

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LİPOTOKSİK ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES SONUCU İFADESİ
DEĞİŞEN MİKRORNALARIN TANIMLANMASI VE REGÜLE ETTİĞİ
GENLERİN ANALİZİ**

MISRA NADİR

Danışman Öğretim Üyesi

YRD. DOÇ. DR. ARZU ATALAY

ANKARA

HAZİRAN

2014

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının, akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Mısra NADİR

İmzası

ONAY

Yrd Doç Dr Arzu ATALAY danışmanlığında, Mısra NADİR tarafından hazırlanan "LİPOTOKSİK ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES SONUCU İFADESİ DEĞİŞEN MİKRORNALARIN TANIMLANMASI VE REGÜLE ETTİĞİ GENLERİN ANALİZİ" adlı bu tez çalışması 30/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:.....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Bu tez Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur, sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LİPOTOKSİK ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES SONUCU İFADESİ DEĞİŞEN MİKRORNALARIN TANIMLANMASI VE REGÜLE ETTİĞİ GENLERİN ANALİZİ

Mısra NADİR

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY

Obezite, tip 2 diyabet ve ateroskleroz gibi metabolik düzensizliklerde serbest yağ asitleri, yağ dokusunun yanısıra başka dokularda da birikmektedir. Hücre içindeki serbest yağ asidi birikimine karşı koyamayan -yağ doku harici dokulardaki- hücrelerde **E**ndoplazmik **R**etikulum (**ER**) stres ve lipotoksik hücre ölümü gerçekleşir. **K**atlanmamış **P**rotein **Y**anıtı (**KPY**) hücrede biriken serbest yağ asitlerinin endoplazmik retikulumda meydana getirdiği stres durumuna karşı koymak için aktive olan bir mekanizmadır ve hücrenin ER'da oluşan strese karşı koyarak adaptasyonu veya hücrenin kendini apoptoza programlaması arasında anahtar rolü üstlenmektedir. Ancak, uzun süren ve çözümlenemeyen ER stresi, hücreler ve dokular için zararlıdır, ER stresi metabolik dokularda kronikleştiği zaman, metabolik hastalıkların gelişimine yol açmaktadır. Lipotoksitenin KPY'nı hangi moleküler mekanizmalarla aktifleştirdiği ve KPY sinyal yolağının adaptif veya destrüktif yanıtlarının nasıl kontrol edildiği halen tamamen aydınlatılamamıştır. Son yıllarda tanımlanan ve gelişim, organogenez, kök hücre statüsünün idamesi, kanser gibi biyolojik süreçlerde rol alan mikroRNAların (miRNA), protein kodlayan genlerin yaklaşık %30-60'ını kontrol ettikleri tahmin edilmektedir. Lipotoksik ER stres kaynaklı KPY aktivasyonu sırasında ifadesi değişen miRNAları tanımlamak amacı ile fare makrofaj hücre hattında (RAW 264.7), lipotoksik ER stres oluşturulmuş ve ardından bu hücreler ve kontrol hücre hattının miRNAome profilleri, QRT-PCR temelli miScript miRNA PCR array kullanılarak biyolojik tekrarlı analiz edilmiştir. miRBase 16.sürümdeki tüm fare miRNAları ile yapılan taramada 227 adet miRNA'nın ifade seviyesinde değişiklik gözlenmiş, 43 tanesinde 2 kat ve üzeri artma/azalma gözlenirken, 13 adetinde ise 3-24 kat artma/azalma görülmüştür. Lipotoksik ER streste ifadesi değişen bu miRNAların hedef transkriplerini belirlemek için yolak analizleri yardımı ile olası hedef mRNAlar belirlenmiş ve QRT-PCR ile ifade seviyeleri analiz edilmiştir.

2014, 113 sayfa

Anahtar kelimeler: miRNA, katlanmamış protein yanıtı, ER stres, QRT-PCR, makrofaj, lipotoksisite

ABSTRACT

MSc Thesis

Thesis Title

IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED MICRORNAS AND ANALYSIS OF THE GENES REGULATED BY THEM DURING LIPOTOXIC ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS

Mısra NADİR

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Arzu ATALAY, PhD, Assistant Professor

During metabolic disorders such as obesity, type 2 diabetes and atherosclerosis, free fatty acids accumulate in fat tissues as well as other tissues. When there is excess fatty acid accumulation in the tissues other than fat tissue, ER stress and lipotoxic cell death takes place. Unfolded protein response (UPR) is a mechanism that is activated against the stress generated in endoplasmic reticulum by the accumulation of intracellular free fatty acids and UPR is the key mediator between the cells' adaptation against the ER stress or programming itself to apoptosis. Unsolved ER stress is harmful for the cells and tissues. It is still not completely clarified how lipotoxicity activates UPR and how the adaptive and destructive responses are controlled. It has been estimated that microRNAs which function during development, organogenesis, maintenance of stem cell status and cancer, regulates 30-60% of all protein coding genes. In order to identify the differentially expressed miRNAs during lipotoxic ER stress originating UPR activation, we have generated lipotoxic ER activation in mouse macrophage cell line (RAW 264.7) and analyzed the miRNAome profiles of this cell line and control cell line using QRT-PCR based miScript miRNA PCR array which contained all known mouse miRNAs in miRBase release 16. After analysis, 227 miRNAs showed altered expression levels; 43 miRNAs above 2 fold difference and 13 miRNAs 3-24 fold difference. Pathway analysis was performed in order to identify the target mRNAs of these lipotoxic ER stress associated miRNAs and the expression levels of these target mRNAs were investigated.

2014,113 pages

Keywords: miRNA, unfolded protein response, ER stress, QRT-PCR, macrophage, lipotoxicity

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca desteğini her zaman hissettiğim, bana güvenen ve verdiğim tüm emeğe saygı duyan, yüksek lisansım süresince tüm bilimsel bilgi birikimini benimle paylaşan, yaptığım hatalara sabırla ve hoşgörüle yaklaşan ve benim sorgulamamı sağlayan, manevi hayatına ve olaylara karşı duruşuna saygı duyduğum, bana örnek olan ve ileriki yaşamımda da asla varlığını kaybetmek istemeyeceğim değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY'a,

Bu tez çalışmasını gerçekleştirmemi sağlayan projedeki katkılarından dolayı Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ebru ERBAY'a ve ekibine,

Bu tez çalışmasının mali kaynağını sağlayan TÜBİTAK'a (Proje No: 212T171) ve sağladığı burs ile yüksek lisans eğitimim süresince maddi kaygılarımı azaltan, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Laboratuvara geldiğim ilk günden beri bir an olsun abiliğini, kardeşliğini benden esirgemeyen tüm teknik problemlerime, yardıma ihtiyacım olduğu konularda bilgisini ve desteğini benden eksik etmeyen çalışma arkadaşım Bio.Alp AYDOS'a, ortak yanlarımız olduğuna inandığım ve onları hiçbir zaman kaybetmemeyi umduğum, bana karşı güler yüzünü, bilgisini, yardımseverliğini ve içtenliğini her gün hissettiğim çalışma arkadaşım Blm. Uzm.Yasemin ÖZTEMUR'a,

Bilgisinden bir gün bile şüphe duymadığım, tecrübeleriyle, kusursuz çalışma düzeniyle bana aynı anda hem abla, hem arkadaş hem de öğretmen olan çok sevdiğim çalışma arkadaşım Dr. Nevin BELDER'e, enstitüye geldiğim ilk günden itibaren hiçbir konuda desteğini esirgemeyerek adeta bana bir abla olan, sabrına, pozitifliğine ve her daim gülen yüzüne hep imrendiğim, yeni başladığım dönemde kendisine sorduğum tüm sorulara bıkmadan cevap veren sevgili çalışma arkadaşım Blm.Uzm. Funda DEMİRİSOY'a

Gerçek bir arkadaş, gerçek bir bilim insanı olan, işine kendisini adanmış ve ileride çok farklı yerlerde şimdikinden çok daha başarılı olarak göreceğimden emin olduğum, tez

süresince benden bilgisini ve manevi desteğini eksik etmeyen, sevinçli, üzüntülü her anımı paylaştığım ve çok özlediğim çalışma arkadaşım Blm. Uzm. Selen PEKER'e, sevecenliğiyle ve hiç bitmeyen sabrıyla akademisyen olmak için doğmuş olduğuna inandığım, gözlerinin içinin her daim gülmesini dilediğim, her zaman bilgilerine, bakış açısına ihtiyaç duyacağımı bildiğim çalışma arkadaşım Blm. Uzm. Gülizar AYDOĞDU'ya

Hayatım boyunca bana inanan, en zor anlarımda yanımda olan, bana verdikleri maddi manevi tüm desteğin karşılığında sadece benimle gurur duymalarını sağlamaya çalıştığım canım annem Serpil NADİR, canım babam Erhan NADİR ve canım dayım Sedat TEZEL'e

Yüksek lisans sürecinde tanıdığım varlığını asla kaybetmek istediğim ve bu süreçte tüm zor zamanlarımda yardımına koşmaktan bir saniye bile şüphe etmeyen, çok başarılı olacağına emin olduğum canım arkadaşım, gerçek bir dost Bio. Begüm GENCER'e

Ve son olarak bana her zaman bir aile gibi davranan, sıcaklıkları bir gün bile eksilmeyen tüm Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı çalışanlarına, sonsuz teşekkür ederim.

2014

Mısra NADİR.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ETİK BEYAN..... | i |
| ONAY | ii |
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT..... | iv |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xiii |
| SİMGELER DİZİNİ | xiv |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1.Endoplazmik Retikulum ve Stresi | 1 |
| 1.2.MikroRNA'ların Görevleri | 1 |
| 2.KURAMSAL TEMELLER | 4 |
| 2.1.Endoplazmik Retikulum Stresi | 4 |
| 2.2.Protein Katlanmasında Rol Oynayan Moleküller | 4 |
| 2.3.Katlanmamış Protein Cevabı | 5 |
| 2.4. Katlanmamış Protein Cevabı Sinyal Yolları..... | 8 |
| 2.4.1. Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) Sinyal Yolu..... | 8 |
| 2.4.2. Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) Sinyal Yolu..... | 8 |
| 2.4.3. Inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1) Sinyal Yolu | 9 |

| | |
|---|----|
| 2.5. Endoplazmik Retikulum Stresiyle İndüklenen Apoptoz Yolakları | 9 |
| 2.5.1.CHOP (CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) Homolog Protein) İndüksiyonu | 10 |
| 2.5.2. JNK Aktivasyonu..... | 12 |
| 2.5.3. Kaspaz Aktivasyonu | 12 |
| 2.6. MikroRNA'lar ve ER Stres | 13 |
| 2.7.MikroRNA'lar ve XBP1 | 14 |
| 2.8. MikroRNA Tanımlanmasında Kullanılan Biyoinformatik Araçlar | 16 |
| 3.GEREKÇE ve AMAÇ | 19 |
| 4. MATERYAL ve YÖNTEM | 21 |
| 4.1.Materyal | 21 |
| 4.1.1. Genel Reaktifler | 21 |
| 4.1.2. Kullanılan RNA Örnekleri..... | 21 |
| 4.1.3. RNA İzolasyon Reaktifleri | 21 |
| 4.1.4. cDNA Sentez Reaktifleri | 21 |
| 4.1.5. MikroRNAom PCR Temelli Profilleme Analizi | 22 |
| 4.1.6. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Reaktifleri | 22 |
| 4.1.7. Primerler Ve Amplifikasyon Bölgeleri..... | 22 |
| 4.1.8. Kullanılan Cihazlar | 24 |
| 4.2.Yöntem..... | 25 |
| 4.2.1. Total RNA İzolasyonu | 25 |
| 4.2.2.RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi | 25 |

| | |
|--|----|
| 4.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi | 25 |
| 4.2.4. miRNA PCR-Array ile miRNAom Profillerinin Belirlenmesi..... | 26 |
| 4.2.5. miRNAom Analizi için cDNA Sentezi..... | 27 |
| 4.2.6. miScript miRNA PCR Array | 28 |
| 4.2.7. miRNAom Veri Analizi..... | 29 |
| 4.2.8. İfadesi Değişen miRNAların Hedeflerinin <i>in silico</i> Analizi..... | 30 |
| 4.2.9. Primer Tasarımı | 30 |
| 4.2.10. Hedef mRNA Seviyesi Analizi İçin cDNA Sentezi | 32 |
| 4.2.11. Kantitatif Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu | 32 |
| 5. ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 35 |
| 5.1. Makrofaj hücre hattına palmitat uygulaması ve hücrelerden total RNA Eldesi .. | 35 |
| 5.2. miRNA PCR-Array İle miRNAom Profillendirilmesi | 36 |
| 5.3. İfadesi Değişen MikroRNAların Hedeflerinin <i>In Silico</i> Analizi | 44 |
| 5.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları | 68 |
| 6. TARTIŞMA ve SONUÇ..... | 70 |
| 7. KAYNAKLAR | 75 |
| 8. EKLER..... | 78 |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | 97 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. 1. MikroRNA biyogenezi | 3 |
| Şekil 2. 1. KPY Yolakları.. | 7 |
| Şekil 2. 2. ATF6 Sinyal Yolağı..... | 9 |
| Şekil 2. 3. ER stres apoptoz yolakları | 10 |
| Şekil 2. 4. CHOP, JNK, ATF4 apoptoz yolakları..... | 11 |
| Şekil 2. 5. Kaspaz apoptoz yolakları..... | 13 |
| Şekil 4. 1. miRNA miScript PCR array çalışma şeması | 26 |
| Şekil 4. 2. miRNAom PCR array üzerinde normalizasyon ve diğer kontrollerin yerleşimi..... | 27 |
| Şekil 4. 3.Herpud1 transkriptine spesifik primerlerin Primer3 ile tasarlanması..... | 31 |
| Şekil 5. 1.Xbp-1 kırılma testi. 1) RAW+ Tapsigargin, 2) RAW, 3) RAW+Palmitat.. | 35 |
| Şekil 5. 2. RNA örneklerinin AGE görüntüsü | 36 |
| Şekil 5. 3.Çalışmadaki eş zamanlı PCR reaksiyonlarından bir örnek | 37 |
| Şekil 5. 4. (A) Kontrol Örnekleri kısmi listesi..... | 38 |
| Şekil 5. 5.Tüm çalışmada yer alan 12 adet plakadaki internal kontrol genlerinin Ct değerleri | 39 |
| Şekil 5. 6.miRNAom veri analizinin kısmi listesi | 40 |
| Şekil 5. 7.Tüm miRNAom çalışması sonucu ifadesi değişen miRNAların 3 boyutlu grafik ile gösterimi..... | 41 |
| Şekil 5. 8.miRNAom verilerinin scatter plot görüntüsü | 41 |
| Şekil 5. 9.mmu-miR-132-3p' nin hedeflediği potansiyel mRNA sayısı | 45 |
| Şekil 5. 10. mmu-miR-132-3p' nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin miRSVR skoruna göre sıralanmış kısmi listesi | 45 |

| | |
|--|----|
| Şekil 5. 11.mmu-miR-132-3p'nin hedeflerinden Herpud1 mRNAsı ile interaksyon bölgeleri | 46 |
| Şekil 5. 12. Yolak analizi için kullanılan miRNA hedeflerinin kısmi listesi..... | 47 |
| Şekil 5. 13.GeneCodis arayüzü..... | 48 |
| Şekil 5. 14.mmu-miR-132-3p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizi sonucu KEGG sınıflandırması | 50 |
| Şekil 5. 15. mmu-miR-132-3p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu | 51 |
| Şekil 5. 16. mmu-miR-132-3p'nin hedeflediği ER'da protein işlenmesi ile ilgili potansiyel mRNA hedeflerinin listesi (KEGG) | 52 |
| Şekil 5. 17. mmu-miR-294-3p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu | 53 |
| Şekil 5. 18. mmu-miR-124-3p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu | 53 |
| Şekil 5. 19. mmu-miR-486-5p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu | 54 |
| Şekil 5. 20. mmu-miR-542-5p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu | 54 |
| Şekil 5. 21.mmu-miR-1191'in hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu | 55 |
| Şekil 5. 22.mmu-miR-125a-3p 'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu | 55 |
| Şekil 5. 23.mmu-miR-449a-5p 'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu | 56 |
| Şekil 5. 24.mmu-miR-2136'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu | 56 |

| | |
|---|----|
| Şekil 5. 25.miRNA hedeflerinin görev aldıkları biyolojik süreçlere göre pasta grafik sunumu(GO: Biyolojik süreç)..... | 61 |
| Şekil 5. 26.miRNA hedeflerinin görev aldıkları biyolojik süreçlere göre pasta grafik sunumu(GO: Biyolojik süreç)..... | 62 |
| Şekil 5. 27.miRNA hedeflerinin görev aldıkları biyolojik süreçlere göre pasta grafik sunumu(GO: Biyolojik süreç)..... | 63 |
| Şekil 5. 28.mmu-miR-132-3p hedeflerinde gerçekleştirilen biyolojik süreç analizi sonucu gruplanan gen kümesi..... | 64 |
| Şekil 5. 29.Bazı miRNA ve hedef mRNAlarının komplementeritesi..... | 67 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 2.1..Farklı miRNA aktivitelerinin, çeşitli pro-adaptif ve pro-apoptotik KPY sinyal yollarına katkısı | 14 |
| Çizelge 2. 2.MikroRNAların hedef mRNAlarının belirlenmesinde kullanılan veri tabanlarının özellikleri | 17 |
| Çizelge 4. 1. Total RNA izolasyonu için kullanılan malzeme listesi. | 21 |
| Çizelge 4. 2. Çalışmada kullanılmak üzere tasarlanan primerler. | 22 |
| Çizelge 4. 3.Kullanılan cihazlar listesi..... | 24 |
| Çizelge 4. 4. miRNA PCR Array ters transkripsiyon reaksiyonu | 28 |
| Çizelge 4. 5.Çalışmada kullanılan örnekler ve kısaltmaları | 28 |
| Çizelge 4. 6.miScript miRNA PCR Array QRT-PCR Reaksiyonu. | 28 |
| Çizelge 4. 7.Light Cyler 480 platformunda gerçekleştirilen QRT-PCR reaksiyon koşulları | 29 |
| Çizelge 4. 8. QRT-PCR reaksiyonu reaktif miktarları..... | 33 |
| Çizelge 4. 9.RotorGene-Q platformunda gerçekleştirilen QRT-PCR reaksiyon koşulları. | 33 |
| Çizelge 5. 1. RNA örneklerinin konsantrasyonları | 36 |
| Çizelge 5. 2. Lipotoksik ER stres sonucu ifadesi değişen 43 miRNA..... | 42 |
| Çizelge 5. 3.Lipotoksik ER stres sonucu ifadesi değişen miRNA hedeflerinin görev aldıkları yollar (KEGG) | 57 |
| Çizelge 5. 4. İleri analizler için seçilen mRNA ve ilgili oldukları miRNAlar. | 65 |
| Çizelge 5. 5. QRT-PCR sonuçları (3 biyolojik tekrar ortalamaları)..... | 69 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|--------------------|--|
| °C | Santigrat derece |
| µl | Mikrolitre |
| µM | Mikro Molar |
| bç | Baz çifti |
| cDNA | Komplementer DNA |
| ddH ₂ O | Çift distile su |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| dNTP | Deoksinükleotit |
| EtOH | Etanol |
| g | Gram |
| L | Litre |
| mRNA | Mesajcı RNA |
| miRNA | MikroRNA |
| ml | Mililitre |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RNA | Ribonükleik asit |
| RPM | Dakikadaki dönüş sayısı |
| QRT-PCR | Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu |
| TBE | Tris Borik Asit-EDTA |
| UTR | (Untranslated Region) Transle Olmayan Bölge |
| UV | Ultraviyole |
| V | Volt |
| ER | Endoplazmik Retikulum |
| KPY | Katlanmamış Protein Yanıtı |

1.GİRİŞ

1.1.Endoplazmik Retikulum ve Stresi

Endoplazmik Retikulum (ER) sitozol boyunca yayılmış membran tübüllerinden oluşmuş birbirine bağlı yoğun bir ağ yapısı olarak ilk olarak 1945 yılında keşfedilmiştir¹. Endoplazmik retikulum, hücrede sentezlenen proteinlerin katlanması ve işlenmesinden sorumlu temel organeldir².

ER, proteinlerin katlanması ve olgunlaşmasında, lipid biyosentezinde, hücreler arası Ca⁺ dengesinin sağlanmasında ve redoks potansiyelinin düzenlenmesinde çok önemli role sahiptir. ER'daki protein katlanma ve modifikasyon süreci, ER homeostazındaki değişimlere oldukça hassastır³. ER fonksiyon kapasitesini aşan fizyolojik veya patolojik durumlarda lümende katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir ve bu durum ER stresi olarak isimlendirilmektedir. ER stresi hücre içerisinde oluştuktan sonra hücrenin hayati fonksiyonlarını devam ettirebilmek, hücrenin homeostazını korumak için **Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY)** devreye girmektedir. KPY, stres altındaki ER'ın protein katlama kapasitesini idame ettirmekten sorumludur. Protein Kinaz RNA (PKR), benzeri ER Kinaz (PERK), Aktive edici Transkripsiyon Faktörü (ATF6), İnozitol Gerektiren kinaz 1 (IRE1) yolları KPY sinyal yollarının başlıcalarıdır⁴.

1.2.MikroRNA'ların Görevleri

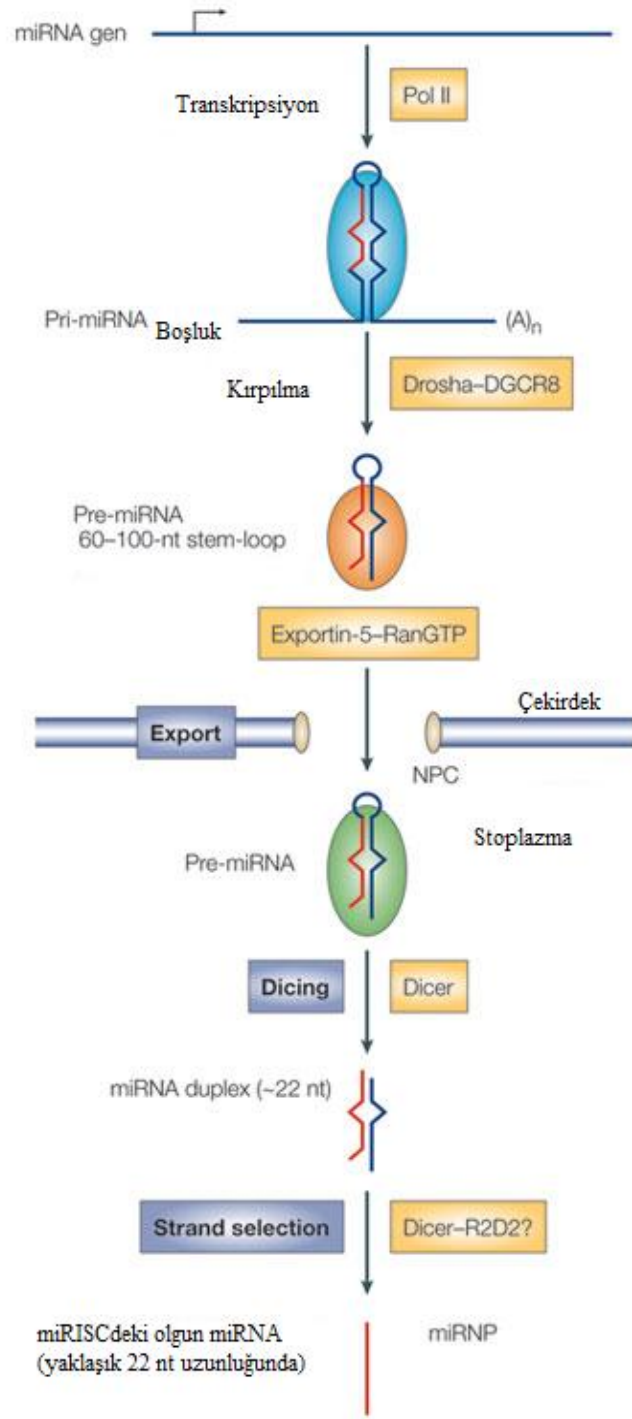
Mikroribonükleik asitler (**miRNA**), ortalama 22 nükleotit uzunluğunda küçük, protein kodlamayan düzenleyici RNA molekülleridir. Hayvan ve bitkilerde, protein kodlayan genlerin mRNA'sına bağlanarak transkripsiyon sonrası baskılanmasını direk olarak etkileyerek gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar⁵. 1990'ların başında *Caenorhabditis elegans*'ta (*C.elegans*) postembriyonik gelişmenin temporal kontrolünün analizi sırasında *lin-4* ve *let-7* RNAlarının tanımlanması ile keşfedilmiştir⁶. *Let-7* homologları, memeliler de dahil olmak üzere diğer bilateral hayvanlarda da bulunmaktadır.

C.elegans'ta gelişim zamanlamasını düzenleyen *let-7*'nin pek çok türde korunmuş olması bu miRNA ailesinin biyolojik fonksiyonun önemini de vurgulamıştır. Ardından hücre içi

küçük RNA sınıfının önemli temsilcisi olan *let-4* ve *let-7* RNAları, kurtlarda, sineklerde ve memelilerde rapor edilmiş ve mikroRNA olarak isimlendirilmiştir⁷⁻⁹.

2001 yılında sayısız miRNA'nın farklı canlılarda tanımlanmaya başlanması ile, miRNAlar oldukça önemli ve cazip bir çalışma alanı olmaya başlamıştır⁷⁻¹⁰. Son yıllarda, yüksek verimle uygulanan dizileme çalışmalarlarıyla beraber miRNAların, oldukça fazla sayıda fosfataz ve kinazları da regüle ettiği ortaya çıkmıştır¹¹. İnsanda protein kodlayan genlerin %60'ının miRNA aracılı gen ifadesinin kontrolü için potansiyel hedef olduğu *in silico* olarak tahmin edilmektedir¹².

MikroRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha kompleksi tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür¹³. Pre-miRNA molekülü bir nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır. Sonrasında pre-miRNAlar sitoplazmada RNAz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA-miRNA* dupleksine çevrilir¹⁴. Dicer, aynı zamanda RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi (RNA-Induced Silencing Complex) RISC oluşumunu başlatır. Dicer, pre-miRNA'nın sap- ilmiğini kestikten sonra, miRNA-miRNA dupleksinden sadece biri RISC kompleksine dahil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonat'ın etkisiyle bu iki iplikten 5'ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılır Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır, RISC kompleksinin substratı olarak işlenir. MikroRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonat proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar. Şekil 1.1'de mikroRNA biyogenezi şematik olarak görülmektedir.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Şekil 1. 1. MikroRNA biyogenezi(Kim 2005'den modifiye edilmiştir).

Önceden miRNA:miRNA* çifti olarak tanımlanan yapıda olgun miRNA, öncül miRNA'nın 5' kolundan köken aldı ise miRNA-5p ve 3' ucundan köken aldı ise miRNA-3p olarak adlandırılır.

2.KURAMSAL TEMELLER

2.1.Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum yeni sentezlenen salgı ve membran proteinlerinin hücrede yer aldığı organeldir. Bu proteinler organelden çıkarılmadan önce post-translasyonel olarak modifiye edilmeli ve uygun bir biçimde katlanmak zorundadır¹⁵. ER fonksiyon kapasitesini aşan fizyolojik veya patolojik durumlarda lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir ve bu durum ER stresi olarak isimlendirilmektedir. ER stresi hücre içerisinde oluştuktan sonra hücrenin hayati fonksiyonlarını devam ettirebilmek için **K**atlanmamış **P**rotein **Y**anıtı (**KPY**) adı verilen sinyal yolları devreye girmektedir. Protein kinaz R benzeri ER kinaz (**PERK**), aktive edici transkripsiyon faktörü (**ATF6**), inozitol gerektiren kinaz 1 (**IRE1**) yolları, **KPY** sinyal yollarının başlıcalarıdır. Bu yollar ilerde de bahsedileceği gibi, şekil 2.1'de daha ayrıntılı bir şekilde gösterilmektedir.

2.2.Protein Katlanmasında Rol Oynayan Moleküller

ER şaperonları, endoplazmik retikulumun fonksiyonu için gereklidir. Bu şaperonlardan özellikleri en iyi tanımlanan BIP, HSPA5 şeklinde de isimlendirilmiş, glukozla düzenlenen protein 78'dir(**GRP78**). Monomerik veya dimerik formdadır ve 78 kDa ağırlığındadır. Aynı zamanda oligomerik formu depo halinde bulunmaktadır. Monomerik formu ise şaperon görevi görmektedir. **GRP78**, ER haricinde, çekirdek ve mitokondride de bulunmaktadır. Proteinin ER'a translokasyonunun düzenlenmesi, protein katlanmasının sağlanması, kalsiyum bağlanması, apoptozisin düzenlenmesi, **KPY**'nin düzenlenmesi, protein kalite kontrolünün sağlanması, protein yıkımının sağlanması **GRP78**'in **KPY** ile ilgili başlıca görevleridir^{16,17}. **GRP78** şaperonu, kanser hücrelerinin tümör baskılama, ilaç direnci gibi patolojik koşullar altında hayatta kalabilmesi için gereklidir¹⁸.

Protein katlanmasından sorumlu bir diğer protein olan glukozla düzenlenen protein 94 (**GRP94**) dimerik bir proteindir ve 94 kDa ağırlığındadır. ER'da en fazla bulunan proteindir. Protein katlanmasının sağlanması ve eğer katlanamayan proteinler varsa yıkımının sağlanması **GRP94**'ün başlıca görevleridir. Bunların dışında ayrıca kalsiyum

bağlanması, apoptozisin düzenlenmesi, immünite (antijen sunumu) gibi hücre içi olaylarda da rol almaktadır.

Kalneksin ve kalretikulin, glikoproteinlerin kalite kontrolünden sorumludur. Glikoproteinlere bağlanan kalneksin ve kalretikulin, disülfid izomerazlar ve foldazlar için substrat sunar ve bunun sonucunda proteinin tersiyer yapısı şekillenmiş olur¹⁹. Olgunlaşmamış protein endoplazmik retikuluma girdiği zaman N-bağlı glikanlarla (iki N-asetilglukozamin, dokuz mannoz ve üç glukoz molekülünden oluşur) modifiye edilir. Protein doğru katlanmışsa son glukozun uzaklaştırılması ile şaperonların bağlandığı bölge ortadan kaldırılarak olgun proteinin golgiye transferi gerçekleşir. Ancak protein doğru katlanmamışsa ER lümenine gömülü, UGGT ya da (UDP)-glukoz (glikoprotein, glukoziltransferaz) katlanmamış kısma bağlanır ve deglikozile glikana glukoz ekler. Dolayısıyla kalneksin, kalretikulin için bağlanma bölgesi oluşturulur. Bu zaman zarfında doğru konformasyon sağlanmışsa UGGT tekrar aktive olmaz ve protein golgiye gider. Bu şart sağlanamamışsa UGGT'nin düzenlediği sikluslar protein yıkımı gerçekleşene kadar tekrarlanır²⁰.

2.3.Katlanmamış Protein Cevabı

Katlanmamış protein cevabı (KPY), ER'da lokalize olmuş üç temel sinyal yolağının aktif hale geçmesi ile düzenlenir. Son yapılan çalışmalarda, belirli hücre tiplerinde bu mekanizmanın aktif hale geçmesinin diğer yolaklarla da ilişkili olabileceğinden bahsedilmektedir. Farklı sinyal mekanizmalarının da olmasına rağmen, her aktif hale geçen yolak, ER strese yanıt veren genlerin transkripsiyonunu yönetir¹⁵.

Hücrede stres oluşması durumunda, cevap vermesi ve stresi yenmesi homeostazın sağlanması için gereklidir. N-bağlı glikozilasyon inhibisyonu ve kalsiyum homeostazının bozulması, enfeksiyon, genetik mutasyon, besin eksikliği, hipoksi gibi ekzojen ya da endojen kaynaklı bir çok stres nedeni vardır¹⁵. Hücrenin, karşılaştığı ER stres ile baş edebilmek ve homeostazı sağlamak için aktive olan başlıca KPY yolakları, şekil 2.1'de gösterilmektedir.

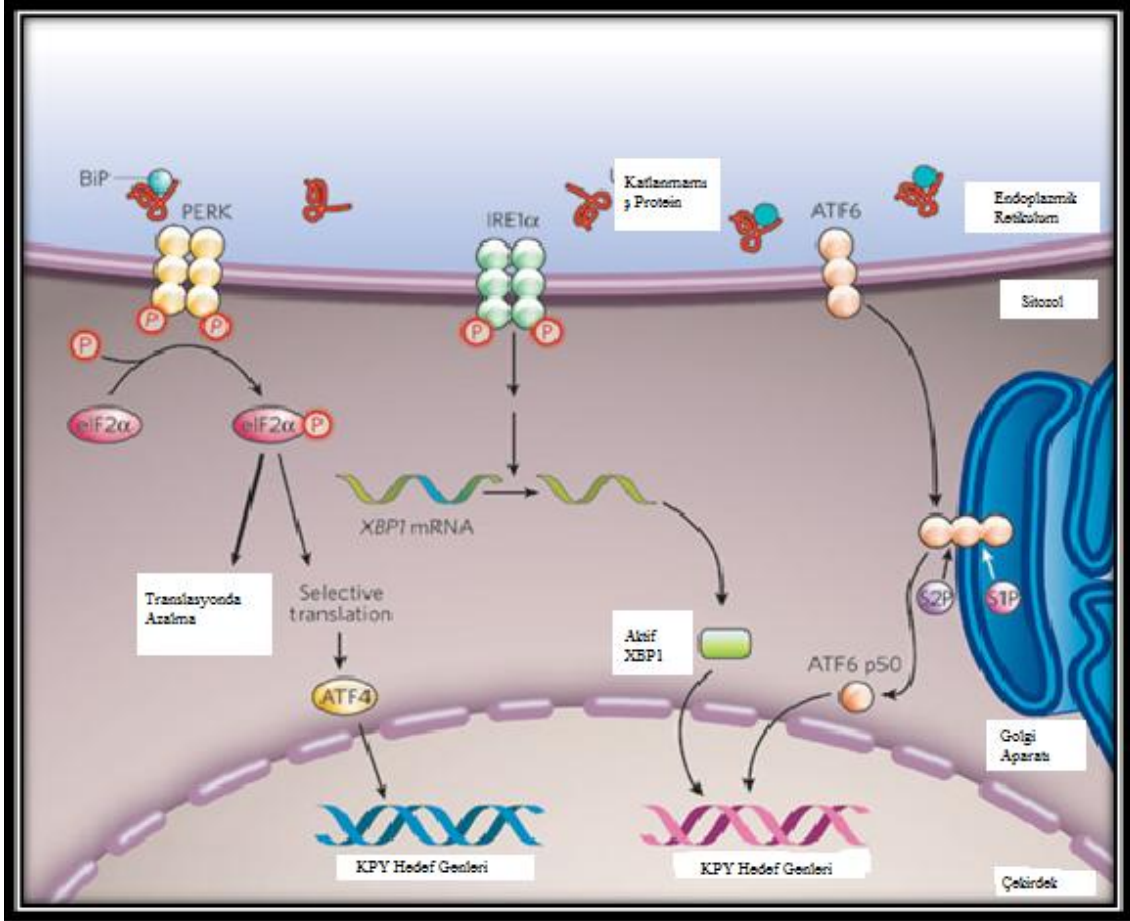
ER, lümeninde biriken katlanmamış proteinlerin katlanmasını sağlamak için kapasitesini artırır. Katlanmaya destek olan yardımcı moleküllerin sentezi artırılır. Yanlış katlanan proteinler düzeltilemezse ER yükünü azaltmak için yıkıma gönderilir. Hücre yine de adaptasyonu sağlayamazsa çevre dokuya zarar vermemesi için apoptoza yönlendirilir.

Makrofaj, pankreas beta hücreleri gibi sekretuar hücrelerin farklılaşma ve hücre büyümesi, yanlış katlanan protein üretimine neden olur ve bu KPY'yi indükleyen fizyolojik durumlardır. Patolojik durumları ise, hipoglisemi, hiper-homosisteinemi ve iskemi gibi artmış metabolik durumlar; sekretuar ve transmembran proteinleri kodlayan genlerde mutasyon; hepatit C gibi enfeksiyonlardır¹⁵. Günümüze kadar KPY sensörü olarak üç transmembran protein tanımlanmıştır.

KPY, ER'da katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi sonucunda tetiklenen evrimsel süreçte korunmuş bir cevaptır.

KPY aktivasyonunu tetikleyen etmenler şunlardır:

- Normal ER işlevini yeniden kurmak ve değişen çevreye adaptasyonu sağlamak,
- ER lümenine gelecek yeni proteinlerin miktarını azaltmak,
- ER'da proteinlerin katlanma kapasitesini arttırmak,
- ER'da bulunan katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin degradasyonunu (ERAD) ve tekrar sitoplazmaya dönüşünü sağlamaktır.



Şekil 2.1. KPY Yolakları (Kezhong Zhang & Randal J. Kaufman Nature 2008'den modifiye edilmiştir²¹).

Eğer KPY tarafından aktive olan koruma mekanizması normal ER fonksiyonunu tamir etmek için yeterli değilse hücreler apoptoza giderler. Son yapılan araştırmalar ER stresi ve KPY'nin diyabet, obezite ve ateroskleroz gibi metabolik hastalıklarda, kanserde, immun yanıtta ve Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda önemli rol oynadığını desteklemektedir. ER stresi ve KPY üzerinde yapılacak daha ileri çalışmalar bu fizyolojik mekanizmanın tam rolünü açıklamak için gereklidir ve potansiyel tedaviler için yeni yollar sağlayacaktır.

2.4. Katlanmamış Protein Cevabı Sinyal Yolları

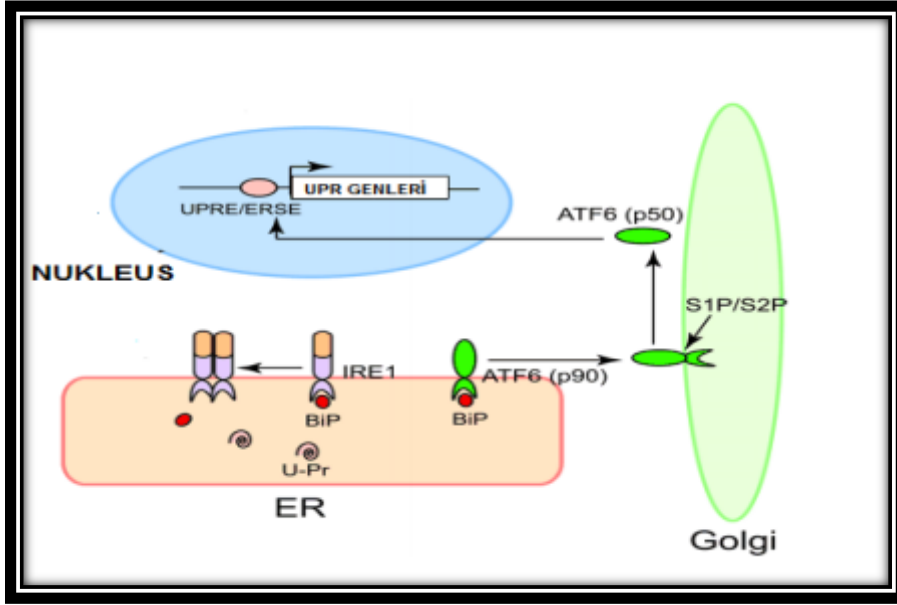
2.4.1. Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) Sinyal Yolu

Memeli hücrelerinde, ER strese verilen ilk yanıt geçici olarak translasyonun etkisinin azaltılmasıdır. Bu olay PERK sinyal yolağı tarafından yönetilmektedir. PERK, ER membranında lokalize, Tip I transmembran serin treonin kinaz proteindir²²⁻²⁴. Normal şartlar altında GRP78 ile beraber bulunması molekülün inaktif durumda kalmasını sağlar. ER kapasitesini aşan yükü veya stresle karşılaştığı zaman beraberinde bulunan GRP78 lümene katlanmaya yardımcı olması için gönderilirken PERK homodimer olarak fosforillenir^{22,25}. Aktive olan PERK daha sonra ökaryotik başlama faktörü eIF2 α 'daki Serin-51'i fosforiller^{23,24}. Fosforile eIF2 α , genel translasyonu hücre içinde durdurur. Ancak bazı seçilmiş proteinlerin translasyonu devam eder ve miktarları artar. Translasyonun inhibe olması sonucu kısa ömürlü proteinler hücreden temizlenir. En tipik örnek siklin D'dir. ER stres sırasında bu proteinin yokluğu memeli hücrelerinin hücre siklusu sırasında G1 fazında kalmasına yol açar.

2.4.2. Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) Sinyal Yolu

ATF6, hücrede ER stresi olmadığında, ER membranında GRP78 ile beraber inaktif şekilde bulunmaktadır. Bu proteinin memeli hücrelerinde, oldukça sık rastlanan dokuların dağılımında ATF6 α ve ATF6 β olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır²⁶.

ER stres ile karşılaşınca PERK'dekine çok benzer bir mekanizmayla GRP78 lümene katlanmaya yardımcı olmak için gönderilirken ATF6'da posttranskripsiyonel modifikasyona uğrar²⁷. Golgiye gönderilen ATF6, site1 proteazla (S1) sonra site2 proteaz (S2) ile etkileşerek kırılır^{28,29}. Ardından site2 proteaz tarafından kırılan ATF6 çekirdeğe gönderilir. Burada GRP78, GRP94 gibi ER şaperonlarının ifadesini artırır. Sonuç olarak bu proteinlerin sentezi artar ve ER katlama kapasitesi yükselerek strese karşı korunma sağlanmaya çalışılır.



Şekil 2. 2. ATF6 Sinyal Yolağı (Rawson *et. al.* Mol Cell. 2000'den modifiye edilmiştir²⁹)

2.4.3. Inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1) Sinyal Yolu

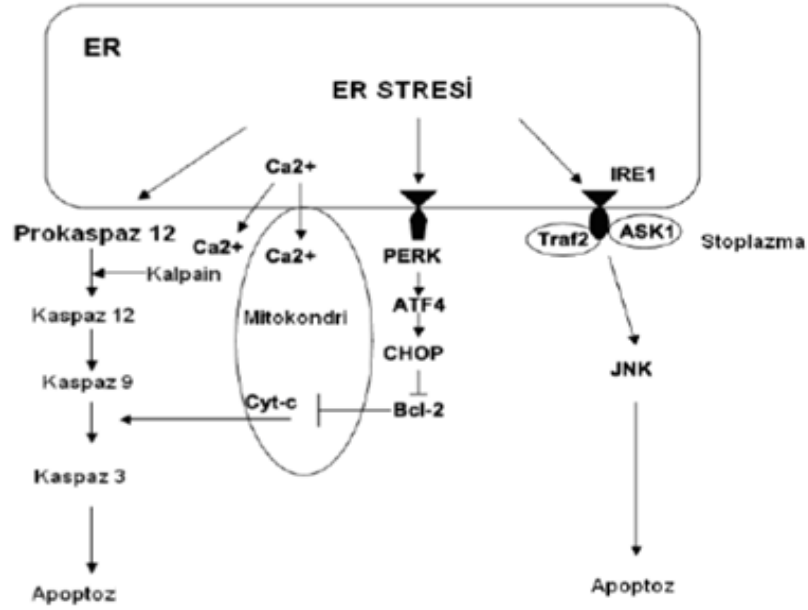
IRE1 transmembran yapıda bir proteindir. İki formu vardır. IRE1- α tüm hücrelerde bulunurken β formu ise bağırsaklarda bulunmaktadır³⁰. Her iki izoformu da ER'da transmembran proteini olarak bulunmaktadır. IRE1 α , farede yaşamsal olarak önem taşıyan genlerden biridir³¹.

IRE1, diğer KPY yolları gibi GRP78 ile kompleks halindeyken inaktiftir. ER stres sırasında GRP78'in ayrılması, IRE1 α 'nın dimerizasyonunu, oligomerizasyonunu ve trans-otofosforilasyonunu sağlar. Aktif haldeki IRE1'in RNAaz aktivitesi ile X-box bağlayıcı protein 1 (XBP) mRNAsından 26 nükleotid uzaklaştırılır ve oluşan kırpılmış XBP1 mRNA translasyona girer ve transkripsiyon faktörü kodlar. XBP1 mRNAsı sitoplazmasında normalde de bulunmaktadır. Ancak kırpılmamış şekildedir³².

2.5. Endoplazmik Retikulum Stresiyle İndüklenen Apoptoz Yolları

Hatalı katlanmış proteinlerin birikimi ve ER stresinin üstesinden gelmek için hücrede KPY yolağı aktive olmaktadır. Eğer hatalı katlanmış protein miktarı çok fazla olursa ve stres devam ederse, KPY'nin aktivasyonu ER stresine baş etmek için yetersiz kalmaktadır ve böyle bir durumda ER stresi programlı hücre ölümüne yol açar. Ancak ER stresine

indüklenen apoptozu düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamış değildir³³. PERK, ATF6 ve IRE1 sinyal yolları sadece yaşama işlevlerini sağlayan yolları başlatmazlar aynı zamanda apoptoz yollarını da indüklerler. ER stresi sırasında proapoptotik sinyalleri tetiklemektedir. Fakat direk olarak hücre ölümüne yol açmak yerine CHOP ya da JNK gibi yolağın ilerisindeki moleküllerin aktivasyonunu başlatarak etki ederler³⁴. Oluşan bu programlı ölüm yolları şekil 2.3'te gösterilmektedir.



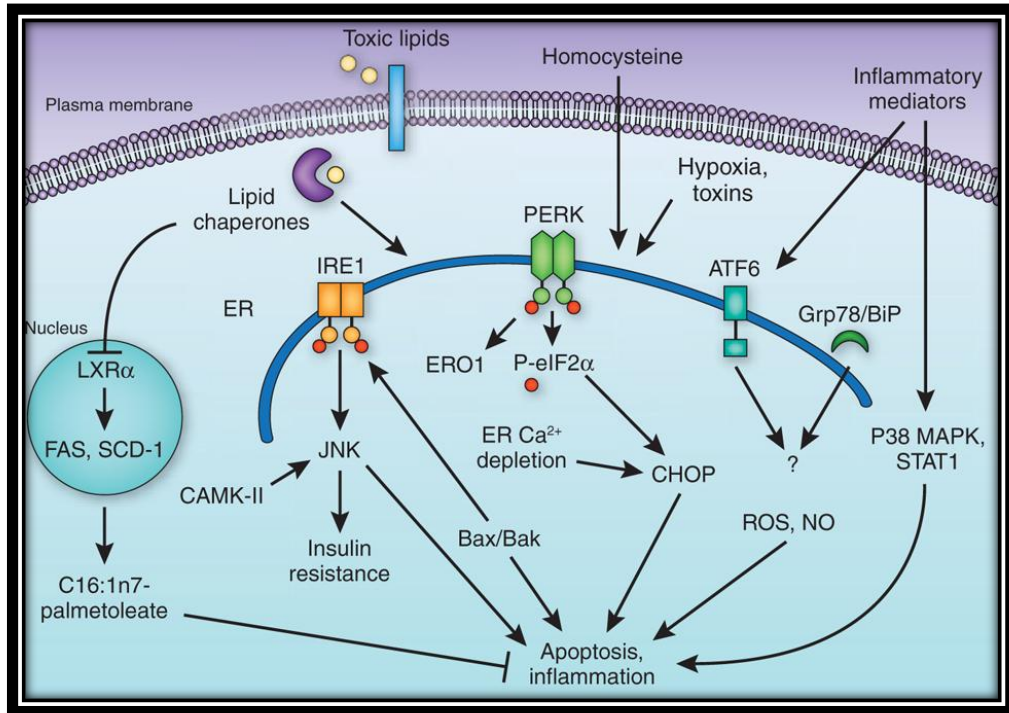
Şekil 2. 3. ER stres apoptoz yolları

2.5.1.CHOP (CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) Homolog Protein) İndüksiyonu

CHOP, bZIP-içeren transkripsiyon faktörü olarak C/EBP ailesinin üyesi olarak tanımlanmıştır. CHOP GADD153 (growth arrest and DNA-damage inducible gene 153) olarak da bilinir, ER stresle DNA hasarından daha çok indüklenir³⁴. Uzayan ER stres süresinde CHOP, en fazla ifadesi artan genlerden biridir^{22,35}. CHOP'un transkripsiyonu ER membranında yer alan PERK, ATF6 ve IRE-1 tarafından aktive edilmektedir^{22,35,36}.

Pek çok çalışmada ER stres kaynaklı apoptoz CHOP yolğını içermektedir. CHOP'un transkripsiyon ve translasyon seviyesindeki kontrollerine ek olarak, aktivasyonunu artırmak için P38 MAPK 78. ve 81. serinden fosforile ederek posttranslasyonel olarak da kontrol sağlamaktadır³⁴. CHOP'un maksimum olarak indüklenmesi için, bütün ER strese cevap yolları gereklidir. Çünkü CHOP'un promotor bölgesi ATF4, ATF6, XPP-1 ve ATF2/ATF3 tarafından transaktive olan 4 cis-davranışlı elementler tarafından düzenlenmektedir. CHOP'un ifadesi GADD34, ERO1, DR5, karbonik anhidraz VI ve TRB3 gibi proapoptotik proteinlerin indüksiyonuna da yol açmaktadır. ERO1 ER luminal proteinken, diğerleri sitozoliktir^{37,38}. BCL2 protein ailesinin üyeleri (BCL2, BAX, BAK, BIK) apoptotik hücre ölümünün düzenlenleyicisi olarak önem taşımaktadır (Şekil 2.4.).

Mitokondri aracılı apoptozda olduğu gibi ER stresıyla indüklenen apoptoz da BCL2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. ER stresıyla indüklenen hücre ölümünde BCL2 proteinlerinin ilişkisi açık olmasına rağmen, ER streşi tarafından nasıl düzenlendiği daha az bilinmektedir³⁴.



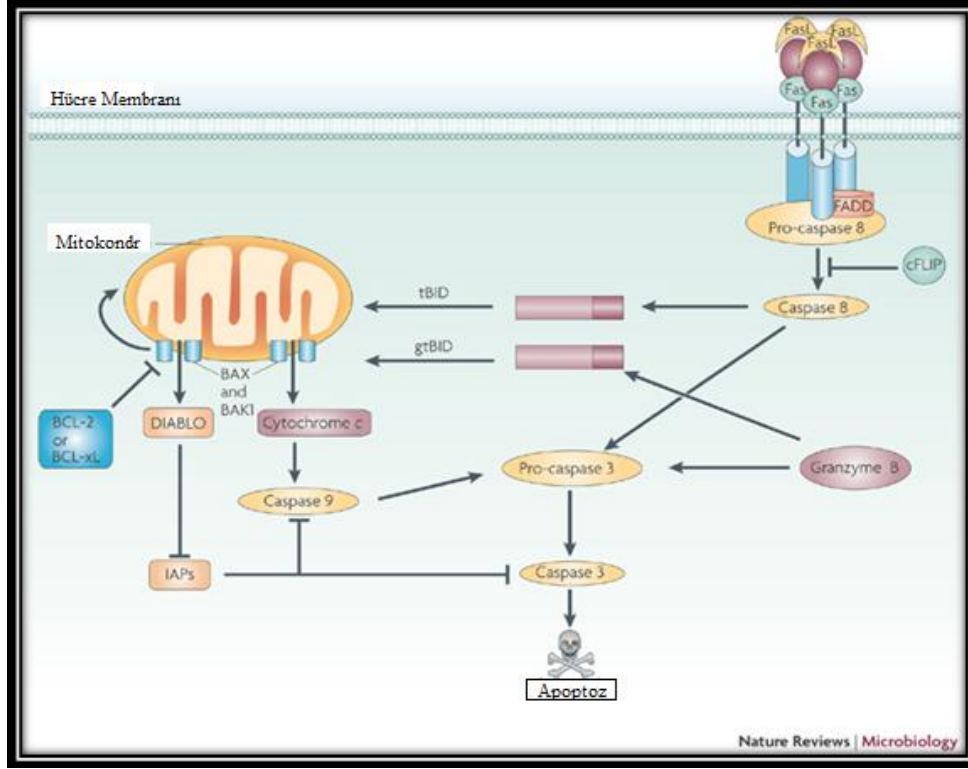
Şekil 2. 4. CHOP, JNK, ATF4 aracılı apoptoz yolları

2.5.2. JNK Aktivasyonu

ER strese yanıt olarak, IRE1 α , adaptör protein TNF reseptör ilişkili faktör 2(TRAF2) ile beraber ER membranında bulunmaktadır³⁹. Sinyal iletiminde görevli proteinlerden olan c-jun NH2- terminal kinaz (JNK) ER stresinde başka bir apoptotik yoldur, gen ekspresyonunu düzenler ve strese karşı yaşam ve hücre ölümü arasındaki ilişkiyi sağlar. ER stres yolunda JNK aktivasyonunun işlevsel önemi henüz tam olarak açıklanmış değildir. KPY IRE1-TRAF2-ASK1 kompleksi tarafından aktive olmaktadır. IRE1, Xbp1 kırılmasındaki rolünden bağımsız olarak JNK sinyal yolunu aktive ederek apoptozu tetiklemektedir. IRE-1- TRAF2 etkileşimi apoptozu tetikleyen transkripsiyonel baskılayıcı faktör olan ATF3'ü de aktive etmektedir. Ayrıca JNK'ın, fosforilasyonla BCL2 proteinlerini düzenlediği de bilinmektedir⁴⁰.

2.5.3. Kaspaz Aktivasyonu

Kaspazlar, ER'la bağlantılı sistein proteaz ailesinin üyesidirler. Hücrelerin içinde inaktif halde bulunmaktadır ve apoptozun indüklenmesinden sonra aktif enzim formuna dönüşmek üzere işlenirler. Kaspazların aktivasyonu apoptoz için gereklidir ve kaspaz 12, 3, 6, 7, 8 ve 9'un işlevleri ER stresıyla ilgili çalışmalarda gösterilmiştir. Kaspaz 12, ER stresıyla indüklenen apoptozun anahtar düzenleyicisi olarak önem taşımaktadır. Kaspaz 12, çeşitli yollardan ER stresi ile aktive olabilmektedir. Birinci yol; kalsiyum tarafından aktive olan sitoplazmik proteaz olan kalpainler tarafından aktive olmasıdır. ER'da kaspaz 12'nin aktivasyonundan sonra kaspaz-12 prokaspaz 9'u keser ve kaspaz 9'da kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açar ve sonuçta apoptoz gerçekleşir. İkinci yol; IRE1 ve adaptor protein TRAF2 ile direk bağlantılı olarak aktive olabilmesidir. Üçüncü yol; Kaspaz 7'nin bazı apoptotik uyarılara cevap olarak ER'da transloke olması ve direk olarak kaspaz 12 'yi aktive edebilmesiyle gerçekleşmektedir. ER stresıyla diğer kaspazların da bağlantılı olduğunu ve diğer kaspazların aktivasyonunu da indüklediği gösterilmiştir (Şekil 2.5.).



Şekil 2. 5. Kaspazların apoptozdaki görevleri

2.6. MikroRNA'lar ve ER Stres

MikroRNA'lar, diziye özgü biçimde gen ifadesini düzenleyen kodlanmayan RNAların küçük bir ailesidir. MikroRNA ailesini oluşturan iki önemli üye ilk olarak *C. elegans*'da gelişmeyi düzenleyen genlerden tanımlanmıştır. MikroRNA'lar, farklı ifade modellerine sahiptir, pek çok gelişimsel ve fizyolojik süreçleri düzenleyebilir. MikroRNA'ların keşfi, kompleks gen regülasyonunu anlamak için yeni bir boyut kazandırmıştır⁴¹. Sonraları yapılan çalışmalarda, kanserde rol oynayan miRNA'lar "oncomir" olarak adlandırılmıştır. Memelilerde miRNA ifadesinin "antagomiR" denilen moleküllerle susturulabileceği gösterilmiştir⁴².

Son çalışmalar KPY ile ilgili olan transkripsiyon faktörlerinin mikroRNAlar tarafından regüle edildiğini desteklemektedir. Ayrıca bu transkripsiyon faktörleri, mikroRNA ifadesini ya da bu ifadenin devamlılığını düzenleyebilir. Bu durum, mikroRNAların, KPY yollarında önemli pek çok düzenleyici fonksiyonu olduğunu vurgulamaktadır. Ayrıca, adaptif ve apoptotik mekanizmalarını kontrol ederek ER stresin hücrel yanıtını yönetirler. Yapılan çalışmaların da bize gösterdiği gibi, bağımsız mekanizmalar tarafından

oluşan ER stres (protozomal degresyonun durması, ER bağlı glikozilasyonun durması ya da Ca⁺ homeostazının bozulması) miRNA ifade modellerini farklı yollarla etkilemektedir. Gözlemlenen farklılıkların pek çoğuna rağmen, strese yol açan farklılıklar, üstünde durulan temel mekanizmalardır.

ER stres ve KPY bileşenlerini araştırmak üzere gerçekleştirilen bazı yüksek hacimli miRNA mikrodizilimlerinin analizi sonucu lipotoksisitenin miRNA ifadesi üzerinde etkisi olduğu saptanmıştır. Pankreas Beta-hücrelerine serbest yağ asidi verilerek 132 adet miRNA'nın ifade seviyelerindeki değişiklikler analiz edilmiştir⁴³. Pek çok miRNA'nın yanısıra en çarpıcı mmu-miR-34a ve mmu-miR-146'nın pankreas Beta hücrelerinde artışı mikroarray ile gösterilmiş ve çalışmada bu iki miRNA üzerine yoğunlaşmıştır. 2010'da kimerik tRNA kullanılarak hücrelerde ER stres oluşturulmuş ve KPY aktivasyonu sonucunda yaklaşık 200 miRNA'nın ifade seviyesinde değişiklik olduğu tespit edilmiştir⁴⁴.

2.7.MikroRNA'lar ve XBP1

XBP1, gelişmekte olan polipeptidlerin ER'a girişini, proteinlerin olgunlaşmasını ve katlanmasını sağlayan genlerin ifadesini artırarak pek çok ER ve salgı yollarını indükleyen bir transkripsiyon faktörüdür^{45,46}. Çizelge 2.1'de KPYnin adaptif ve apoptotik cevaplarını düzenleyen mikroRNAların listesi yer almaktadır

Çizelge 2.1.Farklı miRNAların, çeşitli pro-adaptif ve pro-apoptotik KPY sinyal yollarına katkısı (Byrd *et al*, 2013'den modifiye edilmiştir).

| mikroRNA | Düzenlenen yolak | Hedef Gen(ler) | KPY'ye katkısı |
|--------------|---------------------|----------------|--|
| miR-346 | XBP1(S) | TAP1 | adaptif - TAP1 ifadesi azalır, böylece MHC sınıf-I ilgili antijen sunumu azalır. |
| miR-708 | CHOP | Rhodopsin | adaptif –ER protein katlanma talebini azaltır |
| miR-30c-2-3p | NF-κB (PERK hedefi) | XBP1 | adaptif –KPY süresince XBP1 ifadesini düzenler |
| miR-214 | NF-κB (bağlantılı) | XBP1 | adaptif -KPY aktive oluncaya kadar XBP1 ifadesini düzenler |
| miR-221/222 | CHOP (bağlantılı) | p27Kip1 | apoptotik - p27Kip1 ve MEK/ERK- bağımlı G1 faz arreste katkıda bulunur |

| | | | |
|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|--|
| miR-455 | ATF6 | Calreticulin (bağlantılı) | adaptif - calreticulin seviyesini düzenler |
| miR-663 | ER stres indüklenebilir | ATF4 (bağlantılı) | adaptif - ATF4 hedefleri olan VEGF and TRIB'i direk olmayan yoldan azaltır |
| miRs 17, 34a, 96, 125b | IRE1-bağımlı yıkım | Caspase-2 | adaptif - IRE1 miR'leri degrede edinceye kadar, miRler Caspase2 transkripsiyonunu inhibe eder, apoptozun başlaması ile sonuçlanır. |
| miR-204 | ER stres indüklenebilir | tanımlanmamış | apoptotik - KPY induksiyonu üzerine genel inhibitör etki |
| miR-122 | ER stres indüklenebilir | ER stres proteinleri (bağlantılı) | apoptotik -miR-122- PSMD10-UPR bağımlı KPY gen düzenlenmesi |
| miR-23a~27a~24-2 | ER stres indüklenebilir | tanımlanmamış | apoptotik -ROS üretimini artırır, çoğunlukla PERK ve IRE1i aktive eder. |

XBPI mRNAsının düzenlenmesi için öngörölmüş hedef miRNA'lar

miR-449a ve miR-449b, bu yolda etkili rol oynamaktadır. miR-449'un down regölasyonunun, mide kanserinde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. Son yapılan bir çalışmaya göre miR-30c-2 miRNA'sının KPY süresince ifadesinin arttığı gösterilmiştir⁴⁷.

BIP mRNAsının düzenlenmesi için öngörölmüş hedef miRNA'lar

miR-495'in, akciğer kanser hücreleri yüksek seviyelere ulaştığında kanserin ilerlemesine ve hücrelerde hipoksi dirençliliğine neden olduğu belirtilmiştir. Bu tümör baskılayıcı hareketin, diğer tip kanser hatlarında da olduğu bilinmektedir⁴⁸.

ATF4 mRNAsının düzenlenmesi için öngörölmüş hedef miRNA'lar

ATF4'ün 3' UTR ucunun kısa olmasından dolayı (100 bazın altında) hiçbir tanımlanmış miRNA bu bölgeyle eşleşmemektedir⁴⁸.

PERK mRNAsının düzenlenmesi için öngörölmüş hedef miRNA'lar

İnsan vasküler endotelial hücrelerde (HUVEC), yüksek glukoz stresi boyunca vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) negatif regölasyonu miR-320'nin görevidir. Bunun yanısıra, stromal fibroblastlarda tümör gelişimini azaltıcı etkisi vardır. PERK mRNAsı ile interaksiyonu öngörölen miR-454'ün rolü ile ilgili literatürde kesin bir bilgi bulunmamaktadır⁴⁸.

IRE1 mRNAsının düzenlenmesi için öngürülmüş hedef miRNA'lar

miR-506'nın, kansere dönüşen hücrelerde ve akciğer kanseri hücrelerinde anti-onkogenik bir miRNA olarak görev aldığı bilinmektedir. miR-124 ise nörogenezin yönetildiği beyinde oldukça fazla bulunan bir miRNA'dır. Bu yüzden kanser sürecinde baskılayıcı rol oynar⁴⁸.

ATF6 mRNAsı için öngürülmüş hedef miRNA'lar

miR-203 miRNA'sının tümör baskılayıcı rolü daha önceden ispat edilmiştir. Bu miRNA, mezenkimal hücrelerin, epitel hücreye geçişini teşvik eder ve memeli epitel hücre farklılaşması boyunca kök hücrenin özelliklerinin yıkımını yönetir. miR-424, anjiyogenezin düzenlenmesinde görev alır. Son çalışmalarda bu miRNA'nın azalmış ifadesinin mikroplara karşı savunmada önemli bir rol oynadığı görülmektedir⁴⁸.

2.8. MikroRNA Tanımlanmasında Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Son yapılan çalışmalarda, mikroRNA'ların pek çok organizmanın genlerinin düzenlenmesinde oldukça önemli rol oynadığı ve sayısız hastalık sürecinde etkili olduğu gösterilmektedir⁴⁹. Hastalık sürecinde önem teşkil eden genetik yollar miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir⁵⁰. MikroRNA'lar, hedef mesajcı RNA'ların 3'çevrilmeyen bölgelerine bağlanan kısa (21-23 nükleotid uzunluğunda) RNA'lardır. Bu bağlanma, çoğunlukla hedef genlerin translasyonel baskılanmasına yol açar, ayrıca hedef transkriptin hızlı degradasyonunu da tetiklemektedir. MikroRNA'lar, pek çok sayıdaki ilacın hedefi olabileceği için önem taşıyan proteinlerin olanak dahilinde, seviyelerinin kontrolü için düzenleyici genlerin yeni bir türü olarak sunulabilir. MikroRNA'lar, belirli dokularda, belirli zamanlarda aktif hale geçerek spesifik mikroRNA'lara dönüşür⁴⁹. MikroRNA'ların hedeflerini bulmak, mikroRNA'nın kendisini bulmak kadar önem taşır. Bu mikroRNA'ları tanımlamak ve hedef genlerini ortaya çıkarmak hastalıkların patogenezi anlamak üzere yapılan çalışmalara bir platform sağlar⁵⁰. Pek çok kanserde, mikroRNA ifadesi belirgin bir şekilde değişmiştir ve bu oldukça yararlı bir tanılama tabanında gösterilmiştir. MikroRNA hedeflerini tahmin edebilmek için halen pek çok algoritma geliştirilmektedir.

MikroRNA'nın ifade seviyesinin ve hedeflerinin profillendirilmesi için sayısız veritabanı mevcuttur. Yapılan sekans çalışmalarını ve mikroRNA genomunu baz alan veritabanları;

MiRBase, insan mikroRNA hastalıkları veritabanı (HMDD), miRNAMap ve miRGen'dir. miRBase, her bir desteklenen miRNA için olgun mikroRNAnın sekansını kullanan genel bir veritabanı hizmeti sunar. Ayrıca tahmin edilen öncül dizinin genomik koordinatlarını sağlar. TargetScan, PicTar, TargetMiner, miRDB, mikroRNAların tahmini hedefleri ve hayvanlardaki fonksiyonel açıklamaları için kullanılan veri tabanlarıdır. Microna.org 2005 yılından beri, mikroRNAların tahmini hedeflerini, hedeflerin "seed regionlarındaki" mükemmel baz uyumuna tamamlayıcı durumu baz alarak hedef ve ifade özelliklerini barındırır. TarBase ise, geçerliliği kabul edilmiş mikroRNA hedeflerini içeren araştırmalar için kullanılır⁵⁰.

miRNA hedef tahmini yaklaşımları

Sayısal olarak öngörülen hedefler için farklı metodlar geliştirilmiştir. Bu metodlar, web temelli çalışmalarda, en az bir grup transkriptin tahmin edilmesi için her zaman kullanılabilir.

Çizelge 2. 2.MikroRNAların hedef mRNAlarının belirlenmesinde kullanılan veri tabanlarının özellikleri (Maziere *et al* 2007'den modifiye edilmiştir).

| <i>Metod</i> | <i>Metodun tipi</i> | <i>Metodun Uygulanabilirliği</i> | <i>Verilerin ulaşılabilirliği</i> | <i>Adres</i> |
|----------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Stark <i>et al</i> ⁵¹ | Tamamlayıcı | Çevrimiçi araştırma | Uygun | http://www.russell.embl.de/miRNAs/ |
| miRanda | Tamamlayıcı | İndirilerek kullanım | Uygun | http://www.microna.org/ |
| miRanda miRBase | Tamamlayıcı | Çevrimiçi araştırma | Uygun | http://microna.sanger.ac.uk/ |
| TargetScan | Kuyruk bölgesinden tamamlayıcı | Çevrimiçi araştırma | Uygun | http://www.targetscan.org/ |
| TargetScanS | Kuyruk bölgesinden tamamlayıcı | Çevrimiçi araştırma | Uygun | http://www.targetscan.org/ |
| DIANA microT | Termodinamik | İndirilerek kullanım | Uygun | http://diana.pcbi.upenn.edu/ |
| PicTar | Termodinamik | | Uygun | http://pictar.bio.nyu.edu/ |
| RNAHybrid | Termodinamik ve istatistiksel model | İndirilerek kullanım | | http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/ |
| miTarget | SVM | Çevrimiçi araştırma | | http://cbit.snu.ac.kr/miTarget/ |
| TarBase | Deneysel olarak geçerli kabul edilmiş hedefler | - | Uygun | http://diana.pcbi.upenn.edu/tarbase.html |
| miRBase | Tüm türler için | Çevrimiçi araştırma | Uygun | http://www.mirbase.org/ |

| | | | | |
|---------|---|---------------------|-------|---|
| | bilinen miRNAlar | | | |
| MiRvea | miRNA-hedef çiftinin minimal serbest enerjisi | Çevrimiçi araştırma | Uygun | http://www.microna.org/ |
| miRWalk | Deneysel olarak geçerli kabul edilmiş ve edilmemiş tüm hedefler | Çevrimiçi araştırma | Uygun | http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/ |

miRNA ve Hedeflerinin Belirlenmesi İçin Veritabanlarının Kullanımı

Belli başlı veri tabanları çizelge 2.2'de gösterilmiştir. Bu veritabanlarından bazıları, pek çok makalede yayınlanmıştır ancak nadir güncellenmektedir; bir kısmı ise düzenli olarak yeni miRNA sekanslarını ya da mRNAların 3'UTR'sini hedefleyen mikroRNA'ları dahil ederek yeni sürümler halinde güncellenmektedir. Genel olarak daha çok sayıda mikroRNA'nın hedefinin geçerli hale geldiğini kabul etmekteyiz. Bu konuda yapılan çalışmalar, kullanıcılara sayısal olarak tahmin edilen ve deneysel olarak geçerli kabul edilen mikroRNA hedeflerinden kuşku duymama olanağı verecektir.

Tahmin edilen mikroRNA hedefleri için uygulanan tamamlayıcı metodların hızlı gelişimi, gelecekteki araştırmalar için umut vericidir. MikroRNA'ların nasıl bağlandığının anlaşılması, biyolojik süreçleri hızlandıracağı gibi var olan algoritmaları da daha kesin bir hale getireceği beklenmektedir. Yeni tip algoritmalar, yeni bulunmuş bilgileri yayınlayacak kesinlikte olması için kullanılır Bunun yanı sıra, çevrimiçi çalışmaların, araştırmacılara yararlı araçlarla ve mikroRNAların genlerdeki etkisini değerlendirmek için ya da biyolojik sürecin ilgisini çekmesini sağlaması beklenmektedir. Aslında, mikroRNAların tahmini hedefleri ile çalışmak yeni ilaçların keşfi için kazanç sağlar. Buna paralel olarak sekans verilerinin önemini arttıran çalışmalar, 3'UTR'lerinin nitelendirilmesine daha iyi olanak sağlar ve splicing durumlarında öngörülen mikroRNA hedefi için, sayısal yaklaşımları daha ileri taşır⁴⁹.

3.GEREKÇE ve AMAÇ

Obezite, tip 2 diyabet ve ateroskleroz gibi metabolik düzensizliklerde yağ asitleri, yağ dokusunun yanı sıra başka dokularda da birikmektedir. Hücre içindeki serbest yağ asidi birikimine karşı koyamayan –yağ dokusu harici dokularda- hücrelerde Endoplasmik Retikulum (ER) stres ve lipotoksik hücre ölümü gerçekleşir⁵². Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY) hücrede biriken serbest yağ asitlerinin endoplazmik retikulumda meydana getirdiği strese karşı koymak için aktive olan bir mekanizmadır ve hücrenin ER’da oluşan strese karşı koyarak adaptasyonu veya hücrenin kendisini apoptoza programlaması arasında anahtar rolü üstlenmektedir. Bu süreçte KPY hücrenin ihtiyacı olan şaperon proteinlerinin ifade edilmesi için gerekli sinyallerin hücre çekirdeğine iletilmesini sağlamaktadır⁵³. Ancak ER stresi metabolik dokularda kronikleştiği zaman, şişmanlık, diyabet, ateroskleroz gibi metabolik hastalıkların gelişimine yol açmaktadır. Normal koşullar altında KPY, nihai üç boyutlu konfigürasyonlarına ulaşamamış proteinlerin ER’da birikmesi sonucunda hücrelerin stres durumundan kurtulmak için geliştirdiği bir mekanizmadır⁵⁴. Lipotoksisitenin KPY’ni hangi moleküler mekanizmalarla aktifleştirdiği halen tamamen aydınlatılamamıştır. Son yıllarda tanımlanan ve gelişim, organogenez, kök hücre statüsünün idamesi, kanser gibi biyolojik süreçlerde rol alan mikroRNAların (miRNA) protein kodlayan genlerin yaklaşık %60’ını kontrol ettikleri tahmin edilmektedir. Memeli proteomunun yaklaşık %30’unun salgı yolları ile bağlantılı olduğu ve bu proteinlerin ER’da işlendiği düşünüldüğünde ER’un protein trafiği ve işlenmesi sürecindeki rolünün son derece önemli olduğu görülmektedir. Yapılan tezin amacı, lipotoksik endoplazmik retikulum stres sırasında katlanmamış protein yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan olası mikroRNAlar ve bunların regüle ettiği hedef mRNAlarının ve düzenledikleri yolların analiz edilmesidir. Bu amaçla fare makrofaj hücre hattında (RAW 264.7) lipotoksik ER stres oluşturulmuştur. Adipositler ve makrofajlar tarafından fizyolojik koşullar ve metabolik hastalık durumlarında benzer sinyal yolları kullanıldığı ve obezitede kronik inflamasyon gözlemlendiği daha önce pek çok çalışmada gösterilmiştir⁵⁵.

Bu tez çalışmasında QRT-PCR temelli miScript miRNA array kullanılarak miRNAom analizi gerçekleştirilmiş ve yaklaşık 940 miRNA arasından lipotoksik ER stres sonucu ifadesi değişen miRNAlar tanımlanmıştır. Ardından biyoinformatik araçlar ve yolak analizleri ile bazı miRNAların hedef genleri *in silico* tanımlanmış ve son olarak da bu hedef mRNAların QRT-PCR ile ifade seviyeleri analiz edilmiştir.

Böylece lipotoksik ER streste KPY'nın düzenlenmesinde rol oynayan olası miRNAlar ve bunların regüle ettikleri yollar tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu tez çıktıları ile ileride gerçekleştirilecek fonksiyonel deneylerle de miRNA'ların KPY ile etkileşimi, KPY'nin adaptif ve destrüktif yanıtına katkıları daha detaylı incelenecek ve potansiyel miRNA'ların obezite hayvan modellerinde KPY düzenlemesine olan etkileri *in vivo* olarak analiz edilebilecek ve antagomiRlerin metabolik hastalıkların tedavisinde kullanımı söz konusu olabilecektir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Genel Reaktifler

Genel laboratuvar kimyasalları; Sigma Chemical Co.(St Louis, ABD), Merck (Darmstadt, Almanya), Amresco (Ohio, ABD) ve AppliChem (Darmstadt, Almanya)'dan sağlanmıştır.

4.1.2. Kullanılan RNA Örnekleri

RAW 264.7 fare makrofaj hattında palmitat ile ER stres oluşturulmuştur. %1 yağ asidi içermeyen BSA'lı RPMI besiyeri içinde 1 μ M sodyum palmitat (Sigma) hücrelere 6 saat süre ile uygulanmıştır. Bu hücre peletleri Bilkent Üniversitesinden Yrd. Doç. Dr Ebru Erbay ve ekibi tarafından sağlanmıştır. RNA izole edilinceye kadar peletler -80°C'da saklanmıştır.

4.1.3. RNA İzolasyon Reaktifleri

Total RNA izolasyonu Trizol (Invitrogen) protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda kullanılan reaktifler ve markaları çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. Total RNA izolasyonu için kullanılan malzeme listesi.

| <i>Reaktif</i> | <i>Markası</i> |
|---|-----------------------------------|
| Kloroform | Sigma Chemical Co.(St Louis, ABD) |
| İzopropanol | Isopropil Alkol, Ambresco |
| Ethanol Absolut | AppliChem (Darmstadt, Almanya) |
| Glikojen | Roche |
| DNaz ve RNazsız çift distile su (moleküler biyolojiye uygun) | Ambion |

4.1.4. cDNA Sentez Reaktifleri

Total RNAdan miRNA ifade seviyesi analizi için miScript II Reverse Transcription kit (Qiagen) üretici talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

Total RNAdan mRNA ifade seviyesi analizi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) üretici talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

4.1.5. MikroRNAom PCR Temelli Profilleme Analizi

"Mouse miRNAome miRNA PCR Array" (Qiagen, MIMM-3216Z) ile miRBase 16.sürümde yer alan bilinen tüm fare miRNA'larının ifade seviyesi Roche Light Cycler 480 platformunda analiz edilmiştir. Tüm miRNAom 3 adet 384 kuyulu plaka üzerinde yer almaktadır.

4.1.6. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Reaktifleri

SYBR Green ROX Fast Mastermix (2x), Qiagen firmasından sağlanmış ve talimatlara göre protokol uygulanmıştır.

4.1.7. Primerler Ve Amplifikasyon Bölgeleri

Primer 3 programı ile tasarlanan ve tez çalışmasında kullanılan primerlerin dizileri, gen kimlikleri ve amplifiye ettikleri fragment uzunlukları çizelge 4.2'de yer almaktadır.

Çizelge 4. 2. Çalışmada kullanılmak üzere tasarlanan primerler.

| Gen sembolü | Gen kimliği | F/R | Primer dizisi | Amplifiye edilen fragment boyu (bp) |
|-------------|-----------------|-----|------------------------|-------------------------------------|
| Srsf3 | Gene ID: 20383 | F | CTGCCGTGTAAGAGTGGAAC | 173 |
| | | R | TAGAAAGTGACCTGCTCCGG | |
| Fam108b | Gene ID: 226016 | F | CTCACCTCAGGAATGCGAGTT | 165 |
| | | R | CTCAAACAATGCGAGGCCAT | |
| Cct4 | Gene ID: 12464 | F | CATGTCTCGACCTGTGCAAC | 226 |
| | | R | CTTCCACCAGCTCACAGTCAT | |
| Twistnb | Gene ID: 28071 | F | ATTCTGCTGGAGTGTTCTGC | 160 |
| | | R | GTTGCAAACCTGGTGGTACTCA | |
| Chrac1 | Gene ID: 93696 | F | AAGCCAAGAAAGCACTGACG | 168 |
| | | R | CGCTTCCATCGTCCTCATTG | |
| Mapk9 | Gene ID: 64406 | F | ATCGGGCTCCAGAAGTCATC | 152 |
| | | R | CATGAACTCTGCGGATGGTG | |

| | | | | |
|---------|--------------------|---|--------------------------|-----|
| Sp5 | Gene ID: 26420 | F | ACAGTACCAGAGCCAGATCG | 176 |
| | | R | GGCACACGTGTTGCTTCTTT | |
| Lipm | Gene ID: 78753 | F | GAAAGCTGCGGATCCAGAAG | 194 |
| | | R | CCCCAAGAAGACCATGTTGC | |
| DNAJa2 | Gene ID: 56445 | F | CAGAAGAAGAGGCGAGGACA | 245 |
| | | R | CATTACAGTCGGAGCACACG | |
| Btc | Gene ID: 12223 | F | CTGTGTGGTAGCAGATGGGA | 214 |
| | | R | GCCTTTCTCACAGATGCAGG | |
| Ep300 | Gene ID: 328572 | F | GCAGCAACCAACAGGAATGA | 178 |
| | | R | GTGCTGAAGAGGAGAGGGTT | |
| Tram111 | Gene ID: 229801 | F | ATCGGAATGGCAATGCACTC | 195 |
| | | R | TTTCTGTGCCTTTTCTCGCC | |
| Herpud1 | Gene ID: 64209 | F | AGCAGCCGGACAACCTCTAAT | 174 |
| | | R | TTGTGTAGCCAGAGAA | |
| Dusp9 | Gene ID: 75590 | F | CCACTACAAGCAGATCCCCA | 209 |
| | | R | CCAAGTCGTAGGCATCGTTG | |
| Sfrs13b | Gene ID: 272009 | F | ACAGGCGGTCTTCTTACAGT | 217 |
| | | R | CCATGTGGTCTGGACTTTGC | |
| Mtdh | Gene ID: 67154 | F | GGCAAGAGGAAAACAGAGCC | 174 |
| | | R | ACGGCTAACATCCCCTGAT | |
| Rbmxrt | Gene ID: 19656 | F | TTCGAAGCAGCAGTGAATG | 198 |
| | | R | GCGGTGCATAATCTCTGGTG | |
| Usp24 | Gene ID: 329908 | F | GCTCCTGACATCAAGTGCTG | 221 |
| | | R | CAAACACCTCTGCCAGTTC | |
| Stk38 | Gene ID: 106504 | F | CGAGACCCCACAAGAGACAT | 205 |
| | | R | CTCCCTGATGTGTTCCCAGT | |
| Hmga2 | Gene ID: 15364 | F | CCACATCAGCCCAGGGAC | 174 |
| | | R | TCTCTGCTTTCTTCTGGGCT | |
| Msr1 | Gene ID: 20288 | F | GAAAAGGGAGACAGAGGGCT | 207 |
| | | R | TCTTGATCCGCCTACACTCC | |
| Gnas | Gene ID: 14683 | F | CCTCCAGTGATGAGTCGGAA | 166 |
| | | R | CGGGTACACTCGGATAGACC | |
| Ppm1d | Gene ID: 53892 | F | CAGTCCTGTGCCAAAATGCT | 249 |
| | | R | TGCATCTTCTTCCGGTGACT | |
| Ssfa2 | Gene ID: 70599 | F | CAACACTGCAAACCGTCTGA | 217 |
| | | R | TTCTGTAACCGTAGCCAGCA | |
| lbp | Gene ID: 16803 | F | TGAGTCTCGCCATCTCTGAC | 244 |
| | | R | TGGAAGAGATTCAGCAGCCA | |
| B-actin | Gene ID: | F | TGAGAGGGAAATCGTGCGTGACAT | 180 |

| | | | | |
|-------|---------------------|---|--------------------------|-----|
| | 6671509 | R | ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATGA | |
| Gapdh | Gene ID: 6679937 | F | AGTATGACTCCACTCACGGC | 159 |
| | | R | CACCAGTAGACTCCACGACA | |

4.1.8. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar çizelge 4.3’de gösterildiği gibidir.

Çizelge 4. 3.Kullanılan cihazlar listesi.

| <i>Cihaz Adı</i> | <i>Markası</i> |
|--------------------------|---|
| -20 °C derin dondurucu | Sanyo Biomedical Freezer, Sanyo Electric G., Ltd. Japan |
| -80 °C derin dondurucu | Sanyo MDF-U6086S, Sanyo Electric G., Ltd. Japan |
| +4 °C kit saklama dolabı | Sanyo Medicoool, Sanyo Electric G., Ltd. Japan |
| Çift distile su cihazı | Millipore Gradient Milli-Q |
| Distile su cihazı | Millipore Elix |
| Elektroforez güç kaynağı | Atto MyPower300 AE-8130 |
| Hassas terazi | Shimadzu Corp. BX320H |
| Jel görüntüleme sistemi | GENE Genius Bio Imaging System |
| Manyetik karıştırıcı | DAIHAN WiseStir (Daihan Scientific) Co, LTD. Korea |
| Nanodrop | NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, ABD) |
| Otoklav | Hirayama Hiclave HVA-110 |
| Santrifüj | Hettich Zentrifungen Micro22 D-78532. Germany |
| Santrifüj | Beckman Coulter Microfuge 18 Centrifuge |
| Termal cyler cihazı | BIO-RAD DNA Engine Peltier |
| Vorteks | LMS (Laboratory Medical Supplies) Harmony Mixer UZUSİO VTX-3000L |
| QRT-PCR Cihazı | LightCyler 480, ROCHE ve Rotor-Gene Q, QIAGEN |

4.2.Yöntem

4.2.1. Total RNA İzolasyonu

RAW 264.7 makrofaj hücre hattında lipotoksik ER stres oluşturulmuş örneklerden Invitrogen-Trizol protokolü ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilir. -80 °C'de saklanan materyalin üzerine 1000 µl Trizol eklenir ve materyal parçalanır. Trizol ile homojenize edilen örneklerin üzerine 200 µl kloroform eklenir, solusyon homojen bir görünüme alana kadar vortexlenir ve oda ısısında 5 dakika bekletilir. Örnekler daha sonra önceden 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 12000 g'de 15 dakika santrifüjlenir. Santrifüj sonrasında tüplerde 3 ayrı faz oluşur. En üstte şeffaf ve RNA'nın bulunduğu temiz faz, ortada beyaz bulutumsu DNA fazı ve en altta, organik fazın görülmesi beklenir. Tüpler fazların karışmaması için hareket ettirilmeden santrifüjden çıkartılır. En üstteki RNA'yı içeren şeffaf faz ortada bulunan faza yaklaşımadan başka bir tüpe aktarılır. Aktarılan RNA'nın üzerine 500 µl izopropanol (2-propanol) ve pellet oluşumunu kolaylaştırmak için 0,5 µl glikojen (20 mg/ml) eklenir ve oda ısısında 10 dakika bekletilip 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 12000 g'de 10 dakika santrifüjlenir. Santrifüjün sonunda tüpün dibinde beyaz bir RNA pelleti görülmesi beklenmektedir. Süpernatant atılır ve pellet 1 ml %70 etanol ile 12000 g'de 5 dakika santrifüj edilir, bu işlem 2 kere tekrarlanır. Yıkanan pellet tüplerin kapakları açık bırakılarak kurutulur ve uygun miktarda yaklaşık 30-50 µl nükleaz içermeyen su ile çözülür.

4.2.2.RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

RNA'nın miktarı ve saflığı spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) ile ölçülür. DNA'nın, 280 nm proteinin, 230 nm de fenolün maksimum absorbanı verdiği dalga boyudur. A260/A280 oranınının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın saf olduğunu gösterir.

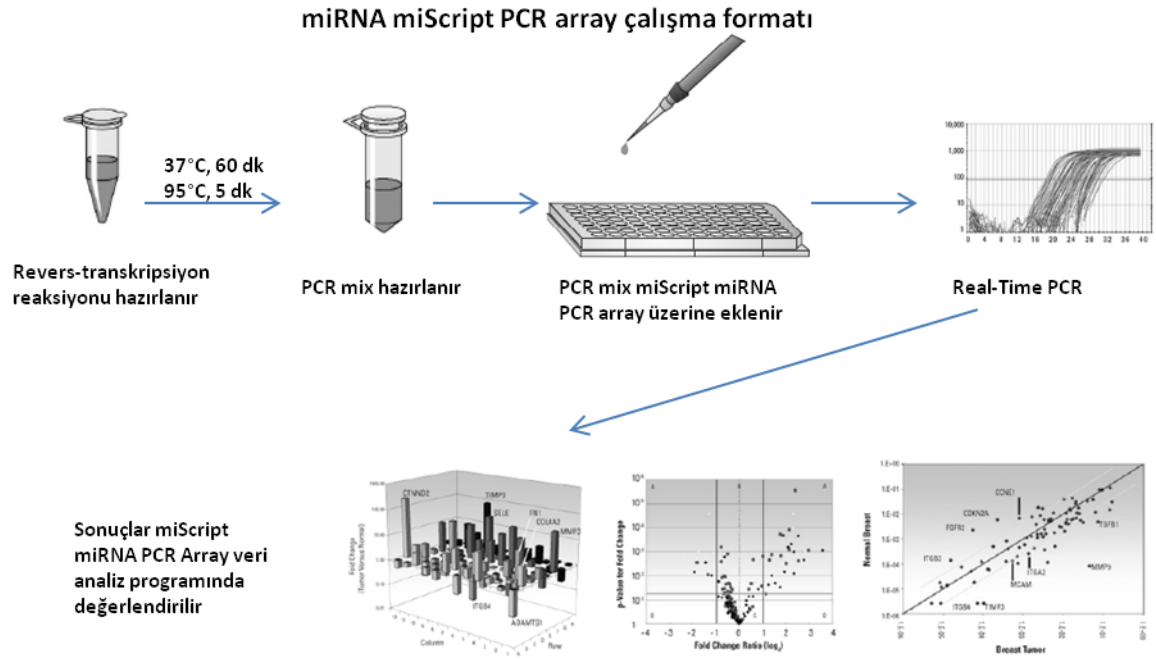
4.2.3.Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen RNAların bütünlüğü ve kalitesi ve ayrıca PCR ürünlerinin bir kısmı yoğunluğu % 0.8-2 arasında değişen agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Hazırlanacak jelin konsantrasyonuna göre gerekli miktarlarda agaroz alınarak, 1xTBE içinde çözülmüştür. Ardından 10mg/ml stok etidyum bromürden 30 ml jel için 1 µl alınarak iyice

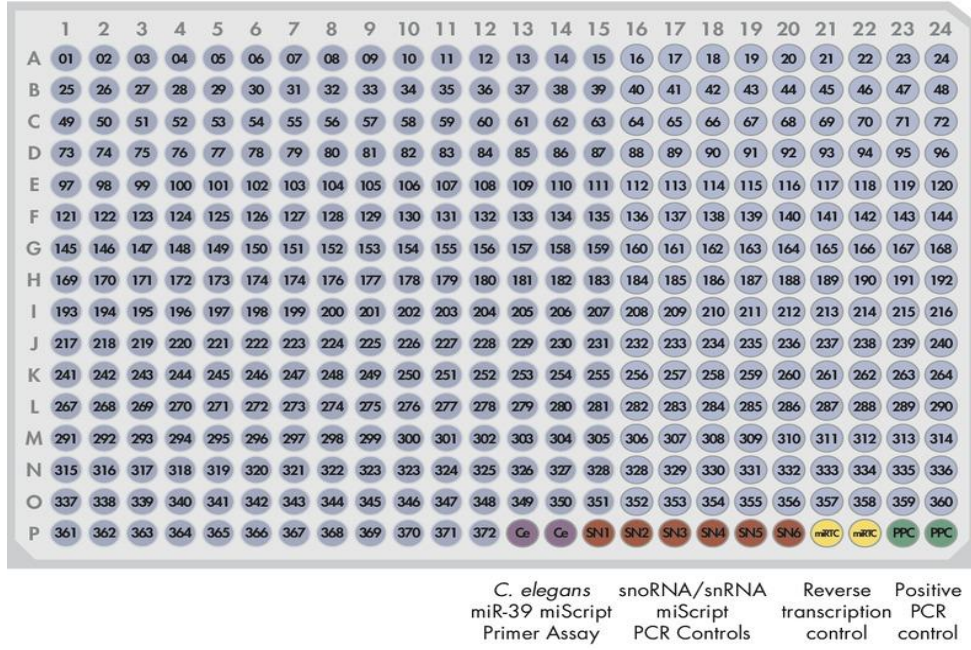
kariştirilmiştir. 2 µl 6x yükleme tamponu, 10µl RNA örneklerinden eklenerek 75V'da 60 dakika yürütülür.

4.2.4. miRNA PCR-Array ile miRNAom Profillerinin Belirlenmesi

Biyolojik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş çalışmada Mouse miRNAome miRNA PCR Array (Qiagen, MIMM-3216Z) kullanılmıştır. miRBase 16. sürümünde yer alan tüm bilinen fare miRNA'larının ifade seviyeleri 384 kuyulu plakalar halinde Roche Light Cycler 480 platformunda analiz edilmiştir. 940 fare miRNAsı 3 plaka üzerinde yer almaktadır. Şekil 4.1'de miRNA miScript PCR array alışma Şeması ve Şekil 4.2'de 384 kuyu formatındaki normalizasyon ve PCR kontrollerinin bulunduğu kuyular görülmektedir.



Şekil 4. 1. miRNA miScript PCR array alışma Şeması



Şekil 4. 2. miRNAom PCR array üzerinde normalizasyon ve diğer kontrollerin yerleşimi

4.2.5. miRNAom Analizi için cDNA Sentezi

Lipit strese bağlı ER stres oluşturan palmitat ile muamele edilmiş RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattından elde edilen RNA'lerden miScript II RT Kit kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. miRNAom çalışması için gerekli olan bu cDNA hazırlanırken, miScript HiSpec Buffer kullanılmıştır. cDNA sentezi sırasında miScript Primer assay ile eş zamanlı PCR için ileri primer kalıpları oluşturulur. miScript SYBR Green PCR kit içerisinde bulunan miScript evrensel primer de geri primer olarak eş zamanlı PCR'da fonksiyon göstererek olgun miRNAların nicel olarak tespitini sağlar.

cDNA sentezi için örneklerin RNA konsantrasyonu eşitlenir, 20 µl cDNA reaksiyonu için 500 ng RNA başlangıç materyali olarak kullanılır. Çizelge 4.4'de reaksiyon bileşenleri yer almaktadır.

Çizelge 4. 4. miRNA PCR Array ters transkripsiyon reaksiyonu

| <i>Bileşen</i> | <i>Miktar</i> |
|-------------------------------------|---------------|
| 5x miScript Hispec Tampon | 4 µl |
| 10x miScript Nucleics Karışımı | 2 µl |
| RNAsız su | Değişken |
| miScript Ters Transkriptaz Karışımı | 2 µl |
| Kalıp RNA (500 ng) | Değişken |
| Toplam Hacim | 20 µl |

Örnekler 60 dakika 37°C, 5 dakika 95°C (enzim inaktivasyonu)'de termal döngü cihazında inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilir. Cihazdan alınan örnek tüpleri daha sonra QRT-PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırılır.

4.2.6.miScript miRNA PCR Array

Bir önceki basamakta sentezlenen 20 µl cDNA üzerine, 310 µl su eklenir, her biri 110 µl'lik 3 tüpe ayrılarak reaksiyon kuruluncaya kadar kaldırılır. miRNAom PCR array iki biyolojik tekrar halinde çalışılmıştır. Biyolojik tekrarlara ait isimlendirme çizelge 4.5'te yer almaktadır. Kit talimatları doğrultusunda PCR reaksiyonu hazırlanır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4. 5.Çalışmada kullanılan örnekler ve kısaltmaları

| <i>Biyolojik örnek</i> | <i>Kısaltması</i> | <i>Açıklama</i> |
|--------------------------|-------------------|-------------------------|
| Raw 264.7 (1) | RA1, | Kontrol Örneği, deney 1 |
| Raw 264.7 + Palmitat (1) | RA+PA1 | Test Örneği, deney 1 |
| Raw 264.7 (2) | RA2 | Kontrol Örneği, deney 2 |
| Raw 264.7 + Palmitat (2) | RA+PA2 | Test Örneği, deney 2 |

Çizelge 4. 6.miScript miRNA PCR Array QRT-PCR Reaksiyonu.

| <i>Bileşen</i> | <i>Miktar</i> |
|----------------|---------------|
|----------------|---------------|

| | |
|--|---------|
| 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Karışımı | 2050 µl |
| 10x miScript Evrensel Primer | 410 µl |
| RNasız su | 1540 µl |
| Kalıp cDNA | 100 µl |
| Toplam Hacim | 4100 µl |

Karışım hazırlandıktan sonra miScript plakası ambalajından çıkarılır ve yükleme rezervuarına transfer edilen reaksiyon karışımından her kuyuya çok kanallı pipet yardımı ile 10 µl eklenir. Optik yapışkan film ile plakanın üstü kapatılır. Örneklerin yüklendiği 384'lük PCR plakası 1 dakika 1000 g'de oda sıcaklığında santrifüj edilir. Plaka, LightCycler®480 Real-Time PCR System (Roche) cihazına yerleştirilir. Reaksiyon koşulları çizelge 4.7'de gösterilmektedir.

Çizelge 4. 7.Light Cycler 480 platformunda gerçekleştirilen QRT-PCR reaksiyon koşulları

| | | | | |
|-----------|---------------------------|-----|------|-------------------------|
| | PCR başlangıç aktivasyonu | 15' | 95°C | |
| 45 siklus | Deaturasyon | 15" | 94°C | Ramp hızı 1°C/saniye |
| | Annealing | 30" | 55°C | |
| | Uzama | 30" | 72°C | |

QRT-PCR bitiminde elde edilen sonuçlar, miScript miRNA PCR Array Veri Analiz Platformu kullanılarak analiz edilmiştir.

4.2.7.miRNAom Veri Analizi

Sonuçlar miScript miRNA PCR Array Data Analysis web yazılımında analiz edilmiştir. (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>). Bu yazılım real-time PCR datasının analizi için geliştirilmiştir. Threshold cycle değerleri (CT) yüklendikten sonra, yazılım otomatik olarak relatif kantifikasyonu ve kaç kat değişim olduğunu $\Delta\Delta CT$ metodu ile hesaplar ve farklı formatlarda sonuçları gösterir.

4.2.8. İfadesi Değişen miRNAların Hedeflerinin *in silico* Analizi

miRNAome veri analizi sonucu ifadesi değişen aday mikroRNAların hedeflerini tanımlamak üzere microRNA.org web yazılımı kullanılmıştır. Her bir miRNAnın hedef gene hangi kısmından bağlandığı, miRSVR skoru, eşleniklik derecesi ve aynı mRNAyı hedef alan diğer miRNAlar belirlenir. Tespit edilen hedeflerin GeneCodis 3.0 web tabanlı analiz programı ile yolak analizi gerçekleştirilmiştir. GeneCodis programı, analiz sonrası, ilişkilendirilen genlerin kaç tanesinin hangi biyolojik süreçte etkili olduğunu farklı formatlardaki grafiklerle sunabilmektedir.

4.2.9. Primer Tasarımı

Seçilen miRNAların hedef mRNAlarına yönelik primerler, Primer3 programı kullanılarak tasarlanmıştır. Gen bölgelerine spesifik primer bölgelerinin özgünlüğü, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> kullanılarak sağlanmıştır. Primer tasarlanırken kullanılacak olan primerlerin; saç tokası yapısı oluşturmamasına, ürünün büyüklüğüne, tekrar bazların olmamasına ve Tm değeri dikkate alınmalıdır. Şekil 4.3'te tüm bu parametrelerin görüldüğü Primer3 arayüzü görülmektedir.

4.2.10. Hedef mRNA Seviyesi Analizi İçin cDNA Sentezi

Tez çalışmasında kullanılan RNA örneklerinden ters transkripsiyon, "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Prensipte olarak, miRNAların uçlarına poliA polimeraz enzimi aracılığı ile poliadenil eklenir ve oligo-dT primerleri kullanılarak ters transkripsiyon ile cDNA sentezi gerçekleştirilir. Poliadenilasyon ve ters transkripsiyon bir tüpte paralel olarak gerçekleşir.

cDNA sentezi için örneklerin RNA konsantrasyonu eşitlenir. Reaksiyon buz üzerinde kurulur. Her örnek için;

500 ng total RNA

1 µl oligo (dT) primer (50 pmol/ml)

4 µl transkriptor geri transkriptaz tampon,5x

0.5 µl RNase inhibitor, 40U/ µl

2 µl deoksiribonükleotid karışımı; (herbiri 10 mM)

0.5 µl geri transkriptaz 20U/ µl

su ile reaksiyon 20 µl'ye tamamlanır ve karışım pipetle karıştırılır.

Örnekler 25°C 10', 55°C 30', 85°C 5' termal döngü cihazında inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilir. Cihazdan alınan tüpler ya -20°C'da saklanır ya da QRT-PCR için kullanılır. 20 µl cDNA üzerine 80 µl su eklenerek cDNA sulandırılarak PCRda kullanılır.

4.2.11. Kantitatif Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Eş zamanlı PCR sırasında, hedef transkriptte özgü primerlerin cDNA üzerinde uygun bölgeye bağlanmasıyla ampikonun logaritmik artışının görülebildiği bir amplifikasyon eğrisi oluşur. Amplifikasyonun gerçekleşmesine paralel olarak, çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green floresan boyası ışığa verir. Verdiği ışımın miktarı, örnekteki spesifik transkriptin ifade seviyesini gösterir. Floresan ışımaların eşik değerini geçtiği

döngü sayısı Ct (Cycle threshold) veya Cp (Crossing point) olarak isimlendirilir. Transkript ifadesi ne kadar çok ise, eşik değerine o denli hızlı ulaşır ve Cp değeri küçük olan örneğin ifadesi fazladır.

Qiagen RotorGene-Q cihazında Qiagen kit talimatları doğrultusunda PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bütün reaksiyonlarda her bir mRNA için negatif kontrol olarak cDNA içermeyen bir PCR reaksiyonu hazırlanmıştır.

-Primerler DNaz ve RNaz içermeyen su içinde çözülür.

-Tüm reaktiflerin buz üzerinde erimesi sağlanır. Reaksiyon hazırlığı sırasında hiç bir tampon ya da enzim vortekslenmez.

-Kullanılan primerlerin tek bir ürün verdiği için çoğalma reaksiyonunun sonuna bir erime reaksiyonu eklenir ve oluşan PCR ürünleri ısıtılarak çift zincirli DNA yapısı bozulur. Çift zincirli DNA'ya bağlı SYBR Green boyası aracılığıyla erime eğrisi oluşur.

-72 reaksiyon tüpü içeren rotorda her tüpte 10 µl olacak şekilde teknik tekrarları ile birlikte reaksiyonlar kurulur. QRT-PCR reaksiyonu reaktif miktarları ise Çizelge 4.8.'de belirtilmiştir.

Çizelge 4. 8. QRT-PCR reaksiyonu reaktif miktarları

| <i>Reaktif</i> | <i>Miktarı (µl)</i> |
|--|---------------------|
| SYBR Green ROX Fast Master PCR master karışımı | 12.5 µl |
| 10 pmol F+R Primer | 1µ |
| cDNA (6,25 ng/µl) | 5µl |
| H ₂ O | 6.5 µl |

Çizelge 4. 9. RotorGene-Q platformunda gerçekleştirilen QRT-PCR reaksiyon koşulları.

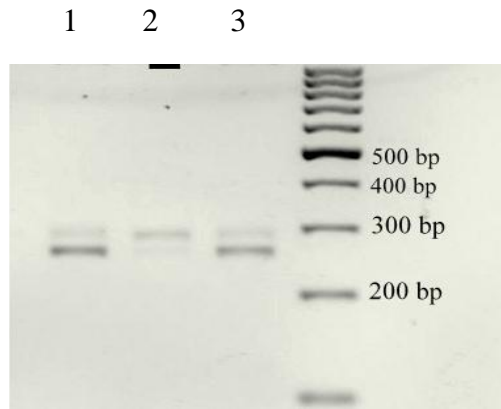
| | | | | |
|-----------|---------------------------|-----|------|-------------------------|
| | PCR başlangıç aktivasyonu | 10' | 95°C | |
| 40 siklus | Deaturasyon | 10" | 95°C | Ramp hızı 1°C/saniye |
| | Annealing | 30" | 60°C | |
| | Uzama | 30" | 72°C | |

-Deney protokolünün sonlanmasının ardından sonuçlar, cihazın yazılımında bulunan programlar doğrultusunda analiz edilir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Makrofaj hücre hattına palmitat uygulaması ve hücrelerden total RNA Eldesi

Tez çalışması kapsamında RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri 6 saat süre ile 1 μ M sodyum palmitat ile muamele edilerek lipotoksik ER stres oluşturulmuştur. IRE1 bağımlı ER stres gerçekleştiğinden emin olmak amacı ile hücrelerden elde edilen RNAdan QRT-PCR yapılarak Xbp1 mRNA'sının kırıldığı kontrol edilmiştir. Şekil 5.1deki PCR sonuçlarına göre positif kontrol olarak kullanılan tapsigargin ve palmitat örneklerinde Xbp1 mRNA'sının kırıldığı, dolayısı ile KPY aktivasyonu olduğu görülmektedir. Xbp1 normalde 283 bp bant verirken kırıldığında 257 bp bant vermektedir. Tapsigargin 300 nM konsantrasyonda kullanılmıştır. Buraya kadar olan kısım Dr Ebru Erbay'ın ekibince gerçekleştirilmiştir.

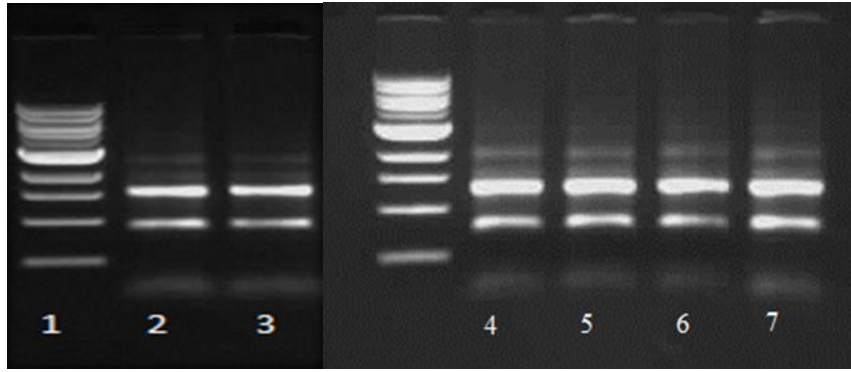


Şekil 5. 1. Xbp-1 kırılma testi. 1) RAW+ Tapsigargin, 2) RAW, 3) RAW+Palmitat

Lipotoksik ER stres oluşturulan örneklerinin izolasyonu Trizol protoküne göre gerçekleştirilmiş ve Nanodrop ile konsantrasyon ve saflıkları analiz edilmiştir (Çizelge 5.1). Ayrıca RNAların bütünlüğü %0.8 agaroz jel elektroforezi ile de kontrol edilmiştir (Şekil 5.2). Hem miRNAom hem de hedef transkript çalışmaları için örnekler çalışılabilir kalitede ve konsantrasyonda elde edilmiştir.

Çizelge 5. 1. RNA örneklerinin konsantrasyonları

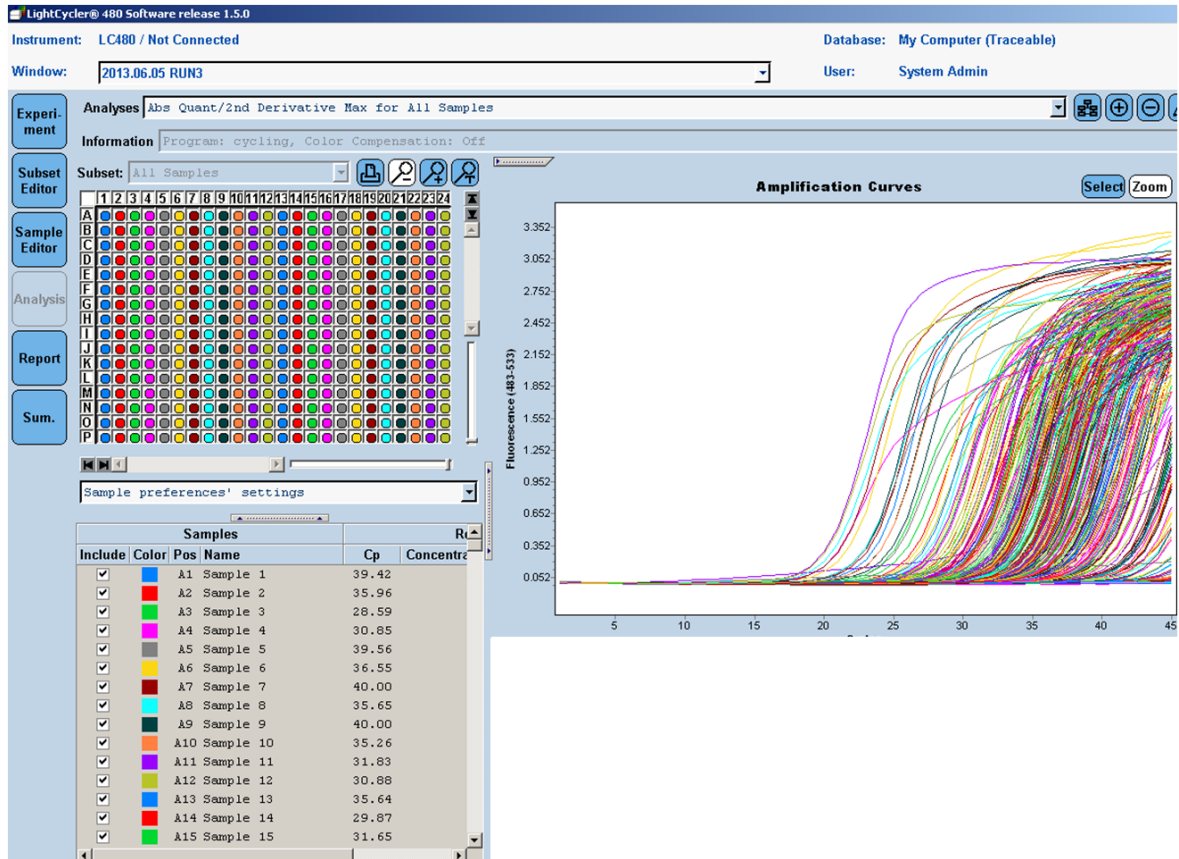
| <i>Biyolojik örnek</i> | <i>Kısaltması</i> | <i>Elde edilen RNA miktarı</i> |
|--------------------------|-------------------|--------------------------------|
| Raw 264.7 (1) | RA1 | 583,2 ng/μl |
| Raw 264.7 + Palmitat (1) | RA+PA1 | 502,2 ng/μl |
| Raw 264.7 (2) | RA2 | 722 ng/μl |
| Raw 264.7 + Palmitat (2) | RA+PA2 | 660 ng/μl |
| Raw 264.7 (3) | RA3 | 632 ng/μl |
| Raw 264.7 + Palmitat (3) | RA+PA3 | 777 ng/μl |



Şekil 5. 2. RNA örneklerinin AGE görüntüsü

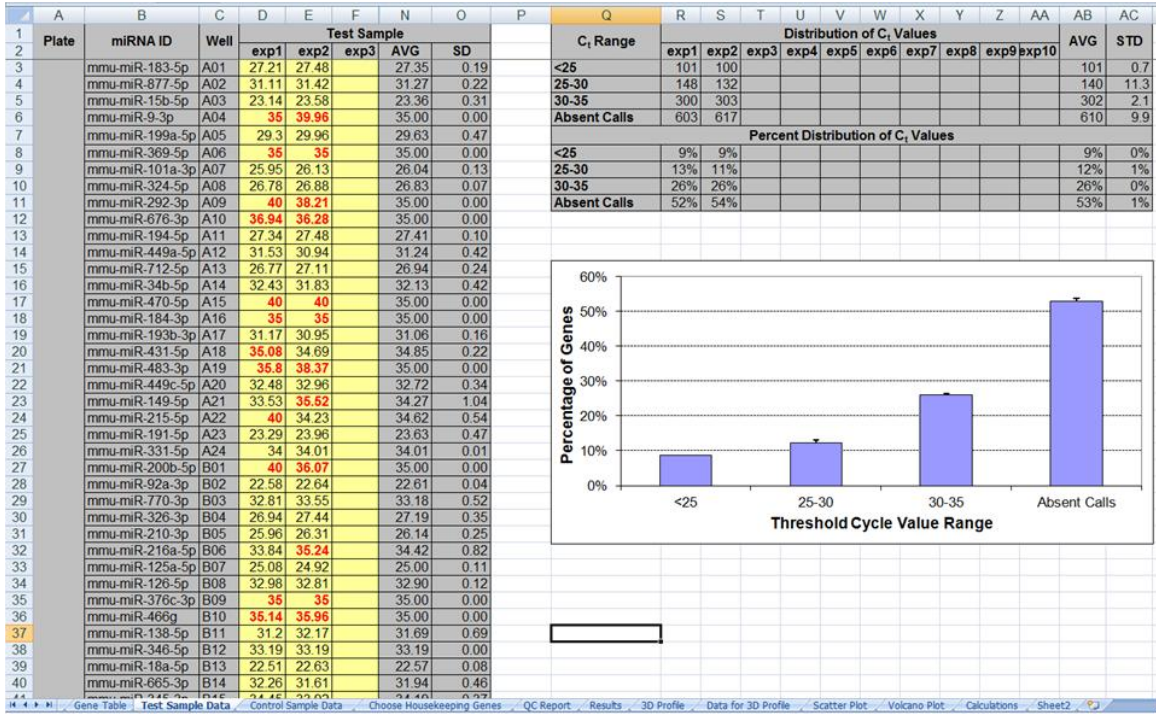
5.2. miRNA PCR-Array İle miRNAom Profillendirilmesi

Biyolojik sistemlerde ve özellikle hücre kültürü deneylerinde tekrarlanabilirlik çok önemlidir. Palmitat ile lipotoksik ER stres oluşturulmuş fare makrofaj hattında ifadesi değişen miRNAları tanımlamak amacıyla iki biyolojik tekrarlı miRNAom taraması gerçekleştirilmiştir. Mouse miRNAome miRNA PCR Array (Qiagen, MIMM-3216Z) sistemi ile miRBase 16.sürümde yer alan tüm bilinen fare miRNA'larının ifade seviyesi 384 kuyulu plakada Roche Light Cycler 480 platformunda profillendirilmiştir. Yaklaşık 940 fare miRNAsı 3 adet 384 kuyulu plaka üzerinde yer almaktadır. Ek 1'de miRNA ve kontrol primerlerinin plakalar üzerindeki yerleşime ait liste yer almaktadır. Bu tezdeki miRNAom çalışması için toplam 12 run gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki PCR reaksiyonlarından bir örnek Şekil 5.3 'de yer almaktadır. Tüm sonuçlar "miScript miRNA PCR Array Data Analysis" web yazılımında analiz edilmiştir.

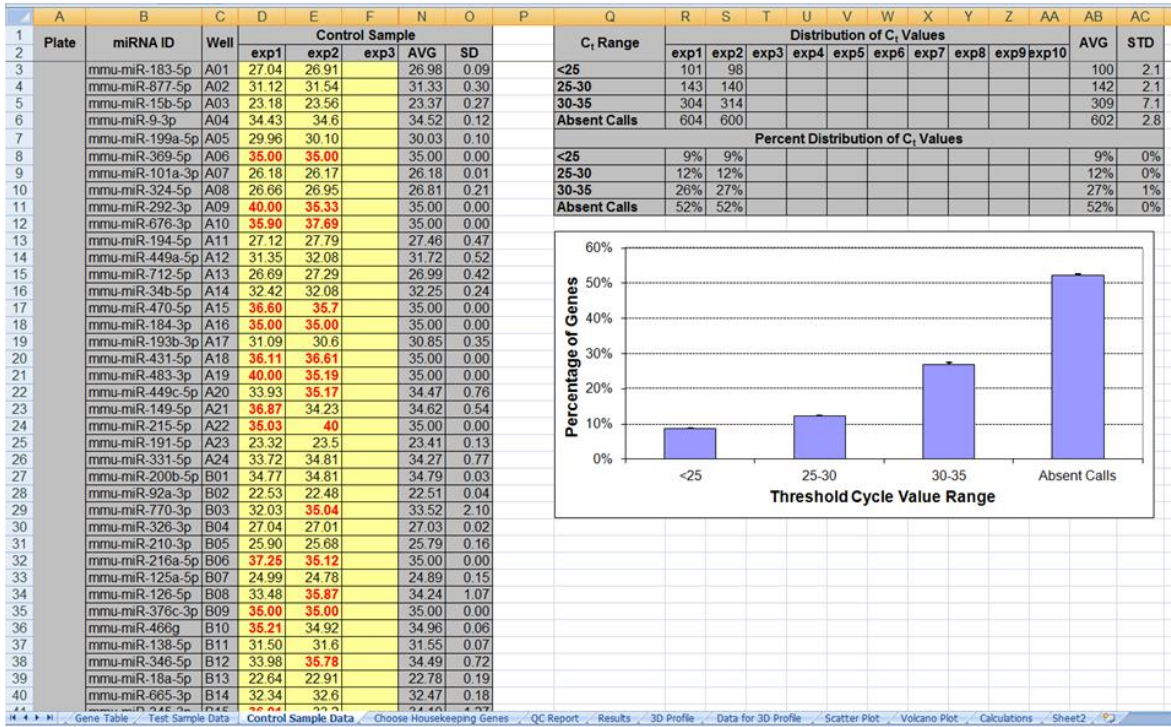


Şekil 5. 3.Çalışmadaki eş zamanlı PCR reaksiyonlarından bir örnek

İki biyolojik tekrarlı veriler yazılımda birleştirilerek analiz edilmiştir. Analiz dosyasında kontrol örnek verileri (RAW) incelendiğinde her bir deneyden gelen CT değerleri görülür (Şekil 5.4.A). Buna göre bu grupta miRNAomun %50'sinin ifade edildiği, bunların yaklaşık %10'unun 25 siklustan önce amplifiye olduğu görülmektedir. Benzer olarak şekil 5.4.Bde de RAW+PA verileri kısmi olarak yer almaktadır. Şekil 5.5'de çalışmada her 384 kuyulu plakada bulunan normalizasyon genlerinin CT değerleri gösterilmektedir. Bu üç şekil detaylı incelendiğinde iki biyolojik tekrar arasındaki tutarlılık daha net olarak gözle çarpılmaktadır. Bu sebeple çalışma duplike olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5. 4. (A) Kontrol Örnekleri kısmi listesi



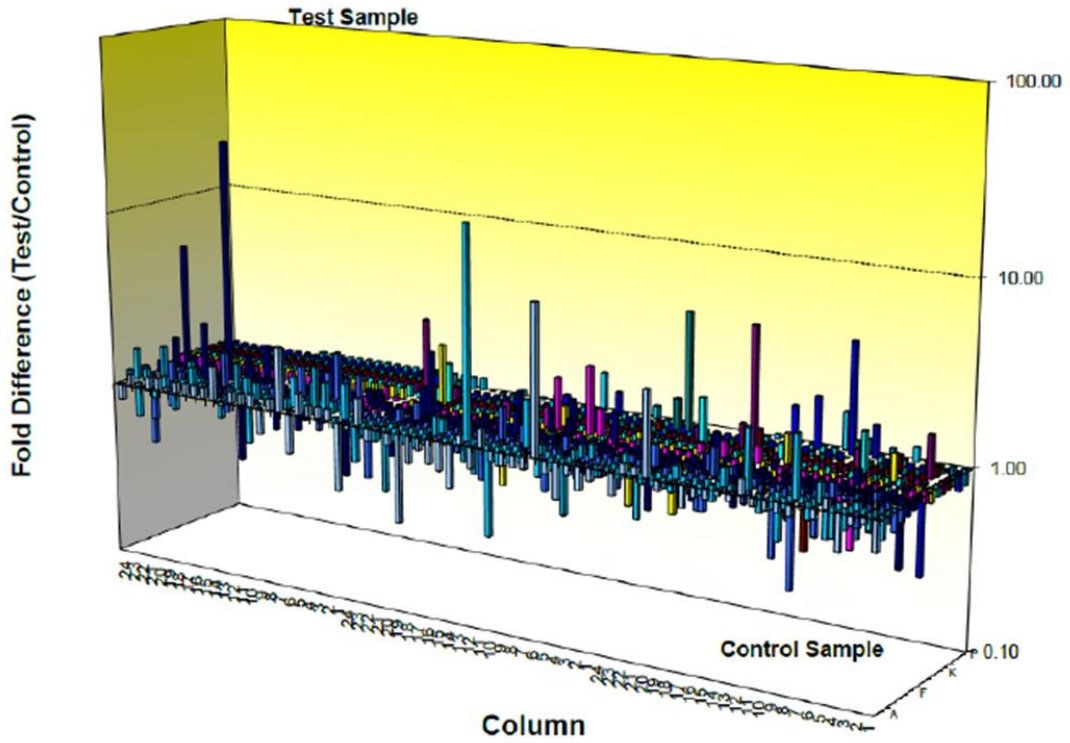
| | A | B | C | D | E | F | N | O | P | Q | R |
|----|---------|--------------------------|------|-------------|------|------|--------------------------|------|----------------|------|------|
| 1 | Plate | Housekeeping Gene Symbol | Well | Test Sample | | | Housekeeping Gene Symbol | Well | Control Sample | | |
| 2 | | | | exp1 | exp2 | exp3 | | | exp1 | exp2 | exp3 |
| 3 | Plate 1 | SNORD61 | P15 | 23.9 | 24.1 | | SNORD61 | P15 | 24.0 | 24.5 | |
| 4 | | SNORD68 | P16 | 19.9 | 19.9 | | SNORD68 | P16 | 19.9 | 20.3 | |
| 5 | | SNORD72 | P17 | 21.9 | 22.0 | | SNORD72 | P17 | 21.9 | 22.5 | |
| 6 | | SNORD95 | P18 | 21.3 | 21.2 | | SNORD95 | P18 | 21.2 | 21.6 | |
| 7 | | SNORD96A | P19 | 20.6 | 20.7 | | SNORD96A | P19 | 20.6 | 21.0 | |
| 8 | | RNU6-2 | P20 | 19.9 | 20.1 | | RNU6-2 | P20 | 20.0 | 20.5 | |
| 23 | | AVERAGE | | | 21.2 | 21.3 | AVERAGE | | | 21.3 | 21.7 |
| 24 | Plate 2 | SNORD61 | P15 | 24.0 | 24.0 | | SNORD61 | P15 | 24.1 | 24.5 | |
| 25 | | SNORD68 | P16 | 19.9 | 19.9 | | SNORD68 | P16 | 19.8 | 20.4 | |
| 26 | | SNORD72 | P17 | 21.9 | 22.0 | | SNORD72 | P17 | 22.1 | 22.6 | |
| 27 | | SNORD95 | P18 | 21.2 | 21.2 | | SNORD95 | P18 | 21.3 | 21.6 | |
| 28 | | SNORD96A | P19 | 20.5 | 20.8 | | SNORD96A | P19 | 20.7 | 21.0 | |
| 29 | | RNU6-2 | P20 | 19.8 | 20.1 | | RNU6-2 | P20 | 20.1 | 20.3 | |
| 44 | | AVERAGE | | | 21.2 | 21.3 | AVERAGE | | | 21.3 | 21.7 |
| 45 | Plate 3 | SNORD61 | P15 | 23.8 | 24.8 | | SNORD61 | P15 | 23.9 | 24.6 | |
| 46 | | SNORD68 | P16 | 19.7 | 20.6 | | SNORD68 | P16 | 19.7 | 20.3 | |
| 47 | | SNORD72 | P17 | 21.9 | 22.9 | | SNORD72 | P17 | 21.8 | 22.6 | |
| 48 | | SNORD95 | P18 | 21.2 | 21.9 | | SNORD95 | P18 | 21.0 | 21.6 | |
| 49 | | SNORD96A | P19 | 20.5 | 21.6 | | SNORD96A | P19 | 20.6 | 21.0 | |
| 50 | | RNU6-2 | P20 | 19.6 | 20.7 | | RNU6-2 | P20 | 19.7 | 19.9 | |
| 65 | | AVERAGE | | | 21.1 | 22.1 | AVERAGE | | | 21.1 | 21.7 |

Şekil 5. 5.Tüm çalışmada yer alan 12 adet plakadaki internal kontrol genlerinin Ct değerleri

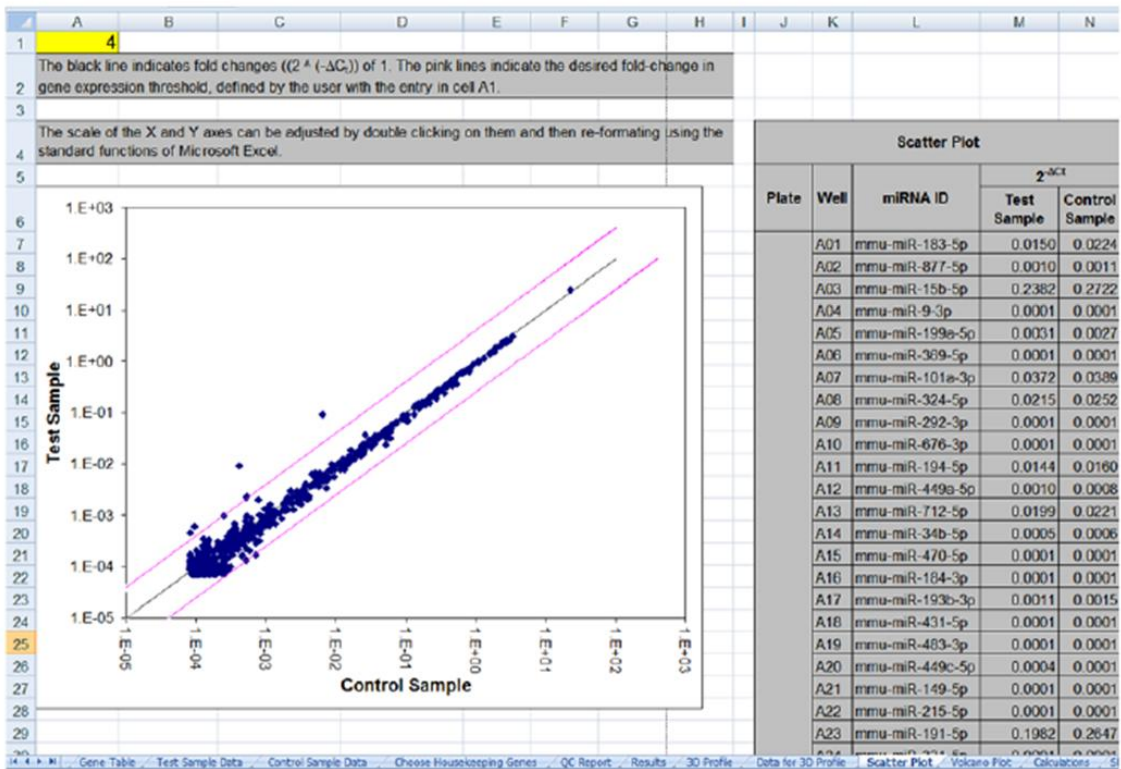
Analiz dosyasının results sekmesi seçildiğinde ise test/kontrol örneklerindeki artış azalış $\Delta\Delta CT$ metodu ile hesaplanmış olarak görülmektedir. Şekil 5.6'da kısmi liste yer almaktadır. Program otomatik olarak anlamlı artış azalan gösteren (>2 kat) sonuçları renkli olarak göstermektedir. Şekil 5.7'de tüm çalışma verisinin 3 boyutlu profili, şekil 5.8'de ise scatter plot görüntüsü yer almaktadır.

| 1 | Plate | miRNA ID | Well | AVG ΔC_t (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG)) | | $2^{\Delta\Delta C_t}$ | | Fold Difference | T-TEST | Fold Up- or Down- Regulation | Comments |
|----|-------|-----------------|------|---|-------------------|------------------------|-------------------|--------------------------------|---------|------------------------------------|----------|
| 2 | | | | Test Sample | Control Sample | Test Sample | Control Sample | Test Sample /Control Sample | p value | Test Sample /Control Sample | |
| 3 | | mmu-miR-183-5p | A01 | 6.06 | 5.48 | 1.5E-02 | 2.2E-02 | 0.67 | N/A | -1.49 | OKAY |
| 4 | | mmu-miR-877-5p | A02 | 9.98 | 9.84 | 9.9E-04 | 1.1E-03 | 0.91 | N/A | -1.10 | B |
| 5 | | mmu-miR-15b-5p | A03 | 2.07 | 1.88 | 2.4E-01 | 2.7E-01 | 0.88 | N/A | -1.14 | OKAY |
| 6 | | mmu-miR-9-3p | A04 | 13.71 | 13.02 | 7.5E-05 | 1.2E-04 | 0.62 | N/A | -1.61 | B |
| 7 | | mmu-miR-199a-5p | A05 | 8.34 | 8.54 | 3.1E-03 | 2.7E-03 | 1.15 | N/A | 1.15 | A |
| 8 | | mmu-miR-369-5p | A06 | 13.71 | 13.51 | 7.5E-05 | 8.6E-05 | 0.87 | N/A | -1.15 | C |
| 9 | | mmu-miR-101a-3p | A07 | 4.75 | 4.68 | 3.7E-02 | 3.9E-02 | 0.95 | N/A | -1.05 | OKAY |
| 10 | | mmu-miR-324-5p | A08 | 5.54 | 5.31 | 2.1E-02 | 2.5E-02 | 0.85 | N/A | -1.17 | OKAY |
| 11 | | mmu-miR-292-3p | A09 | 13.71 | 13.51 | 7.5E-05 | 8.6E-05 | 0.87 | N/A | -1.15 | C |
| 12 | | mmu-miR-676-3p | A10 | 13.71 | 13.51 | 7.5E-05 | 8.6E-05 | 0.87 | N/A | -1.15 | C |
| 13 | | mmu-miR-194-5p | A11 | 6.12 | 5.96 | 1.4E-02 | 1.6E-02 | 0.90 | N/A | -1.12 | OKAY |
| 14 | | mmu-miR-449a-5p | A12 | 9.95 | 10.22 | 1.0E-03 | 8.4E-04 | 1.21 | N/A | 1.21 | B |
| 15 | | mmu-miR-712-5p | A13 | 5.65 | 5.50 | 2.0E-02 | 2.2E-02 | 0.90 | N/A | -1.11 | OKAY |
| 16 | | mmu-miR-34b-5p | A14 | 10.84 | 10.76 | 5.5E-04 | 5.8E-04 | 0.94 | N/A | -1.06 | B |
| 17 | | mmu-miR-470-5p | A15 | 13.71 | 13.51 | 7.5E-05 | 8.6E-05 | 0.87 | N/A | -1.15 | C |
| 18 | | mmu-miR-184-3p | A16 | 13.71 | 13.51 | 7.5E-05 | 8.6E-05 | 0.87 | N/A | -1.15 | C |
| 19 | | mmu-miR-193b-3p | A17 | 9.77 | 9.35 | 1.1E-03 | 1.5E-03 | 0.75 | N/A | -1.34 | B |
| 20 | | mmu-miR-431-5p | A18 | 13.56 | 13.51 | 8.3E-05 | 8.6E-05 | 0.97 | N/A | -1.03 | B |
| 21 | | mmu-miR-483-3p | A19 | 13.71 | 13.51 | 7.5E-05 | 8.6E-05 | 0.87 | N/A | -1.15 | C |
| 22 | | mmu-miR-449c-5p | A20 | 11.43 | 12.97 | 3.6E-04 | 1.2E-04 | 2.91 | N/A | 2.91 | B |
| 23 | | mmu-miR-149-5p | A21 | 12.98 | 13.12 | 1.2E-04 | 1.1E-04 | 1.11 | N/A | 1.11 | B |
| 24 | | mmu-miR-215-5p | A22 | 13.33 | 13.51 | 9.7E-05 | 8.6E-05 | 1.13 | N/A | 1.13 | B |
| 25 | | mmu-miR-191-5p | A23 | 2.34 | 1.92 | 2.0E-01 | 2.6E-01 | 0.75 | N/A | -1.34 | OKAY |
| 26 | | mmu-miR-331-5p | A24 | 12.72 | 12.77 | 1.5E-04 | 1.4E-04 | 1.04 | N/A | 1.04 | B |
| 27 | | mmu-miR-200b-5p | B01 | 13.71 | 13.30 | 7.5E-05 | 9.9E-05 | 0.75 | N/A | -1.33 | B |
| 28 | | mmu-miR-92a-3p | B02 | 1.32 | 1.01 | 4.0E-01 | 5.0E-01 | 0.81 | N/A | -1.24 | OKAY |
| 29 | | mmu-miR-770-3p | B03 | 11.89 | 12.02 | 2.6E-04 | 2.4E-04 | 1.10 | N/A | 1.10 | B |
| 30 | | mmu-miR-326-3p | B04 | 5.90 | 5.53 | 1.7E-02 | 2.2E-02 | 0.78 | N/A | -1.29 | OKAY |
| 31 | | mmu-miR-210-3p | B05 | 4.85 | 4.30 | 3.5E-02 | 5.1E-02 | 0.68 | N/A | -1.46 | OKAY |
| 32 | | mmu-miR-216a-5p | B06 | 13.13 | 13.51 | 1.1E-04 | 8.6E-05 | 1.30 | N/A | 1.30 | B |
| 33 | | mmu-miR-125a-5p | B07 | 3.71 | 3.39 | 7.6E-02 | 9.5E-02 | 0.80 | N/A | -1.25 | OKAY |
| 34 | | mmu-miR-126-5p | B08 | 11.61 | 12.75 | 3.2E-04 | 1.5E-04 | 2.21 | N/A | 2.21 | B |
| 35 | | mmu-miR-376c-3p | B09 | 13.71 | 13.51 | 7.5E-05 | 8.6E-05 | 0.87 | N/A | -1.15 | C |
| 36 | | mmu-miR-466g | B10 | 13.71 | 13.47 | 7.5E-05 | 8.8E-05 | 0.85 | N/A | -1.18 | B |
| 37 | | mmu-miR-138-5p | B11 | 10.40 | 10.06 | 7.4E-04 | 9.4E-04 | 0.79 | N/A | -1.26 | B |
| 38 | | mmu-miR-346-5p | B12 | 11.90 | 13.00 | 2.6E-04 | 1.2E-04 | 2.14 | N/A | 2.14 | B |
| 39 | | mmu-miR-18a-5p | B13 | 1.28 | 1.28 | 4.1E-01 | 4.1E-01 | 1.00 | N/A | 1.00 | OKAY |
| 40 | | mmu-miR-665-3p | B14 | 10.65 | 10.98 | 6.2E-04 | 5.0E-04 | 1.26 | N/A | 1.26 | B |
| 41 | | mmu-miR-345-3p | B15 | 12.90 | 12.61 | 1.3E-04 | 1.6E-04 | 0.82 | N/A | -1.22 | B |
| 42 | | mmu-miR-290-5p | B16 | 13.71 | 13.51 | 7.5E-05 | 8.6E-05 | 0.87 | N/A | -1.15 | C |
| 43 | | mmu-let-7f-5p | B17 | 0.73 | 0.69 | 6.0E-01 | 6.2E-01 | 0.97 | N/A | -1.03 | OKAY |
| 44 | | mmu-miR-134-5p | B18 | 13.27 | 13.51 | 1.0E-04 | 8.6E-05 | 1.18 | N/A | 1.18 | B |

Şekil 5. 6.miRNAom veri analizinin kısmi listesi



Şekil 5. 7. Tüm miRNAom çalışması sonucu ifadesi değişen miRNAların 3 boyutlu grafik ile gösterimi



Şekil 5. 8. miRNAom verilerinin scatter plot görüntüsü

Lipotoksik endoplazmik retikulum stres sonucu ifadesi 2 kat ve üzeri değişiklik gösteren mikroRNAlar çizelge 5.2'de yer almaktadır. miRBase 20. sürümde (Haziran 2013) *Mus musculus*'a ait 1186 öncül (precursor) ve 1908 olgun miRNA tanımlanmışken çalışmada kullanılan miRNA PCR array üzerinde, miRBase 18.sürüm kapsamındaki 900 kadar olgun miRNA yer almaktadır. Öte yandan bu miRNAların regüle ettikleri mRNA hedeflerini belirlemek için kullandığımız microRNA.org sitesindeki veri ise Ağustos 2010'dan bu yana güncellenmediği için bir kısım miRNA'nın hedef gen listelerine ulaşamadığından yolak analizi yapılamamıştır. Ulaşılan bir kısım hedef listeleri de miRNA'nın -3p veya -5p hedeflerinin toplamını içermektedir. Bu yüzden hedef seçerken pek çok kriter gözönüne alınmıştır. Benzer şekilde 8 adet miRNA hedef tahmin eden programını kullanarak oluşturulan miRWalk veritabanı da Mart 2011'den bu yana güncellenmemiştir.

Çizelge 5.2'de özetlendiği üzere çalışma sonucu fare miRNAomundaki 940 miRNA'nın 43 adetinin ifadesi lipotoksik ER stres sonucu 2 kat ve üzeri artmış/azalmıştır. + değerler ifadesi artan, - değerler ifadesi azalan miRNAlardır. Başlangıçta ileri analizler için çoğunlukla 3 kat ve üzeri artış/azalış gösteren miRNAlar incelenmek istenmiş ancak hepsinin hedef genleri microRNA.org son sürümde yer almadığı için hedef genlere ulaşılabilen tüm miRNAlar için yolak analizi gerçekleştirilmiştir. Tabloda hangileri ile yolak analizi veya hedef mRNA'lara yönelik çalışmaların yapıldığı bilgisi mevcuttur. Hedef genlerine ulaşılabilen 9 adetinin yolak analizi gerçekleştirilmiş ve yine 5 tanesinin de seçilen hedeflerinin transkript seviyeleri QRT-PCR ile analiz edilmiştir.

Çizelge 5. 2. Lipotoksik ER stres sonucu ifadesi değişen 43 miRNA

| miRNA | Test/kontrol kat değişim (RA+PA/RA) | Yolak analizi veya hedef mRNA analizi | QRT-PCR ile hedef mRNA ifade seviyesi analizi |
|-----------------|--|---|---|
| mmu-miR-449a-5p | 2,91 | √ | |
| mmu-miR-126-5p | 2,21 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-346-5p | 2,4 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-34b-3p | -2,38 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-542-5p | 3,62 | √ | 1 gen |
| mmu-miR-31-5p | -2,43 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |

| | | | |
|-------------------|-------|---|-------|
| mmu-miR-338-5p | -2,19 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-125a-3p | -2,38 | √ | |
| mmu-miR-466c-5p | -2,45 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-742-3p | -2,44 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-132-3p | 4,73 | √ | 7 gen |
| mmu-miR-124-3p | -3,39 | √ | |
| mmu-miR-698-3p | -2,53 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-let-7c-1-3p | 4,6 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-101a-5p | -3,99 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-1190 | -2,05 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-1191 | 4,06 | √ | 6 gen |
| mmu-miR-1892 | -2,56 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-1896 | -3,04 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-1901 | 6,79 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-1947-5p | -3,2 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-200a-5p | -2,04 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-218-2-3p | -3,23 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-24-1-5p | 15,33 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-294-3p | -2,34 | √ | |
| mmu-miR-3100-3p | -2 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-3085-5p | 2,26 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-135a-1-3p | 2,38 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-3105-5p | -2,41 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-1955-3p | -2,51 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-302d-5p | -2,09 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-3058-3p | 2,22 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-2137 | 2,73 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |

| | | | |
|-------------------------|-------|---|-------|
| mmu-miR-1912-5p | -2,41 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-1894-5p | -2,47 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-1930-3p | 2,33 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-598-5p | -2,41 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-320-5p | 2,02 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-3091-5p | -2,59 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-106a-3p | -2,62 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-1964-5p | 2,13 | microRNA.org'da gen listesi mevcut değil. | |
| mmu-miR-2136 | 5,89 | √ | 4 gen |
| mmu-miR-486-5p//3107-5p | 23,97 | √ | 7 gen |

5.3. İfadesi Değişen MikroRNAların Hedeflerinin *In Silico* Analizi

Bir mikroRNA binlerce transkripti *in silico* regüle edebilmektedir. miRNAom analizi sonucu ifadesi değişen miRNAlar arasından seçilen bir grup miRNA'nın lipotoksik ER stres sırasında hangi mRNAları regüle ettiklerini belirlemek için öncelikle microRNA.org sitesinden mevcut sürümde yer alan her bir mikroRNaya ait hedef genler belirlenmiş ve gen listeleri indirilmiştir. Şekil 5.9'da mmu-miR-132-3p hedefleri microRNA.org veritabanına göre 7,143 adet olarak çıkmaktadır. hedefler linki tıkladığında ise bu mRNAlar ve gen kimlikleri görülmektedir, kısmi liste şekil 5.10' da yer almaktadır. miRSVR skorlarına göre sıralama gerçekleştirilmiştir. Bu listedeki bağlanma detaylarına tıkladığında ise her transkriptte bağlanan miRNAlar ve bağlanma bölgeleri detaylı bir şekilde görülebilmektedir. Şekil 5.11'de mmu-miR-132-3p hedeflerinden Herpud1 transkripti ile bağlanma bölgesinin, transkriptin 3'UTR bölgesinde yer aldığı ve ayrıca komplementeritesinin ve miRSVR skorunun da oldukça yüksek olduğu görülmektedir. miRNA hedef transkriptte seed bölgesinden ve diğer bazlardan komplementerite göstermektedir. Bu transkriptte bağlanan diğer aday miRNAlar da şekilde yer almaktadır.

Binlerce olası hedef transkript arasından hedef belirlemek zor olacağı için microRNA.org sitesinde ilgili miRNA'nın olası tüm hedef transkriptlerinin listeleri -mevcutsa- indirilmiş

ve yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Yolak analizi gerçekleştirilen bazı miRNA hedeflerinin kısmi listesi şekil 5.12'de görülmektedir. mmu-miR-132p 3719 gen, mmu-miR-486-5p'nin ise 1881 gen, mmu-miR-449a-5p'nin 5039 gen, mmu-miR-542-5p'nin 731, mmu-miR-125a-3p'nin 3933 gen, mmu-miR-124-3p'nin 3652 gen, mmu-miR-1191'in 1808 gen, mmu-miR-294-3p'nin 3558 gen ve mmu-miR-2136'nin 1813 genin mRNA'sına bağlanabileceği öngörülmektedir, bu sadece korunmuş miRNAların yüksek miRSVR skor ile bağlandıkları hedefler listesinde yer alanlardır.

microRNA.org - Targets and Expression
Predicted microRNA targets & target downregulation scores. Experimentally observed expression patterns.
August 2010 Release Last Update: 2010-11-01 [release notes]

target sites by: scores by: Computational Biology Center
miRanda - miRSVR
cBio@MSKCC

miRNA Target miRNA miRNA Expression Downloads FAQ

You are currently searching:
• Mus musculus
• mmu-miR-132

miRNA Stats:
• Homo sapiens: 1100
• Mus musculus: 717
• Rattus norvegicus: 387

Searched for: mmu-miR-132 AND Mus musculus
1 match [select all] [clear all]

| miRNA | Genes Targeted | Links |
|--------------------------------------|----------------|--|
| <input type="checkbox"/> mmu-miR-132 | 7,143 | [view targets] [view expression profile] [view in miRBase] |

[view mRNAs targeted by ALL selected miRNAs] [view expression profiles of ALL selected miRNAs]

Şekil 5. 9. mmu-miR-132-3p' nin hedeflediği potansiyel mRNA sayısı

microRNA.org - Targets and Expression
Predicted microRNA targets & target downregulation scores. Experimentally observed expression patterns.
August 2010 Release Last Update: 2010-11-01 [release notes]

target sites by: scores by: Computational Biology Center
miRanda - miRSVR
cBio@MSKCC

miRNA Target miRNA miRNA Expression Downloads FAQ

You are currently searching:
• Mus musculus
• mmu-miR-132
[view targets]
[view expression profile]

miRNA Stats:
• Homo sapiens: 1100
• Mus musculus: 717
• Rattus norvegicus: 387
• Drosophila melanogaster: 186
• Caenorhabditis elegans: 233

Selected miRNAs: mmu-miR-132
Click [] to view alternative isoforms.
Displaying results 1 - 50 of 7,143
[first] [next] [last]

| miRNAs Targeted by mmu-miR-132 | miRSVR score |
|---|--------------|
| Hmga2 [NM_010441 [alignment details] | -3.38 |
| Pspc1 [NM_025682 [alignment details] | -2.57 |
| Lipm [BC031933 [alignment details] | -2.48 |
| Pnn [NM_008891 [alignment details] | -2.40 |
| Slit2 [NM_178804 [alignment details] | -2.27 |
| Hmbx1 [NM_177338 [alignment details] For this gene, only alternative isoforms met search criteria BC002212, BC051457 [alignment details] | -2.18 |
| Nras [NM_010937 [alignment details] AK010412 [alignment details] | -1.32 |
| Phf8 [AK122447, BC033569 [alignment details] AK147939 [alignment details] | -0.31 |
| 2210403K04Rik [AK008813 [alignment details] | -2.09 |
| Dnaja2 [NM_019794 [alignment details] | -2.04 |
| Nin [NM_001081453 [alignment details] NM_008697, AK167264, U40342 [alignment details] | -0.01 |
| Trmt11 [NM_028604, BC048703 [alignment details] | -1.98 |
| Btc [NM_007568 [alignment details] | -1.97 |
| Wt1 [NM_144783, DQ537939 [alignment details] | -1.96 |
| Drg1 [NM_007879 [alignment details] | |

Şekil 5. 10. mmu-miR-132-3p' nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin miRSVR skoruna göre sıralanmış kısmi listesi

| miRNA Stats: |
|--------------------------------|
| · Homo sapiens: 1100 |
| · Mus musculus: 717 |
| · Rattus norvegicus: 387 |
| · Drosophila melanogaster: 186 |
| · Caenorhabditis elegans: 233 |

| Query Target Sites: |
|-----------------------------|
| · mmu-miR-132 438 |
| mirSVR score: -1.1981 |
| PhastCons score: 0.7850 |
| 587 |
| mirSVR score: -0.2085 |
| PhastCons score: 0.6918 |

| Displayed miRNAs ordered by sum of mirSVR scores: |
|---|
| · mmu-miR-543 389 |
| · mmu-miR-132 438 |
| 587 |
| · mmu-miR-340-5p 418 |
| · mmu-miR-144 205 |
| · mmu-miR-217 491 |
| · mmu-miR-218 126 |
| · mmu-miR-544 350 |
| · mmu-miR-451 354 |
| · mmu-miR-96 111 |
| · mmu-miR-320 191 |
| · mmu-miR-410 419 |
| · mmu-miR-370 448 |
| · mmu-miR-376b 576 |
| · mmu-miR-101a 204 |
| · mmu-miR-101b 203 |
| · mmu-miR-33 492 |

mmu-miR-132/Herpud1 Alignment

3' gcUGGU-AC-CGAC-AUCUG-ACAA 5' mmu-miR-132
 ||| || | || ||||| |||||
 438:587 uaAUCAGUGAAUUGCUGAGCAUGU 3' Herpud1

mirSVR score: -1.1981
 PhastCons score: 0.7850

Mouseover a miRNA mature name to see the miRNA/Herpud1 alignment.

Herpud1 homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1

1 UGGCCCUUGUGCUCUGCUGUGGUCUUUGACAGCUCGGACUGGAUCGUCUGGCUCGGCUCUUUUUCCUCCCC 75

76 UGGCGUGGACUCGACAGAGUCAUUGAAAACCCACAGGAUGACAUGUCUUCUGGCCAAGCAAAAAGCACAAAACUA 150

151 AGACAUGAAGCCGUGGUACAACACUGAACAGGGCCCCUCAUGUCGUUAUUCUGAAGAGCUUUAUGUAUACUGUUAU 225

226 GUAGUUUCAUAGGCACUGUAAGCAGAAAGCCAGGGUCGCAUGUUCUGCCUGAGCACCUCGCCAGAUUGUGUGC 300

301 AUGUGUGCUGUACAUGGAAGUCAUAGACGUGUGCAUGUGUGCUCUCAUGGAAGUCAAGAUGCAGAAACGGU 375

miR-451 miR-543 miR-410 miR-340-5p
 376 UCUGCUGGUUCGAUUUGAUUCCUGUUGGAAUUGUCAAAUUAACACUAAGUGUACUACUUUAUUAUAAUCAGUGAAUU 450

miR-370 miR-217 miR-33
 451 GCAGACAUGUUAGCAGACUUUUUCUAGGAGAGACUUUUGUAUAAUUGCUUUUUAAAAUAGCAGUGCUUUCCUUUA 525

526 AACCGAGGGUGGCGACUUGGCAGAGGUAAAACUUUGCCGAGUUUCUGUUCUAUAAAGUUUUGCUAUGAAUGAC 600

miR-132
 601 UGU 602


Şekil 5. 11.mmu-miR-132-3p'nin hedeflerinden Herpud1 mRNAsı ile interaksiyon bölgeleri

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
|----|--------------------|--------------------|---------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | mmu-miR-132 | mmu-miR-486 | mmu-miR-2136 | mmu-miR-125a-3p | mmu-miR-124 | mmu-miR-294 | mmu-miR-1191 | mmu-miR-542-5p | mmu-miR-449a-5p |
| 2 | Hus1 | Obfc2a | Mylk2 | Obfc2a | Hmgcr | Obfc2a | Mybl1 | Bend6 | 2010110K18Rik |
| 3 | Cpsf6 | Nrk | Lphn3 | Flnc | Nrk | Wdr45 | Arfgef1 | Naa40 | Antxr1 |
| 4 | Cpsf6 | Nsun4 | Mtx3 | Phf8 | Nsun4 | Tcf12 | A830018L16Rik | Nrxn3 | Pbx1 |
| 5 | 2510039O18Rik | Sh2d3c | Dnajc21 | Bend6 | Tcf12 | Mrps9 | Slco5a1 | Gm9880 | Phf8 |
| 6 | 2510039O18Rik | 2510039O18Rik | Lphn3 | Mrps9 | 2510039O18Rik | Ubap2l | Tram1 | Luc7l | Ccl9 |
| 7 | Phf8 | Bend6 | Arid3c | Mamld1 | Mylk2 | Pdcl | Kcnb2 | Mapk8 | Gata3 |
| 8 | Gata3 | Mrps9 | Prlr | Dscaml1 | Mrps9 | Mga | Gm106 | Samd14 | Spag9 |
| 9 | Pdcl | Med26 | Git2 | Cnot2 | Ubap2l | Med26 | Gdap1 | Zfp521 | Shkbp1 |
| 10 | E130309F12Rik | Crh | Bcl6 | Cnot2 | Gng10 | Ccdc88a | Phf3 | Lrp1 | Gpr64 |
| 11 | Mtx3 | Slitrk4 | Bcl6 | Fam115a | Shkbp1 | Notch4 | BC043098 | Lcn3 | Naa50 |
| 12 | Gpr64 | Esyt2 | Bcl6 | Ctla | Med26 | Cep68 | Cnnm3 | Chmp4c | Cep68 |
| 13 | Fam55b | Rpgr | Asb4 | Leprot | Plekhh1 | Tmtc1 | Tmem131 | Usp33 | Tmem184b |
| 14 | Dctd | Nedd4l | Bcl2l11 | Arhgap20 | Gpr64 | Tmtc1 | Tmem131 | Spr2d | Mfap3 |
| 15 | Chkb | Chrac1 | C030029H02Rik | Prlr | Cep68 | Cdc27 | Inpp4a | Stag1 | Apol7b |
| 16 | Gli3 | BC025920 | Samd14 | Arl6ip6 | Tmem184b | Cyhr1 | Tsga10 | Lrtm2 | I1C0022H11Rik |
| 17 | Fam115a | Armxc2 | Xlr3b | Gsdmc | Ccb1l | P2rx5 | Eif5b | Mapk4 | Gm9880 |
| 18 | Nol4 | Neurod1 | Dck | Slc6a12 | Slitrk4 | Prlr | Creg2 | Sept9 | Nedd4l |
| 19 | Nol4 | Neurod1 | Mpz1l | Gm5475 | Arhgap21 | Guf1 | Creg2 | Chrm3 | Myl6 |
| 20 | Nedd4l | Asb4 | Irf9 | Gm13646 | Arhgap21 | Bcl6 | Col5a2 | Slco2a1 | 4732416N19Rik |
| 21 | Mapk8 | Gm5149 | E330016L19Rik | Pphln1 | Dscaml1 | Neurod1 | Tmeff2 | Spnb1 | Ktn1 |
| 22 | Zyg11b | Pnkp | Gjc2 | Lcp1 | Esyt2 | Tmem64 | Gls | Pigs | Txnrd2 |
| 23 | Ktn1 | Cadm1 | Gpd2 | Vwa1 | Tmtc1 | Fbxl5 | Mstn | Vat1 | Tomm40 |
| 24 | S100pbp | Cadm1 | Gpd2 | Gtf3c1 | Ydjc | Spinlw1 | Mobkl3 | Dtl | Bcl6 |
| 25 | Guf1 | Mrps18c | Lef1 | Bai2 | Ydjc | Pphln1 | EG329160 | Hoxa11 | Bdnf |
| 26 | Adam29 | Cdk4 | Muted | Esrp1 | Nol4 | Irf9 | EG329160 | Lhx6 | Bdnf |
| 27 | Arhgap27 | Dck | Eif4e1b | Btla | Luc7l | Tmem72 | D1Ert53e | Ythdc1 | Lck |
| 28 | Tmem64 | Gpd2 | Jazf1 | Fkbp11 | Gtf2ird1 | Mfhas1 | D1Ert53e | Gnat2 | Rufy3 |
| 29 | Creml | Kcnn1 | Ap1g1 | Mfhas1 | Tomm40 | Tceanc | D1Ert53e | Ipmk | Cadm1 |
| 30 | Zfp521 | Cbln3 | C77080 | Tceanc | Git2 | Lemd3 | D1Ert53e | Cd109 | Dgcr2 |
| 31 | Lcp1 | Ap1g1 | Tubgcp4 | D16Ert472e | Vsnl1 | Pax3 | D1Ert53e | Fbxl19 | Nkx2-6 |
| 32 | Ipmk | R3hdm1 | Apol8 | Rassf6 | Bcl6 | Asb8 | D1Ert53e | Abcc5 | Pcdhga1 |

Şekil 5. 12. Yolak analizi için kullanılan miRNA hedeflerinin kısmi listesi

Her bir miRNA yüzlerce gen regüle edebileceği için bu genlerin biyolojik işlev, moleküler fonksiyon, hüresel komponent ve protein domainlerinin aynı anda analiz edilebileceği bir yolak analizinin gerçekleştirilmesi genlerin sınıflandırılması ve hedef mRNAların yakalanabilmesi açısından çok önemlidir. Bu kapsamda miRNA hedef genlerinin karakterizasyonu ve yolak analizlerinin gerçekleştirilmesi için web tabanlı bir program olan GeneCodis yolak analiz programı kullanılmıştır [http://genecodis.dacya.ucm.es/analysis/]. Yolak analizleri seçilecek hedef mRNA tayini açısından önemlidir. Şekil 5.13'te GeneCodis arayüzü görülmektedir.

Analysis | Comparative Analysis | Web Services | Help | Release info | Other GeneCodis sites



Gene annotations
co-occurrence discovery

Modular and Singular Enrichment Analysis [?]

1. Select the organism [?]

Mus musculus
please select
Please select

2. Select the annotations [?] [Last update on Dec, 2011]

Annotations

- GO Biological Process
- GO Molecular Function
- GO Cellular Component
- GOSlim Process
- GOSlim Function
- GOSlim Component
- KEGG Pathways
- InterPro Motifs
- MicroRNA
- Omim Diseases
- Panther Pathways
- PharmGKB Drugs
- Pubmed
- Transcription Factors
-
-
-
-
-

Şekil 5. 13.GeneCodis arayüzü

Hedef gen listelerine ulaşılabilen miRNAlar için yolak analizi gerçekleştirilmiştir. Yolak analizi gerçekleştirilemeyen miRNAlar için hedef gen seçimi manuel olarak yapılmaya çalışılmış ancak anlamlı genlere ulaşamamıştır. Ağırlıklı olarak KEGG ve GO analizleri gerçekleştirilmiş ve bu şekilde hedef genler seçilmiştir. Tüm sonuçlar ve gen listeleri detaylı olarak incelenmiş, sadece ER grubu değil, aynı zamanda ubiquitin aracılı proteoliz, golgi, apoptoz, RNA kırılması, lipid metabolizması gibi yolaklar da incelenmiştir.

Sınıflandırılmış genler elde edildikten sonra ise gruptaki hedef mRNA'lar tek tek ayrıntılı olarak incelenerek;

- Komplementerite derecelerine,
- Bağlanma bölgelerindeki baz sayısına,
- Bağlanma bölgelerinin lokasyonuna,
- mirSVR skoruna göre,
- ve literatür bilgisi incelenerek hedef mRNA seçimi yapılmıştır.

Yolak analizleri için tipik bir örnek olarak sadece mmu-miR-132-3p olası hedef genlerinin yolak analizi grafik olarak aşağıdayer almaktadır(Şekil 5.14). 62 adet kanser, 50 adet MAPK yolağı, 39 adet kemokin sinyal yolağı, 38 adet merkez adhezyon, 32 adet ERda protein işlenmesi ile ilgili gen sınıflarına bu sayede ulaşılmıştır. Pasta grafiğı olarak ise aynı sınıflandırma şekil 5.15'de görülmektedir. Şekil 5.16'da ise ER'da protein işlenmesi ile ilgili gen sınıfı görülmektedir. Örneğın Herpud1 geni bu yolakta yer almaktadır. İnteraktif bir liste olarak çıkan gen grupları üzerine tıklanıldığında hedef mRNA'lar ve fonksiyonları incelenebilmektedir. Buna göre Herpud1 yolak analizi sonucu mmu-miR-132-3p olası hedefi olarak primer tasarlanan genlerden birisidir, miRSVR skora göre listeye bakıldığında yakalamak imkansızdır. Bu da yolak analizi ile genleri fonksiyonlarına göre zenginleştirmenin önemini vurgulamaktadır.

mmu-miR-294-3p, mmu-miR-124-3p mmu-miR-486-5p, mmu-miR-542-5p ve mmu-miR-1191, mmu-miR-125a-3p, mmu-miR-449a-5p, ve mmu-miR-2136 için gerçekleştirilen yolak analizlerinin pasta grafikleri sırası ile Şekil 5.17 ile 5.24 arasında görülmektedir. Tüm yolak analiz tablosu ise çizelge 5.3'te görülmekte, yolak analizi gerçekleştirilen miRNA hedeflerinin ilişkili oldukları biyolojik süreçlerde yer alan gen sayıları özetlenmiştir.

Sadece KEGG değil aynı süreç "GO: Biyolojik işlev" için de gerçekleştirilmiş, ancak bu kez sınıflandırılan gen sayıları çok fazla olmuştur. Bu yolak analizine ait gen listesi EK2de yer almaktadır. Özet pasta grafikleri Şekil 5.25, 5.26 ve 5.27'de görülmektedir.

Modular and Singular Enrichment Analysis Results

Organism: Mus musculus
 Annotations selected: KEGG Pathways
 Summary of the user provided list of genes - (zipped)
 Following genes do not show annotations in the selected categories:
 + 115 Genes (3.98%)

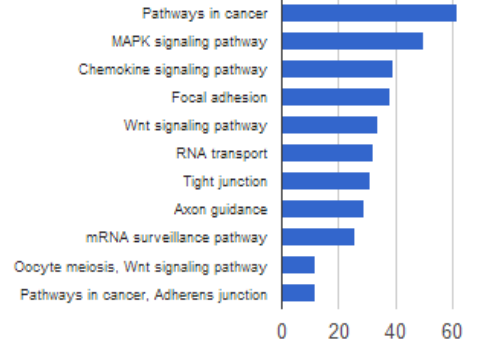
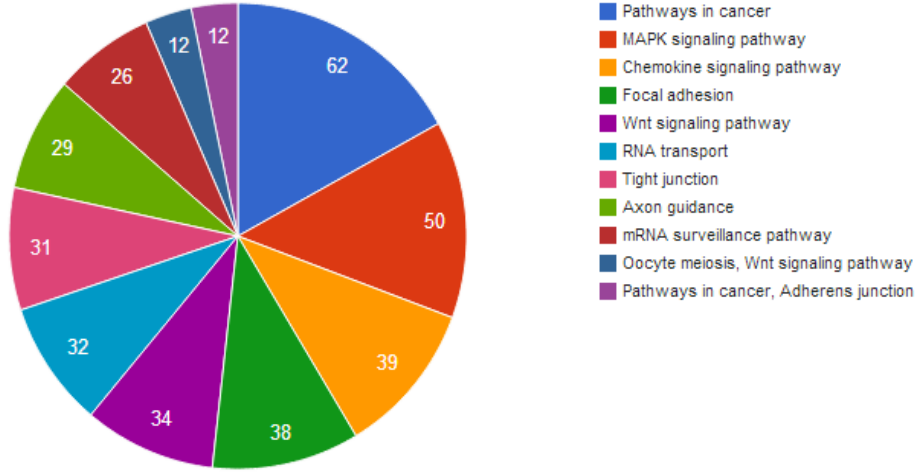
Hyp = Hypergeometric pValue; Hyp* = Corrected hypergeometric pValue

Filter the results by annotation name

| Genes | NGR | TNGR | NG | TNG | Hyp | Hyp* | Annotations |
|----------|-----|-------|----|------|-------------|-------------|---|
| 62 genes | 321 | 37681 | 62 | 2773 | 2.27151e-12 | 4.88376e-10 | (KEGG) 05200: Pathways in cancer |
| 26 genes | 85 | 37681 | 26 | 2773 | 2.14287e-10 | 2.30358e-08 | (KEGG) 03015: mRNA surveillance pathway |
| 50 genes | 263 | 37681 | 50 | 2773 | 5.19318e-10 | 2.79133e-08 | (KEGG) 04010: MAPK signaling pathway |
| 39 genes | 177 | 37681 | 39 | 2773 | 5.02288e-10 | 3.59973e-08 | (KEGG) 04062: Chemokine signaling pathway |
| 34 genes | 150 | 37681 | 34 | 2773 | 2.91382e-09 | 1.25294e-07 | (KEGG) 04310: Wnt signaling pathway |
| 31 genes | 132 | 37681 | 31 | 2773 | 5.80783e-09 | 2.08114e-07 | (KEGG) 04530: Tight junction |
| 38 genes | 199 | 37681 | 38 | 2773 | 5.19726e-08 | 1.5963e-06 | (KEGG) 04510: Focal adhesion |
| 29 genes | 130 | 37681 | 29 | 2773 | 5.97918e-08 | 1.6069e-06 | (KEGG) 04360: Axon guidance |
| 32 genes | 156 | 37681 | 32 | 2773 | 1.03202e-07 | 2.46537e-06 | (KEGG) 03013: RNA transport |
| 32 genes | 161 | 37681 | 32 | 2773 | 2.20879e-07 | 4.74891e-06 | (KEGG) 04141: Protein processing in endoplasmic reticulum |
| 16 genes | 52 | 37681 | 16 | 2773 | 5.70761e-07 | 1.11558e-05 | (KEGG) 05213: Endometrial cancer |
| 21 genes | 89 | 37681 | 21 | 2773 | 1.45813e-06 | 2.61249e-05 | (KEGG) 05215: Prostate cancer |
| 27 genes | 136 | 37681 | 27 | 2773 | 1.93237e-06 | 3.19585e-05 | (KEGG) 04120: Ubiquitin mediated proteolysis |
| 36 genes | 213 | 37681 | 36 | 2773 | 2.43658e-06 | 3.74189e-05 | (KEGG) 04144: Endocytosis |

Şekil 5. 14.mmu-miR-132-3p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizi sonucu KEGG sınıflandırması

Number of genes per concurrent annotations



Şekil 5. 15. mmu-miR-132-3p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu

Gene Group Details

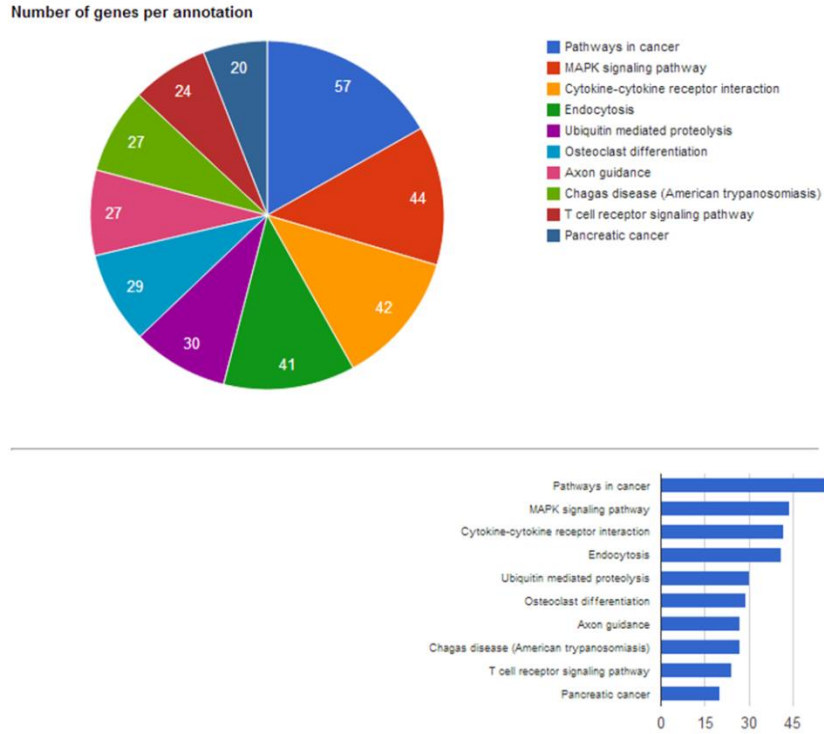
Organism: *Mus musculus*

Annotations enriched: (KEGG) 04141: Protein processing in endoplasmic reticulum

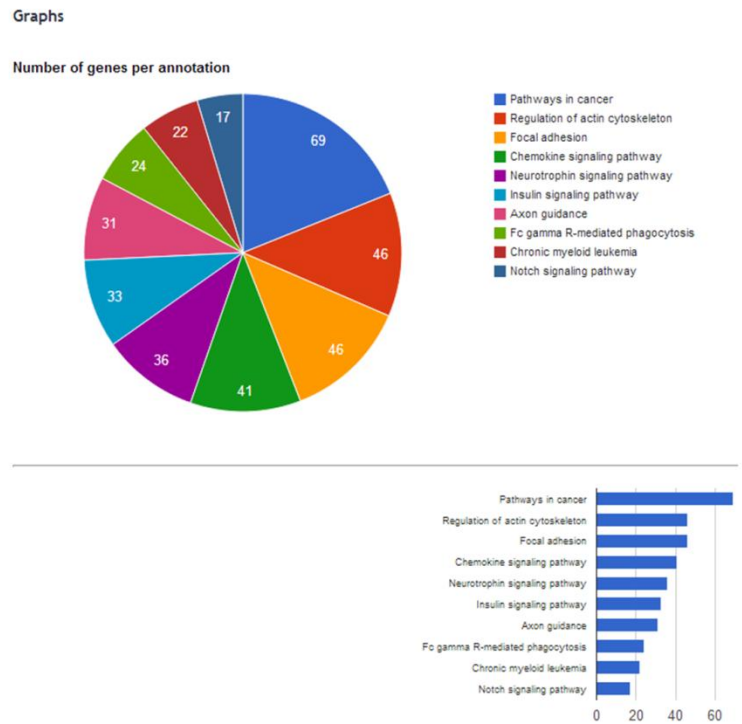
Genes related:

| | |
|---------|--|
| Rpn1 | ribophorin 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98084] |
| Hspa1b | heat shock protein 1B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99517] |
| Hspa4l | heat shock protein 4 like [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107422] |
| Dad1 | defender against cell death 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:101912] |
| Capn2 | calpain 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88264] |
| Sec24a | Sec24 related gene family, member A (<i>S. cerevisiae</i>) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1924621] |
| Ugg2 | UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913685] |
| Dnaja2 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1931882] |
| Ngly1 | N-glycanase 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913276] |
| Eif2ak3 | eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1341830] |
| Dnajc1 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:103268] |
| Hspa1a | heat shock protein 1A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96244] |
| Lman2 | lectin, mannose-binding 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1914140] |
| Ssr3 | signal sequence receptor, gamma [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1914687] |
| Dnajc5 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:892995] |
| Sar1a | SAR1 gene homolog A (<i>S. cerevisiae</i>) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98230] |
| Pdia3 | protein disulfide isomerase associated 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95834] |
| Ube2d3 | ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913355] |
| Tusc3 | tumor suppressor candidate 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1933134] |
| Plaa | phospholipase A2, activating protein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104810] |
| Vcp | valosin containing protein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99919] |
| Man1a | mannosidase 1, alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104677] |
| Hsph1 | heat shock 105kDa/110kDa protein 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:105053] |
| Herpud1 | homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1927406] |
| Ube2d1 | ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1, UBC4/5 homolog (yeast) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2384911] |
| Nfe2l2 | nuclear factor, erythroid derived 2, like 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:108420] |
| Ern1 | endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1930134] |
| Mapk8 | mitogen-activated protein kinase 8 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346861] |
| Sec61a2 | Sec61, alpha subunit 2 (<i>S. cerevisiae</i>) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1931071] |
| Yod1 | YOD1 OTU deubiquitinating enzyme 1 homologue (<i>S. cerevisiae</i>) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2442596] |
| Amfr | autocrine motility factor receptor [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1345634] |
| Dnajb12 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 12 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1931881] |

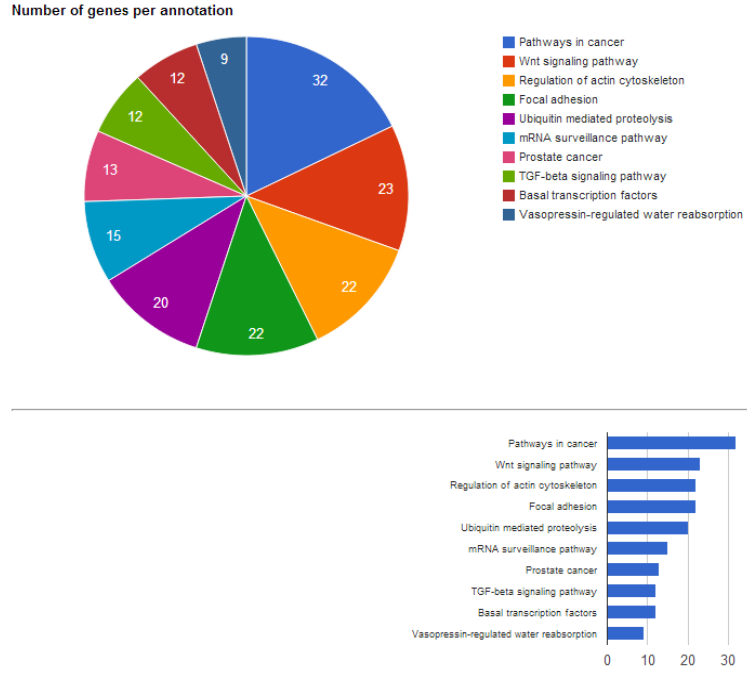
Şekil 5. 16. mmu-miR-132-3p'nin hedeflediği ER'da protein işlenmesi ile ilgili potansiyel mRNA hedeflerinin listesi (KEGG)



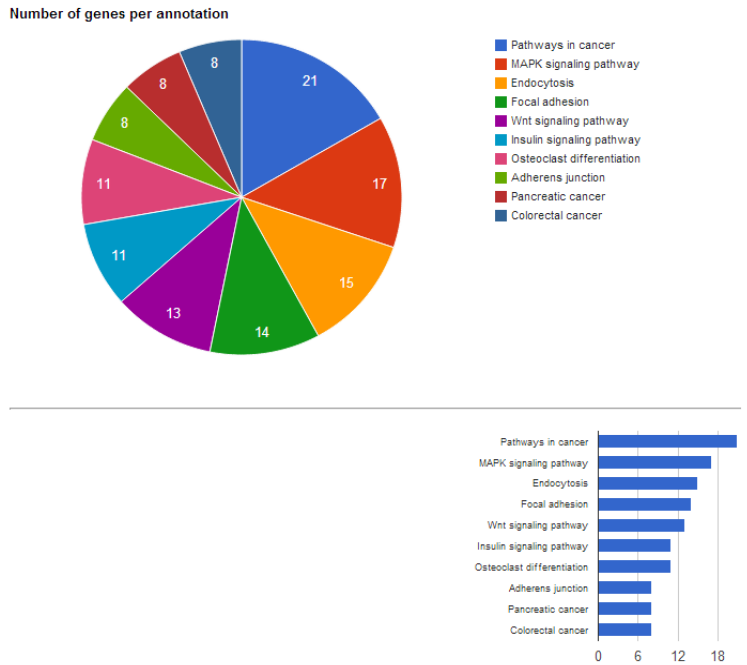
Şekil 5. 17. mmu-miR-294-3p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu



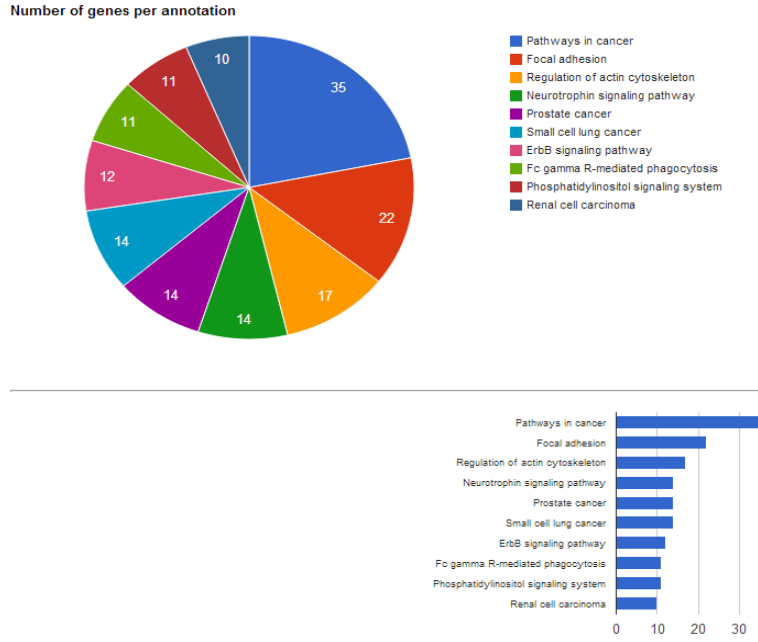
Şekil 5. 18. mmu-miR-124-3p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu



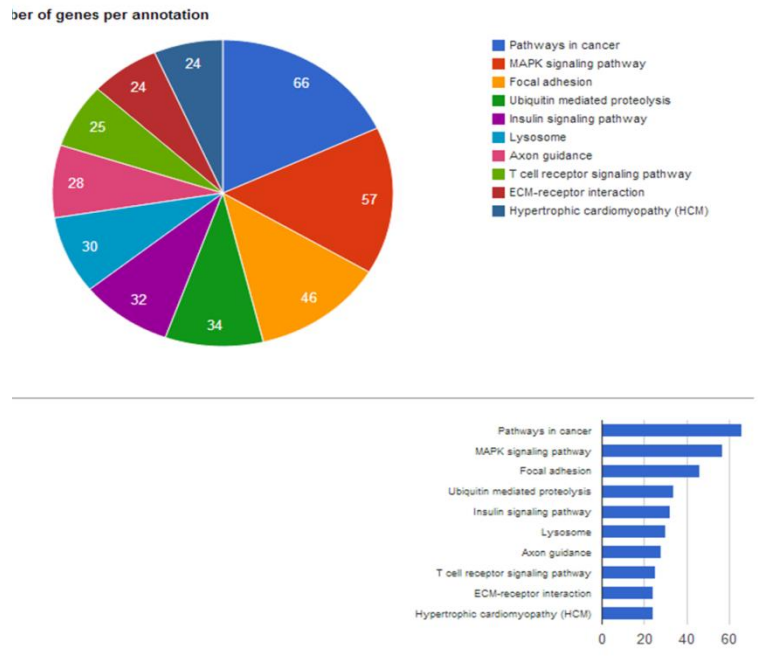
Şekil 5. 19. mmu-miR-486-5p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu



Şekil 5. 20. mmu-miR-542-5p'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu



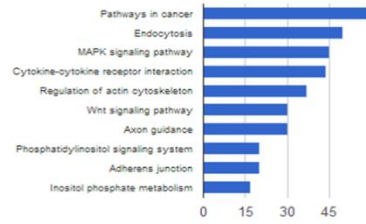
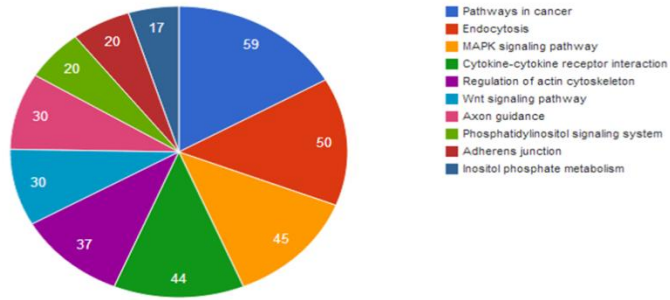
Şekil 5. 21.mmu-miR-1191'in hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu



Şekil 5. 22.mmu-miR-125a-3p 'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu

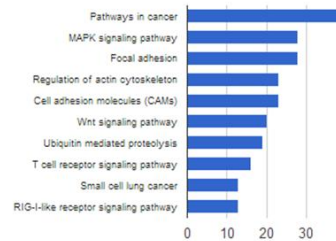
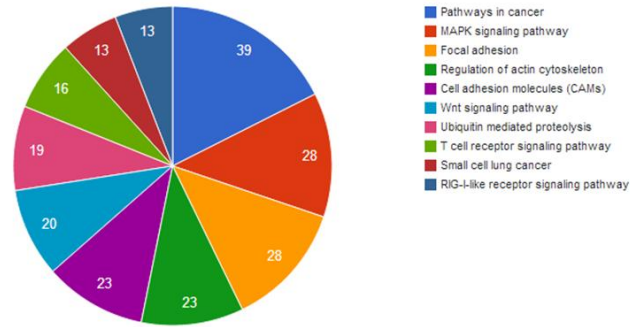
Graphs

Number of genes per annotation



Şekil 5. 23.mmu-miR-449a-5p 'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu

Number of genes per annotation



Şekil 5. 24.mmu-miR-2136'nin hedeflediği potansiyel mRNA hedeflerinin yolak analizinin pasta grafik sunumu

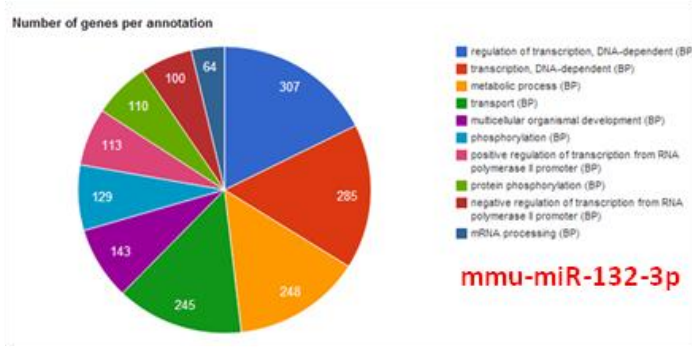
Çizelge 5. 3.Lipotoksik ER stres sonucu ifadesi değişen miRNA hedeflerinin görev aldıkları yollar (KEGG)

| <i>mRNA'ların etkili olduğu biyolojik süreçler</i> | <i>mmu-miR-1191</i> | <i>mmu-miR-542-5p</i> | <i>mmu-miR-486</i> | <i>mmu-miR-132-3p</i> | <i>mmu-miR-294-3p</i> | <i>mmu-miR-124-3p</i> | <i>mmu-miR-449a-5p</i> | <i>mmu-miR-125a-3p</i> | <i>mmu-miR-2136</i> |
|--|---------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| Ubikütün aracılı proteolizis | 8 | | 20 | 27 | 30 | 22 | 24 | | 19 |
| Tip 2 diyabet | | 4 | | | | | | 10 | 6 |
| mTOR sinyal yolağı | 5 | | 8 | 9 | 13 | | 9 | | 7 |
| Kemokin sinyal yolağı | 13 | 8 | 15 | 39 | 25 | 41 | 30 | 31 | |
| İnsülin sinyal yolağı | 11 | 11 | 15 | 23 | 24 | 35 | 26 | 32 | 14 |
| ER protein süreci | 11 | | 14 | 32 | 30 | 26 | 26 | 30 | 14 |
| Adipositokin sinyal yolağı | 9 | 7 | | | 16 | | 15 | | 10 |
| Apoptoz | 8 | | | 18 | 18 | 21 | 12 | 19 | |
| ABC transporterları | | 4 | 8 | | | 8 | 8 | 13 | 9 |
| Adherens birleşimi | | 8 | 9 | 17 | | 18 | 20 | 19 | 9 |
| Akson rehberliği | 12 | 7 | | 29 | 27 | 31 | 30 | 28 | 14 |
| Aktin iskeletinin düzenlenmesi | 17 | | 22 | 28 | 35 | 46 | 37 | 38 | 23 |
| Akut myeloid lösemi | 6 | | 8 | 15 | | 16 | 11 | 11 | |
| Aldosteron düzenleyici sodyum geri emilimi | | | 7 | 8 | | | | | |
| Alzheimer hastalığı | | | | 22 | | 25 | | | |
| Amerikan uyku hastalığı | | 9 | 10 | 19 | 27 | 21 | 16 | | |
| Amoebiasis | | | | | | 18 | | | |
| Amyotrofik lateral skleroz | 5 | | | 10 | 11 | 9 | 11 | | |
| ARVC | | 5 | | 11 | 12 | 18 | 14 | | 11 |
| B hücre reseptör sinyal yolağı | 7 | 6 | | 16 | | 20 | | 19 | 8 |
| Bazal hücre karsinoması | 5 | 5 | | 13 | | 11 | | | 7 |
| Bazal transkripsiyon faktörleri | | | 12 | 9 | 12 | | | | |
| Beta-alanin metabolizması | | | | 6 | 6 | 7 | | | |
| Büyük hücreli akciğer kanseri | 7 | | 8 | 13 | 9 | 14 | 14 | | |
| Dilate kardiyomiopati | | | | | | | | | 10 |
| Dorsa-ventral aksis formasyonu | | | | 5 | | 7 | 5 | 13 | |
| ECM- reseptör etkileşimi | 8 | | | 19 | | 21 | 12 | 24 | 11 |
| Endokrin ve diğer faktör düzenleyici kalsiyum geri emilimi | | | | | 11 | 11 | | | |
| Endometrial kanseri | 6 | | 8 | 16 | | 14 | 10 | | |
| Endositoz | | 15 | 17 | 36 | 41 | 36 | 50 | | 16 |
| Epitel hücrelerin bakteriyel invazyonu | 7 | | 9 | 13 | | 20 | | | |
| ErbB sinyal yolağı | 12 | | 12 | 20 | 20 | 22 | 16 | 17 | 10 |
| Eter lipid metabolizması | | | | 7 | 8 | | | | |
| Fagozom | | | | 21 | | | | | |

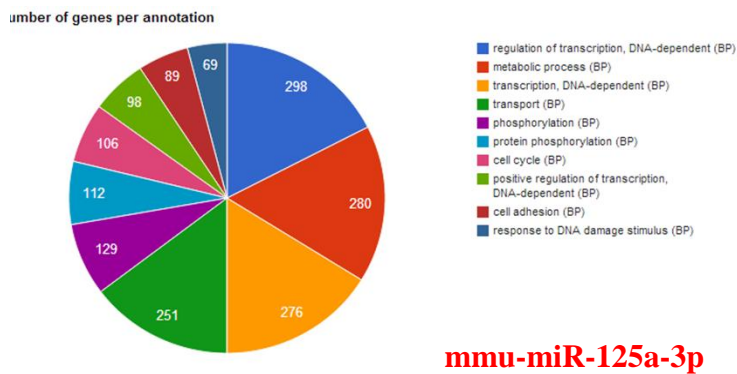
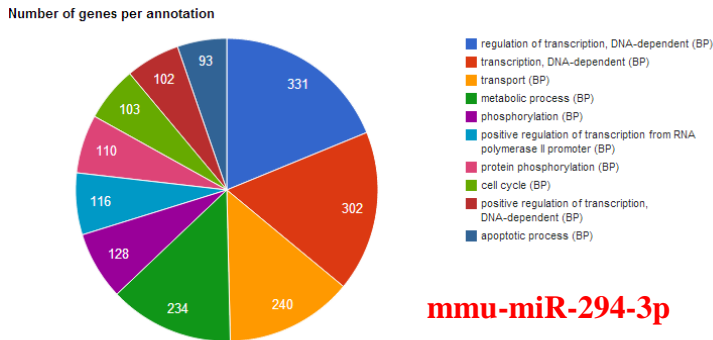
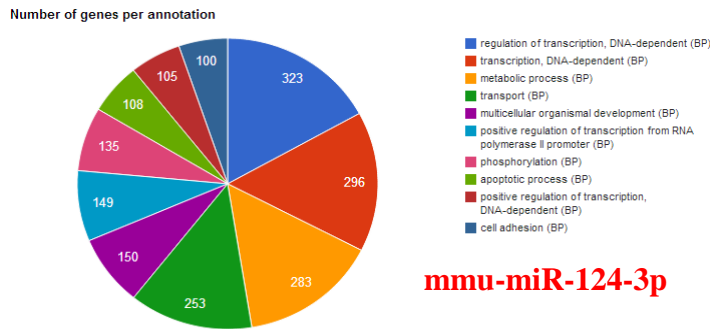
| | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Fc epsilon RI sinyal yolağı | 6 | 7 | | 14 | 12 | 15 | 12 | 19 | |
| Fc gama R-aracılı fagositoz | 11 | | | 17 | 16 | 24 | 14 | 13 | |
| Folat biyosentezi | | | | | | 5 | 4 | | |
| Folik asit biyosentezi | | | | 4 | | | | | |
| Fosfatidilinositol sinyal sistemi | 11 | | 9 | | 13 | 19 | 20 | | 11 |
| Fruktoz ve mannoz metabolizması | | | | | | | 11 | 8 | |
| Galaktoz metabolizması | | | | | 7 | | | 9 | |
| Gap junction | | | | 13 | 14 | 20 | 15 | | |
| Gastrik asit salgılanması | | | | 15 | | 19 | | | |
| Glikolizis | | | | | 10 | | 12 | 15 | |
| Glikosfingolipid biyosentezi | | | | | | 6 | 5 | | |
| Glikozaminglikan biyosentezi | | | | 8 | | | | | |
| Glikozaminglikan biyosentezi-keratin sülfat | | | | | | | 4 | | |
| Glioma | 9 | | 10 | 12 | 15 | 16 | 13 | | 7 |
| Gliserofosfolipid metabolizması | | | | | 16 | | 14 | | 10 |
| Gliserolipid metabolizması | | | | 9 | 10 | 10 | 11 | 10 | 10 |
| Glutamik asit sinapsları | | | | 25 | 19 | 25 | 17 | 23 | |
| GnRH sinyal yolağı | | 6 | | 17 | 19 | 19 | 15 | 17 | 9 |
| Hedgehog sinyal yolağı | 6 | 5 | 8 | 13 | | | 13 | | 7 |
| Hematopoetik kökenli hücreler | | 6 | | 16 | 12 | 17 | | 17 | 9 |
| Hepatit C | 12 | 7 | 14 | 26 | 23 | 24 | | | 15 |
| Hipertrofik kardiyomiyopati | | | | | | | | | 12 |
| Hipertropik Kardiyomiyopati | 6 | | | | | 16 | 13 | 24 | |
| Histidin metabolizması | | | | | 6 | 6 | | 0 | 5 |
| Hücre adhezyon molekülleri (CAMs) | 10 | 9 | | 21 | 19 | 28 | 21 | | 23 |
| Hücre döngüsü | | | 12 | 22 | 26 | 21 | 22 | | 14 |
| IgA üretiminde bağırsak immün sistem ağı | | | | | 9 | | | | |
| İnositol fosfat metabolizması | 8 | | | | | 13 | 17 | | 9 |
| Jak-STAT sinyal yolağı | 11 | | 13 | | 28 | 29 | 24 | 24 | 17 |
| Kalsiyum sinyal yolağı | | 10 | 17 | 23 | 31 | 33 | 25 | | |
| Kanal asidi salgısının toplanması | | 3 | | | | | | 38 | |
| Kanser yolakları | 35 | 21 | 32 | 62 | 57 | 69 | 59 | | 39 |
| Karbonhidrat sindirimi ve absorbanası | | | | | | | | | |
| Kızamık | 8 | | 12 | 20 | 26 | 22 | 19 | 19 | 6 |
| Kolorektal kanser | 8 | 8 | | 14 | 13 | 13 | 16 | | |
| Kronik miyeloid lösemi | 9 | 5 | | 16 | 17 | 22 | 13 | | 8 |
| Küçük hücreli akciğer kanseri | 14 | | 9 | 14 | 17 | 22 | 15 | | 13 |
| Leishmaniasis | | | | 11 | | 11 | | | |
| Lizin degradasyonu | | | | 10 | 13 | 10 | 9 | 10 | 6 |
| Lizozom | | | | 21 | | 20 | 23 | | 12 |
| Lökosit transendotelial migrasyon | | | | 24 | | 23 | 16 | 21 | 12 |

| | | | | | | | | | |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| MAPK sinyal yolağı | 19 | 17 | 22 | 50 | 44 | 40 | 45 | | 28 |
| Melanogenez | 9 | | | 21 | | | 21 | | 10 |
| Melanoma | 9 | | 9 | | 15 | | 15 | 12 | 9 |
| Memelilerdeki günlük kalp ritmi | | | | | 7 | | 7 | | |
| Merkez adhezyon | 22 | 14 | 22 | 38 | 30 | 46 | 33 | | 28 |
| Mesane kanseri | | | | 8 | | 8 | 10 | 8 | |
| Mineral absorbanlanması | | | | | | 10 | | 10 | |
| Mitokondrideki yağ asidi uzaması | | | | | | 4 | 4 | | |
| mRNA takip yolakları | | | 15 | 26 | | 14 | 14 | | |
| N-glikan biyosentezi | | | | 10 | | | 11 | 9 | |
| NOD-benzeri reseptör sinyal yolağı | | 7 | | 14 | 10 | 12 | | 12 | 8 |
| Notch sinyal yolağı | | | | 11 | | 17 | 12 | | |
| Nöroaktif ligand-reseptör ilişkisi | 15 | | | | 33 | | 35 | | 19 |
| Nörotrofin sinyal yolağı | 14 | 8 | | 22 | 18 | 36 | 25 | | 13 |
| Nükleotid eksizyon onarımı | | | 7 | | 11 | | | 11 | |
| O-glikan'ın diğer tiplerinin biyosentezi | | 4 | | | | 9 | | | |
| Oosit oğalması | | | 13 | 23 | 17 | 16 | 17 | 15 | 13 |
| Osteoklaz farklılaşması | | 11 | 12 | 17 | 29 | 18 | 16 | | 12 |
| karyotlarda ribozom biyogenezi | | 5 | | | | | | 12 | |
| p53 sinyal yolağı | | | 9 | | 18 | 11 | 12 | 11 | |
| Pankreas kanseri | 9 | 8 | | 17 | 20 | 16 | 15 | | 11 |
| Pankreatik salgılanma | | | | 16 | | 22 | | | |
| Pentoz fosfat yolağı | | | | | 7 | | 8 | | |
| Peroksizom | 6 | | | 12 | | | | | 8 |
| Primer bağışıklık yetersizliği | 5 | | | 7 | 7 | | | | |
| Primidin metabolizması | | | | | 15 | 19 | | 22 | |
| Prion hastalıkları | | | | 8 | | | 7 | | |
| Progesteron kaynaklı oosit olgunlaşması | | | | 15 | | 14 | 14 | | 11 |
| Propanat metabolizması | | | | | 7 | 10 | 9 | | |
| Prostat kanseri | 14 | | 13 | 21 | 18 | 18 | 19 | | 12 |
| Protein sindirimi ve emilimi | | | | | | 13 | 18 | 19 | 10 |
| Purin metabolizması | | | | 20 | 23 | 27 | | | |
| Renal hücre karsinoması | 10 | | | 14 | 13 | 16 | 17 | 19 | |
| Renin-anjiotensin sistemi | | | | | | | | | |
| RIG-1 reseptör sinyal yolağı | | 5 | 9 | 12 | 14 | 13 | | | 13 |
| RNA degradasyonu | | | | 11 | 13 | | | | |
| RNA transportları | | | | 32 | | 23 | | | |
| Romatoid artrit | 6 | | | 13 | | | 13 | | |
| Safra salgılanması | | | | | 13 | 13 | | | |
| Salgı sekresyonu | | | 9 | 13 | 12 | 18 | 11 | | |
| Selenocompound metabolizması | | | | | | 5 | | | |

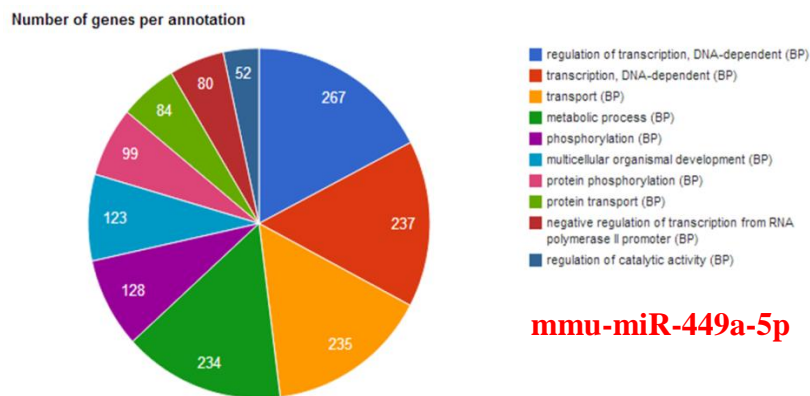
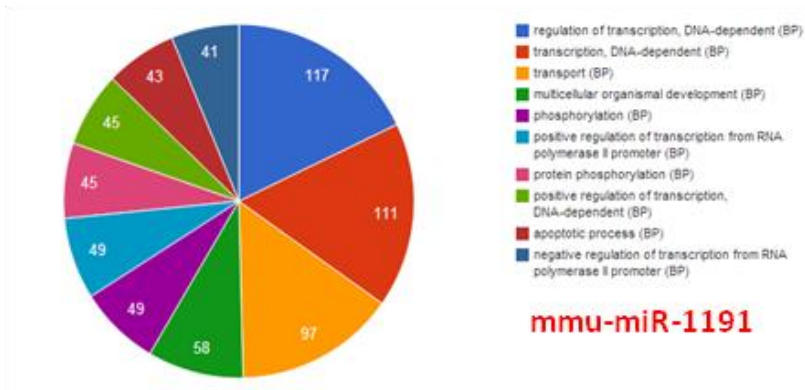
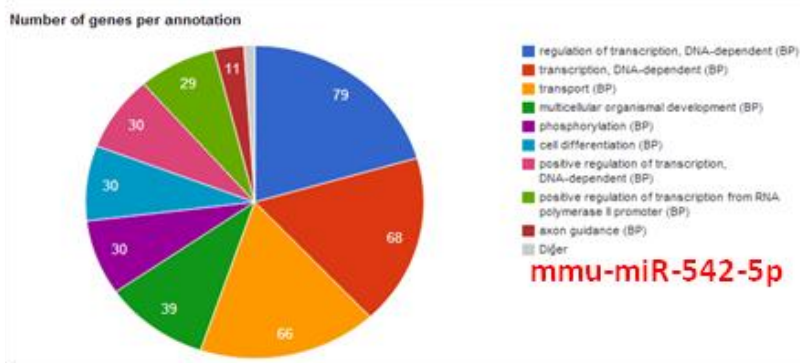
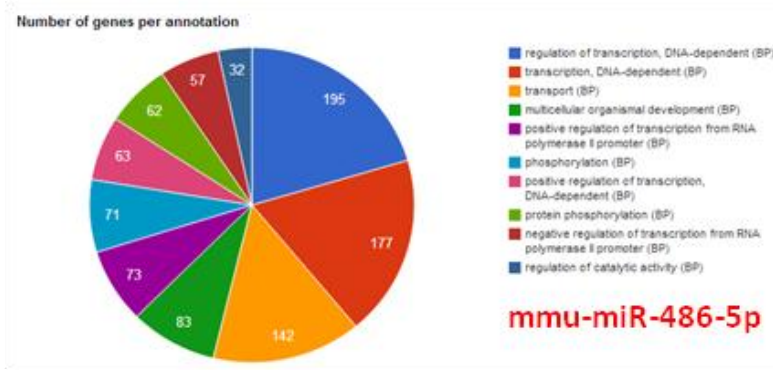
| | | | | | | | | | |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Sfingolipid metabolizması | | | | 9 | 8 | 9 | 9 | | |
| Sistein ve metionin metabolizması | | | | | | 7 | | | 5 |
| Sitokin:sitokin reseptör ilişkisi | 14 | | 21 | 35 | 42 | | 44 | | |
| Sitotoksosite kaynaklı hücre ölümü | | | | 16 | | 22 | 22 | 26 | |
| Sitozolik DNA-sensing yolağı | | | | 10 | | | | | |
| Sitrat döngüsü | 4 | | | | 7 | | 6 | | |
| Spliceosome | | | | 25 | | | 19 | | |
| Steroid biyosentezi | | | 5 | | | 5 | | | |
| T hücresi reseptör sinyal yolağı | 11 | 7 | 13 | 23 | 24 | 21 | 19 | | 16 |
| Tamamlayıcı ve pıhtılaşma basamakları | | | | | | | | | |
| TGF-Beta sinyal yolağı | | | 12 | 17 | 17 | 18 | 13 | | |
| Tight junction | 10 | | 12 | 31 | | 21 | 20 | | 15 |
| Tiroid kanseri | | | | 10 | | 7 | 10 | | |
| Tirozin metabolizması | | | | | | | | | 8 |
| Toksoplazmozis | 11 | 7 | | | 22 | 22 | 22 | | 11 |
| Toll-benzeri reseptör sinyal yolağı | 8 | 7 | | 17 | 17 | | | | |
| Tüberküloz | | 9 | | 23 | 27 | 28 | 23 | 27 | |
| Uzun süreli depresyon | | | 9 | | 14 | 18 | 12 | 17 | |
| Uzun süreli potansiyel artış | | | 8 | 13 | 13 | 14 | 12 | | 7 |
| Vasküler düz kas konsantrasyonu | | | | 15 | 16 | 22 | | 22 | |
| Vazopresin düzenleyici su geri emilimi | 5 | | 9 | 9 | | | | | |
| VEGF sinyal yolağı | | | | 17 | | 15 | | 17 | 8 |
| Veziküler transportda SNARE ilişkisi | | | | | | 11 | 10 | | |
| Viral miyokarditis | | | | | 12 | | 16 | 14 | |
| Wnt sinyal yolağı | 10 | 13 | 23 | 34 | 24 | 31 | 30 | | 20 |
| Yağ asidi biyosentezi | | | | | | 3 | | | |
| Yağ asidi metabolizması | | | | | 8 | 10 | | | |



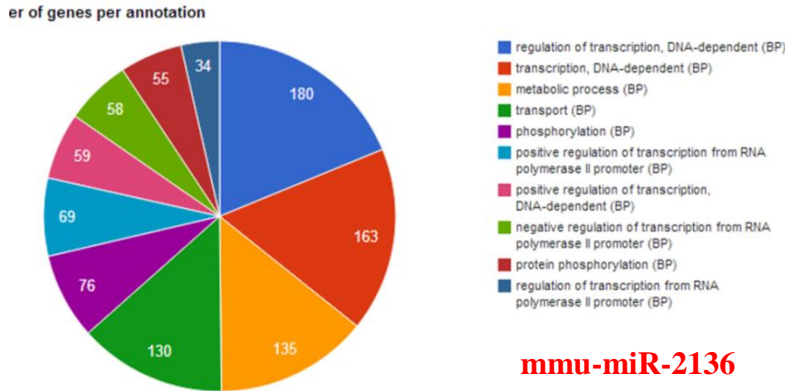
Graphs



Şekil 5. 25.miRNA hedeflerinin görev aldıkları biyolojik süreçlere göre pasta grafik sunumu(GO: Biyolojik süreç)



Şekil 5. 26.miRNA hedeflerinin görev aldıkları biyolojik süreçlere göre pasta grafik sunumu(GO: Biyolojik süreç)



Şekil 5. 27.miRNA hedeflerinin görev aldıkları biyolojik süreçlere göre pasta grafik sunumu(GO: Biyolojik süreç)

GO: biyolojik süreç analizleri sonucu yine mmu-miR-132-3p'nin potansiyel hedeflerinden iki grup gen Şekil 5.28'te görülmektedir. Endoplazmik retikulum lümeni ve ER-golgi ara kompartmanda rol alan gen listesi verilmiştir. Herpud1 geni diğer genlerle beraber bu analizde de sınıflandırılmıştır.

Tüm bu analizlerden sonra miRNAlar tarafından regüle edilen potansiyel hedef mRNAlar daha önce belirtilen kıstaslar doğrultusunda belirlenmiştir. Çizelge 5.4'te bu miRNAlar, Palmitat muamelesi sonucu kaç kat artıp azaldıkları, potansiyel hedefleri, mRNA açık adı ve bağlantı spesifitesini gösteren miRSVR skorları yer almaktadır. 4 miRNAnın ER stres sürecinde ifadesi artmışken, 1 adetinki ise azalmıştır. Şekil 5.29da ise bazı miRNA ve hedeflerinin komplementeritesi görülmektedir.

| | |
|---------|--|
| Cyp2j5 | cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1270149] |
| Tmem8b | transmembrane protein 8B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2441680] |
| Tmem50a | transmembrane protein 50A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919067] |
| Pdia3 | protein disulfide isomerase associated 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95834] |
| Ktn1 | kinectin 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:109153] |
| Sv2a | synaptic vesicle glycoprotein 2 a [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1927139] |
| Ptpn2 | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97806] |
| G6pc2 | glucose-6-phosphatase, catalytic, 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1277193] |
| Gpr37 | G protein-coupled receptor 37 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1313297] |
| Pxdn | peroxidasin homolog (Drosophila) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1916925] |
| Sez6l | seizure related 6 homolog like [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1935121] |
| Kcnma1 | potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99923] |
| Pom121 | nuclear pore membrane protein 121 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2137624] |
| Lhcgr | lutinizing hormone/choriogonadotropin receptor [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96783] |
| Cst3 | cystatin C [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:102519] |
| Tram1l1 | translocation associated membrane protein 1-like 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2443503] |
| Herpud1 | homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1927406] |
| P4ha1 | procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha 1 polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97463] |
| Ext2 | exostoses (multiple) 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:108050] |
| Rnf43 | ring finger protein 43 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2442609] |
| Txndc11 | thioredoxin domain containing 11 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1923620] |
| Fam5c | family with sequence similarity 5, member C [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2443035] |

Şekil 5. 28.mmu-miR-132-3p hedeflerinde gerçekleştirilen biyolojik süreç analizi sonucu gruplanan gen kümesi

Çizelge 5. 4. İleri analizler için seçilen mRNA ve ilgili oldukları miRNAlar.

| miRNA adı | Kat değişiklik (RA / RA+PA) | miRSVR skor | Primer tasarlanan gen adı ve gen kimliği | Genin görevi veya açık adı |
|----------------|-----------------------------------|----------------|---|---|
| mmu-miR-486-5p | 23,97 | -1,59 | Cct4, Gene ID: 12464 | chaperonin containing Tcp1, subunit 4 (delta) |
| | | -2,29 | Srsf3, Gene ID: 20383 | serine/arginine-rich splicing factor 3 |
| | | -1,87 | Fam108b, Gene ID: 226016 | Abhd17b abhydrolase domain containing 17B |
| | | -1,58 | Twistnb, Gene ID: 28071 | TWIST neighbor |
| | | -1,29 | Chrac1, Gene ID: 93696 | chromatin accessibility complex 1 |
| | | -1,21 | Sp5, Gene ID:64406 | trans-acting transcription factor 5 |
| | | -0,2099 | Mapk9, Gene ID: 26420 | mitogen-activated protein kinase 9 |
| mmu-miR-2136 | 5,89 | -1,01 | Gnas Gene ID: 14683 | guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating |
| | | -1,4 | Ppm1d Gene ID: 53892 | protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform |
| | | -0,69 | Ssfa2 Gene ID: 70599 | sperm specific antigen 2 |
| | | -1,23 | Lbp Gene ID: 16803 | lipopolysaccharide binding protein |

| | | | | |
|----------------|-------|-------|-------------------------------|--|
| mmu-miR-132-3p | 4,73 | -2,48 | Lipm Gene ID: 78753 | lipase, family member M |
| | | -2,04 | DNAja2 Gene ID: 56445 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2 |
| | | -1,97 | Btc Gene ID: 12223 | betacellulin, epidermal growth factor family member |
| | | -1,48 | Ep300 Gene ID: 328572 | E1A binding protein p300 |
| | | -0,18 | Tram111 Gene ID: 229801 | translocation associated membrane protein 1-like 1 |
| | | -1,19 | Herpud1 Gene ID: 64209 | homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress- inducible, ubiquitin-like domain member 1 |
| | | -1,15 | Dusp9 | dual specificity phosphatase 9 |
| mmu-miR-1191 | 9,96 | -2,38 | Mtdh Gene ID: 67154 | metadherin |
| | | -1,9 | Rbmxrt Gene ID: 19656 | RNA binding motif protein, X linked-like-1 |
| | | -1,71 | Usp24 Gene ID: 329908 | ubiquitin specific peptidase 24 |
| | | -1,69 | Stk38 Gene ID: 106504 | serine/threonine kinase 38 |
| | | -1,45 | Hmga2 Gene ID: | high mobility group AT-hook 2 |
| | | -1,38 | Msr1 Gene ID: 20288 | macrophage scavenger receptor 1 |
| mmu-miR-542-5p | -3,62 | -1,16 | Sfrs13b Gene ID: | serine/arginine-rich splicing factor 12 |

| mmu-miR-486/Sfrs3 Alignment | |
|--|--|
| 3' gagcccCGUCGAGUCAUGUCCu 5' mmu-miR-486 42:5' cugacaGGAG-UAUGUACAGGa 3' Sfrs3 | mirSVR score: -1.1152 PhastCons score: 0.6629 |

Mouseover a miRNA mature name to see the miRNA/Sfrs3 alignment.

| Sfrs3 splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SRp20) | |
|---|--|
| mmu-miR-486/Fam108b Alignment | |
| 3' gagccccgucGAGUCAUGUCCu 5' mmu-miR-486 478:5' auauauacucCACUGUACAGGg 3' Fam108b | mirSVR score: -0.7161 PhastCons score: 0.6222 |

Mouseover a miRNA mature name to see the miRNA/Fam108b alignment.

| Fam108b family with sequence similarity 108, member B | |
|--|--|
| mmu-miR-486/Cct4 Alignment | |
| 3' gagccccgucGAGUCAUGUCCu 5' mmu-miR-486 : 625:5' guucauaugaUUGAGUACAGGc 3' Cct4 | mirSVR score: -0.6986 PhastCons score: 0.5000 |

Mouseover a miRNA mature name to see the miRNA/Cct4 alignment.

| Cct4 chaperonin containing Tcp1, subunit 4 (delta) | |
|--|--|
| mmu-miR-486/Twistnb Alignment | |
| 3' gagcccCGUCGAGU----CAUGUCCu 5' mmu-miR-486 : : 1140:5' augacaGCAAUUUAAUAUGUACAGGg 3' Twistnb | mirSVR score: -1.0628 PhastCons score: 0.5243 |

Mouseover a miRNA mature name to see the miRNA/Twistnb alignment.

| Twistnb TWIST neighbor | |
|--|--|
| mmu-miR-486/Chrac1 Alignment | |
| 3' gagcccCGUC-GAGU--CAUGUCCu 5' mmu-miR-486 : : 371:5' gacuauGCAGUUUUUAUGUACAGGa 3' Chrac1 | mirSVR score: -1.1921 PhastCons score: 0.5295 |

Mouseover a miRNA mature name to see the miRNA/Chrac1 alignment.

| Chrac1 chromatin accessibility complex 1 | |
|---|--|
| mmu-miR-486/Sp5 Alignment | |
| 3' gaGCCCCGUC-GAGUCAUGUCCu 5' mmu-miR-486 : : 363:5' ccCGAUUCGGACUUUGUACAGGg 3' Sp5 | mirSVR score: -1.2055 PhastCons score: 0.5965 |

Mouseover a miRNA mature name to see the miRNA/Sp5 alignment.

| Sp5 trans-acting transcription factor 5 | |
|---|--|
|---|--|

Şekil 5. 29. Bazı miRNA ve hedef mRNAlarının komplementeritesi

5.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

MiRNAome PCR Array sonuçlarını valide etmek amacıyla, Qiagen ROTOR-GENE Q platformunda 3 biyolojik tekrarlı çalışılan QRT-PCR sonuçları çizelge 5.5.'de gösterilmektedir. Lipotoksik ER stres sonucu ifadesi değişen miRNA hedef mRNAlarının ifade seviyesi QRT-PCR ile analiz edilmiştir. RA ve RA+PA kolonlarında 3 biyolojik tekrar ortalama Ct değerleri yer almaktadır. Kat artış $\Delta\Delta Ct$ metoduna göre formüle yerleştirilip hesaplanmıştır, palmitatla ER stres uygulanan örneğin kontrole göre ifadesinde değişim görülmektedir.

Tablo incelendiğinde kırılmış Xbp1 (sXbp1) -ki lipotoksik ER stres işaretçisidir-ifadesinde 2.8 katlık bir artış gözlenirken, diğer genlerde anlamlı artış veya beklendiği üzere azalmalar gözlenmemiştir. 2 kat ve üzeri değişiklik gösteren bir kaç gen ise 30 siklustan sonra ifade edilmeye başlandığı için tarafımızca anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 5. 5. QRT-PCR sonuçları (3 biyolojik tekrar ortalamaları)

| | RA | RA+PA | RA B-ACTIN | RA+PA B-ACTIN | 2 ^{^-ΔΔCt} | log2 |
|---------|-------|-------|------------|---------------|---------------------|-------|
| sXbp1 | 21,47 | 20,13 | 15,16 | 15,31 | 2,8 | 1,49 |
| Srsf3 | 16,89 | 17,04 | 18,42 | 18,44 | 0,91 | -0,13 |
| Fam108b | 21,16 | 21,17 | 18,42 | 18,44 | 1,01 | 0,01 |
| Cct4 | 18,08 | 17,72 | 18,42 | 18,44 | 1,3 | 0,38 |
| Twistnb | 21,16 | 20,91 | 18,42 | 18,44 | 1,21 | 0,27 |
| Mapk9 | 20,49 | 20,33 | 18,42 | 18,44 | 1,13 | 0,18 |
| Lipm | 18,85 | 18,7 | 18,42 | 18,44 | 1,13 | 0,17 |
| Sfrs13b | 16,86 | 16,75 | 18,42 | 18,44 | 1,09 | 0,13 |
| Dusp9 | 32,02 | 30,96 | 17,26 | 17,26 | 2,08 | 1,06 |
| Tram111 | 26,16 | 24,77 | 17,26 | 17,26 | 2,63 | 1,39 |
| Btc | 21,36 | 21,18 | 17,26 | 17,26 | 1,13 | 0,18 |
| Chrac1 | 20,13 | 20,14 | 17,26 | 17,26 | 0,99 | -0,01 |
| Herpud1 | 26,89 | 27,35 | 17,26 | 17,26 | 0,73 | -0,46 |
| Msr1 | 21,12 | 21,06 | 17,26 | 17,26 | 1,04 | 0,06 |
| Sp5 | 31,43 | 32,13 | 17,32 | 17,84 | 0,88 | -0,18 |
| Gnas | 21,55 | 21,77 | 17,26 | 17,26 | 0,86 | -0,22 |
| Dnaja2 | 36,62 | 35,69 | 17,26 | 17,26 | 1,91 | 0,93 |
| Ibp | 35,52 | 34,5 | 17,26 | 17,26 | 2,03 | 1,02 |
| Usp24 | 21,27 | 21,06 | 17,26 | 17,26 | 1,16 | 0,21 |
| Rbmxt1 | 21,8 | 21,76 | 17,26 | 17,26 | 1,03 | 0,04 |
| Stk38 | 16,99 | 17,63 | 17,32 | 17,84 | 0,92 | -0,12 |
| Mtdh | 18,03 | 17,86 | 17,32 | 17,84 | 1,61 | 0,69 |
| Hmga2 | 30,19 | 30,15 | 17,32 | 17,84 | 1,47 | 0,56 |
| Ep300 | 32,36 | 30,86 | 17,26 | 17,26 | 2,83 | 1,50 |

6.TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezite, tip 2 diyabet ve ateroskleroz gibi metabolik düzensizliklerde hücre içindeki serbest yağ asidi birikimine karşı koyamayan –yağ dokusu harici dokularda- hücrelerde Endoplasmik Retikulum (ER) stres ve lipotoksik hücre ölümü gerçekleşir. Ancak ER stresi metabolik dokularda kronikleştiği zaman, şişmanlık, diyabet, ateroskleroz gibi metabolik hastalıkların gelişimine yol açmaktadır. Son yıllarda tanımlanan ve gelişim, organogenez, kök hücre statüsünün idamesi, kanser gibi biyolojik süreçlerde rol alan mikroRNAların (miRNA) protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ını kontrol ettikleri tahmin edilmektedir. Memeli proteomunun yaklaşık %30'unun salgı yolları ile bağlantılı olduğu ve bu proteinlerin ER'da işlendiği düşünüldüğünde ER'un protein trafiği ve işlenmesi sürecindeki rolünün son derece önemli olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında lipotoksik ER stres durumundaki hücrelerde “miRNAom” profilleri tanımlanmış metabolik hastalıklarda rol oynayan aday mikroRNAlar belirlenmiştir.

mikroRNAlar gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan endojen küçük RNA molekülleridir. Hedef mRNAlar ile baz eşleşmesi temeline dayanan etkileşmeleri ile transkriptleri baskılayarak ya da yıkarak fonksiyon gösteren miRNAlar; gelişim, hücre farklılaşması, bağışıklık ve kanser gibi önemli biyolojik süreçlerde etkilidir.

Yapılan literatür çalışmalarında da görüldüğü gibi ER stres ile ilişkilendirilmiş pek çok miRNA vardır. ER stres ve KPY bileşenlerini araştırmak üzere gerçekleştirilen yüksek işlem hacimli miRNA mikrodizilimleri sonucu lipotoksitenin miRNA ifadesi üzerinde etkisi olduğu saptanmıştır. Pankreas Beta-hücrelerine serbest yağ asitleri verilerek, 132 adet miRNA'nın ifade seviyelerindeki değişiklikler analiz edilmiştir⁴³ Pek çok miRNA'nın yanısıra, mmu-miR-34a ve mmu-miR-146'nın pankreas beta-hücrelerinde artışı miRNA mikroarray ile gösterilmiş ve çalışmada bu iki miRNA üzerinde yoğunlaşmıştır. 2010'da kimerik tRNA kullanılarak hücrelerde ER stres durumu oluşturulmuş ve KPY aktivasyonu sonucunda yaklaşık 200 miRNA'nın ifade seviyesinde değişiklik olduğu tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen tezin amacı, lipotoksik endoplazmik retikulum stres sırasında katlanmamış protein yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan olası mikroRNAlar ve bunların regüle ettiği hedef mRNAlarının ve düzenledikleri yolların analiz edilmesidir. Bu amaçla fare

makrofaj hücre hattında (RAW 264.7) lipotoksik ER stres oluşturulmuştur. Adipositler ve makrofajlar tarafından fizyolojik koşullar ve metabolik hastalık durumlarında benzer sinyal yolları kullanıldığı ve obezitede kronik inflamasyon gözlemlendiği daha önce pek çok çalışmada gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında QRT-PCR temelli miScript miRNA array kullanılarak miRNAom analizi gerçekleştirilmiş ve lipotoksik ER stres sonucu ifadesi değişen miRNAlar tanımlanmıştır. Ardından biyoinformatik araçlar ve yolak analizleri ile miRNAların hedef genleri *in silico* tanımlanmış ve son olarak da bu hedef mRNAların QRT-PCR ile ifade seviyeleri analiz edilmiştir.

Çalışmada kullanılan hücreler, RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattı ER stres oluşturmak için satüre yağ asidi olan palmitat ile kültüre edilmiştir. 6 saat palmitat ile inkübasyondan sonra XBP1 mRNA'sının "kırpılmış" formunun varlığı RT-PCR ile kontrol edilerek lipotoksik ER stres yolu ile KPY'nin aktive edildiği doğrulanmıştır.

KPY'nin aktive edildiği RAW 264.7 ve RAW 264.7+ palmitat hücrelerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Böylece "Qiagen miRNAome PCR Array" için kullanılacak başlangıç materyali hazır duruma gelmiştir. Yapılan biyoinformatik analizler sonucu gerçekten anlamlı değişim gözlenen miRNAlar için literatür ve mikroRNA veri tabanları taranmış, analizleri yapılmıştır. İfadesi anlamlı olarak değişen miRNAlar *in vitro* ve *in silico* analizler için seçilmiş, miRNAlardan bir kısmının yolak analizleri ile düzenledikleri yollar ve hedef mRNAları belirlenerek ifade seviyeleri biyolojik tekrarlarla incelenmiştir.

Lipotoksik ER stres sürecinde rol oynayan miRNAları tanımlamayı hedefleyen bu tez çalışmasında 43 miRNA ifadesinde anlamlı artış azalış gözlenmiş ve aşağıdaki miRNAların hedefleri ile ileri analizler gerçekleştirilmiştir. Yalnız ifadesi değişen 43 miRNAdan sadece 9'unun hedef gen listelerine ulaşarak yolak analizleri gerçekleştirilebilmiştir. Bunlardan da yalnızca 5 tanesinin hedef genlerine primer tasarlanabilmiştir.

mmu-miR-1191

mmu-miR-132-3p

mmu-miR-2136

mmu-miR-486-5p

mmu-miR-124-3p

mmu-miR-449a-5p

mmu-miR-125a-3p mikroRNAları miRNAome PCR Array sonucunda artış gösteren gruptadır ve hedef genlerine ulaşılarak yolak analizi gerçekleştirilebilmiştir.

mmu-miR-542-5p ve mmu-miR-294-3p mikroRNAları ise ifadesi azalan gruptadır ve hedef genlerine ulaşılarak yolak analizi gerçekleştirilebilmiştir.

Biyolojik tekrarlı gerçekleştirilen miRNAome çalışması, son derece yakın değerler vermiştir. Bu da sonuçları güvenilir kılmaktadır. Yolak analizleri ile bu süreçte ifadesi düzenlenen hedef mRNAlar da belirlenmiştir. İfadesi artan miRNAların hedef mRNAlarının azalması, ifadesi azalan miRNAların da hedef mRNAlarının artması beklenmektedir. Ancak miRNAlar nihai etkilerini protein seviyesinde göstermektedirler. Dolayısı ile mRNA QRT-PCR analizlerinde mRNA degradasyonu yerine translasyonel represyon da olabileceği için mRNA seviyesinde azalma/artma görülmeyebilir.

mmu-miR-1191: Bu miRNA için seçilen “RNA bağlama motif proteini”, “ubikutin”, “serin/treonin kinaz” gibi lipotoksik ER stres ile bağlantılı olan Mtdh, Rbmxrt, Usp24, Stk38, Hmga2, Msr1 hedef mRNAları için QRT-PCR ile ifade seviyeleri analiz edilmiş ve anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir.

mmu-miR-132-3p: “Lipaz ailesi”, “epidermal büyüme faktörü”, “E1A binding proteini” ile ilgili olan Lipm, DNAja2, Btc, Ep300, Tram111, Herpud1, Dusp9 mRNAlarını *in silico* regüle eden bu mikroRNA'nın hedef mRNAları için hedef mRNAları için QRT-PCR ile ifade seviyeleri analiz edilmiş ve anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir.

mmu-miR-2136: Gnas,Ppm1d,Ssfa2,lbp protein fosfataz ve lipopolisakkarit binding proteinini içeren hedef mRNAların QRT-PCR ile ifade seviyeleri analiz edilmiş ve anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir.

mmu-miR-486: Şaperonlarla ve serin-arginin splicing ile ilişkili seçilen hedef mRNAlar Srsf3, Fam108b, Cct4, Twistnb, Chrac1, Sp5, Mapk9'dur. QRT-PCR ile ifade seviyeleri analiz edilmiş ve anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir.

mmu-miR-542-5p: Bu mikroRNA miRNAom analizinde lipotoksik ER stres sonrası ifadesi azalan grupta yer almaktadır. Serin, arginin amino asitleri ile ilişkili olan srsf13b hedef mRNAsı belirlenmiştir. QRT-PCR sonuçlarında ise beklenen bir artma görülmemiştir.

Tez çalışmasında lipotoksik ER stres sürecinde KPY'nın düzenlenmesinde rol oynayan miRNAlar ve bunların regüle ettikleri yolaklar tanımlanmaya çalışılmıştır. miRNAom analizi biyolojik tekrarlı gerçekleştirilmiş ve tekrarlar son derece tutarlı çıkmıştır; bu da sonuçları güvenilir kılmaktadır. Benzer şekilde QRT-PCR analizleri ise üç biyolojik tekrarla gerçekleştirilmiştir. İfadesi değişen miRNAlar belirlendikten sonra yolak analizleri ile bu süreçte ifadesi düzenlenen hedef mRNAlar da belirlenmiştir. İfadesi artan miRNAların hedef mRNAlarının azalması, ifadesi azalan miRNAların da hedef mRNAlarının artması beklenmektedir. Ancak miRNAlar nihai etkilerini protein seviyesinde göstermektedirler. Dolayısı ile mRNA QRT-PCR analizlerinde mRNA degradasyonu yerine translasyonel represyon da olabileceği için mRNA seviyesinde azalma/artma görülmeyebilir. Fare miRNA hedef tahminleri için kullanılan programlara bakıldığında her miRNA için 3000-6000 civarı hedef mRNA gözlenmiştir, yolak analizleri sonrası ER stres ile ilgili olan ve seed bölgeye olan komplementeriteye göre hedefler seçilse de QRT-PCR sonuçlarında beklenildiği kadar yüksek seviyede azalma/artma gözlenmemiştir. Bu yüzden QRT-PCR analizleri önce LightCycler 480 ardından RotorGene Q platformunda gerçekleştirilmiştir. LightCycler sonuçları tez çalışmasına eklenmemiştir. Ancak sonuçlarda görüldüğü gibi seçilen genlerin ifadeleri anlamlı olarak değişmemiştir.

Bundan sonra, aynı hedef genlerin immünblotlama ile protein seviyeleri de analiz edilebilir çünkü miRNAlar bazen hedef mRNA transkripti yıkmak yerine protein seviyesi üzerinde etki gösterebilirler. İfadesi değişen bu ve diğer miRNAlar ile pek çok fonksiyonel çalışma da gerçekleştirilebilir. Hedef mRNAların 3'UTR bölgelerinin lusiferaz veya GFP raportör füzyonu ile ifadesi sonucu o miRNAnın gerçekten hedefi regüle edip etmediği gösterilmeli, antagomiR kullanılarak hedef mRNA/protein seviyeleri incelenmelidir. Böylece bu miRNAların obezite hayvan modellerinde KPY düzenlenmesine olan etkileri analiz edilebilecektir. Ayrıca miRNAlar tarafından düzenlenen yeni bir metabolik yol literatüre eklenebilir ve antagomiRlerin metabolik hastalıkların tedavisinde kullanımı söz konusu olabilecektir.

7.KAYNAKLAR

1. Lee C, Ferguson M, Chen LB. Construction of the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*. Nov 1989;109(5):2045-2055.
2. Placido AI, Pereira CM, Duarte AI, et al. The role of endoplasmic reticulum in amyloid precursor protein processing and trafficking: Implication's for Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*. May 14 2014.
3. Cao SS, Kaufman RJ. Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease. *Expert opinion on therapeutic targets*. Apr 2013;17(4):437-448.
4. Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Mar 2013;5(3):a013169.
5. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. Jan 23 2009;136(2):215-233.
6. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. Dec 3 1993;75(5):843-854.
7. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. Oct 26 2001;294(5543):858-862.
8. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. Oct 26 2001;294(5543):862-864.
9. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. Oct 26 2001;294(5543):853-858.
10. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation. *Rna*. Mar 2003;9(3):277-279.
11. Leung AK, Sharp PA. Function and localization of microRNAs in mammalian cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2006;71:29-38.
12. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. Jan 2009;19(1):92-105.
13. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer science*. Nov 2010;101(11):2309-2315.
14. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. Jan 2 2004;303(5654):95-98.
15. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology*. Jun 2007;22:193-201.
16. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. Oct 2004;71(5):289-297.
17. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. Apr 2005;35(4):373-381.
18. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxidants & redox signaling*. Sep 2009;11(9):2307-2316.
19. Wormald MR, Dwek RA. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure*. Jul 15 1999;7(7):R155-160.
20. Maattanen P, Gehring K, Bergeron JJ, Thomas DY. Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Seminars in cell & developmental biology*. Jul 2010;21(5):500-511.

21. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. Jul 24 2008;454(7203):455-462.
22. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*. Jun 2000;2(6):326-332.
23. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. Jan 21 1999;397(6716):271-274.
24. Shi Y, Vattem KM, Sood R, et al. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Molecular and cellular biology*. Dec 1998;18(12):7499-7509.
25. Liu CY, Schroder M, Kaufman RJ. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. Aug 11 2000;275(32):24881-24885.
26. Haze K, Okada T, Yoshida H, et al. Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *The Biochemical journal*. Apr 1 2001;355(Pt 1):19-28.
27. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *The Journal of biological chemistry*. Apr 12 2002;277(15):13045-13052.
28. Shen J, Prywes R. Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6. *The Journal of biological chemistry*. Oct 8 2004;279(41):43046-43051.
29. Ye J, Rawson RB, Komuro R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular cell*. Dec 2000;6(6):1355-1364.
30. Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *The Journal of clinical investigation*. Nov 2002;110(10):1383-1388.
31. Maurel M, Chevet E. Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *American journal of physiology. Cell physiology*. Jun 15 2013;304(12):C1117-1126.
32. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology*. 2002;18:575-599.
33. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. Aug 2009;14(8):996-1007.
34. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*. Sep 2006;7(9):880-885.
35. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *The Biochemical journal*. Sep 1 2002;366(Pt 2):585-594.
36. Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *Journal of molecular biology*. May 17 2002;318(5):1351-1365.
37. Hussain SG, Ramaiah KV. Reduced eIF2alpha phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging. *Biochemical and biophysical research communications*. Apr 6 2007;355(2):365-370.

38. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiological reviews*. Oct 2006;86(4):1133-1149.
39. Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. Jan 28 2000;287(5453):664-666.
40. Jing G, Wang JJ, Zhang SX. ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:589589.
41. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*. Jul 2004;5(7):522-531.
42. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. Dec 1 2005;438(7068):685-689.
43. Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, et al. Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes*. Oct 2008;57(10):2728-2736.
44. Geslain R, Cubells L, Bori-Sanz T, et al. Chimeric tRNAs as tools to induce proteome damage and identify components of stress responses. *Nucleic acids research*. Mar 2010;38(5):e30.
45. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*. Nov 2003;23(21):7448-7459.
46. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*. Jul 2004;21(1):81-93.
47. Byrd AE, Brewer JW. Micro(RNA)managing endoplasmic reticulum stress. *IUBMB life*. May 2013;65(5):373-381.
48. Bartoszewska S, Kochan K, Madanecki P, et al. Regulation of the unfolded protein response by microRNAs. *Cellular & molecular biology letters*. Dec 2013;18(4):555-578.
49. Maziere P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. *Drug discovery today*. Jun 2007;12(11-12):452-458.
50. Kiran C, Deepika P. Lung cancer: microRNA and target database. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*. Jul 2012;15(7):429-434.
51. Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of Drosophila MicroRNA targets. *PLoS biology*. Dec 2003;1(3):E60.
52. Bernales S, Papa FR, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology*. 2006;22:487-508.
53. Borradaile NM, Han X, Harp JD, Gale SE, Ory DS, Schaffer JE. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *Journal of lipid research*. Dec 2006;47(12):2726-2737.
54. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nov 26 2002;99(24):15524-15529.
55. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature reviews. Immunology*. Dec 2008;8(12):923-934.

8.EKLER

EK 1. PCR Array üzerinde yer alan miRNA listesi (Mus musculus miRNAome, katalog no: MIMM-3216Z)

| | Plate 1 | Plate2 | Plate3 | | Plate 1 | Plate2 | Plate3 |
|-----|-----------------|-----------------|------------------|-----|-----------------|-------------------|--------------------------------------|
| A01 | mmu-miR-183-5p | mmu-miR-1898 | mmu-miR-1894-5p | I01 | mmu-miR-196a-5p | mmu-miR-764-5p | mmu-let-7a-1-3p // mmu-let-7c-2-3p |
| A02 | mmu-miR-877-5p | mmu-miR-1899 | mmu-miR-1929-5p | I02 | mmu-miR-380-3p | mmu-miR-3087-5p | mmu-miR-28a-5p // mmu-miR-28c |
| A03 | mmu-miR-15b-5p | mmu-miR-18a-3p | mmu-miR-194-2-3p | I03 | mmu-miR-701-5p | mmu-miR-3072-5p | mmu-miR-3096a-5p // mmu-miR-3096b-5p |
| A04 | mmu-miR-9-3p | mmu-miR-190a-5p | mmu-miR-653-3p | I04 | mmu-miR-350-3p | mmu-miR-369-3p | mmu-miR-3096a-3p // mmu-miR-3096b-3p |
| A05 | mmu-miR-199a-5p | mmu-miR-1900 | mmu-miR-3110-5p | I05 | mmu-miR-154-3p | mmu-miR-1936 | Empty |
| A06 | mmu-miR-369-5p | mmu-miR-1901 | mmu-miR-326-5p | I06 | mmu-miR-467c-5p | mmu-miR-135a-1-3p | Empty |
| A07 | mmu-miR-101a-3p | mmu-miR-1902 | mmu-miR-1930-3p | I07 | mmu-miR-125a-3p | mmu-miR-1251-3p | Empty |
| A08 | mmu-miR-324-5p | mmu-miR-1903 | mmu-miR-3080-5p | I08 | mmu-let-7c-5p | mmu-miR-3066-5p | Empty |
| A09 | mmu-miR-292-3p | mmu-miR-1904 | mmu-miR-32-3p | I09 | mmu-miR-881-5p | mmu-miR-1981-5p | Empty |
| A10 | mmu-miR-676-3p | mmu-miR-1905 | mmu-miR-873a-3p | I10 | mmu-miR-674-5p | mmu-miR-1247-5p | Empty |
| A11 | mmu-miR-194-5p | mmu-miR-1906 | mmu-miR-379-5p | I11 | mmu-miR-654-3p | mmu-miR-146a-3p | Empty |
| A12 | mmu-miR-449a-5p | mmu-miR-191-3p | mmu-miR-3088-3p | I12 | mmu-miR-546 | mmu-miR-223-5p | Empty |
| A13 | mmu-miR-712-5p | mmu-miR-1928 | mmu-miR-200c-3p | I13 | mmu-miR-100-5p | mmu-miR-205-3p | Empty |
| A14 | mmu-miR-34b-5p | mmu-miR-193a-5p | mmu-miR-34a-3p | I14 | mmu-miR-20b-5p | mmu-miR-2183 | Empty |
| A15 | mmu-miR-470-5p | mmu-miR-1935 | mmu-miR-143-5p | I15 | mmu-miR-362-5p | mmu-miR-1b-5p | Empty |
| A16 | mmu-miR-184-3p | mmu-miR-1938 | mmu-miR-3070b-3p | I16 | mmu-miR-133a-3p | mmu-miR-133b-5p | Empty |
| A17 | mmu-miR-193b-3p | mmu-miR-1942 | mmu-miR-1251-5p | I17 | mmu-miR-700-3p | mmu-miR-26a-1-3p | Empty |
| A18 | mmu-miR-431-5p | mmu-miR-1946a | mmu-miR-3059-5p | I18 | mmu-miR-615-3p | mmu-miR-363-3p | Empty |
| A19 | mmu-miR-483-3p | mmu-miR-1947-5p | mmu-miR-1843a-3p | I19 | mmu-miR-467e-5p | mmu-miR-677-3p | Empty |
| A20 | mmu-miR-449c-5p | mmu-miR-1948-3p | mmu-miR-1948-5p | I20 | mmu-miR-708-5p | mmu-miR-1933-5p | Empty |
| A21 | mmu-miR-149-5p | mmu-miR-1949 | mmu-miR-377-5p | I21 | mmu-miR-217-5p | mmu-miR-370-5p | Empty |
| A22 | mmu-miR-215-5p | mmu-miR-1950 | mmu-miR-432 | I22 | mmu-miR-301a-3p | mmu-miR-1981-3p | Empty |
| A23 | mmu-miR-191-5p | mmu-miR-1954 | mmu-miR-3065-3p | I23 | mmu-miR-140-3p | mmu-miR-3064-3p | Empty |
| A24 | mmu-miR-331-5p | mmu-miR-1957a | mmu-miR-1952 | I24 | mmu-miR-503-5p | mmu-miR-3105-3p | Empty |

| | | | | | | | |
|-----|-----------------|------------------------------------|-------------------|-----|-----------------|------------------|-------|
| B01 | mmu-miR-200b-5p | mmu-miR-1962 | mmu-miR-208b-5p | J01 | mmu-let-7d-5p | mmu-miR-679-3p | Empty |
| B02 | mmu-miR-92a-3p | mmu-miR-1983 | mmu-miR-696 | J02 | mmu-miR-335-3p | mmu-miR-3062-5p | Empty |
| B03 | mmu-miR-770-3p | mmu-miR-199b-5p | mmu-miR-135a-2-3p | J03 | mmu-miR-26b-5p | mmu-miR-3105-5p | Empty |
| B04 | mmu-miR-326-3p | mmu-miR-200a-5p | mmu-miR-3082-3p | J04 | mmu-miR-542-3p | mmu-miR-3083-5p | Empty |
| B05 | mmu-miR-210-3p | mmu-miR-203-5p | mmu-miR-3108-3p | J05 | mmu-miR-19a-5p | mmu-miR-3098-3p | Empty |
| B06 | mmu-miR-216a-5p | mmu-miR-204-5p | mmu-miR-182-3p | J06 | mmu-miR-135b-5p | mmu-miR-3061-3p | Empty |
| B07 | mmu-miR-125a-5p | mmu-miR-207 | mmu-miR-3079-5p | J07 | mmu-miR-720 | mmu-miR-539-3p | Empty |
| B08 | mmu-miR-126-5p | mmu-miR-20a-3p | mmu-miR-18b-3p | J08 | mmu-miR-195a-5p | mmu-miR-486-3p | Empty |
| B09 | mmu-miR-376c-3p | mmu-miR-20b-3p | mmu-miR-871-5p | J09 | mmu-miR-711 | mmu-miR-3101-5p | Empty |
| B10 | mmu-miR-466g | mmu-miR-218-1-3p | mmu-miR-19b-1-5p | J10 | mmu-miR-34a-5p | mmu-miR-215-3p | Empty |
| B11 | mmu-miR-138-5p | mmu-miR-218-2-3p | mmu-miR-1956 | J11 | mmu-miR-130b-3p | mmu-miR-136-5p | Empty |
| B12 | mmu-miR-346-5p | mmu-miR-22-5p | mmu-miR-701-3p | J12 | mmu-let-7e-5p | mmu-miR-329-5p | Empty |
| B13 | mmu-miR-18a-5p | mmu-miR-24-1-5p | mmu-miR-1264-5p | J13 | mmu-miR-681 | mmu-miR-541-3p | Empty |
| B14 | mmu-miR-665-3p | mmu-miR-24-2-5p | mmu-miR-652-5p | J14 | mmu-miR-188-3p | mmu-miR-760-3p | Empty |
| B15 | mmu-miR-345-3p | mmu-miR-26a-5p | mmu-miR-493-5p | J15 | mmu-miR-32-5p | mmu-miR-1955-3p | Empty |
| B16 | mmu-miR-290-5p | mmu-miR-26b-3p | mmu-miR-1a-2-5p | J16 | mmu-let-7i-5p | mmu-miR-224-3p | Empty |
| B17 | mmu-let-7f-5p | mmu-miR-27a-5p | mmu-miR-132-5p | J17 | mmu-miR-208b-3p | mmu-miR-302d-5p | Empty |
| B18 | mmu-miR-134-5p | mmu-miR-28a-3p | mmu-miR-3072-3p | J18 | mmu-miR-135a-5p | mmu-miR-1968-5p | Empty |
| B19 | mmu-miR-216b-5p | mmu-miR-293-3p | mmu-miR-1947-3p | J19 | mmu-miR-707 | mmu-miR-1953 | Empty |
| B20 | mmu-miR-362-3p | mmu-miR-293-5p | mmu-miR-1197-3p | J20 | mmu-miR-298-5p | mmu-miR-302a-3p | Empty |
| B21 | mmu-miR-434-5p | mmu-miR-294-3p | mmu-miR-27b-5p | J21 | mmu-miR-666-3p | mmu-miR-3058-3p | Empty |
| B22 | mmu-miR-342-3p | mmu-miR-295-5p | mmu-miR-3074-5p | J22 | mmu-miR-181b-5p | mmu-miR-3094-5p | Empty |
| B23 | mmu-miR-125b-5p | mmu-miR-297b-5p | mmu-miR-673-3p | J23 | mmu-miR-466c-5p | mmu-miR-463-3p | Empty |
| B24 | mmu-miR-874-3p | mmu-miR-297c-5p | mmu-miR-669f-3p | J24 | mmu-miR-384-3p | mmu-miR-344g-3p | Empty |
| C01 | mmu-miR-672-5p | mmu-miR-299a-5p // mmu-miR-299b-5p | mmu-miR-3472 | K01 | mmu-miR-200c-5p | mmu-miR-3091-3p | Empty |
| C02 | mmu-miR-382-5p | mmu-miR-29a-5p | mmu-miR-3093-3p | K02 | mmu-miR-140-5p | mmu-miR-92b-5p | Empty |
| C03 | mmu-miR-872-5p | mmu-miR-29c-5p | mmu-miR-196a-2-3p | K03 | mmu-miR-7a-5p | mmu-miR-3093-5p | Empty |
| C04 | mmu-miR-484 | mmu-miR-300-5p | mmu-miR-3083-3p | K04 | mmu-miR-185-5p | mmu-miR-1b-3p | Empty |
| C05 | mmu-miR-688 | mmu-miR-302b-5p | mmu-miR-1298-3p | K05 | mmu-miR-496a-3p | mmu-miR-466l-3p | Empty |
| C06 | mmu-miR-122-5p | mmu-miR-30a-3p | mmu-miR-490-5p | K06 | mmu-miR-129-5p | mmu-miR-592-5p | Empty |
| C07 | mmu-miR-710 | mmu-miR-30b-3p | mmu-miR-450a-1-3p | K07 | mmu-miR-758-3p | mmu-miR-138-2-3p | Empty |
| C08 | mmu-miR-455-3p | mmu-miR-30c-1-3p | mmu-miR-760-5p | K08 | mmu-miR-128-3p | mmu-miR-3097-3p | Empty |
| C09 | mmu-miR-880-3p | mmu-miR-30c-2-3p | mmu-miR-101b-5p | K09 | mmu-miR-30e-5p | mmu-miR-298-3p | Empty |
| C10 | mmu-miR-485-5p | mmu-miR-30e-3p | mmu-miR-669b-3p | K10 | mmu-miR-339-5p | mmu-miR-3067-5p | Empty |
| C11 | mmu-miR-146a-5p | mmu-miR-31-3p | mmu-miR-136-3p | K11 | mmu-miR-337-3p | mmu-miR-3080-3p | Empty |

| | | | | | | | |
|-----|-----------------|-----------------|------------------------------------|-----|-----------------|-------------------|-------|
| C12 | mmu-miR-489-3p | mmu-miR-325-5p | mmu-miR-3102-3p | K12 | mmu-miR-342-5p | mmu-miR-3106-3p | Empty |
| C13 | mmu-miR-21a-5p | mmu-miR-33-3p | mmu-miR-297a-5* | K13 | mmu-miR-20a-5p | mmu-miR-599 | Empty |
| C14 | mmu-miR-196b-5p | mmu-miR-330-3p | mmu-miR-1965 | K14 | mmu-miR-429-3p | mmu-miR-206-5p | Empty |
| C15 | mmu-miR-137-3p | mmu-miR-339-3p | mmu-miR-99a-3p | K15 | mmu-miR-141-3p | mmu-miR-344c-5p | Empty |
| C16 | mmu-miR-377-3p | mmu-miR-340-5p | mmu-miR-1839-5p | K16 | mmu-miR-7b-5p | mmu-miR-1197-5p | Empty |
| C17 | mmu-miR-654-5p | mmu-miR-365-3p | mmu-miR-92a-2-5p | K17 | mmu-miR-93-5p | mmu-miR-127-3p | Empty |
| C18 | mmu-miR-677-5p | mmu-miR-374b-3p | mmu-miR-667-5p | K18 | mmu-miR-30c-5p | mmu-miR-421-5p | Empty |
| C19 | mmu-miR-671-3p | mmu-miR-376a-5p | mmu-miR-3076-5p | K19 | mmu-miR-543-3p | mmu-miR-665-5p | Empty |
| C20 | mmu-miR-466d-3p | mmu-miR-376b-3p | mmu-miR-383-3p | K20 | mmu-miR-10a-5p | mmu-miR-1968-3p | Empty |
| C21 | mmu-miR-224-5p | mmu-miR-376c-5p | mmu-miR-466h-5p | K21 | mmu-miR-449b | mmu-miR-3063-3p | Empty |
| C22 | mmu-miR-434-3p | mmu-miR-378a-5p | mmu-miR-3057-5p | K22 | mmu-miR-338-3p | mmu-miR-193b-5p | Empty |
| C23 | mmu-miR-375-3p | mmu-miR-382-3p | mmu-miR-3082-5p | K23 | mmu-miR-214-3p | mmu-miR-210-5p | Empty |
| C24 | mmu-miR-302b-3p | mmu-miR-410-3p | mmu-miR-18b-5p | K24 | mmu-miR-574-3p | mmu-miR-3060-3p | Empty |
| D01 | mmu-miR-652-3p | mmu-miR-411-3p | mmu-miR-1955-5p | L01 | mmu-miR-335-5p | mmu-miR-3084-5p | Empty |
| D02 | mmu-miR-330-5p | mmu-miR-425-3p | mmu-miR-134-3p | L02 | mmu-miR-453 | mmu-miR-491-5p | Empty |
| D03 | mmu-miR-495-3p | mmu-miR-433-5p | mmu-miR-466l-5p | L03 | mmu-miR-291a-3p | mmu-miR-3078-5p | Empty |
| D04 | mmu-miR-667-3p | mmu-miR-450b-5p | mmu-miR-431-3p | L04 | mmu-miR-211-5p | mmu-miR-29b-1-5p | Empty |
| D05 | mmu-miR-341-3p | mmu-miR-455-5p | mmu-miR-3112-5p | L05 | mmu-miR-684 | mmu-miR-19b-2-5p | Empty |
| D06 | mmu-miR-541-5p | mmu-miR-463-5p | mmu-miR-379-3p | L06 | mmu-miR-27b-3p | mmu-miR-494-5p | Empty |
| D07 | mmu-miR-30d-5p | mmu-miR-466j | mmu-miR-219-1-3p | L07 | mmu-miR-205-5p | mmu-miR-344d-3p | Empty |
| D08 | mmu-miR-582-3p | mmu-miR-466k | mmu-miR-129-1-3p | L08 | mmu-miR-683 | mmu-miR-410-5p | Empty |
| D09 | mmu-let-7a-5p | mmu-miR-467b-5p | mmu-miR-1198-5p | L09 | mmu-miR-337-5p | mmu-miR-344d-2-5p | Empty |
| D10 | mmu-miR-376a-3p | mmu-miR-467f | mmu-miR-1193-5p | L10 | mmu-miR-742-3p | mmu-miR-128-1-5p | Empty |
| D11 | mmu-miR-34b-3p | mmu-miR-467h | mmu-miR-7b-3p | L11 | mmu-miR-384-5p | mmu-miR-1188-3p | Empty |
| D12 | mmu-miR-21a-3p | mmu-miR-470-3p | mmu-miR-153-5p | L12 | mmu-miR-325-3p | mmu-miR-25-5p | Empty |
| D13 | mmu-miR-487b-3p | mmu-miR-485-3p | mmu-miR-3071-3p | L13 | mmu-miR-501-5p | mmu-miR-1247-3p | Empty |
| D14 | mmu-miR-22-3p | mmu-miR-488-5p | mmu-miR-664-3p | L14 | mmu-miR-324-3p | mmu-miR-468-3p | Empty |
| D15 | mmu-miR-721 | mmu-miR-493-3p | mmu-miR-200b-3p | L15 | mmu-miR-423-3p | mmu-miR-190a-3p | Empty |
| D16 | mmu-miR-504-5p | mmu-miR-503-3p | mmu-miR-1907 | L16 | mmu-miR-451a | mmu-miR-214-5p | Empty |
| D17 | mmu-miR-200a-3p | mmu-miR-540-3p | mmu-miR-3475 | L17 | mmu-miR-132-3p | mmu-miR-1969 | Empty |
| D18 | mmu-miR-378a-3p | mmu-miR-551b-3p | mmu-miR-3075-3p | L18 | mmu-miR-669b-5p | mmu-miR-1943-3p | Empty |
| D19 | mmu-miR-29c-3p | mmu-miR-568 | mmu-miR-471-3p | L19 | mmu-miR-153-3p | mmu-miR-3086-3p | Empty |
| D20 | mmu-miR-294-5p | mmu-miR-598-3p | mmu-miR-344e-5p // mmu-miR-344h-5p | L20 | mmu-miR-96-5p | mmu-miR-3471 | Empty |
| D21 | mmu-miR-467b-3p | mmu-miR-615-5p | mmu-miR-547-5p | L21 | mmu-miR-1a-3p | mmu-miR-217-3p | Empty |
| D22 | mmu-miR-340-3p | mmu-miR-666-5p | mmu-miR-208a-5p | L22 | mmu-miR-10b-5p | mmu-miR-1970 | Empty |

| | | | | | | | |
|-----|-----------------|-----------------|-------------------|-----|-----------------|-------------------|-------|
| D23 | mmu-miR-290-3p | mmu-miR-669e-5p | mmu-let-7e-3p | L23 | mmu-miR-653-5p | mmu-miR-301b-5p | Empty |
| D24 | mmu-miR-380-5p | mmu-miR-669g | mmu-miR-367-3p | L24 | mmu-miR-383-5p | mmu-miR-2137 | Empty |
| E01 | mmu-miR-744-5p | mmu-miR-669h-3p | mmu-miR-598-5p | M01 | mmu-miR-300-3p | mmu-miR-363-5p | Empty |
| E02 | mmu-miR-500-3p | mmu-miR-669h-5p | mmu-miR-195a-3p | M02 | mmu-miR-9-5p | mmu-miR-375-5p | Empty |
| E03 | mmu-miR-155-5p | mmu-miR-669i | mmu-miR-1224-5p | M03 | mmu-miR-743b-5p | mmu-miR-664-5p | Empty |
| E04 | mmu-miR-101b-3p | mmu-miR-669j | mmu-miR-320-5p | M04 | mmu-miR-421-3p | mmu-miR-1941-3p | Empty |
| E05 | mmu-miR-875-3p | mmu-miR-669k-3p | mmu-miR-3064-5p | M05 | mmu-miR-148a-3p | mmu-miR-7a-2-3p | Empty |
| E06 | mmu-miR-29a-3p | mmu-miR-674-3p | mmu-miR-3068-5p | M06 | mmu-miR-181d-5p | mmu-miR-412-5p | Empty |
| E07 | mmu-miR-302c-5p | mmu-miR-675-3p | mmu-miR-1930-5p | M07 | mmu-miR-223-3p | mmu-miR-3070a-3p | Empty |
| E08 | mmu-miR-130a-3p | mmu-miR-676-5p | mmu-miR-212-3p | M08 | mmu-miR-763 | mmu-miR-669o-5p | Empty |
| E09 | mmu-miR-882 | mmu-miR-682 | mmu-miR-100-3p | M09 | mmu-miR-702-3p | mmu-miR-743a-5p | Empty |
| E10 | mmu-miR-542-5p | mmu-miR-693-3p | mmu-miR-874-5p | M10 | mmu-miR-488-3p | mmu-miR-344f-3p | Empty |
| E11 | mmu-miR-203-3p | mmu-miR-693-5p | mmu-miR-128-2-5p | M11 | mmu-miR-15a-5p | mmu-miR-1934-5p | Empty |
| E12 | mmu-miR-27a-3p | mmu-miR-694 | mmu-miR-543-5p | M12 | mmu-miR-24-3p | mmu-miR-551b-5p | Empty |
| E13 | mmu-miR-301b-3p | mmu-miR-695 | mmu-miR-3104-3p | M13 | mmu-miR-124-3p | mmu-miR-144-5p | Empty |
| E14 | mmu-miR-331-3p | mmu-miR-697 | mmu-miR-181c-3p | M14 | mmu-miR-127-5p | mmu-miR-154-5p | Empty |
| E15 | mmu-miR-34c-5p | mmu-miR-708-3p | mmu-miR-544-5p | M15 | mmu-miR-450b-3p | mmu-miR-3095-5p | Empty |
| E16 | mmu-miR-218-5p | mmu-miR-709 | mmu-miR-381-5p | M16 | mmu-miR-221-3p | mmu-miR-3075-5p | Empty |
| E17 | mmu-miR-302d-3p | mmu-miR-741-3p | mmu-miR-505-3p | M17 | mmu-miR-202-5p | mmu-miR-504-3p | Empty |
| E18 | mmu-miR-187-3p | mmu-miR-742-5p | mmu-miR-138-1-3p | M18 | mmu-miR-678 | mmu-miR-344d-3-5p | Empty |
| E19 | mmu-miR-188-5p | mmu-miR-743b-3p | mmu-miR-3060-5p | M19 | mmu-miR-193a-3p | mmu-miR-1971 | Empty |
| E20 | mmu-miR-139-5p | mmu-miR-744-3p | mmu-miR-3088-5p | M20 | mmu-miR-99a-5p | mmu-miR-1967 | Empty |
| E21 | mmu-miR-19a-3p | mmu-miR-872-3p | mmu-miR-1a-1-5p | M21 | mmu-miR-547-3p | mmu-miR-669k-5p | Empty |
| E22 | mmu-miR-343 | mmu-miR-877-3p | mmu-miR-450a-2-3p | M22 | mmu-miR-151-3p | mmu-miR-16-1-3p | Empty |
| E23 | mmu-miR-295-3p | mmu-miR-878-5p | mmu-let-7f-2-3p | M23 | mmu-miR-33-5p | mmu-miR-491-3p | Empty |
| E24 | mmu-miR-181c-5p | mmu-miR-879-5p | mmu-miR-3091-5p | M24 | mmu-miR-497-5p | mmu-miR-1931 | Empty |
| F01 | mmu-miR-23b-3p | mmu-miR-879-3p | mmu-miR-367-5p | N01 | mmu-miR-23a-3p | mmu-miR-344f-5p | Empty |
| F02 | mmu-miR-532-5p | mmu-miR-93-3p | mmu-miR-351-3p | N02 | mmu-miR-582-5p | mmu-miR-1306-3p | Empty |
| F03 | mmu-miR-876-5p | mmu-miR-99b-3p | mmu-miR-1927 | N03 | mmu-miR-761 | mmu-miR-691 | Empty |
| F04 | mmu-miR-133b-3p | mmu-miR-1946b | mmu-miR-106a-3p | N04 | mmu-miR-465a-5p | mmu-miR-487b-5p | Empty |
| F05 | mmu-miR-192-5p | mmu-miR-881-3p | mmu-miR-23a-5p | N05 | mmu-miR-687 | mmu-miR-717 | Empty |
| F06 | mmu-miR-883a-3p | mmu-miR-297a-5p | mmu-let-7a-2-3p | N06 | mmu-miR-106b-5p | mmu-miR-1224-3p | Empty |
| F07 | mmu-miR-883b-3p | mmu-miR-30d-3p | mmu-miR-873a-5p | N07 | mmu-miR-152-3p | mmu-miR-216a-3p | Empty |
| F08 | mmu-miR-770-5p | mmu-miR-3084-3p | mmu-miR-871-3p | N08 | mmu-miR-299a-3p | mmu-miR-1964-3p | Empty |
| F09 | mmu-miR-883b-5p | mmu-miR-344b-5p | mmu-miR-222-5p | N09 | mmu-miR-704 | mmu-miR-1894-3p | Empty |
| F10 | mmu-miR-323-5p | mmu-miR-700-5p | mmu-miR-181b-2-3p | N10 | mmu-miR-17-5p | mmu-miR-670-3p | Empty |

| | | | | | | | |
|-----|-----------------|----------------------|-------------------|-----|-----------------|------------------|-------|
| F11 | mmu-miR-322-5p | mmu-miR-511-5p | mmu-miR-540-5p | N11 | mmu-miR-30a-5p | mmu-miR-1960 | Empty |
| F12 | mmu-miR-222-3p | mmu-miR-125b-2-3p | mmu-miR-452-5p | N12 | mmu-miR-764-3p | mmu-miR-3102-5p | Empty |
| F13 | mmu-miR-590-5p | mmu-miR-92a-1-5p | mmu-miR-3101-3p | N13 | mmu-miR-147-3p | mmu-miR-3108-5p | Empty |
| F14 | mmu-miR-425-5p | mmu-miR-322-3p | mmu-miR-16-2-3p | N14 | mmu-miR-150-5p | mmu-miR-1963 | Empty |
| F15 | mmu-miR-144-3p | mmu-miR-758-5p | mmu-let-7f-1-3p | N15 | mmu-miR-698-3p | mmu-miR-465b-5p | Empty |
| F16 | mmu-miR-804 | mmu-miR-23b-5p | mmu-miR-350-5p | N16 | mmu-miR-296-3p | mmu-miR-365-1-5p | Empty |
| F17 | mmu-miR-719 | mmu-miR-3062-3p | mmu-miR-466n-3p | N17 | mmu-miR-743a-3p | mmu-miR-10a-3p | Empty |
| F18 | mmu-miR-759 | mmu-miR-450a-5p | mmu-miR-3090-5p | N18 | mmu-miR-151-5p | mmu-miR-130a-5p | Empty |
| F19 | mmu-miR-345-5p | mmu-miR-471-5p | mmu-miR-1964-5p | N19 | mmu-miR-501-3p | mmu-miR-412-3p | Empty |
| F20 | mmu-miR-30b-5p | mmu-miR-500-5p | mmu-miR-344c-3p | N20 | mmu-miR-423-5p | mmu-miR-192-3p | Empty |
| F21 | mmu-miR-25-3p | mmu-miR-302c-3p | mmu-miR-2136 | N21 | mmu-miR-105 | mmu-miR-3068-3p | Empty |
| F22 | mmu-miR-875-5p | mmu-miR-361-3p | mmu-miR-129-2-3p | N22 | mmu-miR-124-5p | mmu-miR-208a-3p | Empty |
| F23 | mmu-miR-433-3p | mmu-miR-135b-3p | mmu-miR-3092-5p | N23 | mmu-let-7b-3p | mmu-miR-344e-3p | Empty |
| F24 | mmu-miR-509-5p | mmu-miR-374c-3p | mmu-miR-204-3p | N24 | mmu-let-7c-1-3p | mmu-miR-155-3p | Empty |
| G01 | mmu-miR-883a-5p | mmu-miR-190b-3p | mmu-miR-206-3p | O01 | mmu-let-7d-3p | mmu-miR-3110-3p | Empty |
| G02 | mmu-miR-31-5p | mmu-miR-1249-3p | mmu-miR-449a-3p | O02 | mmu-let-7g-3p | mmu-miR-3097-5p | Empty |
| G03 | mmu-miR-201-5p | mmu-miR-344d-1-5p | mmu-miR-3086-5p | O03 | mmu-let-7i-3p | mmu-miR-465c-5p | Empty |
| G04 | mmu-miR-142-3p | mmu-miR-196b-3p | mmu-miR-1933-3p | O04 | mmu-miR-101a-5p | mmu-miR-1958 | Empty |
| G05 | mmu-miR-686 | mmu-miR-511-3p | mmu-miR-211-3p | O05 | mmu-miR-106b-3p | mmu-miR-122-3p | Empty |
| G06 | mmu-miR-291a-5p | mmu-miR-3099-5p | mmu-miR-3079-3p | O06 | mmu-miR-10b-3p | mmu-miR-448-3p | Empty |
| G07 | mmu-miR-296-5p | mmu-miR-3077-3p | mmu-miR-3109-3p | O07 | mmu-miR-1187 | mmu-miR-212-5p | Empty |
| G08 | mmu-miR-361-5p | mmu-miR-429-5p | mmu-miR-143-3p | O08 | mmu-miR-1188-5p | mmu-miR-3065-5p | Empty |
| G09 | mmu-miR-351-5p | mmu-miR-3100-3p | mmu-miR-1249-5p | O09 | mmu-miR-1190 | mmu-miR-499-5p | Empty |
| G10 | mmu-miR-103-3p | mmu-miR-3087-3p | mmu-miR-669m-3p | O10 | mmu-miR-1191 | mmu-miR-679-5p | Empty |
| G11 | mmu-miR-148b-3p | mmu-miR-3102-5p.2-5p | mmu-miR-219-5p | O11 | mmu-miR-1192 | mmu-miR-3090-3p | Empty |
| G12 | mmu-let-7g-5p | mmu-miR-3059-3p | mmu-miR-3099-3p | O12 | mmu-miR-1194 | mmu-miR-3061-5p | Empty |
| G13 | mmu-miR-409-5p | mmu-miR-672-3p | mmu-miR-3074-1-3p | O13 | mmu-miR-1195 | mmu-miR-669e-3p | Empty |
| G14 | mmu-miR-190b-5p | mmu-miR-201-3p | mmu-miR-1298-5p | O14 | mmu-miR-1196-5p | mmu-miR-668-5p | Empty |
| G15 | mmu-miR-16-5p | mmu-miR-3063-5p | mmu-miR-1951 | O15 | mmu-miR-1199-5p | mmu-miR-3078-3p | Empty |
| G16 | mmu-miR-409-3p | mmu-miR-802-3p | mmu-miR-1943-5p | O16 | mmu-miR-130b-5p | mmu-miR-1198-3p | Empty |
| G17 | mmu-miR-876-3p | mmu-miR-496a-5p | mmu-miR-3089-3p | O17 | mmu-miR-133a-5p | mmu-miR-328-5p | Empty |
| G18 | mmu-miR-126-3p | mmu-miR-3071-5p | mmu-miR-499-3p | O18 | mmu-miR-141-5p | mmu-miR-1912-3p | Empty |
| G19 | mmu-miR-320-3p | mmu-miR-3103-3p | mmu-miR-194-1-3p | O19 | mmu-miR-145a-5p | mmu-miR-26a-2-3p | Empty |
| G20 | mmu-miR-381-3p | mmu-miR-3085-5p | mmu-miR-1940 | O20 | mmu-miR-145a-3p | mmu-miR-1193-3p | Empty |
| G21 | mmu-miR-182-5p | mmu-miR-1945 | mmu-miR-483-5p | O21 | mmu-miR-146b-3p | mmu-miR-452-3p | Empty |
| G22 | mmu-miR-590-3p | mmu-miR-448-5p | mmu-miR-467g | O22 | mmu-miR-148a-5p | mmu-miR-3073a-3p | Empty |

| | | | | | | | |
|-----|-----------------|-------------------|--|-----|-------------------|-------------------|------------|
| G23 | mmu-miR-106a-5p | mmu-miR-3069-5p | mmu-miR-668-3p | O23 | mmu-miR-15a-3p | mmu-miR-7a-1-3p | Empty |
| G24 | mmu-miR-532-3p | mmu-miR-3057-3p | mmu-miR-1941-5p | O24 | mmu-miR-15b-3p | mmu-miR-152-5p | Empty |
| H01 | mmu-miR-142-5p | mmu-miR-670-5p | mmu-miR-221-5p | P01 | mmu-miR-17-3p | mmu-miR-544-3p | Empty |
| H02 | mmu-miR-186-5p | mmu-miR-495-5p | mmu-miR-466o-3p | P02 | mmu-miR-181a-5p | mmu-miR-3106-5p | Empty |
| H03 | mmu-miR-107-3p | mmu-miR-539-5p | mmu-miR-147-5p | P03 | mmu-miR-181a-1-3p | mmu-miR-98-3p | Empty |
| H04 | mmu-miR-29b-3p | mmu-miR-181d-3p | mmu-miR-301a-5p | P04 | mmu-miR-181a-2-3p | mmu-miR-1932 | Empty |
| H05 | mmu-miR-329-3p | mmu-miR-187-5p | mmu-miR-34c-3p | P05 | mmu-miR-183-3p | mmu-miR-3085-3p | Empty |
| H06 | mmu-miR-92b-3p | mmu-miR-216b-3p | mmu-miR-96-3p | P06 | mmu-miR-1839-3p | mmu-miR-1912-5p | Empty |
| H07 | mmu-miR-291b-3p | mmu-miR-3076-3p | mmu-miR-3109-5p | P07 | mmu-miR-186-3p | mmu-miR-3104-5p | Empty |
| H08 | mmu-miR-202-3p | mmu-miR-219-2-3p | mmu-miR-1961 | P08 | mmu-miR-1892 | mmu-miR-137-5p | Empty |
| H09 | mmu-miR-675-5p | mmu-miR-3095-3p | mmu-miR-3098-5p | P09 | mmu-miR-1895 | mmu-miR-3089-5p | Empty |
| H10 | mmu-miR-146b-5p | mmu-miR-3066-3p | mmu-miR-107-5p | P10 | mmu-miR-1896 | mmu-miR-3058-5p | Empty |
| H11 | mmu-miR-411-5p | mmu-miR-509-3p | mmu-miR-767 | P11 | mmu-miR-1897-3p | mmu-miR-3474 | Empty |
| H12 | mmu-miR-878-3p | mmu-miR-148b-5p | mmu-miR-29b-2-5p | P12 | mmu-miR-1897-5p | mmu-miR-125b-1-3p | Empty |
| H13 | mmu-miR-466f-5p | mmu-miR-3094-3p | mmu-miR-669c-5p | P13 | cel-miR-39 | cel-miR-39 | cel-miR-39 |
| H14 | mmu-miR-802-5p | mmu-miR-490-3p | mmu-miR-103-1-5p | P14 | cel-miR-39 | cel-miR-39 | cel-miR-39 |
| H15 | mmu-let-7b-5p | mmu-miR-3092-3p | mmu-miR-344b-3p | P15 | SNORD61 | SNORD61 | SNORD61 |
| H16 | mmu-miR-302a-5p | mmu-miR-592-3p | mmu-miR-669a-5p // mmu-miR-669p-5p | P16 | SNORD68 | SNORD68 | SNORD68 |
| H17 | mmu-miR-98-5p | mmu-miR-505-5p | mmu-miR-3107-3p // mmu-miR-486-3p | P17 | SNORD72 | SNORD72 | SNORD72 |
| H18 | mmu-miR-714 | mmu-miR-1264-3p | mmu-miR-486-5p // mmu-miR-3107-5p | P18 | SNORD95 | SNORD95 | SNORD95 |
| H19 | mmu-miR-762 | mmu-miR-181b-1-3p | mmu-miR-467a-3p // mmu-miR-467d-3p | P19 | SNORD96A | SNORD96A | SNORD96A |
| H20 | mmu-miR-327 | mmu-miR-344g-5p | mmu-miR-466a-5p // mmu-miR-466p-5p | P20 | RNU6-2 | RNU6-2 | RNU6-2 |
| H21 | mmu-miR-19b-3p | mmu-miR-3112-3p | mmu-miR-374b-5p // mmu-miR-374c-5p | P21 | miRTC | miRTC | miRTC |
| H22 | mmu-miR-376b-5p | mmu-miR-196a-1-3p | mmu-miR-3070a-5p // mmu-miR-3070b-5p | P22 | miRTC | miRTC | miRTC |
| H23 | mmu-miR-328-3p | mmu-miR-713 | mmu-miR-199a-3p // mmu-miR-199b-3p | P23 | PPC | PPC | PPC |
| H24 | mmu-miR-338-5p | mmu-miR-3069-3p | mmu-miR-1982.1-3p // mmu-miR-1982.2-3p | P24 | PPC | PPC | PPC |

EK 2. Biyolojik işlevlerine göre hedef mRNAların sınıflandırılması (GO kısmi liste)

| miRNAların rol aldığı biyolojik süreç | Mmu-mir-1191 | Mmu-mir-542-5p | Mmu-mir-486-5p | Mmu-mir-132-3p | Mmu-mir-294-3p | Mmu-mir-449a-5p | Mmu-mir-124-3p | Mmu-mir-125a-3p | Mmu-mir-2136 |
|--|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|
| Actin iskeleti düzenlenmesi (bp) | | | 14 | 150 | 19 | 26 | 23 | 18 | |
| Actin iskeleti yeniden düzenlenmesi (bp) | | | | | 9 | 9 | 10 | 9 | |
| Actin filamentlerinin düzenlenmesi (bp) | 5 | | 8 | | | | | | |
| Adaptif immün yanıtının düzenlenmesi (bp) | | | | 82 | | | | | |
| Adipoz doku gelişimi (bp) | 4 | | | 187 | 6 | | | | |
| Adrenal gland gelişimi (bp) | | | 4 | | | | 6 | | |
| Adrenergik reseptör sinyal yolağı (bp) | | | | | | | | | |
| Akciğer gelişimi (bp) | | 9 | 11 | 85 | 15 | | | | 13 |
| Aktin filament polimerizasyonunun negatif düzenlenmesi(bp) | | | 4 | | | | | | |
| Aktin filament polimerizasyonunun pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 5 | | | | | | |
| Aktin filament polimerizasyonunun düzenlenmesi (bp) | | | 4 | | | | | | |
| Aktin hücre iskeleti organizasyonunun düzenlenmesi (bp) | | | | | 8 | 8 | | | |
| Aktive t hücre çoğalmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 5 | | | | | | |
| Alpha-beta t hücre farklılaşmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Alpha-beta t hücre proliferasyonu (bp) | | | 4 | 158 | | | | | |
| Amacrin hücre farklılaşması (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Anatomik gelişim (bp) | 3 | | | | | | | | |
| Androjen reseptör sinyal yolağı (bp) | | | | 232 | | | 6 | 8 | |
| Anjiyogenez (bp) | 11 | | 18 | 35 | | 28 | | 25 | 19 |
| Anjiyogenezin negatif düzenlenmesi (bp) | | | 7 | | | | | | |
| Anjiyogenezin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | | 13 | | | | |
| Anterior/posterior doku spesifikleşmesi (bp) | 9 | | 13 | | 19 | | | 20 | |
| Anti-apoptoz (bp) | 14 | | 14 | 28 | 20 | 20 | | 29 | |
| Anti-apoptozun pozitif düzenlenmesi (bp) | 6 | | | 97 | 9 | 10 | | 9 | |
| Apoptotik hücre farklılaşması (bp) | | | | 266 | | | | | |
| Apoptotik sürece yol açan sistein tip endopeptidaz aktivasyonu (bp) | | | | | 12 | 14 | 13 | 13 | |
| Apoptotik sürecin düzenlenmesi (bp) | 10 | | 18 | 160 | | | | 35 | |
| Apoptotik sürecin negatif düzenlenmesi (bp) | 31 | 19 | 34 | 94 | 55 | 48 | | 65 | |
| Apoptotik sürecin pozitif düzenlenmesi (bp) | 23 | | 28 | 256 | 44 | 35 | | 38 | 22 |
| Apoptotik süreç (bp) | 43 | 22 | 52 | 364 | 93 | 76 | | 94 | 42 |
| Apoptotik süreçte yer alan sistein-tip endopeptidazın negatif düzenlenmesi(bp) | 7 | | | | | | | 15 | |

| | | | | | | | | | |
|--|-----|----|----|-----|----|----|--|-----|-----|
| Apoptoz indüksiyonu (bp) | 12 | 9 | | 48 | 24 | 32 | | 29 | |
| Apoptozun pozitif regülasyonu (bp) | | | | 29 | | | | | |
| Asimetrik hücre divizyonu (bp) | | | | 362 | | | | | |
| Atardamar septum morfogenezi (bp) | | | | 145 | | | | | |
| Atp katabolik prosesi (bp) | | | 21 | 360 | 40 | 33 | | 41 | 27 |
| B hücre apoptozunun düzenlenmesi (bp) | | | | 136 | | | | | |
| B hücre farklılaşmasının düzenlenmesi (bp) | | | 3 | | | | | | |
| B hücre reseptör sinyal yolağının düzenlenmesi (bp) | | | | 223 | | | | | |
| Bağırsak epitel hücre farklılaşması (bp) | | | 3 | | | | | | |
| Beyin gelişimi (bp) | 12 | | 17 | 249 | | 22 | | 19 | |
| Bmp sinyal yolağı (bp) | 8 | | | | | | | | |
| Bmp uyarana hücresel yanıt (bp) | | | 3 | | | | | | |
| Böbrek gelişimi (bp) | 10 | 6 | 11 | 36 | | 15 | | | |
| Büyüme faktörü benzeri insulin reseptör sinyal yolağı (bp) | 3 | | 4 | | 5 | | | | |
| Büyüme faktörü uyarana karşı yanıt (bp) | | | 3 | | | | | | |
| Büyümenin düzenlenmesi (bp) | | | | 197 | | | | | |
| Camp biyosentetik sürecin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 7 | | | | | | |
| Çekirdeğe protein girişinin negatif düzenlenmesi (bp) | 2 | | | | | | | | |
| Çekirdek lokalizasyonu (bp) | | | | 305 | | | | | |
| Çekirdekte yazılmış mrna katabolik süreci (bp) | | | | 159 | | | | | |
| Çok hücreli organizma büyümesi (bp) | | | 8 | 299 | 13 | | | | |
| Çok hücreli organizma gelişimi (bp) | 58 | 39 | 83 | 220 | | | | 126 | 71 |
| Çok hücreli organizma yaşlanması (bp) | | | | 262 | | | | | |
| Çok hücreli organizmaların büyümesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | 4 | | 101 | | | | | |
| Çoklu doymamış yağ asidi uzaması (bp) | 2 | | | | | | | | |
| Defosforilasyon (bp) | 12 | 11 | 22 | 146 | 31 | 40 | | 28 | |
| Demir iyonu dengesi (bp) | 4 | | | 309 | | | | | 6 |
| Deri gelişimi (bp) | | | | 334 | 28 | | | | |
| Diğer organizmaların hücre ölümlerinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 2 | | 3 | | | | |
| Dizi özgü dna bağlanma transkripsiyon faktör aktivitesinin düzenlenmesi (bp) | | | 7 | 330 | | | | | |
| Dna aracılı transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi (bp) | 45 | 30 | 63 | 331 | | 82 | | 98 | 59 |
| Dna bağımlı transkripsiyon (bp) | 111 | 68 | | 315 | | | | 276 | 163 |
| Dna hasar uyarana karşı yanıt(bp) | 15 | | 29 | 29 | | 45 | | 69 | 27 |
| Dna onarımı (bp) | | | 22 | 221 | 55 | 36 | | 53 | |
| Dna onarımının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 307 | | | | | |
| Dna rekombinasyonu (bp) | | | | 248 | 13 | | | 14 | |
| Dna replikasyonu (bp) | | | | 105 | 22 | 18 | | | |
| Dna replikasyonunun pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 265 | | 9 | | | |
| Dna tekrar elementlerinin idamesi (bp) | | | | 281 | | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|----|---|----|------------|----------|----|--|-------|
| Dna-bağımlı transkripsiyon başlatılması (bp) | | | 5 | | | | | |
| Dna-kaynaklı transkripsiyonun negatif düzenlenmesi (bp) | 24 | | 48 | 67 | 62 | 66 | | 68 44 |
| Doğal wnt reseptör sinyal yolağının negatif düzenlenmesi (bp) | | | 11 | 126 | | 13 | | 20 |
| Doğuştan oluşan immün yanıtı (bp) | | | 14 | 58 | | | | 27 |
| Düz kas dokusunun gelişimi (bp) | | | | 316 | | 6 | | |
| Düz kas hücre çoğalmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | | 5 | | | | | |
| Düz kas hücre çoğalmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 35 | | 11 | | |
| Düz kas hücre değişiminin pozitif düzenlenmesi(bp) | | | | | 14 | | | |
| Ekzositoz (bp) | 9 | | | | | | | |
| Embriyo gelişimi (bp) | 10 | | 15 | 350 | 19 | 22 | | 19 |
| Embriyonik arkabacak morfogenezi(bp) | 5 | | | | | | | |
| Embriyonik bölüt morfogenezi (bp) | 5 | 6 | | | | | | |
| Embriyonik genital morfogenezi (bp) | | | | 239 | | | | |
| Embriyonik kol morfogenezi (bp) | 6 | | | 173 | | 13 | | 12 |
| Embriyonik ön ayak morfogenezi (bp) | 4 | | | | | | | |
| Embriyonik ön bağırsak morfogenezi (bp) | | | | 202 | | | | |
| Embriyonik plasenta gelişimine yol açan hücre farklılaşması (bp) | | | 3 | | | | | |
| Embriyonik sindirim sisteminin gelişmesi (bp) | | 3 | | | 5 | | | |
| Embriyonik sindirim sisteminin morfogenezi (bp) | | | | 29 | | | | |
| Embryonik hemopoiez (bp) | | | | 234 | | | | |
| Embryonik iskelet sistemi morfogenezi (bp) | | | | 355 | 9 | | | |
| Embryonik morphogenez (bp) | | | | 196 | | | | |
| Embryonik organ gelişimi (bp) | | | | 181 | 6 | 5 | | |
| Endoderm gelişimi (bp) | 5 | | 7 | | | | | |
| Endokardial hücre farklılaşması (bp) | | | | 188 | | | | |
| Endokardium gelişimi (bp) | | | 2 | | | | | |
| Endoplazmik retikulum katlanmamış protein yanıtı (bp) | | | | 189 | 8 | | | |
| Endositoz (bp) | 14 | | | 190 | 31 | | | 22 18 |
| Endosomal lümen asitleşmesi(bp) | 2 | | | | | | | |
| Endotelyal hücre göçü (bp) | | | 4 | | | 5 | | |
| Endozom taşınması (bp) | | | | 149 | | | | |
| Endozomdan lizozoma taşıma (bp) | | | | 174 | | | | |
| Epidermis gelişimi (bp) | | | | 327 | | | | |
| Epinefrin salgılanmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | | 3 | | | | | |
| Epitel hücre çoğalmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 113 | | | | 12 |
| Epitel hücre farklılaşmasının negatif düzenlenmesi(bp) | | | 8 | 115 | | | | |
| Epitel mezenkim geçişinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 300 | | | | |
| Epitel-mezenkim hücre geçişinin düzenlenmesine yol açan temel wnt sinyal yolağı(bp) | | | | 90 | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|----|----|--|-----|----|
| Er-ilişkili protein katabolik süreci (bp) | | | | | 9 | | | | |
| Erk ve erk yolağının düzenlenmesi (bp) | | | | 147 | | | | | |
| Er-nükleer sterol yanıt yolağı (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Estrogen uyarana karşı yanıt (bp) | | 5 | | 99 | | | | 9 | |
| Fazla diyete yanıt (bp) | | | | | 20 | | | | |
| Fibroblast çoğalmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | 5 | | | | 11 | | | | |
| Fosfataz aktivitesinin negatif düzenlenmesi (bp) | 6 | | 8 | | | | | | |
| Fosfatidiletanolamin biyosentetik süreci (bp) | 2 | | | 116 | | | | | |
| Fosfatidilinositol defosforilasyonu (bp) | 4 | | | | 6 | 6 | | 8 | |
| Fosfatidilinositol fosforilasyonu (bp) | 5 | | | | 8 | 11 | | 10 | |
| Fosfatidilinositol metabolik süreç (bp) | | | | | | 7 | | 7 | |
| Fosfatidilinositol-aracılı sinyal iletimi (bp) | 4 | | | | | 7 | | | |
| Fosfolipid biyosentetik süreç (bp) | | | | | 10 | | | | |
| Fosforilasyon (bp) | 49 | 30 | 71 | 203 | | | | 129 | 76 |
| Fosforilasyonun pozitif düzenlenmesi (bp) | 4 | | | | | | | 8 | |
| G proteini sinyal yolağı tarafından aktif hale geçen adenilat siklaz (bp) | | | 6 | | | | | | |
| Gastrulasyon (bp) | | | 6 | 168 | | | | | |
| Gelişimsel büyüme (bp) | | | 6 | 230 | | | | | |
| Gen ekspresyonunun negatif düzenlenmesi (bp) | | | 11 | 77 | | | | | |
| Gen ekspresyonunun pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 20 | 293 | | | | 26 | 19 |
| Gen ifadesinin düzenlenmesi (bp) | | | 14 | 128 | | 17 | | | |
| Glucocorticoid uyarana karşı yanıt(bp) | | | | 79 | | | | | |
| Glukokortikoid aracılı sinyal yolağı (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Glukokortikoid reseptör sinyal yolağı (bp) | | | | 42 | | | | | |
| Glukoz metabolik süreci (bp) | | | | | 11 | 13 | | 14 | |
| Glukoz uyarana karşı yanıt (bp) | | | 6 | | | | | | |
| Golgiden plazmaya zar proteini taşınması (bp) | | | 3 | | | | | | |
| G-protein kenetli reseptör sinyal yolağının sonlandırılması (bp) | | | 7 | 113 | | | | | |
| Gtp katabolik süreci (bp) | 10 | | | 37 | 24 | 27 | | 24 | |
| Gtpase aktivitesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | 12 | 21 | 103 | 25 | 33 | | 30 | |
| Helikaz aktivitesinin negatif düzenlenmesi (bp) | | | | 263 | | | | | |
| Helikaz aktivitesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 28 | | | | | |
| Heterofilik hücre-hücre adhezyonu (bp) | | | | 339 | | | | | 8 |
| Hipokampus gelişimi (bp) | 6 | | 7 | 26 | 9 | | | | |
| Hipoksiye karşı yanıt (bp) | | | | | 8 | | | | |
| Histon asetilasyonu (bp) | | | | 252 | 7 | | | | |
| Histon deubikütinleşmesi (bp) | | | 4 | | | | | | |
| Histon h asetilasyonu (bp) | | | 7 | | | 9 | | | 5 |
| Histone ha asetilasyonu (bp) | | | 4 | | | | | | |
| Histone ha k-bağlı deubikütinleşmesi (bp) | 2 | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|----|----|--|-----|----|
| Histone lizin metilasyonu (bp) | | | | | 9 | | | | |
| Histone metilasyonu (bp) | | | | | 6 | | | | |
| Hormon azalışına karşı yanıt (bp) | | | | 27 | | | | | |
| Hormon-aracılı sinyal yolağı (bp) | | | | | 6 | | | | |
| Humoral immun yanıt (bp) | | | 5 | | | | | | |
| Hücre adhezyonu (bp) | 30 | 21 | 34 | 53 | 65 | 72 | | 89 | 45 |
| Hücre adhezyonunun düzenlenmesi (bp) | | | | | 13 | | | | 9 |
| Hücre bölünmesi (bp) | 15 | | 26 | 46 | 55 | 47 | | 50 | 31 |
| Hücre bölünmesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 156 | | | | 10 | |
| Hücre büyümesi (bp) | | | | 53 | 8 | | | | |
| Hücre büyümesinin negatif düzenlenmesi (bp) | | | | 25 | 24 | 22 | | | |
| Hücre büyümesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | | 11 | | | 15 | 10 |
| Hücre çoğalmasının düzenlenmesi (bp) | | | 16 | 298 | | 29 | | | 18 |
| Hücre çoğalmasının negatif düzenlenmesi (bp) | 19 | | 31 | 61 | 43 | 42 | | 52 | 28 |
| Hücre çoğalmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | 18 | 16 | | 357 | 53 | 45 | | 59 | 32 |
| Hücre değişiminin düzenlenmesi (bp) | | | | 41 | | | | | |
| Hücre döngüsü (bp) | 35 | | 55 | 117 | | 83 | | 106 | 50 |
| Hücre döngüsünün durdurulması (bp) | | | 12 | 31 | 17 | 16 | | 18 | |
| Hücre döngüsünün düzenlenmesi (bp) | | | 12 | 186 | 25 | | | | |
| Hücre döngüsünün negatif düzenlenmesi (bp) | | | | | | 11 | | | |
| Hücre döngüsünün pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 250 | | | | | 6 |
| Hücre farklılaşması (bp) | 37 | 30 | 45 | 247 | 78 | 75 | | 82 | 40 |
| Hücre farklılaşmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | | | 274 | | 8 | | | |
| Hücre farklılaşmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 9 | | | | | | |
| Hücre geçişinin negatif düzenlenmesi (bp) | | | 11 | | | 12 | | | |
| Hücre gelişimi (bp) | | | 5 | 273 | | | | | 5 |
| Hücre göçü (bp) | 11 | | 17 | 356 | 18 | 21 | | 22 | 12 |
| Hücre göçünün pozitif düzenlenmesi (bp) | 11 | | 13 | 333 | | 23 | | | |
| Hücre içi protein kinaz zinciri (bp) | 7 | | 14 | | 18 | | | 16 | |
| Hücre içi protein taşınması (bp) | 11 | | 15 | 74 | 25 | | | 27 | 19 |
| Hücre içi sinyal transdüksiyonu (bp) | 19 | | | 310 | 46 | 47 | | 47 | 20 |
| Hücre içi steroid hormon reseptör sinyal yolağının düzenlenmesi(bp) | | | 2 | | 6 | | | | |
| Hücre iletişimi (bp) | | | 15 | 184 | | | | | 11 |
| Hücre kemotaksisi (bp) | | | 5 | | 6 | 7 | | 7 | |
| Hücre morfogenezi (bp) | 6 | | | | 17 | | | 14 | |
| Hücre olgunlaşması (bp) | | 5 | | 120 | | | | | |
| Hücre ölümünün negatif düzenlenmesi (bp) | 5 | | | | | | | | |
| Hücre ölümünün pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 5 | | | | | | |
| Hücre polaritesinin düzenlenmesi (bp) | | | | 191 | 19 | | | | |
| Hücre proliferasyonu (bp) | 13 | | 16 | 84 | | 28 | | 25 | 15 |

| | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|----|----|--|----|----|
| Hücre şeklinin düzenlenmesi (bp) | | | | 370 | | 18 | | 21 | |
| Hücre yağlanması (bp) | | 6 | 7 | | | | | 12 | |
| Hücre yüzeyi reseptör sinyal yolağı (bp) | | | | 336 | 19 | | | 22 | |
| Hücre yüzeyindeki protein lokalizasyonu (bp) | | | | | 12 | 7 | | | |
| Hücre-hücre adhezyonu (bp) | | | 10 | 277 | 14 | 18 | | | 11 |
| Hücre-hücre adhezyonunun pozitif düzenlenmesi (bp) | 3 | | | | | 5 | | 5 | |
| Hücre-matriks adhezyonu (bp) | | | 9 | 348 | | | | 12 | |
| Hücre makromolekül katabolik süreci (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Hücre membran birleşimi (bp) | | | | | | 5 | | | |
| Hücre protein lokalizasyonu (bp) | 5 | | | | | 8 | | | |
| I-kappab kinaz/nf-kappab yolağının negatif düzenlenmesi (bp) | | | | | | 5 | | | |
| İmp metabolik süreç (bp) | | | | 84 | | | | | |
| Isıya karşı oluşan hücresel yanıt (bp) | | | 4 | | | | | | |
| Isıya karşı yanıt(bp) | | | | | 17 | | | | |
| İlaç uyarana karşı yanıt (bp) | | | | 270 | | 21 | | 25 | |
| İmmun yanıt (bp) | | | | 214 | 26 | 25 | | 22 | |
| İn utero embriyonik gelişim (bp) | 14 | 12 | 20 | 291 | 39 | 40 | | 39 | 19 |
| İndol metanole hücresel yanıt (bp) | | | | 166 | | | | | |
| İnflamatuar yanıt (bp) | | | | 201 | 27 | | | | |
| İnositol fosfat defosforilasyonu (bp) | 4 | | | | | | | 7 | |
| İnsulin reseptör sinyal yolağı (bp) | 7 | | 7 | | | | | 11 | |
| İnsulin sekresyonu (bp) | | | | 56 | | | | | |
| İnsulin sekresyonunun düzenlenmesi(bp) | | 4 | 5 | | | | | | |
| İnsulin uyarana karşı yanıt (bp) | | | 6 | | | | | | |
| İnsulin uyarana karşı hücresel yanıt (bp) | | | | | 12 | | | | |
| İntegrin aracılı hücre-hücre adhezyonunun pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 121 | | | | | |
| İnterferon-alfaya hücresel yanıt (bp) | | | | | 3 | | | | |
| İnterferon-gama salgılanması (bp) | | | | 278 | | | | | |
| İnterferon-gamma üretiminin negatif düzenlenmesi (bp) | | 3 | | 178 | | 6 | | | |
| İnterleukin üretiminin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 6 | 280 | | 6 | | | |
| İnterleukin-aracılı sinyal yolağı (bp) | | | 2 | | | | | | 2 |
| İskelet kas dokusu gelişimi (bp) | 6 | | | 64 | | | | 13 | 10 |
| İskelet organization (bp) | 7 | | | 30 | | 18 | | 18 | |
| İskelet sisteminin gelişimi (bp) | | | | 143 | | | | | |
| İyon taşınması (bp) | 39 | | 48 | 284 | 78 | 76 | | 90 | 48 |
| İyon transmembran taşınması (bp) | | | | 346 | 48 | 44 | | 50 | |
| İyonize radyasyona karşı yanıt (bp) | | | | 38 | | | | | |
| Jak kinaz aktivasyonu (bp) | 2 | | | | | | | | |
| Jnk cascade'ın pozitif düzenlenmesi (bp) | 5 | | 10 | | | | | | |
| Jnk kaskadının düzenlenmesi (bp) | | | | 131 | | | | 6 | |

| | | | | | | | | | |
|--|----|----|----|------------|----|----------|---|----|----------|
| Jnk yolağı (bp) | 5 | 5 | | | 14 | 8 | | | |
| Jun fosforilasyonu (bp) | | 3 | | | | | | 3 | |
| Jun kinaz aktivasyonu (bp) | 6 | | | | 9 | 9 | 7 | | |
| Kalp kası hücresi farklılaşması (bp) | | | | | 6 | | | | |
| Kalp gelişimi (bp) | | 11 | 20 | 240 | 26 | 27 | | 31 | 18 |
| Kalp hücresi farklılaşması (bp) | | | | | 3 | | | | |
| Kalp kası dokusunun gelişimi(bp) | | | 5 | | | | | | |
| Kalp kası hücre farklılaşmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 204 | | | | | 2 |
| Kalsiyum iyonuna hücrel yanıt (bp) | | | | | 6 | | | | |
| Kalsiyum iyonuna yanıt (bp) | | 4 | | 88 | 3 | | | 11 | |
| Kan damarı gelişimi (bp) | | | | | 9 | | | 13 | 9 |
| Kan damarı olgunlaşması (bp) | 2 | | | | | | | 3 | |
| Kan damarlarının paternizasyonu (bp) | | | | 328 | 9 | 12 | | | |
| Karaciğer gelişimi (bp) | | | | 86 | | | | | 9 |
| Karbonhidrat metabolik süreci (bp) | | | | 69 | | 30 | | 29 | |
| Kas hücresi farklılaşması (bp) | | | | | 5 | | | | |
| Katalitik aktivitenin düzenlenmesi (bp) | 15 | | 32 | 32 | 16 | 52 | | 47 | 28 |
| Katılşma (bp) | | | 9 | | | 16 | | 13 | |
| Katlanmamış proteine karşı yanıt (bp) | | | | 267 | | 9 | | | 6 |
| Kasyon taşınması (bp) | | | | | 16 | | | | |
| Keratinosit farklılaşmasının negatif düzenlenmesi (bp) | 2 | | | | | | | | |
| Keratinosit taşınmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 138 | | | | | |
| Kıkırdak gelişiminin negatif düzenlenmesi (bp) | 3 | | | | | | | | |
| Kimyasal uyarana yanıt (bp) | | | | 365 | | | | | |
| Kimyasal uyarana yanıt olan apoptoz indüksiyonu (bp) | | 2 | | | | | | | |
| Kofaktör taşınması (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Kolesterole yanıt (bp) | | 2 | | | | | | | |
| Kök hücre bölünmesi(bp) | 2 | | | | | | | | |
| Kök hücre devamlılığının düzenlenmesi (bp) | | 2 | | | | | | | |
| Kök hücre onarımı(bp) | | | 5 | | | | | | |
| Kök hücrenin özelleşmesi (bp) | | | | 259 | | | | | |
| Kromatin yeniden düzenlenmesi (bp) | | | 9 | 164 | 10 | | | | |
| Küçük gtpaz aracılığı ile sinyal transdüksiyonu(bp) | 17 | | 23 | 324 | | 40 | | 46 | 23 |
| Lenfosit homeostazı (bp) | | | | 269 | 3 | | | | |
| Lipid biyosentez süreci (bp) | | | | 59 | 18 | 21 | | 21 | |
| Lipid katabolik süreci (bp) | | | | 41 | | 15 | | | |
| Lipid metabolik süreci (bp) | | | | 238 | | 35 | | | 23 |
| Lizozom organizasyonu (bp) | | | 5 | | | 7 | | | |
| Lizozomal lumen asidifikasyonu (bp) | | | 4 | | | | | | |
| Lökosit göçünün negatif düzenlenmesi (bp) | | 2 | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|----|----|--|-----|-----|
| Magnezyum iyonu taşınması (bp) | | | | 235 | | | | | |
| Manganeaz iyon taşınması (bp) | | | 3 | | | | | | |
| Map kinaz aktivitesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | | 9 | | | | |
| Mapk aktivasyonu (bp) | 9 | | | 125 | 12 | 12 | | 13 | |
| Mapk kaskadının düzenlenmesi (bp) | 4 | | | | | | | | |
| Mapk yolağı (bp) | 7 | | | | | | | | 9 |
| Mapk yolağının pozitif düzenlenmesi (bp) | 8 | | | 64 | 13 | | | 14 | |
| Mayoz sonrası sitokinez (bp) | | | | 40 | | | | | |
| Membran potansiyelinin düzenlenmesi (bp) | | 5 | | | | | | | |
| Membrana protein katılması (bp) | 2 | | | | 5 | | | | |
| Merkaptan-disülfid değişim proteini (bp) | 2 | | | | 30 | | | | |
| Merkez adhezyon birleşiminin negatif düzenlenmesi (bp) | 2 | | | | | | | | |
| Merkez sinir sistemindeki nöron gelişimi (bp) | | | | 119 | | | | | |
| Merkez sinir sisteminin gelişimi (bp) | | | 11 | 44 | | | | | |
| Merkezi adhezyon birleşimi (bp) | | | 4 | | | | | 6 | |
| Metabolik süreç (bp) | 57 | 50 | | 287 | | | | 280 | 135 |
| Metafaz/anafaz mitoz dönüşümünün pozitif düzenlenmesi(bp) | | | | 215 | | | | | |
| Metilasyon (bp) | | | | 253 | | 22 | | | 15 |
| Mezenkimal hücre farklılaşmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 229 | | 8 | | | |
| Mezenşimal hücre çoğalmasının negatif düzenlenmesi (bp) | 2 | | | | | | | | |
| Mezenşimal-epitel geçişi (bp) | 2 | | | 141 | | | | | |
| Mezoderm oluşumu (bp) | | | 7 | | | | | | |
| Microtübül depolimerizasyonunun negatif düzenlenmesi (bp) | | | | | 7 | 7 | | | |
| Microtübül düzenleyici merkez organizasyon (bp) | 2 | | | 76 | 3 | 3 | | | |
| Mikrotübül boyunca vezikül taşınma (bp) | | | | 282 | | | | | |
| Mikrotübül hücre iskeleti organizasyonu (bp) | | | 9 | 72 | 10 | | | 11 | |
| Mikrotübül-temelli hareket (bp) | | | | 347 | 13 | | | | |
| Mitokondriyal atp sentezi bağımlı elektron taşınması (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Mitokondrial taşınma (bp) | | | | | 4 | | | | |
| Mitokondriden sitokrom c salınımı (bp) | | | | | 10 | | | | |
| Mitokondriyal membran geçirgenliğinin düzenlenmesi (bp) | | | | 271 | | | | | |
| Mitotik hücre döngüsünde g/s geçişi (bp) | | | 9 | 78 | 14 | | | | |
| Mitotik hücre döngüsünün düzenlenmesi (bp) | | | | 40 | | | | | |
| Mitotik hücre döngüsünün pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 7 | 319 | | | | | |
| Mitoz (bp) | 14 | | 22 | 161 | 37 | 30 | | 33 | 18 |
| Miyelinasyon (bp) | 5 | | | | | | | | |
| Miyoblast çoğalması (bp) | | | 3 | | | | | | |
| Miyoblast farklılaşmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 4 | | | | | | |
| Miyoblast göçü (bp) | 2 | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|----|---|----|-----|----|----|--|----|----|
| Moleküler fonksiyonun negatif düzenlenmesi (bp) | | | | 130 | | | | | |
| Monosit farklılaşmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Mrna işlenmesi (bp) | 19 | | 32 | 226 | 33 | 32 | | 46 | 25 |
| Mrna kırılma bölgesi seçimi (bp) | | | 3 | | | | | | |
| Mrna taşınması (bp) | | | | 354 | | | | | |
| Myeloid hücre farklılaşması (bp) | | | | 129 | | | | | |
| Nefron tübülü epitel hücre farklılaşması (bp) | | | | 63 | | | | | |
| Nfat proteinin çekirdeğe girişi (bp) | | | | 311 | | | | | |
| Nf-kappab çekirdeğe girişinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 91 | | | | | |
| Nf-kappab transkripsiyon faktör aktivitesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | 8 | | 10 | | | | | 15 | 9 |
| Notch sinyal yolağı (bp) | | | 8 | 338 | | 14 | | | |
| Nöron apoptozunun negatif düzenlenmesi (bp) | 13 | | | 127 | 15 | 20 | | | |
| Nöron farklılaşması (bp) | | | | 243 | | | | | |
| Nöron farklılaşmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | | | 317 | 11 | 11 | | | |
| Nöron farklılaşmasının pozitif farklılaşması (bp) | | | 10 | | | 13 | | 14 | |
| Nöron gelişiminin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 353 | | 12 | | | |
| Nöron göçü (bp) | | | | 192 | | 22 | | 16 | |
| Nöron hücre kaderi (bp) | | | | 134 | | | | | |
| Nöron olgunlaşması (bp) | | | | 41 | | | | | |
| Nöron üretimi gelişimi (bp) | 7 | 7 | 12 | 170 | | 14 | | 16 | 12 |
| Nörotransmitter biosentetik süreç (bp) | | | | | 3 | | | | |
| Nörotransmitter salgı (bp) | | | | | | 7 | | | |
| Nörotransmitter taşınması (bp) | | 5 | | | | | | | |
| Nükleer göç (bp) | 3 | | | 341 | | | | | |
| Nükleositoloplazmik taşınma (bp) | | | | 75 | 7 | | | | |
| Oksidasyon-redüksiyon süreci (bp) | | | 39 | 325 | 84 | 74 | | 90 | 44 |
| Oksidatif strese karşı yanıt(bp) | 8 | | | 368 | | | | 16 | |
| Oligodendrosit progenitör çoğalmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 162 | 7 | | | | |
| Organ büyümesi (bp) | | | 4 | 225 | | | | | |
| Organ büyümesinin negatif düzenlenmesi (bp) | | | 5 | | | | | | |
| Organ morfogenezi (bp) | | 7 | | 38 | 21 | 23 | | | |
| Organ rejenerasyonu (bp) | | 3 | | | | | | | |
| Organik maddeye karşı yanıt (bp) | | | | | | 9 | | | |
| Osmotik strese karşı yanıt (bp) | 3 | | | | | | | | |
| Osteoblast farklılaşması (bp) | | | 7 | | | 9 | | | |
| Osteoblast farklılaşmasının düzenlenmesi (bp) | | | 4 | | | | | | |
| Osteoblast farklılaşmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | | 7 | | | | | | |
| Osteoblast farklılaşmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 8 | | | | | | |
| Osteoclast farklılaşması, nonsense aracılı yıkım (bp) | | | | 318 | 6 | | | | |
| Otofaj (bp) | | | | 70 | 14 | | | 11 | |

| | | | | | | | | | |
|--|----|----|----|-----|----|----|--|-----|----|
| Önbeyindeki hücre proliferasyonu (bp) | 3 | | | 251 | | | | | |
| Patern spesifikasyon süreci (bp) | 8 | | 15 | 285 | | | | | |
| Pdgr reseptör sinyal yolağı (bp) | 4 | | | 209 | | 7 | | | |
| Peptid metabolik süreci (bp) | | | | 152 | | | | | |
| Peptidil-metil metilasyonu (bp) | | | | | 8 | | | | |
| Peptidil-serin fosforilasyonu (bp) | | | | 241 | 12 | | | | |
| Peptidil-tirozin defosforilasyonu (bp) | 8 | 7 | 14 | 60 | 18 | 22 | | 17 | |
| Peptidil-treonin fosforilasyonu (bp) | | | | 294 | | | | | |
| Peroksizom organizasyonu (bp) | | 3 | | | | | | | |
| Pigmentasyon (bp) | | | | | 10 | 9 | | 9 | |
| Plazma membranındaki protein lokalizasyonunun düzenlenmesi (bp) | 2 | | | | 14 | | | | |
| Plazma membranındaki protein lokalizasyonunun negatif düzenlenmesi (bp) | 2 | | | 205 | | 3 | | | |
| Positive regulation of camp metabolic process (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Post-embryonik gelişme (bp) | | | | 154 | | | | | |
| Potasyum iyonunun taşınması (bp) | | | 14 | 185 | | 23 | | | 17 |
| Potasyum iyonunun transmembranda taşınması (bp) | | | 13 | 143 | 20 | 23 | | | 18 |
| Proteazomal ubiquitin-bağı protein katabolik sürecinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | | | 8 | | | |
| Protein bağlanmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 43 | | | | | |
| Protein defosforilasyon (bp) | 9 | | 16 | 207 | | 28 | | 24 | |
| Protein deubikütinasyonu (bp) | | 4 | | | | | | | |
| Protein fosfatase tip a aktivitesinin düzenlenmesi (bp) | | | | 208 | | | | | |
| Protein fosforilasyonunun düzenlenmesi (bp) | | | | | 9 | | | | |
| Protein fosforilasyonu (bp) | 45 | 21 | 62 | 179 | | 99 | | 112 | 55 |
| Protein fosforilasyonunun negatif düzenlenmesi (bp) | | | 8 | | | | | | |
| Protein fosforilasyonunun pozitif düzenlenmesi (bp) | | 8 | 13 | | | 24 | | 23 | |
| Protein homodimerizasyon aktivitesinin negatif düzenlenmesi (bp) | | | | 95 | | | | | |
| Protein homodimerizasyon aktivitesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | | 3 | | | | |
| Protein homooligomerizasyonu (bp) | | | | 50 | | 20 | | | |
| Protein işlenmesi (bp) | | 5 | | | | 10 | | | |
| Protein k-aracılı deubikütinasyonu (bp) | | | | | 15 | | | | |
| Protein katabolik süreci (bp) | | | 6 | | 21 | | | 10 | |
| Protein katlanması (bp) | | | | 56 | 13 | | | | |
| Protein kinase b sinyal yolağının pozitif düzenlenmesi (bp) | 6 | | 9 | | 19 | 12 | | 12 | |
| Protein kinaz aktivitesinin negatif düzenlenmesi (bp) | | | 8 | 224 | | | | | |
| Protein lokalizasyonunun kurulumu (bp) | | | | 167 | | | | | |
| Protein lokasyonunun düzenlenmesi (bp) | | | | 99 | | | | 9 | |
| Protein metabolik sürecinin düzenlenmesi (bp) | | | 3 | | 8 | | | | |
| Protein modifikasyon süreci (bp) | | | 9 | 217 | | | | 19 | |

| | | | | | | | | | |
|--|----|----|----|-----|----|----|---|-----|----|
| Protein monoubikütinasyonu (bp) | | | | 216 | | | | | |
| Protein o-aracılı glikozilasyon (bp) | | | | | 14 | 5 | | | |
| Protein otofosforilasyonu (bp) | 12 | | 17 | 290 | | 30 | | 27 | 23 |
| Protein otoubikütinasyonu (bp) | | | | 133 | 8 | | | 11 | |
| Protein poliubikütinasyonu (bp) | | | 9 | 55 | | 15 | | 15 | |
| Protein serin/tironin kinaz aktivasyonunun pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 4 | | | 8 | | | |
| Protein taşınması (bp) | 27 | 22 | 51 | 153 | 11 | 84 | | 79 | 38 |
| Protein taşınmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | 2 | | | | | | | |
| Protein tetramerizasyonu (bp) | | | | 26 | 78 | | | | |
| Protein tirozin kinaz transmembran reseptörünün aktivasyonu (bp) | | | | | | 4 | 3 | | |
| Protein ubikütinasyonu (bp) | | | 22 | 93 | 84 | 32 | | 32 | |
| Proteoliz (bp) | | 21 | | 47 | | 82 | | 80 | |
| Proteolizinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 4 | 92 | 9 | | | | |
| Proteozomal ubikütin-bağlı protein katabolik süreci (bp) | | | 8 | 71 | 3 | | | 11 | |
| Purin nucleotid biyosentez süreci(bp) | | | | 332 | | | | | |
| Rab gtpase aktivitesinin düzenlenmesi (bp) | | | 6 | 237 | | 9 | | 10 | |
| Rab gtpase aktivitesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 6 | 322 | 5 | 10 | | 10 | |
| Rac protein sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesi(bp) | 2 | | | | | | | | |
| Ras protein sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesi(bp) | | | | | 14 | | | | |
| Receptor-aracılı endositoz (bp) | | | | 73 | | 15 | | | |
| Regülatör t hücreleri farklılaşmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | | | 254 | | | | | |
| Reseptör alınımı (bp) | | | | 303 | 7 | | | 8 | |
| Reseptör aracılı endositozun pozitif düzenlenmesi (bp) | 3 | | | | | 5 | | | |
| Reseptör sinyal yolağında epidermal büyüme faktörü(bp) | | | 5 | 163 | | | | | |
| Rho protein sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesi (bp) | | | | | | 21 | | 16 | 8 |
| Rna biyosentez sürecinin düzenlenmesi (bp) | | | 9 | 107 | | | | | |
| Rna kırılma (bp) | 15 | | 23 | 37 | | 26 | | 38 | 18 |
| Rna kırılmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 245 | | | | | |
| Rna poliadenilasyonu (bp) | 2 | | | | | | | | |
| Rna polimeraz II promotör transkripsiyonunun negatif düzenlenmesi (bp) | 41 | | 57 | 135 | 81 | 80 | | 83 | 58 |
| Rna polimeraz II promotörden transkripsiyonunun düzenlenmesi | 21 | 14 | 35 | 33 | | 41 | | 44 | 34 |
| Rna polimeraz II promotörü ile transkripsiyon(bp) | 8 | | | 110 | | | | | 12 |
| Rna polimeraz II promotöründen transkripsiyon başlatma | | | | 35 | | | | | |
| Rna polimeraz II promotörünün transkripsiyonunun pozitif düzenlenmesi (bp) | 49 | 29 | 73 | 195 | | 95 | | 110 | 69 |
| Rna uç işlenmesi (bp) | 3 | | | | | | | 4 | |
| Scf bağımlı proteozomal ubiquitin bağımlı protein katabolik işlemi (bp) | | | 4 | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|----|----|--|-----|-----|
| Sekansa özgü dna bağlanma transkripsiyon faktör aktivitesinin pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 8 | | | | | | 9 |
| Sekans-spesifik dna bağlayıcı transkripsiyon faktör aktivitesinin negatif düzenlenmesi (bp) | | | 8 | | | 13 | | | |
| Sentrozom lokalizasyonu (bp) | 2 | | | | | | | | |
| Serotonin alımının negatif düzenlenmesi (bp) | | | 3 | | | | | | |
| Siklin-bağımlı protein kinaz aktivitesinin negatif düzenlenmesi (bp) | | | | | 7 | | | | |
| Sikloheksimide yanıt (bp) | 2 | | | | 65 | | | | |
| Sil oluşumu (bp) | | | | | 7 | | | | |
| Sinapsa protein lokalizasyonu (bp) | | | | 180 | 7 | | | | |
| Sinir sistemi gelişimi (bp) | 24 | 13 | 28 | 155 | 53 | 45 | | 57 | 30 |
| Sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesi(bp) | | | 6 | | | | | | |
| Sinyal transdüksiyonunun negatif düzenlenmesi (bp) | 6 | | | 38 | | | | | |
| Sitokin ilişkili sinyal yolağı (bp) | | | | | | 19 | | | 12 |
| Sitokinez (bp) | | | | | 9 | | | | |
| Smad protein kompleksinin oluşumu (bp) | | | 3 | | | | | | |
| Sodyum iyon pompası(bp) | | | 8 | | | | | | 10 |
| Sodyum iyonlarının membran dışına taşınımı(bp) | | | | 100 | | | | | |
| Sodyum iyonlarının taşınımı(bp) | 10 | | 14 | 81 | | | | 21 | 13 |
| Somatik kök hücrelerde idame (bp) | | | | 62 | | | | | |
| Spliceozomlar aracılığıyla çekirdek mrnasının kırılması (bp) | | | | 165 | | | | 8 | |
| Stat proteininin tirozin fosforilasyonu(bp) | 2 | | | | 27 | | | | |
| Steroid hormon kaynaklı sinyal yolağı (bp) | | | | | | 12 | | | 10 |
| Sterol azalmasına karşı yanıt (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Stoplazma organizasyonu (bp) | 2 | | | | 15 | | | | |
| Strese karşı yanıt (bp) | | | 13 | 279 | | | | 23 | |
| Süperoksit e karşı yanıt(bp) | | | | | 15 | | | | |
| T hücersi homeostazı (bp) | | | | 260 | 7 | | | | |
| T hücre aktivasyonunun pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 228 | | | | 6 | |
| T hücre çoğalmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | 4 | | | | | | | |
| T hücre kaynaklı sitotoksisitenin negatif düzenlenmesi (bp) | | | 2 | | | | | | |
| T hücre reseptörü sinyal yolağı(bp) | | | | 288 | | 11 | | 8 | |
| T hücresi etkinleştirilmesi (bp) | | 4 | | | | | | 11 | |
| T hücresi farklılaşması (bp) | | | | 31 | | | | | |
| T yardımcı hücre farklılaşmasının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 244 | | 4 | | | |
| Taşınma (bp) | 97 | 66 | | 369 | | | | 251 | 130 |
| Telomer idamesi (bp) | | | | 351 | | 7 | | | |
| Telomer kısalması aracılığıyla telomer idamesi (bp) | | | 2 | | | | | | |
| Telomeraz aktivitesinin negatif düzenlenmesi (bp) | | | 4 | | | | | | |
| Temel wnt reseptör sinyal yolağı (bp) | 10 | | | 314 | | 15 | | | 12 |

| | | | | | | | | |
|--|-----|----|----|-----|----|----|----|---------|
| Tgf-b reseptör sinyal yolağının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | 5 | | | | | |
| Tgf-b transformunun pozitif düzenlenmesi (bp) | 2 | | | 6 | 3 | | | |
| Tgf-b üretiminin negatif düzenlenmesi (bp) | | | 2 | | | | | |
| Tgf-beta kompleks donanımı (bp) | 2 | | | | | | | |
| Tgf-beta sinyal yolağı(bp) | 8 | | 8 | 367 | 67 | 12 | | 12 |
| Transkripsiyonun düzenlenmesi,dna-bağımlı (bp) | 117 | 79 | | 276 | 15 | | | 298 180 |
| Translasyonun düzenlenmesi(bp) | | | 11 | 65 | | | | |
| Translasyonun pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 151 | | | | |
| Transmembran reseptör proteini , tirozin kinazın sinyal yolağı(bp) | 8 | | | 320 | | 12 | | 15 |
| Transmembranda taşınma(bp) | 28 | 19 | | 36 | | 69 | | 60 31 |
| Transmembrandan iyon taşınmasının düzenlenmesi (bp) | | | | 148 | | 32 | | 27 |
| Ubiküitin bağlı proteinin katabolik süreci (bp) | | | 13 | 286 | | 22 | | 28 |
| Ubiküitin-bağılı protein katabolik sürecine yol açan protein ubikütinasyonu (bp) | | | | 255 | | | | 11 7 |
| Uv'ye hücre sel yanıt (bp) | | 4 | | | | | | 7 |
| Vasküler endotelial büyüme faktörü üretiminin düzenlenmesi (bp) | | | | 33 | | | | |
| Vezikül aracılığıyla taşınma (bp) | 15 | | 21 | 285 | | 34 | | 28 |
| Vezikül yerleştirme (bp) | 2 | | | | 35 | | | |
| Viral üreme (bp) | | | | | | | | |
| Viruse karşı yanıt(bp) | | | 10 | 358 | | | | |
| Wnt reseptör sinyal yolağının negatif düzenlenmesi (bp) | | | 8 | | | | | |
| Wnt reseptör sinyal yolağının pozitif düzenlenmesi (bp) | | | | 359 | 20 | | | |
| Wnt reseptörünün sinyal yolağı (bp) | 13 | | 18 | 30 | | 29 | | 37 19 |
| Yağ asidi biyosentez süreci (bp) | | | | 283 | | 13 | | 16 |
| Yağ asidi farklılaşmasının negatif düzenlenmesi (bp) | | | 6 | | | | | |
| Yağ asidi metabolik süreci (bp) | | | | | | 16 | | |
| Yağ asidi oksidasyonu (bp) | | | | | 5 | | | |
| Yağ hücresi farklılaşması (bp) | | | 6 | 308 | 8 | | | |
| Yara iyileşmesi (bp) | 7 | | | | | 10 | | |
| Yetişkinlerdeki davranış değişimleri (bp) | | | 7 | 139 | 11 | 9 | 10 | 11 |
| Yetişkinlerdeki yürüyüş değişimleri (bp) | | | | 182 | | | | |

9.ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mısra NADİR

Doğum Yeri: Eskişehir-Merkez

Doğum Tarihi: 11.08.1990

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu Lise: Eskişehir Gazi Süper Lisesi(2004-2008)

Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2008-2012)

Uluslararası ya da Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Mısra NADİR, Özlem Tufanlı, F. Funda DEMİRSOY, Ebru ERBAY, Arzu ATALAY
Lipotoksik Endoplazmik Retikulum Stres Sonucu İfadeyi Değişen Mikromaların
Tanımlanması Ve Regüle Ettiği Genlerin Analizi, XIII. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ ve
GENETİK KONGRESİ (Ekim, 2013).