EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BAKLA (*Vicia faba*) BİTKİSİNDE mikroRNA VE HEDEFLERİNİN *in silico* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dilek KOPTEKİN

Tez Danışmanı: Doç Dr. Lale AKTAŞ

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.03.00

Sunuş Tarihi: 15.05.2015

Bornova-İZMİR

2015

Dilek KOPTEKİN tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak sunulan **"Bakla (*Vicia faba*) bitkisinde mikroRNA ve hedeflerinin *in silico* yöntemlerle araştırılması"** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **15.05.2015** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri: **İmza**

Jüri Başkanı **:** Doç. Dr. Lale AKTAŞ

Raportör Üye **:** Doç. Dr. Nehir Ö. ÖZGENTÜRK

Üye **:** Doç. Dr. Nurşen A. KESKİN

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **"Bakla (*Vicia faba*) bitkisinde mikroRNA ve hedeflerinin *in silico* yöntemlerle araştırılması"** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15.05.2015

Dilek KOPTEKİN

ÖZET

BAKLA (*Vicia faba)* BİTKİSİNDE mikroRNA ve HEDEFLERİNİN *in silico* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

KOPTEKİN, Dilek

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Lale AKTAŞ

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Mayıs 2015, 108 sayfa

mikroRNA (miRNA)'lar ökaryotik hücrelerde bulunan, endojen, kodlama yapmayan, ortalama 21 nükleotid uzunluğunda kısa RNA'lardır. Şimdiye kadar, deneysel ve bilgisayar temelli yaklaşımlarla birçok bitkide tanımlanmış olan işlevsel miRNA'lar, mRNA yıkımını yönlendirerek veya translasyonu baskılayarak; bitki büyümesi, gelişmesi ve strese verilen cevaplarda önemli rol oynarlar. Fakat, insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir protein kaynağı olarak yaygın kullanılan bakla bitkisine (*Vicia faba*) ait herhangi bir miRNA bugüne dek tanımlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı; korunmuş bitki miRNA'larını bakla bitkisinde homoloji analizi ile tanımlamaktır. Bilgisayar temelli bir yaklaşım olan EST temelli homoloji analizi kullanılarak, 143 miRNA gen ailesine ait olası 262 bakla miRNA'sı; 20697 ifade edilen dizi etiketi (EST) ve 577 genom araştırma dizisi (GSS) kullanılarak tanımlanmıştır. Olası miRNA'lar; miRNA ikincil yapısı ve miRNA biyogenezi kriterlerine uygun bir şekilde belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, bakla EST'leri kullanılarak olası miRNA'ların hedef tahmini yapılmış ve bu EST'lerin bazılarının gelişim, metabolizma, taşınım, sinyal iletimi ve stres cevabı gibi birçok önemli biyolojik süreci düzenleyen genlerden kodlandığı tahmin edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları; gelecekte yapılacak miRNA çalışmalarında ve bakla bitkisinde miRNA'ların rol oynadığı biyolojik süreçler ile bu süreçlerin altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: mikroRNA, Vicia faba, bakla, EST analizi, Homoloji analizi, *in silico*

ABSTRACT

In silico ANALYSIS microRNAs AND THEIR TARGETS IN FABA BEAN (*Vicia faba*)

KOPTEKİN, Dilek

MSc in Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Lale AKTAŞ

Co-Supervisor: Prof. Dr. Cemal ÜN

May 2015, 108 pages

microRNAs (miRNAs) are a class of endogenous, non-coding short RNAs, around 21 nucleotides (nt) in length found in eukaryotic cells. To date, they are identified in several plants through experimental and computational approaches where they play important roles in growth, development and stress responses by guiding mRNA cleavage or by repressing translation. However, not a single miRNA has been identified in faba bean (*Vicia faba*) up till now, which is an important source of protein widely used for human and animal nutrition. The aim of this study is to identify conserved plant miRNAs in faba bean by using homology analysis. 262 candidate miRNAs belonging to 143 miRNA families in faba bean from 20697 expressed sequence tags (EST) and 577 genome survey sequences (GSS) have been found through computational identification of miRNAs using EST based homology analysis approach. All candidate miRNAs were recognised following the miRNA criteria of secondary structure and biogenesis. Moreover, potential targets of these candidate miRNAs were predicted from faba bean ESTs, some of which seem to encode genes in regulation several important biological processes such as development, metabolism, transport, signal transduction and stress response. The results of this study will contribute to further research on miRNAs, leading to an improved understanding of the role miRNAs play in biological processes and the underlying molecular mechanisms of faba bean.

Keywords: microRNA, *Vicia faba*, faba bean, EST analysis, homology analysis, *in silico*

TEŞEKKÜR

Araştırmanın her aşamasında önerileri ve değerlendirmeleri ile sunduğu katkıdan ötürü tez danışmanım Doç. Dr. Lale Aktaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının her aşamasında bana destek veren ve yardımlarını esirgemeyen Alişen Erdoğan, Enes Ateş ve Tuncay Doğan nezdinde tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

En derin teşekkürlerimi her zaman yanımda olan, hayatımın her aşamasında desteklerini eksik etmeyen ve beni hep yüreklendiren annem Sevim ve kardeşlerim Nurcan, Devrim, Hamit, Fatoş ve Derya'ya sunmak isterim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vii

ABSTRACT ix

TEŞEKKÜR xi

ŞEKİLLER DİZİNİ xv

ÇİZELGELER DİZİNİ xix

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xxi

1. GİRİŞ 1

1.1 Düzenleyici RNA'lar ve RNA Susturma 1

1.2 mikroRNA (miRNA) 3

1.2.1 Bitki miRNA'larının biyogenezi 5

1.2.2 Bitki miRNA genlerinin evrimsel kökeni 9

1.2.3 Analiz yöntemleri 20

1.3 Bakla Bitkisi (*Vicia faba* L.) 23

2. MATERYAL VE METOT 29

2.1 Dizi Verileri ve Referans miRNA'lar 29

2.2 Olası Bakla miRNA'larının Tanımlanması 29

2.3 Olası Bakla miRNA'larının İsimlendirilmesi 31

2.4 Tanımlanan miRNA'larının Hedef Tahminleri 32

2.5 miRNA Hedef Genlerinin İşlev Tanımlaması ve Yolak Analizi 33

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. BULGULAR 35

3.1 Dizi Verileri ve Referans miRNA'lar 35

3.2 Olası Bakla miRNA'larının Tanımlanması 35

3.3 miRNA Hedef Genlerinin İşlev Tanımlaması ve Yolak Analizi 43

4. SONUÇ VE TARTIŞMA 47

EK AÇIKLAMALAR 53

Ek Açıklamalar A 53

Ek Açıklamalar B 78

Ek Açıklamalar C 90

KAYNAKLAR DİZİNİ 93

ÖZGEÇMİŞ 109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Sayfa

1.1 mikroRNA ile ilgili yapılan yayınların (NCBI-Pubmed, 2014) ve miRBase veri bankasına yüklenmiş miRNA sayılarının yıllara göre dağılımı (miRBase, 2014). 4

1.2 Bitkilerde miRNA biyogenezinde önemli adımların özeti (Bologna, et al., 2013) 7

1.3 Hayvan ve bitkilerde, işlevsel mikroRNA / hedef eşleşme örüntüleri (Axtell, 2013). 8

1.4 Bitkilerde (siyah oklar) miRNA genlerinin evrimsel kökenini gösteren olası mekanizmaların, *Drosophila* türleriyle (gri oklar) karşılaştırmalı olarak gösterilmesi. Okların kalınlığı önerilen mekanizmaların gözlenme sıklığını belirtmektedir (Nozawa, et al., 2012). 9

1.5 Bitki miRNA'larının evrimi (Voinnet, 2009). 10

1.6 miRBase (Sürüm 16, Ağustos 2010) verilerine göre oluşturulmuş tablo, bitki aileleri (satırlar) arasında korunmuş miRNA genlerini (sütunlar) göstermektedir. Türe ya da familyaya özgü miRNA genleri tabloya dahil edilmemiştir. Gri ile renklendirilmiş kutulardaki bitki familyalarının söz konusu miRNA gen ailelerini kaybetmiş olabileceği belirtilmiştir. Farklı renklerle vurgulanmış miRNA gen aileleri ise tanımlandıkları taksonomik hattı göstermektedir (Cuperus, et al., 2011). 12

1.7 *Arabidopsis*'de korunmuş miRNA gen aileleri ile diğer bitkiler arasındaki ilişki (Fahlgren, et al., 2010). 15

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

1.8 Atasal türlerdeki a) miRNA genleri ve b) gen aileleri ile bitki evrimi boyunca kazanılmış ya da kaybedilmiş miRNA genleri/gen ailelerinin sayısının hesaplanması. Karelerin içindeki sayılar, atasal ya da bugün hala var olan türlerdeki miRNA genleri veya gen ailelerinin sayısını belirtmektedir. Dalların üzerindeki sayılar, kazanılmış (+) ve kaybedilmiş (-) miRNA genleri ve gen ailelerinin sayısını belirtmektedir. Parantez içinde belirtilmiş (+) sayılar ise protein kodlayan genlerden oluşmuş olma potansiyeli taşıyan kazanılmış miRNA gen ailelerinin sayısını belirtmektedir (Nozawa, et al., 2012)....17

1.9 miR160 dizisi ve hedef bölgeleri farklı bitki türleri arasında filogenetik olarak korunmuştur. *A. thaliana, O. sativa, P. patens,* ve *S. moellendorfii*'deki ARF mRNA fragmentlerinin miR160 ile eşleşme gösterdiği fragmentler yukarıda belirtilmiştir. Mavi ile işaretlenmiş bazlar, dizinin %75'den fazlasını sunmaktadır. Aşağı bölümde ise, aynı türde ifade olan miR160 dizileri gösterilmektedir (Jones-Rhoades, 2012). 18

1.10 miRNA'ların klonlanması ve dizilimlenmesi Lu, et al., 2007; Eminaga, et al., 2013'den değiştirilerek alınmıştır. 21

1.11 EST analizinin iş akış özeti. 24

1.12 a) 1993 – 2003 yılları arasında Dünya'da üretilen bakla miktarlarındaki değişim b) Dünya'da baklanın üretildiği bölgeler ve bu bölgelerin bakla üretim oranları (FAOSTAT, 2015). 25

1.13 1993 – 2003 yılları arasında Dünya genelinde bakla verimliliğindeki değişim (FAOSTAT, 2015).....26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

1.14 a) Dünya'da ve b) Türkiye'de baklanın hasat edilen alan, üretim ve verimliliğindeki değişim (FAOSTAT, 2015).....26

2.1 Kriterlere uygun bir pre-miRNA'nın; sap ilmik (stem-loop) ya da saç tokası (hairpin) yapısı. 31

3.1 Olası bakla miRNA'ların ortolog miRNA'larla gösterdikleri yanlış eşleşme gösteren nükleotid sayıları. 41

3.2 Tanımlanmış olası işlevsel bakla miRNA'ların uzunluk dağılımları. 41

3.3 Tanımlanmış olası işlevsel bakla miRNA dizilerinin nükleotid dağılımları. 42

3.4 Tanımlanmış olası bakla pre-miRNA'ların uzunluk dağılımları. 42

3.5 Tanımlanmış olası bakla pre-miRNA'ların G+C nükleotid içerik dağılımları. 43

3.6 Olası bakla miRNA'larının rol oynadıkları a) biyolojik süreçler ve b) moleküler işlevler. Grafikteki renkler terimlerin yoğunluğunu temsil ederken, boyutlar terimlerin logaritmik boyutunu belirtmektedir.....45

4.1 Tanımlanmış olası bakla miRNA'ların ve miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait miRNA'larının uzunluk dağılımları.....49

4.2 miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait miRNA dizilerinin nükleotid dağılımları. 49

4.3 Tanımlanmış bakla pre-miRNA'ların ve miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait pre-miRNA'larının uzunluk dağılımları. 50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

4.4 Tanımlanmış olası bakla miRNA'ların ve miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait miRNA'larının G+C nükleotid içerik dağılımları. 51

A.1 Olası bakla pre-miRNA'larının ikincil yapıları. 53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge Sayfa

3.1 Tanımlanmış olası bakla miRNA'larının karakterizasyonu. D, Tanımlandıkları dizi; E, EST; G, GSS; S, bulundukları zincir; M, eşleşmeme sayısı; A, pre-miRNA üzerinde hangi kolda bulundukları; LM, işlevsel miRNA uzunluğu; LP, pre-miRNA uzunluğunu belirtmektedir. *, işaretinin bulunduğu sütunlardaki sayılar negatiftir.... 36

B.1 Hedef gen olarak kabul edilen EST dizilerinin işlev analiz sonuçları. Tabloda verilen GO çıktıları; P, biyolojik süreç; F, moleküler işlev; C, hücre bileşeni olarak kategorize edilmiştir. I, inhibisyon; Y, yıkım; B, baskılamayı belirtmektedir. Enzim olduğu belirlenen EST dizileri * işareti ile belirtilmiştir, bu dizilerin enzim kodları ve metabolik yolak analiz sonuçları Çizelge B.2'de verilmiştir. 78

B.2 Enzim olduğu belirlenen EST dizilerinin enzim kodları ve rol oynadıkları metabolik yolaklar 88

C.1 BLASTX analizine göre protein kodlayan diziler üzerinde konumlanan olası bakla miRNA'ları. 90

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
ΔG	Serbestlik Enerjisi
3'UTR	3' translasyonu olmayan bölge
A	Adenin
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
AGO	Argonaut
AMFE	Düzenlenmiş Minimum Katlanma Enerjisi
bp	Baz Çifti
C	Sitozin
C. elegans	*Caenorhabtidis elegans*
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CHS	Kalkon (chalcone) Sentaz
cRNA	kodlama yapan RNA
D-bodies	Dicing-cisimciği
DCL	Dicer-benzeri
DDL	DAWDLE
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dsRNA	Çift Zincirli RNA

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
EC	Enzim Kodları
EST	İfade Edilen Dizi Etiketi
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
g	Gram
G	Guanin
GO	Gen Ontoloji
GSS	Genom Araştırma Dizileri
HEN1	HUA ENHANCER1
HST	HASTY
HTGS	Yüksek Verimli Genomik Dizi
HYL1	HYPONASTICLEAVES1
KEGG	Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
kg	Kilogram
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDLRAP1	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör Adaptor Protein 1
MFE	Minimum Katlanma Enerjisi
MFEI	Minimum Katlanma Enerji İndeksi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
MITE	Minyatür İnvert Tekrarlı Yer Değiştirebilen Element
miRNA	mikroRNA
mRNA	haberci RNA
ncRNA	kodlama yapmayan RNA
Poli-A	Polyadenilat
pre-miRNA	öncül miRNA
pri-miRNA	primer miRNA
PTGS	Post–Transkripsiyonel Gen Susturma
RISC	RNA-Uyarımlı Susturma Kompleksi
RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA Engelleme
RNAaz	Ribonükleaz
rRNA	ribozomal RNA
SE	SERRATE
sin	Sinonim
siRNA	küçük engelleyici RNA
snoRNA	küçük nükleolar RNA

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
snRNA	küçük nüklear RNA
T	Timin
TE	Transpozon
TGS	Transkripsiyonel Gen Susturma
tRNA	taşıyıcı RNA
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Urasil
V.faba	*Vicia faba*

1. GİRİŞ

Bitki genom çalışmaları son on yılda önemli oranda artmıştır. Model bitki olan *Arabidopsis thaliana* genomunun 2000 yılında dizilimlenmesinden (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) bu yana; pirinç (International Rice Genome Sequencing Project, 2005), mısır (Schnabl, et al., 2009), soya fasulyesi (Schmutz, et al., 2010), domates (The Tomato Genome Consortium, 2012) ve buğday (Brenchley, et al., 2012) gibi birçok önemli tarım bitkisinin genom dizilimleri çıkarılmıştır. Yeni nesil dizilim teknolojilerinin geliştirilmesiyle bitki genomik dizilerine ait veriler de hızla artmaya devam etmektedir.

Genom çalışmaları yaygınlaşmadan önce; birçok bilim insanı organizmanın genom uzunluğunun, karmaşıklık düzeyiyle ilişkili olduğuna inanmaktaydı. Fakat birçok organizmanın genom dizilimlerinin ortaya çıkarılması ve nasıl evrildiği üzerine yapılan çalışmalar, organizmanın genom uzunluğunun gözlenen morfolojik karmaşıklığı ya da evrimsel düzeyi ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Genom çalışmaları sonucunda, protein kodlayan gen sayısının tahmin edilenin çok altında olduğu, genomun küçük bir yüzdesini kapsadığı ve DNA'nın büyük bir kısmının kodlama yapmadığı gözlenmiştir.

DNA'nın büyük bir kısmını oluşturan protein kodlamayan bölgelerin, evrimsel fosiller olarak genomda zamanla biriktiği ve biyolojik bir işlevi olmadığı düşünüldüğünden, bu bölgeler "çöp (junk) DNA" olarak tanımlanmıştır. Fakat daha sonra yapılan çalışmalar, DNA'daki bu kodlama yapmayan bölgelerin de işlevsel olabildiğini ve bir kısmının RNA'lar aracılığı ile gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermiştir.

1.1 Düzenleyici RNA'lar ve RNA Susturma

RNA molekülleri, hücrede protein üretimine olanak sağlamanın yanı sıra, proteinin ne zaman ve ne kadar üretileceğini de düzenlerler. DNA'da depolanmış genetik bilginin proteine çevrilmesini sağlayan şifreye sahip RNA; kodlama yapan RNA (cRNA) ya da haberci RNA (mRNA) olarak (Crick, 1968), protein üretimini düzenleyen RNA'lar ise kodlama yapmayan RNA (ncRNA)'lar olarak kategorize edilmektedir (Zamore, et al., 2000). Kodlama yapmayan RNA'lar arasında ilk

olarak, daha uzun olan taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) saptanmıştır. Bunlardan tRNA, protein sentezinde RNA kodonlarını aminoasitlere çevirme görevi gören adaptör molekül olarak yer alırken; rRNA, translasyonun gerçekleştiği ribozomların yapı ve işlevinde önemli rol oynamaktadır (Crick, 1968). Ayrıca küçük nüklear RNA (snRNA)'lar intron bölgelerinin uzaklaştırılmasında görev alırken, küçük nükleolar RNA (snoRNA)'lar da diğer RNA'ların biyogenezinde rol oynamaktadır (Brown, et al., 2008).

Kodlama yapmayan RNA'ların yeni sınıfı olan küçük RNA (sRNA)'lar ise son yirmi yılda keşfedilmişlerdir. Uzunlukları 18-30 nükleotid arasında değişkenlik gösteren sRNA'lar (Zamore, et al., 2000) bitkilerden (Waterhouse,, et al., 1998; Hamilton and Baulcombe, 1999) hayvanlara (Lee, et al., 1993), virüslerden (Umbach, et al., 2008) tek hücreli canlılara (Drinnenberg, et al., 2009) kadar birçok organizmada tanımlanmıştır.

Gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan sRNA'ların düzenlediği süreç "**RNA susturma**" olarak tanımlanmaktadır. RNA susturma, transkripsiyonel (TGS) veya post–transkripsiyonel düzeylerde (PTGS) gen ifadesinin baskılanmasını sağlayabilmektedir. TGS'de, DNA metilasyonu (Daxinger, et al., 2009) ve kromatin modifikasyonu (Verdel, et al., 2004) aracılığıyla transkripsiyon engellenirken; PTGS'de mRNA, ya yıkıma yönlendirilir ya da translasyonu baskılanır (Humphreys, et al., 2005). Bu yönüyle, RNA susturma mekanizmalarının bitkilerde; büyüme, gelişim, farklılaşma, strese verilen cevaplar, heterokromatin oluşumu ve transpozonların baskılanması gibi çok sayıda biyolojik sürecin düzenlemesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Parent, et al., 2012; Incarbone and Dunoyer, 2013).

RNA susturma, ilk olarak 1990'da transgenik petunya bitkisinde tanımlanmıştır (Napoli, et al., 1990). Petunya'da pigmentasyonu katalizleyen bir enzim olan kalkon sentaz (chalcone syntase - CHS)'ın gen ifadesini arttırıp daha mor çiçekler elde etmek isteyen bilim insanları, bitkiye CHS geninin ekstra kopyasını aktarmıştır. Fakat beklenmedik bir şekilde daha mor çiçekler elde etmek yerine, alacalı ya da daha beyaz çiçekli petunyalar elde etmişlerdir. Yapılan çalışmalar bu azalmanın CHS transkripsiyonunun azalması ile ilgili olmadığını

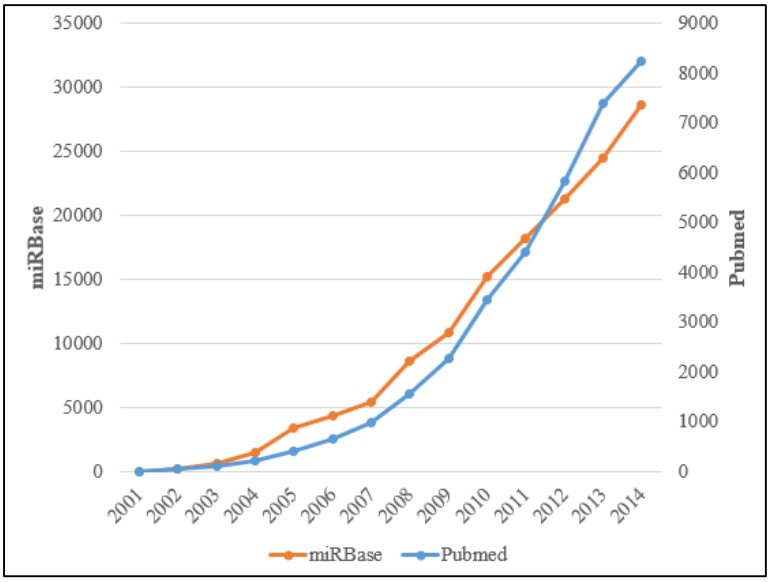
transkripsiyonun devam ettiğini göstermiştir. Dolayısıyla, susturma transkripsiyon sonrası gerçekleşmektedir ve bu durum transkripsiyon sonrası RNA parçalanmasını ifade eden **post–transkripsiyonel gen susturma (post-transcriptional gene silencing, PTGS)** olarak tanımlanmıştır (Van Blokland, et al., 1994). Napoli ve arkadaşları ise; hem transgenin hem de endojen genin baskılanmasını tanımlamak için "**birlikte baskılama (cosuppression)**" terimini kullanmışlardır (Napoli, et al., 1990). Aynı yıllarda; RNA susturma, *Neurospora crassa* mantarında da gözlenmiş, yine baskılama anlamını veren "**quelling**" terimi kullanılarak tanımlanmıştır (Romano and Macino, 1992). Hayvanlarda ise RNA susturma ilk olarak 1995 yılında Guo ve Kempheus tarafından *Caenorhabtidis elegans*'da belirlenmiştir. Guo ve Kempheus, *C. elegans*'da par-1 mRNA'sının yıkımınına hem sense RNA'nın hem de antisense RNA'nın neden olduğunu bulmuşlardır (Guo and Kemphues, 1995). Bu çalışma; RNA susturma ile ilgili en önemli ilerlemeyi sağlayan ve 2006 yılında Fire ve Mello'ya tıp dalında Nobel ödülü kazandıran çalışmaya öncülük etmiştir. Fire ve Mello (1998), gen susturmaya tek zincirli RNA'nın değil, çift zincirli RNA'nın (dsRNA) neden olduğunu bulmuşlardır (Fire, et al., 1998). Takip eden yıllarda; dsRNA'ların; daha kısa, yaklaşık 22 nt uzunluğundaki RNA parçalarına dönüştüğü ve bu RNA parçacıklarının gen susturmaya neden olduğu gösterilmiştir (Hamilton and Baulcombe, 1999; Zamore, et al., 2000; Elbashir, et al., 2001). Hedef mRNA'ların parçalanmasına neden olan bu sRNA'lar **küçük engelleyici RNA (small interfering RNA – siRNA)** olarak; süreç ise **RNA engelleme (RNA interference – RNAi)** olarak tanımlanmıştır.

1.2 mikroRNA (miRNA)

RNA susturma ile ilgili bilgiler birikirken sRNA'ların bir diğer sınıfı da *C. elegans'*da tanımlanmıştır. 1993 yılında *C. elegans*'da "lin-4" isimli küçük, protein kodlamayan RNA'nın lin-14 geninin 3' translasyonu olmayan bölgesine (3'UTR) bağlanarak, gen ifadesini düzenlediği keşfedilmiştir (Lee, et al., 1993; Wightman, et al., 1993). İlk miRNA olarak bilinen lin-4'ün keşfinden yedi yıl sonra, 2000 yılında yine *C. elegans*'ta bulunan let-7'nin (Reinhart, et al., 2000), sineklerden insanlara kadar birçok türde korunmuş olduğunun bulunmasıyla (Pasquinelli, et al., 2000) bu sRNA'lara verilen önem artmış ve 2001 yılından itibaren küçük ve protein

kodlamayan bu transkriptler "**mikroRNA**" olarak adlandırılmaya başlanmıştır (Almeida, et al., 2011).

İlk bitki miRNA'ları ise ancak 2002 yılında keşfedilmiştir (Park, et al., 2002). Bugüne kadar bitkilerden hayvanlara, birçok ökaryotik canlıda binlerce miRNA keşfedilmiş ve çevrimiçi miRNA veri bankaları oluşturulmuştur (Griffiths-Jones, 2004). 2001 yılından beri miRNA'larla ile ilgili yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir (NCBI-Pubmed, 2014). Kamuya açık miRNA veritabanı olan miRBase'in (Sürüm 21, Haziran 2014) verilerine göre; toplamda 223 türe ait 28645 öncül miRNA ve 35828 işlevsel miRNA keşfedilmiş, veribankasına yüklenmiştir. Bunlardan 6942 öncül miRNA ve 8416 işlevsel miRNA 72 bitki türünde tanımlanmış olan miRNA'lardır (Şekil 1.1) (miRBase, 2014).



Şekil 1.1 mikroRNA ile ilgili yapılan yayınların (NCBI-Pubmed, 2014) ve miRBase veri bankasına yüklenmiş miRNA sayılarının yıllara göre dağılımı (miRBase, 2014).

miRNA'lar bitki ve hayvanlardaki gen ifadesinin önemli genetik düzenleyicileri olarak tanımlanmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, bitki miRNA'larının doku farklılaşmasının ve gelişiminin kontrolünde, sinyal iletiminde, abiyotik (su kıtlığı, kuraklık, tuzluluk vb.) ve biyotik (patojenler) stres gibi çevresel etmenlere verilen cevaplarda rol oynadığını gösteren birçok kanıt ortaya koymuştur (Jones-Rhoades, et al., 2006; Khraiwesh, et al., 2012; Luo, et al., 2013).

Bitki miRNA'ları, baskılama sürecinde gen ifadesini düzenleme işlevini (Chen, 2004; Kim, et al., 2005); fitohormonlarla etkileşim (Wang, et al., 2005; Liu, et al., 2009; Chen, et al., 2011; Bian, et al., 2012), miRNA'ların biyogenezini kontrol etme (Vaucheret, et al., 2004) ya da ta-siRNA'ların (trans – acting small interfering RNAs) biyogenezini kapsayan (Maizel and Jouannet, 2012) çeşitli yollar izleyerek gerçekleştirebilmektedir (Jin, et al., 2013).

1.2.1 Bitki miRNA'larının biyogenezi

Bitki miRNA'larının biyogenezine ilişkin pek çok ayrıntı *Arabidopsis thaliana* modelinde belirlenmiştir. Genomik DNA'dan sentezlenen primer miRNA (pri-miRNA) transkriptleri, RNA polimeraz II enzimi tarafından üretilir ve protein kodlayan transkriptlerde olduğu gibi 5'-ucuna 7-metilguanozin şapkası (Xie, et al., 2005), 3'-ucuna ise polyadenilat kuyruğu (Poli-A dizileri) eklenir (Kurihara and Watanabe, 2004; Jones-Rhoades and Bartel, 2004).

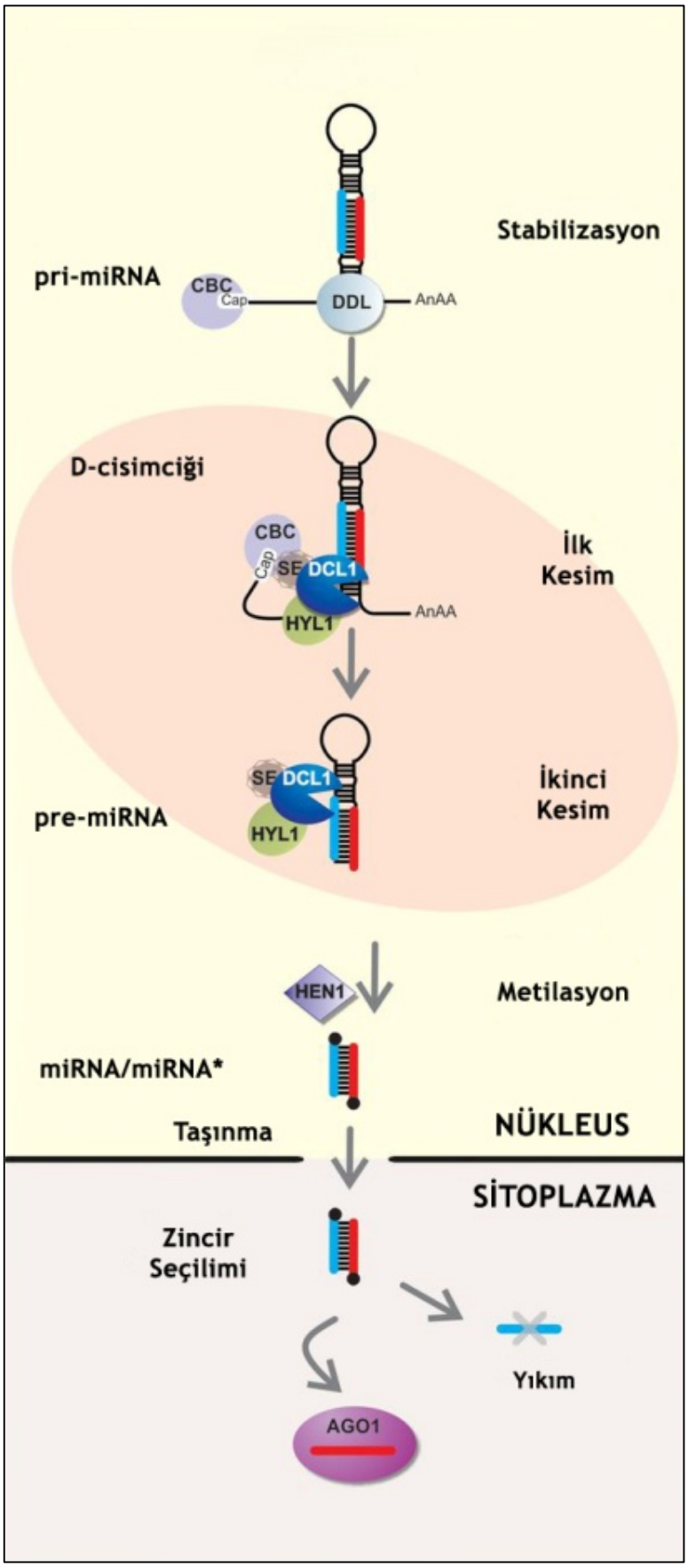
Protein kodlayan transkriptlerden farklı olarak pri-miRNA'lar tam olmayan eşleşme bölgelerine sahiptir. Bu nedenle sap ilmik (stem-loop) ya da saç tokası (hairpin) yapısı olarak adlandırılan kendi üzerine geri katlanmalar oluşturabilirler (Reinhart, et al., 2002). Pri-miRNA'ların saç tokası içeren bu ikincil yapıları, 43 ile yüzlerce baz aralığında olabilen heterojen bir uzunluğa sahip olabilmektedir (miRBase, Sürüm 21, Haziran 2014).

Arabidopsis'te bulunan dört Dicer-like enzimden, Dicer-like 1 (DCL1) bitki miRNA biyogenez sürecinin ana bileşinidir (Schauer, et al., 2002; Fahlgren, et al., 2007). Bu proteinler, yalnız dsRNA'lara bağlanacak şekilde özelleştiklerinden mRNA gibi tek zincirli RNA'ları işlemezler (Schauer, et al., 2002). Ribonükleaz (RNAaz) tip III olan DCL1, pri-miRNA ikincil yapısını keserek, öncül miRNA'yı (pre-miRNA) oluşturur. Pre-miRNA'lar, nükleusun Dicing-cisimciği (D-bodies) denen bölgesinde (Fang and Spector, 2007) DCL1 tarafından tekrar kesilerek, 21-22 nükleotid uzunluğunda miRNA/miRNA* dupleksi oluştururlar (Park, et al., 2002; Reinhart, et al., 2002; Kurihara and Watanabe, 2004; Bologna, et al., 2013). Bitki pri-miRNA'larının büyük kısmı tek bir miRNA/miRNA* dupleksi oluşturmasına rağmen, miR159 ve miR319 gibi bazı lokuslar aynı saç tokası yapısından çoklu dupleksler oluşturabilmektedir (Bologna, et al., 2009).

Pre-miRNA üretim sürecinde DCL1dışında diğer proteinlerin de destekleyici rol oynadıkları bildirilmiştir. Bunlardan DAWDLE (DDL); pri-miRNA'nın DCL1 kesimine kadar stabil kalmasını sağlayan, DCL1 ile etkileşen bir proteindir (Yu, et al., 2008). Diğer yardımcı proteinler; dsRNA bağlanma proteini HYPONASTICLEAVES1 (HYL1) (Kurihara, et al., 2006), C_2H_2 çinko parmak protein SERRATE (SE) (Yang, et al., 2006) ve şapka bağlama kompleksi (ABH1/ CBP80 ve CBP20) proteinleridir (Laubinger, et al., 2008; Kim, et al., 2008). HYL1 ve SE proteinlerinin fonksiyonunun DCL1 tarafından yürütülen kesme işleminin etkisini ve duyarlılığını arttırmak olduğu belirlenmiştir (Dong, et al., 2008).

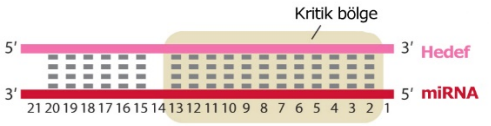
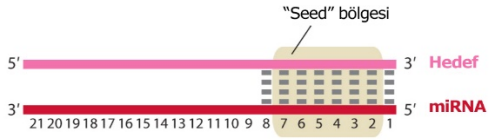
Oluşan miRNA/miRNA* dupleksindeki her bir miRNA zinciri, HUA ENHANCER1 (HEN1) tarafından 3' ucundan metillenerek parçalanmaktan korunur (Yu, et al., 2005). Bu işlemden sonra miRNA/miRNA* dupleksi, importin-β sınıfı bir nükleositoplazmik taşıyıcı olan HASTY(HST) aracılığıyla, nükleustan sitoplazmaya taşınır (Şekil 1.2) (Park, et al., 2005; Jones-Rhoades, et al., 2006).

Sitoplazmaya taşınan miRNA/miRNA* dupleksinin bir zinciri (miRNA*) yıkılırken, işlevsel olan diğer miRNA zinciri, RNA-uyarımlı susturma kompleksinin (RNA-induced silencing complex - RISC) bir bileşeni olan Argonaut (AGO) proteiniyle birleşir. RISC kompleksinde, miRNA ile tam ya da tama en yakın eşleşme gösteren hedef mRNA'lar algılanır. miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanması ise mRNA'nın yıkılmasına veya translasyonunun baskılanmasına neden olur (Şekil 1.2) (Rhoades, et al., 2002; Carrington and Ambros, 2003; Voinnet, 2009).



Şekil 1.2 Bitkilerde miRNA biyogenezinde önemli adımların özeti (Bologna, et al., 2013)

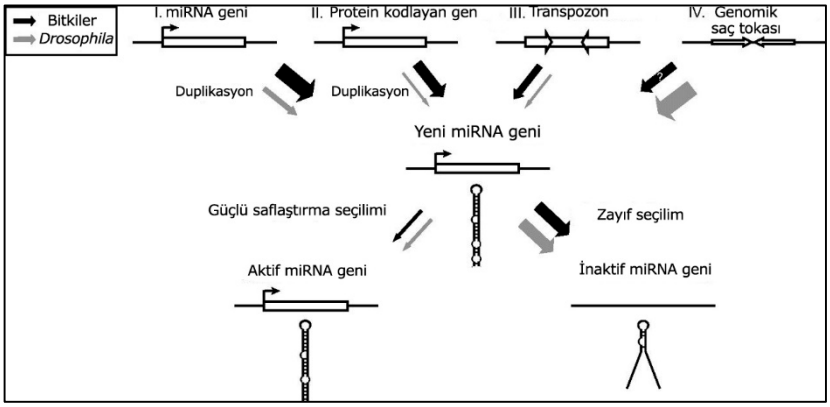
Bitki miRNA'ları ve hedeflerinin evrimi için önerilen mekanizma, hayvan miRNA'ları ve hedeflerinin evrimi için önerilen mekanizmadan farklıdır (Allen, et al., 2004; Chen and Rajewsky, 2007; Axtell and Bowman, 2008; Axtell, et al., 2011). Hayvanlarda miRNA, genellikle hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesiyle eksik eşleşme gösterir. Hayvan miRNA'larının yalnız "seed bölgesi" adı verilen 6-8 bazlık bağlanma bölgesi ile tam eşleşme sergiler (Lewis, et al., 2005; Rajewsky, 2006; Bartel, 2009). miRNA ile hedef mRNA arasındaki bu zayıf eşleşme genellikle translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır (Voinnet, 2009; Carthew and Sontheimer, 2009). Bunun aksine bitki miRNA'ları, genellikle, pek çok mRNA'da yalnız bir tane miRNA eşleşme bölgesi içeren kodlama bölgesini doğrudan hedefler. Tam ya da tama yakın olan bu eşleşme genel olarak hedef mRNA'nın parçalanmasıyla, nadiren de translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır (Şekil 1.3) (Zhang, et al., 2006; Axtell and Bowman, 2008; Voinnet, 2009; Carthew and Sontheimer, 2009; Bartel, 2009; Axtell, 2013).

miRNA/hedef eşleşme örüntüsü	Görünme sıklığı	Hedef baskılama mekanizması
 **Bitkilerde görülen temel eşleşme**	Bitkilerde yaygın, hayvanlarda nadir	mRNA birikiminde susturmaya bağlı (ya da susturmadan bağımsız) indirgenme ve/veya translasyonel baskılama
miRNA'nın hedefi taklit etmesiyle oluşan eşleşme	Bitkilerde birkaç örneği mevcutken, hayvanlarda bunun yerine "seed" eşleşmesi görülür.	Aktif AGO-miRNA kompleksinde rekabet ve ayrılma
 **"Seed" eşleşmesi (Hayvanlarda görülen temel eşleşme)**	Hayvanlarda yaygın, bitkilerde örneği yok	mRNA birikiminde susturmadan bağımsız indirgenmeyle takip edilen translasyonel baskılama

Şekil 1.3 Hayvan ve bitkilerde, işlevsel mikroRNA / hedef eşleşme örüntüleri (Axtell, 2013).

1.2.2 Bitki miRNA genlerinin evrimsel kökeni

miRNA genlerinin evrimsel kökenine ilişkin birçok farklı mekanizma önerilmiştir (Şekil 1.4).

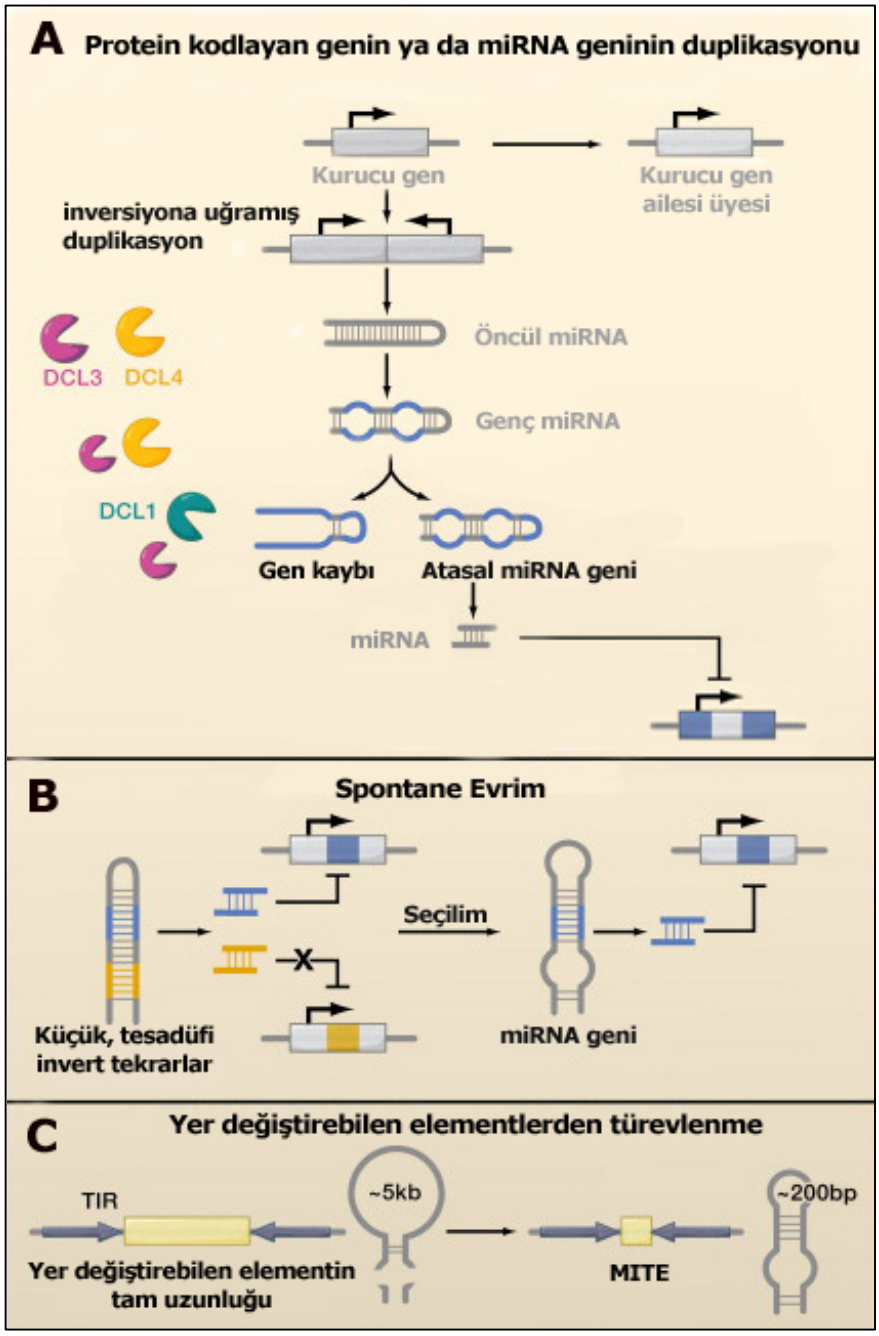


Şekil 1.4 Bitkilerde (siyah oklar) miRNA genlerinin evrimsel kökenini gösteren olası mekanizmaların, Drosophila türleriyle (gri oklar) karşılaştırmalı olarak gösterilmesi. Okların kalınlığı önerilen mekanizmaların gözlenme sıklığını belirtmektedir (Nozawa, et al., 2012).

Bunlardan ilki yeni miRNA oluşumunun, protein kodlayan genin duplike olması ve ardından inversiyona uğraması sonucu gerçekleştiğini ileri süren duplikasyon hipotezidir (Şekil 1.4-II) (Allen, et al., 2004; Rajagopalan, et al., 2006; Fahlgren, et al., 2007; Fahlgren, et al., 2010; Nozawa, et al., 2012). Protein kodlayan genden kökenlenen inversiyona uğramış miRNA'nın, o genin transkriptiyle eşleşebilme olasılığının yüksek oluşu göz önüne alındığında, önerilen bu mekanizma miRNA'ların kökenini açıklaması bakımından oldukça cazip görünmektedir (Şekil 1.5a) (Nozawa, et al., 2012). Nitekim Allen ve arkadaşları (2004) *Arabidopsis thaliana*'da miR161 ve miR168 genlerinin inversiyona uğramış duplikasyonlardan oluştuğunu rapor etmişlerdir (Allen, et al., 2004). Daha sonraki çalışmalarda da inversiyona uğramış duplikasyonlardan kökenlenmiş birçok miRNA geni tanımlanmış (Rajagopalan, et al., 2006; Fahlgren, et al., 2007) ve yeni miRNA'ların duplikasyon ve inversiyonla oluştuğu ortak yargısı ifade edilmiştir (Felippes De, et al., 2008).

miRNA'ların kökenine ilişkin bir diğer mekanizmada ise, önceden var olan miRNA genlerinin ardıl mutasyonlar geçirmesi ile yeni miRNA'ların

oluşabileceğidir (Şekil 1.4-I). Bitkilerde her bir miRNA gen ailesinin birçok miRNA geninden oluştuğu düşüldüğünde, bu mekanizmanın bitkilerde miRNA'ların kökenini açıklamaya yönelik önemli bir mekanizma olduğu görülmektedir (Şekil 1.5a) (Nozawa, et al., 2012).



Şekil 1.5 Bitki miRNA'larının evrimi (Voinnet, 2009).

Ayrıca, bazı miRNA genlerinin kökeninin, insan genomunun neredeyse yarısını, bitki genomlarının ise yüzde sekseninden fazlasını oluşturan transpozonlar (TE) olabileceğini gösteren kanıtlar mevcuttur (Şekil 1.4III, Şekil 1.5c) (Piriyapongsa and Jordan, 2008; Borchert, et al., 2011; Nozawa, et al., 2012). Özellikle, DNA-tip transpozonların spesifik bir sınıfı olan minyatür invert tekrarlı yer değiştirebilen elementler (miniature inverted repeat transposable elements, MITEs), DCL proteinleri için substrat haline gelerek miRNA genleri oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu görüş, *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa*'da MITE'lerden ve diğer yer değiştirebilen elementlerden meydana gelmiş miRNA genlerinin belirlenmesiyle desteklenmiştir (Piriyapongsa and Jordan, 2008).

Oryza sativa ve *Sorghum bicolar*'da bulunan çoklu miRNA gen ailesinin bir transpozon olan *Stowaway* ile ilişkili olduğu bilinmektedir. *Stowaway* transpozon elementlerinden oluşan 25 miR-437 saç tokası yapısının, 22 tanesinin *Sorghum bicolar* genomunda ve diğer üçünün de başka bitki türlerinde kodlandığı bulunmuştur. *Oryza sativa* türüne özgü olan miR441, miR809, miR812, miR814, miR818, miR819 ve miR1862 gen ailelerinin oluşmasında da *Stowaway* transposonlarının katkısı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Legümenlerde, *Medicago truncatula*'ya özgü 81 miRNA saç tokası yapısından, 13 miRNA ailesinin MuDR elementleriyle uyuşması da bu ailelerin kökenlerinin MuDR transpozonlarıyla ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Borchert, et al., 2011).

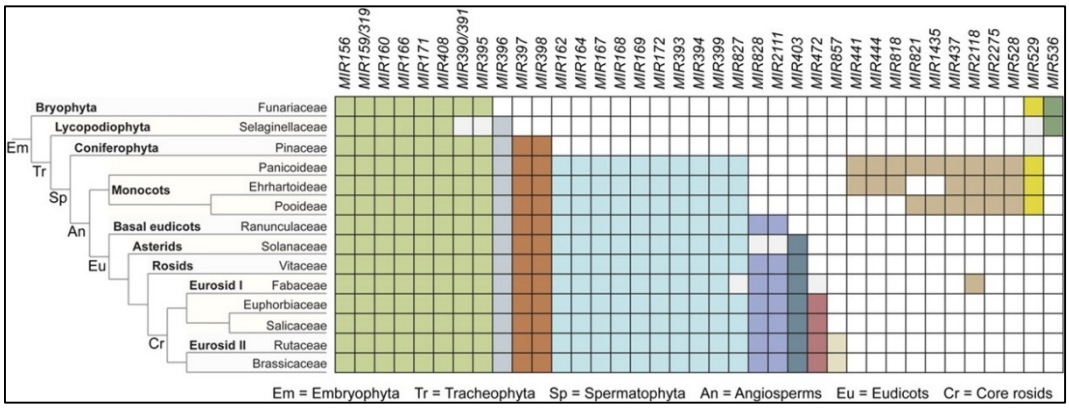
miRNA'ların kökeni ile ilgili son zamanlarda *Drosophila* türleriyle yapılan bir çalışmada, hayvanlarda genç miRNA'ların genomda rastgele saç tokası yapılarından türediği belirlenmiş (Nozawa, et al., 2010) fakat aynı araştırıcılar tarafından bu mekanizmanın bitkilerde yeni miRNA genlerinin oluşmasında başlıca kaynak olmaktan uzak göründüğü bildirilmiştir (Şekil 1.4-IV) (Nozawa, et al., 2012).

Bitki türleri arasında çok uzun zaman önce kökenlendiği düşünülen, son derece korunmuş miRNA genlerinin atasal kökenine ulaşmanın, biriken mutasyonlar nedeniyle oldukça güç olduğu da bildirilmiştir (Felippes De, et al., 2008).

1.2.2.1 Korunmuş miRNA'lar

Bitkiler aleminde evrimsel olarak korunmuş birçok miRNA gen ailesinin var olduğu ve bunlardan bazılarının evrimsel olarak birbirinden oldukça uzak olan karayosunları ve çiçekli bitkiler arasında da korunduğu belirlenmiştir (Cuperus, et al., 2011; Axtell, 2013).

Cuperus ve arkadaşları (2011) tarafından, yüksek verimli dizilim yaklaşımıyla elde edilmiş birçok veri seti birleştirilerek tanımlanan 8 miRNA gen ailesinin (miR156/miR157, miR159/ miR319, miR160, miR166, miR171, miR408, miR390/ miR391 ve miR395) kara bitkilerinin ortak atasından itibaren korunduğu bildirilmiştir. Ayrıca monokotil ve dikotil bitkiler arasında yüksek derecede korunan 21 miRNA gen ailesi de (miR156/157, miR159/319, miR160, miR162, miR164, miR166 miR167, miR168, miR169, miR170/171, miR172, miR390, miR393, miR394, miR395, miR396, miR397, miR398, miR399, miR408, miR482) miRBase'de tanımlanmıştır (Şekil 1.6) (Cuperus, et al., 2011).



Şekil 1.6 miRBase (Sürüm 16, Ağustos 2010) verilerine göre oluşturulmuş tablo, bitki aileleri (satırlar) arasında korunmuş miRNA genlerini (sütunlar) göstermektedir. Türe ya da familyaya özgü miRNA genleri tabloya dahil edilmemiştir. Gri ile renklendirilmiş kutulardaki bitki familyalarının söz konusu miRNA gen ailelerini kaybetmiş olabileceği belirtilmiştir. Farklı renklerle vurgulanmış miRNA gen aileleri ise tanımlandıkları taksonomik hattı göstermektedir (Cuperus, et al., 2011).

miRNA'ların sadece çok hücreli bitkilere özgü olmadıkları, tek hücreli bir yeşil alg olan *Chlamydomonas reinhardtii*'de de miRNA'ların tanımlanmasıyla anlaşılmıştır (Molnar, et al., 2007; Zhao, et al., 2007). Diğer taraftan bugüne kadar

yapılan çalışmalarda, *Chlamydomonas*'da bulunan miRNA'lar ile karayosunları ya da vasküler bitkiler arasında korunmuş miRNA genine rastlanmamıştır (Axtell and Bartel, 2005; Willmann and Poethig, 2007; Fahlgren, et al., 2010; Nozawa, et al., 2012). Bitkilerin yeşil alglerden evrildiği düşünüldüğünde, yeşil alglerle karasal bitkiler arasında ortak miRNA'nın olmayışı, korunmuş miRNA fonksiyonlarının çok hücreliliğe geçiş ve karasal yaşama uyumda önemli olabileceğini düşündürmektedir (Willmann and Poethig, 2007).

Bitki miRNA'larının bilinen en erken evrimsel kökenine dair kanıtlar, bitki miRNA'larının birer üyesi olan miR166/miR165 gen ailesinin ciğerotları ve boynuz otlarından, açık tohumlu bitkilere kadar değişen farklı taksonlar boyunca korunmuş olduğunu gösteren kanıtlarla ortaya konmuştur. Nitekim miR166'nın, kara bitkilerinin ortak atasına kadar korunmuş olması olasıdır (Floyd and Bowman, 2004). Bilinen en eski korunmuş miRNA aileleri, bitkilerde miR166/miR165 ve hayvanlarda let-7'nin bitki ve hayvan gelişim sürecinde farklılaşma ve simetrinin oluşturulmasında önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Shabalina and Koonin, 2008). Temel biyolojik işlevleri düzenleyen bu miRNA'ların büyük bir olasılıkla ortak bir atada ortaya çıkmış ve daha sonra yeniden düzenlenmiş olma olasılığı yüksektir (Chen and Rajewsky, 2007; Shabalina and Koonin, 2008). Bitki ve hayvanlarda birçok korunmuş miRNA bulunmasına karşın bu iki alem arasında ortak miRNA'larla ilgili ikna edici bir kanıt bulunamamıştır. Bitki ve hayvanlarda miRNA yapısı ve mekanizması birbirinden oldukça farklı olsa da, biyogenez sürecinde aynı ya da homolog anahtar proteinlerin var olması; kökensel bir RNAi mekanizmasında bitki ve hayvan miRNA yolaklarının bağımsız olarak evrimleşmiş olabileceğini düşündürmektedir (Millar and Waterhouse, 2005; Jones-Rhoades, et al., 2006; Shabalina and Koonin, 2008; Axtell, 2008; Jones-Rhoades, 2012). Alternatif bir hipotez ise, bu iki grubun her birine ait miRNA yolaklarının ortak atada var olan miRNA benzeri bir yolaktan türevlendiğini ileri sürmektedir (Jones-Rhoades, 2012).

Aslında, miR854 ve miR855 genlerinin hem bitkilerde hem de havyanlarda tanımlandığını belirten bir çalışma Arteaga-Vázquez ve arkadaşları tarafından (2006) yayınlanmıştır (Arteaga-Vázquez, et al., 2006). Fakat daha sonra, dizilim verilerinin detaylı analizi *Arabidopsis thaliana*'da miR854 ve miR855 olarak

tanımlanan bu lokusların, tipik olarak siRNA örüntüsü olduğunu, gerçek miRNA olmadıklarını ortaya koymuştur (Rajagopalan, et al., 2006; Fahlgren, et al., 2007; Axtell, 2008). Bununla beraber, yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada insan ve fare gibi memelilerin doku ve serumlarında eksojen pirinç miRNA'sı miR168a belirlenmiş, bunun insan ve fare karaciğerinde düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör adaptor protein 1 (LDLRAP1) mRNA'sına bağlanarak LDLRAP1 ifadesini baskıladığı ve sonuç olarak fare plazmasından LDL çıkışının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Zhang, et al., 2012).

1.2.2.2 Türe ya da soya özgü miRNA'lar

Birçok miRNA gen ailesi farklı bitki türleri arasında yüksek oranda korunmuşken, yakın zamanda evrilmiş miRNA genlerinden kökenlenen bazıları ise sadece birbirine yakın türlere ya da tek bir türe özgü olabilmektedir (Allen, et al., 2004; Cuperus, et al., 2011). Türe özgü miRNA'ların, genel olarak daha düşük seviyelerde ifade olmaları geleneksel metotlarla belirlenmelerini zorlaştırmaktadır. Yeni nesil dizilim teknolojilerinin sağladığı hızlı ve yüksek verimli yaklaşım; türe özgü veya düşük miktarda bulunan miRNA'ların keşfedilmesini olanaklı kılmıştır. Yüksek verimli dizilim teknolojilerin model organizma olan *Arabidopsis*'te ilk kullanımından sonra (Rajagopalan, et al., 2006; Fahlgren, et al., 2007); pirinç (Heisel, et al., 2008; Sunkar, et al., 2008; Zhu, et al., 2008), *Medicago truncatula* (Szittya, et al., 2008), kavak (Klevebring, et al., 2009), *Taxus chinensis* (Qiu, et al., 2009), asma (Pantaleo, et al., 2010) ve daha birçok türde bilinen, türe özgü miRNA'ların sayısında önemli artış olmuştur (Axtell, 2013).

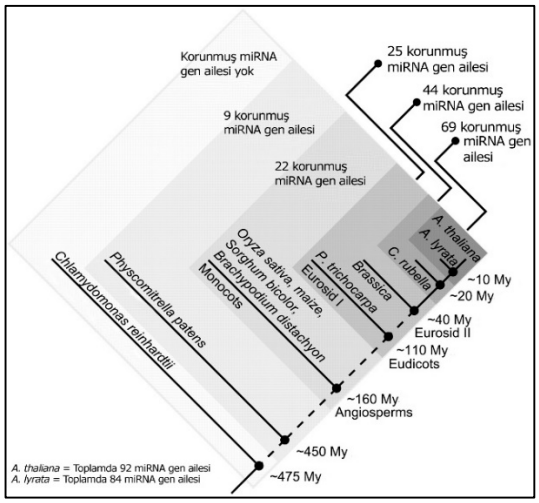
Karayosunu *Physcomitrella patens* (Talmor-Neiman, et al., 2006) ve kibrit otu *Selaginella moellendorffii*'de (Axtell, et al., 2007) de soya özgü miRNA'ların belirlenmesi, evrimsel olarak korunmamış miRNA'ların varlığının kara bitkilerinin çeşitlenmesi açısından evrensel bir özellik olduğuna işaret etmektedir (Fahlgren, et al., 2007; Axtell, 2008; Voinnet, 2009).

Korunmamış miRNA'ların tek bir türe ya da soya özgü oluşu veya daha fazla sayıda miRNA'nın ise yalnız bir kaç yakın türde belirlenmesi, miRNA'ların oluşum ve yok olma oranlarının yüksek olduğuna işaret etmektedir. Korunmuş miRNA'lara göre türe ya da soya özgü miRNA'ların pek çok farklı özelliği vardır: Bu

miRNA'ların ya hedefleri yoktur ya da hedeflerini henüz bilinmeyen kriterlerle tanımaktadırlar. Ayrıca, çoklu paraloglar yerine düşük miktarda bulunan tek kopya genler tarafından şifrelenen saç tokası öncüllerinden işlevsel miRNA'ları oluşturma süreçleri de daha heterojendir (Ma, et al., 2010; Fahlgren, et al., 2010; Axtell, 2013).

Bunun yanı sıra, korunmuş ve türe özgü genlerin ifade düzeyleriyle ilgili olarak yapılan genellemede; miR395 (Jones-Rhoades and Bartel, 2004) gibi bazı korunmuş miRNA'ların optimum büyüme koşullarında düşük düzeyde ifade edilmesi ve miR161 gibi daha az korunmuş bazı miRNA'ların (Rajagopalan, et al., 2006; Fahlgren, et al., 2007) ise nispeten daha yüksek düzeyde ifade edilmesi gibi istisnaların olduğu da not edilmelidir (Ma, et al., 2010; Fahlgren, et al., 2010; Jones-Rhoades, 2012).

Yaklaşık 10 milyon yıl önce ortak bir atadan türleşmiş olan *Arabidopsis thaliana* ve *Arabidopsis lyrata*'daki miRNA genlerini karşılaştıran, yakın zamanda yayınlanmış bir çalışma, iki türde tanımlanmış miRNA genlerinin en az %13'ünün her bir tür için özgün olduğunu göstermiştir (Şekil 1.7). Genç miRNA genlerinin sıklıkla oluşma – yok olma deviniminde, fonksiyonları ile ilişkili olmaksızın evrimsel olarak kısa ömürlü oldukları ortaya konulmuş ve *Arabidopsis* soy hattında miRNA deviniminin bir milyon yıl için 1,2 ile 3,3 miRNA geni arasında olduğu ileri sürülmüştür (Fahlgren, et al., 2010)



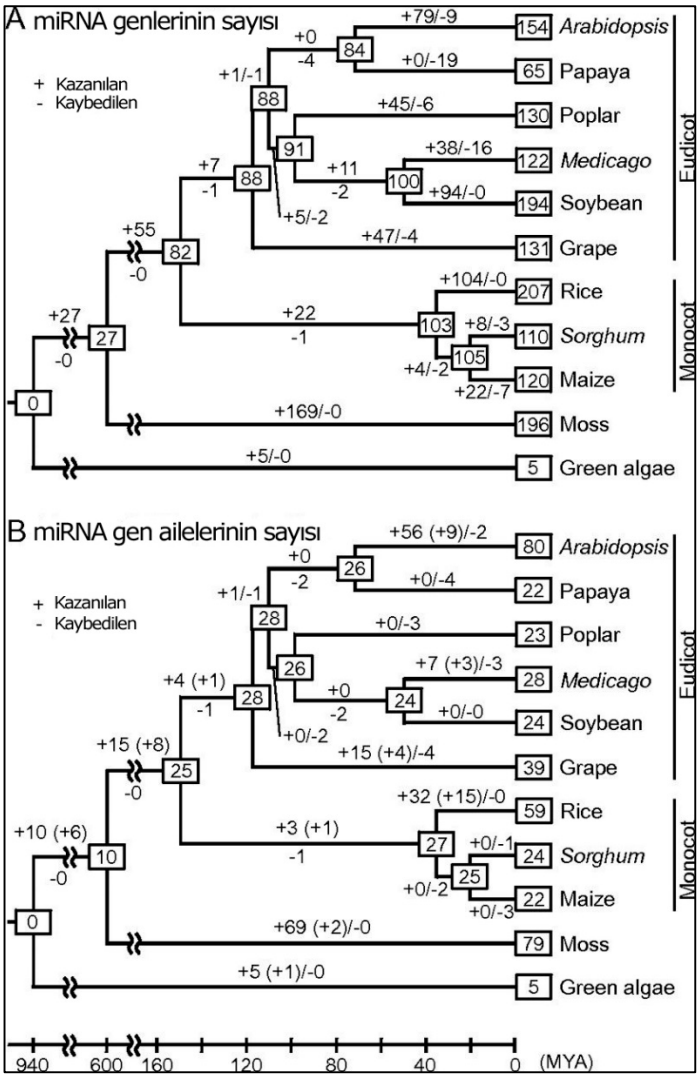
Şekil 1.7 *Arabidopsis*'de korunmuş miRNA gen aileleri ile diğer bitkiler arasındaki ilişki (Fahlgren, et al., 2010).

1.2.2.3 Kazanılan ve kaybedilen miRNA genleri ve gen aileleri

Tıpkı protein kodlayan genler gibi miRNA genleri de; yer değiştirme, insersiyon, delesyon, rekombinasyon ve doğal seçilim gibi evrimsel süreçlere tabiidir (Barrera-Figueroa, et al., 2012). Bir kez oluşan miRNA'ların kaderi, hücrede üstlendikleri/üstlenecekleri işlevlere bağlıdır. Dolayısıyla, transkripsiyon faktörleri (Chen and Rajewsky, 2007), F-box proteinleri (Jones-Rhoades and Bartel, 2004) gibi düzenleyici proteinleri ve miRNA biyogenezinde gerekli proteinleri düzenleyen miRNA'ların (Vaucheret, et al., 2004; Ding, et al., 2009; Li, et al., 2012) evrimsel olarak korunmuş olması beklenilen bir durumdur (Jones-Rhoades, et al., 2006; Barrera-Figueroa, et al., 2012). Bu miRNA'lar düzenledikleri hedef ile bitkinin uyum gücünü arttırabildiklerinden doğal seçilim boyunca korunmuşlardır. Genç miRNA'ların birçoğu ise ya düzenleme yapabileceği hedef geni bulamadıkları ya da bitkinin adaptasyonunda işlevsel olamadıklarından evrimsel süreçte hızla elenmiştir. Öyle ki, genç miRNA'ların yalnız küçük bir kısmı doğal seçilim açısından avantajlı bir işlev kazanabilmiş ve korunabilmiştir (Jones-Rhoades, 2012; Barrera-Figueroa, et al., 2012).

Nozawa ve arkadaşları (2012) biyoinformatik teknikler kullanarak 11 bitki türünde miRNA'ların evrimsel değişimini inceledikleri çalışmalarında, ~1400 TE benzeri olmayan ve ~300 TE benzeri miRNA geni tanımlamışlardır. TE benzeri olmayan bu miRNA genlerinin nasıl evrildiklerine dair bir örüntü oluşturabilmek için, parsimoni metodu kullanarak atasal türlerdeki minimum sayıdaki miRNA genleri ile bitki evrimi boyunca kazanılmış ya da kaybedilmiş miRNA genlerinin sayısını belirlemişlerdir (Şekil 1.8) (Nozawa, et al., 2012). Daha önce birkaç çalışmada belirtilmiş olduğu gibi (Axtell and Bartel, 2005; Axtell, 2008; Fahlgren, et al., 2010) bu çalışmada da, yeşil algler ve kara bitkileri arasında homolog miRNA'lar tanımlanamamıştır (Şekil 1.8a). Bu sonuç, yeşil algler ve kara bitkileri ayrılmadan önce ortak miRNA genlerinin bulunmadığı anlamına gelmez, çünkü var olan atasal miRNA genlerinin bitki evrimi sırasında kaybolmuş olması olasılığı da ileri sürülmüştür. Yeşil algler ve kara bitkilerinin ayrılmasından sonra, kara bitkilerinde miRNA gen sayısının hızla arttığı ve örneğin çiçekli bitkilerin atasında 82 miRNA geni kazanıldığı hesaplanmıştır. Aynı periyotta genlerin sayısı kadar olmasa da gen ailelerinin de sayısı artmıştır. Bu sonuç, ayrım sürecinde kazanılan miRNA'ların çoğunun, miRNA genlerinin duplikasyonuyla kazanılmış

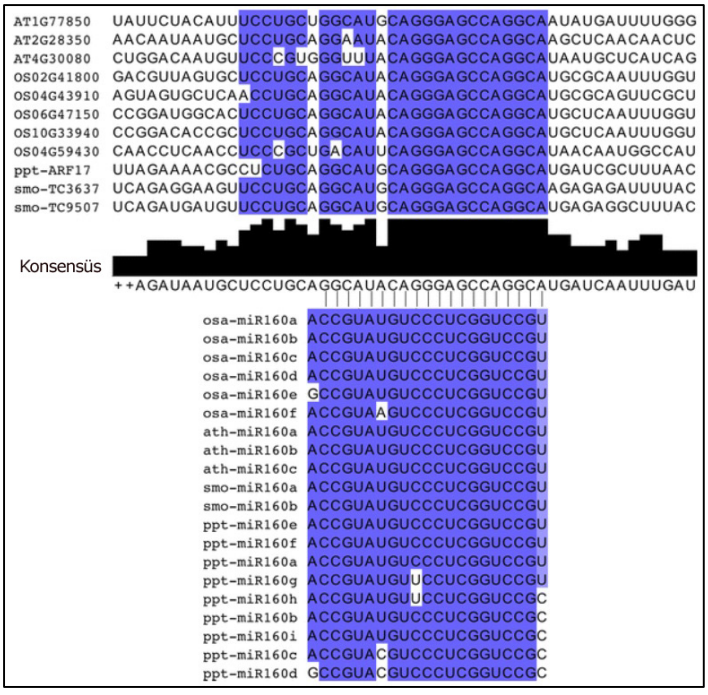
olabileceğine işaret etmektedir. Bu periyottan sonra genlerin sayısındaki evrimsel değişim, her bir soy çizgisinde farklı oranlarda gerçekleşmiştir. Örneğin pirinç; çiçekli bitkilerin evrim sürecinde 126 gen kazanmış ve 1 gen kaybetmişken, papaya aynı periyotta sadece 8 gen kazanabilmiş ve 25 gen kaybetmiştir (Şekil 1.8a). Aynı durum gen ailelerinde de gözlenmiştir (Şekil 1.8b) (Nozawa, et al., 2012).



Şekil 1.8 Atasal türlerdeki *a)* miRNA genleri ve *b)* gen aileleri ile bitki evrimi boyunca kazanılmış ya da kaybedilmiş miRNA genleri/gen ailelerinin sayısının hesaplanması. Karelerin içindeki sayılar, atasal ya da bugün hala var olan türlerdeki miRNA genleri veya gen ailelerinin sayısını belirtmektedir. Dalların üzerindeki sayılar, kazanılmış (+) ve kaybedilmiş (-) miRNA genleri ve gen ailelerinin sayısını belirtmektedir. Parantez içinde belirtilmiş (+) sayılar ise protein kodlayan genlerden oluşmuş olma potansiyeli taşıyan kazanılmış miRNA gen ailelerinin sayısını belirtmektedir (Nozawa, et al., 2012).

1.2.2.4 miRNA ve hedef dizileri arasındaki etkileşim

Bitki türleri arasında miRNA'lar ve hedef dizilerindeki bağlanma bölgeleri filogenetik dağılımda yüksek oranda benzer örüntü göstermektedirler. Farklı türlerde korunmuş miRNA'ların birçoğu her türde homolog genleri düzenlemektedir (Floyd and Bowman, 2004; Rajagopalan, et al., 2006; Jones-Rhoades, et al., 2006; Axtell, et al., 2007; Zhang, et al., 2009; Jones-Rhoades, 2012). Çoğu bitki türünde miRNA'lar ve onların hedef genlerinin evrimsel olarak korunmuş olması, miRNA'lar ile hedef genlerin birlikte evrilmiş olması gerektiğini ve miRNA/hedef eşleşmelerinin bitki evrim sürecinde uzun dönemler kararlı olduğunu düşündürmektedir (Li and Mao, 2007; Jones-Rhoades, 2012; Axtell, 2013). Örneğin *Arabidopsis*'te oksin yanıt faktörü (ARF) genlerini düzenlediği bilinen miR160'ın, tanımlandığı her türde hedef ARF dizilerinin de korunduğunu ortaya koyan güçlü kanıtlar mevcuttur (Şekil 1.9) (Wang, et al., 2005; Liu, et al., 2007; Jones-Rhoades, 2012).



Şekil 1.9 miR160 dizisi ve hedef bölgeleri farklı bitki türleri arasında filogenetik olarak korunmuştur. *A. thaliana, O. sativa, P. patens,* ve *S. moellendorfii*'deki ARF mRNA fragmentlerinin miR160 ile eşleşme gösterdiği fragmentler yukarıda belirtilmiştir. Mavi ile işaretlenmiş bazlar, dizinin %75'den fazlasını sunmaktadır. Aşağı bölümde ise, aynı türde ifade olan miR160 dizileri gösterilmektedir (Jones-Rhoades, 2012).

Ayrıca, yakın zamanlarda yapılmış çalışmalar korunmuş miRNA/hedef etkileşiminin kimi durumlarda farklılık gösterebildiğini de ortaya koymuştur. Örneğin; oldukça korunmuş bir miRNA olan mir159'un birçok bitkideki hedefi, MYB mRNA'sıdır. Fakat domates bitkisinde miR159, MYB mRNA'sı yanısıra *SGN-U567133* genini de hedeflemektedir. miR159-dirençli *SGN-U567133* versiyonunun ifade edilmesinin gelişimsel bozuklara neden olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem, miR159 aracılığıyla gerçekleşen düzenlemede olağan dışında hedefin kullanılıyor olmasının da işlevsel sonuçları olduğuna işaret etmektedir (Buxdorf, et al., 2010). miR159'un yanı sıra, birçok bitkide *GRF* transkripsiyon faktörünü düzenlediği bilinen miR396'nın *Arabidopsis*'de *GRF*'lerin yanı sıra *bHLH74* mRNA'sını hedefleyip düzenlediği ve bu etkileşimin yaprak gelişimini etkilediği gözlenmiştir. miR396/GRF etkileşimi tüm çiçekli bitkilerde yaygın olarak görülürken; miR396/*bHLH74* arasındaki etkileşim; Brassicaceae ve Cleomaceae familyaları ile sınırlıdır (Debernardi, et al., 2012). Bu iki örnek de göstermektedir ki; farklı türlerde korunmuş miRNA'lar, türler arasında korunmuş homolog genleri düzenlenmenin yanı sıra başka hedefler ile de işlevsel etkileşimler gerçekleştirebilmektedir (Axtell, 2013).

Korunmuş miRNA'nın, hedef mRNA üzerindeki baskılama etkinliği de çeşitlilik gösterebilmektedir. Yapılan bir çalışma, *Arabidopsis* miRNA'larının saç tokası öncüllerindeki polimorfizmlerin, miRNA biyogenezini etkilediğini göstermiştir. Nitekim, Col-0 ve C24 ekotiplerinin çaprazlanmasıyla elde edilen hatlarda; *Arabidopsis* miR164a'nın pre-miRNA dizisi üzerindeki polimorfizmlerin, yaprak fenotipi üzerinde etkileri olduğu gözlenmiştir. Benzer polimorfizmlerin *Arabidopsis* ekotiplerinde yaygın olduğu ve bunların neden olduğu varyasyonların, miRNA işlevlerini düzenlediği ileri sürülmektedir (Todesco, et al., 2012; Axtell, 2013)

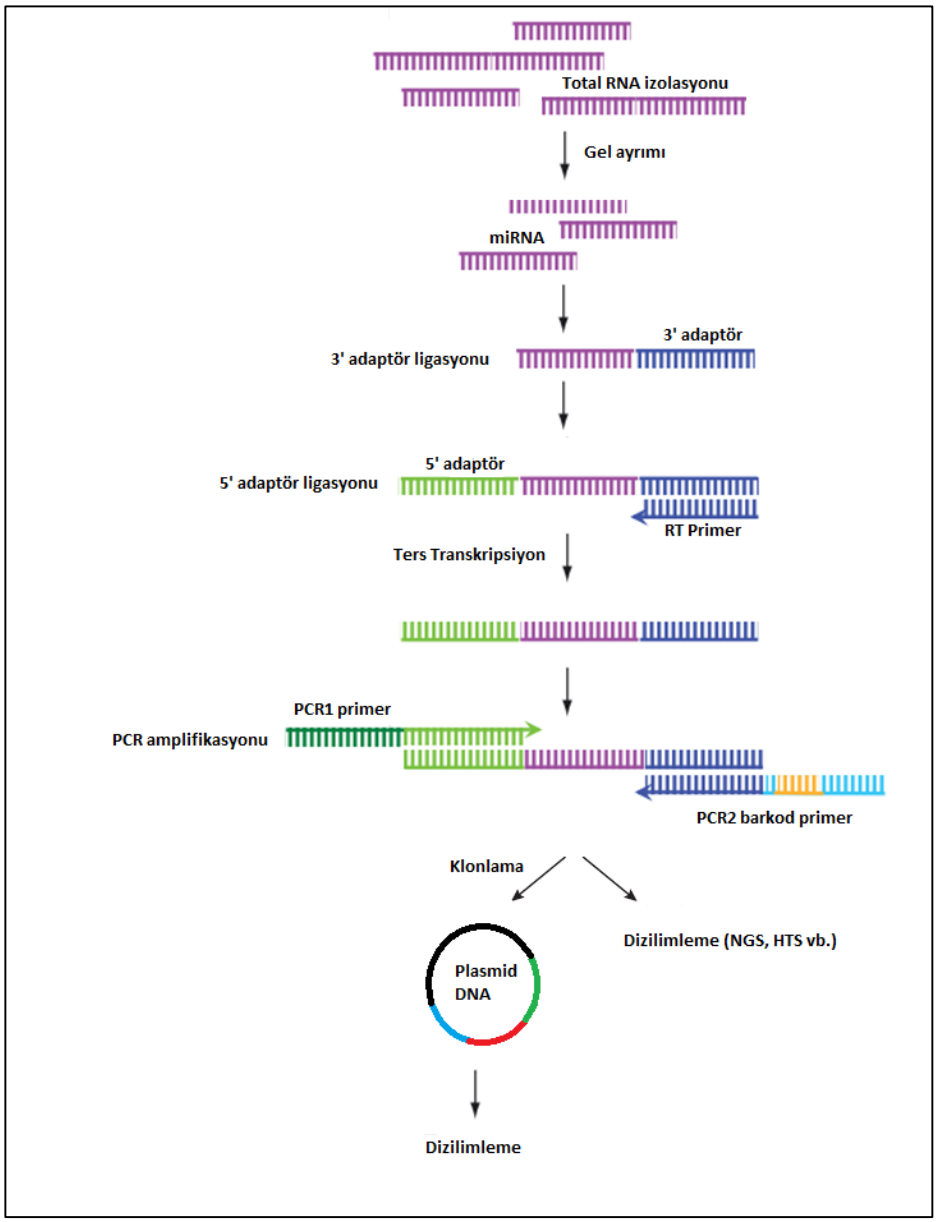
miRNA/hedef eşleşmesinin boyutu da, miRNA aracılığıyla gerçekleşen baskılamanın etkisinin değişmesine katkıda bulunmaktadır. Dikotil ve monokotil bitkileri karşılaştıran bir çalışmada, işlevsel miR396 dizisinde yer alan polimorfizmlerin, hedef mRNA düzenleme etkisinde farklılaşmaya neden olduğu gösterilmiştir (Debernardi, et al., 2012; Axtell, 2013).

1.2.3 Analiz yöntemleri

miRNA'ların belirlenmesinde deneysel ve bilgisayar temelli olmak üzere iki yaklaşım kullanılmaktadır.

Deneysel yaklaşımlar; genetik tarama, doğrudan klonlama ve sRNA kütüphanesi oluşturma ve dizilimleme gibi yaklaşımları içermektedir. Genetik tarama, miRNA'ların belirlenmesi ve analizinde kullanılan ilk deneysel yaklaşımdır. İlk olarak *C. elegans*'da tanımlanmış olan, miRNA ailesinin ilk iki üyesi lin-4 ve let-7 genetik tarama yaklaşımıyla belirlenmiştir (Lee, et al., 1993; Reinhart, et al., 2000). Bu yöntem zaman ve finansal açıdan kullanışlı olmadığından artık tercih edilen bir yöntem değildir. Diğer bir yaklaşım olan sRNA kütüphanesi oluşturma ve dizilimleme, miRNA belirleme de kullanılan temel yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. sRNA'ların klonlanması için geliştirilen birçok farklı protokol mevcuttur. Birbirlerinden bağımsız geliştirilen bu protokoller, detaylarında farklılık gösterseler de, temelde aynı prensipleri izlerler (Şekil 1.10) ve mevcut durumda bilinen çoğu miRNA'nın belirlenmesinde başarı sağlamışlardır. Özellikle yeni nesil dizilim teknolojilerinin sağladığı hızlı ve yüksek verimli yaklaşım ile hem korunmuş miRNA'ların hem de türe özgü veya düşük miktarda bulunan miRNA'ların sayısında önemli bir artış kaydedilmiştir.

miRNA'lar, biyogenez detayları ve özellikle kendilerine özgü ikincil yapıya sahip olmalarından dolayı, bilgisayar temelli yaklaşımlarla belirlenmeye uygundurlar. Nitekim, miRNA'ların belirlenmesi için geliştirilmiş birçok bilgisayar temelli yaklaşım mevcuttur. Bu yaklaşımlar arasından yaygın olarak kullanılan ve miRNA'ların türler arasında filogenetik olarak korunmuş olduğu bilgisine dayanan yaklaşım, homoloji analizidir. Homoloji analizi: tanımlanmış genomik diziler (EST, GSS, tüm genom vb.) ile bilinen miRNA'ların hizalanması ve hizalama sonucu yakalanan eşleşmelerin ikincil yapı tahminlerinin yapılmasına bağlı olarak, yeni türlerde korunmuş miRNA'ların belirlenebilmesini sağlamaktadır. Bu yolla, hem bitkilerde hem hayvanlarda birçok miRNA tanımlanmıştır (Zhang, et al., 2005; Weber, 2005; Pan, et al., 2007; Xie, et al., 2007; Song, et al., 2009; Panda, et al., 2014).



Şekil 1.10 miRNA'ların klonlanması ve dizilimlenmesi Lu, et al., 2007; Eminaga, et al., 2013' den değiştirilerek alınmıştır.

1.2.3.1 EST analizi

İfade edilen dizi etiketleri (EST'ler); bilinen bir genin ifade edilen, küçük kısımlarını belirtmektedirler. Genellikle 1000 baz çiftinden (bp) daha kısadırlar ve ilgili genlerin cDNA kütüphanelerinden elde edilirler. Belli bir dokudaki ve/veya belli bir gelişimsel dönemdeki gen ifadesini temsil ederler (Boguski, et al., 1993; NCBI, 2014).

EST'ler ilk olarak 1980'lerin başında, Putney ve arkadaşları (1983) tarafından, tavşan kas cDNA kütüphanesinden elde edilmiştir (Putney, et al., 1983). Bugün, genom dizilimleme projelerinin yaygınlaşması ve yüksek verimli DNA dizilim teknolojisinin gelişmesine rağmen, EST'ler; yeni genlerin keşfedilmesi, gen ifade düzeyi ve gen düzenlenmesi hakkında bilgi sağlamak için kullanılmaya devam etmektedir. Tüm genom dizilimlemesine oranla daha ekonomik olan ve daha hızlı sonuç veren EST'lerin veribankalarındaki sayısı her geçen gün artmaktadır. NCBI Genbank verilerine göre, şimdiye kadar ~75 milyon EST dizisi NCBI dbEST veribankasında depolanmıştır. Bitkiler aleminde en yüksek sayıda EST dizisine sahip olan organizmalar sırasıyla; *Zea mays* (mısır), *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* (soya), *Triticum aestivum* (buğday) ve *Oryza sativa* (pirinç)'dir (NCBI, 2014).

Genom araştırma dizileri (GSS'ler); EST benzeri nükleotid dizileridir. Fakat EST'lerden farklı olarak cDNA kütüphanelerinden değil, genomik dizilerden elde edilirler. Veribankasında GSS dizileri; rastgele tek geçişli genom araştırma dizileri, kozmid/BAC/YAC son dizileri, ekzon kapanı genomik diziler ve transpozon olarak etiketlenmiş dizileri içerebilmektedir (NCBI, 2014). NCBI Genbank verilerine göre, şimdiye kadar ~35,5 milyon GSS dizisi NCBI dbGSS veribankasında depolanmıştır. Bitkiler aleminde en yüksek sayıda GSS dizisine sahip olan organizmalar sırasıyla; *Zea mays + subsp. mays* (mısır), *Nicotiana tabacum* (tütün), *Sorghum bicolor*, *Brassica oleracea* (yaban hardalı) ve *Hordeum vulgare + subsp. vulgare* (arpa)'dır (NCBI, 2014).

Olası miRNA tahmini için EST verileri ilk olarak Jones-Rhoades ve Bartel tarafından 2004 yılında kullanılmıştır (Jones-Rhoades and Bartel, 2004). Aynı dönemde Bonnet ve arkadaşları da (2004) EST verilerini kullanarak, 91 yeni olası miRNA tanımlamışlardır (Bonnet, et al., 2004). Fakat bugün hala yaygın olarak kullanılan EST analizi aracılığıyla olası miRNA'ların tanımlanması, Zhang ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan çalışmayı temel almaktadır (Zhang, et al., 2005). Zhang ve arkadaşlarının EST verileri ve önceden tanımlanmış miRNA'ların karşılaştırılması ile diğer türlerde olası miRNA'ların tanımlanmasında kullandıkları yöntem, birkaç küçük değişikliğe uğramış olsa da geçerliliğini büyük oranda korumaktadır.

İlk olarak sadece EST dizilerinin kullanılmasından dolayı yöntem EST analizi olarak anılsa da, bugün EST dizilerinin yanı sıra GSS, HTGS vb. dizilerde homoloji aramalarında kullanılabilmektedir (Sunkar and Jagadeeswaran, 2008). Bu tezde yöntem, EST analizi olarak anılacaktır.

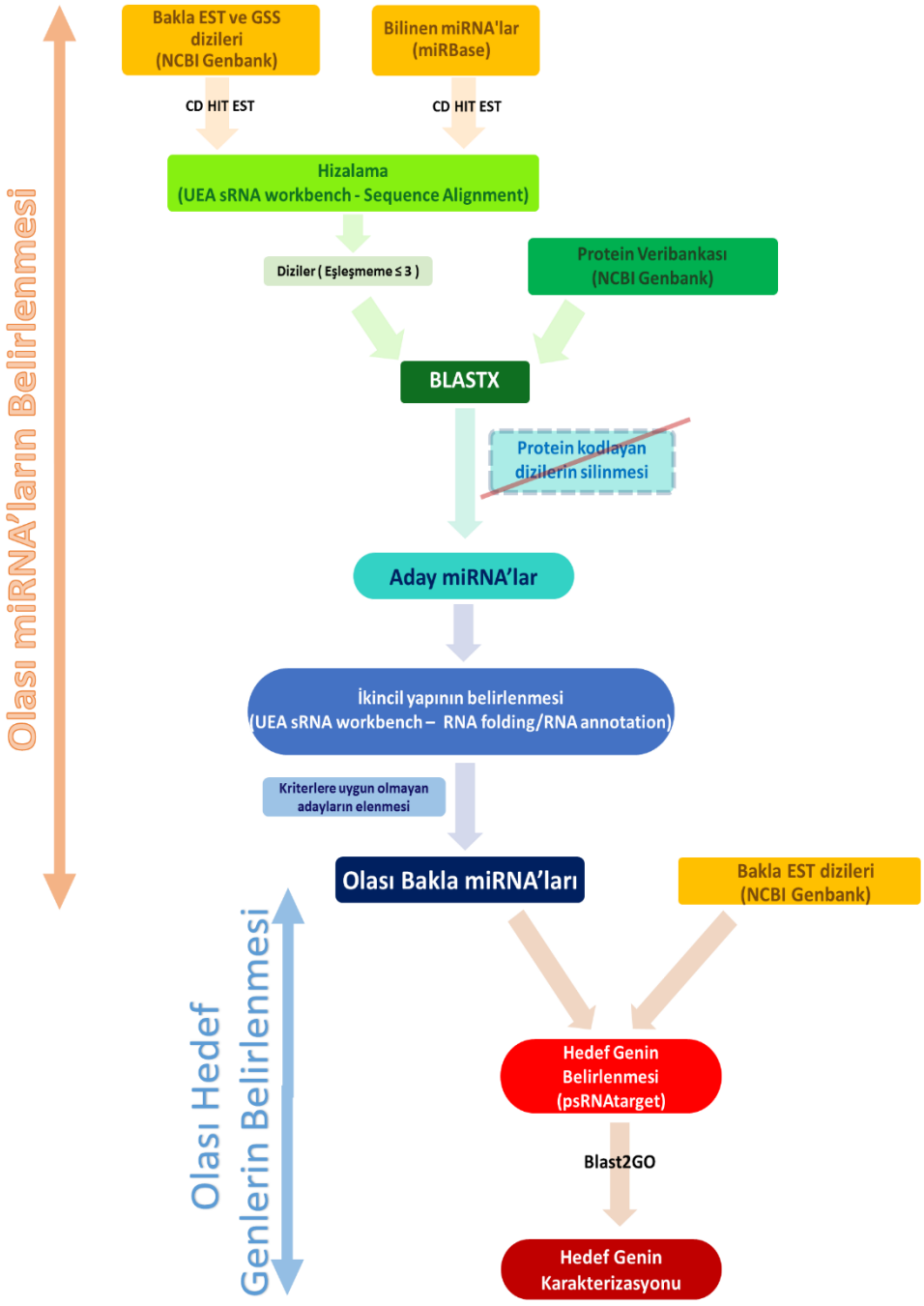
EST analizi; tüm genom dizilimlemesi yapılmamış türlerde, miRNA'ların hızlı bir şekilde çalışılmasını ve işlevlerinin tanımlanmasını sağlayan bir yöntemdir (Zhang, et al., 2005; Zhang, et al., 2006). Ulaşılabilir EST veri bankasından faydalanarak, bunların bilinen miRNA'larla karşılaştırılması, miRNA'ların tanımlanmasını mümkün kılmaktadır. Bu yolla, hem bitkilerde hem de hayvanlarda pek çok miRNA tanımlanabilmiştir (Zhang, et al., 2005; Weber, 2005; Pan, et al., 2007; Xie, et al., 2007; Song, et al., 2009; Panda, et al., 2014).

EST analizinin iş akış özeti Şekil 1.11'de özetlenmiştir. Olası miRNA'ların bilgisayar temelli yaklaşımla belirlenmesindeki kriterler ise materyal ve metot kısmında (Bkz. Bölüm 2.2) belirtilmiştir.

1.3 Bakla Bitkisi (*Vicia faba L.*)

Bakla (*Vicia faba L.*); baklagiller (Fabaceae, sin: Leguminosae) ailesinden, kazık köklü, tek yıllık bir bitkidir. Protein bakımından zengin bir tohuma sahip olan bakla, Avrupa'nın birçok iklim bölgesine uyum sağlamıştır. Hayvan yemi olarak kullanılmasının yanı sıra insan beslenmesinde de önemli olan bakla, başka ürünlerle dönüşümlü olarak ekildiğinde toprağın yapısını iyileştirerek, ürünlerin gelişimini ve verimini dolaylı yoldan arttırmaktadır (Hanafy, et al., 2013).

Baklanın kökeni tam olarak bilinmemekle birlikte; genel olarak kabul edilen görüş, coğrafik kökeninin Yakın Doğu olduğu ve Afganistan'dan Hindistan'a kadar yayılan *V. faba paucijuga* alttürünün baklanın ilksel formu olduğudur. Bu atasal formun temel özellikleri: kısa bir gövde ile küçük yaprak ve küçük tohumlara (1000 tohumun ağırlığı 250 g'dan az) sahip olması ve tercihli otogami göstermesidir (Duc, 1997).

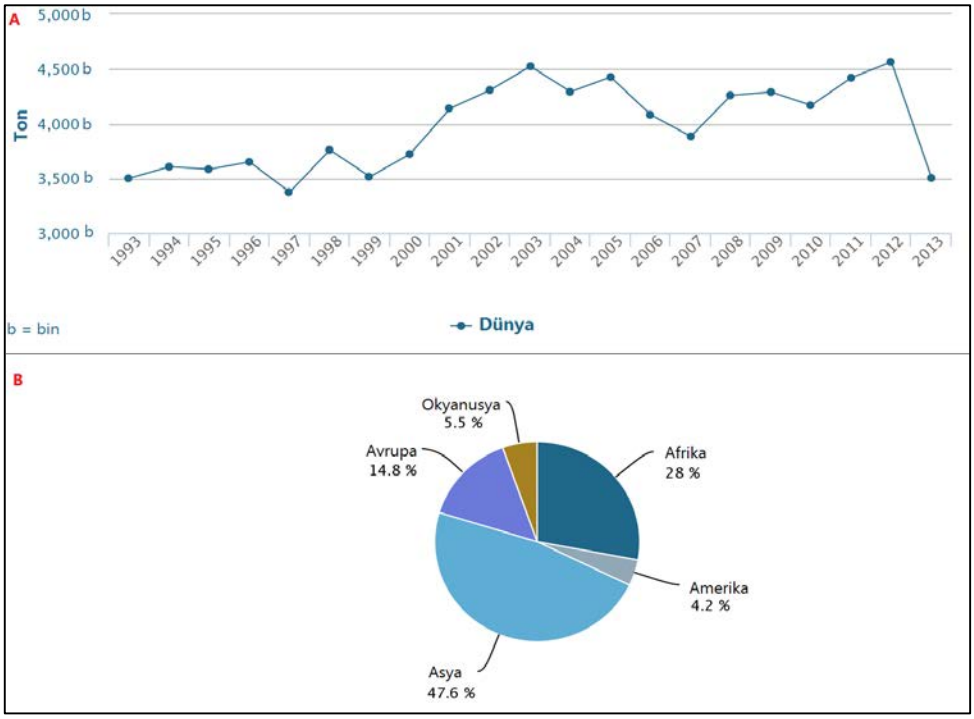


Şekil 1.11 EST analizinin iş akış özeti.

Baklanın erken Neolitik zamanlardan beri yetiştirildiği bilinmektedir. Cubero (1974), bakla evriminde; seçim kriterlerinin tohum büyüklük ve şekli, allogami ve soğuğa tolerans düzeylerinin farklılığı olabileceğini önermiştir (Cubero, 1974).

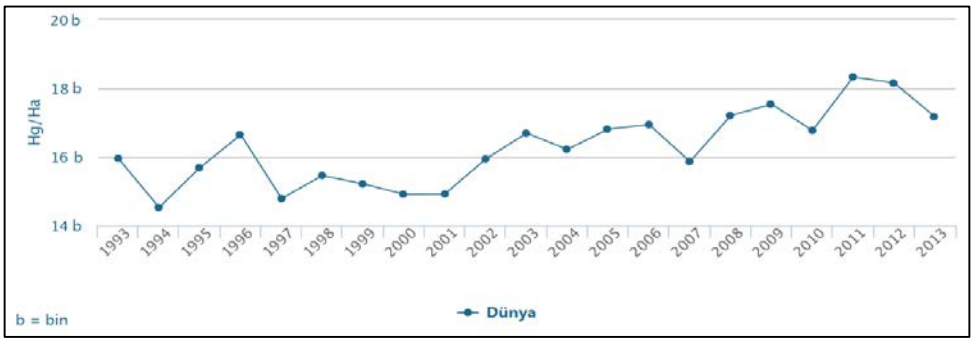
1000 tohumun ağırlığının 1 kg'dan fazla olduğu büyük tohumlu tipler (*Vicia faba major*), Güney Akdeniz ülkeleri ve Çin'de yetiştirilmekteyken; 1000 tohumunun ağırlığının 500 g'dan az olduğu küçük tohumlu tipler (*Vicia faba minor*) Etiyopya bölgesinde bulunmakta ve Kuzey Avrupa tarımında tercih edilmektedir. Orta büyüklükte tohuma sahip tipler (*Vicia faba equina*) ise Orta Asya ve Kuzey Afrika boyunca, özellikle Mısır'da yaygın bir biçimde yetiştirilmektedir (Duc, 1997).

Bugün dünyada yılda ~3,5 x 10^6 ton bakla üretilmektedir (Şekil 1.12a). Özellikle Asya (~1,6 x 10^6 ton) ve Afrika (~0,7 x 10^6 ton) gibi gelişmekte olan ülkelerde insan beslenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.12b). Baklanın en çok üretildiği ülke Çin iken, verimliliğin en yüksek olduğu ülke Arjantin'dir (FAOSTAT, 2015).



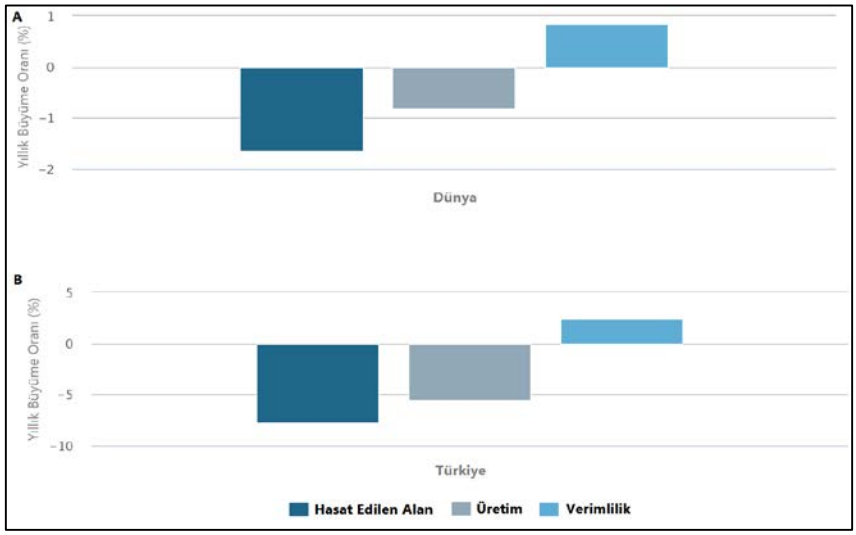
Şekil 1.12 a) 1993 – 2003 yılları arasında Dünya'da üretilen bakla miktarlarındaki değişim b) Dünya'da baklanın üretildiği bölgeler ve bu bölgelerin bakla üretim oranları (FAOSTAT, 2015).

Bakla, uygun koşullarda yetiştirildiğinde yüksek verimli bir tür olmasına karşın kuraklık stresi gibi abiyotik streslere diğer baklagillere oranla daha duyarlıdır (Hanafy, et al., 2013). Bu nedenle verimliliği yıllar arasında önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir (Şekil 1.13) (FAOSTAT, 2015).



Şekil 1.13 1993–2003 yılları arasında Dünya genelinde bakla verimliliğindeki değişim (FAOSTAT, 2015).

Türkiye'de baklanın yabani formuna ait kayıtlar kesin olmamakla birlikte, kültür formunun yetiştiriciliği büyük oranda yapılmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre; 2013'de 40243 ton, 2014 yılında ise 39502 ton bakla meyvesi üretilmiştir (TÜİK, 2015). FAO verilerine göre, Türkiye'de ve dünyada bakla ekilen alan ve üretim yıldan yıla düşme gösterirken; verimlilikte bir artış görülmektedir (Şekil 1.14) (FAOSTAT, 2015).



Şekil 1.14 a) Dünya'da ve b) Türkiye'de baklanın hasat edilen alan, üretim ve verimliliğindeki değişim (FAOSTAT, 2015).

Küresel ısınmanın bir sonucu olan iklim değişikliği nedeniyle, ısı stresiyle birlikte kuraklığın görülme sıklığında ve yoğunluğunda bir artış beklenmektedir. Bakla; iklim değişikliğinden önemli oranda etkilenecek gelişmekte olan ülkeler için önemli bir protein kaynağıdır (Bkz. Şekil 1.12b). Uygun koşullarda yetiştirildiğinde oldukça verimli bir ürün olan bakla; kuraklık stresi gibi abiyotik streslere diğer baklagillere oranla daha duyarlıdır ve verimliliği yıllar arasında önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir (Bkz. Şekil 1.13).

miRBase'in (Sürüm 21, Haziran 2014) verilerine göre; baklagillerde (Fabaceae): *Acacia auriculiformis* (7 öncül, 7 işlevsel), *Arachis hypogaea* (23 öncül, 32 işlevsel), *Acacia mangium* (3 öncül, 3 işlevsel), *Glycine max* (573 öncül, 639 işlevsel), *Glycine soja* (13 öncül, 13 işlevsel), *Lotus japonicus* (62 öncül, 67 işlevsel), *Medicago truncatula* (672 öncül, 756 işlevsel), *Phaseolus vulgaris* (8 öncül, 10 işlevsel), *Vigna unguiculata* (18 öncül, 18 işlevsel) olmak üzere toplam 9 türe ait 1379 öncül miRNA ve 1545 işlevsel miRNA keşfedilmiş ve veribankasına yüklenmiştir (miRBase, 2014). Fakat; literatür verileri incelendiğinde baklaya ait tanımlanmış miRNA'ya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı EST temelli homoloji analizi ile korunmuş bitki miRNA'ları ve etkileştikleri hedefleri baklada tanımlamaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Dizi Verileri ve Referans miRNA'lar

Kamuya açık miRNA veritabanı olan miRBase'den (Sürüm 21, Haziran 2014); Viridiplantae'ye ait, toplamda 73 türe ait 8496 işlevsel miRNA indirilmiştir. Bu miRNA'lar arasından tekrar eden diziler CD-HIT-EST web programı (Huang, et al., 2010) yardımıyla (Benzerlik 1.0 olarak seçilirken, diğer parametreler için anasayfa parametreleri kullanılmıştır.) çıkarılmış ve elde edilen özgün, tekrar etmeyen (non-redundant) işlevsel miRNA'lar çalışmada kaynak veri olarak kullanılmıştır.

Olası bakla miRNA'larını tanımlamada kullanılacak olan EST ve GSS dizi verileri, NCBI Genbank'tan elde edilmiştir. Bakla bitkisine ait toplam 40799 nükleotid dizisi NCBI Genbank'ta depolanmıştır. Bunların 20697'si EST ve 577'si GSS dizisidir (NCBI, 2014). İndirilen EST ve GSS dizilerinden tekrar eden diziler yine CD-HIT-EST web programı (Huang, et al., 2010) yardımıyla, ana sayfa parametreleri kullanılarak çıkarılmış ve elde edilen özgün, tekrar etmeyen EST ve GSS dizileri çalışmada kaynak veri olarak kullanılmıştır.

2.2 Olası Bakla miRNA'larının Tanımlanması

NCBI Genbank'ta depolanmış olan EST ve GSS gibi nükleotid dizileri, tek geçişli (single–pass) dizilim ile üretilirler, dolayısıyla elde edildikleri DNA'nın tek zinciri üzerindeki nükleotid dizilerini temsil ederler. miRNA genleri, DNA'nın her iki zincirinden birinde yer alabilmektedir. Bu nedenle; NCBI'da depolanmış EST ve GSS dizilerinin ters tamamlayıcı (reverse complement) dizileri de çalışmaya dahil edilmiştir. Baklaya ait EST dizisi ve GSS dizilerinin ters tamamlayıcı dizileri, Python programlama diline ait bir kütüphane olan Biopython (Cock, et al., 2009) betiği kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmada NCBI'dan indirilen diziler pozitif zincir olarak kabul edilirken, bu dizilerin ters tamamlayıcıları negatif zincir olarak not edilmiştir.

miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait miRNA'lar ile bakla EST ve GSS dizilerinde (pozitif ve negatif zincirler) eşleşme olup olmadığı

bir PaTMaN hizalama aracı olan (Prüfer, et al., 2008) UEA sRNA workbench programı (Stocks, et al., 2012) kullanılarak taranmıştır. UEA sRNA workbench programı içerisinde yer alan "Sequence Alignment" (Stocks, et al., 2012) aracı kullanılarak; özgün, tekrar etmeyen işlevsel bitki miRNA ile NCBI Genbank'tan indirilen baklaya ait özgün, tekrar etmeyen EST ve GSS dizilerinin hizalaması yapılmıştır. Hizalama için; izin verilen maksimum yanlış eşleşme (mismatch) sayısı 3 (üç) nükleotid, maksimum boşluk (gap) sayısı ise 0 (sıfır) olarak seçilerek, arama EST ve GSS dizilerinin hem pozitif hem negatif zincirleriyle gerçekleştirilmiştir.

Hizalama sonucuna göre, istenen şekilde eşleşme gösteren (yanlış eşleşme sayısı ≤ 3) dizilerin, kriterlere uygun bir ikincil yapıya (sap ilmik / saç tokası) sahip olup olmadıkları UEA sRNA workbench programı (Stocks, et al., 2012) kullanılarak, kontrol edilmiştir. UEA sRNA workbench programının içinde yer alan "RNA folding/RNA annotation" aracı RNAplot (Hofacker, et al., 1994) kullanarak, verilen dizinin ikincil yapısının muhtemel katlanmasını belirlemekte ve ikincil yapının MFE (minimum katlanma enerjisi) değerini vermektedir (Stocks, et al., 2012).

Olası miRNA'ların ikincil yapıları belirlenirken, daha önceden belirlenmiş olan (Ambros, et al., 2003; Zhang, et al., 2005; Zhang, et al., 2006; Meyers, et al., 2008) aşağıdaki kriterler dikkate alınmıştır (Şekil 2.1).

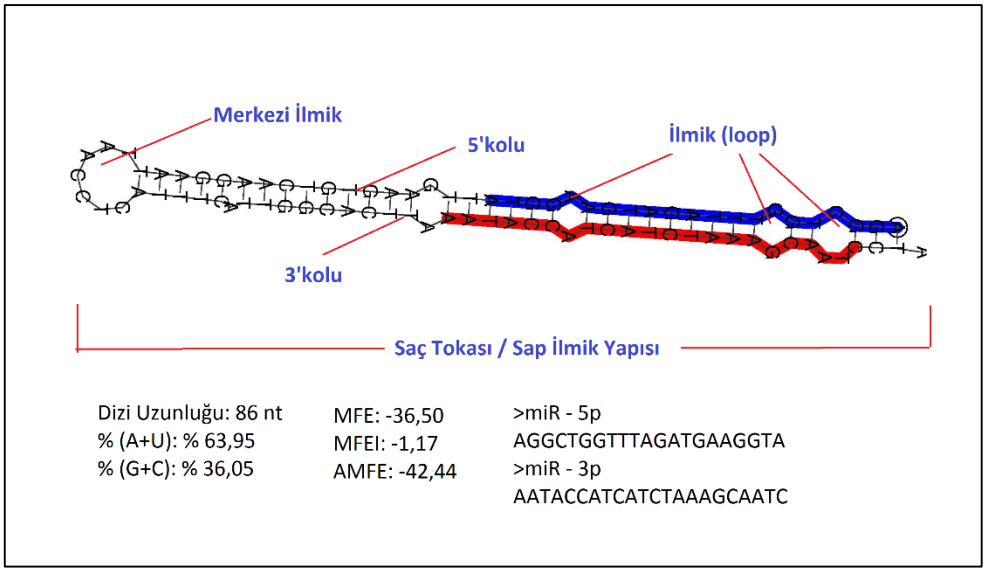
i. pre-miRNA'nın ikincil yapısı sap ilmik / saç tokası yapısında olmalıdır.
ii. pre-miRNA, 60 nt veya üzeri bir uzunluğa sahip olmalıdır.
iii. İşlevsel miRNA, pre-miRNA'nın saç tokası yapısının bir kolunda yer almalıdır.
iv. miRNA/miRNA* dupleksinde, işlevsel miRNA ve karşısına denk düşen miRNA dizisi (miRNA*) arasındaki eşleme göstermeyen nükleotid sayısı 6 nt'dan fazla olmamalıdır.
v. miRNA/miRNA* dupleksi arasında, kırılma veya büyük bir ilmek (loop) olmamalıdır.
vi. Dizideki A+U nükleotid içeriği %30 ila %70 arasında olmalıdır.
vii. Olası pre-miRNA'nın negatif MFE ve MFE indeks (MFEI) değerleri yüksek olmamalıdır. İkincil yapının MFE ve MFEI değerleri, miRNA'ları

diğer sRNA'lardan ayırabilmek için önemlidir. MFE, pre-miRNA'yı temsil eden ikincil yapının katlanma serbestlik enerjisini (ΔG) belirtirken, MFEI değeri aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$MFEI = \frac{(MFE/\ pre - miRNA\ uzunluğu)\ x\ 100}{\%(G + C)}$$

MFE ve MFEI değerlerinin yanı sıra; pre-miRNA'nın 100 nüklotidinin MFE değerini tanımlayan, düzenlenmiş MFE (AMFE) değeri de göz önüne alınmalıdır. AMFE değeri, aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$AMFE = \frac{MFE}{pre - miRNA\ uzunluğu}\ x\ 100$$



Şekil 2.1 Kriterlere uygun bir pre-miRNA'nın; sap ilmik (stem-loop) ya da saç tokası (hairpin) yapısı.

2.3 Olası Bakla miRNA'larının İsimlendirilmesi

Kriterleri sağlayan olası işlevsel miRNA'lar; miRBase veribankasının miRNA'ları isimlendirmek için kullandığı yönteme uygun olarak isimlendirilmiştir (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). Bu miRNA'lar; *Vicia faba*'nın ilk harfleri

(vfa) ve benzerlik gösterdikleri homolog miRNA'ların gen ailelerinin kodları ile isimlendirilmiştir, vfa-miR156 gibi. Aynı gen ailesine ait olup, ikincil yapısı farklılık gösteren ya da işlevsel dizi üzerinde farklılık gösteren paralog miRNA'lar ise gen ailesi kodlarının yanına getirilen küçük harflerle birbirinden ayrılmıştır, vfa-miR156a, vfa-miR156b gibi.

2.4 Tanımlanan miRNA'larının Hedef Tahminleri

Bitki miRNA'larının, hedef mRNA'larıyla genellikle tam ya da tama yakın bir eşleşme gösteriyor olması, bitki miRNA hedeflerinin, bilgisayar temelli yaklaşımlarla belirlenmesini mümkün kılmaktadır. Bitki sRNA'larının hedef tahminini yapmak için geliştirilmiş olan psRNAtarget web programı kullanılarak, hedef tahmini yapılmıştır. Bilindiği üzere, bitki miRNA'sının hedef mRNA'ya bağlanması ile mRNA ya yıkılır ya da translasyonu baskılanır. psRNAtarget, miRNA'ların olası hedef mRNA'larını (hedef genlerini) belirlemenin yanı sıra, miRNA/hedef etkileşimi sonucunda hedefin son durumunun (baskılanma ya da yıkılma) ne olacağına dair de bilgi vermektedir (Dai and Zhao, 2011).

psRNAtarget ile yapılan hedef tahmininde, analizler sonucunda olası miRNA olarak belirlenen dizilerin hedef tahmini için bakla EST dizileri kullanılmıştır. Pozitif hata (false positive) oranını düşürmek ve en olası hedefi bulabilmek için aşağıdaki parametreler kullanılmıştır:

i. Maksimum istisnai durum: 2.0,
ii. Komplementerlik skorunun uzunluğu: 20,
iii. Her sRNA için belirlenecek hedef sayısı: 25,
iv. Hedef erişilebilirliği – hedef bölgesini ayırmak (katlanmaları açmak) için izin verilen maksimum enerji (UPE): 25.0,
v. Hedef erişilebilirlik analizi için hedef bölgesinin komşu dizilerinin uzunluğu: yukarı yönde (upstream) 17 bp / aşağı yönde (downstream) 13 bp,
vi. Translasyonun baskılanmasına neden olan merkezi eşleşmeme aralığı: 9 – 11 nt.

2.5 miRNA Hedef Genlerinin İşlev Tanımlaması ve Yolak Analizi

psRNAtarget sonuçlarına göre bakla miRNA'larının muhtemel hedefi olarak belirlenen EST dizilerinin işlevleri ve metabolik yolakları, Blast2GO (Sürüm 3.0, Kasım 2014) programı (Conesa and Götz, 2008) kullanılarak gerçekleştirilen bir dizi işlem sonucunda belirlenmiştir.

Blast2GO programı, gen ya da protein dizilerinin analiz ve işlev tanımlanmasının yapılmasını sağlayan kapsamlı bir biyoinformatik aracıdır. Gen Ontoloji – GO (The Gene Ontology Consortium, 2008) tanımlamasını yapmak için geliştirilmiş olan Blast2GO programı, GO tanımlamasının yanı sıra Enzim Kodları (EC), KEGG (Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi) Haritaları ve InterPro motifleri ile desteklenmiş bir araçtır.

Blast2GO ile işlev tanımlama ve yolak analizi beş temel adımdan oluşmuştur: BLASTlama, haritalama, tanımlama (annotation), istatiksel analiz ve görselleştirme.

İlk olarak, bakla miRNA'larının muhtemel hedefi olarak belirlenen EST dizilerinin bir protein kodlayıp kodlamadığına bakmak için BLASTX analizi yapılmıştır. EST dizileri, NCBI – tekrar etmeyen (non-redundant) NR veribankası ile bir hizalama aracı olan BLASTX aracıyla (QBlast – NCBI), e değeri: 1e-10, blast hit sayısı:20 olacak şekilde hizalanmıştır. BLASTX sonuçlarına göre NCBI'da depolanmış olan genlerle benzerlik gösteren diziler; olası hedef gen olarak kabul edilmiştir.

BLAST analizleri yapılan dizilerin, GO bazlı bir protein dizi analiz ve sınıflandırma aracı olan InterProScan5 motifleri çıkarılarak, GO çıktıları elde edilmiştir. QuickGo ile bağlantılı çalışan InterProScan5 dışında, hedef genlerin işlev analizi için bir GO veribankası olan AmiGo2 web aracı da kullanılarak, buradan elde edilen GO çıktıları da sonuçlara dahil edilmiştir. Ayrıca, GO'nun indirgenmiş ve belirli organizmalara (genel, bitki, maya vb.) göre uyarlanmış bir versiyonu olan GO-Slim/Plant Slim analize de yapılarak, çıktıları sonuçlara dahil edilmiştir.

Son olarak, hedef genlerin metabolik yolaklarını belirmek için EC ve KEGG haritaları çıkarılmış, bu sayede hedef transkriptlerin varsa enzim kodları ve bu enzimlerin dahil olduğu metabolik yolaklar belirlenmiştir.

Bütün bu analizler sonucunda, elde edilen GO çıktıları; CateGOrizer (Zhi-Liang, et al., 2008) ve REVIGO (Supek, et al., 2011) web araçları kullanılarak özetlenmiş ve görselleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Dizi Verileri ve Referans miRNA'lar

miRBase (Sürüm 21, Haziran 2014)'den indirilen 8496 işlevsel miRNA'dan tekrar eden diziler, CD-HIT-EST web programı (Huang, et al., 2010) yardımıyla (benzerlik 1.0 olarak seçilerek, diğer parametreler için anasayfa parametreleri kullanılmıştır) çıkarılmıştır. Tekrar eden diziler çıkarıldıktan sonra geriye kalan, özgün, tekrar etmeyen 4624 işlevsel miRNA araştırma için seçilmiştir.

NCBI Genbank'tan elde edilen bakla bitkisine ait 20697 EST ve 577 GSS dizilerinden de tekrar eden diziler CD-HIT-EST web programı (Huang, et al., 2010) yardımıyla, ana sayfa parametreleri kullanılarak çıkarılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada, bakla bitkisine ait özgün, tekrar etmeyen 9208 EST dizisi ve 447 GSS dizisi olası bakla miRNA'larının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2 Olası Bakla miRNA'larının Tanımlanması

miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait miRNA'lar ile bakla EST ve GSS dizilerinde (pozitif ve negatif zincirler) bir eşleşme olup olmadığı UEA sRNA workbench programı (Stocks, et al., 2012) kullanılarak taranmıştır. Özgün, tekrar etmeyen 4624 işlevsel miRNA ile NCBI Genbank'tan indirilen baklaya ait özgün, tekrar etmeyen 9208 EST dizisi ve 447 GSS dizilerinin hizalaması yapılmıştır. Hizalama sonucuna göre, istenen şekilde eşleşme gösteren (eşleşmeme ≤ 3) dizilerin, kriterlere uygun bir ikincil yapıya (sap ilmik / saç tokası) sahip olup olmadıkları yine UEA sRNA workbench programı (Stocks, et al., 2012) kullanılarak, kontrol edilmiştir. Katlama sonuçlarına göre, ikincil yapısı kriterlere uygun (Bkz. Bölüm 2.2) olan diziler bakla olası miRNA ve pre-miRNA'sı olarak belirlenerek, bölüm 2.3'de belirtildiği gibi isimlendirilmiştir.

Sonuç olarak; bakla bitkisine ait 143 miRNA familyasına ait toplam 262 olası miRNA tanımlanmıştır. Bunlardan miR845, miR1044c, miR1888, miR5140f, miR5506, miR6182b, miR6281d, miR6281e ve miR8714 olmak üzere 9 tanesi GSS dizilerinden elde edilmişken, diğer 253 olası miRNA ise EST dizilerinden elde edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Tanımlanmış olası bakla miRNA'larının karakterizasyonu. D, Tanımlandıkları dizi; E, EST; G, GSS; S, bulundukları zincir; M, eşleşmeme sayısı; A, pre-miRNA üzerinde hangi kolda bulundukları; LM, işlevsel miRNA uzunluğu; LP, pre-miRNA uzunluğunu belirtmektedir. *, işaretinin bulunduğu sütunlardaki sayılar negatiftir.

vfa-miR	*Bakla miRNA dizileri*	*D*	*Aksesyon No*	*S*	*M*	*A*	*LM*	*LP*	*MFE**	*%(G+C)*	*AMFE**	*MFEI**
miR156a	UGACAGAAGAGAGGGAGCUG	E	HX904779.1	-	2	3'	20	102	22,08	40,2	21,65	0,54
miR156b	UGACAGAAGAGAGCGGGCUG	E	HX904075.1	-	3	3'	20	98	32,29	45,9	32,95	0,72
miR166a	UCGAGCCAGGCUUCAUUUUC	E	HX908783.1	-	3	5'	20	165	39,1	40,0	23,70	0,59
miR166b	UCGGACAAGGCUUCUUUUCUC	E	HX908475.1	-	3	5'	21	153	40,2	44,4	26,27	0,59
miR166c	GGAAUGUUGUAUGGUGCUAG	E	HX907374.1	-	3	5'	20	349	80,3	51,0	23,01	0,45
miR167a	GAUUGUGGUGUGCAGUUUCAUC	E	HX903700.1	+	3	5'	22	196	38,69	37,2	19,74	0,53
			HX914900.1	-								
miR167b	GGUCAUGUUGCAGUUUCAUG	E	HX906727.1	+	3	5'	20	106	31,2	50,9	29,43	0,58
miR167c	GAUGAUGUGCUUGCUUCAAC	E	HX915173.1	-	3	5'	20	104	23,59	42,3	22,68	0,54
miR167d	AGGUCAUGCUCUAGCUUCAUU	E	HX908923.1	-	3	5'	21	110	25,4	45,5	23,09	0,51
miR167e	GAUUGUGGUGUGCAGUUUCAUC	E	HX903576.1	+	3	3'	22	92	20,1	37,0	21,85	0,59
miR167f	GAUCUUGUGUCAAUUUCAUU	E	HX908365.1	-	3	3'	20	233	52,7	36,5	22,62	0,62
miR169a	GCUCCUUGUUCUUGGCUAGC	E	HX907768.1	-	3	5'	20	65	25,5	53,9	39,23	0,73
miR169b	GGGAUUCGCUUUGGCUAUC	E	HX901804.1	-	3	5'	19	269	86,9	54,3	32,30	0,60
miR169c	GCCAGCAUCUUUGGCAACU	E	HX901847.1	+	3	3'	19	204	45,5	44,1	22,30	0,51
miR169d	GGGAGCAUCCAUGGCGACU	E	FL502925.1	+	3	3'	19	145	31,5	42,1	21,72	0,52
miR171	UAAUGGUGCAGAUCAAUCAGA	E	HX909053.1	+	3	5'	21	215	61	49,3	28,37	0,58
miR172a	GGAAUCCUGAUGAUGCUGCAA	E	HX903307.1	+	2	5'	21	140	38,3	45,7	27,36	0,60
miR172b	UGGAAUCUCGUUGAAGCUGCAG	E	HX907874.1	+	3	5'	22	159	54,2	51,0	34,09	0,67
miR319	UUGGAGUCAAGGGAGCUUCCU	E	HX900952.1	+	3	3'	21	128	20,3	32,8	15,86	0,48
miR395a	UUGAAGAGUUUGGUGGGAUUC	E	HX908044.1	+	3	5'	21	95	19,8	42,1	20,84	0,49
			HX913444.1	-								
miR395b	CUGUAAUGUUUGGUGGAACUU	E	HX908124.1	-	3	3'	21	202	33,04	31,2	16,36	0,52
miR396a	UCCACAGGCUUUCUUGAACGG	E	HX901141.1	-	0	3'	21	69	20,6	49,3	29,86	0,61
miR396b	CAAAGCAGUCUUGAACUUUCU	E	HX904682.1	-	3	3'	21	289	85,8	51,9	29,69	0,57
miR399	GGGUUCGUCACCUUUGACACA	E	HX901863.1	+	3	5'	21	91	21,8	46,2	23,96	0,52
miR400	GACUUAUGAUGAUCUUUUGAA	E	HX904260.1	-	3	5'	21	101	20,82	34,7	20,61	0,59
miR408a	UGCACUGUCUCUUCCCUAGC	E	HX914063.1	+	3	5'	20	232	73,9	44,4	31,85	0,72
miR408b	UUCUUUUUCCCUUUCUCUCUC	E	HX904625.1	+	3	5'	21	109	19,6	36,7	17,98	0,49
miR408c	UUGCACUGUCUCUUCCCUAGC	E	HX912952.1	-	3	5'	21	232	78,7	44,4	33,92	0,76
miR414a	UCUUCCUCAUCAUCGUCGUCC	E	HX909881.1	+	2	5'	21	77	19,9	45,5	25,84	0,57
miR414b	UCGUCCUCAUCAUCCUCAUCU	E	HX910920.1	-	3	5'	21	226	58,5	47,4	25,88	0,55
miR414c	UCAUCCUCAUCAUCUUCUUUC	E	HX902254.1	-	3	5'	21	116	19,7	37,1	16,98	0,46
miR414d	UCAACUUCUUCACCAUCGUCA	E	HX907256.1	+	3	3'	21	186	38,63	45,7	20,77	0,45
miR414e	UCAUCAUCAUCAUCAUCAUCA	E	HX904278.1	+	3	3'	21	176	38,9	37,5	22,10	0,59
miR419	UUAUGGAUGCUGCGGAUAUUG	E	HX909070.1	-	3	3'	21	302	81,5	42,1	26,99	0,64
miR477a	CUCUCUCUCCAUGGCUUCCA	E	FL503589.1	+	3	5'	20	98	20,9	52,0	21,33	0,41
miR477b	UCUCGCCCUCAACGGCUUCAC	E	HX906067.1	-	3	3'	21	184	53,96	52,2	29,33	0,56
miR477c	CUCUCCCUCAAGUUGAUCAA	E	HS514025.1	-	3	3'	20	107	27,5	46,7	25,70	0,55
miR482a	UUGGAGAUGAAGGAACCUU	E	HX910903.1	+	2	5'	19	132	27,53	42,4	20,86	0,49
miR482b	AGUGGAUGGUGUGGGAAGACU	E	HX909464.1	-	3	5'	21	147	46,1	42,9	31,36	0,73
miR482c	UGGGAGAUCUAGGAGCUUU	E	HX907077.1	-	3	5'	19	93	25	46,2	26,88	0,58
miR482d	UGGCAGAAGAAGGAUCCUU	E	HX906427.1	+	3	3'	19	145	48,6	42,8	33,52	0,78
miR529	AGAAGAGAGAGAUCAAAGGUU	E	HX906436.1	+	3	3'	21	143	30,65	34,3	21,43	0,63
miR530a	AGGUGGAGUUGCAGUUGGAGG	E	JK265654.1	-	3	5'	21	340	100,1	44,7	29,44	0,66
miR530b	UGCAUCAGCAGCUGCACUUUC	E	HX900306.1	+	3	3'	21	155	38,9	42,6	25,10	0,59
miR530c	AGGUGAAGGUGCAGGUGCAGA	E	HX901892.1	-	3	3'	21	199	68,6	50,8	34,47	0,68
miR774a	UUGGAUACCCAUAUAACCAUC	E	HX913863.1 HX907803.1	+	3	5'	21	236	44,5	34,3	18,86	0,55
miR774b	UGUGAUGAAGAUUUGGAUAAU	E	HX910831.1	+	3	3'	21	90	19,6	35,6	21,78	0,61
miR775	UUCAAUUGCUAGCAGUGCCA	E	HX907653.1	+	3	5'	20	224	58,5	41,5	26,12	0,63

miR778	UGACUUGCUUUAUGUCCACCG	E	HX900485.1	-	3	5'	21	165	43,6	46,1	26,42	0,57
miR816	GUGACAUAUUUUAGUGCUAC	E	HX912107.1	+	3	5'	20	135	28,8	40,0	21,33	0,53
miR834	UGGUGGCAGUAACGUUGGUAA	E	HX908641.1	-	3	5'	21	113	28,9	39,8	25,58	0,64
miR835	UGAAGAACAUAAGCAACAAAG	E	HX905090.1	-	3	5'	21	320	91,1	45,0	28,47	0,63
miR838a	UCUUCUUCUUCUUCUUUCAGA	E	HX911325.1	+	3	5'	21	123	22,8	35,0	18,54	0,53
miR838b	UUUUCUACUUCUUCUUUCAGA	E	HX905022.1	+	3	5'	21	224	59,1	38,4	26,38	0,69
miR838c	UCUUCUUCUUCUACUUCCACA	E	FL506323.1	+	3	5'	21	170	49,2	50,0	28,94	0,58
miR845	UCAAUUGGUAUCAGAGCCUGG	G	AJ852747.1	+	3	3'	21	197	50,51	39,6	25,64	0,65
miR847a	UCAAUCUUCUUCUUCUUCAUG	E	FL505267.1	+	3	5'	21	119	30,3	37,0	25,46	0,69
miR847b	UCAGCACUCUUCUUCAUGAUG	E	HX910428.1	+	3	3'	21	191	64,6	46,6	33,82	0,73
miR848a	ACCAAUCCCAUGGCAAA	E	HX906572.1	+	3	5'	17	267	60,41	40,5	22,63	0,56
miR848b	AGCAAUGCCAUGUCAGA	E	HX902368.1	-	3	5'	17	133	30	48,9	22,56	0,46
miR848c	GGGAAUCCUAUGUCAAC	E	HX906396.1	-	3	5'	17	327	82,9	41,9	25,35	0,61
miR848d	GGAACUCCCAUGUCAAC	E	HX911017.1	-	3	3'	17	99	21,5	46,5	21,72	0,47
miR854a	GAUUAGGAUUGUGAGGAGGAC	E	HX912186.1	-	3	5'	21	120	21,8	42,5	18,17	0,43
miR854b	GAUGAAGAGAGGAAGGAGGAG	E	FL503316.1	+	3	3'	21	252	66,07	40,9	26,22	0,64
miR854c	GGGGAGGAUAUGGAGGAGGAG	E	HX904045.1	-	3	3'	21	71	24,7	57,8	34,79	0,60
miR858	GGUAGAGCAGAGAAUGAAGAU	E	HX900609.1	+	3	3'	21	159	37,14	35,2	23,36	0,66
miR867	UUUAACAUGGUUUAUUUGGAU	E	HX913822.1	-	3	3'	21	275	81,7	42,6	29,71	0,70
miR902	AAUGAUUCAGAUUCUUAAUCU	E	HX911365.1	+	3	5'	21	210	37,52	38,6	17,87	0,46
miR1026	UGAGAAAACCUUGAGAGGCCA	E	HX903658.1	+	3	5'	21	270	67,3	41,9	24,93	0,60
miR1028	UCUUGGAUCUUCAAUCUCACA	E	HX908335.1	+	3	5'	21	94	19,27	42,6	20,50	0,48
miR1032	AGGUGCUUGGCUGGAAUUGGG	E	HX902081.1	+	3	5'	21	167	52,6	43,1	31,50	0,73
miR1039	UCUUUGAGUCUUUCUCUGGUG	E	HX910261.1	-	3	3'	21	83	29	45,8	34,94	0,76
miR1044a	UUGCAGUGGAUACUUGUUUU	E	HX904377.1	+	3	5'	20	72	20,6	43,1	28,61	0,66
			HX906714.1	-								
miR1044b	UUAUAGUGCAUAUUUGAUAU	E	HX913926.1	-	3	5'	20	233	60,4	32,2	25,92	0,81
miR1044c	UUGGAGUGCAUCUUGGUUUU	G	AJ852809.1	+	3	3'	20	256	55,7	32,0	21,76	0,68
miR1052	CUUCUUUUAUUGAUUGUGGCA	E	HX907385.1	-	3	5'	21	67	24,5	47,8	36,57	0,77
miR1061	UAAGUAGUCAAUGGAUUAAUU	E	HX907285.1	+	3	5'	21	149	25,9	33,6	17,38	0,52
miR1087	UAAAGAGUGGUGUUAGUGCUG	E	HX910571.1	-	3	5'	21	221	59,22	37,6	26,80	0,71
miR1153	GAUUGUAAUGCAAUCCCUC	E	HX912931.1	+	3	3'	19	101	18,2	45,5	18,02	0,40
miR1157	UUCGGGUAGCAGCACCAGGUG	E	HX904629.1	+	3	3'	21	210	70,5	49,1	33,57	0,68
miR1168a	AGCACUGAAGACGAAGA	E	HX912945.1	-	2	5'	17	96	24,3	44,8	25,31	0,57
			HX904594.1	+								
miR1168b	AGCAAGGAAAGUGAAGA	E	HX914124.1	-	3	3'	17	193	48,2	36,8	24,97	0,68
miR1435a	CUUCUAAUGUCAAACCUUUU	E	HX906615.1	-	3	5'	20	89	21,2	38,2	23,82	0,62
miR1435b	UUUCUUCAGUCAAACGUUUA	E	FL502960.1	-	3	5'	20	214	44,1	41,6	20,61	0,50
miR1439	UUUUGGAUUGGAGUGACUAUU	E	HX910421.1	-	3	5'	21	138	37,4	37,7	27,10	0,72
miR1507	AGAGCUGUAUGGAACGACACAU	E	HX905871.1	+	3	5'	22	128	28,6	43,0	22,34	0,52
miR1513	UGCGAGAGAAAGCCAUGAC	E	HX905225.1	-	2	5'	19	164	36,5	34,8	22,26	0,64
miR1518	UGAGUUGUAAUGUGAUUAUCA	E	HX906120.1	-	3	3'	21	126	26,1	28,6	20,71	0,73
miR1533a	AUAAUAAUAAUAAUAAUAA	E	HX906270.1	+	2	5'	19	122	34,7	27,1	28,44	1,05
miR1533b	GUAAUAAAUAUGAUAAUGA	E	HX915194.1	+	3	5'	19	185	52,4	42,2	28,32	0,67
miR1533c	ACAAUAAAAAAAAUAAAGA	E	HX908292.1	+	3	5'	19	293	70,4	38,2	24,03	0,63
miR1533d	AGAAAAAAAAUUAUAAUGA	E	HX907350.1	-	3	5'	19	234	43,8	29,5	18,72	0,63
miR1857a	UGGUUUUGUUGGAGCUUGAGC	E	HX914028.1	+	3	5'	21	322	109	55,9	33,85	0,61
miR1857b	UGGUUUUGUUGGAGCUUGAGC	E	HX910078.1	-	3	5'	21	288	98,6	55,9	34,24	0,61
miR1888	UAAGCUUAGGUUUGUGAAGAA	G	AJ852855.1	-	3	3'	21	223	54,8	38,1	24,57	0,64
miR2084a	CGUGCUUUGUUGGAUUGUGGU	E	HX911998.1	+	3	5'	21	323	83,7	44,9	25,91	0,58
miR2084b	CGUGCUUUGUUGGAUUGUGGU	E	HX908148.1	+	3	3'	21	109	23	39,5	21,10	0,53
miR2095	CUUUCUUUUAUGAUAAGUUU	E	HX914800.1	+	3	3'	20	99	19	33,3	19,19	0,58
miR2102a	GUUCAAGCCGCCGCCGCCAG	E	HX909746.1	+	3	5'	20	290	69,5	46,2	23,97	0,52
miR2102b	GACGGUGCCGGUUCCGGUGGCG	E	HX908105.1	-	2	3'	22	283	91,1	50,5	32,19	0,64
miR2105a	UUGUGAUGUGAAUGAACCUU	E	HX909069.1	+	3	3'	20	303	84,9	46,5	28,02	0,60
miR2105b	UUGUAAUGCGAAUUAUUCAU	E	HX904527.1	-	3	3'	20	142	27,8	31,7	19,58	0,62
miR2108a	UUAAUGUGUUGUGUUUCUGUG	E	FL505353.1	+	2	3'	21	186	45,1	39,8	24,25	0,61
miR2108b	UUUAUUUGUUGUGUUUGUGAU	E	HX906831.1	-	3	3'	21	134	38,9	43,3	29,03	0,67
miR2118	CAAAUGGGUGGAUGCAAGUGA	E	HX903494.1	+	3	5'	21	300	83,44	41,3	27,81	0,67
			HX901570.1	-								
miR2592	AGGAUGGUUUUGCUGAAGGUA	E	HX903567.1	+	3	5'	21	105	23	44,8	21,90	0,49
miR2595	CACAUUUUUGUCUUUAUGUCU	E	HX906341.1	-	3	5'	21	327	74,1	37,9	22,66	0,60
miR2596	UCUAUGUCAUUGUUCCAAACU	E	HX903459.1	-	3	3'	21	144	37,1	42,4	25,76	0,61

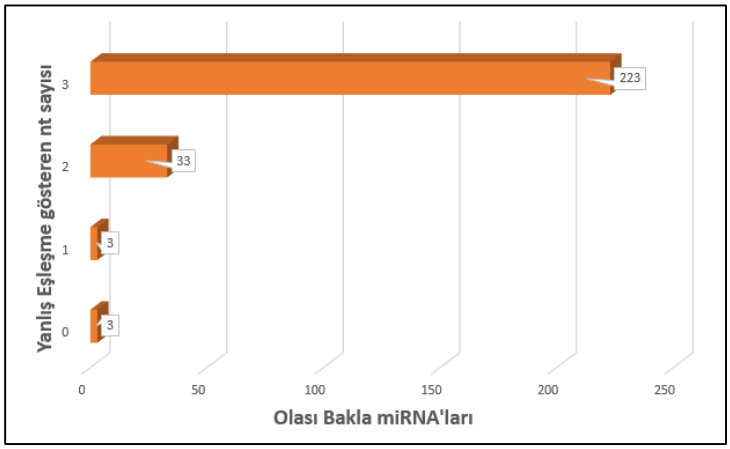
miR2611a	UAUUUUUCAGGGUUUGAUGCA	E	HX909352.1	-	3	5'	21	94	29,6	40,4	31,49	0,78
miR2611b	UAUUUGUGUGUGUUUGAUGUA	E	FL503228.1	-	3	3'	21	297	72,42	40,1	24,38	0,61
miR2630	UGGCUCUGGUCAUUGGUAUUU	E	HX904284.1	+	3	3'	21	109	27,1	43,1	24,86	0,58
			HX903337.1	-								
miR2658	AUGUGACUUUGAAUUUGAUC	E	HX905677.1	+	3	3'	20	122	20,8	37,7	17,05	0,45
			HX904157.1	-								
miR2662	GAGAAAAAAUGUGAAGAGAAU	E	HX911336.1	+	3	5'	21	301	60,6	32,9	20,13	0,61
miR2673	CCUCCUCCUCCUCCUCUUCAAC	E	HX909852.1	+	3	5'	22	141	48,7	47,5	34,54	0,73
miR2678a	UGAAAUUGUAGCGAGUGUCUU	E	HX910864.1	-	1	3'	21	231	64,5	41,1	27,92	0,68
miR2678b	UGAUUAUGUUGCGAGUGUCUU	E	HX907304.1	+	3	3'	21	290	62,2	40,0	21,45	0,54
miR2867	CCAGGGUGUGUUGGAUGGCA	E	HX903796.1	+	3	5'	20	156	38,9	40,4	24,94	0,62
			HX913875.1	-								
miR2868	UUGGUGUAGUGUUGUAGAAA	E	HX914417.1	-	3	3'	20	190	49	43,7	25,79	0,59
miR2873a	UUGGAUUUGAGAUUUGAAAUG	E	HX911344.1	+	3	5'	21	166	50,5	43,4	30,42	0,70
miR2873b	AUGGACUUGAGAUUUGGUUUG	E	HX904828.1	+	2	3'	21	238	78,3	45,4	32,90	0,72
miR2873c	CAAAUGCAUUUGAUUUUGGAC	E	HX904212.1	-	3	3'	21	152	36,36	34,2	23,92	0,70
miR2938	AAUCUUUUGAAAGGGUUGCAG	E	HX903591.1	-	3	5'	21	90	20,3	37,8	22,56	0,60
miR3434	ACUUGUCUGAUUCUUUUAGU	E	HX905250.1	-	3	3'	20	141	33,3	37,6	23,62	0,63
miR3447	UUUGAGUGUGCUAGGUAUGAA	E	FL506413.1	-	3	3'	21	143	30,3	36,4	21,19	0,58
miR3513	UUAAUAAGAUCGAAACUGUAU	E	HX905671.1	+	3	5'	21	150	23,5	38,7	15,67	0,41
miR3520	AAGGGAGACCUUUGAAUUCUG	E	HX911749.1	+	3	3'	21	278	83,22	43,9	29,94	0,68
miR3623	UCAUAAGUUCUUCCAAACACCA	E	HX904371.1	-	3	5'	22	146	29,5	38,4	20,21	0,53
miR3631a	UGUUGGAUGAUUUGAAUAAGU	E	HX909203.1	-	2	5'	21	162	38,2	45,7	23,58	0,52
miR3631b	UGUUGGAUGAUUUGAAUAAGU	E	HX904862.1	+	2	3'	21	158	35,3	41,8	22,34	0,53
miR3631c	UAUAUUGUAUGAAGUUAACAA	E	HX911239.1	-	3	3'	21	230	52,6	40,9	22,87	0,56
miR3633	GGAAUGGAUUGGUAGGAGAC	E	HX908333.1	-	3	5'	20	168	50,4	45,8	30,00	0,65
miR3979a	UCUCUCACUCCCUUCAAAGC	E	HX915120.1	-	3	5'	20	112	29,2	43,8	26,07	0,60
miR3979b	UCUCUCUCUACCUCCAAGGC	E	HX915006.1	-	3	3'	20	127	29,5	40,9	23,23	0,57
miR4239	UUUGUUCUUUUCGGAUCCUCC	E	HX900624.1	+	3	5'	21	129	34,7	45,7	26,90	0,59
miR4245	ACAAAGUUGUAUACUGACGAU	E	HX913628.1	-	2	5'	21	214	49,3	38,3	23,04	0,60
miR4993	CGGCGGCGGCGGUGGAGGAAG	E	HX909788.1	-	3	3'	21	90	41,15	58,9	45,72	0,78
miR4995	AGGCAGUGGCUUGGUUAAGGG	E	HX910711.1 HX901891.1 HX905775.1	+	0	3'	21	282	102,2	54,3	36,24	0,67
			HX910711.1 HX901891.1 HX905775.1	-								
miR5021a	UGAGAAGACGAAGAAGAAAC	E	HX904986.1	-	2	5'	20	167	39,1	31,1	23,41	0,75
miR5021b	UGAGAAGAAAAAGAAGGAGA	E	HX906614.1	+	3	5'	20	157	41,6	42,7	26,50	0,62
			HX907129.1	-								
miR5021c	GAAGGAGAAGAAGAAGAAAA	E	HX906735.1	-	3	5'	20	62	22	43,6	35,48	0,81
miR5021d	AGAGAAGAAGAAAAAGAAGA	E	HX901743.1	-	3	5'	20	272	62,44	39,0	22,96	0,59
miR5021e	UUUGAAGAAGAAGAAGAAGA	E	HX905397.1	-	3	5'	20	116	20,71	25,0	17,85	0,71
miR5021f	UGAACAGAAGAAGAAGAAGA	E	HS513985.1	-	3	5'	20	119	25,7	42,9	21,60	0,50
miR5021g	UGUGAAGAAGAAGAAGAAGA	E	HX908024.1	-	2	3'	20	295	50,6	35,6	17,15	0,48
miR5021h	AGACAAGAAGAAGAAGAGAA	E	HX914394.1	+	3	3'	20	191	48,12	47,1	25,19	0,53
miR5021i	GAAGAAGAAGAAGAAGAAAC	E	HX901365.1	+	3	3'	20	190	44,59	43,2	23,47	0,54
miR5021j	GGAGAAGACGAAGAAGAUAA	E	HX908839.1	-	3	3'	20	306	90	39,2	29,41	0,75
miR5021k	AAAGAAGAAGAAGAAGAAGA	E	HX911325.1	-	3	3'	20	152	25,9	34,2	17,04	0,50
miR5021l	UAAGAAGAAAAAGAAGAAGA	E	HX902984.1	-	3	3'	20	233	52,76	35,2	22,64	0,64
miR5021m	UGUGAAGAAGAAGAGGAAAU	E	HX911762.1	-	3	3'	20	233	67,7	41,2	29,06	0,71
miR5077	GUUCGCCUCAGGUUCGCCA	E	HX911937.1	-	3	3'	19	63	21,3	49,2	33,81	0,69
miR5140a	AAUGGUGAAGAUUUGCUG	E	HX903483.1	+	3	5'	18	169	53,9	47,3	31,89	0,67
miR5140b	GAUGGUAAAGUUUUGGUG	E	HX900715.1	+	3	5'	18	126	36,1	44,4	28,65	0,64
			HX900464.1	-								
miR5140c	UCUGGUGAAGCUUUGCUG	E	HX912842.1	+	3	5'	18	67	19,4	49,3	28,96	0,59
miR5140d	AAUGGUGAAGAUUUGCUG	E	HX905147.1	+	3	5'	18	83	21,2	42,2	25,54	0,61
miR5140e	GCUGGUGUAGUUUUUGUG	E	FL506970.1	+	3	5'	18	88	21,5	43,2	24,43	0,57
miR5140f	GCUGUUGAAGAGUAGGUG	G	AJ852827.1	+	3	5'	18	92	21,02	39,1	22,85	0,58
miR5140g	GUUGGUGAAGAUUUUUUG	E	HX911952.1	-	3	5'	18	179	39	30,2	21,79	0,72
miR5140h	GGUGGUGAAGAUUUGUUG	E	HX902237.1	+	2	3'	18	306	74,2	41,5	24,25	0,58
miR5140i	GCUAGUCCAGAUUUGGUG	E	HX914556.1	+	3	3'	18	122	27,7	43,4	22,70	0,52
			HX912304.1	-								
miR5140j	GAUGGUGGAGAUUUGAUG	E	HX904006.1	+	3	3'	18	279	72,92	46,2	26,14	0,57
miR5140k	GCUCGUGGAAAUUUGGUG	E	HX900526.1	+	3	3'	18	85	24,1	45,9	28,35	0,62

miR5140l	GCUGGAGAUGUUUUGGUG	E	HX907691.1	-	3	3'	18	80	39,8	46,3	49,75	1,08
miR5140m	GCUCGUGGAAAUUUGGUG	E	HX905067.1	-	3	3'	18	85	26,9	45,9	31,65	0,69
miR5198	GGGGAGAAGGGUUUGAGGGAG	E	HX913124.1	-	3	3'	21	282	102,5	50,0	36,35	0,73
miR5204	GUUGGAAGGUGUUGAAGGAAC	E	HX904051.1	-	3	5'	21	346	104	43,9	30,04	0,68
miR5223	CGUGGAAUUUCAUUGAAGCUGC	E	HX913780.1	-	3	5'	22	169	61,7	51,5	36,51	0,71
miR5246	UUGGAGACAACUUUGAAGGCU	E	HX907208.1	+	3	5'	21	65	21,4	43,1	32,92	0,76
miR5248	UUUUUAGUUGGAACACAUUCA	E	HX908636.1	+	3	5'	21	107	25,9	36,5	24,21	0,66
miR5253a	GAUGAGAAUGAUUCUGUUGAA	E	HS514048.1	-	3	3'	21	84	21,6	33,3	25,71	0,77
miR5253b	GAAGAAAAUGAUCAUGUGGGA	E	HX907697.1	-	3	3'	21	127	24,8	38,6	19,53	0,51
miR5304	CAAUGCAGCAUACUCAUUGCC	E	HX900966.1	-	3	3'	21	341	81,9	43,7	24,02	0,55
miR5368	GGACAGUCUCAGGUAGACA	E	HX903465.1	-	0	3'	19	164	64,8	55,5	39,51	0,71
miR5384	CGCGCCGUCGUCCACCGC	E	HX913182.1	+	3	5'	18	303	116,1	58,4	38,32	0,66
miR5506	CGGAUCGCUUCGUGUGACGGU	G	FH893861.1	+	3	5'	21	132	40	51,5	30,30	0,59
miR5533	UUUUGCCAGAAGCCUUCACGG	E	HX909619.1	+	3	5'	21	139	30,55	51,8	21,98	0,42
			HX910397.1	-								
miR5536	AAGGGUAGUGAUAUUGUGGUAG	E	HX905047.1	-	3	3'	22	129	23,4	41,1	18,14	0,44
miR5565a	UUGUUUGGAUGUUCUUGGA	E	FL506709.1	+	2	3'	19	75	21,1	45,3	28,13	0,62
miR5565b	UUGUUUGGCUGUUCUUGGA	E	HX906598.1	+	3	3'	19	66	19,1	47,0	28,94	0,62
miR5630	GCUGAGAGCGGUCCUGAUGGC	E	HX911057.1	+	3	5'	21	77	22,2	61,0	28,83	0,47
			HX909333.1	-								
miR5638	AUAAUUAAACUCUCUCACUUU	E	HX911145.1	-	3	5'	21	110	25,1	34,6	22,82	0,66
miR5640	AGAGAGAAGCCAUUAGAUUCA	E	HX906754.1	+	3	5'	21	137	32,8	39,4	23,94	0,61
miR5653	UGAGUUGAGUUGAGUUGAGUUGAC	E	FL503280.1	-	2	3'	24	242	51,3	36,0	21,20	0,59
miR5658a	AUGAUGAUGAUGAUGAUGGAA	E	HX912420.1	+	1	5'	21	183	37,96	34,4	20,74	0,60
miR5658b	AUGAUGAUGAUGAUGAUGAUG	E	HX912828.1	-	2	5'	21	225	42,32	33,8	18,81	0,56
miR5658c	AUGAUGAUGAUGAUGAAGAAG	E	HX910409.1	-	2	5'	21	239	56	38,9	23,43	0,60
miR5658d	AUGAUGAUGAAGAUGAAGAAG	E	HX909905.1	+	3	5'	21	277	73,6	39,0	26,57	0,68
miR5658e	CUGAUGAUGAUGAAGAUGACA	E	HX901604.1	+	3	5'	21	122	21,7	36,1	17,79	0,49
miR5658f	AUGGUGAUGUCGAUGAUGAAA	E	HX903885.1	+	3	5'	21	97	21,5	40,2	22,16	0,55
miR5658g	ACGAAGAUGAUGAUGAUGAAG	E	HX913689.1	-	3	5'	21	242	65,4	42,6	27,02	0,63
miR5658h	AUGAAGAUGAUGAAGAAGAAA	E	HX912690.1	-	3	5'	21	303	70,41	28,1	23,24	0,83
miR5658i	AUUAUGAUUAUGAUGAUGAAG	E	HX907697.1	-	3	5'	21	200	39,5	27,0	19,75	0,73
miR5658j	AUGAAGAUGAUGAUGAUGUAA	E	HX901537.1	+	2	3'	21	86	18,4	34,1	21,40	0,63
miR5658k	AUGAUGAUGAUGAUGAUGAUG	E	HX904278.1	-	2	3'	21	142	29,5	33,1	20,77	0,63
miR5658l	UUGAUAAUGAUGAUGAUGAAU	E	HX914509.1	+	3	3'	21	180	29,9	28,3	16,61	0,59
miR5658m	UUGAUGAUGAUGAUGAUGGUA	E	HX901706.1	+	3	3'	21	166	26,4	41,0	15,90	0,39
miR5658n	AUGGUGAUGAUGAUGAGGGAA	E	FL506641.1	+	3	3'	21	67	20,3	47,8	30,30	0,63
miR5658o	AUGGUGAUGGUGAUGAUGAAG	E	HX913895.1	-	3	3'	21	72	21,6	44,4	30,00	0,68
miR5658p	ACAAUGAUGAUGAAGAUGAAA	E	HX910949.1	-	3	3'	21	74	18,4	32,4	24,86	0,77
miR5658q	UUGAUAAUGAUGAUGAUGAAU	E	HX912876.1	-	3	3'	21	180	34,7	28,3	19,28	0,68
miR5664	AUAGUCAAUGUUAUUGGUGUG	E	HX913008.1	-	3	5'	21	327	72,8	41,9	22,26	0,53
miR5745	UUUAAUUUGUAUGCAUCGACA	E	HX905793.1	-	3	5'	21	126	52,3	31,8	41,51	1,31
miR5751a	UUGAUUCGAUCUGAUGGUUUG	E	HX904087.1	+	3	5'	21	255	62,3	36,9	24,43	0,66
miR5751b	UUGAUUUCUUCAGCUGGUUUU	E	HX911932.1	+	3	3'	21	212	35,73	32,6	16,85	0,52
			HX900978.1	-								
miR5998a	ACUGUUUGUUUUUUGUUUUAU	E	HX909635.1	+	3	5'	21	121	26,9	32,2	22,23	0,69
miR5998b	AAAGAGUGUGUUUUGUUUUGU	E	FL504301.1	+	3	5'	21	162	30,22	35,8	18,65	0,52
miR6034a	UCAGAUGUUUAUAGCUUUGGA	E	HX908642.1	+	3	5'	21	93	20,5	33,3	22,04	0,66
miR6034b	GUGGAUGUAUAUAGCUUUGGG	E	HS514001.1	+	3	3'	21	232	73,9	46,1	31,85	0,69
			HX914725.1	-								
miR6034c	UCUGAUGUAUACAGUUAUGGG	E	HX914714.1	-	3	3'	21	220	42,8	38,6	19,45	0,50
miR6167	UACCCAGGCGGCAGCUUUGA	E	HX915206.1 HX907761.1	+	2	3'	20	226	81,9	50,9	36,24	0,71
miR6180a	AGGGAGGAAGAAAGUGGACG	E	HX904747.1	+	3	5'	20	203	51,3	40,9	25,27	0,62
miR6180b	AGGGUAGAUGGAAGAGGGCG	E	FL504783.1	-	3	5'	20	69	20,4	56,5	29,57	0,52
miR6182a	UGAAUGUGUGAUGGAUGGGUUU	E	HX909642.1	+	2	5'	22	60	21,9	46,7	36,50	0,78
miR6182b	UGAAUGUGUGAUGGAUGGGUUU	G	FH893897.1	+	2	3'	22	127	26,83	38,6	21,13	0,55
miR6186	CGAGGAAGACGAUGAGUGAGA	E	HX907747.1	-	3	5'	21	123	24,5	52,0	19,92	0,38
miR6188a	GCUGGUUCGAUGAACCCGGCGA	E	HX915076.1	-	2	3'	22	301	91,14	45,9	30,28	0,66
miR6188b	GGUGCAUCGAUGAAUCCAGCGA	E	HX910129.1	-	3	3'	22	96	21,7	46,9	22,60	0,48
miR6190	AGAGGAGAGAAAGAAGCCAUG	E	HX907963.1	-	3	3'	21	266	72,1	45,1	27,11	0,60
miR6202	UGAAGAUGUUAAGAAGUGAA	E	HX914165.1	+	3	3'	20	100	22,6	33,0	22,60	0,68
miR6232	UUUUUGGCAGAUUGAAUUUGG	E	HX909646.1	-	3	5'	21	61	23,8	37,7	39,02	1,03

miR6281a	UUUAGAGAGAGAGAGAGAGAG	E	FL507000.1	+	3	5'	21	147	42,2	38,8	28,71	0,74
miR6281b	UUUAGAGAGAGAGAGAGAGAG	E	HX904161.1	+	3	5'	21	97	33,1	54,6	34,12	0,62
miR6281c	GUGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	E	FL506872.1	-	3	5'	21	86	23,7	36,1	27,56	0,76
miR6281d	GUUAGAGAGAGAGAGAGAGAG	G	JY084328.1	-	2	3'	21	120	26	30,0	21,67	0,72
miR6281e	GUGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	G	JY084317.1	+	3	3'	21	82	21,1	48,8	25,73	0,53
miR6281f	UUUAGAGAGAGAGAGAGAGAG	E	HX900662.1	-	3	3'	21	222	64,2	46,4	28,92	0,62
miR6281g	GAUAGAGAUAGAGAUAGAGAG	E	HX902254.1	-	3	3'	21	116	19,9	36,2	17,16	0,47
miR6300	GUCAAUGUAGUAUAGUGA	E	HX912395.1	+	3	3'	18	260	61,32	41,5	23,58	0,57
			HX901970.1	-								
miR6422a	UGUGAUCAAGAAGGCAAUGGU	E	JK265536.1	+	3	5'	21	173	50,5	47,4	29,19	0,62
miR6422b	UGUGAUCAAGAAGGCAAUGGU	E	HX913717.1	-	3	3'	21	191	59,4	45,6	31,10	0,68
miR6473	UCCAAAAUCCCUUCAAGAAUU	E	HX913005.1	-	3	3'	21	65	19,2	41,5	29,54	0,71
miR6476a	UCUGUGGAGAUGCAUCAUGA	E	HX908302.1 HX904626.1	+	3	5'	20	185	43,43	46,5	23,48	0,50
miR6476b	UCAUUGAAGAUGAAAGAUGA	E	HX911540.1	+	3	5'	20	175	29,96	30,3	17,12	0,57
miR6476c	UCAUUGUUGAUGAAACAUGA	E	HX909869.1	-	3	3'	20	101	26,1	45,5	25,84	0,57
miR6476d	UCUGUGGAGAUGCAUCAUGA	E	HS513848.1	-	3	3'	20	64	18,5	45,3	28,91	0,64
miR6482	CUGGAACUGGUAUCAACCCUGC	E	HX915158.1 HX912203.1	+	2	5'	22	209	66,1	45,0	31,63	0,70
			HX910792.1	-								
miR6485a	UAGGAUGAAGACGAGCAUAG	E	HX901667.1	+	3	3'	20	60	21,6	51,7	36,00	0,70
miR6485b	UAGGAUGAAGACGAGCAUAG	E	HX901688.1	-	3	3'	20	101	27,74	43,6	27,47	0,63
miR7484	UUUGUAUGUUAGAUCAGAGAU	E	HX909949.1	-	3	5'	21	90	20,2	43,3	22,44	0,52
miR7534a	GCAACUAGACUUCAGUUUGAG	E	HX908727.1	+	3	5'	21	134	33,9	37,3	25,30	0,68
miR7534b	GCAACUUGACUACAAUGUGAC	E	HX908699.1	+	2	3'	21	302	84,99	43,7	28,14	0,64
miR7542	UGCUUGCUUUCAGAUGGUG	E	HX913315.1	-	2	5'	19	125	31,53	43,2	25,22	0,58
miR7757	GGUAGCUGAAUGUUUAGUUUA	E	HX907428.1	-	2	3'	21	121	31,3	40,5	25,87	0,64
miR7777	UGAGAUGGUGCUUGUUGAAGA	E	HX900455.1	-	3	3'	21	250	55,95	46,0	22,38	0,49
miR7817	UCUCUUUUGUAUCUGAACGGU	E	HX900803.1	+	3	3'	21	242	50,35	36,4	20,81	0,57
miR8005	UUUAUAGUUUAGAGUUUAGAGUUU	E	HX910294.1	-	3	3'	24	95	22,8	42,1	24,00	0,57
miR8123a	UUGUGCUAUUGCUCAGGC	E	HX901676.1	+	2	5'	18	112	35,5	48,2	31,70	0,66
			HX903879.1	-								
miR8123b	UGGUGCGAUUGCUGAAGC	E	HX909453.1	+	3	5'	18	248	60	46,8	24,19	0,52
			HX909453.1	-								
miR8123c	AUGUGCUAUCGCUCAAGC	E	HX906971.1	+	3	5'	18	240	59,9	43,3	24,96	0,58
			HX910109.1	-								
miR8123d	UUGUGCCAUUGCUCAGGC	E	HX901322.1	+	1	3'	18	97	24,1	47,4	24,85	0,52
			HX911808.1	-								
miR8123e	UUUUGCCUUUGCUCAAGA	E	HX909134.1	+	3	3'	18	267	53,3	38,2	19,96	0,52
miR8610	UUUUGACCAAAUUGAAGAAUG	E	HX912542.1	+	3	5'	21	93	31,4	36,6	33,76	0,92
miR8656	UGGAAAAGUGGAGAGAAGGGG	E	HX914802.1	+	3	5'	21	122	37,3	43,4	30,57	0,70
miR8709	AUACAUGAACUUUGAGUUGA	E	HX914488.1	-	3	3'	20	214	45,25	31,8	21,14	0,67
miR8710	GUCCAUGAAGUUUGGUCCAA	E	HX902601.1	-	3	3'	20	93	22,6	45,2	24,30	0,54
miR8714	AUAGACGAAAUGCAAGAAGAG	G	AJ852711.1	+	3	5'	21	114	20,5	50,0	17,98	0,36
miR9489	UCAGCUUCAGGGACUUGGGGA	E	HX913292.1	+	3	5'	21	86	35,7	55,8	41,51	0,74
miR9559	UUUGGGUUUUGGUCCGUGUUG	E	HX907601.1	-	3	3'	21	224	55,4	44,2	24,73	0,56
miR9569	UCAGUUAUCAUUGGUGUUUUG	E	HX915000.1	-	3	5'	21	146	21,8	30,1	14,93	0,50
miR9674	GUAAGAUGGCUGAUGCUGAGG	E	HX903550.1	+	2	5'	21	230	69,7	46,5	30,30	0,65
miR9722	UAAUUGUCGGAAGAAGAUGAA	E	HX908887.1	+	3	3'	21	264	51,25	38,6	19,41	0,50
miR9764	UGGCAACACUCUAACUUUCUC	E	HX903987.1	-	3	3'	21	303	72,6	39,6	23,96	0,61

Tanımlanan 262 olası bakla miRNA'sının öncül yapıları Ek Açıklamalar A bölümünde verilmiştir.

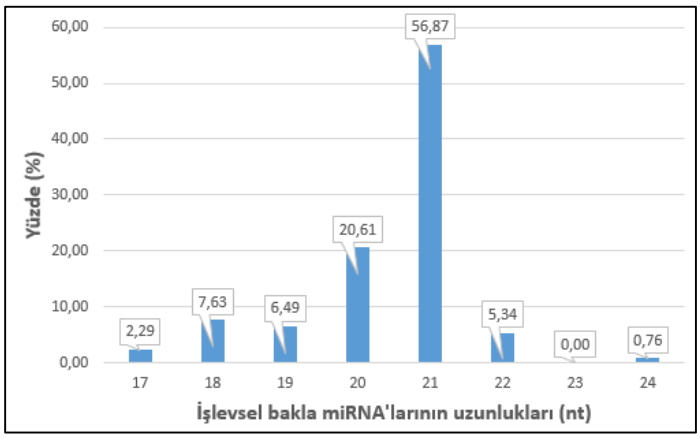
Tanımlanan 262 olası bakla miRNA'sından, 3 tanesi 0 (sıfır), 3 tanesi 1 (bir), 33 tanesi 2 (iki) ve 223 tanesi 3 (üç) nükleotid yanlış eşleşme göstermektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Olası bakla miRNA'ların ortolog miRNA'larla gösterdikleri yanlış eşleşme gösteren nükleotid sayıları.

Tanımlanan olası miRNA'lar ve bu miRNA'ların ikincil yapılarının profili Python programla dili kullanılarak çıkarılmıştır. Buna göre;

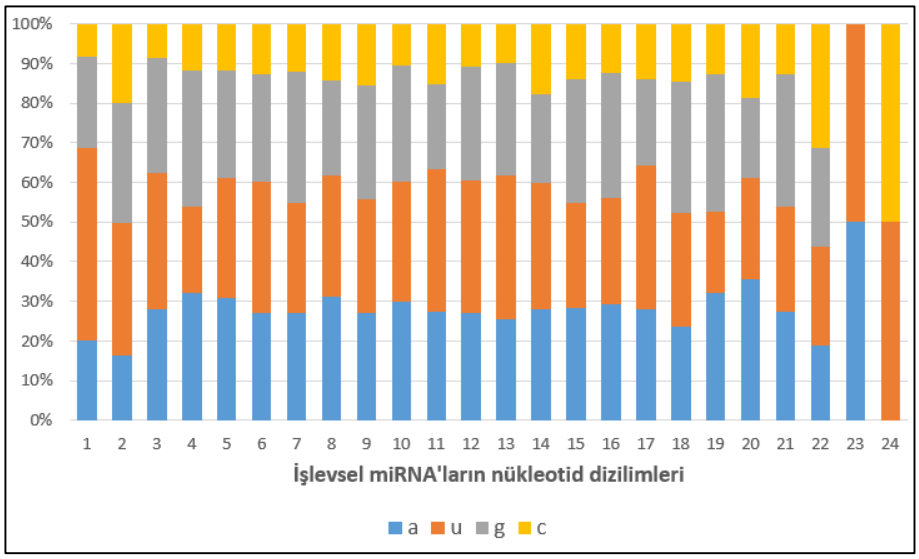
Çalışmada tanımlanan olası işlevsel miRNA'lar, 17 – 24 nt aralığında bir uzunluğa sahip ve 149 tanesi (% 56,87'si) 21 nt uzunluğundadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Tanımlanmış olası işlevsel bakla miRNA'ların uzunluk dağılımları.

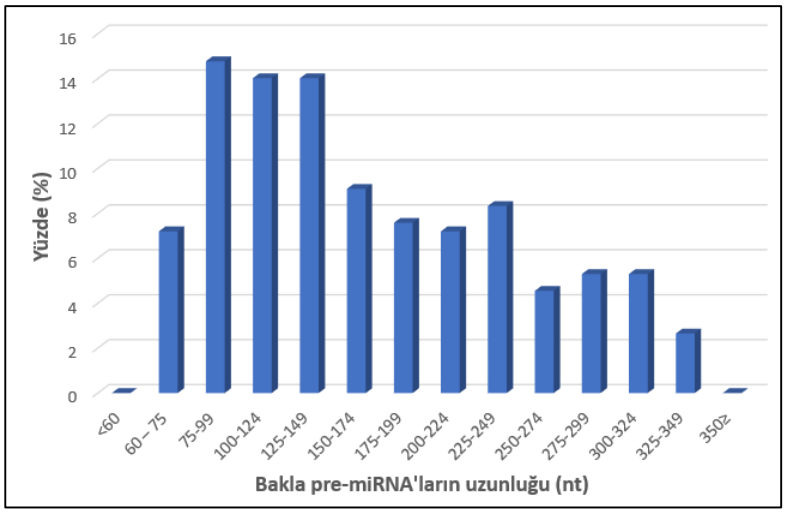
İşlevsel bakla miRNA dizilerinin nükleotid dağılımlarına bakıldığında, miRNA dizilerinin 5' urasil (U) bazı ile başlama eğilimi gösterdiği gözlenmektedir.

262 olası miRNA'dan 128 tanesinin (% 48,85'inin) 5' U ile başladığı görülmektedir (Şekil 3.3).



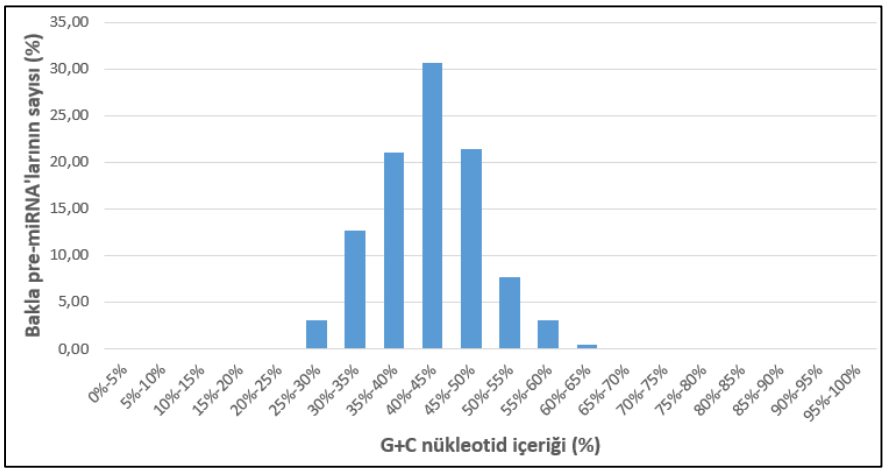
Şekil 3.3 Tanımlanmış olası işlevsel bakla miRNA dizilerinin nükleotid dağılımları.

Olası bakla miRNA'ların ikincil yapılarının (pre-miRNA) uzunlukları 60 – 346 nt arasında (ortalama ~ 170 nt) değişiklik göstermektedir (Şekil 3.4)



Şekil 3.4 Tanımlanmış olası bakla pre-miRNA'ların uzunluk dağılımları.

Bakla pre-miRNA'larının G+C nükleotid oranlarına bakıldığında, bakla pre-miRNA'larının % (G+C) içeriğinin % 25 - % 65 arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Tanımlanmış olası bakla pre-miRNA'ların G+C nükleotid içerik dağılımları.

Tanımlanan olası bakla pre-miRNA'larının MFE değeri, kriterlere uygun bir şekilde -18,2 ile -116,1 kcal/mol arasında (ortalama -43,37) bir değerdedir. MFE değeri baz alınarak hesaplanan (Bkz. Bölüm 2.2) AMFE değeri ortalama -25,71 ve MFEI değeri ortalama -0,62 olarak hesaplanmıştır.

3.3 miRNA Hedef Genlerinin İşlev Tanımlaması ve Yolak Analizi

Tanımlanan olası miRNA'ların hedef tahmini için bakla bitkisine ait özgün, tekrar etmeyen 9208 EST dizisi kullanılmıştır. psRNAtarget sonuçlarına göre, miR171, miR319, miR399, miR774, miR775, miR816, miR848, miR858, miR1028, miR1032, miR1061, miR1153, miR1168, miR1507, miR1513, miR1533, miR1888, miR2084, miR2095, miR2592, miR2662, miR3513, miR3520, miR4239, miR5077, miR5140, miR5246, miR5368, miR5384, miR5506, miR5565, miR5640, miR6182, miR6202, miR6300, miR6473, miR7534, miR7542, miR7817, miR8123, miR8610, miR8656, miR9489, miR9674 olmak üzere 44 miRNA gen ailesine ait miRNA dizileri ile EST dizileri arasında uygun bir miRNA/hedef eşleşmesi görülmezken; 99 miRNA gen ailesine ait miRNA dizileri ile EST dizileri arasında 712 ters tamamlayıcı eşleşme görülmüştür.

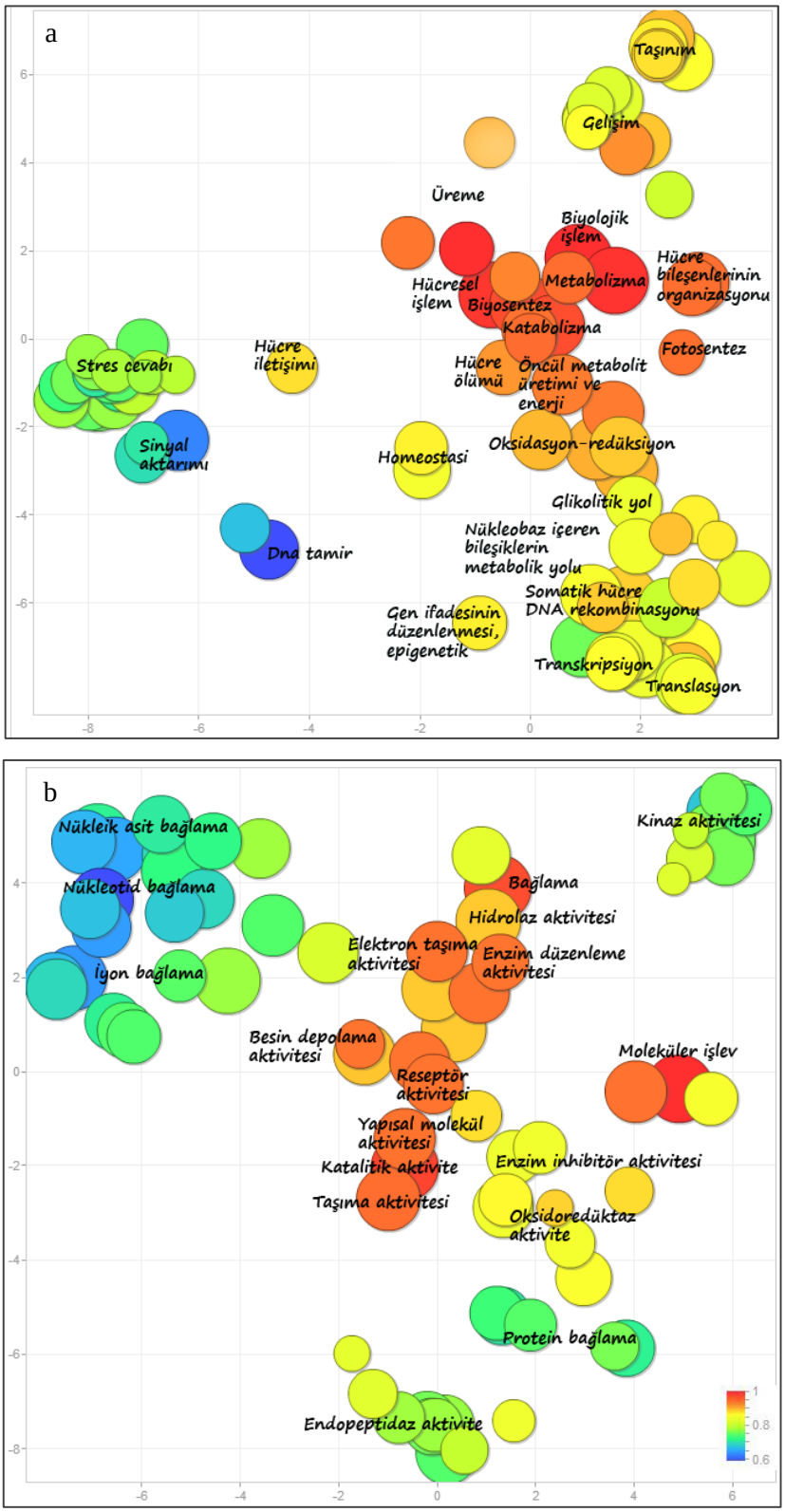
99 miRNA gen ailesine ait miRNA dizileri ile eşleşme gösteren 712 EST dizisinin bir protein kodlayıp kodlamadığına bakmak için BLASTX analizi yapılmıştır. BLASTX sonuçlarına göre; miR835, miR845, miR8005 ve miR9559 olmak üzere 4 miRNA gen ailesiyle etkileşim gösteren EST dizilerinin herhangi bir

proteinle benzerlik göstermezken; diğer 95 miRNA gen ailesine ait miRNA dizileri ile eşleşme gösteren EST dizilerinin ise NCBI'da depolanmış olan genlerle benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu dizilerden e-değeri ve blast hit sayısı en uygun olan diziler; olası hedef gen olarak kabul edilerek, GO, EC ve KEGG haritaları çıkarılmıştır.

Yapılan işlev tanımlaması ve metabolik yolak analizi sonucu bakla bitkisine ait belirlenen 95 miRNA gen ailesine ait miRNA dizilerinin; bitki büyüme, gelişim, sinyal iletimi, abiyotik (su kıtlığı, kuraklık, tuzluluk vb.) ve biyotik (patojenler) stres gibi çevresel etmenlere verilen cevaplar gibi birçok biyolojik ve moleküler süreçte rol oynadığı tahmin edilmiştir (Çizelge B.1)

GO; işlev analizi yapılan genlerin rol oynadığı süreçleri *i.* biyolojik süreç *ii.* moleküler işlev ve *iii.* hücre bileşeni olmak üzere üç grupta vermektedir. Olası bakla miRNA'larının işlev tanımlaması ve yolak analizi sonucu bakla miRNA'larının 94 farklı biyolojik süreçte, 77 farklı moleküler işlev ve 34 farklı sayıda hücre bileşeninde rol oynadığı görülmüştür (Çizelge B.1, Çizelge B.2).

İşlev tanımlaması ve metabolik yolak analizleri sonucu elde edilen GO çıktıları CateGOrizer (Zhi-Liang, et al., 2008) ve REVIGO web aracı (Supek, et al., 2011) kullanılarak özetlenerek görselleştirilmiştir. REVIGO dağılım grafiği, anlamlı benzerlik gösteren GO çıktılarını gruplandırarak iki boyutlu bir alanda göstermektedir. Grafikte yer alan koordinatlar sayısal bir değer ifade etmemektedir, grafiğin düzenlenme prensibi terimler arasında anlamlı benzerlik gösteren GO çıktılarının birbirine yakınlığıdır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Olası bakla miRNA'larının rol oynadıkları a) biyolojik süreçler ve b) moleküler işlevler. Grafikteki renkler terimlerin yoğunluğunu temsil ederken, boyutlar terimlerin logaritmik boyutunu belirtmektedir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bitkiler aleminde evrimsel olarak korunmuş birçok miRNA gen ailesi bulunmaktadır. Bunlardan bazılarının evrimsel olarak birbirinden oldukça uzak olan karayosunları ve çiçekli bitkiler arasında da korunduğu belirlenmiştir. Bitki miRNA'larında gözlenen bu yüksek korunmuşluk düzeyi, miRNA tanımlama çalışmalarında EST analizi gibi homoloji temelli analizlere olanak tanır.

miRBase'in (Sürüm 21, Haziran 2014) verilerine göre; baklagillerde (Fabaceae): *Acacia auriculiformis* (7 öncül, 7 işlevsel), *Arachis hypogaea* (23 öncül, 32 işlevsel), *Acacia mangium* (3 öncül, 3 işlevsel), *Glycine max* (573 öncül, 639 işlevsel), *Glycine soja* (13 öncül, 13 işlevsel), *Lotus japonicus* (62 öncül, 67 işlevsel), *Medicago truncatula* (672 öncül, 756 işlevsel), *Phaseolus vulgaris* (8 öncül, 10 işlevsel), *Vigna unguiculata* (18 öncül, 18 işlevsel) olmak üzere toplam 9 türe ait 1379 öncül miRNA ve 1545 işlevsel miRNA keşfedilmiş, veribankasına yüklenmiştir (miRBase, 2014). Fakat bugüne kadar literatürde baklaya ait tanımlanmış miRNA bulunmamaktadır. Yapılan analizler sonucunda, bu çalışmada bakla bitkisine ait 143 miRNA familyasına ait toplam 262 olası miRNA tanımlanmıştır.

Birçok homoloji temelli analiz çalışmasında, daha önceden tanımlanmış miRNA'lar ile EST ve GSS dizilerini hizalamak için BLAST kullanılmıştır (Zhang, et al., 2005; Panda, et al., 2014). Bu çalışmada ise, BLAST'a göre daha kısa zamanda, daha iyi sonuç veren PaTMaN dizilim hizalama aracı (Prüfer, et al., 2008) kullanılmıştır.

BLAST algoritması, büyük verileri hizalamak için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır (Prüfer, et al., 2008). Blast algoritmaları, tam eşleşme gösteren küçük bir bölge (seed region) belirleyip bu bölgenin etrafında lokal hizalama yapmayı dener. Bu, korunmuş ortak bölgeleri olan ve farklı uzunluklardaki dizilerin hizalanması için oldukça uygundur. Fakat, 100 nükleotidden daha kısa dizilerin hizalaması için yeterli değildir. Kısa seed bölgelerde hizalama süresi uzarken; daha uzun seed bölgelerde ise eşleşmeme ya da boşluk (gap) içeren iyi hizalamaları kaçırabilmektedir (Prüfer, et al., 2008; Mapleson, et al., 2014)

Aynı bağlamda alternatif olarak kullanılan PaTMaN algoritmasının, tüm uzunluklara uygun, doğrusal bir işlem süresi vardır. Bu sayede, PaTMaN algoritması, eşleşmeme ve boşlukların yakalanabilmesine olanak sağlar; fakat bu işlem süresini uzatabilir. PaTMaN, hedef ve sorgu verilerinin önceden işlenmesine ihtiyaç duymayan ve küçük dizi uzaklıkları nedeniyle arama sınırlandırıldığında dahi hızla sonuç verebilen bir araç olarak avantaj sağlamaktadır (Prüfer, et al., 2008).

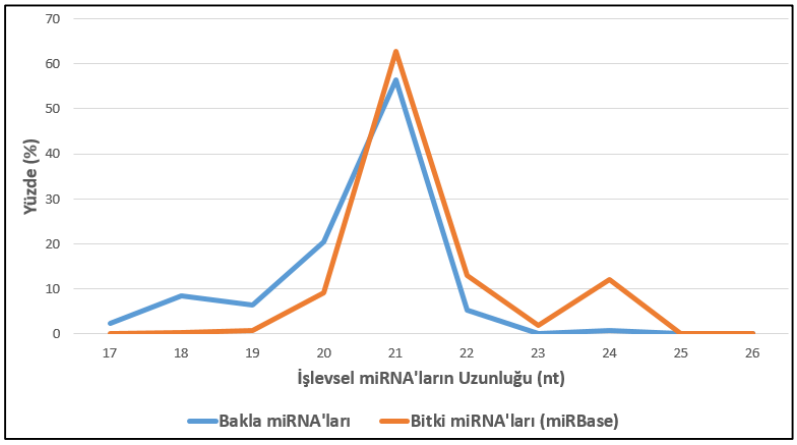
miRNA'ların keşfinin erken döneminde, miRNA/miRNA* dupleksindeki miRNA dizilerinden yalnız birinin işlevsel olduğu, diğer dizinin ise yıkıldığı düşünülmekteydi. Bugün, miRNA/miRNA* dupleksindeki her iki miRNA dizisinin de (hem 5' hem 3' koldaki) işlevsel olabileceğini gösteren birçok kanıt bulunmaktadır. miRNA/miRNA* dupleksindeki iki diziden hangisinin işlevsel olacağı farklı gelişimsel dönemler, dokular ya da ortolog dizilere bağlı olarak değişebilmektedir (Griffiths-Jones, et al., 2011; Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). Ayrıca bir türde saç tokası yapısının 5' kolunda olan miRNA dizisi, başka bir türde 3' kolda konumlanabilir. miRNA dizisinin türediği kol, türün paraloglarında da değişkenlik gösterebilmektedir.

Baklada tanımlanan olası işlevsel miRNA dizilerinden bazılarının sadece tek bir kol üzerinde, bazılarının ise hem 5' kolda hem de 3' kolda konumlandığı belirlenmiştir. miRNA belirlenmesinde, farklı gelişimsel dönemler ya da farklı dokulardan elde edilen ve bir transkript olduğu bilinen EST dizilerinin kullanıldığı göz önüne alındığında, paralog miRNA'ların gelişimsel dönemler ya da farklı dokularda bulunmalarına bağlı olarak saç tokası yapısının farklı kollarından türediği düşünülmektedir (Bkz. Çizelge 3.1).

Tanımlanan olası bakla miRNA'ları ve bu miRNA'ların ikincil yapılarının uygunluklarını değerlendirmek için; miRBase'den indirilen Viridiplantae'ye ait, 8496 işlevsel miRNA ve 6992 pre-miRNA'nın profili Python programlama dili kullanılarak çıkarılmış ve çalışma sonucu belirlenen olası bakla miRNA'ları ile karşılaştırması yapılmıştır. Buna göre;

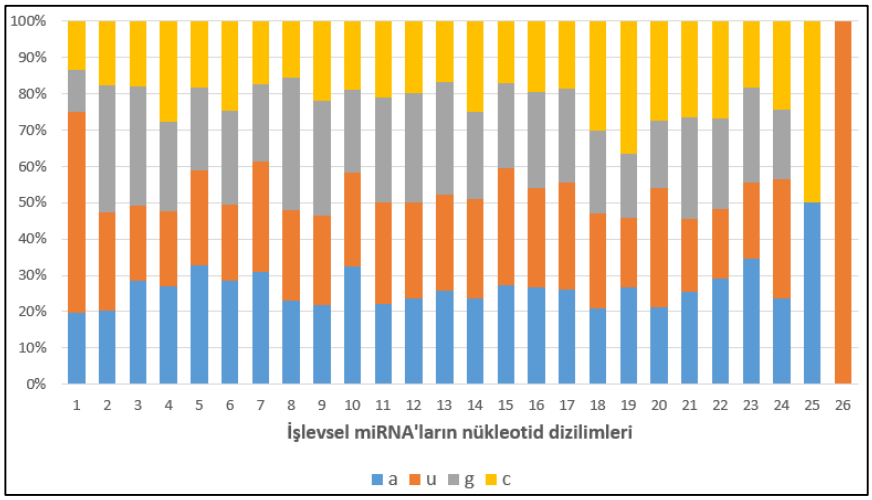
miRBase verileri incelendiğinde; işlevsel bitki miRNA'ların uzunluğunun 17 – 26 nt uzunluğunda olduğu ve miRNA'ların biyogenezine uygun olarak büyük bir

kısmının 21 nt uzunluğunda (% 62,68) olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada tanımlanan olası işlevsel miRNA'lar da, miRBase verilerine uygun olarak 17 – 24 nt aralığında bir uzunluğa sahip ve % 56,44'ü 21 nt uzunluğundadır (Şekil 4.1).



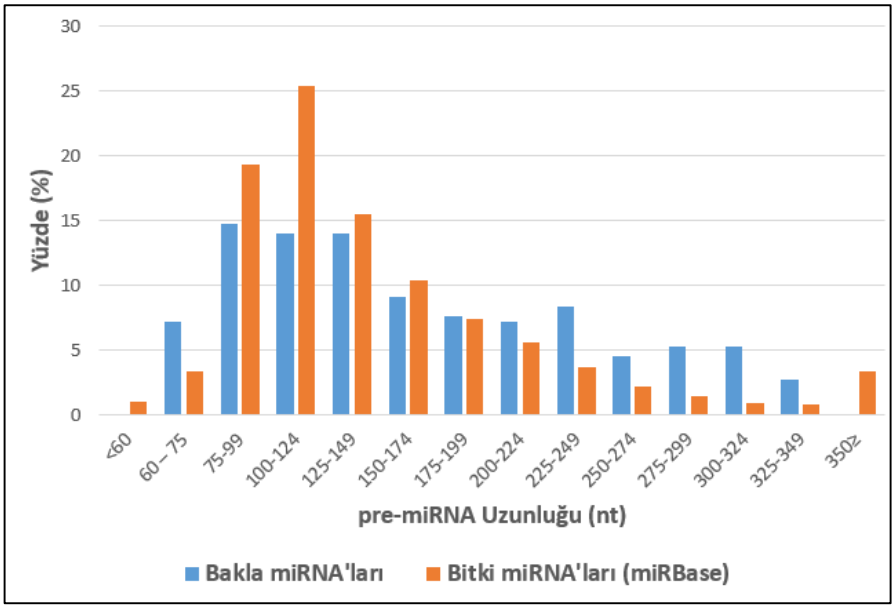
Şekil 4.1 Tanımlanmış olası bakla miRNA'ların ve miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait miRNA'larının uzunluk dağılımları.

İşlevsel bakla miRNA dizilerinin nükleotid dağılımlarına bakıldığında, miRNA dizilerinin 5' urasil (U) ile başlama eğilimi gösterdiği gözlenmiştir. 262 olası miRNA'dan 128 tanesinin (% 48,48'inin) 5' U ile başladığı görülmektedir (Bkz. Şekil 3.3). miRBase verileri incelendiğinde, bitki miRNA'ların da ilk bazının 5' U olma eğilimi gösterdiği, 8496 işlevsel bitki miRNA'sından 4704 tanesinin (% 55,36'ının) 5' U ile başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.2).



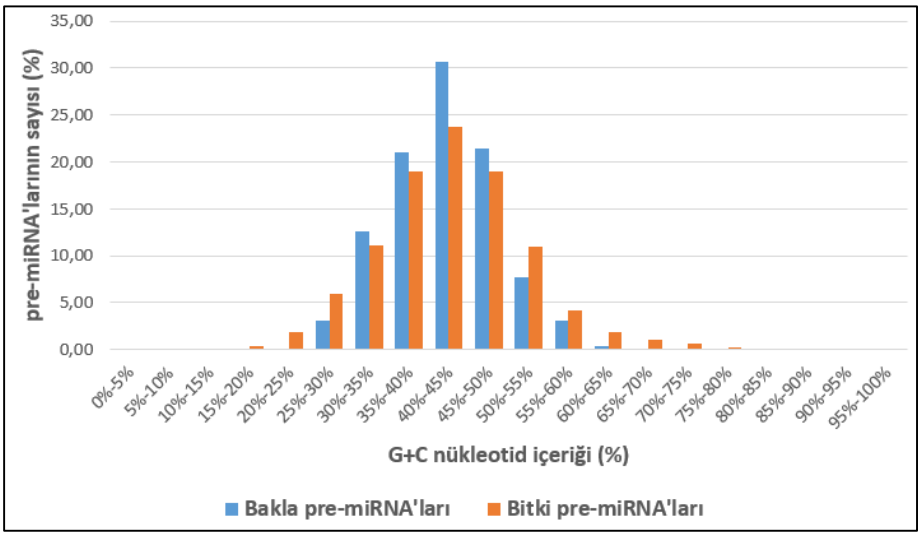
Şekil 4.2 miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait miRNA dizilerinin nükleotid dağılımları.

pre-miRNA belirlemedeki kriterlerde pre-miRNA'nın minimum uzunluğunun 60 nt olması gerektiği belirtilmiştir (Ambros, et al., 2003; Zhang, et al., 2005; Zhang, et al., 2006; Meyers, et al., 2008). Fakat maksimum uzunluk değeri ile ilgili literatürde herhangi bir sınırlamaya rastlanmamıştır. miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait 6992 pre-miRNA incelendiğinde, pre-miRNA uzunluklarının yoğun olarak 60 – 350 nt aralığında olduğu, sadece % 4,32'lik bir kısmının bu aralığın dışında bir uzunluğa sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3). Bu nedenle, olası miRNA'ların ikincil yapıları (pre-miRNA) tahmin edilirken kullanılan EST ve GSS dizilerinin yukarı yönde (upstream) ve aşağı yönde (downstream) 350 nt'lik kısmı temel alınarak olası işlevsel bakla miRNA'ların ikincil yapıları tahmin edilmiştir.



Şekil 4.3 Tanımlanmış bakla pre-miRNA'ların ve miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait pre-miRNA'larının uzunluk dağılımları.

Bakla pre-miRNA'larının G+C nükleotid oranlarına bakıldığında, bakla pre-miRNA'larının % (G+C) içeriğinin % 25 - % 65 arasında değiştiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 3.5). miRBase verileri incelendiğinde çalışma sonuçlarının miRBase verileriyle uyum gösterdiği, bitki pre-miRNA'ların % (G+C) içeriğinin de genellikle % 25 - % 65 arasında değiştiği görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Tanımlanmış olası bakla miRNA'ların ve miRBase veribankasında depolanmış, Viridiplantae'ye ait miRNA'larının G+C nükleotid içerik dağılımları.

EST verileriyle daha önce yapılan homoloji analizlerine bakıldığında; hizalama sonucu eşleşme yakalanan dizilerin (Bkz. Bölüm 2.2 ve 3.2), BLASTX kullanılarak protein veribankası verileriyle tekrar hizalandığı ve protein kodlayan dizilerin çalışmaya dahil edilmediği protokollerin izlendiği görülmektedir (Bkz. Şekil 1.11). Zhang ve arkadaşları tarafından EST analizi ilk geliştirildiğinde, miRNA genlerinin henüz ekzon bölgesinde de kodlandığına dair bir bilgi olmadığından, araştırıcıların sonuçlarındaki pozitif hata oranını azaltmak için protein kodlayan dizileri silmeleri (Zhang, et al., 2005) doğru bir yaklaşım olarak kabul görmüştür. Fakat bugün, bazı miRNA genlerinin intergenik ve intronik bölgelerin yanı sıra, ekzonik bölgelerden de kodlanabildiğini gösteren kanıtlar mevcuttur (Li, et al., 2011; Yang, et al., 2012; Liu and Zhang, 2012). Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada BLASTX hizalaması sonucu protein kodlayan dizilerle eşleşen miRNA dizileri de (Çizelge C.1), çalışmaya dahil edilmiştir.

Sonuç olarak; miRNA'ların keşfi ve biyolojik işlevlerinin geçerliliğinin kanıtlanması, biyolojik bilimlerde devrim etkisi yaratmıştır. Bu keşif bilim camiasının; gen ifadesi, gen düzenleme ve RNA işlevselliği konusunda ilgisini yeniden canlandırarak, geleneksel bakış açılarını tekrar değerlendirmeye yöneltmiştir. Ayrıca, moleküler biyolojinin mihenk taşlarından olan "santral dogma hipotezi"ni zora sokarak, "çöp (junk) DNA hipotezi"nin aksini belirtmiştir. Çöp DNA'nın, DNA'nın büyük bir kısmını oluşturduğu, evrimsel fosiller olarak

genomda zamanla biriktiği ve biyolojik bir amacı olmadığı düşünülürken, miRNA gibi küçük RNA'ların keşfedilmesiyle bunların işlevsel olabileceği gösterilmiştir.

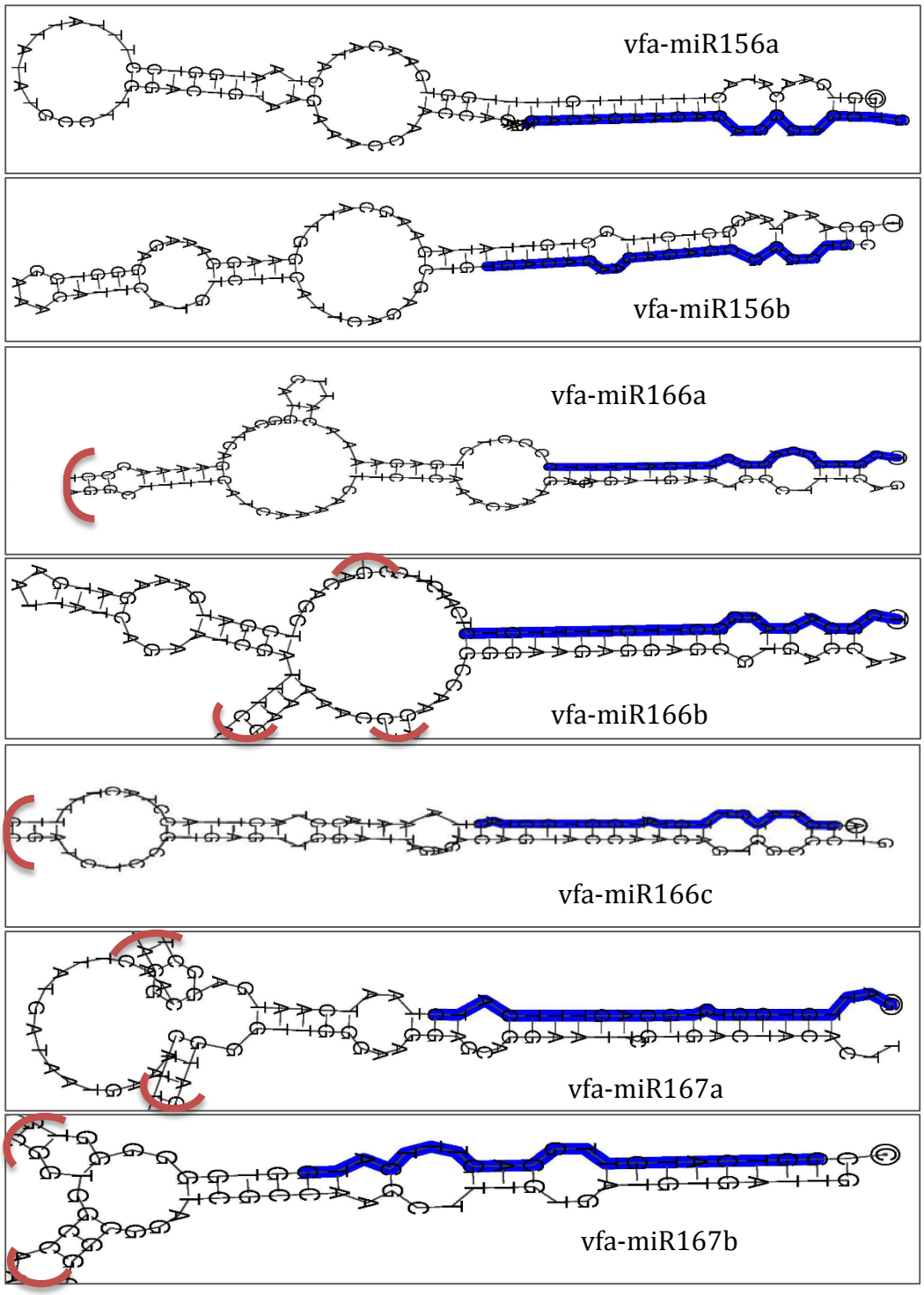
Bitki miRNA'larının işlevsel karakterizasyonuna ait verilerin birikmesi ve miRNA aracılığıyla gen düzenlenme ağlarının araştırılması, miRNA'ların bitki stres cevapları gibi biyolojik süreçlerde oynadıkları roller ve ilişkili moleküler mekanizmaların çözülmesini sağlayacaktır. Böylelikle miRNA temelli yaklaşımlar ile önemli tarımsal bitkilerin ürün kalitesi ve verimliliğini arttırmak mümkün olabilecektir. Nitekim, kullanılan bazı transgenik yaklaşımlar ile çevresel uyaranlara karşı belirli miRNA'ların ifadesi baskılanarak ya da arttırılarak stres toleransı daha yüksek kültür bitkileri yetiştirilebilmiştir.

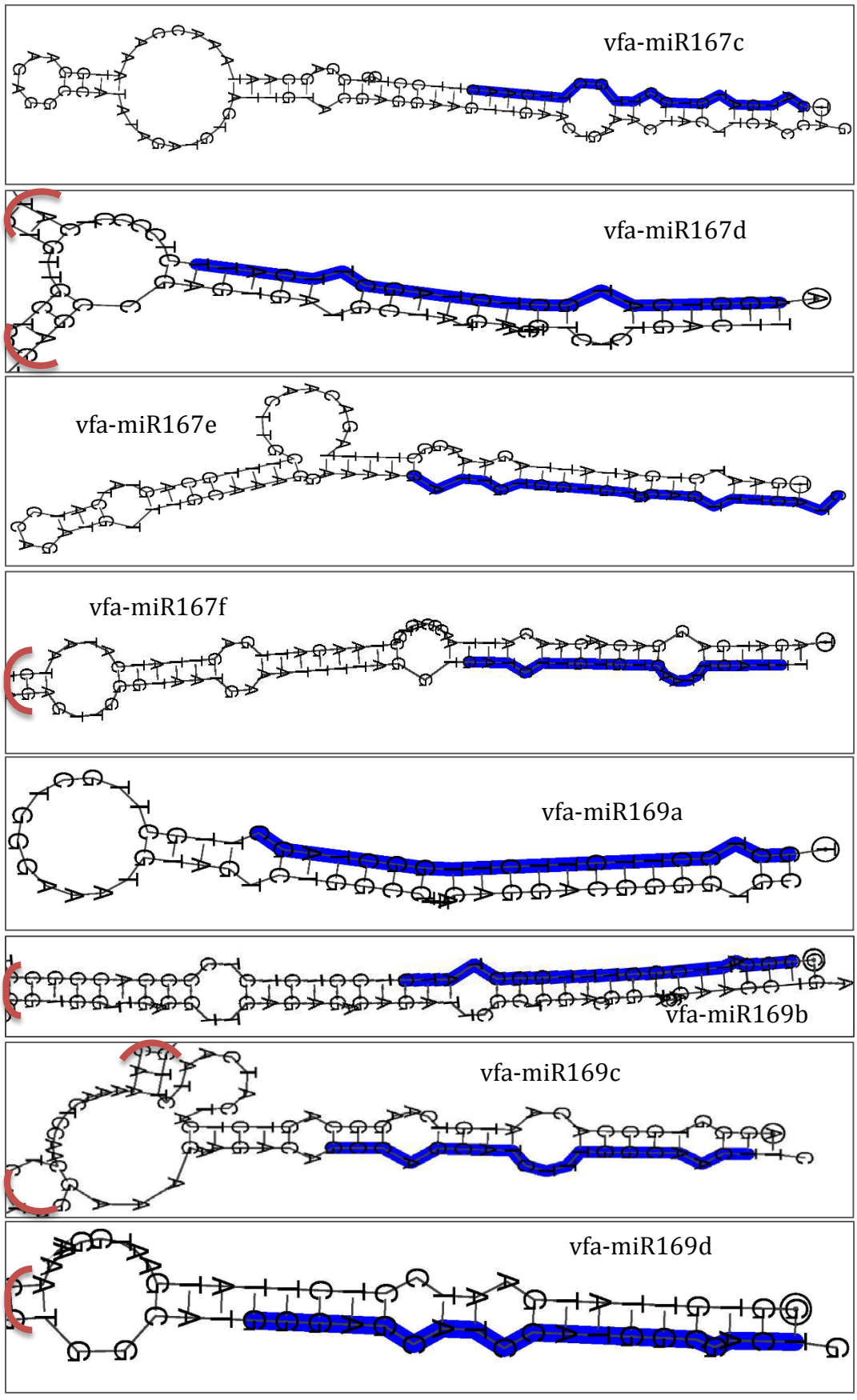
miRNA'ların öneminin anlaşılmasından bugüne, miRNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir (Bkz. Şekil 1.1). miRNA'ların tanımlanması için hem deneysel hem de bilgisayar temelli birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Buna rağmen, genom dizilimi çıkarılmamış organizmalardaki miRNA'ların tanımlanması için kullanılabilecek yöntem sayısı kısıtlıdır. Bu çalışma ile; özellikle genom dizilimi çıkarılmamış önemli tarım bitkilerinde miRNA'ların tanımlanması ve işlev analizlerinin yapılması için EST analizi gibi homoloji temelli biyoinformatik yaklaşımların etkin olduğu tekrar görülmüştür. Fakat, daha kesin sonuçlar için tanımlanan olası miRNA'ların ve etkileştikleri hedeflerin deneysel doğrulamasının yapılması gerekmektedir. İleride yapılacak çalışmalarla, bu çalışmada tanımlanan 262 olası miRNA'nın ve bu miRNA'ların hedef eşleşmelerinin, önemli bir tarım bitkisi olan baklada deneysel olarak doğrulamasının yapılması uygulamaya yönelik çalışmalar açısından da önemli sonuçlar ortaya koyabilecektir.

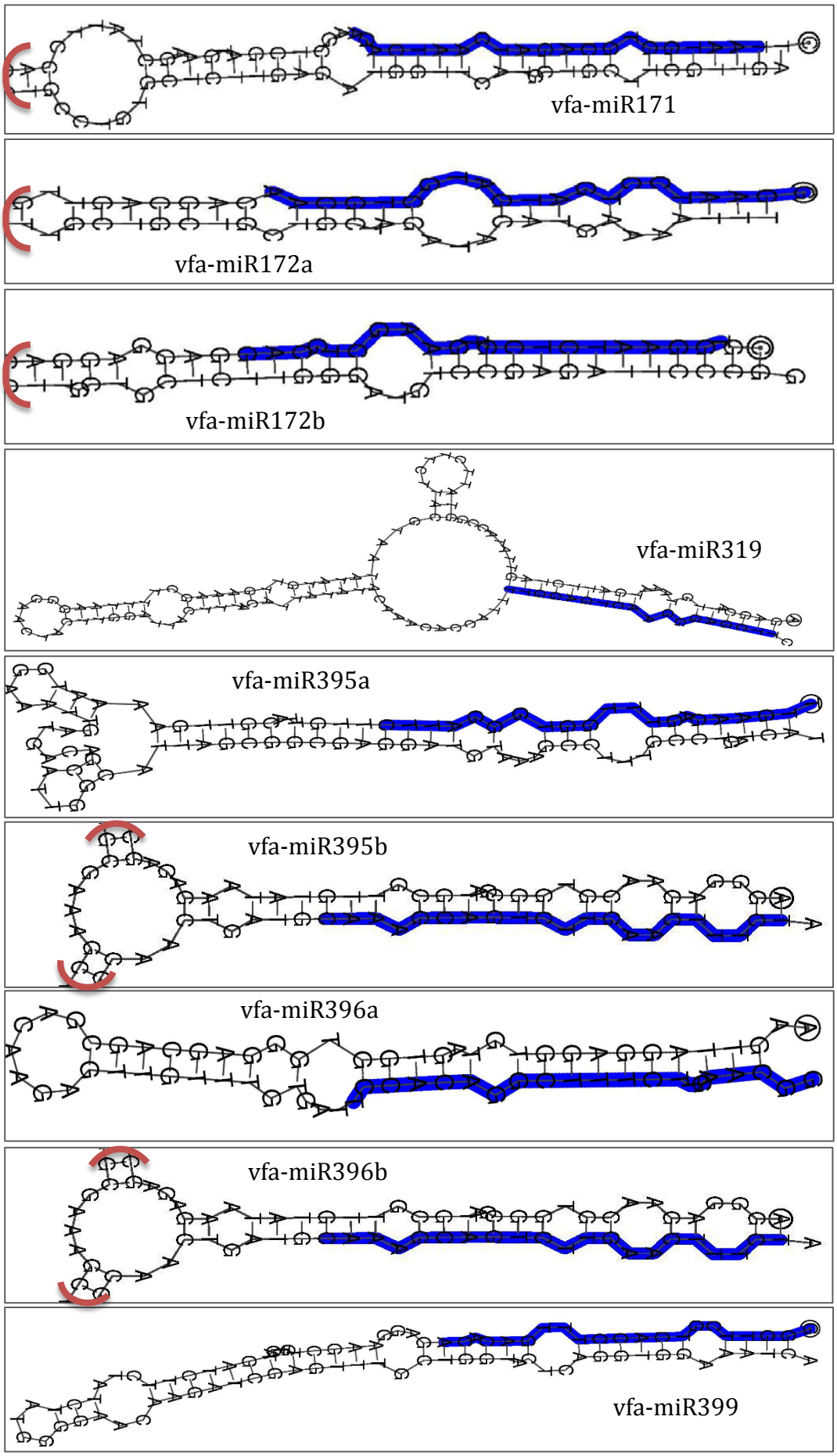
EK AÇIKLAMALAR

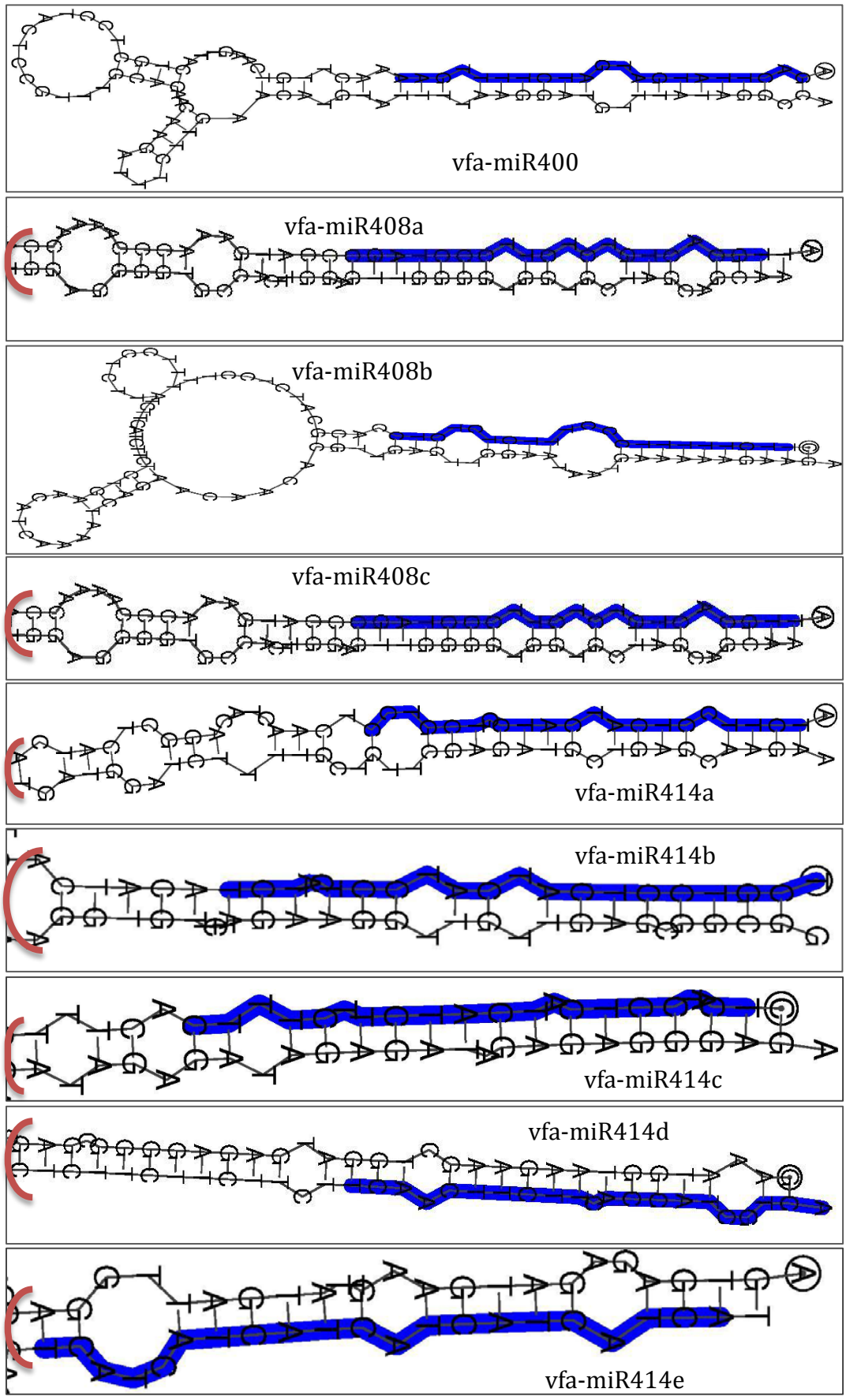
Ek Açıklamalar A

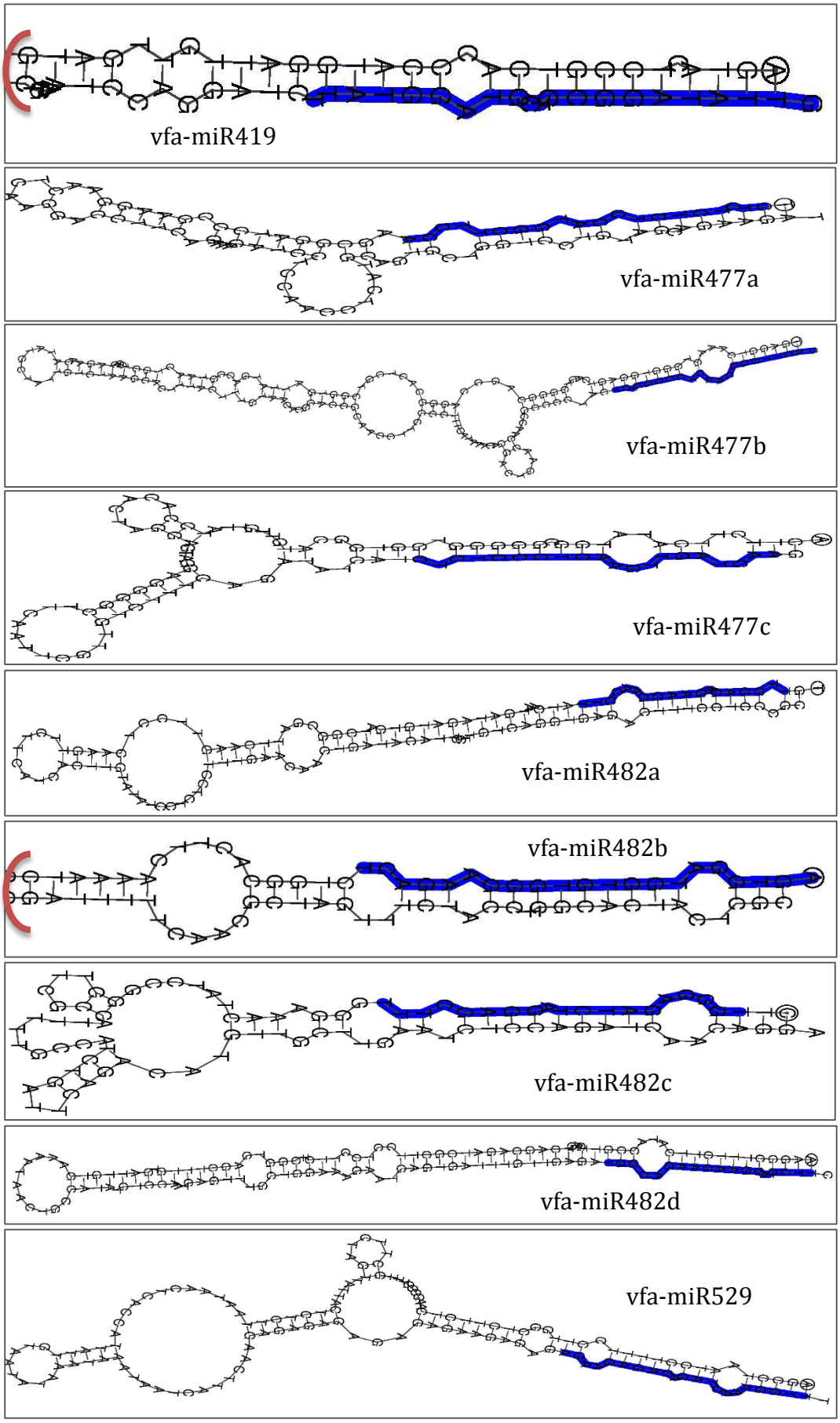
Olası miRNA'ların öncül yapıları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. Yay ile belirtilen yerler, yapının devam ettiğini belirtmektedir.

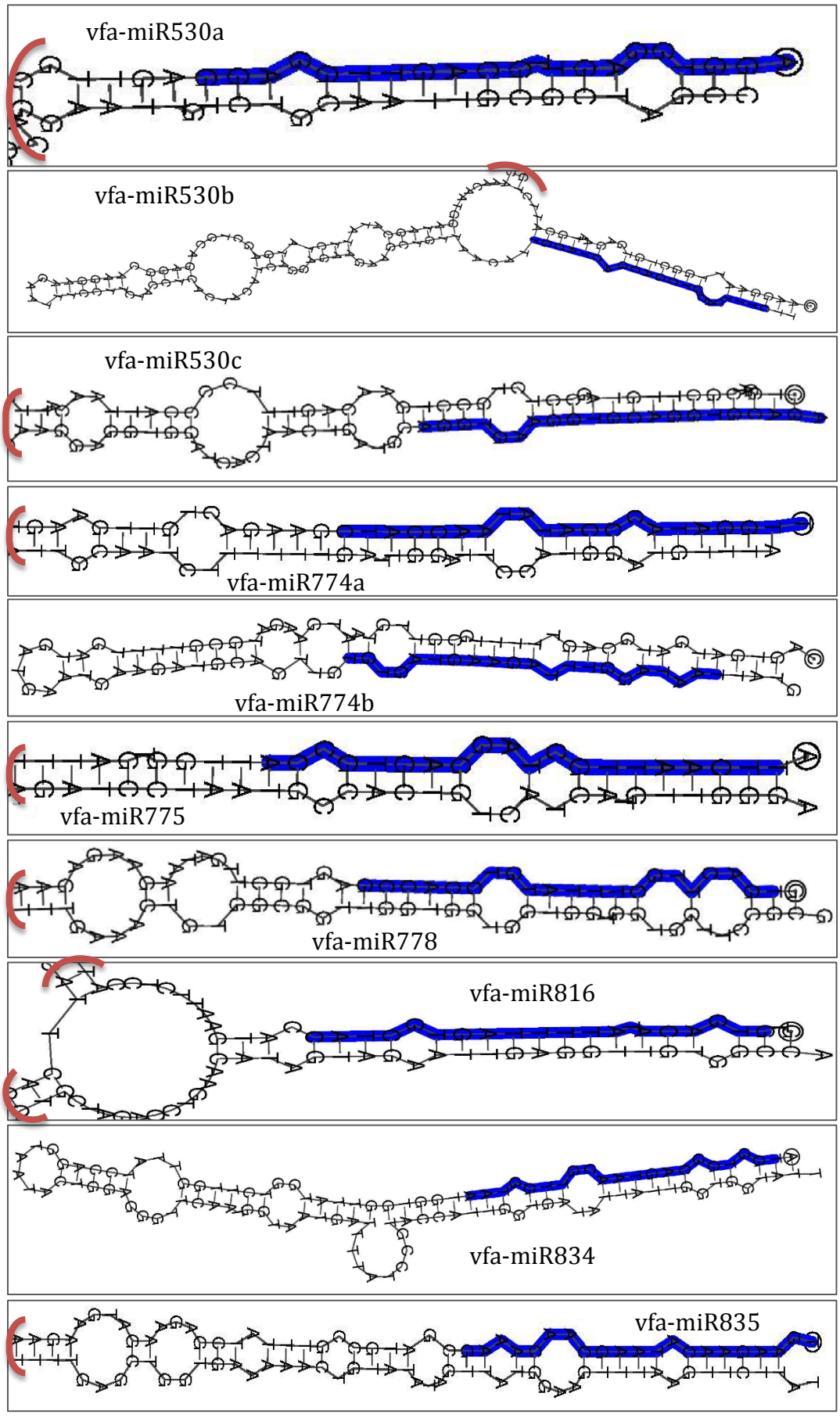


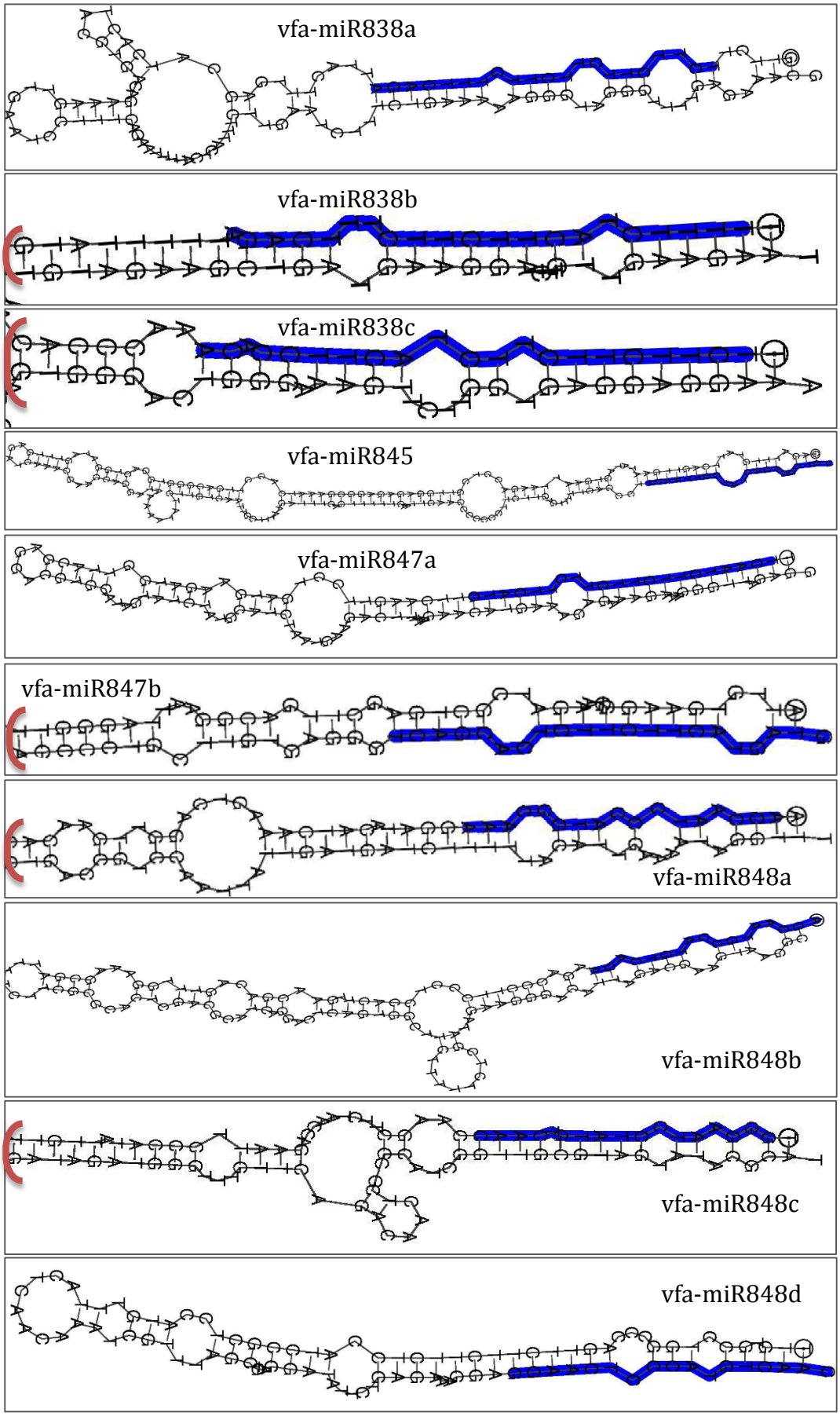

vfa-miR167c
vfa-miR167d
vfa-miR167e
vfa-miR167f
vfa-miR169a
vfa-miR169b
vfa-miR169c
vfa-miR169d

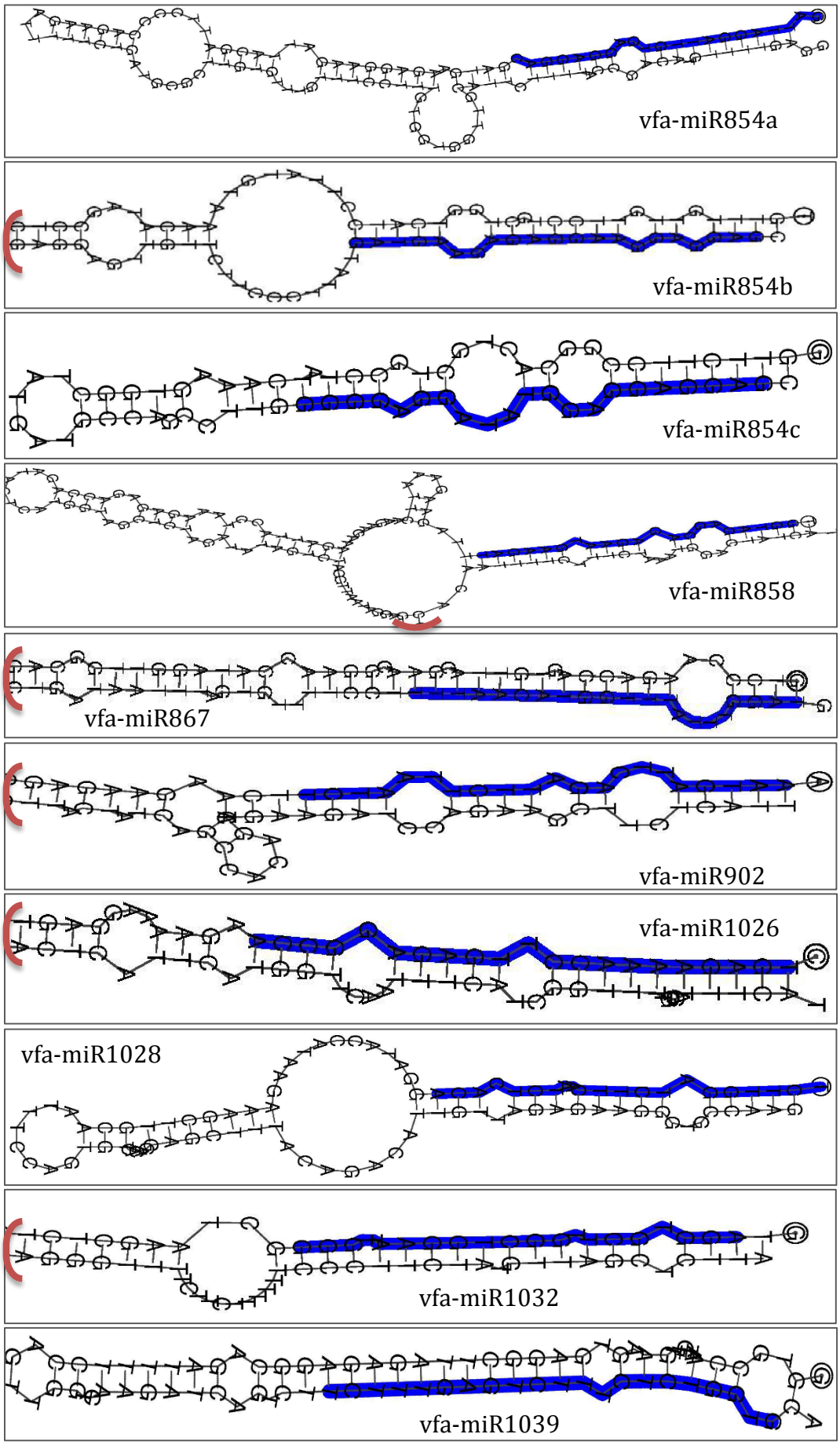

vfa-miR171
vfa-miR172a
vfa-miR172b
vfa-miR319
vfa-miR395a
vfa-miR395b
vfa-miR396a
vfa-miR396b
vfa-miR399

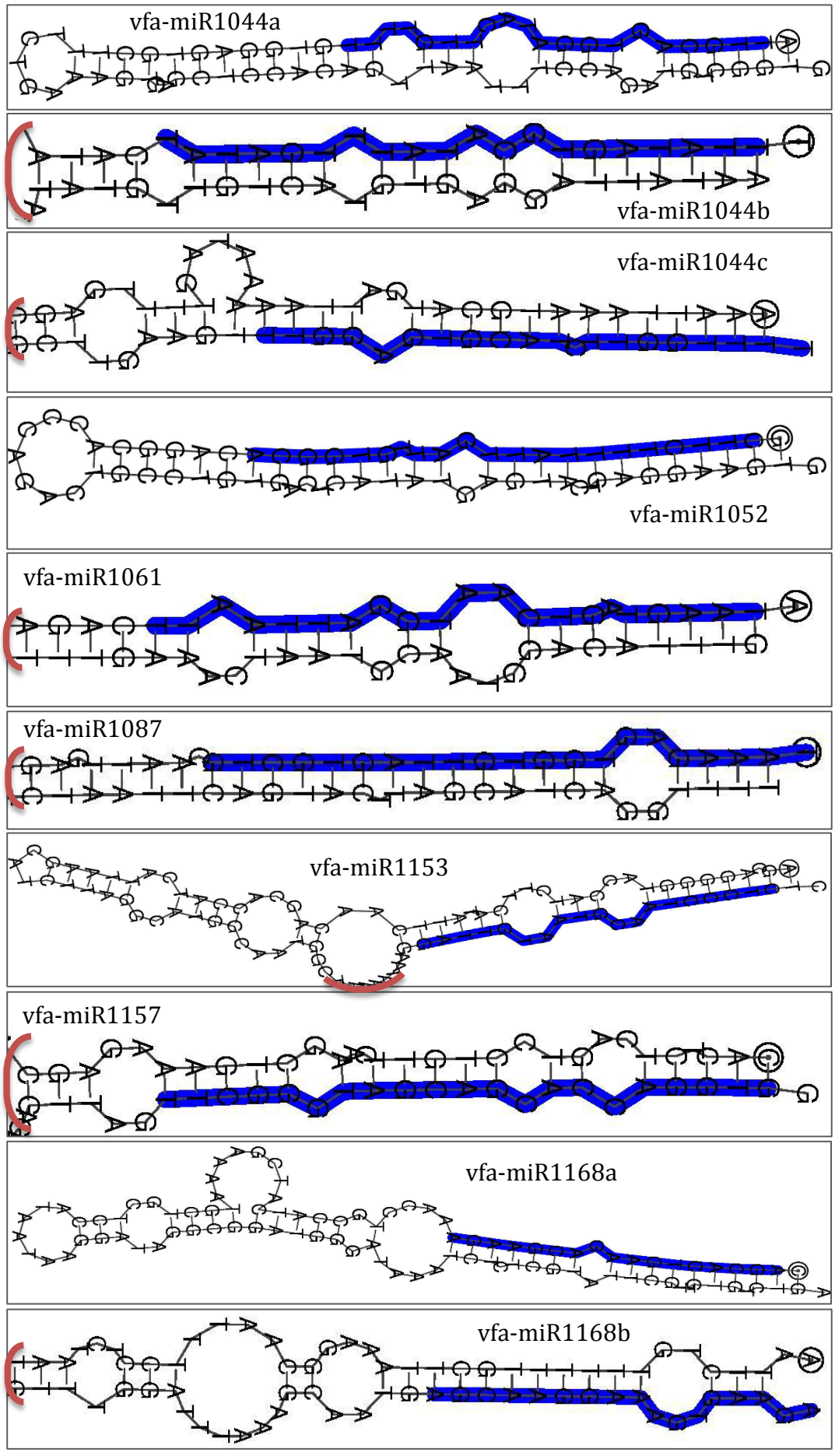

vfa-miR400
vfa-miR408a
vfa-miR408b
vfa-miR408c
vfa-miR414a
vfa-miR414b
vfa-miR414c
vfa-miR414d
vfa-miR414e

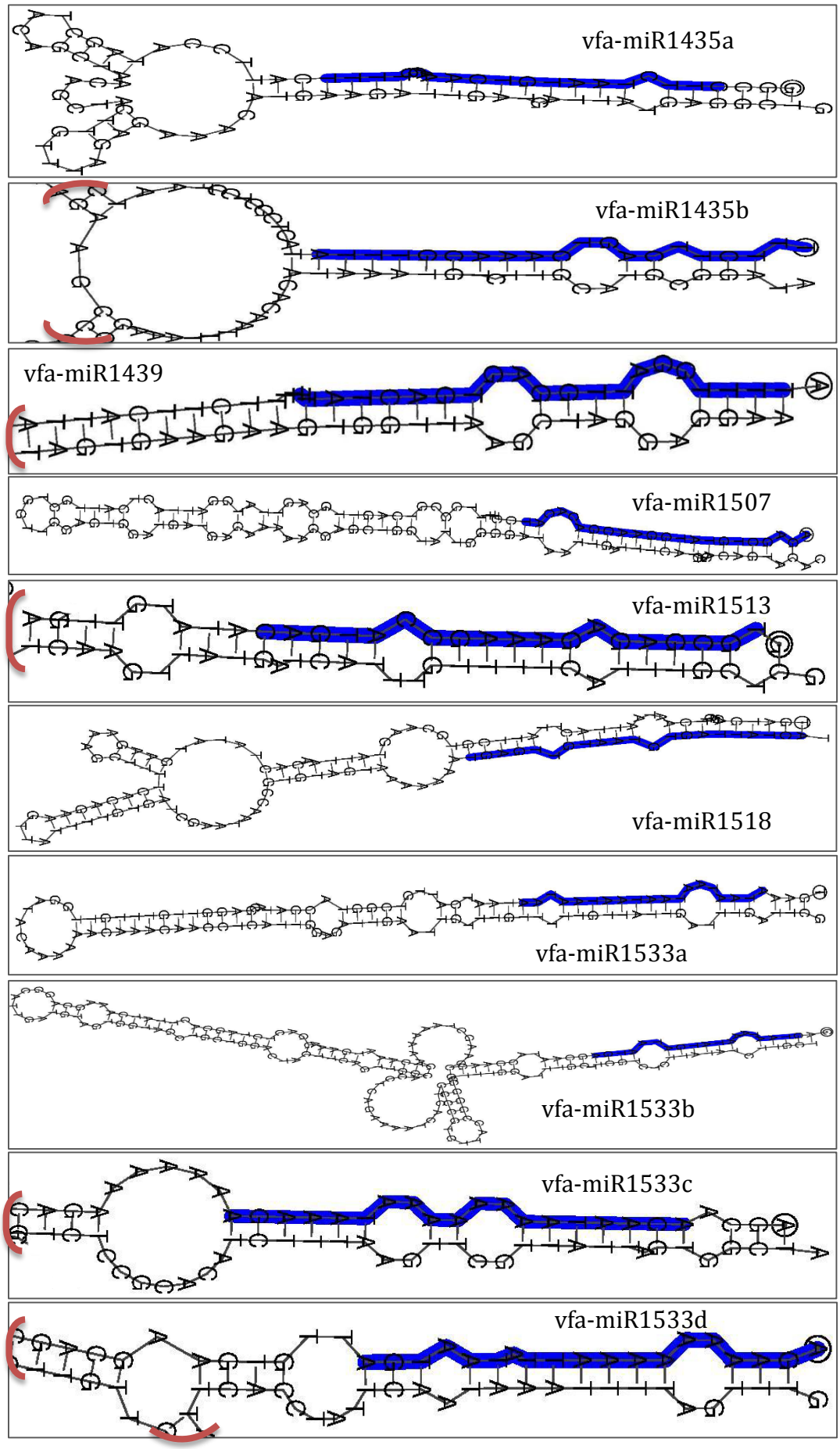

vfa-miR419
vfa-miR477a
vfa-miR477b
vfa-miR477c
vfa-miR482a
vfa-miR482b
vfa-miR482c
vfa-miR482d
vfa-miR529

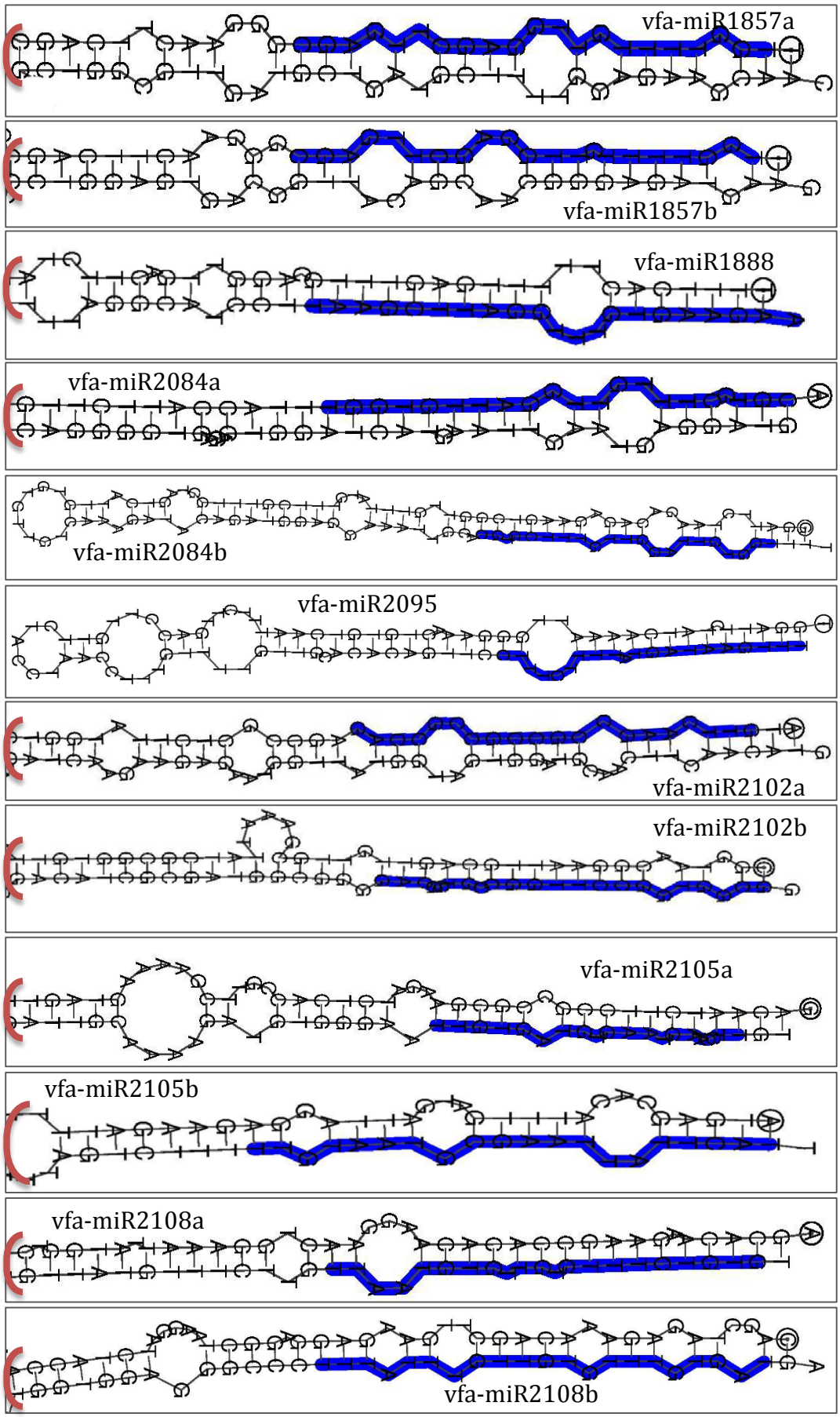

vfa-miR530a
vfa-miR530b
vfa-miR530c
vfa-miR774a
vfa-miR774b
vfa-miR775
vfa-miR778
vfa-miR816
vfa-miR834
vfa-miR835

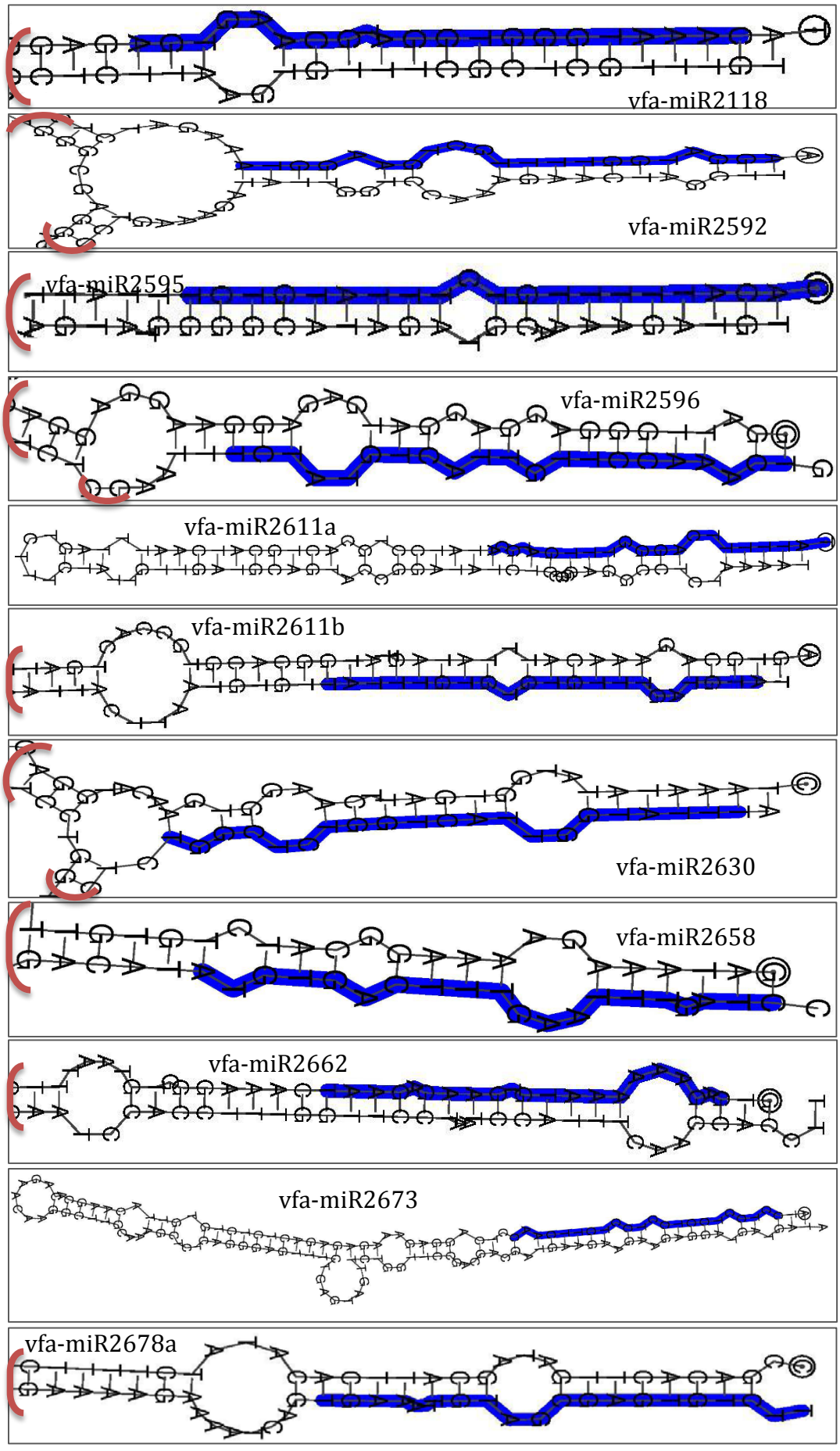

vfa-miR838a
vfa-miR838b
vfa-miR838c
vfa-miR845
vfa-miR847a
vfa-miR847b
vfa-miR848a
vfa-miR848b
vfa-miR848c
vfa-miR848d

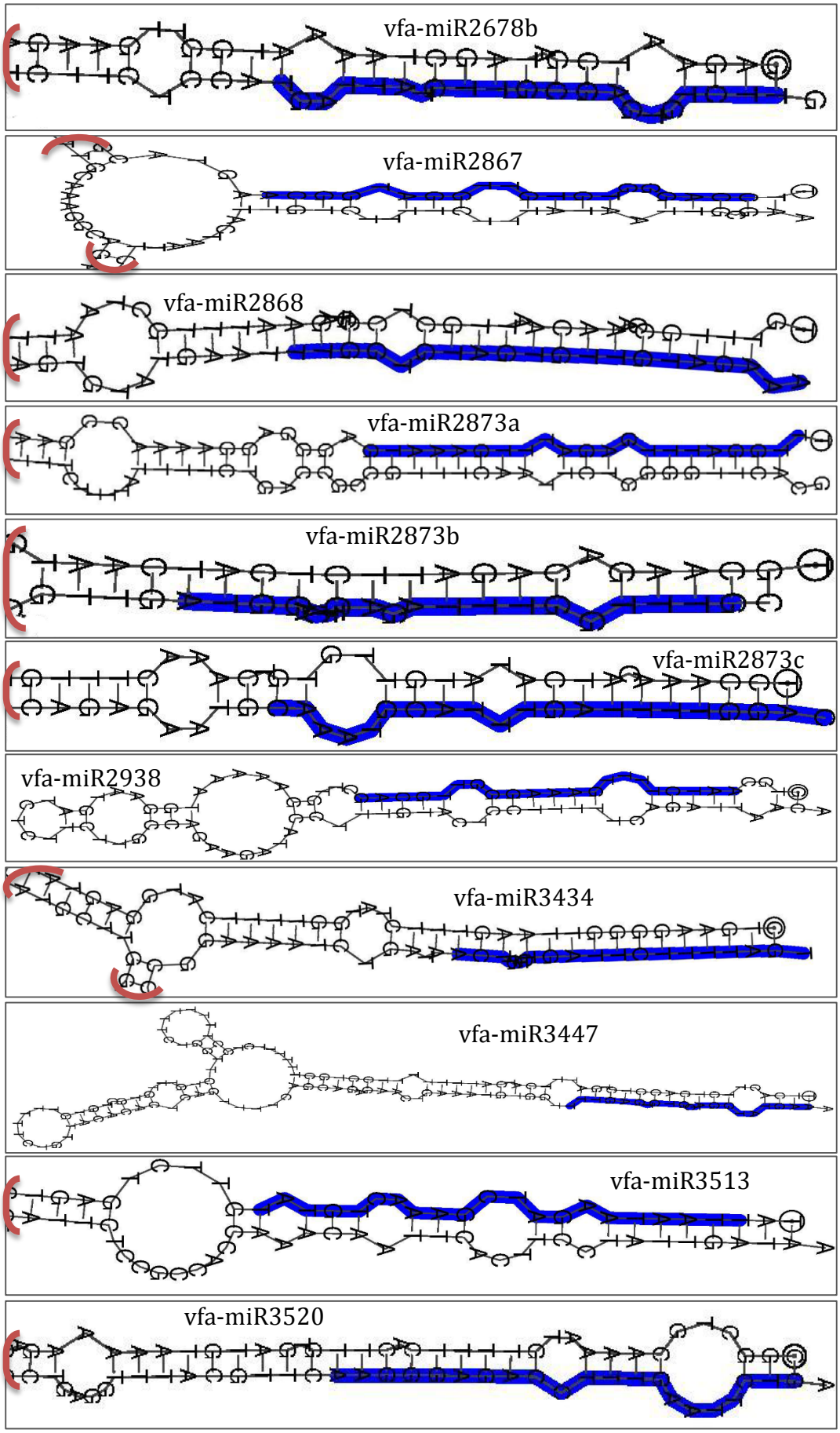

vfa-miR854a
vfa-miR854b
vfa-miR854c
vfa-miR858
vfa-miR867
vfa-miR902
vfa-miR1026
vfa-miR1028
vfa-miR1032
vfa-miR1039

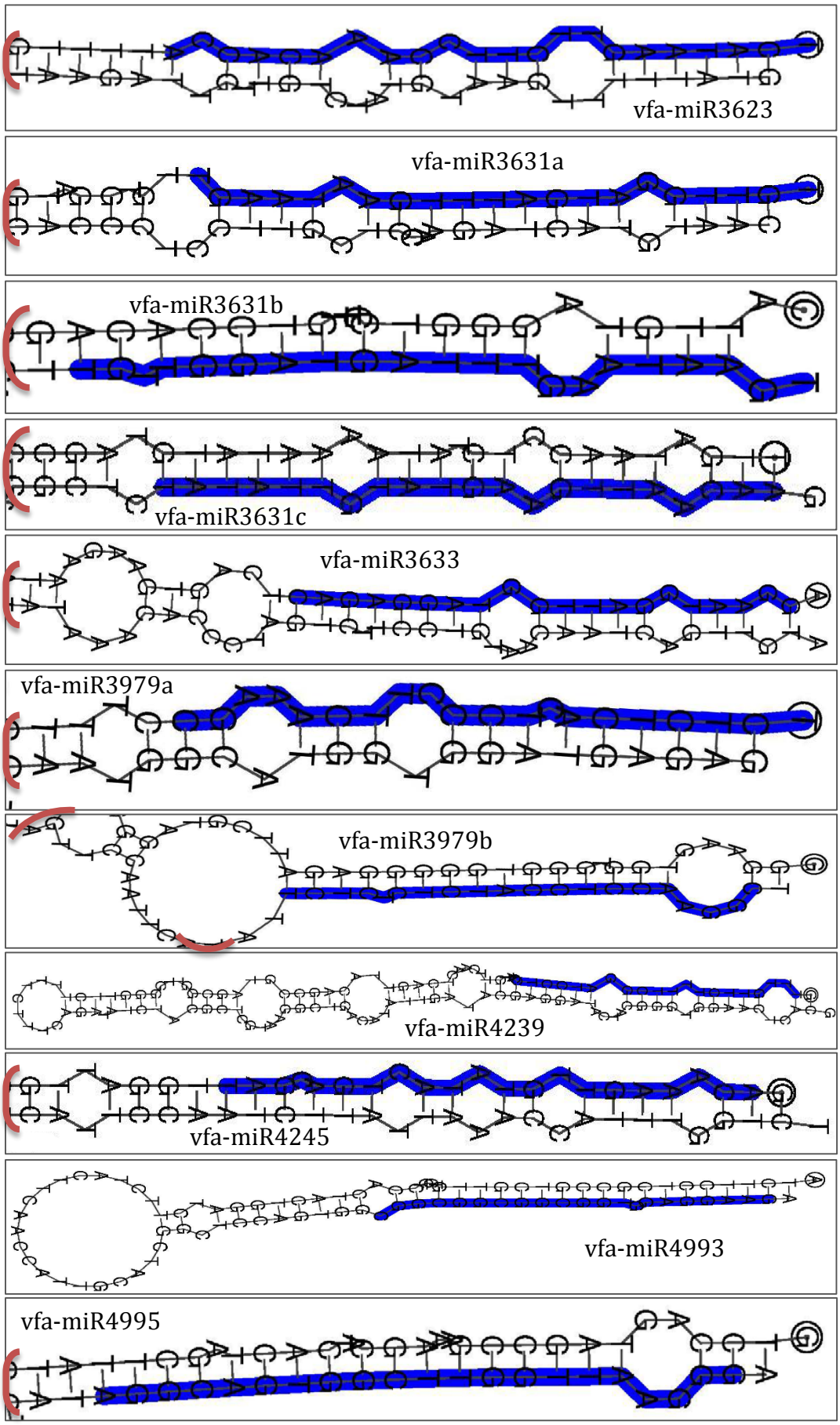

vfa-miR1044a
vfa-miR1044b
vfa-miR1044c
vfa-miR1052
vfa-miR1061
vfa-miR1087
vfa-miR1153
vfa-miR1157
vfa-miR1168a
vfa-miR1168b

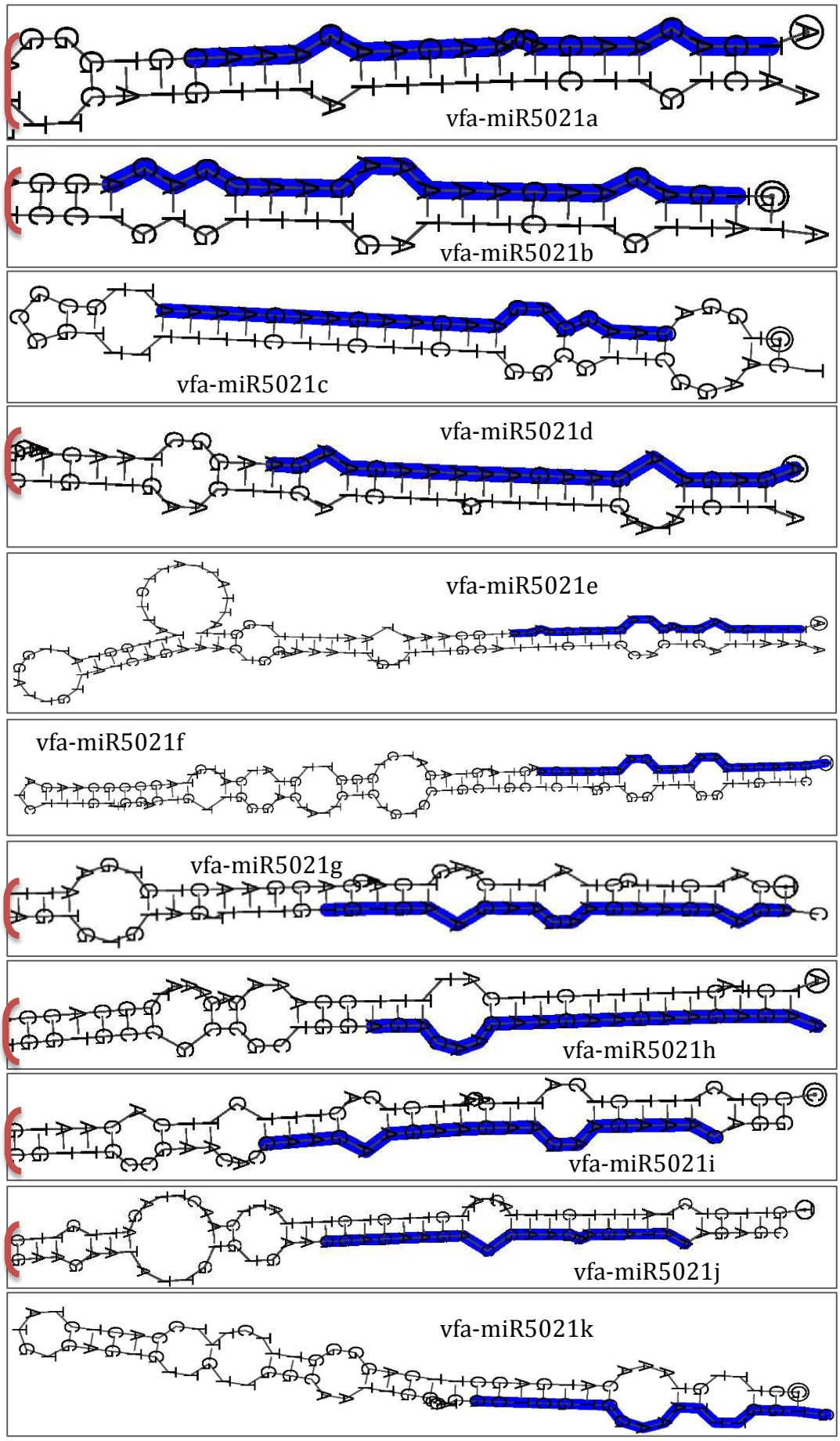

vfa-miR1435a
vfa-miR1435b
vfa-miR1439
vfa-miR1507
vfa-miR1513
vfa-miR1518
vfa-miR1533a
vfa-miR1533b
vfa-miR1533c
vfa-miR1533d

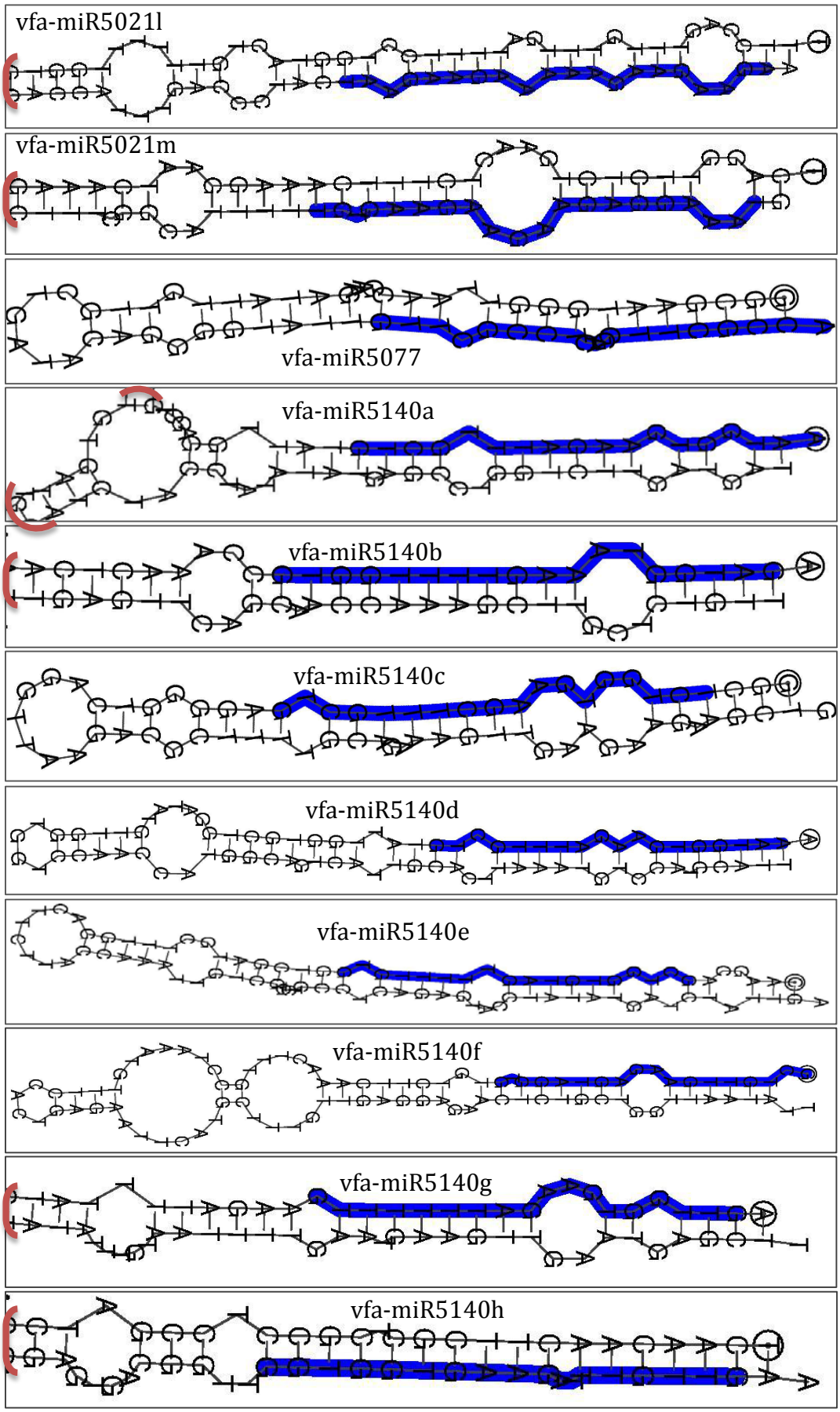

vfa-miR1857a
vfa-miR1857b
vfa-miR1888
vfa-miR2084a
vfa-miR2084b
vfa-miR2095
vfa-miR2102a
vfa-miR2102b
vfa-miR2105a
vfa-miR2105b
vfa-miR2108a
vfa-miR2108b

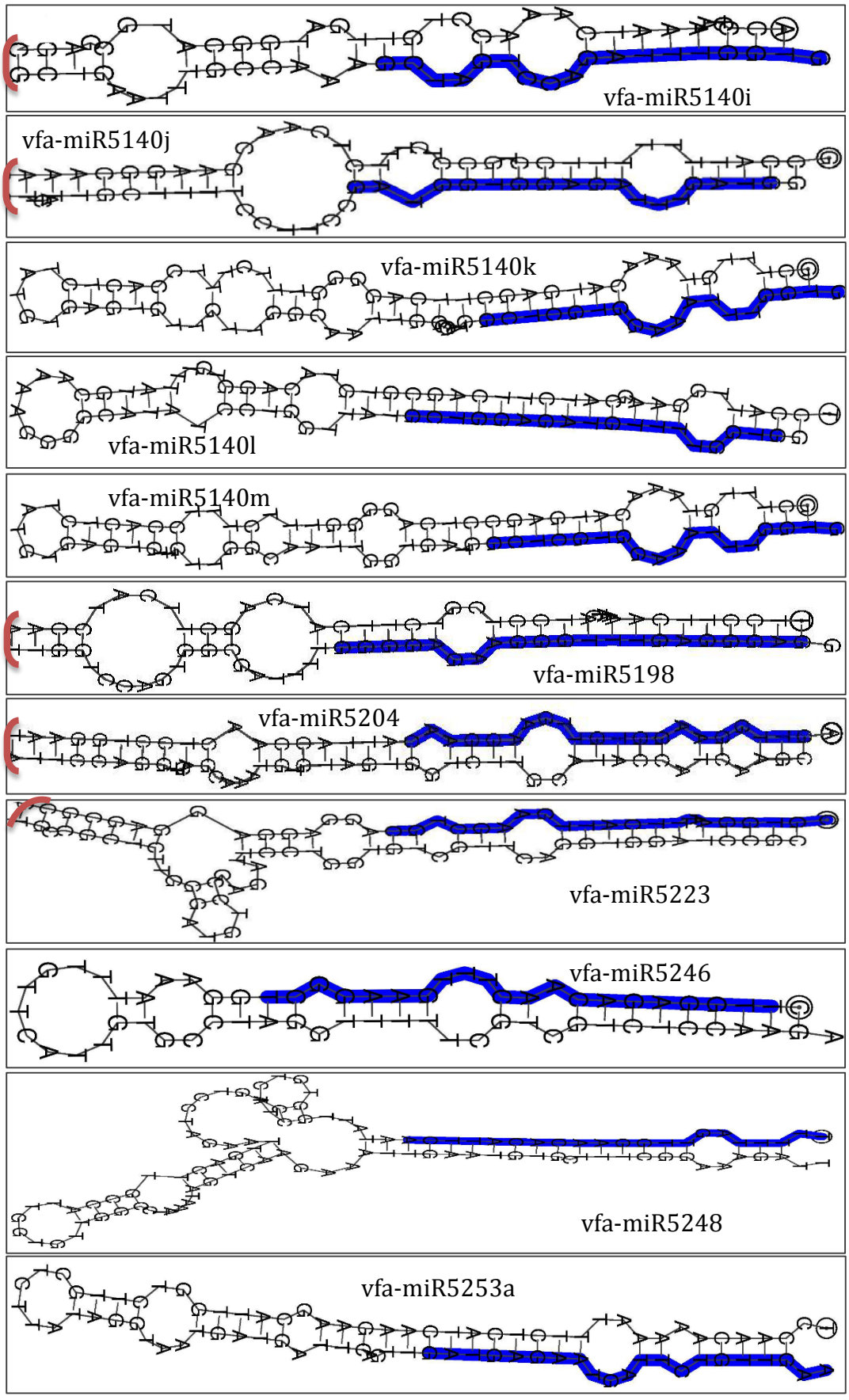

vfa-miR2118
vfa-miR2592
vfa-miR2595
vfa-miR2596
vfa-miR2611a
vfa-miR2611b
vfa-miR2630
vfa-miR2658
vfa-miR2662
vfa-miR2673
vfa-miR2678a

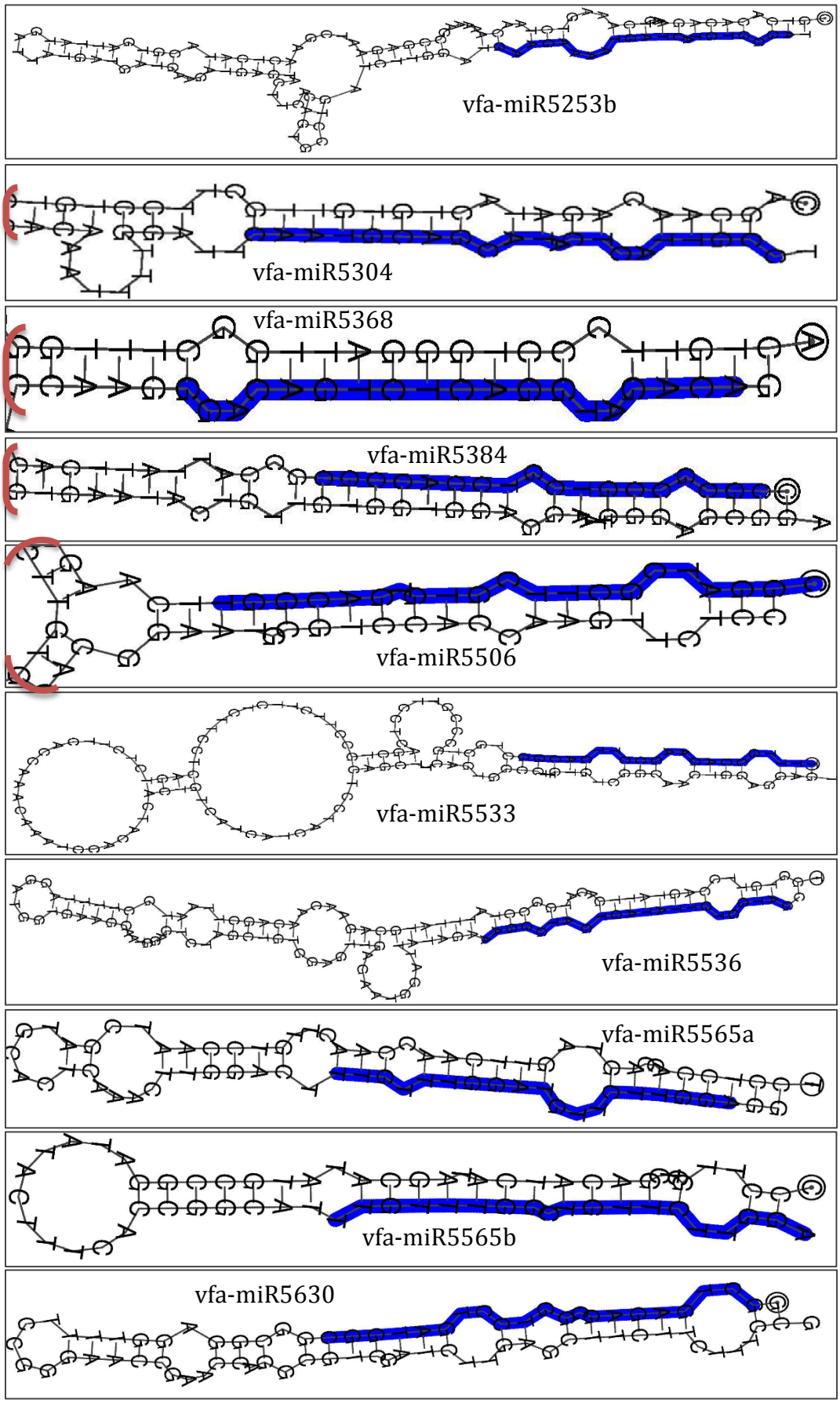

vfa-miR2678b
vfa-miR2867
vfa-miR2868
vfa-miR2873a
vfa-miR2873b
vfa-miR2873c
vfa-miR2938
vfa-miR3434
vfa-miR3447
vfa-miR3513
vfa-miR3520

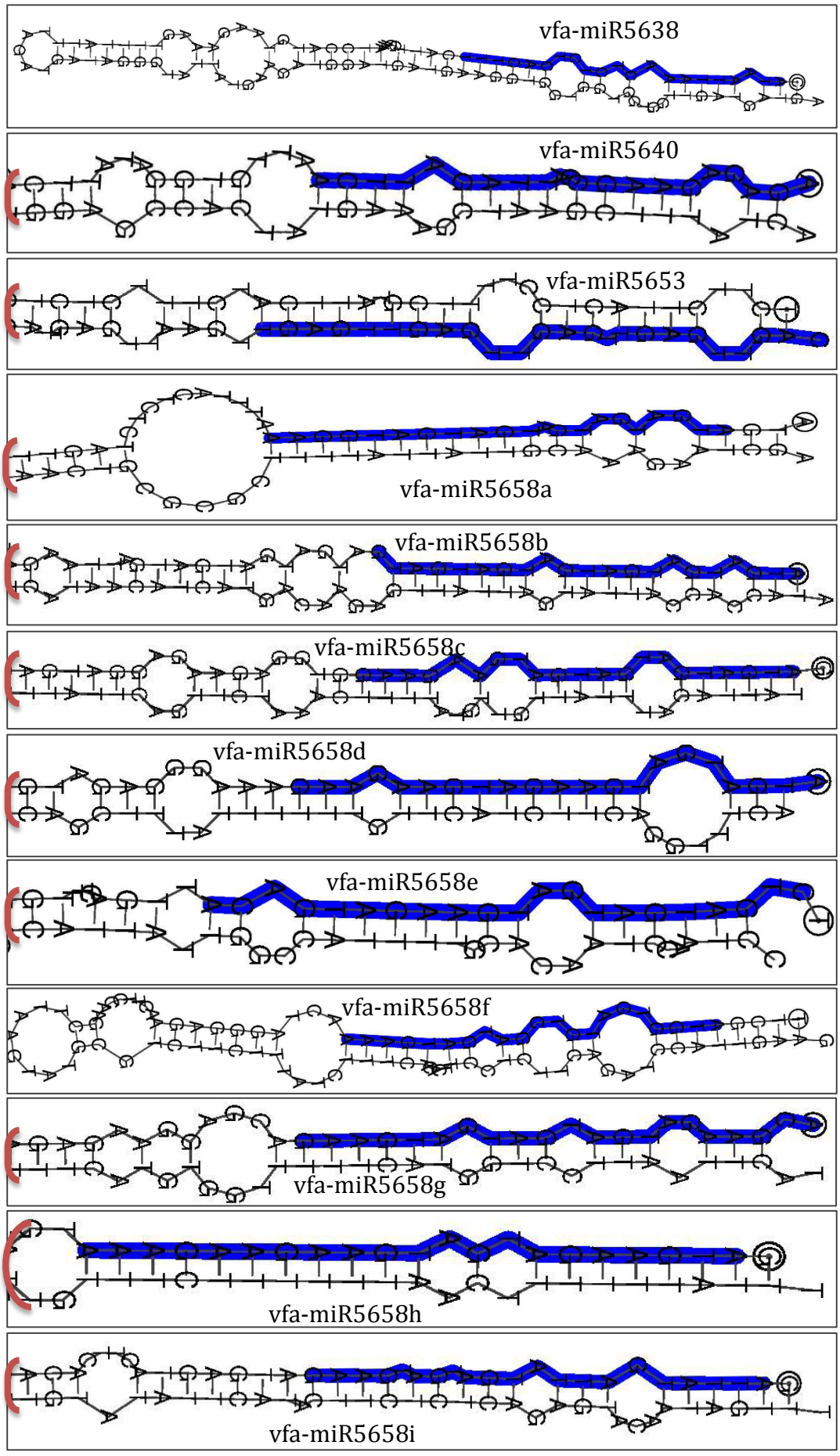

vfa-miR3623
vfa-miR3631a
vfa-miR3631b
vfa-miR3631c
vfa-miR3633
vfa-miR3979a
vfa-miR3979b
vfa-miR4239
vfa-miR4245
vfa-miR4993
vfa-miR4995

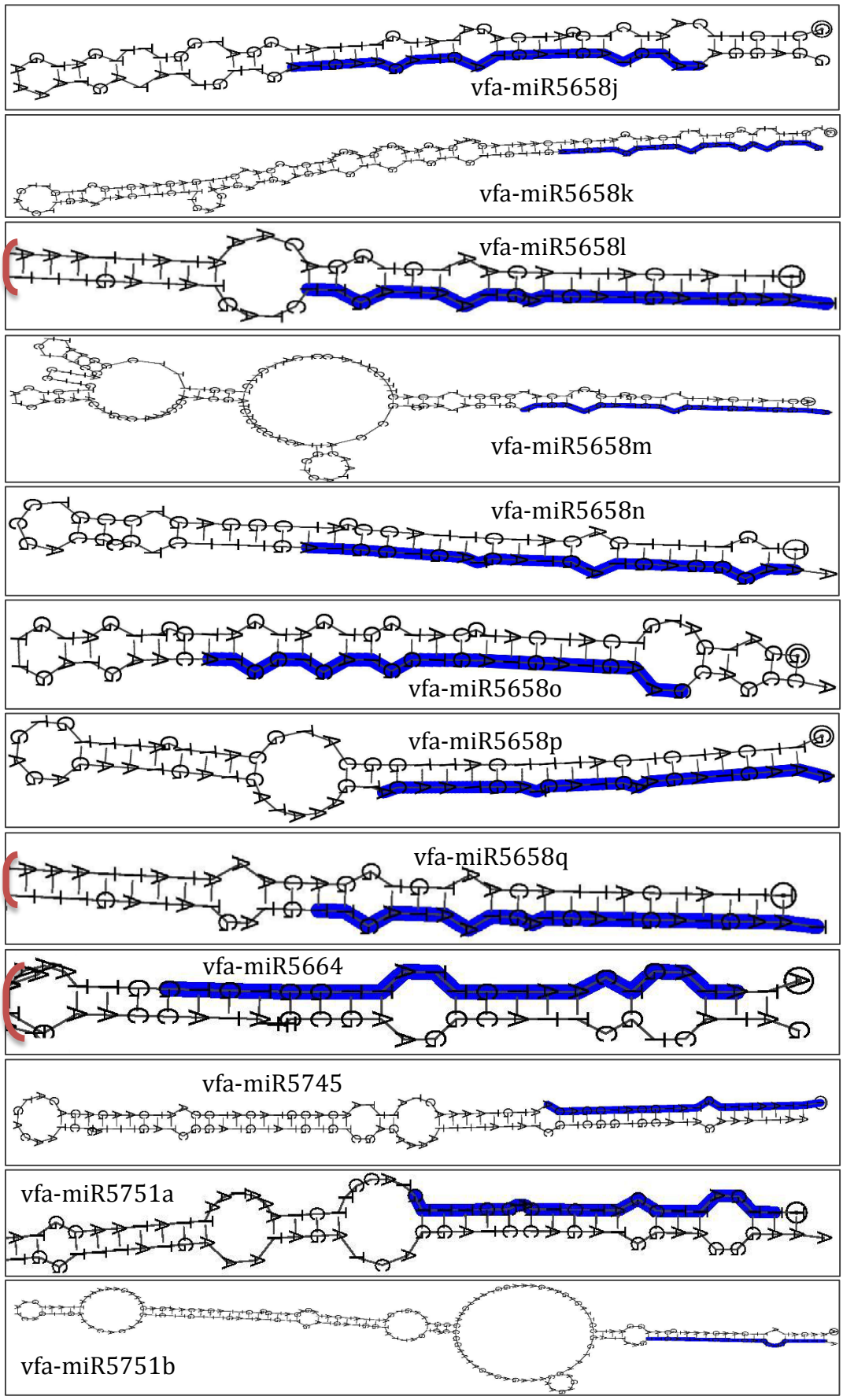

vfa-miR5021a
vfa-miR5021b
vfa-miR5021c
vfa-miR5021d
vfa-miR5021e
vfa-miR5021f
vfa-miR5021g
vfa-miR5021h
vfa-miR5021i
vfa-miR5021j
vfa-miR5021k

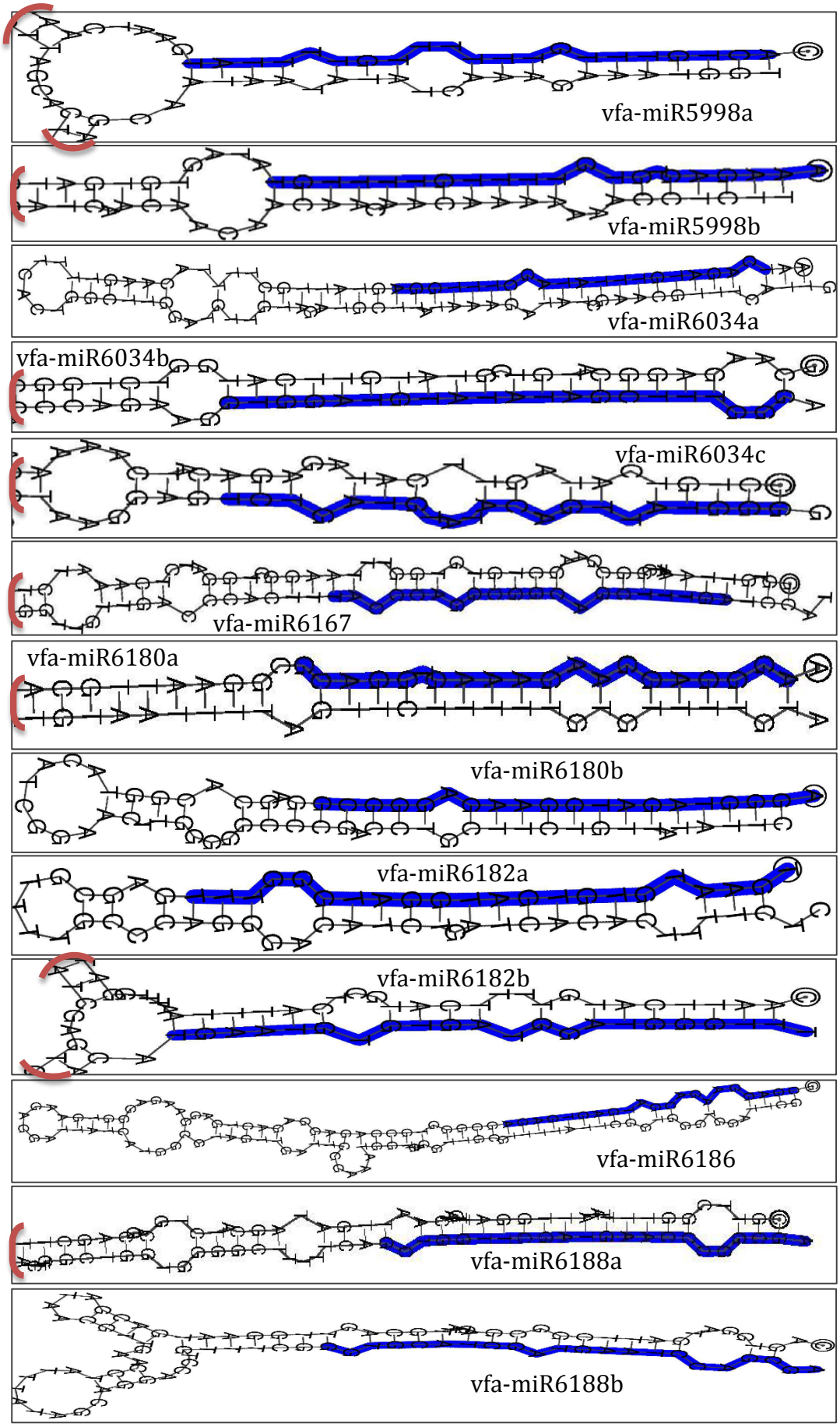

vfa-miR5021l
vfa-miR5021m
vfa-miR5077
vfa-miR5140a
vfa-miR5140b
vfa-miR5140c
vfa-miR5140d
vfa-miR5140e
vfa-miR5140f
vfa-miR5140g
vfa-miR5140h

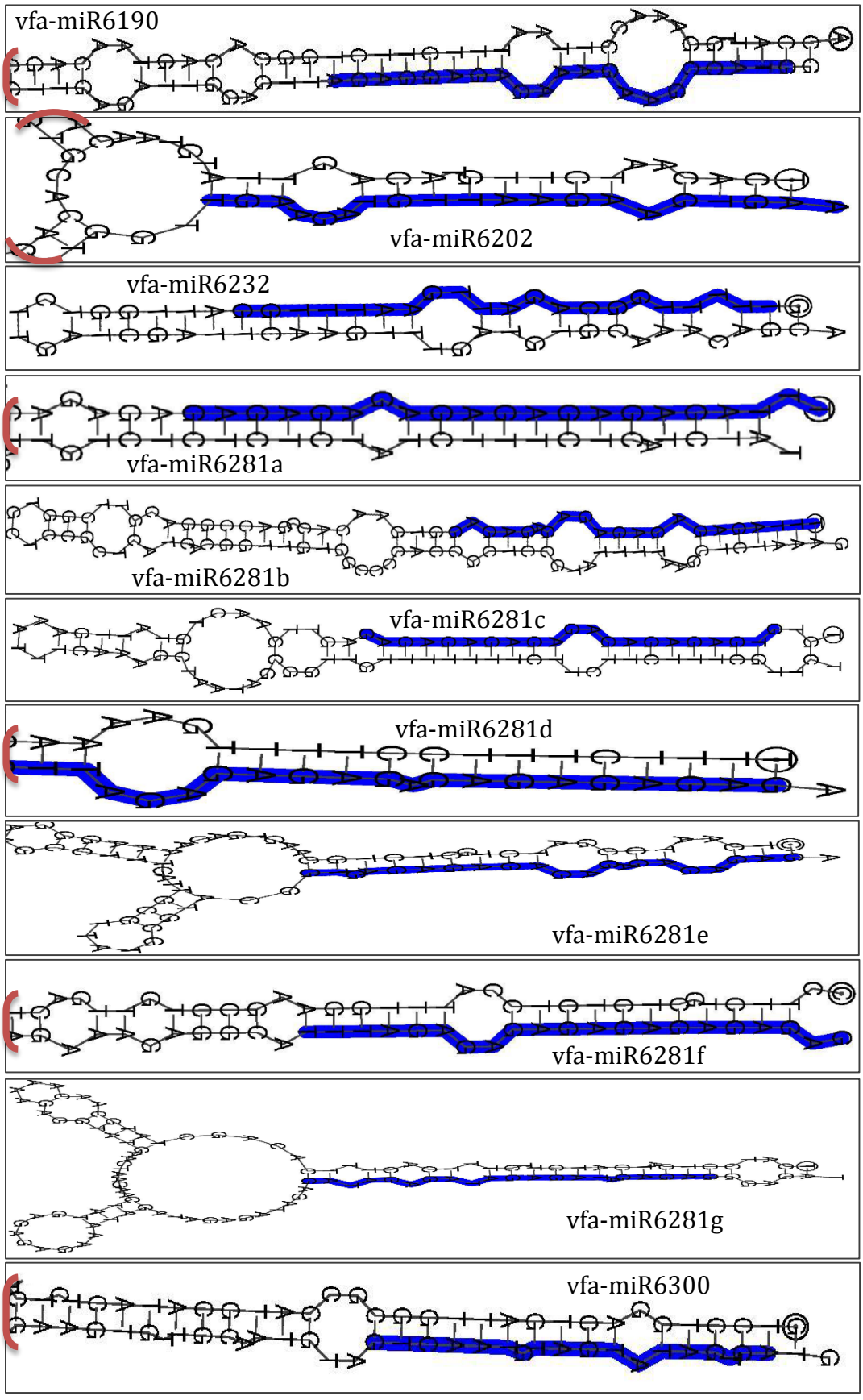

vfa-miR5140i
vfa-miR5140j
vfa-miR5140k
vfa-miR5140l
vfa-miR5140m
vfa-miR5198
vfa-miR5204
vfa-miR5223
vfa-miR5246
vfa-miR5248
vfa-miR5253a

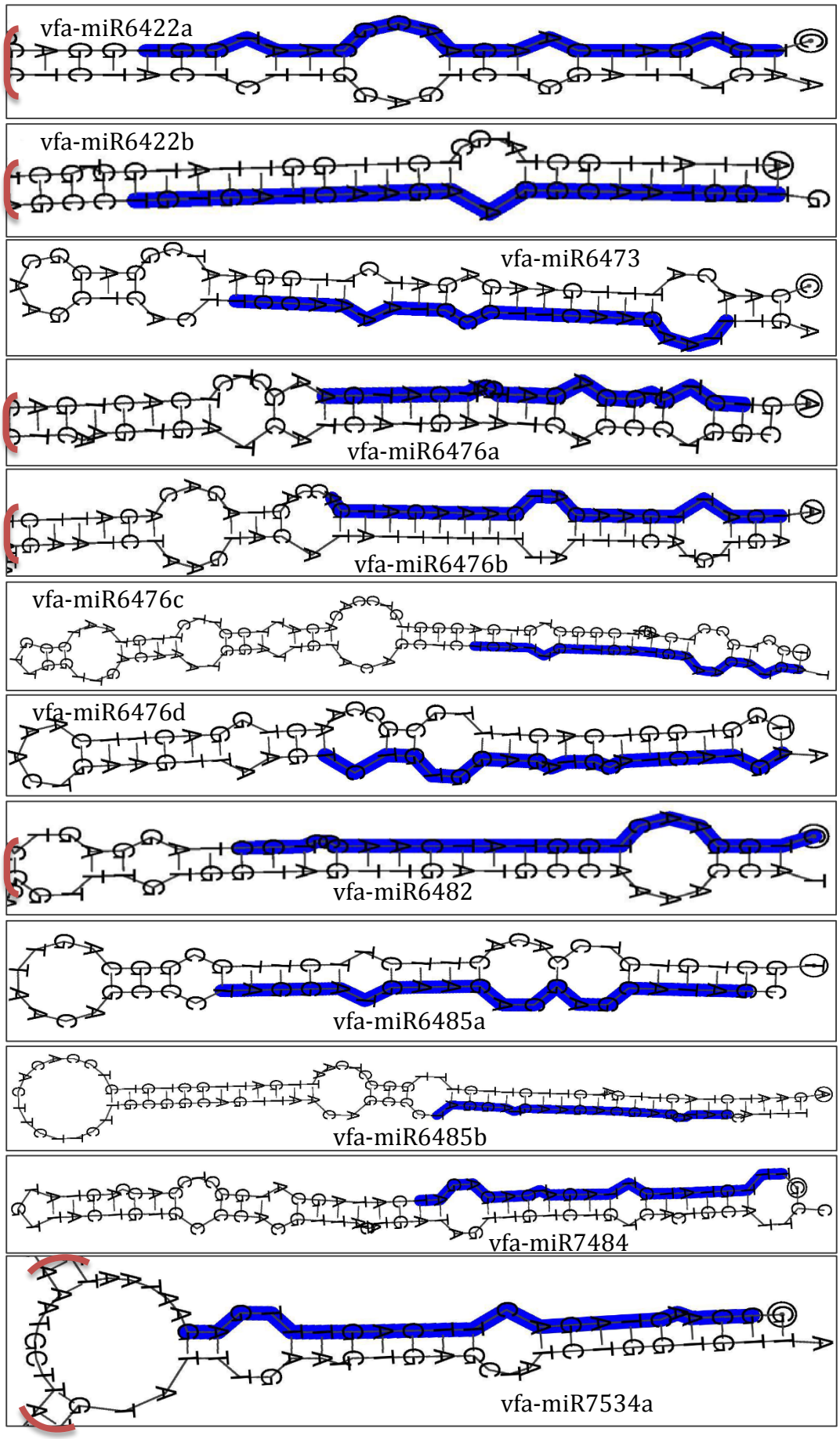

vfa-miR5253b
vfa-miR5304
vfa-miR5368
vfa-miR5384
vfa-miR5506
vfa-miR5533
vfa-miR5536
vfa-miR5565a
vfa-miR5565b
vfa-miR5630

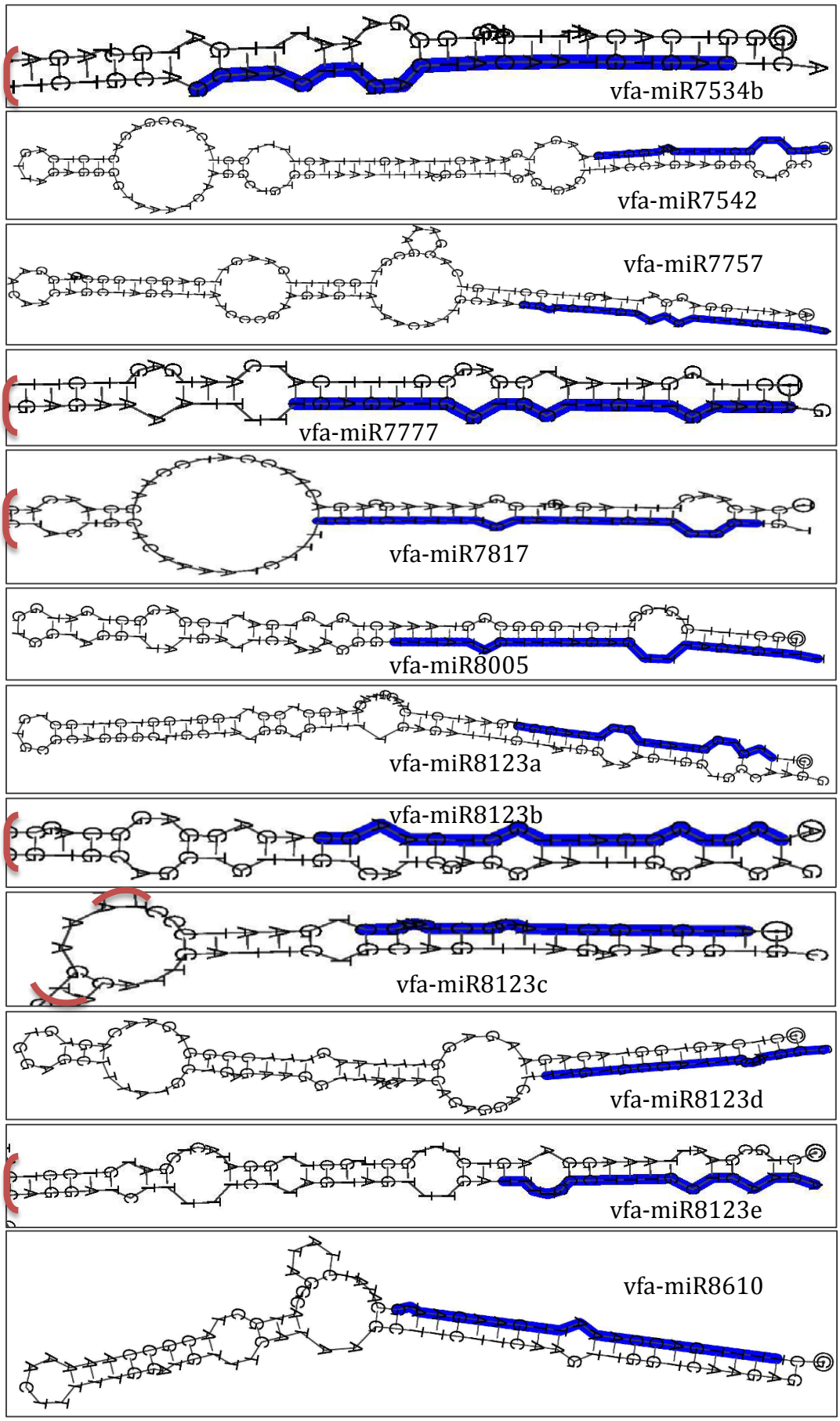

vfa-miR5638
vfa-miR5640
vfa-miR5653
vfa-miR5658a
vfa-miR5658b
vfa-miR5658c
vfa-miR5658d
vfa-miR5658e
vfa-miR5658f
vfa-miR5658g
vfa-miR5658h
vfa-miR5658i

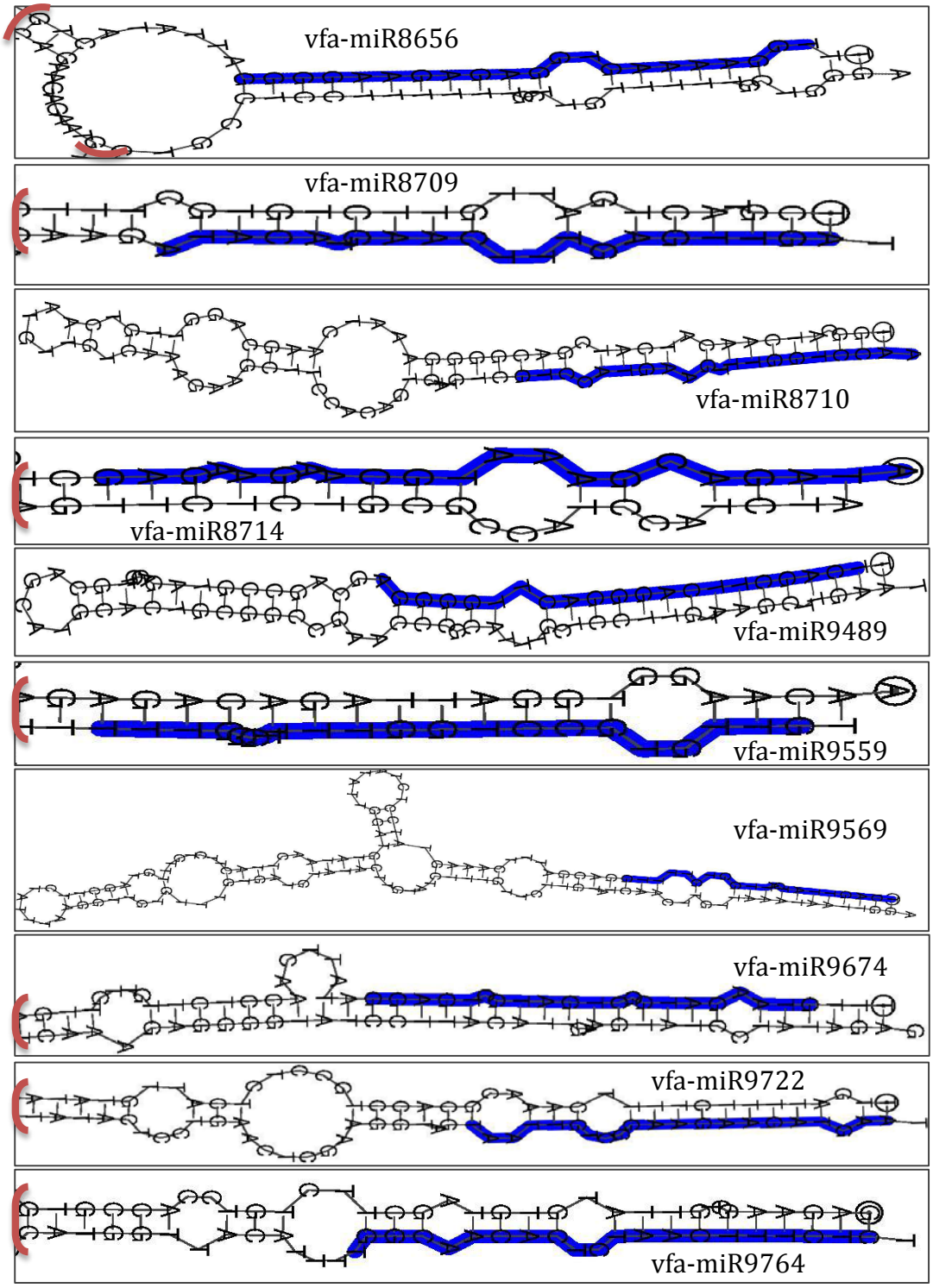

vfa-miR5658j
vfa-miR5658k
vfa-miR5658l
vfa-miR5658m
vfa-miR5658n
vfa-miR5658o
vfa-miR5658p
vfa-miR5658q
vfa-miR5664
vfa-miR5745
vfa-miR5751a
vfa-miR5751b


vfa-miR5998a
vfa-miR5998b
vfa-miR6034a
vfa-miR6034b
vfa-miR6034c
vfa-miR6167
vfa-miR6180a
vfa-miR6180b
vfa-miR6182a
vfa-miR6182b
vfa-miR6186
vfa-miR6188a
vfa-miR6188b


vfa-miR6190
vfa-miR6202
vfa-miR6232
vfa-miR6281a
vfa-miR6281b
vfa-miR6281c
vfa-miR6281d
vfa-miR6281e
vfa-miR6281f
vfa-miR6281g
vfa-miR6300


vfa-miR6422a
vfa-miR6422b
vfa-miR6473
vfa-miR6476a
vfa-miR6476b
vfa-miR6476c
vfa-miR6476d
vfa-miR6482
vfa-miR6485a
vfa-miR6485b
vfa-miR7484
vfa-miR7534a


vfa-miR7534b
vfa-miR7542
vfa-miR7757
vfa-miR7777
vfa-miR7817
vfa-miR8005
vfa-miR8123a
vfa-miR8123b
vfa-miR8123c
vfa-miR8123d
vfa-miR8123e
vfa-miR8610



Şekil A.1 Olası bakla pre-miRNA'larının ikincil yapıları.

Ek Açıklamalar B

Çizelge B.1 Hedef gen olarak kabul edilen EST dizilerinin işlev analiz sonuçları. Tabloda verilen GO çıktıları; P, biyolojik süreç; F, moleküler işlev; C, hücre bileşeni olarak kategorize edilmiştir. I, inhibisyon; Y, yıkım; B, baskılamayı belirtmektedir. Enzim olduğu belirlenen EST dizileri * işareti ile belirtilmiştir, bu dizilerin enzim kodları ve metabolik yolak analiz sonuçları Çizelge B.2'de verilmiştir.

miRNA	*EST Aksesyon No*	*Protein*	*GO çıktıları*	*I*
miR156a miR156b	HX904779.1	Squamosa promotör-bağlanma-benzeri protein	Nükleus(C),	Y
miR166a	HX908783.1	Oksin cevap faktörü	Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), DNA Bağlama(F),	Y
miR166b	HX908475.1	GDP-fukoz protein O-fukoiltransferaz		Y
miR166c	HX907374.1	Anafaz-ilerletici kompleks altbirim 1		Y
miR167a miR167e	HX914900.1	Şaperon protein dnaJ 8, kloroplastik-benzeri	Işık Uyaranlarına Verilen Cevap(P), Stres Cevabı(P), Nükleus(C), Kloroplast Stroması(C), Kloroplast(C), Plastid (C),	Y
miR167c	HX915173.1	Anafaz-ilerletici kompleks altbirim 1	Nükleus(C), Anafaz İlerletici Kompleks(C),	Y
miR167f	HX908365.1	LRR ve NB-ARC domain hastalık direnç proteini	Koruma Cevabı(P), ADP Bağlama(F),	Y
miR169a	HX907768.1	Karılmış (permut) tek zf-CXXC birim / Demeter, RRM-katlanma domain	Biyosentetik İşlem(P), DNA Metabolik Yolu(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Stres Cevabı(P), Gen Ifadesinin Düzenlenmesi, Epigenetik(P), Katalitik Aktivite(F), Bağlama(F),	Y
miR172a	HX908179.1	Transkripsiyon faktör APETALA2	Çok Hücreli Organizma Gelişimi(P), Çiçek Gelişimi(P), Post-Embriyonik Gelişim(P), Anatomik Yapı Morfogenezi(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), DNA Bağlama(F), Dizi Spesifik DNA Bağlama Transkripsiyon Faktör Aktivitesi(F), Nükleus(C),	Y
miR172b	HX911192.1 HX913780.1	Ribozomal protein S17e	Translasyon(P), Ribozom Yapısal Bileşeni(F), Hücre İçi (C), Ribozom(C), Sitozolik Küçük Ribozomal Altbirim(C), Sitozol(C), Hücre Zarı(C), Nükleolus(C),	Y
miR395a	HX913444.1	Suksinat dehidrogenaz	Nükleus(C), Zar(C), Mitokondri(C),	Y
miR396a	HX901141.1	Glutamin-Lösin-Glutamin, QLQ / BÜYÜME-DÜZENLEYİCİ FAKTÖR (GRF) proteinleri	Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), ATP Bağlama(F), Hidrolaz Aktivitesi, Asit anhidritlerde etkili, fosfor-içeren anhidritlerde(F), Nükleus (C),	Y
miR396b	HX904682.1	Tetratrikopeptid-benzeri helikal domain	Protein Bağlama(F),	Y
miR400	HX904260.1	Galaktinol sentaz	Oksidatif Stres Cevabı(P), Hidrojenperokside Verilen Cevap(P), Absisik Aside Verilen Cevap(P), Su Yoksunluğuna Verilen Cevap(P), Soguğa Verilen Cevap(P), Sıcaklığa Verilen Cevap(P), Tuz Stresine Verilen Cevap(P), Yüksek Işık Yoğunluğuna Verilen Cevap(P), Transferaz Aktivitesi(F), Inositol 3-Alfa-Galaktoziltransferaz Aktivitesi(F), Transferaz Aktivitesi, Glikosil gruplarının transferi(F),	

miR408a miR408c	HX912952.1	Plastosiyanin-benzeri / Mavi bakır proteinleri	Elektron Taşıma Aktivitesi(F),	Y
miR408b	HX910705.1*	Fosforibulokinaz	Karbonhidrat metabolik yolu(P), ATP Bağlama(F), Fosforibulokinaz Aktivitesi(F), Kinaz Aktivitesi(F),	B
	HX908785.1*	Küçük GTPaz üstailesi	Küçük GTPaz Aracılığıyla Gerçekleşen Sinyal Aktarımı(P), GTP Bağlama(F),	B
	HX902121.1	AUX/IAA protein	Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Protein Bağlama(F), Nükleus(C),	B
miR414a	HX908767.1	AP2/ERF domain	Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Dizi Spesifik DNA Bağlama Transkripsiyon Faktör Aktivitesi(F), Kinaz Aktivitesi(F),	
miR414a miR414b	HX909453.1	RWD domain / Ubiqutin-konjugasyon enzim/RWD-benzeri	Protein Bağlama(F),	Y
miR414c	FL503008.1	11-S tohum depo protein, bitki	Besin Depolama Aktivitesi(F),	Y
miR414e	HX912420.1*	Peroksidaz	Metobolik İşlem(P), Stres Cevabı(P), Katalitik Aktivite(F), Bağlama(F), Hücre Dışı Bölge(C),	Y
	HX908990.1	Nükleozom birleşme protein (NAP)	Nükleozom Birleşimi(P), Hücre Bileşenlerinin Organizasyonu(P), DNA Metabolik Yolu(P), Nükleus(C),	Y
	HX901537.1	Kuraklık uyarımlı 19 protein-benzer, çinko-bağlama domaini		Y
	HX909905.1	116 kDa u5 küçük nüklear ribonükleoprotein bileşen-benzeri	Embriyo Gelişimi(P), Katabolik İşlem(P), Çok Hücreli Organizma Gelişimi(P), Post-Embriyonik Gelişim(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Üreme(P), Hücre Farklılaşması(P), Nükleotid Bağlama(F), Hidrolaz Aktivitesi(F), Nükleolus(C), Hücre Bileşeni(C), Hücre Zarı(C), Hücre İçi(C), Nükleoplazm(C), Hücre Çeperi(C),	Y
	HX909526.1	Tuz tolerans proteini	Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Post-Embriyonik Gelişim(P), Bağlama(F), Hücre İçi(C),	B
miR419	HX909070.1	Protein kinaz domain / Kalsiyum-bağlı protein kinaz	Protein Fosforilasyonu(P), Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), ATP Bağlama(F), Nükleotid Bağlama(F), Kinaz Aktivitesi(F), Protein Kinaz Aktivitesi(F),	Y
miR477b	HX906067.1	Temel polen allerjen Lol pI	Eşeysel Üreme(P), Üreme(P), Hücre Dışı Bölge(C),	Y
miR477c	HS514025.1	SH3 domain	Protein Bağlama(F),	Y
miR482b	HX909464.1	Olası polisakkarit biyosentez protein / Ksilan biyosentez protein IRX15/IRX15L	Endozom(C), Golgi Kompleksi(C),	Y
miR529	FL505391.1	Histon H2AX-benzeri	Hücre Bileşenlerinin Organizasyonu(P), DNA Metabolik Yolu(P), DNA Bağlama(F), Protein Bağlama(F), Nükleolus(C), Hücre İçi(C),	Y
miR530b	HX910268.1	Armadillo tekrar proteini	Protein Bağlama(F),	Y
miR530c	HX901892.1	Transdüsin/WD40 tekrar protein	Hücre Zarı(C),	Y
	HX912540.1	FAS1 (fassislin-benzer) domain		Y
miR778	HX900485.1*	Glikozit hidrolaz, aile 1	Karbonhidrat metabolik yolu(P), Hidrolaz Aktivitesi, Hidrolize O-glikozil bileşikleri(F),	Y
miR834	HX908641.1	Glisin zengin protein		Y
miR838a	HX909269.1	PMR5 N-terminal domain	Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Stres Cevabı(P),	Y

	HX904281.1	AP2/ERF domain / DNA-bağlama domaini	Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Dizi Spesifik DNA Bağlama Transkripsiyon Faktör Aktivitesi(F), DNA Bağlama(F),	Y
miR838a miR838b	HX907667.1	Germin-benzeri protein / oksin-bağlama protein ABP19a	Bağlama(F), Moleküler İşlev(F), Manganez Iyon Bağlama(F),	Y
miR838b	HS513993.1*	Violaksantin de-epoksidaz	Oksidasyon-Redüksiyon İşlemi(P), Metobolik İşlem(P), Violaksantin de-epoksidaz Aktivitesi(F), Katalitik Aktivite(F), Kloroplast(C), Plastid(C),	Y
	HX909264.1	Myc-tip, temel heliks-lup-heliks (bHLH) domain (transskripsiyon faktör)	Protein Dimerizasyon Aktivitesi(F), Protein Bağlama(F),	B
miR838a miR838c	HX912992.1	RNA tanıma motif domain	Nükleik Asit Bağlama(F), Nükleotid Bağlama(F),	Y
miR847a	HX909499.1	EF-el domain / Kalmodulin-ilişkili, hipotetik izoform 1	Bağlama(F), Kalsiyum Iyon Bağlama(F),	Y
miR854a	HX914391.1 HX912186.1	Geç embriyogenez bol protein, LEA-14		Y
miR854c	HX909746.1	AP2/ERF domain / DNA-bağlama domaini	Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Dizi Spesifik DNA Bağlama Transkripsiyon Faktör Aktivitesi(F), DNA Bağlama(F),	B
	HX910575.1	Tetratrikopeptid tekrar	Protein Bağlama(F),	B
miR867	HX913822.1*	Kelch tekrar tip 1 / Galaktoz oksidaz, beta-pile	Protein Bağlama(F),	Y
miR902	HS514050.1 HX901124.1	Ferritin	Hücre Homeostazı(P), Hücresel Demir Iyon Homeostazı(P), Taşınım(P), Demir İyon Taşınımı(P), Bağlama(F), Ferrik Demir Bağlama(F),	Y
miR1026	HX903658.1	Trans-1,2-dihidrobenzen-1,2-diol dehidrogenaz-benzeri	Metobolik İşlem(P), Katalitik Aktivite(F),	Y
miR1039	HX910261.1	Kloroplast translokaz 159, kloroplastik-benzeri	Sinyal Aktarımı(P), Metobolik İşlem(P), Taşınım(P), Nükleotid Bağlama(F), Protein Bağlama(F), Reseptör Aktivesi(F), Sinyal Dönüştürme Aktivitesi(F), Hidrolaz Aktivitesi(F), Sitozol(C), Hücre Bileşeni(C), Plastid©	Y
miR1044a	HX906714.1	Protein kornikon homolog 4-benzeri	Sinyal Aktarımı(P), Zar(C), Plastid(C),	Y
miR1052	HX907385.1*	ATP-bağlı helikaz HRQ1-benzeri	Metobolik İşlem(P), Nükleik Asit Bağlama(F), Nükleotid Bağlama(F), Hidrolaz Aktivitesi(F),	Y
miR1087	HX910571.1	Mitokondrial import iç membran translokaz altbirim Tim17/Tim22/Tim23 protein ailesi	Zarın İç Bileşenleri(C), Zar(C),	Y
miR1157	HX907189.1	Gama-tokoferol metiyltransferaz	Metobolik İşlem(P), Transferaz Aktivitesi(F),	Y
miR1435a	HX906615.1	Kalsinörin-benzeri fosfoesteraz domain, apaH tip	Hidrolaz Aktivitesi(F),	Y
	HX901579.1	CYTH (CyaB, tiamin trifosfataz) benzeri domain		B
miR1435b	HX904064.1	GTPaz Der benzeri	Nükleotid Bağlama(F),	Y
miR1439	HX910421.1*	Lösosiyanidin oksijenaz / Oksoglutarat/demir-bağlı dioksijenaz	Oksidasyon-Redüksiyon İşlemi(P), Oksidoredüktaz Aktivite(F), Oksidoredüktaz Aktivitesi, Eşleşmiş vericilerde etkin, moleküler oksijenin indirgenmesi veya katılmıyla, verici olarak 2-oksoglutarat, ve her iki vericide her bir oksijen için bir atomun katılımı(F),	Y
miR1518	HX906120.1	Aspartik peptidaz	Proteoliz(P), Protein Metabolik İşlem(P), Aspartik Tip Endopeptidaz Aktivitesi(F),	Y
miR1857a miR1857b	HX904426.1	Nüklear por membran glikoprotein 210-benzeri	Taşınım(P), Protein Taşınımı(P), Hücre Içi Protein Taşınımı(P), Nüklear Taşınım(P),	Y

miR2102b	HX908105.1	Transkripsiyon faktör, TCP	Biyolojik İşlem(P),	Y
miR2105b	HX904527.1	Isı şok protein DnaJ, sistein-zengin domain	Protein Bağlama(F), Isı Şoku ProteinİBağlama(F), Katlanmamış Protein Bağlama(F),	Y
miR2108a	HX911801.1	DNA-bağlama WRKY	Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), DNA Bağlama(F), Dizi Spesifik DNA Bağlama(F), Dizi Spesifik DNA Bağlama Transkripsiyon Faktör Aktivitesi(F),	Y
miR2108b	HX906831.1	Protein kinaz C-benzeri, forbol ester/diaçilgliserol-bağlama domaini	Sinyal Aktarımı(P), Hücre Içi Sinyal Iletimi(P),	Y
	HX910990.1*	Fruktoz-bifosfat aldolaz	Karbonhidrat metabolik yolu(P), öncül metabolit üretimi ve enerji(P), Katabolik İşlem(P), Katalitik Aktivite(F),	Y
	HX906512.1*	ATP-bağlı helikaz HRQ1-benzeri	Metobolik İşlem(P), Nükleik Asit Bağlama(F), Nükleotid Bağlama(F), Hidrolaz Aktivitesi(F),	Y
miR2118	HX901570.1	Ankirin tekrar bölgesi içeren protein 13	Hücre Zarı(C),	Y
miR2595	HX906341.1	Homeodomain-benzeri transkripsiyon düzenleyici izoform	DNA Bağlama(F),	Y
miR2596	HX903459.1	3-ketodihidrosifingozin redüktaz	Metobolik İşlem(P), Katalitik Aktivite(F),	Y
miR2611b	FL503228.1	Defensin-benzeri protein	Biyolojik İşlem(P), Biyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Dış Uyaranlara Verilen Cevap(P), Stres Cevabı(P), Hücre Dışı Bölge(C),	Y
	HX911777.1	Dormansi oksin ilişik protein		Y
miR2630	HX903337.1	Profilin	Anatomik Yapı Morfogenezi(P), Hücresel İşlem(P), Hücre Bileşenlerinin Organizasyonu(P), Hücre Büyümesi(P), Protein Bağlama(F), Nükleolus(C), Hücre Dışı Bölge(C), Hücre Bileşeni(C), Hücre Zarı(C), Plastid(C), Hücre İskeleti(C), Sitoplazma(C), Hücre Çeperi(C), Sitozol(C).	Y
miR2658	HX904157.1*	S-adenozilmetionin dekarboksilaz	Biyosentetik İşlem(P), Spermidin Biyosentez Yolu(P), Spermin Biyosentez Yolu(P), Hücresel İşlem(P), Adenozilmethiyonin Dekarboksilaz Aktivitesi(F), Katalitik Aktivite(F),	Y
miR2673	FL504187.1	Nücleolin-benzeri izoform	Nükleotid Bağlama(F), Nükleik Asit Bağlama(F), Sitozol(C),	Y
	HX901141.1	Büyüme düzenleyici faktör, WRC (Trp, Arg, Cys) domain / Glutamin-Lösin-Glutamin, QLQ	Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), ATP Bağlama(F), Nükleotid Bağlama(F), Hidrolaz Aktivitesi, Asit anhidritlerde etkili, fosfor-içeren anhidritlerde(F), Nükleus(C),	Y
	HX905518.1	Remorin	Hücre-Hücre Sinyal Aktarımı(P), Taşınım(P), Karbohidrat Bağlama(F), Hücre Zarı(C),	Y
	HX912992.1	RNA tanıma motif domain / Nukleotid-bağlama alfa-beta pli domain	Nükleotid Bağlama(F), Nükleik Asit Bağlama(F),	Y
miR2678a	HX910864.1	Toll/interlökin-1 reseptör homolog (TIR) domain	Sinyal Aktarımı(P), Nükleotid Bağlama(F), Protein Bağlama(F),	Y
miR2678b	HX909457.1*	Mini-kromozom devamlılık devam, DNA-bağlı ATPaz	Biyosentetik İşlem(P), DNA Metabolik Yolu(P), Nükleotid Bağlama(F), DNA Bağlama(F), Hidrolaz Aktivitesi(F), Hücre Bileşeni(C),	Y
miR2867	HX913875.1	ATPaz, F1/V1/A1 compleks, alfa/beta altbirim, nukleotid-bağlama domaini	Taşınım(P), Hücresel İşlem(P), Nükleotid Bağlama(F), ATP Bağlama(F), Taşıma Aktivitesi(F), Hidrolaz Aktivitesi(F), Zar(C),	Y
miR2868	HX914417.1	Epidermis-spesifik salgı glikoprotein EP1	Hücre Çeperi(C).	Y

	HX906070.1	Bet v I domain / Temel lateks protein (MLP) domaini	Koruma Cevabı(P), Biyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P),	Y
miR2873a	HX914274.1	NAD-bağlı epimeraz/dehidrataz	Katalitik Aktivite(F), Bağlama(F), Koenzim Bağlama(F),	B
miR2873c	HX904212.1	Fotosistem II PsbQ, oksijen oluşturucu kompleks	Fotosentez(P), Bağlama(F), Kalsiyum Iyon Bağlama(F), Zarın Dış Bileşenleri(C), Tilakoid(C), Fotosistem II(C), Fotosistem II Oksijen Oluşturucu Kompleks(C),	Y
miR2938	HX903591.1 HX903022.1	Alfa-1,4-glukan-protein sentaz	Biyolojik İşlem(P), Çok Hücreli Organizma Gelişimi(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Stres Cevabı(P), Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Hücresel İşlem(P), Karbonhidrat metabolik yolu(P), Katalitik Aktivite(F), Transferaz Aktivitesi(F), Golgi Kompleksi(C), Hücre Dışı Bölge(C), Ribozom(C), Vakuol(C), Hücre Bileşeni(C), Hücre Çeperi(C), Zar(C), Sitozol(C),	Y
miR3434	HX905250.1*	Dihidroneopterin aldolaz/epimeraz domaini	Metobolik İşlem(P), Hücresel İşlem(P), Folik Asit Içeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Katalitik Aktivite(F), Dihidroneopterin Aldolaz Aktivitesi(F),	Y
miR3447	FL506413.1	AP2/ERF domain / DNA-bağlama domaini	Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Dizi Spesifik DNA Bağlama Transkripsiyon Faktör Aktivitesi(F), DNA Bağlama(F),	Y
miR3623	HX904371.1	Toll/interlökin-1 reseptör homolog (TIR) domain	Sinyal Aktarımı(P), Nükleotid Bağlama(F), Protein Bağlama(F),	Y
miR3631a *miR3631b*	HX902274.1 HX909203.1	GDSL esteraz/lipaz	Biyolojik İşlem(P), Stres Cevabı(P), Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Hücresel İşlem(P), Lipid Metabolik Yolu(P), Hidrolaz Aktivitesi(F), Hücre Dışı Bölge(C),	Y
miR3631c	HX911239.1	Mannozilglikoprotein endo-beta-mannozidaz	Karbonhidrat metabolik yolu(P), Hidrolaz Aktivitesi(F), Mannozilglikoprotein Endo-Beta-Mannozidaz Aktivitesi(F),	Y
miR3633	HX908333.1*	Sistationin gama-sentaz, kloroplastik benzeri	Metionin Biyosentetik İşlemi(P), selenyum bileşenli metabolik yol(P), Katalitik Aktivite(F), Bağlama(F), Sistatiyon Gama Sentaz Aktivitesi(F), Pidoksal Fosfat Bağlama(F),	Y
miR3979a	HX915120.1	Aldo/keto reduktaz / NADP-bağlı oksidoredüktaz domain	Oksidasyon-Redüksiyon İşlemi(P), Oksidoredüktaz Aktivite(F),	Y
miR3979b	HX915006.1	Nükleobaz-askorbat taşıyıcı 11/12	Taşınım(P), Hücresel İşlem(P), Taşıma Aktivitesi(F), Zar(C),	Y
miR4245	HX913628.1	Palmitoil protein tiyoesteraz	Katabolik İşlem(P), Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), Hidrolaz Aktivitesi(F), Palmitoil Hidrolaz Aktivitesi(F),	Y
	HX906308.1	Fosfolipit-taşıma ATPaz l	Katyon Taşınımı(P), Fosfolipid Translokasyonu(P), Fosfolipid Taşınımı(P), Metobolik İşlem(P), Fosfolipid Taranslokasyon ATPaz Aktivitesi(F), Hidrolaz Aktivitesi(F), Nükleotid Bağlama(F), ATP Bağlama(F), Katyon Taşıyıcı ATPaz Aktivitesi(F), Metal Iyonu Bağlama(F), Magnezyum Iyonu Bağlama(F), Zarın İç Bileşenleri(C), Zar(C),	Y
miR4993	HX907406.1	Homeodomain, ZF-HD sınıfı	DNA Bağlama(F),	Y
miR4995	HX902543.1	Metal taşıyıcı Nramp5	Metobolik İşlem(P), Taşınım(P), Taşıma Aktivitesi(F), Hidrolaz Aktivitesi(F), Mitokondri(C), Zar(C),	Y
miR5021a	HX900803.1	Ağır metal-birleşik domain, HMA	Taşınım(P), Metal Iyon Taşınımı(P), Bağlama(F), Metal Iyonu Bağlama(F),	B

miR5021b miR5021k	HX903641.1	Dehidrin	Stres Cevabı(P), Suya Verilen Cevap(P), Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P),	B
miR5021c miR5021i miR5021k	HX904365.1	Germin-benzeri protein / oksin-bağlama protein ABP19a	Bağlama(F), Moleküler Işlev(F), Manganez Iyon Bağlama(F),	Y
miR5021c miR5021d miR5021i miR5021k miR5021l	HX911325.1	Sintaksin, N-terminal domain	Taşınım(P), Zar(C),	Y
miR5021c miR5021d miR5021k	HX911546.1	C2 domain / şok protein SRC2	Protein Bağlama(F),	Y
miR5021d miR5021g miR5021k	HX910325.1	GDSL esteraz/lipaz	Biyolojik İşlem(P), Stres Cevabı(P), Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Hücresel İşlem(P), Lipid Metabolik Yolu(P), Hidrolaz Aktivitesi(F), Hücre Dışı Bölge(C),	Y
miR5021d miR5021k miR5021l	HX909606.1	Protein Dr1 benzeri	DNA Bağlama(F), Protein Bağlama(F), Hücre İçi(C),	Y
miR5021d miR5021i miR5021k	HX909966.1*	Transketolaz-benzeri, pirimidin-bağlama domaini		Y
miR5021d miR5021g miR5021k miR5021l	HX911227.1	Somatik embriyogenez reseptör kinaz 2-benzeri	Protein Bağlama(F),	Y
miR5021e miR5021i	HX904137.1	Membran-bağlı ubiqutin-katlama protein, HCG-1	Protein Bağlama(F),	Y
miR5021f	HS513985.1*	Glikozit hidrolaz, aile 9	Karbonhidrat metabolik yolu(P), Hidrolaz Aktivitesi(F), Hidrolaz Aktivitesi, Hidrolize O-glikozil bileşikleri(F),	Y
miR5021g	HX900867.1	SNF1-ilişkili protein kinaz düzenleyici altbirim beta-1	Biyolojik İşlem(P), Azot Düzeylerine Hücresel Cevap (P), Sakkaroza Verilen Cevap(P), Hücre Iletişimi(P), Hücre Dışı Uyaranlara Verilen Cevap(P),	Y
	HX905397.1	AP2/ERF domain / DNA-bağlama domaini	Transkripsiyon Düzenleme, DNA örneği(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Dizi Spesifik DNA Bağlama Transkripsiyon Faktör Aktivitesi(F), DNA Bağlama(F),	Y
miR5021h	HX911183.1 HX912032.1	Histon H2B	DNA Bağlama(F), Nükleozom(C), Nükleus(C),	Y
miR5021j	HX907488.1	Alfa/beta hidrolaz katlanma	Katalitik Aktivite(F),	B
miR5021l	HX910286.1*	Aspartik peptidaz	Proteoliz(P), Protein Metabolik İşlem(P), Hidrolaz Aktivitesi(F), Aspartik Tip Endopeptidaz Aktivitesi(F),	Y
miR5198	HX913124.1	Mpp10 protein	Ribozom Biyogenezi(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Hücresel Azotlu Bileşik Metabolik Yolu(P), Sitozol(C), Nükleolus(C), Hücre İçi(C),	Y
	HX902535.1	Transkripsiyonal faktör DELLA, N-terminal	Biyolojik İşlem(P), Sinyal Aktarımı(P), Hücresel Azotlu Bileşik Metabolik Yolu(P), Biyosentetik İşlem(P), Stres Cevabı(P),	Y
miR5204	HX904051.1	Rab-GTPaz-TBC domain	Küçük Molekül Metabolik Yolu(P), Sinyal Aktarımı(P), Nükleobaz İçeren Bileşikler Katabolik Yolu(P), Rab GTPaz Aktivitesinin Düzenlenmesi(P), Enzim Düzenleme Aktivitesi(F), Rab GTPaz Aktivatör Aktivesi(F),	Y
	HX907377.1	BURP domain / Dehidrasyon-cevap protein RD22-benzeri	Endozom(C), Golgi Kompleksi(C),	Y

miR5223	HX913780.1	40S ribozomal protein S17	Translasyon(P), Ribozom Yapısal Bileşeni(F), Sitozol(C), Nükleolus(C), Ribozom(C), Hücre Zarı(C),	Y
miR5248	HX907500.1	E3 ubikitin-protein ligaz	Biyolojik İşlem(P), Lipid Metabolik Yolu(P), Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), Katabolik İşlem(P), İyon Bağlama(F), Moleküler Işlev(F), Ligaz Aktivitesi(F),	Y
miR5253a	HS514048.1	Senesens-ilişkili protein SAG102	Absisik Aside Verilen Cevap(P), Tohum Dormansi İşlemi(P),	Y
miR5304	HX900966.1	D-izomer spesifik 2-hidroksiasit dehidrogenaz, Katalitik domain	Biyolojik İşlem(P), Metobolik İşlem(P), Oksidasyon-Redüksiyon İşlemi(P), Moleküler Işlev(F), NAD Bağlama(F), Oksidoredüktaz Aktivite(F), Oksidoredüktaz Aktivitesi, CH-OH gruplarında etkili, akseptör NAD ya da NADP(F),	Y
miR5533	HX910397.1	Translasyon uzama faktör EF1B, beta/delta zincirler, korunmuş domain	Translasyon(P), Translasyonel Uzama(P), Translasyonel Uzama Faktör Aktivitesi(F), Translasyon Faktör Aktivitesi, Nükleik Asit Bağlama(F), Protein Kompleksi(C), Sitoplazma(C), Ökaryotik Translasyon Uzatma Faktör 1 Kompleksi(C),	Y
miR5536	HX905047.1*	Flavonol 3-O-glukoziltransferaz	Biyolojik İşlem(P), Metobolik İşlem(P), Transferaz Aktivitesi, Heksozil gruplarının transferi(F),	Y
miR5630	HX909333.1	60S ribozomal protein L9-benzeri	Biyolojik İşlem(P), Translasyon(P), Ribozom Yapısal Bileşeni(F), rRNA Bağlama(F), Hücre Bileşeni(C), Sitozol(C), Ribozom(C), Nükleolus(C), Vakuol(C), Hücre Zarı(C).	Y
miR5638	HX911145.1	Tuz tolerans proteini benzeri	İyon Bağlama(F), Hücre İçi(C),	Y
miR5653	HX909872.1	Siklin C-terminal domain	Nükleus(C),	Y
	HX912289.1	Çinko parmak, HALKA-tip / HALKA-H2-tip	Bağlama(F), Protein Bağlama(F), Çinko Iyon Bağlama(F),	Y
miR5658a miR5658b miR5658c miR5658k miR5658m miR5658n miR5658o	HX911844.1	Peroksidaz	Oksidasyon-Redüksiyon İşlemi(P), Oksidatif Stres Cevabı(P), Metal Iyonu Bağlama(F), Heme Bağlama(F), Oksidoredüktaz Aktivite(F), Peroksidaz Aktivitesi(F), Hücre Dışı Bölge(C),	Y
miR5658a miR5658m	HX911145.1	Tuz tolerans proteini benzeri	İyon Bağlama(F), Hücre İçi(C),	Y
miR5658a miR5658b miR5658c miR5658k	HX901243.1	Nükleozom birleşme protein (NAP)	Nükleozom Birleşimi(P), Hücre Bileşenlerinin Organizasyonu(P), DNA Metabolik Yolu(P), Nükleus(C),	Y
miR5658b miR5658k miR5658m	HX911275.1	G-yama domain / Tuftelin etkileşme protein, N-terminal domain	Tuz Stresine Verilen Cevap(P), Nükleik Asit Bağlama(F),	Y
miR5658b miR5658k	HX909881.1	Nasent polipeptid-birleşik kompleks altbirim alfa-benzeri protein	Plazmodezma(C), Sitozol(C), Golgi Kompleksi(C),	B
miR5658c	HX912864	Kolin-fosfat sitidililtransferaz	Biyosentetik İşlem(P), CDP Kolin Yolu(P), Nükleotidiltransferaz Aktivitesi(F), Transferaz Aktivitesi(F), Katalitik Aktivite(F), Kolin-Fosfat Sitidilitrasferaz Aktivitesi(F),	Y

miR5658g miR5658j	HX913689.1	Nukleozom birleşme protein 1-benzeri protein	Somatik Hücre DNA Rekombinasyonu(P), DNA Aracılığıyla Gerçekleşen Dönüşüm(P), Nükleozom Birleşimi(P), Hücre Farklılaşması(P), DNA Tamiri(P), Kadmiyum Iyonuna Verilen Cevap(P), Hücre Proliferasyonu(P), Histon Bağlama(F), Kromatin Bağlama(F), Özdeş Protein Bağlama(F), Nükleus(C), Sitoplazma(C), Sitozol(C), Hücre Zarı(C),	Y
miR5658g miR5658k miR5658m miR5658o	HX901880.1	Çinko parmak (CCCH-tip) protein ailesi	Metal Iyonu Bağlama(F),	Y
miR5658i miR5658k miR5658o	HX900530.1	DNA-bağlama protein ESCAROLA-benzeri	DNA Bağlama(F), Mitokondri(C), Sitoplazma(C), Nükleolus(C), Nükleus(C),	Y
miR5658m	FL503443.1	Isı Şok Faktör-bağlama protein 1	Hücrenin Isıya Alışması(P), Sıcaklığa Verilen Cevap(P), Tohum Gelişimi(P), Isı Şoku ProteinİBağlama(F), Sitozol(C), Golgi Kompleksi(C), Nükleus(C),	Y
miR5664	HX913008.1*	Serin/treonin-spesifik protein fosfataz/bis(5-nükleozil)-tetrafosfataz	Metobolik İşlem(P), Hücresel İşlem(P), Hidrolaz Aktivitesi(F), Nükleus(C),	Y
miR5745	HX905793.1*	Fosfogliserat dehidrogenaz	Katabolik İşlem(P), Metobolik İşlem(P), Biyosentetik İşlem(P), Taşınım(P), Hücresel İşlem(P), Stres Cevabı(P), Biyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Hücre Ölümü(P), Dış Uyaranlara Verilen Cevap(P), Hücre Bileşenlerinin Organizasyonu(P), Bağlama(F), Nükleotid Bağlama(F), Protein Bağlama(F), Katalitik Aktivite(F), Plastid(C), Nükleus(C), Sitozol(C),	Y
miR5751b	HX900978.1* HX907089.1*	O-metiltransferaz COMT-tip	Metobolik İşlem(P), Protein Bağlama(F), Transferaz Aktivitesi(F), Metiltransferaz Aktivitesi(F),	Y
	HX911763.1*	NADPH-bağlı FMN redüktaz-benzeri	Metobolik İşlem(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Nükleotid Bağlama(F), Katalitik Aktivite(F), Oksidoredüktaz Aktivite(F),	Y
miR5998a	HX903789.1*	GDP-D-mannoz-3,5-epimeraz	Karbonhidrat metabolik yolu(P), Biyosentetik İşlem(P), Hücresel İşlem(P), Katalitik Aktivite(F), Bağlama(F), Sitozol(C),	Y
	HX900328.1	Homeobox domain	Sinyal Aktarımı(P), Çok Hücreli Organizma Gelişimi(P), Post-Embriyonik Gelişim(P), Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Stres Cevabı(P), Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Endojen Uyaranlara Verilen Cevap(P), Hücre Bileşenlerinin Organizasyonu(P), Hücre Büyümesi(P), DNA Bağlama(F), Dizi Spesifik DNA Bağlama Transkripsiyon Faktör Aktivitesi(F), Protein Bağlama(F), Nükleus(C),	Y
miR5998b	FL505272.1	Dehidrin	Stres Cevabı(P), Suya Verilen Cevap(P), Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P),	Y
miR6034a	HX907527.1*	LRR reseptör-benzeri kinaz	Metobolik İşlem(P), Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), Nükleotid Bağlama(F), Katalitik Aktivite(F), Kinaz Aktivitesi(F), Zar(C), Hücre Zarı(C),	Y

	HX910556.1*	Serin/treonin/çift spesifik protein kinaz, katalitik domain	Protein Fosforilasyonu(P), Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), Endojen Uyaranlara Verilen Cevap(P), Sinyal Aktarımı(P), ATP Bağlama(F), Nükleotid Bağlama(F), Protein Kinaz Aktivitesi(F), Kinaz Aktivitesi(F), Hücre Zarı(C),	Y
miR6034b	HX914725.1*	Serin/Treonin kinaz protein ailesi	Protein Fosforilasyonu(P), Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), Sinyal Aktarımı(P), Çok Hücreli Organizma Gelişimi(P), Hücre Farklılaşması(P), Anatomik Yapı Morfogenezi(P), Nükleotid Bağlama(F), Kinaz Aktivitesi(F), Sinyal Dönüştürme Aktivitesi(F),	Y
miR6034c	HX914714.1*	Protein kinaz domain / Serin/treonin/çift spesifik protein kinaz, katalitik domain	Biyolojik İşlem(P), Biyosentetik İşlem(P), Protein Fosforilasyonu(P), Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), Sinyal Aktarımı(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Stres Cevabı(P), Biyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Dış Uyaranlara Verilen Cevap(P), Endojen Uyaranlara Verilen Cevap(P), ATP Bağlama(F), Nükleotid Bağlama(F), Protein Kinaz Aktivitesi(F), Reseptör Aktivesi(F), Bağlama(F), Kinaz Aktivitesi(F), Sinyal Dönüştürme Aktivitesi(F), Katalitik Aktivite(F), Hücre Dışı Bölge(C), Hücre Bileşeni(C), Zar(C), Hücre Zarı(C),	Y
miR6167	HS513933.1 HX906856.1	Klorofil A-B bağlama protein, bitki	Fotosentez(P), Fotosentez, Işık Hasatı(P), Öncül Metabolit Üretimi ve Enerji(P), Zar(C),	B
miR6180a	HX906096.1	Proteosom, altbirim alfa/beta	Protein Metabolik İşlem(P), Katabolik İşlem(P), Hücresel İşlem(P), Proteolizi Kapsayan Hücresel Protein Katabolik Yolu(P), Hidrolaz Aktivitesi(F), Treonin Tip Endopeptidaz Aktivitesi(F), Hücre İçi(C), Proteozom Kompleksi(C),	Y
miR6180b	FL504783.1	Prolin-zengin hücre çeperi-benzeri protein		Y
miR6186	HX908065.1	Ribosomal protein L18/L5	Translasyon(P), Ribozom Yapısal Bileşeni(F), RNA Bağlama(F), Yapısal Molekül Aktivitesi(F), Hücre İçi(C), Ribozom(C),	Y
miR6188a *miR6188b*	HX915076.1 HX910129.1	Temel intrinsik protein / Aquaporin-benzeri	Taşınım(P), Taşıma Aktivitesi(F), Zar(C),	Y
miR6190	HX901618.1	Siklin-benzeri	Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), Protein Bağlama(F), Hücre Döngüsü(C),	B
miR6232	HX909646.1	Zf-FLZ domain		Y
miR6281a *miR6281b* *miR6281d* *miR6281f*	HX911553.1*	Protein kinaz domain / Serin-treonin/tirosin-protein kinaz katalitik domain	Protein Fosforilasyonu(P), ATP Bağlama(F), Protein Kinaz Aktivitesi(F),	Y
miR6281a *miR6281b* *miR6281d* *miR6281f*	HX912367.1	Düşük sıcaklık ve tuz cevap protein ailesi	Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Stres Cevabı(P), Zar(C),	Y
miR6281a *miR6281b* *miR6281d* *miR6281f*	HX911449.1*	Riboz-fosfat difosfokinaz	Nükleotid Biyosentetik İşlemi(P), Magnezyum Iyonu Bağlama(F), Riboz Fosfat Difosfokinaz Aktivitesi(F),	Y
miR6281a *miR6281b* *miR6281f*	HX911246.1	Ubiqitin-konjugasyon enzim benzeri	Biyolojik İşlem(P), Protein Metabolik İşlem(P), Katabolik İşlem(P), Çok Hücreli Organizma Gelişimi(P), Anatomik Yapı Morfogenezi(P), DNA Metabolik Yolu(P), Stres Cevabı(P), Hücresel İşlem(P), Hücre Farklılaşması(P), Protein Bağlama(F), Katalitik Aktivite(F), Transferaz Aktivitesi(F), Hücre Zarı(C), Plastid(C), Hücre İçi(C), Nükleus(C), Sitozol(C),	Y

miR6281a miR6281b miR6281c miR6281d miR6281e miR6281f	HX911325.1	Sintaksin, N-terminal domain	Taşınım(P), Zar(C),	Y
miR6281c miR6281d miR6281e	FL506172.1*	Protein-tirosin fosfataz-benzeri	Hidrolaz Aktivitesi(F),	Y
	HX910366.1	Protein TIFY 10A benzeri / Jasmonat zim-domain protein	Jasmonik Asit Aracılığıyla Gerçekleşen Sinyal Yolağı(P), Polen Gelişimi(P), Çiçek Gelişimi(P), Bakterilere Karşı Koruma Cevabı(P), Jasmonik Aside Verilen Cevap(P),	Y
	HX907735.1 HX907911.1	Kazein kinaz I-benzeri protein	Hücresel Protin Modifikasyon İşlemi(P), Nükleotid Bağlama(F), Kinaz Aktivitesi(F),	Y
miR6281g	HX907945.1	The FAS1 (fassislin-benzer) domain	Biyolojik İşlem(P), Hücre Dışı Bölge(C), Vakuol(C),	Y
miR6422a miR6422b	HX913717.1*	Fosfofruktokinaz domain	Glikolitik Yol(P), Katabolik İşlem(P), Karbonhidrat metabolik yolu(P), Öncül Metabolit Üretimi ve Enerji(P), 6-Fosfofruktokinaz Aktivitesi(F), Kinaz Aktivitesi(F),	Y
miR6476a miR6476d	HS513848.1*	Uzama faktörü 1-alfa	Biyolojik İşlem(P), Katabolik İşlem(P), Translasyon(P), Nükleotid Bağlama(F), Transferaz Aktivitesi(F), Hidrolaz Aktivitesi(F), Hücre Bileşeni(C), Mitokondri(C), Sitozol(C),	Y
miR6476c	HX909869.1*	Pektinesteraz inhibitor domaini	Enzim Inhibitör Aktivitesi(F), Enzim Düzenleme Aktivitesi(F), Pektinesteraz Aktivitesi (F), Hidrolaz Aktivitesi(F),	Y
miR6482	HX910792.1 HX914687.1	Temel intrinsik protein / Aquaporin-benzeri	Taşınım(P), Taşıma Aktivitesi(F), Zar(C),	Y
	HX914832.1	Olası aquaporin PIP-tip 7a / Turgor-cevap protein 7a	Abiyotik Uyaranlara Verilen Cevap(P), Taşınım(P), Stres Cevabı(P), Taşıma Aktivitesi(F), Zar(C), Hücre Zarı(C), Plastid(C),	Y
miR6485a miR6485b	HX901688.1	Ubiqitin-benzeri / Ribozomal protein L40e	Translasyon(P), Ribozom Yapısal Bileşeni(F), Yapısal Molekül Aktivitesi(F), Protein Bağlama(F), Ribozom(C),	Y
miR7484	HX909949.1*	Peptidaz S10, serin karboksipeptidaz	Proteoliz(P), Protein Metabolik İşlem(P), Serin Tip Karboksipeptidaz Aktivitesi(F), Hidrolaz Aktivitesi(F),	Y
miR7757	HX907428.1	Sitokinin ribozid 5'-monofosfat fosforibohidrolaz LOG	Sitozol(C),	Y
miR7777	HX900455.1	60S asidik ribozomal protein P0-benzeri	Biyolojik İşlem(P), Translasyon(P), Yapısal Molekül Aktivitesi(F), Sitozol(C), Ribozom(C),	Y
miR8709	HX914488.1*	Hem peroksidaz, bitki/fungus/bakteri*	Metobolik İşlem(P), Oksidasyon-Redüksiyon İşlemi(P), Stres Cevabı(P), Oksidatif Stres Cevabı(P), Katalitik Aktivite(F), Bağlama(F), Heme Bağlama(F), Peroksidaz Aktivitesi(F),	Y
miR8710	HX902601.1	GATA transkripsiyon faktörü 8-benzeri izoform X1	Biyosentetik İşlem(P), Nükleobaz İçeren Bileşiklerin Metabolik Yolu(P), Bağlama(F), DNA Bağlama(F), Dizi Spesifik DNA Bağlama Transkripsiyon Faktör Aktivitesi(F), Nükleus(C),	Y
miR8714	HX905311.1	Karboksil-terminal peptidaz		Y
miR9569	HX910670.1	Proteinaz inhibitor I3, Kunitz legüm	Endopeptidaz Inhibitör Aktivitesi(F), Enzim Düzenleme Aktivitesi(F),	Y
miR9722	HX907905.1 HX906490.1	Açil transferaz/açil hidrolaz/lisofosfolipaz	Metobolik İşlem(P),	Y
miR9764	HX903987.1	Çinko parmak, HALKA-tip	Bağlama(F), Protein Bağlama(F), Çinko Iyon Bağlama(F),	Y

Çizelge B.2 Enzim olduğu belirlenen EST dizilerinin enzim kodları ve rol oynadıkları metabolik yolaklar

Bakla miRNA'ları	*EST Aksesyon No*	*Enzim Kodları ve isimleri*	*KEGG yolakları*
miR408b	HX910705.1	EC:2.7.1.19 Fosforibulokinaz	Fotosentetik canlılardaki karbon fiksasyonu, Metabolik yolaklar, Farklı çevrelerdeki mikrobial metabolizma
	HX908785.1	EC 3.6.1.15 Nükleosit trifosfat fosfotaz	Pürin metabolizması, Tiyamin metabolizması, Metabolik yolaklar
miR414e	HX912420.1	EC 1.11.1.7 Peroksidaz	Fenilalanin metabolizması, Fenilpropanoit biyosentezi, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi
miR778	HX900485.1	EC 3.2.1 Glikozidazlar	
miR838b	HS513993.1	EC 1.10.99.3 Violaksantin de-epoksidaz	Karotenoyid biyosentezi, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi
miR867	HX913822.1	EC 1.1.3.9 Galaktoz oksidaz	Galaktoz metabolizması
miR1052	HX907385.1	EC 3.6.1.15 Nükleosit trifosfat fosfotaz	Pürin metabolizmas, Tiyamin metabolizması, Metabolik yolaklar
miR1439	HX910421.1	EC 1.14.11.19 Lösosiyanidin oksijenaz	Flavonoid biyosentezi, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi
miR2108b	HX910990.1	EC 4.1.2.13 Fruktoz-bifosfat aldolaz	Glikoliz / Glukoneogenesiz, Pentoz fosfat yolağı, Fruktoz ve mannoz metabolizması, Metan metabolizması, Fotosentetik canlılardaki karbon fiksasyonu, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi, Farklı çevrelerdeki mikrobial metabolizma
	HX906512.1	EC 3.6.1.15Nükleosit trifosfat fosfotaz	Pürin metabolizması, Tiyamin metabolizması, Metabolik yolaklar
miR2658	HX904157.1	EC 4.1.1.50 Adenozilmetionin dekarboksilaz	Sistein ve metiyonin metabolizması, Arjinin ve prolin metabolizması, Metabolik yolaklar
miR2678b	HX909457.1	EC 3.6.1.15 Nükleosit trifosfat fosfotaz	Pürin metabolizması, Tiyamin metabolizması, Metabolik yolaklar
miR3434	HX905250.1	EC 4.1.2.25 Dihidroneopterin aldolaz	Folat (folik asit) biyosentezi, Metabolik yolaklar
miR3633	HX908333.1	EC 2.5.1.48 Sistationin gama-sentaz	Sistein ve metiyonin metabolizması, Seleno-bileşen metabolizması, Sülfür metabolizması, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi
miR5021d miR5021i miR5021k	HX909966.1	EC 2.2.1.1 Transketolaz	Pentoz fosfat yolağı, Fotosentetik canlılardaki karbon fiksasyonu, Ansamisinlerin biyosentezi, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi, Farklı çevrelerdeki mikrobial metabolizma
miR5021f	HS513985.1	EC 3.2.1 Glikozidazlar	
miR5021l	HX910286.1	EC 3.4.23 - Aspartik endopeptidazlar	
miR5536	HX905047.1	EC 2.4.1.91 Flavonol 3-O-glukoziltransferaz	Flavon ve flavonol biyosentezi, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi
miR5664	HX913008.1	EC 3.1.3.16 Protein-serin/treonin fosfotaz	
miR5745	HX905793.1	EC 1.1.1.95 Fosfogliserat dehidrogenaz	Glisin, serin ve treonin metabolizması, Metan metabolizması, Metabolik yolaklar, Farklı çevrelerdeki mikrobial metabolizma
miR5751b	HX900978.1 HX907089.1	EC 2.1.1 - Metiltransferazlar	
	HX911763.1	EC 1.6.5.5 - NADPH:kinon redüktaz	

miR5998a	HX903789.1	EC 5.1.3.18 - GDP-D-mannoz-3,5-epimeraz	
miR6034a	HX907527.1	EC 2.7.11.26 - tau-protein kinaz EC 1.3.1.74 - 2-alkenal redüktaz [NAD(P)+]	
	HX910556.1	EC 2.7.11 - Protein-serin/treonin kinazlar	
miR6034b	HX914725.1	EC 2.7.11 - Protein-serin/treonin kinazlarEC 2.7.11.25 - Mitojenle etkinleşen protein kinaz	
miR6034c	HX914714.1	EC 2.7.11 - Protein-serin/treonin kinazlar EC 4.6.1.2 - Guanilat siklaz	EC 4.6.1.2 : Pürin metabolizması
miR6180a	HX906096.1	EC 3.4.25 - Treonin endopeptidazlar	
miR6281a *miR6281b* *miR6281d* *miR6281f*	HX911553.1	EC 2.7.10 - Protein-tirosin kinazlar	
miR6281a *miR6281b* *miR6281d* *miR6281f*	HX911449.1	EC 2.7.6.1 Riboz-fosfat difosfokinaz	Pentoz fosfat yolağı, Pürin metabolizması, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi, Farklı çevrelerdeki mikrobial metabolizma, Antibiyotik biyosentezleri
miR6281c *miR6281d* *miR6281e*	FL506172.1	EC 3.1.3.16 Protein-serin/treonin fosfotaz EC 3.1.3.41 4-Nitrofenilfosfotaz EC 3.1.3.48 Protein-tirozin fosfotaz	EC 3.1.3.41 : Aminobenzoat bozulması, Farklı çevrelerdeki mikrobial metabolizma
miR6422a *miR6422b*	HX913717.1	EC 2.7.1.11 6-fosfofruktokinaz	Glikoliz / Glukoneogenesiz, Pentoz fosfat yolağı, Fruktoz ve mannoz metabolizması, Galaktoz metabolizması, Metan metabolizması, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi, Farklı çevrelerdeki mikrobial metabolizma, Antibiyotik biyosentezleri
miR6476a *miR6476d*	HS513848.1	EC 2.7.7.4 Sülfat adenil transferaz EC 3.6.1.15Nükleosit trifosfat fosfotaz	EC 2.7.7.4 : Pürin metabolizması, Seleno-bileşen metabolizması, Sülfür metabolizması, Metabolik yolaklar, Farklı çevrelerdeki mikrobial metabolizma EC 3.6.1.15 : Pürin metabolizması, Tiyamin metabolizması, Metabolik yolaklar
miR6476c	HX909869.1	EC 3.1.1.11 Pektin esteraz	Pentoz ve glukronat araçevrimleri, Nişasta ve sakkaroz metabolizması, Metabolik yolaklar
miR7484	HX909949.1	EC 3.4.16.5 Karboksipeptidaz C EC 3.4.16.6 Karboksipeptidaz D	
miR8709	HX914488.1	EC 1.11.1.7 Peroksidaz	Fenilalanin metabolizması, Fenilpropanoit biyosentezi, Metabolik yolaklar, Sekonder metabolitlerin biyosentezi

Ek Açıklamalar C

Hizalama sonucu eşleşme yakalanan diziler (Bkz. Bölüm 2.2, 3.2 ve Bkz. Şekil 1.11) BLASTX kullanılarak protein veribankası verileriyle tekrar hizalandı. BLASTX analizi sonucunda daha önceden tanımlanan protein dizileriyle benzerlik gösteren miRNA dizileri, daha önceki çalışmaların aksine çalışmadan çıkarılmamış, olası ekzonik miRNA'lar olarak çalışmaya dahil edilmiştir (Bkz. Bölüm 4).

Çizelge C.1 BLASTX analizine göre protein kodlayan diziler üzerinde konumlanan olası bakla miRNA'ları.

Bakla miRNA'ları	Protein	Genbank Aksesyon No
miR414e	*V.faba* Floem spesifik protein mRNA'sı	X89207.1
miR530a	*V. faba* P-tipi H+-ATPaz için VHA2 mRNA'sı	AB022442.1
miR530c	N-terminal tamamlanmamış legümin A1 pre-pro-polipeptid	X55013.1
miR775	*V. faba* Ferrodoksin NADP+ redüktaz öncülü (fnr)	U14956.1
miR834	*V.faba* Guanin nükleotidini düzenleyen protein	Z24678.1
miR854c	*V.faba* Sükroz taşıyıcı mRNA'sı	Z93774.1
miR867	*V.faba* HMG-box içeren transkripsiyon faktörü mRNA'sı	X97906.1
miR1533a	*V. faba* aktin mRNA'sı	JX444700.1
	V. faba Tip 2 metallotiyonin için MET mRNA'sı,	AB176563.1
	V. faba MTI (metallotiyonin) mRNA'sı	X77254.1
	V. faba Olası etilen cevap faktör 2 (ERF2) mRNA'sı	EU543660.1
miR1857a miR1857b	*V. faba* klon pVLHI-R P-tipi H+-ATPaz mRNA'sı	AY338226.1
miR2102b	*V. faba* amino asit taşıyıcı c (AAPC) mRNA'sı	AF061436.1
miR2596	*V. faba* peptid taşıyıcı 2 (PTR2) mRNA'sı	AY289623.1
miR2673	*V. faba* dinein ışık zinciri için vfPIP mRNA'sı	AB215106.1
miR2678b	*V. faba* legümin depo proteini için VfLEB2 geni	X14237.1
miR4993	*V. faba* dinein ışık zinciri için vfPIP mRNA'sı	AB215106.1
	V. faba olası ABA-uyarımlı bekçi hücre protein (abg1) mRNA'sı	AF218806.1
	V.faba Floem spesifik protein mRNA'sı	X89207.1
miR5565a miR5565b	*V.faba* Poliubiquitin mRNA'sı	AJ012552.1
miR5658a miR5658b miR5658k	*V.faba* Floem spesifik protein mRNA'sı	X89207.1
	V. faba kültür bitkisi Mammoth Sat5 geni	AY370648.1

miR5658c miR5658l miR5658m miR5658o miR5658q	*V. faba* kültür bitkisi Mammoth Sat5 geni	AY370648.1
miR5658e	*V. faba* erken nodülün için ENOD5 geni	AJ250497.1 AJ250498.1
	V. faba olası oksidatif patlama oksidaz-benzeri protein C mRNA'sı	JF784280.1
	V.faba sakkaroz taşınım mRNA'sı	Z93774.1
	V.faba sakkaroz fosfat sentaz mRNA'sı	Z56278.1
	V. faba olası sakkaroz bağlama proteini için sbpl geni	AJ292221.1
miR5658f	*V. faba* kültür bitkisi Mammoth Sat5 geni	AY370648.1
	V. faba SNF1-ilişkili protein kinaz (snrk1 geni) mRNA'sı	AJ971809.1
	V. faba CREB-benzeri protein mRNA'sı	M81827.1
	V. faba olası ACC sentaz (ACS2) mRNA'sı	EU543656.1
	V. faba klon pVLH2-R P-tip H+-ATPaz mRNA'sı	AY338227.1
	V faba L. P-tip H+-ATPaz mRNA'sı (ha5 geni)	AJ310524.1
	V. faba Fosfoenolpürivat-karboksilaz mRNA'sı, pepc2 izoformu	AJ011303.1
miR5658i	*V.faba* Floem spesifik protein mRNA'sı	X89207.1
miR5658j	*V. faba* Protein fosfotaz 1 düzenleyici altbirim inhibitör-3 mRNA'sı	AB372570.1
	V. faba kültür bitkisi uzun legümen aktin mRNA'sı	AY338230.1
	V. faba kültür bitkisi Mammoth Sat5 geni	AY370648.1
miR5658p	*V. faba* sakkaroz bağlama proteinin geni olduğu kabul edilen sbpl geni	AJ292221.1
	V. faba HMG box mRNA'sı	Z21703.1
	V.faba VfENOD- GRP5 mRNA'sı (glisin-zengin protein)	Z81321.1
miR6482	*V. faba* aquaporin mRNA	AY667436.1
	V. faba plazma membran intrinsik protein 2;1 mRNA'sı, PIP2;1 geni	LK020673.1

KAYNAKLAR DİZİNİ

Allen, E. et al., 2004. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics,* 36(12), pp. 1282-1290.

Almeida, M. I., Reis, R. M. and Calin, G. A., 2011. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research,* 717(1-2), pp. 1-8.

Ambros, V. et al., 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA,* 9(3), pp. 277-279.

Arteaga-Vázquez, M., Caballero-Pérez, J. and Vielle-Calzada, J. P., 2006. A family of microRNAs present in plants and animals. *The Plant Cell,* 18(12), pp. 3355-3369.

Axtell, M. J., 2008. Evolution of microRNAs and their targets: are all microRNAs biologically relevant?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms,* 1779(11), pp. 725-734.

Axtell, M. J., 2013. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Review of Plant Biology,* Volume 64, pp. 137-159.

Axtell, M. J. and Bartel, D. P., 2005. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *The Plant Cell,* Volume 17, pp. 1658-1673.

Axtell, M. J. and Bowman, J. L., 2008. Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends in Plant Science,* 13(7), pp. 343-349.

Axtell, M. J., Synder, J. A. and Bartel, D., 2007. Common functions for diverse small RNAs of land plants. *The Plant Cell,* 19(6), pp. 1750-1769.

Axtell, M. J., Westholm, J. O. and Lai, E. C., 2011. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology,* 12(4), p. 221.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Barrera-Figueroa, B. E., Wu, Z. and Liu, R., 2012. Abiotic stress-associated microRNAs in plants: discovery, expression analysis, and evolution. *Frontiers in Biology,* 8(2), pp. 189-197.

Bartel, D. P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell,* Volume 136, pp. 215-233.

Bian, H. et al., 2012. Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/TIR1 homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist,* 196(1), pp. 149-161.

Boguski, M. S., Lowe, T. M. and Tolstoshev , C. M., 1993. dbEST--database for "expressed sequence tags". *Nature Genetics,* 4(4), pp. 332-333.

Bologna, N. G., Mateos, J. L., Bresso, E. G. and Palatnik, J. F., 2009. A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *The EMBO Journal,* Volume 28, pp. 3646-3656.

Bologna, N. G., Schapire, A. L. and Palatnik, J. F., 2013. Processing of plant microRNA precursors. *Briefings in Functional Genomics,* 12(1), pp. 37-45.

Bonnet, E., Wuyts, J., Rouze´, P. and de Peer, Y. V., 2004. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *PNAS,* 101(31), pp. 11511-11516.

Borchert, G. M. et al., 2011. Comprehensive analysis of microRNA genomic loci identifies pervasive repetitive-element origins. *Mobile Genetic Elements,* 1(1), pp. 8-17.

Brenchley, R. et al., 2012. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature,* 491(7426), p. 705–710.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Brown, J. W., Marshall, D. F. and Echeverria, M., 2008. Intronic noncoding RNAs and splicing. *Trends in Plant Science,* 13(7), pp. 335-342.

Buxdorf, K. et al., 2010. Identification and characterization of a novel miR159 target not related to MYB in tomato. *Planta,* Volume 232, pp. 1009-1022.

Carrington, J. C. and Ambros, V., 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science,* Cilt 301, pp. 336-338.

Carthew, R. W. and Sontheimer, E. J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell,* 136(4), pp. 642-655.

Chen, K. and Rajewsky, N., 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics,* Volume 8, pp. 93-103.

Chen, X., 2004. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science,* 303(5666), pp. 2022-2025.

Chen, Z. H. et al., 2011. Regulation of auxin response by miR393- targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in *Arabidopsis. Plant Molecular Biology,* 77(6), pp. 619-629.

Cock, P. J. A. et al., 2009. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics,* 25(11), pp. 1422-1423.

Conesa, A. and Götz, S., 2008. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. *International Journal of Plant Genomics,* Volume 2008, pp. 1-13.

Crick, F. H. C., 1968. The origin of the genetic code. *Journal of Molecular Biology,* 38(3), pp. 367-379.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cubero, J. I., 1974. On the evolution of Vicia faba L.. *Theoretical and Applied Genetics,* 45(2), pp. 47-51.

Cuperus, J. T., Fahlgren, N. and Carrington, J. C., 2011. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell,* 23(2), pp. 431-442.

Dai, X. and Zhao, P., 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research,* Volume 39, pp. 155-159.

Daxinger, L. et al., 2009. A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. *EMBOpress,* 28(1), pp. 48-57.

Debernardi, J. M., Rodriguez, R. E., Mecchia, M. A. and Palatnik, J. F., 2012. Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA-target interactions. *PLoS Genetics,* Volume 8, p. e1002419.

Ding, D. et al., 2009. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany,* 103(1), pp. 29-38.

Dong, Z., Han, M. H. and Fedoroff, N., 2008. The RNA-binding pro- teins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *PNAS USA,* Volume 105, pp. 9970-9975.

Drinnenberg, I. A. et al., 2009. RNAi in budding yeast. *Science,* 326(5952), pp. 544-550.

Duc, G., 1997. Faba bean (*Vicia faba L.*). *Field Crops Research,* Volume 53, pp. 99-109.

Elbashir, S. M. et al., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature,* 411(6836), pp. 494-498.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Eminaga, S. et al., 2013. UNIT 4.17 Quantification of microRNA Expression with Next-Generation Sequencing. *Current Protocols in Molecular Biology,* 103(4), pp. 1-14.

Fahlgren, N. et al., 2007. High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE,* 2(2), p. e219.

Fahlgren, N. et al., 2010. MicroRNA gene evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell,* 22(4), pp. 1074-1089.

Fang, Y. and Spector, D. L., 2007. Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Current Biology,* Volume 17, pp. 818-823.

FAOSTAT, 2015. *Food And Agriculture Organizatıon of The United Nations.* [Online] Available at: http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E [Accessed 01 04 2015].

Felippes De, F. F. et al., 2008. Evolution of *Arabidopsis thaliana* microRNAs from random sequences. *RNA (New York, N.Y.),* 14(12), pp. 2455-2459.

Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature,* Volume 391, pp. 806-811.

Floyd, S. K. and Bowman, J. L., 2004. Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants. *Nature,* Volume 428, pp. 485-486.

Griffiths-Jones, S., 2004. The microRNA Registry. *Nucleic acids research,* Volume 32, pp. 109-111.

Griffiths-Jones, S., Hui, J. H. L., Marco, A. and Ronshaugen, M., 2011. MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO reports,* 12(2), pp. 172-177.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Guo, S. and Kemphues, K. J., 1995. par-1, A gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/ Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell,* 81(4), pp. 611-620.

Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science,* Volume 286, pp. 950-952.

Hanafy, M. S. et al., 2013. Enhanced tolerance to drought and salt stresses in transgenic faba bean (*Vicia faba L.*) plants by heterologous expression of the PR10a gene from potato. *Plant Cell Reports,* 32(5), pp. 663-674.

Heisel, S. E. et al., 2008. Characterization of unique small RNA populations from rice grain. *PLoS ONE,* Volume 3, p. e2871.

Hofacker, I. L. et al., 1994. Fast folding and comparison of RNA secondary structures (The Vienna RNA Package). *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly,* 125(2), pp. 167-188.

Huang, Y. et al., 2010. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics (Oxford, England),* 26(5), pp. 680-682.

Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K. and Preiss, T., 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *PNAS,* 102(47), p. 16961–16966.

Incarbone, M. and Dunoyer, P., 2013. RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends in plant science,* 18(7), pp. 382-392.

International Rice Genome Sequencing Project, 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature,* Volume 436, pp. 793-800.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Jin, D., Wang, Y., Zhao, Y. and Chen, M., 2013. MicroRNAs and their cross-talks in plant development. *Journal of Genetics and Genomics,* 40(4), pp. 161-170.

Jones-Rhoades, M. W., 2012. Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Molecular Biology,* 80(1), p. 16.

Jones-Rhoades, M. W. and Bartel, D. P., 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell,* 14(6), pp. 787-799.

Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. and Bartel, B., 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual review of plant biology,* Volume 57, pp. 19-53.

Khraiwesh, B., Zhu, J. and Zhu, J., 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms,* 1819(2), pp. 137-148.

Kim, J. et al., 2005. MicroRNA - directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *The Plant Journal,* 42(1), pp. 84-94.

Kim, S. et al., 2008. Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary microRNAs. *Plant Cell Physiology,* 49(11), pp. 1634-1644.

Klevebring, D. et al., 2009. Genome-wide profiling of Populus small RNAs. *BMC Genomics,* Volume 10, p. 620.

Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S., 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research,* 42(Database issue), pp. 68-73.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kurihara, Y. and Watanabe, Y., 2004. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *PNAS USA,* 101(34), pp. 12753-12758.

Kurihara, Y., Takashi, Y. and Watanabe, Y., 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA,* Volume 12, pp. 206-212.

Laubinger, S. et al., 2008. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS USA,* Volume 105, pp. 8795-8800.

Lee, R., RL, F. and V, A., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell,* Issue 75, pp. 843-854.

Lewis, B. P., Burge, C. B. and Bartel, D. P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell,* Volume 120, pp. 15-20.

Li, A. and Mao, L., 2007. Evolution of plant microRNA gene families. *Cell Research,* Volume 17, pp. 212-218.

Li, T., Li, H., Zhang, Y. X. and Liu, J. Y., 2011. Identification and analysis of seven H2O2-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa L. ssp. indica*). *Nucleic Acids Research,* Volume 39, pp. 2821-2833.

Liu, D., Song, Y., Chen, Z. and Yu, D., 2009. Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum,* 136(2), pp. 223-236.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Liu, P. P. et al., 2007. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal,* 52(1), pp. 133-146.

Liu, Q. and Zhang, H., 2012. Molecular identification and analysis of arsenite stress-responsive miRNAs in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* Volume 60, pp. 6524-6536.

Li, W. et al., 2012. Transcriptional regulation of *Arabidopsis* MIR168a and argonaute1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiology,* 158(3), pp. 1279-1292.

Lu, C., Meyers, B. C. and Green, P. J., 2007. Construction of small RNA cDNA. *Methods,* 43(2), pp. 110-117.

Luo, Y., Guo, Z. and Li, L., 2013. Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. *Developmental Biology,* Volume 380, pp. 133-144.

Maizel, A. and Jouannet, V., 2012. Trans-acting small interfering RNAs: biogenesis, mode of action, and role in plant development. %1 içindeR. Sunkar, dü. *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses.* basım yeri bilinmiyor:Springer-Verlag Berlin Heidelberg , pp. 83-108.

Mapleson, D. et al., 2014. Processing Large-scale Small RNA Datasets in silico. In: J. Xu, ed. *Next-generation Sequencing: Current Technologies and Applications.* s.l.:Caister Academic Press, pp. 41-65.

Ma, Z., Coruh, C. and Axtell, M. J., 2010. *Arabidopsis lyrata* small RNAs: transient MIRNA and small interfering RNA loci within the *Arabidopsis* genus. *The Plant Cell,* 22(4), pp. 1090-1103.

Meyers, B. C. et al., 2008. Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *The Plant Cell,* 20(12), p. 3186–3190.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Millar, A. A. and Waterhouse, P. M., 2005. Plant and animal microRNAs: Similarities and differences. *Functional and Integrative Genomics,* 5(3), pp. 129-135.

miRBase, 2014. *miRBase.* [Online] Available at: http://www.mirbase.org/ [Accessed 15 09 2014].

Molnar, A. et al., 2007. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature,* Volume 447, pp. 1126-1129.

Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R., 1990. lntroduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell,* Volume 2, pp. 279-289.

NCBI, 2014. *National Center for Biotechnology Information.* [Online] Available at:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ [Accessed 15 09 2014].

NCBI-Pubmed, 2014. *National Center for Biotechnology Information-Pubmed.* [Online] Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ [Accessed 07 01 2015].

Nozawa, M., Miura, S. and Nei, M., 2010. Origins and evolution of microRNA genes in *Drosophila*. *Genome Biology and Evolution,* Volume 2, pp. 180-189.

Nozawa, M., Miura, S. and Nei, M., 2012. Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biology and Evolution,* 4(3), pp. 230-239.

Panda, D. et al., 2014. Computational identification and characterization of conserved miRNAs and their target genes in garlic (*Allium sativum L.*) expressed sequence tags. *Gene,* 537(2), pp. 333-342.

Pantaleo, V. et al., 2010. Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *The Plant Journal,* Volume 62, pp. 960-976.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Pan, X., Zhang, B., San Francisco, M. and Cobb, G. P., 2007. Characterizing viral microRNAs and its application on identifying new microRNAs in viruses. *Journal of Cellular Physiology,* 211(1), pp. 10-18.

Parent, J. S., Martínez de Alba, A. E. and Vaucheret, H., 2012. The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Frontiers in plant science,* 3(August), p. 179.

Park, M. Y. et al., 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *PNAS USA,* Volume 102, pp. 3691-3696.

Park, W. et al., 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology,* 12(17), pp. 1484-1495.

Pasquinelli, A. E. et al., 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature,* Issue 408, pp. 86-89.

Piriyapongsa, J. and Jordan, I. K., 2008. Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements. *RNA,* Volume 14, pp. 814-821.

Prüfer, K. et al., 2008. PatMaN: rapid alignment of short sequences to large databases. *Bioinformatics,* 24(13), pp. 1530-1531.

Putney, S. D., Herlihy, W. C. and Schimmel, P., 1983. A new troponin T and cDNA clones for 13 different muscle proteins, found by shotgun sequencing. *Nature,* Volume 302, pp. 718-721.

Qiu, D. et al., 2009. High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*). *Gene,* Volume 436, pp. 37-44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. and Bartel, D. P., 2006. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development,* 20(24), pp. 3407-3425.

Rajewsky, N., 2006. microRNA target predictions in animals. *Nature Genetics,* Volume 38, pp. 8-13.

Reinhart, B. J. et al., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature,* Issue 403, pp. 901-906.

Reinhart, B. J. et al., 2002. microRNAs in plants. *Genes Development,* Volume 16, pp. 1616-1626.

Rhoades, M. W. et al., 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell,* 110(4), pp. 513-520.

Romano , N. and Macino, G., 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology,* 6(22), p. 3343–3353.

Schauer, S. E., Jacobsen, S. E., Meinke, D. and Wand Ray, A., 2002. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends in Plant Sciences,* Volume 7, pp. 487-491.

Schmutz, J. et al., 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature,* Volume 463, pp. 178-183.

Schnabl, P. S. et al., 2009. The B73 Maize Genome: Complexity,. *Science,* Volume 326, pp. 1112-1115.

Shabalina, S. A. and Koonin, E. V., 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology and Evolution,* 23(10), pp. 578-587.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Song, C. et al., 2009. Identification and characterization of 27 conserved microRNAs in citrus. *Planta,* 230(4), pp. 671-685.

Stocks, M. B. et al., 2012. The UEA sRNA workbench: a suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. *Bioinformatics (Oxford, England),* 28(15), pp. 2059-2061.

Sunkar, R. and Jagadeeswaran, G., 2008. In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biology,* 8(37).

Sunkar, R. et al., 2008. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC Plant Biology,* Volume 8, p. 25.

Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N. and Smuc, T., 2011. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS One,* 6(7), p. e21800.

Szittya, G. et al., 2008. High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC Genomics,* Volume 9, p. 593.

Talmor-Neiman, M. et al., 2006. Novel micro-RNAs and intermediates of microRNA biogenesis from moss. *The Plant Journal,* Volume 47, pp. 25-37.

The Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature,* Volume 408, pp. 796-815.

The Gene Ontology Consortium, 2008. The Gene Ontology Project in 2008. *Nucleic Acids Research,* 36(1), pp. 440-444.

The Tomato Genome Consortium, 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature,* 485(7400), pp. 635-641.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Todesco, M. et al., 2012. Natural variation in biogenesis efficiency of individual Arabidopsis thaliana microRNAs. *Current Biology,* 22(2), pp. 166-170.

TÜİK, 2015. *Türkiye İstatistik Kurumu.* [Online] Available at: http://www.tuik.gov.tr/ [Accessed 01 04 2015].

Umbach, J. L. et al., 2008. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature,* Volume 454, pp. 780-783.

Van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J. N. M. and Kooter, J. M., 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in Petunia hybrida results from an increase in RNA turnover. *The Plant Journal,* 6(6), pp. 861-877.

Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. and Bartel, D. P., 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes and Development,* Volume 18, pp. 1187-1197.

Verdel, A. et al., 2004. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science,* 303(5658), pp. 672-676.

Voinnet, O., 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell,* 136(4), pp. 669-687.

Wang, J. W. et al., 2005. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell,* 17(8), pp. 2204-2221.

Wang, J. W. et al., 2005. Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell,* Volume 17, pp. 2204-2216.

Waterhouse,, P. M., Graham, M. W. and Wang, M. B., 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense. *PNAS,* Volume 95, p. 13959–13964.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Weber, M. J., 2005. New human and mouse microRNA genes found by homology search. *FEBS Journal,* 272(1), pp. 59-73.

Wightman, B., Ha, I. and Ruykun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Issue 75, pp. 855-862.

Willmann, M. R. and Poethig, R. S., 2007. Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. *Current Opinion in Plant Biology,* 10(5), pp. 503-511.

Xie, F. L. et al., 2007. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *FEBS Letters,* 581(7), pp. 1464-1474.

Xie, Z. et al., 2005. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiology,* 138(4), pp. 2145-2154.

Yang, G. D. et al., 2012. Genomewide analysis of intronic microRNAs in rice and *Arabidopsis*. *Journal of Genetics,* 91(3), pp. 313-324.

Yang, L. et al., 2006. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal,* Volume 47, pp. 841-850.

Yu, B. et al., 2008. The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *PNAS USA,* Volume 105, pp. 10073-10078.

Yu, B. et al., 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science,* Volume 307, pp. 932-935.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP–dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell,* Volume 101, pp. 25-33.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhang, B. H. et al., 2005. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell research,* 15(5), pp. 336-360.

Zhang, B. et al., 2006. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *The Plant Journal,* 46(2), pp. 243-259.

Zhang, B., Pan, X. and Cox, S., 2006. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences,* 63(2006), pp. 246-254.

Zhang, L. et al., 2009. A genome-wide characterization of microRNA genes in maize. *PLoS Genetics,* 5(11), p. e1000716.

Zhang, L. et al., 2012. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research,* Volume 22, pp. 107-126.

Zhao, T. et al., 2007. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii. *Genes Development,* 21(10), pp. 1190-1203.

Zhi-Liang, H., Bao, J. and Reecy, J. M., 2008. CateGOrizer: A Web-Based Program to Batch Analyze Gene Ontology Classification Categories. *Online Journal of Bioinformatics,* 9(2), pp. 108-112.

Zhu, Q. H. et al., 2008. A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. *Genome Research,* Volume 18, pp. 1456-1465.

ÖZGEÇMİŞ

DİLEK KOPTEKİN

E- Posta : dilekkoptekin@gmail.com
Doğum Tarihi : 20 / 07 / 1987

Eğitim Bilgileri

2013 - 2015: Ege Üniversitesi / İzmir
Yüksek Lisans (M.Sc.)
Biyoloji / Botanik (İngilizce)

2005 - 2011: Hacettepe Üniversitesi / Ankara
Yüksek Lisans (M.Ed.)
Biyoloji Eğitimi (Almanca)

2001 – 2004: Bahçelievler Bağlar Lisesi / İstanbul
Fen Bölümü (Türkçe)

Staj

East Anglia Üniversitesi / Norwich, İngiltere
Biyolojik Bilimler Okulu / Biyoinformatik, Danışman: Prof. Dr. Tamas Dalmay
Haziran 2014 – Eylül 2014 (3 ay)

Yabancı Diller

İngilizce, Almanca

Yayınlar

Koptekin, D. and Aktaş, L.Y., 2013. *Bitki miRNA'ları: Biyogenezi, Köken ve Evrimi*, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(2):140-148

Bildiriler

Koptekin, D., 2013, *Origin and Evolution Plant microRNAs*, Poster, Matematiksel Evrim Çalıştayı, İzmir, *9 – 15.09.2013*

Koptekin, D. and Selçuk, A.Y., 2010, *Kartopu Dünya*, İTÜ IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, İstanbul, *27 – 31.08.2010*

Mesleki Eğitim ve Aktiviteler

mikroRNA Kanser Biyomarkırları ve Yeni Nesil Dizimleme Teknolojileri Çalıştayı, *Gediz Üniversitesi / 4-5 Kasım 2014*

Matematiksel Evrim Çalıştayı
Nesin Matematik Köyü / 9 – 15.09.2013

Eğitimcinin Eğitimi Sertifika Programı
İlk Odak Akademi Eğitim Danışmanlığı / Eylül – Aralık 2012

TÜBİTAK Kemaliye (Erzincan) ve Çevresi Ekoloji Temelli Doğa Eğitimi
TÜBİTAK and Hacettepe Üniversitesi / 16 – 25.07.2010

İTÜ III. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi Kordon Kanından Kök Hücre İzolasyonu Çalıştayı, *İstanbul Teknik Üniversitesi / 17 – 20.08.2009*

I.Ulusal Ekoloji ve Çevre Öğrenci Kongresi Düzenleme Komitesi Üyesi
Hacettepe Üniversitesi / 27 – 31.07.2009

Sertifika Bilgileri

Uluslararası Katılımlı Genotiplendirme Sempozyumu Katılım Sertifikası
Ege Üniversitesi and Türkiye Parazitoloji Derneği / 19.06.2013

İTÜ IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi Katılım Belgesi
İstanbul Teknik Üniversitesi / 27 – 31.08.2010

İTÜ III. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi Katılım Belgesi
İstanbul Teknik Üniversitesi / 17 – 20.08.2009

I.Ulusal Ekoloji ve Çevre Öğrenci Kongresi Katılım Belgesi
Hacettepe Üniversitesi / 27 – 31.07.2009

IX. Kuş Gözlem Okulu Katılım Belgesi
Kuş Araştırmaları Derneği (Ankara) / 07 – 08.03.2009

I.Ulusal Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Sempozyumu Katılım Belgesi
Ortadoğu Teknik Üniversitesi / 20.12.2008

XV. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi Katılım Belgesi
Gaziantep Üniversitesi / 27 – 30.08.2008

Bilgisayar

Microsoft Office (Word, Excel, Power point), SPSS, Internet, R, Python