] Çolak, T. ve Bamaç, B., Timus anatomisi, www.toraks.org.tr, 15 Nisan 2018.

[208] Elma, B. Timus Anatomisi, Mediyasten Hastalıkları ve Cerrahisi, Bölüm 3.

[209] Crick, F., (1970). "Central dogma of molecular biology", Nature, 227:561–563.

[210] Crick, F., (1958). "On protein synthesis", Symp. Soc. Exp. Biol., 12:138–163.

[211] Kukurba, K. R. ve Montgomery, S. B., (2015). "RNA Sequencing and Analysis" Cold Spring Harb. Protoc., 11: 951–969.

[212] Wang, Z., Gerstein, M. ve Snyder, M., (2009). “RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics”, Nat. Rev. Genet., 10:57–63.

[213] Mattick, J.S. ve Makunin, I.V., (2006). “Non-coding RNAs”, Hum. Mol. Genet., 1:17-29.

[214] Stefani, G. ve Slack, F.J., (2008). “Small non-coding RNAs in animal development”, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 9(3):219-30.

[215] FANTOM Consortium, RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team, (2002). “Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs”, Nature, 420(6915):563-73.

[216] Guttma, M., (2009). “Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals”, Nature, 458(7235):223-7.

[217] Wilusz, J.E., Sunwoo, H. ve Spector, D.L., (2009). “Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world”, Genes Dev., 23(13):1494-504.

[218] Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. ve Brown P.O., (1995). “Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray”, Science, 270(5235):467-70.

[219] Casneuf, T., Van de Peer, Y. ve Huber, W., (2007). “In situ analysis of cross-hybridisation on microarrays and the inference of expression correlation”, BMC Bioinformatics, 8:461.

[220] Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B. ve Moreno, R.F., (1991). “Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project”, Science, 252(5013):1651-6.

[221] Itoh, K., Matsubara, K. ve Okubo, K., (1994). “Identification of an active gene by using large-scale cDNA sequencing”, Gene, 140(2):295-6.

[222] Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. ve Kinzler, K.W., (1995). “Serial analysis of gene expression”, Science, 270(5235):484-7.

[223] Shiraki, T., Kondo, S., Katayama, S., Waki, K., Kasukawa, T., Kawaji, H., Kodzius, R., Watahiki, A., Nakamura, M., Arakawa, T., Fukuda, S., Sasaki, D., Podhajska, A., Harbers, M., Kawai, J., Carninci, P. ve Hayashizaki, Y., (2003). “Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage”, Proc. Natl. Acad. Sci., 100(26):15776-81.

[224] Rudloff, U., Bhanot, U., Gerald, W., Klimstra, D.S., Jarnagin, W.R., Brennan, M.F. ve Allen, P., (2010). “Biobanking of human pancreas cancer tissue: impact of ex-vivo procurement times on RNA quality”, Ann. Surg. Oncol., 17(8):2229-36.

[225] Thompson, K.L., Pine, P.S., Rosenzweig, B.A., Turpaz, Y. ve Retief, J., (2007). "Characterization of the effect of sample quality on high density oligonucleotide microarray data using progressively degraded rat liver RNA", BMC Biotechnol., 7:57.

[226] Christodoulou, D.C., Gorham, J.M., Herman, D.S. ve Seidman, J.G., (2011). "Construction of normalized RNA-seq libraries for next-generation sequencing using the crab duplex-specific nuclease", Curr. Protoc. Mol. Biol., Chapter 4.

[227] Lister, R., O'Malley, R.C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Berry, C.C., Millar, A.H. ve Ecker, J.R., (2008). "Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis", Cell, 133(3):523-36.

[228] Parkhomchuk, D., Borodina, T., Amstislavskiy, V., Banaru, M., Hallen, L., Krobitsch, S., Lehrach, H. ve Soldatov, A., (2009). "Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA", Nucleic Acids Res., 37(18):123.

[229] Metzker, M.L., (2010). "Sequencing technologies - the next generation", Nat. Rev. Genet., 11(1):31-46.

[230] llumina Cambridge Ltd., (2008). "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry", Nature, 456(7218):53-9.

[231] Fu, G.K., Xu, W., Wilhelmy, J., Mindrinos, M.N., Davis, R.W., Xiao, W. ve Fodor, S.P., (2014). "Molecular indexing enables quantitative targeted RNA sequencing and reveals poor efficiencies in standard library preparations", Proc. Natl. Acad. Sci., 111(5):1891-6.

[232] Lappalainen, T., Sammeth M., (…), Dermitzakis, E.T., (2013). "Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans", Nature, 501(7468):506-11.

[233] Pickrell, J.K., Marioni, J.C., Pai, A.A., Degner, J.F., Engelhardt, B.E., Nkadori, E., Veyrieras, J.B., Stephens, M., Gilad, Y. ve Pritchard, J.K., (2010). "Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing", Nature, 464(7289):768-72.

[234] Lin, W., Piskol, R., Tan, M.H. ve Li, J.B., (2012). "Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome", Science, 335(6074):1302

[235] Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. ve Salzberg, S.L., (2009). "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome", Genome Biol., 10(3):25.

[236] Li, H. ve Durbin, R., (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform", Bioinformatics, 25(14):1754-60.

[237] Wu, T.D. ve Nacu, S., (2010). “Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads”, Bioinformatics, 26(7):873-81.

[238] Wang, K., Singh, D., Zeng, Z., Coleman, S.J., Huang, Y., Savich, G.L., He, X., Mieczkowski, P., Grimm, S.A., Perou, C.M., MacLeod, J.N., Chiang, D.Y., Prins, J.F. ve Liu, J., (2010). “MapSplice: accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery”, Nucleic Acids Res., 38(18):178.

[239] Grant, G.R., Farkas, M.H., Pizarro, A.D., Lahens, N.F., Schug, J., Brunk, B.P., Stoeckert, C.J., Hogenesch, J.B. ve Pierce, E.A., (2011).” Comparative analysis of RNA-Seq alignment algorithms and the RNA-Seq unified mapper (RUM)”, Bioinformatics, 27(18):2518-28.

[240] Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zalesk,i C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. ve Gingeras, TR., “STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner”, Bioinformatics, 29(1):15-21.

[241] Trapnell, C., Pachter, L. ve Salzberg, S.L., (2009). “TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq”, Bioinformatics, 25(9):1105-11.

[242] Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J. ve Pachter, L., (2010). “Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation”, Nat. Biotechnol., 28(5):511-5.

[243] Roberts, A., Pimentel, H., Trapnell, C. ve Pachter, L., (2011). “Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq”, Bioinformatics, 27(17):2325-9.

[244] Robertson, G., Schein, J., Chiu, R., Corbett, R., (…), Hoodless, P.A., ve Birol, I., (2010). “De novo assembly and analysis of RNA-seq data”, Nat. Methods, 7(11):909-12.

[245] Griebel, T., Zacher, B., Ribeca, P., Raineri, E., Lacroix, V., Guigó, R. ve Sammeth M., (2012). “Modelling and simulating generic RNA-Seq experiments with the flux simulator”, Nucleic Acids Res., 40(20):10073-83.

[246] Katz, Y., Wang, E.T., Airoldi, E.M. ve Burge, C.B., (2010). “Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation”, Nat. Methods, 7(12):1009-15.

[247] Anders, S., McCarthy, D.J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G.K., Huber, W. ve Robinson, M.D., (2013). “Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor”, Nat. Protoc., 8(9):1765-86.

[248] Roberts, A., Trapnell, C., Donaghey, J., Rinn, J.L. ve Pachter, L., (2011). “Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias”, Genome Biol., 12(3):22.

[249] Grant, G.R., Liu, J. ve Stoeckert, C.J., (2005). “A practical false discovery rate approach to identifying patterns of differential expression in microarray data”, Bioinformatics, 21(11):2684-90.

[250] Cui, X. ve Churchill, G.A., (2003). “Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments”, Genome Biol., 4(4):210.

[251] Trapnell, C., Hendrickson, D.G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J.L. ve Pachter, L., (2013). “Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq”, Nat. Biotechnol., 31(1):46-53.

[252] Anders, S. ve Huber, W., (2010). “Differential expression analysis for sequence count data”, Genome Biol., 11(10):106.

[253] Wang, L., Feng, Z., Wang, X. ve Zhang, X. (2010). “DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data”, Bioinformatics, 26(1):136-8.

[254] Robinson, M.D., McCarthy, D.J. ve Smyth, G.K., (2010), “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data”, Bioinformatics, 26(1):139-40.

[255] Bullard, J.H., Purdom, E., Hansen, K.D. ve Dudoit, S.,(2010). “Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments”, BMC Bioinformatics, 11:94.

[256] Auer, P.L. ve Doerge, R.W., (2010). “Statistical design and analysis of RNA sequencing data”, Genetics, 185(2):405-16.

[257] Liu, Y., Zhou, J. ve White, K.P., (2014). “RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication?”, Bioinformatics, 30(3):301-4.

[258] Matsui, Y., Halter, S.A., Holt, J.T, Hogan, B.L. ve Coffey, R.J., (1992). “Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF alpha transgenic mice”, Cell, 61:1147-1155.

[259] Lundy, J., Schuss, A., Stanick, D., Mccormack, E.S., Kramer, S. ve Sorvillo, J.M., (1991). “Expression of neu protein, epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in breast cancer”, Am. J. Pathol., 138:1527-1534.

[260] Rajkumar, T. ve Gullick, W.J, (1994). “The type I growth factor receptors in human breast cancer”, Breast Cancer Res., 29:3-9.

[261] Panico, l., D'Antonio, A., Salvatore ,G., Tortora,, G., De Laurentiis, M., De Placido, S., Giordano, T., Merino, M., Salomon, D.S., (..), (1996). “Differential immnohistochemical detection of transforming growth factor alpha, amphiregulin and crIPto in human normal and malignant breast tissues”, Int. J. Cancer, 65:51-56.

[262] Trapnell, C., (2012). “Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks”, Nature Protocols, 7:562–578.

[263] R Core Team, (2014). “R: a Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing,” Vienna, Austria.

[264] Liu, G.F., Cheng, H.J., You, W., Song, E.L., Liu, X.M. ve Wan, F.C., (2015). “ Transcriptome profiling of muscle by RNA-Seq reveals significant differences in digital gene expression profiling between Angus and Luxi cattle”, Animal Production Science, 55(9):1172-1178.

[265] Gen Ontology Consortium, Gen Ontolojisi, http://www.geneontology.org, 1 Kasım 2017.

[266] Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., John H Morris, Kuhn, M., Wyder S., Simonovic, M., Santos A., Doncheva, N.T., Roth A., Bork, P., Jensen L.J., ve Mering, C., (2017). “The STRING database in 2017:quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible”, Nucleic Acids Res., 45:362-68.

[267] Mori, M.A., Liu, M., Bezy, O., Almind, K., Shapiro, H., Kasif, S. ve Kahn, C.R., (2010). “A systems biology approach identifies inflammatory abnormalities between mouse strains prior to development of metabolic disease”, Diabetes, 59(11), 2960-71.

[268] Kurki, E., Shi J., Martonen, E., Finckenberg, P. ve Mervaa, E., (2012). “Distinct effects of calorie restriction on adipose tissue cytokine and angiogenesis profiles in obese and lean mice”, Nutrition & Metabolism, 9:64.

[269] Lee, H., JinJungaJung, K., Hyon, W.K., Byung, J.K., Hae, P.Y. ve Chunga, Y., (2004). “Suppression of apoptosis by calorie restriction in aged kidney”, Ex. Gerontology, 39:1361-1368.

[270] RNA-Seq Blog, FPKM, https://www.rna-seqblog.com/rpkm-fpkm-and-tpm-clearly-explained/, 15 Nisan 2018.

[271] Kul, S., P-değeri, http://www.p005.net/pdegerinedir, 15 Nisan 2018.

[272] Wikipedia, Kat Değişiklik, https://en.wikipedia.org/wiki/Fold_change, 15 Nisan 2018.

[273] Wikipedia, False Discovery Rate, https://en.wikipedia.org/wiki/False_discovery_rate, 15 Nisan 2018.

[274] Omeroğlu Ulu, Z., Ulu, S., Dogan, S., Guvenc Tuna, B. ve Ozdemir Ozgenturk, N., (2018). “Transcriptome Analysis of the Thymus in Short-Term Calorie-Restricted Mice Using RNA-seq”, Int. J. Genomics, 2018:7647980.

[275] Barger, J.L., Walford, R.L. ve Weindruch, R., (2003). "The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era", Exp. Gerontol., 38:1343–1351.

[276] Bishop, N.A. ve Guarente, L., (2007). "Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans," Nat. Rev. Genet., 8:835–844.

[277] Chen, Y., Ling, L., Su, G., Han, M., Fan, X., Xun, P., Xu, G. (2016). "Effect of Intermittent versus Chronic Calorie Restriction on Tumor Incidence: A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies", Sci Rep., 6:33739.

[278] White M.J., Beaver C.M., Goodier M.R., Bottomley, C., Nielsen, C.M., Wolf, A.F., Boldrin, L., Whitmore, C., Morgan, J., Pearce, D.J. ve Riley, E.M. (2017). "Calorie Restriction Attenuates Terminal Differentiation of Immune Cells", Front. Immunol., 7:667.

[279] Gene Ontoloji Consortium, GO:0003824 terimi, http://amigo2a.stanford.edu/amigo/term/GO:0003824, 1 Kasım 2017.

[280] Gene Ontoloji Consortium, GO:0005488 terimi, http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005488, 1 Kasım 2017.

[281] Gene Ontoloji Consortium, GO:0008152 terimi, http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0008152, 1 Kasım 2017.

[282] Gene Ontoloji Consortium, GO:0009987 terimi, http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0009987, 1 Kasım 2017.

[283] Gene Ontoloji Consortium, GO:0044464 terimi, http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0044464, 1 Kasım 2017.

[284] Gene Ontoloji Consortium, GO:0043226 terimi, http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0043226, 1 Kasım 2017.

[285] Fontana, L., Partridge, L. ve Longo, V.D., (2010) "Extending healthy life span from yeast to humans", Science, 328:321–326.

EK-A

ETİK KURULU RAPORU

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU
(YÜDHEK)

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
27.03.2014	390	21.03.2014 Tarihli Yazı	Yrd.Doç.Dr. Soner DOĞAN

"MMTV-TGF- Farelerinde Meme Tümörü Gelişiminin Aralıklı Kalori Kısıtlaması ile Önlenmesinde Adipokinlerin Epigenetik Modifikasyonunun ve mikroRNA'ların Rollerinin Belirlenmesi." adlı bilimsel çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 3 Yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Raportör	Prof. Dr. Işıl Aksan KURNAZ	
Üye	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	KATILMADI
Üye	Prof. Dr. Başar ATALAY	KATILMADI
Üye	Yard.Doç.Dr.Soner DOĞAN	KATILMADI
Üye	Yard. Doç. Dr. Ediz DENİZ	
Üye	Doç. Dr. C. Narter YEŞİLDAĞLAR	KATILMADI
Üye	Sumru KİRAZCI	

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Zehra ÖMEROĞLU ULU

Doğum Tarihi ve Yeri :24.10.1981 Kolonya-Almanya

Yabancı Dili :İngilizce

E-posta :zehraomeroglu.ulu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2010
Lisans	Biyoloji	Ege Üniversitesi	2006
Ön Lisans	Tıbbi Laboratuvar	Afyon Kocatepe Üniversitesi	2001

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2015-2016	YTÜ	Asistan Öğrenci
2009-2010	YTÜ	Asistan Öğrenci
2006-2007	MEB-Lise	Öğretmen

YAYINLARI

Makale

1. Ozdemir Ozgenturk N., Omeroglu Ulu Z., Ulu S., Un C., Oztabak K.O., Altunatmaz K., (2017). “Preparing and Analyzing Expressed Sequence Tags (ESTs) Library for the Mammary Tissue of Local Turkish Kivircik Sheep”, International Journal of Genomics, 1-11.
2. N. Ozdemir Ozgenturk, G. Turan, N.H. Aydın, S. Ulu, Z. Omeroglu Ulu, (2017). “The Detection of SSRs from Olive (Olea europaea L.) EST Collection by Comparing 4 Different Bioinformatics Softwares”, Sigma J. Eng & Nat. Sci., 35(4):763-770.
3. Omeroğlu Ulu Z., Ulu S., Dogan S., Guvenc Tuna B. ve Ozdemir Ozgenturk N., (2018). “Transcriptome Analysis of the Thymus in Short-Term Calorie-Restricted Mice Using RNA-seq”, Int. J. Genomics, 2018:7647980.
4. Ozdemir Ozgenturk N., Omeroglu Ulu Z., Ulu S., Celik M., Tellioglu B., Yıldırım F., Akıs Akad I., Gurel A., Un C., Oztabak K., (2018). ”Analysis of Expressed Genes in Normal and Tumoral Mammary Gland Tissue of the Terrier Dog”, Kafkas Universitesi Vet. Fak. Derg., 24(3):357-364.

Bildiri

1. Nehir Ozdemir Ozgenturk, Zehra Omeroglu Ulu, Soner Dogan, Bilge Guvenc Tuna ve Salih Ulu, Pathways and co-expression network analysis of immune-related genes in short-term calorie restricted mice, J. Mol. Genet. Med 2018, Vol 12-49, İspanya
2. Nehir Ozdemır Ozgenturk, Ali Yasir Koc, Zehra Omeroglu Ulu, Soner Dogan, Bilge Guvenc Tuna ve Salih Ulu, Comparison of the Effect of caloric restriction types on the expression of some cancer-associated genes via RNA-seq, J. Mol. Genet. Med 2018, Vol 12-88, İspanya
3. N. Ozdemir Ozgenturk, Zehra Omeroglu Ulu, Soner Dogan, Bilge Guvenc Tuna ve Salih Ulu, RNA-seq based transcriptome analysis of thymus tissues of MMTV-TGF-α mice in calorie restriction fed, 3th International Conference on Transcriptomics,30-31. 10.2017, Bangkok
4. N. Ozdemir Ozgenturk, S. Ulu, Z. Omeroglu Ulu, A. Akar, Preparation of de novo transcriptome analysis from Turkish Filbert (Corylus colurna L.) and Tombul hazelnut (Corylus avellana L. Tombul), 3 th International Conference on Transcriptomics,30-31. 10.2017, Bangkok
5. N. Ozdemir Ozgenturk, B. Yirmibes, Z. Omeroglu Ulu, H.N. Aydın, S. Ulu, Detection of Some Conserved microRNA’s in Hazelnut (Corylus colurna L. and Corylus avellena L.), International Green Biotechnology Congress, 11-13.09, 2017, Istanbul.
6. S. C. Gonenc, Z. Ulu, H. N. Aydin, S. Ulu, B. Yirmibes, N. Ozdemir Ozgenturk, Analyze of Some Conserved miRNA in Olea europaea, International Green Biotechnology Congress, 11-13.09, 2017, Istanbul.

7. Z. Omeroglu Ulu, S. Ulu, S. Dogan, B. Guvenc Tuna, N. Ozdemir Ozgenturk Preparation of RNA-Seq analysis from Mouse thymus fed short-term calorie restriction. International DNA Day and Genome Congress (IDDGC), April 24-28, 2017, Kırşehir.
8. B. Yirmibes, H.N. Aydın, Z. Omeroglu Ulu, S. Ulu, N. Ozdemir Ozgenturk, Analyze of some protected miRNA in Corylus avallena L, International DNA Day and Genome Congress (IDDGC), April 24-28, 2017, Kırşehir.
9. S. C. Gonenc, Z. Ulu, H. N. Aydin, S. Ulu, B. Yirmibes, N. Ozdemir Ozgenturk, Analyzing of certain conserved miRNA in Olea europaea, International Congress on Fundamental and Applied Sciences, 22-26 Agustos 2016, ID–ICFAS2016: 1233, Istanbul.
10. Z. Omeroglu, C. Un, K. Oztabak, K. Altunatmaz, S. Ulu, N. Ozdemir Ozgenturk, GO Analysis of ESTs in Kivircik Sheep Mammary Gland cDNA Library, HIBIT 2015 The 9th International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics, 16-17.10.2015, Muğla.
11. N. Ozdemir Ozgenturk, Z. Omeroglu, S. Ulu, D. Koptekin, C. Un, Computational Prediction miRNA Candidates in Olive EST Library, HIBIT 2015 The 9th International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics, 16-17.10.2015, Muğla.
12. N. Ozdemir Ozgenturk, Z. Ömeroğlu Ulu, S. Ulu, D. Koptekin, C. Un, Computational Identification of miRNA Targets Using Olive Library, Post-Transcriptional Gene Regulation in Plants, 10-11.07.2015, Paris.
13. N. Ozdemir Ozgenturk, B. Tellioglu, S. Ulu, Z. Ömeroglu Ulu, Construction and Comparison of EST Library for Expressed Genes in Normal and Tumoral Mammary Gland Tissue of the Terrier Dog, International Symposium on Molecular Chemistry, 18-19. 12. 2014, İstanbul.
14. Z. Omeroglu Ulu, C. Un, K. Oztabak, A. Yılmaz, N. Ozdemir, Analyses of EST Collection from Prenatal and Postnatal Mammary Tissue of Sheep, HIBIT 2013 The 8th International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics 25-27.09.2013, Ankara.
15. N. Ozdemir, Z. Omeroglu, F. Oruç, C. Un, K. Oztabak, K. Altunatmaz, “Generating of Expressed Sequence Tags (ESTs) for the Mammary Tissue of Local Turkish Kivircik Sheep’’ The International Congress on Bioinformatics and Biomics 18-22 Mayıs 2011, Kuşadası.
16. Z. Omeroglu, F. Oruç, C. Un, K. Oztabak, K. Altunatmaz, N. Ozdemir, "Comparing Fragment Assembly Programs with Kıvırcık Sheep Mammary Gland EST’s Library", 1st International Symposium on Computing in Science and Engineering, Kusadası, Turkey, 3-5 June 2010.
17. F. Oruc, N. Ozdemir, U. Sezerman, Z. Omeroglu, S. Vural Korkut, C. Un, "Using Different Bioinformatic Softwares for Olive EST Collection", 1st International Symposium on Computing in Science and Engineering, 79 pp., Kusadası, Turkey, 3-5 June 2010.

18. Z. Omeroglu, F. Oruç, C. Un, K. Oztabak, K. Altunatmaz, N. Ozdemir, "EST Library Construction for the Mamary Tissue of Local Turkish Kivircik Sheep", HIBIT'10 The Fifth International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics, 45 pp., Antalya, Turkey, 20-22 April 2010.

Proje

1. DOP- Kalori Kısıtlaması İle Beslenen MMTV-TGF-α Farelerin Farklı Dokularından RNA-seq Analizi (2016-…)
2. BAP-Yeni Nesil Dizileme ile Türk fındığı Corylus colurna L. ile Tombul Fındığın Corylus avellana L. Transkriptom Analizlerinin Yapılması ve Karşılaştırılması (2017-…)

ÖDÜLLERİ

1. Tübitak 2211 Yurtiçi Doktora Bursu (2015-2018)