

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARE MEME TÜMÖR VİRÜSÜ-DÖNÜŞÜM BÜYÜME FAKTÖRÜ-
 α FARELERİNE AİT RNA-SEKANS VERİLERİNDEN
BELİRLENEN KANSER İLİŞKİLİ GENLERİN
EKSPRESYONLARININ TİMUS DOKUSUNDA GÖSTERİLMESİ**

ALİ YASİR KOÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. NEHİR ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE MEME TÜMÖR VİRÜSÜ-DÖNÜŞÜM BÜYÜME FAKTÖRÜ-
 α FARELERİNE AİT RNA-SEKANS VERİLERİNDEN
BELİRLENEN KANSER İLİŞKİLİ GENLERİN
EKSPRESYONLARININ TİMUS DOKUSUNDA GÖSTERİLMESİ**

Ali Yasir KOÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 26.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Akın SEVİNÇ
Altınbaş Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün FYL-2017-3153 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tezi olarak sunulan bu çalışma, FYL-2017-3153 numaralı Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi olarak desteklenmiş ve Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

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

Tezde kullanılan doku örneklerinin temini konusunda yardımcı olan Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Soner DOĞAN'a, RNA izolasyonu sürecinde laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Bölümünde yüksek lisans öğrencisi sevgili Münevver Burcu ÇİÇEKDAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezin oluşturulması sürecinde bilimsel katkıları ve yönlendirmeleriyle destek olan Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde doktora öğrencisi sevgili Zehra ÖMEROĞLU ULU'ya, deneysel çalışmalarında yanımda olan değerli arkadaşım Hatice Nur AYDIN'a ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Her aşamada yanımda olan kıymetli aile fertlerime, desteklerinden dolayı en içten sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında ve hayatımın her aşamasında beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan hayat arkadaşım Hatice Şeyma KOÇ'a minnettarlığımı sunarım.

Haziran, 2018

Ali Yasir KOÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	3
1.3 Hipotez.....	3
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER	5
2.1 Kalori Kısıtlaması	5
2.2 Beslenme ve Bağışıklık	9
2.2.1 Beslenme ve Bağışıklık Dengesi	9
2.2.2 Timüs	11
2.3 Meme Kanseri.....	12
2.3.1 MMTV-TGF - α Fare	12
2.3.2 Meme Kanseri İlişkili Genler	14
2.4 Biyoinformatik.....	18
2.4.1 Transkriptom	19
2.4.1.1 RNA-seq.....	19
2.5 Gerçek Zamanlı PCR.....	23
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METHOD	26

3.1	Materyaller.....	26
3.1.1	Kullanılan Hayvan Materyali	26
3.1.2	Kullanılan Biyoinformatik Veriler	27
3.2	Metot.....	27
3.2.1	Genlerin Belirlenmesi.....	27
3.2.2	RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi.....	28
3.2.3	RNA İzolasyonu	28
3.2.4	RNA Miktar Tayini	29
3.2.5	RNA Jel Elektrophorezi	29
3.2.6	Primer Tasarlama.....	30
3.2.7	Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	30
3.2.8	Gerçek Zamanlı PCR.....	31
BÖLÜM 4		
SONUÇ VE ÖNERİLER.....		33
4.1	Sonuçlar	33
4.1.1	Genlerin Belirlenmesi.....	33
4.1.2	RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi Sonuçları	33
4.1.3	RNA Miktar Tayini Sonuçları	36
4.1.4	RNA Jel Elektrophorezi	37
4.1.5	Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları	37
4.2	Tartışma	48
KAYNAKLAR		55
EK-A		
ETİK KURULU RAPORU.....		62
ÖZGEÇMİŞ.....		63

SİMGE LİSTESİ

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

KISALTMA LİSTESİ

AKK	Aralıklı Kalori Kısıtlama
AL	<i>Ad Libitum</i>
AMP	Adenozin Mono fosfat
AMPK	Adenozin Mono fosfat Kinaz
ATP	Adenozin Trifosfat
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
DEGs	Farklı Oranda Ekspresse Olan Genler
DEPC	Dietil Pirokarbonat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Östrojen Reseptörü
GO ID	Gen Ontolojisi Kimlik Numarası
KKK	Kronik Kalori Kısıtlama
MMTV	Fare Meme Tümör Virüsü
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
NGS	Yeni Nesil Dizileme
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIP3	Fosfotidil İnositol 3,4,5-trifosfat
Q-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNA-seq	RNA Sekanslama
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TGF- α	Dönüşüm Büyüme Faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Metabolik sistem ve immün sistem arasındaki ilişkinin şekilsel gösterimi.....	10
Şekil 2.2 TGF- α ve EGF'nin reseptörü ve etkileri	13
Şekil 2.3 <i>Pten</i> ve <i>Trp53</i> yolakları	18
Şekil 2.4 RNA-seq aşamaları.....	20
Şekil 2.5 Sekanslama ve sinyal okunmasının şekilsel gösterimi	21
Şekil 2.6 GO:0002706 numaralı, lenfosit aracılığıyla bağışıklığın düzenlenmesinin, biyolojik süreç anatasyon ağacında gösterimi	23
Şekil 2.7 Gerçek Zamanlı PCR fazları ve amplifikasyon eğrisi grafiği	24
Şekil 4.1 RNA-seq datasından elde edilen, <i>Gata3</i> geninin ekspresyon grafiği.....	34
Şekil 4.2 RNA-seq datasından elde edilen, <i>Pten</i> geninin ekspresyon grafiği.....	35
Şekil 4.3 RNA-seq datasından elde edilen, <i>Trp53</i> geninin ekspresyon grafiği	35
Şekil 4.4 RNA-seq datasından elde edilen, <i>Akt1</i> geninin ekspresyon grafiği.....	35
Şekil 4.5 RNA-seq datasından elde edilen, <i>Runx1</i> geninin ekspresyon grafiği.....	36
Şekil 4.6 RNA-seq datasından elde edilen, <i>Sfb3b1</i> geninin ekspresyon grafiği.....	36
Şekil 4.7 RNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (soldan sağa örnek numaraları 169, 164, 203, 95, 107, 133, 64, 88, 18).....	37
Şekil 4.8 <i>Gata3</i> ve <i>Trp53</i> 'e ait çoğalma eğrisi grafiği	38
Şekil 4.9 <i>Gata3</i> ve <i>Trp53</i> 'e ait erime eğrisi grafiği	38
Şekil 4.10 <i>Pten</i> için 18. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi.....	40
Şekil 4.11 <i>Gata3</i> için 18. haftada 2 grup arasındaki kat değişimi	40
Şekil 4.12 <i>Trp53</i> için 18. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi	41
Şekil 4.13 <i>Pten</i> için 50. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi.....	42
Şekil 4.14 <i>Gata3</i> için 50. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi	43
Şekil 4.15 <i>Trp53</i> için 50. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi	44
Şekil 4.16 <i>Pten</i> için 80. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi.....	45
Şekil 4.17 <i>Gata3</i> için 80. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi	46
Şekil 4.18 <i>Trp53</i> için 80. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi	47
Şekil 4.19 <i>Pten</i> için haftalar arasındaki kat değişimi.....	47
Şekil 4.20 <i>Gata3</i> için haftalar arasındaki kat değişimi	48
Şekil 4.21 <i>Trp53</i> için haftalar arasındaki kat değişimi	48
Şekil A.1 Etik Kurulu Raporu.....	62

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 17 ile 18. haftalarda sakrifiye edilen farelerin kalori alım oranı tablosu.....	27
Çizelge 3.2 Altromin TPF1414 diyetin bileşenleri.....	27
Çizelge 3.3 Yükleme için RNA Örneklerinin Hazırlanması	30
Çizelge 3.4 cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve hacimleri	31
Çizelge 3.5 PCR reaksiyonları için gerekli hacmi içeren bileşenler.....	31
Çizelge 3.6 Q-PCR reaksiyonları için gerekli olan sıcaklık değerleri ve süreler	32
Çizelge 4.1 Beslenme grupları arası ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı olan genler ve p değerleri.....	34
Çizelge 4.2 İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık ölçüm değerleri.....	36
Çizelge 4.3 <i>Gapdh</i> , <i>Pten</i> , <i>Gata3</i> ve <i>Trp53</i> genlerinin ortalama C _t değerleri.....	39

FARE MEME TÜMÖR VİRÜSÜ-DÖNÜŞÜM BÜYÜME FAKTÖRÜ- α FARELERİNE AİT RNA-SEKANS VERİLERİNDEN BELİRLENEN KANSER İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYONLARININ TİMÜS DOKUSUNDA GÖSTERİLMESİ

Ali Yasir KOÇ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Meme kanseri, yüksek ölüm oranlarına sahip bir kanser türüdür. Fare meme tümör virüsü-dönüşüm büyüme faktörü-alfa (MMTV-TGF- α) transgenik fareleri, meme kanseri araştırmalarında kullanılır. Bunlar, ömürlerinin ikinci yılından itibaren meme kanseri geliştiren deney hayvanlarıdır. Genlerin ekspresyonlarındaki değişimler, kanser oluşumunda kritik rol oynar. Gen ekspresyon değişimlerinin belirlenmesinde, RNA-seq yaygın kullanılan bir yöntemidir. Kalori kısıtlaması, güçlü bir beslenme müdahalesidir. Yetersiz beslenmeye yol açmadan, alınan kaloringin sınırlandırılması olarak bilinir. Canlılar üzerinde, yaşam sürelerini arttırmak, tümör oluşumunu engellemek ve immün fonksiyonu güçlendirmek gibi etkileri kaydedilmiştir. Beslenme kısıtlamasına karşı timüs ve diğer lenfoid organlar hızlı tepki verirler. Kalori kısıtlaması ile timüs dokusundaki ifadesi değişen kanser ilişkili genler bu çalışmanın odak noktasıdır. Çalışmanın amacı, RNA-seq ile tespit edilmiş olan “farklı oranda ifade edilen genlerin” (DEGs), Gerçek Zamanlı PCR ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanması, RNA-seq verilerinin onaylanması ve ileriki haftalarda ekspresyon miktarlarının takip edilmesidir.

Bu çalışmada, daha önceki bir çalışmada elde edilen RNA-seq verileri referans olarak kullanıldı. RNA-seq’de kullanılan RNA’lar, 10. haftadan itibaren ad libitum beslenme, kronik kalori kısıtlanmış beslenme ve aralıklı kalori kısıtlanmış beslenme gruplarına ayrılan, MMTV-TGF- α farelerin, 17.-18. haftada sakrifiye edilip alınan timüs dokularından izole edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, kullanılan RNA’lar yine aynı protokolle yetiştirilmiş farelerin 17.-18., 49.-50. ve 80.-81. haftalarda sakrifiye edilip alınan timüs dokularından izole edildi. RNA-seq verilerinde, kalori kısıtlaması uygulanmış bireylerde, anlamlı olarak totalde 6091 “farklı miktarda ifade edilen genler”

(DEGs) ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Seçilen 21 meme kanseri yönlendirici gen, DEGs verilerinde tarandı. 6 tanesinin ifadesindeki değişimlerin istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu genlerin 3'ünün ifade edilme oranlarındaki değişimler Gerçek Zamanlı PCR ile valide edildi. Aynı miktarda enerji girdisi olup farklı kalori kısıtlaması türleri uygulanmış farelerde gen ifadesinde farklılıklar olduğu kaydedildi. Böylece, kalori kısıtlamasının yanı sıra, beslenme tipinin de tümör oluşumunun engellenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kalori kısıtlaması, RNA-Seq, Gerçek Zamanlı PCR, Meme Kanseri



ABSTRACT

DISPLAYING THE EXPRESSION OF SELECTED CANCER ASSOCIATED GENES FROM RNA-SEQ DATA OF MOUSE MAMMARY TUMOR VIRUS-TRANSFORMING GROWTH FACTOR- α MICE IN THYMUS TISSUE

Ali Yasir KOÇ

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Breast cancer is a type of cancer that has high mortality rates. Mouse mammary tumor virus transforming growth factor- α (MMTV-TGF- α) transgenic mice are experimental animals that are used in breast cancer researches. They are organisms that develop breast cancer from the second year of their lives. Changes in the expression of genes play a critical role in cancer formation. RNA-seq is a widely used method in determining gene expression changes. Caloric restriction is a potent nutritional intervention. It is known as limiting the calorie intake without causing malnutrition. It has been reported effects on organisms such as increasing life span, inhibiting tumor formation and strengthening immunological function. The thymus and other lymphoid organs respond quickly to nutritional restriction. The cancer-related genes that are altered expressions in thymus tissue by caloric restriction are the focal point of this study. The aim of the study is to compare the "differentially expressed genes" (DEGs) identified by RNA-seq with Real Time PCR results and validation of the RNA-seq data and follow up expression amount of these genes in the following weeks.

In this study, RNA-seq data obtained from an earlier study were used as reference. It has been reported that RNAs used in RNA-seq were isolated from thymus tissues of MMTV-TGF- α mice, which have been sacrificed at 17th -18th week, divided into Ad Libitum diet, chronic caloric restricted diet and intermittent caloric restricted diet groups from 10th week of the life. RNAs used in this study were isolated from thymus tissues of mice, which have been sacrificed at 17th – 18th, 49th -50th and 80th – 81st week, grown by the same protocol. In total 6091 statistically significant “differentially expressed genes” (DEGs) ($p < 0.05$) were detected in RNA-seq data that obtained from

caloric restricted mice. The selected 21 breast cancer-directed genes were screened in DEGs data. It was found that changes in the expression of 6 genes were statistically significant. Changes in expression rates of 3 genes of these were validated by Real Time PCR. It was noted that there were differences in gene expression in the same amount of energy input and in different caloric restriction. Thus, it is thought that besides calorie restriction, nutrition type is also effective in preventing tumor formation.

Keywords: Calorie Restriction, RNA-Seq, Real Time PCR, Breast Cancer



1.1 Literatür Özeti

1930’lardan bu yana, kalori kısıtlamasının canlılar üzerinde çeşitli etkileri olduğu kaydedilmeye başlanmıştır [1]. Yaşam süresi ve yaşlanma, tümör oluşum süreçleri, immün cevap gibi konularda zamanla farklı model canlılarda (sinek, balık, fare, maymun) bu manipülasyonun etkileri araştırılmıştır [2]. Bunun sonucunda, yaşam süresini arttırdığı, yaşlanmayı geciktirdiği, tümör oluşumunu baskıladığı, immün sistemi güçlendirdiği, otoimmün mekanizmaları engellediği farklı çalışmalarda bildirilmiştir [3].

Kalori kısıtlamasının iki ana uygulaması vardır. Bunlardan ilki, devamlı olarak kalori kısıtlamasının uygulandığı kronik kalori kısıtlamasıdır. Diğer uygulama ise, periyotlar halinde kalori kısıtlaması uygulanan aralıklı kalori kısıtlamasıdır. Bu iki uygulamadan daha çok bilinen ve kullanılan kronik kalori kısıtlamasının %20-40 oranlarında uygulandığında, kanser oluşumunu %95 gibi bariz bir miktarda engellediği pek çok çalışmada kaydedilmiştir [4]. Öte yandan, aralıklı kalori kısıtlamasının etkileri daha az bilinir ve kanseri engellemesi konusunda birbiriyle örtüşmeyen sonuçlara ulaşılmıştır. Buna göre, aralıklı kalori kısıtlaması kimi çalışmalarda kanser oluşumunu engellerken [5], başka çalışmalarda bu etkinin gözlenmediği ifade edilmiştir [6]. Bu iki uygulama türünün birbirine üstünlüğü de henüz netleşmemiş bir konudur. Her iki uygulamanın da kanser oluşumunu engellemede birbirinden üstün olduğu farklı araştırmalar mevcuttur [5], [7].

Metabolik sistem ve immün sistem arasında karşılıklı bir ilişki bulunur. Alınan enerji miktarının fazla veya eksik olmasına bağlı olarak, immün sistem üzerinde pozitif veya

negatif etkiler gözlenir. Enerji alımı ile tüketimi arasında oluşan dengenin, kalori kısıtlaması durumlarında negatife kaydığı, bunun sonucunda bazı nöroendokrin moleküller aracılığıyla bağışıklık cevabını güçlendirdiği düşünülmektedir [8]. Kalori kısıtlamasının T hücrelerini arttırdığı, T hücre repertuarını çeşitlendirdiği, timüsün yaşlanmasını geciktirdiği öne sürülen çeşitli çalışmalar mevcuttur [9].

Meme kanserinin kadınlar arasında görülme sıklığı, tüm kanserler arasında ikinci sıradadır [10]. Meme kanseri oluşumunda birçok risk faktörü bulunur ve bunlar arasında genetik faktörler %5-10 arası pay sahibidir. *Brca1* ve *Brca2* genleri bu kanserin oluşumuna dahil olan iki ana tümör baskılayıcı gendir. Bununla birlikte, *Akt1*, *Runx1*, *Sf3b1*, *Gata3*, *Trp53*, *Pten* genlerinin de kanserleşme sürecine katıldığı bildirilmiştir [11]. MMTV-TGF- α fareler, kanser oluşum sürecinde etkin rol oynayan TGF- α 'nın fazla ifade edildiği transgenik canlılardır ve meme kanseri araştırmalarında kullanılırlar [12].

Biyoinformatik uygulamalar, biyolojik çalışmalardan elde edilen yüksek miktarda verinin analizini, bu verinin saklanması ve yorumlanmasını sağlar. RNA-seq, biyoinformatik analizlerin yoğun olarak kullanıldığı bir çeşit Yeni Nesil Dizileme (NGS) uygulamasıdır [13]. Meme kanseri hücrelerinde yeni gen füzyonlarının tespiti için yapılan bir çalışmada RNA-seq yöntemi kullanılmış ve katı tümörlerde yeni karşılaşılan bu tip tümörlerin karakterizasyonu yapılmıştır [14]. Bununla birlikte RNA-seq, gen ekspresyon değişimlerinin tespitinde bütüncül bir bakış sağlar. Bir hücredeki ifade edilen tüm genlerin araştırılması RNA-seq ile yapılan transkriptom analizi ile mümkündür. Bu analizle, farklı oranda ifade edilen genlere (DEGs) ulaşılması amaçlanır. DEGs farklı durum, zaman veya dokuda ifade edilme miktarı değişen genler olarak tanımlanır. İfadesi değişen genlerin tespiti, kanser oluşum süreçlerinin aydınlatılmasında rol oynar [15]. Güncel bir çalışmada, petrolün embriyonik gelişime etkisi iki farklı balık türünde çalışmış, RNA-seq ile yapılan analiz sonucunda elde edilen DEGs altı kategoriye ayrılmış, böylece petrolün gelişimde etkilediği mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlanmıştır [16].

Gerçek zamanlı PCR (Q-PCR) nükleotidlerin çoğaltılmasını ve bu çoğalmayla eş zamanlı olarak görüntülenmesini sağlar. Aynı zamanda bir genin ifadesindeki değişimlerin nispi ölçümünü sağlayan kantitatif bir metodudur [17]. Birçok transkriptom çalışmasında, mikroarray veya RNA-seq ile elde edilen gen ifadesi

değişim verileri, Q-PCR ile valide edilir. Örneğin bir çalışmada, fare embriyolarında dairesel RNA'ların RNA-seq ile transkriptom analizi yapılmış daha sonrada bulunan sonuçları onaylamak için Q-PCR kullanılmıştır [18].

1.2 Tezin Amacı

Kalori kısıtlamasının pek çok canlıda tümör oluşumunu engellediği bilinmektedir [19], [3]. Bu çalışmalarda çoğunlukta belirli oranda ve sürekli kalori kısıtlaması (kronik kalori kısıtlaması) uygulanmıştır. Bununla birlikte, kalori kısıtlamasının bir diğer türü olan, periyotlar halinde kalori alımının kısıtlandığı aralıklı kalori kısıtlaması (AKK), daha az çalışılmıştır. Dahası, tümör oluşumunu engellemesi konusunda birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir. Şöyle ki, bazı çalışmalarda AKK'nın tümör oluşumunu engellediği gösterilirken [5], bunu bildirmeyen çalışmalar da mevcuttur [6].

Bu çalışmanın amacı, daha önce RNA-seq verilerinin analizi ile transkriptom seviyesinde farklılıkları gösterilen tümör ilişkili genlerin, *ad libitum*, kronik kalori kısıtlanmış, aralıklı kalori kısıtlanmış olarak beslenen MMTV-TGF- α farelerinin timüsünde Gerçek Zamanlı PCR ile transkriptom analiz sonuçlarına paralel ekspresyon değişiminin tespit edilmesidir.

Öte yandan, AL, AKK ve KKK beslenme gruplarına ayrılan farelerde, meme kanseri ilişkili genlerin ifadesinde yaş ve beslenme tipinin etkisiyle oluşacak farklılıkların belirlenmesi hedeflenmektedir. Erken teşhisin meme kanserindeki önemi bilindiğinden, meme kanseri oluşturacak bu farelerde yaşamlarının erken evrelerinde bu değişikliklerin tespitinin, kalıtsal meme kanseri vakaları yanı sıra sonradan oluşan meme kanseri vakalarına da ışık tutması amaçlanmıştır. Bununla birlikte geç dönemde uygulanan kalori kısıtlamasının, tümör oluşumuna sebep olan genlerin ekspresyon değişiminde normal beslenmeye göre bir farklılığa sebep olup olmadığı öğrenilmek istenmektedir.

1.3 Hipotez

Yapılan literatür taramasında kalori kısıtlamasının tümör oluşumunu engellediği görülmüştür. Bölümümüzde tamamlanan bir çalışmada, RNA-seq temelli transkriptom analizi ile kalori kısıtlanmış ve normal beslenmiş bireyler arasında “farklı oranda ekspresse edilen genlere” ulaşılmıştır. Bu genler arasında meme kanseri ilişkili genlerin de bulunduğu tespit edilmiştir. Bu göstergeler, meme kanseri ilişkili genlerin ifadesinde

beslenme ve beslenme tipinin etkisiyle anlamlı değişikler olduğu, bu değişimleri tümör oluşumunu azalttığı hipotezini kurmamızı sağlamıştır. Bu çalışmada, meme kanseri ilişkili genlerin RNA-seq analizinden elde edilen ekspresyon değişim sonuçlarının, Gerçek Zamanlı PCR ile doğrulanması beklenmektedir.



GENEL BİLGİLER

2.1 Kalori Kısıtlaması

Yaygın kullanılan bir deneysel manipülasyon yöntemi olarak kalori kısıtlaması, yetersiz beslenmeden kaçınarak organizmanın aldığı kalori miktarının sınırlandırılması olarak tanımlanır [20]. Enerji girdisinin azaltılması, temel besinlerin yeterli miktarda alımı ile kombine edilir. 1900'lerin başından beri çeşitli canlılarda bu manipülasyonun etkileri inceleme konusu olmuştur. Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda, farklı organizmalarda birçok biyolojik süreç üzerinde çeşitli etkilere rastlanmıştır. Temel olarak, canlıların yaşam sürelerini arttırıp yaşlanmayı geciktirdiği, tümör oluşumunu engellediği, otoimmüniteyi baskıladığı ve immün sistemi çeşitli yollarla olumlu yönden etkilediği kaydedilmiştir [3].

Kalori kısıtlamasının, yaşam süresi ve yaşlanma üzerine etkisi, 1930'larda yapılan bir çalışma ile ilk olarak kaydedilmiştir. Sıçanlarda yapılan bu çalışmada beslenmedeki kısıtlamanın yaşam süresini uzattığı ve yaşlanmayı geciktirdiği sonucuna ulaşılmıştır [1]. Daha sonraki yıllarda fare, solucan, balık ve sinek model organizmalarında yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara ulaşılmıştır [7] [19]. Model organizmalarla yapılan çalışmalar bu konunun anlaşılmasında ilerleme sağlasa da, beslenmeye yapılan bu müdahalenin insan yaşam süresi üzerine etkilerini öğrenmek için, primatlar kullanılarak yürütülen çalışmalar daha güvenilir sonuçlar verir. Primat modeli seçilen al yanaklı maymunlar üzerinde bu konuda iki bağımsız çalışma yürütülmüştür. Bunların ilkinde kalori kısıtlamasının yaşam süresini etkilemediği, ama yaş ile ilişkili hastalıkların görülmesinde azalmaya sebep olduğu kaydedilmiştir. Diğer çalışmada ise hem yaşam süresini hem de sağlıklı yaşam süresini olumlu etkilediği sonucuna ulaşıldığı belirtilmiştir [21]. Tüm bu çalışmalara göre kalori kısıtlamasının organizmaların

ortalama yaşam sürelerini ve/veya maksimum yaşam sürelerini uzattığı, yaşlanmayı geciktirdiği tezine ulaşılır. Bununla birlikte sadece enerji alımındaki azalmanın değil, diyet bileşenlerinin ve kısıtlamanın periyotlar halinde uygulanmasının yaşlanma üzerinde bu etkinin ortaya çıkmasına katkı sağladığı eklenmiştir. Yaşa bağlı olarak değişiklik gözlenen bazı biyolojik süreçlerde (insülin direncinin gelişimi, bağışıklık direncinin azalması, nöronlardaki değişiklikler vb.) bu değişikliklerin gözlenme durumunun azalması ve yine yaşa bağlı hastalıkların (birçok kanser türü, böbrek hastalıkları vb.) ortaya çıkmasının ve görülme sıklığının azalması, yaşlanma ve yaşam süresi üzerine etkinin ana motivasyonu olarak söylenebilir. Bununla birlikte, bu etkinin moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Yine de insülin ve insülin benzeri sinyalleşme yolları ile glikoz sinyalleşme yollarının kalori kısıtlanmasıyla aşağı yönde düzenlenmesinin yaşam süresini etkilediği hipotezi yaygın kabul gören bir görüştür [22].

Kalori kısıtlaması, canlıların fizyolojisini pek çok yönden etkilediğine dair birçok kanıt mevcuttur. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun ve zararlarının azalması bu etkilerden biri olarak bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, kalori kısıtlamasının bağırsakta yağ emilimini değiştirdiği ve bunun sonucunda artan vitamin A emiliminin, oksidatif hasarların düzenlenmesine katkı sağladığı kaydedilmiştir. Yine başka bir çalışmada, sıçanlarda kalori kısıtlamasının radikalleri yok etmede öncü rol üstlenen katalaz enziminin seviyesini seçici olarak arttırdığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, radikallerle mücadele eden bir diğer enzim olan süperoksit dismutazın ifade edilme oranlarını da arttırdığı tespit edilmiştir [23].

İmmün sistem kalori kısıtlaması ile belirgin olarak etkilenen fizyolojik sistemlerden biridir. Lenfoid organların besin eksikliğine hızlı tepki verdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Yetersiz beslenme bağışıklık sistemine ciddi zararlar verirken, yaygın kabule göre yetersiz beslenme olmaksızın uygulanan kalori kısıtlaması immün cevabı olumlu etkiler [24]. Farelerde yapılan çalışmalarda, kalori kısıtlaması uygulamalarının, timüsün yaşlanmaya bağlı dönüşümlerini geciktirdiği, T hücre öncüllerinin sayısını arttırdığı, T hücrelerinin repertuarını koruduğu, sitokinler ile verilen inflamasyon öncesi cevabı güçlendirdiği kaydedilmiştir. Benzer sonuçlara, sineklerde ve insan olmayan primatlarda rastlanmıştır [24].

Kalori kısıtlaması otoimmün hastalıkları baskılar. Otoimmün hastalıklar, bağışıklık sisteminin kendi vücut hücrelerine saldırdığı hastalıklardır. Genetik olarak otoimmün hastalık eğilimli farelerde yapılan bir çalışmada, kalori kısıtlamasıyla enerji alımının azaltılmasından timüs ve diğer lenfoid organların etkilendiği, lenfoid hücre çoğalma oranında açık bir düşüş gözleendiği ve sonuç olarak da otoimmün hastalık oluşmasına gecikme olduğu kaydedilmiştir. Dahası, bu durum çalışılan farelerin ömrünün uzamasını sağlamıştır [25].

Kalori kısıtlamasının kanser üzerine etkisi, yaşlanmaya olan etkisinden sonra en bilinen etkisidir. 1940'larda, Tannenbaum'un [26] diyet sınırlandırılması uygulanmış farelerde kendiliğinden meme tümörü oluşumunun normal beslenenlere göre %50'den daha fazla azaldığını söylediği çalışmalarının etkisiyle, "diyetin sınırlandırılması" olgusu, üzerine odaklanılan bir terim haline gelmiştir. Beslenmeye yapılan müdahalelerin kanser oluşumuna etkisi günümüzde de odaklanılan konuların içerisinde yer alır. Diyetteki yağ tipinin değiştirilmesi beslenmeye yapılan müdahalelerden biridir [27]. Diğerisi ise, çok daha önceleri etkisi araştırılmaya başlanan kalori kısıtlamasıdır. Pek çok çalışmada kalori kısıtlanması ile tümör oluşumunun engellendiğine dair kanıtlar ortaya konmuştur. Dahası, hayvanlarla yapılan çalışmalarda, %20-40 oranında uygulanan kronik kalori kısıtlamasının, tümör oluşumunu %95'e varan oranlarda azalttığı açıkça kaydedilmiştir [28]. Bir başka tanım yapılacak olursa, kalori kısıtlaması obeziteyi engelleyen bir beslenme rejimidir. Obezitenin pek çok kanser türünün oluşmasında güçlü katkıları olduğu bilinir. Bu yüzden, kalori kısıtlamasının bu diğer tanımı, onun kanser oluşumunu engellemedi ki rolünde göz ardı etmemek gerekir. Bununla birlikte, kalori kısıtlamasının çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların kanserleşme üzerine etkilerini de engellediği görülmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada, çeşitli dokularda (deri, meme, karaciğer), çeşitli ajanlar (benzo-a-piren, dietilnitrozamin, radyasyon formları) aracılığı ile indüklenen kanserleşme süreçlerinin, kalori kısıtlaması yapılan bireylerde normal bireylere kıyasla belirli oranda engellendiği sonucuna ulaşılmıştır [29]. Kalori kısıtlamasının kanserleşme süreçlerini engellemede hangi mekanizmaları kullandığı henüz aydınlatılmamıştır. Yine de bu konuda yapılan çalışmalardan ulaşılan tahminlere göre, reaktif oksijen türlerini azaltması, hücre çoğalmasını baskılaması, gen ekspresyonlarını değiştirmesi, inflamasyonu azaltması, apoptozu teşvik etmesi ve immün sistemi güçlendirmesi gibi etkileriyle tümör oluşumunu engellemektedir [30].

Kalori kısıtlamasına yanıt olarak çeşitli metabolik süreçlerde yer alan proteinlerin ekspresyonları düzenlenir. Enerji dengesi, lipogenez/lipoliz, insülin-glukoz regülasyonu ve tokluk bu süreçlerden bazılarıdır. Şüphesiz bunlardan en dikkat çeken, kalori kısıtlamasının tümör oluşumunu engelleme etkisini, enerji homeostasisini düzenleyen moleküllerin regülasyonunu sağlayarak gösterdiği söyleyen kanıtlardır. Bu moleküllere örnek olarak da leptin ve adinopektin molekülleri sunulmuştur [31]. Leptinin tümör oluşumunun engellenmesiyle ilgili olduğunu destekleyen bir çalışmada, MMTV-HER2/Neu transgenik fareleri kullanılmış, aralıklı kalori kısıtlaması ile kombine edilmiş eykosapentonik asit uygulaması yapılmıştır. Sonuç olarak, serumdaki leptin seviyesini bariz bir şekilde düştüğü ve meme tümörü görülme oranının yüksek oranda azaldığı kaydedilmiştir [27]. Bunun dışında yeni keşfedilen ve enerji homeostasisi ile lipid metabolizmasında önemli bir rol oynayan bir peptid hormon olan adropin molekülünün meme kanseri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Farelerde yapılan bu çalışmada, kronik kalori kısıtlaması uygulanmış ve buna bağlı olarak adropin seviyesinde artış gözlenmiştir. Kalori kısıtlamasının etkisiyle artan adropin'in, kanser oluşumunu engellemede kritik öneme sahip olduğu öne sürülmüştür. Bu etki, akut adropin terapisi uygulanan MCF-7 ve MDA-MB231 meme kanseri hücrelerinin çoğalmalarında azalma gözlenmesiyle desteklenmiştir [32].

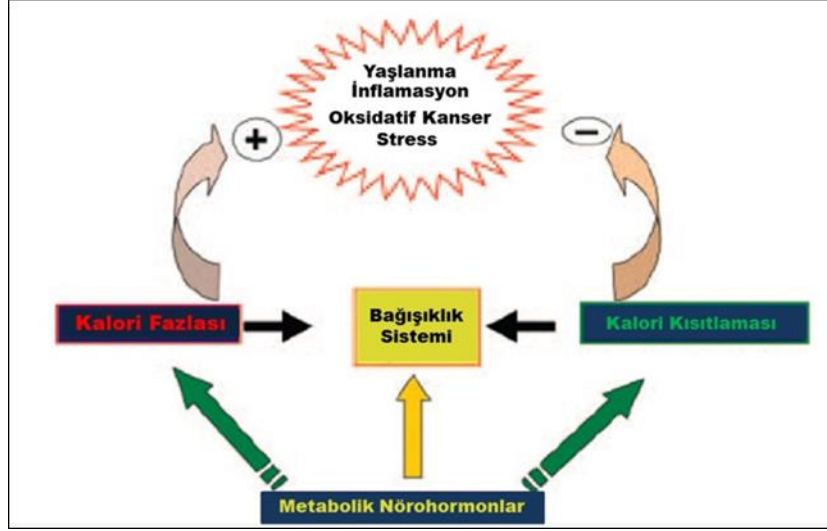
Canlıların herhangi bir kısıtlama olmaksızın besine ve suya ulaşabileceği duruma, ad libitum beslenme denir. Bu tarz beslenme kalori kısıtlama deneylerinde kontrol grubu olarak kullanılır [3]. Kalori kısıtlaması uygulamalarının ise iki temel uygulaması vardır. Bunlardan ilki kronik kalori kısıtlamasıdır (KKK). Bu tür uygulamalarda, uygulama süresince belirli miktar kalori sürekli olarak kısıtlanır. KKK çok kullanılan ve daha fazla bilinen kalori kısıtlaması türüdür. KKK'nın %20-40 oranında uygulandığı kemirgenlerde, meme tümörü oluşumunu %95 oranında azalttığı, pek çok çalışmada kaydedilmiş, iyi derecede bilinen bir etkidir [4]. İkinci tür uygulama ise aralıklı kalori kısıtlamasıdır (AKK). Bu uygulamada, açık ve kapalı kalori kısıtlama dönemleri vardır. Açık dönemde kalori kısıtlaması olurken, kapalı dönemde organizmalar Ad libitum olarak beslenir. AKK, KKK'ya göre daha yeni bir uygulamadır ve daha az çalışılmıştır. AKK'nın kansere etkisi konusunda birbiriyle çelişen sonuçlara ulaşılmıştır. Yüksek oranda yağlı diyetle beslenen ve kimyasal kanserojenlerle muamele edilen sıçanlarda, AKK'nın meme tümörü oluşumunu engellemediğini belirten çalışmalar vardır [12], [24]. Buna rağmen, farelerde ve sıçanlarda kimi AKK uygulamaları meme kanseri

görölme oranını düşürmüştür. Kalori kısıtlaması çalışmalarında iki kalori kısıtlaması uygulamasından hangisinin daha verimli olduğu konusunda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Transgenik hayvan modellerinde yapılan bazı çalışmalarda AKK'nın KKK'ya göre kanser gelişimini engellemek konusunda daha başarılı olduğu kaydedilmiştir [33], [34]. Bunun yanı sıra, bu üstünlüğün saptanmadığı çalışmalarda da mevcuttur [27], [35].

2.2 Beslenme ve Bağışıklık

2.2.1 Beslenme ve Bağışıklık Dengesi

İmmün sistem ve metabolik sistem arasında, çeşitli sinyallerin aracılık ettiğı, birbirinin çalışmasını karşılıklı olarak etkileyen, sıkı bir ilişki vardır. Enerji dengesindeki değişikliklere göre immün cevabın baskılanması veya aktive edilmesi söz konusudur. Enerji dengesi, enerji alımı ve tüketimi arasında oluşan dengedir. Enerji dengesi, obezite ve aşırı kalori alımında pozitif kayarken, kalori kısıtlamasında negatife kayar [8]. İmmün fonksiyonun kemokin ve sitokinlerle düzenlendiğı bilinmektedir. Buna ek olarak immün fonksiyonun düzenlenmesinde, enerji dengesindeki değişimlerle kandaki bulunma miktarları değişen nöro-endokrin moleküllerin (leptin, ghrelin, adinopektin) kritik rol oynadığı tezi, yapılan çalışmalarda her geçen gün güçlenmektedir [36]. Bu konuyla ilgili bir çalışmada, obezite durumunda leptin seviyesindeki artış ve ghrelin seviyesindeki azalmanın direkt olarak immün hücrelerin aktivitesini baskıladığı, kalori kısıtlamasında da bu moleküllerin oranlarının tersine döndüğü, bunun sonucunda immün fonksiyonların güçlendiğı ve yaşam süresinin uzadığı belirtilmiştir [37].



Şekil 2.1 Metabolik sistem ve immün sistem arasındaki ilişkinin şekilsel gösterimi

Kalori alımının aşırı olduğu durumlarda vücutta yağ dokusunun birikmesiyle obezite ortaya çıkar [8]. Son yüzyılda, besin maddeleri ve beslenme alışkanlıklarındaki değişmelerle birlikte obezite, insan sağlığını çeşitli yönlerden etkileyen bir sorun olarak önem kazandı. Obeziteye bağlı olarak, kalp hastalıkları, solunum hastalıkları ve kanser gibi sağlık problemlerinde artış gözlendi ve bu hastalıklara bağlı ölüm oranları belirgin seviyede yükseldi. Çünkü obezite bir kronik inflamasyon durumudur [38]. Kronik inflamasyon, akut inflamasyona benzer belirtiler gösteren, ondan daha uzun süren ve dokularda hasara neden olan, böylece tip 2 diyabet, kanser ve kalp hastalıkları gibi hastalıkları tetikleyen bir durumdur. Artan yağ dokusu ve immün doku arasındaki etkileşimler bu inflamasyona sebep olur. Bu hastalıklar dışında, obez bireylerin enfeksiyonlara karşı duyarlılığının belirgin seviyede arttığı belirtilmiştir. Diyetle indüklenmiş obezite görülen farelerde yapılan bir çalışmada, grip virüsüne bağlı ölüm oranının obez bireylerde 6 kat arttığı bildirilmiştir [39]. Bu, kalori aşımının immün sistem üzerinde negatif bir etkiye yol açtığı kanısına yönlendirir. Bununla birlikte, ob / ob mutant farelerinde, T hücresi ile verilen immün yanıtlarda önemli bozukluklar olduğu ve dendritik hücrelerin antijenleri T hücrelerine sunma yetilerinin azaldığı bilinmektedir. Bir başka çalışmada, obez farelerde inflamasyon cevap öncesi salınan sitokinlerde azalma olduğu, yani spesifik olmayan bağışıklığın düşük düzeyde kaldığı söylenmiştir [39]. Tüm bu göstergeler, immün sistemin obeziteye bağlı değişen bazı metabolik faktörlerden etkilendiği tezinin öne sürülmesini sağlamıştır. Buna aday metabolik faktörlerden biri, adenosin mono fosfat (AMP) molekülünün aktive ettiği bir enzim olan adenosin mono fosfat kinazdır (AMPK). AMPK'nın hücrel bir enerji

sensörü olduğu ve enerji dengesinin değişmesiyle kritik bir rol üstlendiği hipotezi ortaya konulmuştur. Buna göre, kalori kısıtlamasıyla alınan enerji azalır ve AMP'de bir artış gözlenir. AMP, AMPK'yı aktive eder. AMPK, mTOR ve JNK gibi yolları inhibe ederek ve T hücresi reseptörüne bağlanıp T hücresini aktive ederek bağışıklık cevabını düzenler. Obezite durumunda ise tam tersi süreç işler ve bağışıklık baskılanır [40].

Enerji dengesinin pozitif tarafta olduğu obezitenin aksine, kalori kısıtlamasında enerji dengesi negatife kayar. Bunun anlamı, alınan enerjinin tüketilenden daha az olmasıdır. Bu durumda kalori kısıtlaması, NAD⁺/ NAD ve AMP / ATP gibi hücrel substratların oranlarını etkiler ve enerji ile ilgili birçok yolda aşağı yönde değişiklikleri tetikler [41]. Enerji dengesinin negatife kayması immün sistemi birçok yönden güçlendirmektedir. Kalori kısıtlamasının immün cevap üzerindeki etkisini hayvan modelleri kullanarak inceleyen çalışmalarda, kalori kısıtlamasının, T hücrelerini arttırdığı, doğal öldürücü hücre aktivitesine, sitotoksik T lenfosit aktivitesine ve mononükleer hücrelerin inflamasyon öncesi sitokin üretme kabiliyetine olumlu etkileri olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır [39]. Bazı çalışmalarda, kalori kısıtlamasının yaşlı farelerde timosit sayısını iki katına çıkardığı, böylece öncül T hücre sayısını çoğaltarak, kanda dolaşan T hücre sayısında bir artış sağladığı iddia edilmiştir [42]. Primatlarda yapılan bir çalışma, kalori kısıtlamasının, timosit oluşum süreçlerini güçlendirirken, T hücrelerin reseptörlerinin repertuarını çeşitlendirdiği sonuçlarına ulaşıldığını bildirmiştir [24].

2.2.2 Timüs

İmmün sistemin gelişmesinde önemli bir rol oynayan timüs, birincil lenfoid organlardan biridir. Doğumdan önce ve doğumdan sonra kemik iliğinden kökenlenen T lenfositler timüse göçer. Timüs, T hücrelerinin farklılaştığı ve olgunlaştığı son duraktır. T hücreleri lenfositlerin bir alt türüdür ve adaptif bağışıklık sistemi için önemlidir. Tümör hücreleri, enfekte hücreler ve nakil hücreler hedefleri arasındadır. Antijenleri tanıyarak öldürücü etki gösterirler. Yaşla birlikte timüste küçülme gözlenir. Dahası, T hücrelerinin miktarı, repertuarı ve etkinliği azalır [24]. Bu durum, insanı çeşitli enfeksiyonlara karşı açık konuma getirir. Ayrıca yaşlanma ile timüste yağ dokusu oluşumu gözlenir. Böylece renk değiştirir ve sarı renk alır [42]. Farelerin kullanıldığı bir kalori kısıtlaması modelinde, kalori kısıtlamasının timüsün yaşlanmasını geciktirdiği sonucuna ulaşılmıştır. Yaşla birlikte gözlenen adipoz doku oluşumunu, adipogenez yollarını

inhibe ederek engellediği, timüsün korteks ve medullasında epitel doku yapısını koruduğu gözlenmiştir [43]. Timüs ve diğer lenfoid organlar besin eksikliğine birçok organdan daha hızlı tepki verir [1]. Yetersiz beslenme gözlenen çocuklarda immün sistemin gelişmediği ve enfeksiyonlara daha açık oldukları kaydedilmiştir. Bununla birlikte birçok çalışmada, yetersiz beslenme olmaksızın uygulanan kalori kısıtlamasının timüsün fonksiyonlarını güçlendirdiği sonucuna ulaşılmıştır [3]. Farelerde ve insan olmayan primatlarda, kalori kısıtlamasının T hücre fonksiyonunu ve repertuarını koruduğu gözlenmiştir. Doğal T hücrelerinin üretimini ve/veya korunmasını teşvik ettiği kaydedilmiştir [24].

2.3 Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en sık gözlenen ve akciğer kanserinden sonra en yüksek ölüm oranlarına sahip olan kanser türüdür. En önemli risk faktörü yaş ve cinsiyet olmakla birlikte, meme kanserine neden olmasından şüphelenilen birçok faktör vardır. Bunlar, genetik faktörler, obezite, düşük emzirme oranları, yaşam tarzı, bazı hormonal ilaçlar olarak sayılabilir. Bu kanserin gelişimini engellemek ve erken teşhis için birçok araştırmacı tarafından çalışmalar yürütülmektedir. Hastalığın ilerleyen evrelerinde çeşitli fiziksel belirtiler gözükse de tam tanı için moleküler tanının önemi her geçen gün artmaktadır. Erken teşhis ile hastaların %95 oranında iyileşmesi mümkündür [10]. Bununla birlikte insan meme kanseri heterojen bir yapıya sahiptir. Tanı ve tedavide çeşitli parametrelere göre hastalığın seyri ve kökeni belirlenebilir. Bu parametreler, morfolojik değerlendirme, östrojen reseptörü sentezleme durumu, progesteron reseptörü sentezleme durumu, epitel büyüme faktörü sentezleme durumu olarak sayılabilir [44], [45]

2.3.1 MMTV-TGF - α Fare

Fare meme tümörü virüsü (MMTV) - dönüşüm büyüme faktörü-alfa (TGF- α) fareler transgenik canlılardır. Yaşam sürelerinin ikinci yılında meme tümörü oluştururlar. MMTV-TGF- α fareler, meme kanseri araştırmalarında kullanılan hayvan modellerinden biridir [46]. MMTV'nin farelerde bazı meme kanseri tümörlerinin oluşumuna sebep olan bir retrovirüs olduğu tespit edilmiştir [46]. Bu bilgi, gen mühendisliğinde bu virüsün kullanılmasının ilk adımı olmuştur. MMTV virüsü, bir viral vektör olarak farelere aktarılır ve fare ergenliğine ulaştığında östrojene duyarlı olan meme dokusunda

mRNA ifade etmeye başlar. MMTV promotörü içeren bu canlılar, bu promotor sayesinde TGF- α 'nın yüksek seviyede ifadesini sağlar [47]. MMTV'nin kullanıldığı başka model organizmalar da vardır (MMTV-Cox2, MMTV-Neu vb.).

Diğer tüm kanserler gibi meme kanseri de normal işleyen sinyal yollarındaki değişim ve bozulmalar sonucu ortaya çıkar. Meme kanserinde özellikle meme epitelinde epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) uyarıldığı sinyal yolağındaki değişim kanser hücrelerinin çoğalmasında ve yayılmasında önemli rol oynar. Bu yolağı uyarıcı ligand TGF- α 'dır. TGF- α hücre çoğalması, farklılaşması ve gelişimini uyarıcı sinyal yolunu aktive eden bir büyüme faktörüdür. Meme bezinin normal ve neoplastik gelişmesinde temel moleküllerden biridir. TGF- α , epidermal büyüme faktörü (EGF) ile yapısal ve işlevsel olarak benzerdir. Dahası onunla aynı reseptörü, EGFR'yi kullanır. Bununla birlikte TGF- α 'nın etkisi EGF'den daha uzun ve derindir [48]. TGF- α 'nın EGFR'ye bağlanması, EGFR'lerin endojen tirozin kinaz aktivitesini aktive eder ve meme bezinde epitelin büyümesini uyarır [45]. Kanser hücresinde çok sayıda ifade edilen bu reseptör ligand ikilisi, otokrin etkiyle kanser hücrelerinin çoğalmasını uyarır [49]. Kanserlin ölümcül boyutlara ulaşmasını sağlayan metastaz için hücrelerin epitel mezankimal dönüşümlerinin uyarılması da bu ikilinin katkısı ile olur. Yapılan bir çalışmada, bu ikilinin östrojen reseptörü negatif (ER(-)) kanser tipinde, ER(+)'e göre daha fazla sentezlendiği iddia edilmiştir. Bunun aksine bir östrojen türü olan 17 β -estrodiole'ün ER(+) meme kanseri hücre hattı hücrelerinde TGF- α 'nın mRNA ve protein seviyesini 5-10 kat arttırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu durum, meme kanserini oluşturan faktörlerin arasındaki ilişkiyi ve meme kanserinin heterojen yapısını gösterir [50].



Şekil 2.2 TGF- α ve EGF'nin reseptörü ve etkileri

2.3.2 Meme Kanseri İlişkili Genler

Kanser oluşumu temelde iki değişim ile açıklanabilir. Bunlar tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğraması ve proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşmesidir [49]. Genetik faktörler, tüm meme kanseri vakalarının sebepleri arasında %5-10 arasında bir paya sahiptir. Meme kanseri geliştirmede yüksek risk ile ilişkilendirilen temel genler *Brca1* ve *Brca2*'dir [10]. Bunlar tümör baskılayıcı genlerdir ve hücrelerin anormal çoğalmasını engellerler. Bu iki gen dışında mutasyona uğrayıp hastalık oluşturan meme kanserini yönlendiren aday genler mevcuttur. Nadir görülen sendromlara yol açan bu genler, meme kanseri görülme sıklığının bu denli artmasında kritik rol oynarlar. *Akt1*, *Runx1*, *Pten*, *Gata3* bu genlere örnek olarak söylenebilir.

Akt1 geni, AKT1 kinaz proteinini (protein kinaz B) kodlayan ve birçok vücut hücresinde ifade olan bir genidir. Hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasında yer alan kritik sinyal yollarında görev alır. Ayrıca apoptozu kontrol etmeye de yardımcı olur. Bu görevlerini, substratlarını serin ve treonin bölgelerinden fosfatlayarak yerine getirir. AKT1 proteinin fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) tarafından aktivasyonu, apoptoza giden yolların engellenmesini ve hayatta kalma sinyallerinin teşvik edilmesini sağlar [51]. Bu genin tümör oluşumundaki etkisi, MMTV promotörü içeren farelerle yapılan bir deney sonucunda kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, tümör oluşumuyla birlikte *Akt1* geninin ifadesinde hızlı bir artışın olduğu gözlenmiştir. Bu genin, pankreas kanser hücrelerinde ve fibröz doku kanser hücrelerinde metastaza yol açtığı ve metastazla ifadesinin arttığı sonucuna ulaşılmışken, bir çalışmada da meme kanseri üzerinde metastazı engelleyici etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır [52]. *Akt1*'in, eritroblastik onkogen B (ErbB2) tarafından indüklenen meme tümörü oluşumunda kritik bir önemi vardır. ErbB2, epidermal büyüme faktörü reseptörü benzeri bir reseptördür ve meme kanserinde ifade edilmesi %30 oranında artar. Bu reseptör, *Akt1* genini indükler. Böylece hücresel büyümeyi ve terapatik direnci sağlar. Diğer yandan, *Akt1* geninde mutasyonun olmadığı durumlarda meme epiteli kanser hücrelerinin boyut ve çoğalmasında azalmalar gözlenmiştir [53].

Gata3 geni, GATA transkripsiyon faktörü ailesinden olan GATA3 proteinini kodlar. En çok yetişkin timüs dokusu ve yetişkin meme dokularında olmak üzere, bu protein birçok dokuda transkripsiyon faktörü görevini ifa eder [54]. Bunun yanı sıra, bu genin en bilinen görevi yardımcı T hücrelerinin gelişiminin ve farklılaşmasının

düzenlenmesindeki rolüdür. Öne sürülen yeni kanıtlara göre diğer immün hücrelerin gelişimde ve sinyal yollarında da kritik role sahip olduğu söylenmiştir [55]. Dahil olduğu bir diğer önemli süreç, GATA3 proteininin farelerde öncül adipositlerin adipositlere dönüşmesini böylece adipogenezi engellediği yolaktır. *Gata3*'de meydana gelecek bir bozukluğun adipoz dokunun oluşumunun dengesini bozarak obezitenin ortaya çıkmasına neden olabileceği kaydedilmiştir [56]. GATA3 transkripsiyon faktörünün meme lüminal epitelinde en fazla bulunan transkripsiyon faktörü olduğu tahmin edilmektedir [54]. Meme bezlerinin morfolojik gelişiminin, yetişkinlerde ve embriyoda normal olarak ilerlemesini bu gen sağlar. Şöyle ki bu genin mutasyonu lümen tipi meme kanserinin belirteci durumundadır. Dahası tüm meme kanseri vakalarının %10'ununda görüle somatik mutasyonların gözlemlendiği üç genden biridir (diğer ikisi *Tp53* ve *Pik3ca*) [57]. Yapılan bir çalışmada, 111 meme tümörü ve 3 meme tümöründen kökenlenmiş hücre hattının genomik DNA'sının sekanslanarak elde edilen mutasyon analizi sonuçlarına göre, *Gata3* genindeki mutasyonların DNA bağlanma bölgeleri olan, yüksek derecede korunmuş, ikinci çinko-parmak bağlanma bölgesinde kümелendiği gözlenmiştir [58]. Bu mutant GATA3'ün DNA'ya bağlanamayarak transkripsiyon faktörü görevini gerçekleştiremediğini gösterir. Böylece normal hücrelerde gerçekleştirdiği epitel hücrelerin mezenkimal dönüşümünü aktive eden proteinler üzerindeki baskılayıcı rolünü kaybeder. Mezenkimal dönüşümün uyarılmasıyla, hücreler metastaz yapabilme yeteneğine sahip olur. Bununla birlikte, meme tümörlerinde yüksek oranda *Gata3* ekspresyonunu düşük metastaz potansiyeli ile ilişkilendiren kanıtlar mevcuttur. Yapılan başka bir çalışmada, *Gata3*'ün ekspresyonunun östrojen reseptör alfa (*Esr1*) geninin ekspresyonu ile ilişkili olduğu kanıtlarına ulaşılmıştır. Bu iki genin birbirlerini pozitif olarak uyararak birbirlerinin ekspresyonlarını arttırdıkları kaydedilmiştir. Çalışmadaki kanıtlara göre, iki genin yüksek oranda ifadesi "lüminal A" tip tümöre neden olurken, düşük ifade oranı "lüminal B" tip tümöre neden olur [59].

Pten geni, bir tümör baskılayıcı protein olan PTEN'i kodlar. İnsanda en yüksek mutasyon frekansına sahip genlerden biridir. PTEN proteini bir fosfotazdır ve PI3K/AKT1 yolağında fosfotidilinositol 4,5-bifosfatın (PIP2), fosfotidilinositol 3,4,5-trifosfata (PIP3) dönüşmesini engelleyerek aşırı miktarda AKT1 proteini uyarılmasını baskılar. Normal hücrelerde bu işlemle hücrenin G1 evresinde kalmasını sağlayarak apoptozu uyarırken, kanserleşme süreçlerinde bu yol ile tümör oluşumunu baskılamış

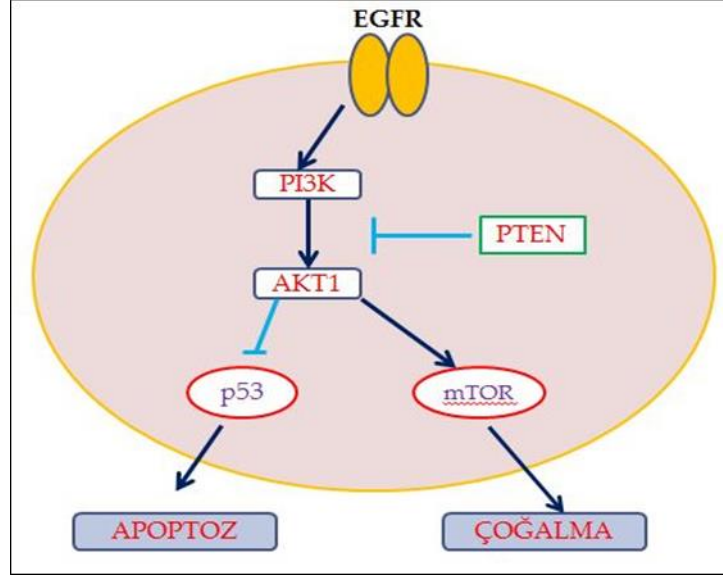
olur [60]. Bununla birlikte, PTEN proteinin konumlandığı bir başka yer çekirdektir ve burada p53 proteinine bağlanarak p53'ün aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar. p53 proteini aracılığıyla hücre döngüsünün durdurulması ve reaktif oksijen türlerinin azaltılması fonksiyonları üzerinden tümör oluşumunun engellenmesi sürecine dahil olur [61]. Birtakım mekanizmalar aracılığıyla (gen lokusundaki heterozigotluk kaybı, gendeki somatik ve germ hattı mutasyonlar, metilasyon ile genin promotorunun susturulması vb.) *Pten*'in ifadesinde değişiklikler olması meme kanserinin başlaması ve ilerlemesiyle doğrudan ilişkilidir [62]. Yapılan bir çalışmada, HER-2'nin (insan epitel büyüme faktörü reseptörü) fazla ekspresyonundan kaynaklı meme kanserinin tedavisinde kullanılan trastuzumab adlı ilacına verilen cevap oranının, *Pten* pozitif hastalarda %70'ken, *Pten* negatif hastalarda %20'den daha az olduğuna ulaşılmıştır. Bu, *Pten* genindeki mutasyonun meme kanserinin iyileşme sürecinde bir dirence neden olduğunu göstermiştir [63].

Runx1 geni, bir transkripsiyon faktörü olan RUNX1 proteinini kodlar. Bu protein çekirdek bağlanma faktörü adı verilen kompleksin alfa alt birimidir. Çoğalma, farklılaşma apoptoz ve hücre bağlantı özelleşmesi gibi çeşitli süreçlerde görev yapar. Runx gen ailesinin 3 üyesinden biri olan *Runx1*, insan meme epitel hücrelerinde baskın olarak ifade edilen üyedir. Meme kanseri vakalarında sürecin önemli bir indikatörüdür. Çünkü bu gen epitel hücrelerin mezenkimal dönüşümlerini engeller. Bunu, E-kaderin proteinlerinin ekspresyonlarını düzenleyerek yaptığı kaydedilmiştir [64]. Kanser ilerleyen süreçlerinde bu genin ifadesinde belirgin derecede düşüş gözlenir. Bu, dönüşüm büyüme faktörleri aracılığı ile mezenkimal dönüşümün uyarılmasının önündeki engelin kalktığını gösterir. Ekspresyon seviyelerinin düşük olduğu bu tarz mutasyonlar ER(+) tipi meme kanserinde çoğunlukla meydana gelir [65]. Bunun tersine üçlü negatif meme kanseri türünde *Runx1* ekspresyon seviyesinde artışın olduğu kaydedilmiştir [64]. Her ikisi içinde *Runx1*'in meme kanserinde tümör oluşumunun teşviki ve tümörün yayılmasını epitel mezenkimal dönüşümü düzenleyerek etkilediği iddia edilmiştir.

Sf3b1 geni, splicing faktör 3b protein kompleksinin alt birim 1'ini oluşturan proteini kodlar. Bu protein, öncül mRNA'nın intronlarının kesilmesi işlemine görev olan bu kompleksin en büyük parçasıdır [44]. RNA'nın işlenmesinde görevli proteinlerde görülen mutasyonlar lenfosittik lösemi ve pankreas kanserlerinde yüksek frekansta görülmesine karşın meme kanserinde daha düşük frekansta gözlenir [66]. Yapılan

sekanslama çalışmalarında, bu mutasyonların yoğun olarak gözlemlendiği genlerden birinin *Sf3b1* geni olduğu tespit edilmiştir. Bu gendeki mutasyonun, ER(+) hastalıklar ve *Akt1* genindeki mutasyonlarla anlamlı derecede ilişkili olduğu iddia edilmiştir. Bir çalışmada, ER(+) meme kanseri gözlenen 77 hastanın tespit edilen 18 önemli mutant geninden biri *Sf3b1* geni olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, ER(+) meme kanseri terapötik süreçlerinde *Sf3b1* genini yeni bir hedef olarak ortaya sunmaktadır [67].

Trp53 geni, bir tümör baskılayıcı gendir ve hücre çekirdeğinde konumlanmış p53 proteinini kodlar. İnsanda *Trp53*'ün ortolog geni olan *Tp53* bulunur [68]. Normal hücrelerde sürekli ifade edilmesine karşın hızla yıkılan bu proteinin seviyesi düşüktür. Ultraviyole ışınlar maruz kalma, kimyasal uyarılara maruz kalma gibi DNA hasarına yol açan çeşitli stres durumlarında ve onkogenik stres durumlarında aktive olur [69]. Buna tepki olarak, hücre tipine göre hücre döngüsünün birçok kontrol noktasında etken proteinleri aktive ederek durdurulması veya hücrenin apoptoza yönelmesi cevapların oluşturulmasını sağlar. Bahsedilen iki temel stres durumunun kanser oluşumuyla önemli derecede ilgi olması, p53 proteinini tümör oluşumunda merkezi bir role oturtur. Dahası, p53 insan kanser tiplerinde en çok mutasyona uğrama frekansına sahip proteindir (~%50) [68]. Kanserleşmiş hücrede p53 hücre döngüsünü durduramaz ve hücreyi apoptoza yönlendiremez. Böylece, kanser hücrelerinde kontrolsüz çoğalma gözlenir. Bu genden yoksun olan farelerin gelişimlerinde herhangi bir anormallik gözlenmez, fakat bunların kendiliğinden tümör oluşturma ihtimali ve kimyasal olarak indüklenme ihtimali çok yüksektir [70]. Bu genin dozunun artırılıp regülasyonunun muhafaza edildiği, fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, normal yaşlanma süreçlerine hızlandırmaksızın DNA zararlarına daha güçlü tepki verildiği ve tümör oluşumuna direnç gösterildiği öne sürülmüştür [69].



Şekil 2.3 *Pten* ve *Trp53* yolakları

2.4 Biyoinformatik

Gelişen teknoloji le birlikte biyoloji ve genetik alanlarında elde edilen bilgideki artış, bu bilgilerin saklanması, yayılıp evrenselleşmesi ve analiz edilmesinde bilgisayarların kullanılmasını zorunlu kılmış, bunun sonucunda da multidisipliner bir bilim olan biyoinformatik ortaya çıkmıştır. İnsan Genom Projesi (HGP), bu bilimin ilerlemesine büyük bir ivme ve heyecan katmıştır Protein ve DNA dizilemesi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen büyük veriler, ilk veri tabanlarını doğurmuştur. Daha sonraki yıllarda, veri tabanları çeşitlenmiş internet erişiminin artmasıyla, yaygınlaşması sağlamıştır. Günümüzde en yaygın kullanılan veri tabanı, birçok farklı veri tabanının da birleşmesine olanak sağlayan “National Center For Biotechnology Information” (NCBI)’dir. İçerisinde gen, protein, SNP, primer gibi çeşitli veri tabanları mevcuttur [71].

Biyolojinin temel kavramlarının, (protein, gen, DNA, RNA) bütüncül ve evrensel bir şekilde ele alınıp, elde edilen bilgilerin biyoinformatik olarak değerlendirilmesiyle, omiks teknolojileri ortaya çıkmıştır. Omiks teknolojisi, gen sekanslarından, protein ekspresyonu modellerinden ve metabolit modellerinden, yüksek verimli ve çok miktarda verinin üretilmesini sağlayan teknolojilerdir. Genomiks, proteomiks, transkriptomiks, metabolomiks gibi türleri vardır. Yüksek teknoloji gerektiren araçlar ve bilgisayarlar kullanılır [72].

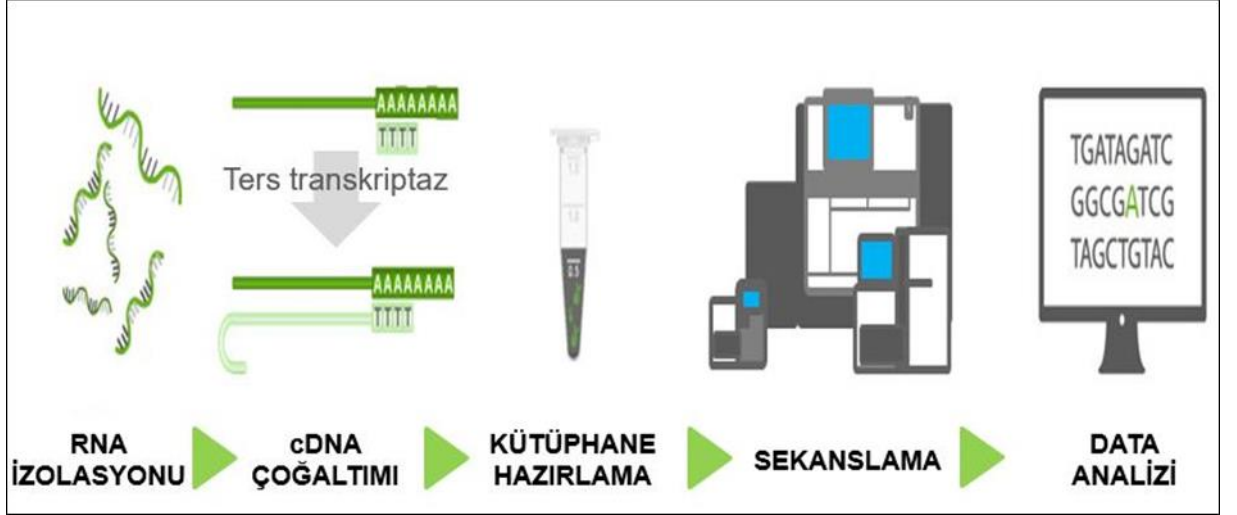
2.4.1 Transkriptom

Genom elemanlarının fonksiyonunun anlaşılması ile hastalık ve gelişim süreçlerinin anlaşılması için, bir hücre veya hücre grubundaki tüm transkriptlerin bilgisine ulaşılması amaçlanan omiks teknolojisidir [72]. Bununla birlikte, sadece mRNA, miRNA, veya kodlanmayan RNA'ların hedef alındığı alt kümeleri de vardır. Herhangi bir zamanda o hücrelerde aktif olan genleri yansıtır. Hücrelerin farklılaşma ve kanserleşme süreçlerini araştırmada kullanılır. Transkriptom çalışmalarında yüksek verimli sonuçların alındığı iki temel uygulama vardır: 1- Microarray 2-RNA-seq. Mikroarray, hibritleşme reaksiyonuna dayalı nispeten eski ama hala sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Örnek DNA ile problemler hibritleşir ve ışığa olur. Problemlerin eldesi için ön bir sekans bilgisi gerektirir [73]. Daha güncel ve daha gelişmiş yöntem olarak RNA-seq kullanılır [74].

2.4.1.1 RNA-seq

RNA sekanslama, bir çeşit Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojisi uygulamasıdır. Mikroarray yönteminin gerektirdiği ön dizi bilgisini gerektirmez. Bu yöntemde, aslında direk RNA üzerinden dizileme olmaz. RNA tek zinciri yapısı itibarıyla, DNA'ya göre daha kırılabilir yapıdadır. Bu yüzden dizilemesi daha zordur. Fakat onu cDNA'ya çevirerek dizilememiz mümkündür. RNA sekanslamaya başlamadan önce kullanılacak RNA'nın kalitesi kontrol edilmelidir. Bunun için, izole edilen RNA'nın, RNA bütünlük sayısı (RIN) ölçülmelidir. Bu değer, 1 ile 10 arasında numaralandırılır ve 10 en saf RNA'yı temsil eder. RNA sekanslama, SNP'lerin tespitini, mutasyon tespitini, alternatif uçbirleştirme tespitini, post-translasyonel modifikasyon tespitini, ekson sınırlarının belirlenmesini sağlar. Ayrıca farklı kantitatif ölçümler gerçekleştirilerek, ekspresyon oranlarının farklı uygulama ve gruplara göre tespitinde kullanılır. Örneğin bir ilacın farklı dozlarının bir canlıya etkisinin araştırılmasında veya beslenme kısıtlamasının genler üzerindeki etkisinin araştırılmasında, ekspresyon seviyelerinin ölçülmesini sağlayarak analiz yapmaya imkan sunar [75].

RNA dizileme 3 temel aşamadan oluşur. 1-Kütüphane hazırlama 2- Sekanslama 3- Data analizi. Bu çalışmada kullanılan RNA-seq verileri, Illumina HiSeq 400 sistemi kullanılarak elde edilmiştir. Bu kısımda, temel aşamalar bu sisteme göre anlatılacaktır.



Şekil 2.4 RNA-seq aşamaları

Kütüphane Hazırlanması

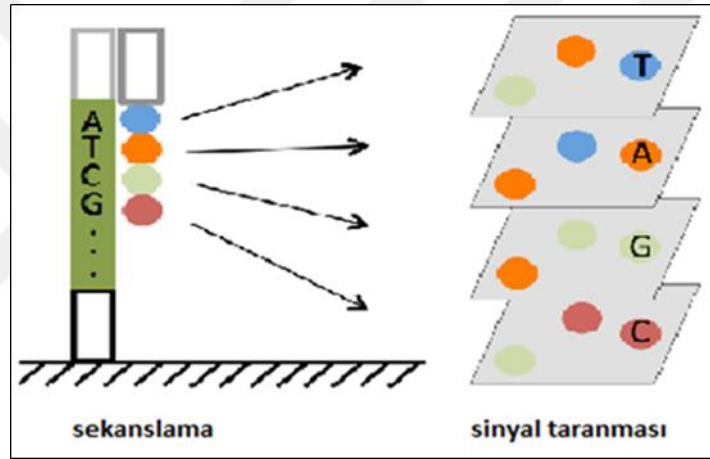
İzolasyondan sonra ilk aşama kütüphane hazırlamaktır ve kullanılacak RNA'nın türüne göre, kullanılacak platforma göre çeşitli metotlar yapılır. Bu işlemin akış sırası şu şekilde özetlenebilir: RNA moleküllerinin izole edilmesi, RNA'nın cDNA'ya ters-transkripsiyonu, rastgele primerle cDNA moleküllerinin çoğaltılması veya fragmentler oluşturulması, dizileme adaptörlerine bağlanması [76].

Kütüphane oluşturmaya başlamadan önce total RNA içerisinde, dizilerin okunmasında sorun çıkartacak olan ve hücrelerde çok miktarda bulunan RNA'lar (en çok bulunan ribozomal RNA vb.) seçici olarak ayrılmalıdır. Bunun için, mRNA'nın çoğaltılması ve seçilmesini sağlayan, mRNA'nın poli A kuyruğuna kovalent bağlanan oligo T dizileri kullanıldığı gibi, rRNA'yı uzaklaştıran ticari kitlerde kullanılabilir. Çalışmanın amacı, hangisinin kullanılacağını belirler [76].

Elde edilen RNA, cDNA'ya çevrilir. Sekanslama makinasına uygun olabilmesi için RNA'nın öncelikle fragmentasyonu ve büyüklük seçimi yapılması gerekir. Fragmentasyon için enzimler veya sonikasyon kullanılabilir. Büyüklük seçiminde küçük fragmentler elenir. Büyük ve sıkı bağlanmış olanlar seçilir. Genelde fragmentlerin uzunlukları 200-250 nükleotid arasında değişir. Elde edilen fragmentler rastgele primerler aracılığıyla ve reverse transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrilir. Daha sonra adaptör oligomerleri takılır, bunlar amplifikasyonu ve sekanslama için gereklidir. Farklı amplifikasyon yöntemleri ile katı yüzeye tutulu örnekler çoğaltılır. Daha sonra tek zincirli hale getirilip dizileme için uygun form elde edilmiş olur [76].

Sekanslama

Farklı platformlara ait farklı sekanslama stratejileri vardır. Bu stratejilerden en bilenenleri piro-sekanslama (Roche 454 sistemi), sentez bazlı sekanslama (Illumina) ve ligasyon bağlı sekanslamadır (SOLiD sistem). Bu çalışmada kullanılan RNA-seq dataları, Illumina HiSeq 400 sistemi kullanılarak elde edilmiştir. Bu sistemde her bir nükleotid farklı bir floresans boya ile bağlı bulunur ve sabit yüzeyde çoğaltılmış olan fragmentlerin üzerine eklenir. Yani toplamda dört farklı renkte floresans boya mevcuttur. Sonuç olarak uygun nükleotid bağlanırsa sentez gerçekleşir ve bağlı olan floresans ışımı yapar. Daha sonra 3 uçtaki sonlandırıcı ortadan kaldırılır ve yeni döngüye geçilir. Örneğin tamamını sekanslayana kadar döngüler devam eder. Bu tarz dizilmeye sıklık geri dönüşümlü dizileme denir [75].



Şekil 2.5 Sekanslama ve sinyal okunmasının şekilsel gösterimi

Data Analizi

Bu aşama dizilemenin en karmaşık kısmıdır. Yüksek verimli sonuçlar için elde edilen ham veriler oldukça fazladır. Biyoinformatik araçlarla optimize edilir ve daha uygun hale getirilir. Dizileme yaklaşık 100-200 baz uzunluğundaki küçük parçalar üzerinden yapıldığı için bunların birleştirilmesi gerekir. Bunun için dizisi kesin olarak bilinen referans genomlar kullanılarak haritalama yapılır. Sıralanan küçük okuma parçalarının kontik adı verilen birbirleriyle benzer kısımları üzerinden küçük parçalar birleştirilir ve bir harita oluşturulup bütüne ulaşılır [77]. En uygun hizalamayı bulmak için dinamik programlama algoritmaları kullanılır. Eğer referans genom kullanılmayacaksa de novo olarak haritalama yapılır. Dizileme ile gen ekspresyon ölçümü, transkriptlerin

birleştirilme aşamasında her lokus için eşleşen okuma sayısının hesaplanmasıyla yapılır [77].

Birçok çalışmada temel amaç olan farklı oranda ekspresse olan genlerin (DEGs) analiziyle, değişen koşula göre neyin yanlış gittiğini, neyin farklılaştığını göstermektir. Ayrıca bu genlerin tespitiyle, genlerin farklı kategorilerde sınıflandırılması ve böylece ifadesi değişen genlerin hangi sistemler üzerinde etkin rol oynadığının geniş bir açıdan görülmesi sağlanır. Bu kategorizasyon için gen ontoloji (GO) analizi kullanılır [77].

DEG Analizi

Farklı oranda ekspresse olan genler (DEGs), iki ya da daha fazla farklı koşul, zaman veya yerde, ifade edilme oranlarında değişiklik gözlenen genler için kullanılan terimdir. Gen ekspresyon seviyesindeki bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı olmalıdır. DEGs'in belirlenmesi ve analizi, kanserleşme gibi biyolojik süreçlerde, ilaçların etkilerini inceleyen çalışmalarda ve dokuların gen profillerinin oluşturulmasında kullanılan önemli bir başlangıç noktasıdır. Teorik olarak bir dokuda kanser gözlemlendiğinde o dokuda ifade olan genlerde de farklılaşmalar olmalıdır. O dokuda ifadesi değişen genlerin tümü DEGs'i oluşturur [75] Günümüzde birçok çalışmada, Microarray ve RNA-seq gibi transkriptom analizleriyle, DEGs belirlenir. Transgenik farelerde kalori kısıtlamasının gen ifadesindeki değişikliklerini araştıran bir çalışmada, RNA-seq ile elde edilen veriler sonucunda, KKK uygulanmış bireylerle AKK uygulanmış bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı 445 DEGs tespit edilmiştir. Bu, kalori kısıtlamasının iki farklı türünün gen ifadesinde önemli derecede değişikliğe neden olduğunu gösteren bir sonuçtur [3]. DEGs'in belirlenmesinden sonra bu veriyi daha da anlamlandırmak için genin işlev ve mekanizmasını tanımlayan analizler yapılır.

Gen Ontolojisi Analizi

Gen Ontolojisi (GO), gen ve gen ürünlerinin biyolojik anlamlarının bütün canlı türleri için kapsamlı bir şekilde ele alıp daha iyi tanımlanabilmesi amacıyla oluşturulan bir isimlendirme kataloğudur. İsimlendirmeye evrensel bir standart getirmesi açısından önemlidir. Üç farklı alanda isimlendirme yapılır. Genin ne yaptığı bilgisi için "moleküler fonksiyon", ne amaçla yaptığı bilgisi için "biyolojik süreç", nerede yaptığı bilgisi için "hücresel bileşen" adlı kategoriler oluşturulmuştur [78]. Bu üç anatasyonun her bileşeninin kendine özel bir GO numarası (GO ID) bulunmaktadır. Örneğin, biyolojik süreçler anatasyonunda, lenfosit aracılığıyla bağışıklığın düzenlenmesi için

GO ID: GO:0002706 olarak kullanılır. Her anatasyonun altında, hiyerarşik şekilde oluşturulan daha spesifik alt anatasyonlar vardır. Aşağı gidildikçe temsil edilen gen sayısı da buna bağlı olarak azalır [78].



Şekil 2.6 GO:0002706 numaralı, lenfosit aracılığıyla bağışıklığın düzenlenmesinin, biyolojik süreç anatasyon ağacında gösterimi

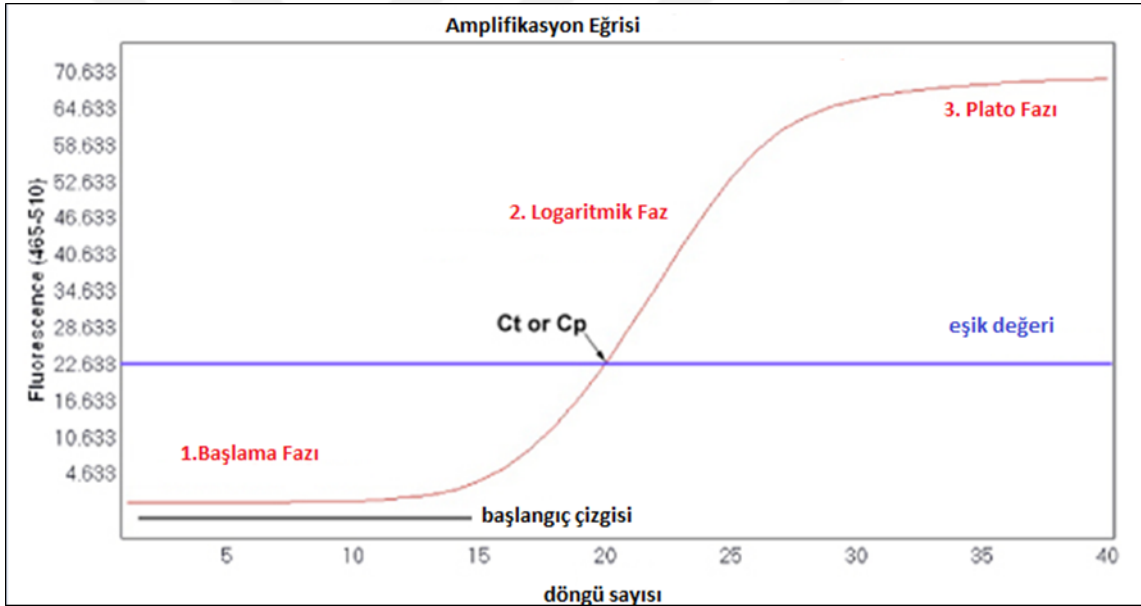
2.5 Gerçek Zamanlı PCR

Polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR), belirlenen dizilerin ya da tüm genomun çoğaltılması için kullanılır. Reaksiyon üç aşamanın döngüsü şeklindedir. İlk olarak denatürasyon ile zincirler ayrılır. Tavlama aşamasında primerler bu zincirlere tutunur ve uzama aşamasında bu primerlerin yardımıyla ikinci zincir uzar. Bu döngü 25-35 defa tekrarlanır. Özelleşmiş bir türü olan Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR), PCR çoğaltımını görünür hale getirir. Bu amaçla floresan işaretli prob ve boyalar kullanılır. Floresan ışıma, oluşan DNA ile doğru orantılı olarak artar. Q-PCR, gerçek zamanlı miktar tayini için en sık kullanılan yöntemlerden biridir [79]. Dahası birçok transkriptom analizi çalışmasında validasyonu yöntemi olarak kullanılır. Örneğin bir çalışmada, farelerde metastaz öncesi niş oluşumu ve metastaza giden süreçleri incelemek amacıyla, meme ve akciğer kanseri hücre-hattından elde edilen RNA'ya, RNA-seq ile transkriptom analizi yapılmış, daha sonra elde edilen veriler Q-PCR ile valide edilmiştir [80].

Q-PCR'da tercih edilen en temel beş saptama yöntemi şunlardır: Hidroliz probu yöntemi (klasik TaqMan sistemi), DNA ile birleşen boyaların, hibridizasyon probu yöntemi, moleküler boncuk yöntemi, "scorpion primeri" kullanımı. Bu yöntemlerden, DNA ile birleşen boyaların haricindekiler çoğaltacakları bölgeye özgüdürler. DNA'ya bağlanan boyalar ise özgül olmayarak herhangi çift zincirli DNA ile güçlü şekilde

bağlanarak kompleks oluşturur. SYBR Green, DNA ile birleşen boyalardan biridir ve yeşil ışık yayar [17].

Q-PCR, üç aşamanın kombinasyonu ile oluşmuştur. 1. Aşamada mRNA, viral orjinli bir ters transkriptaz ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilir. 2. aşamada elde edilen cDNA'nın amplifikasyonu olur. 3. Aşamada ise ürünlerin tespiti ve sayılması olur. Bununla birlikte, bu PCR süresince 3 ayrı faz görülür. İlk olarak birkaç döngü süren ve saptanabilir oranda ürünün oluşmadığı arka plan fazı vardır. Daha sonra, logaritmik fazda ürün miktarı üslü şekilde artar. Son olarak, ekspanensiyel çoğalım olmayan reaksiyon ortamındaki enzim, primer ve nükleotidlerin tükendiği plato fazı gerçekleşir. Geleneksel PCR'ın aksine ölçüm plato fazından sonra değil, logaritmik faza göre yapılır. Böylece inhibitör miktarından, reaksiyon koşullarından ve amplifikasyon etkinliğinden daha az etkilenilir [17].



Şekil 2.7 Gerçek Zamanlı PCR fazları ve amplifikasyon eğrisi grafiği

Logaritmik fazdaki çoğalmanın ifade edilmesinde (2.1) kullanılır.

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

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

logaritmik fazı kolayca tespit edilir. Q-PCR için bir diğer önemli değer eşik değeridir. Her çoğalmanın başlangıçtaki hedef dizi sayısı farklıdır. Reaksiyon boyunca diziler çoğalır ve her çoğalmanın eşit sayıda ürün içerdiği döngü, reaksiyonun eşik değerinin ifade eder. Buradan şu sonuca ulaşılır. İlk başta az sayıda hedef içerenlerin eşik değere ulaşması için daha fazla döngü gerekir. Eşik değer logaritmik fazın başladığı ve doğrusal bir artışın gözlemlendiği en düşük floresan değeri olarak tanımlanır [81].

Q-PCR’da miktarı bilinen “housekeeping genler” standart olarak kullanılır. Bu genler bir organizmanın her hücresinde ifade olan ve temel hücre fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli olan genlerdir. Pek çok çalışmada, *Gapdh* geni standart olarak kullanılır. Bu, hücrede her zaman belirli bir miktarda sentezlenen bir glikoliz enzimidir. Bunun dışında, albümin ve β -aktinin genleri referans gen olarak kullanılan genlere örnektir [81].

MATERYAL VE METHOD

3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan Hayvan Materyali

Bu çalışmada, MMTV-TGF- α farelerinden elde edilen timüs dokusu kullanılmıştır. Bu farelerin orijinali, Minnesota Üniversitesi Hormel Enstitüsü Tıbbi Araştırma Merkezi'nden Dr. Margot Cleary tarafından, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bir koloni oluşturmak için Dr. Soner Doğan'a bağışlanmıştır. Daha sonra, önceden tanımlanmış yetiştirme protokolü esas alınarak Yeditepe Üniversitesi Hayvan Tesislerinde yetiştirilmiştir. Buna göre, yaşamlarının 10. haftasından itibaren 3 beslenme grubuna (AL, KKK, AKK) ayrılan fareler ve 17 ile 18. haftalarda 49 ile 50. haftalarda ve 80 ile 81. haftalarda kurban edilmiştir. KKK, AL beslenmeden %15 kısıtlama ile olmuştur. AKK, açık periyotta AL beslenmeden %60 kısıtlama ile olmuştur (Çizelge 3.1). Diyet olarak Altromin TPF1414 kullanılmıştır. Bu diyet Kobay A.Ş. (Ankara/ Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Diyetin bileşenleri Çizelge 3.2'de belirtilmiştir. Yetiştirilen farelerden elde edilen timüs dokusu RNA izolasyonuna kadar -80°C'de saklanmıştır.

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

11	12	13	14
KKK / AKK	KKK / AKK	KKK / AKK	KKK / AKK
%85 / %100	%85 / %100	%85 / %100	%85 / %40
15	16	17	18
KKK / AKK	KKK / AKK	KKK / AKK	KKK / AKK
%85 / %100	%85 / %100	%85 / %100	%85 / %40

Çizelge 3.2 Altromin TPF1414 diyetin bileşenleri

Bileşenler	1414 TPF
Nem [%]	11,0
Ham Protein [%]	25,0
Ham lipit [%]	9,0
Ham Lif [%]	2,5
Ham Kül [%]	6,5

3.1.2 Kullanılan Biyoinformatik Veriler

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

3.2 Metot

3.2.1 Genlerin Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılacak genlerin belirlenmesinde IntOGen mutasyon platformu kullanıldı. Bu platforma göre, meme tümörü oluşumunda en çok tekrarlanan mutasyona uğramış genlerden 21 gen seçildi.

3.2.2 RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi

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

1. \$ R

R program diline giriş yapıldı.

2. > library(cummRbund)

Komutu ile R içindeki CummRbund kütüphanesine ulaşıldı.

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

Cuffdiff çıktısından bir CummeRbund veritabanı oluşturuldu.

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

>expressionBarplot(mygene)

İstenilen bir genin farklı verilerdeki ekspresyon seviyesi görüntülendi.

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

3.2.3 RNA İzolasyonu

17./18. haftalarda, 49./50. haftalarda ve 80./81. haftalarda sakrifiye edilen MMTV-TGF- α farelerinden elde edilen timüs dokularından kesilerek 25-30 mg'lık örnekler alındı. Bu

örneklerden RNA izolasyonunda Qiagen RNeasy Mini Kit kullanıldı. İlk olarak örnekler eppendorf tüplere alındı ve liziz tampon çözeltisinin içine 1ml için 10 µL olacak şekilde β-merkaptoetanol eklendi. Daha sonra örneklerin üzerine 300 µL liziz tampon çözeltisi eklendi. Homojenizatör aracılığı ile doku parçalandı. Tüpe 300 µL daha liziz tampon çözeltisi eklendi. 3 dakika maksimum hızda santrifüj edilen örneklerin katmanlı yapı oluşturması sonucunda, süpernatant kısmı yeni bir tüpe alındı, pelet kısmı atıldı. %70'lik etanolden, alınan süpernatant ile eşit hacimde tüpün içerisine eklendi ve pipetajla karışması sağlandı. RNeasy kolonlarının altına 2 mL'lik toplama tüpleri yerleştirilip, her seferinde maksimum 700 µL olacak şekilde kolonlardan örnekler geçirildi. RNeasy kolonlar 8.000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Daha sonra 700 µL RW1 tamponu eklendi ve 15 sn 8.000 x g'de santrifüj edildi. Daha sonra 500 µL RPE tamponu eklenip 15 sn 10.000 x g'de santrifüj edildi. 500 µL RPE tamponu daha eklenip bu sefer 2 dakika 10.000 x g'de santrifüj edildi. RNeasy kolonu 1 dakika boş olarak maksimum hızda santrifüj edildi. 1,5 mL'lik yeni tüp kolonun altına konulup 30 µL RNaz'sız su eklendi ve 1 dakika 10.000 x g'de santrifüj edildi. Son işlem bir kez daha tekrarlandı.

3.2.4 RNA Miktar Tayini

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

3.2.5 RNA Jel Elektroforezi

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

dağılması amaçlandı. Daha sonra jel döküldü ve taraklar yerleştirildi. Donması beklendi. 1X MOPS, tank tamponu olarak kullanıldı. RNA örnekleri yükleme için Çizelge 3.3 esas alınarak hazırlandı.

Çizelge 3.3 Yükleme için RNA Örneklerinin Hazırlanması

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

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

3.2.6 Primer Tasarlama

Bu çalışmada Gerçek Zamanlı PCR'da kullanılacak olan, seçilen altı gene ait ileri ve geri yönlü primer literatürdeki örnekleri incelenerek belirlendi. Belirlenen primerler Triogen Biyoteknoloji (İstanbul) şirketinden temin edildi.

3.2.7 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA sentezi için hazır ticari kitlerden biri olan GeneMark First Strabded Synthesis Kit (SAMscript) kullanıldı. Deney esnasında yapılan işlemler buz üzerinde yapıldı. cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları eşitlendi. Bunun için her örnekten 1 µg RNA içerecek hacimde örnek alındı ve RNaz'sız tüpe aktarıldı. Tüpe, 1 µL random primer ve 13,5 µL distile su eklendi ve 70 °C'de 5 dakika kuru ısı bloğunda inkübe edildi. Daha sonra 3 dakika buzda bekletildi. Bu arada, bir tüpün

içerisinde Çizelge 3.4 esas alınarak 9 örnek için bir karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımdan 5,5 µL alınarak tüplerin içine konuldu ve toplam hacim 20 µL'ye ulaşıldı. 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika ve 72°C'de 5 dakika bekletildi. Hazırlanan cDNA'lar gerçek zamanlı PCR'da kullanılmak üzere -20°C'de derecede saklandı.

Çizelge 3.4 cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve hacimleri

Bileşen	Hacim (µL)
RT tampon (10x)	2
dNTP Karışımı	2
RT enzim	1
RNaz inhibitörü	0,5

3.2.8 Gerçek Zamanlı PCR

cDNA eldesinden sonra Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR) işlemi için de hazır ticari kitlerden biri olan GM SYBR Q-PCR Kit kullanıldı. Deney sırasında yapılan işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. cDNA'lar 1'e 4 oranında distile su ile seyreltilti. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonları için gerekli bileşenler Çizelge 3.5'te belirtilen hacimlerde ve toplam hacim 25 µL olacak şekilde kullanıldı.

Çizelge 3.5 PCR reaksiyonları için gerekli hacmi içeren bileşenler

Bileşen	Hacim
Nükleaz'sız Su	9 µL
GM SYBR Q-PCR Karışım	12,5 µL
Geri Primer	0,25 µL
İleri Primer	0,25 µL
cDNA	3 µL
	Toplam = 25 µL

Hazırlanan karışım Biorad Gerçek Zamanlı PCR cihaza konup Çizelge 3.6'daki şartlarda Gerçek Zamanlı PCR gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6 Q-PCR reaksiyonları için gerekli olan sıcaklık değerleri ve süreler

Sıcaklık (°C)	Süre
95	120 sn
95	20sn
55	30 sn
72	45 sn

40 döngü

Gerçek zamanlı PCR (Q-PCR) reaksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten sonra, C_t değerleri incelenen 3 gen ve GAPDH geninde kat değişimi (fold change) hesaplamak amacıyla kullanıldı. ΔC_t ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplamak için karşılaştırmalı C_t metodu kullanıldı.

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar

4.1.1 Genlerin Belirlenmesi

Genlerin belirlenmesinde IntOGen mutasyon platformu kullanılarak aşağıdaki genler seçildi. Bu seçimde meme kanseri oluşumunda mutasyona oluşumu en çok tekrarlanan kanser yönlendirici genlerin seçilmesine dikkat edildi. Böylece şu genler belirlendi:

**Atm, Trp53, Brca1, Brca2, Pik3ca, Cdh1, Chek2, Pten, Stk11, Gata3, Kmt2c, Map3k1, Ncor1, Map2k4, Akt1, Runx1, Arid1a, Nf1, Sf3b1, Ctcf, Notch1.*

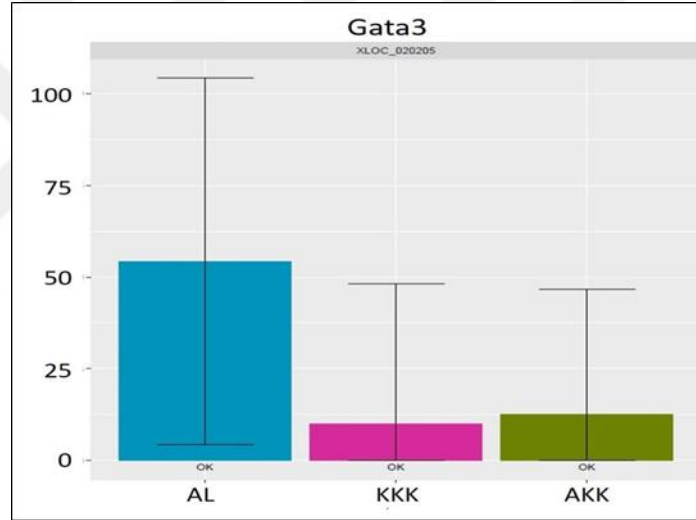
4.1.2 RNA-Seq Datasından Genlerin Analizi Sonuçları

Belirlenen genlerin ifade edilmesindeki değişiklikler, daha önceki çalışmada elde edilmiş RNA-seq datalarından tespit edildi. Bu datalar, belirlenen beslenme grupları için $p < 0,05$ istatistiksel önem derecesinde 6091 adet farklı oranda ifade olan gen (DEG) olduğunu gösterir. Bu genler belirlediğimiz genler için arama havuzu olarak kullanıldı ve seçilen genlerden 6 tanesinin 3 beslenme grubu arasında ifade edilmesindeki değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu genlerin isimleri ve istatistiksel önem dereceleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

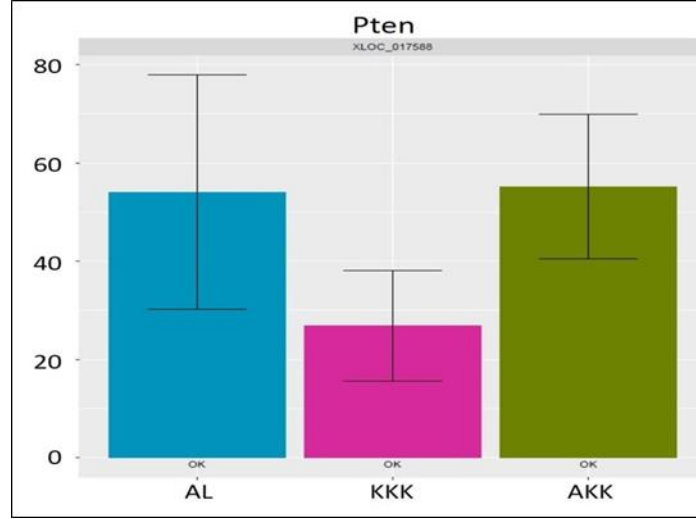
Çizelge 4.1 Beslenme grupları arası ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı olan genler ve p değerleri

GEN	BESLENME GRUBU	p DEĞERİ
<i>Akt1</i>	AL / KKK	0,03390
<i>Trp53</i>	AL / KKK	0,01067
<i>Gata3</i>	AL / KKK	0,04844
	AL / AKK	0,00518
<i>Sf3b1</i>	KKK / AKK	0,02138
<i>Pten</i>	KKK / AKK	0,00167
	AL / KKK	0,00613
<i>Runx1</i>	AL / KKK	0,03537
*p < 0,05		

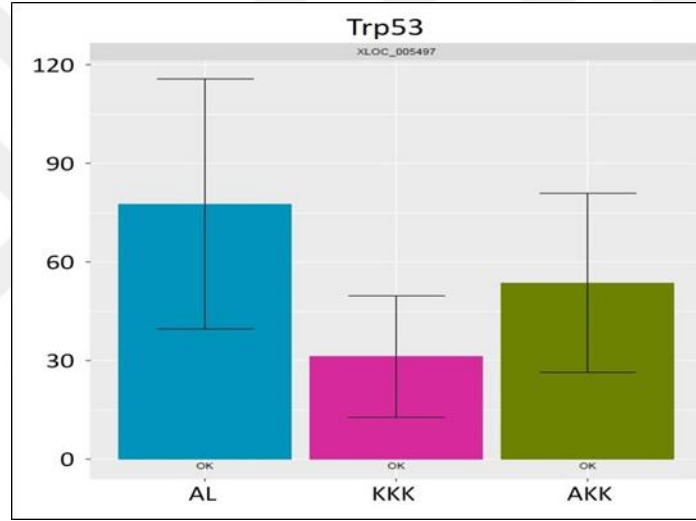
Belirlenen genlerin RNA-seq datasından elde edilen ifade edilme değişiklikleri aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



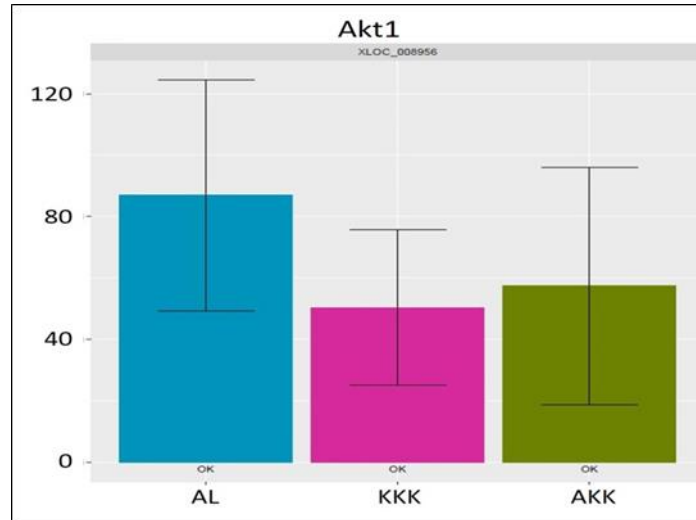
Şekil 4.1 RNA-seq datasından elde edilen, *Gata3* geninin ekspresyon grafiği



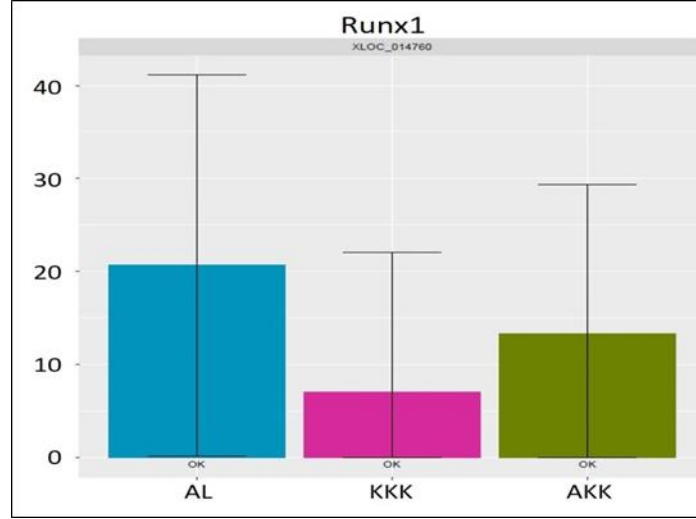
Şekil 4.2 RNA-seq datasından elde edilen, *Pten* geninin ekspresyon grafiği



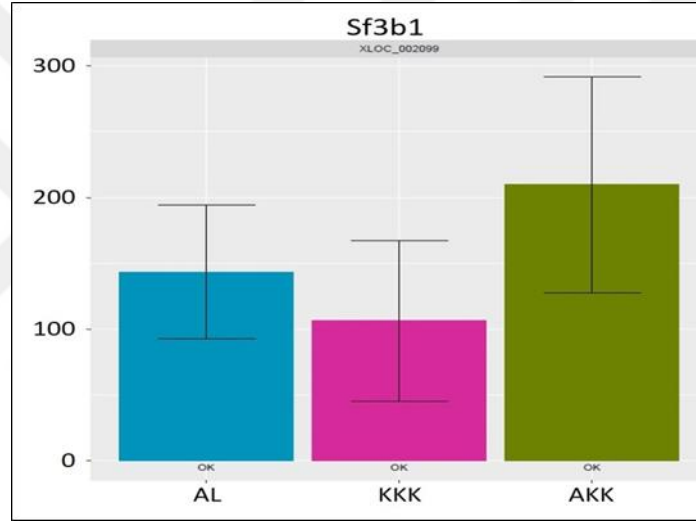
Şekil 4.3 RNA-seq datasından elde edilen, *Trp53* geninin ekspresyon grafiği



Şekil 4.4 RNA-seq datasından elde edilen, *Akt1* geninin ekspresyon grafiği



Şekil 4.5 RNA-seq datasından elde edilen, *Runx1* geninin ekspresyon grafiği



Şekil 4.6 RNA-seq datasından elde edilen, *Sf3b1* geninin ekspresyon grafiği

4.1.3 RNA Miktar Tayini Sonuçları

Timüs dokusu örneklerinden izole edilen RNA'nın miktarı, Nanodrop spektrofotometre yöntemi ile belirlenmiş, şu değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık ölçüm değerleri

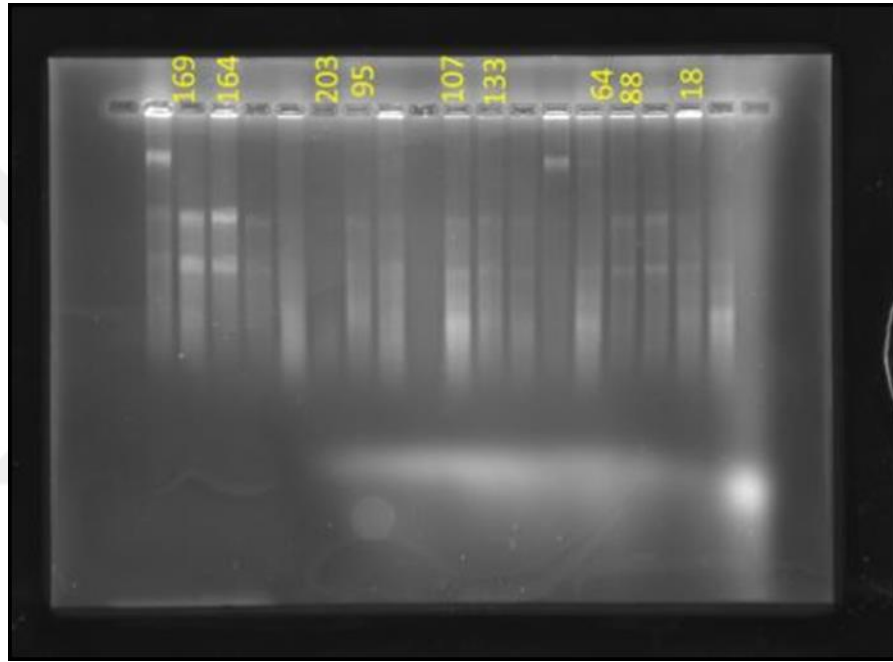
Doku Örneği	Sakrifiye Haftası	Beslenme Grubu	Konsantrasyon	A260/280
T 169	17/18	AL	514,6	2,1
T 164	17/18	KKK	608,3	2,11
T 203	17/18	AKK	311,7	2,11

Çizelge 4.3 İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık ölçüm değerleri (Devamı)

T 95	49/50	AL	243,6	2,09
T 107	49/50	KKK	440,4	2,09
T 133	49/50	AKK	206,4	2,08
T 64	80/81	AL	299,2	2,08
T88	80/81	KKK	262	2,09
T18	80/81	AKK	358,5	2,09

4.1.4 RNA Jel Elektroforezi

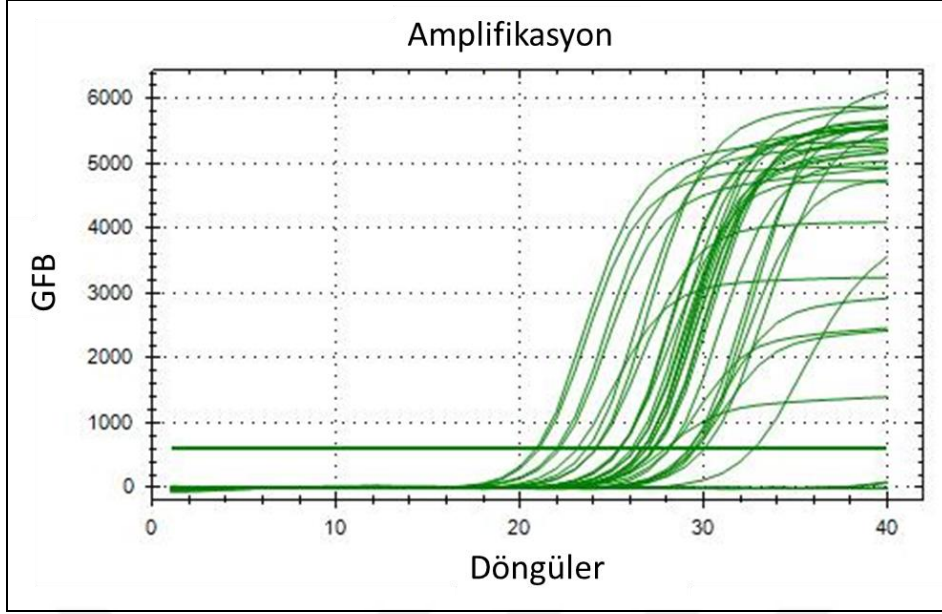
RNA jel elektroforezi sonucunda aşağıdaki jel görüntüsü elde edilmiştir.



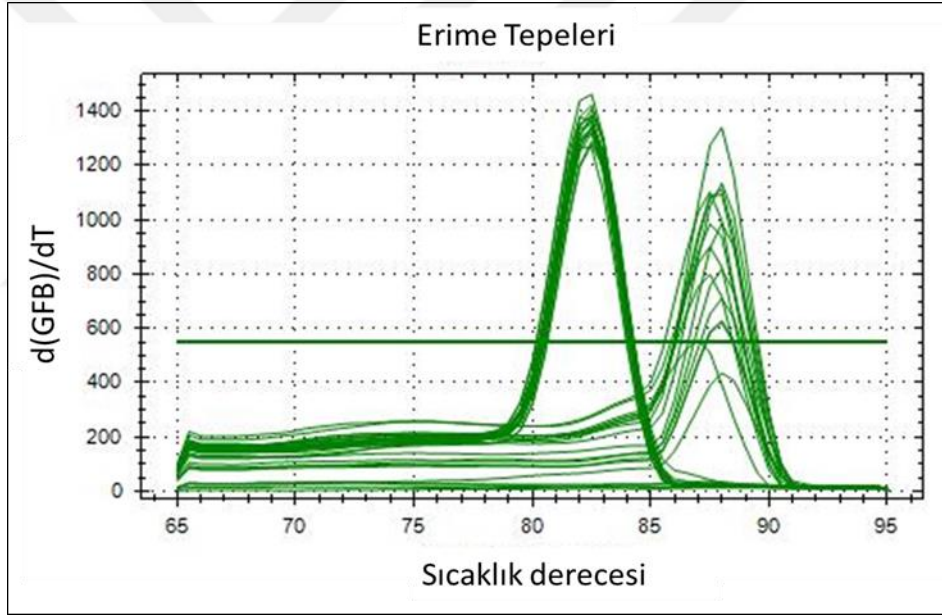
Şekil 4.7 RNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (soldan sağa örnek numaraları 169, 164, 203, 95, 107, 133, 64, 88, 18)

4.1.5 Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

Gerçek Zamanlı PCR sonucunda farklı beslenme grubunda ve farklı haftalarda örneklerde 3 gen için ekspresyon miktarlarındaki kat değişimi değerleri (4.1) kullanılarak hesaplanmıştır. Amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisine örnek olarak *Gata3* ve *Trp53*'e ait grafikler Şekil 4.8 ve 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8 *Gata3* ve *Trp53*'e ait çoğalma eğrisi grafiği



Şekil 4.9 *Gata3* ve *Trp53*'e ait erime eğrisi grafiği

$$\Delta C_t (\text{Kontrol}) = C_t(\text{Kontrol grubu Hedef geni}) - C_t(\text{Kontrol grubu Referans geni})$$

$$\Delta C_t (\text{Deneyisel}) = C_t(\text{Deney grubu Hedef geni}) - C_t(\text{Deney grubu Referans geni})$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deneyisel}) - \Delta C_t(\text{Kontrol})$$

$$2^{-\Delta \Delta C_t} = \text{Kat değişim değeri} \quad (4.1)$$

Gapdh, *Pten*, *Gata3* ve *Trp53* genlerinin ortalama C_t değerleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 *Gapdh*, *Pten*, *Gata3* ve *Trp53* genlerinin ortalama C_t değerleri

Sakrifiye Haftası	18 . Hafta			50. Hafta			81. Hafta		
Beslenme Grubu	AL	KKK	AKK	AL	KKK	AKK	AL	KKK	AKK
Örnek Numarası	169	164	203	95	107	133	64	88	18
<i>Gapdh</i>	19,24	21,88	20,72	23,13	23,14	22,52	19,17	23,12	22,79
<i>Pten</i>	23,22	25,03	27,34	28,40	26,42	28,50	22,78	28,03	27,62
<i>Gata3</i>	24,24		28,72	29,42	32,74	28,79	24,13	29,38	28,05
<i>Trp53</i>	22,09	23,63	26,18	27,27	25,44	26,79	20,97	26,82	26,48

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

Referans gen *Gapdh*, hedef gen *Pten* için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

164 kontrol grubu, 169 deney grubu ise:

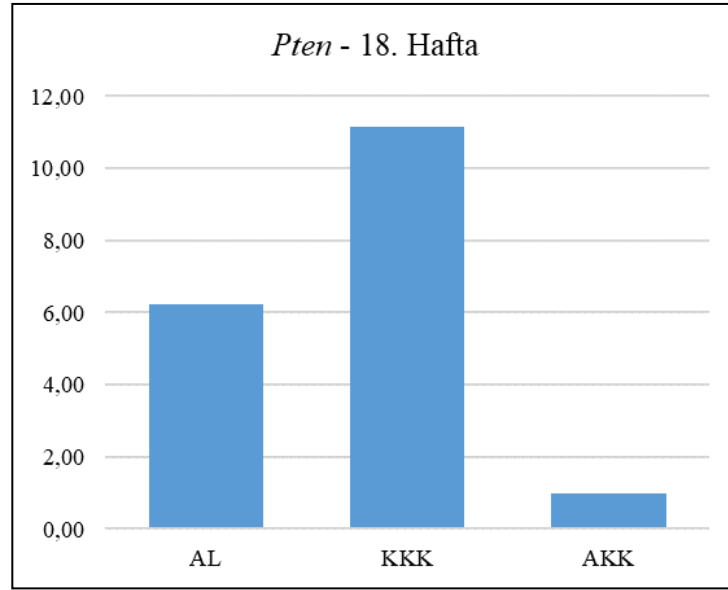
- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 25,03 - 21,88 = 3,15$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 23,22 - 19,24 = 3,98$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0,84$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-0,84} = 0,56$

203 kontrol grubu, 164 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 27,34 - 20,72 = 6,62$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 25,03 - 21,88 = 3,15$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -3,48$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{3,48} = 11,15$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 23,22 - 19,24 = 3,98$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 27,34 - 20,72 = 6,62$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 2,64$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-2,64} = 0,16$

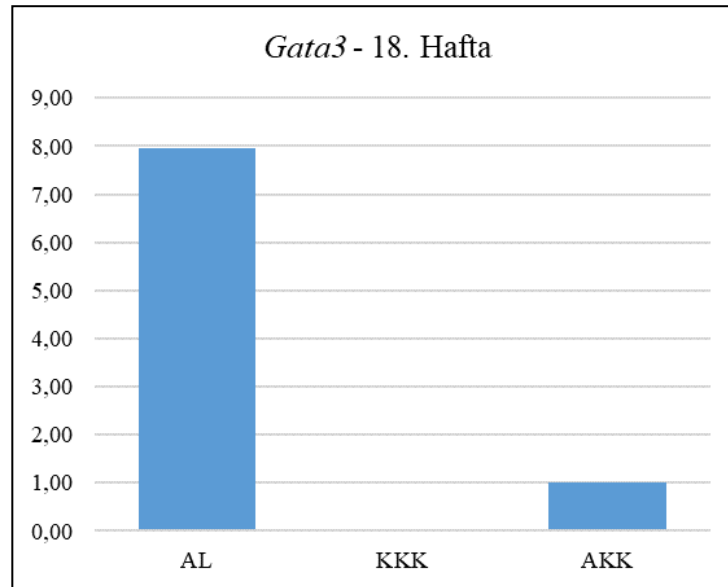


Şekil 4.10 *Pten* için 18. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi

Referans gen *Gapdh*, hedef gen *Gata3* için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 24,24 - 19,24 = 5,00$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 28,72 - 20,72 = 8,00$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 2,99$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-2,99} = 0,13$



Şekil 4.11 *Gata3* için 18. haftada 2 grup arasındaki kat değişimi

Referans gen *Gapdh*, hedef gen *Trp53* için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

164 kontrol grubu, 169 deney grubu ise:

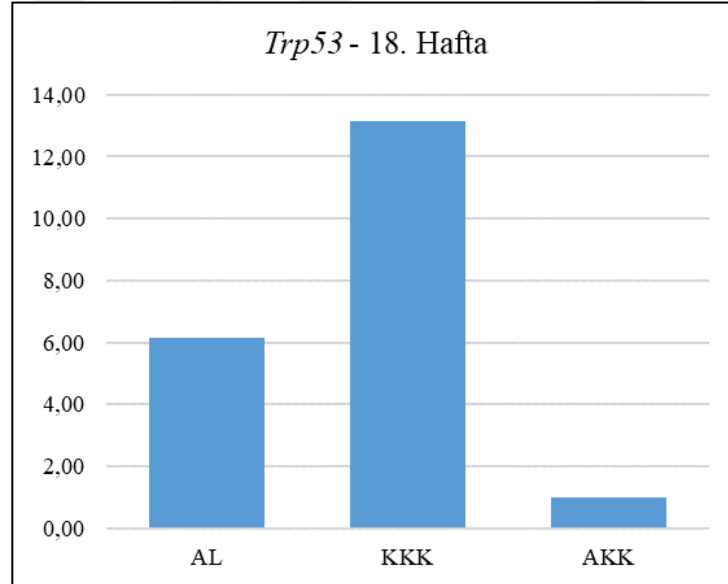
- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 23,63 - 21,88 = 1,75$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 22,09 - 19,24 = 2,85$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 1,10$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-1,10} = 0,47$

203 kontrol grubu, 164 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 26,18 - 20,72 = 5,47$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 23,63 - 21,88 = 1,75$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -3,72$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{3,72} = 13,13$

169 kontrol grubu, 203 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 22,09 - 19,24 = 2,85$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 26,18 - 20,72 = 5,47$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 2,62$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-2,62} = 0,16$



Şekil 4.12 *Trp53* için 18. haftada 3 grup arasındaki kat değışı

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

Referans gen *Gapdh*, hedef gen *Pten* için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

107 kontrol grubu, 95 deney grubu ise:

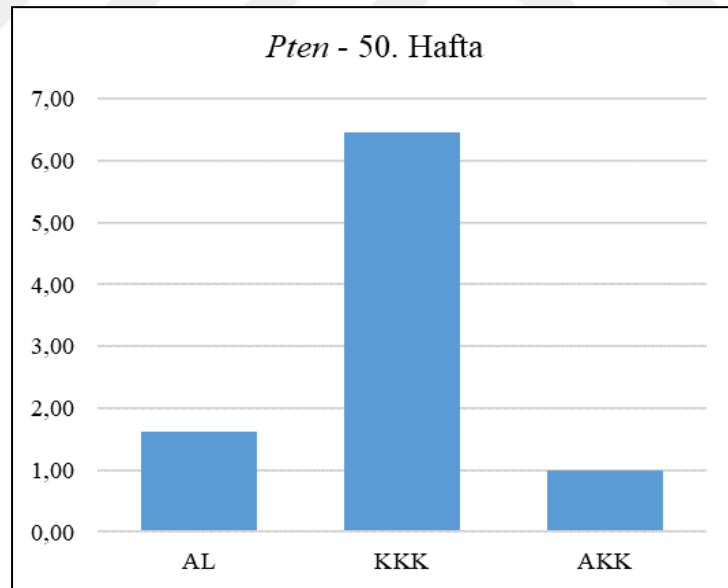
- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 26,42 - 23,14 = 3,28$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 28,40 - 23,13 = 5,27$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 1,99$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-1,99} = 0,25$

133 kontrol grubu, 107 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 28,50 - 22,52 = 5,97$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 26,42 - 23,14 = 3,28$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -2,69$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{2,69} = 6,47$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 28,40 - 23,13 = 5,27$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 28,50 - 22,52 = 5,97$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0,70$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-0,70} = 0,61$



Şekil 4.13 *Pten* için 50. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi

Referans gen *Gapdh*, hedef gen *Gata3* için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

107 kontrol grubu, 95 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 32,74 - 23,14 = 9,60$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 29,42 - 23,13 = 6,29$

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -3,31$

- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{3,31} = 9,89$

133 kontrol grubu, 107 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 28,79 - 22,52 = 6,27$

- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 32,74 - 23,14 = 9,60$

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 3,33$

- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-3,33} = 0,10$

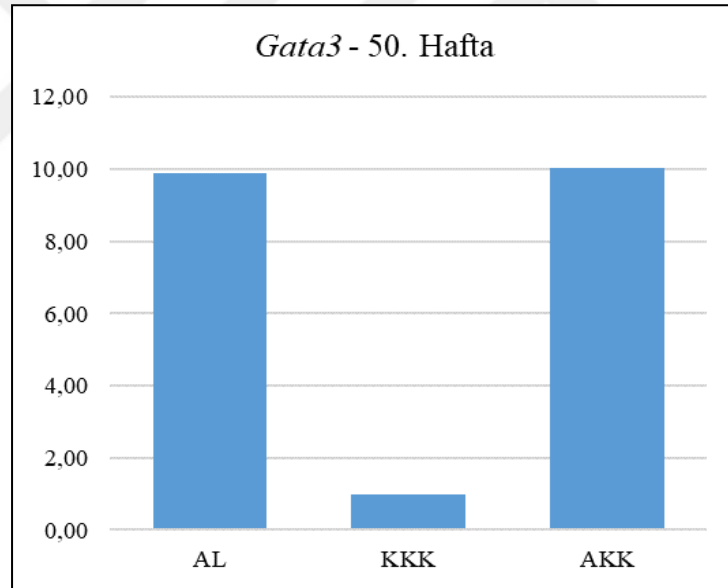
95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 29,42 - 23,13 = 6,29$

- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 28,79 - 22,52 = 6,27$

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -0,02$

- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{0,02} = 1,01$



Şekil 4.14 *Gata3* için 50. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi

Referans gen *Gapdh*, hedef gen *Trp53* için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

107 kontrol grubu, 95 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 25,44 - 23,14 = 2,29$

- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 27,27 - 23,13 = 4,15$

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 1,85$

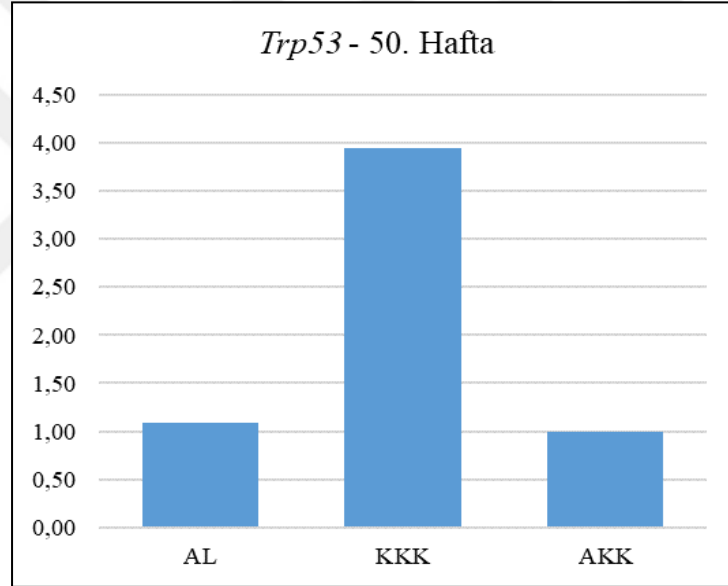
- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-1,85} = 0,28$

133 kontrol grubu, 107 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 26,79 - 22,52 = 4,27$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 25,44 - 23,14 = 2,29$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -1,98$
- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{1,98} = 3,94$

95 kontrol grubu, 133 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 27,27 - 23,13 = 4,15$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 26,79 - 22,52 = 4,27$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0,13$
- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-0,13} = 0,92$



Şekil 4.15 *Trp53* için 50. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi

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

Referans gen *Gapdh*, hedef gen *Pten* için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

88 kontrol grubu, 64 deney grubu ise:

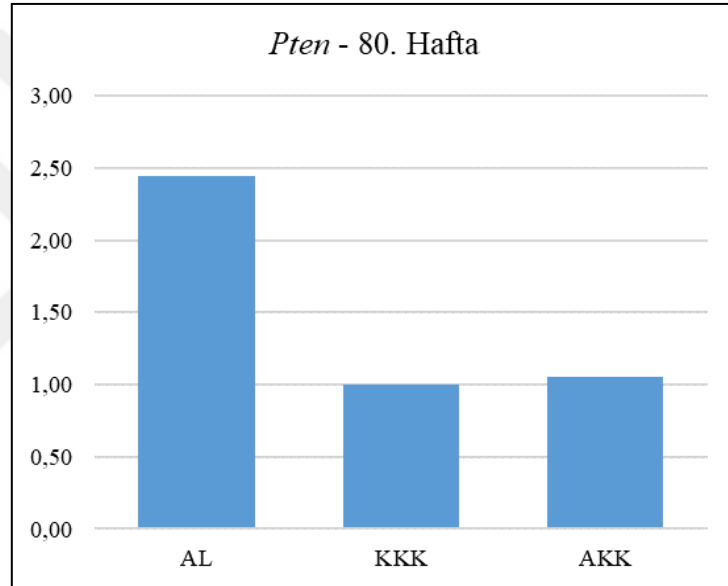
- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 28,03 - 23,12 = 4,90$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 22,78 - 19,17 = 3,61$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -1,29$
- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{1,29} = 2,45$

18 kontrol grubu, 88 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 27,62 - 22,79 = 4,83$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 28,03 - 23,12 = 4,90$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0,07$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-0,07} = 0,95$

64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 22,78 - 19,17 = 3,61$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 27,62 - 22,79 = 4,83$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 1,22$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-1,22} = 0,43$



Şekil 4.16 *Pten* için 80. haftada 3 grup arasındaki kat değışı

Referans gen *Gapdh*, hedef gen *Gata3* için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

88 kontrol grubu, 64 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 29,38 - 23,12 = 6,26$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 24,13 - 19,17 = 4,97$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -1,29$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{1,29} = 2,45$

18 kontrol grubu, 88 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 28,05 - 22,79 = 5,26$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 29,38 - 23,12 = 6,26$

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0,99$

- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-0,99} = 0,50$

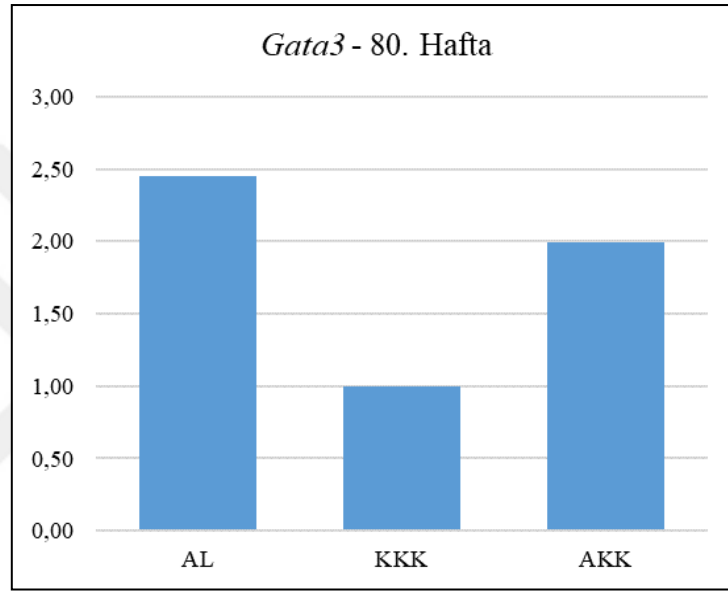
64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 24,13 - 19,17 = 4,97$

- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 28,05 - 22,79 = 5,26$

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0,30$

- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-0,30} = 0,81$



Şekil 4.17 *Gata3* için 80. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi

Referans gen *Gapdh*, hedef gen *Trp53* için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

88 kontrol grubu, 64 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 26,82 - 23,12 = 3,70$

- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 20,97 - 19,17 = 1,80$

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = -1,90$

- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{1,90} = 3,72$

18 kontrol grubu, 88 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 26,48 - 22,79 = 3,69$

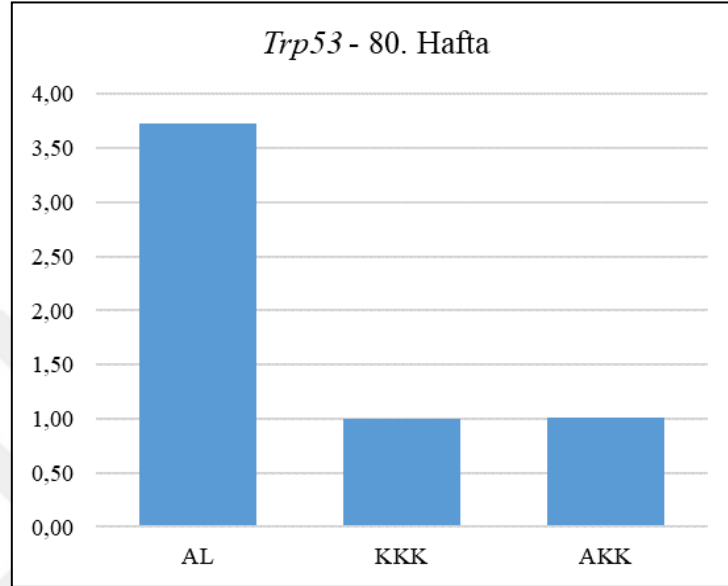
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 26,82 - 23,12 = 3,70$

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 0,01$

- $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-0,01} = 0,99$

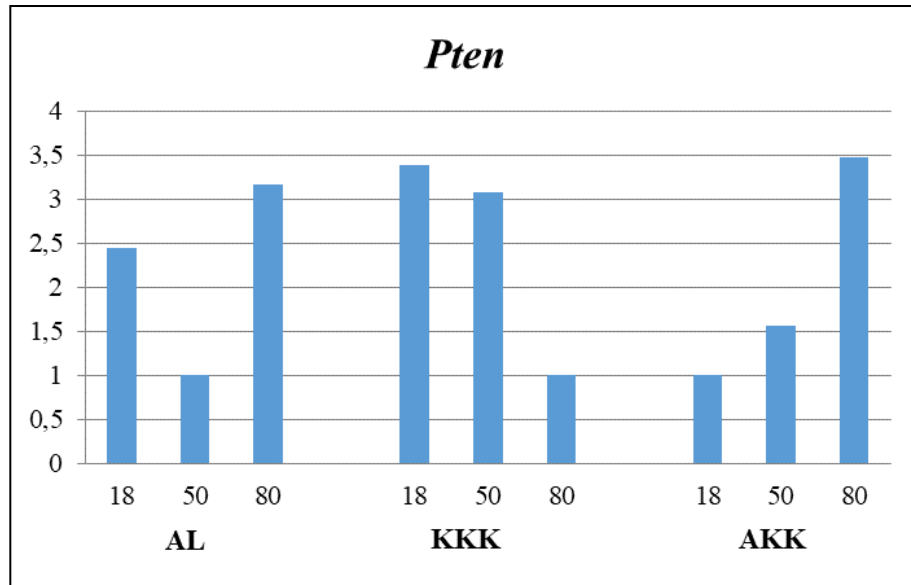
64 kontrol grubu, 18 deney grubu ise:

- $\Delta C_t(\text{Kontrol}) = 20,97 - 19,17 = 1,80$
- $\Delta C_t(\text{Deney}) = 26,48 - 22,79 = 3,69$
- $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol}) = 1,88$
- $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-1,88} = 0,27$

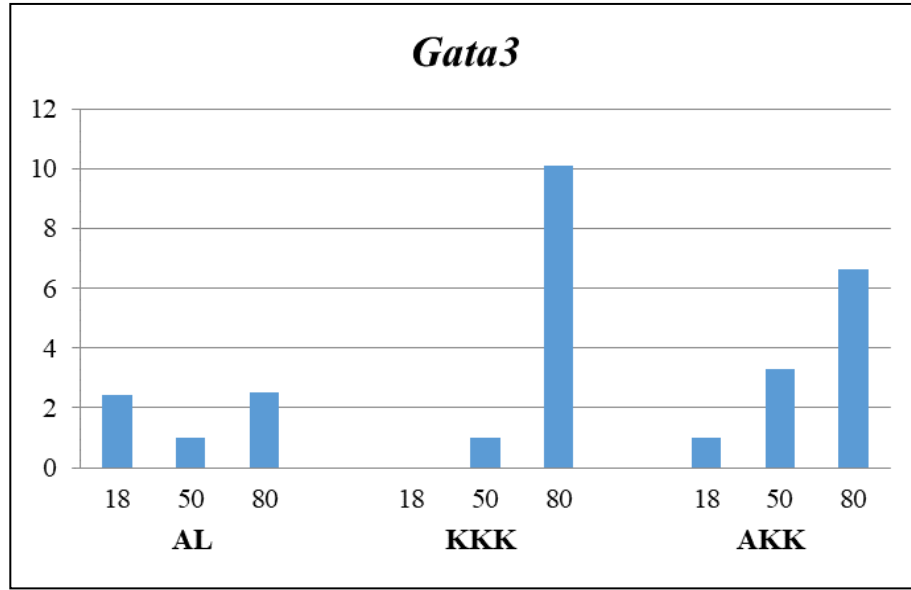


Şekil 4.18 *Trp53* için 80. haftada 3 grup arasındaki kat değişimi

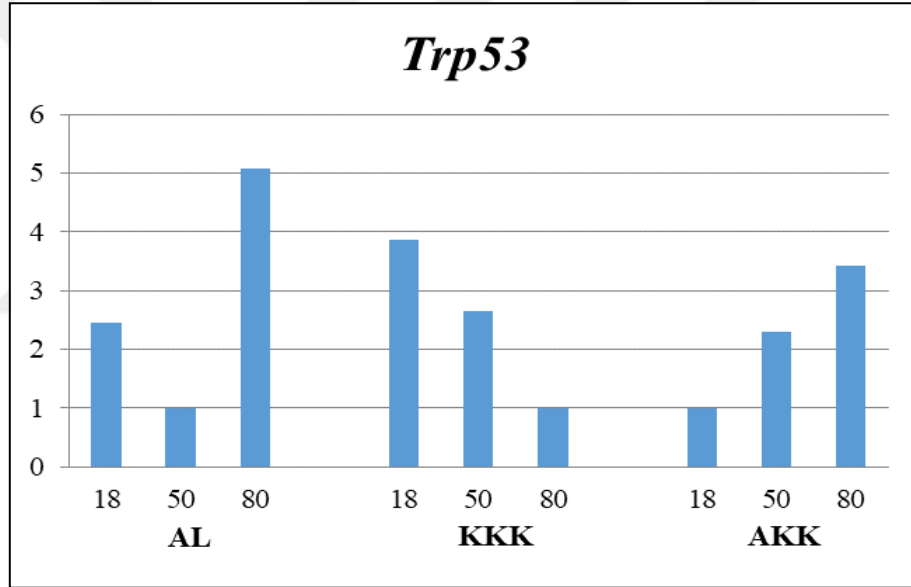
Çizelge 4.3'deki C_t değerleri kullanılarak, 3 gen için 3 farklı beslenme grubunda haftalara göre ekspresyon değerlerindeki değişimler Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19 *Pten* için haftalar arasındaki kat değişimi



Şekil 4.20 *Gata3* için haftalar arasındaki kat değışimi



Şekil 4.21 *Trp53* için haftalar arasındaki kat değışimi

4.2 Tartışma

Meme kanseri, oluşumuna birçok genin dahil olduğu heterojen bir yapıya sahiptir [45]. Yetersiz beslenme olmaksızın alınan kalori miktarının azaltılması olarak bilinen kalori kısıtlamasının, meme kanserini de yüksek oranlarda engellediği bildirilmiştir [82]. Kalori kısıtlamasının, tümör oluşumunu engellemede kullandığı mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bununla birlikte, kalori kısıtlamasının etkilediği bazı süreçlerin tümör oluşumunu engelleme sürecinde rol aldığı tahmin edilmektedir [30], [31], [83].

Bunlardan biri, reaktif oksijen türlerinin azaltılmasını sağlayan bazı yolları uyararak, radikallerin hasarlarının engellenmesidir. Kalori kısıtlanmış farelerde, radikaller molekülleri yok etmekle görevli temel enzimlerden biri olan katalaz enziminin ifade edilmesinin seçici olarak arttığı sonucuna ulaşılmıştır [23].

Kalori kısıtlamasının bir diğer etkisi immün sistem üzerinedir. Kalori kısıtlaması ile immün sistemin güçlendirildiğine dair pek çok kanıt vardır. Timüs ve diğer bağışıklık organlarının besin eksikliğinden güçlü bir şekilde etkilendiği bilinmektedir. Diğer yandan, yetersiz beslenme olmaksızın uygulanan kalori sınırlandırılmasının timüsün yaşlanmasını geciktirdiği, T hücre sayısını attırdığı ve repertuvarını koruduğu belirtilmiştir [39]. Virüslerin bazı kanser türlerine yola açtığı bilinmektedir [46]. T hücrelerin ve onların çeşitliliğinin kanser hücrelerine karşı mücadeledeki önemi de düşünüldüğünde, kalori kısıtlamasıyla bağışıklığın kuvvetlendirilmesi, kanseri engelleyen ve geciktiren süreçlerden biri olarak gösterilir [42].

Kalori kısıtlaması bir diğer bakış açısıyla obezitenin engellemesi olarak tanımlanabilir. Pek çok çalışmada, obezitenin vücutta kronik bir inflamasyona yol açarak kanser başta olmak üzere kalp hastalıkları ve tip 2 diyabet gibi ölümcül sonuçlar doğuran ciddi sağlık problemlerine neden olduğu raporlanmıştır [38]. Obezitenin kansere neden olma faktörleri arasında reaktif oksijen türlerini arttırması ve immün fonksiyonları baskılaması önemli bir yer tutar [8]. Dahası, hücre enerji sensörlerini uyararak hücrelerin çoğalmasını uyaran yolları aktive ettiği de bildirilmiştir [40]. Tüm bu sonuçlarla kalori kısıtlamasının, aşırı kalori alımı durumu olan obeziteye zıt olarak kanserleşme süreçlerini baskıladığı kanısına varılır [29].

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

Bölümümüzde tamamlanan daha önceki bir çalışmada ulaşılan RNA-seq verileri, bu çalışmada referans olarak kullanılmıştır [3]. Bahsi geçen RNA-seq’de kullanılan RNA’lar, bu çalışmada kullanılan farelerle aynı protokolle ve aynı yerde yetiştirilmiş, 17./18. haftalarda sakrifiye edilmiş farelerin timüs dokusundan elde edilmiştir. RNA-seq verilerinde, $p < 0,05$ istatistiksel önem derecesinde toplamda 6091 “farklı oranda ekspresye olmuş gen” tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki dağılımına bakıldığında, 2281 tanesinin AL-KKK arasında, 2825 tanesinin KKK-AKK arasında, 445 tanesinin AL-AKK arasında olduğu görülmüştür. Bu veriler, bu çalışmada tarama havuzu olarak kullanılmıştır [3].

Çalışmada araştırılan meme kanseri ilişkili genlerin tespitinde bir mutasyon platformu olan IntOGen kullanıldı. Buradan seçilen 21 gen, RNA-seq verilerinde tespit edilen DEGs havuzunda arandı. Sonuç olarak 6 tanesinin ifade edilme oranında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik tespit edildi. Buna göre, *Akt1*, *Trp53*, *Gata3*, *Pten* ve *Runx1* genleri için AL-KKK arasında ekspresyon farklılıkları görülmektedir. Yine, *Gata3* geni için AL-AKK arasında, *Sf3b1* ve *Pten* genleri için KKK-AKK arasında ekspresyon farklılıkları görülmektedir (Çizelge 4.1). Bu sonuçlar, kalori kısıtlamasının timüs dokusunda erken evrelerde dahi tümör oluşum süreçlerine dahil olan genlerin ifade edilmesinde önemli değişiklere neden olduğunu göstermiştir. Timüsün besin eksikliğine hızlı cevap veren bir doku olduğu bilindiği için bu beklenen bir sonuçtur [42].

Yapılan Q-PCR sonuçlarında, 18. haftada *Pten* geninin ekspresyonunun KKK beslenmiş farede AL ve AKK beslenmiş farelere göre fazla olduğu sonucuna ulaşıldı (Şekil 4.10). *Pten* hücreleri apoptoza yönlendiren bir tümör baskılayıcı gendir [60]. KKK’nın tümör oluşumunu engellediği literatürde belirtilmiştir [10]. Bu yüzden KKK beslenmiş farenin kalori kısıtlama durumunu bir stres olarak algılayıp kendini koruyucu mekanizmalara yönlendiği söylenebilir. Öte yandan AKK beslenme tipinin de tümör oluşumunu engellediğini gösteren çalışmalar vardır [33]. Buna karşın bu çalışmada bu gen için 18. haftada bu etkiyi göstermediği gözlenmiştir. 50. haftada da beslenme gruplarındaki *Pten* geninin ifade oranları 18. haftadakine benzerlik göstermiştir (Şekil 4.13). Böylece, KKK beslenmenin etkisini hala gösterdiği şeklinde yorumlayabiliriz. Bununla birlikte, 80. haftada KKK ve AKK beslenen farelerde gen ekspresyon seviyesi AL beslenme grubundakilerden düşük kalmıştır (Şekil 4.16). Tümör oluşumunun ilerleyen evrelerde olduğu düşünülen bu haftada KK uygulamalarının tümör oluşumunu engelleme süreçlerine dahil olması beklenirken, ekspresyon seviyelerinin normal beslenmeye göre

düşük gözlenmesi, KK uygulamalarının bu gen için tümör oluşumunu engellemede etki göstermediğini düşündürür. KKK grubundaki farelerin *Pten* ekspresyonları 18. haftadan 80. haftaya doğru azalma göstermiştir (Şekil 4.19). Kanserin ilerleme sürecinde *Pten*'in ekspresyon miktarının azalması beklenir [61]. Bu sonuç, KKK'nın kanserleşme sürecini engelleme de olumlu bir etki göstermediği konusunda kanıt oluşturur. Öte yandan, AKK grubundaki farelerde *Pten* seviyesi 18. haftadan 80. haftaya doğru artış gösterir (Şekil 4.19). Bu, AKK'nın *Pten* ekspresyon seviyesini arttırarak tümör oluşumunu engelleme yolunda önemli bir katkı sunduğunu düşünmemize yol açar. AL grubundaki farelerde ise *Pten* seviyesi 50. haftada kanserleşme sürecinin başlamasıyla beklenen bir düşüş göstermiştir. 80. haftada ise beklenmeyen bir artış göstermiş. *Pten*'in ekspresyonunun tümör oluşumu gözlenirken zamanla azalması bildirilmişken, bu beklenmeyen bir sonuçtur [61]. Bunun sebebi Q-PCR uygulama süreçlerindeki hatalar olabilir. Daha kesin sonuçlar için yeniden primer tasarlanıp daha steril ve optimize şartlarda Q-PCR yapmak gerektiği düşünülmektedir. RNA-seq datasında $p < 0,5$ istatistiksel önem derecesinde KKK ve AKK arasında 0,001 oranında, AL ve KKK arasında 0,006 oranında farklılık tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bununla birlikte, RNA-seq datasında AL ve AKK beslenen farede bu genin ekspresyonu yakın değerlerde iken KKK beslenen farede düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Bu sonuçlar, Q-PCR sonuçlarıyla uyumsuzdur. Deneylerin gözden geçirilip tekrar edilmesi gerekmektedir.

Q-PCR'da ekspresyonuna bakılan diğer bir gen olan *Gata3* geninin 18. hafta için elde edilen sonuçlarında, AL beslenmiş farelerde, AKK beslenmiş farelere göre ekspresyonun oldukça fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.11). *Gata3*'ün timüste yüksek oranda ifade olduğu ve T hücre farklılaşmasında rol aldığı bilinmektedir [54]. Yaşamın erken evrelerinde uygulanan kısıtlamanın gen ekspresyonunda değişime yol açması timüsün besin eksikliğinden hızlı etkilenen bir organ olduğu bilgisiyle örtüşmektedir [42]. 50. haftada ise AL ve AKK beslenmiş farelerde ekspresyon verileri birbirine yakın ve diğer beslenme grubundan fazlayken, KKK beslenmiş farede az miktarda ekspresyon görüldü (Şekil 4.14). Bu sonuca göre, tümör oluşumunun başladığı düşünülen bu zaman diliminde ekspresyon seviyesi artması beklenen *Gata3*'ün KKK ile ekspresyonunun düşmesi bu uygulamanın kanserleşme sürecini engellediği bilgilerini destekler niteliktedir [7]. Bununla birlikte AKK'nın AL beslenme ile aynı seviyelerde gen ekspresyonu göstermesi AKK'nın tümör oluşumunu engellemediğini savunan çalışmalara uygunluk göstermektedir [12]. 80. haftada *Gata3* ekspresyon seviyeleri

AL>AKK>KKK şeklinde ölçüldü (Şekil 4.17). Bu ölçümlere göre, KKK ve AKK gruplarında, AL'ye göre genin ekspresyon seviyesinde bir düşüş olduğu gözükmemektedir. Bu sonuçlar, iki KK uygulamasının da tümör oluşumunu engellediği yönündeki tezi doğrular niteliktedir [7]. Öte yandan, AKK uygulamasında 50. haftada AL ile aynı seviyede ekspresyon gözlenirken 80. haftada AL'den düşük ekspresyon seviyesi gözlenmesi, AKK uygulamasının etkilerini daha uzun zamanda gösterdiğini düşündürmektedir. RNA-seq verilerinde 18. haftada AL ve AKK arasında $p < 0,5$ istatistiksel önem derecinde 0,005 bir farklılık olduğu tespit edilmişti (Çizelge 4.1). Q-PCR sonuçları, AL ve AKK bireyler için RNA-seq verileriyle tutarlılık göstermiştir (Şekil 4.1). Bu beklenen bir sonuçtur. GATA3 normal meme hücrelerinde fazlaca bulunan bir proteindir. Kansereyle birlikte seviyesinde azalma ya da artma gözlenebilir [59]. Tüm beslenme grupların *Gata3* seviyesinin 80. haftaya doğru en yüksek değerlerine ulaştığı ölçülmüştür. *Gata3*'ün meme kanseri oluşum süreçlerine katılan bir onkogen olmasından dolayı bu beklenen bir sonuçtur [58]. Lüminal A tipi meme kanserlerinde *Gata3* ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte lüminal B tipi meme kanseri için *Gata3* ekspresyon seviyelerinin düştüğü kaydedilmiştir [59]. Buna göre, haftalar içerisinde tüm beslenme uygulamalarında *Gata3* ekspresyon seviyesinin artmış olması, özellikle meme tümörü oluşumunun daha net gözlemlendiği 80. haftada tüm beslenme türlerinde diğer haftalara oranla en yüksek ekspresyon seviyesi ölçülmüş olması, bu farelerin lüminal A tipi meme kanseri geliştirmiş olabileceği yönünde bir kanıt ortaya koymaktadır (Şekil 4.20). Bununla birlikte, literatürde lüminal A tipi meme kanserinde EGFR'nin negatif olduğu bildirilmiştir [11]. MMTV-TGF- α farelerinde meme kanseri oluşumu TGF- α 'nın yüksek orandan ekspresyonuna dayandığı için ve bu sinyalin epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) yolağı aracılığı ile bu süreci ilerlettiği bilindiği için, oluşan tümörün Lüminal A tipi kanseri olmadığı söylenebilir [49]. Bu *Gata3*'ün ekspresyonunun artması durumuyla çelişmektedir. Yine de bir onkogen olduğu düşünüldüğünde *Gata3*'ün ekspresyonunun kanserleşme süreciyle birlikte artmış olması onun da bu sürece dahil olmuş olabileceği konusunda kanıt oluşturmaktadır ve bu ekspresyon artışı beklenen bir durumdur.

Q-PCR'da ekspresyon seviyesi ölçülen son gen *Trp53* bir tümör baskılayıcı gendir [69]. Q-PCR sonuçlarına göre 18. haftada KKK beslenmiş bireyde *Trp53* için en yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmişken, en düşük ekspresyon AKK beslenmiş bireyde

gözlenmiştir (Şekil 4.12). Yaşamın erken evresinde kalori kısıtlaması uygulamalarıyla gen ekspresyonunun değişmesi timüsün besin eksikliğine hızlı cevap verdiği bilgisiyle uyum gösterir [42]. Bununla birlikte *Trp53* hücrelerde sürekli ekspresse olmasına karşın, kodladığı protein olan p53 az miktarda aktif halde bulunur. Aktif protein miktarı çeşitli stres durumlarında artar ve hücreleri apoptoza yönlendirir [70]. Yaşamın erken evresinde KKK uygulamasıyla *Trp53* ekspresyonunun AL'ye göre yüksek çıkması, farenin KKK uygulamasını bir stres olarak algılayıp koruyucu mekanizmaları aktifleştirdiği yönünde düşünmemize neden olmuştur. 50. haftada da KKK beslenmiş fare en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmışken, AL ve AKK beslenmiş farelerin ekspresyon seviyeleri yakın değerlerdedir (Şekil 4.15). Bu sonuçlar KKK uygulamasının kanserleşme süreçlerini engelleme etkisiyle uyumluluk göstermektir [34]. Bununla birlikte aynı etki AKK uygulamasında bu gen için aynı etkiyi göstermemiştir. 80. haftaya gelindiğinde ise kanser oluşturma sürecine giren farede AL bireylerde KKK ve AKK farelere göre *Trp53* ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir (Şekil 4.18). Bu durumda, artık kalori kısıtlamasının tümör oluşumunu engelleme etkisi üzerinde olumlu bir müdahalede bulunamadığı sonucuna ulaştırır. Bu beklenmeyen bir sonuçtur çünkü literatürde kalori kısıtlamasının kanseri engellediği belirtilmiştir [34]. KKK grubundaki farelerin *Trp53* ekspresyonları 18. haftadan 80. haftaya doğru azalma göstermiştir (Şekil 4.21). Kanser ilerleme sürecinde *Trp53*'ün ekspresyon miktarının azalması beklenir [35]. Bu sonuç KKK'nın kanserleşme sürecini engelleme de olumlu bir etki göstermediği konusunda kanıt oluşturur. Öte yandan, AKK grubundaki farelerde *Trp53* seviyesi 18. haftadan 80. haftaya doğru artış gösterir. Bu AKK'nın *Trp53* ekspresyon seviyesini arttırarak tümör oluşumunu engelleme yolunda önemli bir katkı sunduğunu düşünmemize yol açar. Bu sonuç literatürdeki bazı çalışmaları destekler niteliktedir [5]. AL grubundaki farelerde ise *Trp53* seviyesi 50. haftada kanserleşme sürecinin başlamasıyla beklenen bir düşüş göstermiştir. 80. haftada ise beklenmeyen bir artış göstermiş. *Trp53*'ün ekspresyonunun zamanla azalması düşünülürken, bu beklenmeyen bir sonuçtur. Bunun sebebi Q-PCR uygulama süreçlerindeki hatalar olabilir. Daha kesin sonuçlar için yeniden primer tasarlanıp daha steril ve optimize şartlarda Q-PCR yapmak gerektiği düşünülmektedir. RNA-seq verilerinde bu gen için AL ve KKK grupları arasında $p < 0,5$ istatistiksel önem derecesinde 0,01 oranında farklılık olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). RNA-seq verileri ve 18. hafta O-PCR verileri kıyaslandığında birbiriyle uyuşmadığı gözlenir. RNA-seq verilerinde AL

beslenmiş fareler bu haftada en yüksek seviyede ekspresyon yapmış iken KKK bireyler en düşük seviyede gen ekspresse etmiştir (Şekil 4.18). Kalori kısıtlamasının timüste hızlı bir tepkiye neden olduğu ve gen ekspresyon seviyesini değiştirdiği bilinmektedir [42]. Kalori kısıtlamasının fare üzerinde strese neden olabileceği düşünüldüğünde Q-PCR ile elde edilen verilerin daha olası bir sonuç olduğu düşünülmüştür. Yine de kesin bir sonuç için daha uygun primerlerle Q-PCR tekrarlanmalıdır.



KAYNAKLAR

- [1] McCay, C. M., Crowell, M. F., & Maynard, L. A., (1935). "The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size one figure", *The Journal of Nutrition*, 10(1): 63-79.
- [2] Weindruch, R., (1996). "The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates", *Toxicologic Pathology*, 24(6): 742-745.
- [3] Omeroğlu Ulu, Z., Ulu, S., Dogan, S., Guvenc Tuna, B., & Ozdemir Ozgenturk, N., (2018). "Transcriptome Analysis of the Thymus in Short-Term Calorie-Restricted Mice Using RNA-seq", *International Journal of Genomics*, 2018: 1-10.
- [4] Dogan, S., Hu, X., Zhang, Y., Maihle, N. J., Grande, J. P., & Cleary, M. P., (2007). "Effects of high-fat diet and/or body weight on mammary tumor leptin and apoptosis signaling pathways in MMTV-TGF- α mice", *Breast Cancer Research*, 9(6): R91.
- [5] Pape-Ansorge, K. A., Grande, Christensen, T. A., Maihle, N. J., & Cleary, M. P., (2002). "Effect of moderate caloric restriction and/or weight cycling on mammary tumor incidence and latency in MMTV-Neu female mice", *Nutrition and Cancer*, 44(2): 162-168.
- [6] Kusuoka, O., Fujiwara-Tani, R., Nakashima, C., Fujii, K., Ohmori, H., Mori, T., Kishi, S., Miyagawa, Y., Goto, K., Kawahara, I., Kuniyasu, H., (2018). "Intermittent calorie restriction enhances epithelial-mesenchymal transition through the alteration of energy metabolism in a mouse tumor model." *International Journal of Oncology*, 52(2): 413-423.
- [7] Chen Y., Ling L., Su G., Han M., Fan X., Xun P., Xu G., (2016). "Effect of Intermittent versus Chronic Calorie Restriction on Tumor Incidence: A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies", *Scientific Reports*, 6: 1-11
- [8] Dixit, V.D. (2008). "Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span." *Journal of Leukocyte Biology*, 84: 882–892.
- [9] Nikolich-Žugich, J., & Messaoudi, I., (2005). "Mice and flies and monkeys too: caloric restriction rejuvenates the aging immune system of non-human primates", *Experimental Gerontology*, 40(11): 884-893.

- [10] Becker, S., (2015). "A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge", *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 131(S1): S36-S39.
- [11] Cancer Genome Atlas Network, (2012). "Comprehensive molecular portraits of human breast tumours." *Nature*, 490(7418): 61-70.
- [12] Rogozina O.P., Bonorden M.J., Grande J.P., Cleary, M.P., (2009). "Serum insulin-like growth factor-I and mammary tumor development in ad libitum-fed, chronic calorie-restricted, and intermittent calorie-restricted MMTV-TGF-alpha mice", *Cancer Prevention Research*, 2: 712-719.
- [13] Costa, V., Angelini, C., De Feis, I., Ciccodicola, A., (2010). "Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq", *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010: 1-19.
- [14] Edgren, H., Murumagi, A., Kangaspeska, S., Nicorici, D., Hongisto, V., Kleivi, K., Rye, I. H., Nyberg, S., Wolf, M., Borresen-Dale, A. L., Kallioniemi, O., (2011). "Identification of fusion genes in breast cancer by paired-end RNA-sequencing", *Genome Biology*, 12(1): R6.
- [15] Chai, J. C., Park, S., Seo, H., Cho, S. Y., Lee, Y. S., (2013). "Identification of cancer-specific biomarkers by using microarray gene expression profiling", *BioChip Journal*, 7(1): 57-62.
- [16] Jung, J. H., Ko, J., Lee, E. H., Choi, K. M., Kim, M., Yim, U. H., Lee, J. S., Shim, W. J., (2017). "RNA seq-and DEG-based comparison of developmental toxicity in fish embryos of two species exposed to Iranian heavy crude oil." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 196: 1-10.
- [17] Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M., (1996). "Real time quantitative PCR", *Genome Research*, 6(10): 986-994.
- [18] Fan, X., Zhang, X., Wu, X., Guo, H., Hu, Y., Tang, F., Huang, Y., (2015). "Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos", *Genome biology*, 16(1): 148.
- [19] Tucker M.J., (1979). "The effect of long-term food restriction on tumours in rodents", *International Journal of Cancer*, 23: 803-807.
- [20] Bishop, N. A., Guarente, L., (2007). "Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans", *Nature Reviews Genetics*, 8(11): 835.
- [21] Kemnitz, J. W., (2011). "Calorie restriction and aging in nonhuman primates", *Ilar Journal*, 52(1): 66-77.
- [22] Lee, C., & Longo, V., (2016). "Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging", *F1000Research*, 5.
- [23] Oriaku, E. T., Chen, F., Desai, V. G., Pipkin, J. L., Shaddock, J. G., Weindruch, R., Hart, R. W., Feuers, R. J., (1997). "A circadian study of liver antioxidant enzyme systems of female Fischer-344 rats subjected to dietary restriction for six weeks", *Age*, 20(4): 221.

- [24] Poetschke H.L., Klug D.B., Perkins S.N., Wang T.Y., Richie E.R., Hursting S.D., (2000). "Effects of calorie restriction on thymocyte growth, death and maturation", *Carcinogenesis*, 21(11): 1959-1964.
- [25] Ogura, M., Ogura, H., Ikehara, S., Dao M.L., and Good R.A., (1989). "Decrease by chronic energy intake restriction of cellular proliferation in the intestinal epithelium and lymphoid organs in autoimmunity-prone mice", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 5918-5922.
- [26] Tannenbaum, A. (1940). "The initiation and growth of tumors: Introduction. I. Effects of underfeeding". *The American Journal of Cancer*, 38(3): 335-350.
- [27] Mizuno N.K., Rogozina O.P., Seppanen C.M., Liao D.J., Cleary M.P., Grossmann M.E., (2013). "Combination of intermittent calorie restriction and eicosapentaenoic acid for inhibition of mammary tumors", *Cancer Prevention Research*, 6: 540–547.
- [28] Cleary M.P., Grossmann M.E., (2011). "The manner in which calories are restricted impacts mammary tumor cancer prevention", *Journal of Carcinogenesis*, 10: 21.
- [29] Hursting S.D., Kari F.W., (1999). "The anti-carcinogenic effects of dietary restriction: mechanisms and future directions", *Mutation Research*, 443(1-2): 235-49.
- [30] Hursting S.D., Lavigne J.A., Berrigan D., Perkins S.N., Barrett J.C., (2003). "Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans", *Annual Review of Medicine*, 54: 131-152.
- [31] Breese C.R., Ingram R.L., Sonntag W.E., (1991). "Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins", *Journal of Gerontology*, 46: B180–B187.
- [32] Tuna, B. G., Atalay, P. B., Altunbek, M., Kalkan, B. M., Dogan, S., (2017). "Effects of Chronic and Intermittent Calorie Restriction on Adiponin Levels in Breast Cancer", *Nutrition and Cancer*, 69(7): 1003-1010.
- [33] Cleary, M. P., Hu, X., Grossmann, M. E., Juneja, S. C., Dogan, S., Grande, J. P., Maihle, N. J., (2007). "Prevention of mammary tumorigenesis by intermittent caloric restriction: does caloric intake during refeeding modulate the response", *Experimental Biology and Medicine*, 232: 70–80.
- [34] Dogan, S., Johannsen, A. C., Grande, J. P., Cleary, M. P., (2011). "Effects of intermittent and chronic calorie restriction on mammalian target of rapamycin (mTOR) and IGF-I signaling pathways in mammary fat pad tissues and mammary tumors", *Nutrition and Cancer*, 63(3): 389-401.
- [35] Berrigan, D., Perkins, S. N., Haines, D. C., Hursting, S. D., (2002). "Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice", *Carcinogenesis*, 23: 817–822.
- [36] Meier U., Gressner A. M., (2004). "Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin", *Clinical Chemistry*, 50(9): 1511–1525.

- [37] Dogan, S., Ray, A., Cleary M. P., (2017). "The influence of different calorie restriction protocols on serum pro-inflammatory cytokines, adipokines and IGF-I levels in female C57BL6 mice: Short term and long term diet effects", *Meta Gene*, 12: 22-32.
- [38] Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., Chen, H., (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance", *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12): 1821-1830.
- [39] White, M. J., Beaver, C. M., Goodier, M. R., Bottomley, C., Nielsen, C. M., Wolf, A. S. F., Riley, E. M., Boldrin, L., Whitmore, C., Morgan, J., Pearce, D. J., (2017). "Calorie restriction attenuates terminal differentiation of immune cells", *Frontiers in Immunology*, 7: 667.
- [40] Hardie, D. G., (2011). "AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function", *Genes & Development*, 25(18): 1895-1908.
- [41] Gillette C. A., Zhu Z., Westerlind K. C., Melby C. L., Wolfe P., Thompson H. J., (1997). "Energy availability and mammary carcinogenesis: effects of calorie restriction and exercise", *Carcinogenesis*, 18: 1183-1188.
- [42] Yang, H., Youm, Y. H., Dixit, V. D., (2009). "Inhibition of Thymic Adipogenesis by Caloric Restriction Is Coupled with Reduction in Age-Related Thymic Involution", *The Journal of Immunology*, 183(5): 3040–3052.
- [43] Fabbiano, S., Suárez-Zamorano, N., Rigo, D., Veyrat-Durebex, C., Dokic, A. S., Colin, D. J., Trajkovski, M., (2016). "Caloric restriction leads to browning of white adipose tissue through type 2 immune signaling", *Cell Metabolism*, 24(3): 434-446.
- [44] Fu, X., Tian, M., Gu, J., Cheng, T., Ma, D., Feng, L., Xin, X., (2017). "SF3B1 mutation is a poor prognostic indicator in luminal B and progesterone receptor-negative breast cancer patients", *Oncotarget*, 8(70): 115018.
- [45] Lundy, J., Schuss, A., Stanick, D., McCormack, E. S., Kramer, S., Sorvillo, J. M., (1991). "Expression of neu protein, epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in breast cancer. correlation with clinicopathologic parameters", *The American Journal of Pathology*, 138: 1527-1534.
- [46] Mant, C., Gillett, C., D'Arrigo, C., Cason, J., (2004). "Human murine mammary tumour virus-like agents are genetically distinct from endogenous retroviruses and are not detectable in breast cancer cell lines or biopsies", *Virology*, 318(1): 393-404.
- [47] Mason, A. L., Gilady, S. Y., Mackey, J. R., (2011). "Mouse Mammary Tumor Virus in Human Breast Cancer: Red Herring or Smoking Gun" *The American Journal of Pathology*, 179(4): 1588-1590.
- [48] Humphreys, R. C., Hennighausen, L., (2000). "Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer", *Oncogene*, 19(8): 1085.

- [49] Matsui, Y., Halter, S. A., Holt, J. T., Hogan, B. L., Coffey, R. J., (1992). "Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF alpha transgenic mice", *Cell*, 61(6): 1147-1155.
- [50] Jiang, W., Zhu, Z., Thompson, H. J., (2009). "Effects of physical activity and restricted energy intake on chemically induced mammary carcinogenesis", *Cancer Prevention Research*, 2(4): 338-344.
- [51] Yoeli-Lerner, M., Yiu, G. K., Rabinovitz, I., Erhardt, P., Jauliac, S., Toker, A., (2005). "Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT", *Molecular Cell*, 20(4): 539-550.
- [52] Hutchinson, J., Jin, J., Cardiff, R. D., Woodgett, J. R., Muller, W. J. (2001). "Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression", *Molecular and Cellular Biology*, 21(6): 2203-2212.
- [53] Ju, X., Katiyar, S., Wang, C., Liu, M., Jiao, X., Li, S., Mueller, S. C., Zhou, J., Turner, J., Lisanti, M.P., Russell, R.G., Ojeifo, J., Chen, W.S., Hay, N., Pestell, R.G., (2007). "Akt1 governs breast cancer progression in vivo", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18): 7438-7443.
- [54] Hendriks, R. W., Nawijn, M. C., Engel, J. D., van Doorninck, H., Grosveld, F., & Karis, A., (1999). "Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus", *European Journal of Immunology*, 29(6), 1912-1918.
- [55] Kouros-Mehr, H., Bechis, S. K., Slorach, E. M., Littlepage, L. E., Egeblad, M., Ewald, A. J., Werb, Z., Pai, S.Y., Ho, I.C., (2008). "GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model", *Cancer Cell*, 13(2): 141-152.
- [56] Tong, Q., Dalgin, G., Xu, H., Ting, C. N., Leiden, J. M., Hotamisligil, G. S., (2000). "Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition", *Science*, 290(5489): 134-138.
- [57] Cancer Genome Atlas Network., (2012). "Comprehensive molecular portraits of human breast tumours", *Nature*, 490(7418): 61.
- [58] Usary, J., Llaca, V., Karaca, G., Presswala, S., Karaca, M., He, X., Lønning, P. E., Langerød, A., Kåresen. R., Oh, D.S., Dressler, L.G., Strausberg, R.L., Chanock, S., Børresen-Dale, A.L., Perou, C.M., (2004). "Mutation of GATA3 in human breast tumors", *Oncogene*, 23(46): 7669.
- [59] Hoch, R. V., Thompson, D. A., Baker, R. J., Weigel, R. J., (1999). "GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer", *International Journal of Cancer*, 84(2): 122-128.
- [60] Kechagioglou, P., Papi, R. M., Provatopoulou, X., Kalogera, E., Papadimitriou, E., Grigoropoulos, P., Nonni, A., Zografos, G., Kyriakidis, D.A., Gounaris, A., (2014). "Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression", *Anticancer Research*, 34(3): 1387-1400.
- [61] Su, J. D., Mayo, L. D., Donner, D. B., Durden, D. L., (2003). "PTEN and phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-

- induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment”, *Cancer Research*, 63(13): 3585-3592.
- [62] Tamguney, T., Stokoe, D., (2007). “New insights into PTEN”, *Journal of Cell Science*, 120(23): 4071-4079.
- [63] Kim, C., Lee, C. K., Chon, H. J., Kim, J. H., Park, H. S., Heo, S. J., Kim, H.J., Kim, T.S., Kwon, W.S., Chung, H.C., Rha, S. Y., (2017). “PTEN loss and level of HER2 amplification is associated with trastuzumab resistance and prognosis in HER2-positive gastric cancer”, *Oncotarget*, 8(69): 113494.
- [64] Janes, K. A., (2011). “RUNX1 and its understudied role in breast cancer”, *Cell Cycle*, 10(20): 3461-3465.
- [65] Mercado-Matos, J., Matthew-Onabanjo, A. N., Shaw, L. M., (2017). “RUNX1 and breast cancer”, *Oncotarget*, 8(23): 36934-36935.
- [66] Maguire, S. L., Leonidou, A., Wai, P., Marchiò, C., Ng, C. K., Sapino, A., Natrajan, R. C., Salomon, A.V., Reis-Filho, J.S., Weigelt, B., (2015). “SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer”, *The Journal of Pathology*, 235(4): 571-580.
- [67] Gökmen-Polar, Y., Neelamraju, Y., Goswami, C. P., Gu, X., Nallamotheu, G., Janga, S. C., Badve, S., (2015). “Expression levels of SF3B3 correlate with prognosis and endocrine resistance in estrogen receptor-positive breast cancer”, *Modern Pathology*, 28(5): 677.
- [68] Blackburn, A. C., Jerry, D. J., (2002). “Knockout and transgenic mice of Trp53: what have we learned about p53 in breast cancer?”, *Breast Cancer Research*, 4(3): 101.
- [69] García-Cao, I., García-Cao, M., Martín-Caballero, J., Criado, L. M., Klatt, P., Flores, J. M., Serrano, M., Weill, J.C., Blasco, M.A., (2002). ““Super p53” mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally”, *The EMBO Journal*, 21(22): 6225-6235.
- [70] Berrigan D., Perkins S. N., Haines D. C., Hursting S. D., (2002). “Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice”, *Carcinogenesis*, 23: 817–822.
- [71] Collins, F. S., Morgan, M., Patrinos, A., (2003). “The Human Genome Project: lessons from large-scale biology”, *Science*, 300(5617): 286-290.
- [72] Morrison, N., Cochrane, G., Faruque, N., Tatusova, T., Tateno, Y., Hancock, D., Field, D., (2006). “Concept of sample in OMICS technology”, *Omics: a Journal of Integrative Biology*, 10(2): 127-137.
- [73] Dupuy, A., Simon, R. M., (2007). “Critical review of published microarray studies for cancer outcome and guidelines on statistical analysis and reporting”, *Journal of the National Cancer Institute*, 99(2): 147-157.
- [74] Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., (2009). “RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics”, *Nature Reviews Genetics*, 10(1): 57.
- [75] Trapnell C., Williams B. A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., Baren M. J., Salzberg S. L., Wold B. J., Pachter J., (2010). “Transcript assembly and

- quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation”, *Nature Biotechnology*, 28: 511–515
- [76] Kumar, R., Ichihashi, Y., Kimura, S., Chitwood, D. H., Headland, L. R., Peng, J., Sinha, N. R., Maloof, J.N., (2012). “A high-throughput method for Illumina RNA-Seq library preparation”, *Frontiers in Plant Science*, 3: 202.
 - [77] Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., (2008). “Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq”, *Nature Methods*, 5(7): 621.
 - [78] Ashburner, M., Ball, C. A., Davis, A. P., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., Sherlock, G., Harris, M. A., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., (2000). “Gene Ontology: tool for the unification of biology”, *Nature Genetics*, 25(1): 25.
 - [79] Wong, S. E., Papenfuss, T. A., Heger, A., Hsu, A. L., Ponting, C. P., Miller, R. D., Fenelon, J. C., Renfree, M.B., Gibbs, R.A., Belov, K., (2011). “Transcriptomic analysis supports similar functional roles for the two thymuses of the tammar wallaby”, *BMC Genomics*, 12: 420.
 - [80] Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S. A., (2006). “Quantification of mRNA using real-time RT-PCR”, *Nature Protocols*, 1(3): 1559.
 - [81] Livak, K. J., Schmittgen, T. D., (2001). “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method”, *Methods*, 25(4): 402-408.
 - [82] Cleary M. P., Jacobson M. K., Phillips F. C., Getzin S. C., Grande J. P., Maihle N. J., (2002). “Weight-cycling decreases incidence and increases latency of mammary tumors to a greater extent than does chronic caloric restriction in mouse mammary tumor virus-transforming growth factor-alpha female mice”, *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 11: 836-843.
 - [83] Rogozina O. P., Bonorden M. J. L., Seppanen C. N., Grande J. P., Cleary M. P., (2011). “Effect of Chronic and Intermittent Calorie Restriction on Serum Adiponectin and Leptin and Mammary Tumorigenesis”, *Cancer Prevention Research*, 4(4): 568-81.

ETİK KURULU RAPORU



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

ETİK KURUL KARARI

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

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

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 3 Yıl

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

Şekil A.1 Etik Kurulu Raporu

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ali Yasir KOÇ
Doğum Tarihi ve Yeri : 21/04/1993, İzmir
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : aliyasirkoc@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2018
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Fen Bilimleri	Özel Yamanlar Fen Lisesi	2011

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
Temmuz 2015 – Ağustos 2015	Balıkesir Üniversitesi	Stajyer