



T. C.

SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NEMATOD *Caenorhabditis elegans* MODEL ORGANİZMASINDA İNSÜLİN
MARUZİYETİNE BAĞLI METABOLOMİK DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI:
C. elegans KANSER MODELİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Özgür Ülkü ÖZDEMİR
(20219247005)**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK
Eş Danışman: Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER**

**SİVAS
HAZİRAN 2025**

Özgür Ülkü ÖZDEMİR'in hazırladığı ve “**NEMATOD *Caenorhabditis elegans* MODEL ORGANİZMASINDA İNSÜLİN MARUZİYETİNE BAĞLI METABOLOMİK DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI: *C. elegans* KANSER MODELİ**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı	Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	
Tez Danışmanı (Eş Danışman)	Pof. Dr. Mustafa ÇELEBİER Hacettepe Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Necati ÖZPINAR Mustafa Kemal Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Binnur BAĞCI Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. NAİL ALTUNAY
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

*Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-2023 - 697** No'lu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© ÖZGÜR ÜLKÜ ÖZDEMİR, 2025



Annem'e...

ETİK

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

17.04.2025

Özgür Ülkü ÖZDEMİR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sağladığı olanaklarla bana sürekli destek olan, bilgi birikimi ve yol göstericiliğiyle ufkumu genişleten çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK'e,

Çalışmalarımı gerçekleştirmek üzere bana laboratuvarının kapılarını açan ve hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen ikinci danışmanım Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER ve tüm bu zorlu süreçte bilgi, deneyim ve samimiyetini esirgemeyen sevgili üçüncü danışmanım Arş. Gör. Dr. Ozan KAPLAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi eğitimim boyunca yanımda olan ve beni destekleyen aileme özellikle annem Devrim Derya DENİZ, babam Hazım ÖZDEMİR kız kardeşlerim Betül Deniz ve Eftalya Sude ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamı hazırlarken desteğini esirgemeyen ve yardımcı olan Nevra Nur EMLİK'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca, ilham kaynağım olan ve bizlere bağımsız, çağdaş ve bilimsel düşüncenin ışığında ilerleme fırsatı sunan Gazi Mustafa Kemal Atatürk'e sonsuz minnet duygularımı sunarım.

"Hayatta en hakiki mürşit ilimdir, fendir."

ÖZET

NEMATOD *Caenorhabditis elegans* MODEL ORGANİZMASINDA İNSÜLİN MARUZİYETİNE BAĞLI METABOLOMİK DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI:

C. elegans KANSER MODELİ

Özgür Ülkü ÖZDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK

Eş Danışman: Prof Dr. Mustafa ÇELEBİER

2025, 75+xvii sayfa

Serbest yaşayan nematod *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), son yıllarda yaşlanma çalışmalarında iyi bilinen bir model organizma haline gelmiştir. Kısa ömrü, kültürlenmesinin ve deney yapılmasının kolaylığı, tam olarak dizilenmiş ve iyi açıklanmış genomu ve ileri ve geri genetik taramalar için bolluğu bunun başlıca nedenleridir. Farklı çalışmalar *C. elegans*'ta yaşlanma, uzun ömür ve metabolizma arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Yaşlanmaya özgü mekanizmaları daha iyi anlamak ve bu fizyolojik süreci karakterize eden biyobelirteçler oluşturmak elzem hale geldiğinden tüm biyomoleküller arasında metabolitler bu biyobelirteçlerin incelenmesi için iyi bir hedef olarak ön plana çıkmaktadır. İki ana besin algılama yolu olan rapamisin hedefi (TOR) ve insülin/IGF sinyalleme (IIS) yolları, en etkili doğrulanmış yaşlanma karşıtı müdahalelerle ilişkilendirilmiştir. İnsülin/İnsülin Benzeri Sinyalizasyon (IIS) ve mTOR sinyal yollarında yer alan genlerin nakavt edilmesi uzun ömürlülüğü artırma eğilimindedir. Diyabet, kanser ve embriyonik ölüm gibi ciddi olumsuz etkiler, bu sinyalleme yollarından herhangi birinde önemli değişikliklerden kaynaklanabilmektedir. Sonuç olarak, yaşlanma karşıtı IIS veya TOR manipülasyonlarının uygulanması, kanser ve diyabet dahil olmak üzere çok sayıda yaşlanmayla ilgili hastalığın ilerlemesini engelleyebilecek önemli bir etkiye sahiptir. Ön çalışmamızda, en iyi doğrulanmış yaşlanma karşıtı müdahalelerin temel besin algılama yollarıyla ilişkili IIS yolağı olan insülin ilacına maruz kalan solucanların uzun ömürlülükle ilişkilendirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise, bu insüline bağlı ömür uzunluğu etkisinin, memelilerde tümör baskılayıcı pRb işleviyle ilişkili olan mutant suş lin-35 ve yabancı N2 solucanlarında LC-Q-TOF-MS/MS analizi ile

metabolomik profillemeleri elde edilmiştir. Ek olarak, insülin maruziyeti sonrasında kanser metabolizmasında meydana gelen değişiklikler ve etkilenen yollar belirlenmiştir. Retinoblastoma (pRB) mutasyonlu lin-35 solucanları insülin tedavi uygulaması sonrası N2 yabanıl solucanlar ile karşılaştırılarak elde edilen metabolitler arasındaki farklar belirlenmiş ve metabolit skorları değerlendirilmiştir. Böylece pRB mutasyonuna sahip lin-35 solucanları ve yabanıl N2 solucanları arasındaki farklar moleküler analizlerle ortaya konulmuştur. Böylelikle, *C. elegans* odaklı kanser-IIS ilişkisi moleküler ve metabolomik analizlerle aydınlatılmıştır. IIS-insülin tedavisi ön çalışmamızda elde ettiğimiz uzun ömürlülük etkisinin altında yatan fizyolojik süreci aydınlatılarak metabolit profili oluşturulmuştur ve uzun ömürlü solucanların (insüline maruz kalan solucanlar) metabolizmasının normal ömre sahip kontrollerle (insülin uygulanmayan solucanlar) karşılaştırıldığında nasıl değiştiği analiz edilmiştir. Bu amaçla, örnekler, Sıvı kromatografi-dörtlü zaman-uçuşlu tandem kütle spektrometrisi (LC-Q-TOF-MS/MS) yöntemi kullanılarak C18 kolon ile gradiyent elüsyon programı kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen ham veriler MZmine 2.53 yazılımı ile analiz edilmiştir. Metabolit profilleri, MetaboAnalyst 6.0 platformunda biyolojik yolk analizleriyle değerlendirilmiş ve bulunan metabolitlerin kanser ve insülin ile ilişkisi ortaya koyulmuştur. Yapılan veri değerlendirmesi sonucunda; $FC > 1.5$ ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak güvenilir pikler tespit edildiğinde, lin-35 solucanları ve N2 solucanlarında toplam 75 metabolit elde edilmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda bu metabolitlerden toplamda 38 tanesi kanser/diyabet modeli ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan en önemli 3 metabolit L-arjinin, fruktoz 6- fosfat ve fumarik asit olarak rol almaktadır. Ayrıca Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) yolk analizi sonucunda 21 metabolik yolk kanser/diyabet modelinde rol almıştır. Bunlardan en önemlisi fenil alenin tirozin ve triptofan biyosentez sinyal yolağı ile Riboflavin sinyal yolağı olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, yaşlanmaya özgü mekanizmaları daha iyi anlaşılır hale getirmiş ve bu fizyolojik süreci karakterize eden biyobelirteçler oluşturmuştur. Yapılan bu çalışmada tespit edilen metabolomik profillerdeki değişikliklerden kanser metabolomik gelişimi mekanizmalarının aydınlatılmasında ve yeni biyobelirteç hedeflerinin geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Ayrıca metabolomik için genel olarak geçerli olduğu gibi, *C. elegans* metabolomunun kapsamlı bir analizini sağlayan analitik bir platform yoktur. Metabolomik verilerinin biyoenformatik analizi de giderek daha fazla önem kazandığından, HMDB örneğini izleyerek, metabolitler, MS-, MS/MS spektrumları dahil olmak üzere *C. elegans*'a özgü metabolit veritabanının oluşturulmasına katkı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteç, *C. elegans*, İnsülin, Kanser, LC-Q-TOF-MS/MS, Lin-35, Metabolomik.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF INSULIN-INDUCED METABOLOMIC CHANGES in THE NEMATODE *Caenorhabditis elegans*: A *C. elegans* CANCER MODEL

Özgür Ülkü ÖZDEMİR

Master of Science Thesis

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK

Co-supervisor Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER

2025, 75+xvii pages

The free-living nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) has recently become a well-established model organism in aging research. Its short lifespan, ease of cultivation and experimental manipulation, fully sequenced and well-annotated genome, and suitability for both forward and reverse genetic screens are the primary reasons for its widespread use. Numerous studies have investigated the relationship between aging, longevity, and metabolism in *C. elegans*. As the need to better understand aging-specific mechanisms and to identify biomarkers characterizing this physiological process becomes increasingly critical, metabolites among all biomolecules have emerged as strong candidates for biomarker discovery. Two major nutrient-sensing pathways, the Target of Rapamycin (TOR) and Insulin/Insulin-like Growth Factor Signaling (IIS) pathways, have been associated with the most effective and validated anti-aging interventions. Gene knockouts within the IIS and mTOR signaling pathways tend to extend lifespan. However, significant alterations in these signaling pathways may result in severe adverse effects such as diabetes, cancer, and embryonic lethality. Therefore, anti-aging interventions targeting IIS or TOR pathways have the potential to significantly hinder the progression of numerous age-related diseases, including cancer and diabetes. In our preliminary study, lifespan extension was observed in worms exposed to insulin treatment, a validated anti-aging intervention associated with nutrient-sensing pathways, particularly the IIS pathway. In this thesis, we investigated the metabolomic profiles of both the *lin-35* mutant strain—linked to the mammalian tumor suppressor pRb function—and wild-type N2 worms using LC-Q-TOF-MS/MS analysis to elucidate the insulin-dependent lifespan extension effect. Additionally, changes in cancer-related metabolism and affected metabolic pathways were identified following insulin exposure. The differences in metabolite profiles between *lin-35* mutant worms and wild-type N2 worms after insulin treatment were assessed, and metabolite scores were evaluated. Thus, molecular analyses revealed the metabolic distinctions between *lin-35* mutants carrying a pRB-like mutation and wild-type N2 worms. This study has illuminated the

cancer-IIS relationship in *C. elegans* through molecular and metabolomic approaches. The physiological processes underlying the observed longevity effect in insulin-treated worms from our preliminary research were further clarified by constructing metabolite profiles. We analyzed how the metabolism of long-lived (insulin-exposed) worms differed from that of control worms (not treated with insulin). To this end, samples were analyzed using a Liquid Chromatography/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC-Q-TOF-MS/MS) system with a C18 column and a gradient elution program. The raw data obtained were processed using MZmine 2.53 software. Metabolite profiles were assessed via pathway analysis on the MetaboAnalyst 6.0 platform, and the relationships of the detected metabolites with cancer and insulin signaling were investigated. Upon evaluation, 75 statistically significant metabolites (fold change >1.5, $p < 0.05$) were identified in lin-35 and N2 worms. Literature review revealed that 38 of these metabolites are associated with cancer and/or diabetes models. The most significant among them were L-arginine, fructose 6-phosphate, and fumaric acid. Moreover, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis indicated that 21 metabolic pathways were involved in the cancer/diabetes model. The most prominent among them were the phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis pathway and the riboflavin metabolism pathway. The findings of this study contribute to a better understanding of aging-specific mechanisms and aid in the identification of biomarkers characterizing this physiological process. The alterations identified in the metabolomic profiles may facilitate the elucidation of cancer metabolism mechanisms and the development of novel biomarker targets. Furthermore, as there is currently no comprehensive analytical platform for studying the full metabolome of *C. elegans*, this study contributes to the creation of a species-specific metabolite database—following the model of HMDB—by incorporating metabolite data, including MS and MS/MS spectra, specific to *C. elegans*.

Keywords: Biomarker, *C. elegans*, Insulin, Cancer, LC-Q-TOF-MS/MS, Lin-35, Metabolomics

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT	x
İÇİNDEKİLER.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
TABLolar DİZİNİ.....	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Metabolom Çalışmalarına Genel Bakış	1
1.2. Metabolomik Hastalıklar.....	4
1.2.1. Kanser ve metabolomik değişiklikler.....	4
1.2.2. Diyabet ve metabolik değişiklikler	7
1.2.3. Kanser ve diyabet ilişkisi.....	8
1.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> (C.elegans).....	9
1.3.1. Lin-35	11
1.3.2. İnsülin/IGF-1 (IIS) sinyal yolu ve <i>Caenorhabditis elegans</i>	13
1.4. İnsülin.....	15
1.4.1. İnsülin Yapısı.....	15
1.4.2. İnsülin kanser ilişkisi.....	16
1.4.3. İnsülin diyabet ilişkisi	18
1.5. Metabolom Çalışmaları.....	19
1.6. <i>Caenorhabditis elegans</i> ve Metabolome.....	22
1.7. Metabolomik Çalışmalarda Veri İşleme ve Yazılım Araçları.....	23
1.8. Metabolomik Çalışmalarda Karşılaşılan Zorluklar ve Çözümler.....	26
1.9. Hata Kaynakları	26
2. AMAÇ	28
3. MATERYAL-METOD.....	29

3.1. <i>C.elegans</i> Suşlarının Seçilmesi ve Temin Edilmesi	29
3.2. <i>C.elegans</i> Kültür Koşulları.....	29
3.2.1. <i>C. elegans</i> kültürü için gerekli olan stok çözeltiler ve kültürün hazırlanması için kullanılan kimyasallar	29
3.2.2. Kültür için kullanılan stok çözeltiler	30
3.3. <i>E. coli</i> OP50 Besin Kaynağının Hazırlanması	32
3.4. Kültür Ortamları	33
3.4.1. Katı kültür ortamı hazırlık ve pasajlama	34
3.4.2. Sıvı kültür ortamı hazırlık ve pasajlama.....	36
3.5. <i>C. elegans</i> Senkronize Kültürünün Elde Edilmesi	37
3.6. <i>C.elegans</i> Suşlarının Dondurulması ve Geri Kazanılması	40
3.7. İnsülin Hazırlanması ve Uygulanması	41
3.8. Metabolit Ekstraksiyonu	42
3.9. LC-Q-TOF-MS/MS Analizlerinde Uygulanan Metodoloji.....	45
3.10. Metabolit Fraksiyonunun Analizi	46
3.11. Veri Analizi	46
4. BULGULAR	48
4.1. İnsülin Uygulaması Sonrası <i>C. elegans</i> Solucanların Metabolomik Analizi	48
4.2. Gruplar Arasında Değişen Metabolitler ve Yolak Analizleri.....	60
5. TARTIŞMA	62
5.1. Veri İşleme Yöntemlerinin Karşılaştırılması	63
6. SONUÇ.....	75
KAYNAKÇA	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. LIN-35 ve MuvB, LIN-52'nin LxCxE motifi.....	13
Şekil 2. <i>C. elegans</i> IIS'nin şeması.	14
Şekil 3. İnsülinin üç boyutlu yapısı ve tahmini reseptör bağlanma yüzeyleri.	16
Şekil 4. N2 ve lin-35 mutant <i>C. elegans</i> suşlarının morfolojik yaşam döngüsü görüntüleri.	29
Şekil 5. <i>E. coli</i> OP50 suşunun besin kaynağı olarak hazırlanması.	33
Şekil 6. NGM agar kültür ortamı hazırlık ve muhafaza aşamaları.	34
Şekil 7. <i>C. elegans</i> bireylerinin pasajlanması ve beslenmesi.	36
Şekil 8. <i>C. elegans</i> bireylerinin senkronizasyon aşamaları.	38
Şekil 9. Senkronizasyon işlemi sonrası yumurta eldesi ve petriye aktarımı.	40
Şekil 10. Metabolomik analiz öncesinde örneklerin hazırlanma süreci.	43
Şekil 11. Metabolit stabilizasyonu için kullanılan soğuk metanol ve sıvı nitrojen işlemleri.	44
Şekil 12. Metabolomik analizlerin gerçekleştirildiği Agilent 6530 LC-Q-TOF-MS/MS sistemi.	45
Şekil 13. Lin-35 ve N2 solucanları PCA grafiği.	50
Şekil 14. Lin-35 ve N2 solucanları metabolitlerin gruplara göre ısı haritası.	51
Şekil 15. Lin-35 ve N2 solucanları VIP Grafiği	52
Şekil 16. Lin-35 solucanları kontrol grubu ve insülin grubu VIP grafiği	53
Şekil 17. N2 solucanları kontrol grubu ve Lin-35 solucanları kontrol grubu VIP grafiği 54	
Şekil 18. N2 solucanları kontrol grubu ve N2 solucanları insülin grubu VIP grafiği.	55
Şekil 19. Lin-35 solucanları insülin grubu ve N2 solucanları insülin grubu VIP grafiği 56	
Şekil 20. Lin-35 solucanları kontrol grubu ve lin-35 solucanları insülin grubu Volcano Grafiği.	57
Şekil 21. Lin-35 solucanları kontrol grubu ve N2 solucanları kontrol grubu Volcano Grafiği.	58
Şekil 22. Lin-35 solucanları insülin grubu ve N2 solucanları insülin grubu Volcano Grafiği.	59
Şekil 23. N2 solucanları insülin grubu ve kontrol grubu Volcano Grafiği.	60
Şekil 24. N2 ve lin-35 suşları zenginleştirilmiş yolak analizleri.	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>C. elegans</i> suşları	29
Tablo 2. <i>C. elegans</i> kültürü için gerekli olan stok çözeltileri kullanılan kimyasalları	30
Tablo 3. <i>C. elegans</i> deneyleri için kültür ortamı-çözelti ve tampon içerikleri.....	31
Tablo 4. LB agar ve LB broth içeriği.....	33
Tablo 5. NGM agar içeriği	34
Tablo 6. LC-Q-TOF-MS/MS parametreleri	45
Tablo 7. Kütüphanede eşleşen endojen metabolitlerin sinyal/gürültü oranları ve havuz örneklerde bağıl standart sapmaları.....	49



KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	Protein kinaz B
ARNT	Aryl hidrokarbon reseptörü nükleer translokator
ASCT2	Alanin serin sistein taşıyıcı 2
ATP	Adenozin trifosfat
BSS	Bağıl standart sapma
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CE-MS	Kapiller elektroforez-kütle spektrometresi
CGC	Caenorhabditis Genetik Merkezi
CRISPR	Kısa palindromik tekrarların kümelenmesi sistemi
Da	Atomik kütle birimi (Dalton)
DDA	Veriye bağlı edinim
DIA	Veriden bağımsız edinim
DREAM	Dp/Retinoblastoma benzeri/E2F/MuvB kompleksi
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplazmik retikulum
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FDG-PET	Fluorodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GFP	Yeşil floresan protein
GLUT	Glikoz taşıyıcıları
GRI	Glikoza duyarlı insülin
GSEA	Gen seti zenginleştirme analizi
GWAS	Genom çapında ilişki çalışmaları
HCA	Hiyerarşik kümeleme analizi
HIF	Hipoksi indükleyici faktör
HK2	Heksokinaz 2
HMDB	İnsan Metabolom Veritabanı
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IGFBP	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
ILP	İnsülin benzeri peptitler
IIS	İnsülin ve IGF-1 sinyalleme yolu
IR	İnsülin reseptörü
IRS	İnsülin reseptör substratı
KEGG	Genler ve genomlar için Kyoto ansiklopedisi
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
LC-Q-TOF-MS/MS	Sıvı kromatografisi dörtlü uçuş zamanlı kütle spektrometrisi
mTOR	Memeli rapamisin hedefi
MS	Kütle spektrometresi
MSEA	Metabolit seti zenginleştirme analizi
MYC	Onkojenik miyelositomatozis
NGM	Nematod Büyüme Ortamı
NMR	Nükleer manyetik rezonans
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
PCA	Temel bileşen analizi
PC1-PC2	Birinci- ikinci temel bileşen
PFK2	Fosfofruktokinaz 2
PI3K	Fosfoinozitid 3-kinaz
PI3K-AKT	Fosfatidilinositol 3-kinaz- Protein Kinaz B yolu

PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su
PLS	Kısmi en küçük kareler
PPP	Pentoz fosfat yolu
RAS	Onkogenik RAS proteini
RB	Retinoblastoma proteini
RNAi	RNA interferansı
ROS	Reaktif oksijen türleri
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SHBG	Seks hormonu bağlayıcı globulin
SOM	Kendi kendini organize eden haritalar
SVM	Destek vektör makineleri
T2D	Tip 2 diyabet
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü
tR	Alıkonma zamanı
UPLC TOF MS	Ultra performanslı sıvı kromatografisi- uçuş zamanlı MS

1. GİRİŞ

1.1. Metabolom Çalışmalarına Genel Bakış

Farklı omik stratejileri (metabolomik, proteomik, transkriptomik ve genomik) içinde metabolomik, sistem biyolojisinde metabolit bağımlı fenotipe en yakın ilişkili olan alt bölümdür. Metabolomik, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin (büyük ölçekli) analizine odaklanmaktadır. Genellikle, 1500-2000 Da'ya kadar olan bileşikler analiz edilmektedir (Au, 2018; Segers et al., 2019; R. Wang et al., 2020). Metabolitler, hücresel düzenleyici süreçlerin son ürünleridir, moleküler değişimler ve fenotip arasında bir bağlantı oluşturur ve bu nedenle bir hücrenin, dokunun veya organizmanın belirli bir zamandaki fizyolojik durumunu yansıtır (Nicholson et al., 1999). Metabolomik alanında, iki ana strateji vardır; hedefli metabolomik ve hedefsiz metabolomik. Hedefsiz metabolomik, araştırılan bileşiklerin önceden tanımlanmadığı biyolojik örneklerdeki metabolitlerin tanımlanmasına ve göreceli kantifikasyonuna odaklanır. Öte yandan, hedefli metabolomikte, metabolitlerin iyi tanımlanmış bir alt kümesi kantifize edilir (Gonzalez-Riano et al., 2016). Metabolomik, biyolojik örneklerin metabolomunun analizinde gelişmiş analitik araçlar ve istatistiksel yaklaşımlar kullanılarak metabolitlerin tanımlanması, karşılaştırılması ve metabolik işlevlerinin araştırılmasına odaklanan, başka bir deyişle kimyasal fenotipin ortaya konduğu çalışmalardır (Goodacre, 2007). Metabolomik araştırmalar, hücre ve dokuların metabolik yapılarını ayrıntılı olarak inceleyerek hastalıkların erken tanınması ve tedavi yaklaşımlarının oluşturulmasında önemli veriler sunar. Hastalık gibi durumların metabolom üzerindeki etkileri ya da ilaçların biyokimyasal düzeydeki sonuçları değerlendirilerek, daha etkili ve güvenli tedavi seçenekleri geliştirilebilir (Patra et al., 2018). "Bireylerin yaşam tarzı ve alışkanlıklarının metabolizma üzerindeki etkileri değerlendirilerek sağlık durumlarının iyileştirilmesi ve beslenme düzenlerinin kişiye özel şekilde düzenlenmesi mümkün hale gelir. Metabolomik araştırmalar ayrıca genetik yapı ve çevresel faktörlerin metabolik işleyiş üzerindeki rolünü ortaya koyarak, kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarına değerli katkılar sağlar. Bu analizler, hücresel metabolizmanın dinamiklerini çözümlememizi ve biyolojik sistemlerin karmaşık yapısını daha iyi kavramamızı sağlayarak, tıp ve sağlık bilimlerinde kritik bilgiler sunar (Patra et al., 2018).

Metabolomik, kanserlerde ve metabolizmayla ilişkili hastalıklarda yaygın olarak kullanılır (Chen et al., 2022). Kanser, hücresel metabolizmayı değiştirdiği bilinen bir hastalıktır; bu nedenle, metabolomik, kanser erken teşhisi ve tanısında ve kansere yönelik tıbbi müdahalelerin ve tedavilerin değerlendirilmesinde önemli bir rol oynayabilir (Kaddurah-Daouk et al., 2008). Çoğu metabolomik kanser çalışmasının nihai hedefi, bir hasta için kansere özgü tanısal, prognostik veya tahmini biyobelirteçler keşfetmektir (Beger, 2013).

'Omik' teknolojileri yaşam bilimlerini önemli ölçüde etkilemiş ve diyabet (Dudzik et al., 2017; Floegel et al., 2013), kardiyovasküler hastalık (Laborde et al., 2014), astım (Reinke et al., 2017), Alzheimer (González-Domínguez et al., 2015) ve kanser (Armitage & Barbas, 2014) gibi yaygın karmaşık hastalıkların patofizyolojisi hakkındaki anlayışımızı ilerletmek için önemli bilgiler sağlamıştır (Andrisic et al., 2018). 'Omiklerin' her biri, diğer daha hedefli yöntemlerin sağladığı bulguları ve birbirini tamamlayarak karmaşık biyolojik sistemler ve patofizyolojik süreçlerin çalışmaları için önemlidir (Andrisic et al., 2018). Bununla birlikte, tüm biyolojik süreçlerin bir alt akış uç noktası olarak metabolomik, bir biyolojik sistem içindeki metabolitlerin genel bir değerlendirmesi için temel bir aracı temsil eder ve fenotip ile yakından ilişkili olan belirli hücresel süreçler altındaki metabolik parmak izlerinin belirli bir 'anlık görüntüsünü' ortaya çıkarır (Nicholson & Lindon, 2008).

Metabolomik, 21. yüzyılın başlarından beri ayrı bir alan olarak var olmuştur. Metabolik analiz kavramı yeni olmasa da metabolomikleri önceki metabolik temelli çalışmalardan ayıran bir yönü, 'küresel yaklaşım' olarak adlandırılan şeyin bir parçası olarak mümkün olduğunca çok sayıda metaboliti aynı anda tespit etme ve ölçme girişimidir. Metabolomiklerin çok yönlülüğü ve çok çeşitli uygulamalarda başarıyla kullanılmasına yol açmıştır (Veldhoen et al., 2012). Metabolomik, bakım, büyüme ve hücresel normal işlev için gerekli olan binlerce doğal olarak oluşan küçük molekülün (metabolitlerin) nitel ve nicel analizi olarak tanımlanabilir. Bu tür moleküller, şekerler, organik asitler, amino asitler, vitaminler, lipitler ve nükleotidler gibi hücresel metabolizmanın substratlarını ve ürünlerini içerir. Bir organizmanın 'metabolom'u, genomu ve proteomunun tam genetik ve protein içeriğini oluşturması gibi, metabolitlerinin tam tamamlayıcısıdır (Jones et al., 2013). Farklı organizmalarda hem yapı hem de işlev açısından değişebilen genlerin aksine, metabolitlerin çoğu (örneğin laktat veya alanin) türler arasında aynı bileşikler olarak korunur ve çoğunlukla bir farede, bir insanda veya bir bitkide olsun aynı işi yapar. Bu, bunları bir organizmada tespit etmek için kullanılan analitik araçların hemen hemen her organizmaya kolayca uygulanabileceği anlamına gelir (Riedl et al., 2012).

Metabolitler, metabolizma sırasında kimyasal olarak dönüştürülen küçük moleküllerdir ve bu nedenle hücresel durumun işlevsel bir çıktısını sağlarlar. İşlevleri sırasıyla epigenetik düzenlemeye ve translasyon sonrası modifikasyonlara tabi olan genler ve proteinlerin aksine, metabolitler biyokimyasal aktivitenin doğrudan imzaları olarak hizmet eder ve bu nedenle fenotip ile ilişkilendirilmeleri daha kolaydır. Bu bağlamda, metabolit profillemesi veya metabolomik, klinik teşhis için yaygın olarak benimsenen güçlü bir yaklaşım haline gelmiştir (Patti et al., 2012). Metabolom, şekerler, amino asitler, oligopeptitler, lipitler, organik asitler vb. dahil olmak üzere çeşitli metabolit sınıflarından gelen binlerce metabolit, küçük moleküller

ağırlıklı ara ürünler (tipik olarak 80-1500 Da moleküler kütleyle sahip) içeren karmaşık bir karışımdan oluşur. Metabolitler; primer veya sekonder, endojen ya da eksojen, suda çözünebilen ya da çözünmeyen gibi çeşitli kategorilere ayrılabilir. Lipidler, amino asitler ve şeker türevleri gibi birçok metabolit türü, genetik düzeyde başlayan biyokimyasal süreçler sonucunda sentezlenerek endojen metabolitler olarak tanımlanır. Bununla birlikte, bazı vitaminler ve amino asit türleri gibi metabolik olarak önemli moleküller, evrimsel süreçte vücutta sentezlenme yeteneğini kaybetmiş olsa da, dış kaynaklardan alınarak metabolizmaya dahil olurlar ve bu nedenle eksojen metabolitler arasında yer alırlar (Demain, 1980). İlaç türevleri, bitkisel bileşikler, gıda ve içecek katkıları, kozmetik ürünler ile çevresel kirleticiler gibi pek çok dış kaynaklı etken, eksojen metabolitlerin metabolik süreçlere dahil olmasına neden olur. Geniş kimyasal çeşitlilik, endojen metabolomun eksojen olanlarla, yani çevresel kirleticilerden, ilaçlardan, katkı maddelerinden, toksinlerden ve diğer ksenobiyotiklerden kaynaklanan kimyasallarla etkileşimiyle daha da karmaşık hale gelir (Dunn et al., 2011; Vuckovic, 2012; Wishart et al., 2007).

Metabolit analizine yönelik çalışmalar, kökenini 1700'lü yıllarda Boerhaave ve Lavoisier gibi bilim insanlarının geliştirdiği yöntemlere kadar dayandırmaktadır. 1800'lü yıllarda ise limondan sitrik asit, süttten laktik asit gibi bileşenlerin elde edilmesine yönelik distilasyon teknikleri geliştirilmiş ve yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Dijkstra, 2009). 1843 yılında Liebig, 'Animal Chemistry (Die Thier-Chemie)' adlı eseriyle, küçük organik moleküllerin metabolik süreçlerdeki işlevlerine odaklanan önemli bir çalışma yayımlamıştır (Dijkstra, 2009). "Bory ve çalışma arkadaşları, 1990'ların başında yayımladıkları araştırmada, bazı durumlarda DNA düzeyinde meydana gelen tek bir nükleotid farklılığının, metabolit düzeyinde 10.000 kata kadar varan değişimlere yol açabileceğini rapor etmişlerdir (Bory et al., 1990). Roger J. Williams, 1940'ların sonlarına doğru yürüttüğü araştırmada, psikiyatri hastalarıyla gerçekleştirdiği incelemeler sonucunda, hastalıkların bireylerin fenotiplerinde bazı değişikliklere yol açtığını ortaya koymuştur. 2006 yılında Palsson tarafından yayımlanan ve modern metabolomik yolak analizlerine öncülük eden çalışmada, genetik düzeydeki varyasyonların metabolit derişimlerini ciddi şekilde etkileyebildiği, ancak bu değişikliklerin metabolitlerin kimyasal çeşitliliğini etkilemediği sonucuna ulaşılmıştır. (Palsson, 2006). Metabolomik araştırmaların erken dönemlerinde, Goffeau ve çalışma arkadaşları maya hücreleri üzerinde gerçekleştirdikleri incelemede yaklaşık 5885 protein bulunmasına karşın yalnızca 600-700 civarında metabolit tespit edildiğini belirtmiş; bu nedenle, genomik ve proteomik yaklaşımlara kıyasla metabolit düzeyindeki fonksiyonel analizlerin daha pratik şekilde yapılabileceğini öne sürmüşlerdir. (Goffeau et al., 1996).

1.2. Metabolomik Hastalıklar

Modern insan toplumu, metabolik düzensizliğin patogenezi ve ilerlemede anahtar bir rol oynadığı obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere kronik hastalıklar ve durumların bir salgınıyla karşı karşıyadır. Düzensiz metabolizmanın, geleneksel olarak kökeni "metabolik" olarak kabul edilmeyen kanser, bilişsel bozukluklar ve solunum patolojileri gibi hastalıklara da önemli bir katkıda bulunduğu giderek daha fazla kabul edilmektedir. İnsan genomunun başarılı bir şekilde dizilenmesi, genomik varyasyonun belirli terapötik müdahalelerin etkisini tahmin etmek için kullanılacağı ve belirli bir bireyde hastalığın optimum yönetimine yol açacağı kişiselleştirilmiş tıbbın yeni bir çağını müjdeliyor gibi görmektedir. Ancak, en yaygın kronik hastalıklarımızın çoğu, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere poligeniktir ve genom çapında ilişki çalışmaları (GWAS'ler) gibi yaklaşımlar şimdiye kadar bu hastalıkların yalnızca küçük bir bölümünü açıklamış ve mekanizma tabanlı müdahale stratejilerine mütevazı katkılarda bulunmuştur (O'Rahilly, 2009). Metabolomik, yani geniş kapsamlı metabolit profillemesi, insan ve hayvan modellerinin kimyasal fenotipini ortaya koyar. Bu özelliği sayesinde, hastalıkların görülme sıklığını, şiddetini ve seyrini öngörebilecek biyobelirteçlerin saptanmasında ve temel mekanik bozuklukların aydınlatılmasında önemli ve özgün bir potansiyel taşımaktadır. Diğer "-omik" teknolojilerine göre metabolomiklerin avantajları şunları içerir: (1) İnsanların yaklaşık 6.500 ayrı küçük molekül metaboliti içerdiği tahmin edilmektedir (Wishart et al., 2012), ancak yeni ve daha hassas ölçüm teknolojileri zamanla giderek daha fazla sayıda kimyasal türü ortaya çıkarmaktadır (Zamboni et al., 2015). Bununla birlikte, metabolit sayısının insanlarda bulunan tahmini 25.000 gen, 100.000 transkript ve 1.000.000 proteinden daha küçük kalması muhtemeldir. (2) Metabolomik, genomik, transkriptomik ve proteomik değişkenliğin aşağı akışındaki kimyasal fenotipleri ölçer ve böylece biyolojik durumun son derece bütünlük bir profilini sağlar. (3) Metabolomik ayrıca ilaç tedavilerinin etki mekanizmalarını ve olası toksikolojik etkilerini ayırt etmek ve genetik, mikrobiyom aktivitesi ve beslenmenin genel metabolik fenotiplere katkılarını ayırmak için hassas ve invaziv olmayan bir araç görevi görür (Newgard, 2017).

1.2.1. Kanser ve metabolomik değişiklikler

Onlarca yıldır kanser araştırmaları, kanser fenotipini temsil eden biyobelirteçleri ve olası terapötik hedefleri ortaya çıkarma amacıyla kanser hücreleri ile sağlıklı benzerleri arasındaki farklı moleküler özelliklerin incelenmesini içermektedir. Bu, sinyal iletiminde (Bianco et al., 2006), hücre yaşlanmasında ve kanser hücrelerinin diğer ayırt edici özelliklerinde (Hanahan & Weinberg, 2000) işlev gören kanserde yer alan birçok moleküler özelliğin tanımlanmasına yol açmıştır. Biyolojik bir sistemin işlevsel seviyeleri genom, transkriptom, proteom ve

metabolomu içermesine rağmen , ikincisi fenotipi en iyi şekilde temsil eden olarak kabul edilir (Dunn, 2008). Kanser metabolomunu keşfetmek, özellikle metabolit konsantrasyonlarındaki ince değişikliklerin kontrol edilebilir olabildiği durumlarda, biyolojik işleve göre fenotipik değişiklikleri ortaya çıkarmanın en iyi yolu olabilir. Bu nedenlerden dolayı metabolomik, kanser araştırmalarında ve yaşam biliminin birçok başka alanında en hızlı gelişen disiplinlerden biri olarak kabul edilir. Diğer -omik alanları gibi, metabolomik de yüzyıl içinde başladı ve önemli ölçüde ilerlemiştir. Metabolomik, 1980'lerde NMR'nin kanseri tespit edebileceğine dair değiştirilmiş bir rapor haberi yayınlandığında büyüdüğü gözlemlenmiştir (Spratlin et al., 2009). İlginç bir şekilde, şu anda metabolomik, kanser alanında yaygın olarak araştırılıyor ve kanser ile normal hücrelerin hastalık tespitinde, tedaviye yanıtın tahmininde ve yeni tedavilerin geliştirilmesinde yardımcı olabilecek değiştirilmiş metabolik profiller ürettiğini göstermiştir. Kanser çalışmasında metabolomik kullanımına olan ilgi, Otto Warburg'un Warburg etkisini önermesiyle başlamıştır; bu etki, kanser hücrelerinin enerjilerinin çoğunu Oksidatif Fosforilasyon (OXPHOS) aracılığıyla adenozin trifosfat (ATP) formunda üretmekten, enerjilerinin çoğunu glikoliz yoluyla üretmeye geçtiğini ileri sürmüştür. Bu gözlem, kolon (Chan et al., 2009), yumurtalık (Guan et al., 2009), hepatoselüler karsinom (Wu et al., 2009) ve meme kanserleri (Oakman et al., 2011) dahil olmak üzere birçok kanser türünde metabolomiklerin incelenmesine olan ilgiyi uyandırmıştır (Nagrath et al., 2011). Metabolomik, özellikle erken teşhis ve taramanın zor olduğu ancak daha iyi prognozla sonuçlandığı kanserlerde hastalığın erken tespitine yardımcı olmak amacıyla bu kanserler için biyobelirteçleri incelemek için kullanılmaktadır. Hastalık teşhisinde ve tedavisinde kullanımının çok yönlülüğü nedeniyle, metabolomik araştırmalarının gelecekte, özellikle daha hassas ve spesifik, uygun maliyetli teşhis araçlarına büyük ihtiyaç duyulan ve gereksiz ilaç uygulamasından ve eşlik eden yan etkilerden kaçınmak için bir terapiye yanıtı daha doğru bir şekilde tahmin etmek için etkili terapilere ve biyobelirteçlere büyük bir aciliyet duyulan kanser alanında artacaktır (Nagrath et al., 2011).

Kanser hücrelerinde en erken ve en çok tanınan metabolik değişikliklerden biri tümörler tarafından artan Glukoz tüketimidir. Tümörler tarafından yükselen Glukoz alımı, ilk kanser evrelemesi, tedaviye yanıtın değerlendirilmesi ve gözetim için Fluorodeoksiglukoz-Pozitron Emisyon Tomografisi (FDG-PET) görüntüleme ile tespit edilir. Yaklaşık bir asır önce Otto Warburg ve diğerlerinin tümör hücrelerinin Glukoz alımını artırdığı ve oksijen varlığında bile yüksek miktarda laktat ürettiği yönündeki ilk gözlemiyle başlayarak, kanser hücrelerinin değişmiş metabolizmaya girdiği iyi bir şekilde belirlenmiştir (Schmidt et al., 2021). Genetik ve/veya epigenetik değişiklikler, besin eksikliği çeken bir ortamda kanser hücrelerine önemli

bir hayatta kalma avantajı sağlayabilir. Kanser hücresi metabolizmasına olan yenilenen ilgi, başlangıçta düzensiz sinyal yollarının ve transkripsiyonel yeniden programlamanın kanser hücrelerinde metabolik değişikliklere yol açtığının fark edilmesinden kaynaklanmıştır (Hsu & Sabatini, 2008). Daha sonra, onkogenlerin indüklenmesinin ve/veya tümör baskılayıcıların kaybının kanser hücrelerinde metabolik değişiklikleri yönlendirmek için yeterli olduğu gösterilmiştir (Dang, 2013). Tümörle ilişkili metabolik değişiklikler ortaya çıkan bir kanser özelliği olarak kabul edilmektedir (Hanahan & Weinberg, 2011).

Glukoz, çoğu hücre için en bol bulunan besindir ve enerji üretimi için biyokütle ve yakıt kaynağı olabilir. Kanserde değişen çok sayıda sinyal yolu, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla glukoz metabolizmasını etkiler. Klasik bir paradigmada, insülin veya diğer büyüme faktörleri tarafından uyarılan reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar), glikolizi uyarmak için fosfatidilinositol 3-kinaz - Protein Kinase B (PI3K-AKT) sinyal yolunu aktive eder (Elstrom et al., 2004). AKT (Protein kinaz B olarak da bilinir), glikolitik aktiviteyi doğrudan heksokinazı (glikolizdeki ilk adımı katalize eden enzim) fosforile ederek ve dolaylı olarak glukoz taşıyıcılarının (GLUT1 ve GLUT4) plazma membranına taşınmasını düzenleyen substratların fosforilasyonu yoluyla artırabilen bir serin-treonin kinazdır (Roberts et al., 2013). PI3K-AKT sinyalleme ayrıca memeli rapamisin hedefi 1'i (mTORC1) indükler ve bu da hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) 1 α 'nın artan ekspresyonu ile sonuçlanır (Majumder et al., 2004). HIF'ler, oksijen varlığında parçalanmış bir α -alt birimden (HIF1 α ve HIF2 α) ve stabil bir β -alt birimden (HIF1 β , ayrıca Aryl Hidrokarbon Reseptörü Nükleer Translokator (ARNT) olarak da bilinir) oluşan heterodimerik transkripsiyon faktörleridir (Majumdar et al., 2010). Hipoksi varlığında, HIF'ler stabilize olur ve glukoz taşıyıcı 1 ve 3'ün (GLUT1 ve GLUT3), heksokinaz 2'nin (HK2) ve fosfofruktokinaz 2'nin (PFK2) bazı izoformlarının artan ekspresyonu dahil olmak üzere hipoksik strese adaptasyona izin veren bir transkripsiyonel yanıtı aktive eder (Schmidt et al., 2021). HIF1 α ayrıca pirüvat dehidrogenaz kinaz ekspresyonunu da teşvik eder, bu da pirüvat oksidasyonunu inhibe eder ve hipoksik koşullara bir adaptasyon olarak glukoz metabolizmasını laktata yönlendirmektedir (Kim et al., 2006). HIF2 α anabolik metabolizmanın diğer yönlerini düzenler ve berrak hücreli renal hücre karsinomu için terapötik bir hedeftir (Hoefflin et al., 2020). Büyüme faktörü reseptör sinyalleme ayrıca glukoz alımını, glikolizi ve pentoz fosfat yolunu (PPP) teşvik etmek için retiküler aktivasyon sistemi (RAS) proteinlerini aktive eder.

Enerji, Glukoz tamamen CO₂'ye oksitlendiğinde maksimum düzeyde açığa çıkar; bu süreç oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla ATP üretir. Hücrelerde oksijen sınırlı olduğunda, glikoliz OXPHOS'tan ayrılır ve glikolizin son ürünü olan pirüvat, bunun yerine laktata indirgenir. İlginç bir şekilde, birçok kanser hücresinde, oksijen sınırlı olmasa bile glukoz

tercihen fermentasyon yoluyla laktata katabolize edilir ("Warburg etkisi"). Piruvatın laktata dönüşümü, kanser hücrelerinin biyosentetik işlevleri desteklemek için uygun bir redoks kofaktör dengesi sağladığı temel bir mekanizma gibi görünmektedir (Vander Heiden & DeBerardinis, 2017). TP53 aktivitesinin kaybının hücreleri OXPHOS yerine glikolitik yola doğru itebileceği gösterilmiştir. Yaklaşık bir asır önce ilk kez gösterildiği gibi, tümörler laktatı sistemik dolaşım yoluyla atar ve buradan karaciğer tarafından alınır ve glukoneogenez yoluyla glukozu yeniden dönüştürülür ("Cori döngüsü"). Son zamanlarda, laktatın tümörlerdeki bazı hücreler tarafından trikarboksilik asit döngüsü (TCA) döngüsünü beslemek için de alınabileceği bildirilmiştir, ancak bunun artan glukoz alımıyla nasıl ilişkili olduğu açık bir soru olmaya devam etmektedir (Liu et al., 2020). Glukozun yanı sıra, kanser hücreleri tarafından diğer besin maddelerinin artan alımının kanser hücresi sağ kalımını, büyümesini ve istilasını desteklediği gösterilmiştir. Onkojenik miyelositomatozis (MYC), bazı kanser hücrelerinde glutamin bağımlılığına yol açan artmış glutaminolizle ilişkilendirilmiştir (Wise et al., 2008). Glutamin, Glukoz gibi, lipogenez için karbon sağlayabilir ve MYC'nin yağ asidi metabolizmasını düzenlediği gösterilmiştir (Gouw et al., 2019). Tümör baskılayıcı retinoblastoma proteininin (RB) inaktivasyonunun, insan kanser hücrelerinde glutamin taşıyıcı alanin serin sistein taşıyıcı 2 (ASCT2)'nin yukarı düzenlenmesi nedeniyle glutamin kullanımını artırdığı da gösterilmiştir (Reynolds et al., 2014). Glukoz ve glutamin, plazma ve doku kültürü ortamlarında en bol bulunan besinler olmasına rağmen, kültürlenmiş kanser hücreleri ve tümörleri tarafından tüketilen besinlerin listesi çok geniştir. Çoğu durumda, belirli besinlere olan gereksinimin tümör tipine ve besin ortamına bağlı olması muhtemeldir.

Hücre soyu, metabolik aktivite, proliferatif indeks, metastatik potansiyel ve tedaviye yanıt dahil olmak üzere kanser hücre fenotiplerinin önemli bir belirleyicisi olarak da kabul edilmektedir. Gelişim sırasında organlar ve dokular oluşukça, hücre kaderini belirleyen genetik programlar yürütülür. Bu gelişimsel programlar, nihayetinde progenitör hücreleri, belirli bir doku tipinin işlevini desteklemek üzere tasarlanmış benzersiz metabolik aktivitelere sahip özel hücre tipleri haline getirir. Karsinogenez sırasında, metabolik aktivite kanser büyümesini desteklemek üzere yeniden düzenlenir, ancak kanser ve ilişkili stromal hücrelerin metabolizmalarını nasıl uyarladıkları, kanserin kökenindeki dokuya ve hücreye bağlıdır (Gaude & Frezza, 2016). Kanser hücreleri, kanser hücrelerinin köken doku/hücre tipini yansıtan soy belirteçlerini nasıl koruduğuna benzer şekilde, belirli metabolik imzaları koruyabilir (Gaude & Frezza, 2016).

1.2.2. Diyabet ve metabolik değişiklikler

Diyabet 2019 yılında 463 milyon kişiyi etkiledi ve 2045 yılına kadar dünya çapında 700 milyon yetişkinin diyabet hastası olacağı, bunların çoğunluğunun tip 2 diyabet (T2D) olacağı tahmin

ediliyor (Saeedi et al., 2019). Hipergliseminin gelişimiyle ilişkili veya öncesinde metabolik homeostazın karakteristik bozulmaları, metabolomikleri T2D için olası yolları açıklamak ve olası biyobelirteçleri keşfetmek için iyi bir yöntem haline getirir. Son yirmi yıldır, metabolomikler büyük epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmıştır ve bazı metabolitler/yollar insülin metabolizmasıyla ilişkili olduğu veya farklı çalışmalarda diyabetin öngörücü olduğu tanımlanmış ve doğrulanmıştır (Guasch-Ferré et al., 2016).

Metabolomik hem endojen hem de ekzojen bilgileri birleştirerek bir fenotipin kapsamlı bir moleküler profilini sağlar. Metabolitler, çevre kirliliği, fiziksel aktiviteler, ilaçlar ve diyet gibi çevresel maruziyetlerden de etkilenen genom, transkriptom, proteom ve enzimatik reaksiyonların alt akış ürünleridir. Metabolom, protein kodlayan bir gendeki tek bir baz değişikliğinin bile bir metabolit seviyesinde 10.000 kat değişikliğe neden olabileceği genlerle yakından ilişkilidir. Genomun (4 nükleotid baz) ve proteomun (20 proteojenik amino asit) nispeten basit kimyasal yapılarının aksine, metabolom binlerce farklı kimyasal sınıftan oluşur ve metabolit sayısının yaklaşık 1 milyon olduğu, gen ve protein sayısının ise sırasıyla yaklaşık 20.000 ve 620.000 olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle, metabolomik bir fenotipin kapsamlı bir moleküler profilini sağlar (Guasch-Ferré et al., 2016).

1.2.3. Kanser ve diyabet ilişkisi

İnsülin, glikoz Emilimini iyileştirerek karbonhidrat ve yağ metabolizmasını düzenleyebilen bir peptit hormonudur. Ancak insülin, diyabetlilerde hücresel glikoz alımını ve kullanımını artırma işlevini kaybeder ve bu klinik olarak insülin direnci olarak tanımlanır. Bu nedenle, beta hücreleri telafi etmek için daha fazla insülin salgılar ve bu da hiperinsülinemiye neden olur (Godsland, 2010). Ayrıca, yüksek insülin seviyesi, insülin hedef hücrelerin yüzeyindeki insülin reseptörüne bağlandığında karaciğer hücrelerini IGF-1 üretmeye teşvik eden hiperinsülineminin bir özelliğidir. IGF-1, kanser hücresi çoğalmasını, farklılaşmasını ve apoptozu düzenlemek için çeşitli metabolik ve mitojenik sinyal yollarını aktive etmek üzere bir reseptör tirozin kinaz olan IGF 1 reseptörüne (IGF-1R) bağlanır (Edward et al., 2010; Liao, Tan, et al., 2019). Çok sayıda alt akış hedefinden sonra, fosfoinozitol-3-kinaz-protein kinaz B ve sıçan sarkomu-mitojenle aktive edilen protein kinaz/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz sinyal yolları aktive olur (Liao, Chua, et al., 2019). Fosfoinozitol-3-kinaz-protein kinaz B sinyal yolu, kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve göçüne yol açarken, sıçan sarkomu-mitojenle aktive edilen protein kinaz/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz sinyal yolu, kanser hücresi metabolizmasını ve çoğalmasını yönetir (Poloz & Stambolic, 2015). Bu nedenle, diyabetli hastalar daha yüksek IGF-1 seviyeleriyle ilişkilidir ve bu da onları kolorektal, meme ve prostat kanserleri gibi birçok kanser türünü geliştirme riskini artırmaya daha yatkın hale getirir. Ayrıca,

birçok çalışma IGF-1'in meme kanseri hücrelerinde diğer kanser türlerine göre daha sık ifade edildiğini ortaya koymuştur (Price et al., 2012) ve bunun nedeni IGF-1'in ifade edildiği yerle ilgilidir. HER2 aracılı meme kanserinin hiperinsülinemi durumunda fare modeli kullanılarak yapılan bir deneyde, artan insülin seviyelerinin HER2 aracılı primer tümör büyümesi ve akciğer metastazı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tümör kütesinin büyüdüğü ve IR ile IGF-1R'nin daha yüksek fosforilasyon seviyelerine sahip olduğu ortaya konuldu ve hiperinsülineminin insülin/IGF eksenini aracılığıyla meme tümörlerinin artan büyümesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (R. D. Ferguson et al., 2013). Hücre büyümesi ve çoğalması için enerji sağlanması gerekir. Genellikle hücreler trikarboksilik asit döngüsü yoluyla enerji elde ederken, kanser hücreleri glikolize geçerek Warburg etkisi olarak bilinen daha kolay bir glikoz alımına yol açar (Vander Heiden et al., 2009). Bu nedenle, diyabetlilerin hiperglisemisi kanser hücrelerine hayatta kalmaları ve çoğalmaları için harika bir koşul sağlar. Bu arada, tümör proteini ve DNA'sının sentezi glikoz metabolizması ile ilişkilidir. Bu nedenle, yüksek kan şekeri seviyesi tümör büyümesini ve metastazı etkiler (Adekola et al., 2012). Çalışmalar ayrıca hipergliseminin mitokondriyal işlev bozukluğunu ve serbest radikallerin ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi diğer reaktif moleküllerin oluşumunu hızlandırdığını, gelişmiş glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) oluşumunu tetiklediğini ve protein kinaz C izomerlerini aktive ettiğini göstermiştir (Hanahan & Weinberg, 2011). ROS yalnızca doğrudan DNA'ya zarar vererek genetik mutasyona neden olmakla kalmaz, aynı zamanda mitogen aktive protein kinazlarını ve p21 aktive kinazı düzenleyerek tümör metastazını teşvik eder. Üstelik ROS, kanser hücrelerinin istilasında rol oynayan ve kanser hücrelerinin olumsuz ortama uyum sağlamasına yardımcı olan anahtar moleküller olan protein kinaz C ve protein tirozin fosfatazı oksijenlendirebilir (Z.-y. Li et al., 2011). AGE reseptörü, bağışıklık hücreleri, nöronlar, osteoblastlar, aktive endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücreleri gibi birçok kanser hücresinde bulunur. Dahası, AGE'ler tarafından tetiklenebilir ve birçok kanserle ilişkili sinyal yoluna bağlanan kronik inflamasyona yol açabilir (Rojas et al., 2011), sonunda hücre genetik mutasyonunu ve evrimini artırarak ileri kanser evrelerine yol açabilir (M. Wang et al., 2020). Ancak, hiperglisemi ve hiperinsülinemi çoğu diyabet hastasında aynı anda mevcut olduğundan ve her bir anormalliğin bağımsız rolünü ayırt etmek zor olduğundan, hipergliseminin tümör büyümesini ve metastazı teşvik eden bağımsız bir faktör olup olmadığı konusunda tutarlı bir görüş yoktur.

1.3. *Caenorhabditis elegans* (C.elegans)

Toprakta yaşayan nematod *Caenorhabditis elegans*, biyolojide önemli bir model organizma haline gelmiştir. İplik kurdu *C. elegans* yuvarlak solucandır. Uzun silindirik bir vücut şekline sahip, pürüzsüz derili, bölümlenmemiş solucanlardan oluşan bir filum olan yuvarlak solucanlar

hem suda hem de karada yaşayan serbest yaşayan ve parazitik formları içerir. *C. elegans* tehlikesiz, bulaşıcı olmayan, patojenik olmayan, parazitik olmayan bir organizmadır. Küçüktür, yaklaşık 1 mm uzunluğa kadar büyür ve toprakta yaşar ve burada mikroplarla, özellikle bakterilerle beslenerek hayatta kalır (Wood, 1988). Tamamen dizilenmiş olan (yaklaşık 100 milyon baz çifti uzunluğunda) *C. elegans* genomu, beş çift otozomdan (I, II, III, IV ve V) ve bir çift seks kromozomundan (X) oluşur, yani mitokondriyal genomdur. *C. elegans*'ın iki cinsiyeti vardır, hermafroditler ve erkekler. Neredeyse tüm bireyler hermafrodittir ve erkekler toplam popülasyonun ortalama sadece %0,05'ini oluşturur. *C. elegans*'taki cinsiyet, X0 cinsiyet belirleme sistemine dayanır. Hermafrodit *C. elegans*'ın eşleşen bir çift cinsiyet kromozomu (XX) vardır ve nadir erkeklerin yalnızca bir cinsiyet kromozomu (X0) vardır. Kendi kendine döllendiğinde, yabanıl tip solucan yaklaşık 300 yumurta bırakır. Bir erkek tarafından döllendiğinde, yavru sayısı 1000'i aşabilir.

C. elegans'ın temel anatomisi bir ağız, bir yutak, bir bağırsak, bir gonad (spermateka aracılığıyla merkezi bir uterusu bağlanan iki bilateral simetrik, U şeklinde gonad kolu) ve bir kolajen kütikül içerir. Vücudun uzunluğu boyunca uzanan dört kas bandı, kasların hayvanın vücudunu yalnızca dorsal ve ventral yönde hareket ettirmesine izin veren, iyice haritalanmış bir nöronal sisteme bağlıdır (Papaevgeniou & Chondrogianni, 2014).

Hızlı üreme döngüsü, yarı saydam bir gövde, bilinen hücre soyu ve çok hücreli bir organizmanın ilki olan dizilenmiş bir genom dahil olmak üzere çeşitli deneysel avantajlar sunmaktadır. Dahası, hermafrodit yapısı kısa sürede çok sayıda izogenik hayvan yetiştirmeye olanak tanır. *C. elegans*'ın yumurtadan fertil yetişkinlere kadar olan tam gelişim döngüsü 20°C'de yaklaşık 3 gün sürer. Solucan, L1 ila L4 olarak adlandırılan dört larva evresinden geçer. Aşırı kalabalık veya yiyecek kıtlığı gibi elverişsiz koşullar altında alternatif, beslenmeyen ve uzun ömürlü bir gelişim evresine, dauer evresine girebilmektedir. Koşullar düzeldikten sonra dauer larvaları normalde yetişkin yaşam süresinde herhangi bir taviz vermeden L4 larvalarından yetişkinlere doğru gelişir.

C. elegans, farklı araştırma alanlarında (örneğin toksikoloji, gelişim biyolojisi, nörobiyoloji, konak-patojen etkileşimleri, yaşlanma araştırmaları ve diğerleri) model organizma olarak kullanılır. Geçtiğimiz yıllarda solucan ayırma, transkriptomik için mikro diziler, görüntüleme teknolojileri, transgenikler veya dokuya özgü gen inaktivasyonu içeren çok sayıda araç geliştirilmiştir (Qadota et al., 2007).

Nematod genlerinin yaklaşık %60-80'i insan genlerinin homologlarıdır (Kaletta & Hengartner, 2006). Bu nedenle *C. elegans* üzerindeki araştırmalar insan sağlığı ve hastalıkları çalışmaları açısından yüksek öneme sahip olabilir. *C. elegans*'ta farklı ileri ve geri genetik araçlar

mevcuttur. RNA interferansı (RNAi), *C. elegans*'ta sistematik gen inhibisyonu için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri haline gelmiştir (Fire et al., 1998; Gönczy et al., 2000; Mello & Conte Jr, 2004). RNAi, hedef gen için spesifik bir diziye sahip çift sarmallı RNA (dsRNA) sunarak gen aktivitesini inhibe eder. Bu, homolog haberci RNA'nın (mRNA) bozulmasına yol açar (Fraser et al., 2000; Kaletta & Hengartner, 2006; Timmons & Fire, 1998). Ayrıca, düzenli aralıklarla serpiştirilmiş kısa palindromik tekrarların kümelenmesi (CRISPR)–Cas9, genom mühendisliği için *C. elegans*'ta uygulanmıştır ve bu başka bir yerde incelenmiştir (Arribere et al., 2014; Au et al., 2019; Dickinson & Goldstein, 2016; Dickinson et al., 2015; Joshi et al., 2020; Kim & Colaiácovo, 2019; Paix et al., 2015; Ward, 2015). *C. elegans* metabolomu ve lipidomu geniş bir polarite aralığını kapsar, bu nedenle gerçek kapsamlı profillemeye elde etmek için birden fazla analitik yöntemin birleştirilmesi gerekir. Özellikle, oldukça polar bölge (negatif logP değerleri) daha fazla geliştirme gerektirir. *C. elegans* farklılaşmış dokulara sahip çok hücreli bir organizmayı temsil ettiğinden, spesifik metabolitlerin yeri önemli bir faktördür. İlk olarak dokuya özgü metabolik modeller geliştirilmiştir (Yilmaz et al., 2020). *C. elegans*'ın şeffaf gövdesi, proteinlerin lokalizasyonu için birçok farklı mikroskopi yönteminin kullanılmasını sağlamıştır, örneğin GFP füzyonları kullanılarak. Dokuya özgü metabolomikler, örneğin MS görüntüleme kullanılarak, uzamsal olarak yeniden çözülmüş metabolomikler için geliştirilecektir. Benzer şekilde, tek hücreli metabolomikler genellikle ilgi kazanmaktadır ve potansiyel olarak izole edilmiş *C. elegans* hücrelerine uygulanabilir (Salzer & Witting, 2021).

1.3.1. Lin-35

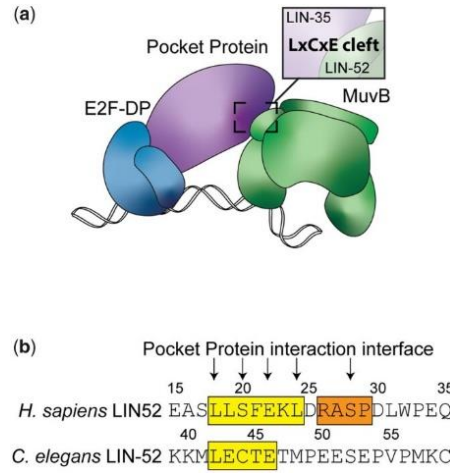
Yaklaşık 50 yıl önce, retinoblastoma proteini (pRB) tümör baskılayıcı özellik gösterdiği ilk kez ortaya konmuş ve hücre döngüsünün kontrolünde kritik bir işlev üstlendiği bilimsel olarak doğrulanmıştır (González-Rangel & Navarro, 2021). O zamandan beri, hücre döngüsü kontrolü ve kanserdeki işlevi yaygın olarak incelenmiştir. Dahası, apoptozis, farklılaşma ve durgunluk gibi çok daha fazla biyolojik yön pRB'ye atfedilmiştir.

Memeli Retinoblastoma (Rb) protein ailesinin üyeleri olan pRb, p107 ve p130, topluca cep proteinleri olarak adlandırılır ve hücre döngüsü sırasında transkripsiyonu düzenlemede önemli roller oynar (Goetsch & Strome, 2022). Memeli hücrelerinde, pRb, E2F-DP transkripsiyon faktörü heterodimerlerini aktive etmekle (memelilerde E2F1/2/3-DP1/2) etkileşime girer, E2F-DP'yi izole eder ve erken hücre döngüsü genlerinin E2F-DP aracılı aktivasyonunu önler (Helin et al., 1992; Lees et al., 1993; Liban et al., 2016). Bunun aksine, Rb benzeri proteinler p107 ve p130 baskılayıcı E2F-DP'ler (memelilerde E2F4/5-DP1/2) ve yüksek oranda korunmuş 5 alt birimli MuvB alt kompleksi (memelilerde LIN9, LIN37, LIN52, LIN54 ve RBAP48) ile etkileşime girerek 8 alt birimli DREAM (Dp, Rb benzeri, E2F ve MuvB) transkripsiyonel

baskılayıcı kompleksini oluşturur (Goetsch & Strome, 2022). DREAM kompleksi ile ilişkilendirildiğinde, MuvB erken ve geç hücre döngüsü genlerinin transkripsiyonel baskılanmasına aracılık eder (Goetsch & Strome, 2022). Dream kompleksinin ve prb'nin transkripsiyonel işlevleri örtüşür ve her biri diğeri inaktif olduğunda hücre durgunluğu (g_0) oluşturmaya ve sürdürmeye yeterlidir. Hücre döngüsüne ilerleme üzerine, prb ve rb benzeri cep proteinleri cdk4/6-siklin d tarafından fosforile edilir, ilgili etkileşim ortaklarını serbest bırakır ve hücre döngüsü genlerinin aktivasyonunu tetikler. Bu nedenle, cep proteinlerinin ilgili transkripsiyonel komplekslerinden birleşmesi ve ayrılması, hücre döngüsü durgunluğu ile hücre döngüsü ilerlemesi arasındaki geçişi yönetir.

Caenorhabditis elegans'ta LIN-35, p130/p107'ye en çok benzeyen tek cep proteindir (Lu & Horvitz, 1998). Cep proteiniyle ilişkili kompleks MuvB, memelilerde homologlar tanımlanmadan önce *Drosophila melanogaster*'de ve *C. elegans*'ta izole edilmiştir. Çeşitli şekillerde DRM ve DREAM olarak adlandırılan *C. elegans* kompleksi, hücre döngüsü genlerini düzenler ve gen baskılanmasını sağlamak için MuvB'ye ihtiyaç duyar. *Caenorhabditis elegans* DREAM ayrıca vulva gelişimi sırasında Ras sinyallemesini antagonize ederek ve somatik hücreleri germ hattı genlerini ifade etmekten koruyarak hücre kaderinin belirlenmesini düzenler (Wang et al., 2005).

Kapsamlı biyokimyasal analizler, DREAM kompleksinin kromatin üzerinde nasıl bir araya geldiğini göstermiştir (**Şekil 1a**). E2F-DP ve bir MuvB bileşeni olan LIN54, bölgeye özgü kromatin lokalizasyonunu yönlendirir. Rb benzeri cep proteini, 2 DNA bağlayıcı DREAM bileşeni arasında bir köprü görevi görür (Guiley et al., 2015). LIN52, LIN52'deki bir "LxCxE motifi" aracılığıyla cep proteiniyle etkileşime girer. Memelilerde, LxCxE motifi, yakındaki bir serin kalıntısının (S28) fosforilasyonu ile optimum hale getirilen suboptimal bir LxSxExL dizisidir (**Şekil 1b**) (Guiley et al., 2015). DYRK1A kinazı tarafından S28 fosforilasyonu, memeli DREAM oluşumunu indükler (Litovchick et al., 2011). *C. elegans*'ta, korunan *lin-52* geni optimum LxCxE dizisini kodlar (**Şekil 1c**). *Caenorhabditis elegans*, LIN-52'de bir DYRK1A homologundan ve buna karşılık gelen konsensüs motifi RxSP'den yoksundur, bu da *C. elegans*'ta bir fosfo-anahtarın DREAM oluşumunu indüklediğini düşündürmektedir (Litovchick et al., 2011) (Guiley et al., 2015). Önemli olarak, LxCxE bağlanma motifi, insan papilloma virüsü (HPV) viral onkoprotein E7 tarafından LIN52'nin memeli cep proteini p130 ile ilişkisini önlemek için kullanılan yüksek afiniteli bir etkileşime aracılık eder (Guiley et al., 2015).



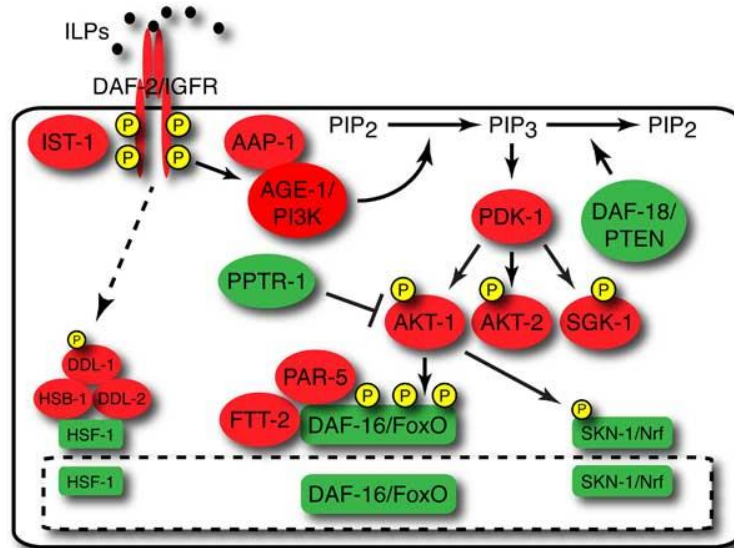
Şekil 1. LIN-35 ve MuvB, LIN-52'nin LxCxE motifi. Vurgulanan bölge bu çalışma için hedef bölgeyi göstermektedir: LIN-35 cep proteiniyle doğrudan etkileşime giren MuvB alt birimi LIN-52'deki bir LxCxE bağlanma motifi. b) *Homo sapiens* LIN52 ve *C. elegans* LIN-52 dizilerinin hizalanması. İnsan LxSxExL ve solucan LxCxE dizileri sarı renkle vurgulanmıştır ve insan DYRK1A konsensüs fosforilasyon dizisi turuncu renkle vurgulanmıştır. Oklar, cep proteiniyle etkileşime katılan kalıntıları ve bu çalışmada alanine dönüştürülen amino asit kalıntıları göstermektedir (Goetsch & Strome, 2022).

1.3.2. İnsülin/IGF-1 (IIS) sinyal yolu ve *Caenorhabditis elegans*

İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), biyolojik etkilerini, içsel tirozin kinaz aktivitesine sahip hücre yüzeyi transmembran reseptörlerine bağlanarak ve bunları aktive ederek gösterir. Aktive edilmiş insülin ve IGF-1 reseptörleri, aralarında iskele proteinlerinin IRS (İnsülin Reseptörü Substratı) ailesinin de bulunduğu çeşitli substratları fosforile eder (White, 1998). Tirozinle fosforile edilmiş IRS proteinleri, fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K)/Akt, Ras/MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) ve mTOR yolları (Taniguchi et al., 2006) gibi aşağı akış kaskadlarının bileşenlerinin toplanmasını ve aktivasyonunu teşvik eder. Bu ve diğer insülin ve IGF-1 sinyalleme (IIS) yolu bileşenleri metazoonlarda yaygın olarak korunmuştur (Piñero González et al., 2009). Dahası, IIS'nin büyüme, üreme ve yaşlanma gibi sistem genelindeki işlevleri beslenme durumuna bağlamadaki rolü hem korunmuştur hem de evrensel olarak önemlidir. Genetik olarak işlenebilir sistem olan *C. elegans*'ın IIS'nin işlevini incelemek için kullanılması değerli olmuştur ve IIS'nin işlevleri, düzenlenmesi ve çıktıları hakkında birçok önemli içgörü sağlamıştır.

İnsülin/IGF-1 sinyal yolu, tüm ökaryotlarda besin bulunabilirliğine yanıt olarak büyümeyi, metabolizmayı ve üremeyi kontrol eden evrimsel olarak korunan bir fosforilasyon kaskadıdır. Dahası, bu yolun yaşlanmayı düzenlemede iyi bilinen bir rolü vardır çünkü azalan IIS, *C. elegans*, *D. melanogaster* ve *Mus musculus* 'ta yaşam süresinin uzamasına yol açar (Zečić & Braeckman, 2020). *C. elegans*'ta yalnızca bir insülin reseptörü (IR) vardır: DAF-2 (Clayton et al., 2011). İnsülin benzeri ligand bağlanması üzerine, *C. elegans* DAF-2 reseptörü otofosforile

olur ve bu da PI3K/AGE-1'in p110 katalitik alt biriminin alınması ve aktivasyonu ile sonuçlanır (Morris et al., 1996). AGE-1, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatın (PIP₂) fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfata (PIP₃) dönüşümünü katalize eder (Weinkove et al., 2006). *C. elegans* genomu, sırasıyla IRS ve PI3K adaptör birimi homologları olan *ist-1* ve *aap-1*'i kodlar (Wolkow et al., 2002). Ancak, *aap-1* ve *ist-1*, en azından yabancı tip solucanda, DAF-2 tarafından AGE-1/p110 katalitik alt birim aktivasyonu için vazgeçilmez kabul edilir (Wolkow et al., 2002). Yüksek PIP₃ seviyeleri, 3-fosfoinozitol bağımlı kinaz-1 homologu PDK-1'in aktivasyonu ile sonuçlanır; bu da sırasıyla Akt/PKB homologları AKT-1 ve AKT-2'yi ve serum ve glukokortikoid indüklenbilir kinaz SGK-1'i fosforile eder ve aktive eder (Zečić & Braeckman, 2020). Memelilerde hem AKT hem de SGK, fosforilasyon yoluyla FoxO3A'yı inhibe edebilir ancak düzenleyici bölgelere olan tercihlerinde farklılık gösterir. *C. elegans*'ta, SGK-1'in düzenleyici rolü daha az açıktır. SGK-1 *in vitro* DAF-16'yı fosforile ederken, *in vivo* DAF-16 hücre altı lokalizasyonunu etkilemez, ancak muhtemelen DAF-16 ile etkileşime giren diğer proteinleri etkileyerek düzenleyici işlevini uygular (Chen et al., 2013). AKT-1 ve AKT-2 tarafından DAF-16'nın fosforilasyonu, 14-3-3 iskele proteinleri PAR-5 ve FTT-2 ile ilişki yoluyla sitoplazmada sekestrasyonuna yardımcı olur (Berdichevsky et al., 2006). Stres, *daf-2*'deki veya yolak kinazlarından herhangi birindeki mutasyonlar nedeniyle IIS'nin azaldığı koşullar altında, DAF-16 hedeflerinin transkripsiyonunu düzenlediği çekirdeğe taşınır (Şekil 2) (Evans et al., 2008; McElwee et al., 2004; Murphy et al., 2003; Wang & Kim, 2003).



Şekil 2. *C. elegans* IIS'nin şeması. Aktif IIS, DAF-16/FoxO, HSF-1 ve SKN-1/Nrf transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyona bağlı sitoplazmik sekestrasyonuna katkıda bulunur. İnsülin/IGF-1 reseptör ortologu DAF-2 ve IIS'yi destekleyen diğer yol bileşenleri kırmızı renktedir ve IIS'yi antagonize eden veya IIS tarafından antagonize edilen moleküller yeşil renktedir. DAF-2 aktivitesini hem destekleyebilen hem de antagonize edebilen insülin

benzeri peptitler siyah renktedir. Kısaltmalar: ILP'ler, insülin benzeri peptitler; PI3K, fosfoinozid 3-kinaz; PIP2, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat; PIP3, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat (Murphy & Hu, 2013).

1.4. İnsülin

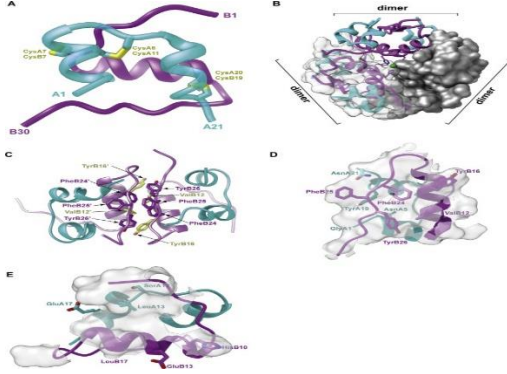
İnsülin, pankreastaki Langerhans adacıklarında yer alan β hücrelerinden salgılanan bir peptit hormonudur. Hücrelerin glukoza daha kolay almasını sağlayarak, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasını dengelemeye yardımcı olur. Aynı zamanda mitojenik etkileri sayesinde hücre büyümesi ve bölünmesini destekler ve bu yolla kan şekeri düzeylerinin normal sınırlar içinde kalmasını sağlar. İnsülin direnci, normal veya yüksek insülin seviyesinin zayıflamış bir biyolojik yanıt ürettiği durum olarak tanımlanır (Cefalu, 2001) klasik olarak bu, insülin aracılı glikoz atılımına karşı bozulmuş duyarlılığı ifade eder (Reaven, 2004). Kompanse edici hiperinsülinemi, kas ve yağ dokusunda periferik insülin direncinin varlığında, normal kan glikoz düzeylerini korumak için pankreas beta hücresi salgısının artmasıyla ortaya çıkar.

İnsülin direnci sendromu, insüline karşı direnç gelişmiş bireylerde yaygın olarak gözlemlenen çeşitli anormallikler ve bunlara eşlik eden fiziksel sonuçların bütünüdür. Farklı dokuların insüline olan duyarlılığı ve bağımlılığı arasındaki değişkenlik dikkate alındığında, bu sendromun belirtilerinin, yüksek insülin seviyelerinin karmaşık etkilerini ve bu etkilere karşı dokuların farklı tepkilerini yansıtmaları olasıdır (Reaven, 2004).

1.4.1. İnsülin Yapısı

İnsan insülin polipeptitlerinin amino asit dizileri Sanger ve arkadaşları tarafından 1950'lerin başında belirlenmiştir (Lawrence, 2021). Hormon, olgun formunda iki polipeptit zincirinden oluşur: 30 kalıntılı bir B zinciri ve 21 kalıntılı bir A zinciri, iki disülfür bağıyla (CysB7 ile CysA7 ve CysB19 ile CysA21) birbirine bağlanmıştır ve ayrıca A zincirinde (CysA6 ile CysA11) bulunan bir başka disülfür bağı vardır. İnsülinin olgun formu, B zincirinin C terminalinin A zincirinin N terminaline sözde "C peptidi" ile bağlandığı tek zincirli bir polipeptit olan "proinsülin" öncüsünden kaynaklanır (Lawrence, 2021). Olgunlaşma, C peptidinin enzimatik olarak uzaklaştırılmasını ve ayrıca yeni oluşan B ve C peptid C uçlarının karboksipeptidazlar tarafından kırılmasını içerir (Rouillé et al., 1995; Smeekens et al., 1991). İnsülin yapısı belirlenen altıncı proteindir. 2,8 Å çözünürlükte X-ışını kristalografisi ile belirlenen bu yapı, B zincirinin merkezi bir α heliksi (B9 ile B19 kalıntılarını kapsayan) ve A zincirinin iki α heliksi (sırasıyla A1 ile A8 ve A12 ile A20 kalıntılarını kapsayan) içerdiğini ortaya koymuştur (**Şekil 3A**). B20 ile B23 kalıntıları bir tip II β dönüşü oluşturur ve B24 ile B30 kalıntıları B zincirinin α heliksine anti-paralel uzanan uzatılmış bir iplik oluşturur. Kristalin içinde, 51 kalıntılı molekül, iki katlı (kristalografik olmayan) bir eksenle ilişkili dimerlere bir araya getirilir ve dimerler daha sonra üç katlı (kristalografik) bir eksenle ilişkili trimerlere

dönüşür (Şekil 3B). Monomerlerin dimerlere bir araya getirilmesi, büyük ölçüde, anti-paralel, iki zincirli bir β tabakası oluşturan ilgili B24-B30 zincirleri tarafından aracılık edilir (Şekil 3C). İki çinko iyonu, heksamerin üç katlı simetri ekseninde yer alır ve her iyon, HisB10 kalıntısının bireysel üçlüleri tarafından koordine edilir (Şekil 3B).



Şekil 3. İnsülinin üç boyutlu yapısı ve tahmini reseptör bağlanma yüzeyleri. (A) Zincir A (camgöbeği) ve B (macenta) ile birlikte iki zincir arası disülfür bağı ve bir zincir içi disülfür bağı gösteren insülin monomerinin yapısı. (B) İnsülin dimerinin ve üç dimerin insülin heksamerine montajı. İki çinko atomu (yeşil) heksamer ekseninde yer alır. Üç dimer çeşitli gösterimlerle gösterilmiştir (sırasıyla şerit, şerit artı şeffaf yüzey ve opak yüzey). (C) Seçili kalıntıların vurgulandığı insülin dimer arayüzünün ayrıntısı. (D) İnsülinin reseptör bağlanma kalıntılarının sözde "klasik" kümesi (çubuk gösterimi); bunlar insülinin dimer oluşturan yüzeyiyle (saydam beyaz) örtüşür. (E) İnsülinin reseptör bağlanma kalıntılarının tahmini ek kümesi (çubuk gösterimi); bunlar insülinin heksamer oluşturan yüzeyiyle (saydam beyaz) örtüşür (Rouillé et al., 1995; Smeekens et al., 1991).

1.4.2. İnsülin kanser ilişkisi

İnsülin direnci veya hiperinsülinemi, özellikle kolorektal, pankreas, menopoz sonrası meme ve endometriyal kanserler olmak üzere çeşitli kanser türlerinin riskini ve ilerlemesini artırır (Hursting & Berger, 2010). İnsülin, tümör güçlendirici etkilerini doğrudan preneoplastik ve neoplastik hücrelerdeki insülin reseptörü (IR) veya hibrit IR/IGF-1 reseptörleri (IGF-1R'ler) aracılığıyla veya dolaylı olarak IGF-1, östrojenler veya diğer hormonlar aracılığıyla uygular. Mekanik bir bakış açısından, insülinin (veya benzer etkiler uygulayan IGF-1'in) tümörler veya prekanseröz hücrelerdeki hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması, P13K/Akt yolunu aktive ederek, hücre büyümesinin ve mitogenezin merkezi düzenleyicisi olarak görev yapan memeli rapamisin hedefi (mTOR) kompleksinin aşağı akış aktivasyonuna yol açar (Pollak, 2008). Ek olarak, dolaşımdaki yüksek insülin düzeyleri, IGF-1'in hepatik sentezini yukarı düzenleyerek ve IGF bağlayıcı protein (BP) –1 üretimini aşağı düzenleyerek IGF-1'in biyolojik aktivitesini artırır (Pollak, 2008; Renehan et al., 2006). Hem insülin hem de IGF-1, *in vitro* kanser hücresi proliferasyonunu destekleyen ve apoptozu baskılayan mitojenlerdir. İnsülin düzeylerindeki artış, karaciğer sentezinde ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 1'in (IGFBP1) kan düzeylerinde bir azalmaya yol açar ve kanda IGFBP2'de bir azalma ile ilişkilidir. Bu etkiler,

biyoyararlanımlı IGF1'de bir artışa neden olur. İnsülin ve IGF1, hücre çoğalmasını teşvik etmek ve birçok doku tipinde apoptozu engellemek için sırasıyla insülin reseptörleri ve IGF1 reseptörleri aracılığıyla sinyal verir. Bu etkiler tümör oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. İnsülin direnci ayrıca seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) dolaşımdaki düzeylerinde bir azalmaya ve estradiol ve testosteronun biyoyararlanımında bir artışa neden olur. Buna paralel olarak, yağ dokusu aromataz ve 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimlerini üretir ve estradiol üretimini artırır. Buna göre, insülin direnci ile karakterize edilen obez bireylerde estradiol üretimi daha yüksektir. Artan biyoyararlanım ve estradiol ve testosteron oluşumunun birleşik etkisi, bu hormonların östrojen ve androjen reseptörlerine bağlandığı hedef hücreleri etkileyebilmektedir. Seks steroidinin reseptörlerle bağlanmasının etkisi, doku türüne bağlı olarak değişebilir, ancak bazı dokularda (örneğin meme epiteli ve endometriyum), bağlanma hücrel çoğalmayı teşvik eder ve apoptozu engeller. Ancak, diyabet ile meme ve prostat gibi tipik seks hormonu ile ilişkili kanserler arasındaki ilişkilerin büyüklüğü, diğer diyabet ile ilişkili kanserler için olanlardan (karaciğer (El-Serag et al., 2006), pankreas, (Huxley et al., 2005) ve endometrium (Friberg et al., 2007) için özet HR yaklaşık 2,0) daha az açıktır (meta = analiz ile özet HR = meme için 1,20 ve prostat için 0,84 (Friberg et al., 2007)). Bu nedenle, seks hormonu ile ilişkili kanserlerde insülin direncinin karsinogeneze giden yolu karmaşık görünmektedir. Endometriyal kanserinin hormon ile ilişkili olduğu bilinmesine rağmen, kombine östrojen-progestagen oral kontraseptiflerinin ve seçici bir östrojen reseptör modülatörü olan tamoksifenin etkileri, endometrium ve memede zıt yönlerde etki eder (Grosse et al., 2009) ve vücut yağlanmasıyla daha yakından ilişkilidir. Kolon kanseri için, diyabet ve vücut yağlanması arasındaki ilişki kadınlarda daha az açıktır, çünkü kadın seks hormonları kolon epitelindeki insülin direncinin etkisini değiştirebilir. Rastgele kontrollü bir çalışma, östrojen artı progestin kullanımının kadınlarda kolorektal kanser riskini azalttığını göstermektedir (Chlebowski et al., 2004). Hem tip 1 diyabet mellitus (T1DM) hem de tip 2 diyabet mellitus (T2DM) hiperglisemiye neden olur, ancak etyolojileri çarpıcı biçimde farklıdır. T1DM, insülin üreten pankreas beta hücrelerinin otoimmün aracılı yıkımı sonucu oluşur ve insülinopeni yoluyla hiperglisemiye neden olur. T1DM'deki endojen insülin üretiminin eksikliği, ekzojen insülinin deri altına uygulanmasıyla tedavi edilir. Genellikle, endojen hepatik glukoz üretimini baskılamak ve ekzojen karbonhidrat alımının metabolizmasına izin vermek için ekzojen insülinin suprafizyolojik dozları gerekir (Gregory et al., 2019). Sağlıklı bireylerin pankreası tarafından üretilen endojen insülin, hepatik glukoz metabolizmasını düzenlemek için doğrudan portal vene girebilir, ancak bu T1DM'li kişilerde yoktur. Bu nedenle, glukoz homeostazını endojen insülinin yaptığı kadar etkili bir şekilde

korumak için, genellikle ekzojen insülinin suprafizyolojik dozları gerekir. Öte yandan, T2DM, insülin direnci ve dolayısıyla bozulmuş glukoz klerensi nedeniyle oluşur. Doğal insülin direncini aşmak için pankreas insülin üretimini artırır ve bu da hiperinsülinemiye yol açar. Hem ekzojen insülinle tedavi edilen T1DM'de hem de T2DM'de ortaya çıkan dolaşımdaki insülin seviyeleri, sağlıklı kontrollerin pankreasının ürettiğinden önemli ölçüde daha yüksektir. Her iki diyabet türünde de eş zamanlı hiperinsülinemi, diyabetin kökeni ne olursa olsun (yani endojen veya ekzojen) kanser gelişimini teşvik edebileceği önerilen başlıca mekanizmalardan biri haline gelmiştir. Diyabetin kanser gelişimini teşvik edebileceğine dair önerilen başlıca mekanizmalardan biri, nedeni ne olursa olsun (endojen veya ekzojen) hiperinsülinemidir. İnsülin ve kanser arasındaki bağlantı bu incelemenin konusudur, ancak insülinin obezite, diyabet ve kanser arasındaki tek bağlantı olma olasılığının yüksek olduğu kabul edilmektedir. Özellikle eşlik eden obezite ile birlikte önerilen ek kanser teşvik edici faktörler hiperglisemi, hiperlipidemi ve ayrıca leptin, östrojen, resistin ve inflamatuvar sitokinlerin dolaşımdaki seviyelerinin artması ile birlikte IGF bağlayıcı proteinlerin ve adiponektin seviyelerinin azalmasıdır (Perry & Shulman, 2020) ve bunların tümör hücresi çoğalmasında, yayılmasında ve onkogen ekspresyonunda izin verici bir rol oynadığı önerilmektedir (Rahman et al., 2021).

1.4.3. İnsülin diyabet ilişkisi

Tip 2 diyabet, pankreas beta hücresi fonksiyonunun ilerleyici bozulması, kontrolsüz hepatik glikoz üretimi, artan insülin direnci, dislipidemi ve kardiyovasküler hastalık ile karakterize karmaşık bir metabolik bozukluktur (McGill et al., 2024). İnsülin direnci zamanla kötüleştikçe, vücut daha fazla insülin salgılayarak bunu telafi eder, böylece beta hücreleri üzerindeki stresi artırır ve sonunda uzun vadede beta hücresi yetmezliğine yol açar (Aronoff et al., 2004; Ferrannini, 1998). Birleşik Krallık Krallık Prospektif Diyabet Çalışması kohortunun analizi, beta hücresi fonksiyonunun %40-50'sinin T2D tanısı sırasında zaten kaybolduğunu ve yılda yaklaşık %5 oranında kademeli olarak azaldığını gösterir ("U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group," 1995). Bu nedenle, beta hücresi fonksiyonunu korumak için spesifik müdahalelerin yokluğunda, T2D'li bireyler sonunda tipik olarak bazal insülinle başlayıp, bazal artı prandial insülin içeren çoklu günlük insülin enjeksiyonları ile tedavinin yoğunlaştırılmasıyla devam eden ekzojen insülin tedavisine ihtiyaç duyacaktır (Hanefeld et al., 2020). İnsülin tedavisinin başlatılması bir "son çare" seçeneği olarak düşünülebilse de (Yoshioka, 2018) ve genellikle terapötik atalet nedeniyle hastalık ilerlemesinin geç dönemlerinde gerçekleşse de (Khunti et al., 2018), daha erken insülin başlatılmasının glikoz hedeflerine ulaşılması ve beta hücresi fonksiyonunun olası korunması dahil olmak üzere

avantajları olabilir (Owens, 2013). Bununla birlikte, insülin formülasyonları ve uygulama sistemlerindeki yenilikler devam etmektedir. Son otuz yılda, hızlı etkili insülin analogları, uzun etkili analoglar ve inhalasyon insülininin geliştirilmesiyle çeşitli insülin formülasyonlarının etkinliği ve güvenliğinde önemli ilerlemeler gördük; bunların hepsi daha az hipoglisemi ile normal fizyolojik insülin salgılanmasını daha yakından taklit eder (Mathieu, 2021). Daha da önemlisi, araştırmacılar ve ilaç şirketleri glikoza duyarlı insülin (GRI) formülasyonları geliştirmenin çeşitli aşamalarındadır; genellikle "akıllı insülinler" olarak adlandırılan bu formülasyonlar, mevcut glikoz seviyelerine yanıt olarak insülin aktivitesi sağlamak üzere tasarlanmıştır (Rege et al., 2017). Ayrıca insülin pompaları, otomatik insülin verme (AID) sistemleri ve bağlı insülin kalemleri gibi gelişmiş insülin verme teknolojilerinin gelişimini de görmüştür. Glisemik sonuçları iyileştirmenin yanı sıra, bu teknolojilerin sağladığı esneklik, tedavi memnuniyetini artırır, ilaç uyumuna önemli bir katkıda bulunur (Grunberger et al., 2021) ve insülin tedavisinin klinik ve psikolojik yükünün bir kısmını azaltır (Grunberger et al., 2021).

1.5. Metabolom Çalışmaları

Metabolomik araştırmaların başlangıcı, diyabetin teşhisinde metabolik kökenli olan idrar renklerinin, tatlarının veya kokularının test edildiği Antik Yunan'a kadar uzanmaktadır (Nicholson et al., 1999). Ancak, 1970'lerde Horning ve Horning (Horning & Horning, 1971) ve Pauling ve arkadaşları (Pauling et al., 1971) tarafından yapılan sistematik çalışmalar, tek bir metabolitin belirlenmesi yerine biyolojik sıvılardaki kapsamlı, duruma özgü metabolit setinin analizine odaklanan metabolomik araştırmalarda yeni bir çağ başlatmıştır. Metabolomik ve metabolomiklere yönelik modern yaklaşımlar son yirmi yılda geliştirilmiştir. Nicholson ve arkadaşları (Nicholson et al., 1999) metabolomik'i " canlı sistemlerin patofizyolojik uyaranlara veya genetik modifikasyona karşı dinamik çok parametrelili metabolik yanıtının nicel ölçümü " olarak tanımlamıştır. Metabolomik alanında, organizmaya özgü metabolomik veritabanlarının kurulması ve sürdürülmesinin hayati önem taşıdığı yaygın olarak kabul edilmektedir çünkü her organizma benzersiz ve kimyasal olarak farklı bir metaboloma sahiptir (Tian et al., 2024).

İnsan genom projesinin tamamlanması, biyobilimcilere, klinisyenlere ve epidemiyologlara kronik hastalıkların altında yatan genetik nedenleri belirlemek, hastalık riskini tahmin etmek, popülasyon/hasta tabakalaştırması yapmak ve terapi için yeni ilaç hedefleri belirlemek için yeni bir yol sağlamayı vaat ediyor (Collins et al., 2003). Bu bağlamda yapılan bir araştırmada Liu ve ark.'nın (Liu et al., 2015), oral glikoz tolerans testi sırasında çeşitli zaman noktalarında sağlıklı ve obez genç erkeklerin serumunda insülin direnciyle ilişkili metabolik imzayı inceleyen çalışmasıdır. 10.000'den fazla kadın üzerinde yapılan bir çalışmada Auro ve ark. (Auro et al., 2014), amino asitlerle ilişkili menopoz durumunun glutamin, tirozin ve izoleüsin,

serum kolesterolü ve aterojenik lipoproteinleri ve ayrıca glisin ve toplam, tekli doymamış ve omega-7 yağ asidi ve omega-9 yağ asidi olan bir kadın alt grubunda artırdığını bildirmiştir. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada, kanser için daha doğru noninvaziv testler geliştirmeye yönelik ilk adım olarak serum metabolomikleri kullanılmıştır ve elde edilen kanser imzalarında sınırlı bir fikir birliği olmasına rağmen, bunların bir kısmı daha sonra yaş, BMI, cinsiyet ve sigara içme geçmişi gibi kafa karıştırıcı faktörler dikkate alınarak düzeltilebilir. Ancak, Kumar ve ark. tarafından yapılan çalışma (Kumar et al., 2015), ¹H NMR ile değerlendirildiğinde sarkosin ve üç yeni metabolitin, prostat kanseri için bilinen güvenilir prostat spesifik antijen testini iyileştirmeye yardımcı olabileceği yönündeki önceki raporları doğrulamıştır. Ayrıca iki çalışma (Zamani et al., 2014; Zhu et al., 2014) safra asidi metabolizmasındaki değişiklikleri kolon kanserinin göstergesi olarak tanımlamış ve bir çalışma (Zhu et al., 2014) bu yolun maligniteleri premalignitelerden ayırt edebileceğini öne sürmüştür. Alanin ve glisinin yüksek seviyeleri artık hem prostat kanserinde hem de kolon kanserinde (Zhu et al., 2014) bildirilmiştir ve daha önce oral premalignitelerin tükürüğünde de yüksek alanin bildirilmiştir; bu da bu amino asidin neoplazi veya kanser için yararlı bir noninvaziv belirteç olabileceğini düşündürmektedir. Hayvan modelleri, ilgi duyulan genleri manipüle etme veya hastalığı kontrollü bir şekilde oluşturma ve metabolik etkileri tüm organizma düzeyinde araştırma olanağı sunar (James & Parkinson, 2015). LaConti ve ark. (Zhu et al., 2014) yakın zamanda, iyi bilinen bir fare modelinde prekanseröz lezyonlar, ileri pankreas kanseri ve normal pankreas arasında ayırım yapan ultra performanslı sıvı kromatografisi uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (UPLC TOF MS) ile tespit edilen 50 iyonun serum metabolik imzasını tanımlayan bir çalışma yayınladılar. Tanımlanan metabolitlerden biri olan sitratın, sıçanlarda pankreas kanseri üzerine yapılan başka bir serum çalışmasında da yükseldiği bildirildi ve mevcut çalışma, sitrattaki bu artışın sitrat sentaz ekspresyonunun artmasından kaynaklandığını göstermektedir (Zhu et al., 2014).

Bitkiler, bitki metabolizması on binlerce ila yüz binlerce küçük molekül arasında değişen şaşırtıcı organik kimyacılarıdır. Literatürde bitki aleminde var olduğu bildirilen toplam metabolit sayısının 1.060.000'den fazla olduğu ve tür başına ortalama 4,7 benzersiz metabolit bulunduğu tahmin edilmektedir (Hayashi et al., 2023). Yakın tarihli bir çalışma, amino asit glutamatın uzun mesafeli, kalsiyum bazlı bir bitki savunma sinyalinin aktivasyonundaki rolünü göstermiştir (Mousavi et al., 2013; Toyota et al., 2018). Yapılan bir diğer çalışmada bitki metabolomlarını ele almada hedefsiz metabolomların yararlılığını vurgulanmıştır. Çalışmada *Malvaceae* bitkisinin; *H. mutabilis*, *H. schizopetalus* ve *M. arboreus*'un kimyasal bileşimini, PCA ve OPLS-DA ile birleştirilmiş LC-HR-ESI-MS tekniklerini kullanarak araştırmayı ve karşılaştırmayı sağlamıştır. Bu bitki türlerinde tespit edilen metabolitlerin hem türlerinin hem

de dağılımlarının bilinmesi, kemotaksonomik ve kimlik doğrulama amaçları için yararlı olabileceği ve ayrıca gelecekteki fitokimyasal keşifler ve gıda ile ilgili uygulamalar için temelleri genişletebileceği düşünülmektedir (Abdelhafez et al., 2020). Bir diğer çalışmada bitki rekabetinin farklı seviyelerine yanıt olarak çavdar metabolizmasında meydana gelen değişiklikleri daha iyi anlamak için araştırma yapılmıştır. 4-hidroksibenzoik asit ve stres göstergesi olarak 2-(piridin-4-il)malonaldehit konsantrasyonunun rekabete yanıt olarak arttığını göstermiştir. Çavdarın farklı türler ve komşu baklagillerin yoğunluklarıyla rekabete yanıt olarak metabolizmasındaki değişikliklerin anlaşılması, çavdar-baklagil karışımı ekim için stratejilerin geliştirilmesinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (Hazrati et al., 2022).

Metabolomik analizin model organizma araştırmaları üzerindeki yaygın etkisi, yararlılığının resmi olarak onaylanmasını sağlamıştır. Metabolomik veri kümelerinin türler arası bu karşılaştırması, farklı sistemlerdeki metabolizmayı inceleyen araştırmacılar arasındaki etkileşimleri kolaylaştırmalı, yeni biyoenformatik araçların ve metabolomik stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlamalı ve metabolik ağların evrimine ilişkin anlayışımızı artırmalıdır. Benzer şekilde, yetişkin *Drosophila*'daki bireysel dokuların metabolit bileşimini belirlemek için bir ZIC-HILIC LC-Orbitrap MS platformu (Chintapalli et al., 2013) kullanılarak ilk çaba gösterilmiştir (Cox et al., 2017). *Drosophila*'da yaşlanmanın genetik çalışmaları için güçlü bir yeni analitik araç sağlamıştır. Örneğin, metabolomik çalışmalar diyet kısıtlamasının uzun ömürlülüğü artırıcı etkilerinin metabolik yollardaki belirli kaymalarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Laye et al., 2015). Ek olarak, metabolomik, *Drosophila*'da yaşlanma sırasında metionin metabolizmasının değiştiğini ortaya koymuş ve S-adenozil-homosisteinin bu süreçte önemli bir rol oynadığının tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Parkhitko et al., 2016). Bu nitelikteki keşifler, yalnızca tek bir deneyde yüzlerce ila binlerce metaboliti tespit etme ve niceleme yeteneği ile mümkün hale gelmiştir. Bu nedenlerden dolayı, metabolomik, model organizma metabolik çalışmalarında temel bir araç olarak belirlenmiştir. Bir diğer model organizma Zebra balığında yapılan çalışmada Zebra balığı bağırsağında Mikroplastikler (MP)'lere maruz kaldıktan sonra bağırsak iltihabı ve oksidatif stresle ilişkili önemli histolojik değişiklikler ve enzimatik biyobelirteç değişiklikleri gözlenmiştir (Qiao et al., 2019).

C. elegans, metabolizmayı, gelişimi, üreme olgunlaşmasını ve uzun ömürlülüğü düzenleyen korunan mekanizmaların incelenmesi için benzersiz bir platform olarak geliştirilmiştir ve bu, en iyi ihtimalle kısmen anlaşılmış olan derinlemesine iç içe geçmiş bir düzenleyici ağ ortaya koymuştur (Fielenbach & Antebi, 2008). Bir çalışmada *C. elegans* metabolit ve protein bolluğunun yaşa bağlı değişikliklerini araştırmıştır (Liang et al., 2014). Bu araştırma sonucunda

yaşa bağı olarak serbest yağ asidi seviyelerinde artış, birçok purin ve pirimidin metabolitinin seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir (Copes et al., 2015).

C. elegans ve diğer model organizmalarda var olduğu bilinen çok sayıda henüz tamamen karakterize edilmemiş metabolit göz önüne alındığında, bu keşfedilmemiş kimyasal çeşitliliğin organizmaların biyolojisi için herhangi bir öneme sahip olup olmadığı tartışma konusudur. Canlı bir organizma veya organizma topluluğu tarafından üretilen herhangi bir molekülün, yalnızca molekülün biyosentetik geçmişi sayesinde, üreticinin durumu hakkında belirli bilgiler taşıdığı belirtilmelidir (Meinwald, 2011).

1.6. *Caenorhabditis elegans* ve Metabolome

Toprakta yaşayan nematod *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), biyolojide önemli bir model organizma haline gelmiştir. Hızlı üreme döngüsü, yarı saydam bir gövde, bilinen hücre soyu ve çok hücreli bir organizmanın ilki olan dizilenmiş bir genom dahil olmak üzere çeşitli deneysel avantajlar sunmaktadır. Dahası, hermafrodit yapısı kısa sürede çok sayıda izogenik hayvan yetiştirmeye olanak tanır. *C. elegans*'ın yumurtadan fertil yetişkinlere kadar olan tam gelişim döngüsü 20°C'de yaklaşık 3 gün sürer. Solucan, L1 ila L4 olarak adlandırılan dört larva evresinden geçer. Aşırı kalabalık veya yiyecek kıtlığı gibi elverişsiz koşullar altında alternatif, beslenmeyen ve uzun ömürlü bir gelişim evresine, dauer evresine girebilir. Koşullar düzeldikten sonra dauer larvaları normalde yetişkin yaşam süresinde herhangi bir taviz vermeden L4 larvalarından yetişkinlere doğru gelişir.

C. elegans, farklı araştırma alanlarında (örneğin toksikoloji, gelişim biyolojisi, nörobiyoloji, konak-patojen etkileşimleri, yaşlanma araştırmaları ve diğerleri) model organizma olarak kullanılır. Geçtiğimiz yıllarda solucan ayırma, transkriptomik için mikro diziler, görüntüleme teknolojileri, transgenikler veya dokuya özgü gen inaktivasyonu içeren çok sayıda araç geliştirilmiştir (Qadota et al., 2007).

Nematod genlerinin yaklaşık %60-80'i insan genlerinin homologlarıdır (Kaletta & Hengartner, 2006). Bu nedenle *C. elegans* üzerindeki araştırmalar insan sağlığı ve hastalıkları çalışmaları açısından yüksek öneme sahip olabilir. *C. elegans*'ta farklı ileri ve geri genetik araçlar mevcuttur. RNA interferansı (RNAi), *C. elegans*'ta sistematik gen inhibisyonu için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri haline gelmiştir (Fire et al., 1998; Gönczy et al., 2000; Mello & Conte Jr, 2004). RNAi, hedef gen için spesifik bir diziye sahip çift sarmallı RNA (dsRNA) sunarak gen aktivitesini inhibe eder. Bu, homolog haberci RNA'nın (mRNA) bozulmasına yol açar (Fraser et al., 2000; Kaletta & Hengartner, 2006; Timmons & Fire, 1998). Ayrıca, düzenli aralıklarla serpiştirilmiş kısa palindromik tekrarların kümelenmesi (CRISPR)–Cas9, genom mühendisliği için *C. elegans*'ta uygulanmıştır ve bu başka bir yerde incelenmiştir (Arribere et

al., 2014; Au et al., 2019; Dickinson & Goldstein, 2016; Dickinson et al., 2015; Joshi et al., 2020; Kim & Colaiácovo, 2019; Paix et al., 2015; Ward, 2015). *C. elegans* metabolomu ve lipidomu geniş bir polarite aralığını kapsar, bu nedenle gerçek kapsamlı profillemeye elde etmek için birden fazla analitik yöntemin birleştirilmesi gerekir. Özellikle, oldukça polar bölge (negatif logP değerleri) daha fazla geliştirme gerektirir. *C. elegans* farklılaşmış dokulara sahip çok hücreli bir organizmayı temsil ettiğinden, spesifik metabolitlerin yeri önemli bir faktördür. İlk olarak dokuya özgü metabolik modeller geliştirilmiştir (Yılmaz et al., 2020). *C. elegans*'ın şeffaf gövdesi, proteinlerin lokalizasyonu için birçok farklı mikroskopi yönteminin kullanılmasını sağlamıştır, örneğin GFP füzyonları kullanılarak. Dokuya özgü metabolomikler, örneğin MS görüntüleme kullanılarak, uzamsal olarak yeniden çözülmüş metabolomikler için geliştirilecektir. Benzer şekilde, tek hücreli metabolomikler genellikle ilgi kazanmaktadır ve potansiyel olarak izole edilmiş *C. elegans* hücrelerine uygulanabilir (Salzer & Witting, 2021).

1.7. Metabolomik Çalışmalarda Veri İşleme ve Yazılım Araçları

Metabolomik, biyolojik materyallerin küçük molekül bileşimini ölçmek için kullanılan yöntem ve teknikleri kapsar ve aslında en hızlı gelişen araştırma alanlarından biridir. Metabolomik profilin -metabolom- belirlenmesi, tıpta yeni tanı araçlarının geliştirilmesi de dahil olmak üzere birçok biyolojik bilimde çok sayıda uygulamaya sahiptir. Nükleer manyetik rezonans ve kütle spektrometrisindeki son teknolojik gelişmeler, her biyolojik örnekten daha fazla veri elde etme kapasitesini önemli ölçüde iyileştirmektedir. Sonuç olarak, metabolomik çalışmalarda üretilen verilerin karmaşıklığı ve hacmiyle başa çıkabilen hızlı ve doğru istatistiksel ve biyoenformatik araçlara ihtiyaç vardır (Alonso et al., 2015). Veri işlemenin ana hedefi, ham veri dosyalarını her bir iyonun karakteristik bilgilerine hızlı ve kolay erişim sağlayacak biçimlere dönüştürmektir. Bu karakteristik bilgiler; iyonun m/z oranı, tutulma süresi ve ilgili veri dosyasından elde edilen iyon yoğunluğu ölçümünü kapsar. Temel parametrelerin yanı sıra, veri işleme süreci iyonlara ait izotopik dağılım gibi ilave bilgileri de ortaya çıkarabilir. Tipik veri işleme hattı genellikle filtreleme, özellik tespiti, hizalama ve normalizasyon dahil olmak üzere birden fazla aşamadan geçer. Filtreleme yöntemleri, ölçüm gürültüsü veya temel çizgi gibi etkileri ortadan kaldırmak amacıyla ham ölçüm sinyalinin işler. Özellik tespiti, ham sinyalden ölçülen iyonların temsillerini tespit etmek için kullanılmaktadır. Hizalama yöntemleri ölçümleri farklı örnekler arasında kümeler ve normalizasyon, örnekler arasındaki istenmeyen sistematik varyasyonu ortadan kaldırmaktadır (Katajamaa & Orešič, 2007).

Ham verilerini işlemek ve depolamak için çeşitli tescilli veri biçimleri geliştirilmiştir; bu heterojenlik araştırmacıların bu verileri işlemesini zorlaştırır. Bu nedenle, ham veri dosya türlerinin (örneğin. RAW) evrensel bir biçime (örneğin .CSV, .TXT, .mzXML veya .MGF)

dönüştürülmesi için ProteoWizard, MassMatrix ve MATLAB ve R dahil olmak üzere birkaç başka yazılım kullanılmaktadır (Cambiaghi et al., 2016). Ham veriler uygun bir biçime dönüştürüldükten sonra daha fazla analiz edilebilmektedir. Giriş verileri genellikle örneklerin satırlar ve sinyal özelliklerinin sütunlar olduğu veri matrisleri olarak düzenlenir. MetaCore TM, MetaboAnalyst ve IncroMAP farklı türde tablo biçimindeki verileri kabul eder (örneğin metinsel sekmeye ayrılmış TXT veya virgülle ayrılmış değerli CSV dosyaları), oysa 3Omics yalnızca CSV dosyalarını kabul eder. MetaboAnalyst ayrıca, mzXML, mzDATA veya NetCDF biçiminde olması gereken NMR veya MS tepe listelerinin veya MS spektrumlarının sıkıştırılmış dosyalarını da kabul eder. MetaCore TM'de olduğu gibi, gen listeleri Affymetrix veya Agilent gibi mikrodizi analiz yazılımlarının çıktı dosyalarından da içe aktarılabilir. Bileşik adları veya kimlikleri, sayısal bir niteliğin değerleriyle birlikte (örneğin katlama değişiklikleri, P değerleri, gen ifadesi değişiklikleri, protein seviyeleri, metabolit konsantrasyonları) dahil edilmeli ve veri türü kullanıcı tarafından belirtilmelidir (Eichner et al., 2014; Xia & Wishart, 2011). Metabolomik ve proteomik uygulamalarda LC-MS verilerinin işlenmesi için ise platformdan bağımsız bir yazılım olan MZmine'in (<http://mzmine.sourceforge.net/index.shtml>) yakın zamanda geliştirilmesi, önemli bir adım sağlamaktadır (Katajamaa et al., 2006). Yazılım, yeni algoritmaları ve uygulamaları entegre etme yeteneğine sahip modüler bir altyapı kullanmaktadır. Yazılımın diğer önemli özelliği, GC-MS ve CE-MS gibi diğer kütle spektral veri türlerine genişletilebilir olmasıdır. Metabolomik veriler, çok çeşitli istatistiksel ve makine öğrenimi algoritmalarıyla analiz edilmiştir. Bunlar iki ana sınıfa ayrılabilir: gözetimsiz ve gözetimli algoritmalar (Pedro, 2002; Shulaev, 2006). Metabolomik verilerin analizinde rutin olarak kullanılan gözetimsiz yöntemlere örnek olarak hiyerarşik kümeleme (Eisen et al., 1998), temel bileşen analizi (PCA) (Alter et al., 2000; Eisen et al., 1998) ve kendi kendini organize eden haritalar (Tamayo et al., 1999) verilmektedir. Gözetimli yöntemler arasında ANOVA (Churchill, 2004), kısmi en küçük kareler (PLS) (Musumarra et al., 2003) ve ayırıcı fonksiyon analizi (DFA) (Raamsdonk et al., 2001) bulunur. Gözetimsiz yöntemler genellikle karmaşık metabolomik verileri özetlemek için uygulanır. DeneySEL ve/veya biyolojik değişkenlerle ilişkili veri örüntülerini tespit etmek için etkili bir yol sağlarlar. Metabolomik araştırmalarda en yaygın şekilde başvurulanan gözetimsiz analiz yöntemlerinden biri temel bileşen analizidir (PCA) (Bro & Smilde, 2014; Wold et al., 1987). PCA, metabolik özelliklerin doğrusal olarak ilişkili olmayan (yani ortogonal) temel bileşenler olarak bilinen bir dizi değişkene doğrusal dönüşümüne dayanır. Bu ayrıştırma yöntemi, ilk bileşen tarafından açıklanan varyansı en üst düzeye çıkarırken, sonraki bileşenler giderek azalan miktarda varyansı açıklar. Aynı zamanda, PCA bu bileşenler arasındaki kovaryansı en aza

indirir (yani, birbirlerinden bağımsızdırlar). PCA yöntemi uygulandıktan sonra, bir dizi yükleme vektörü ve puan vektörü elde edilir. Yükleme vektörleri temel bileşenleri temsil eder ve her vektör katsayısı, her değişkenin temel bileşene olan bireysel katkısına karşılık gelir. Puan vektörleri, her bir örneğin yeni ortogonal baza yansıtılmasını temsil eder. Bu örnek puanlarını ilk temel bileşenler üzerine çizmek, küresel veri setini özetlemenin kullanışlı bir yoludur, çünkü normalde bu ilk temel bileşenler veri setindeki değişkenliğin çoğunu yakalar. PCA ayrıca, örnek aykırı değerlerini belirleyebildiği veya çalışmadaki gizli önyargıları ortaya çıkarabildiği için, veri kalitesini değerlendirmek amacıyla metabolomik çalışmalarda da kullanılmaktadır (Gika et al., 2008; Rasmussen et al., 2011; Winnike et al., 2009).

Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) ve kendi kendini organize eden haritalar (SOM) gibi diğer gözetimsiz yöntemler de metabolomik verilere uygulanmıştır. Bu yöntemler, PCA tarafından kolayca kapsanmayan verilerdeki doğrusal olmayan eğilimleri tespit etmek için özellikle uygun olabilmektedir. SOM'lar, metabolik fenotipleri ve özellik modellerini görselleştirmek ve ayrıca benzerliklerine göre ilgi çekici metabolitleri önceliklendirmek için metabolomik çalışmalarda kullanılmıştır (Kohonen et al., 2000). HCA ayrıca, önceden tanımlanmış bir mesafe ölçüsüne göre özellik ve örnek düzeylerinde bir kümeleme prosedürü sağlayan güçlü bir kümeleme ve görselleştirme aracıdır (Brauer et al., 2006).

Gözetimli yöntemler, diğer varyans kaynaklarını azaltırken, ilgi duyulan fenotipik değişkenle ilişkili metabolik kalıpları tanımlamak için kullanılır. Bu yöntemler ayrıca, metabolomik özelliklere dayalı sınıflandırıcılar oluşturma da temelini oluşturur (Xia et al., 2013). Kısmi en küçük kareler (PLS) (Fonville et al., 2010) metabolomikte en yaygın kullanılan gözetimli yöntemlerden biridir. Regresyon analizi (yani, ilgi duyulan niceliksel değişken) veya ikili sınıflandırıcı (PLS-DA; yani, ilgi duyulan ikili değişken) olarak kullanılabilir. PCA'dan farklı olarak, PLS bileşenleri açıklanan veri kümesi varyansını değil, ilgi duyulan değişken ile metabolomik veriler arasındaki kovaryansı en üst düzeye çıkarır. Bu nedenle, PLS bileşenlerinin özellik katsayıları (yüklemeler), bir özelliğin farklı örnek gruplarının ayrımına ne kadar katkıda bulunduğunun bir ölçüsünü temsil eder. Ancak, PLS'nin bir zayıflığı, ilgi duyulan değişkenle ilişkili olmayan bazı metabolik özelliklerin sonuçları etkileyebilmesidir. Bu sorunla başa çıkmak için ortogonal PLS (O-PLS) (Trygg & Wold, 2002) geliştirilmiştir. O-PLS modelleri, PLS modellerinden evrilmiştir ve veri varyansını iki bileşene ayırır: İlgi duyulan değişkenle ilişkili birinci bileşen ve ilişkisiz ikinci bileşen (yani ortogonal). Metabolomik örneklerin sınıflandırılması genellikle PLS ve O-PLS modellerinin ayırıcı analiz versiyonlarına uydurularak gerçekleştirilir (PLS-DA, O-PLS-DA) (Kemsley, 1996). PLS ve O-PLS modellerinin performansı kapsamlı bir şekilde karşılaştırılmıştır ancak bugüne kadar iki

yöntemden hangisinin üstün olduğu konusunda bir fikir birliği yoktur. Ancak son yıllarda metabolomik alanda PLS modellerinin kullanımından O-PLS modellerine doğru kademeli bir geçiş gözlemlenmiştir (Fonville et al., 2010). Destek vektör makineleri (SVM'ler), metabolomik verilere dayalı sınıflandırıcılar oluşturmak için kullanılan bir başka gözetimli analiz yöntemi sınıfıdır (Mahadevan et al., 2008). SVM'ye dayalı sınıflandırıcıların yorumlanması daha zor olsa da, metabolomik veriler ile ilgi değişkeni arasındaki doğrusal olmayan ilişkilerin varlığını yönetebilirler (Alonso et al., 2015).

1.8. Metabolomik Çalışmalarda Karşılaşılan Zorluklar ve Çözümler

Metabolom karmaşıklığı metabolomik çalışmalarda büyük bir zorluk teşkil eder. Organizma metabolomu, lipidler, organik asitler, karbonhidratlar, amino asitler, nükleotidler ve steroidler gibi kimyasal olarak çeşitli bileşikler içerir. Bildirilen metabolitlerin büyük sayısı, bazı ölçütlere göre, çok çeşitli atomların, işlevsel grupların ve kimyasal yapısal kısımların dahil edilmesinden kaynaklanan 52 farklı bileşik sınıfını temsil eder. Karşılaştırıldığında, genlerin ve proteinlerin yapı taşları nispeten azdır. Genler yalnızca dört temel nükleotidin kombinasyonlarından oluşur ve proteinler 20 amino asidin kombinasyonlarından oluşur ve yine de bunların sırası ve mekansal düzenlemesi, keşfedilmeyi bekleyen daha fazlası ile çok sayıda tanımlanmış gen ve protein üretir. Kimyasal yapılarda bulunan muazzam değişkenlik, polarite, çözünürlük ve uçuculuk gibi belirgin şekilde farklı fizikokimyasal özelliklere sahip analitlerin bir araya gelmesiyle sonuçlanır. Dahası, insan vücudundaki metabolitleri değerlendirmek zor olabilir çünkü bunlar geniş ve dinamik bir konsantrasyon aralığında (pikomolardan milimolara) bulunur. Üçüncü engel, her metabolitin her dokuda veya biyosıvıda bulunmaması ve farklı örnek tiplerinde aynı konsantrasyonda bulunmalarının kesinlikle beklenmemesidir. Son olarak, organizmal metabolomun, bireyler arasında tekdüze olmayabilecek gıdalardan, ilaçlardan ve çevresel maruziyetten kaynaklanan ekzojen metabolitler veya ksenobiyotikler içermesi beklenebilir. Bu nedenle, kapsamlı metabolomikler gerçekleştirmek zordur. Hiçbir tek metabolomik yöntemi tüm metabolomu doğru bir şekilde ölçmemektedir (Al-Sulaiti et al., 2023; Johnson & Gonzalez, 2012).

1.9. Hata Kaynakları

Omik verilerinin analizi ve entegrasyonu için birçok farklı alandaki araştırmacılar için paha biçilmez bir yardım teşkil eden birçok araç mevcuttur; buna rağmen, yeni deneysel verilerden ve mevcut bilgiden etkili bir şekilde yararlanmak için, özellikle heterojen veri entegrasyonu ve bunların kapsamlı analizi konusunda hâlâ karşı karşıya kalınan açık zorluklar vardır (Sampson et al., 2013).

Örneklerin toplanması ve hazırlanmasından, analitik işlemler ve cihazlardan kaynaklanan değişkenliklere kadar birçok unsur metabolomik analizlerde varyasyon kaynağı oluşturur. Ölçüm belirsizlikleri ve veri işleme aşamasında yapılan işlemler de sonuçlar üzerinde küçük ya da büyük ölçekte etkili olabilir. Metabolomik çalışmalar genellikle uzun zaman dilimlerine yayılır ve bazı durumlarda yıllar sürebilir. Çok merkezli araştırmalarda farklı cihazlar kullanılması bu varyasyonları artırabilir. Tek bir merkezde yürütülen çalışmalarda dahi zamanla kimyasal reaktiflerde, laboratuvar ekipmanlarında ya da sarf malzemelerinde değişiklikler görülebilir. Analitik cihazların duyarlılığı ve performansı yalnızca uygulanan yöntemle değil, aynı zamanda cihazın dijital ve mekanik altyapısıyla da ilişkilidir ve bu durum da zaman içinde farklılık gösterebilir. Tüm bu değişkenlikler, çeşitli analitik ve istatistiksel yöntemler kullanılarak en aza indirilmeye çalışılmaktadır (Kaplan, 2024).



2. AMAÇ

Memelilerde, retinoblastoma tümör baskılayıcı (pRB), büyük ölçüde E2F adı verilen bir transkripsiyon faktörünün aktivitesini düzenleyerek, hücresel çoğalma ve farklılaşmayı kontrol etmede önemli bir rol oynar. Hermafrodit nematod *Caenorhabditis elegans* hem akıcı bir yol hem de canlı organizmada analiz fırsatı sağlar. Genomu tek bir pRB benzeri protein (LIN-35), tek bir DP benzeri protein (DPL-1) ve üç E2F benzeri protein kodlar.

İnsülin, çevresel sinyalleri vücuda iletmekten ve metabolizma, büyüme, gelişme, uzun ömür ve davranış dahil olmak üzere temel biyolojik süreçleri düzenlemekten sorumlu bir peptit hormonudur.

Son yıllarda omik teknolojiler ile biyoinformatik araçların gelişimi, insan hastalıklarının moleküler ve hücresel düzeydeki etkilerinin anlaşılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Metabolomik çalışmaları, özellikle ilaç geliştirme süreçleri ve kişiselleştirilmiş tıp alanlarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, kanser araştırmalarında bu teknolojilerin kullanımı diğer biyomedikal alanlara kıyasla henüz sınırlı kalmaktadır.

Bu tez çalışmasında N2 yabanıl ve lin-35 mutant *Caenorhabditis elegans* solucanlarına metabolomik değişiminin incelenmesi metabolit profili üzerinde meydana getirdiği değişikliğin LC-Q-TOF-MS/MS sistemi analizleri ile *in vitro* düzeyde değerlendirmeleri hedeflenmiştir. Bu amaçla;

- *C. elegans* solucanları kültür devamlılığı, -80°C’de dondurulma- muhafazası ve -80°C’den çıkartılıp çözdürülerek kültür devamlılığı
- Senkronizasyon işlemlerinin yapılması
- İnsülin ilacı uygulanarak N2 ve lin-35 solucanlara metabolit analizlerinin yapılması
- Gruplar arasında metabolit profilinde gerçekleşen değişimin LC-Q-TOF-MS/MS cihazı kullanılarak C18 kolon ile çalışmanın gerçekleştirilmesi
- LC-Q-TOF-MS/MS cihazında elde edilen “.mzdata” uzantılı verilerin mZmine 2.53 ile filtrelenmesi
- Elde edilen metabolitlerin Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) veri tabanında yaygın isimlerine göre adlandırılması
- Hedef metabolitlerin MetaboAnalyst 6.0 veri tabanından tespit edilmesi tespit edilen metabolitlerin PCA, Heatmaps, Volcano, VIP grafiklerine dönüştürülmesi
- Elde edilen metabolitlerin yolak analizi yapılarak rol aldığı yolların saptanması

3. MATERYAL-METOD

3.1. *C.elegans* Suşlarının Seçilmesi ve Temin Edilmesi

Bu çalışmada kullanılarak *C. elegans*'ın yabanıl tipi (N2 Bristol) ile mutant suşu (lin-35) AWR54 (kea7[*Lin-35 p::degron::GFP::Lin-35*]) I; ieSi57 [eft-3p::TIR1::mRuby::unc-54 3'UTR + Cbr-unc-119(+)] II, Minnesota Üniversitesi'nde yer alan ve Ulusal Sağlık Enstitüleri Araştırma Altyapı Programları Ofisi (P40 OD010440) tarafından desteklenen Caenorhabditis Genetics Center (CGC) aracılığıyla temin edilmiştir.

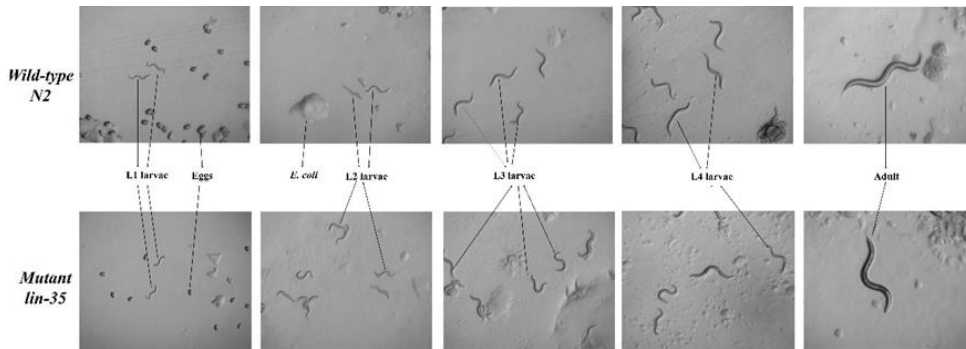
Tablo 1. *C. elegans* suşları

Suş Adı	Gen Adı	Gen adı (Memeli Ortologu)	Hedef Doku	Rol oynadığı hücresel süreçler	Referanslar
N2 Wild Type					(S. Brenner, 1974)
lin-35	C32F10.2	Retinablastoma p107, p130	İntestinal sistem, Çoklu (multiple) tipler,	Tümör Supresor	(Grishok & Sharp, 2005)

3.2. *C.elegans* Kültür Koşulları

3.2.1. *C. elegans* kültürü için gerekli olan stok çözeltiler ve kültürün hazırlanması için kullanılan kimyasallar

Temin edilen suşlar standart NGM agar kültür koşullarında kültüre edilir (S Berk et al., 2024; S. Brenner, 1974). Laboratuvarında, nematodlar *Escherichia coli* bakterisi içeren NGM agar petri kapları (ISOLAB, #08102061) üzerinde büyütülür (**Şekil 4**) (Berk, 2024; Theresa Stiernagle, 2006). Deneyler, sıvı S-medium kültür ortamında gerçekleştirilir. *E.coli*, 37 °C'de LB Broth besiyerinde inkübe edilir (Avery, 1993).



Şekil 4. N2 ve lin-35 mutant *C. elegans* suşlarının morfolojik yaşam döngüsü görüntüleri. Yumurtadan erişkin evreye kadar (L1–L4 larval evreleri dâhil) gelişim evreleri boyunca, 20 °C'de NGM agar ortamında yetiştirilen bireylerin stereomikroskop ile 40X büyütmede elde edilen görüntüleri sunulmuştur (Berk, 2024).

Nematod büyüme ortamı (Nematod Growth Medium-NGM), S-medium, S-bazal, LB agar, LB broth, eser metaller çözeltisi, dondurma solüsyonu, M9 tamponu çözeltilerinin kimyasal adları, markaları, moleküler ağırlıkları, kimyasal formülleri ve katalog numaraları **Tablo 2**'de gösterilmiştir.

Tablo 2. *C. elegans* kültürü için gerekli olan stok çözeltileri kullanılan kimyasalları

	Kimyasal Adı	Kimyasal Formül	Marka	Katalog Numarası	Moleküler Ağırlığı (g/mol)
1	Agar		Sigma Aldrich	9002-18-0	-----
2	Citric Acid Monohydrate	C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	Sigma Aldrich	5949-29-1	210,14
3	Copper (II) Sulfate Pentahydrate	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Sigma Aldrich	7758-99-8	249,68
4	D (+)-Glucose Monohydrate	C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	ISOLAB	14431-43-7	198,17
5	Di-Potassium Hydrogen Phosphate	K ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich	7758-11-4	174,2
6	Di-Sodium Hydrogen Phosphate Dihydrate	HNa ₂ O ₄ P·2H ₂ O	ISOLAB	10028-24-7	177,99
7	Disodium EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	Sigma Aldrich		372,24
8	Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	Sigma Aldrich	56-81-5	92,09
9	Iron(II) Sulfate Heptahydrate	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma Aldrich	7782-63-0	278,01
10	Kalsiyum Klorür Dihidrat	CaCl ₂ ·2H ₂ O	TEKKİM	10035-04-8	147,02
11	Lauryl Sulfate Broth		MERCK	2660500	
12	Magnesium Sulfate Heptahydrate	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma Aldrich	10034-99-8	246,48
13	Manganese(II) Chloride Tetrahydrate	MnCl ₂ ·4H ₂ O	Sigma Aldrich	13446-34-9	197,90
14	Potassium Dihydrogen Phosphate	KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich	7778-77-0	136,08
15	Potassium Phosphate Monobasic	KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich	7778-77-0	136,08
16	Potasyum Hidroksit	KOH	EMBOY	-	56,11
17	Sodium Chloride	NaCl	Sigma Aldrich	7647-14-5	58,5
18	Sodium Hydroxide Pellets	NaOH	Carlo Erba	1310-73-2	39,9971
19	Tri-Potasyum Sitrat	C ₆ H ₅ K ₃ O ₇ ·H ₂ O	TEKKİM	6100-05-6	324,42
20	Zinc Sulfate Heptahydrate	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma Aldrich	7446-20-0	287,54
21	Dimethyl Sulfoxide	C ₂ H ₆ OS	Sigma Aldrich	67-68-5	78,13

3.2.2. Kültür için kullanılan stok çözeltiler

- **1 M potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) tampon hazırlanması:** 136,086 g KH₂PO₄ tartılır, 1L dH₂O'da 1L'lik steril cam şişede çözündürülür ve otoklavlanır. 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır.
- **1 M dipotasyum fosfat (K₂HPO₄) tampon hazırlanması:** 174,2 g K₂HPO₄ tartılır, 1 L dH₂O ile 1L'lik steril cam şişede çözündürülür ve otoklavlanır 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır.
- **5 M sodyum hidroksit (NaOH) tampon hazırlanması:** 100 g NaOH tartılır, 500 mL dH₂O'da 500 mL'lik steril cam şişede çözündürülür ve otoklavlanır 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır.
- **5 N potasyum hidroksit (KOH) tampon hazırlanması:** 140,25 g KOH tartılır, 500 mL dH₂O'da 500 mL'lik steril cam şişede çözündürülür ve otoklavlanır 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır.
- **0,01 M sodyum klorür (NaCl) tampon hazırlanması:** 584 mg NaCl tartılır 100 mL dH₂O'da 100mL'lik steril cam şişede çözündürülür ve otoklavlanarak 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır.
- **1 M kalsiyum klorür dihidrat (CaCl₂(2H₂O)) tampon hazırlanması:** 147,01 g tartılır 1L dH₂O'da 1L'lik steril cam şişede çözündürülür ve otoklavlanır 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır.

- **Kolesterol hazırlanması:** 500 mg Kolestrol tartılır, 100 mL %99'luk ethanolde 100 mL'lik cam şişede çözündürülür -20 °C'de saklanır.
- **M9 4X tampon hazırlanması:** KH_2PO_4 (12g), Na_2HPO_4 (24g), NaCl (20g), 4 mL (1M) MgSO_4 1 L dH_2O ile 1 L'lik cam şişede çözündürülür ve otoklavlanır.
- **S bazal tampon hazırlanması:** NaCl (5,85g), K_2HPO_4 (1g), KH_2PO_4 (6g), 1 L dH_2O 'da 1 L'lik steril cam şişede çözündürülür. Kolestrol (5g/mL ethanolde) (1 mL) eklenir ve otoklavlanır.
- **1M potasyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7$) tampon hazırlanması:** Sitrik asit monohidrat (CH_2OOH) 20g, Tripotasyum sitrat ($\text{HOC}(\text{COOK})(\text{CH}_2\text{COOK})_2$) 293,5 g tartılır MgSO_4 1 L dH_2O 'da 1 L'lik cam şişede çözündürülür ve otoklavlanır.
- **1 M magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) tampon hazırlanması:** 246,48 g tartılır, 1 L dH_2O 'da 1 L'lik cam şişede çözündürülür ve otoklavlanır.
- **Eser metaller tampon hazırlanması:** Disodyum EDTA (1,86 g), Demir sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0,69 g), Mangan klorür tetrahidrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (0,2 g), Çinko sülfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0,29 g), Bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (0,025 g) tartılır, 1L dH_2O 'da çözündürülür 1L'lik cam şişede çözündürülür ve otoklavlanır.

C. elegans deneyleri için kültür ortamları, tampon içerikleri **Tablo 3**'te verilmiştir.

Tablo 3. *C. elegans* deneyleri için kültür ortamı-çözelti ve tampon içerikleri

Katı Kültür Ortamı (NGM AGAR)- 1L	NaCl- 3g	Sıvı kültür ortamı (S MEDIUM)	Potasyum Sitrat-1M 10mL	Citric acid monohydrate- 20g
	Agar- 17g			Tri-potasyum citrate monohydrate-293,5g
	Pepton- 2,5g		CaCl ₂ (2H ₂ O)-1M-3 mL	
	CaCl ₂ (2H ₂ O)- 1mL (1M) Otoklav sonrası eklenir.		MgSO ₄ (7H ₂ O)-1M-3 mL	
	MgSO ₄ (7H ₂ O)- 1mL (1M) Otoklav sonrası eklenir.		S Bazal- 1L	NaCl-5,85
	Potasyum fosfat tamponu (K ₂ HP ₄ &KH ₂ PO ₄)-25mL (1M)- Otoklav sonrası eklenir.			K ₂ HPO ₄ -1g
				KH ₂ PO ₄ -6g
				Kolesterol-1mL (5mg/ml Ethanol)
	Kolesterol 1mL (5mg/ml Ethanol) Otoklav sonrası eklenir.		Eser metaller çözeltisi-1L olarak hazırlanır1L S Medium 10mL kullanılır	Disodyum EDTA-1,86g
				FeSO ₄ 7H ₂ O-0.69g
		MnCl ₂ 4H ₂ O-0,2g		
		ZnSO ₄ 7H ₂ O-0,29		
			CuSO ₄ 5H ₂ O-0,025g	
	Gliserol (%30)		M9 (4X) Buffer (1L)	KH ₂ PO ₄ -3g

Dondurma Solüsyonu				Na ₂ HPO ₄ -6g
				NaCl-5g
				MgSO ₄ (7H ₂ O) -1M- 1mL

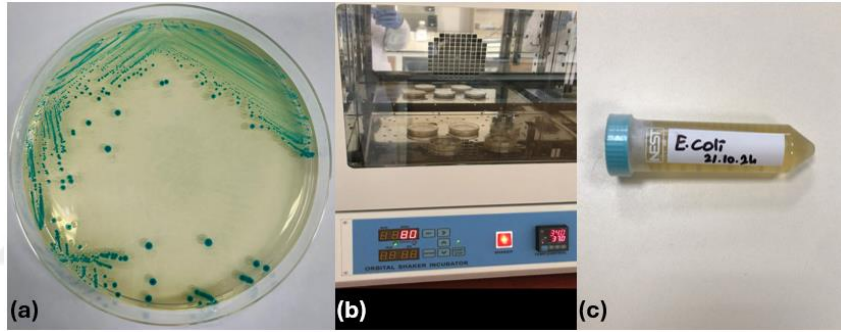
3.3. *E. coli* OP50 Besin Kaynağının Hazırlanması

E. coli OP50 suşu, *C. elegans* için bir besin kaynağı olarak kullanılır ve monoksenik olarak yetiştirilir. *E. coli* OP50, büyümesi NGM ile sınırlı olan bir urasil oksotrofudur. Sınırlı bir bakteri kültürü tercih edilir çünkü solucanların daha kolay gözlenmesini ve daha iyi çoğalmasını sağlar (S. Brenner, 1974).

- Başlangıç kültürü, Luria-Bertani (LB) agarı **Tablo 4** [10 g Bakto-tripton, 5 g Bakto-maya, 5 g NaCl, 15 g agar, pH 7,5] 1L H₂O içinde çözündürülerek hazırlanır.
- Elde edilen kültüre ortamı 121°C sıcaklıkta 90 dk otoklavlanır. Otoklav sonrası kültüre ortamı sıcaklığı 55°C' e kadar düşürülerek 60 x 15mm boyutundaki petrilere dökülür. LB agar kültür ortamı petrinin tabanını kaplaması gerekmektedir aynı zamanda petri kabı yüksekliğinin yaklaşık yarısı olması gerekmektedir. Burada 55°C sıcaklık altında düşen LB agar kültür ortamı katılaşacağı için petri tabanına homojenize dökülememektedir. Burada amaç agar dökülme sıcaklığı ve petri kabı boyutlarına verilen talimatlara göre yapılması önem taşır.
- Kültür ortamı petri kapları 1 ila 2 gün +4°C' de dinlendirilir. +4°C' den çıkartılan LB agar petri kapları laboratuvarımızda bulunan *E. coli* OP50 bakteri besin kaynakları bek alev yanında demir öze yardımı ile tek koloni oluşturacak şekilde ekim yapılır (**Şekil 5a**).
- Ekim işlemini takiben petri kaplarının yüzeyi, kontaminasyonu önlemek amacıyla parafilm ile tamamen kapatılır. 37 °C' de 2 gece inkübasyon gerçekleştirerek *E. coli* bakterilerinin çoğaldığı inkübasyon sonrası doğrulanmıştır (**Şekil 5b**).
- İnkübasyon sonrası petri kaplarından bir tanesi alınarak bek alev yanında demir öze yardımı ile LB Broth sıvı besiyeri ortamına ekim yapılır. Diğer Petri kapları, -4°C'de kontaminasyondan korunarak altı ay süreyle saklanır.
- Petrilerden tek bir koloniyi demir öze yardımıyla LB Broth (**Tablo 4**) [10 g Bakto-tripton, 5 g Bakto-maya, 5 g NaCl, 15g Agar, pH 7] 1 litre H₂O içinde çözündürülerek hazırlanır. Hazırlanan LB Broth sıvı kültür ortamına LB Agar içerisinde inkübasyonu tamamlanan *E. coli* bakteri kolonisi içerisinden demir öze ile LB Broth sıvı kültür ortamına aktarım gerçekleştirilir. Burada LB agar ortamından alınan *E.coli* bakterileri LB Broth sıvı kültüre ortamının cam yüzeyine vurularak sıvı içerisine aktarımı değerlendirilir. Az sayıda koloni bırakmak inkübasyon süresini uzatacağı gibi *E.coli*

bakterinin çoğalmasını da engelleyebilmektedir. Bu sebeplerden dolayı katı ortamdan alınan

- *E. coli* bakteri kolonilerini toplamak büyük önem taşımaktadır. LB Broth sıvı kültür ortamı 37°C’ de 2 gece inkübe edilir.
- 2 gece sonundan inkübasyondan alınan bakteri kültür ortamı gözlemlenir. Tortu oluşumu ve renk değişimi gözlenmesi halinde 121°C’ de otoklav gerçekleştirilir.
- Tortu oluşumu ve renk değişimi gözlenmeyen kültür ortamı için inkübasyon süresinin uzatılmasında fayda vardır. Otoklavdan alınan bakteri ortamı 50 mL’lik falkon tüplere alınır ve kapakları parafilm ile kapatılır (Şekil 5c). Eşit hacimde steril ortama alınan *E. coli* besin kaynağı +4°C’de 1 yıl muhafaza edilebilir. Besiyeri kaynakları 3 ay aralıklarla kontrol edilmelidir. -80°C’ de muhafaza edilen *E. coli* bakterileri her 6-9 ayda bir yukarıda anlatılan adımlara tabii tutularak bakteri kültürünün oluşabilecek olumsuz durumlardan kaçınılması sağlanmalıdır (S Berk et al., 2024; Byerly et al., 1976).



Şekil 5. *E. coli* OP50 suşunun besin kaynağı olarak hazırlanması. A. *E. coli* OP50 LB agar tek koloni ekiminin petri görüntüsü B. LB agar petrileri inkübasyon görüntüsü. C. *E.coli* OP50 *C. elegans* besin kaynağı olarak kullanımına hazır görüntüsü.

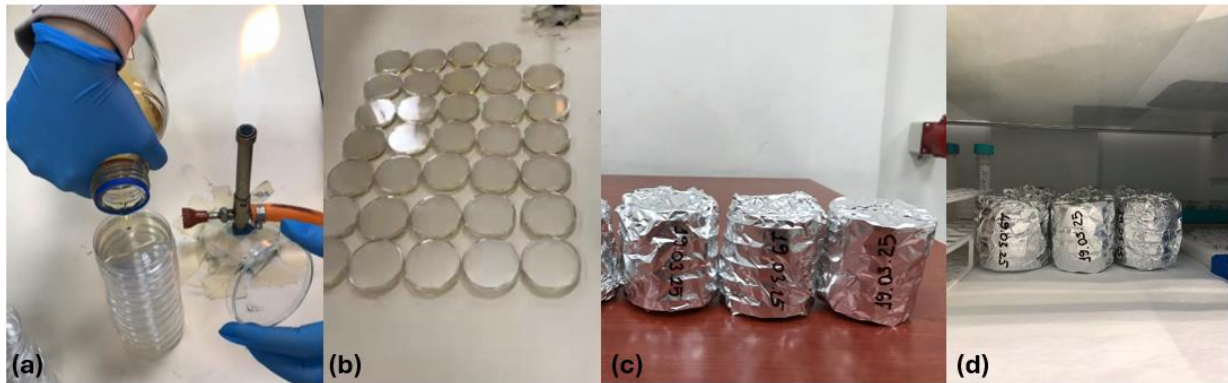
Tablo 4. LB agar ve LB broth içeriği

LB Agar içeriği						
Kullanılan Malzeme	Bakto-Trypton	Bakto-Maya	Agar	NaCl	dH ₂ O	pH:7.5
Miktar	10 g	5 g	15 g	5 g	1L	
LB Broth içeriği						
Kullanılan Malzeme	Bakto-Trypton	Bakto-Maya	Agar	NaCl	dH ₂ O	pH:7.0
Miktar	10 g	5 g	15 g	5 g	1L	

3.4. Kültür Ortamları

3.4.1. Katı kültür ortamı hazırlık ve pasajlama

- NaCl (3 g), peptone (2,5 g), agar (15 g) ayrı ayrı hassas terazide tartımları yapılarak 1L ddH₂O içerisinde çözündürülür. 125°C’de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 55 °C’ye kadar soğutulur. Soğuması gerçekleşen katı kültür büyüme ortamına 0,2 µm gözenekli filtrelerden süzülen 1mL 1M CaCl₂, 1mL kolesterol (5mg/ml ethanolde), 1 mL 1M MgSO₄ ve 25 mL 1 M KPO₄ (pH:6) besiyerine eklenerek homojenizasyonu sağlanır (Tablo 5).
- Çalışmalar için 1 L hazırlanmış olan NGM agar solüsyonu 60 x15 mm’lik petri kabı tabanını kaplaması gerekmektedir, aynı zamanda petri yüksekliğinin yarısı yüksekliğinde olması gerekmektedir. Belirtilen şekilde bek alevi yanında steril ortamda 60 x 15 mm boyutundaki kaplara homojenize NGM agar kültür ortamı dökümü gerçekleştirilir (Şekil 6a).
- Dökümü tamamlanan petri kapları oda sıcaklığında 1 gece katı hale gelmesi beklenir (Şekil 6b). Katı kıvama gelen büyüme ortamı alüminyum folyo ile paketlenerek +4°C’ de muhafaza edilir (Şekil 6c) (S Berk et al., 2024).
- NGM besiyeri ortamında nematodların beslenmesi ve yaşamını sürdürmesi için petrilere içerisine 40 µL *E. coli* OP50 solüsyonu steril koşullarda eklenir. Petrilere dökülen NGM agar solüsyonu steril ortamda +4 °C’ de 2-3 hafta boyunca muhafaza edilebilir (Şekil 6d).
- +4°C’den çıkartılan petrilere model organizmaların beslenmesi ve yaşamını devam ettirebilmesi için 20°C’de etüv içerisinde muhafaza edilir.



Şekil 6. NGM agar kültür ortamı hazırlık ve muhafaza aşamaları. **A.** Steril koşullarda NGM agar ortamı 60 × 15 mm petri kaplarına dökülerek homojen dağılım sağlanmıştır. **B.** Oda sıcaklığında bir gece bekletilerek ortamın katılaşması sağlanmıştır. **C.** Katı hâle gelen besi ortamları alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C’de saklanmıştır. **D.** +4 °C’de 2–3 hafta süreyle muhafaza edilen petri kapları, deney öncesi etüvde 20 °C’ye getirilmiştir.

Tablo 5. NGM agar içeriği

Otoklav öncesi	Otoklav sonrası
----------------	-----------------

Kullanılan Malzeme	NaCl	Agar	Pepton	Kolesterol (5mg/ml ethanolde)	1M KPO ₄ Tamponu	1M MgSO ₄
Miktar	3 g	17 g	2,5 g	1 mL	1 mL	1 mL

3.4.1.1. NGM petri kaplarındaki *C.elegans*'ların pasajlanması ve beslenmesi

C. elegans'ın üreme sistemi yaşa bağlı değişikliklere uğrar. Üreme hızı yaşla birlikte önemli ölçüde azalır ve üreme sisteminin yapısı bozulur (Garigan et al., 2002). Genç, üreme çağındaki solucanlar yeni petri kaplarına aktarılır. *C. elegans*'ın bir petriden diğerine aktarılması için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Hızlı ve kullanışlı bir yöntem, ‘pasajlama’ olup bu işlem “changing” olarak da adlandırılmaktadır. Bireyler L4 aşamasına geldikleri zaman (yaklaşık olarak 4 gün sürmektedir) yaşamını devam ettirdiği petri kaplarından yeni petri kaplarına alınması gerekmektedir (Theresa Stiernagle, 2006).

- Pasajlama öncesinde kullanılacak neşter tek kullanımlık değil ise bek alevden geçirilip daha sonra %70’ lik alkol ile strelize edilmedir. Sterilize olan neşter temiz bir peçete yardımı ile kurutularak tekrar sadece alevde birkaç saniye bekletilmelidir. Neşter sıcaklığının normal sıcaklığa düşmesi beklenmelidir. Sıcaklığı normal dereceye inen neşter pasajlama için hazır duruma gelmiştir.
- Pasajlama sırasında eski agar parçasının ~1x1 cm² boyutlarında kesim yapılır ve alevde sterilize edilmiş neşter yardımıyla yeni petri kabı yüzeyine ters çevrilerek bırakılır.
- Pasajlama sonrası yeni *C. elegans* petri kaplarına 50 µL *E. coli* OP50 besini verilir (Şekil 7). Eklenen *E. coli* besini pasajın etrafında farklı dört noktaya bırakılarak bireylerin besine hareket etmesi teşvik edilir.
- Böylece bireyler yaklaşık 8 saat içerisinde yeni petri kabı yüzeyinde dağılım gösterir. Bireyler gün aşırı beslenme işlemleri tekrarlanmalıdır. Aksi halde bireyler yetersiz besin sebebiyle dauer aşamasına geçiş yapabilmektedir (Riddle et al., 1997) ve yine sık sık besin verilmesi de bireylerde aynı sürecin başlamasına sebep olmaktadır (Bargmann, 1998).
- Yeni petri kabı içerisinde 4 gün sonunda L4 aşamasına gelen bireyler yukarıda belirtilen adımlar tekrar edilerek yeni petri kaplarına aktarılır ve işlemler aynı şekilde devam ettirilir (Seyda Berk et al., 2024).



Şekil 7. *C. elegans* bireylerinin pasajlanması ve beslenmesi. Pasaj yapıldıktan sonra solucanlar *E. coli* OP50 besin kaynağı yeni petri kabı üzerinde dört ayrı noktaya bırakılarak solucanların petri kabı içerisinde beslenmesi sağlanır.

3.4.2. Sıvı kültür ortamı hazırlık ve pasajlama

C.elegans kültür ortamı katı ve sıvı olmak üzere ikiye ayrılır. Katı kültür ortamı NGM agar olarak adlandırılır. Sıvı kültür ortamı ise S-Bazal ve S-Medium olmak üzere ikiye ayrılır.

Sıvı kültür ortamlarının (S-Bazal ve S-Medium) içeriği **Tablo 3'** de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

- S-Bazal kültür ortamı [5,85g NaCl, 1g K₂HPO₄, 6g KH₂PO₄] cam şişe içerisine alınır 1L ddH₂O eklenerek otoklav yapılır. Otoklav sonrası sıcaklık 55°C'de 1mL kolesterol tampon çözelti eklenerek S-Bazal kültür ortamı elde edilir.
- 121°C' de 90 dakika otoklav yapılır. Otoklavdan çıkartılan S- Bazal sıvı kültür ortamı 0,2 µm gözenekli filtrelerden süzülerek 50 mL'lik falkon tüplere bölünür.
- Falkon tüplerinin kapakları parafilmlele sıkıca kaplanır ve +4°C' de muhafaza edilir. S- Medium kültür ortamı ise 1L S-Bazal kültür ortamına [10mL 1M Potasyum Sitrat, 3 mL 1M CaCl₂(2H₂O) ve 3 mL 1M MgSO₄(7H₂O)] eklenmesi ile elde edilir.
- Elde edilen S- Medium sıvı kültür ortamı 0,2 µm gözenekli filtrelerden süzülerek 50 mL'lik falkon tüplere bölünür. Falkon tüplerinin kapakları parafilmlele sıkıca kaplanır ve +4°C' de muhafaza edilir.
- S-Medium sıvı kültür ortamı tekrar otoklav yapılmasına gerek yoktur ama S-Bazal kültür ortamı üzerine eklenen kimyasalların steril olması ve ekleme sırasında kullanılan pipet uçlarının sterilizasyonu bireylerin yaşamını devam ettireceği kültür ortamları için büyük önem taşımaktadır. Bu işlemlerin tamamı bek alev yanında gerçekleştirilmeli ve kullanılacak malzemeler kullanım öncesi bek alev ile muamele edilmelidir.
- NGM agar ortamında hayatını devam ettiren canlılar katı kültür ortamı senkronizasyonun tamamlandıktan sonra 60x15mm boyutundaki 1X 4mL M9 tamponuna alınır.

- 1 gece inkübasyon sonrası petri yüzeyi içeriğinde bulunan M9 tamponu ile yıkama yapılarak 15mL’lik falkonlar tüplere aktarılır ve 1200 rpm’ de 2 dk santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası üst faz tamamen uzaklaştırılır ve pelet elde edilir. Pelet üzerine 5mL S-Bazal eklenerek pipetaj yapılır. Pipetaj sonrası solucanlar 60 x 15 mm boyutundaki petri kabına aktarılır 50 µL *E. coli* besiyeri eklenir.

Solucanlar sıvı kültür ortamında gün aşırı 50 µL *E. coli* ile beslenir. Yaşam süreçleri katı kültür ortamında olduğu gibi 20°C’ de etüv içerisinde gerçekleşir.

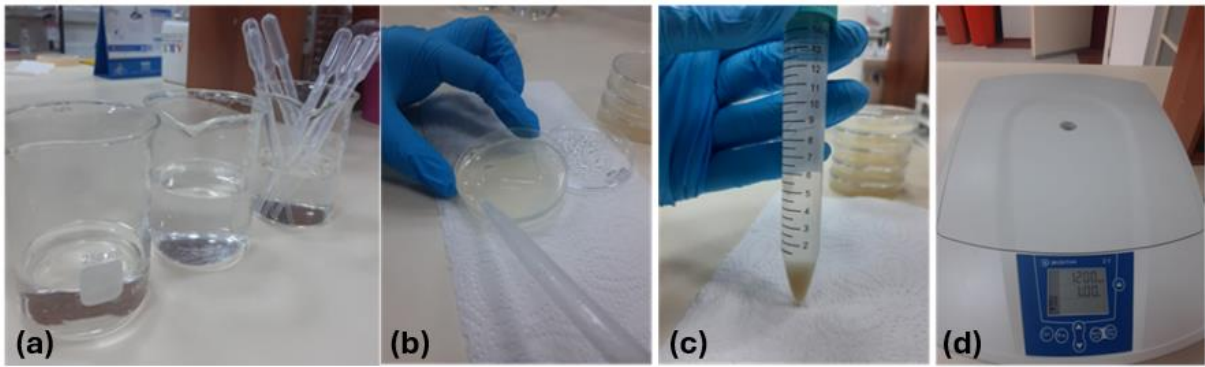
- L4 formuna gelen solucanlar bek alev yanında steril 1mL’lik pipet yardımı ile falkon tüpe aktarılır. Petri kabının yüzeyi aktarım gerçekleştikten sonra sıvı kültür ortamının içeriğine uygun şekilde tekrar yıkama yapılır. Yıkama sonrası kalan solucanlarda toplanmış olur ve 15mL’lik falkon tüp içerisine alınır.
- Falkon tüp 1200 rpm’ de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üst faz atılır pelet elde edilir. Pelet üzerine 4 mL S-Bazal sıvı kültür ortamı eklenir pipetaj yapılarak canlıların homojenize dağılımı sağlanır.
- 4mL S- Bazal 4 ayrı steril petri kabına 1’er mL dağıtılır ve petri kaplarının üzerine 3 mL S-Bazal tamponu eklenir.
- Her bir petri kabına 50µL *E. coli* eklenerek solucanlar gün aşırı beslenir. Sıvı kültür ortamında pasajlama yapılacağı zaman bu adımlar tekrar edilir (Berk, 2024).

3.5. *C. elegans* Senkronize Kültürünün Elde Edilmesi

Deneyler başlandığında nematodlar gelişimsel olarak aynı safhada olmaları için senkronizasyon işlemi yapılmaktadır. Bu işlem sırasında ergin nematodlar öldürülerek ortamda yumurtalar korunmaktadır (T. Stiernagle, 2006). L4 aşamasına gelen solucanlar en az 4 petri kabı olması gerekmektedir. Petri kabı sayısının az olması senkronizasyon sonrası yetersiz yumurta eldesine neden olabilir bu da deney sırasında olumsuzluklara sebep olmaktadır.

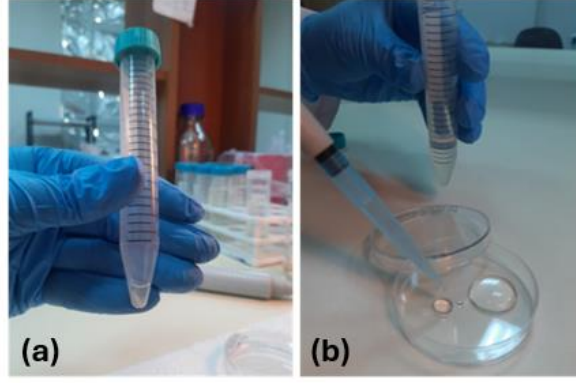
- Senkronizasyon öncesi hazırlık aşamasında 3 adet steril beher steril bench üzerine alınır, bek alev yakılır ve kullanılacak pastör pipetlerin sterilizasyonu için 3 beherden ikisine beherin hacminin yarısı kadar ddH₂O eklenir son beher kabına ise yine beherin yarına denk gelecek şekilde %70’lik ethanol eklenir (**Şekil 8a**).
- Pastör pipetleri ilk olarak %70’lik ethanol beher içerisinde 5-6 kez pipetajlama yapılarak iç yüzeyinin tamamı ethanolle muamele edilir. Bu işlemin ardından su dolu ilk behere alınır ve burada da 5- 6 kez pipetajlama yapılarak ethanolden arındırılır. Kullanımı gerçekleştirilecek tüm pastör pipetleri bu işlemlere tabi tutulur, son olarak yarısı su dolu beher kabı içerisine bırakılır.

- Burada senkronizasyon için yaklaşık 1-1,5 mL beher içerisindeki ddH₂O sudan alınarak senkronizasyonu yapılacak bir petri kabına aktarılır. Yıkama sırasında uygulanan basınç, agar yüzeyinin bozulmasına neden olmayacak ancak bireyleri yüzeyden ayırabilecek düzeyde olmalıdır. Bu aşamada agar kaldırılmamaya özen gösterilmelidir. Aksi takdirde senkronizasyon sonrası agar da yüzeyde bulunur ve yumurtadan birey çıkışı engellenmiş olur. Yüzeyi çok yumuşak yıkamakta bireyleri agar yüzeyinden kaldıramayacağı için yeterli yumurta eldesinin önündeki en büyük dezavantajlardan birini oluşturur. Hafif tazyikle yüzeyin tamamını yıkama birey eldesi için optimum koşulların sağlamaktadır.
- En az 4 ayrı petri kabının yüzeyleri ayrı ayrı bu işlemlere tabii olur. Yıkama sonrası elde edilen su petri kabı 45 derecelik açıda tutularak (**Şekil 8b**) pastör pipeti ile alınır ve 15mL'lik falkon tüplere eklenir.
- Bu işlemler sonucunda 4 petri kabından yaklaşık 6 mL birey içeren ddH₂O eldesi sağlayacaktır.
- Aynı petri kapları beherden alınan temiz sularla ayrı ayrı tekrar yıkanarak yaklaşık 12 mL ddH₂O eldesi sağlar (**Şekil 8c**).
- Mikroskop altında petri kapları ayrı ayrı kontrol edilerek birey kalan bölgelerin tekrar ddH₂O ile yıkanması ve kontrol edilmesinde fayda bulunmaktadır. İlk yıkama ve ikinci kontrol yıkaması sonrası 15mL'lik falkon tüpe alınan yaklaşık 12mL birey içerikli ddH₂O 1200 rpm de 2 dk santrifüjü gerçekleştirilir (**Şekil 8d**).



Şekil 8. *C. elegans* bireylerinin senkronizasyon aşamaları. **A.** Pastör pipetlerin sterilizasyonu için hazırlanan beher kaplarında %70 etanol ve ddH₂O kullanılması. **B.** Petri kabındaki bireyler, 45° açıyla tutulan yüzeyden yıkanarak pipetle toplanması. **C.** Petri kapları ikinci kez temiz ddH₂O ile yıkanarak daha yüksek verimde birey eldesi sağlanması. **D.** Falkon tüplere alınan bireyler 1200 rpm'de 2 dakika santrifüjü.

- Santrifüj sonrası falkon tüp sarsılmadan üst faz 1 mL kalana kadar steril pastör pipet yardımı ile alınır ve atılır. Pelet üzerine 14 mL ddH₂O eklenerek sert bir şekilde çalkalama yapılır. İlgili çalkalama işlemi ortalama 2 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir
- İlk santrifüj sonrası besiyerinde bulunan agar ve *E. coli* besiyerinden solucanların uzaklaştırılması hedeflenmektedir. Çalkalama işlemi tamamlandığı zaman falkon tüp tekrar 1200 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir.
- İkinci santrifüj aşamasında da hedef aynıdır. Santrifüjden çıkartılan falkon tüp sarsılmadan üst fazı 1mL kalıncaya kadar steril pastör pipet yardımıyla uzaklaştırılır.
- 1 mL kalan peletin üzerine 500 mL NaOH, 1000 mL %5’lik çamaşır suyu eklenerek 6 dk boyunca çalkalanır. Bu aşama literatürde “agartma” olarak da geçmektedir. İşlem süresince falkon tüp olabildiğince sert bir şekilde çalkalanır. Burada amaç bireylerin içerisindeki yumurtaları canlıları parçalayarak dökmelerini sağlamak ve ortamda bulunabilecek yumurta harici bakteri kaynakları öldürmektir. Çamaşır suyu ve NaOH ortamında uzun süre bekleyen yumurtalar parçalanarak yok olmaktadır, yine aynı ortamda az bekleyen yumurtalar ise bireylerin yumurtalarını bırakması tamamlanamadığı için sonraki yıkama adımlarında uzaklaştıramayarak yumurta eldesinin önüne geçmektedir.
- 6 dakika laboratuvarımızda en uygun süre olarak gözlemlenmiş ve başarılı senkronizasyon eldesinin altın basamağı olmuştur.
- 6 dakika sonunda falkon hacmi 15 mL’e tamamlanıncaya kadar ddH₂O eklenir ve 1200 rpm’de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası falkon sarsılmadan üst fazın tamamı alınarak ortamdan uzaklaştırılır.
- Falkon hacmi 15 mL’ tekrar ddH₂O eklenerek tamamlanır ve 1200 rpm’ de 2 dk son santrifüj adımı gerçekleştirilir. Bu adımın nihai hedefi ortamda bulunabilecek kimyasallardan uzaklaştırmaktır. Santrifüjden çıkartılan 15 mL’lik falkon tüpünden pelet kalacak şekilde tüm sıvı hacmi uzaklaştırılır (Şekil 9a).
- Yumurta eldesi gerçekleştirilmiştir. Pelet üzerine 4 mL 1x M9 tamponu eklenir ve 20°C’ de 1 gece inkübe edilir. Eğer bireyler uzun süre muhafaza edilmek istenirse bu aşamada 20°C yerine +4°C’ de 3-4 ay muhafaza edilebilmektedir. Elde edilen M9 tampon çözeltisi eklenen falkon içerisindeki yumurtalar 60 x 15mm boyutundaki petri kabı içerisine pipetajlama yapılarak alınır (Şekil 9b).
- Bu aşamadan itibaren tüm solucanlar gelişimlerini aynı evreden başlatacaklardır.



Şekil 9. Senkronizasyon işlemi sonrası yumurta eldesi ve petriye aktarımı. **A.** Yumurtaların pelet görüntüsü. **B.** Yumurtaların M9 tamponu içeren petrilere aktarımı.

Kültür, diseksiyon mikroskobu altında kontrol edilerek gözlemlendi. 20°C'de, L1 larvalarını elde etmek yaklaşık 8 saat, L2 larvalarını elde etmek 18 saat, L3 larvalarını elde etmek 25 saat ve L4 larvalarını üretmek 37 saat sürer (Demirel et al., 2024). Tüm deneylerde senkronize iyi beslenmiş genç yetişkinler kullanıldı. Yumurtadan çıkış sürelerinde 1-2 saatlik farklılıklar olması mümkündür ama en nihayetinde tamamı yumurta aşamasındadır. İnkübasyon sonrası 24 saati tamamlanan yumurtalar L1 aşamasına gelir.

- Petri kabındaki L1 bireyleri steril bir pipet yardımıyla petri yıkama aşamasında olduğu gibi 45 derecelik açı ile tutularak 15 mL'lik falkon tüpe aktarılır. Petri yüzeyinde birey kalmamasına özen gösterilmelidir.
- Falkon tüp 1200 rpm'de 2 dk santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası M9 tampon çözeltisi steril pipet yardımı ile uzaklaştırılır ve bireylerin üzerine S-Bazal sıvı kültür ortamı eklenir.
- S-Bazal sıvı kültür ortamı eklenen L1 bireyleri pipetajlama yapılarak steril 60 x 15 mm boyutundaki petri kaplarına alınır.
- 50µL *E. coli* eklenerek 20°C etüv içerisinde inkübe edilir.
- Bireyler L4 aşamasına geldiklerinde deney için hazır evreye ulaşmış demektir. Burada S-Bazal ve S-Medium sıvı büyüme ortamları bireylerin yaşam standartları açısından farklılıklar içermektedir. Deney içeriğine göre sıvı kültür ortamı belirlenmesinde fayda vardır (Seyda Berk et al., 2024).

3.6. *C.elegans* Suşlarının Dondurulması ve Geri Kazanılması

C. elegans türünün avantajlarından birisi uzun süreli saklama için dondurulabilmesidir (Brenner, 1974) ve daha sonra tekrar çözündürülerek deneylerde kullanılabilmesidir. Solucanlar senkronizasyon yapıldıktan 4 gün sonra L4 formuna erişmektedir. Bakım ve kültürü kolay olmasına rağmen olumsuz olabilecek durumlar, sıcaklık değişimleri, yetersiz beslenme, aşırı

canlı yoğunluğu veya kontaminasyon, canlı hayatını riske etmektedir. Bu durumlar göz önünde bulundurularak canlılar dondurularak muhafaza edilmelidir.

- L4 formuna gelen solucanlara bölüm 3.4' de belirtilen işlemlere uygun olarak senkronizasyon yapılır.
- Senkronizasyon sonrası S-Bazal ortamına alınan solucanlara *E. coli* besiyeri kaynağı verilmez ve 7 gün aç bırakarak dauer sürecine girmesi beklenir.
- Dauer süreci başlayan solucanlar 15mL'lik falkon tüplere aktarılır. 1 dk 1200 rpm'de santrifüj gerçekleştirilir.
- Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılır ve falkon tüp içerisine 1200 µL %30'luk gliserol eklenir. Yine aynı falkon tüp içerisine 2800 µL S-Bazal sıvı kültür ortamı eklenerek pipetaj yapılır.
- Pipetaj sonrası 1 mL'lik steril kriyoviyal tüplere gliserol /S-bazal çözeltisi dağıtılır.
- Kriyoviyal Tüpler -80°C'de muhafaza edilir. İşlem sonrası tüplerden bir tanesi ertesi gün çıkartılarak NGM agar içerisine alınır.
- 12-18 saat beklenir ve canlılık durumu mikroskop altında değerlendirilmiştir.
- Başarısız olan dondurma işlemleri için aynı adımlar tekrar uygulanmalıdır.
- Başarılı dondurma işlemleri için suş güvenliği tehlike altında ise veya deneyler bir süre yapılmayacak olup suş devamlılığı gerekmiyorsa istenildiği zaman
- -80°C'den kriyoviyal tüp çıkartılarak çözülür (Berk, 2024).

3.7. İnsülin Hazırlanması ve Uygulanması

NovoRapid® marka 100U/mL insülin ticari olarak temin edilmiştir. 1 ml'si 100 U (3.5 mg) insülin aspart içerir. Bir flakon 1000 U'ye eşdeğer 10 ml içermektedir. 1 ünite insülin aspart 6 nmol, 0.035 mg tuzsuz anhidr insülin aspart'a eşdeğerdir. 6×10^{-4} M ana stok olmaktadır.

- Her bir mikrosantrifüj tüplerine 10 µL 6×10^{-4} M insülin ana stok dağıtılır ve -20°C'de muhafaza edilir.
- Deneyler için 6 kuyucuklu petri kaplarının her bir kuyucuğuna 2 mL S medium eklenir. S medium eklenmesi sonucunda değişen konsantrasyonun korunması için ilaç final konsantrasyonu 100x derişik hazırlanmaktadır.
- -20°C'de muhafaza edilen 6×10^{-4} M insülin ana stoğu önce 1×10^{-6} M ara stok haline gelecek şekilde seyreltilir. Bu seyreltme işlemi ddH₂O ile gerçekleştirilir.
- İlaç konsantrasyonlarına 10nM'a denk gelecek şekilde ikinci seyreltmesi yapılmak üzere ddH₂O eklemesi yapılır.
- Deney çalışmaları için solucanların yaşamını devam ettireceği S-Medium kültür hacmi 2 mL olduğu için ilaç konsantrasyonu derişik hazırlanır.

- 1 mL S-Medium her bir kuyucuğa ayrı ayrı eklenir. Her bir kuyucuğa 10.000 birey alınır ve solucanların besiyeri kaynağı olan 10µL *E. coli* eklenir.
- 100x derişik hazırlanmış olan insülin kuyucuklara teker teker 10µL eklenir. Böylece her kuyucuk içerisindeki konsantrasyon 10nM'a denk gelir. Seyreltme işlemi su ile yapıldığı için kontrol grubuna herhangi bir çözücü ya da kimyasal eklenememektedir.
- Son olarak tüm kuyucuklara solucanların kültür ortamında üremeleri engellenmesi adına 10 µL 0.04 M FudR eklenir. Her deney grubu iki tekrarlı çalışılır ve deneyler 3 tekrardan oluşur.

0.04 M Fudr hazırlanması: 100 mg Fudr tartılır, 10 mL dH₂O'da steril 15 mL'lik falkonda çözdürölür ve 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüplerinde -20 °C' de saklanır.

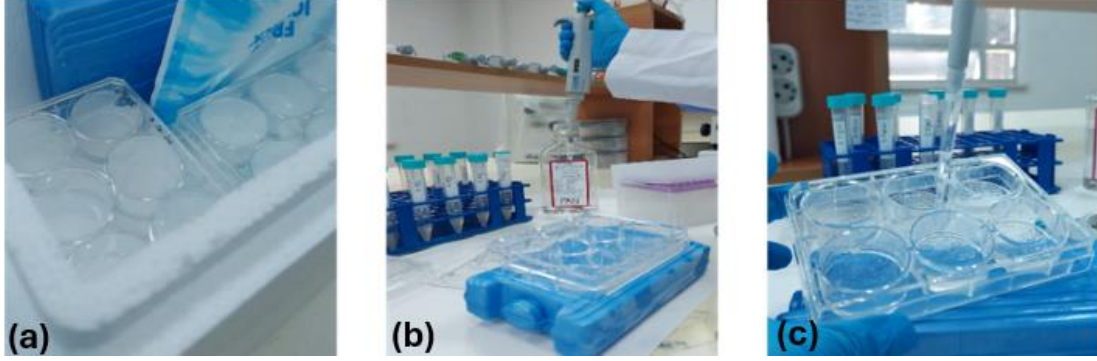
- Solucanlar, 7 gün boyunca bu koşullar altında kültüre edilmiştir solucanlar insülin farklı konsantrasyonlarına (0,01-10nM) maruz bırakılmış ve tüm konsantrasyonlarda her iki suşta da (N2 ve lin-35) ömür uzaması gözlemlenmiştir. Bu ömür uzunluğunun altında yatan metabolomik değişimleri aydınlatmak amacıyla bu projede önceki çalışmamızda uygulanan en yüksek insülin konsantrasyonu (10nM) solucanlara uygulanarak metabolomik değişimleri incelenmiştir (Berk, 2024).

3.8. Metabolit Ekstraksiyonu

10nM insüline maruz bırakılan solucanlar 7. gün sonunda metabolit ekstraksiyonu Solmaz ve arkadaşlarının protokoline göre (İ. Solmaz et al., 2022) gerçekleştirilmiştir. Bu metabolit ekstraksiyonu aşağıdaki gibidir:

- 7 gün boyunca insüline maruz bırakılan solucanları ve insüline maruz bırakılmayan kontrol solucanları içeren 6 kuyulu plakalar buz üzerine yerleştirilir. Özellikle enzimler ılık ortamda aktif hale gelir ve substratları dönüştürmeye devam eder. Bu durum ise örnek toplandıktan sonra bile bazı metabolitlerin parçalanmasına veya oluşmasına yol açabilir. Buz üzerinde koymak, bu süreçleri hızla yavaşlatır veya durdurur, örneğin metabolomik profili olduğu gibi korunur. Bu sebeple örnekler öncelikli buz üzerine alınır (**Şekil 10a**).
- Her bir kuyucuktaki *E.coli* OP50 kalıntılarını (besiyeri ve solucanların üzerindeki) ortamdan uzaklaştırmak amacıyla 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilir. 6-kuyulu plakaların her bir kuyusundaki solucanlara 1X PBS ile yıkama işlemi uygulanarak ayrı steril 15 ml'lik falkon tüplere aktarılır (**Şekil 10b**).
- Bu aşamada lin-35 solucanları ve N2 solucanları dikkatli bir şekilde falkon tüp üzerine etiket yapılmalıdır. Oluşabilecek karışıklıklar deney sonuçlarını direkt etkilemektedir. Her suş, ilaç var olan gruplar ve kontrol grupları için ayrı ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.

- 15mL'lik falkon tüplere alınan solucanlar 1200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılır ve pelet 1X PBS tamponu ile homojenize edilerek tekrar yıkama işlemi gerçekleştirilir ve tüpler 2 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüj edilir. (Şekil 10c).

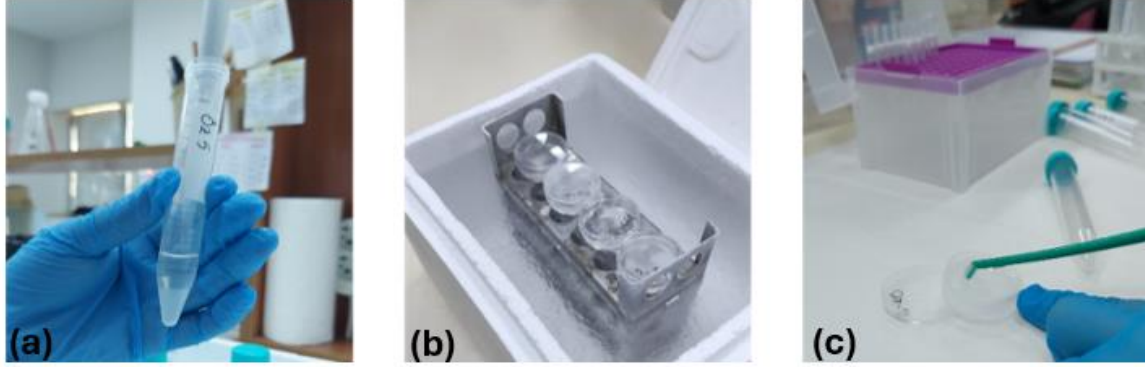


Şekil 10. Metabolomik analiz öncesinde örneklerin hazırlanma süreci. **A.** 6 kuyucuklu petri kabı içerisindeki solucanlar buz üzerinde 15 mL'lik falkon tüplere aktarılır. **B.** 1X PBS tamponu ile yıkama işlemi uygulanarak kültür ortamındaki istenmeyen *E. coli* ve insülin uzaklaştırılır **C.** 1X PBS ile yeniden yıkanan bireyler santrifüj edilmek üzere toplandı.

- Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılır. Elde edilen pelet üzerine 1mL soğuk HPLC Gradient methanol eklenir (Şekil 11a) ve pipetaj yapılarak 35x12 mm boyutundaki petri kaplarına alınır. Metabolitlerin çoğu (özellikle polar ve uçucu olanlar) ısıya ve enzimatik parçalanmaya karşı oldukça hassastır. Soğuk metanol ile ekstraksiyon, enzimlerin aktivitesini inhibe eder, böylece hücre lizisi sırasında metabolitlerin bozulmasını engeller. Bu sayede, hücre içi metabolit profili ekstraksiyon anındaki hâline daha sadık kalır.
- Strafor içerisine sıvı nitrojen eklenir ve petri kaplarındaki solucanları sıvı nitrojen buharında dondurmak amacıyla strafor içerisine metal düzenek (metal tüplük) yerleştirilir (Şekil 11b). Sıvı nitrojen, straforun yüksekliğinin yaklaşık 5-6 cm daha azı olmalıdır. Bu, kullanılacak metal malzemenin boyutuna göre de değişiklik gösterebilmektedir. Sıvı nitrojen (yaklaşık -196 °C) ile şok dondurma, tüm hücresel aktiviteleri anında durdurur. ATP, NADH, glutatyon, amino asitler, organik asitler gibi metabolitler oldukça kararsızdır. Enzimatik bozunmalar ya da oksidasyonla hızla parçalanabilirler. Sıvı nitrojen sayesinde bu metabolitler bozulmadan analiz anına kadar korunur.
- Dondurma işlemi sırasında petri kaplarının kapakları kapalı olmalıdır, sıvı nitrojen ile direkt temas etmemelidir. Aksi taktirde petri kabında çatlak ya da kırıklar oluşabilir bu da numune kaybına sebep olabilmektedir. Yükseklik sağlayan malzeme plastik ya da

sıvı nitrojen içerisinde eriyecek ya da kırılacak cisim olmamalıdır. Petri içerisinde bulunan solucanlar sıvı nitrojen buharında 3-5 dk bekletilerek dondurulur.

- Sıvı fazdan katı faza gelen petri içerisindeki metanol solüsyonu strafor içerisinden dikkatlice çıkartılarak hücre sıyrıcı yardımıyla kazınır ve 15mL'lik falkon tüplere ayrı ayrı alınır (Şekil 11c).



Şekil 11. Metabolit stabilizasyonu için kullanılan soğuk metanol ve sıvı nitrojen işlemleri. **A.** Metanol ile muamele edilen solucan örnekleri santrifüj edilmiştir. **B.** Petri kapları sıvı nitrojen buharında metal yüzey üzerine yerleştirilerek şok dondurma gerçekleştirilmiştir. **C.** Donmuş örnekler döner bıçaklı kazıyıcı ile sıyrılarak falkon tüplere aktarılmıştır.

- Bu aşamada falkon tüpleri parafilm sarılarak -80°C sıcaklıkta deney gerçekleştirilene kadar muhafaza edilebilir. Deney hemen gerçekleştirilecek ise kazıma işlemi sonrası elde edilen örnekler 1,5mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılır ve 300 rpm' de 10 dk santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası üst faz yeni bir 1,5mL'lik mikrosantrifüj tüpe aktarılır. $+4^{\circ}\text{C}$ vakum santrifüjünde (Labconco Refrigerated CentriVap Concentrator) metanol tamamen uçuncaya kadar kurutulur. Methanolün tamamen uçması ve sadece analiz edilecek numune kalma aşaması yaklaşık 20 saat sürmektedir.
- Uçurma işlemi, metabolitleri kuru hâle getirir, bunlar analiz öncesinde tekrar sıvı faza alınmalıdır. Uçurulan örneklere 200 μL 1:1 (h/h) su (Milli-Q): Asetonitril (ACN) karışımı ilave edilerek numuneler çözündürülür. Çözdürülen örnekler 45sn vortex işlemine tabii tutularak homojenizasyon sağlanır. Bu aşamada kullanılan su:ACN karışımı, geniş polarite aralığına sahip metabolitleri çözmek için oldukça etkili bir çözücüdür. Bu karışım hem polar hem de yarı-polar bileşenleri yeniden çözmektedir.
- Homojenizasyon sonrası numuneler 1:1 Su/Asetonitril çözeltisi içerisinde 80'er μL her birinden ayrı ayrı alınarak HPLC insert vialler içerisine entegre edilmiş cam tüplere aktarılır.

- Deneyler, C18 kolon (Agilent Zorbax 1,8 μ M, 50,0 $\times$ 2,1 mm) kullanılarak bir Agilent 6530 LC-Q-TOF-MS/MS cihazında (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) (Şekil 12) gerçekleştirilmesi için hazırdr.



Şekil 12. Metabolomik analizlerin gerçekleştirildiği Agilent 6530 LC-Q-TOF-MS/MS sistemi. Cihaz, 1200 Infinity UPLC sistemi ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynaklı kütle spektrometresiyle yapılandırılmıştır (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD).

3.9. LC-Q-TOF-MS/MS Analizlerinde Uygulanan Metodoloji

Deneyler, C18 kolon (Agilent Zorbax 1,8 μ M, 50,0 $\times$ 2,1 mm) kullanılarak Agilent 6530 LC-Q-TOF-MS/MS cihazında (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) gerçekleştirildi. Hareketli fazlar (asetonitril:su, %0,1 formik asit) 1. dakikanın sonuna kadar %90 H₂O ile başlayan ve daha sonra asetonitril oranı 15. dakikada doğrusal olarak %90'a çıkarılan 0,20 mL dk⁻¹ akışa tabi tutuldu. Kromatografik koşullar daha sonra 20. dakikada doğrusal olarak başlangıç koşullarına döndürüldü ve daha fazla enjeksiyon için 5 dakikalık bir son çalıştırma uygulandı. Bu gradyan elüsyon programını kullanmanın amacı, seçilen kromatografik koşullar altında hem polar hem de polar olmayan metabolitleri uygun şekilde ayırmaktır. MS cihazı için tarama aralığı 100–1700 m/z idi. Tüm numuneler rastgele sırayla iki tekrar olarak enjekte edildi. Kolon sıcaklığı 30°C ve kılcal voltaj 4000 V olarak ayarlandı. Bir ESI probu ile donatılmış kütle spektrometresi, üretici tarafından cihaz için önerilen standartlar kullanılarak pozitif (ESI+) iyon modunda çalıştırıldı. LC ayırma ve MS tespiti için sistem uygunluğu, analizden önce enjekte edilen kalite kontrol (KK) numuneleri (Waters Co., LC/MS KK Referans Standardı [186006963]) kullanılarak ölçüldü. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği, tutulma süresi ve tepe yoğunluk kaymaları ile kontrol edildi. Tekrarlanabilir kromatografik koşullar, tüm deneylerin aynı koşullar altında gerçekleştirilmesine olanak sağladı (I. Solmaz et al., 2022). Cihazın çalışma koşulları **Tablo'6** da gösterilmektedir.

Tablo 6. LC-Q-TOF-MS/MS parametreleri

Enjeksiyon Hacmi	80 μ L
MS Tarama Aralığı	100-1700 m/z
Kurutucu Gaz Sıcaklığı	350°C
Kurutucu Gaz Akışı	10 L/dakika

Kurutucu Gaz Basıncı	45 psi
Akış Hızı	0,2 mL/dakika

Kütle spektrometrisi analizi, Agilent 6530 LC-Q-TOF-MS/MS cihazında (Agilent Technologies, 184 Santa Clara, CA) yapılır. Çalışmada C18 kolonu (Agilent Zorbax 1.8 μ M, 50 x 2.1 mm) kullanılmıştır.

3.10. Metabolit Fraksiyonunun Analizi

Tüm gruplar için ham kromatogramlar, İzotopolog Parametre Optimizasyonu (IPO) aracıyla optimize edilmiş parametreler kullanılarak XCMS ile işlendi. Grupların istatistiksel karşılaştırmasından önce bir normalizasyon prosedürü gerçekleştirildi. Yanlış pozitif zirveler, yanlış pozitif zirveleri ortadan kaldırmak için ardışık seyreltme tekniği ve zirve alanlarından rastgele hataları atmak için zirve normalizasyonu gibi yakın zamanda tanıtılan veri işleme stratejilerinin uygulanmasıyla birleştirilmiş örnekler ortadan kaldırıldı. Tüm zirvelerin toplam alanı kullanılarak normalize edilen zirveler kendi aralarında karşılaştırıldı ve lin-35 ve N2 arasında anlamlı farklılıklar ($p < 0,05$) ve $>1,25$ 'lik kat değişim değerleri olan zirveler, bireysel örneklerle (lin-35; kontrol ve insülin, N2; kontrol ve insülin) istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Zirve alanlarının normalizasyonları ve karşılaştırmaları MS Excel ile gerçekleştirildi ve istatistiksel karşılaştırma için t-testleri kullanıldı. MetaboAnalyst 6.0'ın MS Peaks to Pathways yardımcı programı, nihai zirve listesini Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) kodlarıyla eşleştirmek için kullanıldı ve ardından olası biyobelirteçler ayrıntılı bir literatür taraması kullanılarak klinik bir değerlendirmeye incelendi ve sonuçlar ilişkilendirildi. Ek olarak, sonuçlar, yüksek verimli metabolomik deneylerden gelen büyük hacimli veriler için yaygın olarak yapıldığı gibi, iki boyutlu PCA skor grafikleri kullanılarak görselleştirildi (I. Solmaz et al., 2022).

3.11. Veri Analizi

Tüm deneyler iki kere tekrar edildi. Her suş kendi içerisinde kontrol ve insülin olmak üzere ikiye ayrılır ve bu gruplar 2 tekrardan oluşur. LC-Q-TOF-MS/MS cihazında tüm gruplar bölüm 3.9 ve 3.10' da belirttiği üzere analiz edilir. Cihazdan “.mzdata” uzantısıyla ham veriler alınır. Piklerin belirlenmesi, eşleştirilmesi, tanımlanması, pik alanlarının tespit edilmesi işlemleri MzMine 2.53 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilir (Pluskal et al., 2010). Veri değerlendirme işlemlerinde m/z tespiti, kromatogram oluşturma, kromatogram dekonvolüsyonu, piklerin oluşturulan kütüphane kullanılarak nitel analizleri, filtreleme, izotop eşleştirilmesi, farklı yüklü iyonların takip edilmesi ve eşleştirme basamakları takip edilir. Gürültü eşiği 10000, m/z eşleşme aralığı 0.008 m/z, minimum alıkonma zamanı aralığı 0.2 dk, maksimum asimetri oranı 1.2, kütüphane eşleştirmelerinde maksimum 3 ppm ve 0.1 dk. aralık olarak parametreler belirlendi. Kütüphane eşleştirmeleri işlemi sırasında, iç standartlar kullanılarak alıkonma

zamanı düzeltmesi yapılır. Alıkonma zamanları, m/z değerlerini, eşleştirme sonuçlarını ve pik alanlarını içeren .csv uzantılı tablo, çıktı olarak programdan alınır.

Veri değerlendirme basamağında ilk olarak kalite kontrol ve havuz örneklerinde iç standartların bağıl standart sapma değerleri hesaplanır. Daha sonra örneklerde eşleşen metabolitlerin ekstraksiyon kör çözelti örnekleri ile karşılaştırılarak filtrelemesi yapılır. Bulunan metabolitler alıkonma zamanına göre en yakın iç standart kullanılarak normalize edilir. Metabolit piklerinin havuz örneklerindeki bağıl standart sapma değerleri kullanılarak, bağıl standart sapma değerleri %30'un üzerinde olanlar filtrelenir. Çalışmanın daha sonraki aşamalarında bu işlemler sonunda elde edilen pikler ve normalize pik değerleri kullanılır. Metabolomik yolak analizlerinde KEGG ve HMDB metabolit veri bankaları aracılığıyla metabolit yolak zenginleştirme analizleri (MSEA), gen metabolit etkileşimleri (GSEA) ve yolak temsiliyet analizleri (ORA) biyoinformatik yaklaşımlar kullanılır (Rosato et al., 2018). HMDB veri bankası üzerinden eşleşen piklerin kodları veri tabanı üzerinden bakılarak metabolit isimleri ve KEGG kodları belirlenir. Elde edilen KEGG veri kodları KEGG veri bankasında taranarak yolaklarla eşleştirilen metabolitler görselleştirilir, birbirleri ile ilişkilendirilir, metabolitlerin değişimleri kullanılarak yolakların etkinlik değerleri hesaplanır. Bu yaklaşımlarla metabolitlerin kimyasal sınıflandırılmaları, hangi doku veya organda bulundukları ve toplamda fenotip üzerindeki etkileri hesaplanabilir (Frainay et al., 2018). KEGG veri tabanı üzerinden alınan kodlar MetaboAnalyst6.0 yazılımı kullanılarak PCA grafiği, Isı grafikleri, Volcano Grafiği, VIP grafiği çıkarıldı. Yolak analizleri MetaboAnalyst6.0 destekli olarak KEGG veri bankasında gerçekleştirildi. Yolak analizlerinde ve gruplar arasında değişen metabolitlerin belirlenmesinde sadece kütüphane eşleşmesi veren metabolitler kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. İnsülin Uygulaması Sonrası *C. elegans* Solucanların Metabolomik Analizi

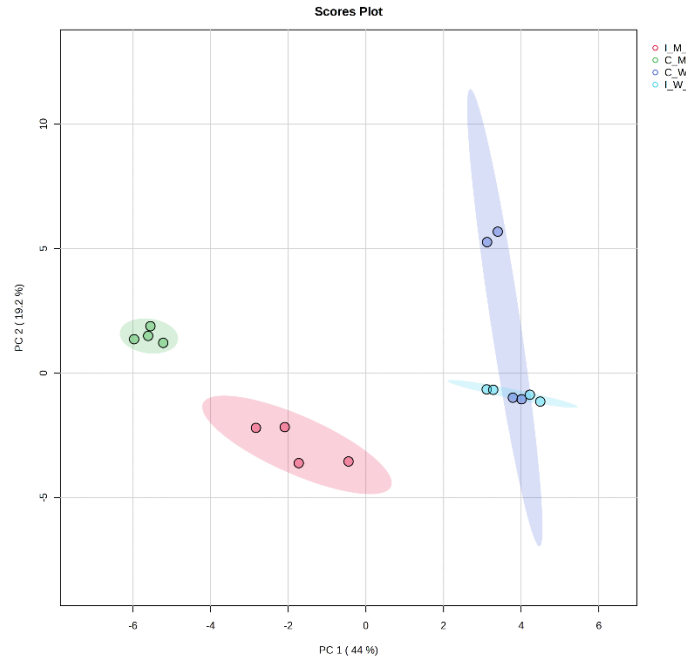
Metabolomik analizlerde ham veride 2161 adet pik tespit edilmiştir. Bu piklerde kütüphaneden 115 eşleşme yakalanmıştır. Sinyal/gürültü (>3) ve havuz örneklerde bağıl standart sapma değerlerine ($<30\%$) göre yapılan filtreleme işlemi sonucu bu sayılar 75 eşleşen metabolit olarak tespit edilmiştir. Eşleşme sağlayan 75 metabolit endojen ve eksojen olmak üzere iki gruba ayrılmıştır ve 38 endojen metabolitler analiz edilmiştir. **Tablo 7’de** eşleşen metabolitlerin m/z değerleri, alıkonma zamanları (tR), yaygın isimleri ve HMDB kodları, sinyal/gürültü oranları ve havuz örneklerdeki bağıl standart sapma değerleri verilmiştir.

Tablo 7. Kütüphanede eşleşen endojen metabolitlerin sinyal/gürültü oranları ve havuz örneklerde bağıl standart sapmaları.

	m/z	t _R	Metabolit Adı	KEGG Kodu	HMDB	S/G	%BSS
1.	670.1656806	4.59	CMP-N-trimethyl-2-aminoethylphosphonate	C03691	HMDB0012206	5646.041134	15.00064
2.	733.2551756	4.96	(N-acetylneuraminosyl (a2-6)lactosamine)	C04886	HMDB0001081	6450.191785	11.96852316
3.	335.0968014	5.53	Glutathione episulfonium ion	C14874	HMDB0060479	2693.801254	37.11060005
4.	146.0224938	5.44	5-Aminoimidazole-4-carboxamide	C04051	HMDB0003192	1957.935018	36.59671995
5.	766.1414577	4.78	FAD	C00016	HMDB0001248	1103.957776	11.30663863
6.	291.1086752	5.52	2-(3-Carboxy-3-(methylammonio)propyl)-L-histidine	C04692	NA	2091.912072	35.77751368
7.	529.1259611	6.11	17-beta-Estradiol-3-glucuronide	C05503	HMDB0006224	4035.268587	26.11163868
8.	218.0775456	4.9	2-Oxoarginine	C03771	HMDB0004225	1222.014153	5.44795072
9.	273.0978686	6.77	Glycerophosphocholine	C00670	HMDB0000086	2573.108661	28.90296672
10.	407.2025579	9.47	Thromboxane B2	C05963	HMDB0003252	6699.407596	17.11836654
11.	259.0474324	0.96	Fructose 6-phosphate	C00085	HMDB0000124	35887.343	42.09473773
12.	180.051496	0.93	L-Tyrosine	C00082	HMDB0000158	4864.565314	13.22721425
13.	166.8322944	12.17	Diaminopimelic acid	C00666	HMDB0001370	3.502199267	40.226247
14.	284.0870577	4.95	Uridine	C00299	HMDB0000296	1066.169817	0
15.	513.0878162	4.37	SAICAR	C04823	HMDB0000797	3305.323195	44.52742227
16.	598.1930982	5.58	Protoporphyrin IX	C02191	HMDB0000241	1155.554357	2.409406144
17.	540.0803649	4.27	4-Carboxy-1-hydroxybutyryl-ThPP	C22667	NA	2359.846093	22.9200263
18.	1023.612538	8.99	Guanidoacetic acid	C00581	HMDB0000128	6817.106404	4.532985984
19.	518.2042576	5.38	5-Methyltetrahydrofolic acid	C00440	HMDB0001396	1662.954145	28.85081798
20.	279.226504	8.38	Stearic acid	C01530	HMDB0000827	29182.90051	5.589977235
21.	125.0103486	0.91	Thymine	C00178	HMDB0000262	105087.4435	2.564628728
22.	114.9938568	0.76	Fumarik acit	C00122	HMDB0000134	5.141799988	37.08931999
23.	137.0270707	3.97	4-Hydroxybenzoic acid	C00156	HMDB0000500	5705.977001	31.29462604
24.	399.1916292	6.86	Tetrahydrocortisone	C05470	NA	4294.433472	6.014746685
25.	282.7821261	0.92	Xanthosine	C01762	HMDB0000299	14193.41547	24.10802704
26.	216.0635964	4.44	Ureidosuccinic acid	C00438	HMDB0000828	1005.330679	0
27.	147.0193482	0.91	Dihydroxyfumarik acit	C00975	HMDB0002050	6.241663963	41.42525404
28.	668.1254366	6.97	Dephospho-CoA	C00882	HMDB0001373	1937.397257	46.11750681
29.	343.9881879	1.13	Cyclic GMP	C00942	HMDB0001314	1052.689818	2.61887447
30.	160.9687895	0.80	3-Hydroxymethylglutaric acid	C03761	HMDB0000355	13768.36157	32.56130446
31.	173.0229324	0.78	L-arginin	C00062	HMDB0000517	7851.45514	24.74244772
32.	132.9760587	0.83	D-Malic acid	C00497	HMDB00031518	3804.345446	39.59820539
33.	148.9507214	0,70	meso-Tartaric acid	C00552	NA	1009.22107	0
34.	167.0072359	0.90	Phosphoenolpyruvic acid	C00074	HMDB0000263	19667.54	24.57726372
35.	306.0716379	0.90	dCMP	C00239	HMDB0001202	1584.992479	33.09450675
36.	117.0116366	0.90	Succinic acid	C00042	HMDB0000254	12959.06007	16.71831738
37.	146.9686338	1.59	Citramalic acid	C00815	HMDB0000426	5272.989509	46.02230888
38.	128.0336728	0.93	Pipecolic acid	C00408	HMDB0000070	19908.56541	9.616601087 ¹

¹ m/z: Mass-to-Charge Ratio (Kütle-Yük Oranı), t_R: Retention Time (Alıkönme Süresi), S/G: Sinyal/Gürültü, %BSS:Bağıl Standart Sapma.

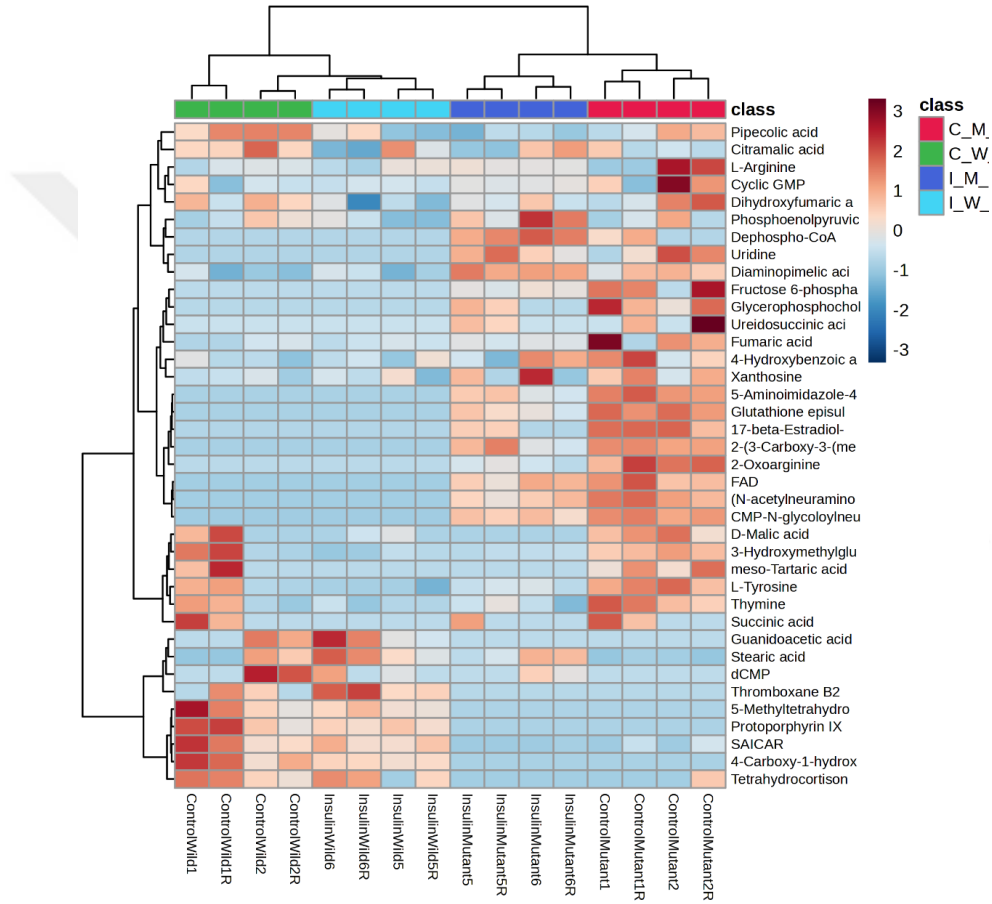
Çalışma grupları arasındaki farklılıkları ve metabolik aktiviteyi değerlendirmek amacıyla, N2 ve lin-35 suşları arasındaki değişimler ile insülin ve kontrol grupları arasındaki değişimler ayrı ayrı analiz edilmiştir. Ham verilerin MetaboAnalyst 6.0 platformunda analiz edilmesiyle elde edilen KEGG veri tabanı kodları, HMDB ile eşleştirilmiş ve bu işlem sonucunda 38 endojen metabolit tanımlanmıştır. Tanımlanan bu metabolitlere ait pikler kullanılarak dört grup oluşturulmuştur: insülin uygulanan lin-35 (kırmızı), kontrol lin-35 (yeşil), kontrol N2 (mor) ve insülin uygulanan N2 (mavi). Bu gruplara ait tanımlanmış metabolit verileri temel alınarak oluşturulan Temel Bileşen Analizi (PCA) grafikleri **Şekil 13**'te sunulmuştur.



Şekil 13. Lin-35 ve N2 solucanları PCA grafiği².

² Toplam varyansın %63,2'sini açıklayan Temel Bileşenler Analizi (PCA), dört deney grubuna (insülin uygulanan lin-35 [kırmızı], kontrol lin-35 [yeşil], kontrol N2 [mor] ve insülin uygulanan N2 [mavi]) ait metabolit profillerini temel alarak gerçekleştirilmiştir. PCA sonuçlarına göre, birinci temel bileşen (PC1) varyansın %44'ünü, ikinci temel bileşen (PC2) ise %19,2'sini açıklamaktadır. PCA grafiğinde, N2 suşu içerisinde insülin uygulanan ve kontrol grupları arasında metabolomik düzeyde yalnızca sınırlı bir ayrışma gözlenmiştir; bu durum, insülin uygulamasının N2 suşu üzerindeki etkisinin oldukça düşük düzeyde olduğunu göstermektedir. Buna karşın, lin-35 mutant suşlarında insülin uygulanan grup ile kontrol grubu arasında belirgin bir metabolik ayrışma saptanmıştır. Ayrıca, N2 ve lin-35 suşları arasında da insülin uygulamasından bağımsız olarak metabolomik farklılıkların bulunduğu gözlemlenmiştir.

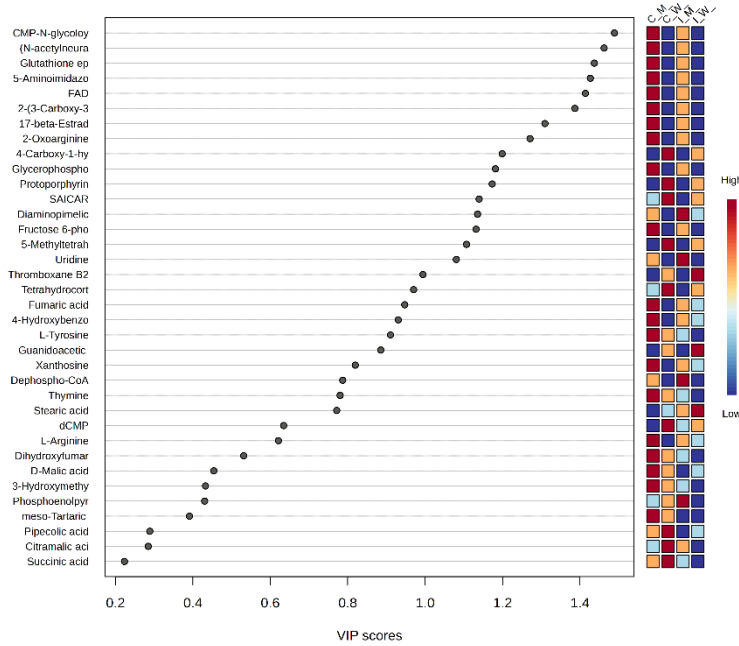
PCA analizinde gözlenen lin-35 ve N2 suşları arasındaki metabolomik farklılıkların daha ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla, tanımlanan 38 endojen metabolit kullanılarak ısı haritası (heatmap) analizi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 14**). Bu analizde; kontrol grubuna ait lin-35 suşları (kırmızı), insülin uygulanan lin-35 suşları (mavi), kontrol grubuna ait N2 suşları (yeşil) ve insülin uygulanan N2 suşları (açık mavi) olmak üzere dört grup karşılaştırılmıştır. Isı haritasında renk skalası, metabolitlerin tepe (peak) yoğunluklarını temsil etmektedir: Koyu kırmızı tonlar daha yüksek, koyu mavi tonlar ise daha düşük metabolit seviyelerini göstermektedir. Her bir grup için biyolojik tekrar sayısı dört olarak belirlenmiştir (n = 4).



Şekil 14. Lin-35 ve N2 solucanları metabolitlerin gruplara göre ısı haritası³.

³ Şekil 14'te sunulan ısı haritası, dört deney grubuna (kontrol lin-35 suşları [kırmızı], insülin lin-35 suşları [mavi], kontrol N2 suşları [yeşil] ve insülin N2 suşları [açık mavi]) endojen metabolitlerin yoğunluk düzeylerini görselleştirmektedir. Haritanın üst kısmında yer alan renk şeması, her bir çalışma grubunu ve bunlara ait biyolojik tekrarları temsil etmektedir. Haritanın sağ tarafında ise sınıflandırma, metabolit isimlerine göre yapılmıştır. Renk skalasında koyu kırmızı yüksek, koyu mavi ise düşük metabolit yoğunluklarını ifade etmektedir. Isı haritası, kontrol ve insülin uygulanan N2 suşları arasında metabolit düzeyinde belirgin bir fark gözlenmemektedir. Buna karşın, lin-35 suşları ile N2 suşları arasında metabolit seviyelerine yansıyan farklılıklar mevcuttur. Özellikle lin-35 suşlarında metabolit seviyeleri genel olarak daha yüksek olup, N2 suşlarına kıyasla belirgin bir renk ayrışması gözlenmektedir. Ayrıca, lin-35 suşlarında insülin uygulanan ve kontrol grupları arasında artan ve azalan metabolit seviyeleri ayrılmaktadır. Isı haritası lin-35 mutant suşlarında metabolit ifadesinin daha anlamlı düzeyde değiştiğini ve N2 suşlarına göre daha belirgin bir metabolomik yanıt oluştuğunu göstermektedir.

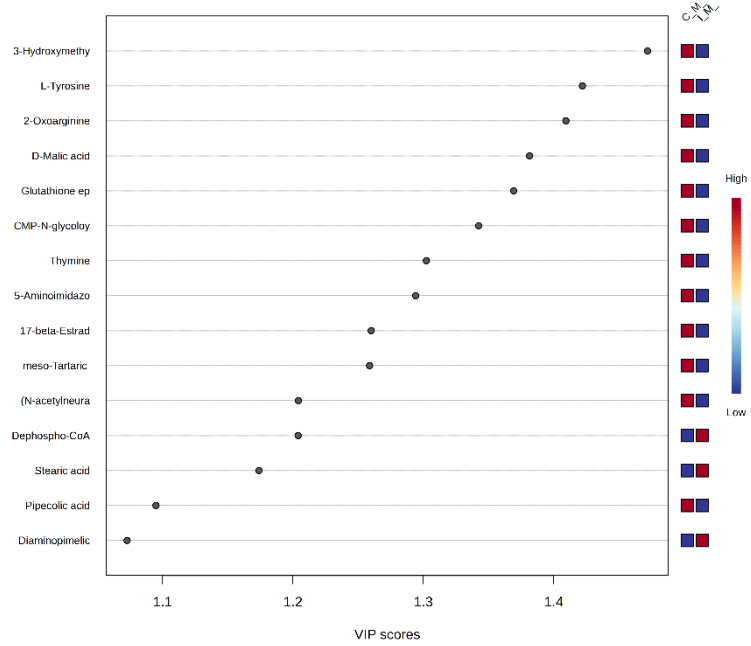
Isı haritası verileri temel alınarak MetaboAnalyst 6.0 platformu aracılığıyla değişken önemi projeksiyonu (VIP: Variable Importance in Projection) analizleri gerçekleştirilmiş ve her bir metabolitin gruplar arası ayrım gücünü yansıtan VIP skorları elde edilmiştir. Bu veriler **Şekil 15**'te sunulmaktadır. Grafik üzerinde lacivert tonlar en yüksek, kırmızı tonlar ise en düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. İnsülin uygulanan lin-35 suşu ile kontrol lin-35 suşu arasında belirgin VIP skoru farklılıkları gözlenmiştir; bu da iki grup arasında metabolit düzeyinde anlamlı bir ayrışma olduğunu ortaya koymuştur. Kontrol N2 ve insülin uygulanan N2 suşları arasında VIP skorları açısından dikkate değer bir farklılık saptanmamıştır. Özellikle kontrol lin-35 grubu, diğer gruplara kıyasla en yüksek VIP skorlarına sahipken, bu gruba insülin uygulandığında VIP değerlerinde genel bir azalma eğilimi gözlenmiştir. VIP skorlarının aralığı 0,02 ile 1,68 arasında değişmektedir. Bu durum, metabolitlerin ifade düzeylerinin gruplar arası farklılıkları açıklamadaki katkı düzeyini ortaya koymaktadır.



Şekil 15. Lin-35 ve N2 solucanları VIP Grafiği ⁴

⁴ Şekil 15'te sunulan VIP skor grafiğinde, kırmızı ve lacivert renkleri sırasıyla gruplar arasında en yüksek ve en düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. Grafiğin sol tarafında yer alan metabolit adlandırmaları, bu bileşiklerin dört çalışma grubunda göstermiş oldukları toplam VIP skorlarına göre sıralanmıştır. VIP skorları 0,02 ile 1,68 arasında değişmekte olup, bu değerler metabolitlerin gruplar arasındaki ayrımı açıklamadaki önemini yansıtmaktadır. Grafiğin sağ kısmında yer alan renk kodlaması (sarı, kırmızı, lacivert ve açık mavi), ilgili metabolitlerin her bir gruptaki ifade düzeylerini göstermektedir. Burada kırmızı tonlar yüksek VIP skorlarını, lacivert tonlar ise düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. Analiz kapsamında dört deney grubu değerlendirilmiştir: kontrol grubuna ait lin-35 suşları (C_M_), insülin uygulanan lin-35 suşları (I_M_), kontrol grubuna ait N2 suşları (C_W_) ve insülin uygulanan N2 suşları (I_W_). VIP skoru grafiği, özellikle lin-35 mutant suşlarında insülin uygulamasının metabolit düzeyinde belirgin değişikliklere yol açtığını göstermekte olup, bu bulgu N2 suşlarında gözlemlenen sınırlı değişimle karşılaştırıldığında oldukça dikkat çekicidir.

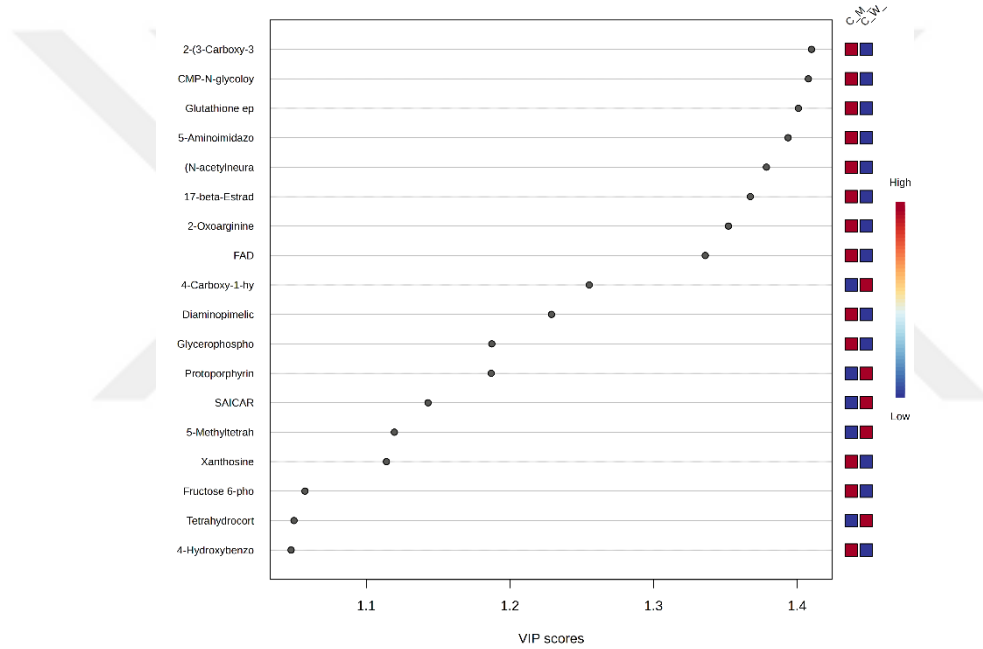
Genel VIP skor dağılımı ve metabolit düzeyleri, lin-35 ve N2 suşları arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu genel değerlendirmenin ötesinde, her suşun kendi içinde insülin uygulamasının etkilerini daha ayrıntılı analiz etmek amacıyla, lin-35 suşuna ait kontrol ve insülin uygulanan gruplar ayrı olarak incelenmiştir. Bu kapsamda **Şekil 16**'da yalnızca lin-35 mutant solucanlarına ait grupların (kontrol ve insülin) VIP skorları sunulmuştur. Analizde, VIP skoru $\geq 1,0$ olan metabolitler dikkate alınarak anlamlı değişim gösteren bileşikler ön plana çıkarılmıştır. Bu eşik değer temel alındığında, toplam 15 metabolit VIP skoru 1,0'ın üzerinde bulunmuştur. Grafikte kullanılan renk kodlamasında kırmızı tonlar yüksek, lacivert tonlar ise düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. Kontrol grubundaki lin-35 solucanları, insülin uygulanan gruba kıyasla genel olarak daha düşük VIP skorlarına sahiptir. Bu bulgular, insülin uygulamasının lin-35 mutant solucanları üzerinde belirgin metabolomik etkiler oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 16. Lin-35 solucanları kontrol grubu ve insülin grubu VIP grafiği⁵.

⁵ Şekil 16'da sunulan VIP skor grafiğinde, lin-35 mutant solucanlarının kontrol ve insülin uygulanan grupları karşılaştırılmıştır (VIP > 1.0). Grafikte kırmızı ve lacivert tonlar sırasıyla en yüksek ve en düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. Sol kısımda yer alan metabolit adlandırmaları, çalışma grubunda elde edilen genel VIP skorlarına göre sıralanmıştır. Bu sınırlı analizde yer alan metabolitlerin VIP skorları 1.0 ile 1.47 arasında değişmektedir. Grafiğin sağ kısmında yer alan renk skalası (sarı, kırmızı, açık mavi ve lacivert), ilgili metabolitlerin her bir gruptaki ifade düzeylerini yansıtmaktadır. Kırmızı renk, yüksek metabolit seviyelerini; lacivert renk ise düşük seviyeleri göstermektedir. Bu VIP analizi, lin-35 mutant solucanlarının insülin uygulaması öncesi ve sonrası metabolomik profillerinde anlamlı değişiklikler meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Özellikle VIP > 1.0 olan 15 metabolit üzerinden yapılan değerlendirme, insülin uygulamasının kontrol grubuna kıyasla belirgin düzeyde farklılık yarattığını göstermektedir.

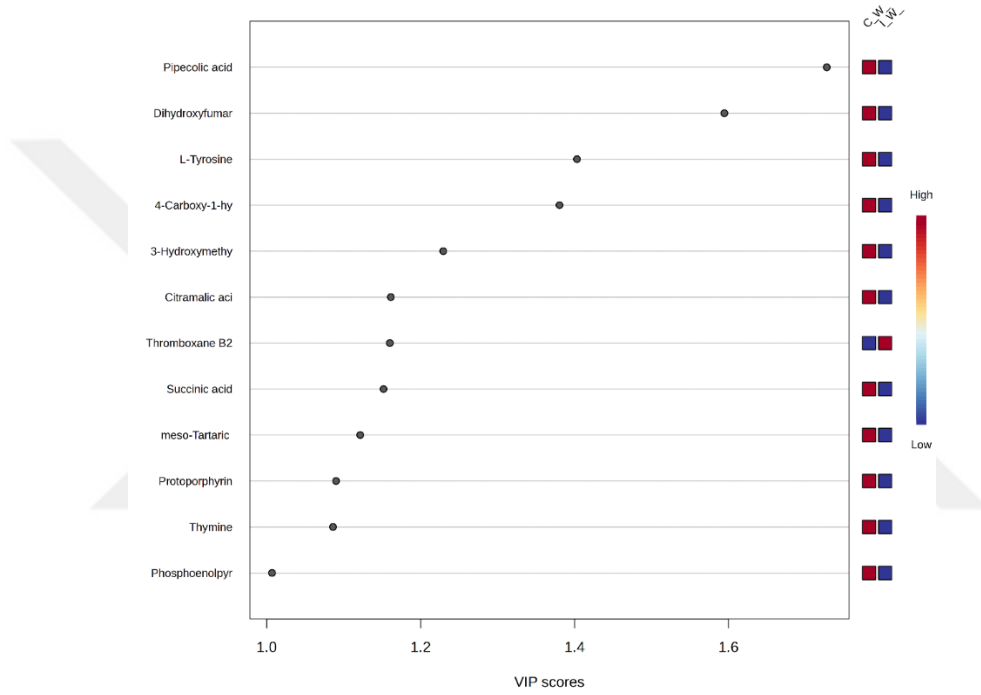
Genel VIP skor dağılımına ek olarak, suşlar arası karşılaştırmaları daha ayrıntılı değerlendirmek amacıyla, **Şekil 17**'de lin-35 ve N2 solucanlarına ait kontrol grupları VIP skorları sunulmuştur. Bu analizde, yalnızca VIP skoru ≥ 1.0 olan metabolitler değerlendirmeye alınmıştır. Belirlenen eşik doğrultusunda toplam 18 metabolit bu kapsama girmiştir. Elde edilen sonuçlar, lin-35 suşu kontrol grubu, N2 suşu kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek VIP skorlarına sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, lin-35 mutantlarının metabolomik düzeyde N2 suşlarından daha belirgin bir farklılık sergilediğine işaret etmektedir. Grafikte kullanılan renk skalasında kırmızı tonlar yüksek VIP skorlarını, lacivert tonlar ise düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. Bu görsel ifade, analiz edilen metabolitlerin gruplar arasında ayrım yapmadaki önem düzeylerini açık biçimde ortaya koymaktadır.



Şekil 17. N2 solucanları kontrol grubu ve Lin-35 solucanları kontrol grubu VIP grafiği⁶

⁶ Şekil 17'de sunulan VIP skor grafiğinde, N2 kontrol grubu ile N2 insülin uygulanan solucanları karşılaştırılması gösterilmektedir (VIP > 1.0). Grafikte kırmızı ve lacivert tonlar sırasıyla en yüksek ve en düşük VIP skorlarına karşılık gelmektedir. Sol kısımda yer alan metabolit isimleri, dört grup genelinde elde edilen VIP skorlarına göre sıralanmıştır. Bu sınırlı analiz kapsamında değerlendirilen metabolitlerin VIP skorları 1.0 ile 1.41 arasında değişmektedir. Grafiğin sağ bölümünde yer alan renk skalası (sarı, kırmızı, açık mavi ve lacivert), her bir grubun ilgili metabolit düzeylerini yansıtmaktadır. Bu bağlamda kırmızı, yüksek; lacivert ise düşük metabolit seviyelerini temsil etmektedir. N2 solucanlarında insülin uygulaması sonrasında metabolomik profilin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde değiştiğini göstermektedir. VIP skoru 1.0'ın üzerinde olan 18 metabolitin değerlendirilmesi, insülin uygulamasının metabolit seviyelerinde belirgin farklılıklara yol açtığını ortaya koymaktadır.

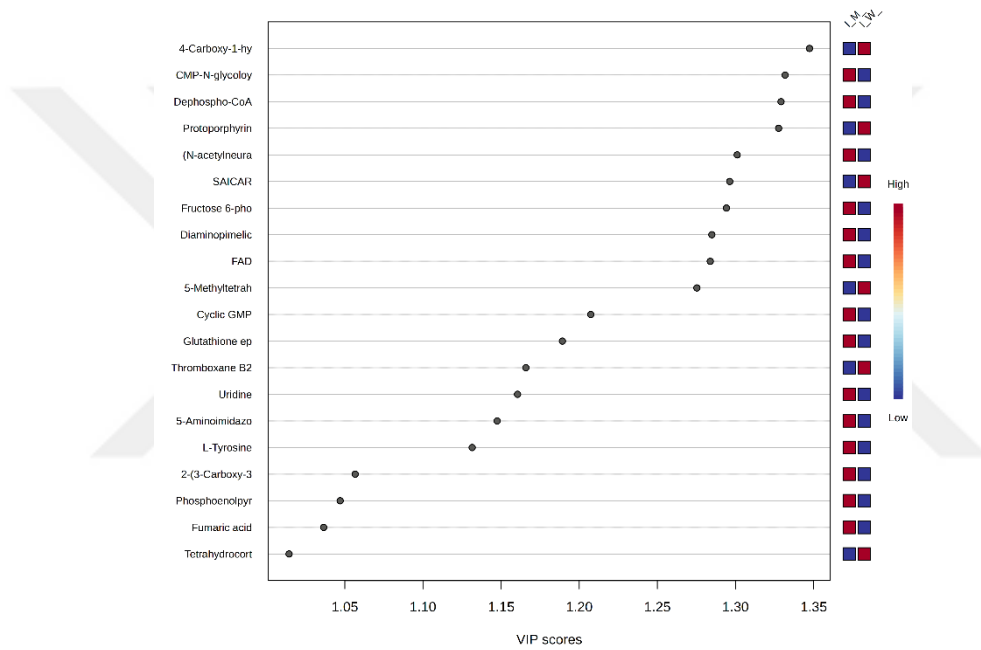
Şekil 18'de, N2 kontrol grubu ile N2 insülin grubu VIP skor dağılımları karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Bu analizde yalnızca VIP skoru 1.0'ın üzerinde olan metabolitler değerlendirmeye alınmış ve toplamda 12 metabolit bu kriteri sağlamıştır. Yapılan karşılaştırma sonucunda, insülin uygulanan N2 grubundaki metabolitlerin VIP skorları, bir metabolit dışında tamamında kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyelerde bulunmuştur. Grafikte kullanılan renk skalasında kırmızı tonlar yüksek VIP skorlarını, lacivert tonlar ise düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. İnsülin uygulamasının N2 solucanlarında metabolit düzeylerini genel olarak düşürdüğünü ve metabolomik profilde belirgin bir farklılık yarattığını göstermektedir.



Şekil 18. N2 solucanları kontrol grubu ve N2 solucanları insülin grubu VIP grafiği⁷.

⁷ Şekil 18'de sunulan VIP skor grafiğinde, N2 kontrol grubu ve N2 insülin grubu solucanlarının karşılaştırılması yer almaktadır (VIP > 1.0). Grafikte kullanılan kırmızı ve lacivert tonlar sırasıyla en yüksek ve en düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. Grafiğin sol kısmında yer alan metabolit isimleri, dört farklı çalışma grubunda elde edilen genel VIP skorlarına göre sıralanmıştır. Bu analizde yer alan metabolitlerin VIP skorları 1.0 ile 1.72 arasında değişmektedir. Grafiğin sağ bölümünde yer alan renk skalası (sarı, kırmızı, açık mavi ve lacivert), ilgili metabolitlerin gruplar içerisindeki ifade düzeylerini yansıtmaktadır. Bu bağlamda, kırmızı renk yüksek metabolit düzeylerini, lacivert renk ise düşük düzeyleri göstermektedir. Analiz sonuçları, insülin uygulamasının N2 solucanlarının metabolomik profilinde dikkate değer değişikliklere yol açtığını ortaya koymaktadır.

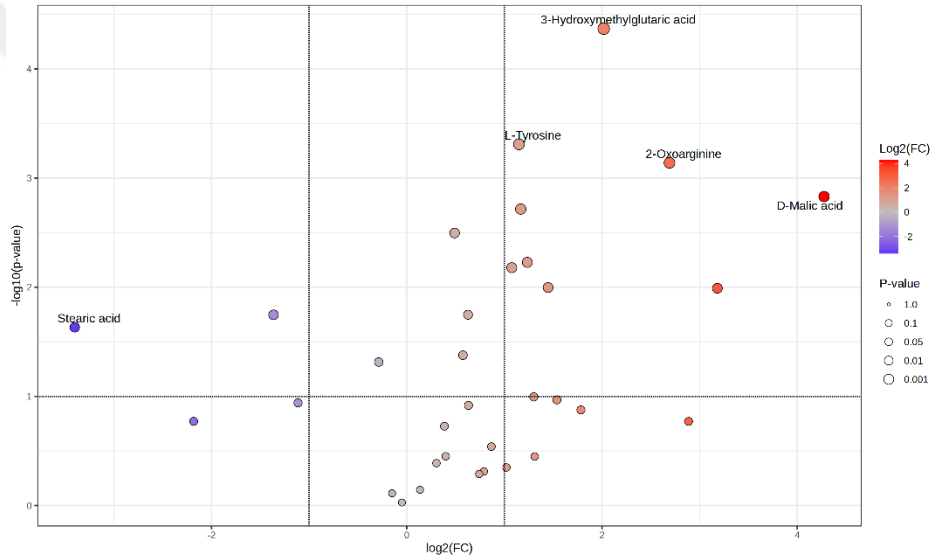
Şekil 19'da lin-35 ve N2 solucanlarına ait insülin grupları VIP skorları sunulmuştur. Bu analizde, yalnızca VIP skoru ≥ 1.0 olan metabolitler değerlendirmeye alınmıştır. Belirlenen eşik doğrultusunda 20 metabolit bu kapsama girmiştir. Elde edilen sonuçlar, lin-35 suşu insülin grubu, N2 suşu insülin gruplarına kıyasla daha yüksek VIP skorlarına sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, lin-35 mutantlarının metabolomik düzeyde N2 suşlarından daha belirgin bir farklılık sergilediğine işaret etmektedir. Grafikte kullanılan renk skalasında kırmızı tonlar yüksek VIP skorlarını, lacivert tonlar ise düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. Bu görsel ifade, analiz edilen metabolitlerin gruplar arasında ayrım yapmadaki önem düzeylerini açık biçimde ortaya koymaktadır.



Şekil 19. Lin-35 solucanları insülin grubu ve N2 solucanları insülin grubu VIP grafiği ⁸.

⁸ Şekil 19'da sunulan VIP skor grafiğinde, lin-35 insülin grubu ve N2 insülin grubu solucanlarının karşılaştırılması yer almaktadır (VIP > 1.0). Grafikte kullanılan kırmızı ve lacivert tonlar sırasıyla en yüksek ve en düşük VIP skorlarını temsil etmektedir. Grafiğin sol kısmında yer alan metabolit isimleri, dört farklı çalışma grubunda elde edilen genel VIP skorlarına göre sıralanmıştır. Bu analizde yer alan metabolitlerin VIP skorları 1.0 ile 1.39 arasında değişmektedir. Grafiğin sağ bölümünde yer alan renk skalası (sarı, kırmızı, açık mavi ve lacivert), ilgili metabolitlerin gruplar içerisindeki ifade düzeylerini yansıtmaktadır. Kırmızı renk yüksek metabolit düzeylerini, lacivert renk ise düşük düzeyleri göstermektedir. İnsülin uygulamasının N2 solucanlarının metabolomik profilinde dikkate değer değişikliklere yol açtığını ortaya koymaktadır.

Şekil 20'de, lin-35 mutant *C. elegans* solucanlarının kontrol ve insülin uygulanan grupları arasında anlamlı değişim gösteren metabolitlerin dağılımını gösteren Volcano grafiği sunulmuştur. Bu grafik, MetaboAnalyst6.0 platformu aracılığıyla oluşturulmuştur. Grafikte kırmızı renkle gösterilen metabolitler, insülin uygulaması sonucunda anlamlı düzeyde artış gösteren bileşikler temsil ederken; mavi renkle gösterilen metabolitler ise anlamlı düzeyde azalış gösterenleri ifade etmektedir. Grafiğin sağ tarafında konumlanan kırmızı noktalar yukarı regüle edilen, sol tarafında yer alan mavi noktalar ise aşağı regüle edilen metabolitleri göstermektedir. Orta bölgede, gri renkte ya da düşük renk yoğunluğuna sahip olarak görülen metabolitler ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemektedir. Bu dağılım, insülin uygulamasının lin-35 mutant solucanların metabolik profili üzerindeki etkilerini görsel olarak değerlendirmek adına önemli bir gösterge sunmaktadır.

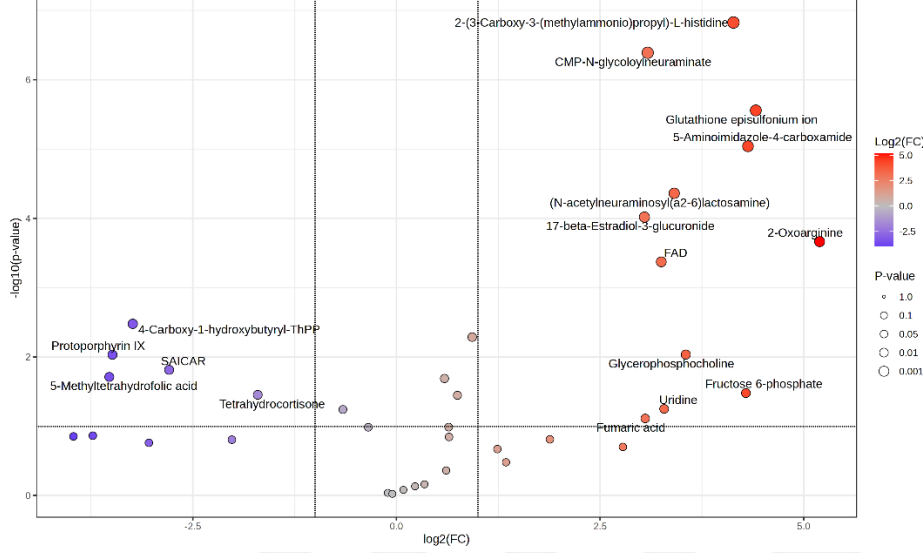


Şekil 20. Lin-35 solucanları kontrol grubu ve lin-35 solucanları insülin grubu Volcano Grafiği⁹.

Gruplar arası metabolit düzeylerindeki farklılıklar, bir diğer Volcano grafiği olan **Şekil 21**'de görsel olarak sunulmuştur. Bu analizde, lin-35 mutant *C. elegans* kontrol grubu ile N2 (yabanıl tip) *C. elegans* kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, 13 metabolitin anlamlı düzeyde artış, 5 metabolitin ise anlamlı düzeyde azalış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle grafiğin üst ve en sağ bölgesinde konumlanan metabolitler, hem yüksek derecede yukarı regülasyon göstermeleri hem de güçlü istatistiksel anlamlılık taşımaları açısından dikkat çekicidir. Bu durum, Volcano grafiğinin yapısından kaynaklanmaktadır: X eksenini $\log_2$

⁹ Kırmızı renk artış gösteren metabolitleri gösterirken, mavi renk azalış gösteren metabolitleri temsil etmektedir. Volcano Grafiğinin sağında yer alan kırmızı renk anlamlı artış gösteren metabolitleri, Volcano Grafiğinin solunda yer alan mavi renk ise anlamlı azalış gösteren metabolitleri ifade etmektedir. Orta kısımda yer alan gri renkli veya düşük kırmızı- maviliğe sahip olan dağılım ise anlamlı değişim göstermeyen metabolitleri ifade etmektedir. Grafikte D-Malic acid, 3-Hydroxymethylglutaric acid, L-Tyrosine, ve 2-Oxoarginine gibi metabolitler anlamlı şekilde artış göstermiştir. Stearic acid ise azalmış bir metabolit olarak mavi renkte gösterilmiştir.

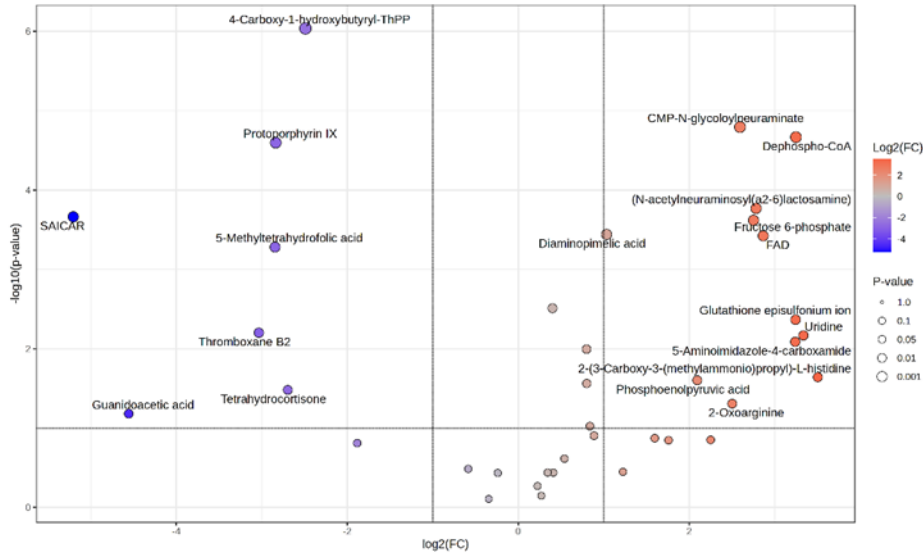
dönüşümü uygulanmış katlanma değişim değerlerini ($\log_2FC$), Y eksenini ise $-\log_{10}(p\text{-değeri})$ olarak gösterilen istatistiksel anlamlılık düzeyini temsil etmektedir. Bu nedenle, grafikte hem yatayda uzaklaşan hem de dikeyde yükselen metabolitler, biyolojik olarak anlamlı ve istatistiksel olarak güçlü değişimleri ifade etmektedir.



Şekil 21. Lin-35 solucanları kontrol grubu ve N2 solucanları kontrol grubu Volcano Grafiği¹⁰.

Gruplar arası metabolit düzeylerindeki farklılıkları ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen karşılaştırmalardan biri de lin-35 mutant *C. elegans* bireylerine uygulanan insülin grubu ile N2 (yabanıl tip) bireylerine uygulanan insülin grubunu kapsamaktadır. Bu karşılaştırmaya ait Volcano grafiği **Şekil 22**'de sunulmuştur. Analiz sonuçları, 12 metabolitin anlamlı düzeyde artış, 7 metabolitin ise anlamlı düzeyde azalış gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, insülin uygulamasına verilen metabolik yanıtın genetik altyapıya bağlı olarak farklılık gösterebileceğini ve lin-35 mutantlarının metabolik profillerinde insülin uyarısına karşı belirgin değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir.

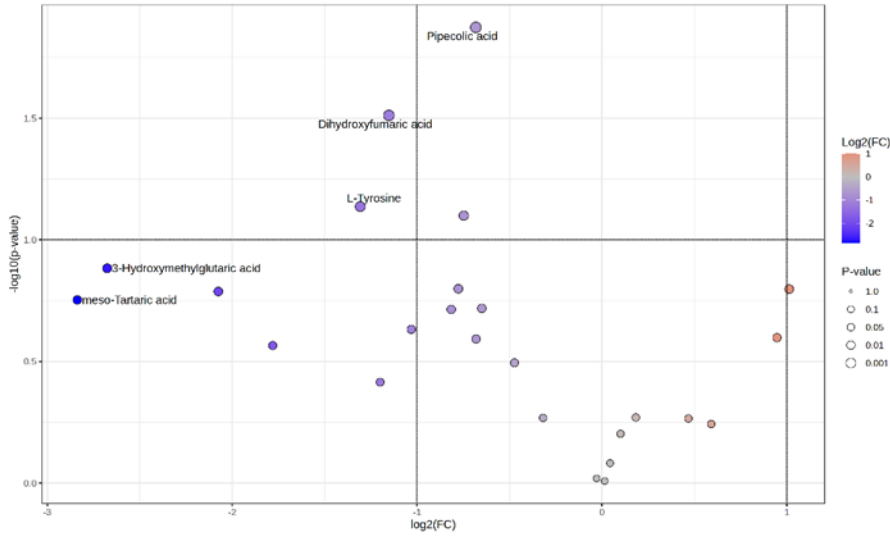
¹⁰ Volcano grafiğinde kırmızı renkle gösterilen metabolitler, deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösteren bileşikler temsil ederken; mavi renkle gösterilenler, anlamlı düzeyde azalış sergileyen metabolitleri ifade etmektedir. Grafiğin sağ tarafında yer alan kırmızı sinyaller, yukarı regülasyon gösteren metabolitlere; sol tarafındaki mavi sinyaller ise aşağı regülasyon gösteren metabolitlere karşılık gelmektedir. Orta bölgede, gri renkli ya da zayıf kırmızı-mavi tonlara sahip sinyaller ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermeyen metabolitleri temsil etmektedir. Bu analizde, anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlenen metabolitler arasında: 2-(3-Carboxy-3-(methylammonio)propyl)-L-histidine, CMP-N-glycolylneuramate, Glutathione episulfonium ion, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide, (N-acetylneuraminosyl(α2-6)lactosamine), 17-beta-Estradiol-3-glucuronide, FAD (Flavin adenine dinucleotide), 2-Oxoarginine, Glycerophosphocholine, Uridine, Fructose 6-phosphate ve Fumarik asit gibi bileşikler yer almaktadır. Öte yandan, azalış gösterdiği saptanan ve grafikte mavi renkle belirtilen metabolitler ise: Protoporphyrin IX, 4-Carboxy-1-hydroxybutyryl-ThPP, SAICAR (Succinylaminoimidazolecarboxamide ribose-5'-phosphate), 5-Methyltetrahydrofolic acid ve Tetrahydrocortisone olarak belirlenmiştir.



Şekil 22. Lin-35 solucanları insülin grubu ve N2 solucanları insülin grubu Volcano Grafiği¹¹.

Gruplar arası metabolit düzeylerindeki farklılıkları ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen karşılaştırmalardan biri de N2 suşu kontrol grubu ve insülin grubunu kapsamaktadır. Bu karşılaştırmaya ait Volcano grafiği **Şekil 23**'te sunulmuştur. Analiz sonuçları, 2 metabolitin anlamlı düzeyde artış, 2 metabolitin ise anlamlı düzeyde azalış gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, insülin uygulamasına verilen metabolik yanıtın genetik altyapıya bağlı olarak farklılık gösterebileceğini metabolik profillerinde insülin uyarısına karşı değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir.

¹¹ Volcano grafiğinde kırmızı renkle gösterilen metabolitler, deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösteren bileşikler, mavi renkle gösterilenler ise anlamlı düzeyde azalış gösteren metabolitleri temsil etmektedir. Grafiğin sağ tarafında konumlanan kırmızı sinyaller yukarı regülasyon gösteren metabolitleri, sol tarafa yer alan mavi sinyaller ise aşağı regülasyon gösteren metabolitleri ifade etmektedir. Orta bölgede bulunan gri renkli ya da zayıf kırmızı/mavi tonlara sahip sinyaller ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermeyen metabolitleri yansıtmaktadır. Bu kapsamda, anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlenen metabolitler arasında şunlar yer almaktadır: CMP-N-glycolylneuraminate, Dephospho-CoA, (N-acetylneuraminosyl(2-6)lactosamine), Diaminopimelic acid, Fructose 6-phosphate, FAD (Flavin adenine dinucleotide), Glutathione episulfonium ion, Uridine, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide, 2-(3-Carboxy-3-(methylammonio)propyl)-L-histidine, Phosphoenolpyruvic acid ve 2-Oxoarginine. Buna karşılık, anlamlı düzeyde azalış gösterdiği belirlenen metabolitler ise şunlardır: SAICAR (Succinylaminoimidazolecarboxamide ribose-5'-phosphate), 4-Carboxy-1-hydroxybutyryl-ThPP, Protoporphyrin IX, 5-Methyltetrahydrofolic acid, Thromboxane B2, Guanidoacetic acid ve Tetrahydrocortisone.



Şekil 23. N2 solucanları insülin grubu ve kontrol grubu Volcano Grafiği¹².

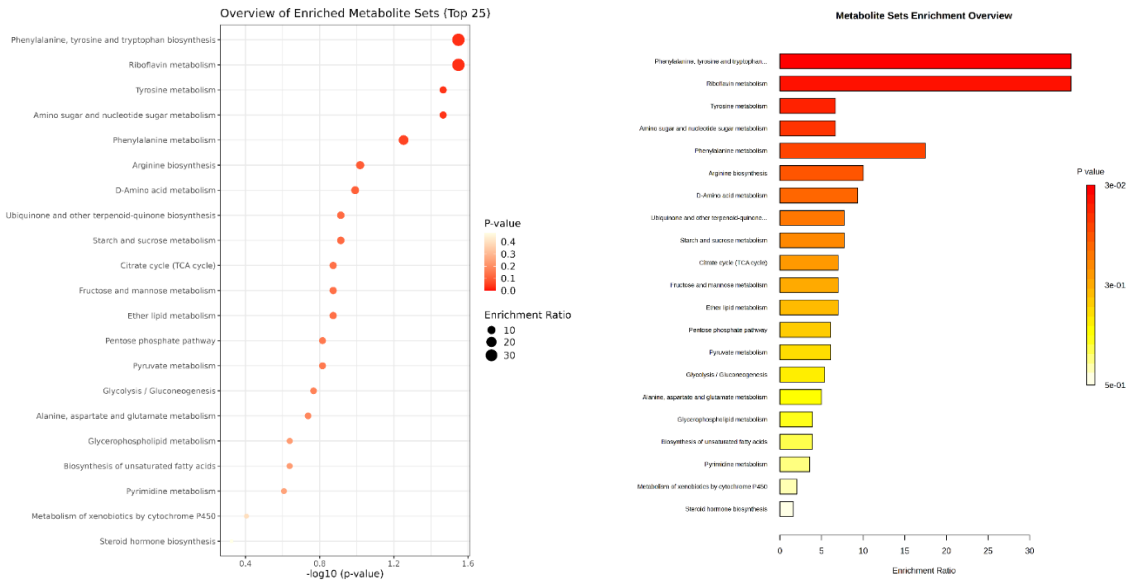
4.2. Gruplar Arasında Değişen Metabolitler ve Yolak Analizleri

Metabolik aktivite ve çalışma grupları arasındaki farkları ortaya koymak amacıyla, N2 ve lin-35 suşları ile bu suşların insülin ve kontrol grupları arasındaki metabolit profilleri, Bölüm 4.1’de ayrıntılı şekilde açıklandığı üzere ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bu analizlerin devamında, MetaboAnalyst 6.0 yazılımı kullanılarak elde edilen liste doğrultusunda KEGG veri tabanına ait kodlar eşleştirilmiş ve toplamda 38 endojen metabolit dahil edilerek yolak analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz ile N2 ve lin-35 suşları arasında, insülin uygulaması sonrası görev alan biyokimyasal sinyal yolları belirlenmiş ve Şekil 24’de görselleştirilmiştir.

Şekillerde yer alan grafik, ilgili metabolitlerin dahil oldukları metabolik yollara ve bu yolların istatistiksel olarak ne ölçüde etkilenmiş olduğunu göstermektedir. X eksen, p-değerinin negatif logaritması alınarak hesaplanan istatistiksel anlamlılığı yansıtırken; Y eksen, analizde tanımlanan metabolik yolları sıralamaktadır. Grafikteki balonların renk skalası, p-değerine bağlı olarak değişmekte olup koyu kırmızı renkteki balonlar daha yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık göstermektedir. Açık turuncudan sarıya doğru giden renk geçişleri ise daha az anlamlılık düzeyine karşılık gelmektedir. Balonların boyutu ise zenginleştirme oranını (enrichment ratio) temsil etmektedir. Bu oran, belirli bir metabolik yolda yer alan ve analizde saptanan metabolitlerin sayısına göre, yolağın deneysel koşullardan ne düzeyde etkilendiğini

¹² Volcano grafiğinde kırmızı renkle gösterilen metabolitler, insülin uygulanan *C. elegans* N2 grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösteren bileşikler, mavi renkle gösterilenler ise anlamlı düzeyde azalış gösteren metabolitleri temsil etmektedir. Grafiğin sağ tarafında konumlanan kırmızı sinyaller yukarı regülasyon gösteren metabolitleri, sol tarafta yer alan mavi sinyaller ise aşağı regülasyon gösteren metabolitleri ifade etmektedir. Orta bölgede bulunan gri renkli veya soluk kırmızı/mavi tonlara sahip sinyaller ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermeyen metabolitleri yansıtmaktadır. Bu bağlamda, insülin uygulanan grupta anlamlı düzeyde artış gösterdiği saptanan metabolitler arasında L-Tyrosine, Dihydroxyfumaric acid ve Pipecolic acid yer almaktadır. Buna karşın, anlamlı düzeyde azalma gösterdiği belirlenen metabolitler ise 3-Hydroxymethylglutaric acid ve meso-Tartaric acid olarak tespit edilmiştir.

kantitatif olarak yansıtmaktadır. Zenginleştirme oranı ne kadar yüksekse, ilgili yolakta o kadar fazla sayıda anlamlı değişim gösteren metabolit yer almaktadır. Grafikte Y ekseninde yer alan her bir yatay çubuk, bir metabolik yolu temsil etmektedir. Bu çubukların uzunluğu, zenginleştirme oranını ifade ederken; çubuğun rengi ise p-değerine göre istatistiksel anlamlılık düzeyini göstermektedir. Renk skalasında kırmızı tonlar ($p < 0.05$) istatistiksel olarak yüksek anlamlılık taşıırken, turuncu/sarı tonlar ($p \approx 0.1-0.3$) orta düzeyde anlamlılık ve beyaz-açık sarı tonlar ($p > 0.5$) anlamlı olmayan yolları işaret etmektedir. En koyu kırmızı renge sahip çubuklar, analizde istatistiksel olarak en anlamlı zenginleşme gösteren metabolik yolları temsil etmektedir.



Şekil 24. N2 ve lin-35 suşları zenginleştirilmiş yolak analizleri¹³.

¹³ X ekseninde daha sağda konumlanan noktalar, daha düşük p-değerlerini temsil etmekte olup istatistiksel olarak daha anlamlı metabolik yolları göstermektedir. Y eksenine ise analizde değerlendirilen metabolik yolları sıralamakta ve zenginleştirme derecesine göre bu yolların etkilenme düzeyini yansıtmaktadır. Balon renkleri p-değeri ile ilişkilidir; koyu kırmızı renk daha düşük p-değerini (yüksek istatistiksel anlamlılık), açık turuncu ve sarı tonlar ise daha yüksek p-değerini (daha düşük anlamlılık) ifade etmektedir. Balonların büyüklüğü, zenginleştirme oranını temsil eder; bu oran ne kadar büyükse, ilgili metabolik yolun analizde saptanan metabolitlerle o kadar fazla temsil edildiğini gösterir. Şekilde yer alan grafik, 38 endojen metabolitin toplam 21 metabolik yolakta yer aldığını ortaya koymaktadır. Bu yollar arasında özellikle Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis ile Riboflavin metabolisme yolları yüksek zenginleştirme oranı ve düşük p-değeri ile öne çıkmaktadır. Diğer 19 yolak ise değişen oranlarda etki göstermektedir; ancak Steroid hormone biosynthesis yolu, zenginleştirme oranı ve istatistiksel anlamlılık açısından en düşük etkiyi göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, pRB mutasyonuna sahip lin-35 ve yabancı tip N2 *C. elegans* solucanlarında, insülin tedavisi sonrasında kanserle ilişkili metabolik profili incelemek ve tanısal bir model geliştirmek amacıyla LC-Q-TOF-MS/MS tabanlı metabolomik analiz gerçekleştirilmiştir. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda insülin uygulama sonrasında model organizma *C. elegans*'ta metabolit değişimlerini ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada insülin maruziyeti sonrası *C. elegans* yabancı tip ve kanserle ilişkili mutant suşunda (lin-35/Rb) metabolit değişimleri LC-Q-TOF-MS/MS modern ileri teknik kullanılarak, metabolomdaki değişiklikler *in vivo* olarak belirlenmiştir. Böylelikle bu proje çıktılarının model organizma üzerinde metabolomik değişimleri incelenmiştir. *C. elegans* odaklı IIS-kanser ilişkisinin aydınlatılmış ve bu metabolizmada önemli rol oynayacak biyobelirteçler elde edilmesi sağlamıştır. Dolayısıyla projenin bu araştırmaları kapsayan şekilde olması ve araştırmanın literatüre ilk defa kazandırılacak olması yönünden özgün değeri oldukça yüksektir.

Genetik ve biyokimyasal veriler, pRB'yi çoğu insan kanserinde düzensizleşen doğrusal bir yola yerleştirmiştir. Retinoblastoma protein ailesi memeli hücrelerinin gerçek hücre, otonom hücre döngüsü düzenleyicileri olarak kabul edilir. RB'ler, E2F proteinlerinin transkripsiyonel aktivitesini azaltarak G1'den S fazına geçişi kontrol eder ve böylece çoğalma için gerekli hedef genlerin transkripsiyonel baskılanmasına yol açar. Buna karşılık, RB'lerin Siklin D/CDK4-6 tarafından fosforilasyonu, E2F'lerle etkileşimleri engelleyerek E2F aracılı transkripsiyonun indüklenmesine izin verir (Dick et al., 2018; Fiorentino et al., 2009) E2F ailesi, aktivatörleri (E2F1, E2F2, E2F3a ve E2F3b) ve öncelikle baskılayıcılar olarak tanımlanan üyeleri (E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 ve E2F8) içerir (Chang et al., 2024). RB'ler erken memeli gelişiminde merkezi bir rol oynarken (Brunet et al., 2020; Jacks et al., 1992) bu hücre döngüsü düzenleyici eksenindeki E2F bileşenleri de gelişimsel süreçleri etkiler. *C. elegans*'ın kanser araştırmalarındaki yararlılığını doğrulamıştır. Kanser *C. elegans*'ta araştırılabileceğini göstermek, onkogenik süreçlerle ilgili temel soruları çözmek için etik kaygılardan uzak, bu güçlü genetik modeli yeniden gözden geçirmeye yardımcı olmaktadır. *C. elegans*, kanser biyolojisi hakkında değerli bilgiler sağlamanın yanı sıra araştırmacıların yeni ve mevcut ilaçların hedeflerini, etki mekanizmalarını ve yan etkilerini anlamalarına da yardımcı olabilmektedir (Ceron, 2023). Basit, gereksiz olmayan genetik yapısı ve kültür kolaylığı nedeniyle temel sinyal yollarını ve davranışsal tepkileri araştırmak için mükemmel bir model olarak hizmet etmektedir. Hücresel durgunluğu indükleyerek ve koruyarak, omurgasızlardan memelilere kadar korunan DREAM transkripsiyonel baskılayıcı kompleksi, memeli hücre döngüsünün bekçisi olarak görev yapar (Goetsch et al., 2017). Dp, Retinoblastoma benzeri, E2F

ve MuvB'yi içeren oldukça korunan DREAM transkripsiyonel baskılayıcı kompleksi, bu hücre döngüsü durgunluk yolunu aracılık eder (Sadasivam & DeCaprio, 2013). Solucan DREAM kompleksinin bir bileşeni olan insan retinoblastoma proteininin bir ortoloğu olan Lin-35, *C. elegans*'ta bulunan bir cep proteindir ve rol oynadığı önemli mekanizmalardan biri apoptozdur (Schertel & Conradt, 2007). Lin-35'in EGF ailesinin bir üyesi olan lin-3 ekspresyonunu baskıladığı bulgusu, parakrin büyüme faktörü sinyallemesinin baskılanmasının, Rb ailesinin üyelerinin hücre büyümesini yavaşlattığı ve dolayısıyla kanseri önlediği bir mekanizma olma olasılığını gündeme getirmektedir (Polley & Fay, 2012). Bu nedenle, lin-35 fonksiyon analizinin yeni Rb ailesi tümör baskılama mekanizmalarına ilişkin önemli bilgiler sunabileceği öne sürülmüştür. Lin-35, kanserle ilişkili pRb fonksiyonuyla bağlantılıdır ve tümör baskılayıcı etkiye sahiptir (Ş. Berk et al., 2024). İnsülin, tümör güçlendirici etkilerini doğrudan preneoplastik ve neoplastik hücrelerdeki insülin reseptörü veya hibrit IR/IGF-1 reseptörleri aracılığıyla veya dolaylı olarak IGF-1, östrojenler veya diğer hormonlar aracılığıyla uygular. Mekanik bir bakış açısından, insülinin tümörler veya prekanseröz hücrelerdeki hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması, P13K/Akt yolunu aktive ederek, hücre büyümesinin ve mitogenezin merkezi düzenleyicisi olarak görev yapan memeli rapamisin hedefi kompleksinin aşağı akış aktivasyonuna yol açar (Pollak, 2008). Hem insülin hem de IGF-1, in vitro kanser hücresi proliferasyonunu destekleyen ve apoptozu baskılayan mitojenlerdir.

Yapılan bu tez çalışmasında, pRB eksikliği sonucu gelişen tümör oluşumu lin-35 solucan grupları ve yabanıl N2 solucanlarında insülin ilacı ön işleme tabi tutularak LC-Q-TOF-MS/MS analizi yapılmış ve metabolomik profillemeleri elde edilmiştir. Yapılan insülin ilaç ekleme işlemi sonrasında kanser metabolizmasında meydana gelen değişiklikler ve etkilenen yolların belirlenmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışmada tespit edilen metabolomik profillerdeki değişikliklerden kanser metabolomik gelişimi mekanizmalarının aydınlatılmasında katkı sağlayacağı ve yeni biyobelirteç hedeflerinin geliştirilmesine fayda sağlayabileceği öngörüsünde bulunulabilir.

LC-Q-TOF-MS/MS tabanlı metabolomik analizlerden elde edilen verilere biyoinformatik analizler uygulanarak pasajların metabolom profilleri belirlenmiş ve metabolik yolak analizleri sonucu değişim gösteren birçok metabolik yolağa etki ettiği tespit edilmiştir.

5.1. Veri İşleme Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Metabolomik çalışmalar hedef analitlerin önceden belirlenmediği, mümkün olan en fazla sayıda pikin tespit edilmesinin amaçlandığı çalışmalardır. Tespit edilen pik sayısı arttıkça bu piklerin arasında sahte pozitif/negatif sonuçların karışması da daha fazla olur. Yanlış pozitif sonuçlar, matris etkileri, çapraz kontaminasyon gibi nedenlerle oluşabilir. Bu etkiler, örnekte

bulunmayan metabolitlerin varmış gibi tespit edilmesine yol açar. Bunu önlemek amacıyla kullanılan yöntemlerden olan ardışık seyreltme yönteminde örnekler bir seri dilüsyon halinde hazırlanarak analiz basamağına eklenir ve pik eşleştirme yapılır. Bu işlemten sonra, örneklerin pik şiddetleri seyreltme faktörü ile kıyaslanarak pik şiddetlerinde aynı oranda değişim olup olmadığına bakılır (Kaplan & Çelebier, 2020). Kör çözelti kullanarak gerçekleştirilen filtreleme yönteminde, sadece çözücünden oluşan bir çözelti, örnek hazırlama basamağında gerçek örneklerle aynı adımlarla muamele edilir (Vuckovic, 2012). Veri işleme basamağında sinyal/gürültü oranlarına göre filtreleme yapılarak gürültü pikleri elimine edilir.

Veri işleme basamağında tez çalışmalarında yapılan karşılaştırma metabolit tanımlama yöntemleri arasındaki farklılıklardır. Metabolomik çalışmalarda metabolit tanımlama işlemi, bölüm 1.8. ve bölüm 1.9' da üzerinde durulduğu üzere çok katmanlı bir süreçtir. Metabolom, farklı kimyasal yapılar, polarite, moleküler ağırlık ve izomerler gibi çeşitli özelliklere sahip binlerce metaboliti içeren geniş ve karmaşık bir bileşikler kümesidir. Bu çeşitlilik, her bir metaboliti doğru bir şekilde tanımlamayı zorlaştırır. Ayrıca, metabolit tanımlama için kullanılan referans veri tabanları genellikle sınırlıdır ve tüm biyolojik sistemlerde bulunan tüm metabolitleri kapsamamaktadır, bu da bilinmeyen veya nadir bulunan metabolitlerin tanımlanmasını zorlaştırır.

Putative metabolit tanımlama, metabolomik çalışmalarda keşfedilen ve kimliği kesin olarak belirlenmemiş ancak bazı özellikleri (örneğin, kütle/yük oranı) bilinen metabolitlerin geçici olarak tanımlanmasıdır. **Şekil 13**'te putative ve kütüphane eşleşmeleri sonrası tanımlanan metabolitler kullanılarak gerçekleştirilen yolak analizi zenginleştirme sonuçlarına ait PCA grafikleri bulunmaktadır. Dört bileşenden oluşturulan ve toplam varyansın %63,2'ini açıklayan grafiğinde, birinci temel bileşen (PC1) %44, ikinci temel bileşen (PC2) ise %19,2'lik paya sahiptir. Elde edilen PCA grafiğinde N2 suşları arasında metabolomik düzeyde insülin uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında değişim temel olarak %50 oranındadır ki bu grafikte insülin uygulaması sonrası N2 suşundaki değişim neredeyse fark edilmemektedir. Ancak lin-35 suşları insülin uygulanan grup ve uygulanmayan kontrol grubu arasındaki değişim gözle görülür derecededir. Aynı zamanda lin-35 suşları ve N2 suşları arasında da farklılıklar açıkça gösterilmiştir. Putative ve kütüphane eşleştirmelerinin etkisiyle birbirlerinden bariz bir şekilde farklılaşmıştır. Bu bölümde elde ettiğimiz bilgiler ışığında sonuçlar üzerinde anlamlı bir farklılık yaratmadığını ancak metabolit tanımlamada kullanılan yöntemin ciddi farklılıklar yarattığı sonucuna ulaşarak, çalışmaların geri kalanında filtreleme için ekstraksiyon kör çözeltilerini, metabolit tanımlama için ise kütüphane eşleşmelerinin temel alındığı tanımlama yöntemleri kullandık.

Elde edilen metabolitler arasında zıt metabolik özellikler olup olmadığını **Şekil 14'** de yer alan ısı haritalaması ile gösterilmiştir. Sırasıyla kontrol grubu N2 solucanları, insülin eklenen N2 solucanları, insülin eklenen lin-35 solucanları ve kontrol lin-35 solucanları ile hedefsiz metabolomik analizler gerçekleştirdik. Lin-35 solucanları ve N2 solucanlarında toplam 75 farklı metabolit belirlenmiştir. Bunlardan endojen 38 metabolit ile sınırlama yapılmıştır. Eşleşen 38 endojen metabolit içerisinde kontrol lin-35 solucanlarında L-Arginin, cyclic GMP, fructose 6- phosphat, Glycerophosphocholine, Ureidosuccinic acid, Fumarik asit, 4-Hydroxybenzoic acid, Xanthosine, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide, Glutathione episulfoxide, 17-beta-Estradiol, 2-(3-Carboxy-3-(methylamino) propyl)-histidine, 2-Oxoarginine, FAD, (N-acetylneuraminic acid), CMP-N-glycolylneuraminic acid, D-Malic acid, 3-Hydroxymethylglutaric acid, meso-Tartaric acid, L-Tyrosine, Thymine metabolitleri önemli ölçüde artarken, kontrol N2 solucanlarında 5-Methyltetrahydrofolate, Protoporphyrin IX, SAICAR, 4-Carboxy-1-hydroxysemialdehyde, Tetrahydrocortisol düşük seviyelerde artış gösterilmiştir. Dikkat çekici bir şekilde lin-35 solucanları kontrol grubunda 21 metabolitin insülin takviyesi yapıldığında önemli ölçüde azaldığını gösterdik (**Şekil 14**). 21 metabolitin üre döngüsü ve arginin metabolizması, glikoliz / glukoneogenez, TCA (krebs) döngüsü, pentoz fosfat yolu, purine/pyrimidine metabolizması, steroid hormon biyosentezi, amino asit biyosentezi ve katabolizması, glutatyon metabolizması / antioksidan savunma ve sialik asit ve glikan metabolizması olduğunu tespit ettik.

Şekil 15'te lin-35 solucanları kontrol ve insülin grupları ve N2 solucanları kontrol ve insülin grupları arasında farklılaşan metabolitlerin VIP skor grafiği verilmiştir. VIP skor grafiğinin x ekseninde metabolitler, y ekseninde VIP skorları bulunmaktadır. VIP puanları, PLS-DA modeli aracılığıyla belirlenen istatistiksel olarak anlamlı metabolitler hesaplanmıştır. Bu puanlar, her değişkenin modeldeki grupların ayrılmasına olan katkısını nicelleştirir. En yüksek puan alan metabolitler en üsttedir ve bu da grup farklılaşmasına daha fazla katkıda bulunduklarını gösterir. Sağda renk gradyanı metabolit seviyelerini temsil eder, kırmızı yüksek bolluğu, mavi ise düşük bolluğu gösterir. Kontrol lin- 35 solucanların VIP skoru en yüksek seviyede seyreden en fazla metabolit sayısına sahiptir. Ancak insülin lin-35 solucanlarında bu skorlar neredeyse tamamında azalmış olarak görülür. Burada insülin ilacının lin-35 pRB üzerine etkisi dikkat çekmektedir. N2 solucanları kontrol grubu ve insülin grubunda metabolit VIP skorları arasında değişim PCA verileri ve ısı grafiğinde olduğu gibi düşük seviyelerde görülmüştür. **Şekil 16'**da Lin-35 solucanları kontrol grubu ve insülin grubu VIP grafiği 1.0 skorlarının üzerinde olan metabolitler olarak sınırlandırılmıştır. Sınırlamalar sonucu lin-35 solucanları kontrol ve insülin gruplarında 15 metabolit saptanmıştır. Bu grafiğe göre lin-35 kontrol grubu metabolit seviyeleri

12 metabolitte artış gösterirken sadece 3 metabolit lin-35 solucanları insülin grubunda lin-35 solucanları kontrol grubuna göre artış göstermektedir. **Şekil 17'** de N2 solucanları kontrol grubu ve lin-35 solucanları kontrol grubu VIP grafiği 1.0 skorlarının üzerinde olan metabolitler olarak sınırlandırılmıştır. Sınırlamalar sonucu N2 solucanları kontrol grubu ve lin-35 solucanları kontrol grubu arasında 15 metabolit saptanmıştır. Bu grafiğe lin-35 solucanları kontrol grubu metabolitlerinde 11 metabolit N2 solucanları kontrol grubundan daha yüksek seviyede VIP skoru vermiştir. N2 solucanları kontrol grubu metabolit skorlarından sadece 4 metabolitin lin-35 solucanları kontrol grubundan daha yüksek VIP skoruna sahip olduğu gösterilmektedir. Son olarak **Şekil 18'** de N2 solucanları kontrol grubu ve N2 solucanları insülin grubu VIP grafiği 1.0 skorlarının üzerinde olan metabolitler olarak sınırlandırılmıştır. Sınırlamalar sonucu N2 solucanları kontrol grubu ve lin-35 solucanları insülin grubu arasında 12 metabolit saptanmıştır. Bu grafiğe N2 solucanları kontrol grubu metabolitlerinde 11 metabolit N2 solucanları insülin grubundan daha yüksek seviyede VIP skoru vermiştir. N2 solucanları insülin grubu metabolit skorlarından sadece 1 metabolitin N2 solucanları kontrol grubundan daha yüksek VIP skoruna sahip olduğu gösterilmektedir. **Şekil 19'da** lin-35 ve N2 solucanlarına ait insülin grupları VIP skorları sunulmuştur. Bu analizde, yalnızca VIP grafiği 1.0 skorlarının üzerinde olan metabolitler değerlendirmeye alınmıştır. Belirlenen eşik doğrultusunda 20 metabolit bu kapsama girmiştir.

Ham verilere ek olarak, bu veriler üzerinden eşleşen metabolitlerin bir listesi oluşturulmuş ve bu liste temel alınarak, lin-35 solucanlarında bulunan metabolitler üzerine tartışma yapılmıştır. **Şekil 20'** de lin-35 solucanları kontrol grubu ve lin-35 solucanları insülin grubunda farklılaşan metabolitlere ait bir Volcano Grafiği sunulmuştur. Bu grafiğin ortasındaki dikey çizgiler arasında kalan kısımlar ve aşağıdaki yatay çizginin altında kalan kısımlar ve grubunda anlamlı olmayan noktalar, bu metabolitlerin kontrol grubu ve insülin grupları arasında önemli bir farklılık göstermediğini işaret eder. Mavi ve kırmızı kısımlar ise kontrol ve insülin gruplarındaki miktarı artmış veya azalmış metabolitleri göstermektedir. Azalmış olanlar mavi, artmış olanlar kırmızı ile gösterilmiştir. Bu grafik, metabolit profillerindeki değişikliklere genel bir bakış sunmakta, belirli metabolitlerin hangi gruplarda artış veya azalış gösterdiğini ve bu değişimlerin anlamlılık düzeylerini görsel olarak ortaya koymaktadır.

Elde edilen grafikte lin-35 solucanları kontrol grubu ve lin-35 solucanları insülin grubu arasında stearic acid seviyesinde anlamlı ölçüde azalma olduğu görülmektedir. Yine aynı grafikte D-Malic acid, 3-Hydroxymethylglutaric acid, L-Tyrosine, ve 2-Oxoarginine metabolit seviyelerinin anlamlı ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

1991 yılı kadar erken bir tarihte yapılan çalışmalar, yağ asitlerinin gen düzeyleri üzerindeki etkilerini transkripsiyonel veya transkripsiyonel düzenleme yoluyla uyguladığını göstermiştir (Distel et al., 1992). Bu düzenleyici mekanizmalar arasında, stearik asit, kodlamayan RNA'ların modülasyonu yoluyla insülin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Stearik asit farelere uygulandığında, araştırmacılar çeşitli mikro RNA'ların farklı ifade kalıplarını gözlemlemiştir. Örneğin, miR-34a-5p, adacık hücrelerinde en önemli yukarı düzenlemeyi sergilemiş ve özellikle B hücreli lenfoma (Bcl)-2 ve Bcl-w ifadesini baskılamıştır. Stearik asitle uyarılan miR-34a-5p'nin bu yukarı düzenlenmesi, p53'e bağlı bir sinyal yolu aracılığıyla endoplazmik retikulum (ER) stresine ilişkili sensör protein kinaz R benzeri endoplazmik retikulum kinazına atfedilebilir (Lu et al., 2016). Ayrıca, stearik asit pankreas β -TC6 hücrelerinde miR-297b-5p ve miR-374c-5p ekspresyonunu azaltmıştır. Bunun yanında, stearik asit dopamin salınımını uyarır ve beslenme motivasyonlarını ve yiyecek arama davranışlarını etkiler. Tip 2 diyabetin küresel yaygınlığı, hastalığın daha genç bireyleri etkilemeye başlamasıyla birlikte onlarca yıldır artmaktadır. Uzun zincirli (>C14) doymuş esterlenmemiş yağ asitlerinin pankreas adacık β hücrelerinde toksik etkilere yol açabileceği yaygın olarak kabul görmektedir ve yüksek stearik asit seviyelerine maruz kalmanın T2DM gelişimine baskın bir katkıda bulunan faktör olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (Shen et al., 2025), bu da insülin direncinden (IR) ve β hücresi lipotoksisitesinden kaynaklanmaktadır. IR, insülin talebini artırır ve β hücre kütesinin genişlemesi ve gelişmiş insülin salgılanması yoluyla β hücresi telafisini harekete geçirir ve en sonunda hiperinsülinemiye yol açar. Stearik asit metabolizmasını hedeflemek T2DM'yi iyileştirmek için önemli bir strateji olabilir. Stearik asidin tümör biyolojisi üzerindeki etkisi çok yönlüdür ve tümör büyümesi, metastaz ve anjiyogenezi kapsar. Bir yandan stearik asidin kanser hücresi çoğalmasını doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir (Fermor et al., 1992; Gleeson et al., 1990; Sylvester et al., 1993) (Shen et al., 2025), öncelikle DNA sentezine müdahale ederek ve hücre döngüsü düzenleyici ifadesinin baskılanması yoluyla (C. Li et al., 2011). Diğer çalışmalar stearik asidin doymuş ve doymamış yağ asitlerinin dengeli oranını koruyabileceğini ve böylece tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe edebileceğini öne sürmektedir (Habib et al., 1987). Ek olarak stearik asidin yağ asidiyle ilişkili bir enzim olan asil-CoA sentetaz uzun zincir ailesi 5'in ekspresyonunu yukarı düzenlemekte rol oynadığı ileri sürülmüştür (Zhang et al., 2021).. Öte yandan, diyet stearik asidi tümör üretimi için gerekli olan belirli çoklu doymamış yağ asitlerinin kullanılabilirliğini engeller ve tümör insidansını düşürür veya tümör gelişiminde gecikmeye neden olur (Bennett, 1984). *In vitro* deneyler, stearik asidin laminin integrin reseptörünü içeren bir mekanizma yoluyla tümör hücresi yapışmasını ve dolayısıyla invazyon ve genişlemeyi engellediğini

göstermiştir (Singh et al., 1995). Stearik asidin antikanser özelliklerinin yanı sıra, ilaç direnci için etkili stratejiler geliştirmek için çok önemli olan tümör kemoterapisinde hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir (Tang et al., 2022). Tümörlerde, stearik asidi hedeflemek ilerlemesini önemli ölçüde iyileştirebilir. Stearik asidin metabolik yeniden programlamada önemli bir enzim olan pirüvat dehidrogenaz kinazı inhibe ettiği ve nihayetinde kolorektal adenokarsinom hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Mitchel et al., 2021). Stearik asit ayrıca S-asilasyon yoluyla onkojenik sinyal AKT iletimini inhibe eder (Nuskova et al.).

Şekil 21'de lin-35 solucanları kontrol grubu ve N2 solucanları kontrol grubunda farklılaşan metabolitlere ait bir Volcano Grafiği sunulmuştur. Bu grafiğin ortasındaki dikey çizgiler arasında kalan kısımlar ve aşağıdaki yatay çizginin altında kalan kısımlar ve grubunda anlamlı olmayan noktalar, bu metabolitlerin kontrol grubu lin-35 solucanları ve kontrol grubu N2 solucanların arasında önemli bir farklılık göstermediğini işaret eder. Mavi ve kırmızı kısımlar ise lin-35 kontrol grubu ve N2 kontrol gruplarındaki miktarı artmış veya azalmış metabolitleri göstermektedir. Azalmış olanlar mavi, artmış olanlar kırmızı ile gösterilmiştir. Bu grafik, metabolit profillerindeki değişikliklere genel bir bakış sunmakta, belirli metabolitlerin hangi gruplarda artış veya azalış gösterdiğini ve bu değişimlerin anlamlılık düzeylerini görsel olarak ortaya koymaktadır.

Elde edilen grafikte lin-35 solucanları kontrol grubu ve N2 solucanları kontrol grubu arasında Protoporphyrin IX, 4-Carboxy-1-hydroxybutyryl-ThPP, SAICAR, 5-Methyltetrahydrofolic acid seviyesinde anlamlı ölçüde azalma olduğu görülmektedir. Yine aynı grafikte 2-(3-Carboxy-3-(methylammonio)propyl)-L-histidine, CMP-N-glycoloylneuraminate, Glutathione episulfonium ion, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide, (N-acetylneuraminosyl(2-6)lactosamine), 17-beta-Estradiol-3-glucuronide, FAD (Flavin adenine dinucleotide), 2-Oxoarginine, metabolit seviyelerinin anlamlı ölçüde arttığı tespit edilmiştir. **Şekil 22**'de lin-35 solucanları insülin grubu ve N2 solucanları insülin grubunda farklılaşan metabolitlere ait bir Volcano Grafiği sunulmuştur. Bu grafiğin ortasındaki dikey çizgiler arasında kalan kısımlar ve aşağıdaki yatay çizginin altında kalan kısımlar ve grubunda anlamlı olmayan noktalar, bu metabolitlerin lin-35 solucanları insülin grubu ve N2 solucanları insülin grubu arasında önemli bir farklılık göstermediğini işaret eder. Mavi ve kırmızı kısımlar ise lin-35 solucanları insülin grubu ve N2 solucanları insülin grubu miktarı artmış veya azalmış metabolitleri göstermektedir. Azalmış olanlar mavi, artmış olanlar kırmızı ile gösterilmiştir. Bu grafik, metabolit profillerindeki değişikliklere genel bir bakış sunmakta, belirli metabolitlerin hangi gruplarda artış veya azalış gösterdiğini ve bu değişimlerin anlamlılık düzeylerini görsel olarak ortaya koymaktadır.

Elde edilen grafikte lin-35 solucanları insülin grubu ve N2 solucanları insülin grubu arasında CMP-N-glycolylneuraminate, Dephospho-CoA, (N-acetylneuraminosyl (2-6) lactosamine), Diaminopimelic acid, Fructose 6-phosphate, FAD gibi metabolitler anlamlı artış gösterirken SAICAR, 4-Carboxy-1-hydroxybutyryl-ThPP, Protoporphyrin IX ise anlamlı azalış göstermektedir.

Metabolomik yolak analizleri, hücrelerin ve organizmaların biyokimyasal ve metabolik süreçlerini derinlemesine anlamamızı sağlayan güçlü bir araçtır. Bu analizler, bir organizmadaki metabolitlerin bütünsel bir profili çıkarılarak farklı metabolik yolların dinamiklerini incelemeye olanak tanır. Özellikle hastalık süreçlerinin anlaşılması, biyobelirteçlerinin tanımlanması ve metabolik yanıtların değerlendirilmesinde önemli bir rol oynar. Metabolik yolak analizleri ayrıca, belirli bir hücre ya da dokunun stres koşullarına, ilaçlara ya da çevresel faktörlere verdiği yanıtları takip etmek için de kullanılabilir. Bu analizler, hücre metabolizmasındaki kilit adımları, düzenleyici mekanizmaları ve yollar arasındaki karmaşık etkileşimleri ortaya çıkararak, hem temel biyoloji araştırmalarında hem de biyomedikal uygulamalarda yenilikçi yaklaşımlar geliştirilmesine zemin hazırlar (Zhang et al., 2013). **Şekil 23**'te N2 solucanları insülin grubu ve kontrol grubu farklılık gösteren metabolitlerin Volcano Grafiği yer almaktadır. Elde edilen insülin uygulanan grupta anlamlı düzeyde artış gösterdiği saptanan metabolitler arasında L-Tyrosine, Dihydroxyfumaric acid ve Pipecolic acid yer almaktadır. Buna karşın, anlamlı düzeyde azalma gösterdiği belirlenen metabolitler ise 3-Hydroxymethylglutaric acid ve meso-Tartaric acid olarak tespit edilmiştir.

Şekil 24'te N2 ve lin-35 suşları zenginleştirilmiş yolak analizleri genel görünümü verilmiştir. Amino asitler, hastalıkların potansiyel biyobelirteçleri olarak susturulmuş bileşiklerdir. Yakın zamanda yapılan bir inceleme, triptofanın çeşitli kanser türlerinde en sık değişen konsantrasyonlara sahip metabolit olduğunu göstermiştir (Liesenfeld et al., 2013). Aromatik amino asitler l -triptofan (Trp), l -tirozin (Tyr) ve l -fenilalanin (Phe), serotonin (Trp) veya epinefrin ve dopamin (Tyr ve Phe) gibi nörotransmitterlerin ve hormonların doğrudan veya dolaylı öncüleri olarak görev yapar (Krzyściak, 2011).

Triptofan ve fenilalanin, insan diyetindeki temel amino asitlerdir. Tirozin, diğer amino asitler gibi, proteinlerin yapı taşıdır ve hücresel işlevler için alternatif bir enerji kaynağıdır (Nguyen et al., 2020). Triptofan metabolizması serotonin üretimiyle bağlantılıdır. Fenilalanin, esansiyel olmayan amino asit tirozinin üretimi için gereklidir. Tirozinin fenilalanininden üretimi ilk olarak 1934'te Womack ve Rose tarafından keşfedilmiştir (Womack & Rose, 1934). Aromatik amino asit tirozin, protein sentezi için bir yapı taşı, bir enerji kaynağı ve melanin ve dopamin ve diğer katekolaminler de dahil olmak üzere çeşitli nörotransmitterlerin sentezi için bir öncü olmak da

dahil olmak üzere birçok metabolik rol oynar. Tirozin için şu anda bilinen bu işlevlerin ötesinde, son çalışmalar tirozinin hem metabolizmada hem de hücre çoğalmasının kontrolünde düzenleyici roller oynayabileceğini öne sürmüştür (Newgard et al., 2009). Ek olarak, normalde tirozini enerjiye dönüştürmek için hareket eden tirozin aminotransferaz (TAT) enzimi, apoptozu teşvik etmek ve hepatoselüler karsinom gelişimini önlemek için hareket eden bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. Tümör hücreleri, yükselmiş metabolik aktivitelerini karşılamak için özellikle Trp ve Phe gibi esansiyel amino asitler olmak üzere amino asitlere olan yüksek taleple karakterize edilir. Bu amino asitlerin tükenmesinin hücre büyümesi ve sağkalımı üzerinde önemli bir etkiye sahip olması muhtemeldir (Butler et al., 2021). Hem omurgalılarda hem de solucanlarda, tirozin metabolizması ile insülin sinyalleme arasında bir bağlantı olduğunu düşündüren veriler mevcuttur (Spencer et al., 1978). Tirozini fumarat ve asetoasetata dönüştüren korunan bir bozunma yolunun ilk adımını katalize eden TAT, omurgalılarda insülin sinyallerinin düzenlenmesinin bir hedefi olarak iyi çalışılmış olup, insülin etkileri hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde görülmüştür. Aromatik amino asitlerin metabolik hastalıktaki kesin rolü bilinmemekle birlikte, insülin direncinde veya diyabet gelişiminde nedensel bir rol oynayabileceğini ileri sürmektedir (Langenberg & Savage, 2011). Tirozin düzeyleri arttıkça, solucanlarda olduğu gibi, artışların insülin sinyaline verilen yanıtları değiştirmesi ve önceden var olan insülin direncini zararlı bir şekilde artırması mümkündür. İnsülin sinyalizasyonu ile tirozin metabolizması arasındaki bağlantı, potansiyel olarak azalmış insülin sinyalizasyonunun, yükselmiş tirozin seviyelerine yol açması ve bunun da daha sonra insülin sinyalizasyonunda daha fazla azalmaya yol açması gibi bir kısır döngüye bile yol açabilir (A. A. Ferguson et al., 2013).

Farklı amino asit seviyelerinin tümörler üzerinde farklı etki seviyeleri vardır ve tümör tedavileri amino asit metabolizmasını değiştirebilir, dolayısıyla tümör mikro çevresini etkileyerek tedaviye yanıtı etkileyebilir. Trp ve metabolitleri, Trp'nin proteinlerin yapı taşı olarak hizmet ettiği hücre büyümesi ve bakımı ile Trp metabolitlerinin nörotransmitter ve sinyal molekülleri olarak hizmet ettiği çevresel ve diyet ipuçlarına organizmanın verdiği tepkilerin koordinasyonu arasında değişen çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rollere sahiptir (Cervenka et al., 2017). Birkaç kanıt dizisi, Trp metabolizmasının kanser üzerinde önemli bir rol oynayabileceğini, antitümör bağışıklık tepkilerini baskılayarak ve kanser hücrelerinin kötü huylu özelliklerini artırarak tümör ilerlemesini teşvik edebileceğini göstermektedir (Platten et al., 2019). Yapılan bir diğer araştırmada araştırılan üç aromatik amino asidin (tirozin, fenilalanin ve triptofan) gastroözofageal kanserli hastaların mide içeriğinde ve dokularında arttığını göstermektedir. Tirozin ve fenilalanin düzeyleri bu hastaların idrarında da artmıştır (Wiggins et al., 2015). Bu

çalışmada elde edilen zenginleştirilmiş yolak analizdeki phenylalanine, tyrosine, ve tryptophan biyosentez metabolizması en çok artış göstererek iki yolaktan biridir.

Riboflavin (7,8-dimetil-10-ribitil-izooloksazin), B2 vitamini olarak da bilinir, çok çeşitli metabolik yollarda rol oynar, çünkü çok sayıda enzimatik reaksiyonda kullanılan temel yardımcı faktörler flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid'in (FAD) öncüsüdür (Joosten & van Berkel, 2007; Lienhart et al., 2013). Riboflavin, elektron taşıma zincirindeki 2 elektronlu alıcı/verici ve 1 elektronlu alıcı/verici komplekslerinin kontrolünde merkezi bir rol oynar (Giulivi et al., 2010).

Bir çalışma, orta düzeyde riboflavinin apoptozisin dışsal yolunu etkileyebileceğini, daha yüksek miktarların ise birçok antiapoptotik faktörü aşağı düzenleyerek ve birçok diğer apoptozis indükleyici faktörü yukarı düzenleyerek apoptozisin içsel yolu gibi ek hücre ölüm mekanizmalarını aktive edebileceğini ileri sürmektedir (Hassan et al., 2013). Riboflavin apoptozu ve otofajiyi indükleyebilir ve kemoradyoterapi altındaki kanser tedavisinin yönetimi için yararlı olabilir (Hassan et al., 2013). Bu çalışmada elde edilen zenginleştirilmiş yolak analizdeki riboflavin metabolizması en çok artış göstererek ikinci yolak olarak görev almaktadır.

Amino şekerler, hidroksil fonksiyonelliklerinden en az birinin bir amino grubu ile ikame edildiği şeker türevleridir. Heksoz veya pentoz yapılarına bir amino grubunun eklenmesi, bu moleküllerin fizikokimyasal özelliklerini ve biyolojik aktivitelerini önemli ölçüde değiştirir (Skarbek & Milewska, 2016). Yapılan çalışmalarda MetaboAnalyst veri tabanı üzerinden Amino şeker nükleotid şeker metabolizması metabolitlerinin detaylı analizinde fruktoz 6-fosfat ve CMP-N-glikolilneuraminik asit olduğu görüntülenmektedir.

Arginin çok yönlü bir amino asittir. Protein sentezinde bir yapı taşı rolünün yanı sıra poliaminler, kreatin ve nitrik oksit için bir öncüdür (Mossmann et al., 2018). Arginin ayrıca prolin ve glutamat ile dönüştürülebilir ve mTORC1'i aktive ederek hücre büyümesini destekleyebilir. Dahası, argininin metabolizmayı en azından kısmen mTORC1'den bağımsız olarak etkilediğine dair kanıtlar vardır (Mossmann et al., 2023). mTOR, ribozom biyogenezisi ve protein, nükleotid, yağ asidi ve lipid sentezi gibi anabolik süreçleri teşvik eder ve otofaji gibi katabolik süreçleri inhibe eder (Saxton & Sabatini, 2017). mTOR sinyalinin inhibisyonu, özellikle mTORC1 inhibisyonu, bir antikanser stratejisi olarak araştırılmıştır ancak sınırlı bir başarıya sahiptir. Rapamisin analogları (rapaloglar) mTORC1 efektörü 4EBP'nin fosforilasyonunu tamamen inhibe etmez ve mTORC2–AKT aktivitesinin telafi edici yukarı regülasyonuna yol açar. Besin algılama mTORC1 aktivasyonunda önemli bir rol oynar. Bu nedenle, kanser hücresi metabolizmasındaki ve hücre içi besin seviyelerindeki değişiklikler de

mTORC1 aktivasyonunun sürdürülmesine katkıda bulunabilir. Buna karşılık, kanser hücresi metabolizmasındaki değişiklikler mTOR sinyalleme tarafından yönlendirilir ve mTOR sinyalleme tarafından teşvik edilen metabolik yollar arasında amino asit, glikoz, nükleotid, yağ asidi ve lipid metabolizması bulunur (Saxton & Sabatini, 2017).

Metabolik yol zenginleştirme analizi, amino asit metabolik yollarının ve özellikle arginin metabolizmasının L-dKO tümörlerinde güçlü bir şekilde değiştiği ifade edilmiştir (Keshet et al., 2018). Arginin sentezleyen üre döngüsündeki değişiklikler kanserde yaygındır. 11 eşleştirilmiş tümör ve tümör dışı hasta biyopsilerinde hedeflenmemiş metabolomikler, üre döngüsü metabolitleri ornitin ve sitrülünin azaldığını, arginin ve asetillenmiş poliaminlerin ise arttığını ortaya koymaktadır (Keshet et al., 2018). Enerji metabolizmasına dair metabolomik analizler, sitrik asit döngüsü (TCA döngüsü) metabolitlerinde ve glikolizle ilişkili bileşiklerde önemli değişiklikler göstermiştir. Kanser hücrelerinin büyümesi sırasında glikoliz tarafından büyük miktarda enerji üretildiğini ve bunun normal hücrelerde gözlenen ve oksidatif fosforilasyonu içeren enerji metabolizmasından farklı olduğunu bildirmiştir. Bu bulgu, kanser ve normal hücrelerin farklı büyüme modellerinin, dahil olan farklı enerji üretim yollarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Hücre çoğalması nedeniyle kanser hücrelerinde glikoz alımı, aerobik glikoliz ve metabolizma oranları artmaktadır (Du et al., 2021). Çalışmada sitrik asit metaboliti lin-35 solucanları kontrol grubu ve N2 solucanları kontrol grubu Volcano Grafiğinde ifade edildiği üzere en düşük yükseklikte yer almaktadır. Sağlıklı hücrelerdeki enerji, şeker moleküllerini oksitleyen mitokondrilerden gelir; buna karşın tümör hücreleri enerji için esas olarak oksijen atomlarının veya mitokondrilerin katılımını gerektirmeyen glikolize güvenir (Di Gioia et al., 2020). Çalışmada ısı grafiğinde N2 solucanları kontrol grubu ve N2 solucanları insülin grubu arasında neredeyse hiç fark görünmemektedir. Kanser hücreleri, farklı metabolik yollarla hücre büyümesini ve çoğalmasını sürdürür. Yeni kanser hücreleri, hücrelerin redoks durumunu korumak için proteinler, nükleik asitler, lipidler ve önemli yardımcı faktörler dahil olmak üzere çok sayıda biyomoleküler bileşene ihtiyaç duyar. Amino asitler, tümörler tarafından gelişim sırasında besin kaynağı olarak kullanılır; ayrıca yeni kanser hücreleri tarafından ana karbon kaynağı olarak da kullanılabilirler (Voeller et al., 2004).

Daha önce yapmış olduğumuz çalışmada pRB mutasyonu *C. elegans* lin-35 solucanları insülin ön işleme tabi tutulması sonrası yaşam süresi uzadığı ve yumurta verimliliğinin arttığını tespit ettik. Burada meydana gelen değişimlerin reseptör *daf-2*'nin ifadesinde bir azalmaya neden olarak uzun ömürle ilişkilendirilmiştir, böylece IIS yolunu inhibe ettiği ifade etmiştir. Lin-35 solucanlarında insülin veya IGF-1'in hem DAF-16/FOXO'ya bağımlı hem de mTOR'a bağımlı mekanizma yoluyla yaşam süresini uzatabileceği sonucunu da ifade ettik (Berk, 2024). Elde

edilen bu sonuçlar ayrıca ifade edilen metabolit ve yolaklar göz önünde bulundurularak *C. elegans* IIS yolu, DAF-16/FOXO ve mTOR sinyal yolu literatür araştırmaların önünü açmıştır. Hahn ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir diğer çalışmada (Hahn et al., 2019) metformin ve DR gibi metabolik stresi indükleyerek etki eden uzun ömür müdahalelerinin, mitokondriyal kırılmalardan ve bozulmuş metabolik esneklikten etkilenen yaşlı organizmalar için uygun olup olmadığını sorgulanmıştır (Espada et al., 2020). Diyabetli kişilerde yapılan sağkalım analizlerine dayanarak, metforminin uzun ömür faydalarının metabolik olarak sağlıklı yaşlı bireylere de uzanabileceği öne sürülmüştür ve bu durum metforminin insanlarda ilk olası yaşlanma karşıtı ilaç olarak klinik testlerine yol açmıştır. İnsülin sinyalleme ile FOXO transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi arasındaki ters korelasyon nematodlar ve insanlar arasında korunmuştur (Martins et al., 2016) ve diyabetli farelerde artmış FOXO aktivitesi tespit edilmiştir (Battiprolu et al., 2012). Diyabette yüksek FOXO aktivitesinin sonuçları tam olarak anlaşılmamış olsa da FOXO tarafından indüklenen gen ifadesi programları türler arasında karşılaştırılabilir. FOXO ekseninin, nematodlardaki rolüne benzer şekilde diyabetli kişileri ileri yaştaki metformin toksisitesinden koruması olasıdır. İlginç bir şekilde, yakın tarihli bir çalışma, DR'nin yaşlı farelerde sağlık uzatma tedavisi olarak etkinliğini kaybettiğini (Hahn et al., 2019) ve buna değişmiş lipid metabolizmasının ve mitokondriyal biyogenezin 'omik' imzalarının eşlik ettiğini bulmuştur. Bu çalışma, geç yaşta başlanan metformin tedavisinin ölümcül ATP tükenmesi ve hücre ölümüyle sonuçlanan bir metabolik başarısızlıklar dizisine neden olduğunu göstermektedir. Bu çalışma ışığında diyabetli kişilerde kullanılan ilk olası yaşlanma karşıtı ilaç artan FOXO aktivitesine sebep olduğu ve lipid metabolizması ve mitokondriyal biyogenez eşlik ettiği saptanmıştır. Bu tez çalışmasında da solucanlar diyabet ile ilişkilendirilen solucanlarda insülin uygulaması sonrası mitokondriyal metabolitler seviyelerinde azalma olduğu ancak bazı mitokondri ve enerji metabolitlerinin yine de artış gösterdiği ifade edilmiştir. Ancak bu metabolitlerin N2 suşu kontrol grubu ve lin-35 suşu kontrol gruplarında düşük seviyelerde VIP skoruna karşılık geldiğine görülmektedir.

WormBase veritabanındaki farklı genlerin fonksiyonel tanımı, en önemli şekilde yukarı ve aşağı düzenlenen ilk beş genin nükleer reseptör *daf-12* ve insülin/IGF-1 sinyal yollarının (*daf-2*) *daf-16* ve *hsf-1* dahil aşağı akışından etkilendiğini ortaya koyar. Total ginsenoside ön işlemine alınan *C. elegans* solucanlarında yaşam süresinin uzadığı tespit edilmiştir (Yu et al., 2021). Yaşam süresi düzenleyici yollarında zenginleştirilmiş farklı şekilde ifade edilen genler, *jnk-1*, *phi-62* ve *nhr-80*'in önemli ölçüde yukarı düzenlendiğini gösterilmiştir. Jnk-1 ve phi-62, DAF-16'yı aktive eden ve *C. elegans*'ın yaşam süresini uzatan transkripsiyon faktörü DAF-16'nın yukarı akışındadır (Kawasaki et al., 1999). Bu sonuçlar *C. elegans*'ın *fard-1* geninin,

nükleer reseptör DAF-12 tarafından düzenlenen bir lipid asil-CoA redüktazını kodlaması öngörülmektedir. Bu dört gen, lipid metabolizmasını ve uzun ömürlülüğü düzenler (Yu et al., 2021). Daf-2 sinyal yoluna olan ilgi kısmen genin yağ ve karbonhidrat metabolizmasında rol oynaması, insülinin bir otologu olması, ancak aynı zamanda yaşlanmada rol oynaması ve *C.elegans*'ta üremede önemli bir role sahip olması gerçeğini yansıtmaktadır. Daf-2 üzerinde yapılan araştırmanın sonuçları, ROS'un yaşlanma üzerindeki etkisine ilişkin teoriye önemli bir katkı sağlamıştır. Yapılan bir diğer çalışmada amino asit metabolizmasındaki değişiklikler, hem NMR spektroskopisi hem de GC-MS ile tespit edilen sulu profillerden açıkça N2 solucanlarındaki amino asit içeriği, *daf-2* mutanttakinden daha yüksektir ve bu, daha önce bildirildiği gibi *daf-2*'de amino asitlerin daha yüksek bir katabolizmasına doğru bir kayma ile iyi bir uyum içindedir (Fuchs et al., 2010). Bu tez çalışmasında da amino asit içeriği N2 solucanları grubunda N2 solucanları insülin eklenmesine göre daha yüksek seviyelerde ifade edilmiştir. Ancak pRB mutasyonlu *lin-35* solucanları artan enerji ve ATP ihtiyaçlarından dolayı N2 solucanlarında *lin-35* solucanlarına kıyasla bu ifadeler daha düşük seviyelerde görülmüştür. Memeli Nrf transkripsiyon faktörü *C. elegans*'ın SKN-1'i ile otologdur ve yaşam süresinin artmasındaki rolü iyi belgelenmiştir (Pearson et al., 2008). Yapılan bir diğer çalışmada *skn-1*-RNAi solucanlarındaki metabolit seviyelerinin N2'e kıyasla kat değişimi hesaplanmıştır. *C. elegans*'ta daha düşük bir AMP/ATP oranının, daha yüksek bir AMP/ATP oranına sahip olanlara kıyasla daha uzun bir yaşam süresiyle sonuçlandığını öne sürülmüştür (Apfeld et al., 2004). Benzer şekilde, AMP/ATP oranındaki artışın hücresel AMPK yolunun aktivasyonundan kaynaklandığı öne sürülmüştür. (Hardie et al., 2012). ATP esas olarak mitokondri bazlı TCA döngüsü yoluyla üretildiğinden, TCA döngüsüyle ilişkili metabolitlere ve genlere bakılır. Bu çalışmada TCA döngüsünde bir artış meydana gelmemiştir ancak bu tez çalışmasında TCA döngüsü ifade edildiği üzere yüksek oranda artış gösteren yollardan bir tanesidir. Dahası D-Malic acid, Fumaric acid ve Succinic acid TCA döngüsü ile doğrudan ilişkili metabolitlerdir ve dört çalışma grubu içerisinde kontrol *lin-35* solucanlarında en yüksek ifadeye sahiptir bu sonuçlar yaşam süresi uzaması ve ATP ihtiyacı ile paralel sonuç sağlamıştır.

6. SONUÇ

Bu tez çalışması, pRB inaktivasyon lin-35 solucanlarına insülin eklenmesi sonucu meydana gelen metabolik değişimlerin N2 yabanıl solucanları ve pRB inaktivasyon lin-35 solucanlarının kapsamlı bir şekilde incelenmesi ve hastalığın biyokimyasal mekanizmalarına dair yeni bilgiler elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Metabolomik analiz yöntemleri, hastalık biyobelirteçlerinin tespiti ve biyolojik yolların detaylı olarak değerlendirilmesi açısından önemli bir yaklaşım sunmaktadır. Çalışmada kullanılan LC-Q-TOF-MS/MS, pRB inaktive metabolit düzeylerindeki olası farklılıkları ortaya koymada etkili bir şekilde kullanılmıştır.

Analiz sonuçları, enerji metabolizması, lipid metabolizması, amino asit metabolizması gibi biyolojik süreçlerde belirgin değişimlere işaret etmektedir. L-Tyrosine, 2-Oxoarginine, D-malic asit ve Stearik asit gibi metabolitlerin seviyelerindeki farklılıklar, kanser/diyabet modeli ile ilişkilendirilebilecek önemli bulgular arasında yer almaktadır. Bu metabolitler hem kanser süreçlerinde hem de insülin düzenlenmesinde kritik roller üstlenebilir. Özellikle amino asit ve enerji metabolizmasında gözlemlenen değişiklikler, kanser/diyabet potansiyel etkilerini düşündürmektedir.

Çalışmada elde edilen tüm grafiklerde amino asit metabolizmasında yer alan metabolitler lin-35 solucanlarında düşük skorlarda olduğu ifade edilmiş ancak N2 solucanlarında bu metabolitler yüksek seviyelerde skorlarla ifade edilmiştir.

Çalışmanın bir diğer önemli çıktısı, kanser solucan modelinde metabolomik profillemeye ile elde edilen verilerin, hastalığın erken teşhis ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarında biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelidir. Bununla birlikte, metabolit düzeylerindeki değişikliklerin klinik uygulamaya entegre edilebilmesi için fare modeli veya hücre modelleri grupları üzerinde yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut çalışmada, pRB inaktif lin-35 solucanları sağlıklı kontrollerden ayırmak için metabolomik ve çok değişkenli analizler bir araya getirilerek kanser metabolik özellikleri belirlenmeye ve kanser diyabet ilişkili prognoz daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır. Gelecekteki çalışmalar genomik ve proteomik yöntemleri birleştirerek kanser/diyabet biyobelirteçleri ve aday tedavi hedefleri hakkında daha fazla bilgi edinilmelidir.

KAYNAKÇA

- Abdelhafez, O. H., Othman, E. M., Fahim, J. R., Desoukey, S. Y., Pimentel-Elardo, S. M., Nodwell, J. R., Schirmeister, T., Tawfike, A., & Abdelmohsen, U. R. (2020). Metabolomics analysis and biological investigation of three Malvaceae plants. *Phytochem Anal*, 31(2), 204-214. <https://doi.org/10.1002/pca.2883>
- Adekola, K., Rosen, S. T., & Shanmugam, M. (2012). Glucose transporters in cancer metabolism. *Current opinion in oncology*, 24(6), 650-654.
- Al-Sulaiti, H., Almaliti, J., Naman, C. B., Al Thani, A. A., & Yassine, H. M. (2023). Metabolomics approaches for the diagnosis, treatment, and better disease management of viral infections. *Metabolites*, 13(8), 948.
- Alonso, A., Marsal, S., & Julià, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 23.
- Alter, O., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Singular value decomposition for genome-wide expression data processing and modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10101-10106.
- Andrisic, L., Dudzik, D., Barbas, C., Milkovic, L., Grune, T., & Zarkovic, N. (2018). Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biology*, 14, 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.009>
- Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P. S., & Curtis, R. (2004). The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes & development*, 18(24), 3004-3009.
- Armitage, E. G., & Barbas, C. (2014). Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.08.041>
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., & Want, L. (2004). Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes spectrum*, 17(3), 183-190.
- Arribere, J. A., Bell, R. T., Fu, B. X., Artiles, K. L., Hartman, P. S., & Fire, A. Z. (2014). Efficient marker-free recovery of custom genetic modifications with CRISPR/Cas9 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 198(3), 837-846. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169730>
- Au, A. (2018). Metabolomics and lipidomics of ischemic stroke. *Advances in clinical chemistry*, 85, 31-69. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.02.002>
- Au, V., Li-Leger, E., Raymant, G., Flibotte, S., Chen, G., Martin, K., Fernando, L., Doell, C., Rosell, F. I., & Wang, S. (2019). CRISPR/Cas9 methodology for the generation of knockout deletions in *Caenorhabditis elegans*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(1), 135-144. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200778>
- Auro, K., Joensuu, A., Fischer, K., Kettunen, J., Salo, P., Mattsson, H., Niironen, M., Kaprio, J., Eriksson, J. G., Lehtimäki, T., Raitakari, O., Jula, A., Tiitinen, A., Jauhiainen, M., Soininen, P., Kangas, A. J., Kähönen, M., Havulinna, A. S., Ala-Korpela, M., . . . Perola, M. (2014). A metabolic view on menopause and ageing. *Nat Commun*, 5, 4708. <https://doi.org/10.1038/ncomms5708>
- Avery, L. (1993). The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 133(4), 897-917.
- Bargmann, C. I. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science*, 282(5396), 2028-2033.
- Battiprolu, P. K., Hojaye, B., Jiang, N., Wang, Z. V., Luo, X., Iglewski, M., Shelton, J. M., Gerard, R. D., Rothermel, B. A., Gillette, T. G., Lavandero, S., & Hill, J. A. (2012). Metabolic stress-induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice. *J Clin Invest*, 122(3), 1109-1118. <https://doi.org/10.1172/jci60329>

- Beger, R. D.** (2013). A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*, 3(3), 552-574. <https://doi.org/10.3390/metabo3030552>
- Bennett, A. S.** (1984). Effect of dietary stearic acid on the genesis of spontaneous mammary adenocarcinomas in strain A/ST mice. *International journal of cancer*, 34(4), 529-533.
- Berdichevsky, A., Viswanathan, M., Horvitz, H. R., & Guarente, L.** (2006). C. elegans SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *cell*, 125(6), 1165-1177.
- Berk, S.** (2024). Insulin and IGF-1 extend the lifespan of Caenorhabditis elegans by inhibiting insulin/insulin-like signaling and mTOR signaling pathways: C. elegans - Focused cancer research. *Biochemical and biophysical research communications*, 729, 150347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150347>
- Berk, S., Cetin, A., Özdemir, O. Ü., Pektaş, A. N., Yurtcu, N., & Dastan, S. D.** (2024). The combination of metformin and high glucose increased longevity of Caenorhabditis elegans a DAF-16/FOXO-independent manner: cancer/diabetic model via C. elegans. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1435098. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1435098>
- Bianco, R., Melisi, D., Ciardiello, F., & Tortora, G.** (2006). Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *European journal of cancer*, 42(3), 290-294. <https://doi.org/0.1016/j.ejca.2005.07.034>
- Bory, C., Bouliou, R., Chantin, C., & Mathieu, M.** (1990). Diagnosis of alcaptonuria: rapid analysis of homogentisic acid by HPLC. *Clinica Chimica Acta*, 189(1), 7-11. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(90\)90228-K](https://doi.org/10.1016/0009-8981(90)90228-K)
- Brauer, M. J., Yuan, J., Bennett, B. D., Lu, W., Kimball, E., Botstein, D., & Rabinowitz, J. D.** (2006). Conservation of the metabolomic response to starvation across two divergent microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51), 19302-19307.
- Brenner.** (1974). The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics*, 77(1), 71-94. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1213120/pdf/71.pdf>
- Brenner, S.** (1974). The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics*, 77(1), 71-94.
- Bro, R., & Smilde, A. K.** (2014). Principal component analysis. *Analytical methods*, 6(9), 2812-2831.
- Butler, M., van der Meer, L. T., & van Leeuwen, F. N.** (2021). Amino acid depletion therapies: starving cancer cells to death. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32(6), 367-381.
- Byerly, L., Cassada, R., & Russell, R.** (1976). The life cycle of the nematode Caenorhabditis elegans: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental biology*, 51(1), 23-33.
- Cambiaghi, A., Ferrario, M., & Masseroli, M.** (2016). Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Briefings in Bioinformatics*, 18(3), 498-510. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw031>
- Cefalu, W. T.** (2001). Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Experimental biology and medicine*, 226(1), 13-26.
- Cervenka, I., Agudelo, L. Z., & Ruas, J. L.** (2017). Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science*, 357(6349), eaaf9794.
- Chan, E. C. Y., Koh, P. K., Mal, M., Cheah, P. Y., Eu, K. W., Backshall, A., Cavill, R., Nicholson, J. K., & Keun, H. C.** (2009). Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *Journal of proteome research*, 8(1), 352-361. <https://doi.org/10.1021/pr8006232>
- Chen, A. T. Y., Guo, C., Dumas, K. J., Ashrafi, K., & Hu, P. J.** (2013). Effects of C aenorhabditis elegans sgk-1 mutations on lifespan, stress resistance, and DAF-16/F ox O regulation. *Aging cell*, 12(5), 932-940.

- Chen, Y., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>
- Chintapalli, V. R., Al Bratty, M., Korzekwa, D., Watson, D. G., & Dow, J. A. (2013). Mapping an atlas of tissue-specific *Drosophila melanogaster* metabolomes by high resolution mass spectrometry. *PloS one*, 8(10), e78066.
- Chlebowski, R. T., Wactawski-Wende, J., Ritenbaugh, C., Hubbell, F. A., Ascensao, J., Rodabough, R. J., Rosenberg, C. A., Taylor, V. M., Harris, R., & Chen, C. (2004). Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine*, 350(10), 991-1004.
- Churchill, G. A. (2004). Using ANOVA to analyze microarray data. *Biotechniques*, 37(2), 173-177.
- Clayton, P. E., Banerjee, I., Murray, P. G., & Renehan, A. G. (2011). Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(1), 11-24.
- Collins, F. S., Morgan, M., & Patrinos, A. (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*, 300(5617), 286-290.
- Copes, N., Edwards, C., Chaput, D., Saifee, M., Barjuca, I., Nelson, D., Paraggio, A., Saad, P., Lipps, D., Stevens, S. M., Jr., & Bradshaw, P. C. (2015). Metabolome and proteome changes with aging in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*, 72, 67-84. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.013>
- Cox, J. E., Thummel, C. S., & Tennessen, J. M. (2017). Metabolomic Studies in *Drosophila*. *Genetics*, 206(3), 1169-1185. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.200014>
- Dang, C. V. (2013). MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(8), a014217. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014217>
- Demain, A. L. (1980). Microbial production of primary metabolites. *Naturwissenschaften*, 67, 582-587. <https://doi.org/10.1007/BF00396537>
- Demirel, T., Özdemir, Ö. Ü., & Berk, Ş. (2024). *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1899). *Russian J Nematol*, 32, 15-30.
- Di Gioia, M., Spreafico, R., Springstead, J. R., Mendelson, M. M., Joehanes, R., Levy, D., & Zanoni, I. (2020). Endogenous oxidized phospholipids reprogram cellular metabolism and boost hyperinflammation. *Nature immunology*, 21(1), 42-53.
- Dickinson, D. J., & Goldstein, B. (2016). CRISPR-based methods for *Caenorhabditis elegans* genome engineering. *Genetics*, 202(3), 885-901. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.182162>
- Dickinson, D. J., Pani, A. M., Heppert, J. K., Higgins, C. D., & Goldstein, B. (2015). Streamlined genome engineering with a self-excising drug selection cassette. *Genetics*, 200(4), 1035-1049. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.178335>
- Dijkstra, A. J. (2009). How Chevreul (1786-1889) based his conclusions on his analytical results. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 16(1), 8-13. <https://doi.org/10.1051/ocl.2009.0239>
- Distel, R., Robinson, G., & Spiegelman, B. (1992). Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 267(9), 5937-5941.
- Du, Y., Fan, P., Zou, L., Jiang, Y., Gu, X., Yu, J., & Zhang, C. (2021). Serum metabolomics study of papillary thyroid carcinoma based on HPLC-Q-TOF-MS/MS. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 593510.
- Dudzik, D., Zorawski, M., Skotnicki, M., Zarzycki, W., García, A., Angulo, S., Lorenzo, M. P., Barbas, C., & Ramos, M. P. (2017). GC-MS based Gestational Diabetes Mellitus longitudinal study: Identification of 2-and 3-hydroxybutyrate as potential

- prognostic biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 144, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.056>
- Dunn, W. B.** (2008). Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Physical biology*, 5(1), 011001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/5/1/011001>
- Dunn, W. B., Broadhurst, D. I., Atherton, H. J., Goodacre, R., & Griffin, J. L.** (2011). Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical society reviews*, 40(1), 387-426. <https://doi.org/10.1039/B906712B>
- Edward, G., David, M., Michael, C., Richard, M., Susan, M., Laurel, A., Michael, P., Judith, G., & Douglas, Y.** (2010). Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes care*, 33(7), 1674-1685.
- Eichner, J., Rosenbaum, L., Wrzodek, C., Häring, H.-U., Zell, A., & Lehmann, R.** (2014). Integrated enrichment analysis and pathway-centered visualization of metabolomics, proteomics, transcriptomics, and genomics data by using the InCroMAP software. *Journal of Chromatography B*, 966, 77-82.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., & Botstein, D.** (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 14863-14868.
- El-Serag, H. B., Hampel, H., & Javadi, F.** (2006). The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(3), 369-380.
- Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., & Rudin, C. M.** (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research*, 64(11), 3892-3899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2904>
- Espada, L., Dakhovnik, A., Chaudhari, P., Martirosyan, A., Miek, L., Poliezhayeva, T., Schaub, Y., Nair, A., Döring, N., & Rahn, N.** (2020). Loss of metabolic plasticity underlies metformin toxicity in aged *Caenorhabditis elegans*. *Nature metabolism*, 2(11), 1316-1331.
- Evans, E. A., Kawli, T., & Tan, M.-W.** (2008). *Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS pathogens*, 4(10), e1000175.
- Ferguson, A. A., Roy, S., Kormanik, K. N., Kim, Y., Dumas, K. J., Ritov, V. B., Matern, D., Hu, P. J., & Fisher, A. L.** (2013). TATN-1 mutations reveal a novel role for tyrosine as a metabolic signal that influences developmental decisions and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, 9(12), e1004020.
- Ferguson, R. D., Gallagher, E. J., Cohen, D., Tobin-Hess, A., Alikhani, N., Novosyadlyy, R., Haddad, N., Yakar, S., & LeRoith, D.** (2013). Hyperinsulinemia promotes metastasis to the lung in a mouse model of Her2-mediated breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 20(3), 391-401.
- Fermor, B. F., Masters, J. R., Wood, C. B., Miller, J., Apostolov, K., & Habib, N. A.** (1992). Fatty acid composition of normal and malignant cells and cytotoxicity of stearic, oleic and sterculic acids in vitro. *European journal of cancer*, 28(6-7), 1143-1147.
- Ferrannini, E.** (1998). Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocrine Reviews*, 19(4), 477-490.
- Fielenbach, N., & Antebi, A.** (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes & development*, 22(16), 2149-2165.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Floegel, A., Stefan, N., Yu, Z., Mühlenbruch, K., Drogan, D., Joost, H.-G., Fritsche, A., Häring, H.-U., Hrabě de Angelis, M., & Peters, A.** (2013). Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes*, 62(2), 639-648. <https://doi.org/10.2337/db12-0495>
- Fonville, J. M., Richards, S. E., Barton, R. H., Boulange, C. L., Ebbels, T. M., Nicholson, J. K., Holmes, E., & Dumas, M. E.** (2010). The evolution of partial least squares models and related chemometric approaches in metabonomics and metabolic phenotyping. *Journal of Chemometrics*, 24(11-12), 636-649.
- Frainay, C., Schymanski, E. L., Neumann, S., Merlet, B., Salek, R. M., Jourdan, F., & Yanes, O.** (2018). Mind the Gap: Mapping Mass Spectral Databases in Genome-Scale Metabolic Networks Reveals Poorly Covered Areas. *Metabolites*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/metabo8030051>
- Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., & Ahringer, J.** (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408(6810), 325-330. <https://doi.org/10.1038/35042517>
- Friberg, E., Orsini, N., Mantzoros, C., & Wolk, A.** (2007). Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia*, 50, 1365-1374.
- Fuchs, S., Bundy, J. G., Davies, S. K., Viney, J. M., Swire, J. S., & Leroi, A. M.** (2010). A metabolic signature of long life in *Caenorhabditis elegans*. *Bmc Biology*, 8, 1-12.
- Garigan, D., Hsu, A. L., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., & Kenyon, C.** (2002). Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics*, 161(3), 1101-1112. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.3.1101>
- Gaude, E., & Frezza, C.** (2016). Tissue-specific and convergent metabolic transformation of cancer correlates with metastatic potential and patient survival. *Nature communications*, 7(1), 13041. <https://doi.org/10.1038/ncomms13041>
- Gika, H. G., Theodoridis, G. A., & Wilson, I. D.** (2008). Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry fingerprinting of human urine: sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies. *Journal of chromatography A*, 1189(1-2), 314-322.
- Giulivi, C., Zhang, Y.-F., Omanska-Klusek, A., Ross-Inta, C., Wong, S., Hertz-Picciotto, I., Tassone, F., & Pessah, I. N.** (2010). Mitochondrial dysfunction in autism. *Jama*, 304(21), 2389-2396.
- Gleeson, R., Ayub, M., Wright, J., Wood, C., Habib, N., Soutter, W., Sullivan, M., & White, J.** (1990). Fatty acid control of growth of human cervical and endometrial cancer cells. *British journal of cancer*, 61(4), 500-503.
- Godsland, I. F.** (2010). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. *Clinical science*, 118(5), 315-332.
- Goetsch, P. D., & Strome, S.** (2022). DREAM interrupted: severing LIN-35-MuvB association in *Caenorhabditis elegans* impairs DREAM function but not its chromatin localization. *Genetics*, 221(3). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac073>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., & Johnston, M.** (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- González-Domínguez, R., García-Barrera, T., & Gómez-Ariza, J. L.** (2015). Metabolite profiling for the identification of altered metabolic pathways in Alzheimer's disease.

- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107, 75-81.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.010>
- González-Rangel, A. A., & Navarro, R. E.** (2021). LIN-35 beyond its classical roles: its function in the stress response. *Int J Dev Biol*, 65(4-5-6), 377-382.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.200194rn>
- Gonzalez-Riano, C., Garcia, A., & Barbas, C.** (2016). Metabolomics studies in brain tissue: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 141-168.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.008>
- Goodacre, R.** (2007). Metabolomics of a superorganism. *J Nutr*, 137(1 Suppl), 259s-266s.
<https://doi.org/10.1093/jn/137.1.259S>
- Gouw, A. M., Margulis, K., Liu, N. S., Raman, S. J., Mancuso, A., Toal, G. G., Tong, L., Mosley, A., Hsieh, A. L., & Sullivan, D. K.** (2019). The MYC oncogene cooperates with sterol-regulated element-binding protein to regulate lipogenesis essential for neoplastic growth. *Cell Metabolism*, 30(3), 556-572. e555.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.012>
- Gönczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S. J., Copley, R. R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., & Cassin, E.** (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature*, 408(6810), 331-336. <https://doi.org/10.1038/35042526>
- Gregory, J. M., Smith, T. J., Slaughter, J. C., Mason, H. R., Hughey, C. C., Smith, M. S., Kandasamy, B., Greeley, S. A. W., Philipson, L. H., & Naylor, R. N.** (2019). Iatrogenic hyperinsulinemia, not hyperglycemia, drives insulin resistance in type 1 diabetes as revealed by comparison with GCK-MODY (MODY2). *Diabetes*, 68(8), 1565-1576.
- Grishok, A., & Sharp, P. A.** (2005). Negative regulation of nuclear divisions in *Caenorhabditis elegans* by retinoblastoma and RNA interference-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(48), 17360-17365.
- Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Galichet, L., & Coglianò, V.** (2009). A review of human carcinogens—Part A: pharmaceuticals. *The lancet oncology*, 10(1), 13-14.
- Grunberger, G., Sherr, J., Allende, M., Blevins, T., Bode, B., Handelsman, Y., Hellman, R., Lajara, R., Roberts, V. L., & Rodbard, D.** (2021). American Association of Clinical Endocrinology clinical practice guideline: the use of advanced technology in the management of persons with diabetes mellitus. *Endocrine practice*, 27(6), 505-537.
- Guan, W., Zhou, M., Hampton, C. Y., Benigno, B. B., Walker, L. D., Gray, A., McDonald, J. F., & Fernández, F. M.** (2009). Ovarian cancer detection from metabolomic liquid chromatography/mass spectrometry data by support vector machines. *BMC bioinformatics*, 10, 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-259>
- Guasch-Ferré, M., Hruby, A., Toledo, E., Clish, C. B., Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., & Hu, F. B.** (2016). Metabolomics in prediabetes and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes care*, 39(5), 833-846.
- Guiley, K. Z., Liban, T. J., Felthousen, J. G., Ramanan, P., Litovchick, L., & Rubin, S. M.** (2015). Structural mechanisms of DREAM complex assembly and regulation. *Genes & development*, 29(9), 961-974. <https://doi.org/10.1101/gad.257568.114>
- Habib, N., Wood, C., Apostolov, K., Barker, W., Hershman, M., Aslam, M., Heinemann, D., Fermor, B., Williamson, R., & Jenkins, W.** (1987). Stearic acid and carcinogenesis. *British journal of cancer*, 56(4), 455-458.
- Hahn, O., Drews, L. F., Nguyen, A., Tatsuta, T., Gkioni, L., Hendrich, O., Zhang, Q., Langer, T., Pletcher, S., & Wakelam, M. J.** (2019). A nutritional memory effect

- counteracts the benefits of dietary restriction in old mice. *Nature metabolism*, 1(11), 1059-1073.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanefeld, M., Fleischmann, H., Siegmund, T., & Seufert, J.** (2020). Rationale for timely insulin therapy in type 2 diabetes within the framework of individualised treatment: 2020 update. *Diabetes Therapy*, 11(8), 1645-1666.
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A.** (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4), 251-262.
- Hassan, I., Chibber, S., & Naseem, I.** (2013). Vitamin B2: a promising adjuvant in cisplatin based chemoradiotherapy by cellular redox management. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 715-723.
- Hayashi, K., Alseekh, S., & Fernie, A. R.** (2023). Genetic and epigenetic control of the plant metabolome. *Proteomics*, 23(13-14), e2200104. <https://doi.org/10.1002/pmic.202200104>
- Hazrati, H., Kudsk, P., Ding, L., Uthe, H., & Fomsgaard, I. S.** (2022). Integrated LC–MS and GC–MS-Based Metabolomics Reveal the Effects of Plant Competition on the Rye Metabolome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(9), 3056-3066. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06306>
- Helin, K., Lees, J. A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E., & Fattaey, A.** (1992). A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *cell*, 70(2), 337-350. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90107-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90107-N)
- Hoefflin, R., Harlander, S., Schäfer, S., Metzger, P., Kuo, F., Schönenberger, D., Adlesic, M., Peighambari, A., Seidel, P., & Chen, C.-y.** (2020). HIF-1 α and HIF-2 α differently regulate tumour development and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nature communications*, 11(1), 4111. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17873-3>
- Horning, E. C., & Horning, M.-G.** (1971). Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clinical chemistry*, 17(8), 802-809.
- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M.** (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *cell*, 134(5), 703-707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>
- Hursting, S. D., & Berger, N. A.** (2010). Energy Balance, Host-Related Factors, and Cancer Progression. *Journal of Clinical Oncology*, 28(26), 4058-4065. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.27.9935>
- Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., Berrington de Gonzalez, A., Barzi, F., & Woodward, M.** (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British journal of cancer*, 92(11), 2076-2083.
- James, E. L., & Parkinson, E. K.** (2015). Serum metabolomics in animal models and human disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 18(5). https://journals.lww.com/clinicalnutrition/fulltext/2015/09000/serum_metabolomics_in_animal_models_and_human.9.aspx
- Johnson, C. H., & Gonzalez, F. J.** (2012). Challenges and opportunities of metabolomics. *Journal of cellular physiology*, 227(8), 2975-2981.
- Jones, O. A., Maguire, M. L., Griffin, J. L., Dias, D. A., Spurgeon, D. J., & Svendsen, C.** (2013). Metabolomics and its use in ecology. *Austral Ecology*, 38(6), 713-720. <https://doi.org/10.1039/c5np00003c>
- Joosten, V., & van Berkel, W. J.** (2007). Flavoenzymes. *Current opinion in chemical biology*, 11(2), 195-202.

- Joshi, C. J., Schinn, S.-M., Richelle, A., Shamie, I., O'Rourke, E. J., & Lewis, N. E. (2020). StanDep: Capturing transcriptomic variability improves context-specific metabolic models. *PLoS computational biology*, 16(5), e1007764. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007764>
- Kaddurah-Daouk, R., Kristal, B. S., & Weinshilboum, R. M. (2008). Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 48(1), 653-683. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094715>
- Kaletta, T., & Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature reviews Drug discovery*, 5(5), 387-399. <https://doi.org/10.1038/nrd2031>
- Kaplan, O. (2024). *Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Hattında LC/MS Temelli Metabolomik ve Lipidomik çalışmaları Hacettepe Üniversitesi*.
- Kaplan, O., & Çelebier, M. (2020). Evaluation of recent data processing strategies on Q-TOF LC/MS based untargeted metabolomics. *Mass Spectrometry Letters*, 11(1), 1-5.
- Katajamaa, M., Miettinen, J., & Orešič, M. (2006). MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*, 22(5), 634-636.
- Katajamaa, M., & Orešič, M. (2007). Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of chromatography A*, 1158(1-2), 318-328.
- Kawasaki, M., Hisamoto, N., Iino, Y., Yamamoto, M., Ninomiya-Tsuji, J., & Matsumoto, K. (1999). A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. *The EMBO Journal*.
- Kemsley, E. (1996). Discriminant analysis of high-dimensional data: a comparison of principal components analysis and partial least squares data reduction methods. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 33(1), 47-61.
- Keshet, R., Szlosarek, P., Carracedo, A., & Erez, A. (2018). Rewiring urea cycle metabolism in cancer to support anabolism. *Nature Reviews Cancer*, 18(10), 634-645.
- Khunti, K., Gomes, M. B., Pocock, S., Shestakova, M. V., Pintat, S., Fenici, P., Hammar, N., & Medina, J. (2018). Therapeutic inertia in the treatment of hyperglycaemia in patients with type 2 diabetes: A systematic review. *Diabetes Obes Metab*, 20(2), 427-437. <https://doi.org/10.1111/dom.13088>
- Kim, H. M., & Colaiácovo, M. P. (2019). CRISPR-Cas9-guided genome engineering in *Caenorhabditis elegans*. *Current protocols in molecular biology*, 129(1), e106. <https://doi.org/10.1002/cpmb.106>
- Kim, J.-w., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>
- Kohonen, T., Kaski, S., Lagus, K., Salojärvi, J., Honkela, J., Paatero, V., & Saarela, A. (2000). Self organization of a massive document collection. *IEEE transactions on neural networks*, 11(3), 574-585.
- Krzyściak, W. (2011). Activity of selected aromatic amino acids in biological systems.
- Kumar, D., Gupta, A., Mandhani, A., & Sankhwar, S. N. (2015). Metabolomics-derived prostate cancer biomarkers: fact or fiction? *J Proteome Res*, 14(3), 1455-1464. <https://doi.org/10.1021/pr5011108>
- Laborde, C. M., Mourino-Alvarez, L., Posada-Ayala, M., Alvarez-Llamas, G., Serranillos-Reus, M. G., Moreu, J., Vivanco, F., Padial, L. R., & Barderas, M. G. (2014). Plasma metabolomics reveals a potential panel of biomarkers for early diagnosis in acute coronary syndrome. *Metabolomics*, 10, 414-424. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0595-9>

- Langenberg, C., & Savage, D. B.** (2011). An amino acid profile to predict diabetes? *Nature medicine*, 17(4), 418-420.
- Lawrence, M. C.** (2021). Understanding insulin and its receptor from their three-dimensional structures. *Molecular Metabolism*, 52, 101255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101255>
- Laye, M. J., Tran, V., Jones, D. P., Kapahi, P., & Promislow, D. E.** (2015). The effects of age and dietary restriction on the tissue-specific metabolome of *Drosophila*. *Aging cell*, 14(5), 797-808.
- Lees, J. A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N., & Helin, K.** (1993). The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Molecular and cellular biology*, 13(12), 7813-7825. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.12.7813-7825.1993>
- Li, C., Zhao, X., Toline, E. C., Siegal, G. P., Evans, L. M., Ibrahim-Hashim, A., Desmond, R. A., & Hardy, R. W.** (2011). Prevention of carcinogenesis and inhibition of breast cancer tumor burden by dietary stearate. *Carcinogenesis*, 32(8), 1251-1258.
- Li, Z.-y., Yang, Y., Ming, M., & Liu, B.** (2011). Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 414(1), 5-8.
- Liang, V., Ullrich, M., Lam, H., Chew, Y. L., Banister, S., Song, X., Zaw, T., Kassiou, M., Götz, J., & Nicholas, H. R.** (2014). Altered proteostasis in aging and heat shock response in *C. elegans* revealed by analysis of the global and de novo synthesized proteome. *Cellular and molecular life sciences*, 71, 3339-3361.
- Liao, Z., Chua, D., & Tan, N. S.** (2019). Reactive oxygen species: a volatile driver of field cancerization and metastasis. *Molecular cancer*, 18(1), 65.
- Liao, Z., Tan, Z. W., Zhu, P., & Tan, N. S.** (2019). Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment—Accomplices in tumor malignancy. *Cellular immunology*, 343, 103729.
- Liban, T. J., Thwaites, M. J., Dick, F. A., & Rubin, S. M.** (2016). Structural conservation and E2F binding specificity within the retinoblastoma pocket protein family. *Journal of molecular biology*, 428(20), 3960-3971. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.017>
- Lienhart, W.-D., Gudipati, V., & Macheroux, P.** (2013). The human flavoproteome. *Archives of biochemistry and biophysics*, 535(2), 150-162.
- Liesenfeld, D. B., Habermann, N., Owen, R. W., Scalbert, A., & Ulrich, C. M.** (2013). Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 22(12), 2182-2201.
- Litovchick, L., Florens, L. A., Swanson, S. K., Washburn, M. P., & DeCaprio, J. A.** (2011). DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. *Genes & development*, 25(8), 801-813. <https://doi.org/10.1101/gad.203421>
- Liu, L., Feng, R., Guo, F., Li, Y., Jiao, J., & Sun, C.** (2015). Targeted metabolomic analysis reveals the association between the postprandial change in palmitic acid, branched-chain amino acids and insulin resistance in young obese subjects. *Diabetes Res Clin Pract*, 108(1), 84-93. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.01.014>
- Liu, S., Dai, Z., Cooper, D. E., Kirsch, D. G., & Locasale, J. W.** (2020). Quantitative analysis of the physiological contributions of glucose to the TCA cycle. *Cell Metabolism*, 32(4), 619-628. e621. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.09.005>
- Lu, H., Hao, L., Li, S., Lin, S., Lv, L., Chen, Y., Cui, H., Zi, T., Chu, X., & Na, L.** (2016). Elevated circulating stearic acid leads to a major lipotoxic effect on mouse pancreatic beta cells in hyperlipidaemia via a miR-34a-5p-mediated PERK/p53-dependent pathway. *Diabetologia*, 59(6), 1247-1257.

- Lu, X., & Horvitz, H. R.** (1998). *lin-35* and *lin-53*, two genes that antagonize a *C. elegans* Ras pathway, encode proteins similar to Rb and its binding protein RbAp48. *cell*, 95(7), 981-991. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81722-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81722-5)
- Mahadevan, S., Shah, S. L., Marrie, T. J., & Slupsky, C. M.** (2008). Analysis of metabolomic data using support vector machines. *Analytical chemistry*, 80(19), 7562-7570.
- Majmunder, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C.** (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*, 40(2), 294-309. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.022>
- Majumder, P. K., Febbo, P. G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L. M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T. J., & Golub, T. R.** (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nature medicine*, 10(6), 594-601. <https://doi.org/10.1038/nm1052>
- Martins, R., Lithgow, G. J., & Link, W.** (2016). Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging cell*, 15(2), 196-207. <https://doi.org/10.1111/accel.12427>
- Mathieu, C.** (2021). Minimising hypoglycaemia in the real world: the challenge of insulin. *Diabetologia*, 64, 978-984.
- McElwee, J. J., Schuster, E., Blanc, E., Thomas, J. H., & Gems, D.** (2004). Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44533-44543.
- McGill, J. B., Hirsch, I. B., Parkin, C. G., Aleppo, G., Levy, C. J., & Gavin, J. R., 3rd.** (2024). The Current and Future Role of Insulin Therapy in the Management of Type 2 Diabetes: A Narrative Review. *Diabetes Ther*, 15(5), 1085-1098. <https://doi.org/10.1007/s13300-024-01569-8>
- Meinwald, J.** (2011). Natural products as molecular messengers. *Journal of natural products*, 74(3), 305-309.
- Mello, C. C., & Conte Jr, D.** (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431(7006).
- Mitchel, J., Bajaj, P., Patil, K., Gunnarson, A., Pourchet, E., Kim, Y. N., Skolnick, J., & Pai, S. B.** (2021). Computational identification of stearic acid as a potential PDK1 inhibitor and in vitro validation of stearic acid as colon cancer therapeutic in combination with 5-fluorouracil. *Cancer Informatics*, 20, 11769351211065979.
- Morris, J. Z., Tissenbaum, H. A., & Ruvkun, G.** (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 382(6591), 536-539.
- Mossmann, D., Müller, C., Park, S., Ryback, B., Colombi, M., Ritter, N., Weißenberger, D., Dazert, E., Coto-Llerena, M., Nuciforo, S., Blukacz, L., Ercan, C., Jimenez, V., Piscuoglio, S., Bosch, F., Terracciano, L. M., Sauer, U., Heim, M. H., & Hall, M. N.** (2023). Arginine reprograms metabolism in liver cancer via RBM39. *cell*, 186(23), 5068-5083.e5023. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.09.011>
- Mossmann, D., Park, S., & Hall, M. N.** (2018). mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(12), 744-757.
- Mousavi, S. A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., & Farmer, E. E.** (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature*, 500(7463), 422-426.
- Murphy, C. T., & Hu, P. J.** (2013). Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. *WormBook*, 1-43. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.164.1>

- Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H., & Kenyon, C.** (2003). Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 424(6946), 277-283.
- Musumarra, G., Barresi, V., Condorelli, D. F., & Scirè, S.** (2003). A bioinformatic approach to the identification of candidate genes for the development of new cancer diagnostics.
- Nagrath, D., Caneba, C., Karedath, T., & Bellance, N.** (2011). Metabolomics for mitochondrial and cancer studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(6), 650-663. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2011.03.006>
- Newgard, C. B.** (2017). Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metabolism*, 25(1), 43-56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.018>
- Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., Haqq, A. M., Shah, S. H., Arlotto, M., & Slentz, C. A.** (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metabolism*, 9(4), 311-326.
- Nguyen, T. N., Nguyen, H. Q., & Le, D. H.** (2020). Unveiling prognostics biomarkers of tyrosine metabolism reprogramming in liver cancer by cross-platform gene expression analyses. *PLoS One*, 15(6), e0229276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229276>
- Nicholson, J. K., & Lindon, J. C.** (2008). Metabonomics. *Nature*, 455(7216), 1054-1056.
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes, E.** (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11), 1181-1189.
- Nuskova, H., Serebryakova, M., Ferrer-Caelles, A., Sachsenheimer, T., Luchtenborg, C., & Miller, A.** (2021) Stearic acid blunts growthfactor signaling via oleoylation of GNAI proteins. *Nat. Commun*, 12, 4590.
- O’Rahilly, S.** (2009). Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature*, 462(7271), 307-314.
- Oakman, C., Tenori, L., Biganzoli, L., Santarpia, L., Cappadona, S., Luchinat, C., & Di Leo, A.** (2011). Uncovering the metabolomic fingerprint of breast cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(7), 1010-1020. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.05.001>
- Owens, D. R.** (2013). Clinical evidence for the earlier initiation of insulin therapy in type 2 diabetes. *Diabetes technology & therapeutics*, 15(9), 776-785.
- Paix, A., Folkmann, A., Rasoloson, D., & Seydoux, G.** (2015). High efficiency, homology-directed genome editing in *Caenorhabditis elegans* using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Genetics*, 201(1), 47-54. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179382>
- Palsson, B. Ø.** (2006). *Systems biology: properties of reconstructed networks*. Cambridge university press.
- Papaevgeniou, N., & Chondrogianni, N.** (2014). The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation. *Redox Biol*, 2, 333-347. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.007>
- Parkhitko, A. A., Binari, R., Zhang, N., Asara, J. M., Demontis, F., & Perrimon, N.** (2016). Tissue-specific down-regulation of S-adenosyl-homocysteine via suppression of dAhcyL1/dAhcyL2 extends health span and life span in *Drosophila*. *Genes & development*, 30(12), 1409-1422.
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S.** (2018). Nano based drug delivery systems: recent

- developments and future prospects. *J Nanobiotechnology*, 16(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G.** (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4), 263-269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pauling, L., Robinson, A. B., Teranishi, R., & Cary, P.** (1971). Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(10), 2374-2376.
- Pearson, K. J., Lewis, K. N., Price, N. L., Chang, J. W., Perez, E., Cascajo, M. V., Tamashiro, K. L., Poosala, S., Csiszar, A., & Ungvari, Z.** (2008). Nrf2 mediates cancer protection but not longevity induced by caloric restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2325-2330.
- Pedro, M.** (2002). Emerging bioinformatics for the metabolome. *Briefings in Bioinformatics*, 3(2), 134-145.
- Perry, R. J., & Shulman, G. I.** (2020). Mechanistic links between obesity, insulin, and cancer. *Trends in cancer*, 6(2), 75-78.
- Piñero González, J., Carrillo Farnés, O., Vasconcelos, A. T., & González Pérez, A.** (2009). Conservation of key members in the course of the evolution of the insulin signaling pathway. *Biosystems*, 95(1), 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2008.06.003>
- Platten, M., Nollen, E. A., Röhrig, U. F., Fallarino, F., & Opitz, C. A.** (2019). Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nature reviews Drug discovery*, 18(5), 379-401.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Oresic, M.** (2010). MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics*, 11, 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Pollak, M.** (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 915-928.
- Poloz, Y., & Stambolic, V.** (2015). Obesity and cancer, a case for insulin signaling. *Cell death & disease*, 6(12), e2037-e2037.
- Price, A. J., Allen, N. E., Appleby, P. N., Crowe, F. L., Travis, R. C., Tipper, S. J., Overvad, K., Grønbaek, H., Tjønneland, A., & Johnsen, N. F.** (2012). Insulin-like growth factor-I concentration and risk of prostate cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 21(9), 1531-1541.
- Qadota, H., Inoue, M., Hikita, T., Köppen, M., Hardin, J. D., Amano, M., Moerman, D. G., & Kaibuchi, K.** (2007). Establishment of a tissue-specific RNAi system in *C. elegans*. *Gene*, 400(1-2), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.06.020>
- Qiao, R., Sheng, C., Lu, Y., Zhang, Y., Ren, H., & Lemos, B.** (2019). Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Sci Total Environ*, 662, 246-253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.245>
- Raamsdonk, L. M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M. C., Berden, J. A., Brindle, K. M., Kell, D. B., & Rowland, J. J.** (2001). A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature biotechnology*, 19(1), 45-50.
- Rahman, I., Athar, M. T., & Islam, M.** (2021). Type 2 diabetes, obesity, and cancer share some common and critical pathways. *Frontiers in oncology*, 10, 600824.
- Rasmussen, L. G., Savorani, F., Larsen, T. M., Dragsted, L. O., Astrup, A., & Engelsen, S. B.** (2011). Standardization of factors that influence human urine metabolomics. *Metabolomics*, 7, 71-83.

- Reaven, G.** (2004). The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 33(2), 283-303.
- Rege, N. K., Phillips, N. F., & Weiss, M. A.** (2017). Development of glucose-responsive 'smart' insulin systems. *Current opinion in endocrinology, diabetes and obesity*, 24(4), 267-278.
- Reinke, S. N., Gallart-Ayala, H., Gómez, C., Checa, A., Fauland, A., Naz, S., Kamleh, M. A., Djukanović, R., Hinks, T. S., & Wheelock, C. E.** (2017). Metabolomics analysis identifies different metabotypes of asthma severity. *European Respiratory Journal*, 49(3). <https://doi.org/10.1183/13993003.01740-2016>
- Renehan, A. G., Frystyk, J., & Flyvbjerg, A.** (2006). Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 17(8), 328-336.
- Reynolds, M. R., Lane, A. N., Robertson, B., Kemp, S., Liu, Y., Hill, B. G., Dean, D. C., & Clem, B. F.** (2014). Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene*, 33(5), 556-566. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.635>
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., & Priess, J. R.** (1997). *C. elegans* ii.
- Riedl, J., Kluender, C., Sans-Piché, F., Heilmeier, H., Altenburger, R., & Schmitt-Jansen, M.** (2012). Spatial and temporal variation in metabolic fingerprints of field-growing *Myriophyllum spicatum*. *Aquatic botany*, 102, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.03.017>
- Roberts, D. J., Tan-Sah, V. P., Smith, J. M., & Miyamoto, S.** (2013). Akt phosphorylates HK-II at Thr-473 and increases mitochondrial HK-II association to protect cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(33), 23798-23806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.482026>
- Rojas, A., González, I., Morales, E., Pérez-Castro, R., Romero, J., & Figueroa, H.** (2011). Diabetes and cancer: Looking at the multiligand/RAGE axis. *World journal of diabetes*, 2(7), 108.
- Rosato, A., Tenori, L., Cascante, M., De Atauri Carulla, P. R., Martins Dos Santos, V. A. P., & Saccenti, E.** (2018). From correlation to causation: analysis of metabolomics data using systems biology approaches. *Metabolomics*, 14(4), 37. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1335-y>
- Rouillé, Y., Duguay, S. J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva Jr, A. A., Chan, S. J., & Steiner, D. F.** (1995). Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Frontiers in neuroendocrinology*, 16(4), 322-361.
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., & Ogurtsova, K.** (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes research and clinical practice*, 157, 107843.
- Salzer, L., & Witting, M.** (2021). Quo Vadis *Caenorhabditis elegans* Metabolomics-A Review of Current Methods and Applications to Explore Metabolism in the Nematode. *Metabolites*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/metabo11050284>
- Sampson, J. N., Boca, S. M., Shu, X. O., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Matthews, C. E., Hsing, A. W., Tan, Y. T., Ji, B. T., Chow, W. H., Cai, Q., Liu, D. K., Yang, G., Xiang, Y. B., Zheng, W., Sinha, R., Cross, A. J., & Moore, S. C.** (2013). Metabolomics in epidemiology: sources of variability in metabolite measurements and implications. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22(4), 631-640. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.Epi-12-1109>

- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *cell*, 168(6), 960-976.
- Schmidt, D. R., Patel, R., Kirsch, D. G., Lewis, C. A., Vander Heiden, M. G., & Locasale, J. W. (2021). Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA Cancer J Clin*, 71(4), 333-358. <https://doi.org/10.3322/caac.21670>
- Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y. V., & Eeckhaut, A. V. (2019). Analytical techniques for metabolomic studies: A review. *Bioanalysis*, 11(24), 2297-2318. <https://doi.org/10.1039/C9AN00144A>
- Shen, X., Miao, S., Zhang, Y., Guo, X., Li, W., Mao, X., & Zhang, Q. (2025). Stearic acid metabolism in human health and disease. *Clinical Nutrition*, 44, 222-238. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.12.012>
- Shulaev, V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, 7(2), 128-139.
- Singh, R., Hardy, R., Wang, M., Williford, J., Gladson, C., McDonald, J., & Siegal, G. (1995). Stearate inhibits human tumor cell invasion. *Invasion & metastasis*, 15(3-4), 144-155.
- Skarbek, K., & Milewska, M. J. (2016). Biosynthetic and synthetic access to amino sugars. *Carbohydr Res*, 434, 44-71. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.08.005>
- Smeekens, S. P., Avruch, A. S., LaMendola, J., Chan, S. J., & Steiner, D. F. (1991). Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(2), 340-344.
- Solmaz, I., Kaplan, O., Çelebier, M., Lay, İ., & ANLAR, F. B. (2022). A combination of Q-TOF LC/MS and LC-MS/MS based metabolomics in pediatric-onset multiple sclerosis demonstrates potential biomarkers for unclassified patients. *Turkish journal of medical sciences*, 52(4), 1299-1310. <https://doi.org/10.55730/1300-0144.5436>
- Spencer, C. J., Heaton, J. H., Gelehrter, T. D., Richardson, K. I., & Garwin, J. (1978). Insulin selectively slows the degradation rate of tyrosine aminotransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(21), 7677-7682.
- Spratlin, J. L., Serkova, N. J., & Eckhardt, S. G. (2009). Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clinical cancer research*, 15(2), 431-440. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1059>
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook: The online review of C. elegans biology [Internet]*.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 1-11. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Sylvester, P. W., Ip, M. M., & Briski, K. P. (1993). Effects of specific fatty acids on prolactin-induced NB2 lymphoma cell proliferation. *Life sciences*, 52(24), 1977-1984.
- Tamayo, P., Slonim, D., Mesirov, J., Zhu, Q., Kitareewan, S., Dmitrovsky, E., Lander, E. S., & Golub, T. R. (1999). Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 2907-2912.
- Tang, C., Qiu, S., Mou, W., Xu, J., & Wang, P. (2022). Excessive activation of HOXB13/PIMREG axis promotes hepatocellular carcinoma progression and drug resistance. *Biochemical and biophysical research communications*, 623, 81-88.
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., & Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(2), 85-96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>

- Tian, Z., Hu, X., Xu, Y., Liu, M., Liu, H., Li, D., Hu, L., Wei, G., & Chen, W. (2024). PMhub 1.0: a comprehensive plant metabolome database. *Nucleic Acids Res*, 52(D1), D1579-d1587. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad811>
- Timmons, L., & Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6705), 854-854. <https://doi.org/10.1038/27579>
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., Howe, G. A., & Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*, 361(6407), 1112-1115.
- Trygg, J., & Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, 16(3), 119-128.
- U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. (1995). *Diabetes*, 44(11), 1249-1258.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033.
- Vander Heiden, M. G., & DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *cell*, 168(4), 657-669. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>
- Veldhoen, N., Ikonou, M. G., & Helbing, C. C. (2012). Molecular profiling of marine fauna: integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76, 23-38. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.10.005>
- Voeller, D., Rahman, L., & Zajac-Kaye, M. (2004). Elevated levels of thymidylate synthase linked to neoplastic transformation of mammalian cells. *Cell Cycle*, 3(8), 1003-1005.
- Vuckovic, D. (2012). Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(6), 1523-1548. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6039-y>
- Wang, D., Kennedy, S., Conte Jr, D., Kim, J. K., Gabel, H. W., Kamath, R. S., Mello, C. C., & Ruvkun, G. (2005). Somatic misexpression of germline P granules and enhanced RNA interference in retinoblastoma pathway mutants. *Nature*, 436(7050), 593-597. <https://doi.org/10.1038/nature04010>
- Wang, J., & Kim, S. K. (2003). Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*.
- Wang, M., Yang, Y., & Liao, Z. (2020). Diabetes and cancer: Epidemiological and biological links. *World J Diabetes*, 11(6), 227-238. <https://doi.org/10.4239/wjd.v11.i6.227>
- Wang, R., Li, B., Lam, S. M., & Shui, G. (2020). Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression. *Journal of genetics and genomics*, 47(2), 69-83. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.11.009>
- Ward, J. D. (2015). Rapid and precise engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome with lethal mutation co-conversion and inactivation of NHEJ repair. *Genetics*, 199(2), 363-377. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.172361>
- Weinkove, D., Halstead, J. R., Gems, D., & Divecha, N. (2006). Long-term starvation and ageing induce AGE-1/PI 3-kinase-dependent translocation of DAF-16/FOXO to the cytoplasm. *Bmc Biology*, 4, 1-13.
- White, M. F. (1998). The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*, 182(1-2), 3-11.

- Wiggins, T., Kumar, S., Markar, S. R., Antonowicz, S., & Hanna, G. B. (2015). Tyrosine, phenylalanine, and tryptophan in gastroesophageal malignancy: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 24(1), 32-38.
- Winnike, J. H., Busby, M. G., Watkins, P. B., & O'Connell, T. M. (2009). Effects of a prolonged standardized diet on normalizing the human metabolome. *The American journal of clinical nutrition*, 90(6), 1496-1501.
- Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H. K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., & McMahon, S. B. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48), 18782-18787. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810199105>
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., & Dong, E. (2012). HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. *Nucleic acids research*, 41(D1), D801-D807.
- Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., & Sawhney, S. (2007). HMDB: the human metabolome database. *Nucleic acids research*, 35(suppl_1), D521-D526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl923>
- Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 2(1-3), 37-52.
- Wolkow, C. A., Muñoz, M. J., Riddle, D. L., & Ruvkun, G. (2002). Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2/insulin-like signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49591-49597.
- Womack, M., & Rose, W. C. (1934). Feeding experiments with mixtures of highly purified amino acids. 6. The relation of phenylalanine and tyrosine to growth.
- Wood, W. B. (1988). Determination of pattern and fate in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol (N Y 1985)*, 5, 57-78. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6817-9_2
- Wu, H., Xue, R., Dong, L., Liu, T., Deng, C., Zeng, H., & Shen, X. (2009). Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 648(1), 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.033>
- Xia, J., Broadhurst, D. I., Wilson, M., & Wishart, D. S. (2013). Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics*, 9, 280-299.
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature protocols*, 6(6), 743-760.
- Yilmaz, L. S., Li, X., Nanda, S., Fox, B., Schroeder, F., & Walhout, A. J. (2020). Modeling tissue-relevant *Caenorhabditis elegans* metabolism at network, pathway, reaction, and metabolite levels. *Molecular Systems Biology*, 16(10), e9649. <https://doi.org/10.15252/msb.20209649>
- Yoshioka, N. (2018). Psychological reluctance to insulin therapy: as an illness side of diabetes mellitus. *Diabetology international*, 9(2), 82-83.
- Yu, X., Li, H., Lin, D., Guo, W., Xu, Z., Wang, L., & Guan, S. (2021). Ginsenoside Prolongs the Lifespan of *C. elegans* via Lipid Metabolism and Activating the Stress Response Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*, 22(18). <https://doi.org/10.3390/ijms22189668>
- Zamani, Z., Arjmand, M., Vahabi, F., Eshaq Hosseini, S. M., Fazeli, S. M., Iravani, A., Bayat, P., Oghalayee, A., Mehrabanfar, M., Haj Hosseini, R., Tashakorpour, M., Tafazzoli, M., & Sadeghi, S. (2014). A metabolic study on colon cancer using (1)h nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem Res Int*, 2014, 348712. <https://doi.org/10.1155/2014/348712>

- Zamboni, N., Saghatelian, A., & Patti, G. J.** (2015). Defining the metabolome: size, flux, and regulation. *Molecular cell*, 58(4), 699-706.
- Zečić, A., & Braeckman, B. P.** (2020). DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and Its Role in Metabolic Remodeling. *Cells*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010109>
- Zhang, L., Lv, J., Chen, C., & Wang, X.** (2021). Roles of acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 and colony stimulating factor 2 in inhibition of palmitic or stearic acids in lung cancer cell proliferation and metabolism. *Cell biology and toxicology*, 37, 15-34.
- Zhang, Y., Lin, L., Xu, Y., Lin, Y., Jin, Y., & Zheng, C.** (2013). ¹H NMR-based spectroscopy detects metabolic alterations in serum of patients with early-stage ulcerative colitis. *Biochemical and biophysical research communications*, 433(4), 547-551.
- Zhu, J., Djukovic, D., Deng, L., Gu, H., Himmati, F., Chiorean, E. G., & Raftery, D.** (2014). Colorectal cancer detection using targeted serum metabolic profiling. *Journal of proteome research*, 13(9), 4120-4130.

