T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN (*Olea europaea L. cv* Gemlik) BİTKİSİNDE KORUNMUŞ miRNA'LARIN ANALİZİ

SULTAN CANSU GÖNENÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. NEHİR ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

İSTANBUL, 2016

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA*) BİTKİSİNDE KORUNMUŞ MİRNA'LARIN ANALİZİ

Sultan Cansu GÖNENÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 03.06.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Cemal ÜN

Ege Üniversitesi _____

Yard. Doç. Dr. Emel ORDU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2015-01-07-YL02 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince bana her türlü olanağı sağlayan başta Prof. Dr. Sezgin ÇELİK olmak üzere Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve bütün çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışma arkadaşlarım Hatice Nur AYDIN, Zehra ULU, Salih ULU, Büşra YİRMİBEŞ ve yol arkadaşlarım Huriye Karaçay, Şeyda Kaya ve İrem Büyük'e teşekkürlerimi sunarım. Bu yolda benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen can dostum Fulya TERZİ'ye çok teşekkür ederim.

Beni destekleyen ve her koşulda yanımda duran ailem; Sedat GÖNENÇ, Huriye GÖNENÇ, Cankut GÖNENÇ, Cihan GÖNENÇ ve Duygu GÖNENÇ'e teşekkürü borç bilirim.

Ağustos, 2016

Sultan Cansu GÖNENÇ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ ..... **Error! Bookmark not defined.**

KISALTMA LİSTESİ ..... **Error! Bookmark not defined.**

ŞEKİL LİSTESİ..... **Error! Bookmark not defined.**

ÇİZELGE LİSTESİ ..... **Error! Bookmark not defined.**

ÖZET ..... **Error! Bookmark not defined.**

ABSTRACT ..... **Error! Bookmark not defined.**

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 4

1.3 Hipotez 4

BÖLÜM 2

2.1 Literatür Özeti 6

2.1.1 Mikro RNA nedir? 6

2.1.2 Canlı Türlerindeki miRNA ve İşlevi 6

2.1.3 miRNA'ların Biyogenezi 8

2.1.4 Korunmuş miRNA'lar 11

2.1.5 miRNA'ların Transkripsiyonu 13

2.2 Zeytin 13

2.2.1 Zeytinin Sınıflandırılması 13

2.2.2 *O. Europaea'*nın Dünyadaki Ve Türkiye'deki Yayılışı 14

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD 16
3.1 Bitki Materyali 16
3.2 Tamponlar ve Çözeltiler 16
3.3 Moleküler Markerlar 17
3.4 Enzimler 17
3.5 Kitler 17
3.6 Oligonükleotidler 18
3.7 Malzemelerin Hazırlanması 18
3.8 Total RNA İzolasyonu 19
3.8.1 Trizol İzolasyonu Total RNA izolasyonu 19
3.8.2 miRCURY™ RNA Isolation Kiti ile İzolasyon 20
3.9 RNA Analizi 21
3.9.1 Formaldehit Jelinin Hazırlanması 21
3.9.2 Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması 21
3.9.3 RNA miktar Tayini 21
3.10 miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR kit ile cDNA sentez 22
3.11 Reverse Transkripsiyon (RT PCR) 23
3.12 Real Time PCR (qPCR) 24
3.12.1 Örneklerin Hazırlanması 24
3.12.2 qPCR işlemi 24
BÖLÜM 4
SONUÇLAR 26
4.1 Total RNA'nın izolasyonu 26
4.3 miRNA'ların İzolasyonu ve analizi 27
4.1 Reverse Transkripsiyon (RT PCR) 28
4.2 Real Time PCR Sonuçları 29
BÖLÜM 5
TARTIŞMA VE ÖNERİLER 40
KAYNAKÇA 44
ÖZGEÇMİŞ 52

SİMGE LİSTESİ

bç	Baz çifti
bp	Baz çifti (base pair)
g	Relatif Santrifüj Kuvveti
kb	Kilobaz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
pH	Ortam Reaksiyonu
U	Ünite
UV	Ultraviyole
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat Derece
~	Ortalama, yaklaşık
™	Ticaret Markası (Trade mark)

KISALTMA LİSTESİ

Ago	Argonaute protein
cDNA	Komplementer DNA
Cq	Döngü miktarı (Quantification cycle)
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo Nükleozid Fosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
EST	Expressed Sequence Tags
GSP1	Gen Spesifik Primer 1 : mir159
GSP2	Gen Spesifik Primer 2 : mir160
GSP3	Gen Spesifik Primer 3 : mir171
GSP4	Gen Spesifik Primer 4 : mir396
GSP5	Gen Spesifik Primer 5 : mir2919
GSP6	Gen Spesifik Primer 6 : mir8123
G20Z1	Gemlik G20 zeytin hattı genç yaprak miRNA ürünü 1
G20Z2	Gemlik G20 zeytin hattı genç yaprak miRNA ürünü 2
IsomiRs	miRNA veri tabanı
MOPS	3-(-N-morfolino) Propan Sülfonik Asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RT	Ters transkriptaz
TBE	Tris-Borat-EDTA
NK/NTC	Negatif Kontrol
mRNA	Haberci RNA (Messenger RNA)
miRNA	mikro RNA
Pol II	RNA polimeraz tarafından II
RBP	RNA-binding proteins RNA bağlanma proteinleri
RISC	RNA induced silencing complex RNA uyarılmış susturma kompleksi
RNAi	RNA sessizleşmesi (RNA interfering)
siRNA	Küçük müdahaleci RNA
Tm	Erime sıcaklığı, bağlanma sıcaklığı
UTR	Untranslated region (Çevrilmemiş Bölge)

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1 Mikro RNA Biyogenezi ve Çalışma Prensibi 4
Şekil 2. 1 miRNA Biyogenezi 11
Şekil 2. 2 Türkiye'de Bölgelere Göre Zeytin Ağaçlarının Dağılımı 15
Şekil 4. 1 Trizol Tüm RNA İzolasyonunun Formaldehit Jel Görüntüsü..... 27
Şekil 4. 2 cDNA PCR Jelde Yürüme Görüntüsü..... 29
Şekil 4. 3 miR159 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği..... 30
Şekil 4. 4 miR159 Real Time PCR Erime Eğrisi..... 30
Şekil 4. 5 miR160 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği..... 31
Şekil 4. 6 miR160 Real Time PCR Erime Eğrisi..... 32
Şekil 4. 7 miR171 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği..... 33
Şekil 4. 8 miR171 Real Time PCR Erime Eğrisi..... 33
Şekil 4. 9 miR396 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği..... 34
Şekil 4. 10 miR396 Real Time PCR Erime Eğrisi..... 35
Şekil 4. 11 miR2919 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği..... 36
Şekil 4. 12 miR2919 Real Time PCR Erime Eğrisi..... 36
Şekil 4. 13 miR8123 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği..... 37
Şekil 4. 14 miR8123 Real Time PCR Erime Eğrisi 38
Şekil 4. 15 Real Time Sonrası Agaroz Jel Kontrolü 39

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3. 1 Tampon ve Çözeltiler 16
Çizelge 3. 2 Moleküler Markerlar 17
Çizelge 3. 3 Enzimler 17
Çizelge 3. 4 Kitler 17
Çizelge 3. 5 Oligonükleotidler 18
Çizelge 3. 6 Reverse Trankripsiyon Reaksiyon Kurulumu 22
Çizelge 3. 7 Polimeraz Zincir Reaksiyon Döngüsü 23
Çizelge 3. 8 qPCR Döngüsü 25
Çizelge 4. 1 miRNA'ların Miktar Tayini 26
Çizelge 4. 2 miR159 Real Time Pcr Cq ve Tm Değerleri 31
Çizelge 4. 3 miR160 Real Time Pcr Cq ve Tm Değerleri 32
Çizelge 4. 4 miR171 Real Time Pcr Cq ve Tm Değerleri 34
Çizelge 4. 5 miR396 Real Time Pcr Cq ve Tm Değerleri 35
Çizelge 4. 6 miR2919 Real Time Pcr Cq ve Tm Değerleri 37
Çizelge 4. 7 miR8123 Real Time Pcr Cq ve Tm Değerleri 38

ÖZET

ZEYTİN (*Olea europaea L. cv* Gemlik) BİTKİSİNDE KORUNMUŞ miRNA'LARIN ANALİZİ

Sultan Cansu GÖNENÇ

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Zeytin (Olea europaea), zeytingiller (Oleaceae) ailesinden meyvesi yenen Akdeniz iklimine ait bir ağaç türüdür. Zeytin meyvesi fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum mineralleriyle birlikte, A,D,E,K vitaminlerini içermektedir. Zeytinyağının kanser oluşumunu engellediği ve radyoaktiviteye karşı hücreleri koruduğu tespit edilmiştir. Zeytinyağı, önemli ölçüde antioksidan içermesi ve yüksek sıcaklıklara dayanıklı olması açısından da önem teşkil etmektedir. Doymamış yağ asitlerince zengin olan, şeker ve kalp-tansiyon hastaların diyeti için oldukça önemli olduğu bilinen zeytinin daha iyi anlaşılabilmesi için üzerinde moleküler düzeyde çalışma yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada, zeytin bitkisinde mikro RNA'ların incelenmesi amaçlanmıştır. MikroRNA'lar (miRNAlar), endojen ifade edilen, tek-zincirli ve protein kodlamayan kısa (21-23 nükleotid uzunluğunda) RNA dizileridir. Transkripsiyon sonrası (post-transcriptional) seviyede, gen translasyonunu baskılayarak veya mRNA degradasyonunu (bozunmasını) indükleyerek gen ifadesini düzenlerler. miRNA'lar bitki ve hayvanların her ikisinde de

oldukça iyi korunmuş dizilerdir ve miRNA'ların evrimsel olarak gen düzenlenmesinin çok eski bir parçası olduğu ve oldukça hayati bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı zeytin bitkisinde bazı korunmuş mikro RNA'ların tanımlanmasıdır. Daha önce EST kütüphanesi kurulmuş olan G-20 zeytin hattından (Olea europea) belirli korunmuş miRNA'ların analizi gerçekleştirildi. miRNA'ların ayrışmasını sağlamak üzere RNA izolasyon kiti (miRCURY™ RNA Isolation Kit– Cell & Plant) kullanıldı. Ayrıştırılan toplam RNA miktarı Nanodrop® ND-100 spektrofotometre (Nanodrop Technologies, USA) cihazında ölçüldü. Reverse transkripsiyon (RT) ile miRNA'ların cDNA ya sentezi (miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR) gerçekleştirildi. Korunmuş miRNA lara (miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123) özgü 6 primer çifti kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Real Time PCR; miRNA QPCR master mix'i kullanılarak AriaMX Real-Time PCR Sistem (Agilent Technologies, Inc.) ile gerçekleştirildi.

Olea europaea yaprağından PCR ve Real Time PCR tekniği ile bitkilerde korunmuş olan miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123 miRNA'ları çoğaltıldı.

cDNA'lar ilk çoğaltımda miRNA'ya özgü primerler kullanılarak standart PCR ile yapıldı ve yüksek dimerizasyon ile kısa PCR ürünleri verdi. Agaroz jele yüklenen ürünlerin bantları 50 bç uzunluğun altında olduğu için primer dimer mi yoksa PCR ürünü mü olduğu ayırt edilemedi.

Real Time PCR reaksiyonunda evrensel primerler kullanılarak, daha uzun PCR ürünleri veren örnekler amplifikasyon grafiği ve erime eğrisi analiziyle başarıyla tespit edildi.

Bu çalışmada Real Time PCR ile agaroz jel elektroforezine gerek kalmadan, PCR ile eş zamanlı bir şekilde çıkan ürünlere bakıldı. Böylece korunmuş miRNA'ların zeytinde tespiti daha güvenilir verilerle sağlandı.

Anahtar Kelimeler: miRNA, *Olea europaea*, Zeytin , RT-PCR, cDNA, Real-Time PCR

ABSTRACT

ANALYZE OF SOME CONSERVED miRNA IN OLIVE (*Olea europaea L. cv* Gemlik)

Sultan Cansu GÖNENÇ

Department of Molecular Biology and Genetic

MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Olive (Olea europaea) is from the family Oleaceae is a species of tree which's fruits are eaten, belongs to the Mediterranean climate. Olive fruit contains phosphorus, potassium, calcium and magnesium minerals along with A, D, E,K vitamins. It has been found that olive oil prevents the formation of cancer and protects cells against radioactivity. Olive oil has an importance of containing high levels of antioxidants and being resistant to high temperatures. For a better understanding of Olive, which is rich in unsaturated fatty acids and important for diabetic and cardiac- high blood pressure patients' diet , it is required to do studies on it at the molecular level.

In this study, we aimed to investigate the micro RNAs in olive plants. MicroRNAs (miRNAs) are short, non-protein- coding RNA sequences which are single-stranded and endogenously expressed. They regulate gene expression at the post-transcriptional level, by inhibiting gene traslation or inducing mRNA degredation. miRNAs are well

conserved in both plants and animals, and are thought to be a vital and evolutionarily ancient component of gene regulation.

The aim of this study was to identify some conserved microRNAs in olive plants.

Previously EST library established by the G-20 line of olive (Olea europea) young leaf samples were collected. Total RNAs including miRNAs were isolated by using miRCURY™ RNA Isolation Kit– Cell & Plant. Extracted total RNA were quantified by Nanodrop® ND-100 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, USA).

Reverse transcription (RT) of miRNAs was done by miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR kit). Then with 6 miRNA specific primer pairs Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed. Real-Time PCR amplification was performed by using miRNA QPCR Master Mix on an AriaMX Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Inc.).

miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 and miR-8123 which are conserved in plants were amplified from leaf tissues of *Olea europaea* by PCR and real-time PCR.

cDNAs were first amplified with standard PCR by using miRNA specific primers, which have high dimerization property and give short length PCR products. The bands generated in the agarose gel were lower than 50bp and it could not be distinguished whether they are dimers or PCR products. In real-time PCR, the amplifications were done by using universal reverse primer that results in longer PCR products, which could be detected by amplification plots and verified by melt curve analysis.

In this study by using universal reverse primers miRNA presence could be detected with real-time PCR, without the need for agarose gel electrophoresis. Thus detection of conserved miRNAs in olive were provided with more reliable data.

Key words: miRNA, *Olea europaea*, Olive, RT-PCR, cDNA, Real-Time PCR

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Zeytin ağacı (Olea europaea), zeytingiller (Oleaceae) familyasından; meyvesi yenebilen, Akdeniz ikliminde yetişen bir ağaç türüdür. Zeytingiller familyasının 27 kadar cinsi ve 600 kadar türü vardır [1].

Gemlik Zeytini; Trilye, Kıvırcık, Kaplık, Kara gibi isimlerle de bilinen, Marmara Bölgesi'ndeki zeytin ağaçlarının büyük bir kısmını kapsayan zeytin çeşididir. Zeytinin en belirgin özelliği renginin koyu siyah olması ve etinin çekirdekten kolayca ayrılabilmesidir. Bu zeytin çeşidi % 29.9 oranında yağ içerir. Gemlik Zeytin'i tat ve yapısı sebebiyle Dünya'nın en iyi salamuralık zeytin çeşidi olarak kabul edilmektedir. Ülkemizde kamu kurumları ve özel kuruluşlar tarafından üretilen zeytin fidanlarının % 80'ne yakını Gemlik Zeytin fidanlarıdır [2].

Bölümümüz laboratuvarında daha önce yapılan çalışmada, zeytin bitkisinin yaprak ve meyve örnekleri kullanılarak iki cDNA kütüphanesi kurulmuş, kütüphanelerden rastgele seçilen 3840 adet klon örneklerinin dizi analizleri yapılarak zeytin için EST koleksiyonu oluşturulmuştur [3].

Zeytinin moleküler yapısının anlaşılması için gen ifadesinin düzenlenmesi incelenmelidir. Mikro RNA (miRNA), gen yazılmasında görevli mRNA (mesajcı RNA) üzerinde farklı şekillerde etki göstererek gen ifadesini düzenleyen kısa (ortalama 22 nükleotid uzunluğunda) dizilerdir. Bu projede öncelikle EST kütüphanesi yapılmış olan G20 zeytin hattında korunmuş miRNA lar (miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123) varlığı gösterilmesi hedeflenmiştir[4].

miRNA'lar kodlamayan RNA'lardandır, yani DNA'dan transkripsiyonu (RNA üretimi) yapılan ama translasyonu yapılmayan (proteine çevirilmeyen) genler tarafından kodlanırlar. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. Olgun miRNA molekülleri bir veya daha çok mesajcı RNA (mRNA) ile kısmi tamamlayıcıdır yani kısmi baz eşleşmesi gösterir ve başlıca işlevleri gen ifadesini düzenlemektir. Mikro RNA'lar (miRNA'lar) ~ 22 nükleotid uzunluğunda, post transkripsiyonel gen düzenlenemesini etkileyen küçük ribonükleik asitlerdir [4].

Mikro RNA'lar ilk olarak 1993'te Lee ve çalışma arkadaşları tarafından Victor Ambros laboratuvarında keşfedildi [5][6]. Ancak, miRNA'lar 2000'li yılların başına kadar biyolojik düzenleyiciler olarak ayrı bir sınıf olarak kabul edilmedi[7][8][9][10][11][12]. MikroRNA terimi ilk 2001'de kullanıma girdi [13].

miRNA araştırmaları farklı hücre tipi ve dokularda farklı miRNA setleri ifade edildiğini ortaya çıkardı [14][15]. Bitki ve hayvanların gelişiminde ve birçok biyolojik süreçte miRNA'ların çeşitli roller oynadığı tespit edildi [16][17][18][19][20][21][22].

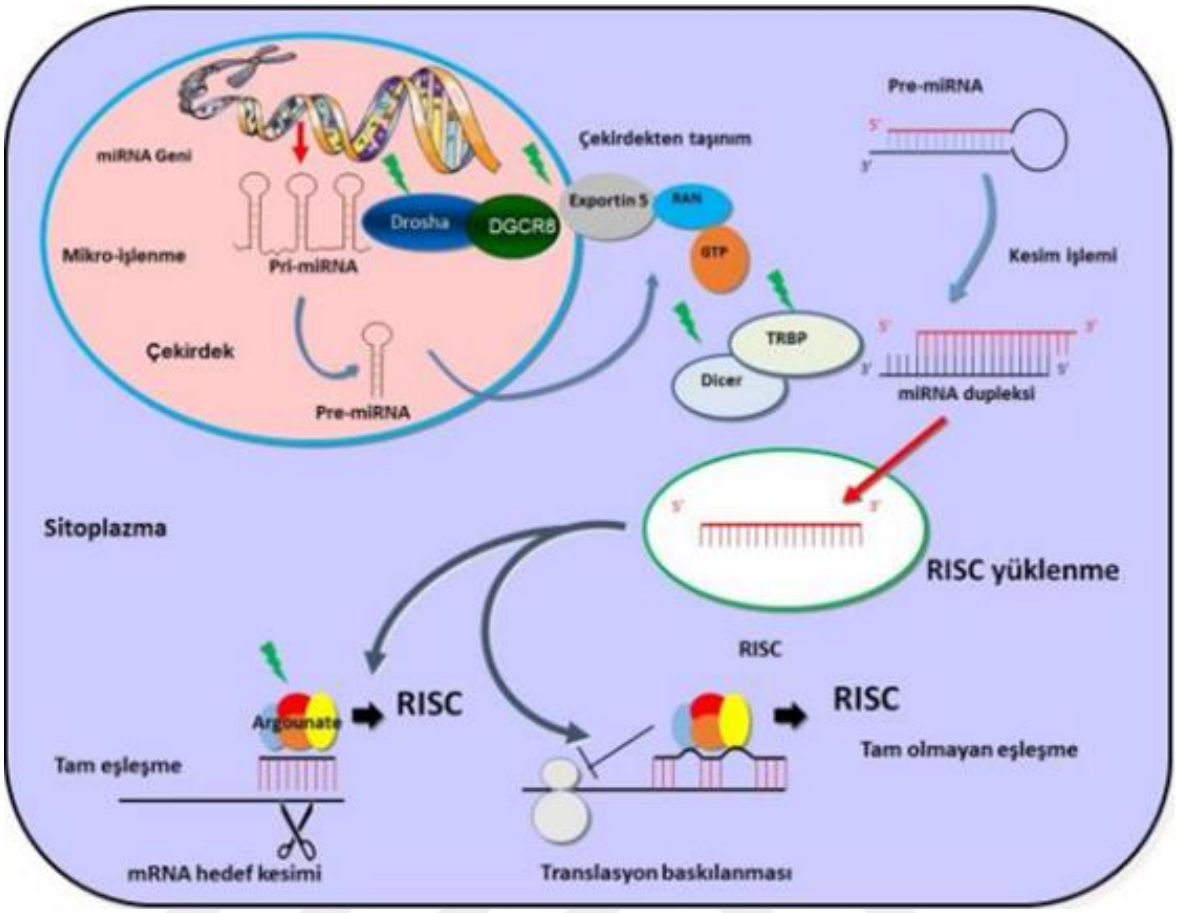
Düzensiz miRNA gen ifadesi hastalık durumlarında meydana gelir. miRNA temelli tedaviler yeni araştırma alanlarındandır [23][24][25][26].

İlk defa miRNA'ların düzensizliklerine bağlı olarak tespit edilen insan hastalığı, kronik lenfositik lösemi oldu. Bunu takiben B hücre tümörlerinde de miRNA etkisi tespit edildi [27].

Genelde uzunluğu ~ 22 nükleotid olan bu küçük RNA'lar bitkilerde büyüme ve gelişimde önemli roller almaktadır. Hızla artan kanıtlara göre bitki miRNA'ları kendi hedef genlerini yazılmasını baskılayıcı yönde çalışmaktadır. Gen yazılmasının baskılanması yoluyla yönetilen bu genlerin gelişimsel süreçteki görevleri; kök hücre kimliği, hormon sinyali, gelişimsel örüntüler (meristem hücre kimliği, yaprak organ morfogenezi ve polaritesi, çiçek farklılaşması ve gelişimi, oksin sinyali, sınır oluşumu/organ ayrımı), miRNA biyogenezi (biyolojik oluşumu) ve stres yanıtı gibi işlevlerdir [4][28][29].

miRNA biyogenezi, nükleusta RNA polimeraz II enziminin işlev görmesiyle ilerleyen gen yazılması yoluyla başlar ve hairpin (saç tokası) yapısındaki olgun miRNA dizisinin ilk hali olan işlenmemiş uzun miRNA (pri-miRNA) oluşmaktadır [30].

Saç tokası (hairpin) yapısı, Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DGCR8 (DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8) oluşan yapı (Pasha kompleksi) vasıtasıyla kesilir ve 60-70 nükleotid uzunluğunda öncül miRNA'nın (pre-miRNA) oluşturmasını sağlar. Öncül hairpin nükleustan Exportin-5 (XPO5) ile sitoplazmaya taşınır ve diğer bir RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından ortalama 22 nükleotid uzunluğundaki çift sarmal miRNA'ya kesilir. Kesilerek olgun diziyi oluşturacak iplik, miRNA indüklenmiş susturma kompleksini olan RISC kompleksine (Argonaute'a) yüklenir [31]. Ago protein ailesinin üyesinden biri olan RISC proteini, hedef mRNA'nın 3' UTR gen bölgesine bağlanır [4] ve mRNA dönüşüm mekanizmasını baskılar [32]. Eksik baz eşleşmesiyle, miRNA RISC'i uyarırken, gen okumanın baskılaması gerçekleşir. Tam eşleşme durumunda ise; mRNA kesime uğrar ve kararlılığını kaybeder (Şekil 1.1) [31].



Şekil 1. 1 Mikro RNA biyogenezi ve çalışma prensibi

1.2 Tezin Amacı

Zeytin (*Olea europaea*) bitkisinde RNA'ların izolasyonu ve bitkilerde daha önce araştırılmış primerler vasıtasıyla RT PCR (Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılması ve bunun sonucunda cDNA şekline getirilmiş miRNA'lar kullanılarak, Real Time PCR yöntemiyle Zeytin bitkisine özgü korunmuş olan bu miRNA'ların (miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123) tespiti amaçlanmıştır. Daha sonra yapılacak çalışmalarda zeytinin gen ifadesinin kontrolünde bu miRNA'ların etkisi araştırılabilir.

1.3 Hipotez

Zeytin (Olea europaea), zeytingiller (Oleaceae) ailesinden meyvesi yenen Akdeniz iklimine ait bir ağaç türüdür. Şeker ve kalp-tansiyon hastaların için oldukça önemli

olduğu bilinen zeytin bitkisini daha iyi anlayabilmek için moleküler düzeyde çalışmalar yapılmalı ve yeni moleküler yaklaşımlar getirilmelidir.

Moleküler düzeyde çalışılan mikro RNA'lar (miRNA), transkripsiyonda görevli mRNA (mesajcı RNA) üzerinde farklı şekillerde etki göstererek gen ifadesini düzenleyen kısa (ortama 22 nükleotid) uzunluğundaki dizilerdir.

Zeytin'in moleküler mekanizmasının anlaşılması için gen ifadesinin düzenlenmesi incelenmelidir. Dolayısıyla bu çalışmada daha önce bitkilerde tespit edilmiş olan korunmuş miRNA'ların zeytin bitkisi için de korunmuş olabileceği düşünüldü ve bu korunmuş miRNA'ların zeytinde de tespiti hedeflendi.

Dolayısıyla bu çalışma ile gen ifadesini düzenlenmesinde etkili olan miRNA'lar zeytinde aydınlatılmış olur.

BÖLÜM 2

MİKRO RNA'LAR VE ZEYTİN BİTKİSİ

2.1 Literatür Özeti

Zeytin ağacı (Olea europaea), zeytingiller (Oleaceae) familyasından; meyvesi yenebilen, Akdeniz ikliminde yetişen bir ağaç türüdür. Zeytingiller familyasının 27 kadar cinsi ve 600 kadar türü vardır[1].

2.1.1 Mikro RNA nedir?

Mikro RNA'lar (miRNA'lar) küçük, endojen (iç kaynaklı) ifade edilen, tek zincirli ve protein kodlamayan RNA'lardır. Bunlar, bitki ve hayvanlarda gen yazılması sonrasındaki (post-transcriptional) seviyede, gen okunmasını (translasyonu) baskılayarak veya mRNA bozunmasını (degradasyonunu) tetikleyerek gen ifadesini düzenlerler [4].

2.1.2 Canlı Türlerindeki miRNA ve İşlevi

Zeytin'in moleküler düzeyde incelenmesi için; gen ifadesinde görevli, mikro RNA (miRNA) denilen küçük RNA dizilerinin keşfedilmesi gerekir. Bitki, hayvan ve bazı virüslerde bulunan miRNA'ların fonksiyonu RNA sessizleşmesi (RNAi= RNA interfering) ve gen ekspresyonunda etkili olan post-transkripsiyonel modifikasyonlardır [4][33].

Ökaryotik çekirdek DNA'sı tarafından bitkilerde ve hayvanlarda kodlanan, hatta genomu DNA şeklinde olan bazı virüsler tarafından da kodlanan miRNA'lar

fonksiyonlarını; mRNA ile baz eşleşmesi sonucu oluşan tamamlayıcılıkla gerçekleştirir [4].

Bunun bir sonucu olarak, bu mRNA molekülleri, aşağıdaki işlemlerin bir ya da bir kaçıyla susturulur:

- mRNA zincirinin iki parçaya ayrılması
- Poli (A) kuyruğu kısalması ile mRNA destabilizasyonu
- Ribozomlar ile mRNA'dan proteine çeviriminin daha az verimli gerçekleşmesi [34][35].

miRNA'lar, genellikle RNA sessizleşmesi (RNAi) yolunun küçük müdahaleci RNA'ları olan siRNA'ya benzer. Yine de tam anlamıyla aynı şekilde oluşmazlar. Kısa saç tokası yapısı oluşturmak için kendi üzerilerine katlanan RNA transkript bölgelerinden miRNA'lar elde edilirken; siRNA'lar çift sarmallı uzun RNA bölgelerinde elde edilir [4].

İnsan genomunda 1000'in üzerinde miRNA kodlayan gen bulunur [36][37][38]. Bunlar birçok memeli türünde bolca bulunan miRNA'lardır [14][39][40][41]. İnsanlar ve diğer memeli genlerinin yaklaşık % 60'ı miRNA'ların hedefi gibi görünmektedir ve çoğu genin hastalık sürecinde miRNA'lar temel rol oynamaktadır [33][42][43][44].

Gen düzenlemesinde miRNA'ların hayati öneme sahip olduğu, hem bitki hem de hayvanlar için eski, evrimsel olarak korunmuş bir yapı olduğu düşünülmektedir [45][46][47][48][49].

Mikro RNA yolunun çekirdek bileşenleri bitki ve hayvan arasında muhafaza edilirken, iki alem için de birincil miRNA oluşumu ve etkisi birbirinden bağımsızdır [50][51].

Bitki miRNA'ları genellikle, mRNA hedefleri ile mükemmele yakın eşleşme gösterir. Bu miRNA'lar hedef transkript bölünmesi yoluyla gen baskılamasını gerçekleştirirler [16].

Bunun aksine hayvan miRNA'larının 5' ucunun sonunda bulunan 6-8 nükleotid kadar küçük bölge (tohum bölge) sayesinde hedef mRNA'lar belirlenir [52][53][54].

Bu eşleşme hedef mRNA bölünmesini teşvik etmek için yeterli değildir [34]. Kombinasyonal düzenleme hayvanlarda miRNA düzenlemesinin bir özelliğidir [34][55].

Çeşitli tahmin yöntemlerine bağlı olarak bazı miRNA çeşitlerinin gen baskılaması yapmasında hedef olan özgün mRNA'ların ortalama sayısına ilişkin tahminler gerçekleştirilir [56].

Çoğu yaklaşım memeli miRNA'ların birçok özgün hedefi olabileceğini göstermektedir. Örneğin, omurgalıların yüksek oranda korunmuş miRNA'ların bir analizine göre, ortalama olarak, miRNA'ların yaklaşık 400 korunmuş mRNA hedefleri olduğu gösterilmektedir [44]. Benzer bir şekilde deneyler göstermektedir ki; tek miRNA türü yüzlerce özgün mRNA'nın kararlılığını azaltabilir [57].

Yani belirli bir miRNA'nın yüzlerce farklı hedef mRNA'sı olabilir ve belirli bir hedef mRNA çoklu miRNA grupları ile düzenlenebilir [58][59].

Deneyler göstermektedir ki, tek bir miRNA türü yüzlerce protein üretimini baskılamaktadır ama genellikle bu baskı çoklu miRNA etkisine kıyasla nispeten (2 kat daha az) daha hafiftir [60][61].

2.1.3 miRNA'ların Biyogenezi

RNAi (RNA susturulması/RNA interfering)'nın kullanım alanları konusunda son yıllarda pek çok çalışma yapılmış ve hala daha yapılmaktadır. Özellikle gen susturulması mekanizmasıyla çalışan yeni gen tedavisi yöntemleri geliştirilmektedir. Biyotik veya abiyotik stres faktörlerine özgü hedef gen bölgeleri miRNA'lar ile baskılanarak, patojen zararı, kuraklık, tuzluluk ve sıcaklık gibi abiyotik stres faktörlerinin etkisinin azaltılması hedeflenmektedir. Mikro RNA'lar ya kodlama yapan genler (ekzon) ya da kodlama yapmayan genler (intron) arasından üretilmektedir. Karakterize miRNA genlerinin çoğu; genler arası ya da komşu genlere antisens odaklıdır ve bu nedenle transkripsiyonda bağımsız birimler olduğundan şüphe edilir [10][11][12][62].

Bununla birlikte bazı durumlarda, ev sahibi gen ile mikro RNA geni beraber transkribe edilir. Bunun anlamı miRNA ve protein kodlayan genin çift olarak düzenlenmesidir [63][64].

miRNA genlerinin % 40 kadarı; intronlar içinde protein ve proteine çevrimi olmayan kodlayan genleri veya ekzonlar içinde uzun protein kodlamayan transkriptlerde yatıyor

olabilir [65]. Bunlar genellikle bir hedefe yönelmede bulunan miRNA'lar değildir [66][67].Bu nedenle genellikle bir ev sahibi gen ile birlikte düzenlenir [65][68][69].

Tüm miRNA'ların % 42-48'i diğer miRNA ile ortak bir promotor gösterir. Bu promotor bölgesi polisistronik bölgelerin ayrı ayrı halkalarının (loop yapılarının) işlenmesiyle olgun miRNA'yı oluşturur [62][70]. Bu zorunlu olarak aynı miRNA'lar ailesinin yapı ve fonksiyon bakımından homolog olduğu olgun anlamına gelmez. Bahsedilen promotorler ile gösterilmiştir ki; RNA polimeraz II tarafından üretilen gen transkriptlerinin promotor bölgelerindeki motiflerde benzerlikler bulunmaktadır [62][71].

Mikro RNA fonksiyonunu iki şekilde gösterir. İlki mRNA'dan okunma (translasyon) olurken miRNA ribozomun gidiş yönünün ön tarafına bir eşleşme gösterir ve ribozomun dizi üzerinde ilerlemesi durur. Böylece mRNA'dan protein sentezi durdurulur. İkinci yol ise miRNA'nın gösterdiği eşleşme ile mRNA'nın yıkılmasıdır. Bu yolla da yine protein sentezi engellenmiş olur [4].

Biyotik veya abiyotik stres faktörlerine özgü hedef gen bölgeleri miRNA'lar ile susturulur. Böylece patojen zararı, kuraklık, tuzluluk ve sıcaklık gibi abiyotik stres faktörlerinin etkisi azaltılır. Strese maruz kalan bitkilerde oluşan miRNA'lar, bitki stres yanıt mekanizmasında transkripsiyon sonrası (post-transcriptional) işlev gören düzenleyicilerdir. Bu düzenleyiciler hedef gen ifadesini engellemektedirler [72].

DNA şablonu olgun miRNA üretimi konusunda son sözü söylemez: IsomiRs verilerine göre insan miRNA'larının % 6'sı RNA düzenlemesi gösterir, RNA dizilerinin site-spesifik modifikasyonunda kodlanan RNA'ların ürün verimi farklıdır. Yalnızca genoma kıyasla miRNA çeşitliliğini ve aktivitesini arttırır.

Mikro RNA işlenmesine ve transkripsiyon efektör kompleksinin oluşumuna bakış Şekil 2.1'de gösterilmiştir. miRNA biyogenezinde iki yolak bulunmaktadır. Bunlardan biri; bağımsız genlerden microRNA üretimi, diğeri; intronik microRNA üretimidir. Standart miRNA'ların yapımında miRNA yolakları RNA polimeraz II enzimi vasıtasıyla yapılan transkripsiyon (yazılma) işlemi ile gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda birincil miRNA (pri-miRNA) ürünü oluşur. Yaklaşık 80 bp (baz çifti) uzunluğundaki kök halka (saç tokası) yapısındaki birincil miRNA, birincil transkriptten öncül miRNA olarak pri-miRNA'yı

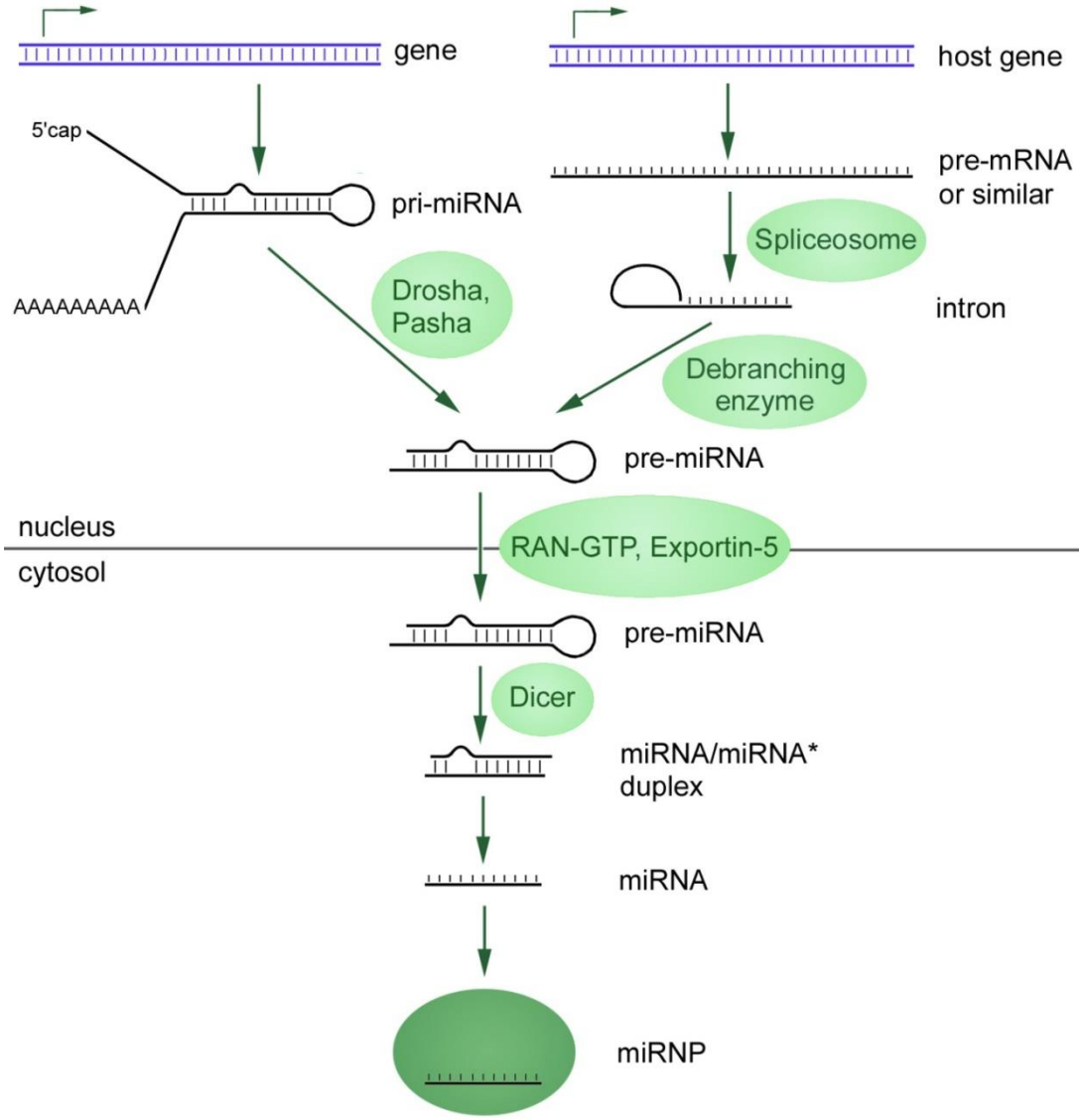
oluşturulur. Pri-miRNA olgun miRNA'yı oluşturmadan önce çok aşamalı süreçlerden geçer [73].

Şekil 2. 1'de bulunan enzimlerden Drosha ve Pasha; pri-miRNA'nın (primary microRNA transcript = birincil miRNA transkripti) pre-miRNA'ya (öncül miRNA) dönüşümünü yaparken, splayzosom pre-mRNA'yı (precursor messenger RNA = öncül mRNA) intron kemente dönüştürür. Gruplaşmayı bozucu enzim, intron kementlerini pre-miRNA'ya katlanabilir RNA formuna getirir. RAN-GTP ve Exportin-5 çekirdekten çıkışı sağlar. Dicer enzimi saç tokası (hairpin) yapısını keserek çift zincirli miRNA'yı oluşturur. Daha sonra çift zincirli yapı bozulur ve tek zincirli olgun miRNA oluşur. Şekildeki miRNP ise microRNA ribonükleoproteini ifade eder.

miRNA'nın olgunlaşması ve fonksiyonuna kavuşması bir takım RBP (RNA bağlanma

proteini) hareketine son derece bağımlıdır [74]. Bu proteinlerin bazıları, küçük RNA süreçleri ve küçük RNA temelli gen düzenlenmesi durumlarında karakteristik yapı oluşturan tekli protein bölgesi içerir [75].

Hedef tanımada temel belirleyici faktör, miRNA ve mRNA arasındaki kısa dizi tamamlayıcılığıdır. Bu durum özellikle miRNA'da 2. ve 8. nükleotid arasındaki gen bölgesi için geçerlidir [76].



Şekil 2. 2 miRNA Biyogenezi

2.1.4 Korunmuş miRNA'lar

Bitkilerde korunmuş olan miRNA'lar daha önce yapılmış olan çalışmalara bakılarak deneysel olarak önceden tespiti yapılmış miRNA'lardan seçilir. Zeytin bitkisinin de bu miRNA varlığını koruyup korumadığını incelemek adına dutta, haşhaşta, kaynaklara girmiş olan korunmuş miRNA tipleri (miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 and miR-8123) çalışma kapsamında incelenmek için tercih edildi [77][78].

miR159 ailesi transkripsiyon faktörlerinde R2R3 MYB bölgesini kodlayan, korunmuş GAMYB benzeri genleri baskılar. Bahsi geçen transkripsiyon faktörü bitkideki giberallin hormon genlerinin ifadesi üzerine etki eder. Bu giberallin anterlerdeki sinyalizasyon ve

tohumun çimlenmesiyle ilişkilendirilen bir bitki hormonudur. Arabidopsis bitkisi için iki büyük miR159 aile üyesi: miR159a ve miR159b'dir. İkisi de GAMYB benzeri genler olan MYB33 ve MYB65 genlerine özgü işlevsellik gösterirler [79]. miR159'un polimorfizmlerine bakıldığında 187 farklı dizilimi olduğu görülür [80].

miR160, Arabidopsis thaliana (turpgiller alt türü) ve Oryza sativa (pirinç) gibi bitki türlerinde tahmini ve deneysel olarak doğrulanmış ve korunmuş bir mikro RNA tipidir [81]. miR-160 kendi ekspresyonunu düzenlemek için oksin yanıt faktörü genlerinin çevrilmemiş (UTR / untranslated region) bölgeleri ile eşleşme gösterip bağlandığı tahmin edilmektedir [82]. Bu hedeflerden biri olan ARA 17 geni, bir miRNA direnci ile karşı karşıya kaldığı zaman, çok sayıda gelişimsel bozukluk bitkide gözlenebilir [83]. Ama özellikle, A. Thaliana'nın oksin yanıt faktörü genleri gen yazılması sonrası (post-transcriptional) olarak mir-160 tarafından düzenlendiği düşünülmektedir [83][84]. miR160'ın polimorfizmlerine bakıldığında 141 farklı dizilimi olduğu görülür [85].

miR171'in Arabidopsis'te korkuluk benzeri (SCL SCARECROW-LIKE (SCL)) transkripsiyon faktörlerinin ifadesini bastırmada, meristemlerin farklılaşmasını bastırmada rolü vardır [86]. miR171'in hedefi olan, klorofil biyosentezinde görevli, korkuluk benzeri proteinleri (SCL6 / 22/27) bilinmeyen bir mekanizma ile negatif yönde düzenlediği gösterilmiştir [87]. Toplam dört bitkide miR171 korunmuş olarak bulunmaktadır ve A. thaliana'da üç, pirinç ve üzümde dokuz, kavakta ise on üç miR171 geni mevcuttur [88]. miR171'in polimorfizmlerine bakıldığında 212 farklı dizilimi olduğu görülür [89].

miR396, Arabidopsis yapraklarındaki eski korunmuş miRNA'lardan olup, hücre çoğalmasını kontrol etmek için bilinen transkripsiyon faktörleri olan büyüme düzenleyici faktör (GRF) ailesine ait korunmuş hedefleri düzenler [90].

Arabidopsis olarak, miR396 iki farklı tip miRNA (miR396a ve miR396b) kodlar ve dizi analizileri (ATceramidase benzeri1, AT ceramidase benzeri 2 ve AT ceramidase benzeri 3) gibi üç seramıdaz benzeri genin miR396'ya hedef olabileceğini göstermektedir [90]. miR396'nın polimorfizmlerine bakıldığında 134 farklı dizilimi olduğu görülür [91].

mir2919 *Oryza sativa* (pirinçte), *Prunus persica* (şeftalide), *opium poppy* (haşhaşta) veya bazı diğer tek çenekli bitkilerde bulunmuş bir türdür [78][92].

mir8123; *Prunus persica* (şeftalide) ve *Solanum tuberosum* (patatestede) miR8123a ve miR8123b olmak üzere iki çeşidini bulunur [93][94].

2.1.5 miRNA'ların Transkripsiyonu

miRNA genlerinin transkripsiyonu genellikle RNA polimeraz tarafından II (Pol II) gerçekleştirilir [62][71].

Genellikle DNA dizisinin yakınında bir promotere bağlanan polimeraz saç tokası (hairpin loop) yapısına gelecek pri-miRNA'yı kodlar. Elde edilen transkript 5' ucunda özel olarak değişime uğramış nükleotit ile örtülü 5' şapka(cap) eklenir, çoklu adeninler ile 3' uca poli A kuyruğu eklenir ve kesim yapılır. Hayvan miRNA'ları başlangıçta yaklaşık 80 nükleotid uzunluğunda, RNA stem loop parçası olarak transkripsiyonu yapar, bu da birincil miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılan bir kaç yüz nükleotid uzunluğundaki miRNA ön kısmını oluşturur [62][66].

2.2 Zeytin

2.2.1 Zeytinin Sınıflandırılması

Zeytin (*Olea europaea),* şu an kullanılan sınıflandırma sistemlerine göre 20-29 cinse sahip olan *Oleaceae* familyasına aittir. Olea cinsi, diğer bitkilere kıyasla zor yetiştirme şartlarına sahip sahalardan çıkan çeşitli tür ve alt türleri içermektedir. Bunların çoğu çalılar ve ağaçlardan oluşmaktadır. Zeytin bitkisinin sınıflandırması Çizelge 2.1'de gösterilmiştir [95].

Çizelge 2. 1 Zeytinin taksonomisi

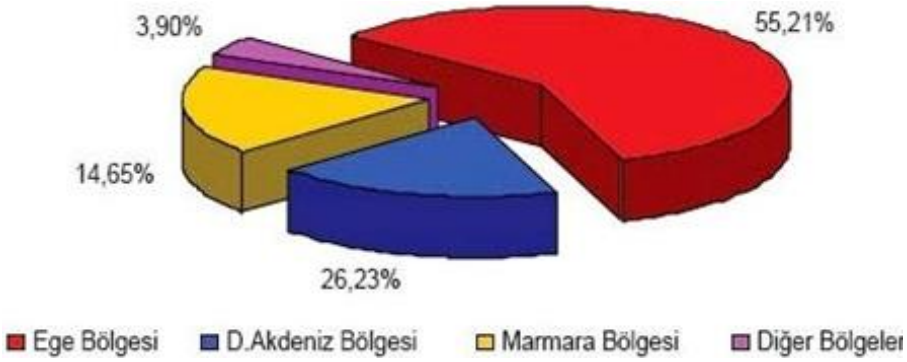
Kingdom	*Plantae*
Subkingdom	*Tracheobionta*
Division	*Magnoliophyta*
Class	*Magnoliopsida*
Subclass	*Asteridae*
Ordo	*Lamiales*
Familya	*Oleaceae*
Genus	*Olea*

2.2.2 *O. Europaea*'nın Dünyadaki Ve Türkiye'deki Yayılışı

Günümüzde zeytin ağaçlarının % 98 kadar büyük bir kısmı Akdeniz ülkelerinde bulunmaktadır. Akdeniz'in belli başlı zeytin üreten ülkeleri İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Portekiz, Suriye, Fas ve Cezayir'dir [96].

Dünyada yaklaşık 10 milyon hektar alan üzerinde ortalama 900 milyondan fazla zeytin ağacı olduğu düşünülmektedir. 2004 yılı istatistiklerine göre 15.340.488 ton olan Dünya zeytin üretiminin % 98'i Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerden oluşup, % 2'si ise diğer ülkelerden sağlanmaktadır. 2004 yılı istatistiklerine göre, Dünya'da en fazla zeytin üreten ülkeler arasında İspanya %29.7' lik üretim ile ilk sıradayken, İtalya ise %20.5' lik üretimle büyük bir paya sahiptir; Yunanistan, Türkiye, Tunus ise diğer önemli zeytin üreticileri arasında yer almaktadır [97].

Türkiyede Zeytin ağaçlarının bölgelere göre olan dağılımı Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 3 Türkiye'de bölgelere göre zeytin ağaçlarının dağılımı

Nanodrop; DNA, RNA, protein, peptid vs. maddelerin ölçümlerinde miktar tayini için son zamanlarda kullanılan oldukça kullanışlı bir spektrofotometrik yöntemdir. Absorbans (optik yoğunluk, OD) değerine bakılarak kullanılan bir teknikle ölçüm gerçekleştirilir. Absorbans bir ışının absorblayıcı (soğurucu) bir ortamdan geçtikten sonraki değerinin geçmeden önceki değerine oranı ile ölçülür. Temel mekanizma olarak, ışının ne kadarının o ortamdan geçebildiğini ölçerek mevcut çözeltide ne kadar madde miktarı olduğunu tespit eder [98].

1 µl madde miktarı ile yapılan ölçüm sonucunda absorbans değerlerine bakılarak mikrolitrede nanogram cinsinden madde miktarına ulaşılır. Bu şekilde alınan değer ile nükleik asit miktarı tespit edilir. Ayrıca farklı dalga boylarında gönderilen ışınlara bakılarak farklı absorbans değerleri ölçülür. Bu ölçüm değerlerinin birbirlerine oranlarına göre maddelerin ne derece uygun saflıkta olduğu tespit edilir [98].

Zeytin (*Olea europaea* L. cv. Ayvalik çeşidi) bitkisinden meyve (olgun ve ham) yaprak (yıl sonu ve yıl başı) olmak üzere daha önce altı adet küçük RNA kütüphanesi kurulmuş ve yüksek verimli Illumina dizileme tekniği ile dizilenmiştir. Biyoinformatik analizleriyle 93,526,915 gen okuması yapılarak 22 miRNA ailesine ait 135 korunmuş miRNA tespit edilmiştir. Buna ek olarak; zeytinde 38 yeni miRNA keşfedilmiştir. Zeytin ağacı miRNA'larının ifadesi altı farklı kütüphane arasında büyük ölçüde değişir [99].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Bitki Materyali

Fide şeklindeki *Olea europaea* Gemlik kültivarı Türkiye Cumhuriyeti Tarım Bakanlığı Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

3.2 Tamponlar ve Çözeltiler

Çizelge 3. 1 Tampon ve çözeltiler

Tampon veya çözelti	Yapısı veya hazırlanma şekli
DEPC (Di Etil Piro Karbonat)'li su	% 0,1'lik solusyonları hazırlandı. Oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı.
Etanol	%75-80 stok solüsyonu hazırlandı.
Etidyum bromür (EtBr)	5 mg/ml EtBr'e steril moleküler biyolojik su ilave edildi.
MOPS (5X)	0,2 MOPS pH 7, 50 mM NaOH, 50 mM EDTA ve DEPC' li su bir gece inkübe edildikten sonra otoklavlandı.
RNA yükleme çözeltisi	1 mM EDTA, pH 8.0, %0.4 bromfenol mavisi ve %50 gliserol karışımı, DEPC'li su ilave edildi.
dNTP karışımı	10 mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı hazırlandı.
TBE çözeltisi (10X)	54 g Tris, 27,5 g Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA, 1L saf suya tamamlandı.
DNA yükleme çözeltisi	250 mM Tris-HCl pH 7.5, %0.2 bromfenol mavisi, %0,2 ksilen siyanol ve %40 gliserol karışımı

3.3 Moleküler Markerlar

Çizelge 3. 2 Moleküler markerlar

RiboRuler High Range RNA Ladder (n/2µl)	6000 bp, 4000 bp, 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 500 bp ve 200 bp bantları gözlenir.
Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder	1X'lik TBE'de 1000 bp ile 100 bp arasında toplam 10 bant gözlenir.

3.4 Enzimler

Çizelge 3. 3 Enzimler

Taq polimeraz	Qiagen Taq DNA Polymerase
Ters transkriptaz	ArrayScript™ reverse transkriptaz (RT)

3.5 Kitler

Çizelge 3. 4 Kitler

RNA izolasyon kiti	miRCURY™ RNA Isolation Kit– Cell & Plant
cDNA sentez kiti	miRCURY LNA^{TM} Universal RT microRNA PCR
Real-Time PCR	AriaMX Real-Time PCR Sistem (Agilent Technologies, Inc.)

3.6 Oligonükleotidler

Çizelge 3. 5 Oligonükleotidler

Primerin Adı	Primer Dizini
GSP1 miR-159f GSP1 miR-159r	5’-GTGGGTTTGGATTGAAGGG - 3’ 5’-GTGCAGGGTCCGAGG - 3’
GSP2 miR-160f GSP2 miR-160r	5’-TTGTGCCTGGCTCCCTGT - 3’ 5’-GTGCAGGGTCCGAGGT - 3’
GSP3 miR-171f GSP3 miR-171r	5’-GTTTTGATTGAGCCGTGCC - 3’ 5’-GTGCAGGGTCCGAGGT - 3’
GSP4 miR-396f GSP4 miR-396r	5’-GTTGGGGTTCCACAGCTTT - 3’ 5’-GTGCAGGGTCCGAGGT - 3’
GSP5 miR-2919f GSP5 miR-2919r	5’-TTTTTTTCCCCCCCCCCC - 3’ 5’-GTGCAGGGTCCGAGGT - 3’
GSP6 miR-8123f GSP6 miR-8123r	5’- GTTTGGGAACACGGTAAC- 3’ 5’- GTGCAGGGTCCGAGG- 3’

3.7 Malzemelerin Hazırlanması

RNA molekülleri yapısındaki riboz şekerinin -OH grubu nedeniyle biyolojik ortamlarda çokça bulunan ribonükleaz enzimleriyle parçalanmaktadır. Bu nedenle RNA izolasyonundan önce ortamdaki RNaz kontaminasyonunun kurtulmak için DEPC solüsyonu kullanılır.

RNA izolasyonundan önce kullanılacak havan ve havaneller, tüm plastik ve cam malzemeler % 0,1’lik DEPC’li suda bir gece bekletilir, daha sonra 1 atm basınç altında 121°C’de 60 dakika otoklavlanır. Yine benzer şekilde, RNA ile olan çalışmalarda kullanılacak saf suya % 0,1 oranında DEPC ilave edildi. Bir gece boyunca bekletilip 1 atm basınç altında 121°C’de 60 dakika otoklavlanır.

3.8 Total RNA İzolasyonu

3.8.1 Trizol İzolasyonu Total RNA izolasyonu

Real Time PCR aşamasına geçmeden önce total RNA'yı kontrol etmek amacıyla trizol ile RNA izolasyonu aşağıdaki adımlara uyularak gerçekleştirilir.

G20 zeytin hattından alınan genç yaprak örnekleri sıvı azot ve havan kullanılarak ezildi. Sıvı azot ile çözünmesi engellenen ezilmiş örnekler 50 mg olarak tartılır ve 2 ml'lik eppendorf tüpe alınır. Tartılan örneklerin bulunduğu eppendorf tüpler sıvı azot üzerindeyken 1 ml trizol tüpe eklenir ve oda sıcaklığında el ile çalkalanarak karışması sağlanır. Tüpün duvarına yapışan örnekler için spindown yapılır.Bir taraftan santrifüj $4^{o}C$ sıcaklıkta boşta döndürülür.

Örnekler 10 dk 12000 g'de $4^{o}C$'de santrifüj yapılır.

Süpernatant yeni eppendorf tüpe aktarılır. 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılır. Örneklerin üzerine 0.2 ml kloroform eklenir. 15 saniye kadar elle çalkalanır. 2-3 dk oda sıcaklığında bekletilir. 12.000g'de 15 dakika boyunca $4^{o}C$ sıcaklıkta santrifüj yapılır.

Ayrışma sonucunda üç faz oluşur en üstteki sıvı faz RNA içerdiğinden ayrı bir tüpe aktarılır.

Fazların toplamının yaklaşık yarısını süpernatant kısmı oluşturur. Üst faz RNA'yı orta faz DNA'yı içerir. 0.5 µl %100 izopropanol eklenir ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılır. $4^{o}C$ sıcaklıkta 12000 g'de 10 dk santrifüj yapılır.

Çökme gözlenmediğinden ikinci santrifüj 16000 g'de 10 dk daha ekstradan gerçekleştirilir. Çökme gözlenmediğinden üçüncü santrifüj 16500g'de 12 dk şeklinde gerçekleştirilir. Çökme miktarını arttırmak için son olarak dördüncü santrifüj 16500 g'de 5 dk gerçekleştirilir.

Üst sıvı atılır ve tüpte yalnızca pellet kalır. Pellet bulunan tüpün içine 1 ml %75'lik DEPC'li etanol eklenir. Etanol ve pellet karışımı vorteks ile bir miktar karıştırılır. $4^{o}C$ sıcaklıkta 7500 g'de 5 dk santrifüj yapılır.

Daha sonra üzerindeki süpernatant boşaltılır ve pellet laminar flow kabin içinde tüpün kapağı açık olacak şekilde kurumaya bırakılır. Kuruma işleminden sonra 45 µl RNaz'sız

su eklenir ve birkaç kez pipetleme yapılır. 55^{o}C sıcaklıktaki inkübatörde 10-15 dk süreyle inkübasyona bırakılır.

3.8.2 miRCURY™ RNA Isolation Kiti ile İzolasyon

50 mg bitki yaprağı veya 5x10^{6} bitki hücresi ile bitki hücresinin üzerini kapatacak kadar uygun miktarda sıvı nitrojen havana konur. Örnek ince toz haline gelinceye kadar sıvı nitrojende havaneliyle dövülür.

Dondurulmuş örnek kullanılırken dövme işleminde bitki yaprağının çözünmesine izin verilmeden, sıvı nitrojenin buharlaşmasına müsaade edilir.

Kit içinde bulunan 600 µl lizis solüsyonu bitki örneği üzerine eklenir ve örnek homojenize olana kadar öğütmeye devam edilir. Lizat RNA'yı parçalayan RNaz'ların bulunmadığı mikrosantrifüj tüpüne taşınır.

Lizat 2 dk 14000 g'de döndürülür. Süpernatant başka bir RNaz'sız mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Süpernatant hacimleri not edilir.

Daha önce süpernatantta ölçülmüş hacimlere eşit miktarda %70 etanol eklenir ve vortekslenir.

Toplama tüpündeki numune kolona toplanır. 1 dk süreyle 3500 g'de santrifüj edilir. Eğer tüm lizat miktarı toplama tüpüne geçmediyse ek olarak 1 dk 14000 g'de santrifüj yapılır.

Kolondan geçenler uzaklaştırılır ve kolonla toplama tüpü yeniden birleştirilir. Eğer lizat miktarı 650 µl'yi aşıyorsa kalan lizat kolona yüklenir ve 1 dk 3500 g'de santrifüj yapılır.

400 µl yıkama solüsyonu kolona yüklenir ve 1 dk 14000 g'de santrifüj edilir. Yıkama solüsyonunun tamamının kolondan geçmesi sağlanır. Eğer geçmediyse ek olarak 1 dk daha 14000 g'de santrifüj yapılır. Kolondan geçenler uzaklaştırılır ve kolon ile toplama tüpü yeniden birleştirilir.

400 µl yıkama solüsyonu eklenerek ve 1 dk 14000 g'de santrifüj yapılarak kolon 2 kez daha yıkanır. Kolondan geçenler uzaklaştırılır ve kolon ile toplama tüpü yeniden birleştirilir. Rezinler iyice kuruması 14000 g'de 2 dk santrifüj yapılır ve toplama tüpü uzaklaştırılır.

Kolon kitin içinde bulunan 1.7 mL'lik temiz elüsyon tüpüne yerleştirilir. 50 µl elüsyon tamponu kolona eklenir ve 2 dk 200 g'de santrifüj yapılır.

Daha sonra 14000 g'de 1 dk santrifüj yapılır. Kolondan elüe edilen miktar not edilir. Eğer 50 µl'nin tamamı elüe edilemezse kolon 14000 g'de 1 dk daha ek bir santrifüj yapılır.

Maksimum miktarda RNA elde edilebilmesi için elüsyon basamağı tekrarlanır. RNA'nın dilüsyona uğramaması için elüsyonlar tekrarlandığında numuneler farklı tüplerde toplanır. RNA örneklerinin dilüsyona uğramasından kaçınmak için bir kez elüsyon yapılır. Saflaştırılan RNA örneği -20^{o}C'de günlerce saklanır. Daha uzun süreler stoklanacak RNA'lar ise -70^{o}C'de tutulur.

3.9 RNA Analizi

3.9.1 Formaldehit Jelinin Hazırlanması

Tüm elektroforez ekipmanları DEPC'li su ile temizlendi. %1'lik jel hazırlamak için 0,5 g agaroz (Applichem) ve 10 ml 5X MOPS, 31,25 ml DEPC'li suda mikrodalgada çözülür. Daha sonra karışım 60°C'ye soğutulur. İçerisine etüvde 60°C'ye ısıtılmış 8,75 ml formaldehit ilave edilip, jel tabağına dökülür.

3.9.2 Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması

4,5 µl RNA'ya (1 µl RNA+ 3,5 µl DEPC'li su), 2 µl 5X MOPS, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid ve 0,5 µl Etidyum bromür ilave edilir. 55°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılır. Bu karışıma 2 µl yükleme tamponu ilave edilir ve örnekler jele yüklenir.

Total RNA'lar MOPS ile hazırlanmış jele, 1X MOPS tamponu içindeyken yüklenir. Hazırlanmış %1'lik jel de 75V'da 60 dakika elektroforez edilir.

3.9.3 RNA miktar Tayini

İzole edilen toplam RNA'nın tespiti için Nanodrop spektrofotometre cihazı kullanılır. Böylece RNA miktarları ve kalitesi tespit edilmiş olur.

3.10 miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR kit ile cDNA sentez

miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR kit protokolüne uyularak cDNA sentez adımları gerçekleştirilmiştir.

Her bir hedef RNA örneği nükleazsız su kullanılarak 5 ng/µl konstrasyona ayarlanır.

5X reaksiyon tamponu: 5X reaksiyon tamponu nükleazsız su ile yavaşça çözülür ve beklemeden buz üzerine konulur. Vortekslemek suretiyle karıştırma işlemi gerçekleştirilir.

UniSP kullanımı (RNA spike-ins): Uni Sp6 RNA spike-ins tüp içinde 80 µl nükleazsız su kullanarak süspanse edilir. Santrifüjde bir tur döndürerek karışması sağlanır. RNA spike-ins'in tamamının çözünmesi için buz üzerinde 20-30 dk bırakılır. Numune -20°C'de saklanır. RT reaksiyonundan önce 1µl sentetik spike-ins (108 kopya/µl) her 20 ng RNA örneğine eklenir.

Reaktifler çizelgede belirtildiği oranlarda karıştırılır. Karıştırma işlemi başlangıçta pipetajla yapılır. Daha sonra spin down yapılarak karıştırma işlemi tamamlanır.

Çizelge 3. 6 Reverse Trankripsiyon Reaksiyon Kurulumu

Reaktif	RT Reaksiyonu için Hacim(µl)
5X reaksiyon tamponu	2
Nükleazsız Su	4,5
Enzim Karışımı	1
Sentetik RNA Spike İns	0,5
Template Total RNA (5ng/µl)	2
Toplam Hacim	10

Karıştırılan reaktiflere 60 dk 42°C'de inkübasyon yapılır. Daha sonra 5 dk 95°C'de reverse transkriptaz enzimi ısı ile inaktive edilir. Devamında beklemeden 4°C'de soğutma işlemi yapılır. Örnekler +4°C'de saklanır veya -20°C'de dondurulur.

3.11 Reverse Transkripsiyon (RT PCR)

Bitkilerde daha önce tespit edilmiş olan miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123 isimli literature girmiş bu korunmuş miRNA örnekleri için ileri ve geri olmak üzere altı farklı primer çifti kullanıldı.

200 µl'lik PCR tüpü içine ileri ve geri primerlereden 1'er µl, cDNA örneğinden 1 µl, RNaz'sız sudan 17 µl ve master mix PCR karışımından 5 µl ekleyip spin down yapılır.

Yapılan karışım çizelgede belirtilen sıcaklıkta ve sürelerde polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulur.

Çizelge 3. 7 Polimeraz Zincir Reaksiyon Döngüsü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı	İşlem
94 °C	3 dk	1	Başlangıç denatürasyonu
94 °C	30 sn	35	Denatürasyon
56 °C	40 sn		Bağlanma
72 °C	1 dk		Uzama
72 °C	10 dk	1	Bitiş

0.4 gr agaroz, 40 ml TBE veya TAE, 1.6 µl $EtBr_2$ maddelerinin karışımıyla agaroz jel çözeltisi hazırlanır. Agaroz ve TBE çözeltisi bir erlenin içine konulur ve mikrodalga fırın içinde kaynamasına müsaade edilmeden yaklaşık 4 dk boyunca ısıtılır çözünmesi sağlanır. Karışım çok çalkalanmayarak jelin düzgün polarize olması sağlanır.

Sıcak olan karışım oda sıcaklığına alınarak soğuması sağlanır. Jel henüz donmadan ılıkken $EtBr_2$ boyası eklenir. Daha sonra çok hafifçe alkalanarak boyanın her yere homojen karışması sağlanır. Devamında hiç beklemeden jel tarakları yerleştirilmiş olan jel tabağına karışım dökülür ve donması için beklenir. Jel donduktan sonra jel tarakları çıkarılır böylece jel üzerinde kuyucuklar oluşmuş olur.

Jel tabağı elektroforezin yapılacağı tamponla dolu elektroforez tankına yerleştirilir. Tamponun içinde bulunan jele marker DNA eşliğinde cDNA'dan çoğaltılan PCR ürünleri yerleştirilir. En baştaki kuyucuğa yüklenen marker DNA çözeltisi; 4 µl moleküler biyolojik su, 1 µl boya ve 1 µl ladder DNA (bilinen farklı boyutlardaki DNA karışımı) karıştırılarak hazırlanır. Örnekler ise 4 µl PCR ürünü ve 1 µl boyanın karıştırılmasıyla hazırlanır ve kuyulara yüklenir.

3.12 Real Time PCR (qPCR)

3.12.1 Örneklerin Hazırlanması

miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123 miRNA ileri primerleri 10 µM konsantrasyona seyreltilir. Her bir hedef RNA örneği nükleazsız su kullanılarak 5 ng/µl konstrasyona ayarlanır.

12.5 µl qPCR master mix, 1 µl miRNA'ya özgü ileri primer, 1 µl evrensel geri primer, 0.33 µl ileri primerler (miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123 miRNA) ve toplam hacmi 25 µl'ye tamamlamak için 10,17 µl nükleazsız moleküler biyolojik su karışımı hazırlanır.

3.12.2 qPCR işlemi

Zeytin için kullanılan primerler (miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123 miRNA) ile Exicon kit izolasyon ürünlerinin olan G20Z1 ve G20Z2'nin RNA'ları kullanılır. Karışım köpürmeyecek şekilde yavaşça karıştırılır ve PCR plate'ine eklenir. Hazırlanmış karışımların olduğu her bir kuyucuğa RNA örneğinden 1 µl kadar eklenir. Yine yavaşça karıştırılarak köpük olması engellenir. Karışımların olduğu plate cihaza yerleştirilir. Cihaza yerleştirilen örnekler çizelgedeki döngüye tabi tutulur.

Çizelge 3. 8 qPCR döngüsü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı	İşlem
95°C	10 dk	1	Başlangıç Denatürasyonu
95°C	10 sn	40	Denatürasyon
58.5°C	15 sn		Bağlanma
72°C	20 sn		Uzama
95°C	30 sn	1	Denatürasyon
65°C	30 sn		Bağlanma
95°C	30 sn		Uzama

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1 Total RNA'nın izolasyonu

Exicon kiti ve Trizol ile izolasyon yapılarak; G20 genç zeytin yaprak örneklerinde bulunan total RNA'ların tespiti amaçlanmıştı. Exicon kiti ile yapılan RNA izolasyonundan sonra MOPS ile hazırlanan formaldehit jeline örnekler yüklendi ama jelde görüntü alınamadı. G20 zeytin hattının genç zeytin yapraklarından izole edilen miRNA örneklerinden 1'er µl örnek alınarak Nanodrop spektrofotometre cihazında miktar tayini yapıldı ve Nanodrop cihazından sonuç alınabildi. Aynı örneklerden yapılan iki izolasyonun sonucunda G20Z1 ve G20Z2 isimli iki numune için Çizelge 4.1'deki sonuçlar elde edildi.

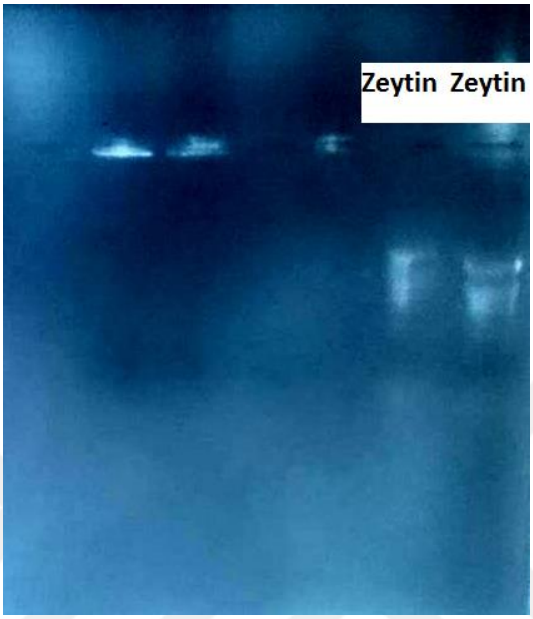
Çizelge 4. 1 miRNA'ların miktar tayini

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/µL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	G20Z1	16.05.10 14:11:13			221,38	2,05	2,02	4,719	1,879	1,923	-0,816	0,192	1,000
2	G20Z2	16.05.10 14:12:40			484,28	2,13	2,70	11,008	4,585	3,392	-1,100	0,192	1,000

Alınan verilere göre G20Z1 örneği için nükleik asit miktarı 1 µl hacimde 221,38 ng olarak belirlendi. OD 260/280 oranı 2,05 ve OD 260/230 oranı ise 2,02 olarak belirlendi.

G20Z2 örneği için nükleik asit miktarı 1 µl hacimde 484,28 ng olarak belirlendi. OD 260/280 oranı 2,13 ve OD 260/230 oranı ise 2,70 olarak belirlendi.

İzolasyonun ardından RNA jeli olan formaldehit jeli hazırlandı ve aynı izolasyon ürünü iki defa jele yüklendi. UV ışık altında tespit edilen ışıma sonucunda Şekil 4.1 'nin görüntüsü elde edildi.



Şekil 4. 1 Trizol Tüm RNA izolasyonunun Formaldehit Jel görüntüsü

4.3 miRNA'ların İzolasyonu ve analizi

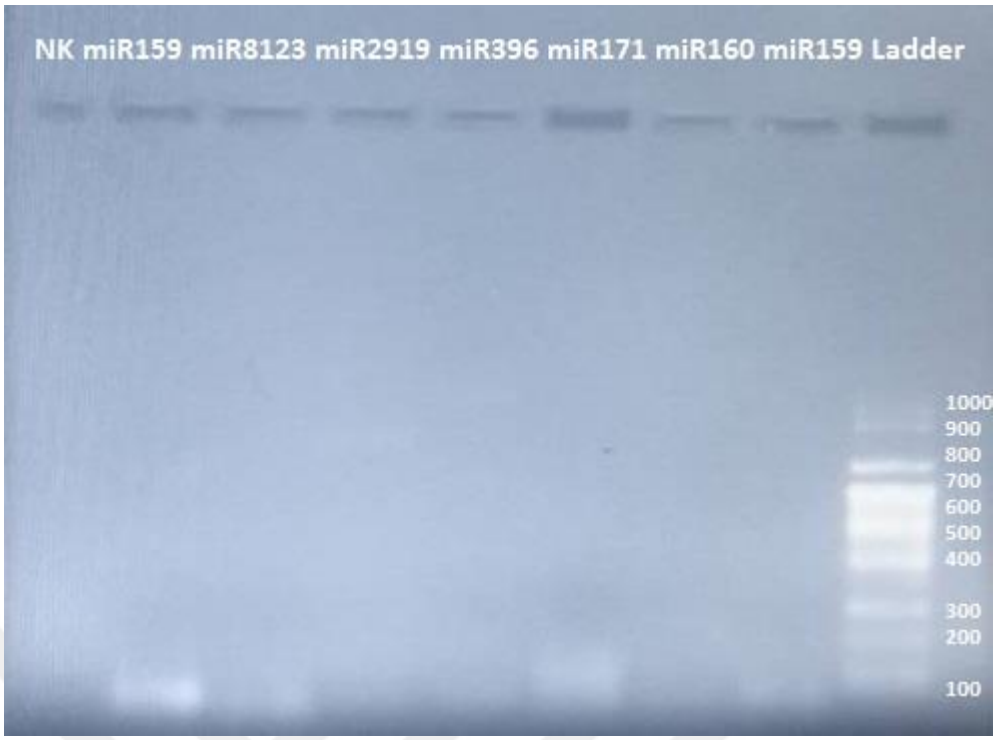
Tek bir örnek ve tek bir doku olarak daha önce EST kütüphanesi yapılmış olan G20 zeytin hattının genç zeytin yaprakları kullanılmıştır. G20Z1 ve G20Z2 olarak adlandırılan iki numune de tamamen aynı örneklerle ve aynı izolasyon protokolü kulanılarak yapılmıştır. Sadece miRNA izolasyon kitin son aşamasındaki elüsyon basamağında G20Z1 örneğine elüsyon tamponunun tüm hacim konularak örnek tek seferde elüe edilmiştir. G20Z2 örneğinde elüsyon tamponunun hacimi yarı yarıya konularak iki seferde elüsyon işlemi gerçekleşmiştir.

4.1 Reverse Transkripsiyon (RT PCR)

Reverse transkripsiyon işlemi ile miRNA'ların cDNA'ya çevrilesi aşamasında; Exicon kitiyle elde edilen G20Z1 ve G20Z2 adlı iki örnek için nanodrop verilerine bakılınca, miRNA miktarı yüksek olan G20Z2 kodlu örnek cDNA'ya çevrimde kullanılacak numune olarak seçildi.

PCR ürünleri agaroz jele yüklendiğinde primerlerin yanlış bölgelere bağlanması sonucu istenen bölgeye özgü spesifik çoğaltımlar yerine istenmeyen (non-spesifik) çoğaltımlar gerçekleşebilir. Bunun dışında primerler istenen bölgelere bağlanmak yerine birbirlerine komplementarite oluşturabilir ve birbirlerine bağlanarak istenmeyen primer dimerleri meydana getirebilirler. Bu gibi durumlarda miRNA'ların cDNA eldesinden üretilen PCR ürünleri çok kısa diziler olduğundan oluşabilecek primer dimerlerden ayırt edilemeyebilirler. Bu dizilerin gerçekten miRNA olup olmadığını anlayabilmek için kuyulardan birine içinde hiç nükleik asit konulmamış bir PCR ürünü yüklenir. Normal şartlarda negatif kontrolde hiçbir bantın gözlenmemesi beklenir. Eğer ki negatif kontrolde küçük boyuttaki bantlar oluşuyorsa, o kısa dizilerin aslında miRNA olmadığı, istenmeyen non-spesifik çoğaltımlar veya primerlerin birbirine bağlanmasıyla oluşan primer-dimerler olduğu söylenir [100].

Altı farklı primer çifti (miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123) ile oluşturulan cDNA'ların polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonucunda oluşan PCR ürünleri ve içerisine cDNA konulmamış PCR ürünü olan negatif kontrol (NK), boya ile birlikte ve baş kısmındaki ladder eşliğinde elektroforez edildi. Yalnızca UV ışık altında tespit edilen ışıma sonucunda Şekil 4.2'nin görüntüsü elde edildi.



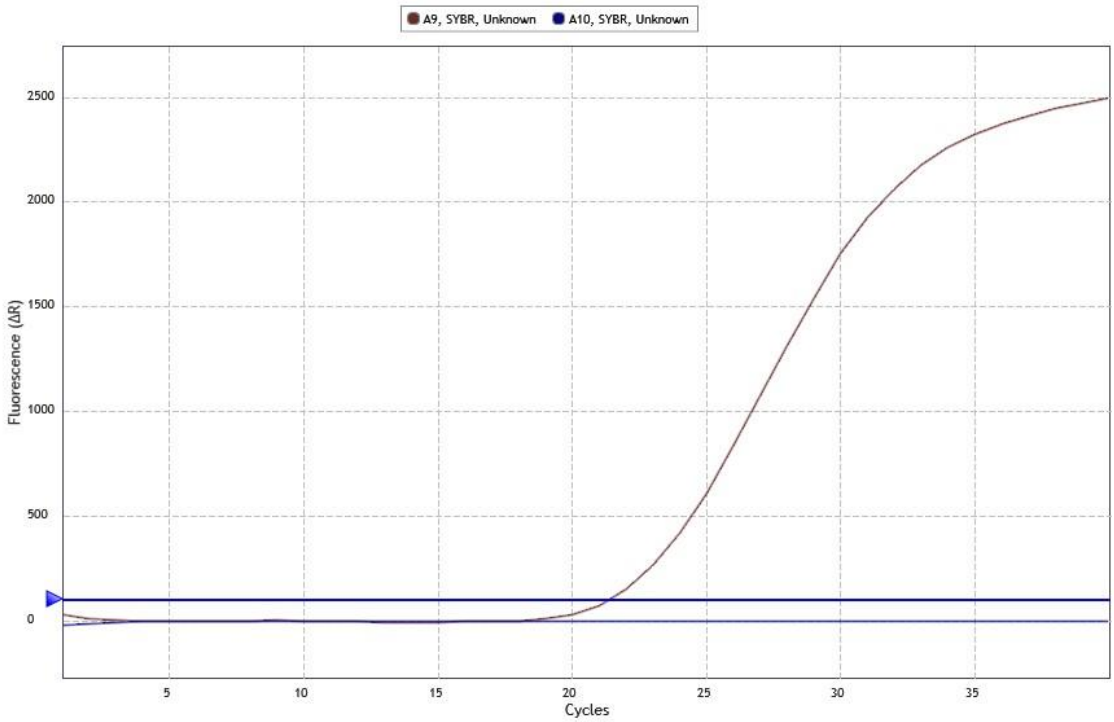
Şekil 4. 2 cDNA PCR jelde yürüme görüntüsü

4.2 Real Time PCR Sonuçları

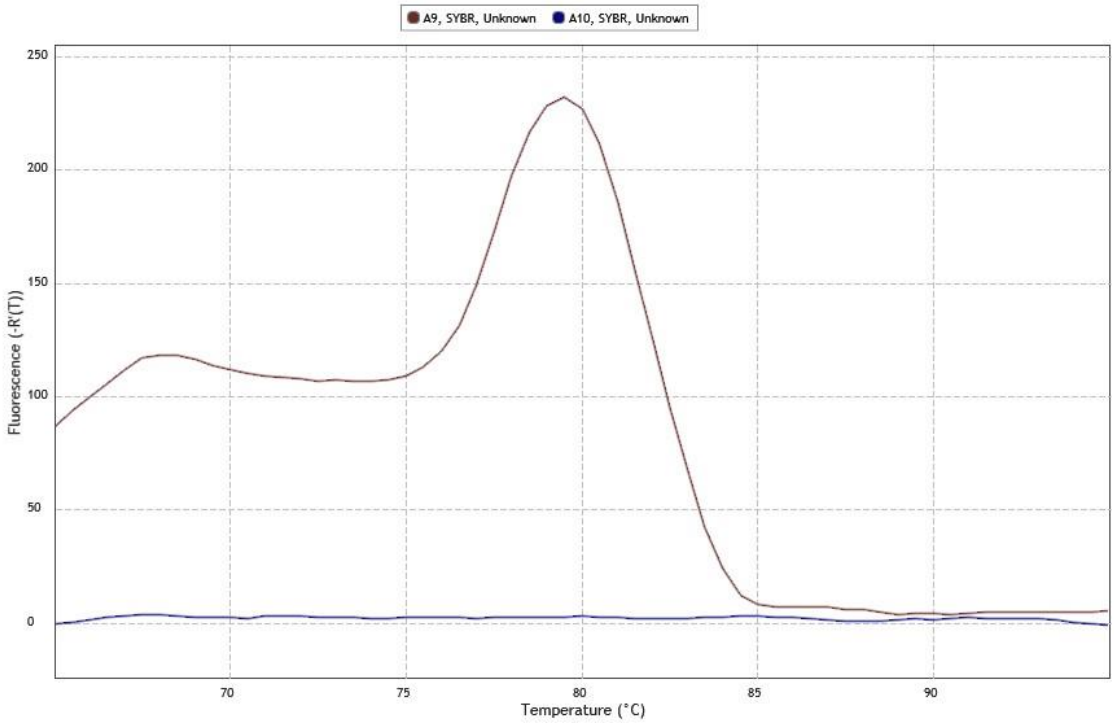
G20Z2 örneğinin cDNA'sının miR159 primeriyle Real Time PCR yapılması sonucunda; Çoğaltım grafiğininde (Şekil 4.3) örnek mor, negatif kontrol ise mavi renkte ifade edildi.

Erime eğrisi (Şekil 4.4) grafiğinde de yine örnek mor, negatif kontrol ise mavi renkte ifade edildi.

Bu primer ile yapılan çoğaltımda Cq: 19.27 ve Tm :79.50 olarak ölçüldü (Çizelge 4.2).



Şekil 4. 3 miR159 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği



Şekil 4. 4 miR159 Real Time PCR Erime Eğrisi

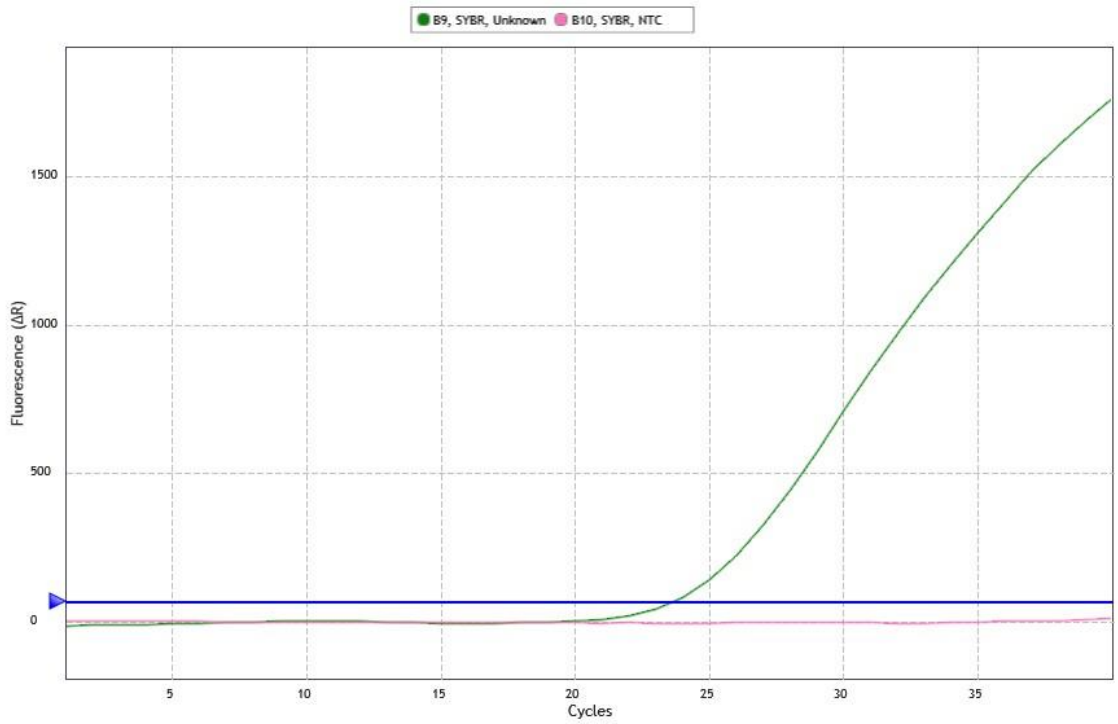
Çizelge 4. 2 miR159 Real Time PCR Cq ve Tm değerleri

Well	Well Type	Dye	Target	Replicate	Cq (-R'(T))	Tm Product 1 (-R'(T))
A9	Unknown	SYBR	SYBR	---	19.27	79.50
A10	Unknown	SYBR	SYBR	---	No Cq	68.00

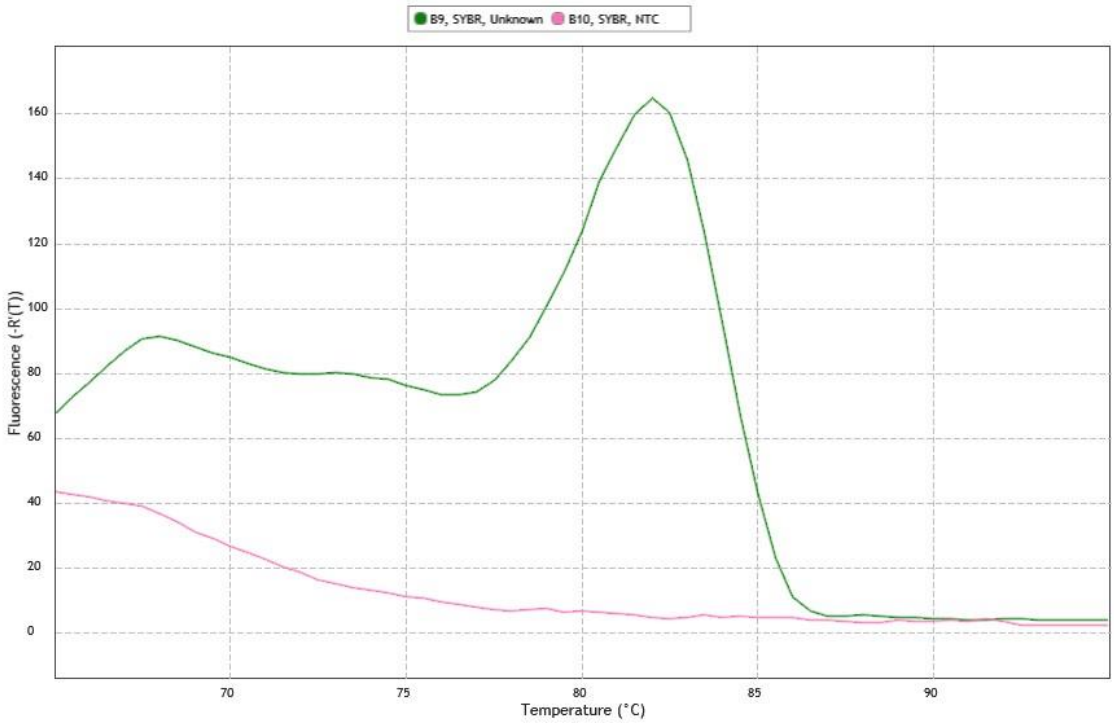
G20Z2 örneğinin cDNA'sının miR160 primeriyle Real Time PCR yapılması sonucunda; Çoğaltım grafiğininde (Şekil 4.5) örnek yeşil, negatif kontrol ise pembe renkte ifade edildi.

Erime eğrisi (Şekil 4.6) grafiğinde de yine örnek yeşil, negatif kontrol ise pembe renkte ifade edildi.

Bu primer ile yapılan çoğaltımda Cq: 23.84 ve Tm: 82.00 olarak ölçüldü (Çizelge 4.3).



Şekil 4. 5 miR160 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği



Şekil 4. 6 miR160 Real Time PCR Erime Eğrisi

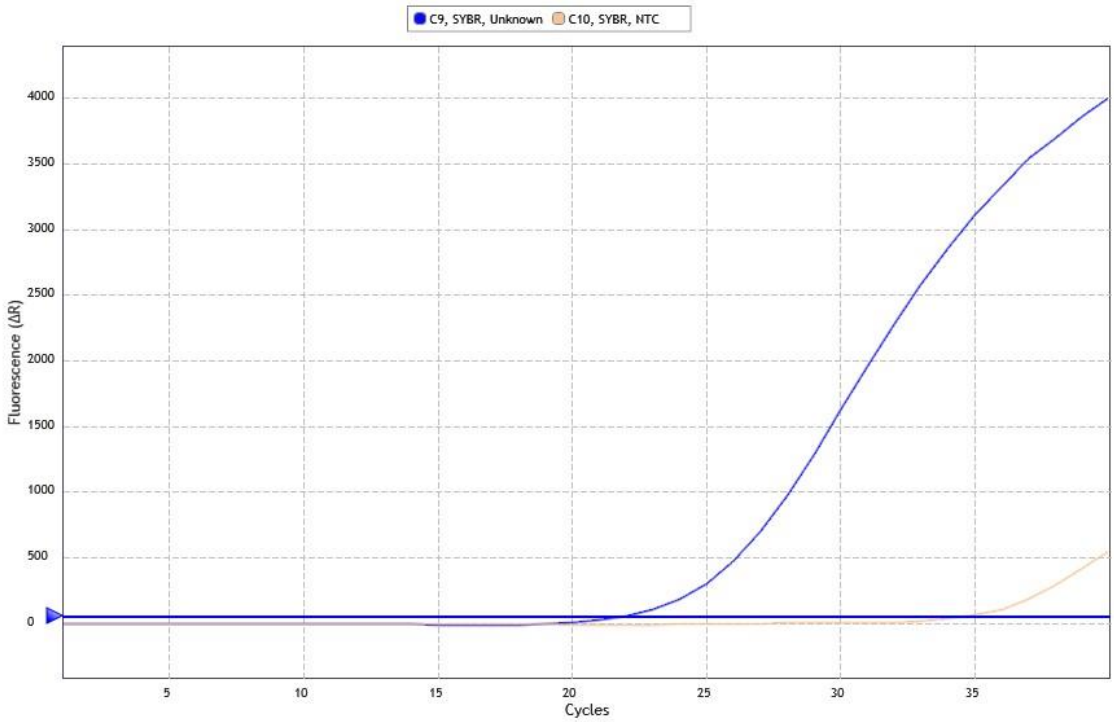
Çizelge 4. 3 miR160 Real Time PCR Cq ve Tm değerleri

Well	Well Type	Dye	Target	Replicate	Cq (-R'(T))	Tm Product 1 (-R'(T))
B9	Unknown	SYBR	SYBR	---	23.84	82.00
B10	NTC	SYBR	SYBR	---	No Cq	65.00

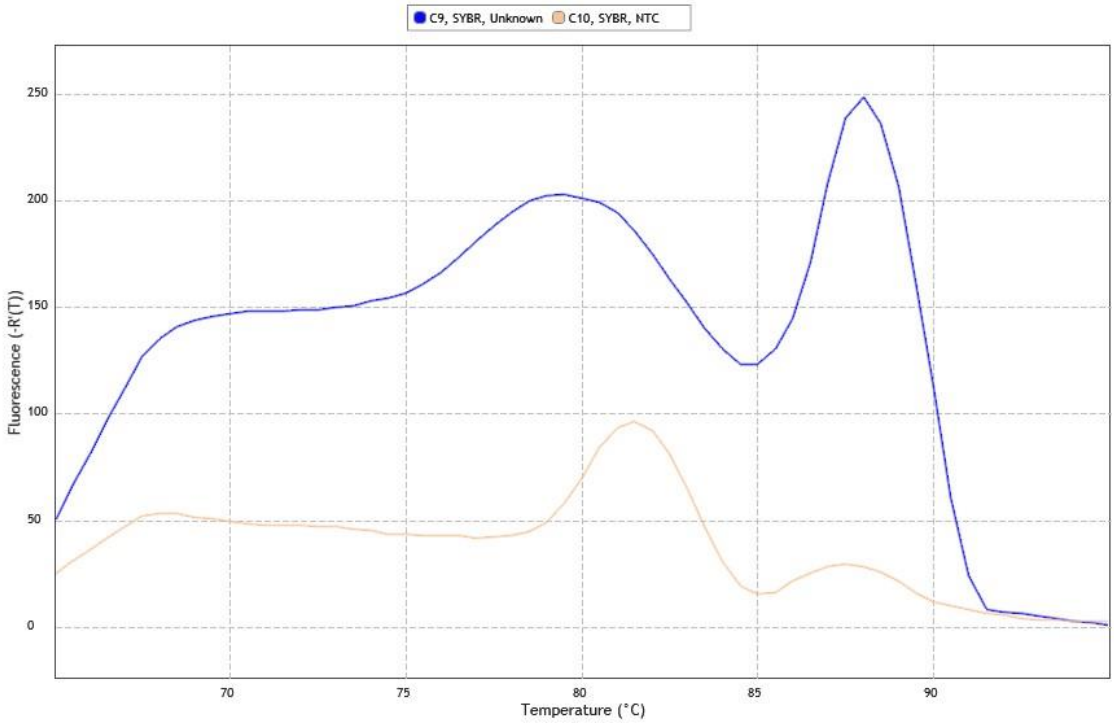
G20Z2 örneğinin cDNA'sının miR171 primeriyle Real Time PCR yapılması sonucunda; Çoğaltım grafiğininde (Şekil 4.7) örnek mavi, negatif kontrol ise pembe renkte ifade edildi.

Erime eğrisi (Şekil 4.8) grafiğinde de yine örnek mavi, negatif kontrol ise pembe renkte ifade edildi.

Bu primer ile yapılan çoğaltımda Cq: 24.82 ve Tm: 88.00 olarak ölçüldü (Çizelge 4.4).



Şekil 4. 7 miR171 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği



Şekil 4. 8 miR171 Real Time PCR Erime Eğrisi

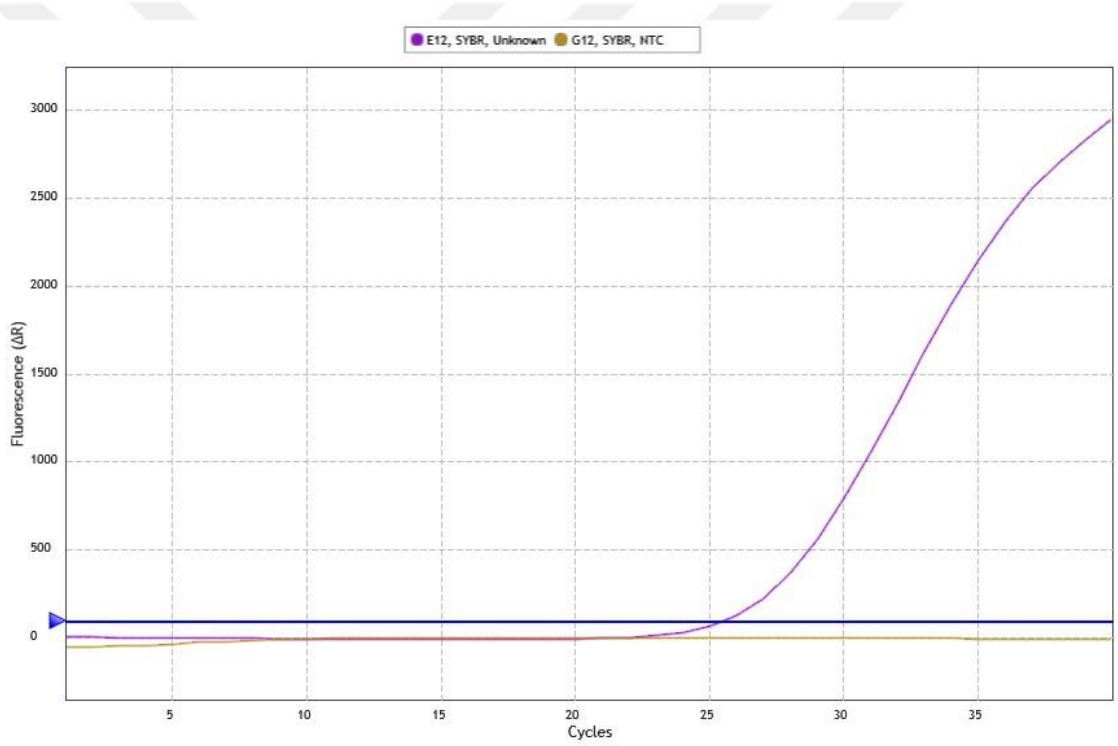
Çizelge 4. 4 miR171 Real Time PCR Cq ve Tm değerleri

Well	Well Type	Dye	Target	Replicate	Cq (-R'(T))	Tm Product 1 (-R'(T))
C9	Unknown	SYBR	SYBR	---	24.82	88.00
C10	NTC	SYBR	SYBR	---	37.89	81.50

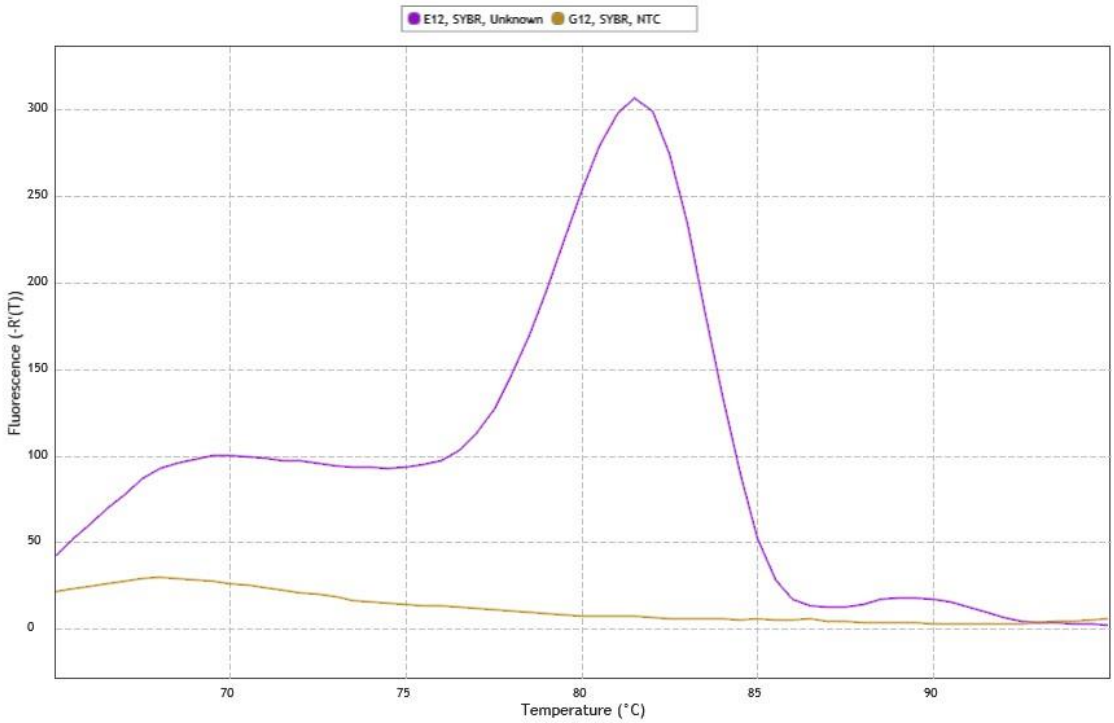
G20Z2 örneğinin cDNA'sının miR396 primeriyle Real Time PCR yapılması sonucunda; Çoğaltım grafiğininde (Şekil 4.9) örnek mor, negatif kontrol ise sarı renkte ifade edildi.

Erime eğrisi (Şekil 4.10) grafiğinde de yine örnek mor, negatif kontrol ise sarı renkte ifade edildi.

Bu primer ile yapılan çoğaltımda Cq: 25.74 ve Tm: 81.50 olarak ölçüldü (Çizelge 4.5).



Şekil 4. 9 miR396 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği



Şekil 4. 10 miR396 Real Time PCR Erime Eğrisi

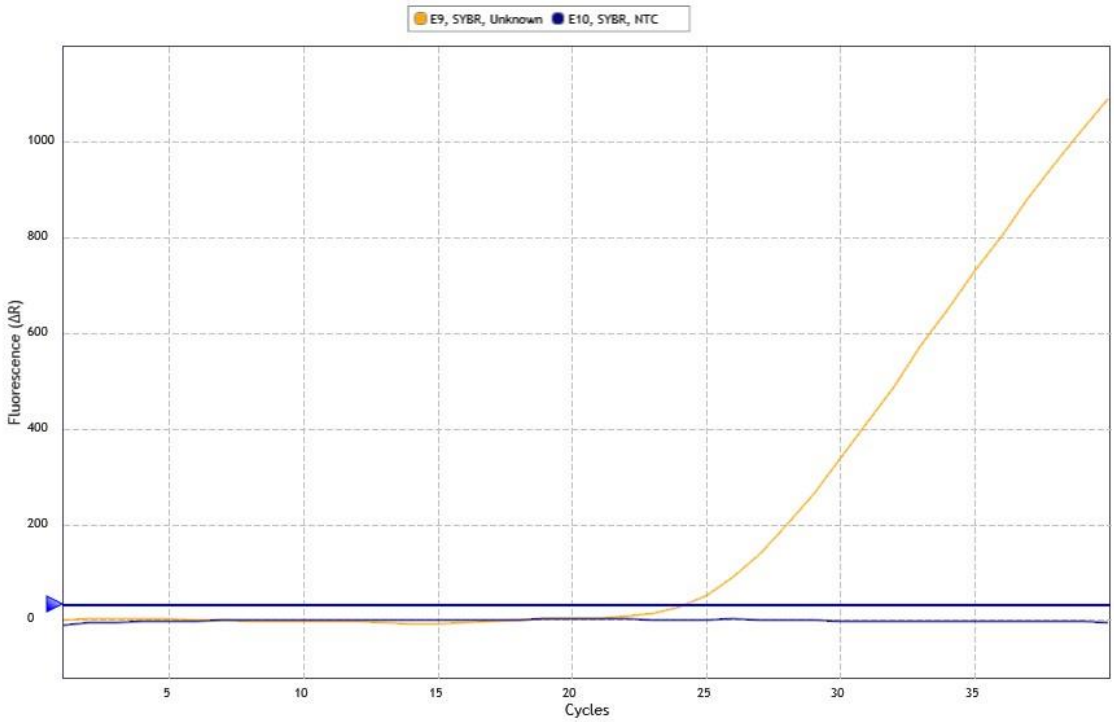
Çizelge 4. 5 miR396 Real Time PCR Cq ve Tm değerleri

Well	Well Type	Dye	Target	Replicate	Cq (ΔR)	Tm Product 1 (-R'(T))
E12	Unknown	SYBR	SYBR	---	25.74	81.50
G12	NTC	SYBR	SYBR	---	No Cq	68.00

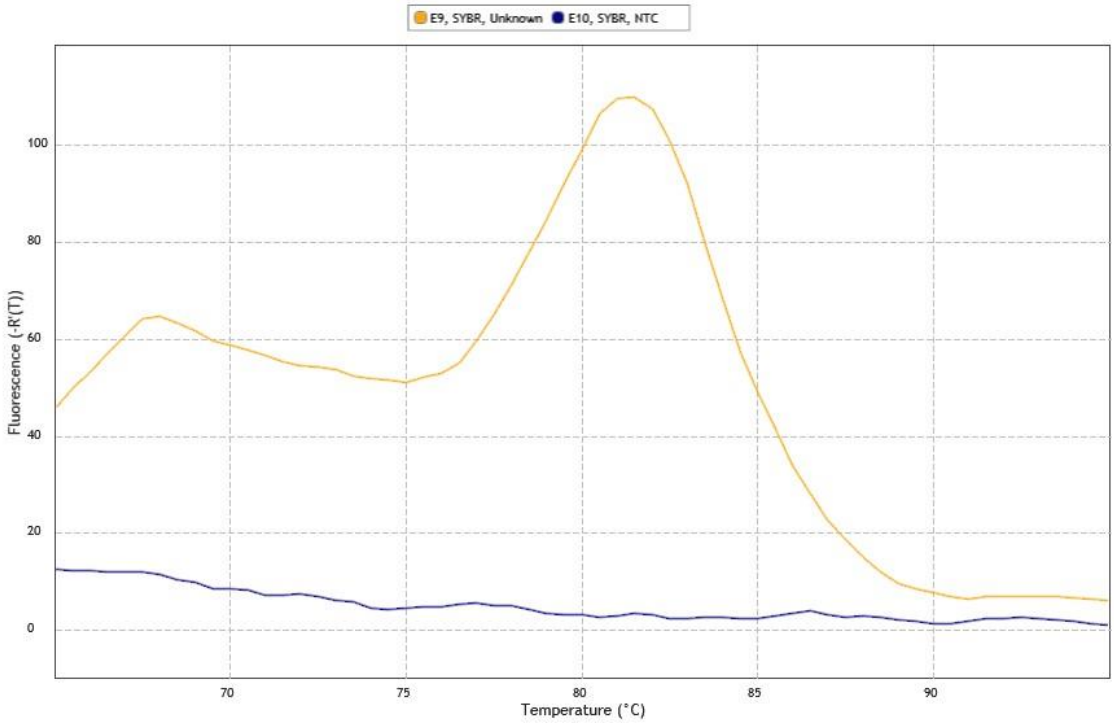
G20Z2 örneğinin cDNA'sının miR2919 primeriyle Real Time PCR yapılması sonucunda; Çoğaltım grafiğininde (Şekil 4.11) örnek sarı, negatif kontrol ise mavi renkte ifade edildi.

Erime eğrisi (Şekil 4.12) grafiğinde de yine örnek sarı, negatif kontrol ise mavi renkte ifade edildi.

Bu primer ile yapılan çoğaltımda Cq: 24.49 ve Tm: 81.50 olarak ölçüldü (Çizelge 4.6).



Şekil 4. 11 miR2919 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği



Şekil 4. 12 miR2919 Real Time PCR Erime Eğrisi

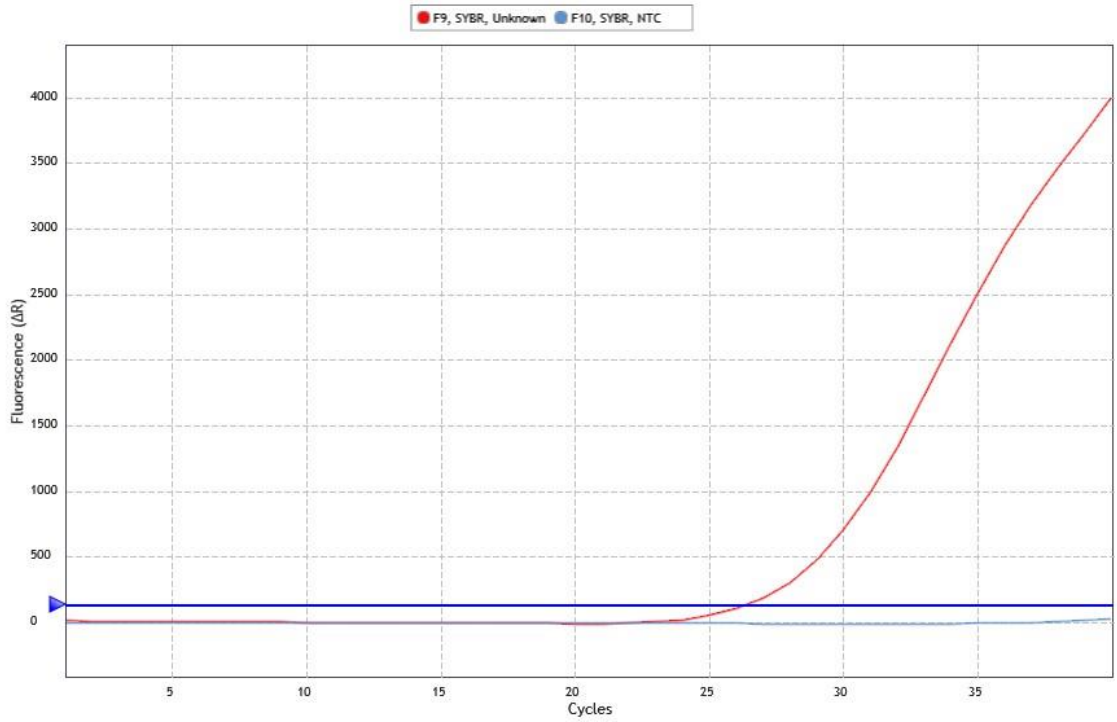
Çizelge 4. 6 miR2919 Real Time PCR Cq ve Tm değerleri

Well	Well Type	Dye	Target	Replicate	Cq (-R'(T))	Tm Product 1 (-R'(T))
E9	Unknown	SYBR	SYBR	---	24.49	81.50
E10	NTC	SYBR	SYBR	---	No Cq	65.00

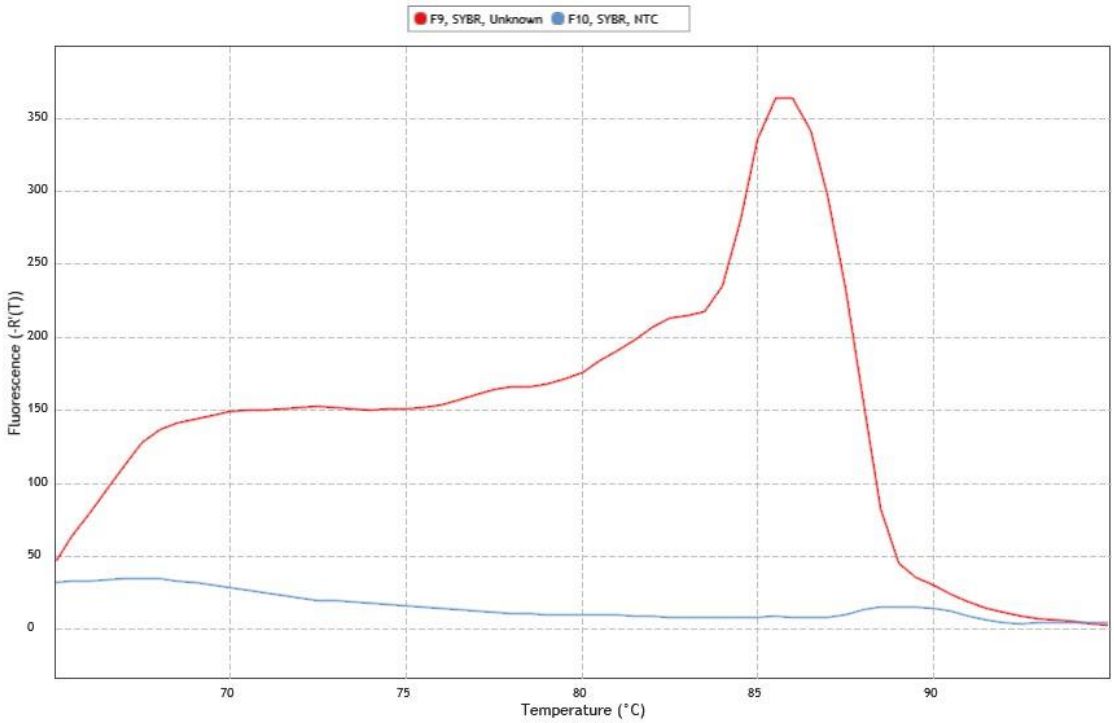
G20Z2 örneğinin cDNA'sının miR8123 primeriyle Real Time PCR yapılması sonucunda; Çoğaltım grafiğininde (Şekil 4.13) örnek sarı, negatif kontrol ise mavi renkte ifade edildi.

Erime eğrisi (Şekil 4.14) grafiğinde de yine örnek sarı, negatif kontrol ise mavi renkte ifade edildi.

Bu primer ile yapılan çoğaltımda Cq: 26.65 ve Tm: 86.00 olarak ölçüldü (Çizelge 4.7).



Şekil 4. 13 miR8123 Real Time PCR Çoğaltım Grafiği

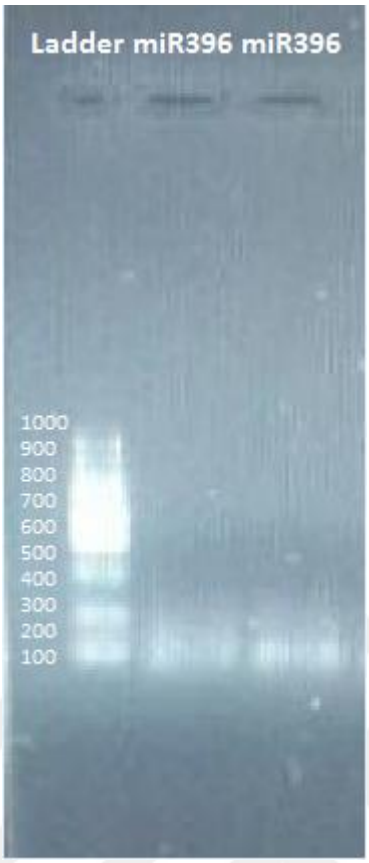


Şekil 4. 14 miR8123 Real Time PCR Erime Eğrisi

Çizelge 4. 7 miR8123 Real Time PCR Cq ve Tm değerleri

Well	Well Type	Dye	Target	Replicate	Cq (-R'(T))	Tm Product 1 (-R'(T))
F9	Unknown	SYBR	SYBR	---	26.65	86.00
F10	NTC	SYBR	SYBR	---	No Cq	67.50

miR396 primeri ile yapılan Real Time PCR ürünü; reaksiyon sonrasında kontrol amacıyla agaroz jelin iki kuyucuğuna yüklendi ve UV ışını altında görüntüsü elde edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4. 15 Real Time Sonrası Agaroz Jel Kontrolü

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE ÖNERİLER

miRNA izolasyonundaki G20Z1 ve G20Z2 olarak adlandırılan iki numune de tamamen aynı örneklerle ve aynı izolasyon protokolü kulanılarak yapılmıştı. Fakat sadece miRNA izolasyon kitin son aşamasındaki elüsyon basamağında G20Z1 örneğine elüsyon tamponunun tüm hacim konularak örnek tek seferde elüe edilmişti. G20Z2 örneğinde elüsyon tamponunun hacimi yarı yarıya konularak iki seferde elüsyon işlemi gerçekleşmişti. Bu işlem sonucunda spektrofotometrik miktar tayin cihazı olan nanodrop verilerine bakıldı ve G20Z2 örneğinden izole edilen miRNA miktarı, G20Z1 örneğinden izole edilen miRNA miktarının 2 katından fazla olarak belirlendi.

Bu durum miRNA kiti ile izolasyonunun son aşamasındaki elüsyon basamağında; tek seferde yapılan elüsyonun verimi düşürdüğü, yarı hacimle işlem 2 defa tekrarlandığında ise verim olarak daha iyi sonuç alındığını gösterir.

Trizol ile izolasyon yapılarak; G20 genç zeytin yaprak örneklerinde bulunan total RNA'lar, RNA jeli olan formaldehit jelinde görüntülendi.

Exicon kiti ileTotal RNA izolasyonu yapıldıktan sonra MOPS ile hazırlanan formaldehit jeline örnekler yüklenmişti. Fakat jelde görüntü alınamamıştı. Bu durumun sebebinin RNA'ların yeterli büyüklükte olmayışı ve cDNA'ya çevrilmediğinden yeteri kadar sağlam olmayan RNA'ların jelde görüntüleme işleminde yapılarının bozulması olduğu düşünüldü.

Nanodrop spektrofotometre cihazında alınan verilere göre G20Z1 örneği için nükleik asit miktarı 1 µl hacimde 221,38 ng olarak belirlendi. OD 260/280 oranı 2,05 ve OD 260/230 oranı ise 2,02 olarak belirlendi.

G20Z2 örneği için nükleik asit miktarı 1 µl hacimde 484,28 ng olarak belirlendi. OD 260/280 oranı 2,13 ve OD 260/230 oranı ise 2,70 olarak belirlendi.

Aynı örneklerden yapılan iki izolasyonun sonucunda G20Z1 ve G20Z2 isimli iki örneğin miktar verimi izolasyonun son aşamasındaki elüsyon basamağı ile ilişkilendirildi.

Proteinler 280 nm dalga boyunda absorbanslandığından miktarının ölçümü için 280 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirilir. Ayrıca nükleik asitlerin madde miktarlarının ne derece saf olduklarını ölçmekte de belirli oranlar kullanılır. A_{260}/A_{280} oranı nükleik asitlerden RNA saflığına bakılırken ise yaklaşık 2,00 oranını vermelidir.

Peptidler, karbonhidratlar, fenolik ve aromatik bileşikleri ölçmek için ise 230 nm dalga boyundaki absorbansa bakılmalıdır. Bu değer oluşan kontaminasyon hakkında bilgi verir. Saf örneklerde A_{260}/A_{230} oranı yaklaşık 2,2 değerinde olmalıdır.

Bu değerlerden yola çıkarak; örneklerin uygun saflıkta olduğu, miktar ve kalite açısından yeterli olduğunu söylenir.

Trizol ile yapılan izolasyon sonucundan; MOPS jel görüntüsüne göre, RNA kalitesinin iyi olmadığına karar verildi. Exicon kiti ile yapılan RNA izolasyonu sonucunda; Nanodrop spektrofotometre cihazının yaptığı miktar tayinine göre, yeterli kalitede RNA izole edildiği tespit edildi. Bu sebepten dolayı deneye Exicon kitiyle izole edilen RNA ile devam edildi.

Reverse transkripsiyon işlemi ile miRNA'ların cDNA'ya çevrilesi aşamasında; G20Z1 ve G20Z2 adlı iki örnek için nanodrop verilerine bakılınca, miRNA miktarı yüksek olan G20Z2 kodlu örnek cDNA'ya çevrimde kullanılacak numune olarak seçildi.

miR-159, miR-160, miR-171, miR-396, miR-2919 ve miR-8123 olmak üzere altı farklı primer çifti ile oluşturulan cDNA'ların polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonucunda oluşan PCR ürünlerinin hepsi 100 bp'lik marker DNA bantının altında bant verdi. Bu cDNA'lar kısa yapıdaki miRNA'lardan çoğaltıldığı için agaroz jelde doğru yerde bant gözlendi. İçerisine cDNA konulmamış PCR ürünü olan negatif kontrolde (NK) ise hiç

bant görülmedi. Bu durum görülen bantların, primerlerin birbirine bağlanması sonucu oluşan primer-dimerler olmadığını ya da oluşan çoğaltımın istenmeyen bir çoğalma (non-spesifik bağlanma) olmadığını gösterir.

UV ışık altında görülen ışıma sonucunda agaroz jelde cDNA bantları görülür. Bu görüntünün sebebi $EtBr_2$ (etidyum bromür) boyasının DNA dizisinde bazlar arasına girmesiyle olur.

G20Z2 örneğinin cDNA'sının miR159 primeriyle Real Time PCR yapılması sonucunda; Çoğaltım grafiğininde (Şekil 4.3) örnek mor, negatif kontrol ise mavi renkte ifade edilmişti. Mor renkli çizgiye bakıldığında düzgün bir üstel (exponansiyel) grafik görülürken, mavi renkli negatif kontrol çizgisine bakıldığında çoğalma olmadığı söylenir.

Bu durum düzgün bir Real Time PCR olduğunu miR159'un çoğaltıldığını gösterir.

Erime eğrisi (Şekil 4.4) grafiğinde de yine örnek mor, negatif kontrol ise mavi renkte ifade edilmişti. Burada da tek pik'in olduğu görülür. Tm:79.50'de miR159'a ait pik bulunur.

Bu primer ile yapılan çoğaltımda Cq: 19.27 ve Tm:79.50 olarak ölçülmüştü (Çizelge 4.2). Cq değeri; eşik değeri ile grafiğin ivmelenerek arttığı kısmındaki çizgilerin çakışma noktasının iz düşümüne bakılarak bulunur. Eşik değeri ise grafikte oluşabilecek ve grafikte göz ardı edilmesi gereken küçük kımıldamaları elimine etmek için, grafiğe göre belirlenen değerdir. Eşik değeri çoğaltım grafiğinde (Şekil 4.3) kalın koyu mavi çizgi şeklinde görülmektedir. Cq ve Tm çizelgesine bakıldığında negatif kontrolde çoğalma olmadığı görülür (Çizelge 4.2) Bu verilere dayanarak miR159'un çoğaltımının başarılı olduğu söylenir.

miR160 primeri için olan grafiklerden, çoğaltım grafiğine (Şekil 4.4) bakıldığında; ürünün düzgün pik verdiğini, negatif kontrolde ise çoğalma görülmediğini söyleriz. Bu durum istenen ürünün çoğaldığını gösterir. Fakat; erime grafiğine (Şekil 4.5) bakıldığında; üründe biri büyük (Tm: 82.00) biri küçük (Tm: 65.00) olan iki pik olduğu görülür. Üründe oluşan küçük pik kontaminasyon sonucu özgün olmayan (non-spesifik) bir bağlanma olduğunu düşündürür. Fakat aynı küçük pik'in negatif kontrolde de görülmesi primer dimer oluşmuş olduğunu gösterir. Cq ve Tm çizelgesine bakıldığında negatif kontrolde dikkate değer bir çoğalma olmadığı görülür (Çizelge 4.3). Sonuçta bu

plate'de istenen örnek çoğalmıştır ama az miktar da olsa primer dimer oluşumu gözlenmiştir.

miR171 primeri için olan çoğaltım grafiğine (Şekil 4.6) göre; 35. döngüden sonra negatif kontrolde çoğalma görülmüş. Bu durum plate'te kontaminasyon olduğunu gösterir. Erime eğrisi grafiğine de bakıldığında iki pik'in olduğu görülür. Öncesindeki (Tm: 81.50) pik kontaminasyon sonucu dışarıdan gelen DNA ile olan bağlanmayı, sondaki büyük pik (Tm: 88.00) ise istenen bağlanmayı ifade eder. Burada Cq ve Tm çizelgesine bakıldığında (Çizelge 4.4) negatif kontrolde çoğalma görülmüştür. Dolayısıyla deneyin tekrar edilmesi gerekir.

miR396 ve miR 2919'un grafiklerine bakıldığında negatif kontrollerinde çoğalma olmadan düzgün bir şekilde miRNA'ların çoğaldığı görülür.

Real Time PCR'dan sonra miR396 primerli örnek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır ve UV altında alınan görüntüde (Şekil 4.16) beklendiği gibi 100 bp civarındaki uzunlukta örnek tespit edilmiştir.

miR8123 için ise çoğaltım grafiğine bakıldığında oluşan pik'in düzgün olduğu fakat; erime eğrisinde oluşan pik'in temiz olmadığı, öncesinde çıkıntı (Tm: 83 'de) oluşturduğu gözlenir. Bu deney tekrar edilmese bile agaroz jeldeki görüntüsü kontrol edilebilir.

Cq değerleri Real Time PCR'da başlangıçtaki madde miktarları hakkında bilgi verir. Cq değeri ne kadar küçükse çoğaltımdaki artış o kadar erken bir döngü sayısında yaşanmış demektir. Bu da küçük Cq değerine sahip örneğin daha çok başlangıç materyali taşıdığını gösterir. Bu çalışmada sadece yaprak dokusu kullanılmış olsa da Cq değeri; farklı dokuların başlangıç materyalini kıyaslamak için kullanılır.

KAYNAKLAR

[1] Zeytin Ağacı ve Zeytin Hakkında Bilgi, http://www.arsivbelge.com/yaz.php?sc=2554, 3 Nisan 2016.

[2] Gemlik Zeytini, http://www.gemlikzeytini.net/, 3 Nisan 2016.

[3] Ozdemir Ozgenturk, N., Oruç, F., Sezerman, U., Kuçukural, A., Vural Korkut, S., Toksoz, F. ve Un C., (2010). "Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from Olea europaea L.", Comp Funct Genomics, 2010:757-512. doi: 10.1155/2010/757512.

[4] Bartel, D.P., (2004) "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function", Cell, 116:281-297.

[5] Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. and Feinbaum A., (Dec 3, 1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14", Cell, 75 (5): 843–54.

[6] Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., (Dec 3, 1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans",Cell, 75 (5): 855–62.

[7] Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G., (February 2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans", Nature, 403 (6772): 901–6.

[8] Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. and Ruvkun G., (2000 Nov 2). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA", Nature, 408(6808):86-9.

[9] Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. and Ruvkun, G., (November 2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA". Nature 408 (6808): 76–9.

[10] Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (October 2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs",Science, 294 (5543): 853–8.

[11] Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., (October 2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans", Science, 294 (5543): 858–62.

[12] Lee, R.C. and Ambros, V., (October 2001). "An extensive class of small RNAs in Caenohabditis elegans", Science, 294 (5543): 862–4.

[13] Ruvkun, G., (Oct 26 2001). "Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world.". Science294 (5543): 797.

[14] Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. and Tuschl, T., (April 2002)."Identification of tissue-specific microRNAs from mouse" ,Curr Biol., 12(9):735-9.

[15] Wienholds, E., Kloosterman, W.P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., Bruijn, E., Horvitz, H.R., Kauppinen, S. and Plasterk, R.H., (Jul 8, 2005). "MicroRNA expression in zebrafish embryonic development",Science, 309 (5732): 310–1.

[16] Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B., (2006). "MicroRNAS and their regulatory roles in plants",Annual Review of Plant Biology, 57: 19–53.

[17] Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M.,(April 2003). "Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila",Cell, 113 (1): 25–36.

[18] Cuellar, T.L. and McManus, M.T., (December 2005). "MicroRNAs and endocrine biology", J. Endocrinol, 187 (3): 327–32.

[19] Poy, M.N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P.E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P. and Stoffel, M., (November 2004). "A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion",Nature, 432 (7014): 226–30.

[20] Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. and Bartel, D.P., (January 2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation",Science, 303 (5654): 83–6.

[21] Wilfred ,B.R., Wang, W.X. and Nelson, P.T., (July 2007). "Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways", Mol. Genet. Metab., 91 (3): 209–17.

[22] Harfe, B.D., McManus, M.T., Mansfield, J.H., Hornstein, E. and Tabin, C.J., (August 2005). "The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb",Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 102 (31): 10898–903.

[23] Trang, P., Weidhaas, J.B. and Slack, F.J., (December 2008). "MicroRNAs as potential cancer therapeutics", Oncogene, 27 (2): S52–7.

[24] Li, C., Feng, Y., Coukos, G. and Zhang, L., (December 2009). "Therapeutic microRNA strategies in human cancer",AAPS J.,11 (4): 747–57.

[25] Fasanaro, P., Greco, S., Ivan, M., Capogrossi, M.C. and Martelli, F., (January 2010). "microRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases",Pharmacol. Ther., 125 (1): 92–104.

[26] Hydbring, P. and Badalian-Very, G., (August 2013). "Clinical applications of microRNAs", F1000Research, 2:136.

[27] Musilova, K. and Mraz, M. (May 2015). "MicroRNAs in B cell lymphomas: How a complex biology gets more complex" ,Leukemia, 5:1004-17. doi: 10.1038/leu.2014.351.

[28] Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., (2004). "Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA", Mol. Cell, 14:787–799.

[29] Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu , J.K., (2006). "Posttranscriptionalinduction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance" ,Plant Cell, 18: 2051 – 2065.

[30] Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory R.I. and Diederichs, S., (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation" ,Nature Cell Biology, 11: 228-234.

[31] Hitit, M., Kurar, E. ve Güzeloğlu, A., (2015). "MikroRNA Biyogenezi", Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 10(3): 211-218. DOI:10.17094/avbd.35776.

[32] Jones-Rhoades, M.W. and Bartel, D.P., (2004). "Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA" ,Mol. Cell, 14:787-799.

[33] Ambros, V., (2004). "The functions of animal microRNAs" ,Nature, 431:350-355.

[34] Bartel, D.P., (January 2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions",Cell, 136 (2): 215–33.

[35] Fabian, M.R., Sonenberg, N. and Filipowicz, W., (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs",Annual Review of Biochemistry, 79: 351–79.

[36] Homo sapiens miRNAs in the miRBase atManchester University, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa, 12 Mart 2016.

[37] Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y., Bentwich, Z., (July 2005). "Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs", Nat Genet., 37(7):766-70.

[38] Erno, W. and Ronald, H.A., (31 October 2005). "Plasterk MicroRNA function in animal development" ,FEBS Letters, 579(26):5911–5922.

[39] Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G, Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B. and Bartel, D.P., (April 2003). "The microRNAs of Caenorhabditis elegans",Genes Dev., 17 (8): 991–1008.

[40] C. elegans microRNAs, http://www.wormbook.org/chapters/www_microRNA/microRNAs.html, 5 Mayıs 2016.

[41] Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. and Tuschl, T., (April 2002)."Identification of tissue-specific microRNAs from mouse" ,Curr Biol., 12(9):620-9.

[42] Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel B. and Bartel, D.P., (2002). "MicroRNAs in plants" ,Genes Dev., 16:1616-1626.

[43] 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, 120 (1): 15–20.

[44] Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B. and Bartel, D.P., (January 2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs" ,Genome Res., 19 (1): 92–105.

[45] Axtell, M.J. and Bartel, D.P., (Jun 2005). "Antiquity of microRNAs and their targets in land plants",The Plant cell, 17 (6): 1658–73.

[46] Tanzer, A. and Stadler, P.F., (May 2004). "Molecular evolution of a microRNA cluster", J. Mol. Biol. ,339 (2): 327–35.

[47] Chen, K. and Rajewsky N., (2007). "The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs",Nature Reviews Genetics, 8 (2): 93–103.

[48] Lee, C.T., Risom, T. and Strauss, W.M., (April 2007). "Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny", DNA Cell Biol, 26 (4): 209–18.

[49] Peterson, K.J., Dietrich, M.R. and McPeek, M.A., (Jul 2009). "MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion",BioEssays, 31 (7): 736–47.

[50] Shabalina, S.A. and Koonin, E.V., (October 2008)."Origins and evolution of eukaryotic RNA interference", Trends in Ecology and Evolution, 10 (10): 578–587.

[51] 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): 221.

[52] 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, 120 (1): 15–20.

[53] Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M., Bartel, D.P. and Burge, C.B., (2003). "Prediction of Mammalian MicroRNA Targets",Cell, 115 (7): 787–798.

[54] Ellwanger, D.C., Büttner, F.A., Mewes, H.W. and Stümpflen, V., (2011). "The sufficient minimal set of miRNA seed types",Bioinformatics,27 (10): 1346–50.

[55] Rajewsky, N., (2006). "microRNA target predictions in animals", Nature Genetics, 38 (6): 8–13. doi:10.1038/ng1798.

[56] Thomson, D.W., Bracken, C.P. and Goodall, G.J., (September 2011). "Experimental strategies for microRNA target identification",Nucleic Acids Res., 39 (16): 6845–53.

[57] Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M., (February 2005)."Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs",Nature, 433 (7027): 769–73.

[58] Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B. and Bartel, D.P., (January 2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs" ,Genome Res., 19 (1): 92–105.

[59] Krek, A., Grün, D., Poy, Matthew, N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, Eric, J., MacMenamin, P., Piedade, I., Gunsalus, Kristin, C., Stoffel, M. and Rajewsky, N., (May 2005). "Combinatorial microRNA target predictions",Nature Genetics, 37 (5): 495–500.

[60] Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N., (September 2008). "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs" ,Nature, 455 (7209): 58–63.

[61] Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P. and Bartel, D.P., (September 2008). "The impact of microRNAs on protein output", Nature, 455 (7209): 64–71.

[62] Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N., (October 2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II",EMBO J., 23 (20): 4051–60.

[63] Mraz, M., Dolezalova, D., Plevova, K., Stano, Kozubik, K., Mayerova, V., Cerna, K., Musilova, K., Tichy, B., Pavlova, S., Borsky, M., Verner, J., Doubek, M., Brychtova, Y., Trbusek, M., Hampl, A., Mayer, J. and Pospisilova, S., (March 2012). "MicroRNA-650 expression is . influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia" ,Blood, 119 (9): 2110–2113.

[64] Lisse, T.S., Chun, R.F., Rieger, S., Adams, J.S. and Hewison, M. (June 2013). "Vitamin D activation of functionally distinct regulatory miRNAs in primary human osteoblasts",J Bone Miner Res., 28 (6): 1478–14788.

[65] Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A.; (October 2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units", Genome Res., 14 (10A): 1902–10.

[66] Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., (December 2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs",RNA 10, (12): 1957–66.

[67] Weber, M.J. (January 2005). "New human and mouse microRNA genes found by homology search",FEBS J., 272 (1): 59–73.

[68] Kim, Y.K. and Kim, V.N, (February 2007). "Processing of intronic microRNAs", EMBO J., 26 (3): 775–83.

[69] Baskerville, S. and Bartel, D.P.(March 2005). "Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes", RNA, 11 (3): 241–7.

[70] Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T. and Margalit, H. (2005). "Clustering and conservation patterns of human microRNAs" ,Nucleic Acids Res., 33 (8): 2697–706.

[71] Zhou, X., Ruan, J., Wang, G. and Zhang, W., (March 2007). "Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species", PLoS Comput. Biol., 3 (3): 37.

[72] Eren, H., İlhan, E., Erdoğan, C. ve Erayman, M., (2014). "MikroRNA'lar ve Stres Şartlarındaki İşlevleri", MKU Ziraat Fakültesi Dergisi, 19 (1):25-35.

[73] Sunkar, R. and J.K., Zhu., (2004). "Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis", Plant Cell, 16:2001-2019.

[74] Adai, A., Johnson, C., Mlotshwa, S., Archer-Evans, S. , Manocha, V., Vance, V. and Sundaresan, V., (2005). "Computational prediction of miRNAs in Arabidopsis thaliana",Genome Res., 15:78-91.

[75] Ohler, U., Yekta, S., Lim, L.P., Bartel, D.P. and Burge, C.B., (2004). "Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification" ,RNA, 10:1309-1322.

[76] Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R.H. and Cuppen, E., (2005). "Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes", Cell, 120:21-24.

[77] Jia, L., Zhang, D., Qi, X., Ma, B. and Xiang Z., (August 13, 2014) "Identification of the Conserved and Novel miRNAs in Mulberry by High-Throughput Sequencing" http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0104409.

[78] Boke, H., Mine, Turktas, E., Parmaksiz I. , Ozcan S. ve Unver T., (2015). "Regulation of the alkaloid biosynthesis by miRNA in opium poppy" ,Plant Biotechnology Journal, 13, pp. 409–420.

[79] Alonso M. ve diğ., (August 10, 2010). "The miR159 regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote Programmed Cell Death in Arabidopsis" ,Plant Physiology, 110:160-630 doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.160630.

[80] Mirbase, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?fam=MIPF0000010, 4 Haziran 2016.

[81] Mirbase, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?fam=MIPF0000032, 4 Haziran 2016.

[82] Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. and Bartel, D.P., (2002). "Prediction of plant microRNA targets" ,Cell, 110 (4): 513–520. doi:10.1016/S0092-8674(02)00863-2. PMID 12202040.

[83] Mallory, A.C., Bartel, D.P. and Bartel, B., (May 2005). "MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and . modulates expression of early auxin response genes.",The Plant cell, 17 (5): 1360–75. doi:10.1105/tpc.105.031716. PMC 1091760. PMID 15829600.

[84] Liu, X., Huang, J., Wang, Y., Khanna, K., Xie, Z., Owen, H.A., Zhao, D., (May 2010). "The role of floral organs in carpels, an Arabidopsis loss-of-function mutation in MicroRNA160a, in organogenesis and the mechanism regulating its expression.", The Plant journal : for cell and molecular biology, 62 (3): 416–28. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04164.x. PMID 20136729.

[85] Mirbase, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?fam=MIPF0000032, 4 Haziran 2016.

[86] Curaba, J., Talbot, M., Li, Z. and Helliwell, C., "Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley" ,BMC Plant Biology, 2013:13:6 DOI: 10.1186/1471-2229-13-6.

[87] Ma, Z. and et. al., (2014 Aug). "Arabidopsis miR171-Targeted Scarecrow-Like Proteins Bind to GT cis-Elements and Mediate Gibberellin-Regulated Chlorophyll Biosynthesis under Light Conditions" ,PLoS Genet., 10(8): e1004519.

[88] Zhu, X., Leng, X., Sun, X., Mu, Q., Wang, B., Li, X., (2015). "Discovery of Conservation and Diversification of miR171 Genes by Phylogenetic Analysis based on Global Genomes" ,The Plant Genome, 8(2):1. doi:10.3835/plantgenome2014.10.0076

[89] Mirbase, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?fam=MIPF0000030, 4 Haziran 2016.

[90] Debernardi, J.M., Rodriguez, R.E., Mecchia, M.A. and Palatnik, J.F., (January 5, 2012). "Functional Specialization of the Plant miR396 Regulatory Network through Distinct MicroRNA–Target Interactions" http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002419.

[91] Mirbase, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?fam=MIPF0000047, 4 Haziran 2016.

[92] Barakat, A., et.al., (2012). "Genome wide identification of chilling responsive microRNAs in Prunus persica" ,BMC Genomics, 13: 481.

[93] Researchgate, https://www.researchgate.net/figure/279751435_fig3_Figure-3-Potato-senseantisense-miRNA-gene-The-newly-explored-potato-miRNA-miR8123-was, 3 Nisan 2016.

[94] Mirbase, http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0026147, 3 Nisan 2016.

[95] Green, P.S., (2002). “A revision of Olea L. (Oleaceae)”, Kew Bulletin, 57:91-140.

[96] Zeytinyağının Ülkemiz Ekonomisine Katkıları, Sorunları ve Beklentileri, http://www.izto.org.tr/portals/0/iztogenel/dokumanlar/zeytinyaginin_ulkemiz_ekonomisine_katkilari_g_altintas_26.04.2012%2022-51-16.pdf, 5 Mayıs 2016.

[97] Food and Agriculture organizations of the United Nations, http://www.fao.org/docrep/012/i0680e/i0680e.pdf, 12 Mayıs 2016.

[98] Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizi, http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20TR/bolum4.pdf, 5 Mayıs 2016.

[99] Yanik, H., Turktas, M., Dundar, E., Hernandez, P., Dorado, G. and Unver, T., (2013 Jan 15). "Genome-wide identification of alternate bearing-associated microRNAs (miRNAs) in olive (Olea europaea L.)" ,BMC Plant Biol., 13:10. doi: 10.1186/1471-2229-13-10.

[100] Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Nükleik Asitlerin Elektroforezi Yüksek Lisans Semineri, http://www.dilekbalik.com/seminer/doktora_ylisans/vcelik_yl.pdf, 5 Mayıs 2016.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sultan Cansu GÖNENÇ

Doğum Tarihi ve Yeri: 01.01.1992/ İSTANBUL

Yabancı Dili: İngilizce

E-posta: cansu.gonenc@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Haliç Üniversitesi (%100 Burslu)	2014
Lise	Fen Bilimleri/MF	Mensucat Santral Anadolu Lisesi	2009

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2016/-	İstanbul Kemerburgaz Üniversitesi	Öğretim Görevlisi
2015/2016	Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü	Tübitak Projesinde Bursiyer Öğrenci

YAYINLARI

Proje

1. Biyoreaktör Depo Sahalarında Nanomalzemelerin Davranışları ve Atıklarına Ayrışma Prosesleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması 112Y320 TÜBİTAK Projesi

ÖDÜLLERİ

1. Yüksek Onur Belgesi - Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü- 2014

2. Bölüm 2.'liği Belgesi - Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü- 2014