

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FİSETİN'İN *DROSOPHILA*
MELANOGASTER'DE YAŞLANMAYLA İLİŞKİLİ
BAZI GENLERİN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Kübra DANIŞ ORUÇ

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

BURDUR, 2024

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca **Yüksek Lisans** Tezi olarak sunduğum “**Fisetin’in *Drosophila Melanogaster*'de Yaşlanmayla İlişkili Bazı Genlerin İfadeleri Üzerine Etkisi**” başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

29/04/2024

(İmza)

Kübra DANIŞ ORUÇ

ÖNSÖZ

Akademik kariyerimin başlangıcı olan yüksek lisans eğitimimde engin bilgisi ve tecrübeleriyle bana rehber olan, tez çalışmam boyunca her zaman bana hoşgörü ile yaklaşarak bana yol gösteren, mesleğimi sevmemde, kendimi geliştirmemde azmi ve başarılarıyla rol modelim olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ'e,

Lisans eğitimimde de bana önemli katkıları olan, beni her zaman destekleyen tez jürim değerli hocam Doç. Dr. Ali Tevfik UNCU'ya,

Tavsiyeleri ve yapıcı eleştirileriyle desteğini hissettiğim değerli hocam tez jürim Doç. Dr. Dilara AKÇORA YILDIZ'a,

Benimle üzüntümü sevincimi paylaşan, beni her zaman iyiye ve güzele yönlendiren, motive eden, desteğini kalpten hissettiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ'a,

Deneyisel sürecimde kendi tecrübe ve birikimlerini benimle paylaşarak bana yardımcı olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali KIYAK'a,

Verilerimin istatistiksel analizinde bana yardımcı olan değerli arkadaşım Dr. İrem ALKAN'a,

Lisansüstü eğitime birlikte başladığımız, birbirimize omuz olduğumuz kıymetli arkadaşlarım Merve SERT ve Busenur AKPINAR'a,

09-YL-23 numaralı proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

2210-A Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a,

Ve son olarak bugünlere gelmemde maddi ve manevi olarak yanımda olan kalpten sevgi ve bağlarını hissettiğim canım babam Ayhan DANIŞ'a, canım annem Fatümetüzzehra DANIŞ'a, biricik kardeşim Buğra Han DANIŞ'a ve sevgili eşim Sinan ORUÇ'a çok teşekkür ederim, iyi ki varsınız.

Nisan, 2024

Kübra DANIŞ ORUÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
1. GİRİŞ	
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. <i>Drosophila melanogaster</i> Yaşam Döngüsü ve Genel Özellikleri.....	5
2.2. Senesens	7
2.3. Senolitikler	10
2.4. Fisetin.....	10
2.5. Tez Çalışmasında İfadesi İncelenen Genler.....	13
2.5.1. <i>dsir2</i>	13
2.5.2. <i>dFOXO</i> Geni	15
2.5.3. <i>dRPD3</i> Geni	18
2.6. Gen İfade Analiz Yöntemleri (RT-PCR).....	19
2.6.1. Gen İfadesi	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.2. Aletler ve Cihazlar	21
3.3. Yöntem.....	22
3.3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> Kültürlerinin Hazırlanması.....	22
3.4. RNA İzolasyonu.....	25
3.5. cDNA Sentezi.....	26
3.6. RT-PCR ile Gen İfade Analizi	28
3.7. İstatistiksel Analiz.....	29
3.8. Tez Çalışmasındaki Genlerin Protein-Protein Etkileşimleri.....	29
3.9. <i>dsir2</i> , <i>dFOXO</i> ve <i>dRPD3</i> Genlerinin Dijital İfade Profilleri	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	30
4.1. Deney Süreçleri.....	30
4.2. Gen İfade Analizi Sonuçları.....	30
4.2.1. <i>dsir2</i> Geni Ekspresyon Profili	30
4.2.2. <i>dFOXO</i> Geni Ekspresyon Profili	33
4.2.3. <i>dRPD3</i> Geni Ekspresyon Profili	35
4.3. <i>dsir2</i> , <i>dFOXO</i> ve <i>dRPD3</i> Genlerinin Protein-Protein Etkileşimleri	36
4.4. <i>dsir2</i> , <i>dFOXO</i> ve <i>dRPD3</i> Genlerinin Protein-Protein Etkileşimlerinde Dijital İfade Profilleri	38
4.4.1. <i>dsir2</i> , <i>dFOXO</i> ve <i>dRPD3</i> Genlerinin Erişkin Erkek <i>D. melanogaster</i> 'da Dijital İfade Profili.....	39
4.4.2. <i>dsir2</i> , <i>dFOXO</i> ve <i>dRPD3</i> Genlerinin Erişkin Dişi <i>D. melanogaster</i> 'da Dijital İfade Profilleri	40
4.4.3. <i>dsir2</i> , <i>dFOXO</i> ve <i>dRPD3</i> Genlerinin Larval <i>D. melanogaster</i> 'da Dijital İfade Profilleri.....	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Drosophila melanogaster</i> yaşam döngüsü (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)	5
Şekil 2.2. Sırasıyla lateral ve dorsal görünümüleriyle erkek (üst) ve dişi (alt) <i>Drosophila melanogaster</i> örnekleri (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)	7
Şekil 2.3. Çeşitli fisetin kaynakları (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)	11
Şekil 2.4. Fisetinin kimyasal yapısı	12
Şekil 2.5. Sirtünlerin tarihsel süreçte keşifleri ve önemli gelişmeler	14
Şekil 2.6. Memeli sirtünlerinin hücre içerisindeki lokalizasyonu (↔:migrasyon yeteneğine sahip sirtünleri ifade etmektedir)	15
Şekil 2.7. <i>dFOXO</i> ve IGF1 sinyal yolağı	17
Şekil 2.8. <i>RPD3</i> 'ün IIS ve FOXO ile ilişkisi	19
Şekil 2.9. Gen ifadesi basamakları (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)	20
Şekil 3.1. <i>D. melanogaster</i> kültürü	22
Şekil 3.2. Fisetin	23
Şekil 3.3. Fisetin'nin farklı sıcaklık ve pH değerlerindeki degradasyon kinetiği	24
Şekil 3.4. Tez çalışmasında RNA izolasyonu öncesi örneklerin hazırlanması aşaması (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)	25
Şekil 3.5. Tez çalışmasındaki deneysel aşamalara genel bir bakış (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)	29
Şekil 4.1. <i>dsir2</i> geni RT-qPCR analizi	31
Şekil 4.2. <i>dFOXO</i> geni RT-qPCR analizi	33
Şekil 4.3. <i>dRPD3</i> geni RT-qPCR analizi	35
Şekil 4.4. Tez çalışmasında incelenen genlerin protein protein etkileşimleri (Cytoscape programı ile oluşturulmuştur.)	37
Şekil 4.5. <i>dsir2</i> , <i>dFOXO</i> ve <i>dRPD3</i> genlerinin erişkin erkek <i>D. melanogaster</i> 'da dijital ifade profili (TBtools programı ile yapılmıştır.)	40
Şekil 4.6. <i>dsir2</i> , <i>dFOXO</i> ve <i>dRPD3</i> genlerinin erişkin dişi <i>D. melanogaster</i> 'da dijital ifade profili (TBtools programı ile yapılmıştır.)	41
Şekil 4.7. <i>dsir2</i> , <i>dFOXO</i> ve <i>dRPD3</i> genlerinin larval <i>D. melanogaster</i> 'da dijital ifade profili (TBtools programı ile yapılmıştır.)	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Senesent hücrelerin marker/proteinleri ve bunların senesensteki rolü	9
Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan alet/cihazlar ve kullanım amaçları .	21
Çizelge 3.2. Standart <i>D. melanogaster</i> besiyeri.....	22
Çizelge 3.3. cDNA sentezinde kullanılan RNA miktarlarının ng/ul değerleri	26
Çizelge 3.4. Gen Ekspresyon Profilleri İncelenecek Olan Genlerin RT-PCR Primer Sekans Bilgileri	28
Çizelge 4.1. <i>D. melanogaster</i> kültürlerinin başlangıç ve bitiş zamanları	30



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

FBE : Fen Bilimleri Enstitüsü

MAKÜ : Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

TÜBİTAK: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

M : Molarite

mg : Miligram

ng : Nanogram

kg : Kilogram

µl : Mikrolitre

RT-qPCR : Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SASPs : Senesensle İlişkili Salgı Fenotipleri

GSH : Glutasyon

DNA : Deoksiribonükleik asit

RNA : Ribonükleik asit

IIS : İnsülin/insülin benzeri büyüme faktörü sinyalleme

MOMP : Mitokondri Dış Zar Geçirgenliği

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

HDAC : Histon Deasetilaz

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Fisetin'in *Drosophila Melanogaster*'de Yaşlanmayla İlişkili Bazı Genlerin İfadeleri Üzerine Etkisi

Kübra DANIŞ ORUÇ

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

Nisan, 2024

Yaşlanma canlılar için doğal ve fizyolojik bir olaydır. Hücrel yaşlanma olan senesens metabolik olarak hücre aktivitesinin devam ettiği ancak hücrelerin bölünmediği bir süreci oluşturmaktadır. Metabolik aktiflikleri devam eden senesent hücreler senesensle ilişkili salgı fenotipleri (SASP) salgılar. Bu salgı bileşenleri organizmaların kronik hastalıklar başta olmak üzere çeşitli hastalıklara yakalanma riskinin artmasına neden olur. Senolitikler senesense uğramış olan hücreleri çeşitli özelliklerine göre hedef olarak onları spesifik bir şekilde ortadan kaldıran bileşiklerdir. Bu tez çalışması kapsamında Bcl-2 ailesi hedefli bir senolitik madde olan fisetin ile çalışılmıştır. Fisetin, moleküler biyolojide model organizmalardan biri olan *Drosophila melanogaster* olarak bilinen meyve sineğine uygulanmıştır. Uygulama 2 farklı dozda (0,002 M ve 0,005M) ve 4 farklı gün grubunda (7, 14,21 ve 28 gün) yapılmıştır. Farklı sürelerde ve fisetin dozlarında yaşlanmayla ilişkilendirilen memeli sirtüin 1 homoloğu *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* genlerinin ifadeleri RT-qPCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi SPSS yazılımı 20.0 (IBM, Armonk, NY, ABD) kullanılarak %95 güven aralığında Duncan testi ($p < 0,05$) ile analiz edilmiştir. Gen ifadeleri incelenen genlerin ayrıca Cytoscape yazılımı kullanılarak protein-protein etkileşimleri ve TBtools programı ile farklı dokularda dijital ifade profilleri çıkarılmıştır. Yapılan ifade analizleri sonucunda *dsir2* geni ifadesi en yüksek 7. Günde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grupta, 14. günde 0,002 M fisetin uygulaması yapılan grupta, 21. günde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grupta ve 28. günde fisetin uygulanmamış kontrol grubunda olduğu görülmüştür. *dFOXO* geni için en yüksek gen ifadesinin 7. günde 0,002 M fisetin uygulaması yapılan grupta, 14. günde fisetin uygulanmamış kontrol grubunda, 21. günde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grupta ve 28. günde fisetin uygulanmamış kontrol grubunda olduğu ve *dRPD3* geni için en yüksek gen ifadesinin 7. Günde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grupta, 14. günde 0,002 M fisetin uygulaması yapılan grupta, 21. günde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grupta ve 28. günde fisetin uygulanmamış kontrol grubunda olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Fisetin, senesens, senolitik, gen ifadesi

Hazırlanan bu Yüksek Lisans/Doktora tezi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09-YL-23 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

M.Sc Thesis

**Effect of Fisetin on the Expression of Some Aging-Related Genes in
Drosophila Melanogaster
Kübra DANIŞ ORUÇ**

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Faculty of Art and Science
Department of Molecular Biology and Genetics**

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

April, 2024

Aging is a natural and physiological process for living organisms. Senescence, which is cellular aging, constitutes a process in which metabolic cell activity continues but the cells do not divide. Senescent cells that continue to be metabolically active secrete senescence-associated secretory phenotypes (SASP). These secretion components cause the organisms to increase the risk of contracting various diseases, especially chronic diseases. Senolytics are compounds that specifically eliminate cells that have undergone senescence by targeting them according to their various properties. In this thesis study, fisetin, a senolytic compound targeting the Bcl-2 family, was investigated using the model organism *Drosophila melanogaster*, commonly known as the fruit fly. Fisetin was applied to *Drosophila* at two different concentrations (0,002 M and 0,005M) across four time groups (7, 14, 21, and 28 days). The expressions of the mammalian sirtuin 1 homolog *dsir2*, *dFOXO* and *dRPD3* genes, which are associated with aging, were analyzed by RT-qPCR method at different times and doses of fisetin. Statistical analysis of all data obtained was analyzed with the Duncan test ($p < 0.05$) with a 95% confidence interval using SPSS software 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA). Protein protein interactions of the genes whose gene expressions were examined were also obtained using the Cytoscape software and digital expression profiles were obtained in different tissues with the TBtools program. As a result of the expression analyses, it was observed that the expression of the *dsir2* gene was highest on the 7th day in the group treated with 0,005M fisetin, on the 14th day in the group treated with 0,002 M fisetin, on the 21st day in the group treated with 0,005M fisetin, and in the untreated control group on the 28th day. The highest gene expression for the *dFOXO* gene was found in the group applied 0,002 M fisetin on the 7th day, in the control group without fisetin application on the 14th day, in the group applied 0,005M fisetin on the 21st day, and in the control group without fisetin application on the 28th day and the highest gene expression for the *dRPD3* gene was observed in the group applied 0,005M fisetin on the 7th day, in the group applied 0,002 M fisetin on the 14th day, in the group applied 0,005M fisetin on the 21st day, and in the control group without fisetin application on the 28th day.

Keywords: Fisetin, senescence, senolytic, gene expression

The present M.Sc./Ph.D. Thesis was supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Projects Coordinator under the Project number of 09-YL-23.

1. GİRİŞ

Yaşlanma tüm organizmalar için zaman içerisinde meydana gelen ve hastalıklara yakalanma riskini arttıran biyolojik bir süreçtir. Yaşlı nüfusun hızla artması yaşlanmayla beraber görülen kronik hastalıkların görülme sıklığının da paralel olarak artış göstermesine sebep olmaktadır. Ülkeler için bu durum ciddi bir ekonomik güç gerektirmektedir. Hızla artan yaşlı nüfus ile, bireylerin bir veya birden fazla kronik hastalığa sahip olmasının yıllar içerisinde bir sorun hale geleceği düşünülmektedir. Dünya sağlık örgütü (WHO), 65 yaşın üzerindeki bireylerin %90'ından fazlasında kardiyovasküler hastalık, kanser, demans, diyabet, osteoartrit ve osteoporoz gibi en az bir kronik hastalık bulunurken, %70'inden fazlasında bu tür en az iki hastalığın bulunmakta olduğunu bildirmektedir. Bu sebeple yaşlanma ve yaşlanma biyolojisi kapsamında çalışmalar arttırılmalı, bu alandaki çalışmalar detaylandırılmalı ve çözüm önerileri geliştirilmelidir. Bu kapsama bir çözüm önerisi olarak senolitikler, organizma ve dokularda yaşlanmaya uğramış hücrelerin spesifik olarak seçilerek ortadan kaldırılması için henüz yeni bir araştırma alanını oluşturmaktadır (Zhang vd., 2021).

Organizmalarda hücrenel yaşlanma senesens kavramı ile ifade edilir. Senesense uğramış hücreler ise senesent hücrelerdir. Senesent hücre birikimiyle hastalıklara yakalanma riski artmaktadır. Senesent hücre yükünün birikmesi ise senolitikler ile engellenebilir. Dasatinib ve quercetin gibi senolitik etkileri ilk keşfedilen senolitikler başta olmak üzere bu alanda birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar çeşitli senolitiklerin hem hücre hatları hem de hayvan deneylerinde senesent hücreler üzerindeki uygulamalar sonucunda ömür uzunluğunu arttırıcı etkileri olduğunu göstermiştir (Beck vd., 2020; Regulski, 2017; Roger vd., 2021). Bu tez çalışmasında doğal bir senolitik olan flavanoid bileşik fisetin ile çalışılmıştır.

Fisetin polifenoller sınıfında doğal bir flavanoid bileşik ve senolitik ilaçtır. Senolitik etkisi yanında fisetinin antioksidan etkisi de yüksektir. Ayrıca fisetin hücre içi redoks dengesinin düzenlenmesinde de önemlidir. Bu görevde kilit molekül olan glutasyon (GSH) metabolizmasında da düzenleyicidir. Fisetinin GSH metabolizmasındaki görevi burada görevli 2 ana transkripsiyon faktörü olan NRF-2 ve ATF-4'ün up-regülasyonunu sağlayarak bazal seviyede ve oksidatif stres koşulları altında GSH seviyesinin korunmasını sağlamaktır (Ehren ve Maher, 2013). Fisetin; çilek, elma, hurma, soğan, kivi, şeftali ve salatalık gibi birçok meyve ve sebze doğal olarak

bulunmaktadır. Doğal olarak bulunması bu senolitik ilacı avantajlı kılsa da örneğin çilek tüketilerek fisetinin senolitik etkisine ulaşmak için kilolarca çilek tüketilmesi gerekmektedir. Yapılan bir çalışmada fisetinin günlük olarak tüketilen meyve ve sebzelerle alınma miktarı 0.4 mg olarak hesaplanmıştır (Kimira vd., 1998). Bundan dolayı fisetinin besinlerle alındığında senolitik etkisinden bahsetmek pek mümkün değildir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda fisetinin ilaç olarak alınması alınacak uygun doz açısından daha doğru olacaktır. Çalışma kapsamında düşük (0,002 M) ve yüksek (0.05 M) dozlarında fisetin uygulaması yapılmıştır ve bu dozlar uygulama yapılmamış grup ile (kontrol) kıyaslanmıştır.

Model organizmalar genomları tamamen dizilenmiş olan ve çok çeşitli çalışma alanlarında farklı amaçlar doğrultusunda kullanılan organizmalardır. Yaşlanma çalışmalarında başlıca kullanılan model organizmalara *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* ve fareler örnek olarak verilebilir. Bu canlılar arasında *D. melanogaster* diğer model organizmalara göre çeşitli avantajlara sahiptir. Meyve sineği olarak bilinen *D. melanogaster* genomunun tamamen dizilenmiş olması ve nispeten diğer sık kullanılan model organizmalara göre daha küçük bir genoma sahip olması, genomunun genetik manipülasyonlar için uygunluğu, kolay bir şekilde yetiştirilebilmesi, besin gereksinimleri basit ve ekonomik olduğu için çok fazla sayıda birey elde edilebilmesi, erişkin döneme kısa zamanda erişilebilmesi ve en önemlisi insanlarda bulunan çoğu genin meyve sineklerinde homologlarının bulunması bu canlı grubunu yaşlanma çalışmalarında avantajlı hale getirmektedir (Hales vd., 2015; Piper vd., 2005). Tüm bu avantajları da göz önünde bulundurularak tez çalışmasında *D. melanogaster* ile çalışılmıştır.

Yaşlanma çalışmalarında yaygın olarak kullanılan model organizmalar yanında sıklıkla çalışılan gen grupları da bulunmaktadır. Bu gen gruplarından biri sirtüinlerdir. Sirtüinler memelilerde *SIRT1*'den *SIRT7*'ye kadar olmak üzere 7 üye olarak bulunmaktadır. Görevleri NAD^+ bağımlı histon deasetilazlar (HDAC) olarak deasetilasyon yapmaktır. Bu proteinler hücre içi konum ve farklı deasetilasyon hedefleri ile farklı fizyolojik süreçlerde görev almaktadır. Memeli *SIRT2* homologu *D. melanogaster*'da *dsir2* olarak bulunmaktadır. *dsir2* ekspresyonunun *D. melanogaster*'da ömür uzunluğunu arttırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Bayram vd., 2013; Frankel vd., 2011).

Bir başka histon deasetilaz grubu örneği olarak *RPD3* verilebilir. *dsir2* gibi *RPD3* de çeşitli moleküllerin deasetilasyonunu sağlayarak yolak ve reaksiyonlarda ekspresyon

seviyelerinin düzenlenmesini sağlar. *RPD3*'ün dahil olduğu sınıf I HDAC'lerin çoğu, transkripsiyonel baskı ve epigenetik çevre düzenlemesi için çok önemli olan multiprotein nükleer komplekslerinin alt birimlerini oluşturur. Histon deasetilaz *RPD3*, en az iki farklı komplekste işlev gördüğü düşünülen hem kodlayan hem de kodlamayan bölgelerdeki histonları deasetile etmektedir (Alejandro-Osorio vd., 2009; Yang ve Seto, 2008).

Yaşlanma mekanizmalarındaki önemli genlerden biri olarak bu tez projesi kapsamında *FOXO* geni de çalışılmıştır. *FOXO* genleri aslında transkripsiyon faktörleridir ve memelilerde 4 sınıfı (*FOXO1*, *FOXO3*, *FOXO4/AFX* ve *FOXO6*) tanımlanmıştır. Bu ailenin tüm üyeleri DNA tamirinde, apoptoz, hücre çoğalması, stres direnci ve metabolizmanın düzenlenmesinde görev alan hedef genlerin ifadesinde rol oynamaktadır (Vuranok vd., 2022). *FOXO* transkripsiyon faktörleri ailesi, *C. elegans*'tan insanlara kadar korunur (Du ve Zheng, 2021).

Litaratürde fisetinin çeşitli hücre hatları ve hayvanlar üzerindeki etkilerine dair çalışmalar mevcuttur. Ancak yaşlanma çalışmalarında model organizmalardan biri olan *D. melanogaster*'da fisetin uygulaması yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca fisetin uygulamasının sirtüin genleri üzerine etkisi bazı canlılarda çalışılmakla birlikte, *RPD3* gibi farklı histon deasetilazlar ile etkileşimi gösterilmemiştir. Senesent hücrelerin apoptoz ve otofaji gibi mekanizmalara direnç gösterdiği bilinmektedir. Fisetinin, hücreleri yer aldığı fenton reaksiyonu gibi reaksiyonlarla apoptoza yönlendirebildiği, ayrıca otofaji mekanizmalarını iyileştirdiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu amaç kapsamında da fisetin uygulamasının otofaji mekanizmasında görevli, memelilerdeki *FOXO* geni *Drosophila* homologu, *dFOXO* üzerindeki etkisi tıpkı fisetin uygulamasıyla diğer yaşlama mekanizmalarında görevli genlerin RT-PCR yöntemiyle incelenmesinde olduğu gibi çalışmanın özgün kısımlarını oluşturmaktadır (Alejandro-Osorio vd., 2009; Bayram vd., 2013a; Khan vd., 2013; Spellberg ve Li, 2015; Y. Wang vd., 2021a).

Senolitiklerin etkin mekanizmalarının aydınlatılması, mekanizma ve yolaklardaki moleküllerin görevlerinin açığa çıkarılması farklı hastalık grupları için potansiyel tedavi yöntemlerini oluşturabilecektir. Tez çalışması kapsamında doğal bir flavonoid olan fisetin senolitiğinin kullanması da bileşiğin hali hazırda birçok meyve sebze de bulunmasından dolayı önemlidir. Dasatinib gibi senolitik ilaçlar yerine fisetin gibi besin desteği olarak da kullanılacak senolitikler insan sağlığına faydaları bakımından ve muhtemel yan etkileri olmaması açısından daha değerli olabilir. Fisetinin yaşlanma mekanizmalarında rol oynayan genler üzerindeki etkisinin incelenmesiyle yüksek oranda ölüm sebeplerinden olan yaşlanmanın geciktirilmesi, yaşlanmayla birlikte görülen hastalıkların

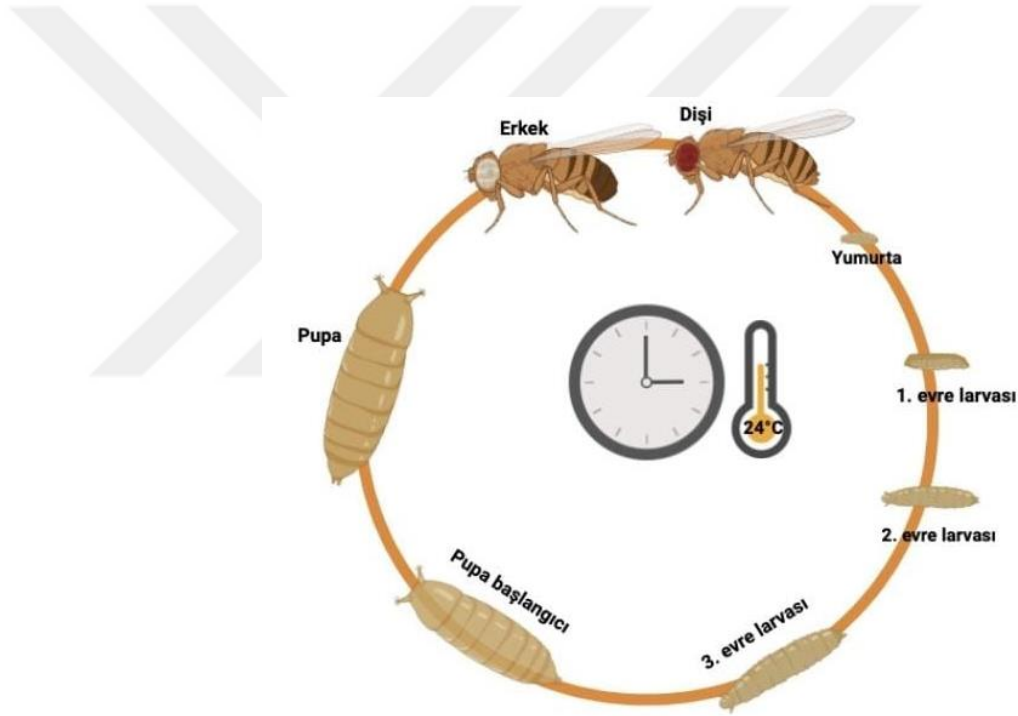
semptom ve seyrinin hafifletilerek bireylerin yaşam kalitelerinin arttırılması, ülkelerde yaşlı nüfusun ekonomik yüklerinin azaltılması gibi potansiyel hedeflerin gerçekleştirilebilmesi ve yapılacak diğer çalışmalar için de anahtar olabilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Drosophila melanogaster* Yaşam Döngüsü ve Genel Özellikleri

Ökaryot bir organizma olan *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü 4 evreden oluşmaktadır. Bu evreler sırasıyla yumurta, larva, pupa ve ergin evreleridir. Yaşam döngüsü Şekil 2.1'de gösterilmiştir. *D. melanogaster* gelişim evresi temelde 2 dönemde gerçekleşir. Bu dönemlerin ilki embriyonik dönemdir. Embriyonik dönemde yumurtanın döllenenmesi başlangıçtır ve genç larvanın yumurtanın çıkmasıyla embriyonik dönem tamamlanır. İkinci gelişim döneminde başlangıç genç larvanın yumurtadan çıkmasıdır ve bu dönem larvanın ergin döneme kadar olan tüm gelişim dönemini kapsamaktadır (Arbeitman vd., 2002; Bownes, 1975).



Şekil 2.1. *Drosophila melanogaster* yaşam döngüsü (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

D. melanogaster model organizmalardan biridir. Yaşlanma çalışmaları başta olmak üzere çeşitli biyolojik çalışmalarda sıklıkla bu organizma tercih edilmektedir. *C. elegans* gibi diğer model organizmalara göre çeşitli avantajlara sahiptir. Meyve sineği olarak bilinen *D. melanogaster*;

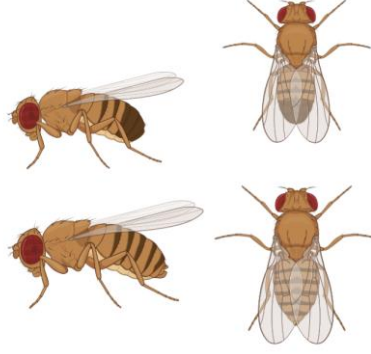
- Genomunun tamamen dizilenmiş olması,

- Nispeten diğer sık kullanılan model organizmalara göre daha küçük bir genoma sahip olması,
- Genomunun genetik manipülasyonlar için uygunluğu,
- Kolay bir şekilde yetiştirilebilmesi,
- Besin gereksinimleri basit ve ekonomik olduğu için çok fazla sayıda birey elde edilebilmesi,
- Erişkin döneme kısa zamanda erişilebilmesi,
- En önemlisi insanlarda bulunan çoğu genin meyve sineklerinde homologlarının bulunması,

Özellikleri ile yaşlanma çalışmalarında avantaj sağlayan bir canlıdır (Hales vd., 2015; Piper vd., 2005).

D. melanogaster ilk kez 1830 yılında dipteryolojinin (sinek bilimi) babası olarak da bilinen Johann Wilhelm Meigen tarafından tanımlansa da genetik çalışmalarda ilk olarak 1910 yılında Thomas Hunt Morgan tarafından kullanılmıştır. Thomas Hunt Morgan el merceği ile yaptığı bir incelemede beyaz gözlü bir meyve sineğini farketmiş ve bu göz özelliğini kromozomlarda belirli bir bölgeyle ilişkilendiren ve böylece bu canlı grubunda kromozom haritalaması yapacak ilk bilim insanı olmuştur (Benson, 2001). Gelişim biyolojisi temelli olmak üzere birçok biyolojik ve moleküler temelli çalışmada kullanılan *D. Melanogaster*'in tüm genom dizilemesi 2001 yılında tamamlanmıştır ve bu canlı grubunda ortalama 14.000 gen varlığı tespit edilmiştir (Keller, 2007).

D. melanogaster diploid olarak 4 çift kromozoma sahiptir. Kromozomlarından 3 tanesi otozomal, 1 tanesi ise eşey kromozomudur. Fiziksel olarak bu canlı grubu kırmızı renkte bir çift göze, sarı-kahverengi renk tonlarında abdomene ve abdomende paralel olarak dizilmiş siyah çizgilere sahiptir. Genellikle fiziksel olarak erkek ve dişi bireylerde farklılıklar vardır. Erkek ve dişi *D. melanogaster* örnekleri Şekil 2.2'de sırasıyla gösterilmiştir. Dişi bireylerde abdomen erkek bireylere göre daha uzun ve sivri şekildedir ve 7 segmente sahiptir. Erkek bireylerde ise abdomen daha kısa ve küt şekilde olmakla birlikte 5 segment bulunmaktadır. Dişi bireyler yumurta depolama özelliğine sahiptir ve bu özellik dişi bireylerin abdomenlerinin daha geniş olmasına sebep olmuştur. Ayrıca *D. Melanogaster*'in farklı soylarında gözlemlenen abdomen arkasının dişilerde açık renkte erkeklerde ise siyah renkte olduğudur.



Şekil 2.2. Sırasıyla lateral ve dorsal görünüşleriyle erkek (üst) ve dişi (alt) *Drosophila melanogaster* örnekleri (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

Gelişim periyodu incelendiğinde ise *D. Melanogaster*'in optimum olarak 24°C'de yaklaşık 5-7 günlük sürede erişkin evreye ulaştığı gözlemlenmiştir. Tez çalışmasında da 24°C sıcaklıkta inkübatörde *D. Melanogaster* kültür edilmiştir. Ayrıca literatürde *D. Melanogaster*'in farklı sıcaklıklarda da kültür edildiği görülmüştür. Sıcaklık farkıyla birlikte gelişimsel süreçte farklılıklar meydana gelmektedir. Örneğin 12°C sıcaklıkta *D. Melanogaster* kültürünün yaklaşık 50 günde 18°C'de ise 19 günde tamamlandığı bildirilmiştir (Yeşilada ve Gelegen, 2000).

2.2. Senesens

Yaşlanma kavramı hem aging hem de senesens ile literatürde karşılık bulmaktadır. Ancak bu iki terim arasında önemli bir fark bulunmaktadır. Aging organizmalarda süreç içerisinde ve organizma gelişimiyle meydana gelir. Senesens ise embriyogenezden itibaren meydana gelen bir süreçtir. Senesens kavramı ilk olarak Leonard Hayflick tarafından kullanılmıştır. Leonard Hayflick ve Paul Moorhead insan fibroblast hücrelerinde yaptıkları çalışma ile hücrelerin kültürde sonsuza kadar bölünmediğini, belirli bir sınıra kadar bölünme yeteneklerinin devam ettiğini ve sonrasında hücrelerin bölünmemesine rağmen canlılıklarını devam ettirdiklerini gözlemlemiştir. Bu literatüre "Hayflick Limiti" olarak kazandırılmıştır. Yani hücreler fizyolojik süreçlerini takiben belirli bölünme kapasitesine sahiptir ve bu 'Hayflick Limiti' olarak bilinmektedir. Ortalama olarak 40-60 bölünme sayısı sonrasında hücreler Hayflick limitine ulaşır ve normal fizyolojik sürecindeki hücreler senesense girer (Hayflick, 1965). Senesent hücrelerin çoğalma özelliği yoktur ancak bu hücreler metabolik olarak aktif canlı hücrelerdir.

Hücrelerin fizyolojik süreçlerinin sonucu olan senesens, çeşitli mekanizma ve etkenlerle indüklenebilir. Bunlara örnek olarak; iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma, kemoterapi ajanları (örneğin etoposid, doksorubisin), reaktif metabolitler (örneğin ROS, NOS), enflamatuar sitokinler (örneğin IL-6, IL-1), hasar ve patojenle ilişkili moleküller (örneğin HMGB1, LPS, viral RNA), onkojen aktivasyonu ve telomer erozyonu verilebilir (L. Zhang vd., 2021). Ayrıca replikatif stres, genotoksik stres, oksidatif stres, onkojen aktivasyonu ve enflamatuar faktörler de hücrelerin senesense girmesinde etkili olabilmektedir (Y. Wang vd., 2021a; L. Zhang vd., 2021). Senesens geçirmiş olan hücreler senesent hücreler olarak adlandırılır (Childs vd., 2017). Bu hücreler normal fizyolojik süreçte olan hücrelere göre farklılık göstermektedir. Senesent hücreler, genişlemiş morfoloji, artmış β -galaktosidaz aktivitesi, bir dizi enflamatuar SASP'nin (senesens ilişkili sekreter fenotipi) salınması, epigenetik ve DNA hasarı ile ilişkili değişikliklerin oluşumu gibi farklı biyobelirteçlerle karakterize edilen bir hücre döngüsü durması durumuna girer. SASP senesent hücreler tarafından salgılanan, pro-inflamatuar sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, proteazlar ve farklı bioaktif molekülleri içeren bileşik grubudur. Bu bileşikler yaşlanma sürecinde kilit rollere sahiptir. SASP salgılanması senesent hücre etrafındaki sağlıklı hücre ve dokuların fonksiyonunda bozukluklara sebep olabilir. Aynı zamanda SASP molekülleri hücreler arasındaki sinyalleşme ve iletişimi de bozabilir ve senesent hücre yükünün artması dokularda enflamasyona sebep olabilir (Birch ve Gil, 2020).

Hücreler içerisinde SASP bileşenlerinin önemli düzenleyicileri mitokondrilerdir. Ancak bu düzenleme mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. 2023 yılında yapılan bir çalışmada mitokondrilerin programlı hücre ölümü olan apoptoz mekanizmasındaki ve senesentteki rolleri araştırılmıştır. Apoptoz sırasında, mitokondri dış zar geçirgenliği (MOMP) hücre ölümüne sebep olmaktadır. Yapılan çalışmada mitokondrilerin alt kümesinde meydana gelen MOMP'nin hücre yaşlanmanın ayırt edici bir özelliği olduğu ortaya konmuştur. İn vivo ortamda olarak yapılan MOMP inhibisyonu ile yaşlı farelerde iltihabi belirteçler azalmış ve buna bağlı olarak yaşam süresinin iyileştiği rapor edilmiştir (Victorelli vd., 2023).

Senesent hücreler için belirli hücresel markerler ve proteinler bulunmaktadır. Bu marker ve proteinler Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Senesent hücrelerin marker/proteinleri ve bunların senesesteki rolü

Protein/Marker	Senesesteki Rolü
IL-6 ve IL-1	SASP Bileşenleri
TNF-α	
HMGB1	
β-galaktosidaz	β -galaktosidaz aktivitesi başta olmak üzere senesent hücrelerin metabolik aktiviteleri değişikliklere uğrar.
Hücre morfolojisindeki değişiklikler	Işık mikroskobu altında incelendiğinde senesent hücrelerin morfolojik olarak daha geniş olduğu gözlemlenmiştir.
p53, p16^{INK4A}, siklinler ve sikline bağımlı kinazlar gibi tümör baskılayıcıların aktivasyonu	DNA hasarı meydana geldiğinde hücrel mekanizmalar devreye girerek bu hasarı ortadan kaldırmaya çalışır. Ancak belirtilen protein ve marker aktivasyonlarıyla hasar kalıcı hale gelir.
Heterokromatik olarak DNA değişimi	Senesent hücrelerin DNA'sı DAPI gibi boyalarla boyandığında DNA'nın normal hücrelere kıyasla daha yoğun olduğu gözlemlenir.

Hücrel senesens her ne kadar hücrelerin fizyolojik süreçlerinin bir sonucu olsa da bu sürecin sağlıklı hücre ve doku mikro çevresine olan etkisi bu hücrelerden salgılanan faktörler sebebiyle zararlı olabilmektedir. Ayrıca yaşlanma ve yaşlanmadan dolayı oluşan kalp, böbrek, nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıklara daha da yatkınlık durumu bireyin yaşam kalitesini düşürmektedir (Chaib vd., 2022). Yeni nesil ilaçlar olan ve spesifik olarak senesent hücreleri hedefleyip bu hücreleri ortadan kaldırabilen senolitikler, dokularda senesent hücrelerin birikimin önlenmesi ve birikmeye dayalı oluşacak olan olumsuz durumların elimine edilebilmesi için yeni bir yöntem olarak görülmektedir. Ayrıca senolitiklerin yaşlanmayla ilişkili genlerle olan etkileşimlerinin detaylı olarak incelenmesi ve ekspresyon profillerinin açığa çıkarılması yapılacak yeni çalışmalara ışık tutabilmek için de son derece önem taşımaktadır.

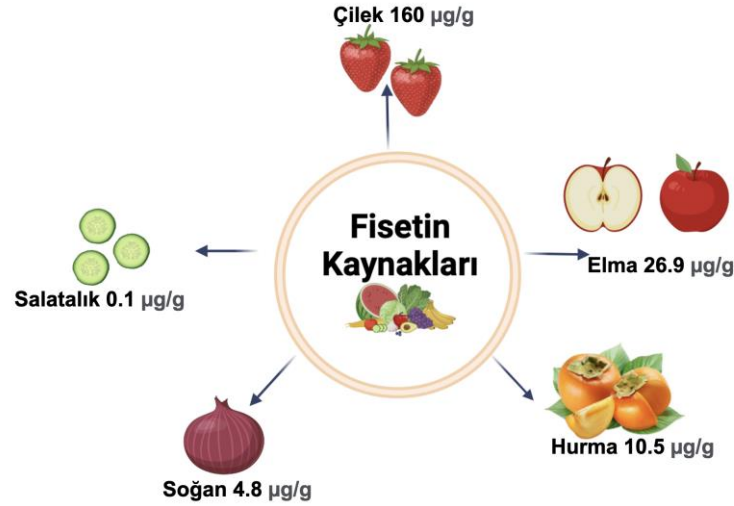
2.3. Senolitikler

Senesent hücreleri ayırt edici özelliklerine göre spesifik olarak seçerek bu hücreleri apoptoza yönlendiren, ortadan kaldıran yeni nesil ilaçlar senolitiklerdir. Senolitikler yaşlanma çalışmaları öncesi mylema gibi çeşitli kanser türlerinde de kullanılmıştır. Senolitiklerin senesent hücreleri spesifik olarak nasıl seçtikleri her senolitik çeşidi için belirlenmemiştir. Senolitiklere örnek olarak dasatinib, quercetin, fisetin verilebilir (Di Micco vd., 2021).

Senolitikler ile ilgili yapılan ilk çalışmalar hücrelerin anti-apoptotik yollarının biyoinformatik olarak analizleri ve hücre kültüründe farklı türde yaşlanmış hücreler üzerinde ilaç kütüphanelerinin taranması aşamalarını içermektedir. Senesent hücrelerin apoptoza karşı dirençli olmaları anti-apoptotik yolların hedeflenmesine sebep olmuştur. Hedefledikleri yollara ve etki mekanizmalarına göre senolitikler çeşitli sınıflara ayrılmaktadırlar. Senolitik etkinliği ilk belirlenen ilaç dasatinib (D)'dir. Senolitik aktivitesinin keşfinden önce klinikte çeşitli lösemi (ileri kronik lösemi, akut lenfoblastik lösemi, kronik miyeloid lösemi) türlerinin tedavisinde kullanılmıştır ve hedef molekülü bir apoptoz düzenleyicisi olan BCL-2 proteindir (Wang vd., 2021). Bir diğer tanımlanan senolitik doğal bir flavanoid bileşik olan quercetin (Q) BCL-2, PI3K / AKT yolunu, insülin / IGF-1, HIF-1^α yollarını hedefleyen doğal olarak oluşan bir flavonoid bileşiktir. Özellikle yaşlanmış endotel hücreleri üzerinde etkin olduğu gösterilmiştir. Dasatinib ve quercetin senolitiklerinin birlikte/kombine olarak kullanılmasının hem yaşlanmış preadipositlerde hem de yaşlanmış endotel hücreleri üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin ise birden fazla bileşik ve yolağın aynı anda hedeflenmesi olduğu düşünülmektedir.

2.4. Fisetin

Fisetin, quercetin gibi polifenoller olarak bilinen doğal pigmentler ailesinden flavanoid bileşiktir. Çeşitli fisetin kaynakları Şekil 2.3'de gösterilmiştir. En çok çilekte (160 ug/g) olmak üzere fisetin; elma, hurma, soğan, kivi, şeftali ve salatalık gibi birçok meyve ve sebze de bulunmaktadır (Khan vd., 2013; J. Wang ve Zhao, 2016).



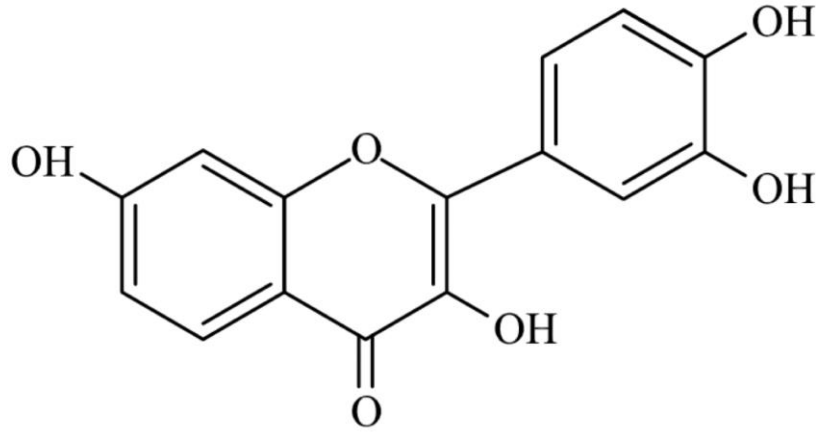
Şekil 2.3. Çeşitli fisetin kaynakları (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

Senolitik etkisinin yanında fisetin güçlü bir antioksidan ve proinflatuar yanıt için önemli bir bileşiktir (Khan vd., 2013). Ayrıca fisetin hücre içi redoks dengesinin düzenlenmesinde kilit molekül olan glutasyon (GSH) metabolizmasında da görevlidir. Burada fisetin görevi GSH metabolizmasındaki 2 ana transkripsiyon faktörü olan NRF-2 ve ATF-4'ün up-regülasyonunu sağlayarak bazal seviyede ve oksidatif stres koşulları altında GSH seviyesinin korunmasını sağlamaktır (Ehren ve Maher, 2013).

Senolitikler ve senolitik çalışmalarıyla ilgili genel bir sorun bu bileşikler için belirlenmiş spesifik mekanizmaların olmamasıdır. Ancak fisetin ve quercetin için 2021 yılında yapılan bir çalışmada spesifik seçici bir mekanizma önerilmiştir. Yapılan çalışmada esas alınan senesent hücreler ve normal hücreler arasındaki demir ve bakır iyonları birikim miktarlarının farklılığı ve buna bağlı olarak oluşan reaktif oksijen türlerine bağlı olarak hücrenin apoptoz eğilimidir. Senesent hücrelerde normal hücrelere oranla daha fazla Fe ve Cu iyon birikimi meydana gelmektedir. Bunun sebebi ise hücreye bakır ve demir alımından sorumlu olan Atp7a gibi yapıların yaşlanmayla birlikte fonksiyon bozukluğuna uğramasıdır. Senesent hücrelerde senolitik ajanlardan fisetin ve quercetin uygulamasıyla hücre içerisinde biriken bakır ve demir fenton ve fenton benzeri reaksiyonlarla indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerine maruz kalır ve bu tepkimeler neticesinde çok sayıda reaktif oksijen türleri meydana gelir. Fisetin ve quercetin tarafından oluşturulan reaktif oksijen türleri H_2O_2 ve OH^- 'dir. Özellikle hidroksil (OH^-) radikalinin hücre içerisinde aşırı miktarda birikmesi bu radikalın başlıca DNA olmak üzere makromoleküllere atak yapmasına ve böylece hücrenin apoptoza gitmesine sebep olmaktadır. Normal hücrede bakır ve demir iyon birikimi hücrenin kendi

geliştirdiği mekanizmalarla tolere edilebilecek bir seviyede olduğundan normal hücre fizyolojik sürecine devam edebilmektedir (Lall vd., 2016; Y. Wang vd., 2021b).

Fisetin belirtildiği üzere flavonoid bir bileşiktir. Flavonoidlerin biyosentezi fenilalanin amino asitinin 4-kumaril-COa'ya dönüştürüldüğü reaksiyon ile başlamaktadır (Falcone Ferreyra vd., 2012). 4-kumaril-COa, flavonoid biyosentez yoluna giren bileşiktir. Yolaktaki ilk enzimi kalkon sentazdır ve 4-kumaroil-COa'dan kalkon üretimini kataliz eder. Kalkonoidler olarak adlandırılan bu kalkon omurgası flavonoidlerin ana hattını oluşturur ve bu omurgaya eklenecek çeşitli kimyasal yapılar sonucunda flavonoidler flavonlar, flavonoller, flavononlar gibi alt türlere ayrılırlar. Flavonoller 15 karbonlu bir iskelet yapısına bu yapıda 2 fenil grubuna sahip bileşiklerdir. Flavonoller aynı zamanda 3-hidroksiflavon bileşikleri olarak da bilinmektedir. Bunun sebebi karbon iskeletinde üçüncü karbondan hidroksil (-OH) grubu ve dördüncü karbondan keton grubu bulunması kaynaklıdır. Fisetin flavonoller sınıfında yer almaktadır ve kimyasal yapısı Şekil 2.4'de gösterilmiştir. Ayrıca fisetin hidrofobik bir yapıya sahiptir, bu sayede hücreye nüfuz eder ve antioksidan etki mekanizmasını hücrede birikerek gösterir. Fisetin antioksidan ve senolitik etkisine ilaveten antiinflamatuvar ve anti kanserojen etkilere de sahiptir (Khan vd., 2013).



Şekil 2.4. Fisetinin kimyasal yapısı (S. Zhang vd., 2020)

Fisetinin senolitik etkisi yapılan farklı çalışmalarda incelenmiştir. Bu çalışmalarda farklı organizmalar ve deney modelleri kullanılmıştır. İnsan göbük damarı endotel hücre hattında (HUVEC) yapılan bir çalışmada fisetinin senolitik etkisi gösterilmiştir. Aynı çalışmada incelenen IMR-90 insan fibroblast hücre hattında ise fisetin senolitik olarak etki göstermemiştir. (Zhu vd., 2017). Organizma olarak C57BL/6 farelerinin kullanıldığı

başka bir çalışmada ise fisetinin de bulunduğu 10 flavonoid taranmış ve bu flavonoidlerin senolitik etkisi incelenmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda en güçlü senolitik bileşiğin fisetin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Fisetinin devamlı olmayan aralıklarla uygulamasının hem yaşlı farelerde hem de progeroid olan (erken yaşlanma hastalığı) farelerde çoklu dokularda yaşlanma belirteçlerini azalttığı görülmüştür (Yousefzadeh vd., 2018).

Litaratürde fisetinin senolitik ilaç olarak *D. melanogaster*'de uygulaması bulunmamaktadır. Ancak fisetine benzer yapıda flavonoid bileşik ve senolitik olan quercetin *D. melanogaster*'da çalışılmıştır. 2022 yılında yapılan bu çalışmada quercetin mavi ışık maruziyetine bırakılmış *D. melanogaster* organizmasında ömür uzunluğu çalışması yapılmıştır. Çalışmada besiyerine farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.01, 0.002 M) quercetin eklenmiş ve bu konsantrasyonlarda kültüre edilen sinekler mavi ışığa da maruz bırakılmıştır. Yapılan analizler ve toksisite çalışması sonucunda elde edilen sonuç mavi ışık altında kültüre eklenen quercetin ömür uzunluğunu uzattığı yönünde olmuştur (D. Zhang vd., 2023).

2.5. Tez Çalışmasında İfadesi İncelenen Genler

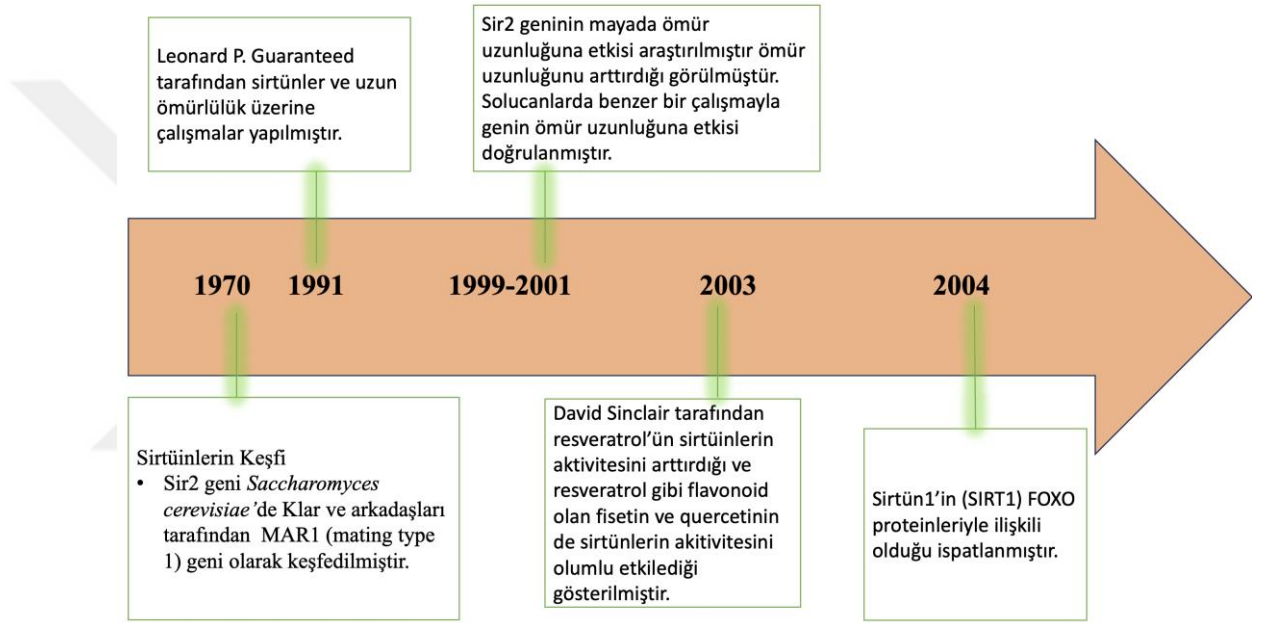
Organizmaların gelişim dönemlerinin farklı evrelerinde gen seviyelerinde de farklılıklar görülebilmektedir. Yaşlanmayla ilişkilendirilmiş genlerin etki mekanizmalarına göre ifadeleri artıp azalabilir. Tez çalışmasında yaşlanmayla ilişkilendirilen ve *D. melanogaster*'de bulunan *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* genlerinin ifadeleri, farklı zaman aralıklarında incelenmiştir.

2.5.1. *dsir2*

Sirtüinler ilk olarak bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'de Klar ve arkadaşları tarafından 1970'lerde keşfedilmiştir. Klar ve arkadaşları keşfettikleri genleri Mar1 olarak tanımlamışlardır (Klar vd., 1979). Bu gen grubuna sirtüin ismi ise 1999 yılında Roy Frye tarafından verilmiştir (Bayram vd., 2013). Sirtüin ismi mayada keşfedilen *Sir2* geninden türetilmiştir. SIR olarak kısaltılan sirtüinlerde SIR 'sessiz bilgi düzenleyecileri' anlamına gelmektedir (Dang, 2014). Sirtüinlerin keşfedilmesinden itibaren önemli tarihsel süreçleri Şekil 2.5'de gösterilmiştir. Memelilerde 7 sirtüin geni varyantı olmak üzere sirtüinlerin sinekler, solucanlar, bakteriler ve bitkilerde varlıkları belirlenmiştir. Memeli sirtüinlerinin hücre içerisindeki lokalizasyonları Şekil 2.6'de gösterilmiştir. Memelilerden farklı olarak *D. melanogaster*'de 5 sirtüin varyantı

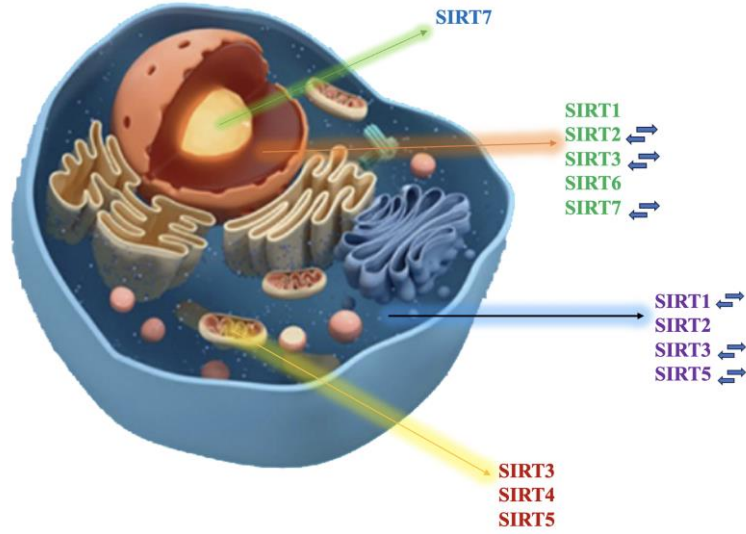
bulunmaktadır. Bunlar arasında *dsir2* maya Sir2'nin ve memeli Sirt1'in homologudur. Yetişkin sinekte *dsir2* proteini çekirdekte bulunur. Embriyonal dönemde, hem çekirdekte hem de sitoplazmada tespit edilmiştir. Sinsityal blastoderm aşamasında ise, *dsir2* sadece sitoplazmada bulunmaktadır. Hücreleşme başladığında ise yeniden hem çekirdekte hem de sitoplazmada ifade olmaktadır (Blander ve Guarente, 2004; Dang, 2014).

Sirtünler nikotin adenin dinükleotidine (NAD⁺) bağımlı sınıf III histon deasetilazlardır. Histonların asetillenmesi genelde gen ifadesini arttıran modifikasyonlardır. Deasetillenme ise histonların daha sıkı sarılmasına ve böylece gen ifadesinde azalmaya sebep olmaktadır.



Şekil 2.5. Sirtünlerin tarihsel süreçte keşifleri ve önemli gelişmeler (Wu vd., 2022; Ziğtara vd., 2022)

Sirtünler hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda birçok önemli biyolojik yolakta görev alırlar. Bunlar arasında gen ifadesinin düzenlenmesi, DNA onarımı, hücre gelişim, programlı hücre ölüm mekanizması olan apoptoz ve metabolizma faaliyetleri sayılabilir (Bayram vd., 2013).



Şekil 2.6. Memeli sirtünlerinin hücre içerisindeki lokalizasyonu (↔:migrasyon yeteneğine sahip sirtünleri ifade etmektedir) (Ziğtara vd., 2022)

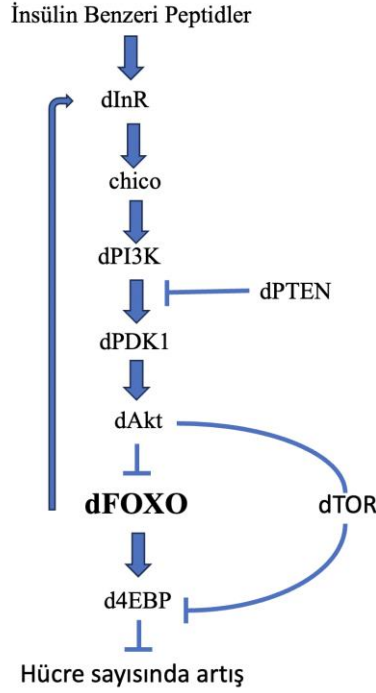
D. melanogaster'de *dsir2* geninin susturulmasının sinek ömrünü kısalttığı yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Blander ve Guarente, 2004). Yapılan bir çalışmada genetik olarak manipüle edilmiş *dsir2* genini aşırı ifade eden sineklerin kontrollerine kıyasla daha uzun yaşadığı bildirilmiştir (Bauer vd., 2004; Rogina ve Helfand, 2004). Meyve sineği de dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda gen ekspresyonu incelemesinin yapıldığı GAL4/UAS sistemi kullanılan bir çalışmada ise *dsir2*'nin aşırı ifade edilmesinin hem erkek ve hem de dişi sineklerin yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir. Ancak genin uzun ömürlülük etkisinin; ifade zamanı, yeri ve seviyelerine bağlı olduğu da gösterilmiştir (Rogina ve Helfand, 2004). Genetik çalışmaların yanında bilim insanları *dsir2* geninin aktivitesinin enzim aktivitesindeki indüklemeye de mümkün olup olmayacağı sorusuna da yönelmişlerdir. Bu soru dahilinde *dsir2* geninin aktivitesinde artışa sebep olan maddeler taranmıştır (Frankel vd., 2011). Taranan maddelerin büyük bir çoğunluğunu polifenolik maddeler oluşturmaktadır. Bu maddelere örnek olarak resveratrol verilebilir. Meyve sineklerinde resveratrolün ömür uzunluğuna etkisi yapılan her çalışmada net olarak gösterilememiş olsa da farelerin diyetlerine resveratrol eklenmesi mevcut durumlarını iyileştirmiştir (Pearson vd., 2008).

2.5.2. *dFOXO* Geni

Diyet, canlılarda yaşam kalitesini öngörülenden daha fazla etkilemektedir ve beslenmenin ömür uzunluğu üzerindeki ciddi etkileri farklı canlı gruplarında

gösterilmiştir. Memeliler, solucanlar ve sinekler de dahil olmak üzere metabolizmanın kilit yollarından biri insülin benzeri büyüme faktörü sinyal yolağı (IGF1)'dir. IGF1 sinyal yolağı da dahil olmak üzere hücrel sinyal yollarının çoğu insanlar ve sinekler arasında yüksek oranda korunmuştur ve bilinen insan hastalık genlerinin yaklaşık %77'si *Drosophila*'da bir ortolojiye sahiptir (Puig ve Mattila, 2011). İnsülin sinyal yolağında *D. melanogaster* genomu 8 insülin benzeri peptid, tek bir insülin reseptörünü ve PI3K dalının hücre içi bileşenlerini bulundurur. Organizmalarda insülin sinyallemedeki önemli nokta bir transkripsiyon faktörü olan *FOXO*'dur. Memelilerde *FOXO1*, *FOXO3a*, *FOXO4* ve *FOXO6* olmak üzere 4; *Drosophila Melanogaster*'da ise *dFOXO* olarak tek bir varyant bulunmaktadır (Carter ve Brunet, 2007). *FOXO* proteinleri büyüme ve gelişme, hücrenin DNA hasarından korunması, enerji homeostazı, hücre döngüsü, hücrel farklılaşma ve organizmanın ömür uzunluğu gibi biyolojik faaliyetlerde önemlidir (Puig ve Mattila, 2011). Memeli *FOXO* proteinlerinin *D. melanogaster* ortoloğu olan *dFOXO* 11 ekzonluk gen tarafından kodlanan ve 613 aminoasit içeren bir transkripsiyon faktörüdür (Puig ve Mattila, 2011). *FOXO* proteinleri sirtüinlerle etkileşime girerek yaşlanmadan sorumlu olan süreçleri etkileyebilmektedir. (Jerome vd., 2022; Ziğtara vd., 2022).

Drosophila FOXO homoloğu *dFOXO*'nun transkripsiyonel düzenlemesi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu mekanizma için post-translasyonel değişikliklerin *dFOXO* aktivitesini nasıl etkilediği daha çok çalışılmıştır. *dFOXO* tanımlandığında, memeli *FOXO* proteinlerinin Akt tarafından fosforilasyonla insülin=IGF sinyali ile inhibe edildiği bilinmekteydi (Puig ve Mattila, 2011). Buna rağmen *FOXO* aktivitesinin fosforilasyon ve asetilasyon ile modüle edildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. İnsülin/insülin benzeri büyüme faktörü sinyalleme (IIS) yolu, büyüme ve gelişmeyi, enerji alımı ve homeostazını, stres faktörlerine karşı yanıtı ve canlı çoğalmasını düzenleyen besin algılama yoludur. Özellikle, IIS yolağındaki mutasyonlar, maya, solucanlar, sinekler ve farelerde daha uzun yaşam süresi ile ilişkilendirilmiştir. *D. melanogaster*, insülin reseptörüne (dInR) bağlanarak downstream yolağı aktive eden sekiz insülin benzeri peptite (Dilps) sahiptir (Piper ve Partridge, 2018). *dFOXO*'nun IGF1 sinyal yolağı Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. *dFOXO* ve IGF1 sinyal yolağı (Puig vd., 2003)

dInR *Drosophila* insülin reseptörüdür. *dInR*, *dPI3K/dAkt* yolu aracılığıyla hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenlemektedir. *dFOXO*, insülin sinyal *dAkt* tarafından fosforile edilir ve bu fosforilasyon *dFOXO*'nun transkripsiyonel aktivitesinde inhibisyona sebep olur. Sineklerde IIS yolağındaki aşağı akış hedefi olan bu transkripsiyon faktörü bahsedildiği üzere *dAkt* tarafından fosforile edilir. *dFOXO* fosforilasyonu onun 14-3-3 proteinine bağlanabilmesini sağlar ve bu da *dFOXO*'nun parçalanmasına sebep olur. *dAkt* fosforilasyon bölgeleri olmayan ve bundan dolayı fosforilasyona uğramayan mutant *dFOXO* insülin inhibisyonu geçirmez, çekirdekte kalmaktadır ve yapısal olarak aktifliğini korumaktadır.

d4EBP'nin indüksiyonu, *dFOXO* tarafından büyüme inhibisyonuna yol açarken, *dInR*'nin aktivasyonu, transkripsiyonel olarak indüklenen yeni bir geri besleme kontrol mekanizması sağlar. Sinek dokularında *dFOXO*'nun hedeflenen ifadesi, hücre boyutunu etkilemeden hücre sayısını belirterek organ boyutunu düzenler. Tüm bu etkileşimler *dFOXO*'yu, büyümeyi ve proliferasyonu modüle eden insülin yolunun önemli bir transkripsiyonel düzenleyicisi yapmaktadır.

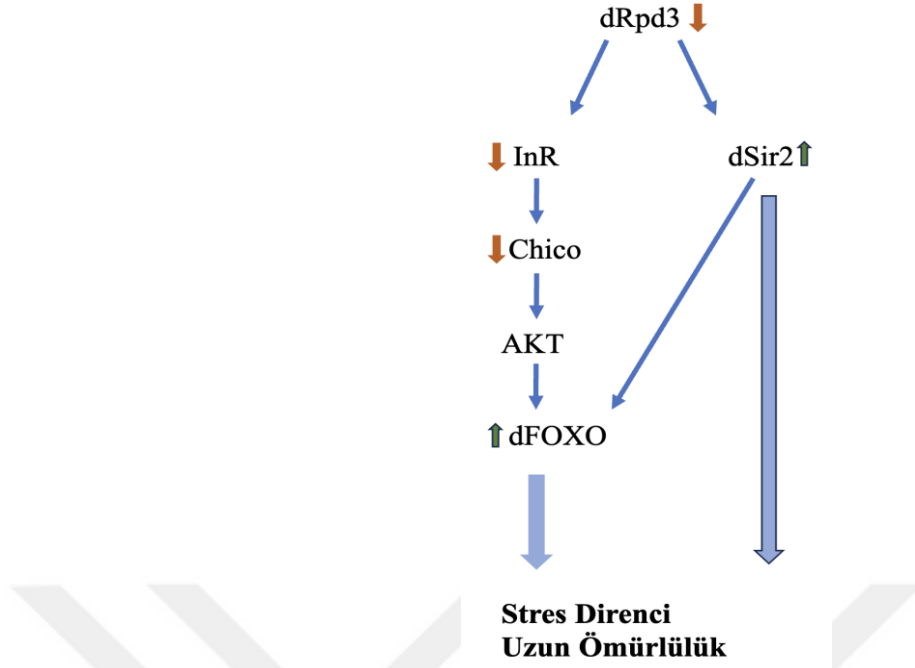
D. melanogaster'de, insülin benzeri sinyal azaldığında yaşlanma yavaşlamaktadır. İnsülin benzeri reseptör (*InR*) veya reseptör substratı (*chico*) mutasyona uğradığında veya

insülin üreten hücrelerin ablasyonunda ömür uzunluğu %50'den fazla uzamaktadır (Hwangbo vd., 2004). Yapılan çalışmalarda *dFOXO*'nun aşırı ekspresyonunun, sineklerde ve solucanlarda yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir. Ek olarak, sinek kasında *dFOXO*'nun aşırı ifade edilmesi de ömrü uzatmaktadır. Çekirdekte lokalize olan bu transkripsiyon faktörünün yağ dokuda ve bağırsakta aşırı ekspresyonunun sinek ve solucanlarda ömür uzunluğunu arttırdığı gösterilmiştir (Giannakou vd., 2004).

2.5.3. *dRPD3* Geni

RPD3 çinko bağımlı sınıf 1 histon deasetilazlardan (HDAC) biridir. HDAC aktivitesi hücre çoğalması, farklılaşması ve gelişmesi, yaşlanma gibi önemli süreçleri etkilemektedir. HDAC1 fonksiyon bozuklukları, kanser ve Alzheimer hastalığı başta olmak üzere nörodejeneratif hastalıklar dahil birçok hastalık çeşidiyle ilişkilendirilmiştir. *RPD3* memeli HDAC1'in bir ortoloğudur. *RPD3* *p53* gibi diğer çeşitli proteinlerin lizin kalıntılarından deasetilleyebilir veya örneğin *p21* ve *p57* genlerin promotör bölgesine bağlanarak gen transkripsiyonlarını etkileyebilir. Azaltılmış *RPD3* ifadesinin maya, solucan ve *D. melanogaster*'de yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (Frankel vd., 2015; Woods vd., 2016; Woods ve Rogina, 2016). *D. melanogaster*'de *RPD3*'ün mutasyonel analizi ilk olarak 1999 yılında Mannervik ve Levine tarafından yayınlanmıştır. Mannervik ve Levine *RPD3* mutant suşlarının *RPD3* RNA ekspresyon seviyelerini düşürdüğünü ve *Drosophila* embriyosunun segmentasyonunda güçlü kusurlar gösterdiğini analiz etmişlerdir (Mannervik ve Levine, 1999).

RPD3'ün uzun ömürlülük üzerine etkisi belirli bir yolak veya moleküller ile direkt olarak ilişkilendirilmemiş olsa da yapılan bir çalışmada FOXO'da olduğu gibi IIS yolağıyla ilişkisi gösterilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular RPD3 aktivitesindeki azalmanın aynı zamanda IIS yolağındaki gen ifadelerinin de düşmesine sebep olduğu buna bağlı olarak da metabolik değişikliklerle hücrelerin daha fazla enerji depoladığı, açlık ve oksidatif stres direncinin de yükseldiği yönündedir. RPD3'ün IIS ve FOXO ile ilişkisi Şekil 2.8'de gösterilmiştir. RPD3'ün IIS ve FOXO ile ilişkisini destekleyen genetik bir çalışmada RPD3 ve dFOXO için çift mutant olan sineklerin, RPD3 tek mutant olan sineklere göre daha az stres direnci ve ömre sahip olduğu belirlenmiştir. Azalan *RPD3* aktivitesi, InR ve chico mRNA seviyesini azaltırken, *dFOXO* ve *dsir2* mRNA seviyelerini artırır. Azalan *RPD3* metabolizmayı etkiler, IIS'yi azaltarak ve *dsir2* seviyelerini artırarak stres direncini ve uzun ömürlülüğü sağlar (Woods vd., 2016).

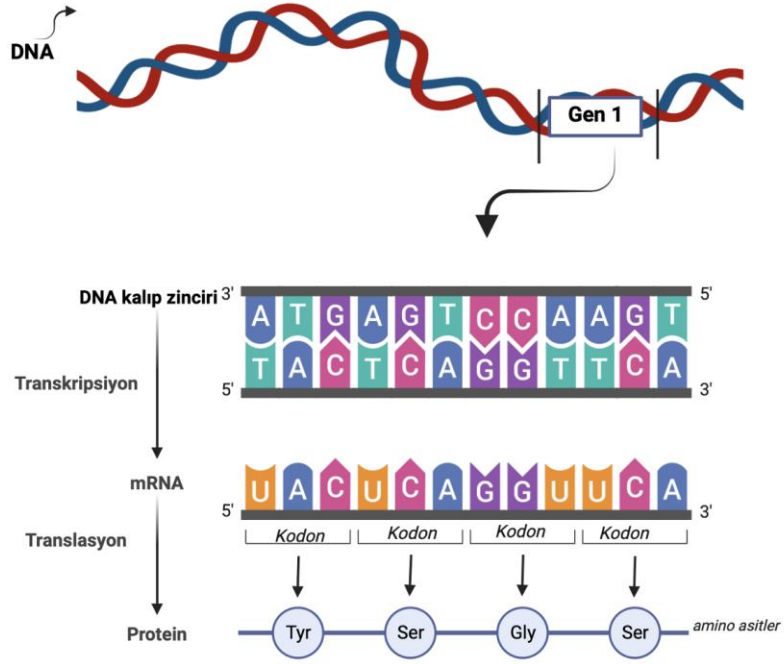


Şekil 2.8. *RPD3*'ün IIS ve FOXO ile ilişkisi (Woods vd., 2016)

2.6. Gen İfade Analiz Yöntemleri (RT-PCR)

2.6.1. Gen İfadesi

Genin ifadesi ya da ekspresyonu bir genin proteine dönüşüm süreci olarak tanımlanır. Bu mekanizma prokaryot ve ökaryot canlılar arasında farklılıklara sahip olsa da temelde her iki canlı grubunda da transkripsiyon ve translasyon ana basamaklardır. Transkripsiyon DNA'dan mRNA oluşum sürecidir ve prokaryotlarda transkripsiyon stoplazmada gerçekleşirken ökaryotlarda çekirdekte meydana gelir. Translasyon ise mRNA'nın polipeptid zincirine dönüştürüldüğü işlemdir ve tüm canlılarda ribozom organeline gerçekleşir. Transkripsiyon ve translasyon işlemleri Şekil 2.9'de gösterilmiştir. Translasyon sonucunda oluşan polipeptid zinciri ökaryot canlılarda translasyon sonrası çeşitli modifikasyonlar geçirerek fonksiyonel proteine dönüştürülür (Mata vd., 2005; Qausain vd., 2019).



Şekil 2.9. Gen ifadesi basamakları (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

Gen ifadesini analiz etmenin farklı yol ve metodları bulunmaktadır. Analiz yöntemleri genel olarak dizileme temelli, hibridizasyon temelli ve PCR temellidir. Bunlar arasında PCR temelli metodlar sıklıkla tercih edilmektedir. Normal PCR yöntemine kıyasla RT-PCR yöntemi daha hassas ve hızlı bir yöntemdir. Gen ifadesinin az miktarda RNA varlığında bile ekspresyonu RT-PCR ile analiz edilebilir. RT-PCR yöntemi için çalışılacak doku ya da örnekler öncelikle hazırlanır. Hazırlanan örneklerden total RNA izolasyonu yapılır. RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi gerçekleştirilir. Takip edilen kit prosedürüne uygun olarak sentezlenen cDNA'lar ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir (Artika vd., 2022).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında deney hayvanı olarak *D. melanogaster* yabanıl tipi kullanılmıştır. *D. melanogaster* kültürüne senolitik madde fisetin (Doctor's Best) uygulaması yapılmıştır. Fisetin 0,002 M ve 0,005M dozlarda 7, 14, 21 ve 28 günlük deney gruplarına uygulanmıştır.

3.2. Aletler ve Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar ve çalışmada hangi amaç doğrultusunda kullanıldıkları Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan alet/cihazlar ve kullanım amaçları

Alet/Cihaz	Çalışmada Kullanım Amacı
Otoklav	Sarf malzemelerin sterilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
Isıtıcı	<i>D. melanogaster</i> standart besiyeri hazırlığında kullanılmıştır.
Hassas Terazi	
İnkübatör	<i>D. melanogaster</i> inkübasyonu amacıyla kullanılmıştır.
Homojenizatör	RNA izolasyonu öncesi sineklerin doku homojenizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
PCR Kabini	cDNA sentezi ve RNA izolasyonu PCR kabini içerisinde yapılmıştır.
Soğutmalı Santrifüj	RNA izolasyonu aşamasında faz ayrımı ve Rt-qPCR aşamalarında çözelti homojenliğini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
Mini Santrifüj	
BioTek Epoch Mikroplate Spektrofotometre	İzole edilen RNA'nın kalitesini tayin etmek amacıyla kullanılmıştır.
PCR (Biorad T100™ Thermal Cycler)	Primerlerin Tm derecelerinin optimizasyonunda ve cDNA sentezinde kullanılmıştır.
RT-qPCR (Biorad CFX-96)	Tez çalışmasındaki genlerin ifade analizleri için kullanılmıştır.
Buzdolabı (+4 ve -20 °C)	Çalışmada kullanılan malzeme kimyasalların muhafaza edilmesi amacıyla kullanılmıştır.
-80 °C Derin Dondurucu	

3.3. Yöntem

3.3.1. *Drosophila melanogaster* Kültürlerinin Hazırlanması

D. melanogaster kültürü için standart *D. melanogaster* besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içeriği Çizelge 3.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. Standart *D. melanogaster* besiyeri

Besiyeri İçeriğindeki Maddeler	Miktarları
Mısır Unu	21 g
Şeker	19 g
Agar	1 g
Maya	4 g
Distile Su (dH ₂ O)	205 mL
Asit (Propiyonik Asit-CH ₃ CH ₂ COOH)	1 mL

Besiyeri hazırlanırken tüm katı malzemeler tartılır, distile su eklenir ve uygun kıvamına gelinceye kadar kaynatılır. Propiyonik asit eklenir ve besiyeri şişelerine uygun kalınlık sağlanacak şekilde dökülür. 24 saat oda sıcaklığında inkübe edilen besiyeri şişeleri ertesi gün kullanıma hazır hale getirilmiş olur. *D. melanogaster* kültürü Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

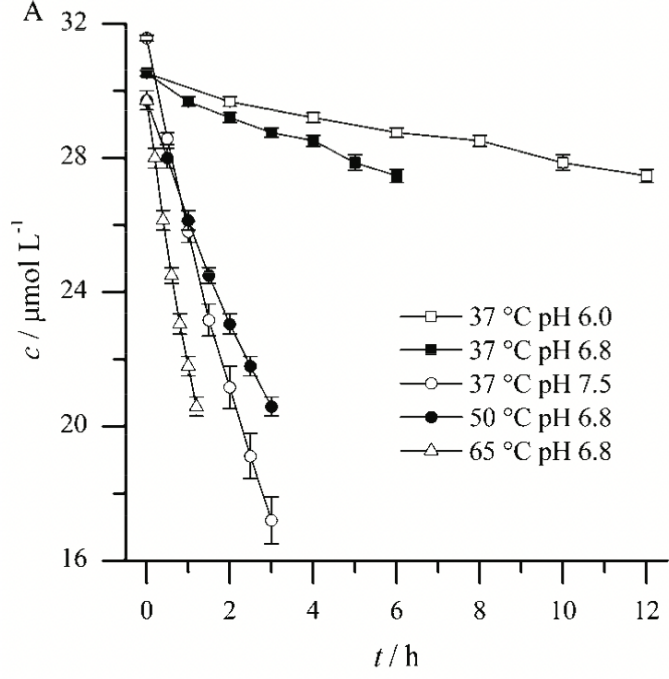


Şekil 3.1. *D. melanogaster* kültürü

Tez çalışmasında fisetin uygulaması 1-3 günlük sineklere 7,14,21 ve 28 gün olarak yapılmıştır. Deneysel gruplarına 0,002 M ve 0,005M olmak üzere iki farklı doz fisetin uygulaması yapılmış ve her bir gün aralığı için ayrıca kontrol grupları da oluşturulmuştur. Fisetin kapsül şeklinde ticari olarak elde edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan fisetin Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Her bir fisetin kapsülü 100 mg saf fisetin içermektedir. Fisetinin çözünürlüğü sıcaklık ve pH’dan önemli derecede etkilenmektedir. Yapılan bir çalışmada fisetin ve yine bir flavanoid olan quercetin için farklı sıcaklık, pH değerlerinde ve farklı protein varlıklarında çözünürlükler incelenmiş; buna göre sıcaklığın artmasının ve pH’nın düşmesinin flavanoidlerin degradasyonuna yol açtığı görülmüştür (J. Wang ve Zhao, 2016). Fisetin için pH ve sıcaklık etkisiyle degradasyon Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Bu sebeple Şekil 3.3’e göre kültüre eklenen fisetinin ~%17’lik degradasyona uğrayacağı tespit edilmiş ve besiyerine koyulacak fisetin konsantrasyonları buna göre hesaplanmış, besiyeri sıcaklığı ölçülerek sıcaklık ~57 °C’de iken fisetin toz şeklinde besiyerine eklenmiştir.

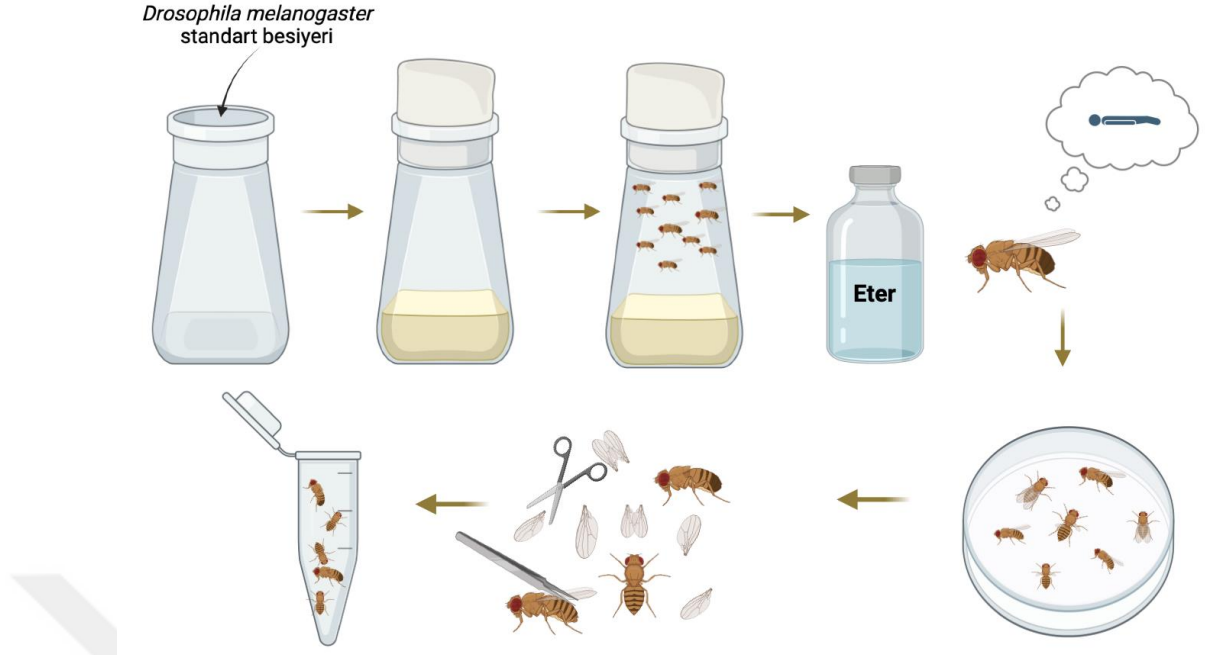


Şekil 3.2. Fisetin



Şekil 3.3. Fisetin'in farklı sıcaklık ve pH değerlerindeki degradasyon kinetiği (J. Wang ve Zhao, 2016)

Fisetin içeren standart besiyerlerinin hazırlanmasının ardından her bir besi yerine 1-3 günlük 30-50 adet sinek koyulmuş, 7,14,21 ve 28 gün boyunca takip edilmiştir. Besiyerleri 7 günlük deney grubunda tek sefer; 14, 21 ve 28 günlük deney gruplarında haftada bir kez olmak üzere değiştirilmiştir. Sinekler her grup için uygulama sürelerinin tamamlanmasının ardından kültür şişelerinden toplanmıştır. Bu aşamada *D. melanogaster* erginleri boş bir şişeye aktarılmıştır ve şişenin ağzı eter damlatılmış tıpa ile seri şekilde kapatılmıştır. Böylece sineklerin eter etkisiyle hareketsiz kalarak bayılması sağlanmıştır. Bayılan sinekler incelenmek üzere petri kabı üzerine alınmıştır. Bu aşamada sineklerin kanatları pens ile tutularak makasla kesilmiştir ve cinsiyet ayrımlarının da yapılmasının ardından eppendorf tüplere 10'ar adet (2 dişi+8 erkek) sinek olmak üzere ayrılmışlardır. Bu aşama Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Eppendorf tüplere toplanan sinekler RNA izolasyonu öncesi doku homojenizasyonuna hazır hale getirilmişlerdir.



Şekil 3.4. Tez çalışmasında RNA izolasyonu öncesi örneklerin hazırlanması aşaması (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

3.4. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu ticari olarak temin edilen Vitascript RNA izolasyon kiti basamakları takip edilerek yapılmıştır. Kit protokolüne göre deney gruplarından 10 birey her deney grubu için ayrılmış, sineklerin kanatları kesilmiş, 1,5 ml'lik eppendorf tüplere alınmış ve 1 ml RiboEx™ içinde qiagen tissue ruptor kullanılarak homejenize edilmiştir. Homejenat 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası 1 ml RiboEx™ başına 200 µl kloroform eklenip 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalanarak 2 dk da oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler 12.000 g'de 15 dk 4°C'de santrifüj edilmiş ve sulu fazlar yeni tüplere aktarılmıştır. Sonrasında sulu faz üzerine 1 hacim (400 µl) RB1 tamponu eklendi ve ters çevirerek iyice karıştırıldı. Tüplerdeki 700 µl karışım kit içerisindeki F tipi mini kolona aktarıldı. Oda sıcaklığında 11.000 g'de santrifüj işleminden sonra geçiş atıldı ve mini kolon yeniden aynı tüpe yerleştirildi. Mini kolona 500 µl SW1 tamponu eklendi ve yeniden oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 11.000 g'de santrifüj edildi. Mini kolona 500 µl RNW buffer eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 11.000 g'de santrifüj edildi. Geçiş atıldı ve mini kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi. Yıkama tamponundan tamamen kurtulmak için tüpler oda sıcaklığında 11.000 g'de 1 dk daha santrifüj edildi. Mini kolon yeni 1.5 ml'lik eppendorf tüplere

aktarıldı. Mini kolonun merkezine 50 µl kit içerisindeki nükleaz içermeyen su eklendi ve 1 dk bekletildi. Son olarak tüpler oda sıcaklığında 1 dk boyunca 11.000 g' de santrifüjlendi ve RNA izolasyonu tamamlandı. İzole edilen total RNA'ların konsantrasyon ve kalitesini belirlemek amacıyla UV spektrometre cihazıyla (Epoch, Biotek, US) ölçüm yapılmıştır. Kalitesi ve konsantrasyonu belirlenen total RNA'lar ifade analizinde kullanılması amacıyla -80 °C' de saklanmıştır.

3.5. cDNA Sentezi

cDNA sentezi öncesinde Total RNA'ların konsantrasyonları her grup için hesaplanmıştır. Epoch okunan iki değerin ortalaması alınmış ve 120 ng RNA için gereken hacim hesaplanmıştır. RNA konsantrasyonları Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. cDNA sentezi için kullanılan RNA miktarının hesaplanması

Deney Grupları	RNA Miktarları			
	Nanodrop 1.Okuma	Nanodrop 2.Okuma	Ortalama Değer	120 ng RNA için gereken hacim (µl)
7 Gün Kontrol1	50,022	48,957	49,4895	2,4514
7 Gün Kontrol2	45,517	46,71	46,1135	2,6022
7 Gün 0,002 M1	57,682	57,204	57,443	2,0890
7 Gün 0,002 M2	45,739	49,762	47,7505	2,5130
7 Gün 0,005M1	18,462	19,957	19,2095	6,2469
7 Gün 0,005M2	52,222	50,409	51,3155	2,3384
14 Gün Kontrol1	32,767	32,0	32,3835	3,7055
14 Gün Kontrol2	32,672	33,204	32,938	3,6432
14 Gün 0,002 M1	31,073	32,946	32,0095	3,7488
14 Gün 0,002 M2	15,503	18,229	16,866	7,1149

14 Gün 0,005M1	20,513	21,771	21,142	5,6759
14 Gün 0,005M2	42,735	41,204	41,9695	2,8592
21 Gün Kontrol1	27,625	28,174	27,8995	4,3011
21 Gün Kontrol2	25,345	27,355	26,35	4,5540
21 Gün 0,002 M1	19,313	18,753	19,033	6,3048
21 Gün 0,002 M2	21,071	23,499	22,285	5,3847
21 Gün 0,005M1	96,838	104,449	100,6435	1,1923
21 Gün 0,005M2	114,872	112,688	113,78	1,054
28 Gün Kontrol1	23,617	24,696	24,155	4,9679
28 Gün Kontrol2	43,966	46,28	45,123	2,6593
28 Gün 0,002 M1	30,73	29,763	30,2465	3,9674
28 Gün 0,002 M2	53,79	58,315	56,0525	2,1408
28 Gün 0,005M1	82,821	86,479	84,65	1,4176
28 Gün 0,005M2	42,308	39,914	41,111	2,9189

RNA'dan cDNA sentezi her bir grup için yapılmıştır. cDNA sentezi kit protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Protokole göre, öncelikle deney grubu ve RNA miktarlarına göre uygun olarak kit içeriğinde sunulan nükleaz bulunmayan su PCR tüplerine konulmuştur. Ardından sırasıyla 4 µl 5X VS reaksiyon tamponu eklenmiştir. Deney gruplarının Çizelge 3.3'de hesaplanan hacme göre RNA örneklerinden uygun miktarlarda ve son olarak VitaScript™ enzim karışımından her tüp için 1 µl eklenmiştir. Böylece cDNA sentezinin son hacmi her bir tüp için 20 µl olmuştur. Her bir deney grubu için 2'şer cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar gen ifade analizinde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

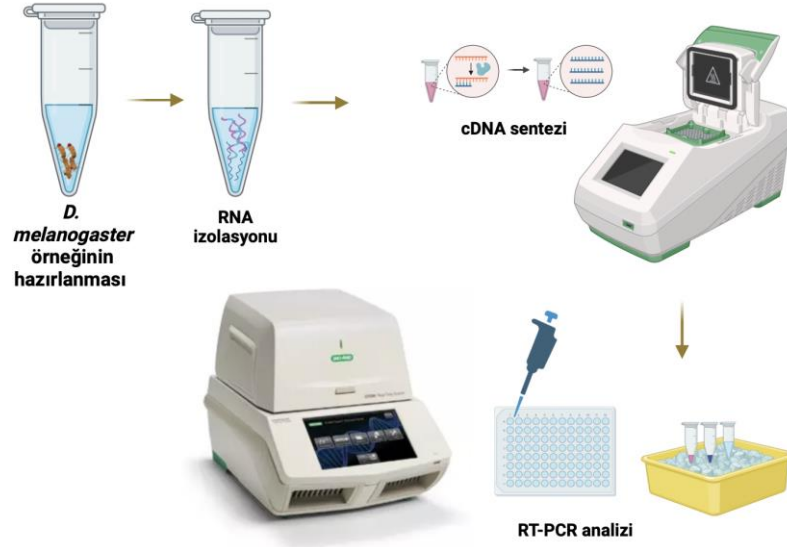
3.6. RT-PCR ile Gen İfade Analizi

Tez çalışmasında gen ifadesini analiz etmek için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için gerekli olan primer setleri forward ve reverse olarak NCBI Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) ile ilgili gen bölgesini çoğaltacak şekilde ve ortalama 60 °C T_m olacak şekilde tasarlanmış ve Çizelge 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Gen Ekspresyon Profilleri İncelenecek Olan Genlerin RT-PCR Primer Sekans Bilgileri

Gen	Primer (Forward/Reverse)	Sekans
<i>dsir2</i>	F	GACGCCCTCCAATTCCTCGT
	R	GGAGCCGCCGAGATGTAGAG
<i>dRPD3</i>	F	TCGCATACGCATGACCCACA
	R	TCGGCAGTGGCTTTATGGGG
<i>dFOXO</i>	F	AGAACACAACGATGACGCAGG
	R	CAACCGTACGATCCTTGCTG
<i>GAPDH</i>	F	CAAGTTGTGGCGTGATGGAC
	R	ATCATAGGACGCACCCTTGC

Sentezlenmiş olan cDNA’lar dilüe edilerek RT-PCR analizi için hazırlanmıştır. Dilüsyon, çalışılacak her gen için farklı konsantrasyonda yapılmıştır. Öncelikle sentezlenen cDNA örneklerinin hacmi 20 µl’dir ve ilk dilüsyon 2.5 kat olarak hacmin 50 ul’ye tamamlanması şeklinde yapılmıştır. Tez çalışmasındaki kontrol geni *GAPDH* RT-PCR yönteminde 50 µl son hacimle çalışılmıştır. RT-PCR Procomcure 2X Magic SYBR karışımı protokolü takip edilerek yapılmıştır. Total karışım içerisinde su, SYBR karışımı, primerler (forward ve reverse) bulunmaktadır. cDNA sentezi için her bir kuyucuk başına 7.2 µl su, 10 µl SYBR miks, 0.4 µl forward primer ve 0.4 µl reverse primer gereklidir. Analiz edilecek örnek sayısına göre kuyucuk sayısının 1 fazlası kadar miks hazırlanır. Plate’de öncelikle her bir kuyucuğa 2’şer µl kalıp RNA dağıtılır, kalıplar dağıtıldıktan sonra kuyucuk başına 18 µl miksten dağıtılır. Çözeltiler dağıtıldıktan sonra plate üzeri kapatılır, 3000 rpm’de 1 dk santrifüj edilir ve Biorad CFX 96 cihazına plate yerleştirilir.



Şekil 3.5. Tez çalışmasındaki deneysel aşamalara genel bir bakış (Biorender programı kullanılarak çizilmiştir.)

3.7. İstatistiksel Analiz

Gen ifade çalışmalarından elde edilen veriler istatistik ve anlamlılık açısından SPSS yazılımı 20.0 (IBM, Armonk, NY, ABD) kullanılarak %95 güven aralığında Duncan testi ($p < 0,05$) ile analiz edilmiştir.

3.8. Tez Çalışmasındaki Genlerin Protein-Protein Etkileşimleri

Bu tez çalışması kapsamında *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* genleri incelenmiştir. Çalışma kapsamında bu genlerin protein protein etkileşimleri de incelenerek genler arasındaki ilişki analizi çıkarılmıştır. Analiz Cytoscape yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Shannon vd., 2003).

3.9. *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* Genlerinin Dijital İfade Profilleri

dsir2, *dFOXO* ve *dRPD3* genlerinin tez çalışması kapsamında dijital ifade profilleri incelenecek 3 gen için de FPKM değerleri FLYatlas veritabanından alınarak log₂'ye çevirilmiş ve TBtools programı ile farklı dokularda incelenmiştir (Chen vd., 2020; The Drosophila adult expression atlas).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Deney Süreçleri

Uygulama gruplarına 7, 14, 21 ve 28 günlük sürelerde fisetin uygulaması yapılmış ve gen ifade analizleri incelenmiştir. Kültür başlangıç ve bitiş zamanları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *D. melanogaster* kültürlerinin başlangıç ve bitiş zamanları

Deney Grubu	Başlangıç Tarihi	Bitiş Tarihi
7 Gün/0,002 M F	25.07.2023	31.07.2023
7 Gün/0,005M F	25.07.2023	31.07.2023
7 Gün/Kontrol	25.07.2023	31.07.2023
14 Gün/0,002 M F	21.07.2023	03.08.2023
14 Gün/0,005M F	25.07.2023	07.08.2023
14 Gün/Kontrol	21.07.2023	03.08.2023
21 Gün/0,002 M F	18.07.2023	07.08.2023
21 Gün/0,005M F	14.07.2023	03.08.2023
21 Gün/Kontrol	14.07.2023	07.08.2023
28 Gün/0,002 M F	07.07.2023	03.08.2023
28 Gün/0,005M F	07.07.2023	03.08.2023
28 Gün/Kontrol	07.07.2023	03.08.2023

4.2. Gen İfade Analizi Sonuçları

Tez çalışmasında 7, 14, 21 ve 28 günlük fisetin uygulaması yapılmış gruplarda ve kontrol gruplarında RT-qPCR yöntemiyle *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* genlerinin ekspresyon profili incelenmiştir. Analizlerde “A” herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubunu, “B” 0,002 M fisetin uygulamasını ve “C” ise 0,005M fisetin uygulamasını belirtmektedir.

4.2.1. *dsir2* Geni Ekspresyon Profili

dsir2 geninin ifade analizi sonucunda en yüksek gen ifadesinin 7. Günde 0,005 M fisetin uygulaması yapılan grupta, 14. günde 0,002 M fisetin uygulaması yapılan grupta, 21. günde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grupta ve 28. günde fisetin uygulanmamış

kontrol grubunda olduğu görülmüştür. *dsir2* genine ait ifade profili Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *dsir2* geni RT-qPCR analizi (Veriler GAPDH geni içsel kontrol kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanmıştır. A: Fisetin uygulaması yapılmamış kontrol grubunu, B: 0,002 M fisetin uygulanan grubu ve C: 0,005M fisetin uygulanan grubu temsil etmektedir)

dsir2 geninin *Drosophila*'nın gelişimsel aşamaları içerisinde hangi dönemde en yüksek aktivasyona sahip olduğu tek bir gelişimsel süreçle ilişkilendirilmemiştir. Erken embriyonik dönemde daha yoğun eksprese edilen *dsir2* geni ekspresyonu, embriyogenezin ilerleyen aşamalarında sinir sistemi ile sınırlıdır. Embriyogenez sonrası genin ifadesi larvalarda düşük pupa ve erişkin dönemde ise orta seviyelerdedir. Genin erişkin dönemde nöron çekirdeklerinde ve yağ dokusu hücrelerinde immüno lokalizasyonu gösterilmiştir (Frankel vd., 2011). Yapılan bazı çalışmalarda larval dönemde *dsir2* geninin inhibisyonunun ya da eksikliğinin yaşam ve ömür uzunluğu üzerinde olumsuz bir etkiye sebep olduğu gösterilmiş ve *dsir2* mutant sineklerin ömür uzunluğunun azaldığı gösterilmiştir (Åström vd., 2003).

dsir2 geninin erişkin dönemde *D. melanogaster*'da ifadesinin fizyolojik gelişim sürecinde zaten yüksek seviyede olması 21 gün deney grupları açısından önem arz etmektedir. 21. gün deneylerinde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grup, kontrol grubu ve 0,002 M fisetin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermiştir ($p < 0.05$). 21 günlük *D. melanogaster* yaşam döngüsünde erişkin dönemdedir

ve kontrol grubuna kıyasla 0,005M fisetin uygulanan grupta gen ifadesinin artmış olması literatür verileriyle paralellik göstermektedir. Aynı zamanda fisetinin burada senolitik olarak da etki gösterdiği düşünülmektedir. 28. günde 0,002 M ve 0,005M fisetin uygulanan gruplar istatistiksel olarak birbirleri ile benzer ($p>0.05$), ancak kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde farklılık göstermiştir ($p<0.05$). 7. günde *dsir2* geni, 0,005M fisetin uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı çıkmıştır ($p<0.05$). 0,002 M fisetin uygulanan grup, kontrol grubu ve 0,005M fisetin uygulanan grup ile istatistiksel olarak benzer seviyede çıkmıştır ($p>0.05$). 14. günde 0,002 M fisetin uygulanan grup, kontrol grubu ve 0,005M fisetin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı çıkmıştır ($p<0.05$).

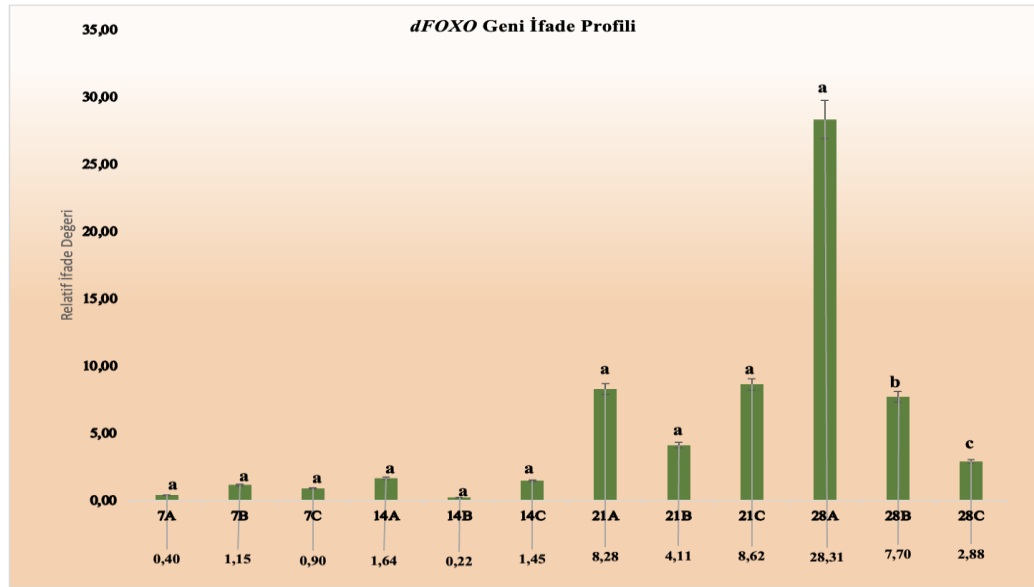
Fisetin senolitik etkisi yanında kalori kısıtlaması mimetiği olarak da işlev yapmaktadır. Kalori kısıtlaması (CR) günlük alınan temel besin maddelerinde bir yoksunluk olmadan yalnızca kalori alımını azaltarak alınan kalori miktarını örneğin aralıklı açlık gibi beslenme şekilleriyle belirli seviyede tutmayı sağlamaktır (Van Cauwenberghe vd., 2016). Kalori kısıtlamasının yaşlanma ve yaşlanmayla ilgili hastalıklarla ilişkisi de yapılan farklı çalışmalarda incelenmiştir. 2020 yılında sıçanlarda yapılan bir çalışmada sıçanlar 3 farklı gruba ayrılmış, gruplardan biri yaşlı sıçanlardan seçilmiş ve bu gruba kalori kısıtlaması uygulanmıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler kalori kısıtlaması uygulanan yaşlı sıçanlardan oluşan grubun serbest yeme periyodu uygulanmış deney grubuna göre yaşam yüzdesinin arttığını göstermiştir (Ma vd., 2020). Kalori kısıtlama mimetikleri (CRMs) kalori kısıtlamasının yararlı etkilerinin hem fizyolojik hem de moleküler ve hücresele düzeyde üretilmesini sağlayarak sağlık adına teşvik edici etkilere yol açan bileşiklerdir. Fisetin bu bileşik grubu içerisinde daha az araştırılmış ancak umut vaad eden bir bileşiktir. Fisetinin oksidatif stres üzerindeki düzenleyici rolü sayesinde yaşlanmada yararlı etkiler gösterdiği düşünülmektedir. 2018 yılında yapılan bir çalışmada fisetinin kalori kısıtlama mimetiği olarak etkisi incelenmiştir. Çalışmada genç (4 aylık) ve yaşlı (24 aylık) sıçanlar ile çalışılmış, deney gruplarına 6 hafta boyunca oral olarak 15 mg/kg fisetin uygulanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler fisetin uygulamasının, yaşlanmaya bağlı oluşan reaktif oksijen türlerinin, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu seviyelerini baskıladığını göstermiştir (Singh vd., 2019).

2004 yılında fisetin ve farklı polifenolik bileşiklerin yer aldığı bir çalışma yapılmış ve fisetin sirtüin aktive edici bileşik (STAC) olarak tanımlanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda fisetin *C. elegans* ve *D. melanogaster*'da sirtüin aktivitesini indükleyerek

ömür uzunluğunu arttırıcı etki göstermiştir (Wood vd., 2004). Fisetin uygulamasıyla *dsir2* aktivitesi fisetin senolitik ve kalori kısıtlamasındaki rolleriyle bir bütün olarak değerlendirildiğinde bu tez çalışmasında elde edilen verilerle uyumludur. Her ne kadar senolitikler ve kalori kısıtlaması yaşlanma sürecini etkileyen farklı mekanizmaları hedefleyen iki farklı yaklaşım olsa da yaşlanmadaki olumlu etkileri göz önünde bulundurulduğunda bu iki konsepti daha bütüncül bir bakış açısı ile incelemek gereklidir.

4.2.2. *dFOXO* Geni Ekspresyon Profili

dFOXO geninin ifade analizi sonucunda en yüksek gen ifadesinin 7. günde 0,002 M fisetin uygulaması yapılan grupta, 14. günde fisetin uygulanmamış kontrol grubunda, 21. günde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grupta ve 28. günde fisetin uygulanmamış kontrol grubunda olduğu görülmüştür. *dFOXO* genine ait ifade profili Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *dFOXO* geni RT-qPCR analizi (Veriler GAPDH geni içsel kontrol kullanılarak $2^{-\Delta\Delta ct}$ metodu ile hesaplanmıştır. A: Fisetin uygulaması yapılmamış kontrol grubunu, B: 0,002 M fisetin uygulanan grubu ve C: 0,005M fisetin uygulanan grubu temsil etmektedir.)

Bölüm 2.5.2.’de de açıklandığı üzere organizmalarda insülin sinyallemedeki önemli nokta bir transkripsiyon faktörü olan *FOXO*’dur. *FOXO* transkripsiyon faktörünün *D. melanogaster* homoloğu *dFOXO*’dur. İnsülin sinyallemede görevli genlerin ifadesinde azalışla yaşlanma gecikmektedir. *dFOXO* insülin sinyallemede

görevli dAkt tarafından fosforile edilir ve bu fosforilasyon *dFOXO*'nun inhibisyonuna sebep olmaktadır. İnsülin sinyallesindeki azalmayla fosforilasyon gerçekleşmez ve *dFOXO* aktivasyonunu korur. Bu da *dFOXO*'nun, başta yaşlanma olmak üzere düzenlediği süreçler açısından olumlu bir etkidir. Bir histon deasetilaz (HDAC) olan dsir2 *dFOXO*'yu deasetile eder, bu deasetilasyon insülin yolağında görevli olan *FOXO*'nun ifadesini değiştirmektedir (Hariharan vd., 2010).

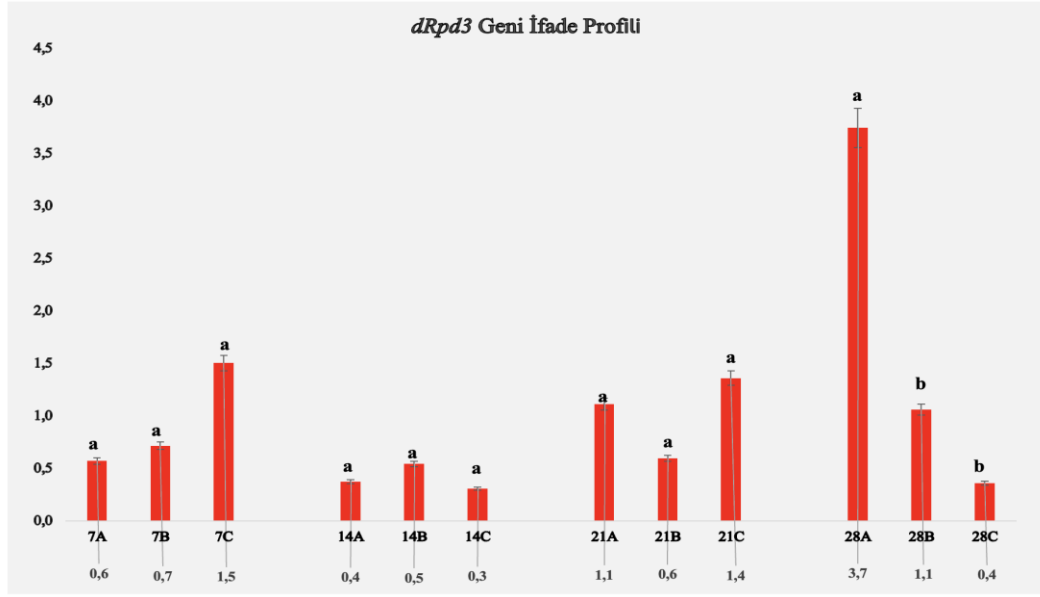
dFOXO geni için elde edilen veriler 28 günlük deney grubu haricinde deney gruplarında paralel olarak fisetin dozunun artması ya da azalmasıyla direkt olarak ilişkilendirilememiştir. Elde edilen verilerde yalnızca 28. Gün deney seti verileri istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu deney seti içerisinde 0,002 M fisetin uygulanan grup ve 0,005M fisetin uygulanan grup birbirleri ile ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.05$). 7 günlük deney grubunda kontrol grubu diğer gruplara kıyasla daha düşük ifade olmuşken 0,002 M fisetin ve 0,005M fisetin uygulanan gruplarda anlamlı farklar elde edilmemiştir. 14 günlük deney grubunda kontrol grubu diğer gruplara göre daha yüksek ifade seviyesine sahip olsa da, 0,005M uygulanan fisetin, *dFOXO* geninin ifadesinde 0,002 M fisetin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artışa sebep olmamıştır. Bununla birlikte fisetin uygulamasıyla ifade profili incelenen *dFOXO* geninin analizinden elde edilen veriler, bu genin ifadesinin yaş ile birlikte artış gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Yapılan birçok çalışmada *dFOXO* geninin özellikle sinek kasında ifade edildiği gösterilmiştir (Bai vd., 2013; Hwangbo vd., 2004). Ayrıca bu gen, otofaji mekanizmasını da regüle ederek ömür uzunluğunu artırıcı etki göstermektedir (Demontis ve Perrimon, 2010). *dFOXO* aynı zamanda ubikuitin proteazom sistemi (UPS) aracılığıyla protein parçalanmasında da bir aracıdır. UPS aktive olarak yanlış katlanmış proteinlerin seçilerek bozunmasını sağlar ve kas bütünlüğünün korunmasına yardımcı olmaktadır (Zhao vd., 2007).

Tez çalışması kapsamında total RNA izolasyonu yapılmış ve organizmanın farklı doku ve organlarından ayrıca bir analiz yapılmamıştır. Elde edilen sonuçlar fisetinin kontrol gruplarına kıyasla *dFOXO* gen ifadesi üzerinde ifadeyi artırıcı bir etkisi olmadığını göstermektedir. Bunun sebebi uygulanan fisetin miktarının bu genin ifadesi üzerindeki etkisi için yetersiz kalması, genin spesifik dokularda ifadesinin daha yüksek olması ancak bu çalışma kapsamında farklı dokulardan ayrıca bir analiz yapılmamış olması olabilir.

4.2.3. *dRPD3* Geni Ekspresyon Profili

dRPD3 geninin ifade analizi sonucunda en yüksek gen ifadesinin 7. Günde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grupta, 14. günde 0,002 M fisetin uygulaması yapılan grupta, 21. günde 0,005M fisetin uygulaması yapılan grupta ve 28. günde fisetin uygulanmamış kontrol grubunda olduğu görülmüştür. *dRPD3* genine ait ifade profili Şekil 4.3'da gösterilmiştir.



Şekil 4.3. *dRPD3* geni RT-qPCR analizi (Veriler GAPDH geni içsel kontrol kullanılarak $2^{-\Delta\Delta ct}$ metodu ile hesaplanmıştır. A: Fisetin uygulaması yapılmamış kontrol grubunu, B: 0,002 M fisetin uygulanan grubu ve C: 0,005M fisetin uygulanan grubu temsil etmektedir.)

dRPD3 geni için elde edilen verilerde 7, 14 ve 21. gün deney süreçlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir ($p>0.05$). 28. günde 0,002 M fisetin uygulanan grup ve 0,005M fisetin uygulanan grup istatistiksel olarak birbirleri ile benzer ($p>0.05$), ancak bu gruplar kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık göstermiştir ($p<0.05$).

Litaratürde *dRPD3* geninin senolitikler ile direkt olarak ilişkisi hakkında spesifik bir bağlantı kurulmamıştır. Ancak, *dRPD3*'ün yaşlanma sürecindeki etkisi yapılan farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, *dRPD3*'nün inhibisyonu veya mutasyonu, *Drosophila*'da ömrü uzatabilir ve bu etki, genellikle enerji metabolizması, oksidatif stres yanıtı ve diğer hücrel süreçlerle ilgili genlerin düzenlenmesi ile ilişkilidir. Bu tür

genetik değişiklikler, yaşlanan hücrelerin ortadan kaldırılmasını ve yaşlanmayla ilişkili hastalıkların azaltılmasını etkileyebilecek mekanizmaları da içermektedir.

Kalori kısıtlamasının, *RPD3*'nün ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, kalori kısıtlamasının *RPD3* üzerinden yaşlanma süreçlerini regüle edebileceği ve ömür uzunluğunu arttırıcı bir etki sağlanabileceği anlamına gelir. Ayrıca, kalori kısıtlaması ve *RPD3*'ün inhibisyonu veya mutasyonu ile elde edilen ömür uzatma etkilerinin benzerliği, bu iki faktörün yaşlanmayı düzenlemede benzer mekanizmalara sahip olabileceğini de düşündürmektedir (Rogina vd., 2002; Rogina ve Helfand, 2004b).

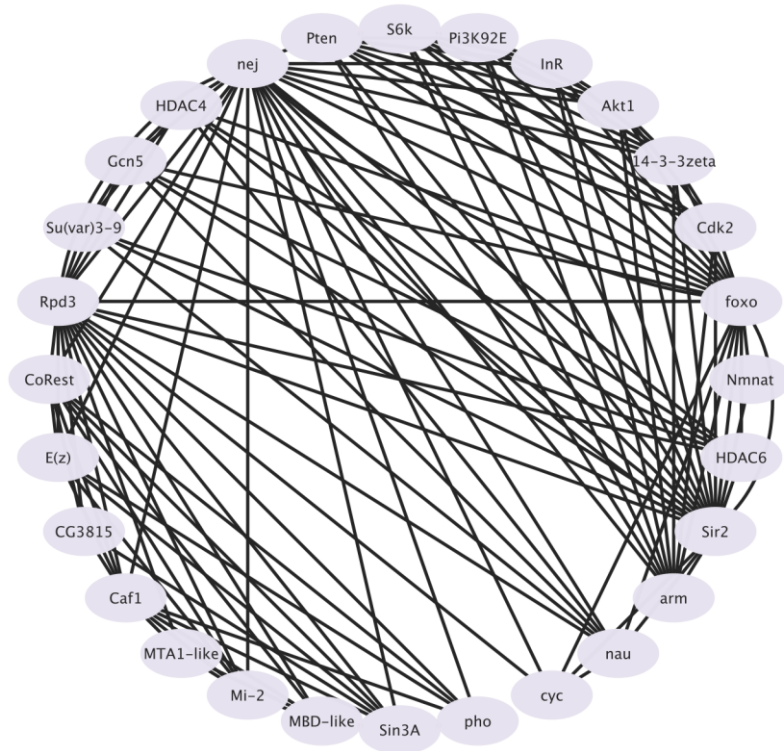
RPD3 ve *dsir2* etkileşimlerinin incelendiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Rogina ve Helfand, 2004b). Hem *RPD3* hem de *dsir2* genlerinde mutasyonlar oluşturulan sinekler kontrollerine kıyasla daha az ömür uzunluklarına sahip olmuşlardır. Yalnızca *rp3* mutant olan sinekler *RPD3* ve *dsir2* mutant sineklere kıyasla daha uzun bir yaşam süresi göstermiştir. 2015 yılında yapılan bir çalışmada ise *RPD3*'ün azaltılması sinek ömrünü uzatmıştır. GAL4/UAS sistemi kullanılarak yapılan çalışmada oluşturulan *RPD3* kısmi mutasyonu ile *rp3* mRNA seviyesi %60 oranında azalmış ve bu uzun ömürlülükle sonuçlanmıştır (Kopp vd., 2015).

Drosophila'da *dRPD3* seviyelerinin büyük ölçüde azaltılması ölümcül olarak rapor edilmiştir, ancak *dRPD3* seviyelerinin kısmi olarak azalmasının yaşam süresi üzerindeki etkisi tam olarak değerlendirilmemiştir. *RPD3* geninin hipomorfik ve nötr mutasyon ile incelenmesi sonucu elde edilen veriler; erkeklerde %41 ile %47 oranında ömür uzaması, dişilerde ise %52 oranında ömür uzatıcı etkiyle sonuçlanmıştır (Rogina vd., 2002). Fisetinin hem bir senolitik ajan hem de kalori kısıtlama mimetiği olarak *dRPD3* geni aktivitesinde bir azalmaya sebep olabileceği bu çalışmanın hipotezini oluşturmuştur. Ancak *dRPD3* geninin ifade analizi verilerine göre elde edilen bulgular, sadece daha yaşlı sineklerde bu etkinin oluştuğunu göstermektedir.

4.3. *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* Genlerinin Protein-Protein Etkileşimleri

Cytoscape yazılımı kullanılarak genlerin protein-protein etkileşimleri çıkarılmıştır. şekil 4.4'de görüldüğü gibi tez çalışmasında ifade analizi incelenen üç genin de proteinleri *D. melanogaster*' da etkileşim halindedir. Ayrıca örneğin *cyc* proteini hem *RPD3* proteini hem de *FOXO* proteini ile, *PI3K92E* proteini, *cdk 2* ve *akt1* proteini hem *dsir2* proteini hem de *FOXO* proteini ile *nej*, *HDAC6*, *HDAC4*, *Gcn5* proteini her üç gen proteini ile etkileşim halindedir.

Proteinler arasında her üç genin proteiniyle de etkileşim halinde olan nejire (*nej*) proteini transkripsiyonel yardımcı aktivatör CREB-bağlayıcı protein (CBP)'yi kodlar. CBP belirli nükleer proteinleri, özellikle de histon H3'ü lizin 17 ve lizin 27 pozisyonlarında (K17 ve K27'de) ve H4'ü lizin 8 pozisyonlarında (K8) asetile ederek gen ifadesinin düzenlenmesini sağlar. Bu düzenleme hücre çoğalması, hücre içi sinyalleşme, farklılaşma ve hücre gelişim açısından oldukça önemlidir. 2023 yılında tamamlanan bir çalışmada nej geninin, yağ dokusu, bağırsak ve sinir sistemi gibi farklı bölgelerde ifadesinin arttırılması veya düşürülmesinin *D. melanogaster*'in yaşam süresini nasıl etkilediği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar bu genin erkek ve dişi sineklerde etkilerinin farklı olduğunu göstermiştir. Dişilerde nej'in bağırsakta aşırı ifade edilmesinin ve sinir sisteminde sürekli ifadesinin %6 ila 15 daha uzun yaşam süresi sağladığı gözlemlenmiştir. Nej aktivasyonunda düşüş durumunda ise deneyin çoğu varyantında *D. melanogaster*'in yaşam süresi üzerinde olumsuz bir etki yarattığı görülmüştür (Koval vd., 2023).



Şekil 4.4. Tez çalışmasında incelenen genlerin protein protein etkileşimleri (Cytoscape programı ile oluşturulmuştur.)

HDAC6 ve HDAC4 histon deasetilazlardandır. 2017 yılında yapılan bir çalışmada normal gelişimsel süreçte koku hafızasını korumak için hem larva hem de

yetişkinlik aşamalarında HDAC6'nın gerekli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada HDAC6 ve RPD3 arasında da bir etkileşim olduğu belirlenmiştir. Öğrenme ve hafıza gibi nöronal işlevlerin incelenmesi için *Drosophila* farklı organizmalara göre daha basit ve etkili bir yaklaşım sunmaktadır.

HDAC aile üyelerinin sağlıklı beyinlerdeki rolünü incelemek amacıyla, *Drosophila* HDAC'lerinin tek tek RNAi baskılanması gerçekleştirilmiş ve larvaların koklama ve hafızasındaki etkisi gözlemlenmiştir. Pan-nöronal *RPD3* veya *HDAC6* baskılanmasının ardından hafızada bir eksiklik meydana geldiği bulunmuştur. *RPD3*'ün bellek ile ilgili etkileri bildirilmiş, ancak HDAC6'nın henüz öğrenme ve hafıza ile ilgili olduğu bildirilmemiştir (Perry vd., 2017).

Her üç genin proteiniyle de etkileşim halinde olan bir diğer protein *Gcn5*'tir. *Gcn5* proteini *D. melanogaster*'da bulunan bir histon asetiltransferaz (HAT) sınıfı üyesidir. Bu proteinin fonksiyonu gen ifadesi, hücresel proliferasyon, metabolik aktivasyonlar gibi biyolojik olayların regülasyonunu sağlamaktır. *Drosophila*'da dört farklı *Gcn5* kompleksi bileşimi ve aktivitesi bildirilmiştir. Kompleksler özetle Spt-Ada-Gcn5 asetiltransferaz (SAGA), Ada2a içeren (ATAC), Ada2/Gcn5/Ada3 transkripsiyon aktivatörü (ADA) ve Chiffon Histone asetiltransferaz (CHAT) kompleksidir. SAGA ve ADA kompleksleri *S. cerevisiae* mayasında da bulunurken, ATAC yalnızca insanlar gibi diğer metazoalarda, CHAT kompleksi ise böceklere özgü olarak bulunmaktadır. *Drosophila*'da *Gcn5* kaybının, gelişimsel süreçlerde ciddi bozukluklara neden olabileceği gösterilmiştir. Özellikle, *dGcn5* mutant sineklerde yumurta oluşumu olan oogenezin ve larva ve pupa dönemlerinden yetişkin dönemine geçiş olan metamorfozun başlaması engellenmektedir. Ayrıca *dGcn5* mutant sineklerde dış iskelet oluşumu bozulmakta ve yetişkin ekstremitelerinde (örn; bacaklar, kanatlar) bozukluklar gözlemlenmektedir (Ciurciu vd., 2006; Torres-Zelada ve Weake, 2021).

4.4. *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* Genlerinin Protein-Protein Etkileşimlerinde Dijital İfade Profilleri

Dijital gen ifadesi profili bir organizmada bulunun farklı hücre tiplerinde ve organizmanın farklı dokularında ya da farklı koşullar altında ifade olan genlerin miktarlarını gösteren veri setleridir (Audic ve Claverie, 1997). Dijital gen ifade profilinin oluşturulmasında FPKM değerleri önemli bir parametreyi oluşturmaktadır. Belirli bir genin uzunluğunu ve toplam okuma sayısını dikkate alarak, genin ifade düzeyini

normalize eder. Bu sayede, farklı genlerin ve farklı örneklerin ifade düzeyleri karşılaştırılabilir hale gelir. Genlere ait FPKM değerleri FLYatlas'tan alınmıştır. FPKM (Fragments Per Kilobase Of Transcript Per Million Mapped Reads) transkriptom verilerinden elde edilen sonuçları ifade etmek için kullanılan bir terimdir.

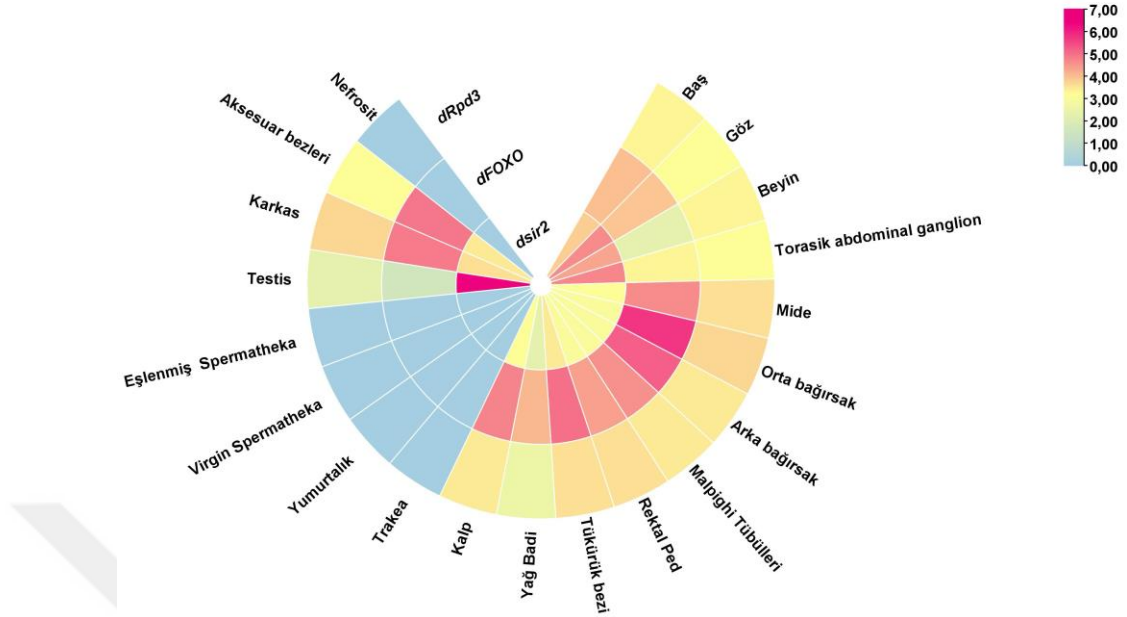
D. melanogaster'in erişkin dişi, erişkin erkek ve larval dönemde; baş, göz, beyin, torasik abdominal ganglion, mide, orta bağırsak, arka bağırsak, malpighi tübülleri, rektal ped, tükürük bezi, yağ badi, kalp, trakea, yumurtalık, virgin spermatheka, eşlenmiş spermatheka, testis, karkas ve aksesuar bezlerinde *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* genlerinin dijital ifade profilleri incelenmiştir.

4.4.1. *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* Genlerinin Erişkin Erkek *D. melanogaster*'da Dijital İfade Profili

Genlerin herbir dokuda cinsiyetler ve gelişimsel dönemler dahil olmak üzere dijital ifade profilleri incelendiğinde farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Erişkin erkek *D. melanogaster*'da *dsir2* geni testiste, *dFOXO* geni karkas ve aksesuar bezlerinde, *dRPD3* geni ise aksesuar bezleri ve orta bağırsakta en yüksek miktarda ifade olmaktadır. Erişkin erkeklerde dijital ifade profili Şekil 4.5' de gösterilmiştir.

D. melanogaster'da aksesuar bezleri üreme sistemi ve evrimi açısından pek çok bilim insanı tarafından çalışılmıştır. Esas olarak erkeklerde üreme organı olarak bulunan aksesuar bezleri çiftleşme sırasında spermle birlikte dişiye aktarılan salgı proteinlerini ve moleküllerini üretir. Dişiye aktarılan tüm bu protein ve moleküller fertilité için gereklidir. Aynı zamanda dişilerin çiftleşme sonrasındaki fizyolojik süreçlerinde, dişilerin sperm depolama kabiliyetlerinde ve sperm rekabetinde de bu moleküllerin önemli görevleri vardır (Cridland vd., 2022).

Orta bağırsak *D. melanogaster*'da memelilerde olduğu gibi hormonal düzenleme ve hormon üretimi, sindirim ve besinlerin emilimi gibi farklı hücre tiplerinden oluşan bir dokudur. Oldukça karmaşık yapıya sahip olan *D. melanogaster* orta bağırsağı özellikle son yıllarda kök hücre çoğalması ve farklılaşmasındaki sinyal yollarının rolünü araştırmak için model sistem olarak araştırmacılar tarafından incelenmektedir. Burada iki temel hücre tipinden bahsetmek mümkündür. Enterositler sindirim enzimlerini salgılar, besinleri emer ve bu besinleri taşır. Enteroendokrin hücreler ise bağırsak hareketliliğini düzenler ve bakteriler gibi dış uyaranlar için bağırsak hormonlarının salgılanmasından sorumludur (Hung vd., 2020).

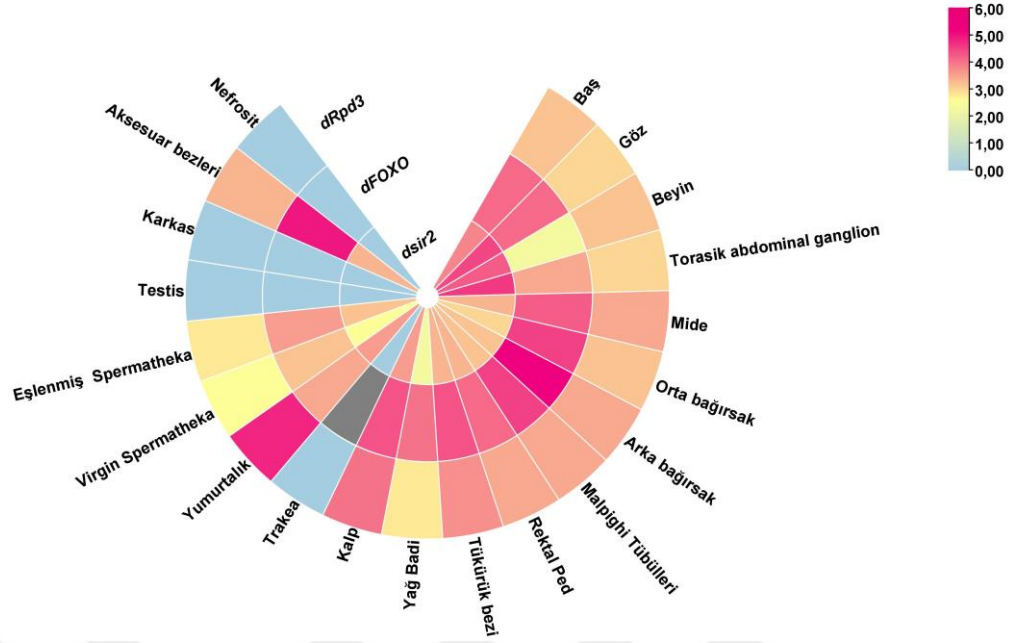


Şekil 4.5. *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* genlerinin erişkin erkek *D. melanogaster*'da dijital ifade profili (TBtools programı ile yapılmıştır.)

4.4.2. *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* Genlerinin Erişkin Dişi *D. melanogaster*'da Dijital İfade Profilleri

Erişkin dişilerde *dsir2* geni torasik abdominal gangliyonlarda, *dFOXO* geni aksesuar bezlerinde ve *dRPD3* geni yumurtalıklarda en yüksek ifadeye sahiptir. Erişkin dişide dijital ifade profili Şekil 4.6' da gösterilmiştir. Torasik abdominal ganglion terimi genel itibariyle böceklerin sinir sisteminin tanımlanması için kullanılan genel bir terimdir. Göğüs ve karın bölgesinde bulunan ganglionları ifade etmektedir. *D. melanogaster*'da göğüs ve karın bölgesindeki gangliyonlar uçuş hareketi, yürüme, solunum ve sindirim olmak üzere temel yaşamsal faaliyetlerde önemli rollere sahiptir (Court vd., 2020).

Dişi meyve sineklerinde önemli terimlerden biri de spermatekadır. Çiftleşme sonrası yumurtaların depolanmasını sağlayan bu organ dişi üreme sisteminin bir organıdır. Aynı zamanda virjin ve eşlenmiş formlara sahiptir. Virjin terimi daha önce çiftleşmemiş ve bundan dolayı yumurta depolamamış, eşlenmiş ya da mated spermateka ise yumurta depolayan ve döllenmiş spermateka anlamına gelmektedir. Depolanan yumurtalar çiftleşmeden yaklaşık 5 gün ile 3 haftalık süre zarfında kullanılabilir (Dhillon vd., 2020; Hopkins vd., 2020).

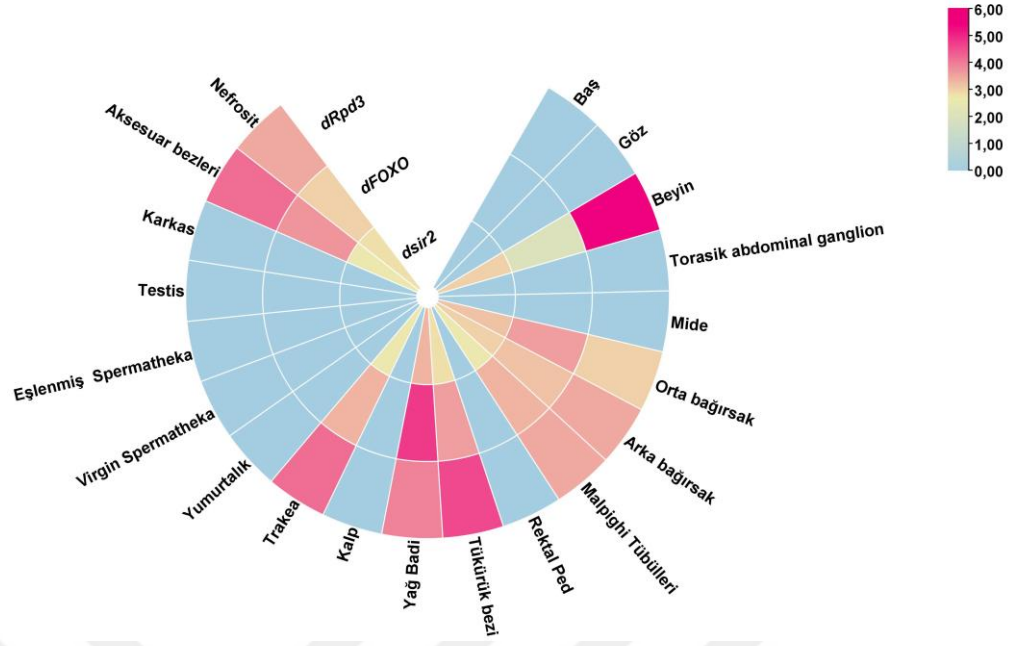


Şekil 4.6. *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* genlerinin erişkin dişi *D. melanogaster*'da dijital ifade profili (TBtools programı ile yapılmıştır.)

4.4.3. *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* Genlerinin Larval *D. melanogaster*'da Dijital İfade Profilleri

Larval dönemde *dsir2* geni tüm doku ve organlarda ortalama değerlere sahipken bu değerler içerisinde en yüksek ifade miktarı yağ dokuya aittir. *dFOXO* geni için de *dsir2* geninde olduğu gibi en yüksek ifade yağ dokudadır. Bu iki genden farklı olarak larval dönemde *dRPD3* geni en yüksek ifadesi beyinde gözlemlenmiştir. Genlere ait larval dönemde dijital ifade profili Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Yağ dokusu özellikle böceklerde ve farklı eklem bacaklılarda bulunan doku türlerinden biridir. *D. melanogaster*'da yağ dokusu farklı vücut bölümlerine yayılmıştır ve birçok işleve sahiptir. Enerji depolama, hareket, besin algılanması, homeostazın sağlanması ve bağışıklık tepkilerinin verilmesi *D. melanogaster*'da rapor edilmiş yağ dokusu fonksiyonlarındandır. Yağ dokusu büyüme ve gelişme için diğer dokularla da etkileşime girer ve gelişim dönemlerinin farklı aşamaları, farklı çevresel koşullar altında metabolik süreçlerin koordinasyonunu sağlamaktadır (Zheng vd., 2016).



Şekil 4.7. *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPd3* genlerinin larval *D. melanogaster*'da dijital ifade profili (TBtools programı ile yapılmıştır.)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaşlanma biyolojik bir süreçtir. Ancak yaşlanırken daha az kronik hastalık ve sağlık sorunuyla yaşlanmak yani kaliteli yaşlanmak da mümkündür. Canlılar yaşlanırken tüm sistemleri bu biyolojik süreçten etkilenmektedir. Biyolojik süreçlerin merkezinde ise hücreler yer alır ve değişiklikler hücre düzeyinde başlamaktadır. Hücresel yaşlanma senesens ile ifade edilir ve senesens geçiren hücreler senesent hücrelerdir. Senesent hücreler normal fizyolojik süreçteki hücrelerden hem fizyolojik ve hem de morfolojik olarak farklılıklara sahiptir. Farklılıklar bu hücrelerin yeni nesil ilaçlar olan senolitiklerce tanınması açısından önemlidir (Wissler Gerdes vd., 2020).

Senolitikler henüz yeni bir araştırma alanı olmasına rağmen bu alanda yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Yaşlanma ve yaşlanma biyolojisi alanlarına senolitiklerin katkı sunduğu pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda fareler, solucanlar ve sinekler gibi farklı deney hayvanları ve hücre hatlarıyla çalışmalar bulunmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında meyve sineği olarak bilinen *D. melanogaster* kullanılmış ve doğal bir senolitik madde olan fisetin organizmanın büyüme ortamına eklenmiştir. Fisetinin insanlarda da bulunan *D. melanogaster* homologları ve yaşlanmayla ilişkili tespit edilmiş *dsir2*, *dFOXO*, *dRPD3* genleri üzerindeki etkisi organizmanın yaşam süresince farklı günlerde incelenmiştir.

Genlerin Rt-qPCR yöntemi ile ekspresyon analizleri sonucunda fisetinin *dsir2* geni üzerinde artan dozunun gen ifadesini arttırıcı yönde etki ettiği görülmüştür. Ancak *dFOXO* ve *dRPD3* genleri üzerinde fisetinin böyle bir etkisi açıkça görülemedi. Fisetinin standart besiyerine toz halde direkt olarak eklenmesinin ya da uygulanan fisetin dozunun yetersiz kalmasının çalışmadan beklenen sonuçlar üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir. Lipozomal formda fisetin uygulaması ile yapılacak çalışmalar daha belirgin sonuçlar elde etmeye yardımcı olabilir. *dFOXO* geninin spesifik olarak sinek kasında ifade edildiği bilinmektedir, ancak bu tez çalışmasında total RNA izolasyonu yapılarak gen ifade analizleri yapılmıştır. Bu durum, uygulama grupları arasında belirgin farklılıkların oluşmasını engellemiş olabilir. *dFOXO* geninin fisetine karşı aktivitesindeki olası değişimi görmek amacıyla sinek kaslarından bir RNA izolasyonu planlanarak yeni bir deney setinin oluşturulması planlanabilir. *dRPD3* geninin ifadesinin azalması yaşlanmayı geciktirmektedir. Senolitik bir bileşik olan fisetin, bizim çalışmamızda bu genin ifadesinde bir azalışa sebep olmamıştır.

Tez çalışmasında ifadeleri RT-qPCR yöntemiyle analiz edilen genlerin aynı zamanda protein düzeyinde ilişkileri ve dijital ifade profilleri de incelenmiştir. Bu incelemeler çeşitli yazılımlar ve programlar yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Protein-protein etkileşimlerine bakıldığında *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* proteinlerinin her üçünün de *nej*, *HDAC6*, *HDAC4*, *Gcn5* proteinleriyle etkileşimde olduğu görülmüştür. Dijital ifade profili analizinde ise genlerin *D. melanogaster*'in farklı doku ve organlarında *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* genlerinin erkek, dişi ve larval dönemdeki ifadeleri incelenmiştir. Bu analiz sonucunda *dsir2* geninin erişkin dönemlerdeki ifadesinin larval döneme göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Fisetin bir senolitik olarak farklı dozları ile *D. melanogaster*'da *dsir2*, *dFOXO* ve *dRPD3* genlerinin aktivitesi üzerinde etkisiyle daha önce çalışılmamıştır. Çalışmamız bu anlamda bir ilk olsa da bu alanda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. *dRPD3* geninin *D. melanogaster* fizyolojisi içerisinde etkisi *dsir2* ve *dFOXO* genlerine kıyasla daha az bilinmektedir ve bu gen üzerinde çok daha az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple genlerin birbirleriyle ilişkisinin daha detaylı olarak aydınlatılması fisetin ve fisetine benzer senolitiklerin genlerin aktivitesi üzerinde ne gibi değişimlere sebep oldukları daha fazla araştırılmalıdır.

Yaşlı nüfusun hızla artmasıyla yaşlanmayla beraber görülen kronik hastalıkların görülme sıklığı da paralel olarak artış göstermektedir. Ülkeler için bu durum ciddi bir ekonomik yük oluşturmaktadır. Hızla artan yaşlı nüfusun ve bireylerin bir ve birden fazla kronik hastalığa sahip olmasının sağlık sektörü açısından da yıllar içerisinde daha da artan bir sorun haline geleceği düşünülmektedir. Bu sebeple yaşlanma ve yaşlanma biyolojisi kapsamında çalışmalar arttırılmalı, bu alandaki çalışmalar detaylandırılmalı ve çözüm önerileri geliştirilmelidir. Bu kapsamda senesense uğramış hücrelerin ortadan kaldırılması yeni ve umut verici bir hedeftir. Senolitiklerin etki mekanizmalarının aydınlatılması, mekanizma ve yolaklardaki moleküllerin görevlerinin açığa çıkarılması, farklı hastalık grupları için potansiyel tedavi yöntemlerini oluşturabilecektir. Tez çalışması kapsamında doğal bir flavonoid olan fisetin senolitiğinin kullanması da, bu bileşiğin hali hazırda birçok meyve sebze de bulunmasından dolayı önemlidir. Dasatinib gibi senolitik ilaçlar yerine fisetin gibi besin desteği olarak da kullanılacak senolitikler insan sağlığı açısından faydaları ve sınırlı yan etkileri açısından daha değerli görülmektedir. Senolitiklerin genler ve metabolizma üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmaların detaylandırılmasıyla yüksek oranda ölüm sebeplerinden olan yaşlanmanın geciktirilmesi, yaşlanmayla birlikte görülen hastalıkların semptom ve seyirinin

hafifletilerek bireylerin yaşam kalitelerinin artırılması, yaşlı nüfusun ekonomik yükünün azaltılması gibi konularda insanlığa faydalı sonuçlar alınacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Alejandro-Osorio, A. L., Huebert, D. J., Porcaro, D. T., Sonntag, M. E., Nillasithanukroh, S., Will, J. L. ve Gasch, A. P. (2009). The histone deacetylase Rpd3p is required for transient changes in genomic expression in response to stress. *Genome Biology*, 10(5), 1-13. <https://doi.org/10.1186/GB-2009-10-5-R57/FIGURES/5>
- Arbeitman, M. N., Furlong, E. E. M., Imam, F., Johnson, E., Null, B. H., Baker, B. S., Krasnow, M. A., Scott, M. P., Davis, R. W. ve White, K. P. (2002). Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 297(5590), 2270-2275. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1072152/SUPPL_FILE/ARBEITMANSO.M.PDF
- Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E. ve Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, 13(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/GENES13122387>
- Åström, S. U., Cline, T. W. ve Rine, J. (2003). The *Drosophila melanogaster* sir2+ gene is nonessential and has only minor effects on position-effect variegation. *Genetics*, 163(3), 931-937. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/163.3.931>
- Audic, S. ve Claverie, J. M. (1997). The Significance of Digital Gene Expression Profiles. *Genome Research*, 7(10), 986-995. <https://doi.org/10.1101/GR.7.10.986>
- Bai, H., Kang, P., Hernandez, A. M. ve Tatar, M. (2013). Activin Signaling Targeted by Insulin/dFOXO Regulates Aging and Muscle Proteostasis in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 9(11), 1003941. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003941>
- Bauer, J. H., Goupil, S., Garber, G. B. ve Helfand, S. L. (2004). An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 12980-12985. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0403493101>
- Bayram, A. (2013). Sirtuin Genleri ve İşlevleri. *Fırat Tıp Dergisi*, 18(3), 136-140. <https://dergipark.org.tr/pub/firattip/issue/6340/84564>
- Beck, J., Horikawa, I. ve Harris, C. (2020). Cellular Senescence: Mechanisms, Morphology, and Mouse Models. *Veterinary Pathology*, 57(6), 747-757. https://doi.org/10.1177/0300985820943841/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0300985820943841-FIG2.JPEG
- Benson, K. R. (2001). T. H. Morgan's resistance to the chromosome theory. *Nature Reviews Genetics*, 2(6), 469-474. <https://doi.org/10.1038/35076532>

- Birch, J. ve Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes ve development*, 34(23-24), 1565-1576. <https://doi.org/10.1101/GAD.343129.120>
- Blander, G. ve Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry*, 73, 417-435. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.73.011303.073651>
- Bownes, M. (1975). A photographic study of development in the living embryo of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology*, 33(3), 789-801. <https://doi.org/10.1242/dev.33.3.789>
- Carter, M. E. ve Brunet, A. (2007). FOXO transcription factors. *Current biology : CB*, 17(4). <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2007.01.008>
- Chaib, S., Tchkonina, T. ve Kirkland, J. L. (2022). Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nature Medicine* 2022 28:8, 28(8), 1556-1568. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01923-y>
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y. ve Xia, R. (2020). TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. *Molecular Plant*, 13(8), 1194-1202. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2020.06.009>
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J. ve van Deursen, J. M. (2017). *Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing*. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.116>
- Ciurciu, A., Komonyi, O., Pankotai, T. ve Boros, I. M. (2006). The *Drosophila* histone acetyltransferase Gcn5 and transcriptional adaptor Ada2a are involved in nucleosomal histone H4 acetylation. *Molecular and cellular biology*, 26(24), 9413-9423. <https://doi.org/10.1128/MCB.01401-06>
- Court, R., Namiki, S., Armstrong, J. D., Börner, J., Card, G., Costa, M., Dickinson, M., Duch, C., Korff, W., Mann, R., Merritt, D., Murphey, R. K., Seeds, A. M., Shirangi, T., Simpson, J. H., Truman, J. W., Tuthill, J. C., Williams, D. W. ve Shepherd, D. (2020). A Systematic Nomenclature for the *Drosophila* Ventral Nerve Cord. *Neuron*, 107(6), 1071-1079.e2. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2020.08.005>
- Cridland, J. M., Majane, A. C., Zhao, L. ve Begun, D. J. (2022). Population biology of accessory gland-expressed de novo genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 220(1). <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAB207>
- Dang, W. (2014). The controversial world of sirtuins. *Drug Discovery Today: Technologies*, 12, e9-e17. <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2012.08.003>
- Demontis, F. ve Perrimon, N. (2010). FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell*, 143(5), 813-825. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.10.007>

- Dhillon, A., Chowdhury, T., Morbey, Y. E. ve Moehring, A. J. (2020). Reproductive consequences of an extra long-term sperm storage organ. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/S12862-020-01704-6/FIGURES/4>
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D. ve dAdda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Du, S. ve Zheng, H. (2021). Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases. *Cell ve Bioscience* 2021 11:1, 11(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/S13578-021-00700-7>
- Ehren, J. L. ve Maher, P. (2013). Concurrent regulation of the transcription factors Nrf2 and ATF4 mediates the enhancement of glutathione levels by the flavonoid fisetin. *Biochemical Pharmacology*, 85(12), 1816-1826. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2013.04.010>
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P. ve Casati, P. (2012). Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3(SEP), 34352. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2012.00222/BIBTEX>
- Frankel, S., Woods, J., Ziafazeli, T. ve Rogina, B. (2015). RPD3 histone deacetylase and nutrition have distinct but interacting effects on *Drosophila* longevity. *Aging (Albany NY)*, 7(12), 1112. <https://doi.org/10.18632/AGING.100856>
- Frankel, S., Ziafazeli, T. ve Rogina, B. (2011). dSir2 and longevity in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 46(5), 391-396. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2010.08.007>
- Giannakou, M. E., Goss, M., Jünger, M. A., Hafen, E., Leivers, S. J. ve Partridge, L. (2004). Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5682), 361. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1098219>
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuente, A. M. ve Roberts, D. M. (2015). Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics*, 201(3), 815-842. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.115.183392>
- Hariharan, N., Maejima, Y., Nakae, J., Paik, J., Depinho, R. A. ve Sadoshima, J. (2010). Deacetylation of FoxO by Sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes. *Circulation research*, 107(12), 1470. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227371>
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614-636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hopkins, B. R., Sepil, I. ve Wigby, S. (2020). Structural variation in *Drosophila melanogaster* spermathecal ducts and its association with sperm competition

dynamics. *Royal Society Open Science*, 7(3).
<https://doi.org/10.1098/RSOS.200130>

Hung, R. J., Hu, Y., Kirchner, R., Liu, Y., Xu, C., Comjean, A., Tattikota, S. G., Li, F., Song, W., Sui, S. H. ve Perrimon, N. (2020). A cell atlas of the adult *Drosophila* midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(3), 1514-1523.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1916820117/-/DCSUPPLEMENTAL>

Hwangbo, D. S., Garsham, B., Tu, M. P., Palmer, M. ve Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*, 429(6991), 562-566. <https://doi.org/10.1038/NATURE02549>

Jerome, M. S., Kuthethur, R., Kabekkodu, S. P. ve Chakrabarty, S. (2022). Regulation of mitochondrial function by forkhead transcription factors. *Biochimie*, 198, 96-108. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2022.03.013>

Keller, A. (2007). *Drosophila melanogaster*'s history as a human commensal. *Current Biology*, 17(3), R77-R81. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2006.12.031>

Khan, N., Syed, D. N., Ahmad, N. ve Mukhtar, H. (2013). Fisetin: A Dietary Antioxidant for Health Promotion. *Antioxidants ve Redox Signaling*, 19(2), 151. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.4901>

Kimira, M., Arai, Y., Shimoi, K. ve Watanabe, S. (1998). Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *Journal of epidemiology*, 8(3), 168-175. <https://doi.org/10.2188/JEA.8.168>

Klar, A. J. S., Fogel, S. ve Macleod, K. (1979). MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *Genetics*, 93(1), 37-50. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/93.1.37>

Kopp, Z. A., Hsieh, J. L., Li, A., Wang, W., Bhatt, D. T., Lee, A., Kim, S. Y., Fan, D., Shah, V., Siddiqui, E., Ragam, R., Park, K., Ardesna, D., Park, K., Wu, R., Parikh, H., Parikh, A., Lin, Y. R. ve Park, Y. (2015). Heart-specific Rpd3 downregulation enhances cardiac function and longevity. *Aging*, 7(9), 648-663. <https://doi.org/10.18632/AGING.100806>

Koval, L. A., Proshkina, E. N., Zemskaya, N. V., Solovev, I. A., Schegoleva, E. V., Shaposhnikov, M. V. ve Moskalev, A. A. (2023). *Drosophila melanogaster* Lifespan Is Regulated by nejure Gene Expression in Peripheral Tissues and Nervous System. *Molecular Biology*, 57(5), 848-866. <https://doi.org/10.1134/S0026893323050060/FIGURES/11>

Lall, R. K., Adhami, V. M. ve Mukhtar, H. (2016). Dietary flavonoid fisetin for cancer prevention and treatment. *Molecular nutrition ve food research*, 60(6), 1396. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201600025>

Ma, S., Sun, S., Geng, L., Song, M., Wang, W., Ye, Y., Ji, Q., Zou, Z., Wang, S., He, X., Li, W., Esteban, C. R., Long, X., Guo, G., Chan, P., Zhou, Q.,

- Belmonte, J. C. I., Zhang, W., Qu, J. ve Liu, G. H. (2020). Caloric Restriction Reprograms the Single-Cell Transcriptional Landscape of *Rattus Norvegicus* Aging. *Cell*, 180(5), 984-1001.e22. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.008>
- Mannervik, M. ve Levine, M. (1999). The Rpd3 histone deacetylase is required for segmentation of the *Drosophila* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 6797-6801. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.12.6797>
- Mata, J., Marguerat, S. ve Bähler, J. (2005). Post-transcriptional control of gene expression: A genome-wide perspective. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(9), 506-514. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.07.005>
- Pearson, K. J., Baur, J. A., Lewis, K. N., Peshkin, L., Price, N. L., Labinskyy, N., Swindell, W. R., Kamara, D., Minor, R. K., Perez, E., Jamieson, H. A., Zhang, Y., Dunn, S. R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L. A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., ... de Cabo, R. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell metabolism*, 8(2), 157-168. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2008.06.011>
- Perry, S., Kiragasi, B., Dickman, D. ve Ray, A. (2017). The Role of Histone Deacetylase 6 in Synaptic Plasticity and Memory. *Cell reports*, 18(6), 1337-1345. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.01.028>
- Piper, M. D. W. ve Partridge, L. (2018). *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(9), 2707-2717. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2017.09.016>
- Piper, M. D. W., Skorupa, D. ve Partridge, L. (2005). Diet, metabolism and lifespan in *Drosophila*. *Experimental gerontology*, 40(11), 857-862. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2005.06.013>
- Puig, O., Marr, M. T., Ruhf, M. L. ve Tjian, R. (2003). Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. <https://doi.org/10.1101/gad.1098703>
- Puig, O. ve Mattila, J. (2011). Understanding Forkhead Box Class O Function: Lessons from *Drosophila melanogaster*. <https://home.liebertpub.com/ars>, 14(4), 635-647. <https://doi.org/10.1089/ARS.2010.3407>
- Qausain, S., Srinivasan, H., Jamal, S., Nasiruddin, M. ve Khan, M. K. A. (2019). Phosphorylation and Acetylation of Proteins as Posttranslational Modification: Implications in Human Health and Associated Diseases. *Protein Modificomics: From Modifications to Clinical Perspectives*, 69-86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811913-6.00003-5>

- Regulski, M. J. (2017). Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds : a compendium of clinical research and practice*, 29(6), 168-174. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28682291/>
- Roger, L., Tomas, F. ve Gire, V. (2021). Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *International journal of molecular sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS222313173>
- Rogina, B. ve Helfand, S. L. (2004a). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15998-16003. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0404184101>
- Rogina, B. ve Helfand, S. L. (2004b). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15998-16003. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0404184101>
- Rogina, B., Helfand, S. L. ve Frankel, S. (2002). Longevity regulation by Drosophila Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5599), 1745. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1078986>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. ve Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, 13(11), 2498. <https://doi.org/10.1101/GR.1239303>
- Singh, S., Garg, G., Singh, A. K., Bissoyi, A. ve Rizvi, S. I. (2019). Fisetin, a potential caloric restriction mimetic, attenuates senescence biomarkers in rat erythrocytes. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 97(4), 480-487. <https://doi.org/10.1139/BCB-2018-0159>
- Spellberg, M. J. ve Ii, M. T. M. (2015). FOXO regulates RNA interference in Drosophila and protects from RNA virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), 14587-14592. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1517124112/-/DCSUPPLEMENTAL>
- The Drosophila adult expression atlas*. (t.y.). 02/10/2023. Geliş tarihi 02 Kasım 2023, gönderen http://flyatlas.org/about_atlas.html
- Torres-Zelada, E. F. ve Weake, V. M. (2021). The Gcn5 complexes in Drosophila as a model for metazoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1864(2), 194610. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2020.194610>
- Van Cauwenberghe, C., Vandendriessche, C., Libert, C. ve Vandenbroucke, R. E. (2016). Caloric restriction: beneficial effects on brain aging and Alzheimer's disease. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 27(7-8), 300-319. <https://doi.org/10.1007/S00335-016-9647-6>

- Victorelli, S., Salmonowicz, H., Chapman, J., Martini, H., Vizioli, M. G., Riley, J. S., Cloix, C., Hall-Younger, E., Machado Espindola-Netto, J., Jurk, D., Lagnado, A. B., Sales Gomez, L., Farr, J. N., Saul, D., Reed, R., Kelly, G., Eppard, M., Greaves, L. C., Dou, Z., ... Passos, J. F. (2023). Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP. *Nature* 2023 622:7983, 622(7983), 627-636. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06621-4>
- Vuranok, N., Üniversitesi, S., Fakültesi, T., Ve, H., Anabilim, E., Sakarya, D. ve Tarihi, G. (2022). Hastalıkların Tedavisinde Umut Vadeden Yeni Hedef: FOXO Transkripsiyon Faktörleri. *Hipokrat Tıp Dergisi*, 2(1), 25-32. <https://doi.org/10.29228/HMJ.11>
- Wang, J. ve Zhao, Xi. H. (2016). Degradation kinetics of fisetin and quercetin in solutions affected by medium pH, temperature and co-existed proteins. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81(3), 243-253. <https://doi.org/10.2298/JSC150706092W>
- Wang, Y., He, Y., Rayman, M. P. ve Zhang, J. (2021a). Prospective Selective Mechanism of Emerging Senolytic Agents Derived from Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(42), 12418-12423. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C04379/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF1C04379_0003.GIF
- Wang, Y., He, Y., Rayman, M. P. ve Zhang, J. (2021b). Prospective Selective Mechanism of Emerging Senolytic Agents Derived from Flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(42), 12418-12423. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C04379>
- Wissler Gerdes, E. O., Zhu, Y., Tchkonina, T. ve Kirkland, J. L. (2020). Discovery, development, and future application of senolytics: theories and predictions. *The FEBS Journal*, 287(12), 2418-2427. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15264>
- Wood, J. G., Regina, B., Lavu, S., Hewitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M. ve Sinclair, D. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430(7000), 686-689. <https://doi.org/10.1038/NATURE02789>
- Woods, J. K. ve Rogina, B. (2016). The effects of Rpd3 on fly metabolism, health, and longevity. *Experimental Gerontology*, 86, 124-128. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2016.02.015>
- Woods, J. K., Ziafazeli, T. ve Rogina, B. (2016). Rpd3 interacts with insulin signaling in *Drosophila* longevity extension. *Aging (Albany NY)*, 8(11), 3028. <https://doi.org/10.18632/AGING.101110>
- Wu, Q. J., Zhang, T. N., Chen, H. H., Yu, X. F., Lv, J. Le, Liu, Y. Y., Liu, Y. S., Zheng, G., Zhao, J. Q., Wei, Y. F., Guo, J. Y., Liu, F. H., Chang, Q., Zhang, Y. X., Liu, C. G. ve Zhao, Y. H. (2022). The sirtuin family in health and disease.

Signal Transduction and Targeted Therapy 2022 7:1, 7(1), 1-74.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01257-8>

Yang, X. J. ve Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(3), 206. <https://doi.org/10.1038/NRM2346>

Yeşilada, E. ve Gelegen, L. (2000). Drosophila melanogaster' in ömür uzunluğu üzerine kadmiyum nitratın etkisi. *Turkish Journal of Biology*, 24(3), 593-599. <http://search/yayin/detay/26353>

Yousefzadeh, M. J., Zhu, Y., McGowan, S. J., Angelini, L., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Xu, M., Ling, Y. Y., Melos, K. I., Pirtskhalava, T., Inman, C. L., McGuckian, C., Wade, E. A., Kato, J. I., Grassi, D., Wentworth, M., Burd, C. E., Arriaga, E. A., Ladiges, W. L., Tchkonja, T., ... Niedernhofer, L. J. (2018). Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*, 36, 18-28. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2018.09.015>

Zhang, D., Shan, J., Liang, B., Zhong, L., Tang, H., Xu, Y., Jin, H., Chen, Y. ve Shen, J. (2023). Senolytic Drug Quercetin Rescues Survival from Blue Light Toxicity in Drosophila Model. *Photochemistry and Photobiology*, 99(4), 1115-1121. <https://doi.org/10.1111/PHP.13734>

Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J. ve Robbins, P. D. (2021). Recent advances in the discovery of senolytics. *Mechanisms of Ageing and Development*, 200, 111587. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2021.111587>

Zhang, S., Xue, R., Geng, Y., Wang, H. ve Li, W. (2020). Fisetin Prevents HT22 Cells From High Glucose-Induced Neurotoxicity via PI3K/Akt/CREB Signaling Pathway. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 508530. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.00241/BIBTEX>

Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S. H. ve Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism*, 6(6), 472-483. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2007.11.004>

Zheng, H., Yang, X. ve Xi, Y. (2016). Fat body remodeling and homeostasis control in Drosophila. *Life Sciences*, 167, 22-31. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2016.10.019>

Zhu, Y., Doornebal, E. J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., Tchkonja, T. ve Kirkland, J. L. (2017). New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging*, 9(3), 955-963. <https://doi.org/10.18632/AGING.101202>

Ziğtara, P., Dziewiğcka, M. ve Augustyniak, M. (2022). Why Is Longevity Still a Scientific Mystery? Sirtuins—Past, Present and Future. *International Journal of*

