T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALORİ KISITLI DİYETLE BESLENEN FARELERİN TİMÜS DOKUSUNDA YAŞLANMA İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Mart, 2020

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALORİ KISITLI DİYETLE BESLENEN FARELERİN TİMÜS DOKUSUNDA YAŞLANMA İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru KILIÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 11.03.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr.Öğr.Üyesi Akın SEVİNÇ, Üye
Altınbaş Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Kalori Kısıtlı Diyetle Beslenen Farelerin Timus Dokusunda Yaşlanma ile İlişkili Genlerin İfadelerinin Araştırılması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ebru KILIÇ

Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunulan bu çalışma, Acıbadem Üniversitesi Triogen laboratuvarında bulunun cihazı hizmet alımı ile kullanılması yoluyla yapılmıştır.

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi, deneyimi ve yardımlarıyla beni yönlendiren, zamanını, desteği ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Tezde kullanılan doku örneklerinin temini konusunda yardımcı olan Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Soner DOĞAN'a, Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu sürecinde laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Acıbadem Üniversitesi Medikal Biyoteknoloji Bölümünde doktora öğrencisi sevgili Elif Merve AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezin oluşturulması sürecinde bilimsel katkıları ve yönlendirmeleriyle destek olan Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun sevgili Dr. Zehra ÖMEROĞLU ULU'ya ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ebru KILIÇ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ vii
KISALTMA LİSTESİ viii
ŞEKİL LİSTESİ ix
TABLO LİSTESİ x
ÖZET xi
ABSTRACT xiii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 7
1.3 Hipotez 7
2 GENEL BİLGİLER 8
2.1 Kalori Kısıtlaması 8
2.2 Beslenme ve Bağışıklık 12
2.2.1 Beslenme ve Bağışıklık Dengesi 12
2.2.2 Timüs 15
2.3 Yaşlanma 15
2.4 Transkriptom 16
2.4.1RNA-seq Data Analizleri 16
2.5 Gerçek Zamanlı PCR 20
3 MATERYAL VE METHOD 24
3.1 Materyaller 24
3.1.1 Kullanılan Hayvan Materyal 24
3.1.2 Kullanılan Biyoinformatik Veriler 25
3.2 Metot 25
3.2.1 Genlerin Belirlenmesi 25
3.2.2 RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi 27
3.2.3 RNA İzolasyonu ve RNA Miktar Tayini 27

3.2.4 RNA Jel Elektroforez 28
3.2.5 Primer Tasarlama 29
3.2.6 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi 29
3.2.7 Gerçek Zamanlı PCR 30
4 SONUÇ VE ÖNERİLER 32
4.1 Sonuçlar 32
4.1.1 Genlerin Belirlenmesi 32
4.1.2 RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi Sonuçları 32
4.1.3 RNA Miktar Tayini Sonuçları 33
4.1.4 RNA Jel Elektroforezi 33
4.1.5 Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları 34
4.2 Öneriler 39
KAYNAKÇA 48
A 2- ΔΔCt Hesaplamaları 56
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 67

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
C_t	Eşik değeri döngüsü
µg	Mikro gram
µL	Mikro litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
p	Olasılık değeri
sn	Saniye
°C	Santigrat derece
g	Yerçekimi kuvveti

KISALTMA LİSTESİ

AKK	Aralıklı Kalori Kısıtlama
AL	*Ad Libitum*
AMP	Adenozin Mono fosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
DEGs	Farklı Oranda Ekspresse Olan Genler
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
KKK	Kronik Kalori Kısıtlama
MMTV	Fare Meme Tümör Virüsü
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
NGS	Yeni Nesil Dizileme
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNA-seq	RNA Sekanslama
TGF-α	Dönüşüm Büyüme Faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Metabolik sistem ve immün sistem arasındaki ilişkinin şekilsel gösterimi 13
Şekil 2.2 RNA-seq aşamaları 17
Şekil 2.3 Sekanslama ve sinyal okunmasının şekilsel gösterimi 18
Şekil 2.4 GO:0002706 numaralı, lenfosit aracılığıyla bağışıklığın düzenlenmesinin, biyolojik süreç anatasyon ağacında gösterimi 20
Şekil 2.5 Gerçek Zamanlı PCR fazları ve amplifikasyon eğrisi grafiği 22
Şekil 4.1 RNA seq. Heatmap sonuçları 32
Şekil 4.2 RNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (soldan sağa örnek numaraları 169, 164, 203, 95, 107, 133, 64, 88, 18) 33
Şekil 4.3 OPA1 ve KRT14'e ait çoğalma eğrisi grafiği 34
Şekil 4.4 OPA1 ve KRT14'e ait erime eğrisi grafiği 34
Şekil 4.5 TRP53'e ait erime eğrisi grafiği 35
Şekil 4.6 APOD ve CAV1'e ait erime eğrisi grafiği 35
Ş**ekil 4.7** SCP2, SOD1, TBX2, TOP2B ve RSL1D1'e ait erime eğrisi grafiği 36
Şekil 4.8 18. Hafta ekspresyon seviyeleri 37
Şekil 4.9 50. Hafta ekspresyon seviyeleri 38
Şekil 4.10 80. Hafta ekspresyon seviyeleri 39

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 17 ile 18. haftalarda sakrifiye edilen farelerin kalori alım oranı tablosu 24

Tablo 3.2 Altromin TPF1414 diyetin bileşenleri 25

Tablo 3.3 Belirlenen genlerin Forward ve Reverse Primer dizileri 26

Tablo 3.4 Yükleme için RNA Örneklerinin Hazırlanması 29

Tablo 3.5 cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve hacimleri 30

Tablo 3.6 PCR reaksiyonları için gerekli hacmi içeren bileşenler 30

Tablo 3.7 Q-PCR reaksiyonları için gerekli olan sıcaklık değerleri ve süreleri 31

Tablo 4.1 İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık ölçüm değerleri 33

Tablo 4.2 GAPDH, Wrnip1, Trp53, Top2b, Tbx2, Sod1, Smc5, Scp2, Opa1, Krt14, Coq7, Cdkn1, Cav1, Bcl6, Apod, Rsl1d genlerinin ortalama Ct değerleri 36

Tablo 4.3 Belirlenen genlerin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri 37

ÖZET

Kalori Kısıtlı Diyetle Beslenen Farelerin Timus Dokusunda Yaşlanma ile İlişkili Genlerin İfadelerinin Araştırılması

Ebru KILIÇ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Diyet ve yaşlanma arasındaki ilişkiye ilgi her geçen gün artıyor. Araştırmalar kalori kısıtlı diyetler ve bazı antioksidanların çeşitli yaşlanma modellerinde yaşam süresini uzattığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Timüs, diğer lenfoid organlar gibi besin eksikliğine hızlı cevap verir. Kalori kısıtlanması, yetersiz beslenme olmaksızın kalori alımının azaltılmasıdır. Yeditepe Üniversitesi ile bölümümüzde ortak yapılan bir çalışmada, 2 farklı kalori kısıtlı ve normal diyetle beslenen 18 haftalık Fare Tümörü Virüsü Dönüştürücü Büyüme Faktörü-α (MMTV TGF-α) farelerinin timüs dokularından yeni nesil dizileme teknolojisine göre 3 RNA-seq datası elde edilmiş ve biyoinformatik analizleri sonucu "totalde 6091 farklı şekilde ifade edilen genlere" (DEGs) ($p<0.05$) ulaşılmıştır. Bu çalışmada öncelikle gen data bankalarından belirlenen yaşlanma ile ilişkili 15 gen, üç farklı RNA-seq DEG dataları içinde araştırılmış ve ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. DEG sonucuna göre beslenme farklılığına göre ekspresyon seviyesi farklılık gösteren genlerin, dokular ekspresyonun validasyonu Real Time PCR ile yapılmıştır. Real Time PCR

için 18, 51 ve 81. haftadaki fare timüs dokularından elde edilen total RNA dan cDNA sentezi yapılmıştır. Böylece farklı beslenme tarzı uygulamalarının,yaşlanma ile ilişkili olan genlerin ifadesinde, yaşamın erken, orta ve geç zamanlarında ekspresyon seviye farklılıkları gözlemlenmiştir. Aynı miktarda enerji girdisi olup farklı kalori kısıtlaması türleri uygulanmış farelerde gen ifadesinde farklılıklar olduğu kaydedildi. Böylece, kalori kısıtlamasının yanı sıra, beslenme tipinin de yaşlanmada etkili olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kalori kısıtlaması, yaşlanma, RNA-seq, gerçek zamanlı PCR

ABSTRACT

Investigation of the Expression of Aging Related Genes in Thymus Tissue of Mice with a Calorie Restricted Diet

Ebru KILIÇ

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Adviser: Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Interest in the relationship between diet and aging is increasing day by day. Studies have shown that calorie-restricted diets and some antioxidants prolong life in various aging models. The thymus, like other lymphoid organs, responds quickly to nutrient deficiency. Calorie restriction is the reduction of calorie intake without malnutrition. In a study conducted with Yeditepe University in our department, 3 RNA-seq data were obtained from thymus tissues of 18-week-old Mouse Tumor Virus Transforming Growth Factor-α (MMTV TGF-α) mice which were fed 2 different calorie restricted and normal diet. With RNAseq data by the new generation sequencing technology and according to result of the bioinformatic analysis "total 6091 expressed genes in different ways DEG (DEGs) ($p < 0.05$)'' was reached. In this study, 15 genes related to aging determined primarily from gene data banks were investigated in three different RNA-seq DEG data and their expression levels were determined. The validation of the expression of the genes with different levels of expression according to the difference in nutrition according to DEG results was performed by Real Time PCR. For Real Time PCR, cDNA was synthesized from total RNA obtained from mouse thymus tissues at 18, 51 and 81 weeks. Thus, differences in expression levels of different

nutrition styles, expression of genes associated with aging, early, middle and late times of life were observed. Differences in gene expression were noted in mice with the same amount of energy input and different types of calorie restriction. Thus, in addition to calorie restriction, the type of nutrition is thought to be effective in aging.

Keywords: Calorie restriction, aging, RNA-seq, real time PCR

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kalori kısıtlamasının omurgalı ve omurgasızlarda yaşam süresini uzattığına ilişkin pek çok kanıt vardır. Bununla birlikte fizyolojiyi etkileyen bazı değişiklerle sebep olduğuna ilişkin çalışmalar da mevcuttur. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun ve zararlarının azalması, tümör oluşumunun azalması, patojenik vakaların azalması, immün fonksiyonların değişmesi bu fizyolojik değişiklerinin bazılarıdır [1]. Fizyolojik değişikliklerin başlangıcı kalori kısıtlama süresi ile değişir. Kemirgenlerde yapılan kalori kısıtlama çalışmalarında Kronik Kalori Kısıtlaması (KKK)'nin, Ad Libitum (AL) beslenmeye göre baskılayıcı tümör gelişiminde, otoimmünite baskılanmasında ve yaşam süresinin uzamasında daha etkili bir deneysel manipülasyon aracı olduğu bildirilmiştir [2].

Yapılan araştırmalar, oksidatif hasarın meyve sineği (*Drosophila melanogaster*) modelinin yaşam süresi üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Doğal SOD (Super Oksit Dismutaz)'a ek olarak sığır SOD verilen yetişkin sineklerin, oksidatif streslere karşı daha dirençli oldukları ve ortalama ömürlerinde önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir. SOD (Süper Oksit Dismutaz) ve katalazın düzenlenmesi ve serbest radikallerin oluşumunun baskılanması ve endojen enzimatik savunma kapasitesinin arttırılması yoluyla yaşlanma karşıtı aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir [3].

Metabolik ve immün sistemler arasında sıkı bir bağlantı vardır. Sitokinler ve kemokinler bu iki sistem arasında iletişimi sağlar. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda obezitenin bağışıklık eksikliği ve kronik inflamasyonla ilişkili olduğu ve olgunluk öncesi ölümlere sebep olabileceği bildirilmiştir. Bunun tam zıttı etki göstererek, kalori kısıtlamasının enerjitik dengeyi bunun tersine çevirerek bağışıklığı güçlendirdiği ve anti kanser, anti yaşlanma etkili süreçleri etkilediği belirtilmiştir [4].

Yüksek verime sahip RNA sekanslamanın en büyük avantajlarından biri, qRT-PCR kullanarak yapılabilen doğrudan tahminlerdir. Jung vd. tarafından yapılan çalışmaya göre RNA-seq çalışmaları transkriptom analizlerinde farklı oranda ifade olmuş genlerin tespitinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. RNA-seq yönteminin sonuçları birçok çalışmada Real Time PCR ile onaylanır.[5]

Dergunova vd. 'nın yaptıkları çalışmada yüksek verimli RNA sekanslama (RNA-Seq), geçici orta serebral arter tıkanması (tMCAO (*Transient Middle Cerebral Artery Occlusion*))'ndan sonra iskemi ile yarım küre hasarından kaynaklanan sıçan beyinlerinin subkortikal yapılarında diferansiyel olarak eksprese edilen genlerin (DEGs) varlığını ortaya koymuşlardır. Ekspresyonunun değiştiği tespit edilen 20 genin ekspresyonunun gerçek zamanlı RT-PCR ile analizi RNA-Seq sonuçlarını doğruladığı gösterilmiştir [6]. Yapılan çalışmalarda, armutta farklı tuzların uygulanmasıyla tuz stresinde farklı olarak ifade edilen genlerin analizinde RNA-seq yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada 6 kök ve yaprak örneğinden yararlanılmıştır ve bu örnekler arasındaki kıyaslamada 276 adet DEGs belirlenmiştir. Daha sonra bu DEGs'lerin birbiri arasında analizi yapılmıştır.[7]

Bu çalışmada ekspresyon seviyesini inceleyeceğimiz Wrnip1, Trp53, Top2b, Tbx2, Sod1, Smc5, Scp2, Opa1, Krt14, Coq7, Cdkn1, Cav1, Bcl6, Apod, Rsl1d genlerinin yaşlanma ile ilişkileri çeşitli yayınlarda gösterilmiştir. Örneğin fare fibroblastlarında, BCL6'nın, siklin D1 ekspresyonunun indüklenmesini gerektiren bir işlem yoluyla p53'ün aşağı akışındaki yaşlanmayı geciktiren güçlü bir yaşlanma inhibitörü olduğunu rapor etmişlerdir [8]. Senagolage vd.'nın yaptığı çalışmada Adiposit Bcl6 delesyonunun, hem glikoz atılımını arttırdığı hem de glikoneogenezi keskin bir şekilde azalttığını; burdan yola çıkarak tüm vücut metabolizmasında güçlü bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Moleküler düzeyde, adipositlerdeki genomik analiz, BCL6'nın, immün hücrelerdeki transkripsiyonel baskılayıcı etkilerine benzer şekilde, BCL6'nın kinaz sinyal genlerinin ve yağ asidi biyosentetik genlerininin ekspresyonlarını azalttığı ortaya koymuştur [9].

Yapılan çalışmalarda, Serbest Radikal veya Oksidatif Stres Yaşlanma Teorisinin, normal metabolik işlemlerden eksojen veya endojen olarak oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) yaşlanma sürecinde rol oynadığı varsayılmaktadır. Antioksidan savunma sistemindeki 18 farklı genetik manipülasyonla yapılan araştırmada sadece Cu / Zn-süperoksit dismutaz (Sod1) için negatif olan fare modelinin, Yaşlanmanın Oksidatif Stres Teorisinde öngörüldüğü gibi ömür süresi üzerinde azaltıcı yönde etkisi olduğu gösterilmiştir. Sod1 - / - farelerinin dokularında, üzerinde çalışılan diğer fare modellerinin hepsinden daha yüksek düzeyde bir DNA oksidasyonu gözlemlendiği gösterilmiştir. Bu nedenle, veriler artan hücresel yaşlanmanın Sod1 - / - farelerde gözlemlenen hızlandırılmış yaşlanma fenotipinde rol oynayabileceğini göstermişlerdir [10]. SOD-1 mitokondride süperoksit radikallerinin detoksifikasyonunu düzenler ve yaşlanma sırasında oksidatif hasar birikimini önler [11]

Martin vd. tarafından yapılan çalışmada, yaşlılığın baskılanmasında proto-onkogen TBX2(T-box transkripsiyon faktörü 2) ve PML(kanserde sıklıkla kaybedilen veya mutasyona uğramış tümör baskılayıcı protein, promyelositik protein)'in birlikte çalıştığı gösterilmiştir. Varsayılan proto-onkogen TBX2, hem yaşlanma fenotipinin oluşumunda PML fonksiyonunun negatif bir regülatörü olarak hem de yaşlanmada rol oynayan PML-IV ile baskılanabilir E2F-hedef geni (PML'nin E2F-hedef genlerinin baskısıyla ilişkili yaşlanmada rol oynadığı da gösterilmiştir) olarak tanımlanmıştır. Bu veriler, yaşlanmayla ilişkili TBX2 baskısını kontrol etmek için PML-IV'ün baskın PML izoformu olduğu fikrini pekiştirmektedir [12]. Birkaç PML izoformu arasında, PML-IV yaşlanmayı başlatan tek proteindir. Diğer bir çalışmada ise TBX2'nin, T-kutusu aile üyesi, kanser hücrelerinde sıklıkla aşırı eksprese edilen ve p14 ve p21'in baskılanması dahil olmak üzere hücre büyüme kontrolünün atlanmasında işlev gördüğü düşünülen bir bastırıcı olduğu gösterilmiştir. Hem p21 hem de p14 / 19ARF'nin TBX2 tarafından baskılanmasının, kanser hücrelerinde güçlü ve işbirliğine dayalı bir anti senesens sinyali sağladığı belirtilmiştir [13].

Yoshimura vd. tarafından yapılan çalışmada, WRNIP1'in erken yaşlanma hastalığı Werner sendromunda defektif olan WRN helikaz ile etkileşime girdiğini göstermişlerdir. WRNIP1 başlangıçta Werner helikaz etkileşimli protein (WHIP)

olarak tanımlandı ve daha sonra HUGO adlandırma kurallarına göre Werner helikaz etkileşimli protein 1 olarak yeniden adlandırıldı. Wrnip1 pozitif hücrelerinde spontan kardeş kromatid değişimi (SCE), WRNIP1 bulunmayan hücrelere göre daha fazladır. UV ışınımı sonrası WRNIP1'in TLS (DNA Sentezi Translezyonu) 'ye katkısının, DNA replikasyonu stresinden sonra replikasyon çatallarının ve kontrol noktasının aktivasyonunun sürdürülmesi olduğu belirtilmiştir [14].

Trp53'ün, hem dişi hem de erkek Sirt6-eksik farelerin ömrünü önemli ölçüde uzattığını gösterilmişdir. p53 erken yaşlanma ve yaşlanmada yaygın olarak yer almaktadır ve tedavileri geliştirmek için çok sayıda çalışmanın odağını oluşturmaktadır. [15]. Ayrıca Trp53'ün, in vivo veya in vitro ortamda düşük DNA hasarı seviyelerinde apoptoza aracılık ettiğini göstermişlerdir [16].

Yapılan çalışmalarda Topoizomeraz II beta (Top2b), transkripsiyon sırasında DNA'nın topolojik durumlarını değiştiren bir enzim olduğunu göstermişlerdir. Erken retinal progenitör hücrelerde Top2b silinmesi nöral farklılaşmada ciddi kusurlara neden olur ve tüm retinal hücre tiplerinde hücre sağ kalımını destekler [17]. Yaşlanma ile birlikte topoizomeraz II beta aktivitesindeki düşüşün yetişkin hücreler arası iletişimde komplikasyonlara yol açabileceği gösterilmiştir. Yaşlanma ve DNA onarımında topoizomeraz II beta biyobelirteç olarak tespit edilmiştir. Topoizomeraz IIb'nin yapılan çalışmada belirtilen 221 yaşlanma vakasıyla ilişkili olduğu gösterilmiş olup, topoizomeraz IIb'nin insan yaşlanmasına katıldığı belirtilmiştir. [18]

Jacome vd. tarafından yapılan çalışmada, ilk kez SMC5(Structural maintenance of chromosomes protein 5) / 6 kompleksi tarafından sağlanan genom koruma aktivitesinin, memelilerde kanserin ve yaşlanmanın baskılanması için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. SMC5 / 6 kompleksinin temel bir SUMO ligazı olan NSMCE2, farelerde kanseri ve yaşlanmayı baskıladığı da gösterilmiştir [19].

SCP2'in azaltılmasının, L-FABP'nin daha fazla sentezlenmesine eşlik eden hepatik toplam ve esterleştirilmiş kolesterol seviyelerini arttırdığını gösterilmiştir. Burada sunulan veriler, SCP2 / SCPx gen ürünlerinin fitol oksidasyona katkıda bulunduğunu göstermiştir. SCP-2, fitol (örneğin endoplazmik retikulumdaki ve / veya oksidasyon için peroksizomlardaki fitanik asit) oksidasyonundaki azalmanın üzerindeki etkisiyle fitol alımını / birikimini etkileyebilir. Fitolün kendisi doğrudan PPARa'yı bağladığı ve aktive ettiği için, fitol metabolizmasında çoklu genlerin (Scp-2 / Scp-x dahil) hepatik ekspresyonu, yüksek oranda eksprese edilmiş nükleer reseptör, peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör-a (PPARa) ile düzenlenir. MEKK-3 eksikliğinin, insan sterol taşıyıcı proteini SCP2'nin bir ortoloğu olan nükleer hormon reseptörü NHR-49 ve DAF-22 yoluyla; yağ asidi metabolizmasının yeniden programlanmasına ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun azaltılmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. C. elegans'ta, mekk-3'ün (memeli mitojenle aktifleştirilen MEKK3 benzeri kinazların bir homoloğu) baskılanmasının, ömrü uzattığı gösterilmiştir [20].

CoQ(Koenzim Q7) seviyelerinin, omurgasız modellerde uzun ömürlülüğü düzenlemek için gerekli olduğunu gösterilmiştir. Kalori kısıtlaması ve resveratrol ile tedavi gibi sağlıklı yaşlanma müdahaleleri, mitokondriyal verimliliği indükleyerek CoQ biyosentezi dahil çeşitli biyoenerjetik yolakları aktive ettiği gösterilmiştir. CoQ biyosentezinin düzenleyici mekanizmaları arasında, mevalonat yolundaki enzimlerin transkripsiyon faktörü PPARa aracılığıyla transkripsiyonel düzenlemesi ve oksidatif strese cevap olarak NF-κB tarafından COQ7 ekspresyonunun transkripsiyonel indüksiyonu bulunmuştur [21].

Keratin filamenti hücre iskeleti, epitel hücresinin normal fonksiyonu için hayati öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Mutant keratinositlerin hayatta kalma ve strese dayanma yetenekleri üzerinde derin bir etkiye sahip olmaları muhtemeldir ve teorik olarak bu, hücre transformasyonuna katkıda bulunan ve hücre sağkalımını etkileyen bir faktör olabilir [22].

Erişkin farelerde, Opa1(Mitochondrial Dynamin Like GTPase)'in silinmesi, erken yaşta yaşlanma fenotipini ve erken ölümü tetiklediği gösterilmiştir. Opa1'in silinmesiyle birlikte kaslardaki mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ER'de başlatılan, genel metabolizmayı ve yaşlanmayı sistematik olarak etkileyen bir

sinyalleşme kaskadını tetikleyebilir [23].

CDKN1(siklin bağlı kinaz inhibitörü)'in düzenlenmesi ile ilgili şimdiye kadar toplanan bilgiler, birkaç önemli tümör baskılayıcı ve onkogenik sinyal yolunun, hücre döngüsü ilerlemesinin, hayatta kalmanın, yaşlanmanın ve apoptozun üzerindeki etkilerini göstermek için CDKN1 ekspresyonunun etkili olabileceğini ortaya koymuştur. TGFB1 ve MYC için indüklenmiş ekspresyon seviyelerinin kalıcılığı, sadece CDKN1 ekspresyon seviyesindeki geçici artış nedeniyle hücrelerin ilk hücre döngüsü durdurulmasından sonra hücre proliferasyonu için destek sağlayabileceğini belirtmişlerdir [24].

Artan Cav-1(Kaveolin1) ekspresyonun, dokuya özgü işlevsizlikleri ve yaşa bağlı hastalıkları indükleyerek doku yaşlanmasını etkilediği belirtilmiştir. Ayrıca, yaşlıların derisinde Cav-1 geninin fazla ekspresyonunun, dermal fibroblastlarda transforme büyüme faktörü-β yolağı aracılığıyla kollajen sentezini baskılayarak cildin yaşlanmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir [25].

ApoD(Apolipoprotein D)'nin, ROS birikimi tarafından üretilen lipid peroksit seviyelerini yaşlanma veya patolojik koşullar ile kontrol eden bir nöroprotektan olduğu gösterilmiştir [26]. ApoD eksikliğinin, nöronal kalsiyum bağımlı işlevsellik belirteçlerinde yaşla belirgin bir azalma ile sonuçlandığı ve kortekste nöronal sayıların erken azalmasına işaret ettiği, böylelikle nörodejeneratif koşulları sağlıklı beyin yaşlanmasından açıkça ayıran parametrelere etki ettiği göstermişlerdir [27].

CSIG (RSL1D1(Ribosomal L1 domain-containing protein 1))'nın , hücre döngüsü düzenlemesi, apoptoz ve tümör metastazı dahil olmak üzere çeşitli işlemlere dahil edildiği yapılan çalışma ile gösterilmiştir. CSIG'in ekspresyonunun, PTEN ekspresyonunu kuvvetle azalttığını, hücre çoğalma oranlarını arttırdığını ve yaşlanan fenotipi azalttığını göstermişlerdir [28].

Bu bilgiler ışığında yaşlanma ile ilişkilerinin olduğu belirlenmiş olan Wrnip1, Trp53, Top2b, Tbx2, Sod1, Smc5, Scp2, Opa1, Krt14, Coq7, Cdkn1, Cav1, Bcl6, Apod, Rsl1d gibi yaşlanma sürecinde hücre metabolizmasında doğrudan etkili oldupu tespit edilen genlerin, Real Time PCR ile ekspresyon seviyelerine bakılarak ifade oranları tespit edilecektir.

1.2 Tezin Amacı

Farklı beslenme tarzlarının yaşlanma süreci üzerinde etkilerinin incelemesi amaçlanmıştır. Kalori kısıtlama çalışmalarında sıklıkla kullanılan kronik kalori kısıtlaması yönteminin alternatifi olarak aralıklı kalori kısıtlamasının gen ifadesi üzerine etkilerinin kontrol grubu ile beraber kıyaslanması mümkün olacaktır. Yaşlanma üzerinde etkili olduğu düşünülen 15 genin, transgenik farenin 3 farklı yaşam evresinde beslenme tipinin etkisiyle oluşacak ifade farklılıkların belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için sekanslama verileri aracılığı ile yaşlanmayla ilişkisi tespit edilen 15 genin ifadelerindeki bu değişimin doğrulanması için Real Time PCR kullanılarak biyoinformatik analizler ile elde edilen ekspresyon bilgisinin dokuda doğrulanması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Literatür taraması yapıldığında kalori kısıtlamasının, yaşlanmayla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bölümümüzde daha önce tamamlanmış çalışmada, RNA-seq temelli transkriptom analizi ile kalori kısıtlanmış ve normal beslenmiş bireyler arasında "farklı oranda ekspresse edilen genler" tespit edilmiştir. Tespit edilen farklı oranda ekspresse edilmiş genler içerisinde yaşlanmayla ilişkili olan genler belirlenmiştir. Bu ilişki sebebiyle kalori kısıtlamasının ve beslenme tipinin yaşlanmayla ilişkili genlerin ifade olmasında anlamlı değişikliklere sebep olduğu, bu değişiklikler kalori kısıtlamasının yaşlanmayı geciktirdiği hipotezini kurmamızı sağlamıştır. Bu çalışmada, yaşlanmayla ilişkili genlerin RNA-seq analizinden elde edilen ekspresyon değişim sonuçlarının, Gerçek Zamanlı PCR ile doğrulanması beklenmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Kalori Kısıtlaması

Yaygın kullanılan bir deneysel manipülasyon yöntemi olarak kalori kısıtlaması, yetersiz beslenmeden kaçınarak organizmanın aldığı kalori miktarının sınırlandırılması olarak tanımlanır [29]. Enerji girdisinin azaltılması, temel besinlerin yeterli miktarda alımı ile kombine edilir. 1900'lerin başından beri çeşitli canlılarda bu manipülasyonun etkileri inceleme konusu olmuştur. Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda, farklı organizmalarda birçok biyolojik süreç üzerinde çeşitli etkilere rastlanmıştır. Temel olarak, canlıların yaşam sürelerini arttırıp yaşlanmayı geciktirdiği, tümör oluşumunu engellediği, otoimmüniteyi baskıladığı ve immün sistemi çeşitli yollarla olumlu yönden etkilediği kaydedilmiştir [30].

Kalori kısıtlamasının, yaşam süresi ve yaşlanma üzerine etkisi, 1930'larda yapılan bir çalışma ile ilk olarak kaydedilmiştir. Sıçanlarda yapılan bu çalışmada beslenmedeki kısıtlamanın yaşam süresini uzattığı ve yaşlanmayı geciktirdiği sonucuna ulaşılmıştır [31]. Daha sonraki yıllarda fare, solucan, balık ve sinek model organizmalarında yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara ulaşılmıştır [32]. Model organizmalarla yapılan çalışmalar bu konunun anlaşılmasında ilerleme sağlasa da, beslenmeye yapılan bu müdahalenin insan yaşam süresi üzerine etkilerini öğrenmek için, primatlar kullanılarak yürütülen çalışmalar daha güvenilir sonuçlar verir. Primat modeli seçilen al yanaklı maymunlar üzerinde bu konuda iki bağımsız çalışma yürütülmüştür. Bunların ilkinde kalori kısıtlamasının yaşam süresini etkilemediği, ama yaş ile ilişkili hastalıkların görülmesinde azalmaya sebep olduğu kaydedilmiştir. Diğer çalışmada ise hem yaşam süresini hem de sağlıklı yaşam süresini olumlu etkilediği sonucuna ulaşıldığı belirtilmiştir [33]. Tüm bu çalışmalara göre kalori kısıtlamasının organizmaların ortalama yaşam sürelerini ve/veya maksimum yaşam sürelerini uzattığı, yaşlanmayı geciktirdiği tezine ulaşılmıştır. Bununla birlikte sadece enerji alımındaki azalmanın değil, diyet bileşenlerinin ve kısıtlamanın periyotlar

halinde uygulanmasının yaşlanma üzerinde bu etkinin ortaya çıkmasına katkı sağladığı eklenmiştir. Yaşa bağlı olarak değişiklik gözlenen bazı biyolojik süreçlerde (insülin direncinin gelişimi, bağışıklık direncinin azalması, nöronlardaki değişiklikler vb.) bu değişiklerin gözlenme durumunun azalması ve yine yaşa bağlı hastalıkların (birçok kanser türü, böbrek hastalıkları vb.) ortaya çıkmasının ve görülme sıklığının azalması, yaşlanma ve yaşam süresi üzerine etkinin ana motivasyonu olarak söylenmiştir. Bununla birlikte, bu etkinin moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Yine de insülin ve insülin benzeri sinyalleşme yolakları ile glikoz sinyalleşme yolaklarının kalori kısıtlanmasıyla aşağı yönde düzenlenmesinin yaşam süresini etkilediği hipotezi yaygın kabul gören bir görüştür [34].

Kalori kısıtlamasının, canlıların fizyolojisini pek çok yönden etkilediğine dair birçok kanıt mevcuttur. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun ve zararlarının azalması bu etkilerden biri olarak bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, kalori kısıtlamasının bağırsakta yağ emilimini değiştirdiği ve bunun sonucunda artan vitamin A emiliminin, oksidatif hasarların düzenlenmesine katkı sağladığı kaydedilmiştir. Sıçanlarda kalori kısıtlamasının radikalleri yok etmede öncü rol üstlenen katalaz enziminin seviyesini seçici olarak arttırdığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, radikallerle mücadele eden bir diğer enzim olan süperoksit dismutazın ifade edilme oranlarını da arttırdığı tespit edilmiştir [35].

İmmün sistem kalori kısıtlaması ile belirgin olarak etkilenen fizyolojik sistemlerden biridir. Lenfoid organların besin eksikliğine hızlı tepki verdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Yetersiz beslenme bağışıklık sistemine ciddi zararlar verirken, yaygın kabule göre yetersiz beslenme olmaksızın uygulanan kalori kısıtlaması immün cevabı olumlu etkiler. Farelerde yapılan çalışmalarda, kalori kısıtlaması uygulamalarının, timüsün yaşlanmaya bağlı dönüşümlerini geciktirdiği, T hücre öncüllerinin sayısını arttırdığı, T hücrelerinin repertuvarını koruduğu, sitokinler ile verilen inflamasyon öncesi cevabı güçlendirdiği kaydedilmiştir. Benzer sonuçlara, sineklerde ve insan olmayan primatlarda rastlanmıştır [36].

Kalori kısıtlaması otoimmün hastalıkları baskılar. Otoimmün hastalıklar, bağışıklık sisteminin kendi vücut hücrelerine saldırdığı hastalıklardır. Araştırmacılar, Kronik kalori kısıtlamasının kemirgenlerde tümör gelişimini baskılamak, otoimmüniteyi baskılamak ve ömrü uzatmak gibi parametrelerde; ad libitum (AL) diyetinden daha etkili bir deneysel manipülasyon olduğunu bildirmiştirler. [37].

Kalori kısıtlamasının kanser üzerine etkisi, yaşlanmaya olan etkisinden sonra en bilinen etkisidir. 1940'larda, Tannenbaum'un diyet sınırlandırılması uygulanmış farelerde kendiliğinden meme tümörü oluşumunun normal beslenenlere göre %50'den daha fazla azaldığını söylediği çalışmalarının etkisiyle, "diyetin sınırlanması" olgusu, üzerine odaklanılan bir terim haline gelmiştir. Beslenmeye yapılan müdahalelerin kanser oluşumuna etkisi günümüzde de odaklanılan konuların içerisinde yer alır. Diyetteki yağ tipinin değiştirilmesi beslenmeye yapılan müdahalelerden biridir [38]. Diğeri ise, çok daha önceleri etkisi araştırılmaya başlanan kalori kısıtlamasıdır. Pek çok çalışmada kalori kısıtlanması ile tümör oluşumunun engellendiğine dair kanıtlar ortaya konmuştur. Dahası, hayvanlarla yapılan çalışmalarda, %20-40 oranında uygulanan kronik kalori kısıtlamasının, tümör oluşumunu %95'e varan oranlarda azalttığı açıkça kaydedilmiştir [39]. Bir başka tanım yapılacak olursa, kalori kısıtlaması obeziteyi engelleyen bir beslenme rejimidir. Obezitenin pek çok kanser türünün oluşmasında güçlü katkıları olduğu bilinir. Bu yüzden, kalori kısıtlamasının bu diğer tanımı, onun kanser oluşumunu engellemedi ki rolünde göz ardı etmemek gerekir. Bununla birlikte, kalori kısıtlamasının çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların kanserleşme üzerine etkilerini de engellediği görülmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada, çeşitli dokularda (deri, meme, karaciğer), çeşitli ajanlar (benzo-a-piren, dietilnitrozamin, radyasyon formları) aracılığı ile indüklenen kanserleşme süreçlerinin, kalori kısıtlaması yapılan bireylerde normal bireylere kıyasla belirli oranda engellendiği sonucuna ulaşılmıştır [40]. Kalori kısıtlamasının kanserleşme süreçlerini engellemede hangi mekanizmaları kullandığı henüz aydınlatılmamıştır. Yine de bu konuda yapılan çalışmalardan ulaşılan tahminlere göre, reaktif oksijen türlerini azaltması, hücre çoğalmasını baskılaması, gen ekspresyonlarını değiştirmesi, inflamasyonu azaltması, apoptozu teşvik etmesi ve immün sistemi güçlendirmesi gibi etkileriyle tümör oluşumunu engellemektedir [41].

Kalori kısıtlamasına yanıt olarak çeşitli metabolik süreçlerde yer alan proteinlerin ekspresyonları düzenlenir. Enerji dengesi, lipogenez/lipoliz, insülin-glukoz regülasyonu ve tokluk bu süreçlerden bazılarıdır. Şüphesiz bunlardan en dikkat çekeni, kalori kısıtlamasının tümör oluşumunu engelleme etkisini, enerji homeostasisini düzenleyen moleküllerin regülasyonunu sağlayarak gösterdiği söyleyen kanıtlardır. Bu moleküllere örnek olarak da leptin ve adinopektin molekülleri sunulmuştur [42]. Leptinin tümör oluşumunun engellenmesiyle ilgili olduğunu destekleyen bir çalışmada, MMTV-HER2/neu transgenik fareleri kullanılmış, aralıklı kalori kısıtlaması ile kombine edilmiş eykosapentonik asit uygulaması yapılmıştır. Sonuç olarak, serumdaki leptin seviyesini bariz bir şekilde düştüğü ve meme tümörü görülme oranının yüksek oranda azaldığı kaydedilmiştir[43]. Bunun dışında yeni keşfedilen ve enerji homeostasisi ile lipit metabolizmasında önemli bir rol oynayan bir peptit hormon olan adropin molekülünün meme kanseri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Farelerde yapılan bu çalışmada, kronik kalori kısıtlaması uygulanmış ve buna bağlı olarak adropin seviyesinde artış gözlenmiştir. Kalori kısıtlamasının etkisiyle artan adropin'in, kanser oluşumunu engellemede kritik öneme sahip olduğu öne sürülmüştür. Bu etki, akut adropin terapisi uygulanan MCF-7 ve MDA-MB231 meme kanseri hücrelerinin çoğalmalarında azalma gözlenmesiyle desteklenmiştir [44].

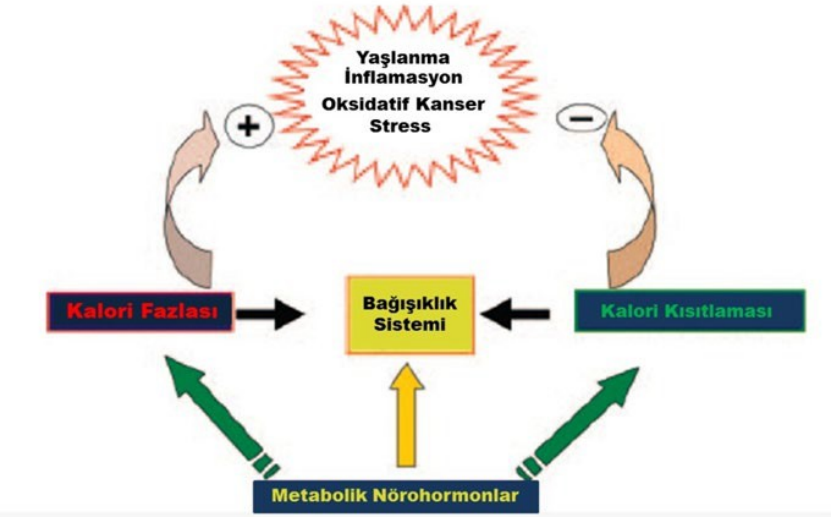
Canlıların herhangi bir kısıtlama olmaksızın besine ve suya ulaşabileceği duruma, ad libitum beslenme denir. Bu tarz beslenme kalori kısıtlama deneylerinde kontrol grubu olarak kullanılır. Kalori kısıtlaması uygulamalarının ise iki temel uygulaması vardır. Bunlardan ilki kronik kalori kısıtlamasıdır (KKK). Bu tür uygulamalarda, uygulama süresince belirli miktar kalori sürekli olarak kısıtlanır. KKK çok kullanılan ve daha fazla bilinen kalori kısıtlaması türüdür. KKK'nın %20-40 oranında uygulandığı kemirgenlerde, meme tümörü oluşumunu %95 oranında azalttığı, pek çok çalışmada kaydedilmiş, iyi derecede bilinen bir etkidir. İkinci tür uygulama ise aralıklı kalori kısıtlamasıdır (AKK). Bu uygulamada, açık ve kapalı kalori kısıtlama dönemleri vardır. Açık dönemde kalori kısıtlaması olurken, kapalı dönemde organizmalar Ad libitum olarak beslenir. bir uygulamadır ve daha az çalışılmıştır. AKK'nın yaşlanmaya etkisi konusunda birbiriyle çelişen sonuçlara ulaşılmıştır [45]. Buna rağmen, farelerde ve sıçanlarda kimi AKK uygulamaları

yaşlanma görülme oranını düşürmüştür. Kalori kısıtlaması çalışmalarında iki kalori kısıtlaması uygulamasından hangisinin daha verimli olduğu konusunda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Transgenik hayvan modellerinde yapılan bazı çalışmalarda AKK'nın KKK'ya göre yaşlanma gelişimini engellemek konusunda daha başarılı olduğu kaydedilmiştir [1], [2].

2.2 Beslenme ve Metabolizma

2.2.1 Beslenme ve Bağışıklık Dengesi

İmmün sistem ve metabolik sistem arasında, çeşitli sinyallerin aracılık ettiği, birbirinin çalışmasını karşılıklı olarak etkileyen, sıkı bir ilişki vardır. Enerji dengesindeki değişikliklere göre immün cevabın baskılanması veya aktive edilmesi söz konusudur. Enerji dengesi, enerji alımı ve tüketimi arasında oluşan dengedir. Enerji dengesi, obezite ve aşırı kalori alımında pozitife kayarken, kalori kısıtlamasında negatife kayar [46]. İmmün fonksiyonun kemokin ve sitokinlerle düzenlendiği bilinmektedir. Buna ek olarak immün fonksiyonun düzenlenmesinde, enerji dengesindeki değişimlerle kandaki bulunma miktarları değişen nöro-endokrin moleküllerin (leptin, ghrelin, adinopektin) kritik rol oynadığı tezi, yapılan çalışmalarla her geçen gün güçlenmektedir [47]. Bu konuyla ilgili bir çalışmada, obezite durumunda leptin seviyesindeki artış ve ghrelin seviyesindeki azalmanın direkt olarak immün hücrelerin aktivitesini baskıladığı, kalori kısıtlamasında da bu moleküllerin oranlarının tersine döndüğü, bunun sonucunda immün fonksiyonların güçlendiği ve yaşam süresinin uzadığı belirtilmiştir [48].



Şekil 2.1 Metabolik sistem ve immün sistem arasındaki ilişkinin şekilsel gösterimi

Kalori alımının aşırı olduğu durumlarda vücutta yağ dokusunun birikmesiyle obezite ortaya çıkar. Son yüzyılda, besin maddeleri ve beslenme alışkanlıklarındaki değişmelerle birlikte obezite, insan sağlığını çeşitli yönlerden etkileyen bir sorun olarak önem kazandı. Obeziteye bağlı olarak, kalp hastalıkları, solunum hastalıkları ve kanser gibi sağlık problemlerinde artış gözlendi ve bu hastalıklara bağlı ölüm oranları belirgin seviyede yükseldi. Çünkü obezite bir kronik inflamasyon durumudur. Kronik inflamasyon, akut inflamasyona benzer belirtiler gösteren, ondan daha uzun süren ve dokularda hasara neden olan, böylece tip 2 diyabet, kanser ve kalp hastalıkları gibi hastalıkları tetikleyen bir durumdur Artan yağ dokusu ve immün doku arasındaki etkileşimler bu inflamasyona sebep olur. Bu hastalıklar dışında, obez bireylerin enfeksiyonlara karşı duyarlılığının belirgin seviyede arttığı belirtilmiştir. Diyetle indüklenmiş obezite görülen farelerde yapılan bir çalışmada, grip virüsüne bağlı ölüm oranının obez bireylerde 6 kat arttığı bildirilmiştir. Bu, kalori aşımının immün sistem üzerinde negatif bir etkiye yol açtığı kanısına yönlendirir. Bununla birlikte, ob / ob mutant farelerinde, T hücresi ile verilen immün yanıtlarda önemli bozukluklar olduğu ve dendritik hücrelerin antijenleri T hücrelerine sunma yetilerinin azaldığı bilinmektedir. Bir başka çalışmada, obez farelerde inflamasyon cevap öncesi salınan sitokinlerde azalma olduğu, yani spesifik olmayan bağışıklığın düşük düzeyde kaldığı söylenmiştir. Tüm bu göstergeler, immün sistemin obeziteye bağlı değişen bazı metabolik faktörlerden etkilendiği tezinin öne sürülmesini

sağlamıştır. Buna aday metabolik faktörlerden biri, adenozin mono fosfat (AMP) molekülünün aktive ettiği bir enzim olan adenozin mono fosfat kinazdır (AMPK). AMPK'nın hücresel bir enerji sensörü olduğu ve enerji dengesinin değişmesiyle kritik bir rol üstlendiği hipotezi ortaya konulmuştur. Buna göre, kalori kısıtlamasıyla alınan enerji azalır ve AMP'de bir artış gözlenir. AMP, AMPK'yı aktive eder. AMPK, mTOR ve JNK gibi yolakları inhibe ederek ve T hücresi reseptörüne bağlanıp T hücresini aktive ederek bağışıklık cevabını düzenler. Obezite durumunda ise tam tersi süreç işler ve bağışıklık baskılanır [49].

Enerji dengesinin pozitif tarafta olduğu obezitenin aksine, kalori kısıtlamasında enerji dengesi negatife kayar. Bunun anlamı, alınan enerjinin tüketilenden daha az olmasıdır. Bu durumda kalori kısıtlaması, NAD+/ NAD ve AMP / ATP gibi hücresel substratların oranlarını etkiler ve enerji ile ilgili birçok yolakta aşağı yönde değişiklikleri tetikler. Enerji dengesinin negatife kayması immün sistemi birçok yönden güçlendirmektedir. Kalori kısıtlamasının immün cevap üzerindeki etkisini hayvan modelleri kullanarak inceleyen çalışmalarda, kalori kısıtlamasının, T hücrelerini arttırdığı, doğal öldürücü hücre aktivitesine, sitotoksik T lenfosit aktivitesine ve mononükleer hücrelerin inflamasyon öncesi sitokin üretme kabiliyetine olumlu etkileri olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır. Bazı çalışmalarda, kalori kısıtlamasının yaşlı farelerde timosit sayısını iki katına çıkardığı, böylece öncül T hücre sayısını çoğaltarak, kanda dolaşan T hücre sayısında bir artış sağladığı iddia edilmiştir. Bunun dışında, kalori kısıtlamasının sıçanlarda hafıza T hücrelerini de arttırdığını söyleyen çalışmalar da mevcuttur. Primatlarda yapılan bir çalışma, kalori kısıtlamasının, timosit oluşum süreçlerini güçlendirirken, T hücrelerin reseptörlerinin repertuvarını çeşitlendirdiği sonuçlarına ulaşıldığını bildirmiştir. Buna zıt kanıtlara ulaşılan çalışmalar da mevcuttur [50].

2.2.2 Timüs

İmmün sistemin gelişmesinde önemli bir rol oynayan timüs, birincil lenfoid organlardan biridir. Doğumdan önce ve doğumdan sonra kemik iliğinden kökenlenen T lenfositler timüse göçer. Timüs, T hücrelerinin farklılaştığı ve olgunlaştığı son duraktır. T hücreleri lenfositlerin bir alt türüdür ve adaptif bağışıklık sistemi için önemlidir. Tümör hücreleri, enfekte hücreler ve nakil hücreler hedefleri arasındadır. Antijenleri tanıyarak öldürücü etki gösterirler.

Yaşla birlikte timüste küçülme gözlenir. Dahası, T hücrelerinin miktarı, repertuvarı ve etkinliği azalır. Bu durum, insanı çeşitli enfeksiyonlara karşı açık konuma getirir. Ayrıca yaşlanma ile timüste yağ dokusu oluşumu gözlenir. Böylece renk değiştirir ve sarı renk alır [51]. Farelerin kullanıldığı bir kalori kısıtlaması modelinde, kalori kısıtlamasının timüsün yaşlanmasını geciktirdiği sonucuna ulaşılmıştır.Yaşla birlikte gözlenen adipoz doku oluşumunu, adipogenez yolaklarını inhibe ederek engellediği, timüsün korteks ve medullasında epitel doku yapısını koruduğu gözlenmiştir. Timüs ve diğer lenfoid organlar besin eksikliğine birçok organdan daha hızlı tepki verir [52]. Yetersiz beslenme gözlenen çocuklarda immün sistemin gelişmediği ve enfeksiyonlara daha açık oldukları kaydedilmiştir. Bununla birlikte birçok çalışmada, yetersiz beslenme olmaksızın uygulanan kalori kısıtlamasının timüsün fonksiyonlarını güçlendirdiği sonucuna ulaşılmıştır. Farelerde ve insan olmayan primatlarda, kalori kısıtlamasının T hücre fonksiyonunu ve repertuarını koruduğu gözlenmiştir. Doğal T hücrelerinin üretimini ve/veya korunmasını teşvik ettiği kaydedilmiştir [53].

2.3 Yaşlanma

Timusun yaşlanması, lenfostromal timik bölgelerin adipositlerle aşamalı olarak değiştirilmesiyle birlikte hassas T hücresi oluşumundaki azalma ile karakterizedir. Bir metabolik devamlılığı sağlama müdahalesi olan kalori kısıtlamasının (CR) timik yaşlanmayı nasıl düzenlediğini belirlemek, immünosenesensi önlemek için ilgili mekanizmaların tanımlanmasına izin verebilir. Kronik kalori kısıtlaması bir fare modeli üzerinde kullanılarak, yaşa bağlı timik adipojenik mekanizmadaki bir azalmanın timik fonksiyonun sürdürülmesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Kalori kısıtlamasının; timik stroma'nın yaşa bağlı adipojenik programlamasını spesifik olarak inhibe ettiği ve timopoeziyi koruduğu gösterilmiştir [54].

2.4 Transkriptom

Genom elemanlarının fonksiyonunun anlaşılması ile hastalık ve gelişim süreçlerinin anlaşılması için, bir hücre veya hücre grubundaki tüm transkriptlerin bilgisine ulaşılması amaçlanan omiks teknolojisidir. Bununla birlikte, sadece mRNA, miRNA, veya kodlanmayan RNA' ların hedef alındığı alt kümeleri de vardır. Herhangi bir zamanda o hücrelerde aktif olan genleri yansıtır. Hücrelerin farklılaşma ve kanserleşme süreçlerini araştırmada kullanılır. Transkriptom

çalışmalarında yüksek verimli sonuçların alındığı iki temel uygulama vardır:1-Microarray 2-RNA-seq. Mikroarray, hibritleşme reaksiyonuna dayalı nispeten eski ama hala sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Örnek DNA ile problar hibritleşir ve ışıma olur. Probların eldesi için ön bir sekans bilgisi gerektirir [55]. Daha güncel ve daha gelişmiş yöntem olarak RNA-seq kullanılır [56].

2.4.1 RNA-seq Data Analizleri

RNA sekanslama, bir çeşit Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojisi uygulamasıdır. Mikroarray yönteminin gerektirdiği ön dizi bilgisini gerektirmez. Bu yöntemde, aslında direkt RNA üzerinden dizileme olmaz. RNA tek zinciri yapısı itibariyle, DNA'ya göre daha kırılgan yapıdadır. Bu yüzden dizilemesi daha zordur. Fakat onu cDNA'ya çevirerek dizilememiz mümkündür. RNA sekanslama, SNP'lerin tespitini, mutasyon tespitini, alternatif uçbirleştirme tespitini, post-translasyonal modifikasyon tespitini, ekson sınırlarının belirlenmesini sağlar. Ayrıca farklı kantitatif ölçümler gerçekleştirerek, ekspresyon oranlarının farklı uygulama ve gruplara göre tespitinde kullanılır. Örneğin bir ilacın farklı dozlarının bir canlıya etkisinin araştırılmasında veya beslenme kısıtlamasının genler üzerindeki etkisinin araştırılmasında, ekspresyon seviyelerinin ölçülmesini sağlayarak analiz yapmaya imkan sunar [57].

RNA dizileme 3 temel aşamadan oluşur.1-Kütüphane hazırlama 2- Sekanslama 3-Data analizi. Bu çalışmada kullanılan RNA-seq dataları, Illumina HiSeq 400 sistemi kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 2.2 RNA-seq aşamaları

- **Kütüphane Hazırlanması**

İzolasyondan sonra ilk aşama kütüphane hazırlamaktır ve kullanılacak RNA'nın türüne göre, kullanılacak platforma göre çeşitli metotlar yapılır. Bu işlemin akış sırası şu şekilde özetlenebilir: RNA moleküllerinin izole edilmesi, RNA'nın cDNA'ya ters-transkripsiyonu, rastgele primerle cDNA moleküllerinin çoğaltılması veya fragmentler oluşturulması, dizileme adaptörlerine bağlanmasıdır.

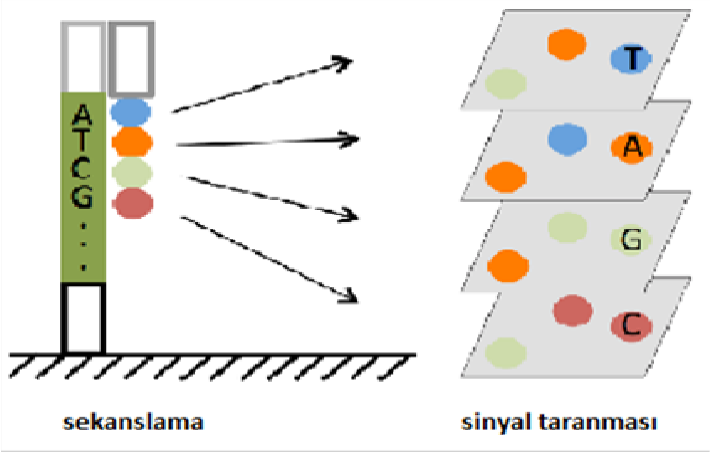
Kütüphane oluşturmaya başlamadan önce total RNA içerisinden, dizilerin okunmasında sorun çıkartacak olan ve hücrelerde çok miktarda bulunan RNA'lar (en çok bulunan ribozomal RNA vb.) seçici olarak ayrılmalıdır. Bunun için, mRNA'nın çoğaltılması ve seçilmesini sağlayan, mRNA'nın poli A kuyruğuna kovalent bağlanan oligo T dizileri kullanıldığı gibi, rRNA'yı uzaklaştıran ticari kitlerde kullanılabilir. Çalışmanın amacı, hangisinin kullanılacağını belirler [58].

Elde edilen RNA, cDNA'ya çevrilir. Sekanslama makinasına uygun olabilmesi için RNA'nın öncelikle fragmentasyonu ve büyüklük seçimi yapılması gerekir. Fragmentasyon için enzimler veya sonikasyon kullanılabilir. Büyüklük seçiminde küçük fragmentler elenir. Büyük ve sıkı bağlanmış olanlar seçilir. Genelde fragmentlerin uzunlukları 200-250 nükleotid arasında değişir. Elde edilen fragmentler rastgele primerler aracılığıyla ve reverse transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrilir. Daha sonra adaptör oligomerleri takılır, bunlar amplifikasyonu ve sekanslama için gereklidir. Farklı amplifikasyon yöntemleri ile katı yüzeye

tutulu örnekler çoğaltılır. Daha sonra tek zincirli hale getirilip dizileme için uygun form elde edilmiş olur [58].

- **Sekanslama**

Farklı platformlara ait farklı sekanslama stratejileri vardır. Bu stratejilerden en bilenenleri piro-sekanslama (Roche 454 sistemi), sentez bazlı sekanslama (Illumina) ve ligasyon bağlı sekanslamadır(SOLiD sistem). Bu çalışmada kullanılan RNA-seq dataları, Illumina HiSeq 400 sistemi kullanılarak elde dilmiştir. Bu sistemde her bir nükleotid farklı bir florasans boya ile bağlı bulunur ve sabit yüzeyde çoğaltılmış olan fragmentlerin üzerine eklenir. Yani toplamda dört farklı renkte florasans boya mevcuttur. Sonuç olarak uygun nükleotid bağlanırsa sentez gerçekleşir ve bağlı olan florasans ışıma yapar.



Şekil 2.3 Sekanslama ve sinyal okunmasının şekilsel gösterimi

Daha sonra 3 uçtaki sonlandırıcı ortadan kaldırılır ve yeni döngüye geçilir. Örneğin tamamını sekanslayana kadar döngüler devam eder. Bu tarz dizilmeye siklik geri dönüşümlü dizileme denir [57].

- **Data Analizi**

Bu aşama dizilemenin en karmaşık kısmıdır. Yüksek verimli sonuçlar için elde edilen ham veriler oldukça fazladır. Biyoinformatik araçlarla optimize edilir ve daha uygun hale getirilir. Dizileme yaklaşık 100-200 baz uzunluğundaki küçük parçalar üzerinden yapıldığı için bunların birleştirilmesi gerekir. Bunun için dizisi kesin olarak bilinen referans genomlar kullanılarak haritalama yapılır. Sıralanan küçük okuma parçalarının kontik adı verilen birbirleriyle benzer kısımları üzerinden küçük parçalar birleştirilir ve bir harita oluşturulup bütüne ulaşılır. En uygun hizalamayı bulmak için dinamik programlama algoritmaları kullanılır. Eğer referans genom kullanılmayacaksa de novo olarak haritalama yapılır. Dizileme ile gen ekspresyon ölçümü, transkriptlerin birleştirilme aşamasında her lokus için eşleşen okuma sayısının hesaplanmasıyla yapılır [59].

Birçok çalışmada temel amaç olan farklı oranda ekspresse olan genlerin (DEGs) analiziyle, değişen koşula göre hangi genin ekspresyonunun ne seviyede değiştiğini, neyin farklılaştığını göstermektir. Ayrıca bu genlerin tespitiyle, genlerin farklı kategorilerde sınıflandırılması ve böylece ifadesi değişen genlerin hangi sistemler üzerinde etkin rol oynadığının geniş bir açıdan görülmesi sağlanır. Bu kategorizasyon için gen ontoloji (GO) analizi kullanılır [59].

- **DEG Analizi**

Farklı oranda ekspresse olan genler (DEGs), iki ya da daha fazla farklı koşul, zaman veya yerde, ifade edilme oranlarında değişiklik gözlenen genler için kullanılan terimdir. Gen ekspresyon seviyesindeki bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı olmalıdır. DEGs'in belirlenmesi ve analizi, kanserleşme gibi biyolojik süreçlerde, ilaçların etkilerini inceleyen çalışmalarda ve dokuların gen profillerinin oluşturulmasında kullanılan önemli bir başlangıç noktasıdır. Teorik olarak bir dokuda kanser gözlendiğinde o dokuda ifade olan genlerde de farklılaşmalar olmalıdır. O dokuda ifadesi değişen genlerin tümü DEGs'i oluşturur [57]. Günümüzde birçok çalışmada, Microarray ve RNA-seq gibi transkriptom analizleriyle, DEGs belirlenir. Transgenik farelerde kalori kısıtlamasının gen ifadesindeki değişikliklerini araştıran bir çalışmada, RNA-seq ile elde edilen veriler sonucunda, KKK uygulanmış bireylerle AKK uygulanmış bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı 445 DEGs tespit edilmiştir. Bu, kalori kısıtlamasının iki farklı türünün gen ifadesinde önemli derecede değişikliğe neden olduğunu gösteren bir sonuçtur [54]. DEGs'in belirlenmesinden sonra bu veriyi daha da anlamlandırmak için genin işlev ve mekanizmasını tanımlayan analizler yapılır.

- **Gen Ontolojisi Analizi**

Gen Ontolojisi (GO), gen ve gen ürünlerinin biyolojik anlamlarının bütün canlı türleri için kapsamlı bir şekilde ele alıp daha iyi tanımlanabilmesi amacıyla oluşturulan bir isimlendirme kataloğudur. İsimlendirmeye evrensel bir standart getirmesi açısından önemlidir. Üç farklı alanda isimlendirme yapılır. Genin ne yaptığı bilgisi için "moleküler fonksiyon", ne amaçla yaptığı bilgisi için " biyolojik süreç", nerede yaptığı bilgisi için "hücresel bileşen" adlı kategoriler oluşturulmuştur. Bu üç anatasyonun her bileşeninin kendine özel bir GO numarası (GO ID) bulunmaktadır. Örneğin, biyolojik süreçler anatasyonunda, lenfosit aracılığıyla bağışıklığın düzenlenmesi için GO ID: GO:0002706 olarak kullanılır. Her anatasyonun altında, hiyerarşik şekilde oluşturulan daha spesifik alt anatasyonlar vardır. Aşağı gidildikçe temsil edilen gen sayısı da buna bağlı olarak azalır [61].



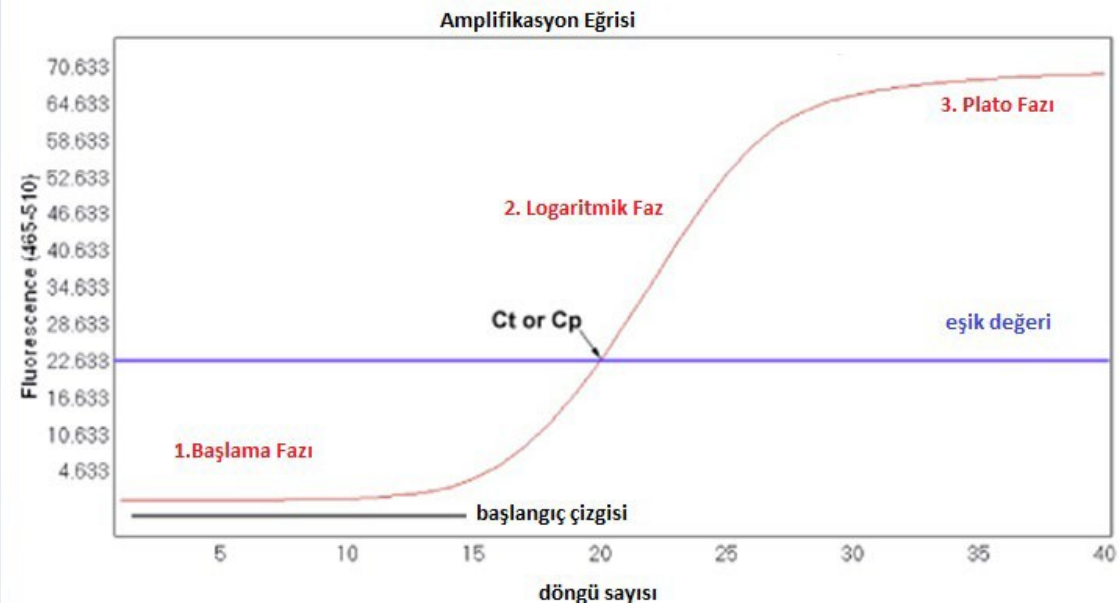
Şekil 2.4 GO:0002706 numaralı, lenfosit aracılığıyla bağışıklığın düzenlenmesinin, biyolojik süreç anatasyon ağacında gösterimi

2.5 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR), belirlenen dizilerin ya da tüm genomun çoğaltılması için kullanılır. Reaksiyon üç aşamanın döngüsü şeklindedir. İlk olarak denatürasyon ile zincirler ayrılır. Bağlanma aşamasında primerler bu zincirlere tutunur ve uzama aşamasında bu primerlerin yardımıyla ikinci zincir uzar. Bu döngü 25-35 defa tekrarlanır. Özelleşmiş bir türü olan Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR), PCR çoğaltımını görünür hale getirir. Bu amaçla floresan işaretli prob ve boyalar kullanılır. Floresan ışıma, oluşan DNA ile doğru orantılı olarak artar. Q-PCR, gerçek zamanlı miktar tayini için en sık kullanılan yöntemlerden biridir [62]. Dahası birçok transkriptom analizi çalışmasında validasyonu yöntemi olarak kullanılır. Örneğin bir çalışmada, farelerde metastaz öncesi kanser oluşumu ve metastaza giden süreçleri incelemek amacıyla, meme ve akciğer kanseri hücre-hattından elde edilen RNA'ya, RNA-seq ile transkriptom analizi yapılmış, daha sonra elde edilen veriler Q-PCR ile valide edilmiştir [63].

Q-PCR'da tercih edilen en temel beş saptama yöntemi şunlardır: Hidroliz probu yöntemi (klasik TaqMan sistemi), DNA ile birleşen boyaların, hibridizasyon probu yöntemi, moleküler boncuk yöntemi, "scorpion primeri" kullanımı. Bu yöntemlerden, DNA ile birleşen boyaların haricindekiler çoğaltacakları bölgeye özgüldürler. DNA'ya bağlanan boyalar ise özgül olmayarak herhangi çift zincirli DNA ile güçlü şekilde bağlanarak kompleks oluşturur. SYBR Green, DNA ile birleşen boyalardan biridir ve yeşil ışık yayar [64].

Q-PCR, üç aşamanın kombinasyonu ile oluşmuştur. 1. Aşamada mRNA, viral orjinli bir ters transkriptaz ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilir. 2. aşamada elde edilen cDNA'nın amplifikasyonu olur. 3. Aşamada ise ürünlerin tespiti ve sayılması olur. Bununla birlikte, bu PCR süresince 3 ayrı faz görülür. İlk olarak birkaç döngü süren ve saptanabilir oranda ürünün oluşmadığı arka plan faz vardır. Daha sonra, logaritmik fazda ürün miktarı üslü şekilde artar. Son olarak, eksponensiyel çoğalım olmayan reaksiyon ortamındaki enzim, primer ve nükleotidlerin tükendiği plato fazı gerçekleşir. Geleneksel PCR'ın aksine ölçüm plato fazından sonra değil, logaritmik faza göre yapılır. Böylece inhibitör miktarından, reaksiyon koşullarından ve amplifikasyon etkinliğinden daha az etkilenilir [64].



Şekil 2.5 Gerçek zamanlı PCR fazları ve amplifikasyon eğrisi grafiği

Logaritmik fazdaki çoğalmanın ifade edilmesinde (2.1) kullanılır.

$$T_n = T_0(E)^n \qquad (2.1)$$

Denklemde yer alan parametrelerden T_0 hedefinin ilk baştaki miktarını, T_n döngüsünde hedefin ulaştığı miktarı ve E de çoğalma etkinliğini gösterir. Buna göre çoğalmanın etkililiği maksimum 2 olabilir. Bu her döngünün sonunda 2 kat ürün elde dildiğini gösterir. PCR etkinliğinin minimum değeri 1'dir ve bu çoğalma olmadığını gösterir. Floresan ölçüm, Q-PCR'da her döngünün sonunda yapılır.

Böylece çoğalmanın logaritmik fazı kolayca tespit edilir. Q-PCR için bir diğer önemli değer eşik değeridir. Her çoğalmanın başlangıçtaki hedef dizi sayısı farklıdır. Reaksiyon boyunca diziler çoğalır ve her çoğalmanın eşit sayıda ürün içerdiği döngü, reaksiyonun eşik değerinin ifade eder. Buradan şu sonuca ulaşılır. İlk başta az sayıda hedef içerenlerin eşik değere ulaşması için daha fazla döngü gerekir. Eşik değer logaritmik fazın başladığı ve doğrusal bir artışın gözlendiği en düşük floresan değeri olarak tanımlanır [64].

Q-PCR'da miktarı bilinen "housekeeping genler" standart olarak kullanılır. Bu genler bir organizmanın her hücresinde ifade olan ve temel hücre fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli olan genlerdir. Pek çok çalışmada, GAPDH geni standart olarak kullanılır. Bu, hücrede her zaman belirli bir miktarda sentezlenen bir glikoliz enzimidir. Bunun dışında, β-aktinin ve albümin genleri referans gen olarak kullanılan genlere örnektir [65].

3

MATERYAL VE METHOD

3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan Hayvan Materyali

Bu çalışmada, MMTV-TGF-α farelerinden elde edilen timüs dokusu kullanılmıştır. Bu farelerin orijinali, Minnesota Üniversitesi Hormel Enstitüsü Tıbbi Araştırma Merkezi'nden Dr. Margot Cleary tarafından, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bir koloni oluşturmak için Dr. Soner Doğan'a bağışlanmıştır. Daha sonra, önceden tanımlanmış yetiştirme protokolü esas alınarak Yeditepe Üniversitesi Hayvan Tesislerinde yetiştirilmiştir. Buna göre, yaşamlarının 10. haftasından itibaren 3 beslenme grubuna (AL, KKK, AKK) ayrılan fareler ve 17 ile 18. haftalarda 49 ile 50. haftalarda ve 80 ile 81. haftalarda sakrifiye edilmiştir. KKK, AL beslenmeden %15 kısıtlama ile olmuştur. AKK, açık periyotta AL beslenmeden %60 kısıtlama ile olmuştur.(Çizelge 3.1) Diyet olarak Altromin TPF1414 kullanılmıştır. Bu diyet Kobay A.Ş. (Ankara/ Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Diyetin bileşenleri Tablo 3.1'de belirtilmiştir. Yetiştirilen farelerden elde edilen timüs dokusu RNA izolasyonuna kadar -80°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1 17 ile 18. haftalarda sakrifiye edilen farelerin kalori alım oranı tablosu

11	12	13	14
KKK / AKK	KKK / AKK	KKK / AKK	KKK / AKK
%85 / %100	%85 / %100	%85 / %100	%85 / %40

Tablo 3.2 Altromin TPF1414 diyetin bileşenleri

	1414 TPF
Nem [%]	**11.0**
Ham Protein [%]	**25.0**
Ham lipit [%]	**9.0**
Ham Lif [%]	**2.5**
Ham Kül [%]	**6.5**

3.1.2 Kullanılan Biyoinformatik Veriler

Bu çalışmada, karşılaştırmalı analiz yapabilmek için daha önceden bölümümüzde yürütülen 2016-01-07-DOP01 numaralı BAP projesinden elde edilen RNA-seq verileri kullanılmıştır. Bahsedilen veriler, bu çalışmada da kullanılan hayvan materyaliyle aynı prosedür ve ortamda yetiştirilmiş hayvanların timüs dokusundan saflaştırılan RNA'nın, RNA-seq bazlı transkriptom analizi sonucu elde edilmiştir. Analiz sonucu tespit edilen, $p<0,05$ istatiksel önem derecesinde, 6091 adet farklı oranda ekspresse olan gen (DEG), bu çalışmada incelenecek genlerin arama havuzu olarak kullanılmıştır.

3.2 Method

3.2.1 Genlerin Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılacak genlerin belirlenmesinde IntOGen mutasyon platformu kullanıldı. Bu platforma göre, yaşlanma oluşumunda en çok tekrarlanan mutasyona uğramış genlerden 15 gen seçildi.

Tablo 3.3 Belirlenen genlerin forward ve reverse primer dizileri

Primer	Dizi (5' -> 3')	Tm Değeri [°C]
Apod-F	AGCCAACTACTCGCTGATGG (20)	59,4
Apod-R	GAGACGTTGCTCTGTTTGGC (20)	59,4
Bcl6-F	TAGGCAGACACAGGGACTTGA (21)	59,8
Bcl6-R	CAAGCATGACGCAGAATGTGG (21)	59,8
Cav1-F	GACCCCAAGCATCTCAACGA (20)	59,4
Cav1-R	CGTCGAAACTGTGTGTCCCT (20)	59,4
Cdkn1-F	GTCCTTGGTGGTGAGACAGG (20)	61,4
Cdkn1-R	CATCCCAGATAAGCCCACCC (20)	61,4
Coq7-F	CACAGTTCGGGGATGACCTT (20)	59,4
Coq7-R	TGCTCCATATTCACCAGCGT (20)	57,3
Krt14-F	GCGCACCAAGAACTAAAGCTG (21)	59,8
Krt14-R	GGACAATACAGGGGCTCTTCC (21)	61,8
Opa1-F	CAAGCATTACAGGAAGGTGTCAG (23)	60,6
Opa1-R	GCGCTCCAAGATCCTCTGAT (20)	59,4
Rsl1d1-F	AAAGCCTATGAAGCCAAGCTCC (22)	60,3
Rsl1d1-R	TGCCAGAAGGTTCACAGACA (20)	57,3
Scp2-F	AGTCTGTAGGAGACCTTCGCT (21)	59,8
Scp2-R	GAGTTCTCACCTCCAGGCTTC (21)	61,8
Smc5-F	GCAGAGACGGAGTGTGAGTG (20)	61,4
Smc5-R	GCCACAAGACTGCATCATACG (21)	59,8
Sod1-F	TGTGACTGCTGGAAAGGACG (20)	59,4
Sod1-R	ACGGCCAATGATGGAATGCT (20)	57,3
Tbx2-F	ACAAGTACCAGCCGCGATTC (20)	59,4
Tbx2-R	AGTGACAGCGATGAAGTCGG (20)	59,4
Top2b-F	GCTGAGGGTATTGGGACTGG (20)	61,4
Top2b-R	CCTTCTAGCATCCGCCTGAC (20)	61,4
Trp53-F	TTGGACCCTGGCACCTACAATG (22)	64
Trp53-R	GCAGACAGGCTTTGCAGAATGG (22)	64
Wrnip1-F	GGGCTTGAATGGACTGCAAC (20)	59,4
Wrnip1-R	AAATGTGGGACCGCTGTAGG (20)	59,4

3.2.2 RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi

RNA-seq dataları, 10. haftadan itibaren kalori kısıtlaması uygulamasının iki türü uygulanmış ve 17 ile 18. haftalarda sakrifiye edilen MMTV TGF-α fareleri ile kontrol grubu olarak Ad Libitum beslenmiş yine aynı tür farelerden elde edilen timüs dokusundan izole edilen RNA'yı kullanılarak elde edilen datalardır. Bu dataların içinde 3 farklı beslenme grubu için 3 farklı data mevcuttur. Bu datalar, belirlenen beslenme grupları için $p<0,05$ istatiksel önem derecesinde 6091 adet farklı oranda ifade olan gen (DEG) olduğunu gösterir. Bunların, 2281 tanesinin AL-KKK arasında, 2825 tanesinin KKK-AKK arasında, 445 tanesinin AL-AKK arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler belirlemiş olduğumuz genler için bir arama havuzu olarak kullanılmıştır. Belirlemiş olduğumuz genlerin bu datalarda aranması için Linux işletim sistemi bulunan bilgisayardan Linux terminal kullanıldı. R programı aracılığı ile gerekli bilgiler çekildi. Bunu için şu sıralı kodlar yazıldı.

1. $ R

R program diline giriş yapıldı.

2. > library(cummRbund)

Komutu ile R içindeki CummRbund kütüphanesine ulaşıldı.

3. >cuff_data < - readCufflinks('diff_out')

Cuffdiff çıktısından bir CummeRbund veritabanı oluşturuldu.

4. >mygene<- getGene(cuff_data, 'Gen')

>expressionBarplot(mygene)

İstenilen bir genin farklı verilerdeki ekspresyon seviyesi görüntülendi. Daha sonra belirlenen genlerin ulaşılan sonuçlarına göre, 3 beslenme grubu için ifade edilme oranlarındaki değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığına yine bu dataların kullanılması sonucunda ulaşıldı. İstatistiksel olarak önemli olan genler kaydedildi.

3.2.3 RNA İzolasyonu ve RNA Miktar Tayini

17./18. haftalarda, 49./50. haftalarda ve 80./81. haftalarda sakrifiye edilen MMTV-TGF-α farelerinden elde edilen timüs dokularından kesilerek 25-30 mg'lık örnekler alındı. Bu örneklerden RNA izolasyonunda Qiagen RNeasy Mini Kit kullanıldı. İlk

olarak örnekler eppendorf tüplere alındı ve liziz tampon çözeltisinin içine 1ml için 10 µL olacak şekilde β-merkaptoetonol eklendi. Daha sonra örneklerin üzerine 300 µL liziz tampon çözeltisi eklendi. Homojenizatör aracılığı ile doku parçalandı. Tüpe 300 µL daha liziz tampon çözeltisi eklendi. 3 dakika maksimum hızda santrifüj edilen örneklerin katmanlı yapı oluşturması sonucunda, süpernatant kısmı yeni bir tüpe alındı, pelet kısmı atıldı. %70'lik etanolden, alınan süpernatant ile eşit hacimde tüpün içerisine eklendi ve pipetajla karışması sağlandı. RNeasy kolonlarının altına 2 mL'lik toplama tüpleri yerleştirilip, her seferinde maksimum 700 µL olacak şekilde kolonlardan örnekler geçirildi. RNeasy kolonlar 8.000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Daha sonra 700 µL RW1 tamponu eklendi ve 15 sn 8.000 x g'de santrifüj edildi. Daha sonra 500

µL RPE tamponu eklenip 15 sn 10.000 x g'de santrifüj edildi. 500 µL RPE tamponu daha eklenip bu sefer 2 dakika 10.000 x g'de santrifüj edildi. RNeasy kolonu 1 dakika boş olarak maksimum hızda santrifüj edildi. 1,5 mL'lik yeni tüp kolonun altına konulup 30 µL RNaz'sız su eklendi ve 1 dakika 10.000 x g'de santrifüj edildi. Son işlem bir kez daha tekrarlandı.

Elde edilen çözeltiden RNA konsantrasyon ve miktar tayini için NanoDrop spektrofotometre ile ölçüm yöntemi kullanıldı. Öncelikle referans olarak RNaz'sız sudan 1 µL aletin kuyusuna damlatılıp boş ölçüm alındı. Daha sonra RNA içerdiği düşünülen çözeltiden 1 µL alınıp aletin kuyusuna damlatıldı ve ölçüm yapıldı. Örneklerin saflık derecesi ve RNA miktarı sayısal ve grafik olarak elde edildi.

3.2.4 RNA Jel Elektroforezi

RNA Elektroforez jeli yapımında öncelikle (75 mL %1 lik) hazırlamak için 0,75 g agaroz tartıldı ve sterilize edilmiş bir beherin içine aktarıldı. 5X'lik MOPS' tan 15 mL ve DEPC'li sudan 46,875 mL alınıp beherin içerisine aktarıldı. Sonra ağzı kapatılan beher mikro dalga fırına koyulup agarozun çözünmesi sağlandı. Buharlaşan kısım yerine DEPC'li su ilave edildi ve etüvde sıcaklığının 60°C'ye gelmesi için bekletildi. Bir tüpte 13,125 mL formaldehit etüvde ısıtılarak sıcaklığının 60°C'ye gelmesi sağlandı. Toplam 75 mL'lik hacme ulaşmak için formaldehit beherin içerisine aktarılırdı. Bir süre elle karıştırılarak formaldehitin karışım içine iyi bir şekilde dağılması amaçlandı. Daha sonra jel döküldü ve taraklar yerleştirildi. Donması beklendi. 1X MOPS, tank tamponu olarak

kullanıldı. RNA örnekleri yükleme için Tablo 3.4 esas alınarak hazırlandı.

Tablo 3.4 Yükleme için RNA örneklerinin hazırlanması

Gerekli Malzemeler	**Yüklenen Miktar**
5X MOPS	2 µL
RNA	2 µL
Steril DEPC'li Su	2,5 µL
Formaldehit	3,5 µL
Formamid	10 µL
Etidyum Bromür (mg/mL)	0,5 µL
	Toplam = 20,5 µL

RNA örneği içeren tüpler, 55°C de 15 dakika kuru ısı bloğunda inkübe edildi. Ardından örneklere 2 µL yükleme tamponu eklenerek, jele yüklendi. Jelde 60 Voltta 90 dakika yürütüldü.

3.2.5 Primer Tasarlama

Bu çalışmada Gerçek Zamanlı PCR'da kullanılacak olan, seçilen altı gene ait ileri ve geri yönlü primer literatürdeki örnekleri incelenerek belirlendi. Belirlenen primerler hizmet alımı ile sentezlettirildi.

3.2.6 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA sentezi için hazır ticari kitlerden biri olan GeneMark First Strabded Synthesis Kit (SAMscript) kullanıldı. Deney esnasında yapılan işlemler buz üzerinde yapıldı. cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları eşitlendi. Bunun için her örnekten farklı miktarlarda toplamda 10 µg RNA içerecek hacimde örnek alındı ve RNaz'sız tüpe aktarıldı. Tüpe, 1 µL random primer eklendi. Daha sonra 3 dakika buzda bekletildi. Bu arada, bir tüpün içerisinde Tablo 3.5 esas alınarak 9 örnek için bir karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımdan 5,5 µL alınarak tüplerin içine konuldu ve toplam hacim 20 µL'ye ulaşıldı. 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika ve 72°C'de 5 dakika bekletildi. Hazırlanan cDNA'lar gerçek zamanlı PCR'da kullanılmak üzere -20°C'de derecede saklandı.

Tablo 3.5 cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve hacimleri

Bileşen	**Hacim (µL)**
RT tampon (10x)	4
dNTP Karışımı	2
RT enzim	1
RNaz inhibitörü	1

3.2.7 Gerçek Zamanlı PCR

cDNA eldesinden sonra Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR) işlemi için de hazır ticari kitlerden biri olan GM SYBR Q-PCR Kit kullanıldı. Deney sırasında yapılan işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. cDNA'lar 1'e 3 oranında distile su ile seyreltildi. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonları için gerekli bileşenler Tablo 3.6'te belirtilen hacimlerde ve toplam hacim 15 µL olacak şekilde kullanıldı.

Tablo 3.6 PCR reaksiyonları için gerekli hacmi içeren bileşenler

Bileşen	**Hacim**
Nükleaz'sız Su	5,6 µL
GM SYBR Q-PCR Karışım	7,5 µL
Geri Primer	0,2 µL
İleri Primer	0,2 µL
cDNA	1,5 µL
	Toplam = 15 µL

Hazırlanan karışım Biorad Gerçek Zamanlı PCR cihaza konup Tablo 3.7'deki şartlarda Gerçek Zamanlı PCR gerçekleştirildi.

Tablo 3.7 Q-PCR reaksiyonları için gerekli olan sıcaklık değerleri ve süreler

Sıcaklık (°C)	**Süre**	
95	120 sn	
95	15sn	
59-62	30 sn	40 siklus
72	30 sn	

Gerçek zamanlı PCR (Q-PCR) reaksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten sonra, C_t değerleri incelenen 15 gen ve GAPDH geninde kat değişimi (fold change) hesaplamak amacıyla kullanıldı. ΔC_t ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplamak için karşılaştırmalı C_t metodu kullanıldı.

4

SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 Sonuçlar

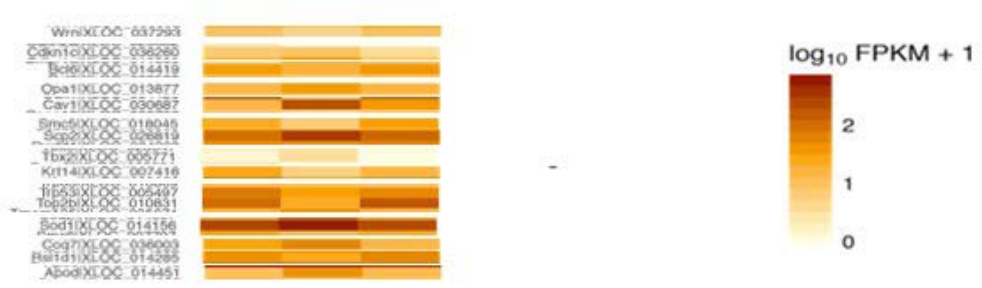
4.1.1 Genlerin Belirlenmesi

Genlerin belirlenmesinde IntOGen mutasyon platformu kullanılarak aşağıdaki genler seçildi. Bu seçimde yaşlanmayla ilişkili genlerde mutasyon oluşumu en çok tekrarlanan genlerin seçilmesine dikkat edildi. Böylece şu genler belirlendi:

* Wrnip1, Trp53, Top2b, Tbx2, Sod1, Smc5, Scp2, Opa1, Krt14, Coq7, Cdkn1, Cav1, Bcl6, Apod, Rsl1d1

4.1.2 RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi Sonuçları

Belirlenen genlerin ifade edilmesindeki değişiklikler, daha önceki çalışmada elde edilmiş RNA-seq datalarından tespit edildi. Bu datalar, belirlenen beslenme grupları için $p<0,05$ istatiksel önem derecesinde 6091 adet farklı oranda ifade olan gen (DEG) olduğunu gösterir. Bu genler belirlediğimiz genler için arama havuzu olarak kullanıldı ve seçilen genlerden 15 tanesinin 3 beslenme grubu arasında ifade edilmesindeki değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna ulaşıldı.



Şekil 4.1 RNA seq. Heatmap sonuçları[1]

[1] Yukarıdan aşağıya sırasıyla Wrnıp1, Cdnkn1, Bcl6, Opa1, Cav1, Smc5, Scp2, Tbx2, Krt14, Trp53, Top2b, Sod1, Coq7, Rsl1d1, Apod

4.1.3 RNA Miktarı Tayini Sonuçları

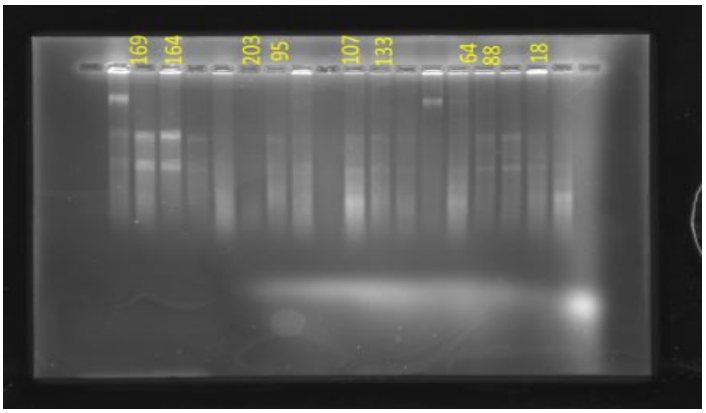
RNA konsantrasyon ve miktar tayini için NanoDrop spektrofotometre ile ölçüm yöntemi kullanıldı. Öncelikle referans olarak RNaz'sız sudan 1 µL aletin kuyusuna damlatılıp boş ölçüm alındı. Daha sonra RNA içerdiği düşünülen çözeltiden 1 µL alınıp aletin kuyusuna damlatıldı ve ölçüm yapıldı. Örneklerin saflık derecesi ve RNA miktarı sayısal ve grafik olarak elde edildi.

Tablo 4.1 İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık ölçüm değerleri

Doku Örneği	Sakrifiye Haftası	Beslenme Grubu	Konsantrasyon	A260/280
T 169	17/18	AL	514,6	2,1
T 164	17/18	KKK	608,3	2,11
T 203	17/18	AKK	311,7	2,11
T 95	49/50	AL	243,6	2,09
T 107	49/50	KKK	440,4	2,09
T 133	49/50	AKK	206,4	2,08
T 64	80/81	AL	299,2	2,08
T88	80/81	KKK	262	2,09
T18	80/81	AKK	358,5	2,09

4.1.4 RNA Jel Elektroforezi

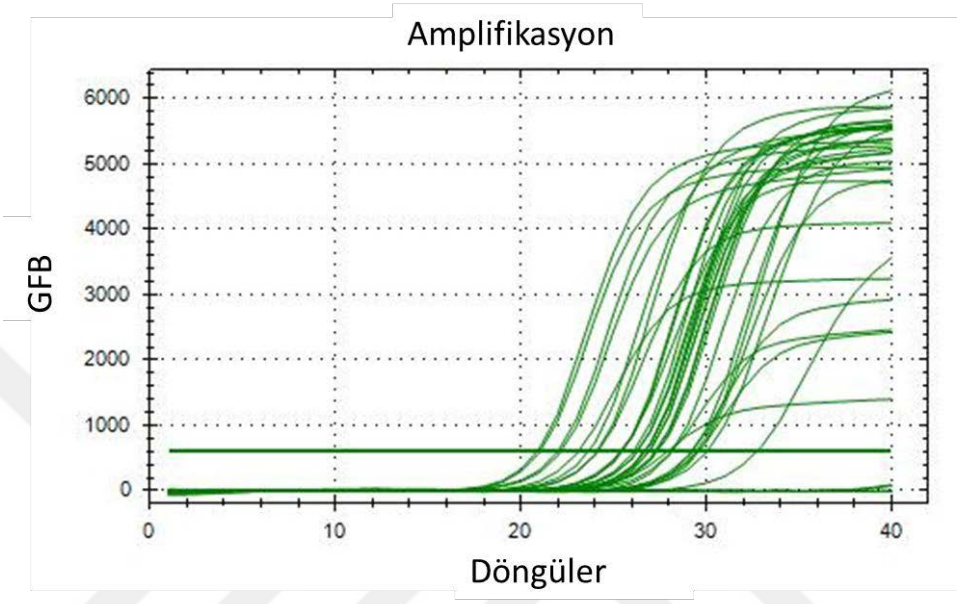
RNA jel elektroforezi soncunda aşağıdaki jel görüntüsü elde edilmiştir.



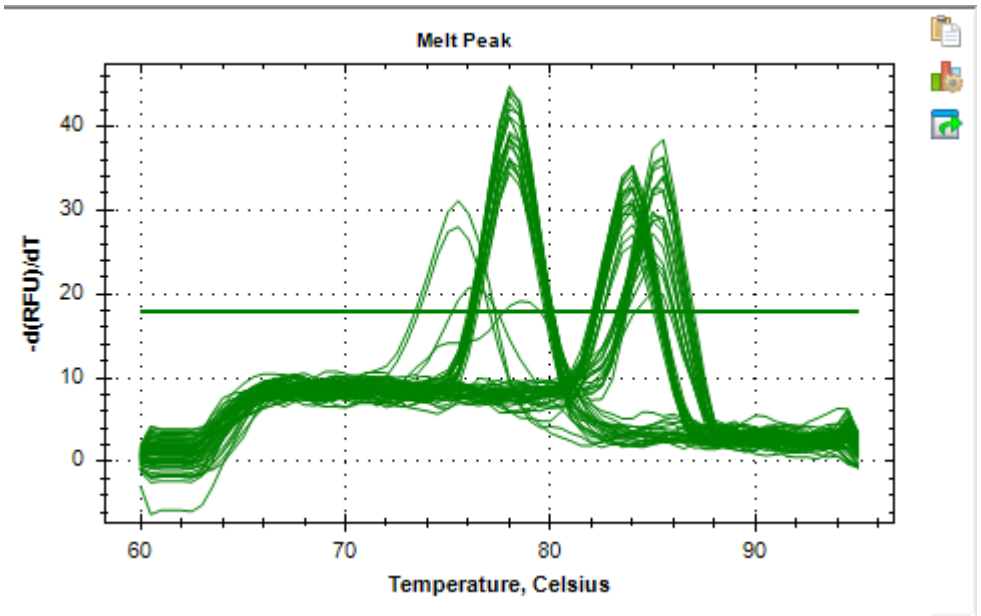
Şekil 4.2 RNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (soldan sağa 169 (18. HAFTA AL), 164 (18. HAFTA KKK), 203 (18. HAFTA AKK), 95 (50. HAFTA AL), 107 (50. HAFTA KKK), 133 (50. HAFTA AKK), 64(80. HAFTA AL), 88 (80.HAFTA KKK), 18 (80. HAFTA AKK))

4.1.5 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

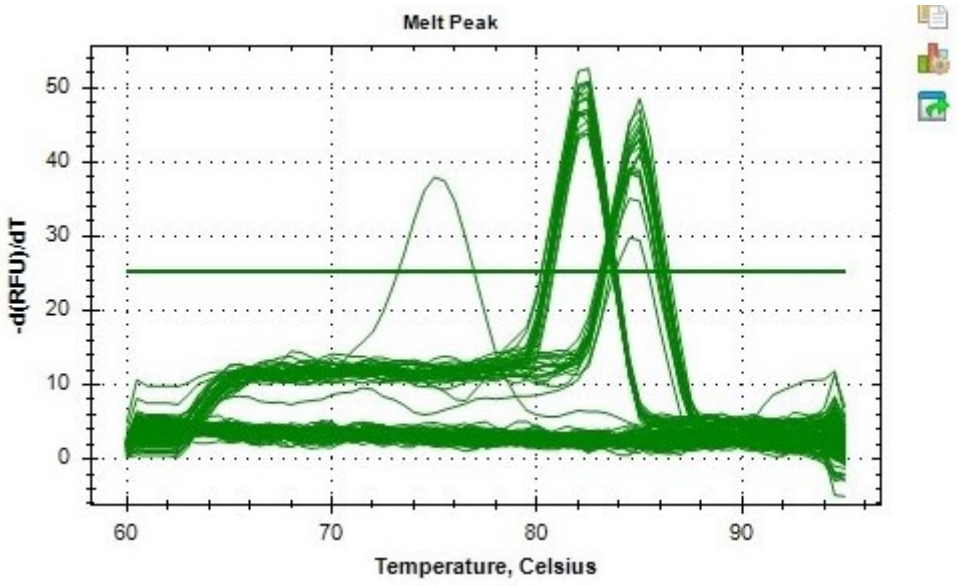
Gerçek Zamanlı PCR sonucunda farklı beslenme grubunda ve farklı haftalarda örneklerde 15 gen için ekspresyon miktarlarındaki kat değişimi değerleri (4.1) kullanılarak hesaplanmıştır. Amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisine örnek olarak OPA1 ve KRT14'e ait grafikler Şekil 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir.



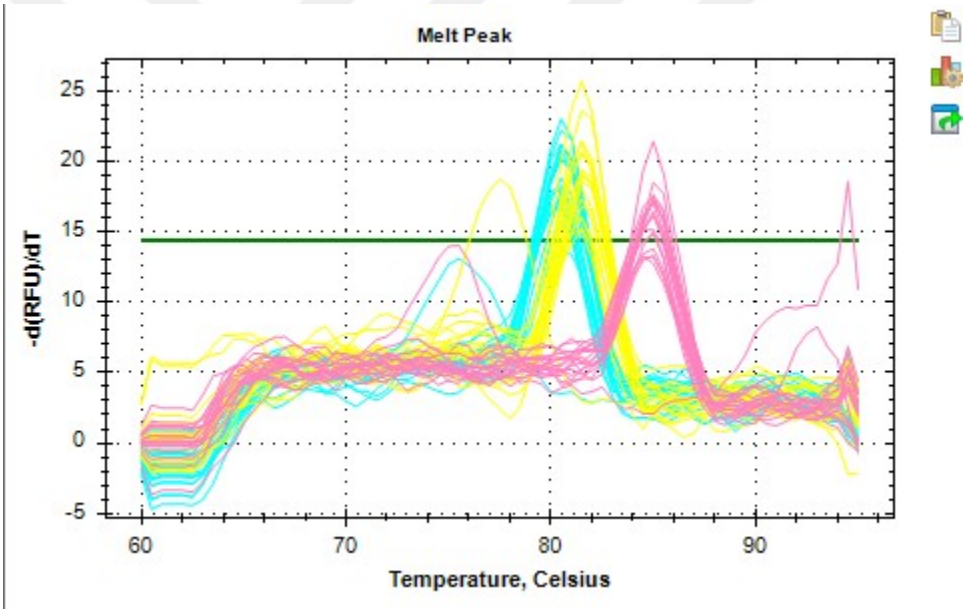
Şekil 4.3 OPA1 ve KRT14'e ait çoğalma eğrisi grafiği



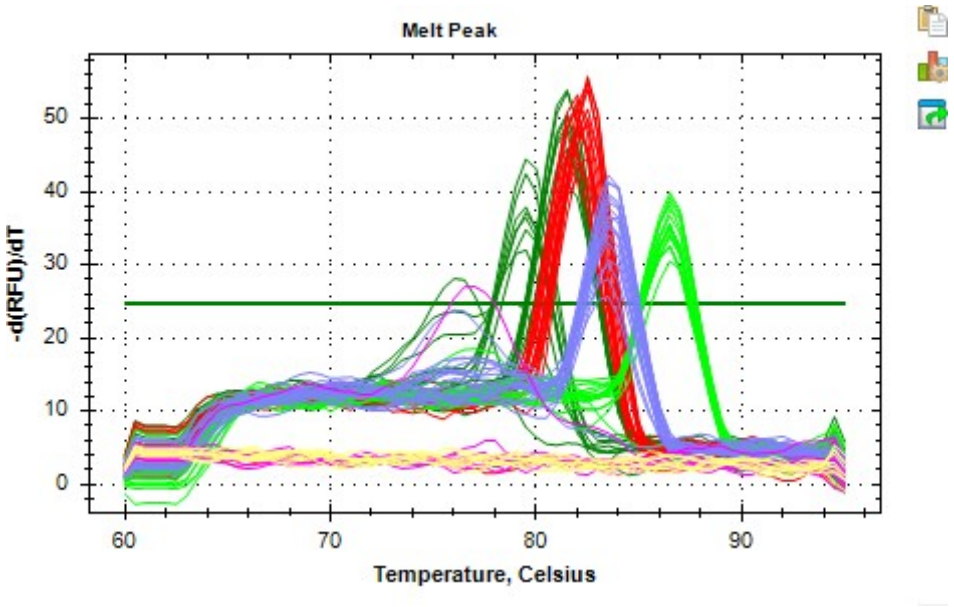
Şekil 4.4 OPA1 ve KRT14'e ait erime eğrisi grafiği



Şekil 4.5 TRP53'e ait erime eğrisi grafiği



Şekil 4.6 APOD ve CAV1'e ait erime eğrisi grafiği



Şekil 4.7 SCP2, SOD1, TBX2, TOP2B ve RSL1D1'e ait erime eğrisi grafiği

GAPDH ve belirlenen genlerin ortalama C_t değerleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3 GAPDH ve belirlenen genlerinin ortalama C_t değerleri

	169 18. AL	164 18. KKK	203 18. AKK	95 50. AL	107 50. KKK	133 50. AKK	64 80. AL	88 80. KKK	18 80. AKK
GAPDH	19.24	21.88	20.72	23.13	23.14	22.52	19.17	23.12	22.79
WRNIP1	23,69	23,52	23,87	25,52	24,53	23,53	23,54	25,31	24,17
TOP2B	21,08	21,55	22,06	21,88	20,97	22,7	22,23	23,23	20,87
TBX2	24,89	25,9	24,95	26,38	27,17	24,65	25,16	27,28	26,54
SOD1	19,44	19,22	19,15	19,54	19,2	18,73	19,45	19,72	20,35
SMC5	35,2	28,9	38,64	39,14	27,73	36,37	34,25	38	38,3
SCP2	26,91	25,36	26,45	25,5	25,73	25,28	24,59	25,71	27,65
OPA1	22,12	23,14	22,77	22,77	22,38	22,32	22,21	22,45	22,44
KRT14	25,42	25,27	26,53	25,86	25,37	24,13	25,9	25,55	24,72
COQ7	22,32	22,34	21,37	23,18	23,2	20,9	21,83	21,61	22,06
CDKN1	21,46	22,22	22,13	22,26	21,77	21,60	22,4	20,87	22,19
CAV1	28,37	29,6	29,85	27,01	26,3	26,93	26,45	23,73	25,1
BCL6	19,82	20,31	19,71	20,33	19,8	19,62	21	20,73	19,46
APOD	26,03	27,37	28,21	27,05	26,66	26,97	26,06	24,19	24,47
RSL1D1	21,57	22,61	22,12	23,51	22,83	21,49	21,81	24,55	24,78
TRP53	20,05	20,73	21,67	21,62	21,65	20,32	21,34	22,38	22,8

ΔC_t (Kontrol) = C_t(Kontrol grubu Hedef geni) - C_t(Kontrol grubu Referans geni)

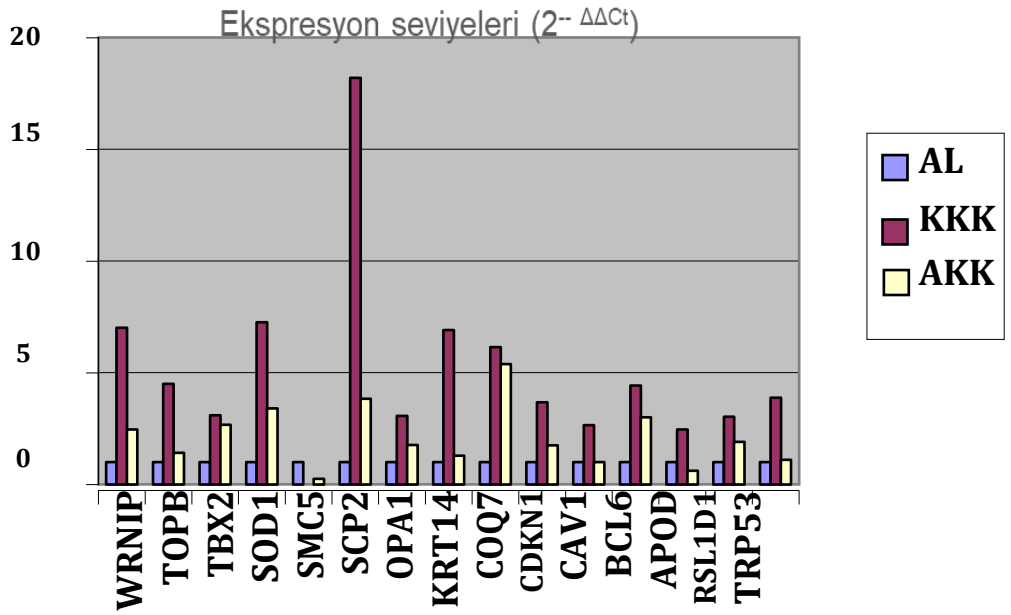
ΔC_t (Deneysel) = C_t(Deney grubu Hedef geni) - C_t(Deney grubu Referans geni)

$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Denseysel) - ΔC_t(Kontrol)

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Kat değişim değeri (4.1)

Tablo 4.4 Belirlenen genlerin AL'ye göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

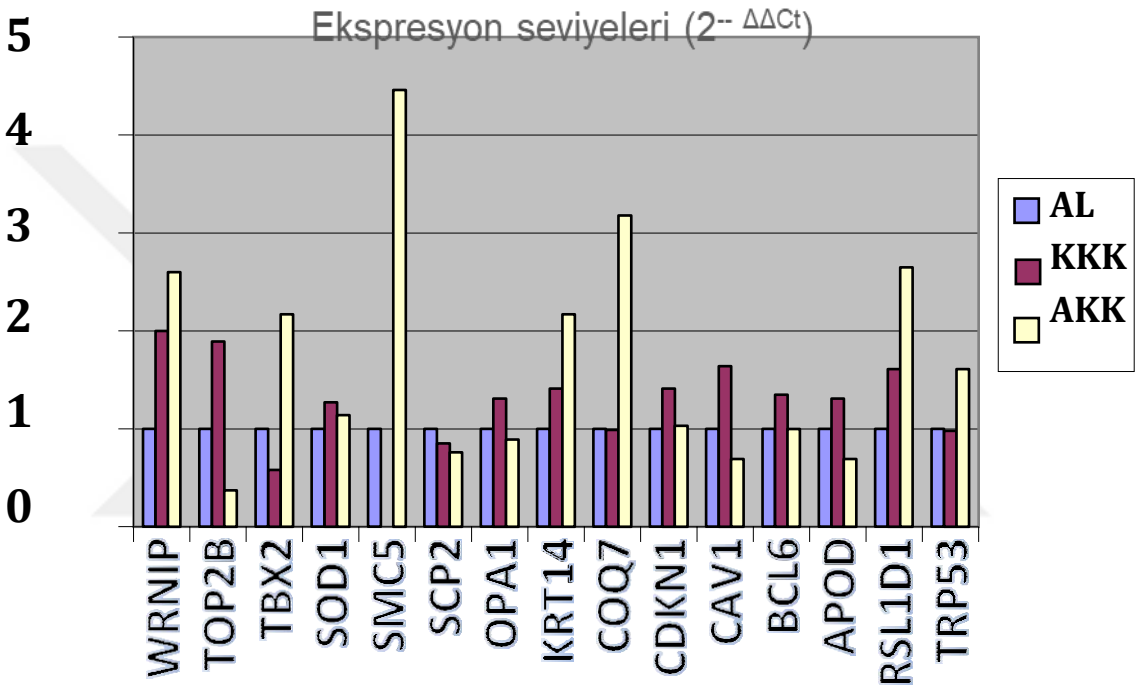
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Genler	169 18. AL	164 18. KKK	203 18. AKK	95 50. AL	107 50. KKK	133 50. AKK	64 80. AL	88 80. KKK	18 80. AKK
WRNIP1	1	7,01	2,46	1	2	2,6	1	4,53	7,94
TOP2B	1	4,5	1,41	1	1,89	0,37	1	9,91	28,05
TBX2	1	3,09	2,67	1	0,58	2,17	1	19,02	4,08
SOD1	1	7,26	3,41	1	1,27	1,14	1	12,8	5,35
SMC5	1	491,1	0,25	1	2740	4,46	1	74,54	15,56
SCP2	1	18,2	3,83	1	0,85	0,76	1	34,77	5,35
OPA1	1	3,07	1,77	1	1,31	0,89	1	21,11	15,45
KRT14	1	6,91	1,29	1	1,41	2,17	1	81,57	43,11
COQ7	1	6,14	5,38	1	0,99	3,18	1	21,4	7,62
CDKN1	1	3,68	1,75	1	1,41	1,03	1	42,5	23,58
CAV1	1	2,65	1	1	1,64	0,69	1	116,9	330,8
BCL6	1	4,43	3,01	1	1,35	1	1	16,44	14,6
APOD	1	2,46	0,61	1	1,31	0,69	1	36,5	164,2
RSL1D1	1	3,03	1,9	1	1,61	2,65	1	23,9	1,94
TRP53	1	3,89	1,1	1	0,98	1,61	1	39,39	5,61



Şekil 4.8 18. Hafta ekspresyon seviyeleri

17. Hafta sonuçlarına göre;

- Wrnıp geni, Top2b geni, Tbx2 geni, Sod1 geni, Scp2 geni, Opa1 geni, Krt14 geni, Coq7 geni, Cdkn1 geni, Cav1 geni, Bcl6 geni, Rsl1d1 geni ve Trp53 geni için KKK beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, AKK da KKK'ya göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür.
- Apod geni için KKK beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, AKK da en az ekspresyon seviyesi görülmüştür.



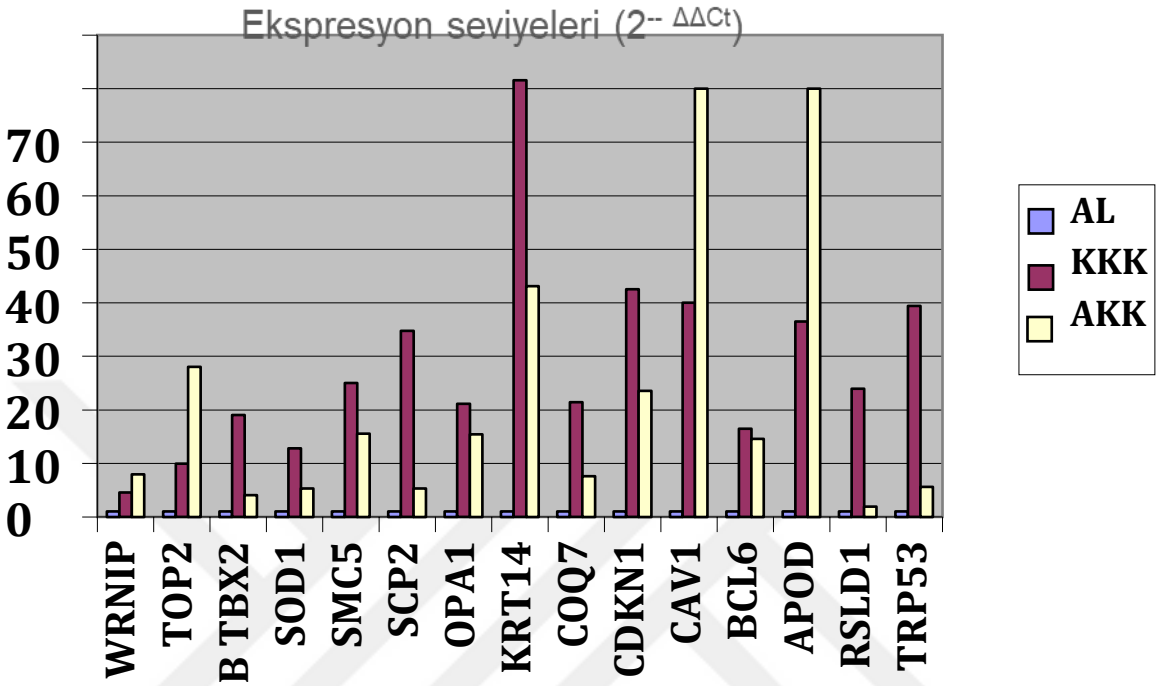
Şekil 4.9 50. Hafta ekspresyon seviyeleri

50. Hafta sonuçlarına göre;

- Wrnıp geni, Krt14 geni, Coq7 geni, Rsl1d1 geni ve Trp53 geni için AKK beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, KKK da AKK'ya göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür. En düşük ekspresyon seviyesi AL'de gözlemlenmiştir.
- Tbx2 geni AKK beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, KKK'da en az ekspresyon seviyesi görülmüştür.
- Top2b geni, Sod1 geni, Opa1 geni, Cdkn1 geni, Cav1 geni, Bcl6 geni, Apod geni için KKK beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, AKK da

KKK'ya göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür.

- Scp2 geninde AL beslenme tipinde en fazla ekspresyon görünürken, KKK'da orta seviyede, AKK'da ise en az seviyede ekspresyon gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10 80. Hafta ekspresyon seviyeleri

80. Hafta sonuçlarına göre;

- Wrnıp geni, Top2b geni, Cav1 geni ve Apod geni için AKK beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, KKK beslenme tipinde ekspresyon seviyeleri AKK'ya nispeten daha az gözlemlenmiştir.
- Tbx2 geni, Sod1 geni, Smc5 geni, Scp2 geni, Opa1 geni, Krt14 geni, Coq7 geni, Cdkn1 geni, Bcl6 geni, Rsl1d1 geni ve Trp53 geni için KKK beslenme tipinde ekspresyon seviyesi en fazla iken, AKK da KKK'ya göre daha az ekspresyon seviyesi görülmüştür.

4.2 Öneriler

Yaşlanma, strese uyum cevabında azalmaya yol açan ve yaşla ilişkili hastalıkların riskinin arttığı, fonksiyonlarda ilerleyici ve yaygın bir bozukluk olarak tanımlanabilir. Yaşlanan bireyin dışarıdan gelen uyarılara karşı homeostazı koruması giderek zorlaşır. Yaş ilerledikçe immün sistemdeki değişikliklerle hem

otoimmun hastalıklara hem de infeksiyonlara yatkınlık ortaya çıkar. Kanser insidensinde belirgin bir artış gözlenir. [67].

Yaşlanma, insan yaşamında doğal ve aşamalı bir süreçtir. Kalori kısıtlamasının, yaşam süresi ve yaşlanma üzerine etkisi, 1930'larda yapılan bir çalışma ile ilk olarak kaydedilmiştir. Sıçanlarda yapılan bu çalışmada beslenmedeki kısıtlamanın yaşam süresini uzattığı ve yaşlanmayı geciktirdiği sonucuna ulaşılmıştır [31].

Kalori kısıtlamasının iki yaygın kullanımı vardır. İlki, sürekli kısıtlama uygulanan kronik kalori kısıtlaması (KKK), diğeri kısıtlama periyotları olan aralıklı kalori kısıtlamasıdır (AKK). Bunlar dışında, kalori kısıtlama çalışmalarında kontrol grubu olarak besin ve suya erişimin serbest olduğu ad libitum beslenme kullanılır [61]. Bu çalışmada kullanılan RNA'lar, 10. haftadan itibaren ad libitum beslenme, kronik kalori kısıtlanmış beslenme ve aralıklı kalori kısıtlanmış beslenme olmak üzere üç besleme grubuna ayrılan MMTV-TGF-α farelerin timüs dokularından izole edilmiştir. Bu farelerin bir kısmı 17./18. haftada, bir kısmı 49./50. haftada, bir kısmı da 80./81. haftada sakrifiye edilmiştir. Sonuç olarak, 3 ayrı beslenme grubundan 3 farklı zamanda alınan timüs dokusuna ait RNA envanteri elde edilmiştir.

Bölümümüzde tamamlanan daha önceki bir çalışmada ulaşılan RNA-seq verileri, bu çalışmada referans olarak kullanılmıştır. Bahsi geçen RNA-seq'de kullanılan RNA'lar, bu çalışmada kullanılan farelerle aynı protokolle ve aynı yerde yetiştirilmiş, 17./18. haftalarda sakrifiye edilmiş farelerin timüs dokusundan elde edilmiştir. RNA-seq verilerinde, $p<0,05$ istatiksel önem derecesinde toplamda 6091 "farklı oranda ekspresse olmuş gen" tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki dağılımına bakıldığında, 2281 tanesinin AL-KKK arasında, 2825 tanesinin KKK-AKK arasında, 445 tanesinin AL-AKK arasında olduğu görülmüştür. Bu veriler, bu çalışmada tarama havuzu olarak kullanılmıştır [61].

Buradan seçilen 15 gen, RNA-seq verilerinde tespit edilen DEGs havuzunda arandı ve ifade edilme oranlarında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler olduğu tespit edilmiştir.

Buna göre, WRNIP1, TOP2B, SCP2, KRT14, CDKN1, CAV1, APOD ve TRP53

genleri için AL-KKK arasında ekspresyon farklıkları görülmektedir. TBX2, SOD1,

SMC5, OPA1, COQ7, BCL6, RSL1D1 genleri için ise AL-AKK arasında ekspresyon farklılıkları görülmektedir.

Kalori kısıtlamasının yaşlanmayı negatif yönde etkilediğini gösteren birçok mekanizma tespit edilmiştir. [3].

Yapılan Q-PCR sonuçlarında, 18. haftada WRNP1 geninin ekspresyonunun KKK beslenmiş farede AL ve AKK beslenmiş farelere göre fazla olduğu sonucuna ulaşıldı (Şekil 4.8). Aynı genin 50. haftadaki Q-PCR'da ölçülen ekspresyon sonuçlarında ise AKK ile beslenmiş farede ekspresyonun AL ve KKK'ya göre daha fazla olduğu sonucuna ulaşıldı (Şekil 4.9). 80. hafta sonuçlarında da buna benzer olarak AKK beslenmede en fazla ekspresyon gözlenirken KKK ve AL beslenmiş farelerde az miktarda ekspresyon tespit edildi (Şekil 4.10). 18. Haftada çıkan Q-PCR sonuçlarıyla RNA Seq. Sonuçları eşleşmemektedir (Tablo 4.4). Bu veriler sonucunda KKK beslenmenin bu gen üzerine pozitif etki yaptığı düşünülmektedir. WRNIP1'in erken yaşlanma hastalığı Werner sendromunda defektif olan WRN helikaz ile etkileşime girdiği bildirilmiştir [14].

Q-PCR'da ekspresyonuna bakılan diğer bir gen olan TOP2B geninin 18. hafta için elde edilen sonuçlarında, KKK beslenmiş farelerde, AKK beslenmiş farelere göre ekspresyonun oldukça fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.8). 50. haftada da AL ve AKK beslenmiş farelerde ekspresyon verileri birbirine yakın ve azken, KKK beslenmiş farede fazla miktarda ekspresyon görüldü (Şekil 4.9).80. haftada TOP2B ekspresyon seviyeleri AKK>KKK>AL şeklinde ölçüldü (Şekil 4.10). RNA-seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, AL ve AKK bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 4.4). Top2b gen transkripsiyonu düzenici olarak bilinmektedir [66]. Böylelikle kanser oluşumu gözlendikçe bu genin ekspresyonunun azalması beklenmektedir. Ancak 18. Ve 50. Haftalarda bu KKK beslenen farelerde bu genin ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. Bu da KKK beslenme tipinin bu genin ekspresyonunu artırarak yaşlanma sürecini geciktirebileceği söylenebilir.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen bir diğer gen TBX2, hem varsayılan bir proto-onkogen, hem de yaşlanma fenotipinin oluşumunda PML (kanserde sıklıkla kaybedilen veya mutasyona uğramış tümör baskılayıcı protein, promyelositik protein) fonksiyonunun negatif bir regülatörü olarak olarak tanımlanmıştır [13]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon

seviyesi gözlenmişken en düşük ekspresyon AL beslenmiş bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın bilinen tümör baskılama özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da KKK beslenmiş fare en düşük ekspresyon seviyesindeyken, AL ve AKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede KKK ve AKK beslenmelerde ekspresyon belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). RNA- seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, bireyler için farklılık göstermiştir (Tablo 4.4). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda proto- onkogenin seviyesinin artması beklenen bir sonuçtur. Bu gen için tekrar primer tasarlanarak tekrar Q-PCR yapılması gerekmektedir.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen bir diğer gen SOD1 bir yaşlanma geciktirici gendir. SOD (Süper Oksit Dismutaz)'ın katalazın düzenlenmesi, serbest radikallerin oluşumunun baskılanması ve endojen enzimatik savunma kapasitesinin arttırılması yoluyla yaşlanma karşıtı aktiviteye sahip olduğu mekanizmadır [10]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken en düşük ekspresyon AL beslenmiş bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın bilinen yaşlanma geciktirme özelliğini desteklemektedir. 50. haftada KKK ve AKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede en yüksek ekspresyon KKK bireylerde gözlemlendi (Şekil 4.10). AL bireylerde ise düşük seviyededir. RNA-seq verilerinde KKK bireylerde ekspresyon fazlayken ve 18. hafta Q-PCR sonuçlarında AKK bireylerde ise ekspresyon fazladır (Tablo 4.4). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda tümör baskılayıcı genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur. Bu genin ekspresyonuna beslenme tipinin pozitif etki ettiği söylenebilir.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen SCP2 reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun azaltılmasına neden olan bir gendir[20]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın bilinen tümör baskılama özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da ekspresyon seviyeleri AL>KKK>AKK şeklindedir(Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede KKK

ve AKK farelerde AL farelere göre SCP2 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). RNA-seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, AL ve KKK bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 4.4). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda yaşlanma karşıtı genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur. Bu da KKK beslenmenin yaşlanma geciktirici özelliğini vurgulamaktadır.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen Opa1'in silinmesi, erken yaşta yaşlanma fenotipini ve erken ölümü tetikler. Bu da yaşlanma geciktirici gen olduğunu göstermektedir [23]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK ve AKK beslenmiş bireylerde yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiştir (Şekil 4.8). 50. haftada da KKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL ve AKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede KKK bireylerde AKK ve AL farelere göre Opa1 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). RNA-seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, AL ve KKK bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 4.4). Bu durum KKK beslenme tipinin yaşlanma üzerine olumlu etki yaptığı görüşünü desteklemektedir.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen KRT14 hücre transformasyonuna katkıda bulunan ve hücre sağkalımını etkileyen bir gendir [22]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın bilinen yaşlanma geciktirici özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da AKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL ve KKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri düşük ve yakın değerlerdedir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede KKK bireylerde AKK farelere göre KRT14 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda tümör baskılayıcı genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur. AKK beslenmiş fareler 50 ve 80. haftalarda en yüksek seviyede ekspresyon yapmıştır. RNA-seq verilerinde AKK bireylerde fazla iken, 18. hafta Q-PCR sonuçlarında KKK bireylerde fazladır (Tablo 4.4). Bu genin beslenme tipi ve beslenme ile tümör oluşumunu engellemede rol oynadığını söyleyebilmek için yeniden primer tasarlanıp daha steril ve optimize şartlarda Q-PCR yapmak gerektiği düşünülmektedir.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen olan COQ7 seviyelerinin, omurgasız modellerde uzun ömürlülüğü düzenlemek için gerekli olduğunu gösterilmiştir [21]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın da yaşlanma üzerine pozitif etki etme özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da AKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL beslenenlerde orta seviyede ve KKK beslenmiş farelerde en düşük ekspresyon seviyeleri gözlemlenmştir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede KKK bireylerde AKK farelere göre ekspresyon belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). RNA-seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, AL ve KKK bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 4.4). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda metabolizmada regülatör olan bu genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen son gen CDKN1 bir proto-onkogendir [24]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken AKK beslenmiş bireyde KKK'ya yakın ekspresyon seviyesi gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın bilinen tümör baskılama özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da KKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken aynı şekilde AKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede KKK bireylerde AKK ve AL farelere göre CDKN1 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda tümör baskılayıcı genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur. RNA-seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, AL ve KKK bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 4.4). Bu sonuç KKK ve AKK beslenme tiplerinin tümör baskılayıcı özelliklerinden kaynaklanıyor denilebilir.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen CAV1 yaşlanma indükleyici bir gendir[25]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken en düşük ekspresyon AL beslenmiş bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.8). 50. haftada da KKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL ve AKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede

AKK bireylerde KKK ve AL farelere göre CAV1 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). RNA-seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, AL ve KKK bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 4.4). Bu genin beslenme tipi ve beslenme ile tümör oluşumunu engellemede rol oynadığını söyleyebilmek için yeniden primer tasarlanıp daha steril ve optimize şartlarda Q-PCR yapmak gerektiği düşünülmektedir.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen BCL6 yaşlanmayı geciktiren güçlü bir yaşlanma inhibitörüdür [10]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken en düşük ekspresyon AL beslenmiş bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın yaşlanma inhibitörü özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da KKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL ve AKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede KKK bireylerde AKK ve AL farelere göre BCL6 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). RNA-seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, AL ve AKK bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 4.4). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda yaşlanma inhibitörü bir genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur. Bu genin beslenme tipi ile yaşlanmayı engellemede rol oynadığını söyleyebinir.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen diğer gen APOD yaşlanmayı inhibe eden bir gendir [27]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken, AKK ve AL beslenmiş bireylerde benzer ve düşük ekspresyon gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın bilinen yaşlanma baskılama özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da benzer şekilde KKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL ve AKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede AKK bireylerde KKK ve AL farelere göre APOD ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda yaşlanma baskılayıcı genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur. RNA-seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, AL ve KKK bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 4.4).

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen son gen RSL1D1 hücre döngüsünü

düzenleyen ve metastazı önleyen bir gendir [28]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken en düşük ekspresyon AL beslenmiş bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın bilinen tümör baskılama özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da AKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL ve KKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farede KKK bireylerde AKK farelere göre RSL1D1 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.10). RNA-seq verileri ve 18. hafta Q-PCR sonuçları, AL ve AKK bireyler için tutarlılık göstermiştir (Tablo 4.4). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda tümör baskılayıcı genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur. Özellikle bu gen üzerinde AKK beslenme tipinin hücre döngüsünü düzenlemede etkin rol oynadığı söylenebilir.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen son gen TRP53 bir tümör baskılayıcı gendir [17]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken en düşük ekspresyon AL beslenmiş bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu durum KKK'nın bilinen tümör baskılama özelliğini desteklemektedir. 50. haftada da AKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken onu takip eden seviyede AL ve en düşük ekspresyon seviyesinde AKK beslenmiş fareler vardır (Şekil 4.9). 80. haftada ise kanser oluşturma sürecine giren farelerde KKK bireylerin ekspresyonu en fazla iken, AKK farelerde TRP53 ekspresyonu onu takip eder biçimdedir (Şekil 4.10). RNA-seq verilerinde AL-AKK bireylerde ekspresyon farklılığı mevcutken, 18. hafta Q-PCR sonuçlarında AL ve KKK bireyler için ekspresyon farklılığı gözlemlenmiştir (Tablo 4.4). Tümör oluşumunu başlaması beklenen bu haftalarda tümör baskılayıcı genin seviyesinin artması beklenmedik bir sonuçtur. Bu gen üzerinden bakılarak KKK beslenme tipinin hücre proliferasyonunda ve hücre döngüsü düzenlenmesinde pozitif etki yaptığı söylenebilir.

Böylelikle, erken evrelerde seçilen genler özelinde Kronik Kalori Kısıtlaması (KKK)'nın yaşlanma mekanizmalarının düzenlenmesinde daha baskın olduğu söylenebilir. Ancak bazı mekanizmalarda ise Aralıklı Kalori Kısıtlaması (AKK)'nın daha etkin rol oynadığı gözlemlenmiştir.

KAYNAKÇA

[1] Kristan, D.M. (2007). Chronic calorie restriction increases susceptibility of laboratory mice (Mus musculus) to a primary intestinal parasite infection. Aging Cell, 6(6):817-25.

[2] Poetschke, H., Klug, D.B., Perkins, S.N., Wang, T.Y., Richie, E.R., Hursting, S.D. (2000). Effects of calorie restriction on thymocyte growth, death and maturation. Oxford Academic, 1959–1964.

[3] Fleming J.E., Reveillaud, I., Niedzwiecki, A. (1992). Role of oxidative stress in Drosophila aging. Mut. Research, 267-79.

[4] Dixit, V.D. (2008). Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. 882-892.

[5] Jung, S.E., Shin, K.J., Lee, H.Y. (2017). DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. 546-553.

[6] Dergunova, L.V., Filippenkov, I.B., Stavchansky, V.V., Denisova, A.E., Yuzhakov, V.V., Mozerov, S.A., Gubsky, L.V., Limborska, S.A. (2018). Genome-wide transcriptome analysis using RNA-Seq reveals a large number of differentially expressed genes in a transient MCAO rat model. 10.1186/s12864-018-5039-5.

[7] Li, Z., Kang, Y. (2017). Lipid Metabolism Fuels Cancer's Spread. 228-230.

[8] Chen, J., Wang, M., Guo, M., Xie, Y., Cong, Y.S. (2013). miR-127 regulates cell proliferation and senescence by targeting BCL6. 10.1371/journal.pone.

[9] Senagolage, MD., Sommars, M.A., Ramachandran, K., Futtner, C.R., Omura, Y., Allred, A.L., Wang, J., Yang, C., Procissi, D., Evans, R.M., Han, X., Bederman, I.R., Barish, G.D. (2018). Loss of Transcriptional Repression by BCL6 Confers Insulin Sensitivity in the Setting of Obesity. 3283-3298.

[10] Zhang, Y., Unnikrishnan, A., Deepa, S.S., Liu, Y., Li, Y., Ikeno, Y., Sosnowska, D., Van Remmen, H., Richardson, A. (2016). A new role for oxidative stress in aging: The accelerated aging phenotype in Sod1-/- mice is correlated to increased cellular senescence.10.1016/j.redox.2016.

[11] Gkikas, I., Petratou, D., Tavernarakis, N. (2014). Longevity pathways and memory aging. 10.3389/fgene.2014.00155.

[12] Martin, N., Benhamed, M., Nacerddine, K., Demarque, M.D., van Lohuizen, M., Dejean, A., Bischof, O. (2012). Physical and functional interaction between PML and TBX2 in the establishment of cellular senescence. 10.1038/emboj.2011.370.

[13] Zhu, B., Zhang, M., Byrum, S.D., Tackett, A.J., Davie, J.K. (2014). TBX2 blocks myogenesis and promotes proliferation in rhabdomyosarcoma cells. 135(4):785-97.

[14] Yoshimura, A., Seki, M., Enomoto,T. (2017). The role of WRNIP1 in genome maintenance. 10.1080/15384101.2017.1282585.

[15] Ghosh, S., Wong, S.K., Jiang, Z., Liu, B., Wang, Y., Hao, Q., Gorbunova, V., Liu, X., Zhou, Z. (2018). Haploinsufficiency of Trp53 dramatically extends the lifespan of Sirt6-deficient mice. 10.7554/eLife.32127.

[16] Wilson, Y., Morris, I.D., Kimber, S.J., Brison, D.R. The role of Trp53 in the mouse embryonic response to DNA damage. Molecular Human Reproduction. 397-407

[17] Li, Y., Hao, H., Swerdel, M.R., Cho, H.Y., Lee, K.B., Hart, R.P., Lyu, Y.L., Cai, L. (2017). Top2b is involved in the formation of outer segment and synapse during late-stage photoreceptor differentiation by controlling key genes of photoreceptor transcriptional regulatory network. 10.1002/jnr.24037.

[18] Bollimpelli, V.S., Dholaniya, P.S., Kondapi, A.K. (2017). Topoisomerase IIβ and its role in different biological contexts. Archives of biochemistry and biophysics. 78-84.

[19] Jacome, A., Gutierrez-Martinez, P., Schiavoni, F., Tenaglia, E.,Martinez, P., Rodríguez-Acebes, S., Lecona, E., Murga, M., Méndez, J., Blasco, M.A., Fernandez-Capetillo, O. (2015). NSMCE2 suppresses cancer and aging in mice independently of its SUMO ligase activity. 2604-19.

[20] Milligan, G., Inoue, A. (2018). Genome Editing Provides New Insights into Receptor-Controlled Signalling Pathways. 481-493.

[21] Cascajo, M.V., Abdelmohsen, K., Noh, J.H., Fernández-Ayala, D.J., Willers, I.M., Brea, G., López-Lluch, G., Valenzuela-Villatoro, M., Cuezva, J.M., Gorospe, M., Siendones, E., Navas, P. (2015). RNA-binding proteins regulate cell respiration and coenzyme Q biosynthesis by post-transcriptional regulation of COQ7. 622-34.

[22] Zupancic, T., Sersa, G., Törmä, H., Lane, E.B., Herrmann, H., Komel, R., Liovic, M. (2017). Keratin gene mutations influence the keratinocyte response to DNA damage and cytokine induced apoptosis. 587-593.

[23] Tezze, C., Romanello, V., Desbats, M.A., Fadini, G.P., Albiero, M., Favaro, G., Ciciliot, S., Soriano, M.E., Morbidoni, V., Cerqua, C., Loefler, S., Kern, H., Franceschi, C., Salvioli, S., Conte, M., Blaauw, B., Zampieri, S., Salviati, L., Scorrano, L., Sandri, M. (2017). Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. 1374-1389.

[24] Akrivou, M.G., Demertzidou, V.P., Theodoroula, N.F., Chatzopoulou, F.M., Kyritsis, K.A., Grigoriadis, N., Zografos, A.L., Vizirianakis, I.S. (2018). Uncovering the pharmacological response of novel sesquiterpene derivatives that differentially alter gene expression and modulate the cell cycle in cancer cells. 2167-2179.

[25] Nguyen, V., Mendelsohn, A., Larrick, J.W.(2017). Interleukin-7 and Immunosenescence.

[26] Pascua-Maestro, R., González, E., Lillo, C., Ganfornina, M.D., Falcón-Pérez, J.M., Sanchez, D.. (2019). Extracellular Vesicles Secreted by Astroglial

[27] Cells Transport Apolipoprotein D to Neurons and Mediate Neuronal Survival Upon Oxidative Stress.

[28] Sanchez, D., Bajo-Grañeras, R., Del Caño-Espinel, M., Garcia-Centeno, R., Garcia-Mateo, N., Pascua-Maestro, R., Ganfornina, M.D. (2015). Aging without Apolipoprotein D: Molecular and cellular modifications in the hippocampus and cortex. Experimental Gerontology, 19-47.

[29] Ma, L., Shen, Q., Yang, S., Xie, X., Xiao, Q., Yu, C., Cao, L., Fu, Z. Effect of chronic corticosterone-induced depression on circadian rhythms and age-related phenotypes in mice (2016). Acta Biochimica et Biophysica Sinica, Volume 50, Issue 12, December 2018, Pages 1236–1246

[30] Blackburn, A. C., & Jerry, D. J. (2002). Knockout and transgenic mice of Trp53: what have we learned about p53 in breast cancer?. Breast Cancer Research, 4(3), 101.

[31] Oriaku, E. T., Chen, F., Desai, V. G., Pipkin, J. L., Shaddock, J. G., Weindruch, R., ... & Feuers, R. J. (1997). A circadian study of liver antioxidant enzyme systems of female Fischer-344 rats subjected to dietary restriction for six weeks. Age, 20(4), 221.

[32] Becker, S. (2015). A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 131(S1).

[33] Cleary MP & Grossmann ME, (2011) The manner in which calories are restricted impacts mammary tumor cancer prevention. J Carcinog. 10:21

[34] Kim, C., Lee, C. K., Chon, H. J., Kim, J. H., Park, H. S., Heo, S. J., ... & Rha, S. Y. (2017). PTEN loss and level of HER2 amplification is associated with trastuzumab resistance and prognosis in HER2-positive gastric cancer. Oncotarget, 8(69), 113494.

[35] Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods, 25(4), 402-408.

[36] Pape-Ansorge, K. A., Grande, Christensen, T. A., Maihle, N. J., & 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, 44(2), 162-168.

[37] Rogozina OP, Bonorden MJ, Grande JP, Cleary, MP, (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

[38] Omeroğlu Ulu, Z., Ulu, S., Dogan, S., Guvenc Tuna, B., & Ozdemir Ozgenturk, N. (2018). Transcriptome Analysis of the Thymus in Short-Term Calorie-Restricted Mice Using RNA-seq. International journal of

genomics, 2018.

[39] Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature methods, 5(7), 621.

[40] Cleary MP, Hu X, Grossmann ME, et al., (2007) Prevention of mammary tumorigenesis by intermittent caloric restriction: does caloric intake during refeeding modulate the response? Exp Biol Med (Maywood). 232, 70–80

[41] Hursting SD, Lavigne JA, Berrigan D, Perkins SN, Barrett JC (2003) Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. Annu Rev Med., 54:131-152

[42] Hutchinson, J., Jin, J., Cardiff, R. D., Woodgett, J. R., & Muller, W. J. (2001). Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. Molecular and cellular biology, 21(6), 2203-2212.

[43] Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature, 490(7418), 61.

[44] Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature methods, 5(7), 621.

[45] Usary, J., Llaca, V., Karaca, G., Presswala, S., Karaca, M., He, X., ... & Lønning, P. E. (2004). Mutation of GATA3 in human breast tumors. Oncogene, 23(46), 7669.

[46] Rogozina OP, Bonorden MJL, Seppanen CN, Grande JP, Cleary MP, (2011) Effect of Chronic and Intermittent Calorie Restriction on Serum Adiponectin and Leptin and Mammary Tumorigenesis, DOI: 10.1158/1940-6207

[47] Dogan S, Hu X, Zhang Y, Maihle NJ, Grande JP, Cleary MP (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:R91

[48] Mercado-Matos, J., Matthew-Onabanjo, A. N., & Shaw, L. M. (2017). RUNX1 and breast cancer.

[49] Dupuy, A., & Simon, R. M. (2007). Critical review of published microarray studies for cancer outcome and guidelines on statistical analysis and reporting. Journal of the National Cancer Institute, 99(2), 147-157.

[50] Dogan S, Ray A, Cleary MP, (2017) The influence of different calorie restriction protocols on serum pro-inflammatory cytokines, adipokines and IGF-I levels in female C57BL6 mice: Short term and long term diet effects, Meta Gene, S2214-5400(16)30100-1

[51] Gökmen-Polar, Y., Neelamraju, Y., Goswami, C. P., Gu, X., Nallamothu, G., Janga, S. C., & Badve, S. (2015). Expression levels of SF3B3 correlate with prognosis and endocrine resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. Modern pathology, 28(5), 677. ISO 690

[52] Yoeli-Lerner, M., Yiu, G. K., Rabinovitz, I., Erhardt, P., Jauliac, S., & Toker, A. (2005). Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. Molecular cell, 20(4), 539-550.

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

[54] Rogozina OP, Bonorden MJ, Grande JP, Cleary, MP, (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

[55] Yang H, Youm YH, Dixit VD, (2009) Inhibition of Thymic Adipogenesis by Caloric Restriction Is Coupled with Reduction in Age-Related Thymic Involution, J Immunol. ; 183(5): 3040–3052

[56] Costa V, Angelini C, De Feis I, Ciccodicola A, (2010) Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq, Journal of Biomedicine & Biotechnology, 1–19

[57] Edgren, H., Murumagi, A., Kangaspeska, S., Nicorici, D., Hongisto, V., Kleivi, K., ... & Kallioniemi, O. (2011). Identification of fusion genes in breast cancer by paired-end RNA-sequencing. Genome biology, 12(1), R6.

[58] Weindruch, RH, Walford, RL. (1988) The retardation of aging and disease by dietary restriction. Charles C. Thomas; Springfield, Illinois, USA

[59] Tucker MJ, (1979) The effect of long-term food restriction on tumours in rodents. Int J Cancer 23: 803-807

[60] Kusuoka, O., Fujiwara-Tani, R., Nakashima, C., Fujii, K., Ohmori, H., Mori, T., ... & Kuniyasu, H. (2018). Intermittent calorie restriction enhances epithelial-mesenchymal transition through the alteration of energy metabolism in a mouse tumor model. International journal of oncology, 52(2), 413-423.

[61] Murray PA, Barrett-lee P, Travers M, Luqmani Y, Powles T and Coombes RC, (1993) The prognostic signi cance of transforming growth factors in human breast cancer. Br J cancer 67: 1408-1412

[62] Oriaku, E. T., Chen, F., Desai, V. G., Pipkin, J. L., Shaddock, J. G., Weindruch, R., ... & Feuers, R. J. (1997). A circadian study of liver antioxidant enzyme systems of female Fischer-344 rats subjected to dietary restriction for six weeks. Age, 20(4), 221.

[63] Barger JL, Walford RL, Weindruch R. (2003). The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. Exp. Gerontol., 38:1343–1351

[64] Ogura, M, Ogura, H, Ikehara, S, Dao ML, and Good RA, (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

[65] Hoch, R. V., Thompson, D. A., Baker, R. J., & Weigel, R. J. (1999). GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast

cancer. International journal of cancer, 84(2), 122-128.

[66] Lundy J, Schuss A, Stanick D, Mccormack ES, Kramer S and Sorvillo JM, (1991) Expression of neu protein, epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in breast cancer. correlation with clinicopathologic parameters. Am J Pathol 138: 1527-1534

[67] Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(6):430–440. Karan, M.A., Tufan, F., (2010). Mechanisms of aging. Ege Journal of Medicine 49(3),11-17.,

A

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Hesaplamaları

18. haftada yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar aşağıda sırasıyla gösterilmiştir.

Referans gen GAPDH, hedef gen WRNIP1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise (KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 23{,}69 - 19{,}24 = 4{,}45$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 23{,}52 - 21{,}88 = 1{,}64$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -2{,}81$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2{,}81} = 7{,}01$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise (AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 23{,}69 - 19{,}24 = 4{,}45$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 23{,}87 - 20{,}72 = 3{,}15$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -1{,}3$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1{,}3} = 2{,}46$

Referans gen GAPDH, hedef gen TOP2B için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 21{,}08 - 19{,}24 = 1{,}84$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 21{,}55 - 21{,}88 = -0{,}33$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -2{,}17$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2{,}17} = 4{,}5$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 21{,}08 - 19{,}24 = 1{,}84$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 22{,}06 - 20{,}72 = 1{,}34$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -0{,}5$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0{,}5} = 1{,}41$

Referans gen GAPDH, hedef gen TBX2 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 24{,}89 - 19{,}24 = 5{,}65$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 25{,}9 - 21{,}88 = 4{,}02$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -1{,}63$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1{,}63} = 3{,}09$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 24{,}89 - 19{,}24 = 5{,}65$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 24{,}95 - 20{,}72 = 4{,}23$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -1{,}42$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1{,}42} = 2{,}67$

Referans gen GAPDH, hedef gen SOD1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 19{,}44 - 19{,}24 = 0{,}2$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 19{,}22 - 21{,}88 = -2{,}66$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -2{,}86$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2{,}86} = 7{,}26$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 19{,}44 - 19{,}24 = 0{,}2$

- ΔC_t(Deney) = 19,15 – 20,72 = -1,57
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,77
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,77} = 3,41$

Referans gen GAPDH, hedef gen SMC5 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 35,2 – 19,24 = 15,96
- ΔC_t(Deney) = 28,9 – 21,88 = 7,02
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -8,94
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{8,94} = 491,1$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 35,2 – 19,24 = 15,96
- ΔC_t(Deney) = 38,64 – 20,72 = 17,92
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = 1,96
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-1,96} = 0,25$

Referans gen GAPDH, hedef gen SCP2 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 26,91 – 19,24 = 7,67
- ΔC_t(Deney) = 25,36 – 21,88 = 3,48
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -4,19
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{4,19} = 18,2$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 26,91 – 19,24 = 7,67
- ΔC_t(Deney) = 26,45 – 20,72 = 5,73
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,94
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,94} = 3,83$

Referans gen GAPDH, hedef gen OPA 1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,12 – 19,24 = 2,88
- ΔC_t(Deney) = 23,14 – 21,88 = 1,26
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,62
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,62} = 3,07$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,12 – 19,24 = 2,88
- ΔC_t(Deney) = 22,77 – 20,72 = 2,05
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,83
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,83} = 1,77$

Referans gen GAPDH, hedef gen KRT14 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 25,42 – 19,24 = 6,18
- ΔC_t(Deney) = 25,27 – 21,88 = 3,39
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -2,79
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,79} = 6,91$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 25,42 – 19,24 = 6,18
- ΔC_t(Deney) = 26,53 – 20,72 = 5,81
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,37
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,37} = 1,29$

Referans gen GAPDH, hedef gen COQ7 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,32 – 19,24 = 3,08
- ΔC_t(Deney) = 22,34 – 21,88 = 0,46
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -2,62
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,62} = 6,14$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,32 – 19,24 = 3,08
- ΔC_t(Deney) = 21,37 – 20,72 = 0,65
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -2,43
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,43} = 5,38$

Referans gen GAPDH, hedef gen CDKN1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,46 – 19,24 = 2,22
- ΔC_t(Deney) = 22,22 – 21,88 = 0,34
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,88
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,88} = 3,68$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,46 – 19,24 = 2,22
- ΔC_t(Deney) = 22,13 – 20,72 = 1,41
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,81
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,81} = 1,75$

Referans gen GAPDH, hedef gen CAV1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 28,37 – 19,24 = 9,13
- ΔC_t(Deney) = 29,6 – 21,88 = 7,72
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,41
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,41} = 2,65$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 28,37 – 19,24 = 9,13
- ΔC_t(Deney) = 29,85 – 20,72 = 9,13
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = 0
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0} = 1$

Referans gen GAPDH, hedef gen BCL6 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 19,82 – 19,24 = 0,58
- ΔC_t(Deney) = 20,31 – 21,88 = -1,57
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -2,15
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,15} = 4,43$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 19,82 – 19,24 = 0,58
- ΔC_t(Deney) = 19,71 – 20,72 = -1,01
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,59
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,59} = 3,01$

Referans gen GAPDH, hedef gen APOD için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 26,03 – 19,24 = 6,79
- ΔC_t(Deney) = 27,37 – 21,88 = 5,49
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,3
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,3} = 2,46$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 26,03 – 19,24 = 6,79
- ΔC_t(Deney) = 28,21 – 20,72 = 7,49
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = 0,7
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0,7} = 0,61$

Referans gen GAPDH, hedef gen RSL1D1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,57 – 19,24 = 2,33
- ΔC_t(Deney) = 22,61 – 21,88 = 0,73
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,6
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,6} = 3,03$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,57 – 19,24 = 2,33
- ΔC_t(Deney) = 22,12 – 20,72 = 1,4
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,93
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,93} = 1,9$

Referans gen GAPDH, hedef gen TRP53 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 169 kontrol grubu, 164 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 20,05 – 19,24 = 0,81
- ΔC_t(Deney) = 20,73 – 21,88 = -1,15
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,96
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,96} = 3,89$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 20,05 – 19,24 = 0,81

- ΔC_t(Deney) = 21,67 – 20,72 = 0,95
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,14
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,14} = 1,1$

50. haftada yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar aşağıda sırasıyla gösterilmiştir. Referans gen GAPDH, hedef gen WRNIP1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 25,52 – 23,13 = 2,39
- ΔC_t(Deney) = 24,53 – 23,14= 1,39
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1} = 2$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 25,52 – 23,13 = 2,39
- ΔC_t(Deney) = 23,53 – 22,52 = 1,01
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,38 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,38} = 2,6$

Referans gen GAPDH, hedef gen TOP2B için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,88 – 23,13 = -1,25
- ΔC_t(Deney) = 20,97 – 23,14= -2,17
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,92
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,92} = 1,89$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,88 – 23,13 = -1,25
- ΔC_t(Deney) = 22,7 – 22,52 = 0,18
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = 1,43

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-1,43} = 0,37$

Referans gen GAPDH, hedef gen TBX2 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 26,38 – 23,13 = 3,25
- ΔC_t(Deney) = 27,17 – 23,14= 4,03
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = 0,78
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0,78} = 0,58$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 26,38 – 23,13 = 3,25
- ΔC_t(Deney) = 24,65 – 22,52 = 2,13
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,12 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,12} = 2,17$

Referans gen GAPDH, hedef gen SOD1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 19,54 – 23,13 = -3,59
- ΔC_t(Deney) = 19,2 – 23,14= -3,94
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,35
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,35} = 1,27$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 19,54 – 23,13 = -3,59
- ΔC_t(Deney) = 18,73 – 22,52 = -3,79
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,2 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,2} = 1,14$

Referans gen GAPDH, hedef gen SMC5 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 39,14 – 23,13 = 16,01
- ΔC_t(Deney) = 27,73 – 23,14= 4,59

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -11{,}42$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{11{,}42} = 2740$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 39{,}14 - 23{,}13 = 16{,}01$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 36{,}37 - 22{,}52 = 13{,}85$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -2{,}16$ $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2{,}16} = 4{,}46$

Referans gen GAPDH, hedef gen SCP2 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 25{,}5 - 23{,}13 = 2{,}37$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 25{,}73 - 23{,}14 = 2{,}59$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0{,}22$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0{,}22} = 0{,}85$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 25{,}5 - 23{,}13 = 2{,}37$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 25{,}28 - 22{,}52 = 2{,}76$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0{,}39$

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0{,}39} = 0{,}76$

Referans gen GAPDH, hedef gen OPA1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 22{,}77 - 23{,}13 = -0{,}36$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 22{,}38 - 23{,}14 = -0{,}76$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -0{,}4$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0{,}4} = 1{,}31$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 22{,}77 - 23{,}13 = -0{,}36$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 22{,}32 - 22{,}52 = -0{,}2$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0{,}16$

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0{,}16} = 0{,}89$

Referans gen GAPDH, hedef gen KRT14 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 25{,}86 - 23{,}13 = 2{,}73$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 25{,}37 - 23{,}14 = 2{,}23$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -0{,}5$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0{,}5} = 1{,}41$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 25{,}86 - 23{,}13 = 2{,}73$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 24{,}13 - 22{,}52 = 1{,}61$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -1{,}12$ $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1{,}12} = 2{,}17$

Referans gen GAPDH, hedef gen COQ7 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 23{,}18 - 23{,}13 = 0{,}05$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 23{,}2 - 23{,}14 = 0{,}06$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0{,}01$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0{,}01} = 0{,}99$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 23{,}18 - 23{,}13 = 0{,}05$

- ΔC_t(Deney) = 20,9 – 22,52 = -1,62
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,67 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,67} = 3,18$

Referans gen GAPDH, hedef gen CDKN1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,26 – 23,13 = -0,87
- ΔC_t(Deney) = 21,77 – 23,14= -1,37
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,5
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,5} = 1,41$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,26 – 23,13 = -0,87
- ΔC_t(Deney) = 21,6 – 22,52 = -0,92
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,05 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,05} = 1,03$

Referans gen GAPDH, hedef gen CAV1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 27,01 – 23,13 = 3,88
- ΔC_t(Deney) = 26,3 – 23,14= 3,16
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,72
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,72} = 1,64$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 27,01 – 23,13 = 3,88
- ΔC_t(Deney) = 26,93 – 22,52 = 4,41
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = 0,53

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0,53} = 0,69$

Referans gen GAPDH, hedef gen BCL6 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 20,33 – 23,13 = -2,9
- ΔC_t(Deney) = 19,8 – 23,14= -3,34
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,44
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,44} = 1,35$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 20,33 – 23,13 = -2,9
- ΔC_t(Deney) = 19,62 – 22,52 = -2,9
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = 0

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0} = 1$

Referans gen GAPDH, hedef gen APOD için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 27,05 – 23,13 = 3,92
- ΔC_t(Deney) = 26,66 – 23,14= 3,52
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,4
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,4} = 1,31$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 27,05 – 23,13 = 3,92
- ΔC_t(Deney) = 26,97 – 22,52 = 4,45
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = 0,53

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0,53} = 0,69$

Referans gen GAPDH, hedef gen RSL1D1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 23,51 – 23,13 = 0,38
- ΔC_t(Deney) = 22,83 – 23,14= -0,31
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,69
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,69} = 1,61$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 23,51 – 23,13 = 0,38
- ΔC_t(Deney) = 21,49 – 22,52 = -1,03
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -1,41 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{1,41} = 2,65$

Referans gen GAPDH, hedef gen TRP53 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 95 kontrol grubu, 107 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,62 – 23,13 = -1,51
- ΔC_t(Deney) = 21,65 – 23,14= -1,49
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = 0,02
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0,02} = 0,98$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,62 – 23,13 = -1,51
- ΔC_t(Deney) = 20,32 – 22,52 = -2,2
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -0,69 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,69} = 1,61$

80. haftada yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar aşağıda sırasıyla gösterilmiştir. Referans gen GAPDH, hedef gen WRNIP1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 23,54 – 19,17 = 4,37
- ΔC_t(Deney) = 25,31 – 23,12 = 2,19
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -2,18
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,18} = 4,53$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 23,54 – 19,17 = 4,37
- ΔC_t(Deney) = 24,17 – 22,79 = 1,38
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -2,99
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,99} = 7,94$

Referans gen GAPDH, hedef gen TOP2B için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,06 – 19,17 = 2,89
- ΔC_t(Deney) = 22,7 – 23,12 = -0,42
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -3,31
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{3,31} = 9,91$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,06 – 19,17 = 2,89
- ΔC_t(Deney) = 20,87 – 22,79 = -1,92
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -4,81
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{4,81} = 28,05$

Referans gen GAPDH, hedef gen TBX2 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 24,95 – 19,17 = 5,78
- ΔC_t(Deney) = 24,65 – 23,12 = 1,53

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -4,25$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{4,25} = 19,02$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 24,95 - 19,17 = 5,78$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 26,54 - 22,79 = 3,75$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -2,03$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,03} = 4,08$

Referans gen GAPDH, hedef gen SOD1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 19,45 - 19,17 = 0,28$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 19,72 - 23,12 = -3,4$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -3,68$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{3,68} = 12,8$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 19,45 - 19,17 = 0,28$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 20,35 - 22,79 = -2,44$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -2,42$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,42} = 5,35$

Referans gen GAPDH, hedef gen SMC5 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 38,64 - 19,17 = 19,47$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 36,37 - 23,12 = 13,25$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -6,22$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{6,22} = 74,54$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 38,64 - 19,17 = 19,47$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 38,3 - 22,79 = 15,51$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -3,96$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{3,96} = 15,56$

Referans gen GAPDH, hedef gen SCP2 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 26,45 - 19,17 = 7,28$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 25,28 - 23,12 = 2,16$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -5,12$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{5,12} = 34,77$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 26,45 - 19,17 = 7,28$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 27,65 - 22,79 = 4,86$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -2,42$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,42} = 5,35$

Referans gen GAPDH, hedef gen OPA1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 22,77 - 19,17 = 3,6$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 22,32 - 23,12 = -0,8$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -4,4$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{4,4} = 21,11$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,77 – 19,17 = 3,6
- ΔC_t(Deney) = 22,44 – 22,79 = -0,35
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -3,95
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{3,95} = 15,45$

Referans gen GAPDH, hedef gen KRT14 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 26,53 – 19,17 = 7,36
- ΔC_t(Deney) = 24,13 – 23,12 = 1,01
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -6,35
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{6,35} = 81,57$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 26,53 – 19,17 = 7,36
- ΔC_t(Deney) = 24,72 – 22,79 = 1,93
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -5,43
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{5,43} = 43,11$

Referans gen GAPDH, hedef gen COQ7 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,37 – 19,17 = 2,2
- ΔC_t(Deney) = 20,9 – 23,12 = -2,22
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -4,42
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{4,42} = 21,4$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 21,37 – 19,17 = 2,2
- ΔC_t(Deney) = 22,06 – 22,79 = -0,73
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -2,93
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,93} = 7,62$

Referans gen GAPDH, hedef gen CDKN1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,13 – 19,17 = 2,96
- ΔC_t(Deney) = 20,67 – 23,12 = -2,45
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -5,41
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{5,41} = 42,5$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 22,13 – 19,17 = 2,96
- ΔC_t(Deney) = 21,19 – 22,79 = -1,6
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -4,56
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{4,56} = 23,58$

Referans gen GAPDH, hedef gen CAV1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 29,85 – 19,17 = 10,68
- ΔC_t(Deney) = 26,93 – 23,12 = 3,81
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -6,87
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{6,87} = 116,9$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- ΔC_t(Kontrol) = 29,85 – 19,17 = 10,68
- ΔC_t(Deney) = 25,10 – 22,79 = 2,31
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(Deney) - ΔC_t(Kontrol) = -8,37

- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{8,37} = 330,8$

Referans gen GAPDH, hedef gen BCL6 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 19,71 - 19,17 = 0,54$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 19,62 - 23,12 = -3,5$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -4,04$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{4,04} = 16,44$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 19,71 - 19,17 = 0,54$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 19,46 - 22,79 = -3,33$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -3,87$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{3,87} = 14,6$

Referans gen GAPDH, hedef gen APOD için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 28,21 - 19,17 = 9,04$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 26,97 - 23,12 = 3,85$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -5,19$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{5,19} = 36,5$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 28,21 - 19,17 = 9,04$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 24,47 - 22,79 = 1,68$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -7,36$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{7,36} = 164,2$

Referans gen GAPDH, hedef gen RSL1D1 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 22,12 - 19,17 = 2,95$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 21,49 - 23,12 = -1,63$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -4,58$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{4,58} = 23,9$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 22,12 - 19,17 = 2,95$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 24,78 - 22,79 = 1,99$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -0,96$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{0,96} = 1,94$

Referans gen GAPDH, hedef gen TRP53 için aşağıdaki işlemler yapılmıştır: 64 kontrol grubu, 88 deney grubu ise(KKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 21,67 - 19,17 = 2,50$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 20,32 - 23,12 = -2,80$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -5,30$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{5,3} = 39,39$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise(AKK):

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 21,67 - 19,17 = 2,50$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 22,80 - 22,79 = 0,01$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -2,49$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{2,49} = 5,61$

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: ebru.kilic@outlook.com

Konferans Bildirileri

1. KILIÇ E, Özdemir Özgentürk N (2019). Kalori Kısıtlı Diyetle Beslenen Farelerin Timus Dokusunda Yaşlanma ile İlişkili Genlerin İfadelerinin Araştırılması. İstanbul Teknik Üniversitesi Uluslararası Öğrenci Kongresi. 4-6 Ekim 2019, İstanbul. (Poster Bildiri)