

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ FİKİR

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

MedOmiks

PROJE ADI

Kanser Yönetiminde Translasyonel Uygulamalar İçin
Kişiselleştirilmiş Süt Araştırılması

BAŞVURU ID

338312

İçindekiler

1. Proje Özeti.....	2
2. Problem/Sorun	3
3. Çözüm	4
4. Yöntem.....	5
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü.....	9
6. Uygulanabilirlik.....	9
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	10
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)	11
9. Riskler.....	12
10. Kaynaklar.....	14

1. Proje Özeti (Proje Tanımı) (5 puan)

MikroRNA'lar (miRNA), gen anlatımını düzenleyerek önemli hücresel yollarda yer alan yaklaşık 18-22 nükleotid uzunluğunda küçük kodlanmayan RNA çeşididir. MiRNA'ların düzensiz anlatımı çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynar. Kanserde onkogenik miRNA'lar (kanser oluşumunda rol oynayan miRNA'lar) ve tümör baskılayıcı miRNA'lar (kanser oluşumunu baskılayan miRNA'lar) olarak iki farklı şekilde rol oynayabilir (Svoronos vd., 2016). Son yıllarda dolaşımdaki miRNA ekspresyon profillerinin araştırılması oldukça önem kazanarak, miRNA'ların kanser dahil olmak üzere birçok hastalık için potansiyel biyobelirteç ve terapötik hedef olarak görülmesini sağlamıştır (Cui vd., 2019). Ekzojen miRNA'lar olarak da bilinen bitkisel ve hayvansal besinlerde yer alan miRNA'ların (diyet yoluyla transfer olan miRNA'lar) insan dolaşımına transferi kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve tartışılmıştır (Pirim ve Dogan, 2020). MiRNA'lar; insan, inek, domuz ve keçi sütünde bol miktarda bulunur ve önemli sayıdaki süt kökenli miRNA'ların farklı hastalık yollarında yer aldığı bilinmektedir (Auerbach vd., 2016; Izumi vd., 2012). İnek sütü; sitokinler, kemokinler, hormonlar, büyüme faktörleri, nükleotitler, peptitler, enzimler dahil olmak üzere birçok bileşen içerir. Süt kökenli miRNA'lar türler arasında yüksek oranda korunur, insanlara transfer olabilir ve insana ait genlerin anlatımlarını modüle edebilir (Manca vd., 2018; Auerbach vd., 2016; Izumi vd., 2015).

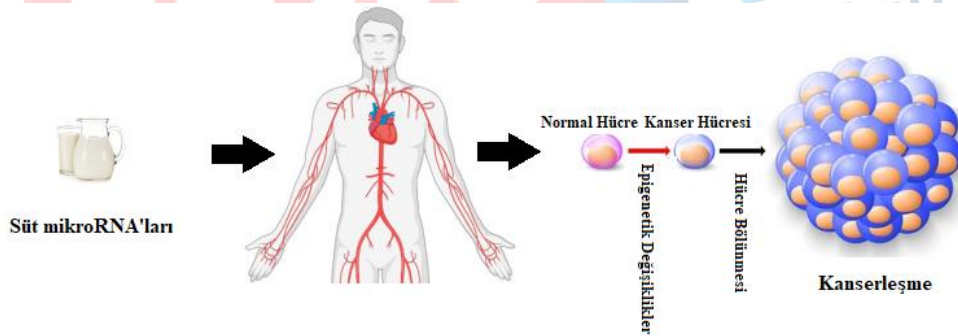
Süt uzun yıllardır genetik mühendislerinin önemli bir araştırma alanı olmuştur ve hayvanlardan modifiye süt çalışmaları literatürde ilgi çekici bir konu olmaya devam etmektedir (Benmoussa vd., 2020; Manca vd., 2018; Chen vd., 2016; Whitelaw vd., 2016; Crispo vd., 2015; Wolf vd., 2015). Proje fikrimiz, kişiselleştirilmiş süt bazlı diyet uygulamaları ile kanser yönetiminde transkripsiyonel uygulamalar için CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) stratejileri ile modifiye edilmiş hastalık önleyici süt ürünleri üretmektir. Bu kapsamda, proje fikrimiz literatürde daha önce denenmeyen miRNA hedefli CRISPR/Cas9 tekniği ile modifiye süt oluşturmaktır. Ek olarak, dünya genelinde ve ülkemizde tüketim düzeyi yüksek olan süt ve süt ürünlerinin hastalıklarda terapötik olarak kullanımları bakımından değerlendirileceği yeni projelere ışık tutma potansiyeline sahiptir.

2. Problem/Sorun (5 puan)

Zhang vd., 2012 yılında ilk kez bitki miRNA'ların sindirim sürecine dayanabileceğini, gastrointestinal sistem yoluyla hayvanın kan dolaşımına girebileceğini ve türler arası transferle gen ekspresyonunu düzenleyebileceğini göstermiştir (Zhang vd., 2012). Bu çalışma sonrası birçok grup diyet yoluyla transfer olan miRNA türlerini araştırarak bu miRNA'ların insan hücrelerine ve dolaşımına geçebilme potansiyellerine dair önemli bulgular elde etmişlerdir (Li vd., 2019; Zhang vd., 2019; Fabris vd., 2016; Shu vd., 2015). Bu bulgular türler arası miRNA aracılı gen regülasyonunun insan sağlığına olumlu/olumsuz etkilerinin olabileceğini öngörmüştür. Bu nedenle, besin içeriklerinde ve tüketim öncesi miRNA içeriklerinin belirlenmesi insan sağlığı için oldukça önemlidir.

Yapılan çalışmalar, inek sütü içeriğinde bulunan miRNA'ların insana transfer olabilmisi nedeniyle önemli bir biyoaktif besin komponenti olabileceğini göstermiştir. İnek sütü miRNA'ları insan dolaşımına geçerek insan hastalıkları ile ilişkili önemli yollara etki edebileceği öne sürülmektedir (Rani vd., 2017). Bu sebeple içme sütü ve süt ürünlerindeki miRNA içeriklerinin belirlenmesi önem arz etmekte olup, bu konuda literatürde önemli bir boşluk olduğu gözlenmektedir.

Bu kapsamda yapılan araştırmalarda, Baier vd. (2014) süt miRNA'ların insan gen regülasyonunu etkileme potansiyellerini göstermiştir. Bu çalışma süt miRNA'larının diyet yoluyla türler arası transfer olarak biyoaktif moleküller olabileceklerini ortaya atan ilk çalışma olmuştur. İmmün sistemle ilişkili süt miRNA'larının inek sütü tüketimine bağlı olarak insan genlerini hedefleyerek ekspresyon seviyelerini değiştirerek bağışıklık sisteminde rol oynayabilecekleri ortaya atılmıştır (Baier vd., 2014). Ek olarak, çalışmalar süt eksozomlarının kolon kanseri hücrelerine, bağırsak hücrelerine, böbrek hücrelerine, makrofajlara ve insan periferik kan mononükleer hücrelerine transfer olabildiği bildirmiştir (Benmoussa vd., 2020; Rani vd., 2017; Izumi vd., 2015; Izumi vd., 2012) (Şekil 1). Bununla birlikte, fizyolojik stabilitelelerini ve biyoaktif potansiyellerini keşfetmek için ise daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

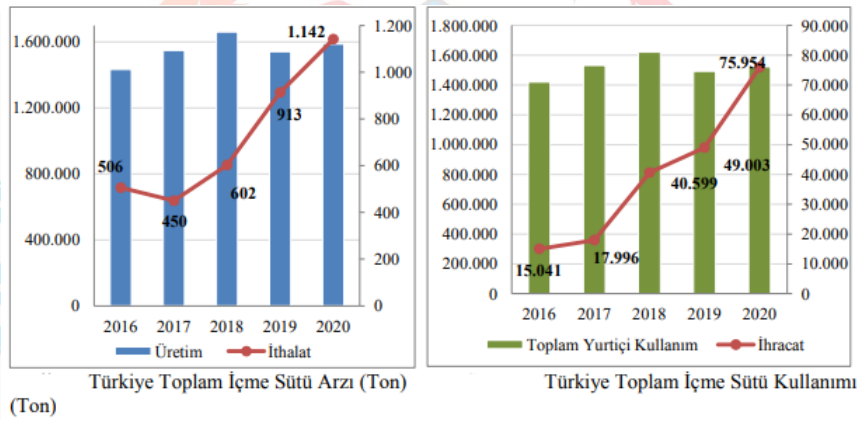


Şekil 1: Süt miRNA'larının diyete bağlı kanserleşme sürecindeki olası rolleri.

Dolayısıyla insana transfer olabilen kanserle ilişkili miRNA'ların toplumumuzda sık tüketilen içme sütünde araştırılması sonraki çalışmalara önemli veri sunma potansiyeli vardır. Bu konudaki literatürlerde yapılan araştırmaların sınırlı olduğu görülmekte ve projemizin literatürlere bu yönde bir katkı sağlayarak yapılabilecek olan yeni diyet yoluyla transfer olan miRNA araştırmaları ve kişiselleştirilmiş süt bazlı diyet uygulamaları bakımından da ön veri oluşturma potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.

3. Çözüm (20 puan)

Diyet yoluyla transfer olan miRNA'ların keşfi ile besinlerin sadece metabolit bir işlev görmediği aynı zamanda türler arası düzeyde konakçı genlerin düzenlenmesinde görev aldığı görülmüştür (Chen vd., 2021; Pirim ve Dogan, 2020). Bu miRNA'ların yararlı etkilerinin yanı sıra farklı miRNA'ların insanlarda kanser moleküler yollarının zenginleşmesinde rol alma gibi zararlı etkileri de saptanmıştır (Patel vd., 2019; Kumar vd., 2017; Shu vd., 2015). Proje fikrimizde dünya genelinde (Yılda kişi başı 88 litre süt tüketimi, Amerika) olduğu (Baier vd., 2014) gibi ülkemizde de büyük bir üretim-tüketim hacmi (<https://arastirma.tarimorman.gov.tr>, Erişim Tarihi: 08.05.2022) (**Şekil 2**) bulunan inek sütünün kanser gelişiminde rol oynayan diyet yoluyla transfer olan onkomiR'leri eleme protokolü geliştirdik. Şu ana kadar, inek sütünün yaklaşık 245 adet miRNA içerdiği tespit edilmiştir (Baier vd., 2014; Izumi vd., 2012; Chen vd., 2010).



Şekil 2: Türkiye İçme Sütü Arz ve Kullanımı (Ton) (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020).

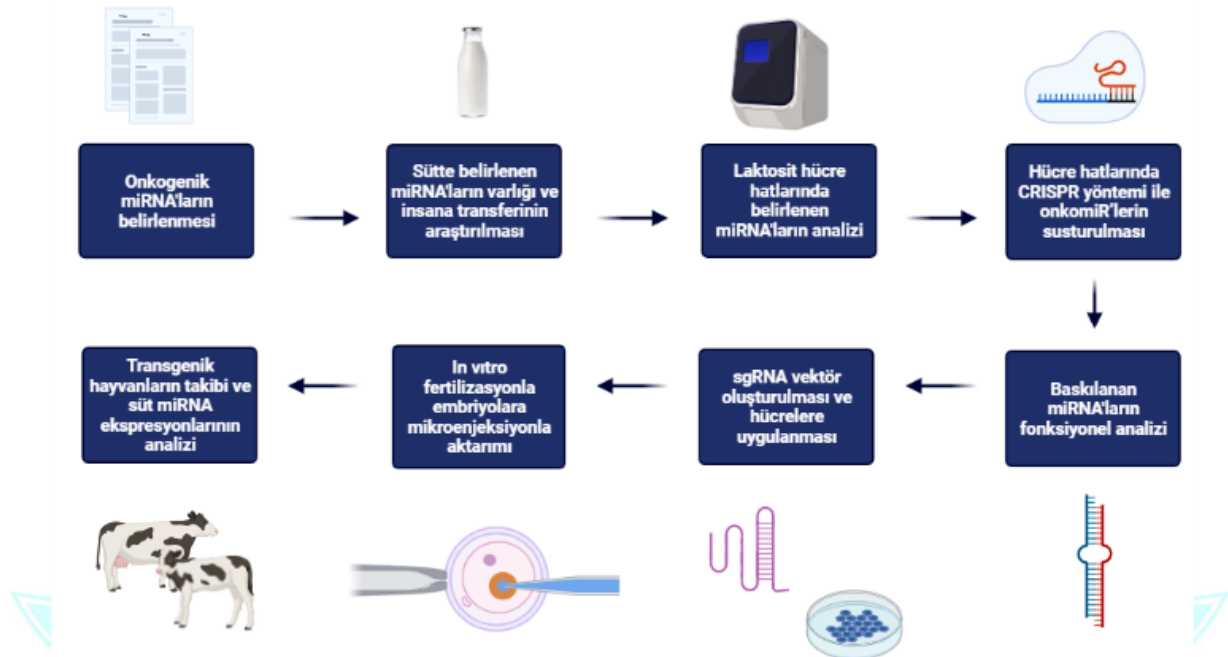
Daha önce yapılmış/yapılmakta olan yöntemlerden farklı olarak projemizde sağlıklı içeriğe sahip bir besin oluşturmak adına temel bir genetik düzenleyici olarak rol oynayan miRNA'lar hedef molekül olarak seçilmiştir.

Proje fikrimizde öncelikle süt içerisindeki bulunan ve insan kanser moleküler yollarında yer alan onkomiR'ler, CRISPR/Cas-9 metodu ile nakavt edilerek hücre hatlarında denemeler ve optimizasyonlar gerçekleştirilecektir. Ardından süt üretiminin sağlanacağı genetik olarak modifiye edilmiş inekler yetiştirilecektir. Bu sayede özellikle dünya genelinde ve ülkemizde artan kanser prevalansını azaltmak için kansere yol açabilecek potansiyel etmenlerden biri olabilecek süt kökenli onkomiR bulunmayan süt üretimi gerçekleştirilip besinlerin daha sağlıklı olabilmesi için farklı ve öncü bir adım atılmış olacaktır. Projemiz başarıyla tamamlanırsa, bu yöntem birçok besin için uygulanılabilecek ve yeni projeler tasarlanabilecektir. Böylece, daha sağlıklı bir diyet ve yaşam anlayışı için bilimsel bir bakış açısı kazanılacaktır.

4. Yöntem (20 puan)

Proje fikrimiz Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Veterinerlik Fakültesi Genetik

Bölümü ile yürütülecektir. Projeimizin 8 farklı iş paketi (İP) ile gerçekleştirilmesi planlanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3: Proje iş akışı.

4.1. Onkogenik miRNA'ların Belirlenmesi

İlk olarak, güncel literatürde inek sütünde miRNA profillerini araştırmış çalışmalar detaylı şekilde incelenmiş ve sütte tespit edilmiş miRNA listesi literatürde oluşturulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1: Sütün çeşitli fraksiyonlarında bulunan miRNA'lar ve fonksiyonları (Rani vd., 2017).

miRNA	Fonksiyon
miR-15b*	T hücrelerinin gelişimi
miR-24*	Kök hücrelerin hematopoitik hücrelere farklılaşması ve fagositoz
miR-27b	T hücre proliferasyonu ve makrofajlarda oksidatif stres
miR-30d	Sitokin sentezi yoluyla immünosupresyon
miR-34a	Proinflamatuvar sitokin sentezi
miR-106a*	Sitokin ekspresyonu ve kanser oluşumu
miR-106b*	Otofaji
miR-130a	Hepatit B virüsünün replikasyonu
miR-155*	T hücresi ve B hücresi yanıtı
miR-181a	T hücrelerinin duyarlılığı ve seçimi
miR-200a*	Hodgkin lenfoma oluşumu
miR-223	Makrofajlarda sitokin üretimi
miR-451	Migrasyon engelleyici faktörün düzenlenmesi

*Onkogenik özellik gösteren miRNA'lar

Tabloda yer alan miRNA'larla ilişkili yapılan güncel araştırmalar incelendiğinde miR-15b, miR-24, miR-106a, miR-106b, miR-155 ve miR-200a süt miRNA'larının farklı kanser

türlerinde onkogenik özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda insan kanser türlerinde ilgili miRNA'ların anlatımı artarak farklı kanser gelişimi, prognozu ve metastaz süreci ile ilişkili yollarda yer aldığı görülmüştür (**Tablo 2**).

Tablo 2: Sütte bulunan ve literatürde onkogenik özellik gösteren miRNA'lar (Rani vd., 2017).

OnkomiR	Kanser Türü	Referans
miR-15b	Mide Kanseri, Kolorektal Kanser, Prostat Kanseri, Mesane Kanseri, Hepatoselüler Karsinom, Meme Kanseri	Wu vd., 2020; Tölle vd., 2019; Chen vd., 2018; Zhao vd., 2017; Sun vd., 2017; Li vd., 2017
miR-24	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri, Hepatoselüler Karsinom, Meme Kanseri, Nazofaringeal Karsinom, Özofagus Skuamöz Hücreli Karsinom	Wang vd., 2020; Maghsudlu vd., 2020; Chen vd., 2016; Kang vd., 2016; Lu vd., 2015; Franchina vd., 2014
miR-106a	Özofagus Karsinomları, Mide Kanseri, Kolorektal Kanser, Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	Tian vd., 2018; Ma vd., 2016; Koga vd., 2016; Wang vd., 2013
miR-106b	Meme Kanseri, Prostat Kanseri, Akciğer Kanseri, Mide Kanseri, Kolorektal Kanser, Hepatoselüler Karsinom, Özofagus Skuamöz Hücreli Karsinom	Sagar vd., 2021; Yu vd., 2019; Jiao vd., 2017
miR-155	Kolorektal Kanser, Meme Kanseri, Mide Kanseri, Pankreas Kanseri	Wang vd., 2019; Shao vd., 2019; Zuo vd., 2018; Qu vd., 2018; Zhang vd., 2017, Khoshinani vd., 2017
miR-200a	Meme Kanseri, Mesane Kanseri	Fortana vd., 2021; Yang vd., 2019

2015 yılında, Shu vd. yürüttükleri biyoinformatik analizler ve diyet çalışması sonucunda insan dolaşımına transfer olabilen ekzojen miRNA'lar belirlemiştir. Belirlenen transfer oranı en yüksek olan inek miRNA'larının (bta-miR-487b, bta-miR-181b ve bta-miR-421) süt tüketimi sonrasında insan plazmasında anlatım seviyelerinde artış gösterdiği tespit edilerek bu miRNA'ların insana transfer olduğu gösterilmiştir (Shu vd., 2015). Yaptığımız biyoinformatik analizlerde bta-miR-487b ve bta-miR-421'nin insan miRNA'ları (hsa-miR-487b-3p ve hsa-miR-421) ile %100 homoloji gösterdiği saptanmış ve bu miRNA'ların literatürde birçok insan kanseri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Li vd., 2020; Pezuk vd., 2019; Shu vd., 2015; Xi vd., 2013). Yukarıdaki tabloya ek olarak, özellikle bu iki miRNA'nın insana transfer oldukları bilindikleri ve insan miRNA'ları ile %100 homoloji gösterdikleri için proje fikrimiz için oldukça önemlidir. Tablo 2'de yer alan miRNA'ların insana transferi bir sonraki aşamada araştırılarak, insana transferi bilinen bta-miR-487b ve bta-miR-421 süt miRNA'larına dahil edilebilecektir. Proje fikrimizin ilk aşaması transferi bilinen süt içeriğinde bulunan onkomiR'leri ve aday onkomiR'ler başarıyla belirlenerek tamamlanmıştır.

4.2. Sütte miRNA Analizi ve İnsana Transferinin Araştırılması

Tablo 1'de belirtilen inek sütünde tespit edilmiş miRNA'lar ve insanda potansiyel fonksiyonları belirtilmiştir. Fakat, bu miRNA'ların insana geçişine yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Öncelikle insana transferi bilinen bta-miR-487b ve bta-miR-421 süt miRNA'ları da dahil edilerek Tablo 1'de yer alan tüm miRNA'ların süt içeriğinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile analizleri yapılacaktır. Bu aşama inek sütünden total RNA izolasyonu tamamlandıktan sonra elde edilen RNA'ların saflığının değerlendirilerek, total RNA'lardan tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA) sentezlenecektir. Elde edilen cDNA örneklerinin anlatım seviyeleri seçilen miRNA'lara spesifik hidroliz problemleri kullanılarak qRT-PCR cihazı ile belirlenecektir. qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen miRNA anlatım değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile normalize edilerek miRNA'lara ait kat değişimi

hesaplamaları yapılacaktır. Normalizasyon için sentetik cel-miR-39-3p ekspresyon değerleri referans olarak kullanılacaktır. miRNA'ların ekspresyon verileri *t*-test ve ANOVA testi ile değerlendirilerek *P*-değerleri hesaplanacaktır. Projemizin bu kısmına ön veri oluşturacak “İçme Sütü ve Kefirde Kanserle İlişkili miRNA'ların Anlatım Seviyelerinin Araştırılması” adlı araştırma projesi Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi desteği ile şu an danışmanımız Doç. Dr. Dilek Pirim'in yürütücülüğünde devam etmektedir.

Süt miRNA'larının insana transferinin kapsamlı araştırılması ise, Baier vd. 2014 yılında yapmış oldukları çalışma referans alınarak yapılacaktır (Baier vd., 2014). Sağlıklı 5 yetişkin bireyde, en az 1 hafta süt ürünlerinden uzak kalma periyodu ile 0.25, 0.5, ve 1 L dozlarının uygulanacağı bir süt tüketimi çalışması yürütülecektir. Hamile, sigara tüketen, süt alerjileri ve kendi bildirdiği sağlık sorunları olan kişiler dahil edilmeyecektir. Yapılan çalışmalarda, insan plazmasında süt miRNA konsantrasyonlarının süt tüketiminden 9 saat sonrasına kadar yüksek kaldığı tespit edilmiştir (Baier vd., 2014). Katılımcılara süt tüketiminden 12 saat önce ve kan örneklerinin alındığı süre boyunca süt ve süt ürünleri tüketmemeleri talimatı verilecektir. Süt tüketiminden önce (başlangıç = 0 saat) ve süt öğününden sonra belirli aralıklarla (1, 3, 6, 9 ve 24 saat) 20 mL kan toplanacaktır. Daha sonra yukarıda detaylı belirtilmiş; total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR analizi yapılacaktır. Kan örneklerindeki saat aralıklarında değişim gösteren miRNA'lar istatistiksel analizlerle tespit edilerek, projenin ileri aşamalarına eklenecektir. Fakat, ilk paragrafta belirtilen ve insana transferi bilinen bta-miR-487b ve bta-miR-421 süt miRNA'ları bu aşamaya dahil edilmeden sonraki aşamayla devam edilecektir. Bu kısım için proje önerisi hazırlanmış proje bütçesi için finansal destek sağlandığı takdirde projemiz yürürlüğe girecektir.

4.3. Laktosit Hücre Hatlarında Belirlenen onkomiR'lerin Analizi

Laktasyon aşamasında olan (doğumdan 150-250 gün sonra) farklı Holstein süt ineklerinden süt elde edilecektir. İlk 50 mL süt atılarak, ardından steril bir santrifüj tüpünde yaklaşık 150 mL toplanacaktır. 37°C'de saklanarak ve 2 saat içinde işleme tabi tutulacaktır. Süt 1000 g'de 20 dakika santrifüj edilerek üst tabakası uzaklaştırılacaktır. Kalan kısım fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu ile şeffaf olana ve süt içermeyene kadar birkaç kez yıkanacaktır. Hücreleri içeren alt faz, taze besiyer ile karıştırılıp, inkübe edilecektir. Kültürlenmiş ve çoğaltılmış inek meme epitel hücrelerinden (BMEC, Bovine Mammary Epithelial Cells) total RNA izolasyonu yapılacaktır. BMEC'lerin karakterizasyonunda qRT-PCR ile *CSN2* (*Casein Beta*) ve *BTN1A1* (*Butyrophilin Subfamily 1 Member A1*) anlatımları belirlenecektir. Ek olarak, Western Blot yöntemi ile β -kazein proteininde ekspresyonu tespit edilecektir. Bahsedilen bu yöntem, 2021 yılında Xu vd. optimizasyonu başarılı şekilde tamamlamış olduğu çalışmadan örnek alınmıştır (Xu vd., 2021). Başarılı bir şekilde total RNA izolasyonu ve kültürlenerek çoğaltma aşamaları tamamlanarak karakterize edilmiş BMEC'lerde Tablo 1'de belirtilen onkomiR'lerin ekspresyonları qRT-PCR yöntemi ile doğrulanacaktır.

4.4. Laktosit Hücre Hatlarında CRISPR/Cas9 Yöntemi ile OnkomiR'lerin Susturulması

qRT-PCR ile sütte ekspresyonu doğrulanmış olan onkomiR'lerin, genomik DNA lokuslarını hedefleyen CRISPR/Cas9'un miRNA ekspresyonunu güçlü bir şekilde baskılaması bu aşamada hedeflenmiştir. CRISPR/Cas9 tekniği ile pri-miRNA'nın (primary) kök-ilmek

yapısı üzerinde mutasyonlar oluşturularak, biyogenez sürecini kesintiye uğratarak miRNA anlatımı nakavt olacaktır. OnkomiR genlerine tamamlayıcı dizilere sahip spesifik rehber RNA'ları (sgRNA) içeren CRISPR/Cas9 vektörleri oluşturulacaktır. Dr. Feng Zhang's Lab tarafından geliştirilen çevrimiçi bir program olan CRISPR DESIGN (<http://crispr.mit.edu>, Erişim Tarihi: 05.05.2022) kullanılarak her miRNA için en az iki farklı sgRNA tasarlanacaktır. Her bir onkomiR'e spesifik CRISPR/Cas9 yapıları, BMEC hatlarına transfekte edilerek onkomiR ekspresyon seviyeleri kontrol vektörleriyle karşılaştırılacaktır. Kontrol vektörleri olarak yeşil floresan proteini (green fluorescent protein, GFP) hedefleyen protospacer dizisi ile oluşturulan plazmitler kullanılacaktır. Tüm spesifik hedef diziler amplifiye edilerek ve lenti-CRISPR vektörlerine klonlanacaktır ve ardından DNA dizilimi ile doğrulanacaktır. CRISPR/Cas9'un Lipofectamine reaktifi kullanılarak hücelere transfeksiyonundan sonra, seleksiyon için 24 saat puromisin (4 µg/mL) uygulanacak ve ardından hücreler normal kültür ortamında çoğaltılacaktır.

4.5. Baskılanan onkomiR'lerin Fonksiyonel Analizi

Transfekte edilmiş hücreler yeterli sayıda çoğaltıldıktan sonra total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR analizi yapılacaktır (4.2 başlığında detaylı belirtilmiştir). CRISPR/Cas9 ile modifiye edilmiş hücre hatlarında miRNA anlatımının baskılanması verimliliği karşılaştırılmalı olarak değerlendirilecektir. Ek olarak, miRNA'ların fonksiyonel analizi için miRNA'ların baskıladığı hedef mRNA'ların qRT-PCR ve Western Blot yöntemleri ile ekspresyonları da değerlendirilecektir.

4.6. sgRNA Vektörlerinin Oluşturulması ve Hücelere Uygulanması

Önceki aşamada spesifik olarak hedef miRNA genlerine bağlanarak nakavt eden plazmit lenti-CRISPR vektörleri fonksiyonel analizlerle valide edildikten sonra gebe ineklerden toplanan oosit hücrelerine uygulanacaktır. Donör ineklerden oositler, ortalama 10 yumurta olacak şekilde, trans-vajinal geri kazanım yoluyla toplanır ve yumurtalar 20 saat süreyle olgunlaştırılır.

Spermatozoitler ise dişi genital yoluna bırakıldıktan sonra en son olgunlaşması gerçekleşir ve fertilizasyon için fonksiyonel duruma gelmektedir. Spermatozoitlerin oositleri dölleme yeteneğine ulaşabilmeleri için kapasitasyona uğramaları gerekmektedir. Kapasitasyon ya daha önce tohumlanmış diğer bir dişiden spermatozoitleri geri alarak veya uygun kapasitasyon sıvısında *swim-up* işlemi ile bir saat inkübe edilerek kazandırılacaktır.

Oositler ve spermatozoitler uygun koşullarda inkübe edildikten sonra sayısal ve morfolojik (nükleer ve sitoplazmik olgunlaşmaları) değerlendirmeler yapıldıktan sonra fertilizasyon aşamasına geçilecektir (Ferre vd., 2020; Parrish vd., 2014; Gundogan, 1998). Bu aşamada CRISPR/Cas9 vektörleri sadece oosit hücrelerine uygulanacaktır.

4.7. In Vitro Fertilizasyonla Embriyolara Mikroenjeksiyonla Aktarımı

Fertilizasyon, kültüre edilmiş oositleri ve kapasitasyona uğramış spermatozoitleri içeren uygun solüsyon içinde kültürlendikten meydana gelecektir. İnkübe edildikten sonra mikroskop altında morfolojik (simetri, renk, blastomerlerin varlığı gibi) olarak değerlendirilecektir. Oluşan embriyolar genellikle alıcılara transfer edilmeden önce gelişimi için bir süre *in vitro* olarak kültüre edilecektir. Embriyolar alıcının uterusuna transfer edilmesinden önce gelişiminin

blastosist ya da morula safhasında olmalıdırlar (Ferre vd., 2020; Parrish vd., 2014; Gundogan, 1998).

4.8. Transgenik Hayvanların Takibi ve Süt miRNA'larının Analizi

In vitro fertilizasyonun gerçekleşmesinde ve başarıya ulaşmasında dikkate alınması gereken birçok faktör ilgili veteriner hekimlerle de görüşülerek güncel literatüre uygun olarak yapılacaktır. Transgenik hayvanlar doğum sürecinden laktasyon sürecine kadar takip edilecektir. Laktasyon aşamasında gelmiş transgenik hayvanların ürettiği sütte nakavt edilmiş miRNA'ların anlatımları qRT-PCR tekniği ile değerlendirilecektir. Ek olarak, transgenik hayvanlara genotip analizleri de yapılacaktır. Elde edilen sonuçlarda, sağlıklı hayvanlardan elde edilen onkomiR içermeyen süt oluşturulabilirse, uygun metodolojiler tekrarlanarak protokolün optimizasyonu sağlanacaktır.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü (15 puan)

Önerilen proje fikrimiz kapsamında kişiselleştirilmiş süt bazlı diyet müdahaleleri ile kanser yönetiminde transkripsiyonel uygulamalar için yeni bir yaklaşım sağlanması amaçlanmıştır. CRISPR/Cas9 yöntemi ile inek sütü içerisinde kanser ile ilişkisi bilinen ve insana transferi bilinen onkomiR içermeyen süt oluşturulması hedeflenmektedir. Projemiz başarıyla tamamlanırsa bundan sonraki adım sütteki tümör baskılayıcı miRNA'ları artırarak terapötik olarak kanser tedavisine katkı sağlayabilecek süt üretimine katkı sağlamak olacaktır. Ek olarak, proje fikrimiz süt miRNA araştırmalarına ve süt üretim teknolojilerine farklı bir perspektif katması açısından oldukça önemlidir. Son olarak, kişiye özel diyet müdahaleleri sadece kanser için değil birçok hastalık için de tasarlanabilir. Bunun yanı sıra, projemiz desteklenirse diyet yoluyla transfer olan miRNA'ların insan sağlığı üzerindeki etkileri hakkında değerli bilgiler sunacaktır.

Bu konudaki literatürlerde yapılan araştırmaların sınırlı olduğu görülmekte ve projemizin literatüre bu yönde bir katkı sağlayarak yapılabilecek olan yeni diyet yoluyla transfer olan miRNA araştırmaları bakımından da ön veri oluşturma potansiyelinin olduğu düşünülmektedir. Chen vd. tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada bölgeye özgü rekombinasyon tabanlı yöntem ile somatik hücre nükleer transferi kullanarak, antimikrobiyal peptid olan HBD3 (Human beta-defensin-3) anlatımı olan 12 sağlıklı transgenik inek üretmiştir ve bu ineklerin meme bezinde HBD3 anlatımı ile bakteri enfeksiyonuna karşı artan direnç göstermiştir. Bu çalışma inek sütü ile ilgili olarak literatürde yapılmış sınırlı çalışmalardan biridir ve proje fikrimiz CRISPR/Cas9 yöntemi ile süt içeriğinde onkomiR susturulması bakımından tamamen farklıdır. **Bu açıdan, proje fikriniz tamamen özgün ve başvuru tarihi itibarıyla literatürde bir çalışma olmadığını belirtmek isteriz.**

Proje fikrimiz, 26-29 Ocak 2021 tarihinde çevrimiçi olarak gerçekleşen "The Festival of Genomics & Biodata" festivalinde takım kaptanı Berkcan DOĞAN tarafından "Young Scientists" oturumunda proje fikri olarak sözlü sunum gerçekleştirmeye hak kazanarak sunulmuştur.

6. Uygulanabilirlik (10 puan)

Proje fikrimizde süttten insana transfer olan ve kanser ile ilişkili onkomiR'ler süt üretiminden sorumlu hücre hatlarında CRISPR/Cas9 metodu ile nakavt edilecek ve hücre hatlarında optimizasyonları test edilecektir. Ardından *in vitro* fertilizasyonla embriyo oluşturulacak ve zigotlara mikroenjeksiyon gerçekleştirilecektir. Oluşturulması planlanan modifiye süt ürünü ticari bir ürüne dönüşebilme potansiyeli oldukça yüksektir ve projemizin temel hedeflerindedir. Özetle, proje çıktılarımızdan birçok hastalık için farklı ticari ürünlere dönüştürülebilme şansının oldukça yüksek olduğu anlamına gelmektedir.

Literatürde CRISPR/Cas9 temelli oldukça fazla sayıda çalışma vardır ve bu tekniğin optimizasyonları yakın zamanda başarıyla tanımlanmıştır. Proje fikrimizle benzer metodolojilerin uygulandığı bir çalışmada, immün yetmezliği olan farelerde *in vitro* fertilizasyon ve CRISPR/Cas9 teknolojileri ile yüksek oranda *Fah* genini hedefleyerek embriyolara mikroenjeksiyon ile uygulanarak yeni insanlaştırılmış fare modelleri oluşturulmuştur (Li vd., 2014). Bu çalışmada, diğer memelilerin genomlarını düzenlemek için aynı prosedürler kolaylıkla uygulanabileceği vurgulanmıştır.

Yapılan araştırmalarda, CRISPR/Cas9 tekniğinin hedeflediği miRNA'ların anlatımını spesifik olarak %96'ya kadar susturabildiği ve bu tekniğin miRNA susturmada antisens inhibitörler ve sünger (*miRNA sponge*) gibi geleneksel metodolojilerden daha verimli, spesifik, ekonomik, kullanışlı ve kararlı bir teknoloji olduğu desteklenmiştir. Daha da önemlisi, ilk kez *in vitro* ve *in vivo* modellerde, CRISPR/Cas9 tekniği ile miRNA nakavt fenotipinin uzun vadeli stabilitesini göstermişlerdir (Chang vd., 2016).

Proje fikrimize dair güncel literatür çalışmaları incelenmiştir ve uygulanabilir metodolojiler göz önüne alınarak, yüksek verim elde edilmiş ve optimizasyonları yapılmış metotlar seçilmiştir. Yapılan bu araştırmaların ışığı altında proje önerimizin uygulanabilirlik açısından herhangi bir sorun teşkil etmemektedir. Proje fikrimizin temelini oluşturulması için bilimsel bulguların ve teknolojiye dair temel prensiplerin gözde geçirildiği ve değerlendirildiği aşama olan 1. Teknolojik Hazırlık Aşamasını başarıyla tamamlayan proje fikrimiz şu an 2. Teknoloji Hazırlık Aşamasındadır. Değerlendirme süresi sonucunda 3. Teknolojik Hazırlık Aşamasına ulaşacağı öngörülmektedir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması (5 puan)

Proje fikrimizde kullanılacak metodolojilerle ilgili piyasa araştırması sonrası elde edilen yaklaşık olarak öngörülen fiyatlar aşağıdaki tabloda aktarılmıştır (**Tablo 3**). Belirtilen güncel fiyatlar daha önce benzer çalışmaları yapmış veteriner hekimlerle, ürün/kit tedarik edecek firma yetkilileri ile görüşülerek takımımız tarafından piyasa araştırması yaparak elde edilmiş ortalama fiyatlardır. Proje fikrimizle ilgili piyasada ve literatürde benzer bir proje veya çalışma bulunmadığı için maliyet karşılaştırması yapılmamıştır.

Tablo 3: Proje bütçe tablosu

Kalem Adı	Birim/Adet	Harcama Dönemi	Birim Fiyatı (₺)
Total RNA İzolasyonu	100 reaksiyon için	3-6 ay	10.000 ₺
cDNA Sentezi	1 miRNA için	3-6 ay	10.000 ₺
qRT-PCR Aşaması		3-6 ay	10.000 ₺
Hücre Hatları (Bovine Lactocytes)	1 flask	7-12 ay	10.000 ₺
Bakteri ve Hücre Kültürü Sarf Malzemeleri	1 miRNA için	7-12 ay	15.000 ₺

CRISPR/Cas9 Enzimi ile miRNA Susturma		13-20 ay	5.000 ₺
Fonksiyonel Analizler (Western Blot vb.)		20-24 ay	10.000 ₺
Genel Laboratuvar Sarf Malzemeleri		Tüm aşamalar	2.000 ₺
<i>In Vitro</i> Fertilizasyon	1 inek için*	22-24+ ay	100.000 ₺
İnek Bakım Masrafları (Yem vb.)	Yıllık/1 inek	24+ ay	10.000 ₺
Toplam			182.000 ₺

*Bir inek için en az 20 embriyo oluşturulması önerilmiştir.

Holstein ineklerinin süt verimi bir laktasyon döneminde 7.000-10.000 litredir. Fakat ıslah yapılmış ve üstün olanları ile yapılmış seçimler sayesinde yılda 10.000 litre süt verimine rahatlıkla ulaşabilir. Bir Holstein ineğinin doğumdan yaklaşık 1 yıl sonra ilk laktasyon dönemine girdiği ve ilk 6 yıl alınan verimin en yüksek olduğu belirtilmiştir. Tek bir inekten bekleme süreleri dahil olarak minimum 50.000 litre süt verimi beklenilmektedir. İnekler için doğum aralığının ~1 yıl olduğu bilgisi göz önüne alınarak, insana transferi kanıtlanmış ve onkomiR özellikte olan 5 miRNA'nın susturulduğu düşünülürse, bir transgenik canlının üreteceği 1 litre sütün taşıma, paketlenme maliyetleri ve vergiler hariç üretim maliyeti ~1,3 ₺ Türk lirasına karşılık gelmektedir.

Proje fikrimizin gerçekleştirilmesi için oluşturulmuş çalışma takvimimiz aşağıdaki gibidir (**Tablo 4**).

Tablo 4: Proje-Zaman planlaması.

İş Paketi/Ay	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-14	15-16	17-18	19-20	21-22	23-24	24+
İP.1													
İP.2													
İP.3													
İP.4													
İP.5													
İP.6													
İP.7													
İP.8													

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar) (5 puan)

İnek sütü yaygın olarak tüketilen bir süt ürünü olmuştur ve uzun süredir insanlar için besin kaynağıdır (**Şekil 4**, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr>, Erişim Tarihi: 05.05.2022).

Bazı Ülkelerde Kişi Başına Süt Tüketimi (Lt/Kişi/Yıl)					
	2015	2016	2017	2018	2019
Rusya	129,5	130,4	130,9	131,2	132,0
Yeni Zelanda	95,2	94,5	93,8	93,7	93,0
AB	92,1	92,3	92,4	92,6	92,7
Kanada	81,5	80,8	80,2	79,6	79,0
ABD	77,0	76,5	76,0	75,3	74,7
Çin	22,6	22,9	23,2	23,6	23,9

Şekil 4: Farklı ülkelerde kişi başına düşen süt tüketim miktarı (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020).

İçme sütü, peynir, yoğurt, ayran, tereyağı, kaymak, süt tozu gibi farklı ürün grubunun temelini oluşturmakla beraber, ayrıca bebek mamalarında da kullanılır. Ulusal Süt Konseyi (ulusalsutkonseyi.org.tr, Erişim Tarihi: 06.05.2022) süt hayvancılığı verilerine göre ülkemizde yıllık 22,96M ton süt üretimim yapılmaktadır.

Multifaktöriyel bir hastalık olan ve dünya çapında artış gösteren kanser, sadece genetik kökenli değil, epigenetik mekanizmalarla da oluşmaktadır. Türkiye’de 2017 yılında toplamda kanser insidansı ise yüz binde 223,1’dir ve 2017 yılında Türkiye’de toplam 180.288 kişiye yeni kanser teşhisi koyulmuştur (<https://hsgm.saglik.gov.tr>, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Erişim Tarihi: 07.05.2022). Diyet temelli kansere yatkınlığı önlemek veya sağlıklı bir yaşam isteyen bireylere yönelik süt ürünleri oluşturmayı hedeflemekteyiz. İnek sütünün farklı fraksiyonlarında farklı miRNA profilleri tanımlanmıştır ve bunların çoğu bağışıklıkla ilişkili olarak karakterize edilmiştir (Rani vd., 2017). Proje fikrimizde belirlenen bu miRNA'ların kanserle ilişkileri literatürde taranarak bazı miRNA'ların potansiyel onkomiR özellik gösterdiği saptanmıştır. Bu yüzden, geliştirmeyi planladığımız süt temelli ürünümüz hastalık önleyici nitelikte olduğu için toplumun her yaş aralığındaki bireyine hitap edecektir. Ayrıca, proje fikrimiz başta tüm süt üretici firmaları hedef almaktayken bu projenin çıktıları ile birlikte diğer besin gruplarının üretimini sağlayan firmalar için de daha sağlıklı bir besin anlayışını geliştirmek adına zararlı etkileri olan miRNA'ları içermeyecek şekilde oluşturulacak deneysel tasarımlar için rehber niteliğinde olabilecektir.

Önerilen iş basamaklarımızın optimizasyonları literatüre uygun şekilde yapılarak, istenilen sonuçlar elde edilirse projenin süt tüketimi fazla olan popülasyonlar için yaygın etkisi ve kapsamı oldukça fazla olacaktır.

9. Riskler (10 puan)

Tasarlanan proje fikrimizde en temel riskler *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve transgenik canlının yaşamını sürdürmesiyle alakalı ortaya çıkabilecek komplikasyonlardır. IVF tekniği ile ilgili maliyet, donör dişilerin bakımı gibi dezavantajların yanı sıra daha hızlı genetik süreç, üreme yeteneği olmayan canlılardan yavru elde edebilme şansı, fazla sayıda embriyo eldesi ve çiftleşme sıklığını artırma birçok avantajı bulunmaktadır (Sheetal vd., 2015). Yapılan çalışmalarda IVF tekniğiyle elde edilen zigotların sadece %20-40'ı blastosit evresine ulaştıklarını göstermektedir (Ferré vd., 2020). Rahme transfer edilmesi sonucunda gebelik görülme ihtimal %42 ile %77,1 arasında değişmektedir (Hasler vd., 2001, Morotti vd., 2014). Doğan her buzağıdan %6'sı doğum sırasında veya sonrasında gerçekleşen komplikasyonlar (hastalıklar, çevresel faktörler, solunum ve sindirim sistemi bozuklukları, doğum komplikasyonları gibi) yüzünden ölmektedir (Zhang vd., 2019) veya transgenik canlının yetişkinliğe ulaşamaması söz konusu olabilir (Azizzadeh vd., 2012). Bu risklerin önüne geçilmesi için fazla sayıda buzağı ile çalışılması planlanmakta olup, alanında uzman ve deneyimli araştırma grupları ile çalışılarak bu sorunların çözülmesi planlanmaktadır.

CRISPR/Cas9 ile miRNA nakavtı sonrasında canlının hayatını kültür ortamında sürdürememesi/büyüme hızının yavaşlaması söz konusu olabilir. Böyle bir durumun oluşmaması adına, ilk olarak, miRNA kombinasyonu halinde susturulması değil, spesifik miRNA'lar tek tek farklı canlılarda susturulması denenerek olası yan etkileri gözlemlenecektir. Herhangi bir risk oluşturma durumu ile karşı karşıya kalınırsa susturulan onkomiR farklı bir

onkomiR ile değiştirilecektir. Bu riski azaltmak için, susturma sürecinden önce miRNA'ların yer aldığı yolaklar ve hedef genler biyoinformatik analizlerle belirlenerek, *in silico* olarak en az yan etkiye sahip miRNA'lar seçilecektir. Proje fikrimizle ilgili olarak yukarıda bahsedilen ve en fazla risk skorunu oluşturan riskler dışında farklı minör riskler de mevcuttur. Fakat bu riskler, deneysel aşamalarla ilgilidir ve özellikle yaptığımız literatürde verimliliği yüksek ve optimizasyonu yapılmış, protokolleri tanımlanmış malzemeler ve kitler kullanılarak aşılacaktır. Ayrıca, tedarikçi firmalardan tam destek alınarak, birçok riske yönelik tedbir ve çözüm önerileri alınması planlanmıştır.

Tablo 5: Risk yönetim tablosu.

İř Paketi (İP)	Risk Açıklaması	Risk Yönetimi	Etki (5)	Olasılık (5)	Risk Skoru
İP 3	Hücre hatlarında yeterince hücrenin çoğaltılamaması	Literatürde laktosit hücre hatlarında yapılan çalışmalar incelenerek oluşturulmuş prosedürler steril olarak uygulanarak hücreler pasajlanacaktır. Böyle bir durumda mikoplazma kontaminasyonu ve kullanılan besiyelerin uygunluğu gözden geçirilecektir. Daha sonra yeni hücre hatları denenerek, yine sonuç alınmazsa yetkili firmadan yeni hücre hatları tedarik edilecektir. Ayrıca, bu aşama hücre kültürü konusunda deneyimle laboratuvarlarda çalışma ilgili araştırma gruplarıyla devam ettirilecektir.	3	2	6
İP 4	sgRNA'nın miRNA'ları hedefleyememesi ve anlatımını baskılayamaması	CRISPR/Cas9 tekniği ile pri-miRNA'nın (primary) kök-ilmek yapısı üzerinde mutasyonlar oluşturularak, biyogenez sürecini kesintiye uğratarak miRNA anlatımı nakavt olacaktır. Literatürde bu protokolü uygulayan çalışmalar başarılı sonuçlar elde etmiştir (Chang vd., 2015). Ek olarak, miRNA'ları hedefleyen en az iki farklı sgRNA tasarlanacaktır.	3	2	6
İP 5	Western Blot tekniği için gerekli spesifik antikor bulunmaması	Bu durumda, metodoloji değiştirilerek miRNA ekspresyon analizi qRT-PCR ile tespit edilecektir. Hedef mRNA anlatımları da bakılarak, kontrol grubuyla karşılaştırma yapılarak susturulmuş miRNA etkisi de incelenecektir.	3	2	6
İP 7	IVF sonrası hamilelik durumunun gerçekleřmemesi	Bu durumu önlemek için embryo transferi için seçilecek ineklerin sağlık kontrolleri kapsamlı olarak	3	4	12

		yapılarak karşılaşılabilecek bu riski minimuma indirmek için veteriner hekim yardımıyla gerekli tüm işlemler gerçekleştirilecektir. Birden fazla embriyo transferi de olası riski düşürecek potansiyelindedir. Ek olarak, IVF ile ineklerin oluşturulması ülkemizde de yapılan çalışmalar dahil olmak üzere optimizasyonu yapılmış farklı teknikler mevcuttur. Böyle bir durumla karşı karşıya gelindiğinde veteriner hekimlerle görüşülerek hormon takviyeleri uygulanabilir.			
İP 8	Transgenik canlının dış faktörler sebebinde hayatını sürdürememesi	Bu durumu engellemek için düzenli veteriner kontrolleri ile optimal koşullarda canlıların doğal ortamlarında yaşamlarını sürdürmesi sağlanacaktır.	5	2	10
İP 8	Genlerin düzenli olmayan anlatımı sonucunda gen ürünlerinin üretiminde artış veya azalış gözlemlenmesi	<i>In silico</i> olarak baskılanacak onkomiR'lerin yer aldığı yollar ve hedef genler belirlenerek, olarak en az yan etkiye sahip miRNA'lar seçileceği için bu risk azalacaktır.	4	2	8

10. Kaynaklar (5 puan)

- Auerbach, A., Vyas, G., Li, A., Halushka, M., & Witwer, K. (2016). Uptake of dietary milk miRNAs by adult humans: a validation study. *F1000Research*, 5, 721.
- Azizzadeh, M., Shooroki, H. F., Kamalabadi, A. S., & Stevenson, M. A. (2012). Factors affecting calf mortality in Iranian Holstein dairy herds. *Preventive veterinary medicine*, 104(3-4), 335–340.
- Baier, S. R., Nguyen, C., Xie, F., Wood, J. R., & Zemleni, J. (2014). MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *The Journal of nutrition*, 144(10), 1495–1500.
- Benmoussa, A., Laugier, J., Beuparlant, C. J., Lambert, M., Droit, A., & Provost, P. (2020). Complexity of the microRNA transcriptome of cow milk and milk-derived extracellular vesicles isolated via differential ultracentrifugation. *Journal of dairy science*, 103(1), 16–29.
- Chang, H., Yi, B., Ma, R., Zhang, X., Zhao, H., & Xi, Y. (2016). CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Scientific reports*, 6, 22312.
- Chen, L., Luo, L., Chen, W., Xu, H. X., Chen, F., Chen, L. Z., Zeng, W. T., Chen, J. S., & Huang, X. H. (2016). MicroRNA-24 increases hepatocellular carcinoma cell metastasis and invasion by targeting p53: miR-24 targeted p53. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 84, 1113–1118.
- Chen, Q., Zhang, F., Dong, L., Wu, H., Xu, J., Li, H., Wang, J., Zhou, Z., Liu, C., Wang, Y., Liu, Y., Lu, L., Wang, C., Liu, M., Chen, X., Wang, C., Zhang, C., Li, D., Zen, K., Wang, F., ... Zhang, C. Y. (2021). SIDT1-dependent absorption in the stomach mediates host uptake of dietary and orally administered microRNAs. *Cell research*, 31(3), 247–258.
- Chen, R., Sheng, L., Zhang, H. J., Ji, M., & Qian, W. Q. (2018). miR-15b-5p facilitates the tumorigenicity by targeting RECK and predicts tumour recurrence in prostate cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(3), 1855–1863.
- Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., Tian, C., Gao, S., Dong, H., Guan, D., Hu, X., Zhao, S., Li, L., Zhu, L., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell research*, 20(10), 1128–1137.
- Chen, X., Lin, Z. F., Xi, W. J., Wang, W., Zhang, D., Yang, F., Li, Y. F., Huo, Y., Zhang, T. Z., Jiang, Y. H., Qin, W. W., Yang, A. G., & Wang, T. (2019). DNA methylation-regulated and tumor-suppressive roles of miR-487b in colorectal cancer via targeting MYC, SUZ12, and KRAS. *Cancer medicine*, 8(4), 1694–1709.
- Chen, X., Yang, Y., Shi, Z., Gao, M. Q., & Zhang, Y. (2016). Effects of Genetically Modified Milk Containing Human Beta-Defensin-3 on Gastrointestinal Health of Mice. *PloS one*, 11(7), e0159700.

12. Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., Nguyen, T. H., Cr n guy, A., Brusselle, L., Ane n, I., & Menchaca, A. (2015). Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PloS one*, 10(8), e0136690.
13. Cui, M., Wang, H., Yao, X., Zhang, D., Xie, Y., Cui, R., & Zhang, X. (2019). Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Frontiers in genetics*, 10, 626.
14. Fabris, L., & Calin, G. A. (2016). Circulating free xeno-microRNAs - The new kids on the block. *Molecular oncology*, 10(3), 503–508.
15. Ferr , L. B., Kjelland, M. E., Str bech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal : an international journal of animal bioscience*, 14(5), 991–1004.
16. Fontana, A., Barbano, R., Dama, E., Pasculli, B., Rendina, M., Morritti, M. G., Melocchi, V., Castelveter, M., Valori, V. M., Ravaioli, S., Bravaccini, S., Ciuffreda, L., Graziano, P., Maiello, E., Copetti, M., Fazio, V. M., Esteller, M., Bianchi, F., & Parrella, P. (2021). Combined analysis of miR-200 family and its significance for breast cancer. *Scientific reports*, 11(1), 2980.
17. Franchina, T., Amodeo, V., Bronte, G., Savio, G., Ricciardi, G. R., Picciotto, M., Russo, A., Giordano, A., & Adamo, V. (2014). Circulating miR-22, miR-24 and miR-34a as novel predictive biomarkers to pemetrexed-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of cellular physiology*, 229(1), 97–99.
18. G ndoĝan, M. (1998). İneklerde in vitro Fertilizasyon (Derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi* , 38 (2) , 103-115 .
19. Hasler J. F. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56(9), 1401–1415.
20. Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., & Takase, M. (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of dairy science*, 95(9), 4831–4841.
21. Izumi, H., Tsuda, M., Sato, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., Iwamoto, H., Namba, K., & Takeda, Y. (2015). Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *Journal of dairy science*, 98(5), 2920–2933.
22. Jiao, D., Yan, Y., Shui, S., Wu, G., Ren, J., Wang, Y., & Han, X. (2017). miR-106b regulates the 5-fluorouracil resistance by targeting Zbtb7a in cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, 8(32), 52913–52922.
23. Kang, M., Xiao, J., Wang, J., Zhou, P., Wei, T., Zhao, T., & Wang, R. (2016). MiR-24 enhances radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma by targeting SP1. *Cancer medicine*, 5(6), 1163–1173.
24. Khoshinani, H. M., Afshar, S., Pashaki, A. S., Mahdavinzhad, A., Nikzad, S., Najafi, R., Amini, R., Gholami, M. H., Khoshghadam, A., & Saidijam, M. (2017). Involvement of miR-155/FOXO3a and miR-222/PTEN in acquired radioresistance of colorectal cancer cell line. *Japanese journal of radiology*, 35(11), 664–672.
25. Koga, Y., Yamazaki, N., Yamamoto, Y., Yamamoto, S., Saito, N., Kakugawa, Y., Otake, Y., Matsumoto, M., & Matsumura, Y. (2013). Fecal miR-106a is a useful marker for colorectal cancer patients with false-negative results in immunochemical fecal occult blood test. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 22(10), 1844–1852.
26. Kumar, D., Kumar, S., Ayachit, G., Bhairappanavar, S. B., Ansari, A., Sharma, P., Soni, S., & Das, J. (2017). Cross-Kingdom Regulation of Putative miRNAs Derived from Happy Tree in Cancer Pathway: A Systems Biology Approach. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1191.
27. Li, F., Cowley, D. O., Banner, D., Holle, E., Zhang, L., & Su, L. (2014). Efficient genetic manipulation of the NOD-Rag1-/-IL2RgammaC-null mouse by combining in vitro fertilization and CRISPR/Cas9 technology. *Scientific reports*, 4, 5290.
28. Li, H., Zhang, J., Lee, M. J., Yu, G. R., Han, X., & Kim, D. G. (2017). OIP5, a target of miR-15b-5p, regulates hepatocellular carcinoma growth and metastasis through the AKT/mTORC1 and β -catenin signaling pathways. *Oncotarget*, 8(11), 18129–18144.
29. Li, J., , Lei, L., , Ye, F., , Zhou, Y., , Chang, H., , & Zhao, G., (2019). Nutritive implications of dietary microRNAs: facts, controversies, and perspectives. *Food & function*, 10(6), 3044–3056.
30. Li, X., Chen, S. H., & Zeng, J. W. (2020). MiR-421 Is Overexpressed and Promotes Cell Proliferation in Non-Small Cell Lung Cancer. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 29(1), 80–89.
31. Lu, K., Wang, J., Song, Y., Zhao, S., Liu, H., Tang, D., Pan, B., Zhao, H., & Zhang, Q. (2015). miRNA-24-3p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in human breast cancer by targeting p27Kip1. *Oncology reports*, 34(2), 995–1002.
32. Ma, H. L., Wen, X. P., Zhang, X. Z., Wang, X. L., Zhao, D. L., Che, S. M., & Dang, C. X. (2015). miR-106a* inhibits the proliferation of esophageal carcinoma cells by targeting CDK2-associated Cullin 1 (CACUL1). *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 61(4), 56–62.
33. Maghsudlu, M., Farashahi Yazd, E., & Amirani, T. (2020). Increased Expression of MiR-27a and MiR-24-2 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of gastrointestinal cancer*, 51(1), 227–233.
34. Manca, S., Upadhyaya, B., Mutai, E., Desaulniers, A. T., Cederberg, R. A., White, B. R., & Zemleni, J. (2018). Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns. *Scientific reports*, 8(1), 11321.
35. Morotti, F., Sanches, B. V., Pontes, J. H., Basso, A. C., Siqueira, E. R., Lisboa, L. A., & Seneda, M. M. (2014). Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos*

- taurus cattle. *Theriogenology*, 81(5), 696–701.
36. Pan, Y., Jiao, G., Wang, C., Yang, J., & Yang, W. (2016). MicroRNA-421 inhibits breast cancer metastasis by targeting metastasis associated 1. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 83, 1398–1406.
 37. Parrish J. J. (2014). Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67–73.
 38. Patel, M., Mangukia, N., Jha, N., Gadhavi, H., Shah, K., Patel, S., Mankad, A., Pandya, H., & Rawal, R. (2019). Computational identification of miRNA and their cross kingdom targets from expressed sequence tags of *Ocimum basilicum*. *Molecular biology reports*, 46(3), 2979–2995.
 39. Pezuk, J. A., Salomão, K. B., Baroni, M., Pereira, C. A., Geron, L., & Brassesco, M. S. (2019). Aberrantly expressed microRNAs and their implications in childhood central nervous system tumors. *Cancer metastasis reviews*, 38(4), 813–828.
 40. Pirim, D., & Dogan, B. (2020). In silico identification of putative roles of food-derived xeno-mirs on diet-associated cancer. *Nutrition and cancer*, 72(3), 481–488.
 41. Qu, Y., Zhang, H., Sun, W., Han, Y., Li, S., Qu, Y., Ying, G., & Ba, Y. (2018). MicroRNA-155 promotes gastric cancer growth and invasion by negatively regulating transforming growth factor- β receptor 2. *Cancer science*, 109(3), 618–628.
 42. Rani, P., V. R. Yenuganti, S. Shandilya, S. K. Onteru, and D. Singh. 2017. miRNAs: The hidden bioactive component of milk. *Trends Food Sci. Technol.* 65:94–102.
 43. Sagar, S.K. (2021). miR-106b as an emerging therapeutic target in cancer. *Genes and Diseases*.
 44. Shao, C., Yang, F., Qin, Z., Jing, X., Shu, Y., & Shen, H. (2019). The value of miR-155 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *BMC cancer*, 19(1), 1103.
 45. Sheetal, S.K., Pandey, N. K. J., Prasad, S., Gupta, H.P. (2015). Embryo Transfer in Cattle- Advantages and Disadvantages. *Indian farmer*, 2, 116-120.
 46. Shu, J., Chiang, K., Zemleni, J., & Cui, J. (2015). Computational Characterization of Exogenous MicroRNAs that Can Be Transferred into Human Circulation. *PloS one*, 10(11), e0140587.
 47. Sun, L. N., Zhi, Z., Chen, L. Y., Zhou, Q., Li, X. M., Gan, W. J., Chen, S., Yang, M., Liu, Y., Shen, T., Xu, Y., & Li, J. M. (2017). SIRT1 suppresses colorectal cancer metastasis by transcriptional repression of miR-15b-5p. *Cancer letters*, 409, 104–115.
 48. Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer research*, 76(13), 3666–3670.
 49. Tian, Y., Sun, C., Zhang, L., & Pan, Y. (2018). Clinical significance of miRNA - 106a in non-small cell lung cancer patients who received cisplatin combined with gemcitabine chemotherapy. *Cancer biology & medicine*, 15(2), 157–164.
 50. Tölle, A., Buckendahl, L., & Jung, K. (2019). Plasma miR-15b-5p and miR-590-5p for distinguishing patients with bladder cancer from healthy individuals. *Oncology reports*, 42(4), 1609–1620.
 51. Wang, J., Guo, J., & Fan, H. (2019). MiR-155 regulates the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells through targeting SOCS3. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(12), 5168–5175.
 52. Wang, S., Liu, N., Tang, Q., Sheng, H., Long, S., & Wu, W. (2020). MicroRNA-24 in Cancer: A Double Side Medal With Opposite Properties. *Frontiers in oncology*, 10, 553714.
 53. Wang, Z., Liu, M., Zhu, H., Zhang, W., He, S., Hu, C., Quan, L., Bai, J., & Xu, N. (2013). miR-106a is frequently upregulated in gastric cancer and inhibits the extrinsic apoptotic pathway by targeting FAS. *Molecular carcinogenesis*, 52(8), 634–646.
 54. Whitelaw, C. B., Joshi, A., Kumar, S., Lillico, S. G., & Proudfoot, C. (2016). Genetically engineering milk. *The Journal of dairy research*, 83(1), 3–11.
 55. Wolf, T., Baier, S. R., & Zemleni, J. (2015). The Intestinal Transport of Bovine Milk Exosomes Is Mediated by Endocytosis in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells and Rat Small Intestinal IEC-6 Cells. *The Journal of nutrition*, 145(10), 2201–2206.
 56. Wu, B., Liu, G., Jin, Y., Yang, T., Zhang, D., Ding, L., Zhou, F., Pan, Y., & Wei, Y. (2020). miR-15b-5p Promotes Growth and Metastasis in Breast Cancer by Targeting HPSE2. *Frontiers in oncology*, 10, 108.
 57. Xi, S., Xu, H., Shan, J., Tao, Y., Hong, J. A., Inchauste, S., Zhang, M., Kunst, T. F., Mercedes, L., & Schrupp, D. S. (2013). Cigarette smoke mediates epigenetic repression of miR-487b during pulmonary carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 123(3), 1241–1261.
 58. Xu, P., Fotina, H., Fotina, T., & Wang, S. (2021). In vitro culture and evaluation of bovine mammary epithelial cells from Ukraine dairy cows. *Iranian journal of veterinary research*, 22(1), 65–71.
 59. Yang, R., Xu, J., Hua, X., Tian, Z., Xie, Q., Li, J., Jiang, G., Cohen, M., Sun, H., & Huang, C. (2020). Overexpressed miR-200a promotes bladder cancer invasion through direct regulating Dicer/miR-16/JNK2/MMP-2 axis. *Oncogene*, 39(9), 1983–1996.
 60. Yu, S., Qin, X., Chen, T., Zhou, L., Xu, X., & Feng, J. (2017). MicroRNA-106b-5p regulates cisplatin chemosensitivity by targeting polycystic kidney disease-2 in non-small-cell lung cancer. *Anti-cancer drugs*, 28(8), 852–860.
 61. Zhang, H., Wang, Y., Chang, Y., Luo, H., Brito, L. F., Dong, Y., Shi, R., Wang, Y., Dong, G., & Liu, L. (2019). Mortality-Culling Rates of Dairy Calves and Replacement Heifers and Its Risk Factors in Holstein Cattle. *Animals : an open access journal from MDPI*, 9(10), 730.
 62. Zhang, L., Chen, T., Yin, Y., Zhang, C. Y., & Zhang, Y. L. (2019). Dietary microRNA-A Novel Functional Component of

Food. Advances in nutrition (Bethesda, Md.), 10(4), 711–721.

63. Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., ... Zhang, C. Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell research*, 22(1), 107–126.
64. Zhang, X. F., Tu, R., Li, K., Ye, P., & Cui, X. (2017). Tumor Suppressor PTPRJ Is a Target of miR-155 in Colorectal Cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 118(10), 3391–3400.
65. Zhao, C., Li, Y., Chen, G., Wang, F., Shen, Z., & Zhou, R. (2017). Overexpression of miR-15b-5p promotes gastric cancer metastasis by regulating PAQR3. *Oncology reports*, 38(1), 352–358.
66. Zhou, Y., Cheng, X., Wan, Y., Chen, T., Zhou, Q., Wang, Z., & Zhu, H. (2020). MicroRNA-421 Inhibits Apoptosis by Downregulating Caspase-3 in Human Colorectal Cancer. *Cancer management and research*, 12, 7579–7587.
67. Zuo, J., Yu, Y., Zhu, M., Jing, W., Yu, M., Chai, H., Liang, C., & Tu, J. (2018). Inhibition of miR-155, a therapeutic target for breast cancer, prevented in cancer stem cell formation. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 21(2), 383–392.

RAPOR TASLAKLARI İLE İLGİLİ NOT:

- Yukarıda yer alan 10 madde en fazla 16 (on altı) sayfada anlatılacaktır.
- Kapak ve içerik olmak üzere en fazla 17 sayfa olacaktır.
- Tüm raporlar akademik rapor standartlarına uygun olarak yazılmalıdır.
- Her rapor bir kapak sayfası içermelidir.
- Yazı tipi: Times New Roman, Punto: 12, Satır Aralıkları: 1,15, iki tarafa yaslı, sayfa kenar boşlukları üst-alt-sağ-sol 2,5 cm olmalıdır. Cilt payı bırakılması gerekmemektedir.
- Rapor içindeki cümleler birbirinin aynı ve tekrarı niteliğinde olmamalıdır.
- Kaynaklardan alınan cümleler ve ifadeler proje rapor yazarının uyarlamalarına sahip olmalı kopyala – yapıştır ile doğrudan alınan cümlelere yer verilmemelidir.
- Raporunda, Web sitemizde yer alan Geçmiş yıl Raporlarından yararlanmış olan takımlarımız alıntı yaptığını ilgili sayfada belirtmesi gerekmektedir. Açıklamayı alıntı yapılan cümlenin ardından belirtmeniz gerekmektedir. ALINTI FORMATI: "Alıntı yapılan Cümle/ler" (Yıl, Yarışma Adı, Kategori, Takım Adı) ÖRNEK ALINTI: "Enkazda depremzedenin nerede olduğunu tespit edilememesi, enkaz kaldırma ve depremzede arama çalışmalarını yavaşlatan en önemli sorundur." (2020, İnsanlık Yararına Teknoloji Yarışması, Afet Yönetimi, X Takımı)