

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BİYOİNFORMATİK YÖNTEMLER KULLANILARAK
KEÇİ GENOMUNDA MİKRORNA'LARIN (miRNA)
SAPTANMASI

Egemen Erdem GÜLER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 07.12.2015

Bornova-İZMİR

2015

Egemen Erdem GÜLER tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Biyoinformatik Yöntemler Kullanılarak Keçi Genomunda MikroRNA’ların (miRNA) Saptanması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.12.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

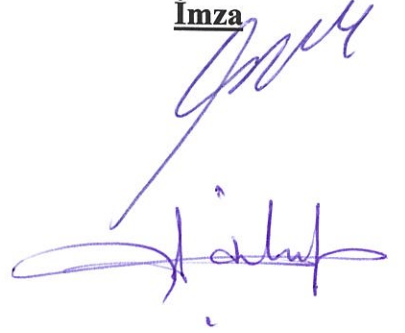
Jüri Üyeleri

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Raportör Üye: Doç. Dr. Lale AKTAŞ

Üye: Doç. Dr. İraz AKIŞ AKAD

İmza



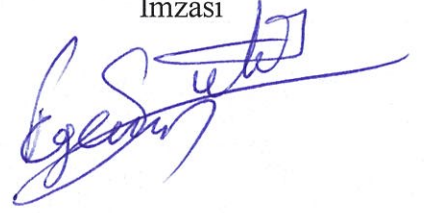
EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum 'Biyoinformatik Yöntemler Kullanılarak Keçi Genomunda MikroRNA'ların (miRNA) Saptanması' 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.

07/12/ 2015

Egemen Erdem GÜLER
İmzası



ÖZET**BİYOİNFORMATİK YÖNTEMLER KULLANILARAK KEÇİ
GENOMUNDA MİKRORNA'LARIN (miRNA) SAPTANMASI**

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Aralık 2015, 33 sayfa

MikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, gen regülasyonu mekanizmasında görev alan RNA molekülleridir. miRNA'lar genellikle DNA üzerindeki protein kodlamayan bölgelerden transkribe edilirler ve evrimsel süreçte korunmuşluk göstermektedirler. miRNA'lar gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel regülasyonunda önemli rol oynamaktadırlar ve küçük degradasyon molekülü olarak görev yaparlar. Ayrıca miRNA'lar kök hücre farklılaşmasında, programlı hücre ölümü mekanizmasında ve hücreden hücreye sinyal iletiminde görev almaktadırlar. Yapılan çalışmalar sonucu miRNA'ların birçok hastalıkla ilişkili olduğu ve çiftlik hayvanlarında et verimi, süt verimi vb. gibi konularla ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada biyoinformatik yöntemler kullanılarak keçi genomunda yeni miRNA'ların saptanması ve daha sonra yapılacak olan genetik çalışmalara bir alt yapı oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla evcil sığır (*Bos taurus*) miRNA'ları keçi (*Capra hircus*) cDNA kütüphanesinde Blastn programı yardımıyla taranmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu keçi genomunda toplam 35 adet yeni aday miRNA saptanmıştır. Saptanan bu aday miRNA'lar sığır ile keçi arasında evrimsel süreçte korunmuşluk göstermektedir. Saptanan yeni aday miRNA'ların daha sonra yapılacak genetik ve evcil hayvan ıslahı çalışmalarına taban oluşturacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Biyoinformatik, Keçi, miRNA

ABSTRACT**ANALYSING OF CONSERVED MIRNAS ON GOAT BY
COMPUTATIONAL APPROACHES**

MSc in Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Cemal ÜN

December 2015, 33 pages

MicroRNAs (miRNAs) are small (nearly 22 nucleotides) RNAs which regulate gene expression by a sort of mechanisms. They are transcribed from DNA but there is no equivalent for proteins. They are mainly located on non-coding sequences of genome and they are conserved in evolutionary process. miRNAs play an important role in post-transcriptional regulation of gene expression and work as small degradation molecules. Also they have roles in stem cells differentiation, apoptosis mechanism and cell to cell communication. In addition, the association between miRNAs and diseases, lactation of farm animals and meat yields are known. In this study, the genetic studies to be performed later on goat genome aimed at building an infrastructure. For this purpose, the cattle (*Bos taurus*) miRNAs were obtained from miRBase and then these miRNA sequences were scanned in goat cDNA libraries by Blastn program to gain match sequences. As a result of this study, 35 new candidate miRNAs in goat genome were determined by computational approaches. These obtained candidate miRNAs are conserved in the evolutionary process between cattle and goat. These obtained miRNAs would be the basis on subsequently to be made genetic studies and improvement of domestic animals.

Key Words: Bioinformatics, Goat, miRNA

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bana katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cemal Ün'e ve Sayın Gökçe Kobazi'ye teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans hayatım boyunca beni her zaman destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen öncelikle aileme daha sonra Sayın Elif Ekeroğlu'na teşekkür ederim. Ek olarak tez konum haricinde çalışma yapmamda büyük katkıları bulunan sayın Prof. Dr. Ülkü Karabay Yavaşoğlu hocama da teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 MikroRNA (miRNA)	3
1.2 miRNA nasıl keşfedildi?.....	4
1.3 mikroRNA'nın biyosentezi.....	6
1.4 miRNA çeşitliliği.....	10
1.5 miRNA'larda 'Kelebek Etkisi'	11
1.6 miRNA'ların gen regülasyonu mekanizması.....	12
1.7 Hücre dışında görevli (circulating) miRNA'lar.....	13
1.7.1 Hücre dışında görevli olan (circulating) miRNA'ların biyolojik fonksiyonları	14
1.8 miRNA'ların hastalıklar ile ilişkileri	15
1.9 miRNA'ların biyomarkır olarak kullanılması	16
2. MATERYAL VE METOT.....	17
3. SONUÇLAR.....	20
4. TARTIŞMA.....	23
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	27
ÖZGEÇMİŞ.....	32
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan çiftlik hayvanları sayılarındaki değişim.....	2
1.2.1 <i>C. elegans</i> ’ta ilk bulunan miRNA olan <i>lin-4</i> hairpin yapısı.....	5
1.3.1 miRNA biyosentezi ve fonksiyonu.....	7
1.3.2 Bitki ve Hayvanlarda miRNA biyogezindeki temel farklılıklar.....	8
1.3.3 Argonaute protein ailesinin domain yapısı.....	9
1.4.1 miRNA dizi değişimi ve çeşitliliği mekanizmaları.....	10
1.7.1 miRNA’ların biyogenezi ve hücre dışına salınması.....	14
2.1 Biyoinformatik yöntemler ile aday miRNA elde edilmesi.....	18

TABLolar DİZİNİ

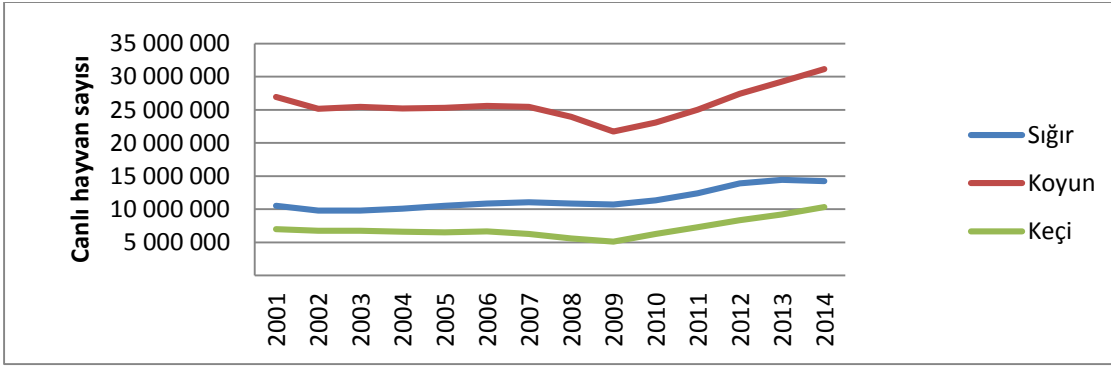
<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 <i>Capra hircus</i> (keçi) genomunda biyoinformatik yöntemler kullanılarak saptanmış olan aday miRNA'lar listesi.....	21

1. GİRİŞ

Hayvanların evcilleştirilmesi insanlık tarihinin en büyük adımlarından birisidir. Hayvanların evcilleştirilmesiyle birlikte başlayan dönüşüm medeniyetlerin değişimine, toplumların oluşmasına ve günümüzdeki hali almasına neden olmuştur (Diamond et al., 2002). İnsanlar göçebe bir hayat sürerken ilk olarak evcilleştirdikleri hayvan köpektir. Bundan 14.000 yıl önce vahşi olan kurt ırkından evcilleşen köpeğin ilk evcilleştirilen hayvan olmasının nedeni iç içe geçmiş iki olay örgüsü ile anlaşılmaktadır. Bu olaylardan birincisi vahşi doğada yaralanan kurtların yiyecek bulabilmek için göçebe kamplarının çevresindeki insan artıklarını tercih etmesidir. İkinci olay ise insanlar kurtların yaklaşan tehlikeyi önceden fark ettiğini görmüş ve geceleri işgalcilere karşı nöbetçi olarak kullanmışlardır (Driscoll et al., 2009). Evcilleştirme tarihinde, hayvanlar kullanım amacına göre dönemlere ayrıldığında başta besin olmak üzere, giyim, barınma gibi hammadde temini açısından ilk evcilleştirilen hayvan keçidir. İran’da yapılan arkeolojik kazılarda keçilerin ilk olarak Mezopotamya’da bundan yaklaşık 12.000 yıl önce, Neolitik devirde, vahşi olan *Capra aegagrus* türünden evcilleştiğini göstermektedir (MacHugh et al, 2001). Keçilerin evcilleştirilmesinden sonra Mezopotamya’da bulunan arkeolojik bulgular vahşi koyun ırkının ikinci evcilleştirilen çiftlik hayvanı olduğunu kanıtlamaktadır (Meadows et al, 2005). Tarımın gelişmesi ve insanların yerleşik hayata geçmesiyle hayvanların evcilleştirme süreci hız kazanmıştır. Tarıma geçiş ile ilk evcilleştirilen hayvan sığır olmuştur. Daha sonraları ise genellikle yük taşımak ve ulaşım için kullanılan eşek, deve ve atlar evcilleştirilmiştir (Baskıcı et al,-1998).

Keçi çiftlik hayvanları içerisinde evcilleştirilen ilk hayvandır. Bereketli Hilal adıyla anılan Mezopotamya’da bulunan ve bugünkü İran’ın batısında yer alan Zagros dağlarında yapılan arkeolojik kazılarda mısır taneleri ve keçi kemiklerine rastlanmıştır. Bulunan keçi kemiklerinin, keçilerin atası olan *Capra aegagrus* ‘a ait olduğu saptanmış ve yapılan araştırmalar sonucu yaklaşık 12.000 yıl öncesine ait olduğu saptanmıştır (Zeder et al., 2000). Keçiler et, süt, tiftik ve post açısından ve ayrıca zirai, ekonomik, kültürel ve hatta dini açıdan çok uzun senelerdir önemli varlıklardır. İnsanlar göçebe hayattan itibaren keçilerin tüyünden, etinden,

sütünden ve postundan yararlanmaktadır. Ayrıca günümüzde çeşitli biyomedikal ilaçların üretilmesi ve geliştirilmesi için de keçiler kullanılmaktadır. Ülkemizin coğrafik şartları ve topografik yapısının uygun olması sebebiyle hayvancılık sektöründe keçi yetiştiriciliği üçüncü sıradadır ve her geçen yıl artış göstermektedir (Şekil 1.1). Ekonomik önemlerinin yüksek olması ve bu önemin her geçen gün artmasından dolayı gerek keçi hastalıklarının moleküler temelini gerekse keçi genomunu inceleyecek moleküler araştırmaların zamanla artması beklenmektedir (Özcan, 1989).



Şekil 1.1: 2001-2014 yılları arasında Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan sığır, koyun ve keçi sayılarındaki değişim (TÜİK).

Keçi genomu yaklaşık 2,66 milyar baz çifti uzunluğundadır ve 22,175 protein kodlayan gen bölgesine sahiptir (Dong et al., 2012). Keçi genomu üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün artış göstermektedir. Keçi kıl foliküllerinden alınan örnekler ile yapılan çalışma sonucu keçi genomunda toplam 56,231 adet tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tespit edilmiş ve bu SNP’ler 10,057 gen ile ilişkilendirilmiştir (Wang et al., 2015).

Mikro-Ribonükleik Asit’ler (miRNA), yaklaşık 17-24 nükleotid uzunluğunda, gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel regülasyonundan sorumlu ve genellikle protein kodlamayan RNA molekülleridir (Pritchard et al., 2012). miRNA’ların keşfi tıbbi, biyolojik ve zirai bilimlerde önemli gelişmelere neden olmuştur (Carrington and Ambros, 2003; Pritchard et al., 2012). miRNA belirleme yöntemleri çeşitlilik göstermektedir. Temelde iki çeşit miRNA belirleme yöntemi

bulunmaktadır. Bunlar; laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen deneysel yöntemler ve bilgisayar temelli yaklaşımlar ile gerçekleştirilen biyoinformatik yöntemlerdir (Unver et al., 2009).

Bu çalışmanın amacı, kültürel ve ekonomik açıdan önemli olan keçi genomundan transkribe edilen ve gen regülasyonunda önemli görevleri bulunan mikroRNA'ların homoloji temelli biyoinformatik yöntemler kullanılarak yeni keçi mikroRNA'larının saptanmasıdır.

1.1 MikroRNA (miRNA)

miRNA'lar, ökaryotlar ve virüslerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar. miRNA'lar 17-25 nükleotid uzunluğunda, kodlama yapmayan RNA'lardır (ncRNAs). Transkripsiyon sonrasında (post-transkripsiyonel) spesifik mRNA hedeflerine komplementer olarak bağlanırlar ve bu şekilde mRNA'nın translasyonel inhibisyonuna veya degradasyonuna yol açarak gen ekspresyonunu düzenlerler (Pritchard et al., 2012). Ayrıca miRNA'ların promotor dizilere komplementer olarak bağlanması, genlerin ekspresyonunu baskılayabilir (Place et al., 2008; Vasudevan et al., 2007).

Çok hücreli canlılar gelişimleri süresince birçok genin kontrolünü ve koordinasyonunu sağlamak durumundadır (Carrington and Ambros, 2003). Gelişim esnasında olduğu gibi hastalık durumlarında veya normal fizyolojik koşullarda da çevresel ve hücrel sinyallerin algılanması ve tepki verilmesi binlerce genin ekspresyonunun kontrolünü gerektirmekte ve bu olaylar organizmada geniş bir yelpazede gerçekleştirilmektedir (Carrington and Ambros, 2003; Pritchard et al., 2012). Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde anahtar rol üstlenen miRNA'lar birçok biyolojik süreç ile etkileşim içerisinde. Ayrıca bazı hastalıklar için biyomarkır özelliği gösterirler. Bu nedenle miRNA ekspresyonunun profilendirilmesi popüler olmuştur. (Pritchard et al., 2012).

Bitkilerde çiçek, yaprak morfolojisinin oluşumunda, gövde, kök gibi organların gelişiminde, generatif ve vejatatif büyüme gibi faz değişimlerinde ve kuraklık, tuzluluk, soğuk gibi çeşitli çevresel streslere karşı oluşturulan moleküler

cevaplarda bitki miRNA'ları gen ekspresyonunun regülasyonunda görev yapmaktadır (Zhang et al., 2007).

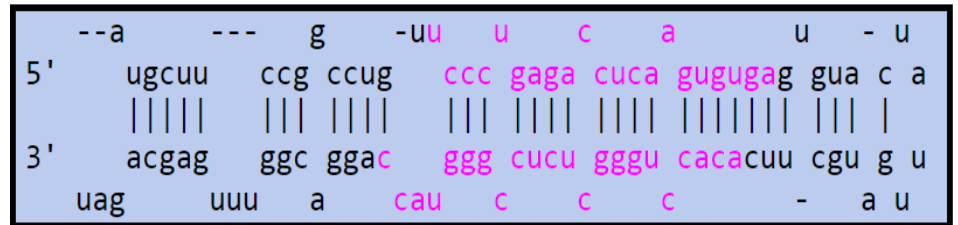
Hayvanlarda ise, örnek olarak, *C. elegans*'ta larval safhaların birbirini izlemesi gibi gelişimsel zamanlamada; embriyo oluşumu, kök hücre farklılaşması ve diğer organ ve dokuları içeren tüm hayvansal dokuların normal gelişimi gibi gelişimsel evrede; kanser hücrelerinin patogenezinde; virüs ilişkili hastalıklar ve çeşitli hastalıklara karşı oluşturulan immünolojik savunmada; apoptoziste ve daha birçok fizyolojik süreçte regülatör olarak miRNA'lar görev yapmaktadırlar (Zhang et al., 2007).

Bitki ve hayvanlarda temel fonksiyonlara sahip olmalarından dolayı çoğu miRNA, bitki ve hayvanlarda yüksek derecede korunmuşluk göstermektedir (Unver et al., 2009; Zhang et al., 2007). Ökaryotlar ile virüs genomlarının toplam %1-3'ünü miRNA'lar oluşturmaktadır (Ghosh et al., 2007). Ayrıca miRNA'ların insanda tüm protein kodlayan genlerin %60'dan fazlasını düzenlediği düşünülmektedir (Farazi et al., 2011; Philippidou et al., 2010).

1.2 miRNA nasıl keşfedildi?

1998 yılında, Craig Mello ve Andrew Fire, RNA interferans mekanizması üzerine olan devrim niteliğindeki çalışmalarını *Nature*'da yayımladı. Önceleri antisens RNA olarak adlandırıldı fakat sens RNA da genleri susturabiliyordu. Ancak sonuçlar tutarsızdı. Bununla birlikte, sens ve antisens RNA genlerin susturulmasına sebep olabileceği için Mello mekanizmanın sadece antisens RNA'nın mRNA ile komplementer olarak eşleşmesi ile olmayacağını düşünmüş ve henüz bilinmeyen mekanizma için RNA interferans terimini önermiştir (Nobelprize.org, 2006). Beklenmedik bir bulgu da 1990 yılında Richard Jorgensen tarafından rapor edilmiştir. Bu bulguda petunya bitkisinin petallerindeki pigmentasyondan görevli kalkon (chalcone) sentaz geninin (CHS) kopyasının ekspresyonu daha az pigmentasyona sebep olmakta ve tamamen veya kısmi beyaz çiçeklere sebep olmaktadır. Bu durum kalkon sentaz geninin aktivitesinin önemli derecede düşürüldüğünü göstermektedir. Yabani tip bitkideki petaller mor renge sahip iken, endojen kalkon sentaz geni ve transgen içeren çiçeklerde downregülasyon sonucunda herhangi bir pigmentasyona sahip olmayan beyaz

bölgeler meydana gelmektedir (Napoli et al., 1990). Farklı bir bulguyu da 1993 yılında Victor Ambrose öne sürmüştür: *C. elegans*'taki *lin-4* geni bir protein kodlamamaktadır ancak larval gelişimin zamanlanmasını kontrol etmektedir. *lin-4* (Şekil 1.2.1) geninin ekspresyonu sonucu iki kısa RNA dizisi oluşmaktadır. Bu kısa RNA dizilerinin *lin-14* geninin 3'UTR (translasyona uğramayan bölgeler) bölgesine komplementer olarak bağlandıkları ve LIN-14 proteininin ekspresyonunu baskıladıkları saptanmıştır. Böylece, ilk miRNA geni *lin-4*, *C. elegans*'ta 1993 yılında keşfedilmiştir (He and Hannon, 2004). Bu buluştan yedi sene sonra yine *C. elegans*'ta ikinci miRNA *let-7* keşfedilmiş ve bu miRNA'nın kurtçuk, sinek ve insan genomlarında korunduğu saptanmıştır ve böylece miRNA alanındaki çalışmalar hız kazanmıştır (Berezikov, 2011). *C.elegans* üzerinde yapılan bu ilk çalışma sonucunda miRNA'ların gelişimsel sürecin basamaklarında görev aldıkları belirlenmiştir (He and Hannon, 2004). Daha sonra, 1998'de dönüm noktası oluşturan bir yayın ile Andrew Fire ve Craig Mello, çift zincirli RNA'nın (dsRNA) gen susturma mekanizmasına sebep olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu mekanizmayı da RNA interferans (RNAi) olarak isimlendirilmiş bu buluşları ile 2006 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel Ödülü almışlardır (mirna regulation of the translational machinery). Bu kısa ve düzenleyici RNA dizileri 2001 senesinde 'mikroRNA veya miRNA' olarak adlandırılmıştır (Lagos-Quintana et al., 2001). Yapılan çalışmalar sonucu bulunan farklı bulgular dünya genelinde, bitki ve hayvanlarda miRNA'nın etkilerini ve mekanizmaların araştırılmasına yönelik çalışmaları yoğunlaştırmıştır (Rhoads, 2010).

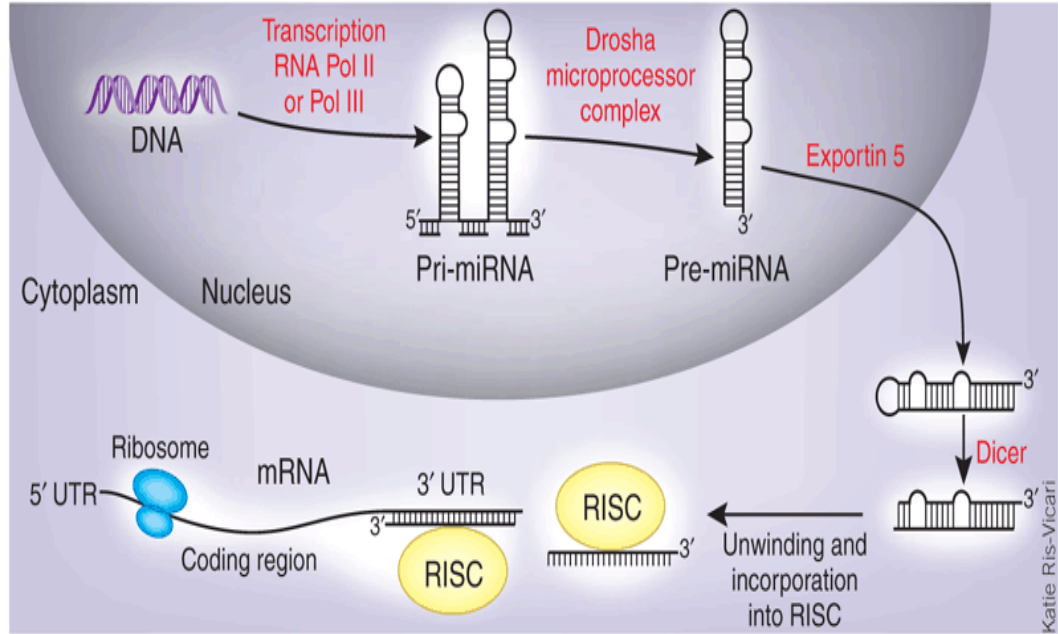


Şekil 1.2.1: *C. elegans*'ta ilk bulunan miRNA olan *lin-4* hairpin yapısı. Üstteki pembe renkli işaretli olan diziler cel-lin-4-5p, aşağıdaki pembe renkli işaretli olan diziler ise cel-lin-4-3p olarak isimlendirilmektedir.

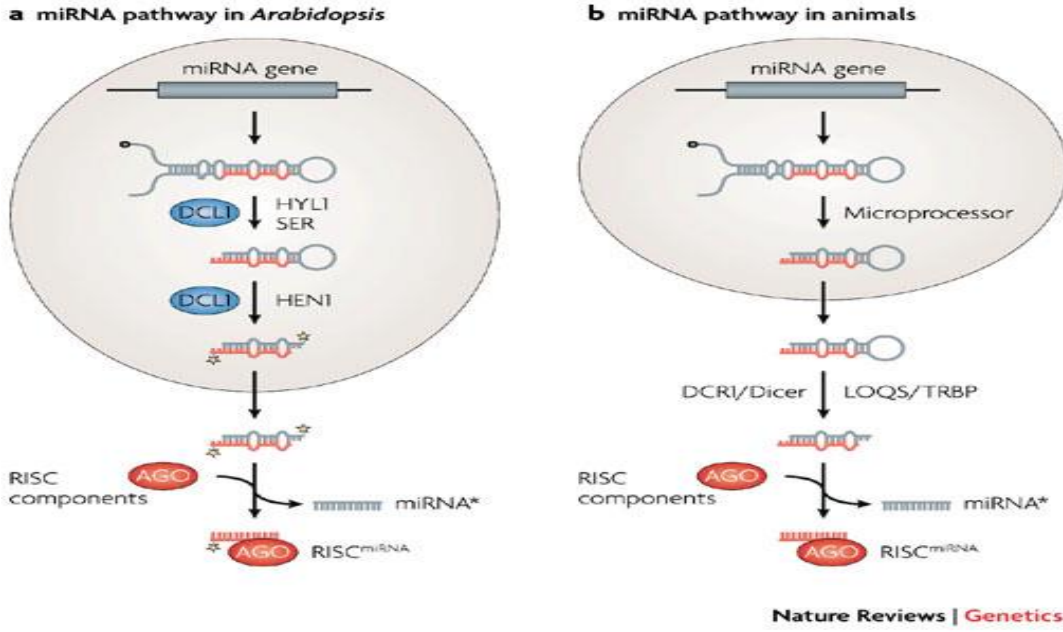
1.3 mikroRNA'nın biyosentezi

mikroRNA genleri kromozomlarda genellikle polisistronik birincil transkriptler olarak transkribe olurlar. Genomik düzenleri temelinde miRNA genleri intronik ve ekzonik (3'UTR ve 5'UTR) olarak bulunurlar (Wang and Yang, 2010). miRNA biyosentezi birkaç karmaşık adımın ardı ardına sıralanması sonucu olur. Bu adımlar şu şekildedir; kromozomlardan miRNA genleri RNA polimeraz II/III tarafından transkribe edilirler. Birkaç kilobaz (kb) uzunluğunda olan ve bir veya birkaç saç tokası (hairpin) yapısı içerebilen birincil transkript (pri-miRNA) 5' şapka ve poli-A kuyruğu içermektedir. Ayrıca bir gen içinde bulunan intronik miRNA'lar, bu genin promotorunu (host) ve diğer düzenleyici elemanlarını kullanarak transkripsiyonu gerçekleştirir (Wang and Yang, 2010). Daha sonra nükleusta, *mikroişlemci kompleksi* adı verilen endonükleaz Drosha protein kompleksi (Drosha proteini yanında DGCR8 proteini (insanda) / Pasha (Drosophila'da)) tarafından pri-miRNA kesime uğrar ve böylece karakteristik saç tokası yapısındaki yaklaşık 60-120 nükleotid uzunluğundaki prekürsör miRNA (pre-miRNA) oluşturulur (Bartel, 2004; Caetano-Anollés, 2010; Lin et al., 2006; Wang and Yang, 2010). Bu basamakta bitkilerde Dicer-benzeri protein 1 (DCL1), HYL1 (çift zincirli RNA bağlanma proteini) ve HEN1 (çift zincirli RNA bağlanma motifi ve C-terminal metil transferaz domaini içerir) gibi diğer yardımcı moleküller rol oynamaktadır (Zhang et al., 2007). Bu kesim sonucu saç tokası yapısındaki pre-miRNA'nın 5' fosfat ucu ve yaklaşık 2 nükleotid uzunluğunda kuyruk ile 3'OH ucu serbest kalır. Hayvanlarda, prekürsör (öncü) miRNA çekirdekten sitoplazmaya, Exportin-5 ve Ran-GTP nüklear por kompleksi yardımıyla taşınır (Lagos, 2008) ve sonra sitoplazmada yer alan ribonükleaz Dicer protein kompleksi ile kesime uğratılır. Meydana gelen yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki çift zincirli RNA (dsRNA)'nın zincirleri birbirlerinden ayrılır ve bir zincirden olgun miRNA meydana gelir (Bartel, 2004; Ghosh et al., 2007). Bitkilerde bu adımda birkaç farklılık mevcuttur, çift zincirli RNA dizisi nükleusta oluşturulduktan sonra HEN1 enzimi ile metillenir ve *exp5* ortoloğu olan HASTY yardımıyla sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya taşınan çift zincirli miRNA helikaz yardımı ile zincirlerine ayrılır ve olgun miRNA gen ekspresyonu düzenleme görevine yöneltilir (Şekil 1.3.1) (Unver et al., 2009; Zhang et al., 2007). miRNA

biyosentezi tüm adımları ile şekil 1.3.1’de gösterilmiştir. Hayvan miRNA’larının sentezi ve işlenmesi nükleus ve sitoplazma içinde gerçekleştirilir. Bitkilerde ise bu işlemler tamamıyla nükleusta gerçekleşir.



Şekil 1.3.1: miRNA biyosentezi ve fonksiyonu. Başlangıç olarak RNA transkripti primer miRNA (pri-miRNA) olarak DNA üzerinden RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonu gerçekleştirilir. Her miRNA’nın primer miRNA’sı karakteristik katlanma (stem-loop) yapısına sahiptir. Böylece RNase III, endonükleaz Drosha mikroprekürsör protein kompleksi tarafından tanınır ve kesime uğratılır. Drosha tarafından gerçekleştirilen pri-miRNA kesimi Pasha/DGCR8 olarak isimlendirilen bir protein yardımına ihtiyaç duyar. Pasha/DGCR8 çift zincirli RNA’nın bağlanması için gerekli olan domaini içermektedir. Bu kesimin sonucunda yaklaşık 60-120 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA adı verilen saç tokası (hair-pin) yapısına sahip prekürsör miRNA oluşur. Pre-miRNA, nükleus zarında bulunan Exportin 5/RanGTP protein kompleksi ile sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada, evrimsel korunmuşluk gösteren RNaz III enzimi olan, Dicer, dsRBD protein kompleksi ile (TAR RNA-bağlanma proteini ve PACT) birlikte pre-miRNA’yı olgun miRNA (~17-25 nt.) haline getirirler. Fonksiyon gösterecek zincir RNA-indüklü susturucu kompleks (RISC) olarak adlandırılan bir protein kompleksi ile bir araya gelir ve RISC protein kompleksi ile birlikte mRNA’nın translasyonunun baskılanmasına neden olur (Samal and Srivastava, 2007).

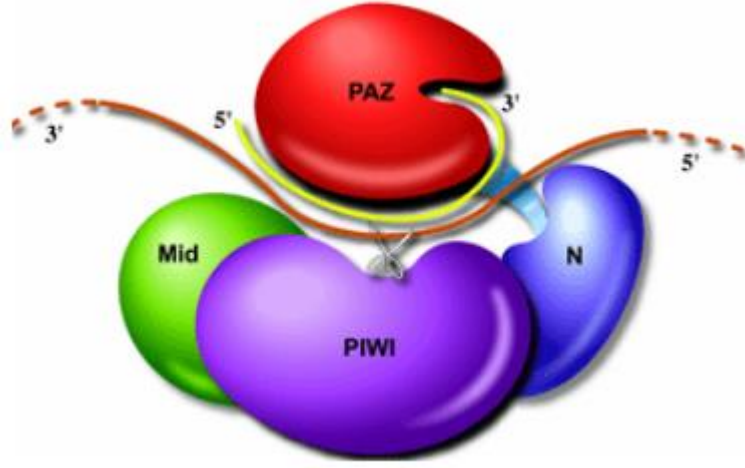


Şekil 1.3.2: Bitki ve Hayvanlarda miRNA biyogenezindeki temel farklılıklar. **a)** *Arabidopsis* bitkisinde miRNA yolağı. **b)** Hayvanlarda miRNA yolağı (James C. and Carrington et al ,2007). Hayvan miRNA'larının biyogenezini nükleusta başlar ve sitoplazmada sona erer. Bitkilerde miRNA'ların işlenmesi ise tamamen nükleus içerisinde gerçekleştirilir.

miRNA biyogenez yolağında görev alan moleküller şu şekildedir:

- ❖ Tip III RNAz'lar: RNA III tipi enzimdir ve dsRNA' ya bağlanarak kesime uğrattır (Caetano-Anollés, 2010). Bunlar;
 - Drosha protein kompleksi: RNAz III tipi enzimdir ve nükleusta bulunur. Kofaktör olarak Pasha ya da insandaki Pasha proteinin homloğu olan DGCR8 proteinine ihtiyaç duymaktadır. Drosha homologları artropodlarda iki tane iken, tüm metazoalarda tek kopya halinde bulunur (Caetano-Anollés, 2010; Lu et al., 2007).
 - Dicer protein kompleksi: Diğer bir RNAz III tipi enzimdir. N-terminal ucunda DExD/H-box helikaz ve bir de PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) bölgesine sahiptir (Caetano-Anollés, 2010; Gomes et al., 2013). Uzun olan dsRNA'yı kesime uğrattırarak 3' ucunda 2 nükleotidlik kuyruğu bulunan yaklaşık 17-24 nükleotid uzunluğunda dsRNA (çift zincirli) zincirini oluşturur. Artropodlarda iki (Dcr1 ve Dcr2), diğer metazoalarda ve protistalarda bir ve bitkilerde ise dört adet (DCL1-2-3-4) homoloğu bulunur (Caetano-Anollés, 2010).

- ❖ Argonaute protein ailesi: N- terminallerinde PAZ domaini, C-terminallerinde ise PIWI domaini bulunmaktadır. Argonaute proteini (Şekil 1.3.3) mRNA kesimi için temel katalitik bölge olup bu proteinin N-terminal ucundaki PAZ domaini rehber zincirin 3' ucuna bağlanmasını sağlarken, yapısal olarak RNAaz H'in aktif bölgesine benzeyen C-terminal uçtaki PIWI domaini hedef mRNA'nın kesiminde görev almaktadır. Argonaute proteinler *Arabidopsis*'in argaunate1 mutantının adını almıştır (Caetano-Anollés, 2010).

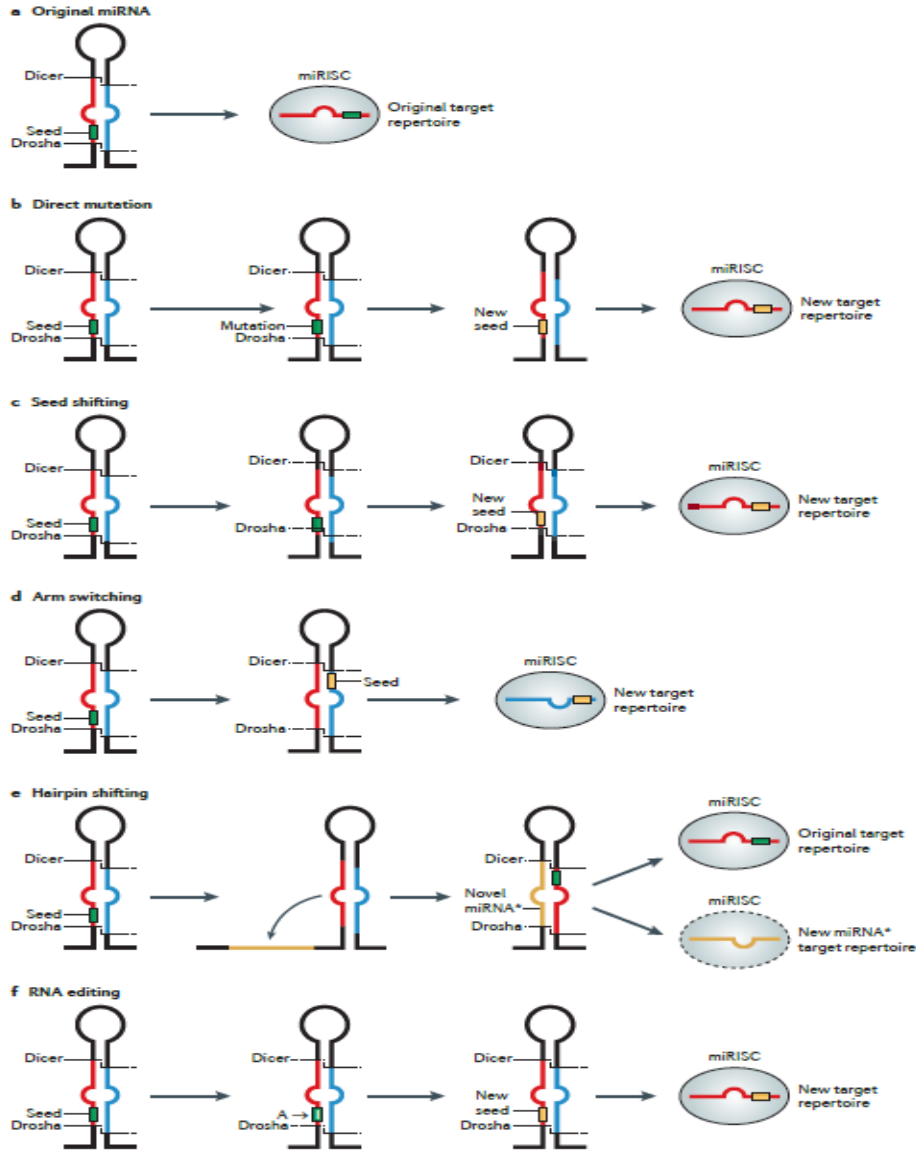


Şekil 1.3.3: Argonaute protein ailesinin domain yapısı (Gündoğdu ve Çelik, 2009).

- ❖ Polimerazlar: miRNA'lar tıpkı proteinler gibi transkribe edilirler. İntronlarda bulunan miRNA'lar genellikle RNA polimeraz II tarafından transkribe edilirler. Genomlarda tekrar dizilerinin içinde bulunan miRNA'lar ise RNA polimeraz III tarafından pri-miRNA'ya transkribe edilirler (Caetano-Anollés, 2010; Wang and Yang, 2010).

1.4 miRNA çeşitliliği

miRNA'lar canlılarda büyük ölçüde korunmuş olmasına rağmen yapılan karşılaştırmalı genomik analizler sonucunda birkaç farklı mekanizma ile dizi değişikliği gerçekleştiği saptanmıştır. Bu mekanizmalar direkt mutasyon, çekirdek değişimi, kol değişimi, saç tokası yapısının ve RNA değişikliği mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalar detaylı olarak Şekil 1.4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 1.4.1: miRNA dizi değişikliği ve çeşitliliği mekanizmaları (Berezikov 2011'den alınmıştır). **a)** Orijinal miRNA saç tokası yapısı Drosha ve Dicer tarafından işlenir. miRNA susturma kompleksi (miRISC) ile birleşen olgun miRNA'nın (kırmızı işaretli) çekirdek (seed) bölgesi (yeşil işaretlenmiş) hedef diziyi belirler. Olgun miRNA'nın karşısında bulunan mavi işaretlenmiş minör miRNA (miRNA*) genellikle gen regülasyonunda önemli bir role sahip değildir. **b)** Olgun miRNA dizinde meydana gelen mutasyonlar doğrudan hedef değişikliğine sebep olabilmektedir.

Meydana gelen bu mutasyonlar özellikle çekirdek (seed / sarı işaretli bölge) bölgesinde meydana geldiği takdirde doğrudan hedef değişikliğine sebep olmaktadır. **c)** miRNA prekürsör yapısında meydana gelen bir mutasyon saç tokası yapısında ve bu yapının işlenmesinde değişikliklere neden olabilmektedir. Çekirdek değişiminde (seed shifting), dominant olgun miRNA dizisi, Dorsha ve Dicer protein komplekslerinin miRNA işlemede değişikliğinden dolayı kayar ve olgun miRNA'nın değişmiş olan 5' ucu, olgun miRNA'nın çekirdek (seed / sarı işaretli kısım) kısmının değişmesine ve böylece hedef değişimine yol açmaktadır. **d)** Arm switching'de ise miRNA prekürsörünün herhangi bir yerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu miRISC'e bağlanan olgun miRNA yerine minör miRNA (miRNA*) dizisinin bağlanmasına neden olur. miRNA*'ın (mavi) RISC ile birleştirilmesi sonucu yeni miRNA dizisi ve dolayısıyla da yeni hedeflere komplementer miRNA oluşmasına yol açar. **e)** Hairpin shifting'de (saç tokası yapısının değişimi), yeni bir saç tokası yapısı aynı olgun miRNA'yı (kırmızı) tutan fakat yeni bir minör miRNA dizisini (sarı) hairpine dahil eden komşu bölgeden evrimleşir ve sonrasında minör miRNA dizisi RISC protein kompleksi ile birleşerek regülatör özellik kazanır. **f)** RNA editing, bir miRNA prekürsörünün yapısının çift-zincirinde adenozinin-iyonozine (A-I) post-transkripsiyonel olarak değişime uğrar. Bu durum miRNA prekürsör yapısının işlenmesini etkiler ve olgun miRNA dizisinde değişiklikler meydana gelir. Özellikle çekirdek bölgesinde (seed / sarı) meydana gelen değişim hedeflenen gen bölgelerinin değişimine sebep olabilir (Berezikov, 2011).

1.5 miRNA'larda 'Kelebek Etkisi'

Kelebek etkisi, bir sistemin başlangıç verilerindeki küçük değişikliklerin büyük ve öngörülemeyen sonuçlar doğurabilmesine verilen addır (Lee et al., 2011).

miRNA dizilerinde meydana gelen değişimler ve tek nokta mutasyonu, organizmanın gen ekspresyonunun değişiminde önemli değişikliklere sebep olur ve bu olay 'kelebek etkisi'ne sebep olabilmektedir. miRNA dizisinin promotor bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonları downstream gen ekspresyonlarına sebep olabilir. Bir gen üzerinde meydana gelen anlamlı veya anlamsız mutasyonlar proteinin fonksiyonel değişikliklerine neden olabilirler. Bu mutasyonlar evrim sürecinde önemli rol oynarlar. Ancak, bir pre-miRNA dizisi üzerinde meydana gelen mutasyon miRNA biyogenezinde bir değişikliğe yol açabilir ve miRNA'nın mRNA hedefi veya zincir seçimi değişikliği gerçekleşebilir. Bu olayların sonucu olarak genlerin geniş spektrumu için ince ayarlı bir baskılama veya değişiklik meydana getirebilir (Lee et al., 2011).

miRNA'da meydana gelen mutasyon veya tek nükleotid polimorfizmi (SNP), türlerin evrimleşmesinde ve yaşam süresinin, dış görünüşün, yeteneğin, zekanın,

hastalıklara ve ilaçlara karşı duyarlılığın çeşitliliğine kısmen katkıda bulunabilir. miRNA genlerindeki mutasyon ya da SNP ile olası bir fenotip arasındaki korelasyonun bulunması ilerleyen günlerde önemli bir araştırma konusu olacaktır (Lee et al., 2011).

Han-Chia ve Lee 2010 yılında yaptığı bir çalışmada, gen ekspresyon profilinin değişikliğinde kelebek etkisini sırayla tetikleyen ve zincir seçimi kaymasına sebep olan bir SNP göstermişlerdir. Bu çalışmada, T ve B-hücreleri ve ayrıca makrofajlar gibi çeşitli immün sistem hücrelerinde başlıca eksprese edilen miR-155'in yabani tip (wild type) ve mutant prekürsörü ile genomik ekspresyon profilindeki miRNA'ların, tek nokta mutasyonunun etkisini açıkça göstermişlerdir. İmmün sistem hücresi olmayan insan embriyonik böbrek hücrelerine (HEK) pre-mir-155 veya pre-mir-155-m transfekte edip mikrodarray ve RT-PCR analizleri ile gen ekspresyon profilleri incelenmiş ve pre-mir-155'teki tek nokta mutasyonu genomik seviyede gen ekspresyonunun 'kelebek etkisi'ne sebep olan zincir seçimi kaymasına neden olduğu saptanmıştır (Lee et al., 2011).

1.6 miRNA'ların gen regülasyonu mekanizması

Olgun miRNA dizileri gen ekspresyonunun regülasyonunu RNA indüklü susturma kompleksi olan RISC protein kompleksi ile gerçekleştirmektedir. RISC kompleksine bağlanan miRNA burada hedeflediği mRNA'ya bağlanır ve hedef mRNA'nın kesimi veya translasyonunun baskılanması yoluyla gen ekspresyonunu engellemektedir. mRNA'nın kesimi veya translasyonunun baskılanması, miRNA ve hedef mRNA arasındaki tam ya da tam olmayan komplementasyon doğrultusunda belirlenir. Özellikle, hayvan miRNA'larının 5' ucunda bulunan yaklaşık 7 nükleotid uzunluğundaki seed (çekirdek) bölgeleri ile dizi tanıma spesifikliği sağlanmaktadır (Caetano-Anollés, 2010; Liu et al., 2008; Zhang et al., 2007). Bitkilerde çoğunlukla miRNA ve hedef mRNA komplementasyonu mükemmel yakın bir şekilde gerçekleşmektedir. Hayvanlarda ise bu durumun tersi olarak çoğu miRNA hedef mRNA'ya tam olarak komplementerlik göstermez (Ambros, 2004). Böylelikle hayvan miRNA'ları birden fazla mRNA hedefleme potansiyelinde sahip olabilmektedir. Bu da bir miRNA'nın birden çok farklı genin translasyonel inhibisyonunun gerçekleştirmesini sağlamaktadır (Ghosh et al.,

2007; Unver et al., 2009). Translasyonel baskılamada, miRNA çoğunlukla hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanır ancak bunun yanı sıra bazı miRNA'lar 5'UTR veya ORF'ye (açık okuma çerçevesi) bağlanabilmektedir (Axtell et al., 2011; Gomes et al., 2013; Zhang et al., 2007).

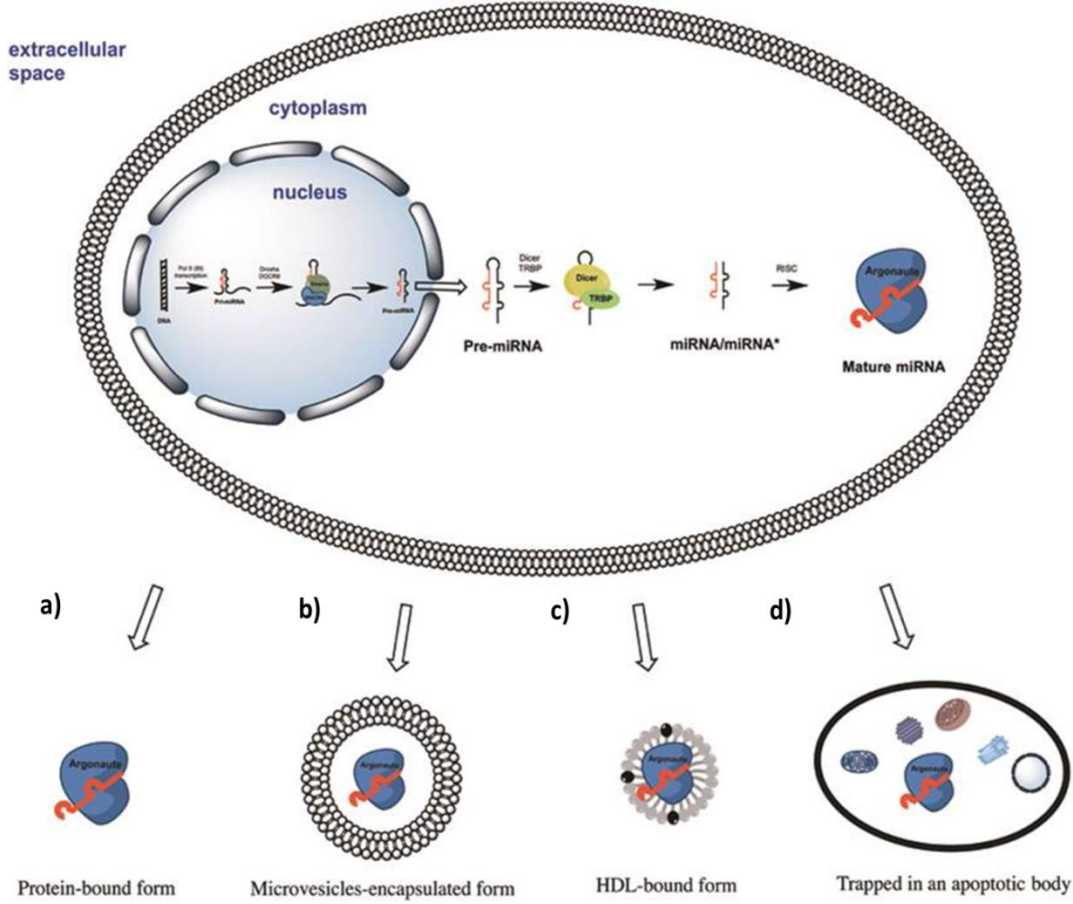
miRNA indüklü gen ekspresyonunun regülasyonunda farklı bir mekanizma da mevcuttur. mRNA dizileri transkripsiyondan sonra 3' ucuna poli-A kuyruğun eklenmesiyle daha stabil hale getirilir ve bu da mRNA'nın parçalanmasını engellemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda miRNA'lar mRNA'ların hızlı de-adenilasyonunu sağlayarak mRNA dizilerinin parçalanmasına yol açmaktadır (Bartel, 2004; Zhang et al., 2007).

1.7 Hücre dışında görevli (circulating) miRNA'lar

miRNA'ların çoğunun hücre içinde görev almalarının yanı sıra önemli bir miktarı da hücre dışında, çeşitli vücut sıvılarında görev alırlar. Hücre dışında bulunan RNA'lar çoğunlukla kararsız olmasına rağmen hücre dışında görevli miRNA'lar kararlı bir yapıya sahiptir ve çeşitli vücut sıvılarında belirli ekspresyon profilleri gösterirler. Serum ve diğer bazı vücut sıvıları ribonükleaz enzimi içermektedir fakat hücre dışına salınma uğrayan miRNA'lar RNaz'ın parçalamasına karşı korunacak şekilde paketlenmişlerdir. miRNA'lar genelde lipid veziküllerde, RNA-bağlı proteinlerle kompleks şeklinde veya her ikisiyle birlikte paketlenerek RNaz degradasyonundan korunabilirler (Etheridge et al., 2011).

Hücre dışındaki miRNA'ların RNaz tarafından degradasyonuna karşı direncinin yanı sıra serum veya plazmada, dondurup çözmeye direnç gösterebilen önemli derecede stabil formda bulunan miRNA'lar tespit edilmiştir. miRNA'ları degradasyondan birkaç farklı mekanizma korumaktadır. Bu mekanizmalardan biri miRNA'ların lipid kesecikler içinde biriktirilmesidir. Hücreler tarafından salınan bu küçük lipid veziküllerinin birkaç tipi vardır. Bunlar: Mikroveziküller, fizyolojik ve patolojik şartlar altında hemen hemen tüm hücre tiplerinde hücre membranlarından oluşturulur ve büyüklüğü 100nm-1µm olabilmektedir. Bir başka mekanizma ise ekzozomlar, endozomal bölümlerden kökenlenen daha küçük membran fragmentleridir (30-100 nm). Ayrıca daha büyük olan (4µm'ye ulaşan)

apoptotik cisimcikler de bir başka miRNA paketleme mekanizmasıdır, hücreler apoptoza giderek öldüğü zaman serbest bırakılırlar (Fichtlscherer et al., 2011). Bir başka hücre içi miRNA taşıma mekanizması ise yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) molekülleridir (Turchinovich et al., 2013).



Şekil 1.7.1: miRNA'ların biyogenezi ve hücre dışına salınması (Şekil; A. Turchinovich et al., 2013' ten alıntıdır). **a)** Argounate proteinine bağlı olan miRNA'nın hücre dışına salınımı. **b)** RISC protein kompleksine bağlı miRNA'nın mikrovezikül yapısı ile kapsüle alınarak hücre dışına salınımı. **c)** HDL moleküllerine bağlı olarak miRNA'nın hücre dışına salınması. **d)** Apoptotik veziküller ile miRNA'nın hücre dışına salınması (A. Turchinovich et al., 2013).

1.7.1 Hücre dışında görevli olan (circulating) miRNA'ların biyolojik fonksiyonları

Yapılan son çalışmalara göre hücre dışında görevli miRNA'ların hastalık biyomarkırları ve yeni terapötikler için büyük oranda potansiyel taşıdıkları

belirtilmektedir (Boon and Vickers, 2013; Monroig and Calin, 2013; Velu et al., 2012). Taşıyıcı farklı mekanizmalar tarafından plazma ribonükleazlarından korunan fonksiyonel miRNA'lar çeşitli rotalar ile alıcı hücrelerine taşınırlar. Hücre dışında dolaşan miRNA'ların en ilgi çekici rolü olan hücre-hücre etkileşimini sağlamanın dışında, çeşitli biyolojik mekanizmaları ve homeostatik yollara aracılık etme görevleri de bulunmaktadır (Boon and Vickers, 2013; Etheridge et al., 2011) .

1.8 miRNA'ların hastalıklar ile ilişkileri

Hayvanlardaki miRNA'lar gen ekspresyonunun regülasyonu fonksiyonlarının yanı sıra birçok hücresel yolda da görev almaktadırlar. Bu görevlerinden biri de bağışıklık sisteminin bir parçası olarak patojen ve viral enfeksiyonların kontrolünü sağlamaktır (Grassmann and Jeang, 2008; Umbach and Cullen, 2009). Viral enfeksiyona karşı immün yanıt oluşturmak amacıyla konakçı tarafından kodlanan spesifik miRNA profilleri oluşturulabilmektedir. Böylelikle kodlanan miRNA'lar viral transkriptlerde hedef bölgeler ile etkileşime girerek viral replikasyonu değiştirebilmektedirler (Grassmann and Jeang, 2008; Mu et al., 2007; Sullivan and Ganem, 2005; Umbach and Cullen, 2009). Viral enfeksiyonlarda konakçı hücresel miRNA profilinde büyük etkiler ortaya çıkarabilmektedir (Ha, 2011). Bazı RNA virüsleri hücredeki miRNA'lar ile direkt olarak etkileşimde bulunabilmekte veya replikasyon potansiyellerini arttırmak için bu miRNA'ları kullanabilmektedirler (Ha, 2011).

Canlılarda miRNA'lar farklı dokuların fonksiyonlarını düzenleme görevlerine sahiptirler. Enfeksiyon sonucu oluşan hastalıklar, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek hastalıkları ve kanser çeşitleri gibi farklı hastalıklarda miRNA'nın hücre ve doku homeostazisinin ayarlanması arasında çeşitli ilişkiler bulunmaktadır. Örneğin Alzheimer hastalığı ile ilişkili miR-9, miR-124a, miR-125b, miR-128, miR-132 ve miR-219 gibi birçok miRNA saptanmıştır, ayrıca miRNA'lar kalp hastalıklarında biyomarkır olarak ta kullanılmaktadır (Ying, 2008, Rooij,2011)

Yapılan bir çalışmada HIV-1 virüsü ile enfekte T-hücrelerinden eksprese edilen insan miRNA'larının virüs tarafından kodlanan farklı genleri hedeflediği

saptanmıştır. Bu miRNA'lerden miR-29a ve miR-29b virüsün *nef* genine, miR-149 virüsün *vpr* genine, miR-378 virüsün *env* genine ve miR-324-5p ise virüsün *vif* genine komplementer olarak bağlanarak bu genleri regüle ettiği saptanmıştır. HIV hastalığının ilerlemesinde önemli rol üstlenen *nef* genini hedefleyen miR-29 ailesinin bu hastalığın tedavisinde potansiyel olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Hariharan et al., 2005). Memelilerde virüs enfeksiyonuna karşı oluşturulan miRNA örneklerini çoğaltmak mümkündür. Örneğin primatlarda miR-32 PFV-1 virüsünün çoğalmasını etkili bir şekilde engellemektedir (Zhang et al., 2007,).

1.9 miRNA'ların biyomarkır olarak kullanılması

Normal biyolojik süreçler, patolojik süreçler veya terapötik bir işleme karşı farmakolojik cevabın göstergesi olabilen, objektif olarak ölçülüp değerlendirilmesi yapılabilen özelliğe biyomarkır denir (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). İdeal biyomarkır bazı belirleyici özellikleri taşımalıdır. Bunlar:

- ❖ Hastaya fiziksel bir zarar vermeyen (non-invaziv) metotlarla erişilebilmeli.
- ❖ Bir hastalığa ya da patolojiye spesifik olmalı.
- ❖ Hastalığın klinik göstergeleri ortaya çıkmadan daha önce (erken tanı) hastalığın güvenilir bir belirleyicisi olmalı.
- ❖ Hastalığın ilerlemesi ve terapötik cevaplara karşı hassas olmalı (uygulanan tedaviye cevap verebilmeli).

miRNA'lar yukarıda sayılı olan tüm özellikleri taşımaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu kalp hastalıklarında, çeşitli kanser türlerinde, virüs enfeksiyonlarında ve daha birçok hastalıkta miRNA'lar biyomarkır olarak kullanılabilmektedir.

miRNA'ların biyomarkır olarak kullanılmasıyla insana yönelik uygulamaların yanı sıra ekonomik olarak önemli olan çiftlik hayvanları için geliştirilen ilaçların analizinde, et verimi, süt verimi ve tüy verimi gibi çeşitli özelliklerin erkenden belirlenmesinde de kullanılabileceği belirtilmiştir (Becker et al., 2011).

2. MATERYAL VE METOT

miRNA dizileri canlılar arasında evrimsel süreçte büyük ölçüde korunmuşluk göstermektedir (Zhou and Liu, 2010). Bu konu baz alınarak, bilgisayar temelli yaklaşımlar ile evrimsel olarak korunmuşluk gösteren dizilerin dizi homolojisinden yararlanılarak yeni miRNA adayları saptanabilmektedir (Jin et al., 2009; Sheng et al., 2011; Zhou and Liu, 2010). miRNA'ların ikincil yapı analizleri ise evrimsel korunmuşluk gösteren dizilerin ve saç tokası yapısının termodinamik stabilitesi temel alınarak ve bunlarla ilişkili veri tabanları kullanılarak saptanabilmektedir. Biyoinformatik yöntemler kullanılarak yeni miRNA adaylarının saptanması başlıca birkaç adımdan oluşmaktadır (Şekil 2.1) (Sheng et al., 2011; Zhou and Liu, 2010). Bunlar:

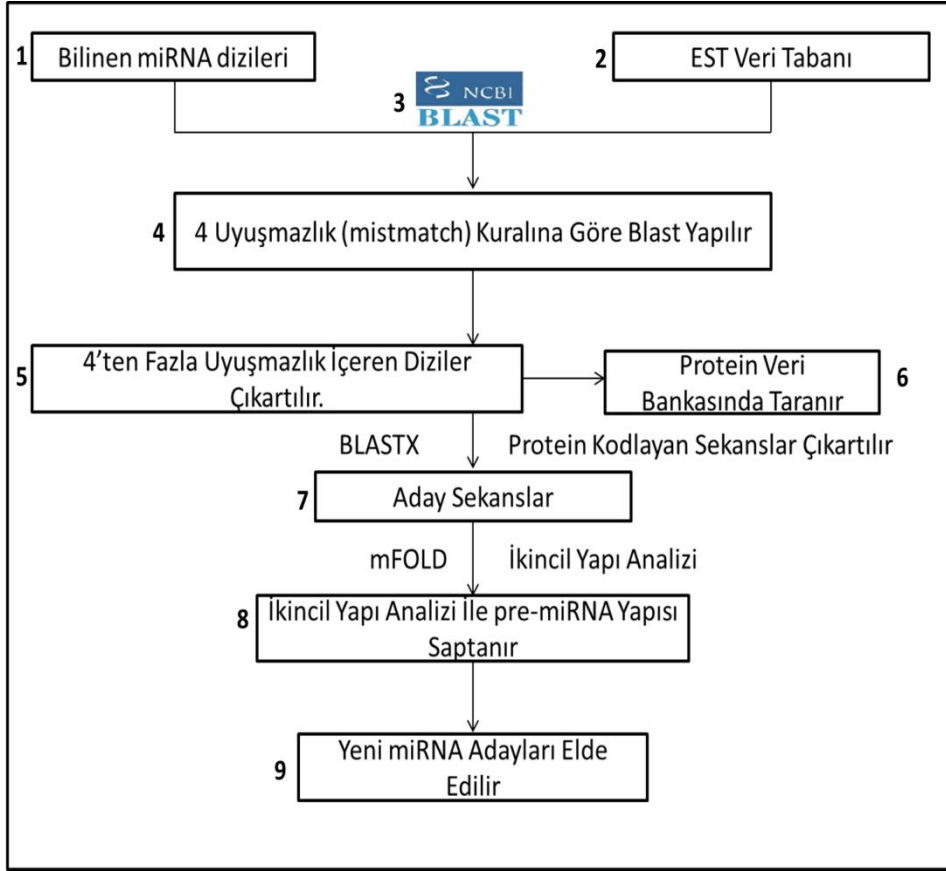
1. Çalışılacak olan organizmaya evrimsel olarak yakın akrabaları arasından miRNA dizileri veri tabanında yer alan bir organizma seçilir ve bu seçilen evrimsel akrabanın dizileri veri tabanından (miRBase) elde edilir.
2. Elde edilen diziler EST (Expressed Sequence Target) veri tabanında Blastn programı kullanılarak analiz edilir.
3. 4 nükleotidden fazla yanlış eşleşme gösteren diziler çıkartılır ve elde kalan diziler Blastx programı kullanılarak protein karşılığı olup olmadığının analizi yapılır.
4. Protein kodlayan diziler çıkartılır ve elde kalan diziler ile bir sonraki basamağa geçilir.
5. Elde kalan diziler ikincil yapı analizine alınır ve saç tokası yapıları RNA Fold veya mFOLD programları kullanılarak analiz edilir. İkincil yapı analizi için baz alınan dizinin prekürsör yapısına benzetilerek aynı uzunlukta bölge seçilir. Bu adımda aday dizilerin pre-miRNA yapılarının en iyi şekilde katlanması, saç tokası yapısına benzemesi ve ayrıca saç tokası yapısının minimum katlanma enerjilerinin (MFE) -19.00°C'den küçük olması beklenir. Katlanma enerjisi nükleotidler

arasındaki bağı kuvvetini ve saç tokası yapısının kararlılığını belirlemede önemli bir kriterdir.

Bu kriterlerin yanı sıra belirlenen dizilerde Guanin (G) ve Sitozin (C) oranı yaklaşık %50-60 aralığında olmalıdır. Yeni saptanmış olan aday miRNA'nın saç tokası yapısında olgun miRNA dizilerinin katlanma bölgesine gelmemesine dikkat edilmelidir (Sheng et al., 2011; Zhou and Liu, 2010).

Bu işlemler sonrasında saptanmış olan miRNA'lar yayına dönüştürüldükten sonra miRBase veri bankasına kaydedilmek için başvuru yapılır (Sheng et al., 2011; Zhou and Liu, 2010).

Yukarıda belirtilen basamaklar takip edilerek yeni miRNA adayları saptanmaktadır. miRNA geni tahmini için biyoinformatik tekniklerin temel basamakları Şekil 2.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.1: Biyoinformatik yöntemler ile aday miRNA elde edilmesi. Ayrıca bu çalışma için izlenen yöntem şu şekildedir: **1)** miRBase’de kayıtlı olan *Bos taurus* (sığır)’a ait olan miRNA’lar bu

çalışmada temel alınmıştır. **2)** NVBI üzerinden blast programı kullanılarak *Capra hircus* 'un EST veri tabanında NCBI Blastn **(3)** kullanılarak bilinen sığır dizileri keçi genomunda taratılmıştır. **4)** Blast sırasında baz alınan sığır dizileri ile EST dizileri arasında en fazla 4 yanlış eşleşme olmalıdır. **5)** 4 nükleotitten fazla uyumsuzluk gösteren diziler çıkartılır ve elde kalan dizilerin **(6)** Blastx programı aracılığıyla protein karşılığı olup olmadığına bakılır. Protein kodlayan diziler devre dışı bırakılır ve aday sekanslar elde edilir. **7)** Elde edilen aday sekanslar ikincil yapı analizi için (hair pin yapısı) **(8)** mFOLD programı yardımı ile katlanır ve düzgün saç tokası yapısı içeren diziler belirlenir. **9)** Düzgün saç tokası yapısı içeren ve katlanma enerjisi uyumlu olan miRNA'lar bu adımların sonucunda belirlenmiş olur.

Bu çalışmada bilgisayar temelli biyoinformatik yöntemler ile olası miRNA adayları saptanmıştır. Çalışılan organizma *Capra hircus* 'a evrimsel açıdan yakın akraba olan *Bos taurus* 'a ait mevcut 808 adet miRNA dizisi miRBase veri tabanı üzerinden elde edilmiştir. Elde edilen miRNA paternleri NCBI BlastN programı ile analiz edilmiştir. 4 uyumsuzluk kuralı ile uyuşan dizilerin protein karşılıklarının olup olmadığı BlastX programı ile kontrol edilmiştir. Elde edilen dizilerin ikincil yapı analizi mFOLD veya RNAFold programları ile yapılmış ve düzgün saç tokası yapısı gösteren diziler elde edilmiştir.

3. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda homoloji temelli biyoinformatik yöntemler kullanılarak toplam 35 adet aday miRNA dizisi saptanmıştır. Elde edilen yeni miRNA adayları Tablo 3.1’de belirtilmiştir. Ayrıca saptanmış olan miRNA’ların prekürsör yapıları ekte yer almaktadır.

Bu çalışma kapsamında elde edilen biyoinformatik verilere bakıldığında bilgisayar temelli yaklaşımlar ile kısa sürede ve az bütçeyle olası aday miRNA dizisi tahmin edilmiştir. Bu çalışma öncesinde miRNA veri tabanlarında *Capra hircus* ile ilgili 09.11.2015 tarihi itibari ile miRBase veri tabanına kayıtlı toplam 267 adet prekürsör miRNA dizisi bulunmaktadır. Bu durum diğer Ruminantlarla kıyaslandığında keçiye ait miRNA kütüphanesinin oldukça kısıtlı olduğunu göstermektedir. Bu çalışma ile birlikte homoloji temelli biyoinformatik yaklaşım ile saptanan bu miRNA’ların hastalıklarla olan ilişkisi araştırılıp miRNA tabanlı ilaçlar üretilebilir ve bulunan miRNA’ların hücre içindeki fonksiyonları araştırılarak süt verimi, et verimi vb. gibi konularla ilgili olan miRNA’lar saptanıp hayvancılıkta ıslah çalışmalarında kullanılması mümkün olabilecektir. Bu çalışma sonucunda da bulunan miRNA’ların bundan sonra yapılacak olan genetik çalışmalara bir taban oluşturacağı düşünülmektedir.

	miRNA	<i>Bos taurus</i> miRNA Dizisi	<i>Capra hircus</i> Aday miRNA Dizisi	İdentifikasyon	Katlanma Enerjisi	EST Erişim Numarası
1	miR-339b	UCCCUGUCCUCCAGGAGCUC	UCCCCGUCCUUCAGGAGCUC	18/20	-35.90	EV439751
2	miR-568	AUGUAUAAAUGUAUACACAC	AUGUAUAAAUGUAUACACAC	20/20	-30.10	EV446364
3	miRR-574	UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGUG	AGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUG	21/24	-6.70	EV438994
4	miR-658	GGCGGAGGGAAGCGGGUCCGUUGGU	GGAGGGAAGCGGGUCCGUUGGU	22/25	-29.20	EV436708
5	miR-1260b	AUCCCACCACUGCCACCA	UCCCACCACUGGCACC	16/18	-29.70	EV443337
6	miR-1282	UCGUUUGCCUUUUUCUGCUU	UCGUUUGCCUUUUUCUGCUU	20/20	-24.20	EV438756
7	miR-1777a	UGGGGGCGGUGGGGGGCGGG	GGGGCGGTGGGGGGCGG	17/20	-31.30	EV439734
8	miR-1777b	GGGGGCGGUGGGGGGCGGGG	GGGGGCGGGGGGGGTGGGG	18/20	-40.20	EV443080
9	miR-2284y-1	AAAAGUUCGUUCGGGUUUUUC	AAAAGUUCAUUUGGGUGUUUC	18/21	-38.70	EV444649
10	miR-2284y-2	AAAAGUUCGUUCGGGUUUUUC	AAAAGUUCAUUUGGGUGUUUC	18/21	-32.90	EV444649
11	miR-2284y-3	AAAAGUUCGUUCGGGUUUUUC	AAAAGUUCAUUUGGGUGUUUC	18/21	-32.10	EV444649
12	miR-2284y-4	AAAAGUUCGUUCGGGUUUUUC	AAAAGUUCAUUUGGGUGUUUC	18/21	-35.40	EV444649
13	miR-2284y-5	AAAAGUUCGUUCGGGUUUUUC	AAAAGUUCAUUUGGGUGUUUC	18/21	-37.10	EV444649
11	miR-2284y-6	AAAAGUUCGUUCGGGUUUUUC	AAAAGUUCAUUUGGGUGUUUC	18/21	-28.80	EV444649
15	miR-2285g-1	AAACCUGAACAAGCUUUUUGG	CUGAACAAACUUUUUGG	17/21	-17.80	EV444985
16	miR-2285g-2	AAACCUGAACAAGCUUUUUGG	CUGAACAAACUUUUUGG	17/21	-26.00	EV444985
17	miR-2304	GGUUGUGUGGUUGUGUGUGU	GGUUGUGGGGGUGUGUGUGU	18/20	-16.70	GO599600.1
18	miR-2305	CGGGGGUGGCGGGGAGGGG	CGGGGGUGGGGGGUGGGG	18/20	-13.50	EV436725
19	miR-2306	CAGGCCUGCCCAUCUAGGACAC	GGCCUGGCCAUCUACGACAC	18/22	-14.70	EV447478
20	miR-2312	AAAACCUGAACGAACUUUUC	AAAACCAGAACCAACUUUU	17/20	-26.00	EV444649
21	miR-2325a	GUUUUGUUUGGGUUUUUUUC	GUUUUGGUGGGGUUUUUUU	17/20	-16.80	EV443424
22	miR-2325b	AGGUUGUUUGGUUUUGUGUU	GGUUAUUUGGUUUUUUGUU	17/20	-10.90	GO599581
23	miR-2326	CCCCCUUCCUCUGGAAAAA	CCCCCUUCUUCUGGAA	17/20	-13.06	EV445372
24	miR-2381	CAGGCUGCUCUGUGCUUGGCU	CAGGCUGCCCUCUGCUUGG	19/21	-18.90	EV442247
25	miR-2409	UCUCACAUGGACGCUGCCCU	UCACAUGGAGCUGCCCU	17/20	-19.50	EV443639
26	miR-2421	UAUUUUUUUGUUUCGUGUUU	UUUUUUUUUUUCGGGUUU	16/18	-12.90	EV447673
27	miR-2423	UUGUGUGGUUGUUGUUUUCCU	UGUGUGGUUGGUGUUUU	17/21	-16.50	GO599613
28	miR-2449	UGGGCAGGAGACAGCAGGGC	UGGGCAGGAGGCAGCAG	17/20	-28.10	EV442783

29	miR-2454-5p	CUGGGGGCUGCCAGGCAGGAGGC	CUGGGGACUGUCAGGCAGG	19/23	-28.40	EV447846
30	miR-2482	GUAGUUUUCUUUGUCGUUUU	UUUUCUUUGUUGUUUU	16/20	-15.00	EV442297
31	miR-2881	GGGGCGGGGGGGCGGGUG	GGGGCGGGGGGGCGGG	16/18	-26.90	EV445867
32	miR-2897	GGUGGGAGGGUCCCACCGAG	GGUGGGAAGGUCCCACC	17/20	-34.80	EV440542
33	miR-6527	CACGUGGACGAAGAGAUGGGA	CACGUGGACGAAGAGAUGGGA	21/21	-17.70	EV440068
34	miR-6528	AGAGGGAAGAGGGAAGGAGG	AGGGAAGAGGAAAGGAGG	18/20	-18.00	EV447462
35	miR-7865	CAGGGAGGGCAGGGGAGGG	CAGGGAGGACAGGGCAGGG	17/19	-31.30	EV448270

Tablo 3.1: *Capra hircus* (keçi) genomunda biyoinformatik yöntemler kullanılarak saptanmış olan aday miRNA'lar listesi.

4. TARTIŞMA

miRNA'lar ökaryotlarda ve virüslerde gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileri olarak bilinmektedirler (Pritchard et al., 2012) ve keşfedildikleri günden itibaren tıbbi, biyolojik ve zirai bilimlerde önemli gelişmelere neden olmuşlardır. Normal fizyolojik durumlarda veya hastalık durumlarında hücrel ve çevresel sinyallerin algılanması ayrıca cevap verilmesi ve bunlarla birlikte gen ekspresyon sürecinde kilit düzenleyiciler olarak birçok biyolojik süreci etkileyebilmeleri ve böylece genlerin ekspresyonunun kontrolünü çok geniş bir organizmal skalada gerçekleştirmeleri miRNA'ların üzerinde yapılan araştırmaları arttırmış ve önemli araştırma konularından biri haline getirmiştir (Carrington and Ambros, 2003; Pritchard et al., 2012). miRNA'lar ayrıca hastalıklarda biyomarkır olarak kullanabilmektedir ve bu nedenle de miRNA profilendirme çalışmaları hız kazanmıştır (Pritchard et al., 2012). miRNA'lar bilgisayar temelli biyoinformatik yöntemler kullanılarak ya da deneysel yöntemler kullanılarak analiz edilebilmektedir.

Sığır dokularında yapılan daha önceki çalışmalarda, on sığır dokusundan toplamda 13451 adet kısa RNA dizisi içeren bir RNA kütüphanesi oluşturulmuş ve bu RNA'lar sekanslanmıştır. Bu çalışmada 29 adet yeni miRNA adayı saptanmıştır (Jin et al., 2009).

Sığır üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise klonlama tekniği kullanılarak 59 adet yeni miRNA adayı elde edilmiştir ve saptanan aday miRNA'larının beşinin hiçbir memeli miRNA'sı ile homoloji göstermediği saptanmıştır (Gu et al., 2007).

2009 yılında domuzlarda yapılan bir çalışmada ise yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak domuz genomunda ve diğer bazı memelilerde korunmuş olan 120 adet korunmuş miRNA homoloğu saptanmıştır (Reddy et al., 2009). Bu sonuçlar yeni nesil deep sequencing yöntemi daha hızlı ve daha çok sayıda miRNA dizisinin saptanmış olduğunu göstermektedir. Fakat yeni nesil yöntemler diğerleri ile kıyaslandığında daha maliyetlidir.

Sığır genomunda homoloji temelli yaklaşımlar kullanılarak insan, fare, koyun ve köpek genomlarında bilinen miRNA'ları kullanılarak 254 adet yeni sığır miRNA'sı saptanmış ve bu miRNA'ların bazıları laboratuvar çalışmaları ile desteklenmiştir (Long and Chen, 2009).

Biyoinformatik yöntemler kullanarak 2010 yılında yapılan bir çalışmada insan ve fare miRNA'ları domuz genomunda taratılmış ve homoloji gösteren yeni 65 adet domuz miRNA'sı saptanmıştır (Zhou and Liu, 2010).

Keçi genomunun sekanslanmasının ardından miRNA çalışmaları da hız kazanmıştır. 2012 yılında keçi meme dokusu üzerinde yapılan çalışmalarda biyoinformatik ve solexa yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılarak, koyun genomu ile homoloji gösteren 31 yeni miRNA saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada keçilerin süt verme evreleri ile ilişkili olduğu düşünülen 10 adet miRNA saptanmıştır (Ji Z et al, 2012). Yapılan bir başka çalışmada ise keçi derisinden ve sırt kasından alınan örnekler ile çalışılmış ve RT-PCR validasyon analizleri sonucunda 5 adet yeni miRNA saptanmıştır (Rui Su et al, 2013). 2013 yılında Yanhong Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada yeni nesil dizileme ve RT-PCR validasyon analizleri sonucunda 83 adet yeni miRNA saptamışlardır (Yanhong Wang et al., 2013).

Keçi miRNA'ları üzerine yapılmış olan farklı bir çalışma ise kızışma döneminde olan çok doğuran ve tek doğuran keçilerden alınan örneklerle yapılmıştır. Bu çalışmada yeni nesil solexa dizileme yöntemi kullanılarak toplamda 120 miRNA saptanmıştır. Bu miRNA'lardan 53'ü yeni saptanmış olan miRNA dizileridir. Ayrıca bu çalışmada bir gebelikte birden fazla doğuran keçi ile tek bir yavru doğuran keçi miRNA profilleri karşılaştırılmış ve 24 miRNA'nın tek yavru doğuran keçide spesifik olarak daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır (An X. et al. / 2015).

Zhenyang Wu ve arkadaşları tarafından 2014'te yapılan bir başka araştırmada beyaz ve siyah renkli keçilerin kıl foliküllerinden RNA dizilemesi yapılmış ve sığır ve koyunda da korunmuş olan 205 adet miRNA saptamışlar fakat bunların 9 tanesi keçi genomu için yeni aday miRNA olarak bildirmişlerdir. Ayrıca yine aynı çalışmada renklere göre miRNA ekspresyon seviyelerini RT-PCR ile karşılaştırılmış ve siyah kıl foliküllerinde çoğu miRNA'nın yüksek seviyede

eksprese olduğunu fakat beyaz kıl foliküllerinde ise sadece miR-1307'nin düşük seviyede eksprese olduğunu saptamışlardır (Zhenyang Wu et al., 2014).

Yuxuan Song ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada keçi endometriumundan aldıkları örneklerle çalışmış ve keçi embriyolarında miRNA profillerndirmesi yapmışlardır. Bu çalışmada yeni nesil solexa dizileme yöntemi kullanmışlar ve 110 miRNA'nın yüksek seviyede eksprese olduğunu ve 33 miRNA'nın da düşük seviyede eksprese olduğunu saptamışlardır. Bu bulguların yanı sıra yaptıkları çalışmada 33 adet yeni miRNA saptadıklarını bildirmişlerdir (Yuxuan Song et al., 2015).

Örnek çalışmalarda da görüldüğü gibi miRNA saptamak için deneysel yöntemler ve homoloji tabanlı biyoinformatik yöntemler bulunmaktadır. Deneysel yöntemler de kendi içerisinde ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan biri klonlama tekniği diğeri ise yeni nesil dizileme tekniğidir. Yeni nesil dizileme tekniğinde, klonlama tekniğine göre daha fazla sayıda miRNA dizisi saptamak mümkündür fakat klonlama tekniğine göre çok daha maliyetlidir. Homoloji temelli biyoinformatik yöntemler ise diğer tekniklere göre daha az maliyetlidir. Deneysel yöntemlerde evrimsel açıdan korunmuşluk gösteren ya da göstermeyen miRNA dizileri saptanabilmektedir. Biyoinformatik yöntemlerde ise dizi homolojisi temel alınarak evrimsel açıdan korunmuşluk gösteren miRNA dizileri, karşılaştırma stratejisiyle belirlenebilmektedir. Her iki yöntem karşılaştırıldığında türler arası korunmuşluk göstermeyen miRNA dizilerinin saptanmasında deneysel yöntemler çok daha etkilidir. Bilgisayar temelli yaklaşımların olumsuz bir yanı ise deneysel yaklaşımlar ile desteklenmeye ihtiyaç duyulmasıdır. Fakat deneysel yöntemler ile karşılaştırıldığında çok daha hızlı, interaktif olarak erişilebilen, laboratuvar malzemeleri gerektirmeyen ve masrafsız bir yöntem olduğu için araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir (Unver et al., 2009). Bu nedenlerle bilim dünyasında biyoinformatik yöntemler gün geçtikçe önem kazanmakta ve gelişmektedir.

Bu çalışmada keçi genomunda olası aday miRNA'ların belirlenmesi amacıyla kısım 2.1'de belirtilen basamakları içeren biyoinformatik yöntemler kullanılarak olası aday miRNA dizileri saptanmıştır. Uygulanılan biyoinformatik yöntem sonucunda keçi genomunda aday 35 adet miRNA dizisi belirlenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1’de de görüldüğü gibi pre-miRNA dizilerinin mfold programı ile katlanması sonucunda oluşan ikincil yapılarının katlanma enerjisi -20.00 kcal/mol’den yüksek olan 15 adet aday pre-miRNA dizisi mevcuttur. Bu gibi sıra dışı durumlara miRBase veri tabanında kayıtlı olan dizilerde de sıkça rastlanmaktadır. Örneğin temel alınan sığır genomunda bulunan bta-miR-574 yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak saptanmıştır (Fuchs et al., 2012) ve miRBase kaydına göre katlanma enerjisi -11.40 kcal/mol’dür. Bu dizinin keçi genomunda homoloğu olarak saptamış olduğumuz dizinin ise katlanma enerjisi -14.30 kcal/mol’dür.

Bu çalışma kapsamında kısa zamanda bilgisayar temelli yaklaşımlar ile olası miRNA adayları saptanmıştır. Bu durum daha öncede literatürde belirtildiği gibi deneysel yöntemlere göre daha avantajlıdır (Unver et al., 2009). Bu çalışma sonucunda saptanmış olan miRNA’ların miRBase kaydı oldukça kısıtlı olan keçi miRNA havuzuna katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bu çalışma sonucunda saptanmış olan miRNA’ların deneysel yöntemler ile desteklenerek et verimi, süt verimi, tüy verimi ve çeşitli hastalıklarla olan ilişkileri araştırılarak daha sonra yapılacak olan genetik çalışmalara taban oluşturacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- An X., Song Y., Hou J., Li G., Zhao H., Wang J. and Cao B.** 2015, Identification and profiling of microRNAs in the ovaries of polytocous and monotocous goats during estrus. / *Theriogenology* 1–12pp.
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., and Lai, E. C.,** 2011, Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol* 12, 221pp.
- Bartel, D. P.,** 2004, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-97pp.
- Baskıcı M.,** 1998, Evcilleştirme Tarihine Kısa Bir Bakış, A.Ü.S.B.F. Dergisi, Cilt 53 Sayı 1-4, Ocak-Aralık, s.73-94.
- Becker C., Riedmaier, I., Reiter, M., Tichopad, A., Pfaffl, M. W., and Meyer, H.,** 2011, Changes in the miRNA profile under the influence of anabolic steroids in bovine liver. *Analyst* 136, 1204-9pp.
- Berezikov, E.,** 2011, Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat Rev Genet* 12, 846-60pp.
- Boon, R. A., and Vickers, K. C.,** (2013), Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 186-92pp.
- Caetano-Anollés, G.,** 2010, ‘Evolutionary Genomics and Systems Biology,’ Wiley-Blackwell.
- Carrington, J. C., and Ambros, V.,** 2003, Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301, 336-8pp.
- Diamond J.,** 2002, Evolution, consequences and future of plant and animal domestication, *Nature*, Vol 418, 8pp.
- Dong Y., Xie M., Jiang Y., Xiao N., Du X., Zhang W.,** 2013, Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*), *Nature Biotechnology* 31,135–141pp.

Driscolla C. A., Macdonald D. W., and O'Brien S. J., 2009, From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication, *PNAS*, vol. 106, suppl. 1, 9971–9978pp.

Etheridge A., Lee I., Hood L., Galas D., and Wang K., 2011, Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res* 717, 85-90pp.

Farazi T. A., Spitzer, J. I., Morozov, P., and Tuschl, T., 2011, miRNAs in human cancer. *J Pathol* 223, 102-15pp.

Fichtlscherer, S., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S., 2011, Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardio vascular disease, *Biol.* 2011;31:2383-2390pp.

Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S. and Mello C., 1998, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669):806-11pp.

Ghosh, Z., Chakrabarti, J., and Mallick, B., 2007, miRNomics-The bioinformatics of microRNA genes. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 6-11pp.

Gomes, C. P., Cho, J. H., Hood, L., Franco, O. L., Pereira, R. W., and Wang, K., 2013, A Review of Computational Tools in microRNA Discovery. *Front Genet* 4, 81pp.

Grassmann, R., and Jeang, K. T., 2008, The roles of microRNAs in mammalian virus infection. *Biochim Biophys Acta* 1779, 706-11pp.

Gündoğdu R., Çelik V., 2009, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 25 (1-2) 34 – 47s.

Ha T. Y., 2011, MicroRNAs in Human Diseases: From Lung, Liver and Kidney Diseases to Infectious Disease, Sickle Cell Disease and Endometrium Disease. *Immune Netw* 11, 309-23pp.

Hariharan M., Scaria V., Pillai B., and Brahmachari S. K., 2005, Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 1214-8pp.

He L., and Hannon, G. J., 2004, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5, 522-31pp.

James C. and Carrington., 2007, Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics* 8, 884 896pp.

Ji Z., Wang G., Xie Z., Wang J. and Zhang C., 2012, Identification of Novel and Differentially Expressed MicroRNAs of Dairy Goat Mammary Gland Tissues Using Solexa Sequencing and Bioinformatics. *PLoS ONE* 7(11): e49463. doi:10.1371/journal.pone.0049463.

Jin W., Grant J. R., Stothard P., Moore S. S., and Guan L. L., 2009, Characterization of bovine miRNAs by sequencing and bioinformatics analysis. *BMC Mol Biol* 10, 90pp.

Lagos J. M. A., 2008, Computational identification and evolutionary analysis of metazoan MicroRNAs, Texas A&M University, 152pp.

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., and Tuschl, T., 2001, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-8pp.

Lee H. C., Yang C. W., Chen C. Y. and Au L. C., 2011, Single point mutation of microRNA may cause butterfly effect on alteration of global gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 1065-9pp.

Liu N., Okamura K., Tyler D. M., Phillips M. D., Chung W. J. and Lai E. C., 2008, The evolution and functional diversification of animal microRNA genes. *Cell Res* 18, 985-96pp.

MacHugh, D.E. and Bradley D.G., 2001, Livestock genetic origins: goats buck the trend. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5382–5384pp.

Meadows J. R., Li K., Kantanen J., Tapio M., Sipos W., Pardeshi V., Gupta V., Calvo J. H., Whan V., Norris B., and Kijas J. W., 2005, Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *J Hered* 96, 494-501pp.

Monroig P. D. and Calin G. A., 2013, MicroRNA and Epigenetics: Diagnostic and Therapeutic Opportunities. *Curr Pathobiol Rep* 1, 43-52pp.

Napoli C., Lemieux C. and Jorgensen R., 1990, Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289pp.

Özcan, L., 1989, Küçükbaş Hayvan Yetiştirme I (Keçi Üretimi) Ç.Ü.Z. F. Zootekni Bölümü, Ders Kitabı No:111.

Philippidou D., Schmitt M., Moser D., Margue C., Nazarov P. V., Muller A., Vallar L., Nashan D., Behrmann I. and Kreis S., 2010, Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma. *Cancer Res* 70, 4163-73pp.

Place R. F., Li L. C., Pookot D., Noonan E. J. and Dahiya R., 2008, MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1608-13pp.

Pritchard C. C., Cheng H. H. and Tewari M., 2012, MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 13, 358-69pp.

Rhoads E. R., 2010, miRNA Regulation of the Translational Machinery (Progress in Molecular and Subcellular Biology), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Samal E., and Srivastava D., 2007, Role of microRNAs in Cardiovascular Biology. In 'Advances in Developmental Biology' (B. Rolf, ed.), Vol. Volume 18, 167-178 pp.

Samal E., Srivastava D., Ris-Vicari K., 2008, *Nature Biotechnology* 26, 400 – 401pp.

Sheng X., Song X., Yu Y., Niu L., Li S., Li H., Wei C., Liu T., Zhang L., and Du L., 2011, Characterization of microRNAs from sheep (*Ovis aries*) using computational and experimental analyses. *Mol Biol Rep* 38, 3161-71pp.

Song Y., An X., Zhang L., Fu M., Peng J. and Han P., 2015, Identification and Profiling of microRNAs in Goat Endometrium during Embryo Implantation. *PLoS ONE* 10(4): e0122202. doi:10.1371/journal.pone.0122202pp.

Su R., Fu S., Zhang Y., Wang R., Zhou Y., Li J. and Zhang W., 2013, Comparative genomic approach reveals novel conserved microRNAs in Inner Mongolia cashmere goat skin and longissimus dorsi. *Mol Biol Rep* (2015) 42:989–995 DOI 10.1007/s11033-014-3835-9pp.

Sullivan C. S. and Ganem D., 2005, MicroRNAs and viral infection. *Mol Cell* 20, 3-7pp.

Turchinovich A., Samatov T. R., Tonevitsky A. G. and Burwinkel B., 2013, Circulating miRNAs: cell–cell communication function? *Front. Genet* 4:119pp.

Türkiye İstatistik Kurumu Hayvan Yetiştiriciliği İstatistikleri, 2014, <https://biruni.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul>

Umbach J. L. and Cullen B. R., 2009, The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev* 23, 1151-64pp.

Unver T., Namuth-Covert D. M. and Budak H., 2009, Review of current methodological approaches for characterizing microRNAs in plants. *Int J Plant Genomics* 2009, 262463pp.

Vasudevan S., Tong Y. and Steitz, J. A., 2007, Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318pp.

Velu V. K., Ramesh R. and Srinivasan A. R., 2012, Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Health and Disease. *J Clin Diagn Res* 6, 1791-5pp.

Wang L., Zhang Y., Zhao M., Wang R. and Li J., 2015, SNP Discovery from Transcriptome of Cashmere Goat Skin , *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 28:1235-1243pp.

Wang Y., Zhang C., Fang X., Zhao Y. and Chen X., 2013, Identification and Profiling of microRNAs and Their Target Genes from Developing Caprine Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 9(5): e96857. doi:10.1371/journal.pone.0096857.

Wang Z. and Yang B., 2010, ‘MicroRNA Expression Detection Methods,’ Springer, Berlin Heidelberg, 978-3-642-04927-9pp.

Wu Z., Fu Y., Cao J., Yu M., Tang X. and Zhao S., 2014, Identification of Differentially Expressed miRNAs between White and Black Hair Follicles by RNA-Sequencing in the Goat (*Capra hircus*). *Int. J. Mol. Sci.* 15, 9531-9545pp.

Zeder M. A. and Hesse B., 2000, The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros mountains 10,000 years ago. *Science* 287, 2254–2257pp.

Zhang B., Wang Q. and Pan X., 2007, MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol* 210, 279-89pp.

Zhou B. and Liu H. L., 2010, Computational identification of new porcine microRNAs and their targets. *Anim Sci J* 81, 290-6pp.

ÖZGEÇMİŞ

Egemen Erdem GÜLER

Tel: 0 535 065 61 89

Adres: 263 Sokak No:13 Daire:5 Kozağaç Mah. Buca / İZMİR

E-mail: egemenerdemguler@gmail.com

Doğum Tarihi : 02.08.1990

Doğum Yeri : İzmir

Uyruğu : T.C.

Medeni Hali : Bekar

Eğitim Durumu :

2013 – 2015 **Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

Biyoloji Ana Bilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

2007 – 2013 **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü**

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Yabancı Diller :

İngilizce

(Okuma: İyi – Yazma: İyi – Konuşma: Orta)

Bilgisayar Bilgisi : Windows

MS Office (İleri Seviyede)

İlgili Olduğu Bilimsel Alanlar: Biyoinformatik, miRNA, Kanser ve miRNA ilişkisi, Evrimsel Genetik, Moleküler Biyoloji.

Sosyal Alanlar: Müzik, Siyaset, Felsefe, Basketbol, Kitap.

Katılmış Olduğu Kongre ve Sempozyumlar

1. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi – Ege Üniversitesi (Katılımcı)
2. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi – Eskişehir / Osmangazi Üniversitesi, Keçi Genomunda Biyoinformatik Yöntemler Kullanılarak Yeni miRNA’ların Saptanması, Egemen Erdem GÜLER, Cemal ÜN. – Sözlü sunum.
3. Ecology and Evolutionary Biology Symposium 2015 – Ankara / ODTÜ, Analysing of Conserved miRNAs in Ruminants by Computational Approaches, Egemen Erdem GÜLER, Cemal ÜN. – Poster Sunumu.

EKLER

Ek 1 Aday *Capra hircus* (chi) miRNA'ları

Ek 1 (1) Aday chi- miR-339b

Ek 1 (2) Aday chi- miR-568

Ek 1 (3) Aday chi- mirR-574

Ek 1 (4) Aday chi- miR-658

Ek 1 (5) Aday chi- miR-1260b

Ek 1 (6) Aday chi- mir-1282

Ek 1 (7) Aday chi- mir-1777a

Ek 1 (8) Aday chi- miR-1777b

Ek 1 (9) Aday chi- miR-2284y-1

Ek 1 (10) Aday chi- miR-2284y-2

Ek 1 (11) Aday chi- miR-2284y-3

Ek 1 (12) Aday chi- miR-2284y-4

Ek 1 (13) Aday chi- miR-2284y-5

Ek 1 (14) Aday chi- miR-2284y-6

Ek 1 (15) Aday chi- mir-2285g-1

Ek 1 (16) Aday chi- mir-2285g-2

Ek 1 (17) Aday chi- miR-2304

Ek 1 (18) Aday chi- miR-2305

Ek 1 (19) Aday chi- miR-2306

Ek 1 (20) Aday chi- miR-2312

Ek 1 (21) Aday chi- miR-2325a

Ek 1 (22) Aday chi- miR-2325b

Ek 1 (23) Aday chi- miR-2326

Ek 1 (24) Aday chi- miR-2381

Ek 1 (25) Aday chi- miR-2409

Ek 1 (26) Aday chi- miR-2421

Ek 1 (27) Aday chi- miR-2423

Ek 1 (28) Aday chi- miR-2449

Ek 1 (29) Aday chi- miR-2454-5p

Ek 1 (30) Aday chi- miR-2482

Ek 1 (31) Aday chi- mir-2881

Ek 1 (32) Aday chi- miR-2897

Ek 1 (33) Aday chi- miR-6527

Ek 1 (34) Aday chi- miR-6528

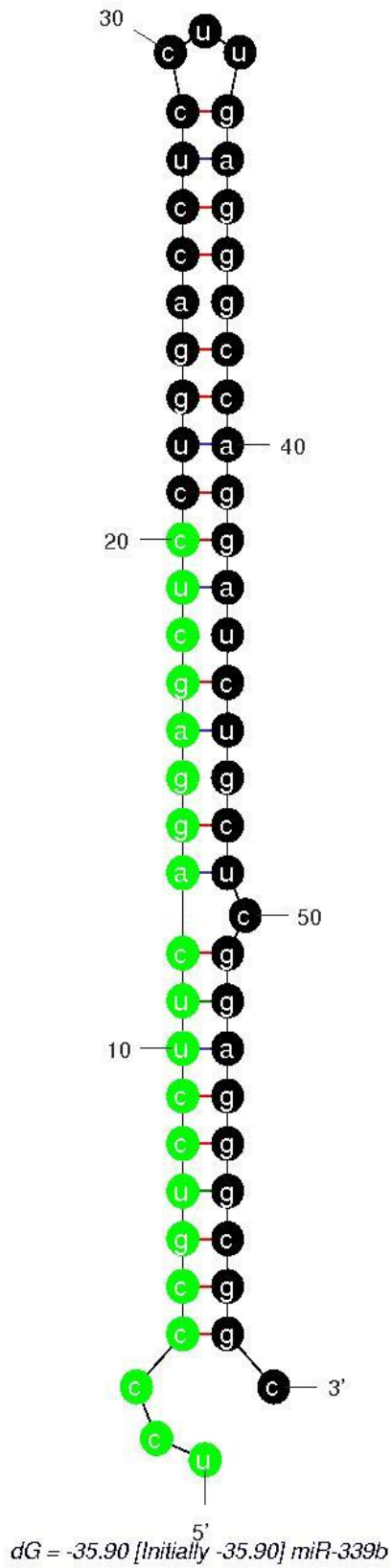
Ek 1 (35) Aday chi- miR-7865

Şekiller üzerinde yeşil ile işaretlenmiş bölgeler olgun miRNA dizilerini göstermektedir.

Ek 1 (1) Aday chi- miR-339b

Output of sir_graph (9)
mfold_util 4.6

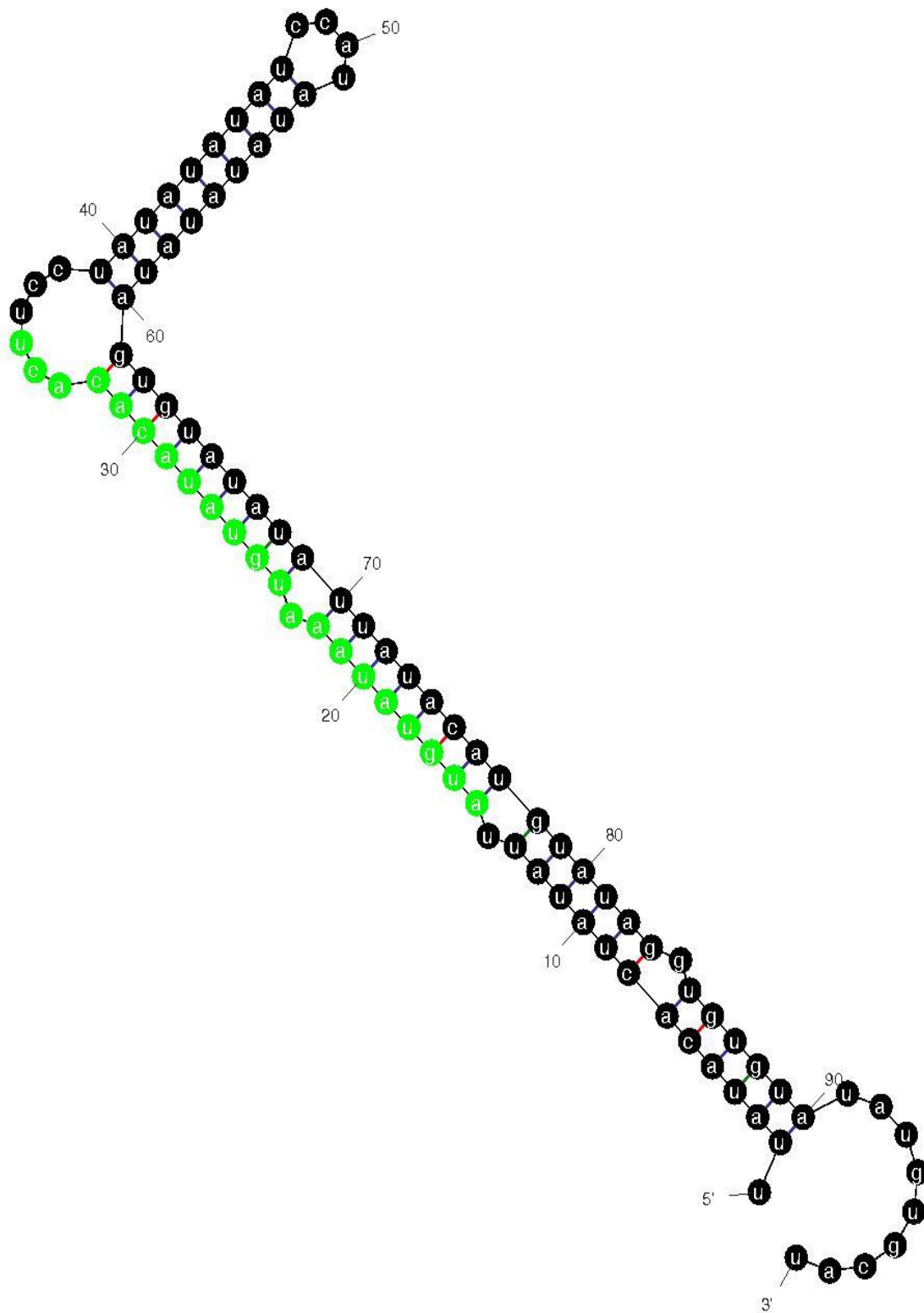
Created Wed Mar 4 15:19:40 2020



Ek 1 (2) Aday chi- miR-568

Output of sir_graph (©
mfold_util 4.5

Created Wed Mar 4 15:35:21 2015

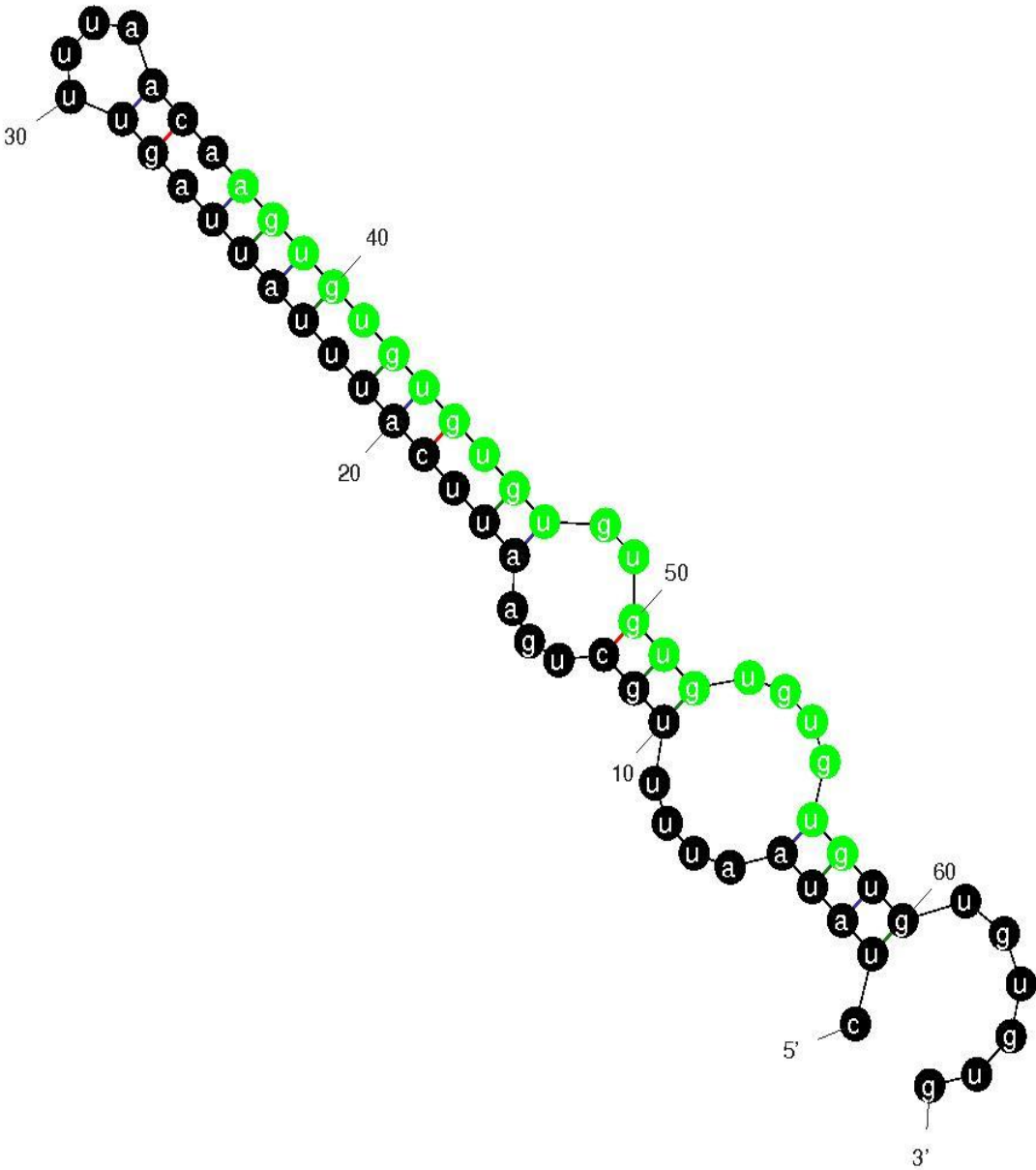


$dG = -30.10$ [Initially -30.10] chi-miR-568

Ek 1 (3) Aday chi- mirR-574

Output of sir_graph (6)
mfold_util 4.6

Created Thu Mar 5 15:43:52 2015

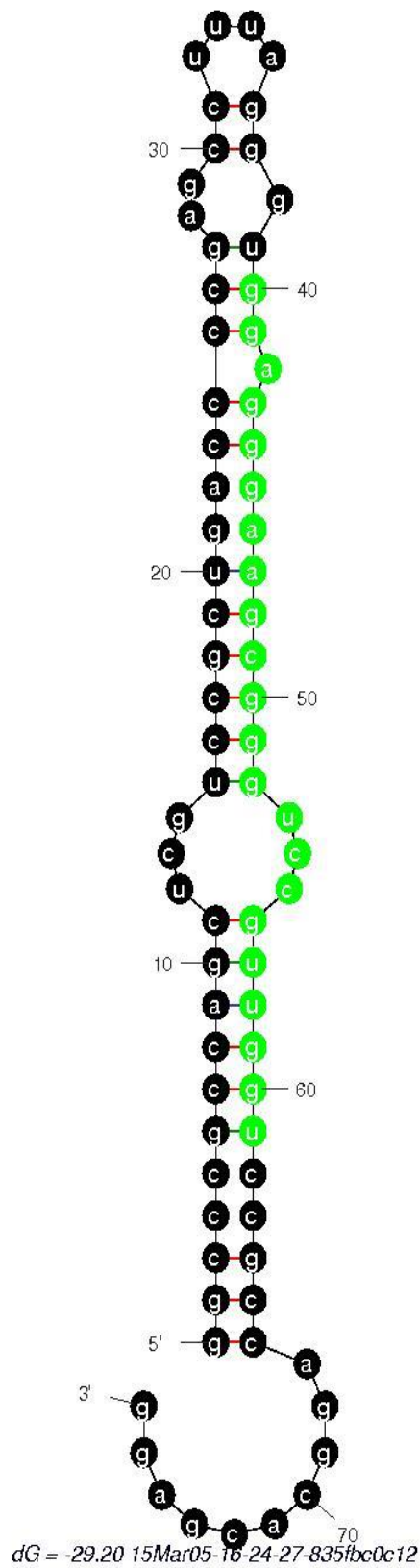


$dG = -6.70$ mir-574

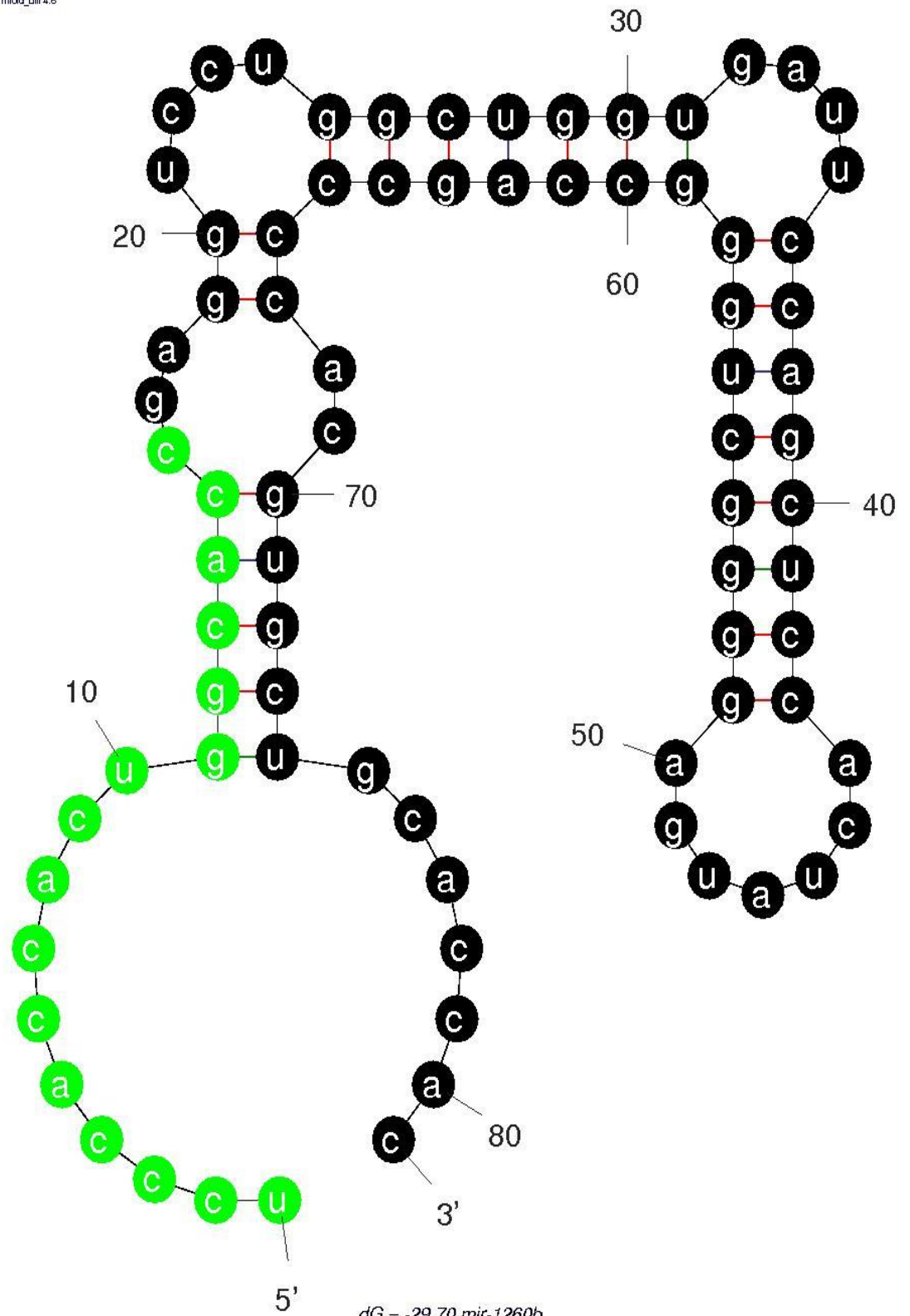
Ek 1 (4) Aday chi- miR-658

Output of `sn_graph` (9)
mfold_v4.5

Created Thu Mar 5 16:24:29 2015



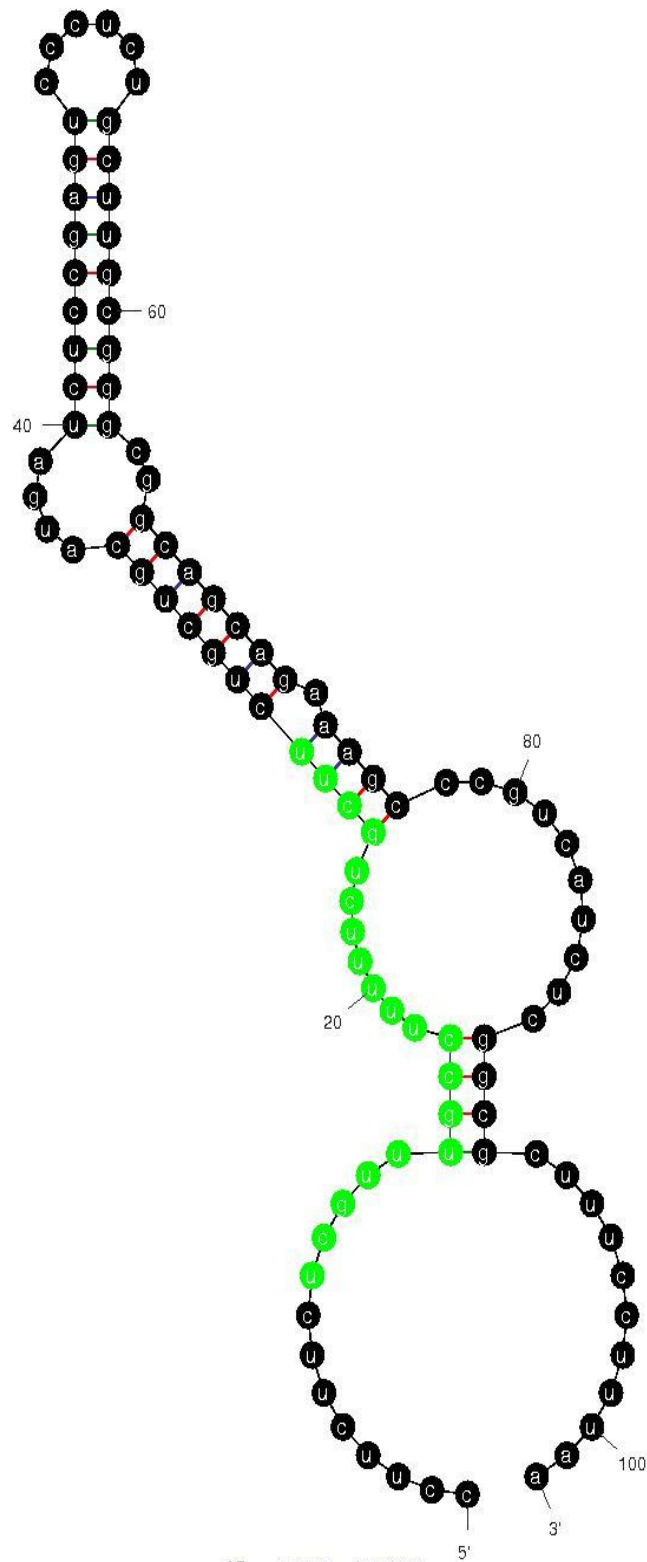
Created Thu Mar 5 16:46:21 2015



Ek 1 (6) Aday chi- mir-1282

Output of sir_graph (9)
mfold_v4.5

Created Thu Mar 5 16:58:29 2015

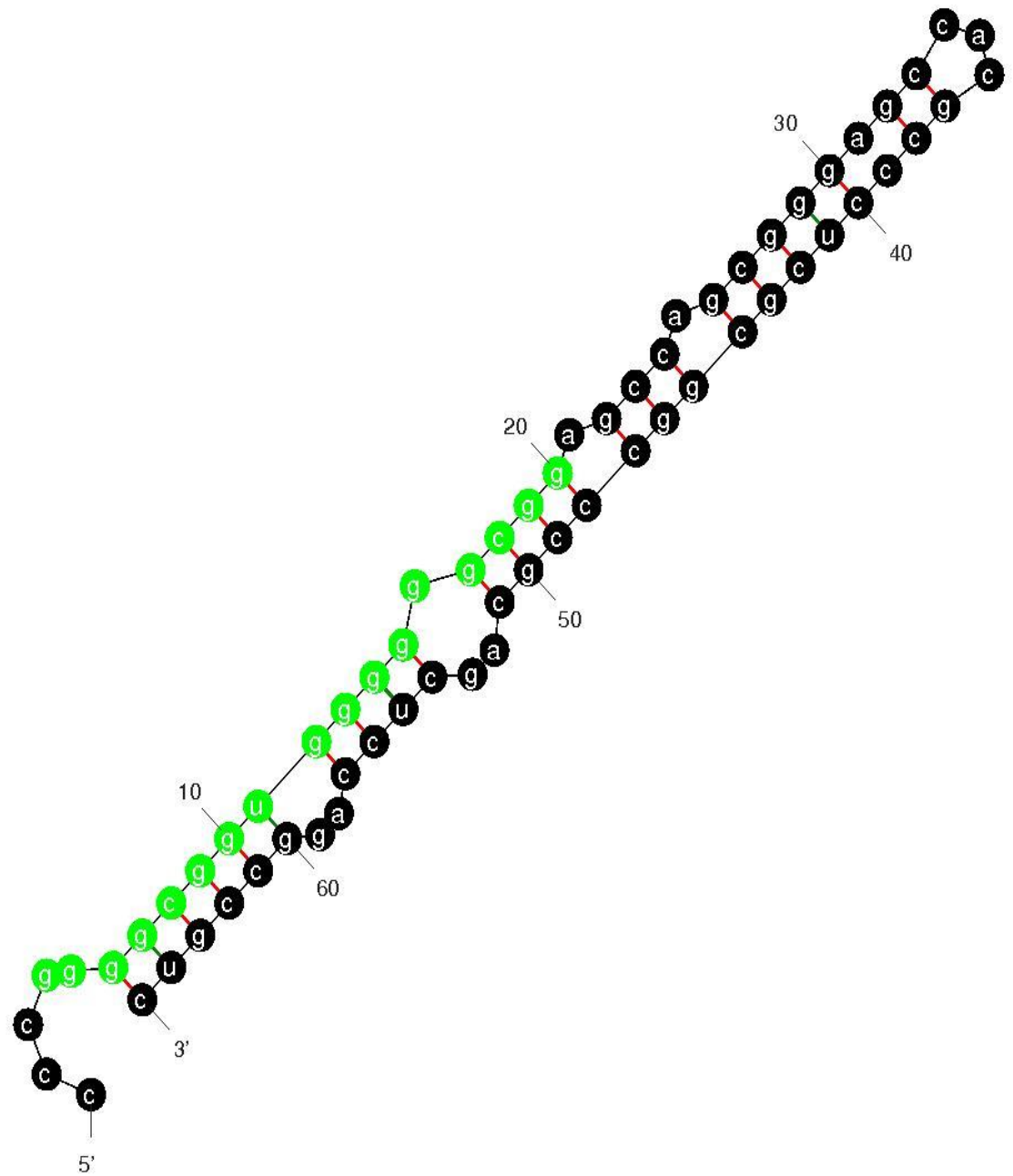


$dG = -24.20$ mir-1282

Ek 1 (7) Aday chi- mir-1777a

Output of `sir_graph` (C)
mfold_util 4.6

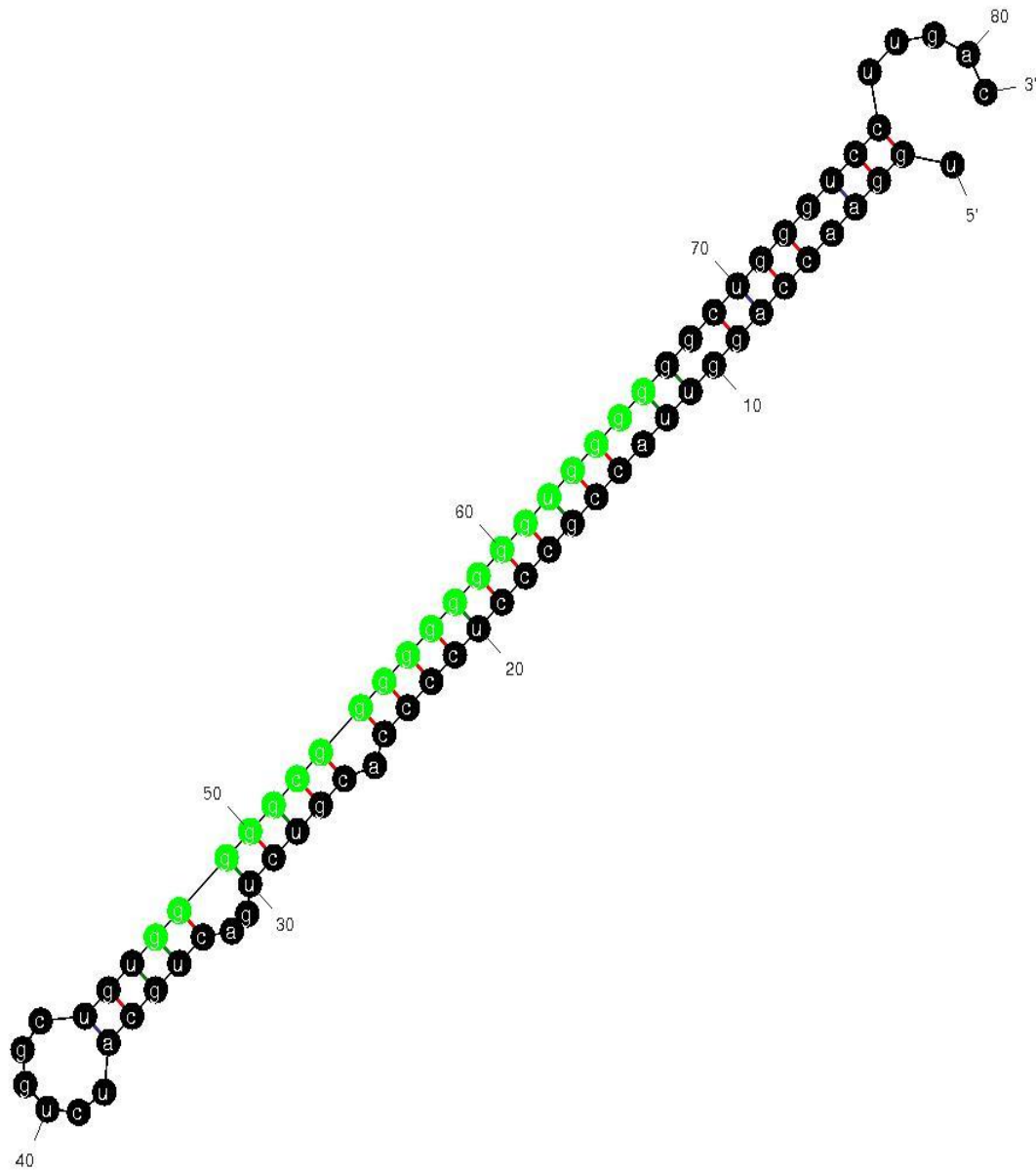
Created Thu Mar 5 17:13:13 2015


$$dG = -31.30 \text{ mir-1777a}$$

Ek 1 (8) Aday chi- miR-1777b

Output of air_graph (9)
mfold_v4.6

Created Thu Mar 5 17:22:53 2015

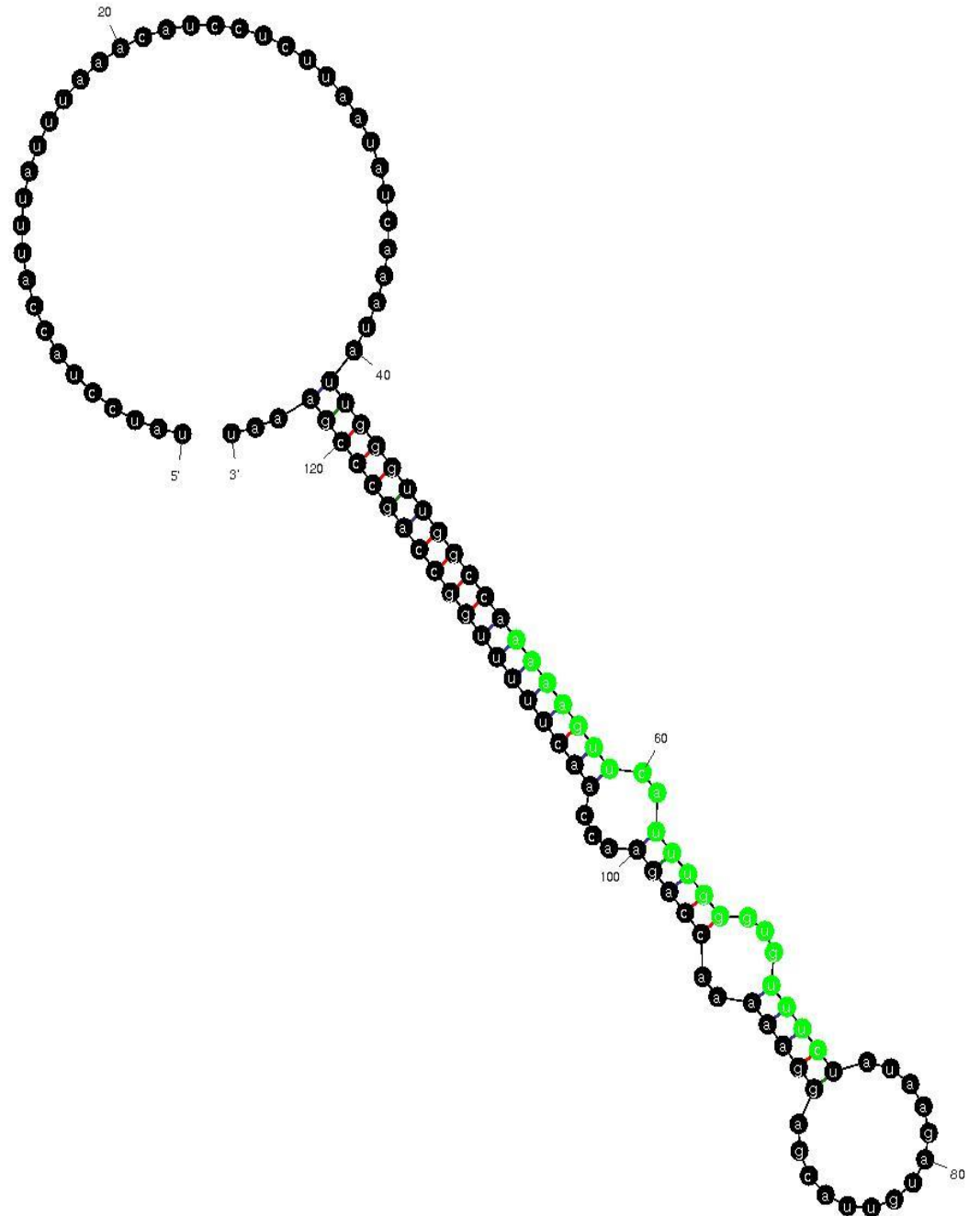


$dG = -40.20$ 15Mar05-17-22-51-7bddb4d3ca

Ek 1 (9) Aday chi- miR-2284y-1

Output of air_graph (9)
mfold_util 4.6

Created Mon Mar 16 09:12:38 2015

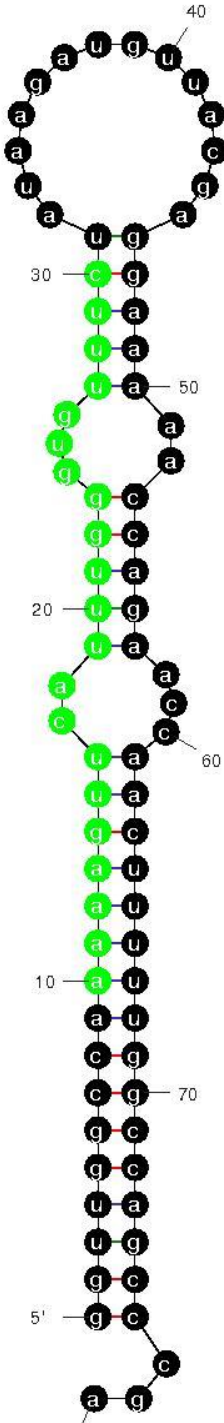


$dG = -38.70$ [initially -38.70] 15Mar16-09-12-35-64f796f662

Ek 1 (10) Aday chi- miR-2284y-2

Output of `sir_graph` (C)
mfold until 4.6

Created Mon Mar 16 09:22:24 2015

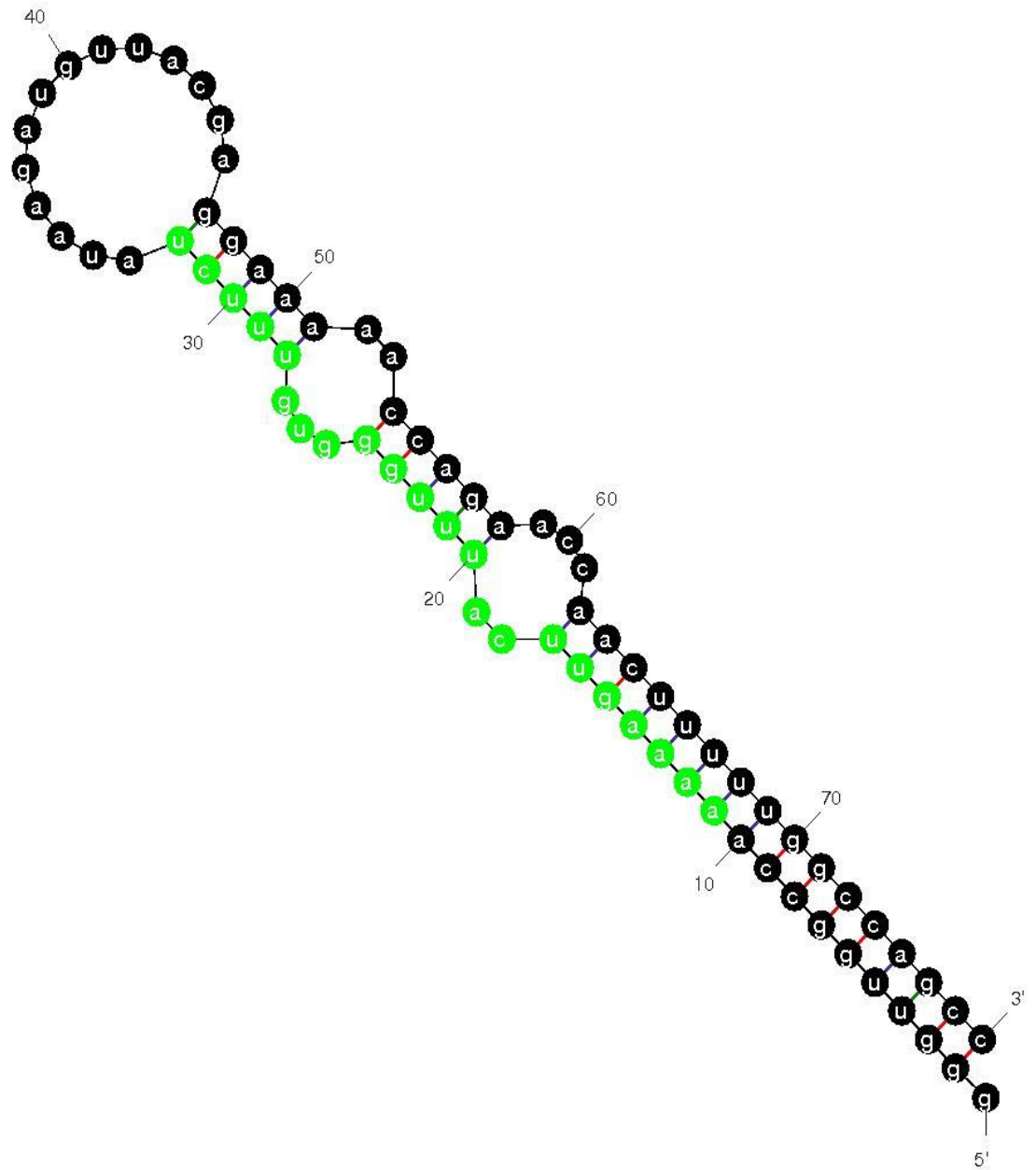


$dG = -32.90$ [Initially -32.90]^{3'} 15Mar16-09-22-21-c4ebc24798

Ek 1 (11) Aday chi- miR-2284y-3

Output of sir_graph (9)
mtold_util 4.6

Created Tue Nov 10 18:07:16 2015

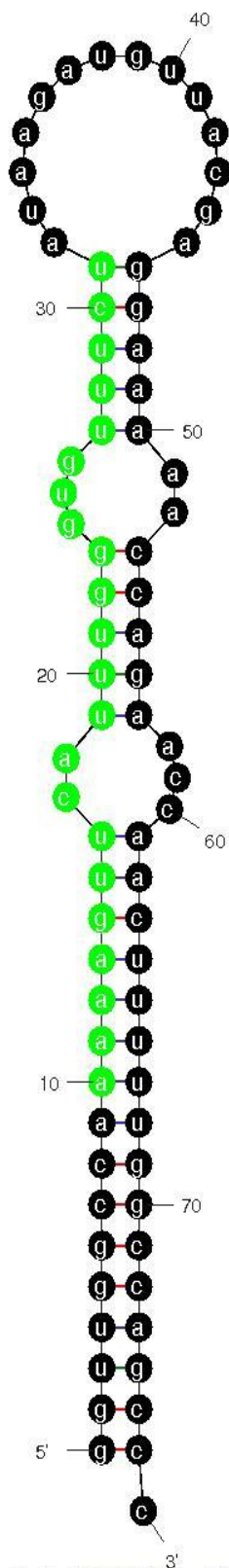


$dG = -32.10$ [Initially -32.10] 15Nov10-18-07-14

Ek 1 (12) Aday chi- miR-2284y-4

Output of `gir_graph` (©
mold_till 4.6

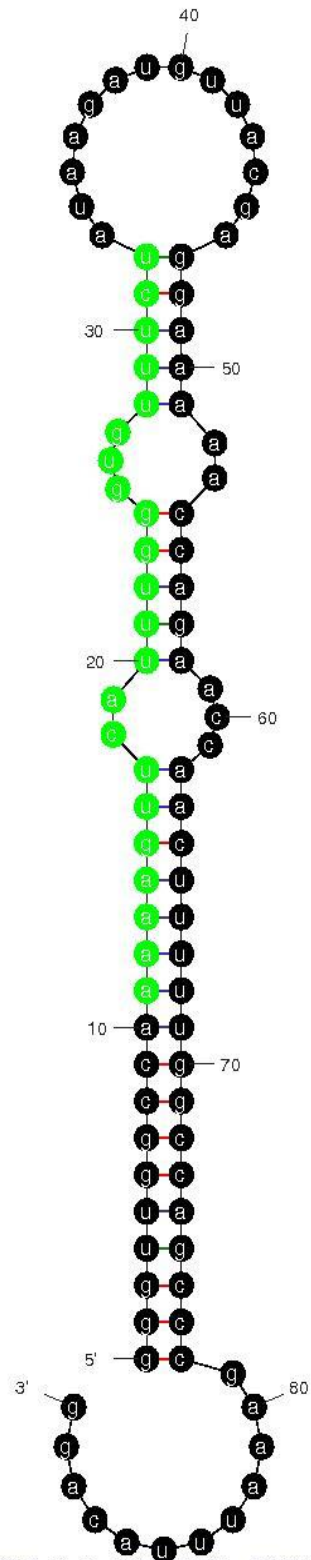
Created Tue Nov 10 18:11:36 2015


$$dG = -32.90 \text{ [Initially } -32.90] \text{ 15Nov10-18-11-35}$$

Ek 1 (13) Aday chi- miR-2284y-5

Output of sir_graph (6)
mfold_util 4.6

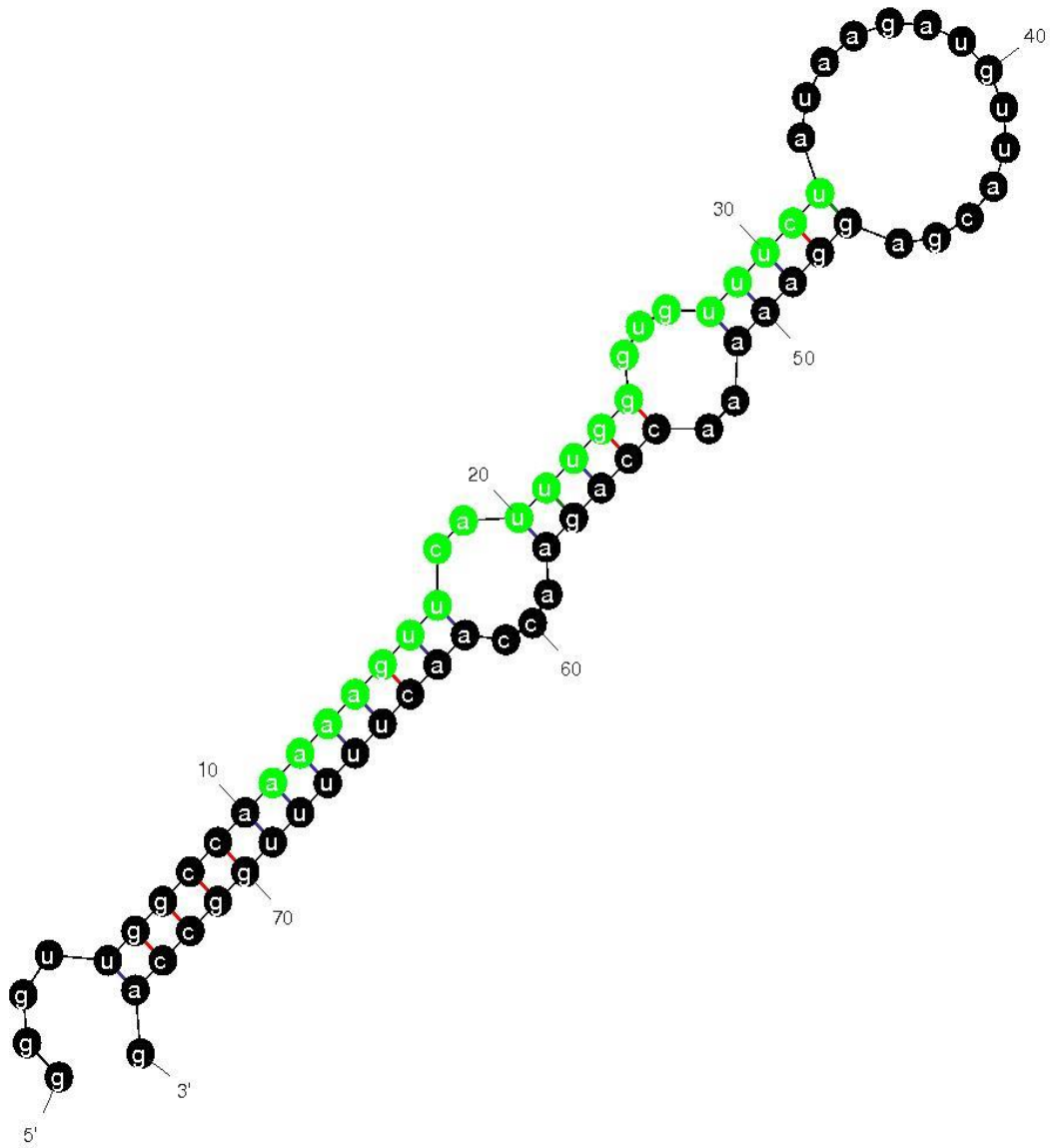
Created Tue Nov 10 18:13:59 2015



Ek 1 (14) Aday chi- miR-2284y-6

Output of sir_graph (9)
mfold_v4.5

Created Tue Nov 10 18:15:59 2015

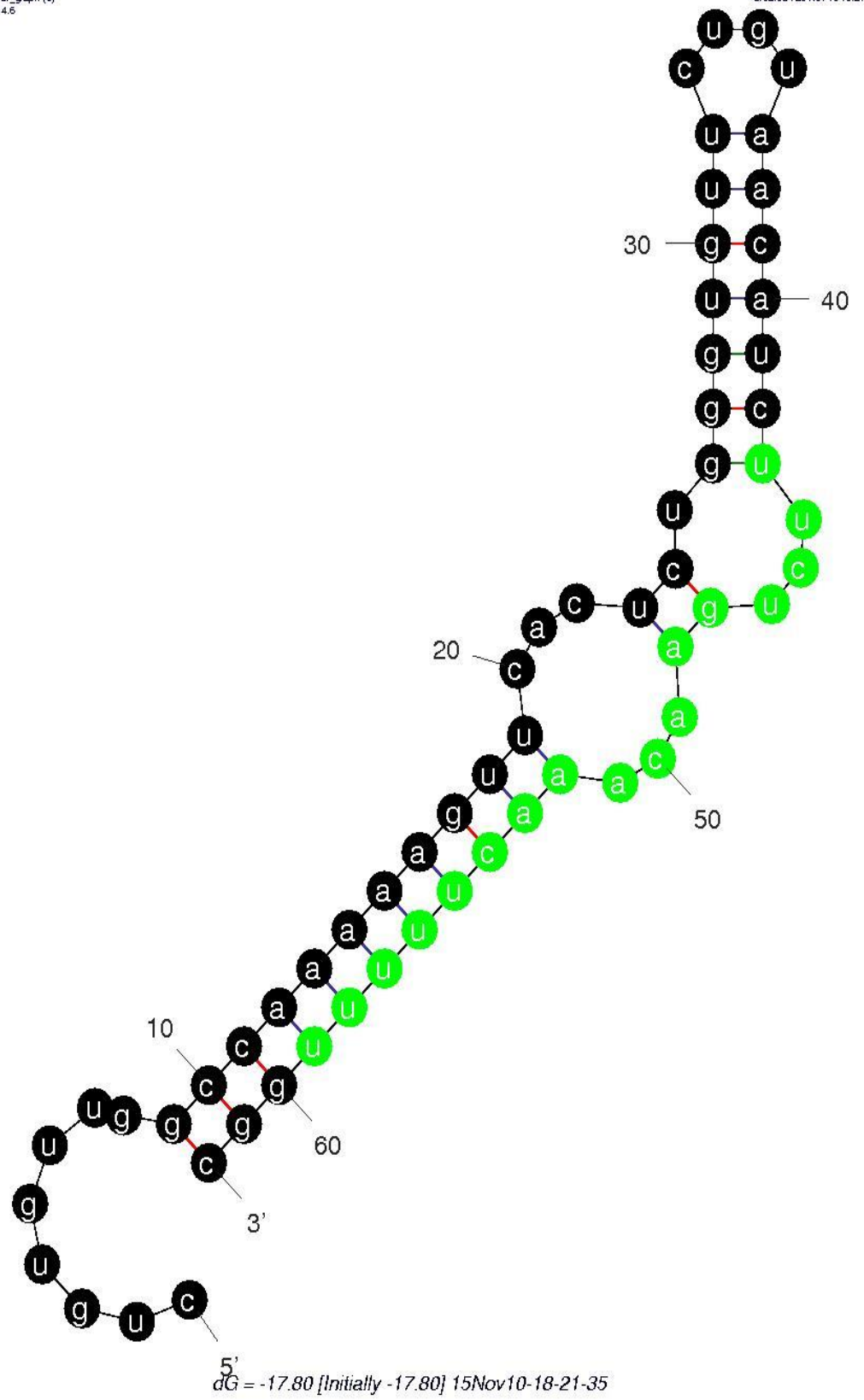


$dG = -26.20$ [Initially -26.20] 15Nov10-18-15-57

Ek 1 (15) Aday chi- mir-2285g-1

Output of sir_graph (9)
mtold_util 4.6

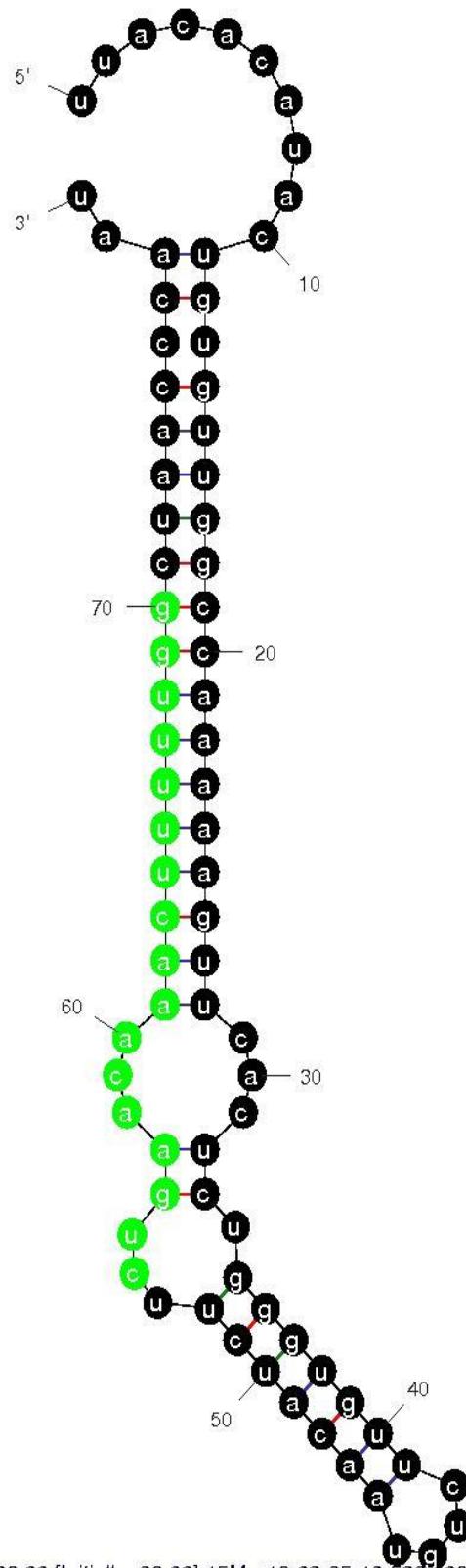
Created Tue Nov 10 18:21:36 2015



Ek 1 (16) Aday chi- mir-2285g-2

Output of sir_graph (Q)
mfold_util 4.6

Created Mon Mar 16 09:35:15 2015

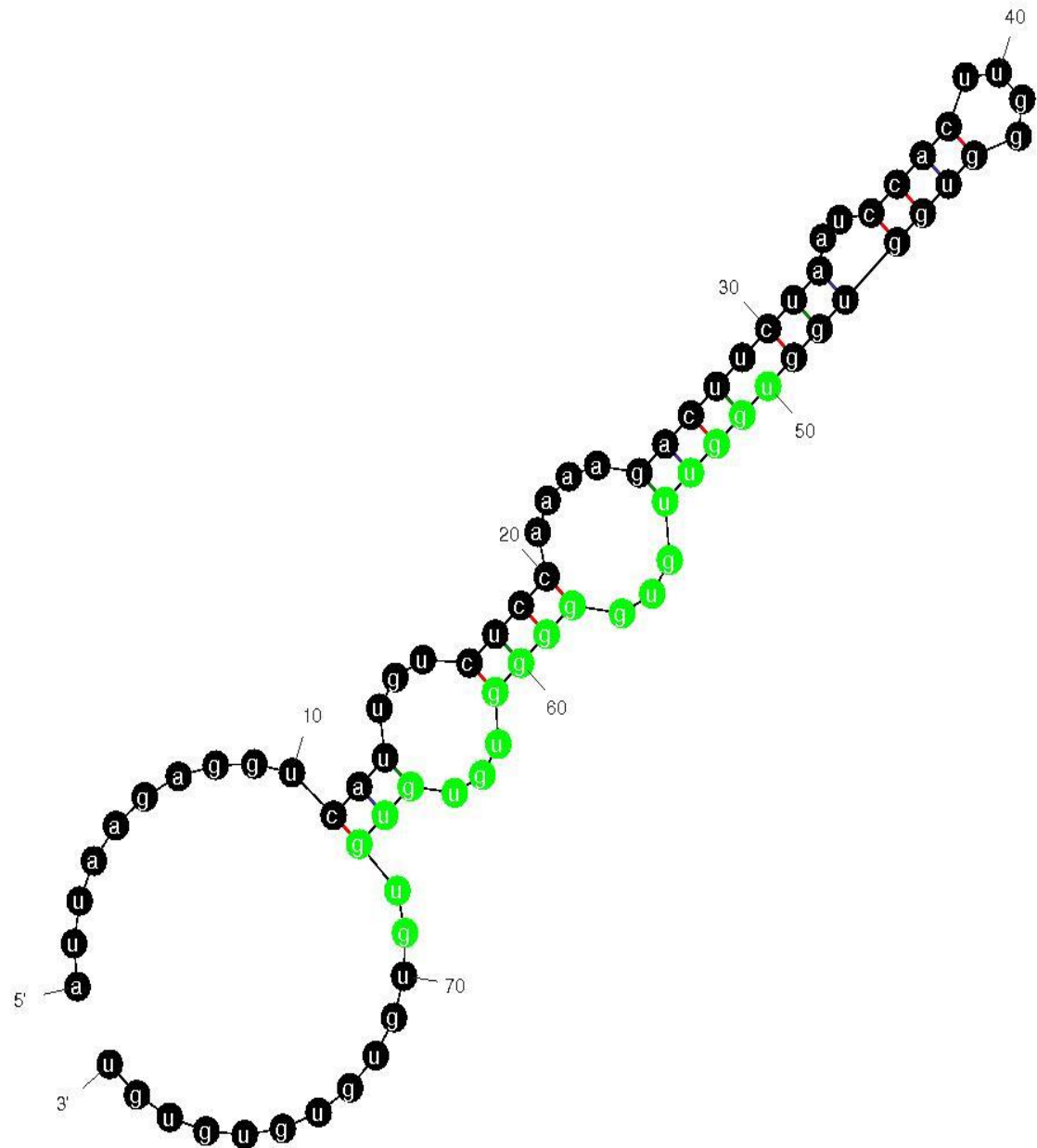


dG = -26.00 [Initially -26.00] 15Mar16-09-35-12-5936f08a98

Ek 1 (17) Aday chi- miR-2304

Output of sir_graph (9)
mfold_util 4.6

Created Tue Nov 10 18:26:28 2015

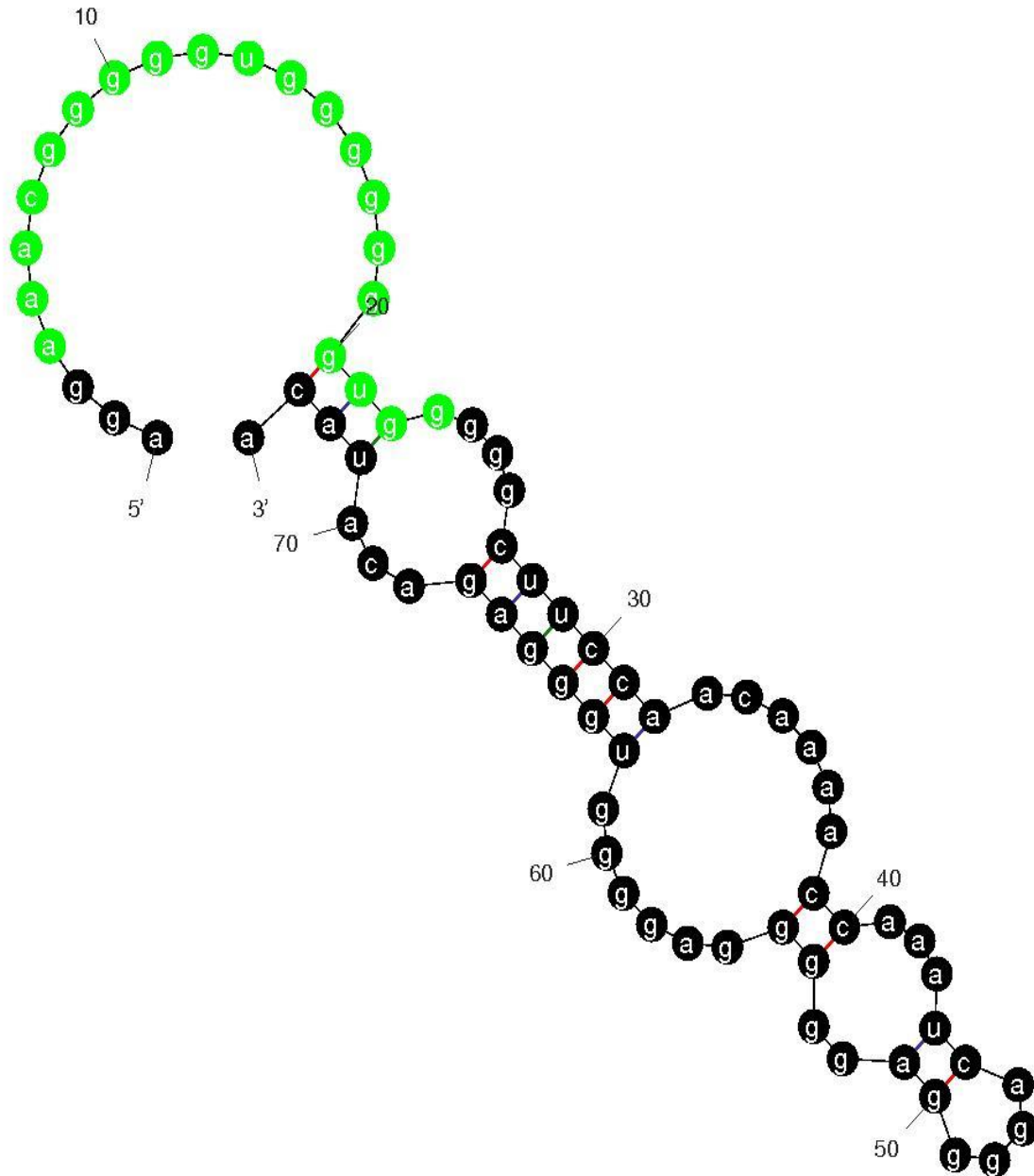


$dG = -16.70$ [Initially -16.70] 15Nov10-18-26-26

Ek 1 (18) Aday chi- miR-2305

Output of sir_graph (Q)
mfold_util 4.6

Created Tue Nov 10 18:31:00 2015

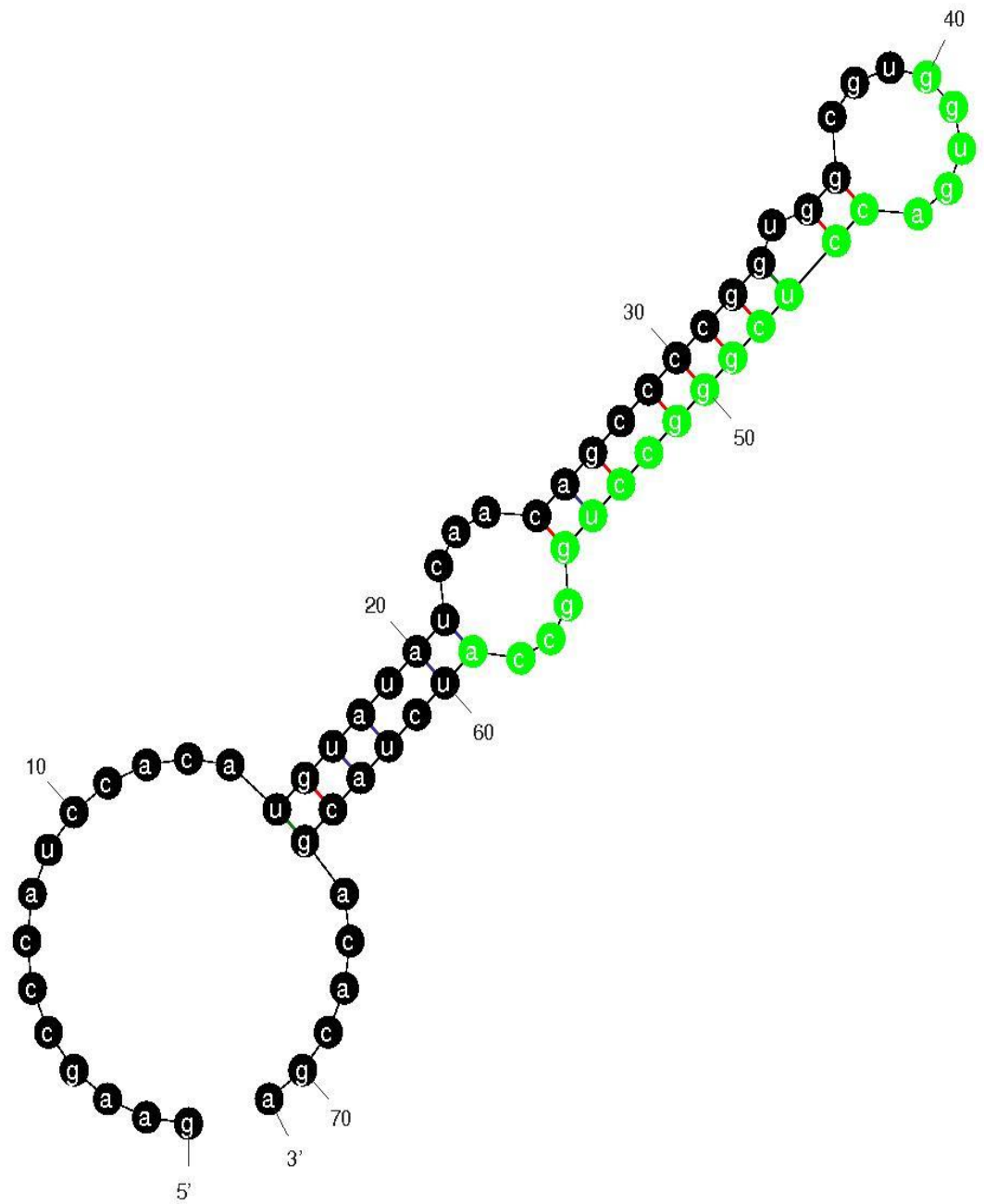


$dG = -13.50$ [Initially -13.50] 15Nov10-18-30-59

Ek 1 (19) Aday chi- miR-2306

Output of sir_graph (9)
mfold_util 4.6

Created Tue Nov 10 18:37:29 2015

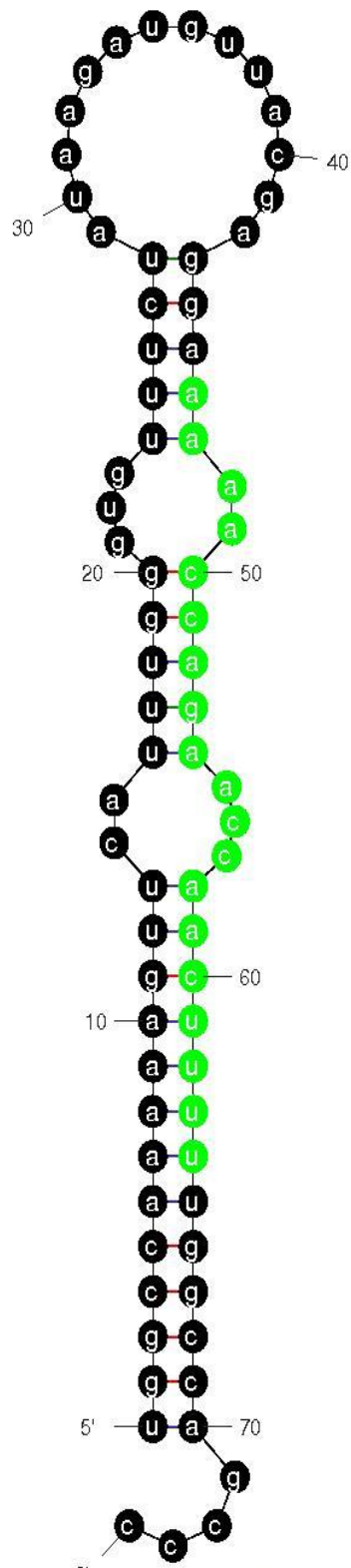


dG = -14.70 [Initially -14.70] 15Nov10-18-37-27

Ek 1 (20) Aday chi- miR-2312

Output of sir_graph (9)
mfold_v4.5

Created Tue Mar 24 05:50:21 2015

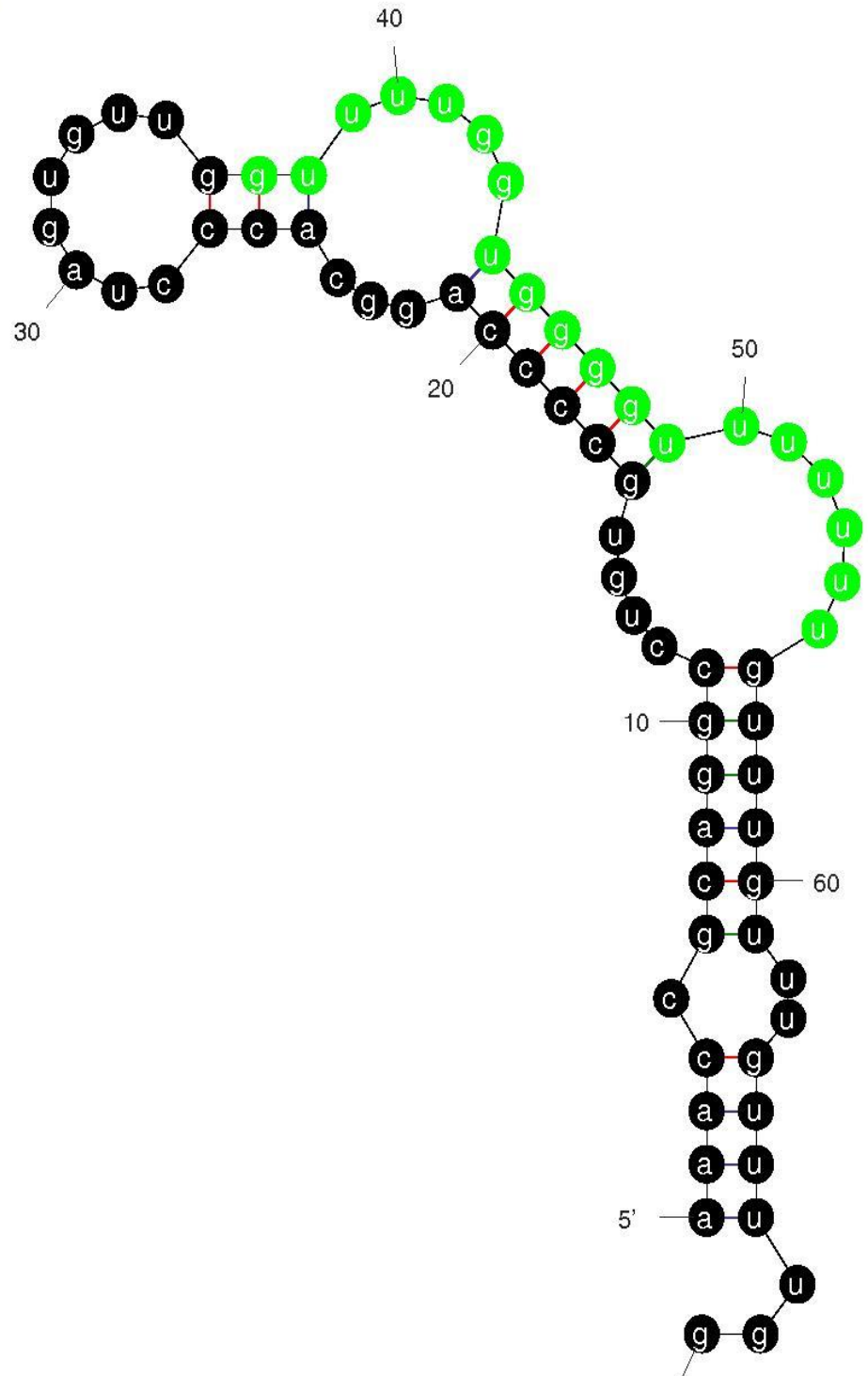


dG = -26.00 [Initially -26.00] 15Mar24-05-50-19-dcdc53220a

Ek 1 (21) Aday chi- miR-2325a

Output of `air_graph` (9)
mfold_util 4.6

Created Tue Mar 24 05:02:24 2015

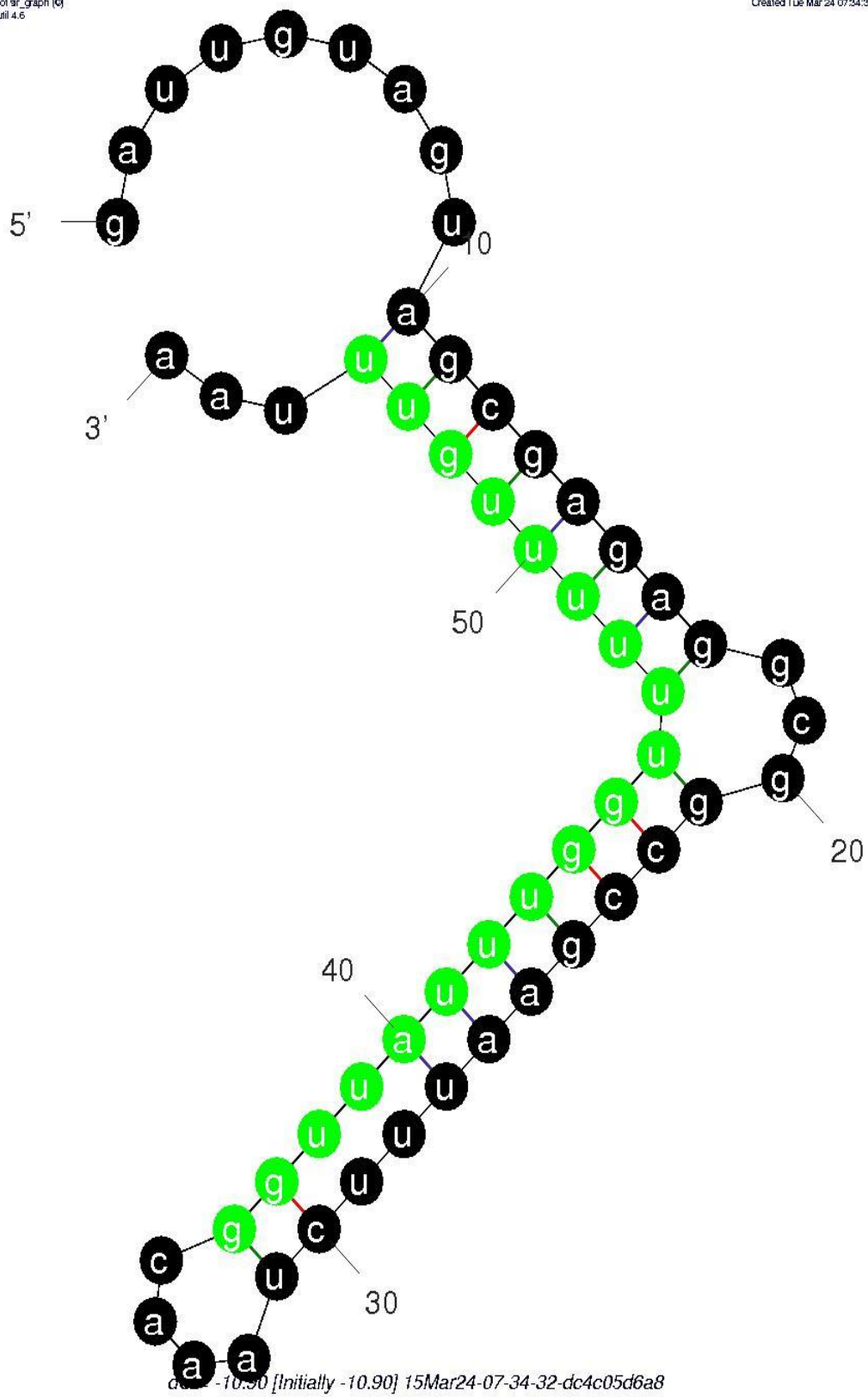


dG = -15.80 [Initially -15.80] 15Mar24-06-02-21-1eba2b889f

Ek 1 (22) Aday chi- miR-2325b

Output of `gir_graph` (C)
mold_util 4.6

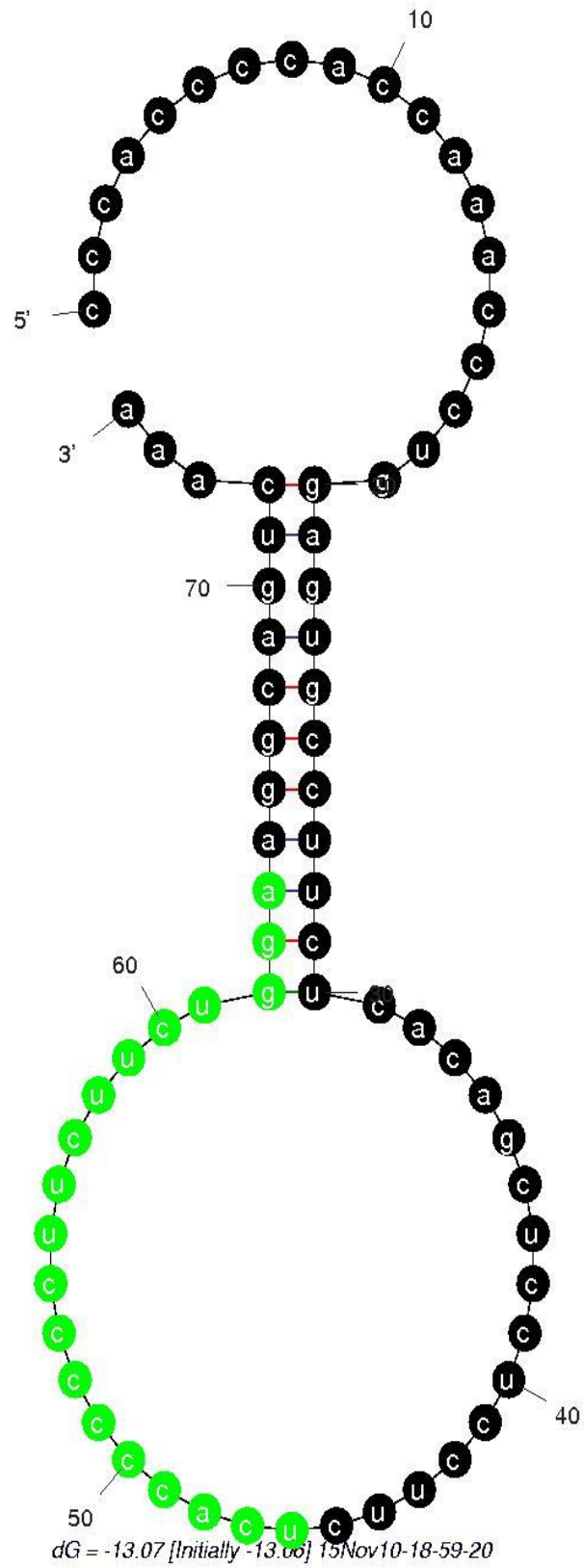
Created Tue Mar 24 07:34:35 2015



Ek 1 (23) Aday chi- miR-2326

Output of sir_graph (Q)
mfold_v4.6

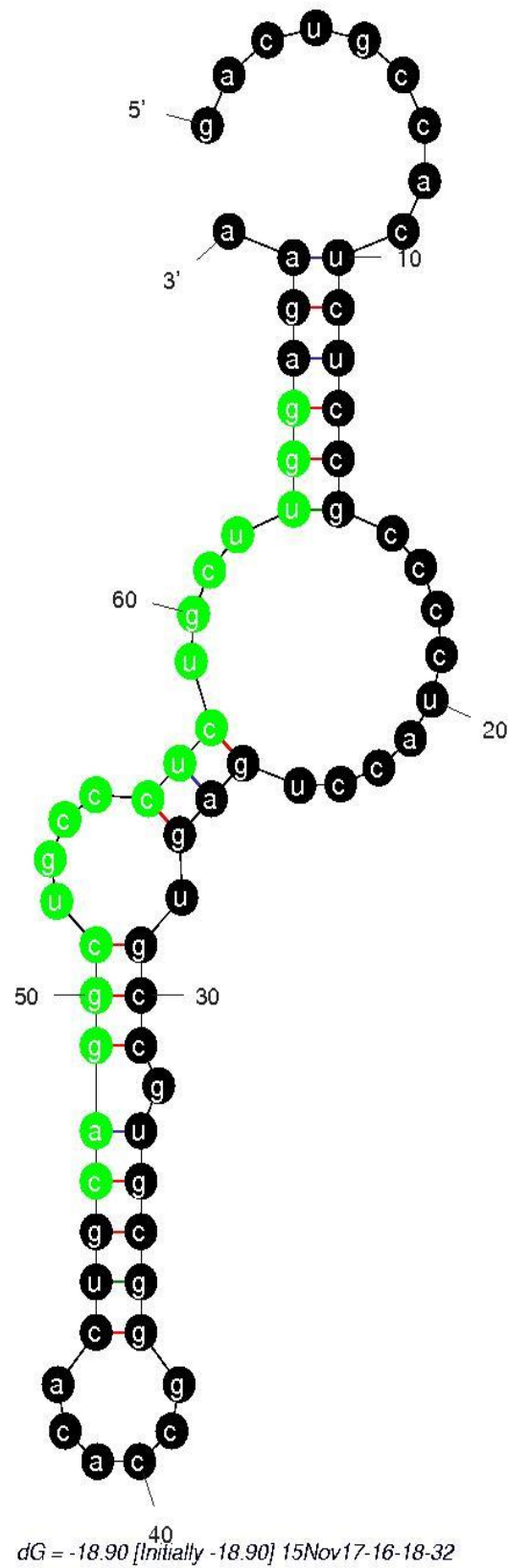
Created Tue Nov 10 18:59:23 2015



Ek 1 (24) Aday chi- miR-2381

Output of sir_graph (9)
mfold_uni 4.5

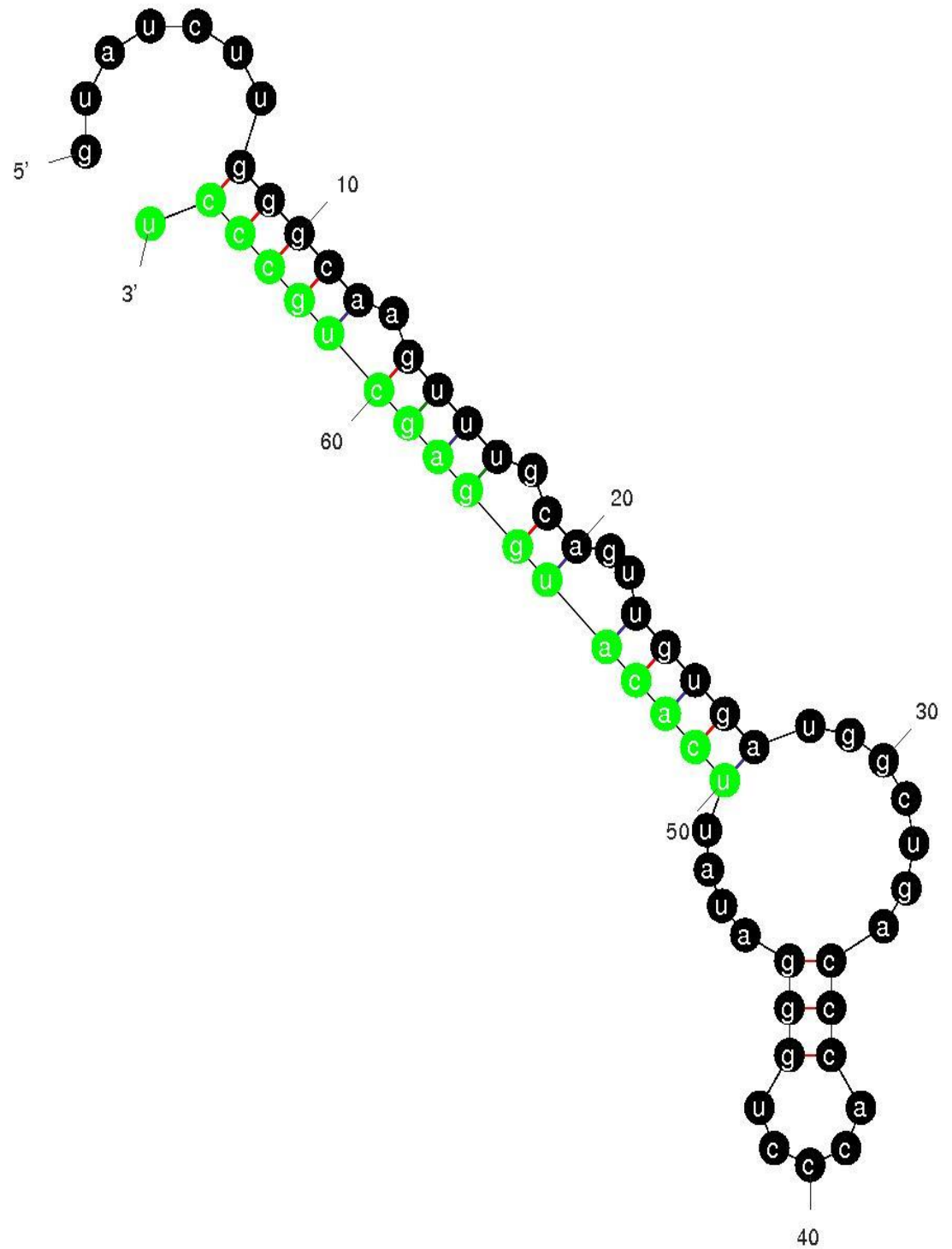
Created Tue Nov 17 16:18:47 2015



Ek 1 (25) Aday chi- miR-2409

Output of sir_graph (©
mfold_util 4.6

Created Tue Nov 17 16:33:03 2015

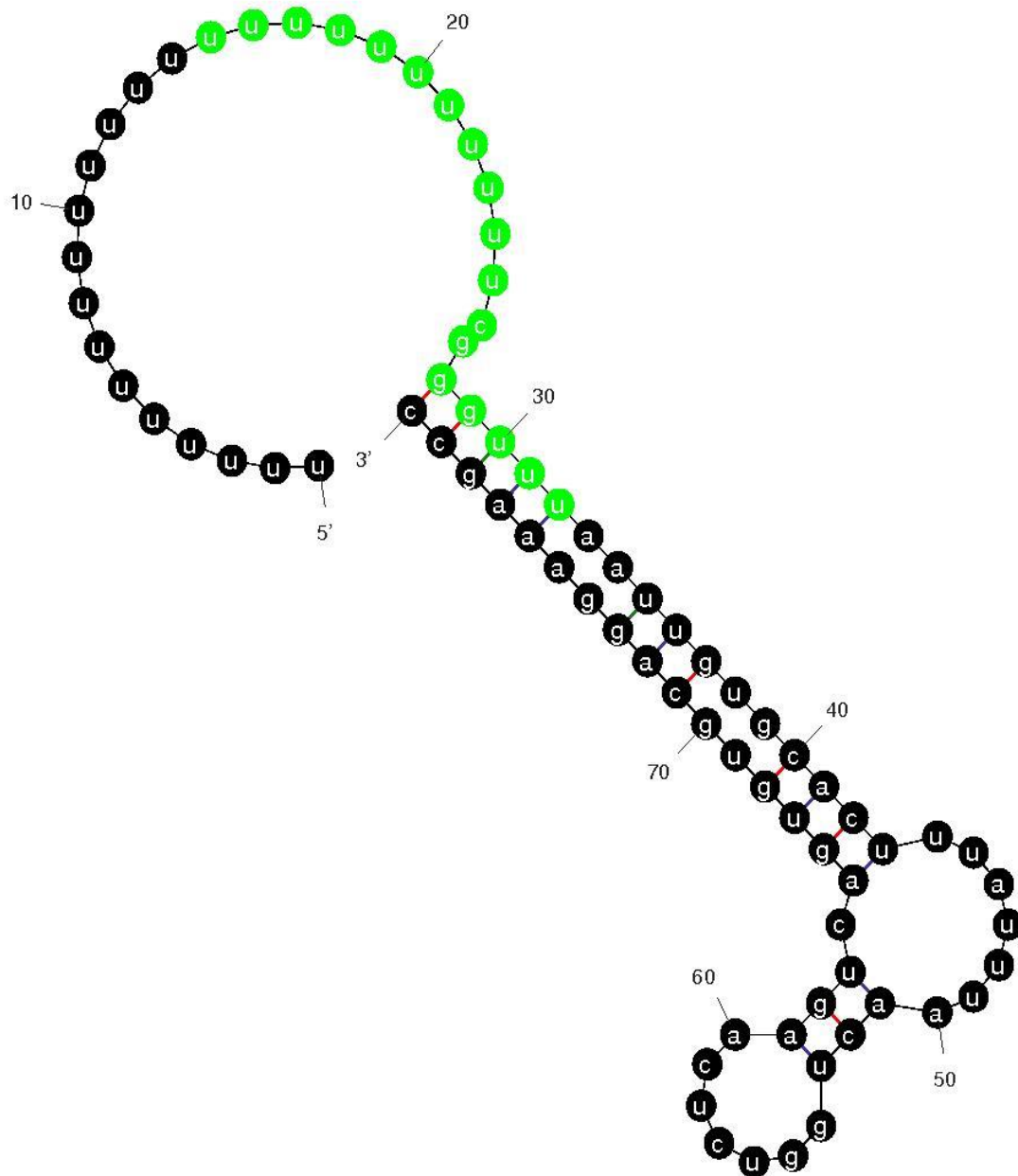


$dG = -19.50$ [Initially -19.50] 15Nov17-16-32-58

Ek 1 (26) Aday chi- miR-2421

Output of sir_graph (9)
mfold_until 4.6

Created Tue Nov 17 16:45:56 2015

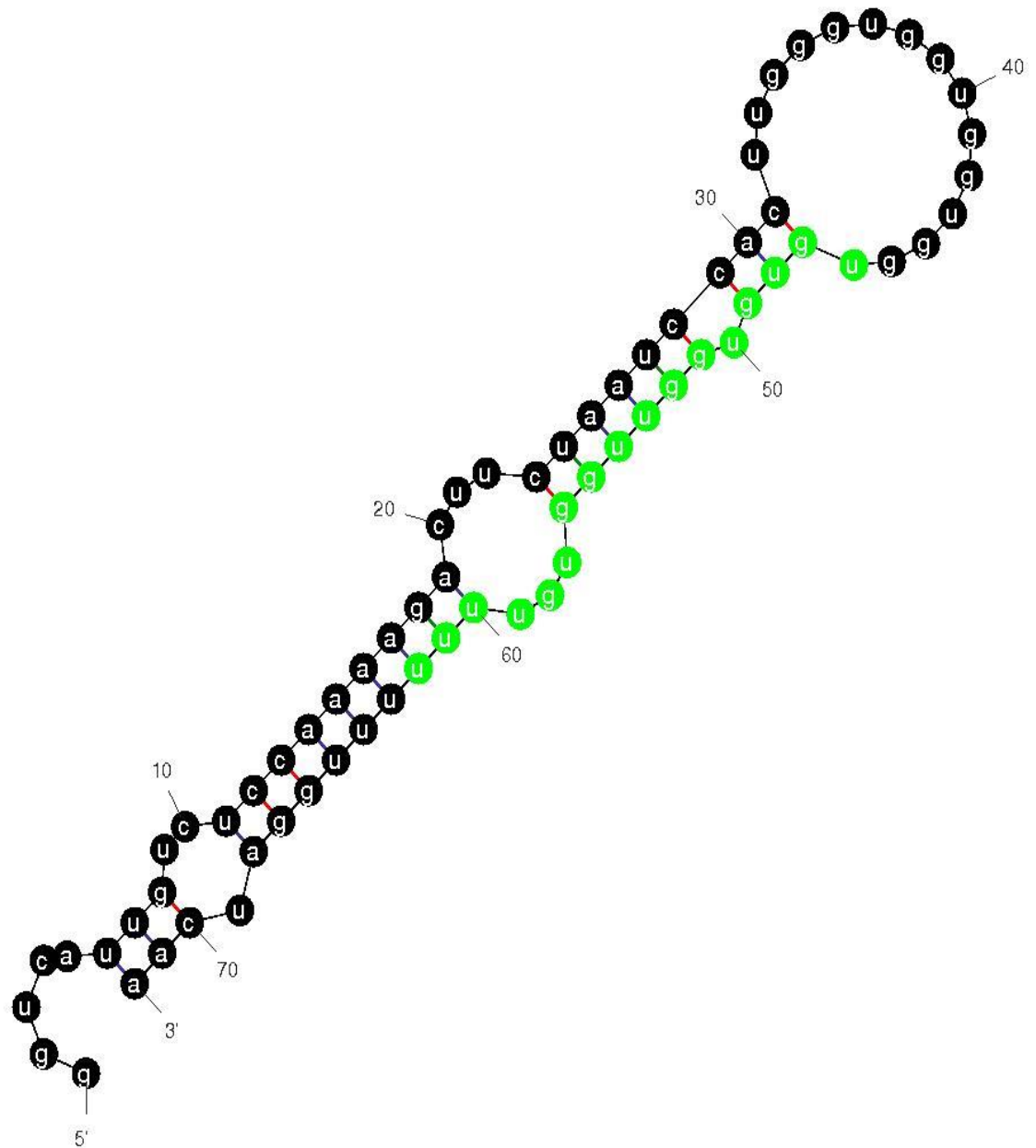


$dG = -12.90$ [Initially -12.90] 15Nov17-16-45-42

Ek 1 (27) Aday chi- miR-2423

Output of sir_graph (Q)
mfold_v4.6

Created Tue Nov 17 16:54:37 2015

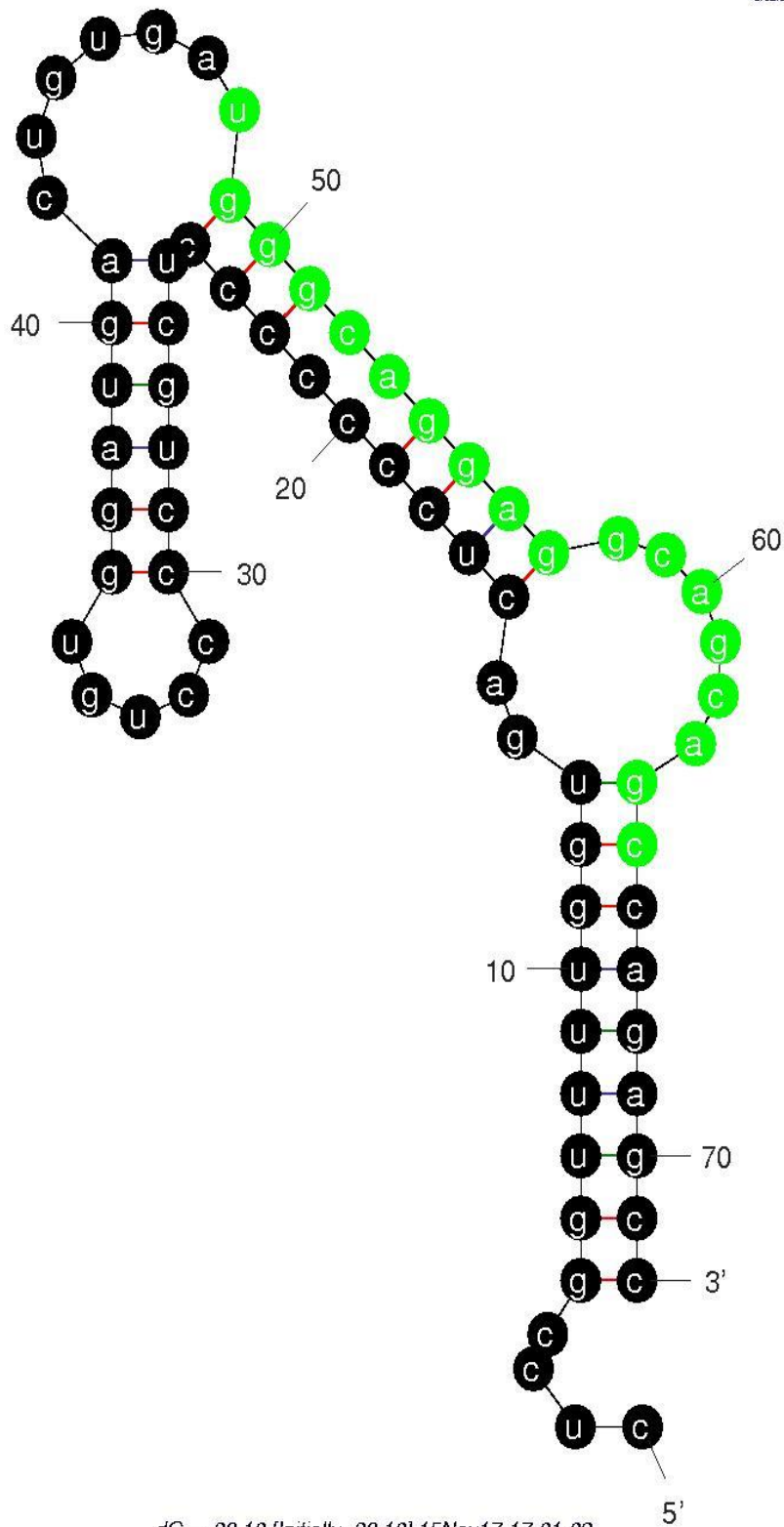


$dG = -16.20$ [Initially -16.50] 15Nov17-16-54-29

Ek 1 (28) Aday chi- miR-2449

Output of sir_graph (9)
mfold_v4.6

Created Tue Nov 17 17:01:13 2015

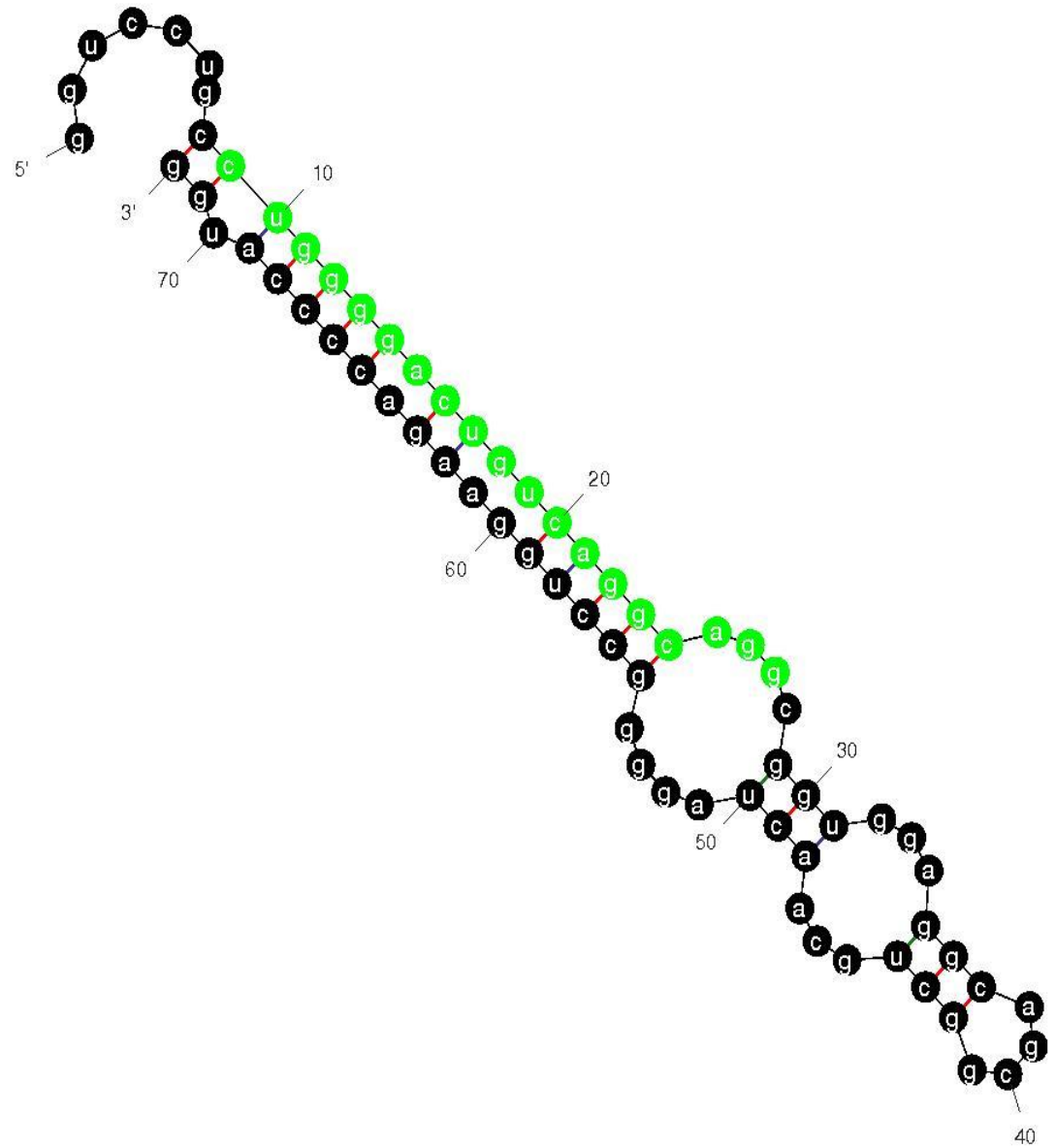


dG = -28.10 [Initially -28.10] 15Nov17-17-01-09

Ek 1 (29) Aday chi- miR-2454-5p

Output of `sir_graph` (C)
mfold_util 4.6

Created Tue Nov 17 17:09:44 2015

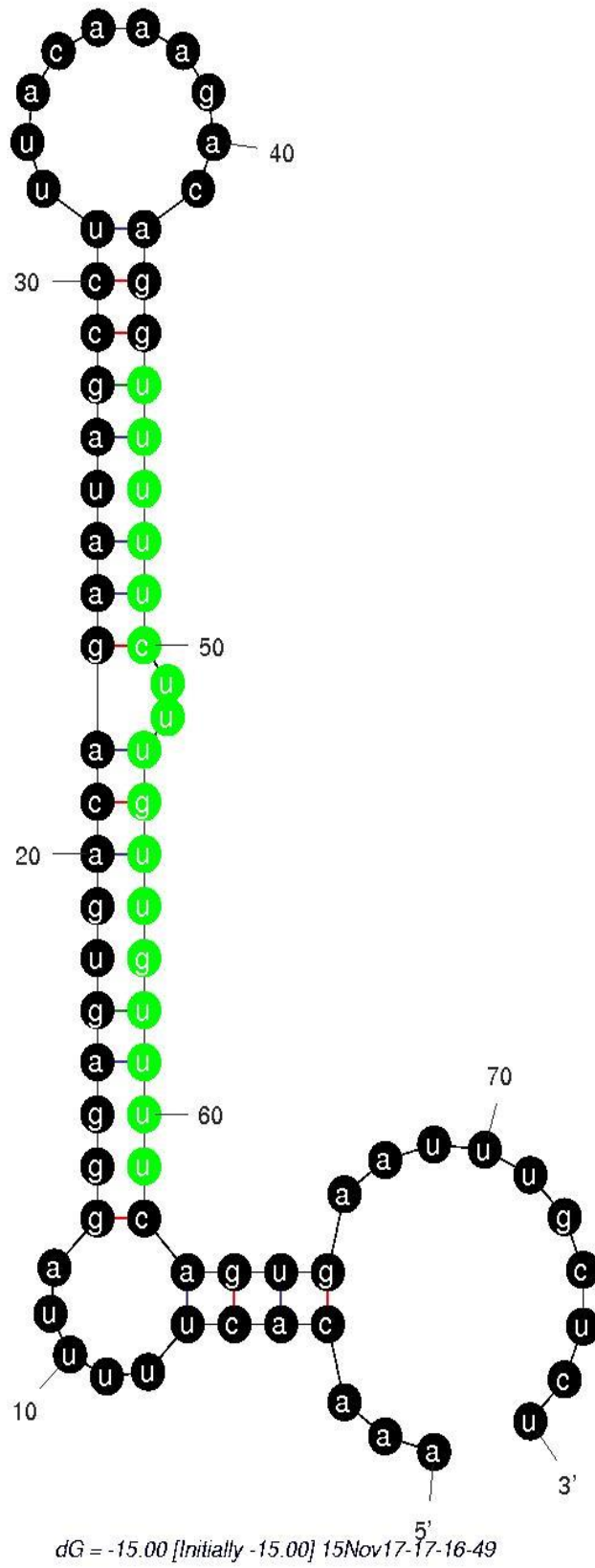


dG = -28.40 [Initially -28.40] 15Nov17-17-09-36

Ek 1 (30) Aday chi- miR-2482

Output of sir_graph (Q)
mfold_util 4.6

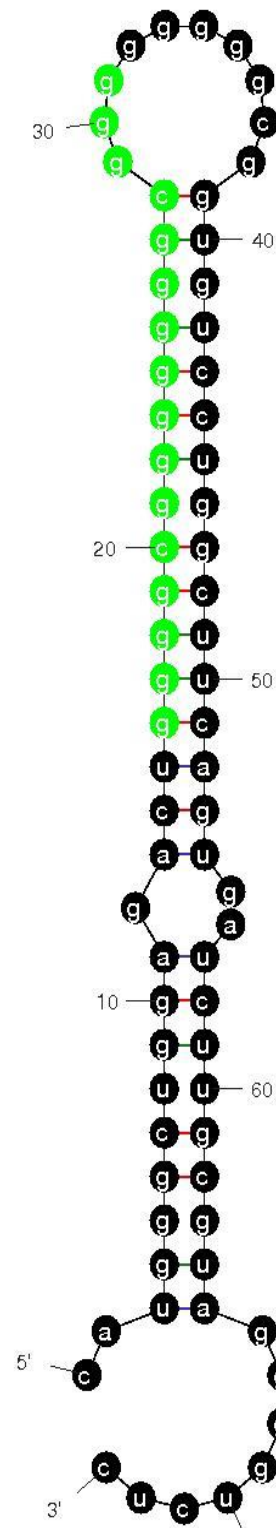
Created Tue Nov 17 17:16:54 2015



Ek 1 (31) Aday chi- mir-2881

Output of `sir_graph` (C)
mfold_util 4.6

Created Tue Nov 17 17:22:21 2015

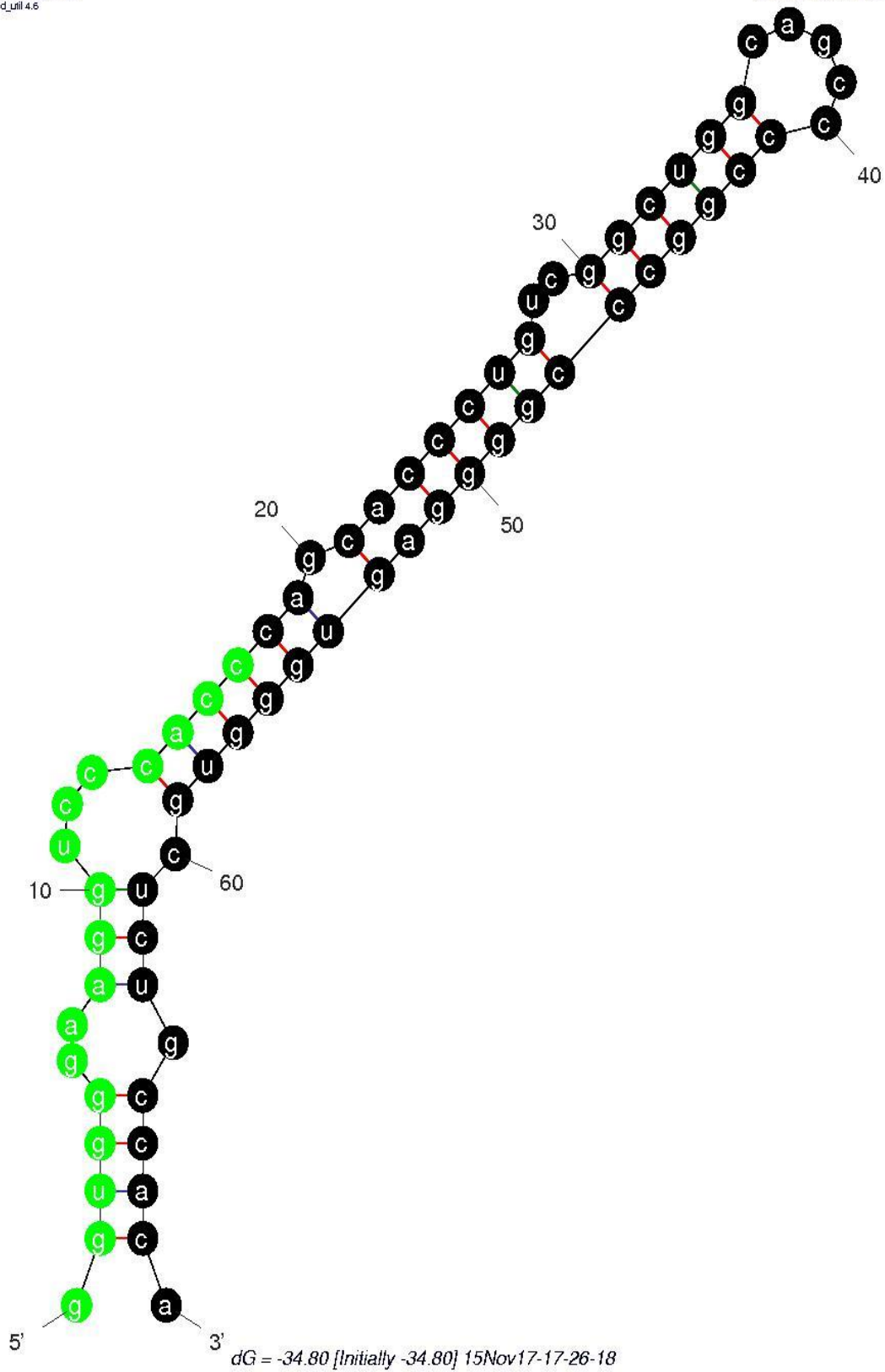


$dG = -26.90$ [Initially -26.90] 15Nov⁷⁰17-17-22-20

Ek 1 (32) Aday chi- miR-2897

Output of sir_graph (9)
mfold_uni 4.6

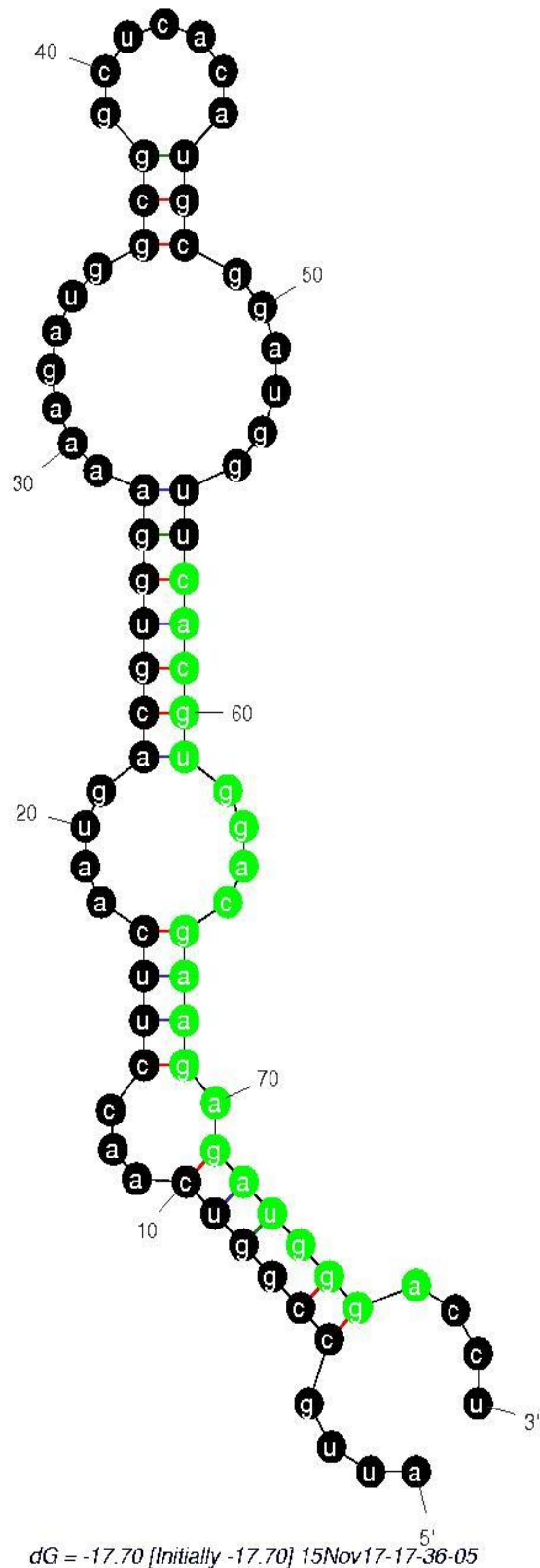
Created Tue Nov 17 17:26:20 2015



Ek 1 (33) Aday chi- miR-6527

Output of sir_graph (9)
mfold_v4.6

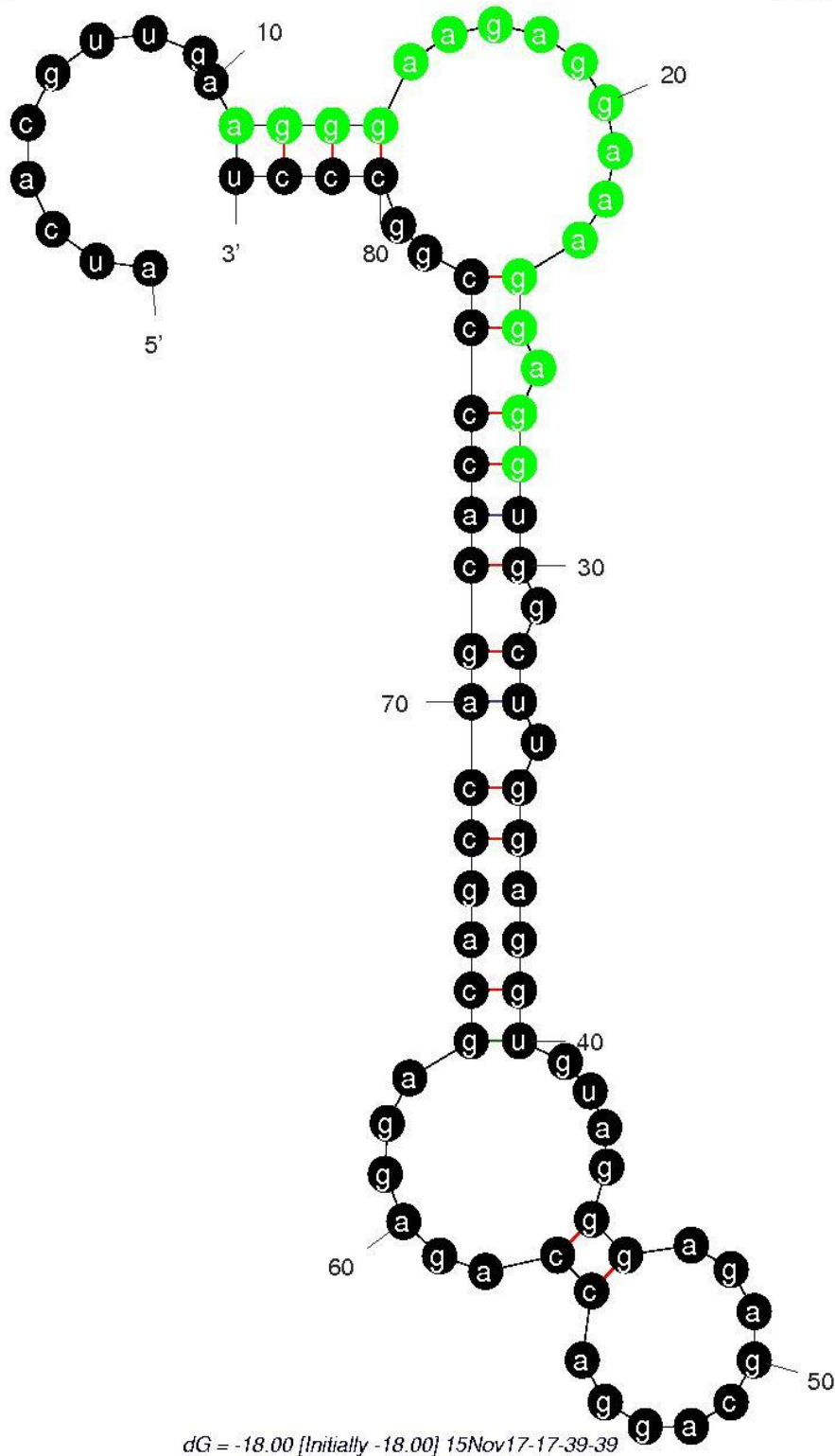
Created Tue Nov 17 17:36:07 2015



Ek 1 (34) Aday chi- miR-6528

Output of sir_graph (©)
mfold_v4.6

Created Tue Nov 17 17:39:40 2015



Ek 1 (35)Aday chi- miR-7865

Output of sir_graph (9)
mtold_util 4.6

Created Tue Nov 17 17:49:56 2015

