

**T.C**  
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**  
**TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Caenorhabditis elegans* OOSİT ve EMBRİYOLARINDA GLOBAL MİKRORNAOM  
PROFİLLERİNİN ANALİZİ**

**Selen GÜÇLÜ**

**Danışman Öğretim Üyesi**

**Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY**

**ANKARA**

**2013**

## ONAY

Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY danışmanlığında, Selen GÜÇLÜ tarafından hazırlanan “*Caenorhabditis elegans* OOSİT ve EMBRİYOLARINDA GLOBAL MİKRORNAOM PROFİLLERİNİN ANALİZİ” adlı bu tez çalışması 21/01/2013 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

# ***Caenorhabditis elegans* OOSİT ve EMBRİYOLARINDA GLOBAL MİKORNAOM PROFİLLERİNİN ANALİZİ**

## **ÖZET**

Pek çok organizmada oosit-embriyo geçişi transkripsiyon ve translasyon yokluğunda gerçekleşir. Dolayısı ile fertilizasyon ve erken embriyonik bölünmeler, oogenezi sırasında sentezlenen ve olgun oositlerde depolanan maternal mRNA ve proteinlerle sağlanır. Erken embriyoda somatik blastomerlerin farklılaşması ve eşey hücre öncülü hücrelerin (germline) özelleşmesi için somatik blastomerlerden totipotensi programının silinmesi ve zigotik transkripsiyonun başlaması gerekir. *Caenorhabditis elegans* embriyosunda maternal proteinlerin somatik blastomerlerde nasıl yıkıldığı tanımlanmıştır (DeRenzo *et al.* 2003). Ancak *C. elegans* erken embriyosunda, maternal transkriptlerin somatik blastomerlerden nasıl uzaklaştırıldığı bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında *C. elegans* germline ve erken embriyolarının – zigotik genom aktivasyonu öncesi ve sonrası- miRNA profilleri yüksek işlem hacimli pirosekanslama ve miRNA mikroarray teknolojileri kullanılarak oluşturulmuştur. Böylece hem oosit-embriyo geçişinde rol oynayan miRNAlar tanımlanmaya çalışılmış hem de *C. elegans* erken embriyosunda maternal mRNA yıkımında mikroRNAların rolü olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Oositte ifade edilen miRNAlar (totipotensi ile ilişkili maternal miRNAlar), 2-blastomerli embriyoda ifade edilen miRNAlar (zigotik genom aktivasyonu öncesi), 8-blastomerli embriyoda ifade edilen miRNAlar (zigotik genom aktivasyonu sonrası) ve gastrulasyon öncesi erken evre karışık miRNAların ifade seviyeleri kıyaslanarak çarpıcı artış-azalış gösteren aday miRNAlar belirlenmiştir. PCR ile ifade seviyelerinin doğrulamasından sonra, biyoinformatik araçlar kullanılarak mikroRNAların hedeflediği mRNAlar tespit edilmiş ve yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada tanımlanan miRNAların detaylı analizi, oosit-embriyo geçişi, erken embriyonik gelişimin düzenlenmesi, somatik blastomerlerin farklılaşması ve totipotentlik statüsünün idamesi gibi süreçlere ışık tutacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** *Caenorhabditis elegans*, mikroRNA, erken embriyogenez, oosit-embriyo geçişi, pirosekanslama, mikroarray

# **ANALYSIS OF GLOBAL MICRORNAOME PROFILES in *Caenorhabditis elegans* OOCYTE and EMBRYOS**

## **ABSTRACT**

In many organisms, the transition from oocyte to embryo occurs in the absence of transcription and translation. Therefore, early developmental programs rely on maternal mRNAs and proteins which are synthesized during oogenesis and used during fertilization and early embryonic divisions. For an early embryo, it is vital to clear totipotency programme in the somatic blastomeres and start zygotic transcription in order to maintain proper embryonic development, differentiation of somatic lineages and germline specification. How maternal proteins are degraded in the somatic blastomeres of *C. elegans* embryos has been described (DeRenzo *et al.* 2003). In contrast, virtually nothing is known how maternal transcripts are cleared from the soma of early embryo in worms. By using high-throughput pyrosequencing and miRNA microarray technologies, miRNAs from *C. elegans* germline and early embryos -before and after zygotic genome activation- were sequenced and miRNAome profiles were generated in this thesis study. The aim of this study is to analyze the miRNAome profiles in *C.elegans* oocytes and early embryos and to determine whether microRNAs have role in maternal mRNA degradation in *C.elegans* in the early embriyo. Germline miRNAs (totipotency associated maternal miRNAs), 2-blastomere stage embryo miRNAs (before zygotic genome activation), 8-blastomere stage miRNAs (after zygotic genome activation), mixed stage miRNAs (before gastrula stage) were compared in order to identify differentially expressed miRNAs. After selection and PCR validation of the candidate miRNAs, downstream targets were identified by using bioinformatic tools and pathway analysis was performed. Further analysis of the identified miRNAs during this study will provide a better understanding of oocyte-embryo transition, regulation of early embryonic development, germline-soma differentiation and maintenance of totipotency status.

**Key Words:** *Caenorhabditis elegans*, microRNA, early embryogenesis, oocyte-embryo transition, pyrosequencing, microarray

## TEŞEKKÜR

Başarılı bilim insanı duruşuyla bana her zaman örnek olan, öngörüsü, sorun çözümündeki yaklaşımları ile rehberliğine ve tecrübelerine ömür boyu ihtiyaç duyacağım değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY'a,

Bu tez çalışmasının mali kaynağını sağlayan TÜBİTAK'a (Proje No:108T918) ve sağladığı 2228 no'lu burs ile yüksek lisans eğitimim süresince maddi kaygılarımı azaltıp hayatımı kolaylaştırarak, bilimsel çalışmalara rahatça yoğunlaşmama yardımcı olan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Hiç bitmeyen enerjileri, hoşgörülü tutumları, hayata bakışları, güler yüzleri, aile hayatları ile örnek aldığım kıymetli arkadaşlarım, dostlarım Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na ve Uzm. Bio. F. Funda DEMİRSOY'a, yüksek lisansa başladığım ilk günlerden mezun olduğu zamana dek geçen sürede bilimsel anlamda bildiklerini cömertçe paylaşan, laboratuvara alışma sürecimde bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Uzm. Mol. Bio. Nuri ERGEN'e,

Deney verilerimin analizi için özveri ile zamanını ayıran, sabırla yardımcı olan, tüm imkanları ile ofisini bana açan arkadaşım Uzm. Mol. Bio. Ahmet Raşit ÖZTÜRK'e,

Tez çalışmalarımı gerçekleştirmeme ortam sağlayan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne, Merkez Laboratuvarı çalışanlarına ve tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi manevi hiç bir desteği esirgemeyen, her zaman yanımda olan, erdemli bir insan olmanın, kaliteli bir hayat yaşamamanın önemini her fırsatta vurgulayan, mutlu bir insan olmak için sadece başarının yeterli olmayacağını, aile hayatının motive edici gücünü bana varlıklarıyla gösteren güzel aileme, özellikle annem Hacer GÜÇLÜ ve babam Mustafa GÜÇLÜ'ye sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Ocak, 2013

Selen GÜÇLÜ

## İÇİNDEKİLER

ONAY .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	x
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	1
1.2. Oosit-Embriyo Geçişi.....	3
1.3. MikroRNAlar .....	9
1.4. Tezin Amacı .....	18
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>20</b>
2.1. mikroRNA Profilleme Metodları .....	21
2.2. miRNA Tanımlanmasında Kullanılan Biyoinformatik Araçlar .....	26
<b>3. MATERYAL YÖNTEM.....</b>	<b>29</b>
3.1. Materyal .....	29
3.1.1. Genel reaktifler.....	29
3.1.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> suşları .....	29
3.1.3. <i>C. elegans</i> idamesinde kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar .....	30
3.1.4. cDNA sentez reaktifleri.....	31
3.1.5. RNA izolasyon reaktifleri .....	31
3.1.6. QRT-PCR reaktifleri .....	31
3.1.7. Kullanılan cihazlar .....	32
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. <i>C. elegans</i> genel idamesi.....	34
3.2.2. Total RNA izolasyonu.....	37
3.2.3. Yeni nesil sekanslama .....	38
3.2.4. cDNA sentezi ve reverse transkripsiyon .....	61
3.2.5. qRT-PCR (Eş zamanlı PCR) .....	62
3.2.6. Hedef mRNA <i>in silico</i> analizi .....	64
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>65</b>
4.1. Diseksiyon ile Evre-spesifik Embriyo ve Oosit Toplanması .....	65
4.2. Erişkin N2 <i>C. elegans</i> 2 ve 8 Hücreli Embriyolardan Total RNA İzolasyonu ve miRNA Mikrodizi Analizi .....	65

4.3. Erişkin <i>fog-2(q71)</i> Mutant <i>C. elegans</i> Oositlerinden ve Karışık Evre Embriyolardan Total RNA İzolasyonu.....	66
4.4. Yeni Nesil Sekanslama ile <i>fog-2(q71)</i> <i>C.elegans</i> Oosit ve Erken Evre Embriyolarının miRNAom Profillerinin Belirlenmesi .....	67
4.5. Yeni Nesil Sekans Datasının MiRanalyzer Programı ile Analiz Sonuçları.....	83
4.6. Exiqon MikroRNA Mikroarray Sonuçları .....	86
4.6. Maternal RNAların Yıkımından Sorumlu Olabilecek MikroRNAların Belirlenmesi.....	90
4.7. QRT-PCR Sonuçları.....	92
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>102</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>111</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>115</b>
EK 1. Çalışmada kullanılan primer bilgileri .....	115
EK 2. qRT-PCR ile analiz edilen mikroRNAların Cp değerleri tablosu.....	116
EK 3. QRT-PCR ile analiz edilen mikroRNAların U18 transkripti ile Cp değerleri normalizasyon sonuçları .....	117
EK 4. QRT-PCR sonuçlarının standart sapmalarını gösteren grafikler .....	118
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>119</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 <i>C. elegans</i> hayat döngüsü.....	1
Şekil 1.2 <i>C. elegans</i> gelişim evreleri .....	2
Şekil 1.3 Erken hücre bölünmelerinin şematik gösterimi.. .....	4
Şekil 1.4 <i>C. elegans</i> gonad kolunun şematik gösterimi .....	5
Şekil 1.5 <i>C. elegans</i> embriyosu bölünmeleri sırasında P granüllerinin ayrılması.....	5
Şekil 1.6 Farklı model organizmalarda MZG zamanlaması.....	7
Şekil 1.7 Zebra balığında maternal zigotik geçiş .....	8
Şekil 1.8 MikroRNA biyogenezi.....	11
Şekil 1.9 “Seed Region” ve miRNA-hedef tanıma mekanizması .....	12
Şekil 1.10 MikroRNA hedefleme mekanizması.....	13
Şekil 1.11 mRNA yıkımı.....	13
Şekil 1.12 miRNA-aracılı translasyonel baskılamanın şematik gösterimi.....	14
Şekil 1.13 Zebra balığında miR-430’un maternal RNA yıkımına etkisi.....	16
Şekil 2.1. Yeni nesil sekanslama platformları arasındaki metod farklılıkları .....	23
Şekil 2.2. Roche 454 GS FLX teknolojisi.....	25
Şekil 3.1. <i>C. elegans</i> diseksiyonunun şematik gösterimi .....	36
Şekil 3.2. Vakum sistemi.....	50
Şekil 3.3. Boncuk depolama aygıtının pikotitre plaka ile birleştirilmesi .....	57
Şekil 3.4. Yükleme bölgesinin doldurulması .....	58
Şekil 3.5. Sekans reaktifleri kasetinin yerleştirilmesi .....	60
Şekil 3.6. Pikotitre plakanın sisteme yerleştirilmesi .....	61
Şekil 4.1. Disekte edilmiş germline ve 2-8 hücreli embriyo görüntüleri. ....	65
Şekil 4.2. SYBR Gold ile boyanmış total RNA görüntüsü .....	68
Şekil 4.3. İlk ligasyon sonrası 45 bç civarında gözlenen ürün. ....	68
Şekil 4.4. %4’lük Metaphor agaroz jelde cDNA’nın PCR amplifikasyonu görüntüsü .....	69
Şekil 4.5. Amplifiye olmuş cDNA’nın %4lük metaphor agaroz jelden kesilmiş görüntüsü.....	70
Şekil 4.6. %2’lik metafor agaroz jelde 454 PCR ürünleri.....	70
Şekil 4.7. %2’lik Metaphor agaroz jelden bantlar saflaştırılmak üzere kesimi sonrası.....	71
Şekil 4.8. %2’lik agaroz jelde saflaştırılmış 454 PCR ürününün kontrolü .....	71
Şekil 4.9. Picogreen belirteci ile hazırlanan standart grafik.....	72
Şekil 4.10. GS FLX reaksiyon raporu .....	77
Şekil 4.11. Pirosekanslama sonrası pikotitre plakadan alınan sinyal görüntüsü .....	78
Şekil 4.12. GS FLX reaksiyon raporu .....	78
Şekil 4.13. Oosit ve erken embriyo ham verisi .....	79
Şekil 4.14. Pirosekanslamada kullanılan linker diziler ve ham veride yer aldıkları kısımlar .....	80
Şekil 4.15. Linker diziler temizlenmesi sonrası istatistikler .....	81
Şekil 4.16. Linker dizilerin temizlenmesi sonrası en popüler dizilerin sıralanması.....	82
Şekil 4.17. miRanalyzer programının rapor sayfası .....	83
Şekil 4.18. 8 blastomerli <i>C.elegans</i> embriyolarında 2 blastomerlilere kıyasla artış gösteren 19 miRNA .....	87



Şekil 4.19. En yüksek farklılık gösteren 50 miRNA'nın gruplandırılması .....	88
Şekil 4.20. Üç biyolojik tekrarlı N2 2 ve 8 blastomerli embriyolar için seçilen miRNAların QRT-PCR sonucu.....	93
Şekil 4.21. İki biyolojik tekrarlı <i>fog-2(q71)V</i> oosit (germline) ve embriyolarından seçilen miRNAlar için QRT-PCR sonucu.....	93
Şekil 4.22. miR-48-5p ve lin-4-5p ifade seviyelerinin 2,8 ve erken evre karışık evre N2 <i>C.elegans</i> 'ta QRT-PCR ile analizi.....	94
Şekil 4.23. Dört farklı miRNA'nın QRT-PCR ile oosit ve embriyolarda ifade seviyesi analizi.....	94
Şekil 4.24. microRNA.org veritabanı ile miRNAların hedef mRNAlarının belirlenmesi.....	96
Şekil 4.25. mikroRNA'nın hedef transkript ile etkileştiği bölgenin görüntüsü.....	96
Şekil 4.26. miRNAlar tarafından hedeflenen mRNAların microRNA.org Ağustos 2010 sürümü ile <i>in silico</i> tayini.....	97
Şekil 4.27. miR-48-5p'nin hedef genlerinin Genocodis yolak analizi sonucunun pasta dilimi ve sütun grafiği gösterimi .....	99
Şekil 5.1. <i>Drosophila</i> , insan ve <i>C. elegans</i> 'ta mikroRNA 5' uç homolojisi analizine göre homoloji gösteren miRNAlar.....	109

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. miRBase sürüm 19.0'a göre çeşitli organizmalardaki güncel miRNA sayılar.....	20
Çizelge 2.2. Sanger sekanslama ve yeni nesil sekanslama teknolojilerinin özellikleri.....	24
Çizelge 2.3. miRNA çalışmalarında kullanılan biyoinformatik araçlar .....	27
Çizelge 3.1. <i>C. elegans</i> idamesinde kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar .....	30
Çizelge 3.2. RNA izolasyon reaktifleri .....	31
Çizelge 3.3. Kullanılan cihazlar listesi.....	32
Çizelge 3.4. Birinci ligasyon reaktifleri .....	40
Çizelge 3.5. İkinci ligasyon reaktifleri .....	41
Çizelge 3.6. Standart grafik için picogreen belirteci ile hazırlanan seyreltmeler.....	46
Çizelge 3.7. Live amplifikasyon karışımı içeriği .....	48
Çizelge 3.8. EmPCR amplifikasyon koşulları.....	49
Çizelge 3.9. NGS platformu için kullanılan boncuklar ve fonksiyonları .....	54
Çizelge 3.10. DNA boncuklarının hazırlanması .....	55
Çizelge 3.11. DNA boncukları inkübasyon karışımının hazırlanması .....	55
Çizelge 3.12. DNA boncuklarının DBIM ile seyreltilmesi .....	56
Çizelge 3.13. Enzim ve Ppiase boncukların boncuk katmanı 1,3 ve 4 için hazırlanması .....	56
Çizelge 3.14. Boncuk katmanı 2'nin hazırlanması.....	57
Çizelge 3.15. Boncuk tabakası 1 için yüklenecek enzim boncuğu hacmi.....	58
Çizelge 3.16. Boncuk tabakası 2 için yüklenecek DNA ve paketleme boncuğu hacmi.....	59
Çizelge 3.17. Boncuk tabakası 3 için yüklenecek enzim boncuğu hacmi.....	59
Çizelge 3.18. Boncuk katmanı 4 için yüklenecek Ppiase boncuk hacmi .....	60
Çizelge 3.19. Sekanslama reaktifleri.....	60
Çizelge 3.20. qRT-PCR reaksiyonu reaktif miktarları .....	63
Çizelge 3.21. QRT-PCR koşulları.....	64
Çizelge 4.1. Toplanan embriyolardan elde edilen RNA miktarı .....	66
Çizelge 4.2. <i>fog-2(q71)</i> oosit ve karışık evre embriyolardan izole edilen RNA miktarları .....	66
Çizelge 4.3. Standart grafik ile hesaplanan örnek konsantrasyonları.....	73
Çizelge 4.4. Örnekler için boncuk sayısı ve % boncuk kazanımı .....	75
Çizelge 4.5. Sekans primeri eklenmiş örnekler için % boncuk kazanımı .....	75
Çizelge 4.6. DNA boncukları için örneklerden alınacak hacim.....	76
Çizelge 4.7. Yeni nesil sekanslama ile tespit edilen miRNAların okunma sayıları .....	84
Çizelge 4.8. Exiqon mikroarray ile analiz edilen miRNAların 2 ve 8 blastomerli embriyolar arasındaki ifade farklılıkları .....	889
Çizelge 4.9. İleri analizlerde kullanılmak üzere seçilen miRNA listesi.....	91
Çizelge 4.10. Çalışılan mikroRNAlar için microRNA.org'da tespit edilen hedef mRNA sayısı ve Genecodis'te ilişkilendirilen mRNA sayısı.....	98
Çizelge 4.11. Genecodis yolak analizine göre her bir miRNAnın regüle ettiği mRNAların ilgili olduğu biyolojik süreçler.....	100

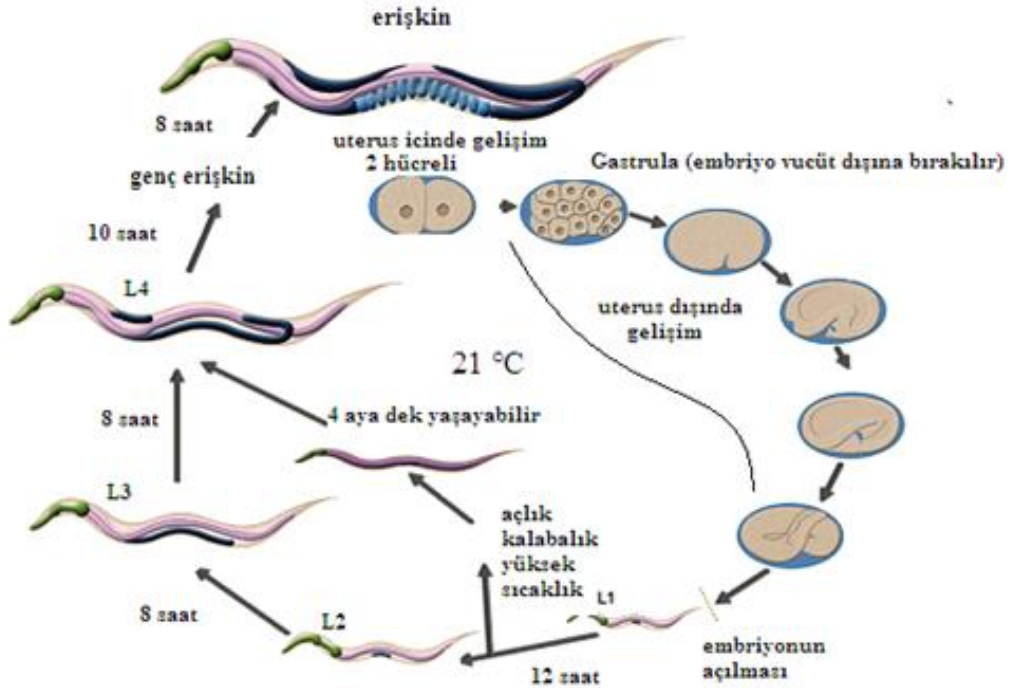
## SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µM	Mikro Molar
bç	Baz çifti
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	Komplementer DNA
ddH <sub>2</sub> O	Çift distile su
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Dioksiribonükleotit
DTT	Ditiotreitol
EtOH	Etanol
g	Gram
g	Yer çekimi kuvveti
Hz	Hertz
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dipotasyum hidrojen fosfat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat
L	Litre
M	Mol
Mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
mM	MiliMolar
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	MikroRNA
ml	Mililitre
N2	Yabanıl tip <i>C. elegans</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
NGM	Nematode Growth Medium (Nematod Büyüme Ortamı)
NGS(YNS)	Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Sekanslama)
PBS	Fosfat buffer saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCF	Rölatif santrifüj kuvveti
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferans
RPM	Dakikadaki dönüş sayısı
QRT-PCR	Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
TBE	Tris Borik Asit-EDTA
TE	Tris EDTA
UTR	(Untranslated Region) Transle Olmayan Bölge
UV	Ultraviyole
V	Volt

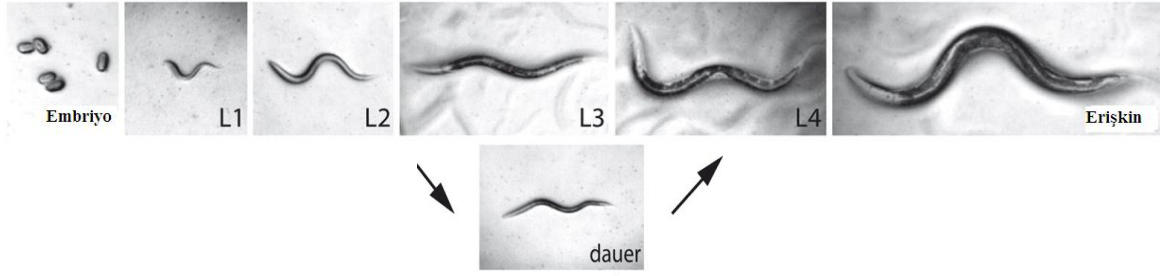
# 1. GİRİŞ

## 1.1. *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) parazitik olmayan, yaklaşık 1 mm boyunda, şeffaf, manipüle etmesi ve gözlemesi kolay, bakteri ile beslenen (*E. coli*), hermafrodit ve erkek olmak üzere iki cinsiyete sahip bir model organizmadır (Brenner 1973). *C. elegans*, 3.5 günde gelişimsel olarak birbirini takip eden dört (L1-L4) larval dönemden sonra embriyo üretebilen erişkin forma gelmektedir. *C. elegans*'ın 21 °C'deki hayat döngüsü şematik olarak Şekil 1.1'de gösterilmiştir. Çevresel şartlar uygun olduğunda yaklaşık üç hafta yaşayabilen *C. elegans*; açlık, kalabalık, sıcaklık gibi uygun olmayan koşullarda ise L1-L2 evresinden sonra L3 evresi yerine, 4 aya dek yaşayabilen "dauer" olarak isimlendirilen forma dönüşebilmektedir. Stres koşulları ortadan kalktığında ise bu formdaki bireyler, L4 evresinden gelişimlerine devam ederek hayat döngülerini tamamlamaktadır (Fielenbach and Antebi 2008). *C. elegans* gelişim evreleri Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.1.** *C. elegans* hayat döngüsü. Gastrulasyondan sonra vücut dışına bırakılan embriyo L1 larva evresine ulaşana dek gelişimini dışarıda sürdürür. L1, L2, L3 ve L4 olmak üzere 4 larval evre geçirir. ( www.wormatlas.com'dan alınıp modifiye edilmiştir.)



**Şekil 1.2.** *C. elegans* gelişim evreleri. L1 aşamasındayken açlık, sıcaklık, kalabalığa maruz kalırsa dauer formuna dönüşür. (Fielenbach and Antebi 2008'den modifiye edilmiştir.)

*C. elegans*'ın model organizma olarak yaygın bir kullanıma sahip olmasının pek çok nedeni bulunmaktadır. Hermafroditlerin kendini dölleyerek 300-350 yavru meydana getirebilmeleri, sperm ve yumurtanın birleşmesiyle meydana gelen bir embriyodan gelişmesi, hücre sayısının sabit olması, gelişimsel aşamaların takip edilebilirliğinin kolay olması, yüksek organizmalarda gözlenen hücre farklılaşması ve hücre çoğalmasının varlığı, vücut örtüsünün şeffaf olması, hayat döngüsünün kısa olması, genomunun küçük olması (yaklaşık 100 megabaz) ve bilinmesi gibi özellikleri gelişimsel biyoloji, hücre biyolojisi, embriyogenez, kanser araştırmalarında elverişli bir model organizma olarak tercih edilmesinin sebepleridir.

Biyoinformatik araçlarla yapılan analizlerde, *C.elegans* genlerinin %60-80'inin insanda homologları tanımlanmıştır (Kaletta and Hengartner 2006). 2000 yılında yapılan bir proteom çalışmasında bilinen 18452 *C.elegans* EST dizisinin en azından %83'ünün (15334 dizi) insan homologları olduğu ve 7954 *C.elegans* proteinini kodlayan, bilinen insan transkriptleri olduğu bildirilmiştir, sadece %11'lik kısım nematod spesifik genleri kodlamaktadır (Lai *et al.* 2000). Gen ve protein seviyesi haricinde *C.elegans* miRNAları sinek ve insan miRNAları ile de homoloji göstermektedir. 2008'de miRBase 10.1 sürümünde yer alan 139 *C. elegans* ve 733 insan miRNAsı ile 5' uç dizi homolojisi analizleri gerçekleştirilmiş ve 76 *C.elegans* miRNAsının insanda da karşılıkları bulunduğu görülmüştür; tanımlanan 76 *C.elegans-H.sapiens* miRNA ailesinde 76 *C.elegans* miRNAsı ve 102 insan miRNAsı yer almaktadır (Ibanez-Ventoso *et al.* 2008).

2002 Tıp/Fizyoloji Nobel ödülü *C.elegans*'ta organ gelişimi genetiği ve programlanmış hücre ölümü çalışmaları ile Sydney Brenner, Robert Horvitz ve John Sulston'a verilmiştir. 2006 Tıp/Fizyoloji alanındaki Nobel ödülü ise *C.elegans*'ta RNA interferans keşiflerinden dolayı Andrew Fire ve Craig Mello'ya verilmiştir. Martin Chalfie *C.elegans*'ta yeşil floresan protein ile ilgili çalışmalarından dolayı 2008 Nobel Kimya ödülünü diğer araştırmacılarla paylaşmıştır.

## **1.2. Oosit-Embriyo Geçişi**

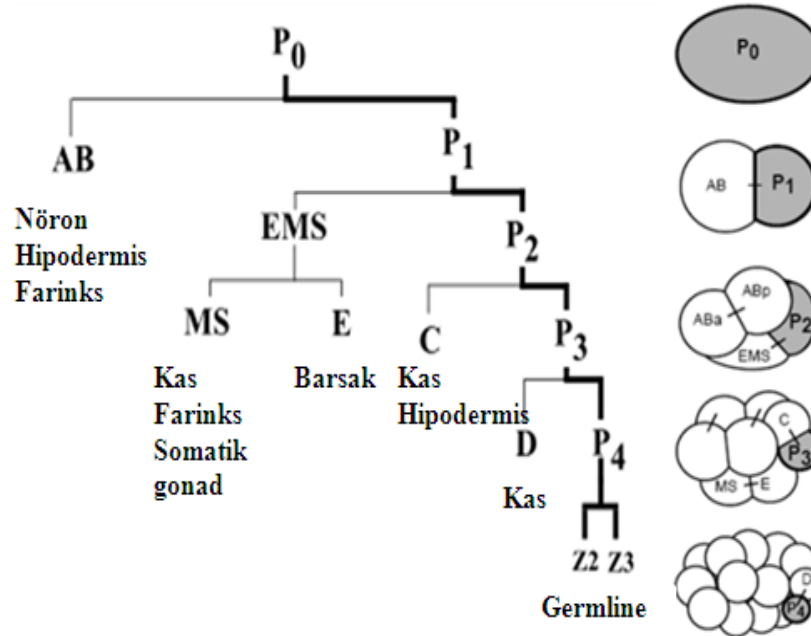
Erken embriyonik gelişim sırasında en önemli hücre farklılaşması olaylarından biri, blastomerlerin somatik ve germline (eşey hücre öncülü) hücrelerini oluşturacak şekilde ayrılmalarıdır. Eşey hücreleri tüm hücre hatlarına dönüşebilme potansiyeline sahipken, somatik hücreler dereceli olarak farklılaşacakları dokuyu oluşturmaktadır.

Nematod *C. elegans*'ta bu eşey-somatik ayrımı, zigotun ilk 4 bölünmesinde meydana gelmektedir. Özelleşmiş bir hücre olan oositin, döllenme sonrası totipotent bir embriyoya dönüşümü oldukça karmaşık bir hücre farklılaşmasıdır. Olgun oositte, döllenme sırasında ve erken embriyoda transkripsiyon ve translasyon durmaktadır. Oogenez sırasında oositte depolanmış proteinler, transkripsiyon faktörleri ve onları kodlayan mRNAların kullanılmasıyla ilkin bölünmeler gerçekleşmektedir.

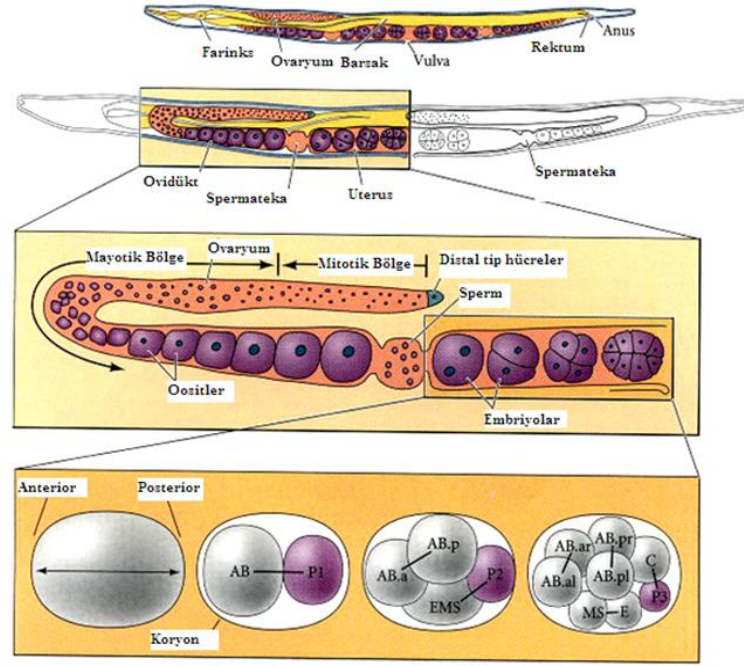
$P_0$  olarak adlandırılan zigot, ilk eşey hücre öncülü blastomerleri oluşturmak üzere bölünmeye başlar. İlk bölünme, büyük kısmı somatik blastomer AB ve daha küçük kısmı germline hücreleri  $P_1$ 'i meydana getirmek üzere gerçekleşir. AB blastomerleri eşit bölünmeler ile somatik hücre hattını oluşturur. AB blastomerlerin aksine  $P_1$  germline hücreleri ise eşit olmayan bölünmeler ile somatik olan EMS ve germline hücreleri  $P_2$ 'yi meydana getirmektedir. Eşit olmayan germline hücre bölünmeleri 5 kurucu hücre hattı (AB, MS, E, C ve D) oluşana dek sürmekte ve primordial germ (eşey) hücreleri olan  $P_4$ 'ü oluşturmaktadır. Bu eşey hücreleri sonraki nesilin gametlerini oluşturacak kök hücre

popülasyonlarıdır (Şekil 1.3). P4 ikiye bölündükten sonra meydana gelen Z2 ve Z3 erişkin *C.elegans*'taki iki gonad kolunu meydana getirmektedir.

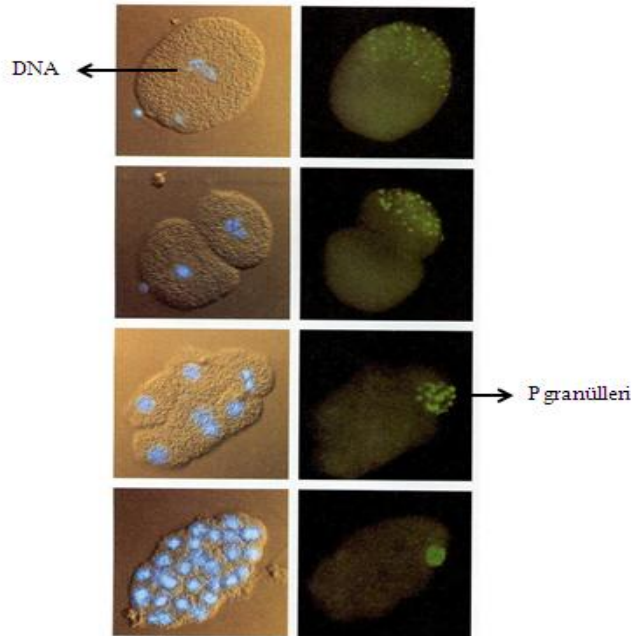
Somatik blastomerlerin akıbeti, hücre-hücre etkileşimi ve maternal kodlanan bileşenlerin asimetric aktivitesi ile belirlenmektedir. Germline hücrelerinden somatik hücre farklılaşmasının mekanizması ise tam olarak netlik kazanmamıştır. Asimetric dağılım gösteren, içeriği tam olarak bilinmeyen germline'a özgü P granülleri, döllenme sırasında tekdüze bir dağılım göstermektedir ancak bir hücreli embriyonun ilk bölünmesinin ardından embriyonun posterior kısmında lokalize olmaya başlamaktadır. Bu ve bunu takip eden diğer bölünmeler boyunca P granülleri, germline hücreleri ile ilişkisini korumaya devam etmektedir. Şekil 1.4'te şematik olarak *C. elegans* gonad kolu, Şekil 1.5'te ise P granüllerinin ayrılması gösterilmiştir. Germline ya da somatik hücelere özgü bileşenlerin asimetric dağılımının, soma-germline ayrımını sağladığı düşünülmektedir. Erken bölünmeler sırasında etkili olan bileşenlerden başlıcası, maternal ya da embriyonik mRNAlardır (Seydoux and Fire 1994).



**Şekil 1.3.** Erken hücre bölünmelerinin şematik gösterimi. P0 zigottur. Eşey hücre öncüllerinin (P0-P3) asimetric bölünmesiyle 5 somatik kurucu hücre (AB, MS, E, C, D) meydana gelmektedir. Koyu çizgi P granüllerinin ayrılmasını göstermektedir (Seydoux and Fire 1994'ten modifiye edilmiştir.)



**Şekil 1.4.** *C. elegans* gonad kolunun şematik gösterimi. Ortak sitoplazmayı paylaşan mitotik hücreler, mayotik hücelere dönüşür. Herbiri kendi sitoplazması ile çevrelenerek spermatekaya yaklaşır. Döllenme sonrası oluşan embriyolar gastrulasyona dek uterusda gelişir. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10011/>'dan modifiye edilmiştir.)



**Şekil 1.3.** *C. elegans* embriyosu bölünmeleri sırasında P granüllerinin ayrılması. Sol kolonda Hoescht ile boyanmış DNA mavi renkte görünmektedir. Sağda ise P granülleri bulunur. P granüllerinin germline hücre hatlarında yıkılmayıp korunduğu görülmektedir. (S. Strome tarafından görüntülenene bu fotoğraf "Early Development of the Nematode *Caenorhabditis elegans*" kitabından modifiye edilerek alınmıştır.)



Çok-hücreli canlıların çoğunda embriyonik gelişimin erken aşamalarında protein sentezi, yumurtaya anneden yüklenen, oogenez sırasında transkribe olup maternal sitoplazmada depolanan gen ürünleri ile kontrol edilmektedir (Seydoux 1996). Bu transkriptler organizmaya bağlı olarak günler, haftalar ya da aylarca stabil kalabildiği gibi ilk bölünmelerle hemen ortadan da kalkabilmektedir. Erken embriyoda bir kaç saatlik bir periyotta maternal mRNAların % 30-40'ından % 60'ına bir yıkım gözlenmektedir.

Döllenmeyi takip eden süreçte zigotun tam erkilliğini (totipotensi) sonlandırması için iki önemli değişikliğin meydana gelmesi gerekmektedir. Bunlar,

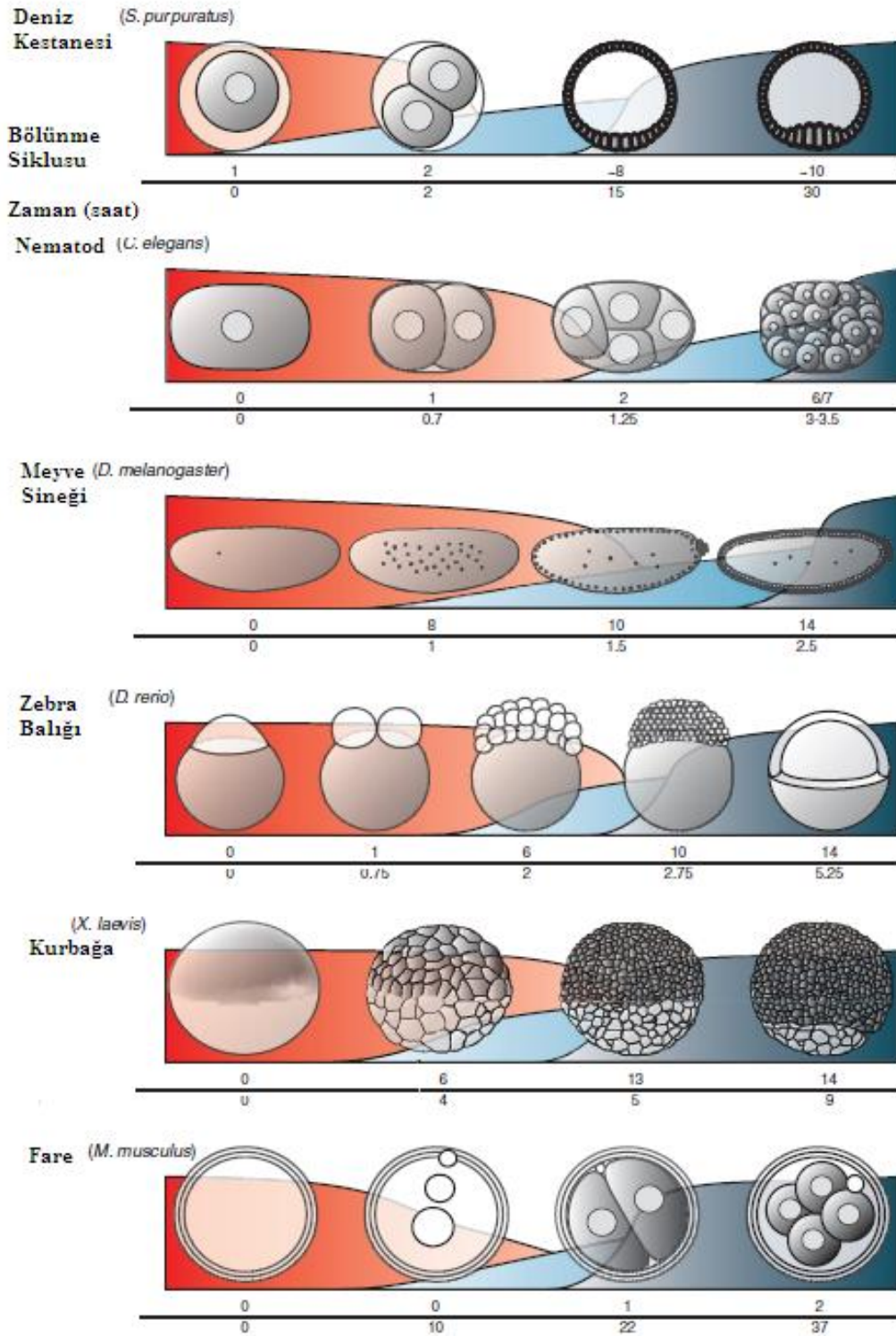
-Yeni zigotik genomun aktifleşmesi ve

-Maternal mRNA ve proteinlerin uzaklaştırılmasıdır.

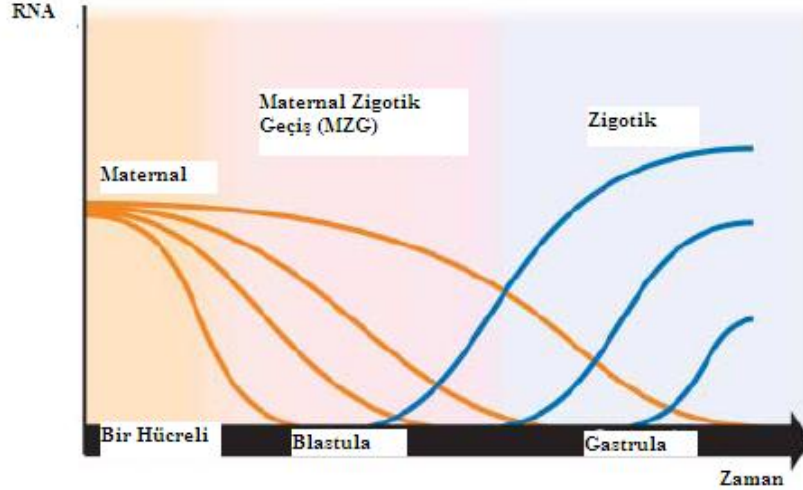
Maternal ya da embriyonik yıkılan veya oluşan transkriptlerin embriyogenezin farklı evrelerindeki eşit olmayan dağılımı hücrenin geleceğini şekillendirmektedir. Gelişimsel kontrol, maternal-zigotik geçiş sırasında, bu iki işlemin kombinasyonu ile maternal genomdan zigotik genoma geçmektedir (Walser and Lipshitz 2011).

Maternal RNAların yıkımının ve zigotik genom aktivasyonunun denk geldiği aşamalar türlere göre değişiklik göstermektedir (Şekil 1.6). *C. elegans*'ta zigotik genom aktivasyonu 4 blastomer aşamasında başlamaktadır (Tadros and Lipshitz 2009).

Zebra balığında maternal zigotik geçiş (MZG) sırasında maternal RNAların yıkıldığı, zigotik yeni mRNAların sentezlendiği Şekil 1.7'de gösterilmiştir (Schier 2007).



**Şekil 1.6.** Farklı model organizmalarda maternal-zigotik geçiş (MZG) zamanlaması. Kırmızı ile maternal mRNAlar, mavi ile de zigotik olarak ifade olan mRNAlar gösterilmiştir. (Tadros and Lipshitz 2009'dan modifiye edilmiştir.)



**Şekil 1.7.** Zebra balığında maternal zigotik geçiş (Schier 2007'den modifiye edilmiştir). Turuncu ile gösterilen maternal RNA seviyesi, embriyonun blastula aşamasında maternal zigotik geçişin gerçekleşmesiyle birlikte azalmakta, zigotik RNA seviyesi ise artmaktadır

Maternal mRNAların yıkımının embriyogenezde nasıl bir rolü olduğu ile ilgili olarak üç ihtimal öne çıkmaktadır;

-Birincisi, belirli maternal mRNAların elenmesinin embriyoyu anormal mRNA seviyesinden koruyabileceğidir.

-İkincisi, erken gelişimin ilerlemesi için spesifik maternal mRNA yıkımının gerekli olduğu yönündedir.

-Üçüncüsü ise bu olayın keyfi gerçekleşmediğini, embriyo için yönlendirici olduğunu belirtmektedir. *D. melanogaster* erken embriyosunda maternal hücre döngüsünde mRNA seviyesinin aşamalı olarak azalmasının, mitotik hücre uzunluğunu aşamalı olarak arttırması bu ihtimali desteklemektedir (Tadros and Lipshitz 2009).

*C. elegans* erken embriyogenezi, somatik ve germline (eşey hücre öncülü) blastomerleri adım adım ayrılırken eşit olmayan bölünmeler ile karakterize olmaktadır. *In situ* hibridizasyon çalışmalarıyla, maternal ve embriyonik olarak transkribe olmuş mRNAların erken bölünmeler sırasında farklı bir dağılım gösterdiği belirtilmiştir. Üç sınıf maternal mRNA tanımlanmıştır:

Sınıf I maternal RNAlar, tüm blastomerlerde aynı dağılımı gösterir.

Sınıf II maternal RNAlar, germline blastomerlerinde korunup somatik blastomerlerde yıkılır.

Sınıf III maternal RNAlar, germline'a özgü P granülleri ile ilişkilidirler, somatik blastomerlerde P granül bulunmaz.

Somatik blastomerlerde embriyonik olarak transkribe olan mRNAlar zigotik genom aktivasyonuna paralel olarak en erken 4-hücre aşamasında gözlenir. Bu transkriptler germline hücrelerinde görülmemektedir. Bu durum soma ve eşey hücre öncülü hücrelerdeki mRNA stabilitesi ve *C. elegans* embriyogenezindeki ilk bir kaç bölünmedeki transkripsiyonun asimetrisinden kaynaklanmaktadır. (Seydoux, Fire 1994)

*C. elegans* erken embriyogenezinde maternal proteinlerin nasıl yıkıldığı tanımlanmıştır ancak maternal transkriptlerin nasıl uzaklaştırıldığı henüz netlik kazanmamıştır (De Renzo and Seydoux 2004). Deadenilasyon bağımlı RNA yıkım yolağı, decapping bağımlı RNA yıkım yolağı, anlamsız kodon (NMD) bağımlı RNA yıkım yolağı, miRNA yolağı ve genel 5'-3' eksonükleaz yolağı normal şartlar altında mRNA yıkımında etkili yolaklardır.

Yapılan son çalışmalar, maternal RNAların yıkılmasında RNA-bağlayıcı proteinler ve küçük RNAların, özellikle mikroRNAların etkili olduğunu göstermektedir (Walser and Lipshitz 2011). MikroRNAların keşfedildikleri günden bu yana, hücre akıbetinin belirlenmesi, gelişimsel zamanlama, hücre ölümü, hücre büyümesi ve daha pek çok biyolojik süreçte görev aldıkları bilinmektedir (Ambros 2004). miRNAların zamansal ve mekansal olarak farklı ifade olmaları hücredeki fonksiyonlarının belirlenmesinde etkilidir.

### **1.3. MikroRNAlar**

mikroRNAlar, post-transkripsiyonel gen düzenlenmesinde önemli role sahip, yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğunda, kodlanmayan küçük RNA molekülleridir (Bartel 2004). MikroRNAlar, mRNAların 3' UTR (çevrilmeyen bölgeler) bölgeleri ile eşleşir ve gen

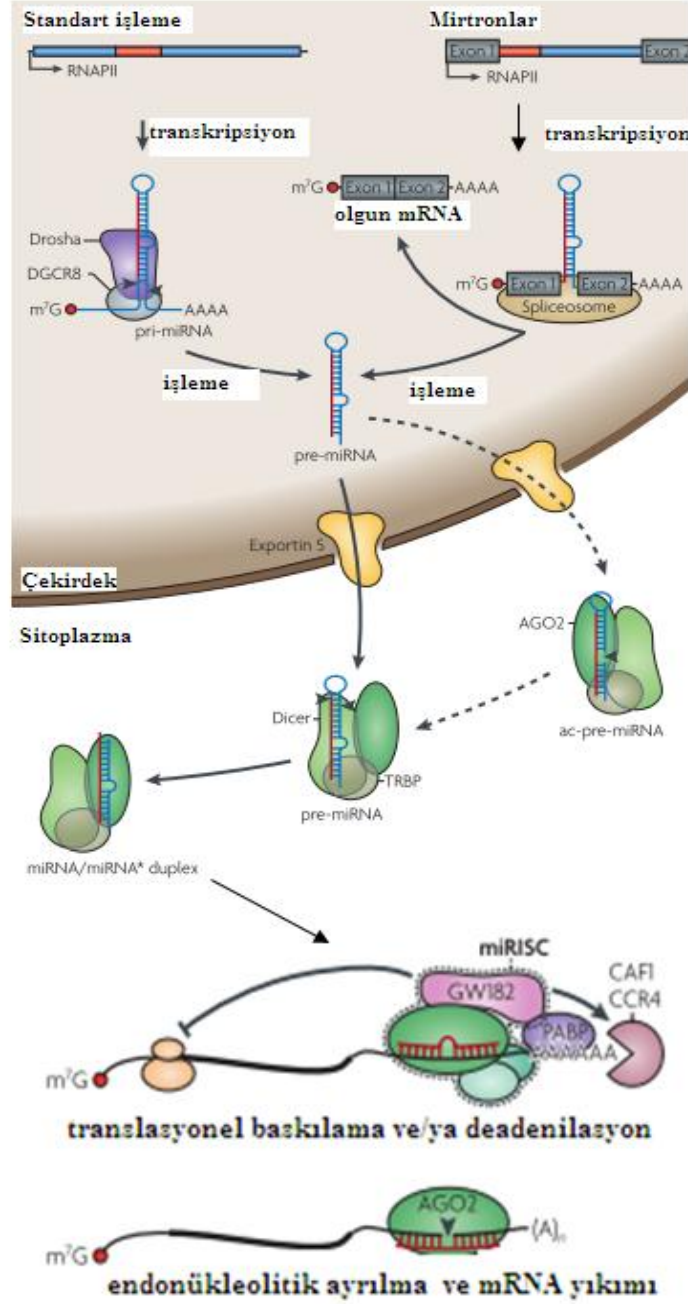
ifadesini baskılayarak ya da mRNA yıkımına neden olarak gen regülasyonunda rol oynar (Ambros 2004).

Keşfedilen ilk mikroRNA olan *lin-4*, nematod *C. elegans*'ta *Victor Ambros* tarafından 1993 yılında tanımlanmıştır. *C. elegans* mutantlarında gelişimsel zamanlamadan sorumlu *lin-4* ve *let-7* genleri tanımlanmış ancak bu genlerin protein kodlamadığı, şimdi mikroRNA (miRNA) olarak adlandırılan küçük RNAları kodladığı görülmüştür (Ambros 2001).

*Ambros* ve onunla eşzamanlı çalışmalar yapan *Gary Ruvkun* ve grubu, *lin-4* RNAlarının *lin-14* geninin 3' UTR bölgesine pek çok bölgede eşleniklik gösterdiğini fark etmiştir. Bu eşlenikliğin temel alındığı deneylerde, *lin-4* RNAların *lin-14* geni üzerinde düzenleyici role sahip olduğu gösterilmiştir. *Lin-14* mRNA seviyesinde farkedilir bir değişim olmamasına rağmen, *LIN-14* protein miktarının azalması, *lin-4* RNAların transkripsiyonel baskılama özelliği kanıtlamıştır (Bartel 2004).

mikroRNAlar, mRNA transkripsiyonuna benzer şekilde belirli zamanlarda ve doku spesifik olarak oluşmaktadır (Kloosterman and Plasterk 2006). Bir miRNA geninden RNA Polimeraz II aracılığıyla transkribe olan, poli A kuyruğu ve Cap bölgesi içeren saç tokası şeklindeki yapı Primary miRNA (pri-miRNA) adını almaktadır. Nükleusta RNAaz III endonükleaz Drossha ve çift zincirli RNA-bağlayıcı protein domaini DGCR8/Pasha aracılığıyla 3' ve 5' uçlarından Cap ve Poly A bölgesi uzaklaştırılır. Bu şekilde yaklaşık 70 nükleotit uzunluğunda öncül miRNA (precursor miRNA: premiRNA) oluşur. Ekspartin-5 proteini ile öncül miRNA çekirdek dışına, sitoplazmaya taşınır. RNAaz III endonükleaz Dicer enzimi ve RNA-bağlayıcı protein domaini TRBP/L ile loop bölgesi kesilir. Bu şekilde yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda miRNA:miRNA\* çifti oluşur. Oluşan olgun miRNA Argonat proteini ile RISC (RNA-Induced Silencing Complex) kompleksi oluşturularak mRNA hedefine yönelir (Bushati 2007). Şekil 1.8'de mikroRNA biyogenezini şematik olarak gösterilmiştir.

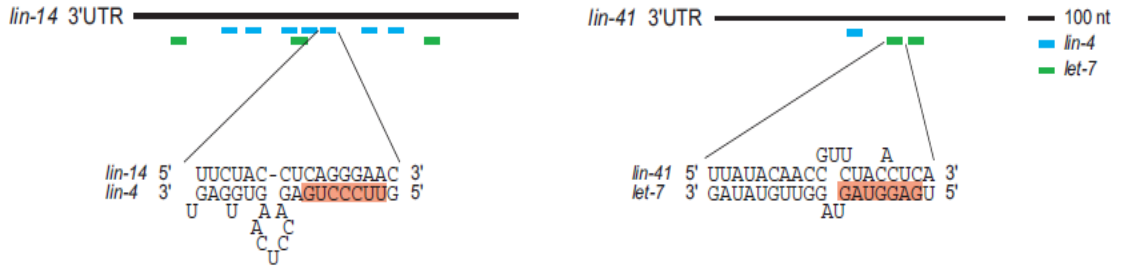
Önceden miRNA:miRNA\* çifti olarak tanımlanan yapı, öncül miRNA'nın 5' kolundan türediysse miRNA-5p ve 3' ucundan türediysse miRNA-3p olarak adlandırılır.



**Şekil 1.4.** MikroRNA biyogenezisi (Krol, Loedige *et al.* 2010'dan modifiye edilmiştir). Bir miRNA geninin RNA polimeraz II aracılığıyla transkribe olmasıyla ya da transkripsiyon sırasında eksonların arasından çıkarılan intron bölgelerinin saç tokası yapısı oluşturmasıyla öncül mikroRNA yapısı meydana gelmekte, ardından çeşitli enzimlerle poli A kuyruğu ve Cap bölgesi, loop bölgesi uzaklaştırılmaktadır. Oluşan miRNA:miRNA\* çifti ayrılıp hedefine yönlenebilmektedir.

## Hedef tanıma mekanizması

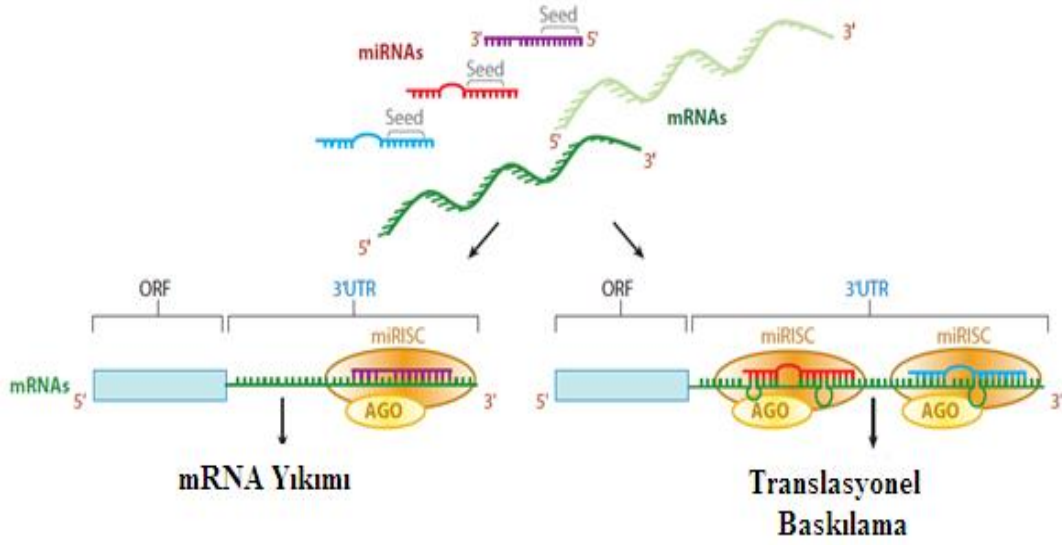
miRNA'nın 5' ucunda 2. ve 8. nükleotide denk gelen, mRNA'nın 3' ucuna tam eşleniklik gösteren bölge "seed region" olarak adlandırılır. Şekil 1.9'da lin-14 mRNA'sını 3' ucundan tanıyan lin-4 miRNA'sı ve lin-41 mRNA'sını tanıyan let-7 miRNA'nın seed region olarak adlandırılan kısmı gösterilmiştir. "Seed region"daki bu komplementerite sayesinde miRNA, hedef mRNA'yı tanımaktadır.



Şekil 1.5. "Seed Region" ve miRNA-hedef tanıma mekanizması (Bushati 2007)

## MikroRNA etki mekanizması

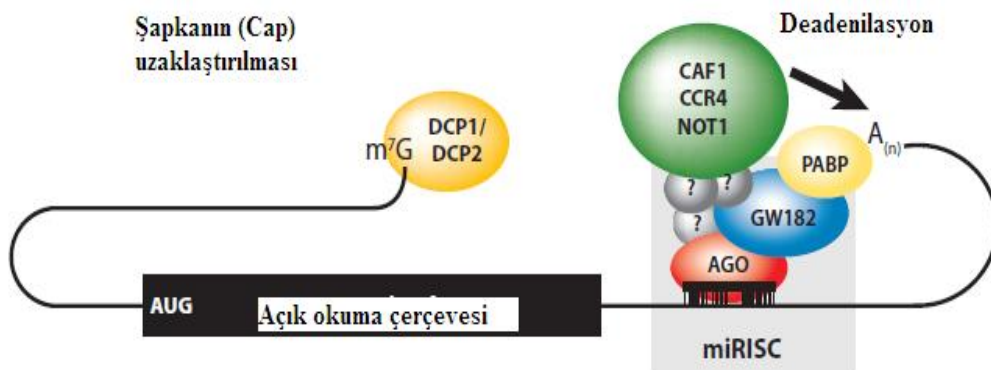
miRNA-mRNA eşleniklik derecesi miRNA'nın etki mekanizmasında belirleyicidir. Hayvanlarda miRNAlar, hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesi ile mükemmel eşleniklik gösterdiğinde mRNA yıkımına, mükemmel olmayan eşleniklik gösterdiğinde ise translasyonel baskılamaya neden olur. miRNA'nın hedef mRNA ile eşleniklik derecesinin etkisi şematik olarak Şekil 1.10'da gösterilmiştir. Hayvanların aksine bitkilerde, kodlanan bölgelerde mükemmel yakın eşleniklik görülür (Carthew and Sontheimer 2009).



**Şekil 1.6.** MikroRNA hedefleme mekanizması (Sun W. 2010'dan modifiye edilmiştir). miRNA “seed region” bölgesinden hedef mRNA 3' UTR bölgesine eşleşir. Mükemmel yakın komplementerite mRNA yıkımı, mükemmel olmayan komplementerite ise translasyonel baskılama ile sonlanmaktadır.

### *mRNA yıkımı*

mRNA'nın 5' CAP bölgesinin ya da 3' poli A kuyruğunun uzaklaştırılması mRNA'nın kararlı yapısını bozarak, mRNA yıkımına neden olur (Şekil 1.11).

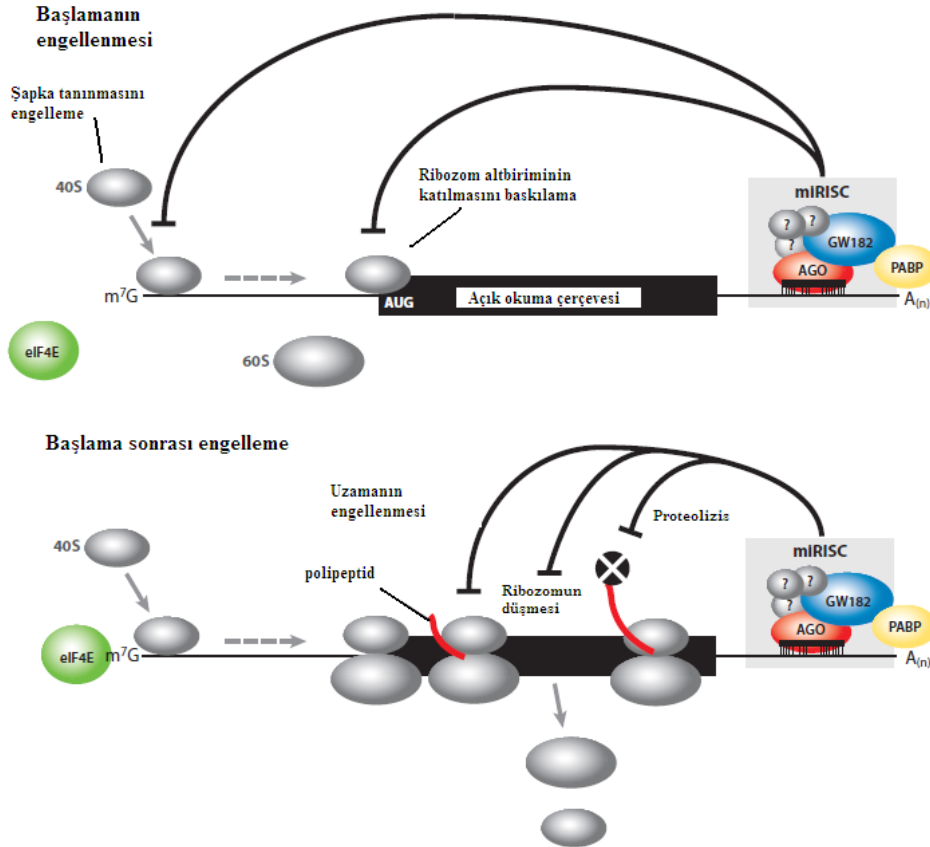


**Şekil 1.7.** mRNA yıkımı (Fabian 2010'dan modifiye edilmiştir). Protein kompleksi ile bir araya gelen miRNA hedef mRNA'nın Poli A kuyruğunu deadenilasyona uğratarak ya da Cap bölgesini uzaklaştırarak mRNA'nın kararlı yapısını bozmakta ve mRNA'nın yıkımına neden olmaktadır.



## Translasyonel baskılama

Proteinlerle etkileşen miRNA kompleksi mRNA'nın 3' UTR bölgesine tutunarak translasyon başlamadan ya da başladıktan sonra polipeptid sentezini engelleyebilmektedir. Ribozom alt biriminin mRNA'ya ve birbirlerine tutunmasını, polipeptidin uzamasını engelleyebilmekte, proteolizise neden olabilmektedir. miRNA-aracılı translasyonel baskılama şematik olarak Şekil 1.12'de gösterilmiştir.



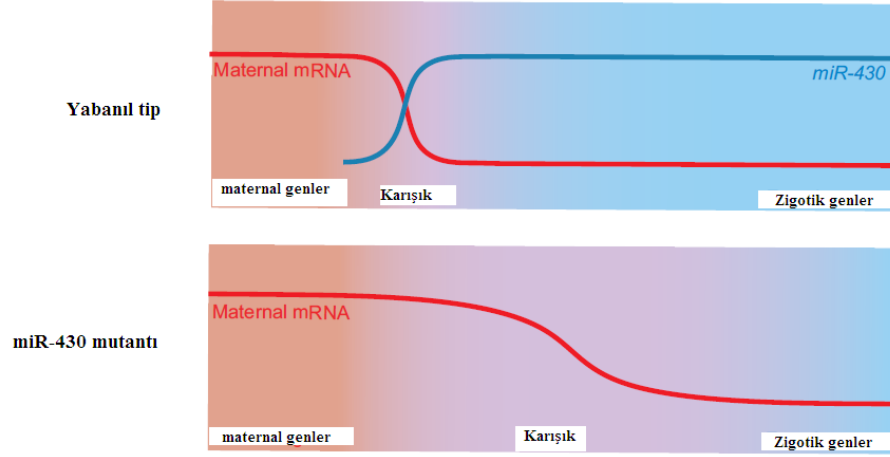
**Şekil 1.8.** miRNA-aracılı translasyonel baskılamanın şematik gösterimi (Fabian, Sonenberg *et al.* 2010'dan modifiye edilmiştir)

MikroRNAların hedeflerinin belirlenmesinde genetik, biyoinformatik ve biyokimyasal temelli yöntemler kullanılmaktadır. Genetik yaklaşımlar, miRNA-mRNA çiftinin etkileşiminin *C. elegans* gelişiminde önemli rolleri olduğunu göstermektedir. miRNA fonksiyon kaybı çalışmalarında, baskılanan mRNA'ların azaldığı görülmüştür. *In silico* yapılan çalışmalarda ise bir miRNA'nın yüzlerce olası hedefinin olduğu görülmektedir ancak *in vivo*'da hangisinin gerçekten etkili olduğu net değildir (Giraldez, Mishima *et al.* 2006).

Spesifik maternal miRNAların rolleri Zebra balığında daha iyi anlaşılmıştır (Bettagowda, Lee and Smith 2008). Zebra balığında miR-430 ile ilgili mikroarray sonuçları ve *in vivo* hedef tahmin çalışmalarıyla, miR-430'un doğrudan yüzlerce mesajcı RNAYı düzenlediği, maternal mRNAların deadenilasyonu ile ilgili olduğu, miR-430'un olmadığı mutantlarda maternal mRNAların biriktiği gösterilmiştir (Giraldez, Mishima *et al.* 2006).

Zebra balığında Dicer enzimi aktivitesi maternal ve zigotik olarak engellendiğinde olgun miRNAların oluşmadığı görülmektedir. Bu mutantlarda gastrulasyon ve beyin gelişiminde defektler gözlenmektedir. Zebra balığında tek bir mikroRNAnın, erken embriyonik gelişiminde en çok ifade olan ve maternal-zigotik geçiş sırasında depolanan miR-430'un maternal mRNA yıkımındaki etkisi gösterilmiştir (Giraldez 2006). Maternal-zigotik geçiş, hayvan gelişiminde etkili evrensel bir süreçtir. Zigotik transkripsiyonun aktifleşmesiyle bilinmeyen bir mekanizma ile maternal mRNAların yıkımı eş zamanlı gerçekleşmektedir. Çalışmalar, zebra balığında miR-430'un, zigotik aşamada deadenilasyonu hızlandırdığı ve yüzlerce maternal transkripti ortadan kaldırdığını göstermektedir. Bu çalışmalarda miRNA hedef bölgesinde, 3' UTR bölgesinde raportör GFP taşıyan mRNAlar, fertilizasyondan kısa bir süre sonra embriyoya enjekte edilmiştir. Yabanıl tip embriyolarda fertilizasyon sonrasındaki 2,5 saatte miR-430'un birikmeye başladığı, 4. saatte mRNAların yıkılmaya başladığı, ancak miR-430un olmadığı Dicer mutantlarında raportör mRNAların yıkımının ertelendiği, sonrasında miR-430 enjekte edildiğinde ise mRNA yıkımının hızlandığı gözlenmiştir. miR-430, maternal RNAların yıkımını sağlayarak embriyonun gelişimi için gerekli olan zigotik aktivasyonun başlamasına olanak sağlamaktadır. (Giraldez 2006).

miR-430'un olmadığı mutantlarda maternal mRNA seviyesindeki değişim Şekil 1.13'te gösterilmiştir.



**Şekil 1.9.** Zebra balığında miR-430'un maternal RNA yıkımına etkisi (Giraldez, Mishima *et al.* 2006'dan modifiye edilmiştir). Yabani tipte zigotik genlerin ifade olmasıyla birlikte maternal mRNA seviyesi azalmakta iken miR-430 mutanti bireylerde, maternal mRNA seviyesindeki azalmanın ertelendiği görülmektedir.

Fare erken embriyogenezinde, mikroRNAların maternal kalıtımının araştırıldığı bir çalışmada, büyüyen oositte Dicer enziminin (mikroRNA biyogenezinde etkili anahtar enzimdir) fonksiyonu engellendiğinde, mikroRNA kalıtımının olmadığı gözlenmekte ve mutant oositlerde hücre bölünmesi ve eksen oluşumunun gerçekleşmediği belirtilmektedir. Normal ve dicer mutanti oositler ile 8 blastomer evresine dek spesifik aşamalarda gerçekleştirilen kapsamlı mikroRNA mikroarray profillemeye çalışmaları sonrası, maternal genlerin direkt ya da dolaylı olarak mikroRNAlar tarafından kontrolü ve fare erken embriyogenezinin erken aşamaları için maternal mikroRNAların gerekliliği gösterilmiştir (Tang, Kaneda 2007).

Öncelikle büyüyen oositteki miRNAlar ile onların zigota kalıtımı araştırılmıştır. Eş zamanlı PCR ile gerçekleştirilen analizlerde, oogenez sırasında mikroRNA profilinin değişken olduğu gözlenmiştir. Ardından zigot için gerçekleştirilen ifade analizlerinde maternal mikroRNAlar zigotta da tespit edilmiştir. Bu durum zigotta miRNAların kendi kendine transkribe olmadığını, maternal olarak kalıtıldığını göstermiştir. Ardından erken embriyonik gelişimde yani evre spesifik embriyolardaki miRNA değişimleri incelenmiştir. Yapılan değerlendirmelerde 1 ile 2 blastomerli aşama arasında maternal miRNAların %60'nın yıkıldığı tespit edilmiştir. Bu durum ilk hücre bölünmesinde miRNAların aktif

olarak yıkıldığını göstermektedir. Bu bulguları doğrulamak amacıyla RNA *in situ* hibridizasyon deneyleri yapılmış ve özellikle let-7 ailesine ait miRNAlar görülmüştür. Oogenez sırasında miktarı artan let-7 ailesi miRNAlarının zigota aktarıldığı ve 2 hücreli aşamadan sonra embriyoda ifadesinin yeniden arttığı görülmüştür. İlerleyen çalışmalarda 4 hücre aşamasındaki embriyodaki total mikroRNAnın 2 hücre aşamasındakinden yaklaşık 2.2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç 2 ve 4 hücre aşamasında mikroRNAların yeniden ifade olmaya başladığını göstermektedir (Tang, Kaneda 2007).

*C. elegans*'ın embriyogenez çalışmalarında öne çıkan bir model sistem olmasının yanı sıra embriyogenezin doğru olarak anlaşılabilmesi için evreye özgü gen ifadesinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bunun için gereken farklı aşamalardaki *C. elegans* embriyolarının toplanması pratikte çok güçtür. Büyük ölçekli teknikler için binlerce embriyoya ihtiyaç duyulmaktadır ve spesifik aşamalardaki embriyolar, manuel seçme yoluyla, yani ağız pipetlemesi ile toplanabilmektedir. Bu problemin üzerinden gelebilmek, spesifik aşamalardaki embriyoları daha kolay toplamak için bir metod tasarlanmıştır; embriyo floresan-aktive hücre ayırımı (fluorescence-activated cell sorting, eFACS). Tek bir eFACS çalışmasında rutin olarak binlerce 1-hücreli embriyo seçilebilmiştir (Stoeckius, Maaskola *et al.* 2009).

*C.elegans*'ta erken embriyonik olaylar posttranskripsiyonel düzenlemeler ile kontrol edilmektedir. eFACS yöntemi ve yeni nesil sekanslama kombine çalışılarak embriyonik olarak ifade olan, post transkripsiyonel düzenlemelerde etkili olduğu düşünülen küçük, kodlanmayan RNAların evre-spesifik profilleri çıkarılmıştır. mikroRNAlar da dahil olmak üzere küçük RNAların ifadelerindeki değişiklikler belirlenmiştir (Stoeckius, Maaskola *et al.* 2009).

Stoeckius ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınladığı bu çalışmaya göre eFACS yöntemi ile elde edilen spesifik aşamadaki embriyolar için *C. elegans* erken embriyogenezindeki mikroRNAlar ve diğer küçük RNAlar yeni nesil sekanslama platformu Illumina/Solexa kullanılarak bir profil oluşturulmuştur. Bu tez çalışmasında ise evre-spesifik embriyolar ağız pipetlemesi ile elde edilmiştir. Ancak ilgili yayın verileri ile elde edilen veriler

kıyaslanarak miRNA profili ifade farklılıklarının tutarlılığı kontrol edilmiş, tespit edilen bu mikroRNAların maternal mRNA yıkımı üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

*C. elegans* embriyolarında zigotik transkripsiyon 4-blastomer aşamasında başlamaktadır. Maternal bileşenlerin erken bölünmelerden gastrulasyona ulaşana dek embriyoya yeterli olduğu görülmektedir. RNA interferans (RNAi) ile maternal bileşenler susturulduğunda ortaya çıkan embriyonik letalite, kodlanmayan RNAların embriyogenezde fonksiyonel rolleri olduğunu göstermektedir (Stoeckius, Maaskola *et al.* 2009). Maternal mRNA ve protein yıkımı zigotun totipotensi özelliğini kaybetmesi ve somatik hücrelere farklılaşabilmesi, yani embriyonun gelişebilmesi için gerekli bir unsurdur. Maternal mRNA ve proteinlerin yıkılmadığı durumda, embriyonun totipotent olarak kalması, dişi gametten gelen kök hücre imzası silinmediği için somatik hücrelerin farklılaşmaması ve dolayısıyla embriyonun gelişmemesi söz konusu olmaktadır.

#### **1.4. Tezin Amacı**

Bu tez çalışmasında, *Caenorhabditis elegans* oosit ve embriyolarında mikroRNAların global mikroRNA profili oluşturulmuş ve oosit-embriyo geçişinde rol oynayan miRNAlar ve ifade seviyeleri çıkarılmış, bu süreçte rol oynayan mikroRNAlar tanımlanmıştır. Ayrıca maternal mRNA yıkımına etkisi olabilecek olası maternal ve zigotik miRNAlar da analiz edilmiştir.

Çalışmada, yabanıl tip N2 ile mutant *fog-2(q71)V* *C. elegans* suşları kullanılmıştır. *fog-2(q71)V* (feminization of germline) mutant hermafrodit bireyler spermatogenez için gerekli olan FOG-2 proteinini kodlayamadıklarından sperm üretmez ve döllenmek için erkek bireye ihtiyaç duyar (Sudhir Nayak 2005). Bu özelliklerinden faydalanılan *fog-2* mutanıtı, L4 aşamasında döllenme öncesinde izole edilip ayrı büyütülmüştür. Erişkin hale geldiğinde döllenme olmadığı için olgun oositlerin biriktiği ve germline'in yarısından fazlasını oluşturduğu görülmektedir. *fog-2* oosit ve gastrula öncesi erken evre embriyoların miRNAom profilleri yeni teknolojilerden biri olan yüksek işlem hacimli yeni nesil sekanslama tekniği ile gerçekleştirilerek maternal ve zigotik miRNAom profilleri

ıkarılmıştır. N2 yabancı tip *C. elegans*'ın zigotik genom aktivasyonu öncesi-2 hücreli ve zigotik genom aktivasyonu sonrası-8 hücreli embriyoları toplanarak mikroRNA mikroarray çalışması çalışması gerçekleştirilmiş, ve maternal zigotik geçişte rol oynayan miRNA profilleri çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatürdeki benzer bir alışma (Stoeckius, Maaskola *et al.* 2009) ile de kıyaslanmış ve farklılıkları tutarlılık gösteren ve yeni tanımladığımız miRNAlar tespit edilmiştir. Elde edilen miRNAların bir kısmının ifade seviyelerindeki artış ve azalış, miRNAlara özgü primerler kullanılarak QRT-PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. Ayrıca miRNAların hedef genleri ve bu hedef genlerin yolak analizi biyoinformatik araçlarla belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen oosit ve embriyo miRNAom profillerinin belirlenmesi ile; totipotensinin sonlandırılmasında rol oynayan miRNAların tanımlanması, embriyonik hücrelerde totipotentliğin nasıl idame ettirildiği ya da sonlandırıldığının anlaşılması, erken embriyogenezde gen regülasyonunda görevli faktörlerin belirlenmesi, oositin embriyoya programlanması, kök hücre biyolojisi ve gelişim biyolojisi alanlarına önemli katkılar sağlanması hedeflenmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Pek çok organizmada mRNA ve protein miktarına kıyasla sınırlı sayıda miRNA bulunmaktadır. Örneğin insanda kodlanmış 1600 öncül, 2042 olgun miRNA'nın yaklaşık 30.000 mRNA ile etkileştiğine inanılmaktadır (Pritchard, Cheng *et al.* 2012). Bu sonuç bir tane miRNA'nın, yüzlerce mRNA'yı düzenlediğini ve gen ekspresyonu açısından miRNAların önemli olduğunu göstermektedir. Yüksek ökaryotlarda genlerin %10-30'unun miRNAlar aracılığıyla düzenlendiği belirtilmektedir (Vallabhaneni 2011).

Orjinali "microRNA Registry" olan miRBase, 1 Ağustos 2012 tarihinde güncellenen 19. sürümüne göre toplamda 193 bitki ve hayvan türünü kapsayan, 21264 saç tokası yapısında öncül miRNA ve 25141 olgun miRNA kaydına sahip bir veri tabanıdır.

miRBase sürüm 19.0'a göre insanda toplam yaklaşık 1600 öncül, 2042 olgun miRNA; *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* gibi iyi çalışılmış model organizmalarda ise yaklaşık 300-400 arası farklı miRNA olduğu görülmektedir (<http://www.mirbase.org>). mikroRNAların ilk keşfedildiği canlı olan *C. elegans*'ta ise 223 öncül, 368 olgun miRNA tanımlanmıştır. Çizelge 2.1'de miRBase sürüm 19.0'a göre model organizmalara ait güncel miRNA sayıları belirtilmiştir.

**Çizelge 2.1.** miRBase sürüm 19.0'a göre çeşitli organizmalardaki güncel miRNA sayıları (<http://www.mirbase.org>)

<i>Organizma</i>	<i>Öncül miRNA sayısı</i>	<i>Olgun miRNA sayısı</i>
<i>Homo sapiens</i>	1600	2042
<i>Drosophila melanogaster</i>	238	426
<i>Caenorhabditis elegans</i>	223	368
<i>Arabidopsis thaliana</i>	299	338

## 2.1. mikroRNA Profilleme Metodları

### Kantitatif reverse transkripsiyon PCR temelli metodlar

Eş zamanlı PCR olarak da adlandırılan bu yöntem, mikroRNA'nın cDNA'ya ters transkripsiyonu temeline dayanır. Reaksiyon ürünlerinin gerçek zamanlı birikmesi ile ifade farklılıklarını gösteren pek çok örneğin, paralel olarak aynı anda çalışılabildiği platformlardır.

Bu yöntem için, mikroRNAlara enzimatik olarak poli-A kuyruğu eklenir, ters transkripsiyon için primerlere uygun saç tokası (stem-loop) bağlanma bölgeleri meydana getirilir. cDNA sentezlenip amplifiye olduğunda oluşan çift zincirli yapılara bağlanarak ışığa veren floresan boyalar sayesinde ifade farklılıkları tespit edilir (Sun, Julie Li *et al.* 2010).

### Hibridizasyon temelli metodlar: mikroarray (mikrodizi)

Northern blotlama, klonlama gibi ilkin mikroRNA profilleme çalışmaları, yoğun iş gücü gerektiren, zaman alıcı ve sınırlı bilgi sağlayan yöntemlerdir. Tanımlanmış miRNA sayısının artmasıyla birlikte, tek bir çipte binlerce miRNA'nın ifade seviyesini saptama imkanı sağlayan mikroarray (mikrodizi) yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Çip üzerinde sabitlenen proplar, örnekteki miRNA seviyesini belirleyebilmektedir. Doku ya da hücrelerden izole edilen küçük RNAlar floresan boyalarla işaretlenmekte ve proplar taşıyan çip ile hibridize edilmektedir. Bağlanmayan miRNAların yıkama ile uzaklaştırılmasının ardından hibridize olmuş miRNAların mikrodizi tarayıcı ya da tarayıcı mikroskop ile floresan yoğunluğunun değerlendirilmesi ile miRNA ifade seviyesi belirlenebilir (Sun, Julie Li *et al.* 2010).

### Sentezleme teknolojisi: yüksek işlem hacimli sekanslama

Genom boyu nükleotit sekanslamasını gerçekleştirebilen yüksek işlem hacimli bu yöntem “yeni nesil sekanslama” olarak adlandırılır. Hibridizasyon temelli mikrodizi çalışmaları ile kıyaslandığında sentezleyerek sekanslama yapılması ile farklılık gösterir. *In vitro* olarak

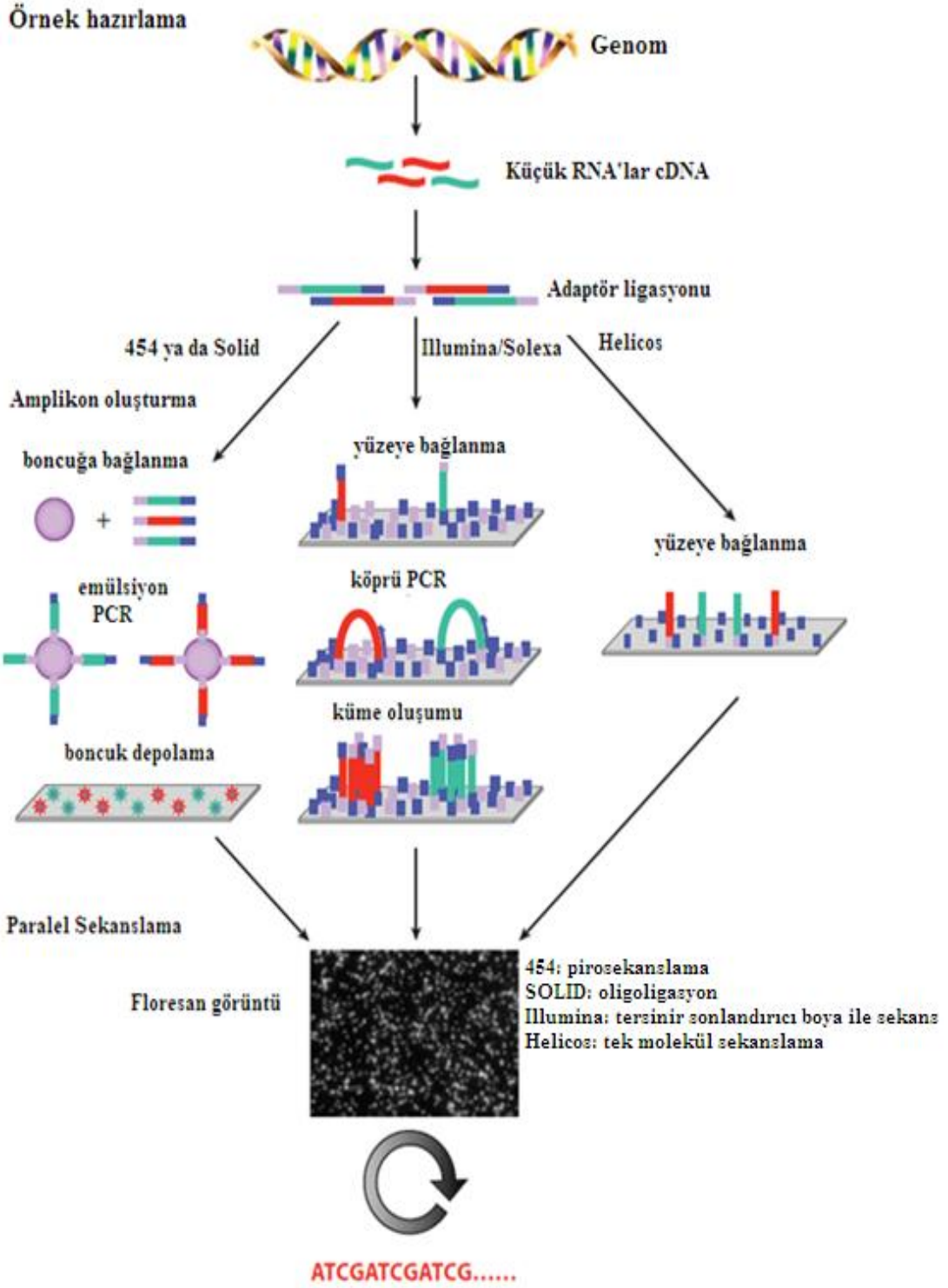


oluşturulan klonal ampikonlar sekanslanır. Tamamlayıcı DNA'lara (Complementary DNA: cDNA) adaptör olarak kısa nükleotit dizileri ligasyon ile eklenir. Kullanılan platformlara göre değişkenlik göstermekle birlikte, bu adaptörler vasıtasıyla cDNA'ların düzlemsel bir yüzeye ya da boncuğa tutunması sağlanır. *In situ* çoklu koloniler ile ya da verilen çeşitli tekli nükleotit molekülleri ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir. Nükleotit okumaları sayesinde pri-miRNA ya da miRNA'nın uzunluğu (30-300 nükleotit) da tespit edilebilir.

SBS (sequencing-by-synthesis: sentezleyerek sekanslama) olarak adlandırılan yeni nesil sekanslama yöntemi, miRNA profillemeye çalışmaları için çok elverişlidir. Sentezleyerek sekanslama temelli miRNA profillemesi, mikrodizi temelli yaklaşımlara göre daha kapsamlı data sağlar. Ayrıca bu yöntemin en büyük avantajı, bilinmeyen yeni miRNA'ların tanımlanmasına imkân sağlamasıdır (Sun, Julie Li *et al.* 2010).

Ticari olarak ulaşılabilen sekanslama-temelli platformlar; pirosekanslama temeline dayanan 454 GS FLX (Roche Applied Science), Illumina Genome Analyzer (Illumina Inc.), SOLID System (Applied Biosystems) ve HeliScope Sequencer (Helicos BioSciences Corp.)' dir.

Yeni nesil sekanslama teknolojileri; kalıp hazırlama, sekanslama, görüntüleme ve data analizi olmak üzere kabaca 4 aşama içerir. Bu aşamaların spesifik protokolleri eşsiz kombinasyonlarla bir platformu diğerinden ayırır. Şekil 2.1'de yeni nesil sekanslama platformları arasındaki metod farklılıkları gösterilmiştir. Çizelge 2.2'de Sanger sekanslama ve yeni nesil sekanslama teknolojilerinin özellikleri gösterilmiştir. Örneğin kalıp hazırlama klonal olarak amplifiye olmuş kalıplar ve tek molekül kalıplar olmak üzere iki metodla gerçekleştirilebilir. Amplifiye olmuş kalıplarda, emülsiyon PCR ve katı-faz amplifikasyonu kullanılan yöntemlerdir. Emülsiyon PCR hücreye gereksinim olmaksızın, bakteriye klonlamada ortaya çıkan problemlerden biri olan 'genomik sekanstan kayıp' gerçekleşmeksizin sekans kalıplarının oluşmasına olanak tanır (Metzker 2010). Şekil 2.2'de bu tez çalışmasında kullanılan Roche 454 GS FLX teknolojisi şematik olarak gösterilmiştir.



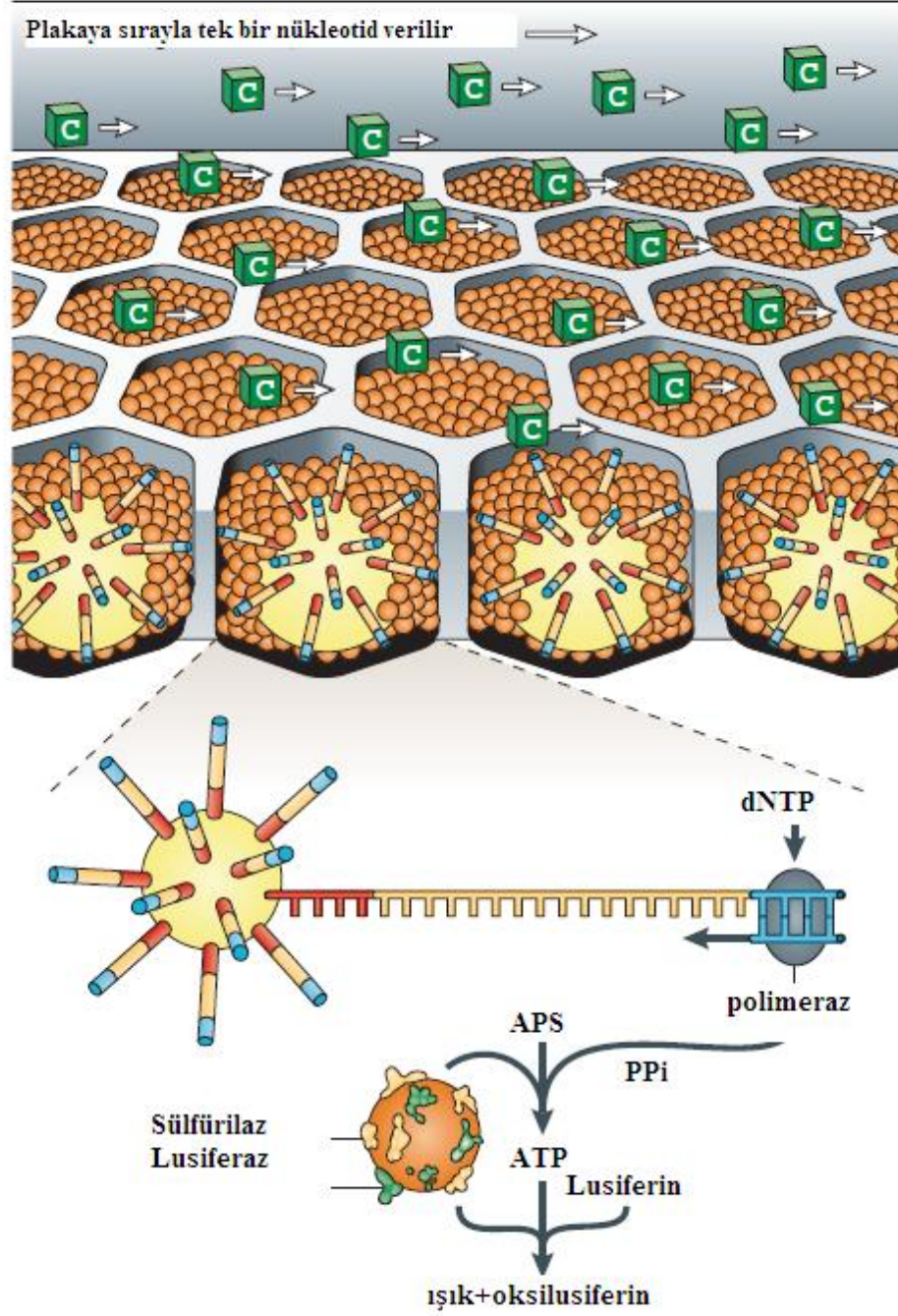
**Şekil 2.1.** Yeni nesil sekanslama platformları arasındaki metod farklılıkları (Sun, Julie Li *et al.* 2010) 454 ve SOLID platformunda DNA yakalayıcı boncuklar kullanılırken Illumina/Solexa'da amplikonlar katı faz yüzeye tutunmakta ve köprü PCR oluşmaktadır.

<i>Sekans Platformu</i>	<i>Üretici</i>	<i>WEB adresi</i>	<i>Kullandığı metod</i>	<i>Amplikasyon</i>	<i>Okuma uzunluğu</i>	<i>Veri boyutu</i>	<i>Çalışma Süresi</i>
ABI 3730xl Kapiller Elektroforez ile Sanger DNA Sekanslama	Applied Biosystems	<a href="http://www.appliedbiosystems.com">http://www.appliedbiosystems.com</a>	Sonlandırıcı boya ile Sanger dideoksi sekanslama	Bakteriyal konakta <i>in vitro</i> klonlama	1 kb	96 KB	3 saat
454 GS FLX	Roche Applied Science	<a href="http://www.454.com">http://www.454.com</a>	Polimeraz aracılı boncuk destekli pirosekanslama	<i>in situ</i> emülsiyon PCR	500-600 bç	450 MB	10 saat
Illumina Genome Analyzer	Illumina Inc.	<a href="http://www.illumina.com">http://www.illumina.com</a>	Polimeraz aracılı, Sabit yüzel üzerinde geri dönüşümlü sonlandırıcı boya	<i>in situ</i> köprü PCR	36 bç (pair-end teknolojsi ile 75+ bç)	1-3 GB	2 gün (pair-end olduğunda 4 gün)
SOLID 3	Applied Biosystems	<a href="http://www.appliedbiosystems.com">http://www.appliedbiosystems.com</a>	İşaretili oktamerler ile ligaz aracılı ligasyon	<i>in situ</i> emülsiyon PCR	36 bç	2-3 GB	5 gün
Helicos BioSciences Corp.	HeliScope Single Molecule Sequencer	<a href="http://www.helicosbio.com">http://www.helicosbio.com</a>	Polimeraz aracılı, tek molekül sekanslama	Amplikasyona gerek duymamaktadır	25-55 bç	14-28 GB	8 gün

**Çizelge 2.2.** Sanger sekanslama ve yeni nesil sekanslama teknolojilerinin özellikleri (Sun, Julie Li *et al.* 2010'dan modifiye edilmiştir)

Roche 454- Pirosekanslama

1-2 milyon boncuk pikotitre plakaya yüklenir



**Şekil 2.2.** Roche 454 GS FLX teknolojisi (Metzker 2010'den modifiye edilmiştir). Tüm pikotitre plakaya tek tek baz yollanmaktadır. Boncuk üzerinde sekanslanacak diziyeye eşlenik baz gelirse, bazın bağlanmasıyla açığa Ppi çıkmakta, APS'yi ATP'ye çevirmektedir. Oluşan ATP ortamdaki enzimlerle etkileşerek lusiferinini okside etmekte ve ışık açığa çıkmasına neden olmaktadır. Dedektörler tarafından algılanan ışık ile sekans belirlenmektedir.

## 2.2. miRNA Tanımlanmasında Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Sadece varolan miRNAların ifade seviyelerindeki farklılıkları gösterebilen, yeni mikroRNA keşfinin mümkün olmadığı mikrodizi yöntemleri sonrasında, mikroRNA ifadesinin genom boyu analizinin gerçekleştiği yeni nesil sekanslama teknolojisi ile günümüzde daha büyük ölçekli sekans sonuçlarına ulaşılabilmektedir. Ancak elde edilen büyük verinin analizi; mikroRNA profilinin çıkarılması ve kıyaslanması için yüksek işlem hacimli veri tabanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Küçük RNAların milyonlarca sekansını analiz edebilen pek çok veri tabanı ve biyoinformatik araçlar geliştirilmektedir. Yeni nesil sekanslama datasının analizinde kullanılan başlıca veri tabanları şunlardır; *miRDeep*, *miReduce*, *miRNAkey*, *UEA sRNAtoolkit*, *miRanalyzer*, *SeqBuster*, *DSAP*, *mirTools*, *E-miR*, *SigTerms*, *Small RNA Workbench* (Sun, Julie Li *et al.* 2010).

Yeni nesil sekanslama datasının analizinde kullanılan veri tabanlarından biri olan miRanalyzer; (<http://bioinfo2.ugr.es/miRanalyzer/miRanalyzer.php>) küçük RNA sekans datasını analiz edebilir. Bu tez çalışmasında mikroRNAların Roche 454 GS FLX platformunda sekanslarının elde edilmesinin ardından mikroRNAların anotasyonu bu veritabanı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Varolan miRNAların tanımlanması, yeni miRNAların keşfi ve miRNA-mRNA entegrasyonunu tespit edebilen pek çok biyoinformatik platform bulunur. Ancak mikroRNAlar için optimal data analizi aşağıdaki aşamaları içermelidir:

- Temizleme; adaptör sekansların uzaklaştırılması
- İlgisiz sekans setlerinin belirlenmesi
- Odaklanılacak transkriptomun haritalanması
- Genom haritalanması ve bilinen anotasyonlarla karşılaştırma
- Ekspresyon farklılığı analizi
- miRNA-mRNA zenginleştirme
- Yolak analizi

miRNA datasının ilgisiz sekanslardan arındırılmasının ardından, miRNA profilinin belirlenmesi ve kıyaslanmasında en yaygın kullanılan veritabanı olan *miRBase*, olgun ve öncül miRNA sekanslarını, bu miRNAların haritadaki lokasyonlarını, çakışan anotasyonları ve tahmini hedef genleri düzenli olarak günceller ve her bir miRNA girdisinin yayın listesini gösterir.

Her bir miRNA için, gen hedef tahmini yapan veritabanlarından bazıları; TargetScan, PicTar, MiRanda'dır. MikroRNA ifade paternleri için yaygın kullanıma sahip veritabanlarından bazıları ise GEO, miRGator, microRNA.org'dur (Gunaratne, Coarfa *et al.* 2012). Çizelge 2.3'te mikroRNAlar için kullanılabilen biyoinformatik araçlar listelenmiştir.

**Çizelge 2.3.** miRNA çalışmalarında kullanılan biyoinformatik araçlar (Sun, Julie Li *et al.* 2010)

<b><i>miRNA veritabanları</i></b>		
miRBase	<a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a>	Tüm türler için bilinen miRNAlar
ASRP	<a href="http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/">http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/</a>	Bitkilerdeki bilinen miRNAlar
miRNAMap	<a href="http://miRNAMap.mbc.nctu.edu.tw/">http://miRNAMap.mbc.nctu.edu.tw/</a>	Metazoan genomları için bilgisayar temelli miRNA-hedef etkileşimi koleksiyonu
miRGen	<a href="http://www.diana.pcbi.upenn.edu/">http://www.diana.pcbi.upenn.edu/</a>	Çoklu hedef tahmin programları ile miRNA-hedef etkileşimleri
CoGemiR	<a href="http://cogemir.tigem.it/">http://cogemir.tigem.it/</a>	miRNA karşılaştırmalı genomu
<b><i>miRNA-hedef etkileşimi için veritabanları</i></b>		
TarBase	<a href="http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/">http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/</a>	DeneySEL miRNA hedefleri koleksiyonu
miRecords	<a href="http://miRecords.biolead.org">http://miRecords.biolead.org</a>	DeneySEL ve bilgisayar temelli tanımlanan miRNA hedef koleksiyonu
<b><i>miRNA tanımlanması için araçlar ve algoritmalar</i></b>		

miRscan	<a href="http://genes.mit.edu/mirscan/">http://genes.mit.edu/mirscan/</a>	<i>C.elegans</i> için sekans korunumu ve yapısal konformasyon temelli
ProMIR	<a href="http://cbit.snu.ac.kr/~ProMIR2/introduction.html">http://cbit.snu.ac.kr/~ProMIR2/introduction.html</a>	İnsan ve fare için sekans korunumu ve yapısal konformasyon temelli
miRDeep	<a href="http://www.mdcterlin.de/en/research/research_teams/systems_biology_of_gene_regulatory_elements/projects/miRDeep/index.html">http://www.mdcterlin.de/en/research/research_teams/systems_biology_of_gene_regulatory_elements/projects/miRDeep/index.html</a>	<i>C. elegans</i> için yeni nesil sekanslama aracılığıyla miRNA tanımlanması
miRanalyzer	<a href="http://web.bioinformatics.cicbiogune.es/microRNA/">http://web.bioinformatics.cicbiogune.es/microRNA/</a>	yeni nesil sekanslama aracılığıyla miRNA tanımlanması ( <i>C. elegans</i> , <i>D. melanogaster</i> ve hayvanlar için)
<b><i>miRNA hedeflerinin tanımlanması için araçlar ve algoritmalar</i></b>		
TargetScanS	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>	Sekans eşlenikliği, miRNA-hedef çiftinin minimal serbest enerjisi
MiRvea	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a>	Sekans eşlenikliği, miRNA-hedef çiftinin minimal serbest enerjisi
PicTar	<a href="http://www.pictar.org/">http://www.pictar.org/</a>	Sekans eşlenikliği, miRNA-hedef çiftinin minimal serbest enerjisi
RNAhybrid	<a href="http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/rnahybrid/">http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/rnahybrid/</a>	Sekans eşlenikliği, miRNA-hedef çiftinin minimal serbest enerjisi
PITA	<a href="http://gebie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html">http://gebie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html</a>	Sekans eşlenikliği, miRNA-hedef çiftinin minimal serbest enerjisi
mirWIP	<a href="http://mirtargets.org/">http://mirtargets.org/</a>	Sekans eşlenikliği, miRNA-hedef çiftinin minimal serbest enerjisi

### 3. MATERYAL YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Genel reaktifler

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

##### 3.1.2. *Caenorhabditis elegans* suşları

Deneyleerde kullanılan yabancı tip ve mutant *C.elegans* suşları Minnesota Üniversitesi'ne bağlı *Caenorhabditis* Genetik Merkezi'nden (CGC) temin edilmiştir. Kullanılan yabancı tip ve mutantın özellikleri aşağıda belirtilmiştir:

N2 (Bristol): erkek ve hermafrodit yabancı tip bireylerden oluşur.

CB4108 (fog-2:feminization of germline): genotip: *fog-2(q71)V*. Erkek/dişi suşu. Çiftleşme ile idame ettirilir. XX bireyler dişi, XO bireyler yabancı tip erkektir (<http://www.cgc.cbs.umn.edu/strain.phpid=7477>).



### 3.1.3. *C. elegans* idamesinde kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar

*C. elegans* idamesi için kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** *C. elegans* idamesinde kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar

<i>Kimyasal Adı</i>	<i>Katalog No</i>	<i>Marka</i>
Agar	A0949	AppliChem (Darmstadt, Almanya)
NaCl	0241	Ambresco (Ohio, ABD)
Kolesterol	C-8503	Sigma (St Louis, ABD)
LB (Luria Broth)	L1717	Duchefa Biochemia
Gliserin %87’lik	A3739	AppliChem (Darmstadt, Almanya)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0781	Ambresco (Ohio, ABD)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,05101	Merck (Darmstadt, Almanya)
MgSO <sub>4</sub>	A4837	AppliChem (Darmstadt, Almanya)
Tripton	1.11931	Merck (Darmstadt, Almanya)

#### *C. elegans* idamesinde kullanılan solüsyonların hazırlanması:

*M9 (Mineral Medium)*: 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g NaCl, 1 ml 1M MgSO<sub>4</sub> tartılır, su ile 1 L’ye tamamlanıp otoklavlanır.

*S Buffer (S tamponu)*: 129 ml 0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 871 ml 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.85 g NaCl eklenip karıştırılır.

*Freezing buffer (dondurma tamponu)*: S Tamponu üzerine toplam hacmin %30’u olacak şekilde Gliserin eklenir.

### 3.1.4. cDNA sentez reaktifleri

Qiagen miScript Reverse Transcription Kit reaktifleri (5x miScript RT Buffer, dH<sub>2</sub>O, miScript Reverse Transcriptase mix) kullanılmıştır.

### 3.1.5. RNA izolasyon reaktifleri

Total RNA izolasyonu Trizol (Invitrogen) protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda kullanılan reaktifler ve markaları Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** RNA izolasyon reaktifleri

<i>Reaktif</i>	<i>Markası</i>
Kloroform	Sigma Chemical Co.(St Louis, ABD)
İzopropanol	Isopropil Alkol, Ambresco
Ethanol Absolut	AppliChem (Darmstadt, Almanya)
Glikojen	Roche
Su (molecular biology grade)	Ambion, Hyclone, Gibco

### 3.1.6. QRT-PCR reaktifleri

Qiagen miScript SYBR Green PCR Kit reaktifleri (2x Quantitect SYBR Green PCR Mastermix, 10x miScript universal primer, SYBR PCR Master mix ve dH<sub>2</sub>O) kullanılmıştır.

### 3.1.7. Kullanılan cihazlar

Tez çalışması deneylerinde kullanılan cihazlar Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Kullanılan cihazlar listesi

<i>Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>
-20 °C dolap	Sanyo Biomedical Freezer, Sanyo Electric G., Ltd. Japan
-80 °C dolap	Sanyo MDF-U6086S, Sanyo Electric G., Ltd. Japan
+4 °C dolap	Sanyo Medicoool, Sanyo Electric G., Ltd. Japan
Çalkalamalı inkübatör	BELLC SL ShellAb
Çift distile su cihazı	Millipore Gradient Milli-Q
Distile su cihazı	Millipore Elix
Elektroforez güç kaynağı	Atto MyPower300 AE-8130
Etüv	Sanyo incubator MIR-253. Sanyo Electric G., Ltd. Japan
Hassas terazi	Shimadzu Corp. BX320H
Jel görüntüleme sistemi	GENE Genius Bio Imaging System Whatman Biometra-TI 2
Manyetik karıştırıcı	DAIHAN WiseStir (Daihan Scientific) Co, LTD. Korea
Mini santrifüj	Benchmark Research Products BRP
Nanodrop	NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, ABD)
Otoklav	Hirayama Hiclave HVA-110
Partikül sayıcı	Beckman Coulter Z1 Particle Counter
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Micro22 D-78532. Germany
Santrifüj	Beckman Coulter Microfuge 18 Centrifuge

Shaker	FinePCR Orbital Shaker SH 30
Soğutmalı çalkalamalı inkübatör	ThermoScientific MAXQ4000
Stereomikroskop	Leica MZ16A
Su banyosu	Aquabaht Lab-Line
Termal cycler cihazı (Isı döngü cihazı)	BİO-RAD DNA Engine Peltier
TissueLyser (doku parçalayıcı)	Retsch Mixer Mill MM400
Çoklu plaka okuyucu	VICTOR <sup>3</sup> V Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter
Vorteks	LMS (Laboratory Medical Supplies) Harmony Mixer UZUSİO VTX-3000L
QRT-PCR Cihazı	Roche LightCycler 480
Yeni nesil sekanslama cihazı	Roche 454 GS FLX Titanium

---

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. *C. elegans* genel idamesi

Bu çalışmadaki tüm *Caenorhabditis elegans* protokolleri [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org)'da yer alan metodlara göre gerçekleştirilmiştir. *C.elegans* suşları 20-21 °C soğutmali etüvde NGM (nematode growth medium) petri üzerinde OP-50 bakterisi ile beslenerek idame ettirilir.

#### *NGM (nematode growth medium) hazırlanması*

6.8 g agar, 1.2 g NaCl, 1 g pepton (tripton) ve 400 ml ddH<sub>2</sub>O ile hazırlanıp otoklavlanan NGM agar, su banyosunda 55°C' ye geldikten sonra sıcaklığa hassas olan kimyasallar; 10 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 400 µl Kolesterol (5 mg/ml Kolesterol/EtOH), 400 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>, 400 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> ve 400 µl 10 mg/ml Streptomisin eklenerek 100 mm'lik petrilere 20'şer ml, 60 mm'lik petrilere 10'ar ml dökülür. Polimerleşmenin ardından petrilerin ortasına, 20 mm'lik petriye 1 ml, 60 mm'lik petriye 500 µl olacak şekilde bir gece önceden 37 °C'de 180 RPM'de kültüre edilen, *E. coli* OP50 eklenip kurumaya bırakılır. Kullanılmayan NGM OP50 petriler 5-6 °C sıcaklıktaki soğuk odada muhafaza edilir.

#### *C. elegans* dondurulması

Dondurulmak üzere besini yeni bitmiş L1-L2 larval evrede *C. elegans*'ların yoğun olduğu petriler tercih edilerek dondurma veriminin artırılması hedeflenir. 1,5 ml S tamponu ile *C. elegans*'lar konik tüplere toplanır. 2000 RPM'de 3 dakika santrifüj edilerek *C. elegans*'lar çöktürülür. Yeni bir kriyotüp alınır, içerisine 500 µl Freezing Buffer (dondurma tamponu) konur. Santrifüj sonrası 100 µl pelet kalacak şekilde supernatant uzaklaştırılıp üzerine 400 µl S tamponu eklenir. Toplamda 500 µl S tamponu içindeki *C. elegans*'lar alınarak kriyotüpteki dondurma tamponu üzerine eklenir, 4-5 kez alt üst edildikten sonra yavaş yavaş donmasını sağlamak amacıyla bir peçeteye sarılarak -80 °C dolaba kaldırılır.

### ***Dondurulmuş C. elegans stoğunun çözülmesi***

Dondurulmuş *C. elegans* -80 °C dolaptan alınıp oda sıcaklığında çözülür ve bakteri içeren NGM petri üzerine dökülür. *C. elegans*'ların hareket edip etmediği stereomikroskop altında kontrol edilip oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Ertesi gün 21 °C inkübatöre kaldırılır.

### ***Escherichia coli (E. coli) OP-50 suşu kültürü hazırlanması***

10 µg/ml streptomisin içeren LB (Luria Broth, Duchefa Biochemia) sıvı besiyerine, 1:100 oranında *E.coli* OP50 suşu (OP50 suşunun Urasil oksotrof olması NGM petri üzerinde büyümesini kısıtlamakta ve idamesinde kolaylık sağlar) eklenerek 16 saat 180 RPM 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde kültüre edilir.

### ***E. coli OP50 suşu pelet hazırlanması***

*E. coli* OP50 suşu 16 saat kültüre edildikten sonra 50 ml'lik konik tüplerde +4 °C'de 4500 RPM'de 10 dakika santrifüj edilir, supernatant uzaklaştırılarak pelet hazırlanır. +4 °C dolapta saklanan peletler, kullanmadan önce vortekslenerek, besini bitmek üzere olan *C. elegans*'ın idame ettirildiği petrilere 50-100 µl ilave edilir.

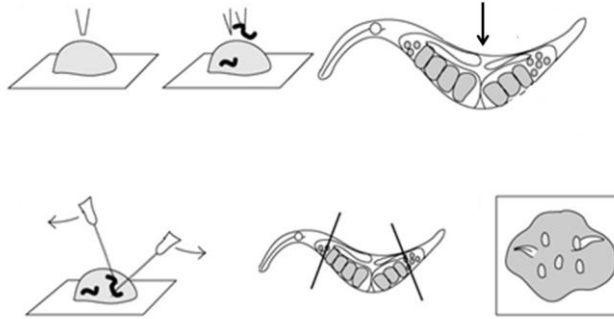
### ***Embriyo senkronizasyonu (egg preparation)***

NGM OP50 petride büyütülen, erişkin *C. elegans* kültürü 2 ml ddH<sub>2</sub>O ile 1,5 ml'lik konik tüpe toplanıp 5 dakika buz üzerinde bekletilir. Sonrasında 2000 RPM'de 3 dakika santrifüj edilerek *C. elegans*'ların dibe çökmesi sağlanır, supernatant 250 µl kalıncaya kadar uzaklaştırılır. 250 µl içindeki pelet üzerine, sırası ile 650 µl ddH<sub>2</sub>O, 200 µl 5 M NaOH ve 400 µl çamaşır suyu eklenir, 5 dakika oda sıcaklığında dakikada bir alt üst edilerek bekletilir sonra 2000 RPM'de 3 dakika santrifüj edilir. Supernatant uzaklaştırılıp 1 ml

ddH<sub>2</sub>O eklenerek iki defa yıkama işlemi gerçekleştirilir, supernatant uzaklaştırılır, tüp dibinde yaklaşık 100 µl bırakılarak embriyolar yeni bir NGM petriye aktarılır.

### ***Erişkin C. elegans diseksiyonu ile spesifik evre embriyoların eldesi***

Erişkin *C. elegans*'tan 2 hücreli ve 8 hücreli embriyoları elde edebilmek için, lamel üzerine konan 15 µl PBS ya da M9 solüsyonuna 20-25 tane erişkin kurt alınır. Ateşte ucu inceltilen cam kapiler mikropipet ile PBS çekilip yenisi eklenerek, petride *C. elegans*'ın üzerine yapışan bakteriler, mikroskop altında bir kaç kez yıkanarak uzaklaştırılır. 10 µl 0,2 mM Levamizol *C. elegans* üzerine eklenir. Levamizol, nematodlar üzerinde etkili bir antihelmintiktir, nematodları felce uğratarak hareketlerini azaltır. Hareketleri yavaşlayan *C. elegans*'lar, 2 tane 0,5x25 mm (25 G x1") enjektör iğneleri ile vulvarlarından disekte edilir (Şekil 3.1), mikroskofta incelenerek açığa çıkan embriyolardan istenen aşamada olanlar ağız pipetlemesi yapılarak Trizol içerisine toplanır. Toplanan embriyolar sıvı azot ile dondurulduktan sonra -80 °C dolaba kaldırılır.



**Şekil 3.1.** *C. elegans* diseksiyonunun şematik gösterimi ([http://hymanlab.mpi-cbg.de/hyman\\_lab/methods/c\\_elegans/c\\_elegans\\_dissection.shtml](http://hymanlab.mpi-cbg.de/hyman_lab/methods/c_elegans/c_elegans_dissection.shtml)'den alınmıştır)

### ***Erişkin C. elegans diseksiyonu ile oosit(germline) eldesi***

Evre-spesifik embriyoların toplanabilmesi için senkronize *C. elegans* yetiştirilir. 'Egg Preparation' protokolü ile izole edilen embriyolar *E. coli* OP50 suşu bakteri içermeyen NGM petrilere ekilir, ertesi gün her bir embriyonun açıldığı kontrol edildikten sonra

bakteri peleti besin olarak ilave edilerek embriyoların senkronizasyonu sağlanır. Besinsiz bir ortamda açılan embriyolar L1 larva evresinde kalır. 'L1 arrest' olarak adlandırılan bu uygulama sayesinde petrideki her bir nematodun aynı büyüme evresinde olması sağlanır. *fog-2(q71)* *C. elegans*'tan oosit(germline) elde edilmesi amaçlandığı için *C. elegans* hermafrodit bireyler erişkin olup erkek bireylerle çiftleşmeden önce L4 evresindeyken 100-200 tanesi tek tek başka bir NGM petriye aktarılır, ertesi gün erginleşen bireyler döllenme öncesi izole edildiği için sadece oosit içerir. Döllenme olmadığı için de yabancı tipe göre çok daha fazla sayıda olgun oosit içerir.

Lamel üzerine konan 15 µl PBS ya da M9 solüsyonuna 10-15 tane erişkin kurt alınır. Ateşte ucu inceltilen mikropipet ile M9 solüsyonu ağız pipetlemesi ile çekilip yenisi eklenerek petride *C. elegans*'ın üzerlerine yapışan bakteriler, mikroskop altında uzaklaştırılır.

10 µl 0,2 mM Levamizol *C. elegans*'lar üzerine eklenir. Hareketleri yavaşlayan *C. elegans*'lar, 2 tane 2,5 ml'lik enjektör iğneleri ile disekte edilerek germline'lar tüm gamet kolu şeklinde (mitotik, mayotik ve olgun oositler) ağız pipeti ile Trizol içerisine toplanır. Sıvı azot ile dondurulduktan sonra -80 °C'ye kaldırılır. Germline elde etmek için *C. elegans* başından ya da kuyruğuna yakın kısımdan, evre spesifik embriyo elde etmek için ise vulvasından disekte edilir.

### 3.2.2. Total RNA izolasyonu

*C. elegans* N2 yabancı tip, 2 ve 8 hücreli embriyolarından ve *fog-2(q71)* mutant oositleri ve karışık evre embriyolarından *Invitrogen*-Trizol protokolü ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilir.

Örneğin içinde bulunduğu Trizol hacmi ile oranı 1: 5 olacak hacimde Kloroform örnek üzerine eklenerek sertçe 15 saniye çalkalanır ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek faz ayrımı sağlanır.



15 dakika 12.000 RCF, +4 °C’de santrifüj edilerek organik fazın çökmesi, RNAnın üstteki berrak kısımda toplanması sağlanır.

Yeni bir tüpe alınan RNA içeren berrak kısım üzerine, Trizol ile oranı 1: 2 olacak şekilde İzopropanol (2-propanol) eklenerek RNA presipite edilir.

Pelet oluşumunu kolaylaştırmak için, 1 ml Trizole 1 µl Glikojen (20 mg/ml) eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilip 10 dakika 12.000 RCF, +4 °C’de santrifüj edilir.

Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra Trizol ile oranı 1: 1 olacak şekilde % 75’lik Etanol eklenip 5 dakika 7500 RCF, +4 °C’de santrifüj edilerek RNA peleti yıkanır.

Kuruyan RNA peleti suda çözülüp 55°C su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra, RNAnın miktarı ve saflığı spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) ile ölçülür.

RNAnın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranları esas alınır. 260 nm DNA’nın, 280 nm proteinin, 230 nm de fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyudur. A260/A280 oranınının 1,8-2,2 aralığında olması RNAnın saf olduğunu gösterir.

### **3.2.3. Yeni nesil sekanslama**

*Gregory Hannon*’un “Cloning Small RNAs for Sequencing with 454 Technology” protokolü talimatları takip edilerek mikroRNAlar, total RNAdan izole edilmiş ve yeni nesil sekanslama için hazırlanmıştır (<http://genoseq.ucla.edu/images/a/a9/SmallRNA.pdf>).

#### ***Küçük RNA’ların ayrılması***

Örneklerin olduğu tüpler denatürasyon için 3 dakika 70 °C’de ısı bloğunda bekletilir ve süre sonunda örnekler buza alınır.

#### **Markerların hazırlanması:**

Kullanılan iki markerdan biri, UV ışık altında ışıma veren Abnova Small RNA marker’dir. (Kat. No: R0007) 1 µl Abnova marker üzerine 4 µl RNAazsız H<sub>2</sub>O eklenir. 5 µl 2x

yükleme tamponu (loading dye) eklenerek 1x'e seyreltilir ve 5 dakika 80 °C'de ısı bloğunda denatüre edilir.

İkinci marker Biodynamics DynaMarker® Prestain Marker for Small RNA (Kat. No: DM250), 10 µl kullanılır. Jelin ilk kuyusuna yüklenen bu marker, elektroforez sırasında ilerleyen örnekleri kontrol etmeye olanak sağlar. 5x TBE yürütme tamponu DEPC muameleli su ile 500 ml'ye tamamlanarak 1x'e seyreltilir, bu tampon ile jel sistemi doldurulur. 2,5 ml'lik enjektörler yardımıyla jelin kuyucukları yıkanır, enjektöre çekilen tampon, kuyucuklara bırakılarak kuyucuklarda hava, üre ve akrilamid kalıntısı kalmaması sağlanır. %15 TBE-Urea jelin, (Invitrogen, 1.0 mmx10 well Kat no: EC6885 BOX) her kuyucuğuna 2x yüklem boyası ile birlikte toplam hacmi 30-40 µl olacak şekilde 20-50 µg total RNA yüklenir.

Jel, 180 V'ta 1 saat 30 dakika elektroforezde Biodynamics marker, jelin 2/3'üne ulaşınca ya dek yürütülür. 5 µl SYBR Gold nükleik asit boyası (Invitrogen Kat. No:S11494) 50 ml DEPC'li su ile hazırlanan 1x TBE içinde çözülüp tanka alınır. Elektroforezde yürümesi tamamlanan jel, spatula ile kenarından kanıtılarak jel kasetinden çıkarılır. Kesilen jel SYBR Gold içeren tank içine alınıp 40 dakika çalkalayıcıda hafifçe sallanır. Jel görüntüleme cihazına alınan jelde, UV ışık altında ışımaya veren marker ABNOVA sayesinde 21 baza denk gelen yerde olgun miRNAların görülür, bant bistüri ile kesilerek ependorf tüplere alınır. MikroRNA içeren jel bantları tartılır, miktarın 6 katı hacimde 0,4 M NaCl tüplere eklenir. Pipet ucu ile jel parçaları ezilip kuru buza gömülerek jelin fiziksel şoka maruz kalması sağlanır, donan örneklerin çözünmesi beklenip çalkalayıcıda gece boyu sallanır.

### ***Küçük RNA'ların presipitasyonu***

Ertesi gün karıştırıcıdan alınan tüpler Nanosep filtrelerle alınır, 14.000 RPM'de 2 dakika santrifüj edilir. Önceki gün eklenen NaCl miktarına ayarlanan pipet ile pelete dokunmadan örnek çekilip yeni bir tüpe konur. Önceki gün eklenen NaCl miktarından daha az elde

edildiği takdirde pipet ayarı küçültülerek hacim saptanır. Örnek başına 1 µl Glikojen (20 mg/ml) eklenir. (Glikojen miktarı örnek hacminden bağımsızdır.) Filtreden geçirilen örneğin 3 katı hacminde Etanol tüplere eklenir, -20 °C'de 4 saat bekletilir. 4 saat sonunda alınan örnekler, 30 dakika +4 °C'de 13.000 RPM'de santrifüj edilir. Supernatant uzaklaştırılıp alkol kurutulduktan sonra 13 µl Rnzsız H<sub>2</sub>O eklenip hafifçe pipetleme yapılır.

### ***Birinci ligasyon***

20 µl'lik ligasyon reaksiyonu buz üzerinde kurulur (Çizelge 3.4). 13 µl RNA, 2 µl 10x ligaz tamponu, 3 µl DMSO (linkerların birbirine yapışmasını engeller), 1 µl 3' adaptör MODBAN (100 µM), 1 µl Ligaz eklenip hafifçe pipetleme yapılarak karıştırılır, termal cycler cihazında 25°C'de 1-2 saat inkübe edilir.

**Çizelge 3.4.** Birinci ligasyon reaktifleri

---

RNA.....	13 µl
10x ligaz tamponu.....	2 µl
DMSO.....	3 µl
3' adaptör MODBAN (100 µM).....	1 µl
RNA Ligaz (Biolabs, Kat No: M0242).....	1 µl

---

Buza alınan tüplere 20 µl 2x yükleme boyası eklenir. ABNOVA marker hazırlanır. 5x TBE yürütme tamponu 400 ml'de DEPC'li su ile 1x'e indirilir. %15'lik üreli jel sisteme yerleştirilir ve kaset sistemi yürütme tamponu ile doldurulur. Eş zamanlı olarak örnekler 65 °C'de ısı bloğunda 3 dakika denatüre edilir. ABNOVA marker 5 dakika 80 °C'de inkübe edilir. Enjektör ile jel kuyucukları yıkandıktan sonra, markerlar ve örnekler kuyucuklara yüklenir. 1,5 saat 180 V'ta örnekler elektroforezde yürütülür, yürümenin tamamlanmasına az bir süre kaldığında 50 ml 1x TBE-DEPC'li su içerisinde SYBR Gold çözülüp tanka konur. Yürümesi tamamlanan jel, kasetten çıkarılıp tanka alınır ve 40 dakika çalkalayıcıda

hafifçe sallanır. 40 dakika sonra jel, görüntüleme cihazına alınır, yaklaşık 40 baz hizasında linkerların bağlandığı miRNA bantlarının görülmesi beklenir. Bantlar, UV altında kesilip yeni tüplere alınarak tartılır ve jel parçaları miktarının 6 katı hacimde 0,4 M NaCl eklenir. Pipet ucu ile jel parçaları ezilip, kuru buza gömülerek jelin fiziksel şoka maruz kalması sağlanır ve donan örnekler çözüldükten sonra gece boyu çalkalayıcıda sallanır.

### ***Birinci ligasyon sonrası RNA presipitasyonu***

Çalkalayıcıdan alınan tüpler Nanosep filtrelerden geçirilip 14.000 RPM’de 2 dakika santrifüj edilir. Pelete dokunmadan örnek çekilip, yeni tüpe alınır. Elde edilen hacmin 3 katı saf EtOH ve 1 µl glikojen (20 mg/ml) eklenir. Örnekler -20 °C’de 4 saat bekletilir ve +4 C’de 30 dakika 13.000 RPM’de santrifüj edilir. Supernatant dökülür, 10 saniye kadar kısaca santrifüj edildikten sonra alkolün buharlaşması için beklenir. 13 µl Rnzsız suda hafifçe pipetleme yapılarak pelet çözülür.

### ***İkinci ligasyon***

20 µl’lik ikinci ligasyon reaksiyonu karışımı termal cyler cihazında 37 °C’de 1 saat inkübe edilir (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** İkinci ligasyon reaktifleri

---

3’ ligasyon ürünü.....	13 µl
10x T4 RNA ligaz tamponu.....	2 µl
DMSO.....	2 µl
100 µM RNA 5’ linker oligonükleotit “Nelson’s Linker”...	1 µl
T4 RNA ligaz(Biolabs Kat. No: M0239L).....	2µl

---

Her tüpe 100 µl 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,4 M NH<sub>4</sub>Asetat eklenir. Örnekler üzerine 120 µl Fenol eklenip (120 µl = 20 µl ligasyon reaksiyonu + 100 µl Tris-EDTA karışımı) tüpler 5 saniye vorteksledikten sonra bir kaç dakika oda sıcaklığında bekletilir.

13.000 RPM' de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilip üst faz yeni bir tüpe alınır, üzerine 120 µl kloroform eklenip 5 sn vortekslenir.

13.000 RPM' de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilir, üst faz (120 µl) alınıp yeni bir tüpe konur ve üzerine 1 µl glikojen eklenir. 3 katı hacimde (120x3=360 µl) saf EtOH eklenerek gece boyu -20 °C'de bekletilir.

### ***İkinci ligasyon sonrası RNA presipitasyonu***

Ertesi gün -20 °C'de muhafaza edilen örnekler 12.000 g 30 dakika +4 °C'de santrifüj edilir, supernatant uzaklaştırılır ve alkol kurutulur. Pelet 6.3 µl suda çözülür.

### ***Ters transkripsiyon***

6.3 µl RNA ligasyon ürünü ve 4,2 µl 5µM BanOne eklenerek 10.5 µl annealing (bağlanma) reaksiyonu kurulur. Karışım 72 °C'de 2 dakika inkübe edilir, 20 °C'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra 2 dakika buzda bekletilir.

30 µl 5x first strand buffer ( 15 µl 10x first strand buffer + 15 µl su), 15 µl 20 mM DTT, 15 µl dNTPs (10 mM ) eklenerek "RT Kokteyl" hazırlanır. Bu karışımdan örnek başına 8,4 µl eklenerek toplam hacim 18,9 µl'ye tamamlanır.

Her örnekte 9 µl olacak şekilde iki tüpe bölünür: +RT kontrol için:1 µl (200 U) Rnaz H<sup>-</sup> RT, -RT kontrol için 1 µl su eklenir. 4 adet tüp, 1 saat 42 °C'de inkübe edilir.

### ***cDNA'nın PCR ile amplifikasyonu***

100 µl'lik PCR reaksiyonu kurulur: 5 µl first strand cDNA ya da –RT kontrol, 70 µl su, 10 µl 10 x PCR Buffer, 6 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (son kons: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl 10 mM dNTP, 1 µl 100 µM 5' PCR BanTwo, 1 µl 100 µM 3' PCR BanOne, ve 5 µl Taq polimeraz.

PCR Koşulları:

96 °C 1 dakika, (96 °C 10 saniye, 50 °C 60 saniye, 72 °C 20 saniye), 27 siklus, 72 °C 3 dakika, 10 °C sonsuz.

### ***cDNA'nın jelden saflaştırılması***

%4'lük Metaphor agaroz jel hazırlanır: 150 ml 1x TBE içeren erlen, buza gömülüp 15 dakika soğutulur. Tartılan 6 gr agaroz yavaş yavaş TBE'ye eklenir ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen süspansiyon haline gelmesi sağlanır (10-15 dakika). Tamamen çözüldükten sonra yine manyetik karıştırıcıda karıştırılarak soğutulur. Konsantrasyonu 10 mg/ml olan EtBr'den 5 µl eklenir. Polimerleşen jele, 100 µl örneğe 20 µl 6x yükleme boyası eklenip, bir kuyuya 40 µl olacak şekilde her örnek 3 kuyuya yüklenir.

Jel 100 V'ta 1 saat elektroforezde yürütülür. UV altında görüntülenen jelden, 70 bç hizasındaki bantlar bistüri ile kesilerek tüplere alınır. *Qiaex II Gel Extraction (Qiagen) Kit* talimatları doğrultusunda jelden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilir. Protokol sonunda örnek peleti 5 dakika buz üstünde kurutulur. Örnekler 30 µl suda çözülür, 13.000 RPM'de 30 saniye santrifüj edilir. DNA su fazına geçtiği için supernatant yeni PCR tüpüne alınır. Devam eden aşamada, 454 sekansında bu 30 µl'den 1 µl alınarak sekans PCR'ı kurulur.

#### **454 PCR primerleri ile amplifikasyon**

100 µl'lik PCR reaksiyonu kurulur. PCR ürünü hariç geri kalan malzemelerle 3 kat hacimde kokteyl hazırlanır (iki örnek ve bir negatif kontrol). En son 1'er µl saflaştırılmış PCR ürünü eklenir.

1 µl saflaştırılmış PCR ürünü, 10 µl 10x PCR Tamponu, 6 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (son konsantrasyon: 1,5 mM), 2 µl 10 mM dNTP (son konsantrasyon: 0,2 mM), 1 µl 20 µM 5' 454 PCR primer, 1 µl 20 µM 3' 454 PCR primer, 5 µl Taq polimeraz ve 74 µl su eklenir.

PCR koşulları: 96 °C 1 dakika, (96 °C 10 saniye, 50 °C 60 saniye, 72 °C 20 saniye) 15 siklus, 72 °C 3 dakika ve 10 °C sonsuz.

%2'lik 150 ml Metaphor agaroz jel hazırlanır, PCR ürünleri 20 µl 6x yükleme boyası eklendikten sonra 40'ar µl 3'er kuyuya yüklenir.

Jel yürümesi tamamlandıktan sonra *Qiaex II Gel Extraction (Qiagen) Kit* talimatları takip edilerek jelden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilir. Protokol sonunda 5 dakika buz üstünde kurutulan örnek peleti, 30 µl suda çözülür. 13.000 RPM'de 30 saniye santrifüj edilir. Üst fazda bulunan DNA, yeni PCR tüpüne alınır. Nanodrop'ta spektrofotometrik olarak 260 nm'de DNA miktarı ölçülür. 1 µl saflaştırılmış DNA örneği %2'lik agaroz jelde kontrol edilir.

Yeni nesil sekanslama için, Roche 454 Genom Sequencing FLX platformu kullanılmıştır. Bu platformda önce örnek kütüphanesi oluşturulur. Ardından emülsiyon PCR olarak adlandırılan, her bir yağ taneciğinin içinde bir reaksiyonun gerçekleştiği PCR aşaması gerçekleştirilir. Emülsiyon PCR kısmı, örneğin amplifikasyonu, toplanması ve zenginleştirilmesi olmak üzere 3 basamaktan oluşur. Sonrasında zenginleştirilmiş örnekler sekanslanmak üzere cihaza yüklenir.

### ***Amplikon kütüphanesi hazırlanması ve saflaştırılması***

Amplikon kütüphanesi hazırlanması aşaması Hannon Protokolüne dahil olarak (454 Sekansı başlığı altında) gerçekleştirilmiştir. Hannon Protokolü sonunda 30 µl suda çözülen DNA örnekleri (*fog-2(q71)* oositleri ve *fog-2(q71)* karışık erken evre embriyolar) yapılan son PCR sonrası ortamda kalan primer, nükleotit kalıntılarında arındırılır. Bunun için 70-100 bç uzunluğundaki amplikonları tutan Ampure Bead'ler (boncuklar) kullanılmış ve “*Amplicon Library Preparation Method Manual, GS FLX Titanium Series October 2009*” talimatları takip edilmiştir.

22 µl alınan örnekler üzerine 72 µl Ampure boncuk eklenir. Vortekslenip 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen tüpler manyetik partikül toplayıcıya (Magnetic Particle Collector, MPC) yerleştirilir. 70-100 bç uzunluğundaki amplikonları tutan boncukların manyetik olarak çekilmesiyle kenarda kalan sıvı artıklar uzaklaştırılır. 200 µl %70'lik EtOH ile iki defa yıkanan tüpler 37 °C ısı bloğuna alınır. Yaklaşık 1 dakika bekletilir, boncukların kuruyup çatlamamasına dikkat edilir. 10 µl Tris-EDTA (TE) örnekler üzerine eklenerek DNA'nın boncuklardan ayrılması sağlanır.

### ***cDNA kütüphane konsantrasyonunun belirlenmesi***

Ampure boncuklar ile 70-100 bç uzunluğundaki amplikonlar saflaştırılır. Çift zincirli DNA'ya bağlanan *Picogreen* belirteciyle hazırlanan standart grafik aracılığıyla örneklerin DNA miktarı Perkin Elmer VICTOR<sup>3</sup>V 1420 Multilabel Counter cihazı kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. *Picogreen* belirteci, 475-505 nm aralığında uyarılır ve 520- 550 nm aralığında ışımaya verir.

Standart grafik, konsantrasyonu bilinmeyen bir örneğin konsantrasyonunu belirlemek için kullanılır. Belirli dilüsyonlarda hazırlanan standart bir çözeltinin absorptans ölçümü yapılarak bir absorptans-dilüsyon grafiği oluşturulur ve örneğin absorptansı esas alınarak grafik yardımıyla karşılaştığı konsantrasyon belirlenir.



Standart grafik hazırlanırken dilüsyon için 1x TE kullanılır. Tüpler hazırlanırken önce 2. tüpten 8. tüpe kadar hepsine 300 µl TE konur. Sonra, hazırlanan bir önceki tüpten diğerine 300 µl eklenerek seyreltme gerçekleştirilir. 99 µl TE ve 1 µl örnek ile 100 µl'lik karışım ölçülmek üzere hazırlanır (Çizelge 3.6).

**Çizelge 3.6.** Standart grafik için picogreen belirteci ile hazırlanan seyreltmeler

<i>Tüp numaraları</i>	<i>TE miktarı</i>
Tüp 1	594 µl TE + 6 µl DNA (100x)
Tüp 2	300 µl TE + 300 µl 1. Tüp karışımı
Tüp 3	300 µl TE + 300 µl 2. Tüp karışımı
Tüp 4	300 µl TE + 300 µl 3. Tüp karışımı
Tüp 5	300 µl TE + 300 µl 4. Tüp karışımı
Tüp 6	300 µl TE + 300 µl 5. Tüp karışımı
Tüp 7	300 µl TE + 300 µl 6. Tüp karışımı
Tüp 8	300 µl TE + 300 µl 7. Tüp karışımı
Embriyo	99 µl TE + 1 µl Embriyo örneği
Oosit (Germline:GL)	99 µl TE + 1 µl Oosit örneği

6 µl Picogreen, 1194 µl TE içinde çözülerek 200 kat seyreltilir. Ölçüm için kullanılacak plakaya sırasıyla 1'den 8'e numaralanmış tüplerden 100'er µl, ardından 100 µl Embriyo ve sonra 100 µl Oosit örneği yüklenir. Her kuyucuğa 100'er µl Picogreen eklenir. Ölçüm sonuçları Excel dosyasına kaydedilir ve standart grafik çizilir.

Amplikonlar deneyin ilerleyen aşamalarında boncuklara tutunacağı için DNA miktarı molekül olarak hesaplanır. Talimatlar gereğince örnek DNA molekül miktarları  $10^7$ 'ye seyreltilir. Seyreltme aşamalı olarak gerçekleştirilir. Önce  $10^9$  sonra  $10^7$  yapılarak prosedüre devam edilir. Prosedürde belirtilen formül ile hesaplamalar gerçekleştirilir.  $10^9$  yapmak için,

$$\text{Embriyo için} \quad \frac{1,57 \cdot 10^{10} \text{ molekül} / \mu\text{l}}{10^9} - 1 = 14,7 \mu\text{l TE} + 1 \mu\text{l Embriyo}$$

Germline için  $\frac{1,61.10^{10} \text{ molekül} / \mu\text{l}}{10^9} - 1 = 15,1 \mu\text{l TE} + 1 \mu\text{l Germline}$

Yukarıdaki eşitlikten elde edilen miktarda TE ve 1  $\mu\text{l}$  örnek PCR tüpünde karıştırılarak  $10^9$  molekül/ $\mu\text{l}$  örnek elde edilir. Sonraki aşamada iki örnek için, 2  $\mu\text{l}$   $10^9 + 198 \mu\text{l}$  su ile  $10^7$  molekül/ $\mu\text{l}$  DNA elde edilir.

### ***Emülsiyon PCR***

*Roche 454 Sequencing GSFLX Titanium Serisi emPCR Metod Manueli- LİB-A MV (October 2009, Rev. Jan 2010)* talimatları doğrultusunda aşağıda belirtilen basamaklar takip edilerek gerçekleştirilir.

-Reaktif ve emülsiyon yağlarının hazırlanması: Reaktiflerin hazırlanması, emülsiyon yağlarının hazırlanması, mock amplifikasyon karışımının hazırlanması, live amplifikasyon karışımının hazırlanması

-DNA kütüphanesinin yağların içine girmesi

-Emülsifikasyon

-Amplifikasyon

-Boncukların geri toplanması: vakum aracılığıyla emülsiyonların toplanması ve ilk yıkamalar, boncukların yıkanması ve geri kazanımı

-DNA kütüphanesi boncuklarının zenginleştirilmesi

-Sekans primerinin bağlanması

### **Reaktif ve emülsiyon yağlarının hazırlanması**

-DMSO benzeri özellik gösteren, ampikonların birbirine yapışmasını engelleyen, PCR additive 55 °C ısı bloğunda çözülür, arada vortekslenir.

-Emülsiyon yağlarının olduğu 4 tüp, 28 Hz'te 2 dakika Tissue Lyser'da (doku parçalayıcı cihaz) çalkalanır.

-5x Mock Mix'ten 1 ml alınıp üzerine 4 ml su eklenerek 1x'e seyreltilir. Emülsiyon yağ tüplerine 1'er ml Mock Mix eklenir. 28 Hz'te 5 dakika çalkalanır.

-Live Mix için, 2 tane 15 ml'lik konik tüpe aşağıdaki reaktifler eklenir. Live amplifikasyon karışımı içeriği Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Live amplifikasyon karışımı içeriği

<b>A</b>	<b>B</b>
600 µl su	685 µl su
390 µl amp. karışımı	390 µl amp. karışımı
115 µl A primeri	30 µl B primeri
750 µl PCR additive	750 µl PCR additive
100 µl enzim	100 µl enzim
2,5 µl PPIase	2,5 µl PPIase

-1 ml 10x boncuk yıkama tamponu, 9 ml su ile 1x'e seyreltilir.

-PCR reaksiyonunun gerçekleşeceği DNA yakalama boncukları (DNA capture bead) vorteklenir ve 4 tane 1,5 ml'lik konik tüpün iki tanesine 230 µl Boncuk A, diğer ikisine 230 µl Boncuk B olacak şekilde konur, boncuklar çöktürülüp supernatant uzaklaştırılır, 1x boncuk yıkama tamponu ile boncuklar iki defa yıkanır. Boncuklar üzerine 80 µl 1x boncuk yıkama tamponu eklenmiştir.

-Amplifiye olmuş DNA kütüphanesi çözülür. (230 µl'de  $6,8 \cdot 10^6$  molekül boncuk bulunur)

$$\text{Bir kütüphanedeki DNA miktarı } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Bead başına tutunan DNA miktarı (4-6)} \times 6,8 \cdot 10^6}{\text{Kütüphane konsantrasyonu (molekül}/\mu\text{l})}$$

$$\text{DNA miktarı} = \frac{5 \text{ molekül/boncuk} \times 6,8 \cdot 10^6 \text{ boncuk}}{10^7 \text{ molekül}/\mu\text{l}} = 3,4 \mu\text{l DNA}$$

- Boncuklar üzerine 3,4  $\mu\text{l}$  DNA eklenir.(4 tüp: 2 tane Embriyo-A ve B, 2 tane GL-A ve B)
- Live amplifikasyon kokteyllerinden 875  $\mu\text{l}$  örnek tüpleri üzerine eklenir.

### ***Emülsifikasyon***

Yağın bulunduğu 4 tüpün ikisi Embriyo, ikisi Germline olarak isimlendirilmiştir. İçinde kokteyl bulunan eppendorf tüplerden yaklaşık 500'er  $\mu\text{l}$  iki tüpe bölündüğünde bir tüpte hem boncuk A hem boncuk B bulunur. Tüpler 12 Hz'te 5 dakika çalkalanır.

### ***Amplifikasyon***

İki örnek için iki ayrı 96'lık PCR plakaya her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  olacak şekilde örnekler yüklenir. EmPCR amplifikasyon koşulları Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.8.** EmPCR amplifikasyon koşulları

<b><i>Basamak Sayısı</i></b>	<b><i>Sıcaklık</i></b>	<b><i>Süre</i></b>
1	94 °C	4 dakika
2	94 °C	30 saniye
3	58 °C	4:30 dakika
4	68 °C	30 saniye
5	2-4. basamak	50 siklus
6	10 °C	Sonsuz

Yaklaşık 6 saat süren PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra her bir kuyudaki faz ayrımı kontrol edilir. Faz ayrımı belirgin olmayan, bulutsu görünüme sahip olan kuyucuklardaki örnekler ilerleyen aşamalarda kullanılmamalıdır.

### ***Boncuk kazanımı***

Kuyucuklardaki örnekler 50 ml'lik konik tüpe toplanır. Kalıntıları toplamak için her bir kuyuya 100 µl izopropanol eklenip çekilir.

Hortum sistemindeki kalıntıları toplamak için 5 ml izopropanol çekilir. Örneklerin toplandığı tüpler izopropanol ile 40 ml'ye tamamlanır.



**Şekil 3.2.** Vakum sistemi

930 g'de 5 dakika santrifüj edilerek boncukların dibe çökmesi sağlanır. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra 20 ml Enhancer fluid eklenir, boncuklar çözünene dek vortekslenir, 930 g'de 7 dakika santrifüj edilir ve supernatant uzaklaştırılır. Aynı işlemler 35 ml izopropanol ile 2 defa tekrar edilir, sonra 35 ml EtOH ile ardından 20 ml Enhancer Fluid ile gerçekleştirilir. Son aşamada tüp dibinde yaklaşık 2 ml bırakılır. Boncukların çözüldüğünden emin oluncaya dek vortekslenir. Örnekler 50 ml'lik tüplerden 1,5 ml'lik konik tüplere alınır. 50 ml'lik tüpte kalanlar 600 µl Enhancer Buffer ile yıkanarak 1,5 ml'lik konik tüplere toplanır. Çöktürülen boncuklar üzerinden supernatant uzaklaştırılır. 2 defa 500 µl Enhancer Buffer eklenerek yıkama gerçekleştirilir ve en son 500 µl Enhancer Buffer'da pelet çözülür.

### ***DNA kütüphanesi boncuk zenginleştirilmesi***

9875 µl moleküler kullanıma uygun suya 125 µl 10 N NaOH eklenerek çift zincirli DNA'nın tek zincirli hale gelmesini sağlayan melting solüsyonu hazırlanır.

500 µl Enhancer buffer içeren tüpten üst faz uzaklaştırılır ve 500 µl melting solüsyonu eklenir. Kısaca santrifüj edilen örnekler 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üst faz uzaklaştırılır. Bu işlem iki kere tekrarlanır. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml Annealing buffer eklenir. Santrifüj edilip üste faz uzaklaştırılır, aynı işlem bir kez daha tekrarlanır.

Boncuk kazanımı yüzdesi hesaplanır. 500 µl Annealing buffer içindeki örnek vortekslenir ve Beckman Coulter Particle Counter cihazında boncuk sayımı yapılır. 10 ml izoton çözeltilisine 3 µl boncuklardan eklenip cihazda sayım yapılır. % 85'in üzerindeki kazanımlar prosedüre devam etmek için yeterlidir.

Boncuk sayımı yapıldıktan sonra protokol kitapçığında belirtilen formül kullanılarak % boncuk kazanımı hesaplanır.

$$\% \text{ Boncuk kazanımı} = \frac{\text{Kazanılan boncuk sayısı}}{\text{Toplam boncuk Sayısı (13,6 x 10}^6)} \times 100$$

Örnek tüpleri kısaca santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırılır, 30 µl Annealing Buffer XT eklenip vortekslenir. A boncuklarının bulunduğu tüplere 12,5 µl Enrichment Primer A, B boncuklarının olduğu tüplere ise 12,5 µl Enrichment Primer B eklenir ve tüpler 5 dakika 65 °C ısı bloğunda, ardından 2 dakika buz üzerine bekletilir. Tüpler üzerine 500 µl Enhancer Buffer eklenir, vortekslenip kısaca santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırılır, bu işlem 3 kere tekrarlanır. Her örnek tüpüne 800 µl Enhancer Buffer eklenir, vortekslenerek örneklerin çözülmesi sağlanır.

Enrichment boncuklar mıknatıslıdır ve streptavidin taşır. Amplifiye olmuş ve tek zincire indirgenmiş ampikonların taşıdığı biotinler ile etkileşerek örneklerin amplifiye olmamış kalıntılardan saflaştırılmasını sağlar.

1 dakika vortekslenerek Enrichment beadlerin tamamen çözülmesi sağlanır. Her tüp için 80 µl olacak şekilde toplam 320 µl enrichment boncuk 1,5 ml'lik bir tüpe alınır, (4 tüp: Embriyo A ve B, Oosit A ve B) Tüpler manyetik partikül toplayıcı aparata yerleştirilir, supernatant uzaklaştırılır. Üzerlerine 1 ml Enhancer Buffer eklenip vortekslenir ve tüp manyetik aparata yerleştirilip supernatant uzaklaştırılır. Bu işlem bir kez daha tekrarlanır, manyetik aparattan alınan her tüpteki pelet üzerine 40 µl Enhancing Fluid XT eklenir.

Örnekler boncuk içeren tüplere eklenir. Tüpler oda sıcaklığında 5 dakika dairesel karıştırıcıda çevrilir. Tüpler manyetik aparata yerleştirilir, 3-5 dakika bekletilir. Bir kaç kez manyetik aparat ters yüz edilir ve supernatant uzaklaştırılır. 1 ml Enhancing Fluid XP eklenip vortekslenir, manyetik aparata yerleştirilip supernatant uzaklaştırılır. Eklenen Enhancing Fluid berrak görüne dek 12-13 kez 1 ml Enhancing Fluid XP eklenip, vorteklenip çöktürülür ve gittikçe küçülen pipetlerle supernatant uzaklaştırılır.

Sonrasında 700 µl melting solüsyonu eklenir, vortekslenip manyetik aparata alınır. 2-3 dakika bekletildikten sonra amplifiye olmuş boncukların örneklerden ayrılması sağlanır. Bu işlem iki kere tekrarlanıp zenginleştirilmiş DNA boncuklarını içeren üst faz yeni bir tüpe alınır (700+700=1400 µl). Boncukların çökmesi sağlanıp üst faz uzaklaştırılır. 500 µl Annealing buffer eklenip vortekslenir, çöktürülüp supernatant uzaklaştırılır. Bu işlem bir kez daha tekrarlanır. 120 ml Annealing buffer boncuklar üzerine eklenerek peletin çözünmesi sağlanır. Bu aşama ile EmPCR amplifikasyonu başarı ile gerçekleşen boncuklar elde edilir.

### ***Sekans primerinin bağlanması***

Sekans primerleri çözülüp vorteklenir ve buz üzerine alınır. 25 µl Sekans primeri A ve 25 µl Sekans primeri B, 120 ml Annealing buffer içeren boncuklar üzerine eklenir. Vortekslendikten sonra 5 dakika 65 °C ısı bloğunda, 2 dakika buz üzerinde bekletilir. Üzerlerine 1 ml Annealing buffer eklenir, vortekslenip, çöktürülüp, supernatant uzaklaştırma işlemi 3 defa tekrarlanır. 1 ml Annealing buffer eklenip karıştırılır. 10 ml izoton çözeltisine 3 µl boncuk eklenip partikül sayım cihazında beadler sayılır, % boncuk kazanımı hesaplanır. % 5-20 arasındaki kazanımlar yeterlidir.

### ***GS FLX cihaz hazırlığı***

“Sequencing Method Manual for the GS FLX+Instrument GS FLX+ Series-XLR70 Kit Ağustos 2011” protokol talimatlarınca cihazın ön yıkamaları yapılır, örnekler pikotitre plakaya yüklenir.

GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70’in The Sequencing XLR70 reaktifi, kit protokolünde tarif edildiği gibi sekans prosedüründe kullanılmadan önce buzu çözülür. Ayrıca Titanium boncuk tamponu, ısıya hassas bir enzim olan Apiraz içerdiği için önceden soğutulur.

**Ön yıkama:** Daha önce gerçekleştirilen sekansın kartuşu cihaz içinde bulunur. Kullanılmış reaktifler uzaklaştırılır ve reaktif kasetleri yenilenir. İçleri ön yıkama tamponu ile doldurulur, borular tüpler içerisine yaklaştırılır ve kapak kapatılır. Bilgisayardan ön yıkama modu seçilerek yıkama başlatılır. Ön yıkama esnasında pikotitre plaka hazırlanır.

**Bead (boncuk) buffer 2 (BB2) hazırlanması:** 1.2 ml Titanium supplement CB, 200 ml önceden soğutulup içine Titanium boncuk tamponu eklenip hafifçe karıştırılır. 34 µl Apiraz enzimi Titanium boncuk tamponu ve Titanium supplement CB karışımına eklenir.



Karışım boncuk tamponu 2 olarak etiketlenip buza alınır. Pikotitre plakanın barkod numarası kaydedilir.

**Boncukların hazırlanması:** Sistemde her biri ayrı hazırlanma prosedürüne ihtiyaç duyan 4 çeşit boncuk bulunur. NGS platformu için kullanılan boncuklar ve fonksiyonları Çizelge 3.9’da gösterilmektedir:

**Çizelge 3.9.** NGS platformu için kullanılan boncuklar ve fonksiyonları

<b><i>Boncuk Tipi</i></b>	<b><i>Fonksiyonu</i></b>
<b><i>DNA boncukları</i></b>	Sekansı yapılacak DNA örneğini taşır.
<b><i>Enzim boncukları</i></b>	İmmobilize enzim bileşenlerini taşır.
<b><i>PPiase boncukları</i></b>	Her bir nükleotit akışından sonra kalıntıları ortadan kaldırır.
<b><i>Packing (paketleme) boncukları</i></b>	Sekanslama sırasında tüm immobilize bileşenleri dengeler.

*Packing (paketleme) boncuklarının hazırlanması:* Paketleme boncukları 1 ml BB2 ile 10.000 RPM de 5 dakika santrifüj edilerek 3 kere yıkanır. 3. yıkamanın ardından 550 µl BB2 tüplere eklenerek buza kaldırılır.

*DNA boncuklarının hazırlanması (örnek ve kontrol için):* Örnek DNA boncuk sayısı, Çizelge 3.10’da belirtilen boyutlarda seçilir. Belirtilen miktarlarda boncuk kullanmak için örnek boncuklardan ne kadar hacimde alınacağı hesaplanır. Her bölge (region) için 2.000.000 boncuk olması gerektiğinden; (30 µl’de 2.000.000 boncuk olması için örneklerden alınan hacimler hesaplanır.) DNA boncukları inkübasyon karışımının içeriği Çizelge 3.11’de, DNA boncuklarının DBIM ile seyreltilmesi için gereken reaktif miktarları ise Çizelge 3.12’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.10.** DNA boncuklarının hazırlanması

<i>Yüklenen bölge (region) boyutu</i>	Büyük
<i>Pikotitre plaka boyutu</i>	70 x75 mm
<i>Her bölge için yüklenecek DNA kütüphanesi boncuk sayısı</i>	2.000.000 (x2)
<i>Kontrol DNA boncuklarının hacmi (µl)</i>	20 (x2)
<i>Santrifügasyon sonrası hedef son hacim (µl)</i>	50 (x2)

Embriyo örneğinden 48 µl, oosit örneğinden 60 µl'den 30'ar µl alındığında 2.000.000 boncuk bulunur. Üzerlerine 20'şer µl kontrol DNA boncuklarından eklenerek son hacim 50 µl'ye tamamlanır.

Boncuklar 1 dakika mikrosantrifüjde çevrildikten sonra tüpler 180° döndürülüp tekrar 1 dakika santrifüj edilip, supernatant uzaklaştırılır.

**Çizelge 3.11.** DNA boncukları inkübasyon karışımının hazırlanması

<i>Yüklenen bölge (region) boyutu</i>	Bütün boyutlar
<i>Pikotitre plaka boyutu</i>	70 x75 mm
<i>BB2 (µl)</i>	1570
<i>Polimeraz kofaktörü (µl)</i>	150
<i>DNA polimeraz (µl)</i>	300
<i>Total hacim (µl)</i>	2020

Her bir DNA tüpü üzerine aşağıda belirtilen miktarda DBIM eklenip karıştırılır. Tüpler 15 dakika dairesel karıştırıcıda çevrilir.

**Çizelge 3.12.** DNA boncuklarının DBIM ile seyreltilmesi

<i>Yüklenen bölge boyutu</i>	Büyük
<i>DNA boncukları (µl)</i>	50 (x2)
<i>DBIM (µl)</i>	950 (x2)
<i>Toplam hacim (µl)</i>	1000 (x2)

*Enzim ve ppiase boncuklarının hazırlanması (boncuk katmanı 1,3 ve 4):* Boncuklar vortekslenip manyetik toplayıcı aparata yerleştirilir, 30 saniye bekletilip bir kaç kez alt üst edilir, 30 saniye beklenecek boncuk peleti oluşması sağlanır. Dikkatlice supernatant uzaklaştırılır.

Enzim boncukları 3 kere 1 ml BB2 ile vortekslenip supernatant uzaklaştırılarak yıkanır. 3. yıkamadan sonra 1 ml BB2 her enzim tüpüne eklenir, vortekslenerek pelet çözülür ve buza kaldırılır. Ppiase boncukları 500 µl BB2 ile vortekslenip supernatant uzaklaştırılarak yıkanır. 3. yıkamadan sonra 500 µl BB2 her Ppiase tüpüne eklenir, vortekslenerek pelet çözülür ve buza kaldırılır.

Boncuklar, boncuk katmanı 1,3 ve 4 için Çizelge 3.13'teki gibi hazırlanır.

**Çizelge 3.13.** Enzim ve Ppiase boncukların boncuk katmanı 1,3 ve 4 için hazırlanması

<i>Boncuk katmanı</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>BB2 (µl)</i>	3250	2500	3340
<i>Enzim boncukları (µl)</i>	550	1300	--
<i>Ppiase boncukları (µl)</i>	--	--	460
<i>Total hacim (µl)</i>	3800	3800	3800

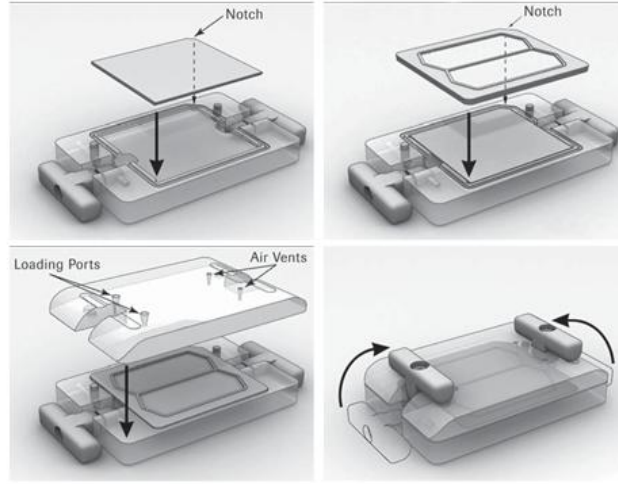
*DNA ve paketlenme boncuklarının birleştirilmesi (boncuk katmanı 2):* DNA boncuklarının DBIM ile inkübasyonu tamamlandıktan sonra BB2 ile paketlenme boncuklarının yıkaması

gerçekleştirilir. Çizelge 3.14'te belirtilen boncuk sayısına göre belirtilen miktarda BB2 ile boncuklar birleştirilir ve 15 dakika oda sıcaklığında dairesel karıştırıcıda çevrilir.

**Çizelge 3.14.** Boncuk katmanı 2'nin hazırlanması

<i>Yüklenen bölge boyutu</i>	Büyük
<i>DNA boncukları (<math>\mu</math>l)</i>	1000 (x2)
<i>Paketleme boncukları (<math>\mu</math>l)</i>	265(x2)
<i>BB2 (<math>\mu</math>l)</i>	435(x2)
<i>Toplam hacim (<math>\mu</math>l)</i>	1700(x2)

*Boncuk depolama aygıtı ile PTP cihazı ve boncuk yükleme gasketinin birleştirilmesi:* Şekil 3.3'te gösterildiği gibi gerçekleştirilir.



**Şekil 3.3.** Boncuk depolama aygıtının pikotitre plaka ile birleştirilmesi

*Tampon/ boncuk 4 katmanın PTP aygıtına yüklenmesi:* Boncuklar, PTP üzerindeki deliklerden enjekte edilir, santrifügasyon ile boncukların PTP kuyucuklarına iyice yerleşmesi sağlanır.

Boncuk katmanı 1: Enzim boncukları ön tabaka

Boncuk katmanı 2: DNA ve paketlenme boncukları tabakası

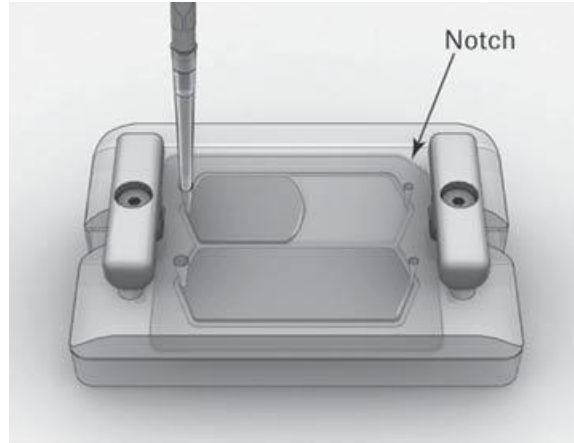
Boncuk katmanı 3: Enzim boncukları son tabaka

Boncuk katmanı 4: PPIase boncukları tabakası

*Boncuk katmanı 1'in yüklenmesi, enzim boncuklarının ön katmanı:* Boncuk karışımı 5 saniye vorteksenerek karıştırılır. Region (bölge) boyutu büyük olduğundan Çizelge 3.15'te belirtilen miktarda boncuk Şekil 3.4'te gösterildiği gibi plaka kuyularından yüklenir.

**Çizelge 3.15.** Boncuk tabakası 1 için yüklenecek enzim boncuğu hacmi

<i>Yüklenen bölge boyutu</i>	Büyük
<i>Yükleme hacmi (<math>\mu</math>l)</i>	1860 (x2)



**Şekil 3.4.** Yükleme bölgesinin doldurulması

5 dakika 1620 g'de Boncuk depolama aygıtı içindeki pikotitre plaka santrifüj edilir.

*Boncuk katmanı 2'in yüklenmesi, DNA ve paketlenme boncukları:* Santrifüjden alınan boncuk depolama aygıtının kuyucuğundan daha önce yüklenen boncuklar çekilip

uzaklaştırılır. 2. boncuk tabakası için boncuk karışımının homojen hale gelmesi sağlanır. Çizelge 3.16’da belirtilen miktarda alınarak pikotitre plakaya yüklenir.

**Çizelge 3.16.** Boncuk tabakası 2 için yüklenecek DNA ve paketleme boncuğu hacmi

<i><b>Yüklenen bölge boyutu</b></i>	Büyük
<i><b>Yükleme hacmi (<math>\mu</math>l)</b></i>	1700 (x2)

10 dakika 1620 g’de boncuk depolama aygıtı içindeki pikotitre plaka santrifüj edilir.

*Boncuk katmanı 3’ün yüklenmesi, enzim boncuklarının son katmanı :* Santrifüjden alınan boncuk depolama aygıtının kuyucuğundan daha önce yüklenen boncuklar çekilip uzaklaştırılır. Deney sonunda bir aksilik olursa hata tespitini kolaylaştırmak için supernatant saklanır. 3. boncuk tabakası için, boncuk karışımı 5 saniye vortekslenerek homojen olması sağlanır. Çizelge 3.17’de belirtilen miktarda boncuk alınarak kuyucuktan pikotitre plakaya yüklenir. 5 dakika 1620 g’de boncuk depolama aygıtı içindeki pikotitre plaka santrifüj edilir.

**Çizelge 3.17.** Boncuk tabakası 3 için yüklenecek enzim boncuğu hacmi

<i><b>Yüklenen bölge boyutu</b></i>	Büyük
<i><b>Yükleme hacmi (<math>\mu</math>l)</b></i>	1860 (x2)

*Boncuk katmanı 4’ün yüklenmesi, PPIase boncukları:* Santrifüjden alınan boncuk depolama aygıtının kuyucuğundan daha önce yüklenen boncuklar çekilip uzaklaştırılır. 4. boncuk tabakası için, boncuk karışımının 5 saniye vortekslenerek homojen hale gelmesi sağlanır. Çizelge 3.18’de belirtilen miktarda boncuk alınarak kuyucuktan pikotitre plakaya yüklenir. 5 dakika 1620 g’de boncuk depolama aygıtı içindeki pikotitre plaka santrifüj edilir.

**Çizelge 3.18.** Boncuk katmanı 4 için yüklenecek PPIase boncuk hacmi

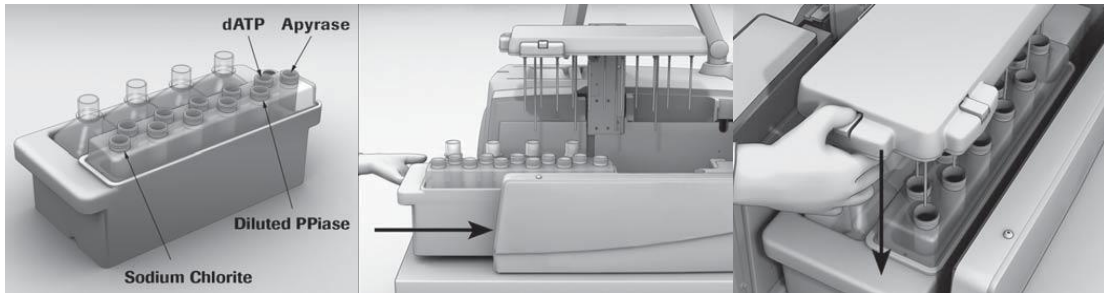
<i>Yüklenen bölge boyutu</i>	Büyük
<i>Yükleme hacmi (µl)</i>	1860 (x2)

### *Sekanslama*

*Sekans reaktif kasetinin hazırlanması ve yüklenmesi:* Her Titanium tampon CB tüpüne, 6.6 ml Titanium supplement CB ve 1000 µl DTT eklenip, hafifçe karıştırılır. 1.7 ml'lik konik tüp içerisinde 45 µ Inhibitör TW reaktif içerisinde 5 µl Ppiase reaktif dilüe edilir. Sekanslama reaktiflerinin olduğu tabla soğukta tutulur. Diğer sekanslama reaktifleri Çizelge 3.19'da belirtildiği gibi ilgili tüplere eklenir, Şekil 3.5'te gösterildiği gibi cihaza yerleştirilir.

**Çizelge 3.19.** Sekanslama reaktifleri

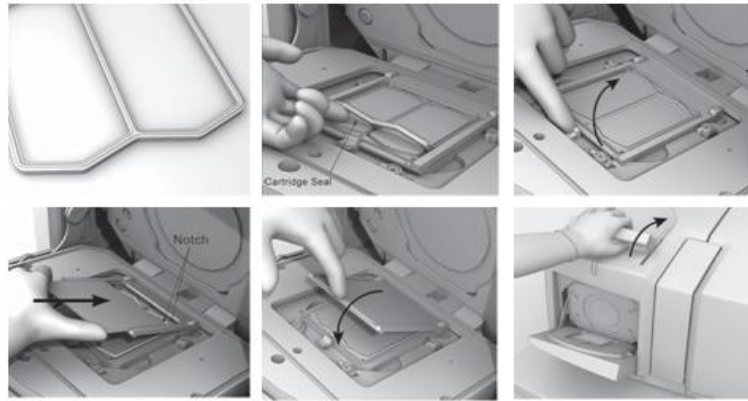
<i>Kit</i>	XLR70
<i>Post-run wash için sodyum klorid tablet</i>	1 tablet
<i>İnhibitör TW'ye eklenecek seyreltilmiş PPIase hacmi</i>	13.2 µl
<i>Apiraz tampon için Apiraz hacmi</i>	260 µl
<i>dATP tampon için dATP hacmi</i>	3000 µl



**Şekil 3.5.** Sekans reaktifleri kasetinin yerleştirilmesi

“Sequencing Method Manual GSFLX Titanium Series October 2009” talimatlarınca pikotitre plaka ve kamera koruyucu önyüzü temizlenir, sekans programı ve diğer çalıştırma parametreleri ayarlanır. Pikotitre plaka barkod numarası girilir, run ismi kaydedilir. “XLR70 Ti” (XLR70 Ti kit 70x75 PicoTiterPlate) sekans kiti seçilir. Pikotitre plaka tipi “2 Region” seçilir. mikroRNA sekansı yapılacağı için döngü sayısı “100 (yaklaşık 250 baz)” seçilir.

Picotitre plakanın cihaza yerleştirilmesi ve sekansın başlatılması: Örneklerin plakaya yüklenmesi ve plakanın cihaza yerleştirilmesi Şekil 3.6’da gösterildiği gibi gerçekleştirilir, gerekli parametrelerin belirlenmesinin ardından sekans başlatılır. Pirosekanslama bittikten sonra veri cihazdan alınır ve analiz edilir.



**Şekil 3.6.** Pikotitre plakanın sisteme yerleştirilmesi

#### **3.2.4. cDNA sentezi ve reverse transkripsiyon**

cDNA sentezi, QIAGEN miScript PCR System talimatlarınca gerçekleştirilmiştir. Olgun 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. Oligo-dT primerlerin 3’ uçlarında evrensel sekans dizileri bulunur. Her miRNAnın cDNA’ya amplifikasyonu sonunda ilgili ampikonun 5’ ucuna bu evrensel diziler eklenir. Bu sayede



takip eden aşamada gerçekleştirilecek QPCR için ilgili miRNA primerlerine eşlenik diziler, oluşan ampliconlara eklenir.

cDNA sentezi için örneklerin RNA konsantrasyonu eşitlenir. Her örnek için MiScript RT tampon 4 µl, RT enzim 1 µl olacak şekilde 5 µl'lik kokteyl hazırlanır. RNA miktarının 500 ng olması için gerekli hacim belirlenir, ona göre su ile reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlanır. 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.

### 3.2.5. qRT-PCR (Eş zamanlı PCR)

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.

Gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü kullanılmıştır.

---

$$\Delta\Delta Ct: [(2^{\text{hücreli embriyo}_{(miRNA\ x)}} - 2^{\text{hücreli embriyo}_{(U18)}}) - (8^{\text{hücreli embriyo}_{(miRNA\ x)}} - 8^{\text{hücreli embriyo}_{(U18)}})]$$

---

Formülde belirtilen U18 geni referans transkript, normalizasyon geni olarak seçilmiştir. Her bir miRNA ifadesi U18 ifadesi kullanılarak normalize edilir.

miRNAYA özgü primerlerin cDNA üzerinde uygun bölgeye bağlanmasıyla ampliconun logaritmik artışının görülebildiği bir amplifikasyon eğrisi oluşur. Amplifikasyonun gerçekleşmesine paralel olarak, çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green floresan boyası ışığa verir. Verdiği ışımının 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.

miScript SYBR Green PCR kit talimatları doğrultusunda PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. Bütün reaksiyonlar ikili tekrarlar halinde çalışılır ve her bir miRNA için negatif kontrol olarak cDNA içermeyen bir PCR reaksiyonu hazırlanır.

-20 µl cDNA üzerine 60 µl su eklenerek cDNA konsantrasyonu 6,25 ng/µl'ye seyreltilir. (Önceki aşamada 500 ng RNA, cDNA'ya çevrildiği için 500 ng cDNA/80 µl = 6,25 ng/µl )

-Primerler Tris-EDTA içinde çözülür.

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

-384 kuyulu plaka için her kuyuda 10 µl olacak şekilde teknik tekrarları ile birlikte reaksiyonlar kurulur: qRT-PCR reaksiyonu reaktif miktarları Çizelge 3.20'de belirtilmiştir.

**Çizelge 3.20.** qRT-PCR reaksiyonu reaktif miktarları

<i>Reaktif</i>	<i>Miktarı (µl)</i>
2x Quantitect SYBR green PCR master karışımı.....	5
10x miScript universal primer.....	1
10x miSript primer.....	1
cDNA (6,25 ng/µl).....	1
H <sub>2</sub> O.....	2

-Hazırlanan reaksiyon karışımı (örnek sayısı x birim reaksiyon karışımı) qRT-PCR plakasındaki (LightCycler®480 Multiwell Plate 384) her bir kuyucukta 9 µl olacak biçimde dağıtılır.

-Kuyulardaki reaksiyon karışımlarının her birine 1 µl örnek cDNA'sı eklenmesiyle son hacim 10 µl'ye tamamlanır.

-Reaksiyon kurulumunun ardından şeffaf, yapışkan bir örtücü (LightCycler®480 Sealing Foil) ile plakanın üzeri kapatılır.

-Örneklerin yüklendiği 384'lük PCR plakası 1 dakika 1000 g'de oda sıcaklığında santrifüj edilir.

-Plaka, LightCycler®480 Real-Time PCR System cihazına yerleştirilir.

-Cihaz, Çizelge 3.21'de belirtilen termal döngü koşullarına uygun biçimde ayarlanır.

**Çizelge 3.21.** QRT-PCR koşulları

<i>Basamak</i>	<i>Süre</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Döngü sayısı</i>
PCR başlangıç aktivasyonu	15 dakika	95 °C	1
Denatürasyon	15 saniye	94 °C	50
Primer bağlanması	30 saniye	55 °C	
Uzama	30 saniye	70 °C	

-Kullanılan primerlerin tek bir ürün verdiği için çoğalma reaksiyonunun sonuna bir erime reaksiyonu eklenir ve oluşan PCR ürünleri 55 °C'den 94 °C'ye ısıtılarak çift zincirli DNA yapısı bozulur. Çift zincirli DNA'ya bağlı SYBR Green boyası aracılığıyla erime eğrisi oluşur.

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

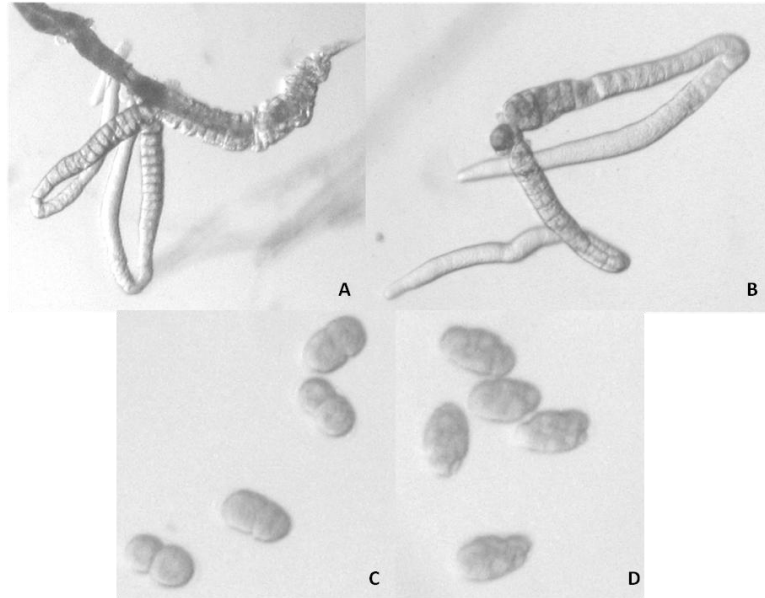
### **3.2.6. Hedef mRNA *in silico* analizi**

Yeni nesil sekanslama ve mikroRNA mikroarray verilerinden elde edilen aday mikroRNAların hedeflerini tanımlamak üzere microRNA.org web yazılımı kullanılmıştır. Her bir miRNAnın hedef gene hangi kısmından bağlandığı, eşleniklik derecesi ve aynı mRNA'yı hedef alan diğer miRNAlar belirtilir. 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 gösteren çeşitli grafikler sunabilmektedir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Diseksiyon ile Evre-spesifik Embriyo ve Oosit Toplanması

RNA izolasyonu için kullanılacak *fog-2(q71)* mutant dişi *C.elegans* suşların disekte edilmesiyle elde edilen germline (mitotik ve mayotik oosit popülasyonu) (Şekil 4.1 A ve B), yabancı tip (N2, Bristol) 2 ve 8 blastomer aşamasındaki embriyolar Şekil 4.1 C ve D'de görülmektedir. Toplanan embriyo ve oositler trizol içine alınıp sıvı azotta dondurulduktan sonra RNA izolasyonuna kadar -80 °C'de saklanmıştır.



**Şekil 4.1.** Disekte edilmiş germline ve 2-8 hücreli embriyo görüntüleri. A.Disekte edilmiş *fog-2(q71)* mutantı, B. 2 tane *fog-2(q71)* gonad kolu (germline) C. 2 blastomer N2 embriyo D. 8 blastomer N2 embriyo

### 4.2. Erişkin N2 *C. elegans* 2 ve 8 Hücreli Embriyolardan Total RNA İzolasyonu ve miRNA Mikrodizi Analizi

N2 *C. elegans* disekte edilerek toplanan 2 ve 8 hücreli embriyolardan Trizol protokolü ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında mikroarray, QRT-PCR doğrulama deneylerinde kullanılmak üzere üçer biyolojik tekrarlı örnek için binlerce 2 ve 8 hücreli embriyo, ağız pipetlemesi ile izole edilmiş ve total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İlk gerçekleştirilen ve mikroarray çalışması için Danimarka'ya

yollanan 12 µl ddH<sub>2</sub>O içinde çözülen RNA miktarları Çizelge 4.1’de gösterildiği gibidir. Çizelgede ortalama olarak 6000-7000 tane embriyodan 3,5-4 µg total RNA izole edilebildiği görülmektedir. Mikroarray için totalde 2,5 µg RNA olacak şekilde iki örnek için gereken hacimler belirlenmiş ve artan miktar QRT-PCR çalışmalarında da kullanılmıştır.

**Çizelge 4.1.** Toplanan embriyolardan elde edilen RNA miktarı

<i>Örnek Tipi</i>	<i>Toplanan embriyo sayısı</i>	<i>Elde edilen RNA miktarı</i>
2 blastomer (N2)	7500	3648 ng
8 blastomer (N2)	6390	4360 ng

miRNA mikroarray hizmeti alınmak üzere her evreden 2.5 µg total RNA kurubuz üzerinde EXIQON firmasına yollanmıştır.

cDNA sentezi için her evreden 500 ng total RNA kullanılmıştır.

#### **4.3. Erişkin *fog-2(q71)* Mutant *C. elegans* Oositlerinden ve Karışık Evre Embriyolardan Total RNA İzolasyonu**

*fog-2 (q71)* *C. elegans* disekte edilerek toplanan oosit ve gastrula öncesi karışık evre embriyolardan elde edilen total RNA miktarları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.2.** *fog-2(q71)* oosit ve karışık evre embriyolardan izole edilen RNA miktarları

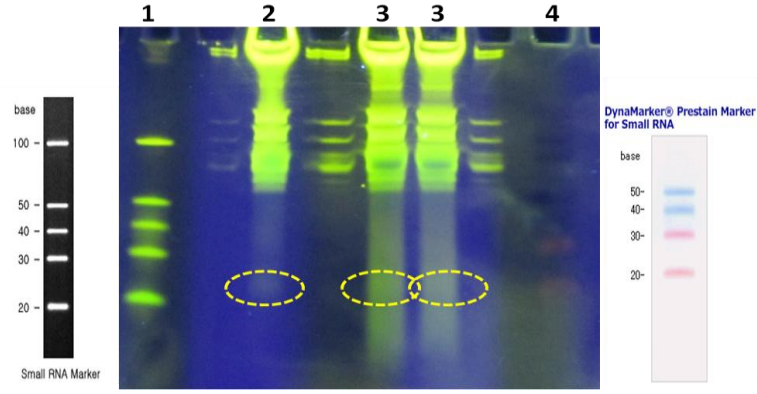
<i>Örnek tipi</i>	<i>Toplanan oosit/ embriyo sayısı</i>	<i>Elde edilen RNA miktarı</i>
<i>fog-2(q71)</i> oosit(germline)	1000	20.98 µg
Gastrula öncesi karışık evre <i>fog2(q71)</i> embriyolar	85000 (epp prep yöntemi)	19.43 µg

#### **4.4. Yeni Nesil Sekanslama ile *fog-2(q71)* *C.elegans* Oosit ve Erken Evre Embriolarının miRNAom Profillerinin Belirlenmesi**

454 Genome Sequencer FLX Titanium (Roche) platformunda pirosekanslama gerçekleştirmek için sırası ile total RNAdan miRNA saflaştırılması, miRNA popülasyonuna iki ayrı basamakta 3' ve 5' linker ligasyonu, ters transkripsiyon, 19-mer dizi içeren ve linkerlara komplementer primerler ile PCR, amplicon kütüphanesinin çoğaltılması basamakları gerçekleştirilmiştir. Amplicon kütüphanesinin ardından emülsiyon PCR olarak adlandırılan, her bir yağ taneciğinin içinde bir reaksiyonun gerçekleştiği PCR aşaması gerçekleştirilmiştir. Emülsiyon PCR kısmı örneğin amplifikasyonu, toplanması ve zenginleştirilmesi olmak üzere 3 basamaktan oluşmaktadır. Sonrasında zenginleştirilmiş örnekler pirosekanslanmak üzere cihaza yüklenmiştir.

#### ***Küçük RNA'ların ayrımı***

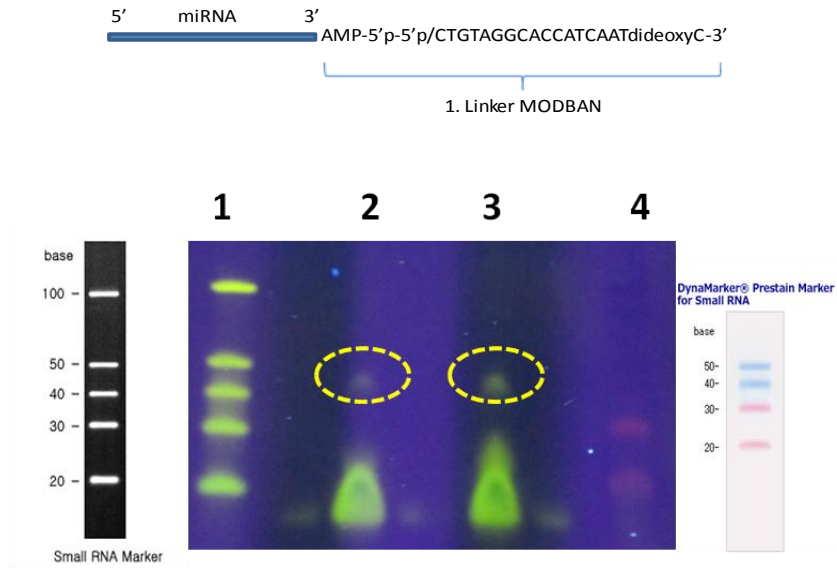
Küçük RNAları total RNAdan ayırmak üzere örnekler üzerine örneklerin hacmi kadar 2X yükleme boyası eklenmiş ve denatürasyondan sonra % 15 üre içeren poliakrilamid jele yüklenmiştir. 180 V'ta yaklaşık 50 dakika yürütüldükten sonra SYBR Gold boyası ile boyanan jelin görüntüsü Şekil 4.2'de görülmektedir. 20 baz çifti civarındaki miRNA bantları kesilip alınmış ve saflaştırılmıştır.



**Şekil 4.2.** SYBR Gold ile boyanmış total RNA görüntüsü. 1. Abnova Small RNA Marker, 2. Oositlerden elde edilen 18 µg total RNA, 3. Karışık evre embriyolardan (gastrula öncesi) elde edilmiş toplam 18 µg total RNA (hacimden dolayı iki ayrı kuyuya yüklenmiştir), 4. Biodynamics DynaMarker® Prestain Marker for Small RNA

### *Birinci ligasyon*

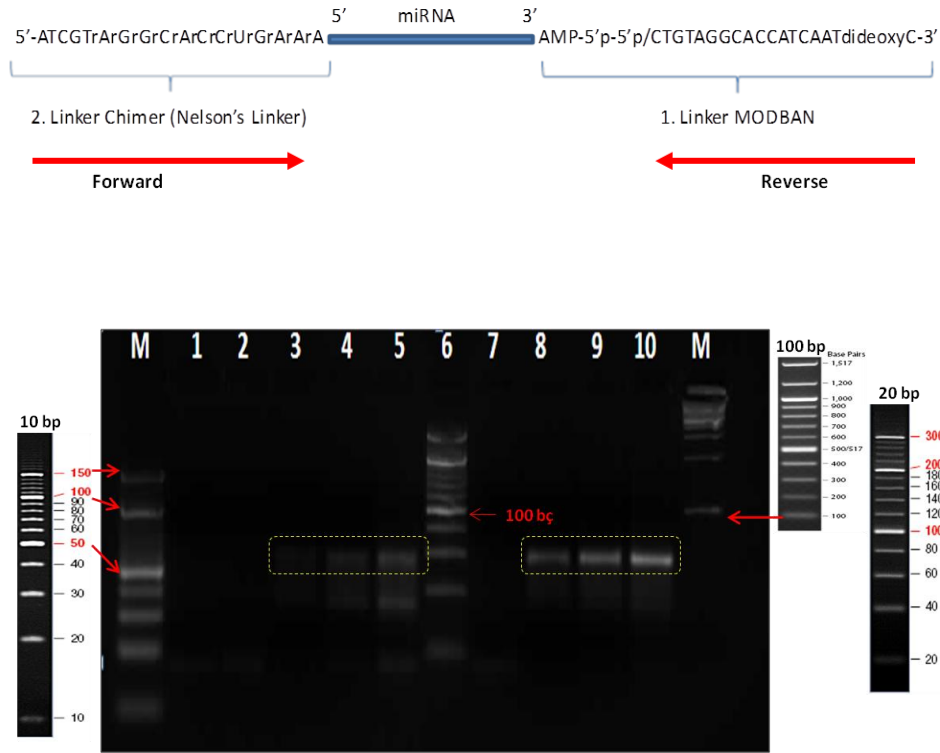
Birinci ligasyonda miRNAların 3' ucuna MODBAN linkerı takılmıştır. 20'şer µl kurulan birinci ligasyon reaksiyonu örneklerine 20'şer µl 2X yükleme boyası eklenmiş ve örnekler tekrar %15'lik üreli poliakrilamid jele yüklenmiştir. İlk ligasyon sonrası 45 bç civarında gözlenen ürün Şekil 4.3'te sarı daire içinde görülmektedir. 20 bç civarındaki kalın bantlar linkerlardır.



**Şekil 4.3.** İlk ligasyon sonrası 45 bç civarında gözlenen ürün. 1. Abnova Small RNA Marker, 2. 3' linker eklenmiş oosit miRNA, 3. 3' linker eklenmiş karışık evre embriyo miRNA, 4. Biodynamics DynaMarker® Prestain Marker for Small RNA

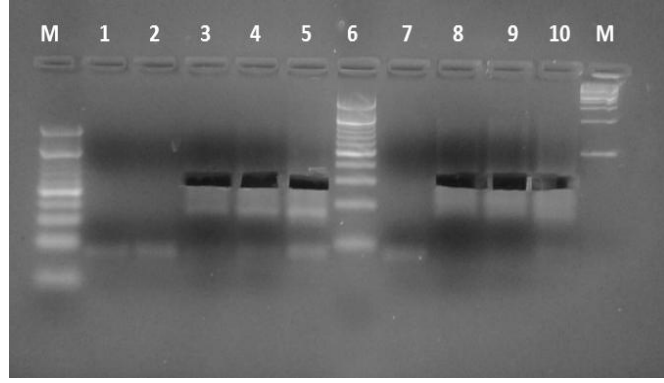
## İkinci ligasyon ve cDNA'nın PCR ile amplifikasyonu

Jelden izole edilen ilk ligasyon ürünü ikinci ligasyon için kullanılmış ve böylece 5' uca Chimer takılmıştır. İkinci ligasyon ürününün tamamı cDNA sentezi için kullanılmış ve ardından Chimer ve MODBAN dizilerine spesifik primerlerle PCR ile çoğaltılmıştır. 100 µl PCR ürünü %4'lük metaphor agaroz jelde 3 kuyuya yüklendikten sonra sarı ile işaretli 60 bç civarındaki bant kesilerek alınmış ve saflaştırılmıştır (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5)



**Şekil 4.4.** %4'lük Metaphor agaroz jelde cDNA'nın PCR amplifikasyonu görüntüsü. M: 10 µl Fermentas O'RangeRuler 10bp DNA Ladder, 1: Negatif PCR, 2: Negatif RT kontrol, 3-4-5: Oosit PCR ürünü , 6: Fermentas O'RangeRuler 20bp DNA Ladder ,7: Negatif RT kontrol, 8-9-10: Karışık Embriyo PCR ürünü, M: 100 bç DNA ladder NEB

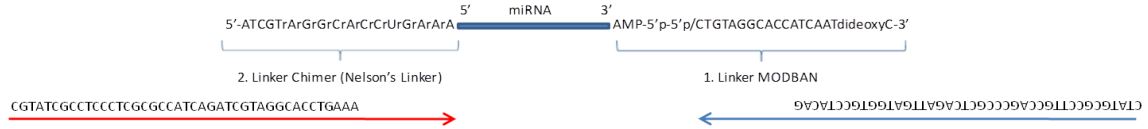




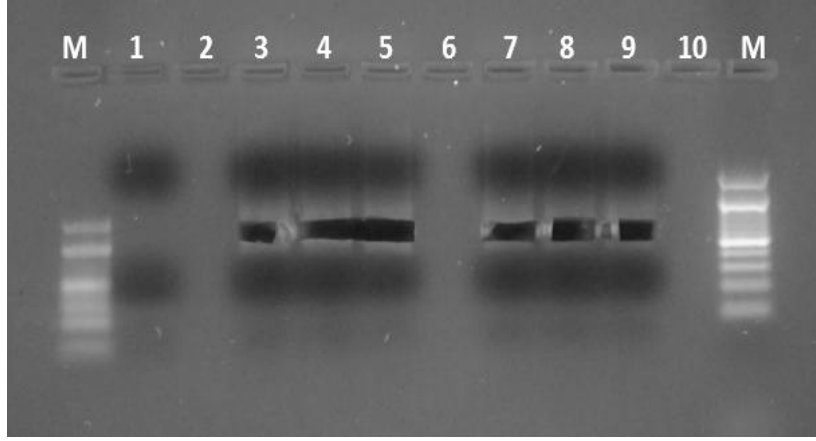
**Şekil 4.5.** Amplifiye olmuş cDNA'nın %4'lük metaphor agaroz jelden kesilmiş görüntüsü

#### 454 PCR primerleri ile amplifikasyon

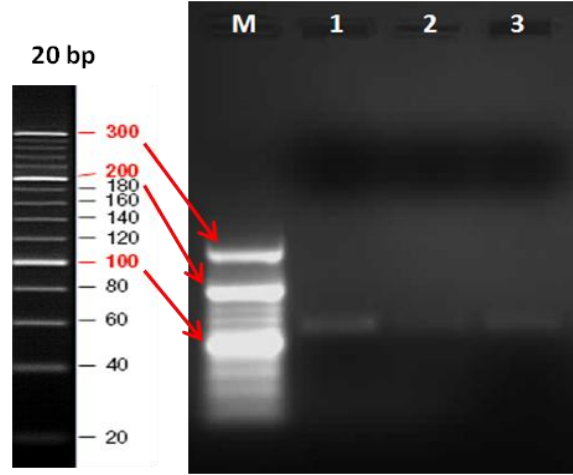
İlk PCR ürünü, 454 amplifikasyonu için kalıp olarak kullanılmış ve BanI ve BanII primerleri ile örnekler çoğaltılmıştır. 100 bç civarında beklenen bantlar jelden kesilip saflaştırılarak (Şekil 4.6 ve 4.7) tekrar %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 4.8).



**Şekil 4.6.** %2'lik metafor agaroz jelde 454 PCR ürünleri M: 10 µl Fermentas O'RangeRuler 10bp DNA Ladder 1-6-10: boş, 2: Negatif PCR, 3-4-5: Oosit PCR ürünü, 7-8-9: Karışık Embriyo PCR ürünü, M: Fermentas O'RangeRuler 20bp DNA Ladder



**Şekil 4.7.** %2'lik Metaphor agaroz jelden bantlar saflaştırılmak üzere kesimi sonrası



**Şekil 4.8.** %2'lik agaroz jelde saflaştırılmış 454 PCR ürününün kontrolü. M: Fermantas O'RangeRuler 20 bp DNA ladder, 1: 2 µl Oosit saflaştırılmış 454 PCR ürünü, 2:2 µl Embriyo saflaştırılmış 454 PCR ürünü, 3:3 µl Embriyo saflaştırılmış 454 PCR ürünü

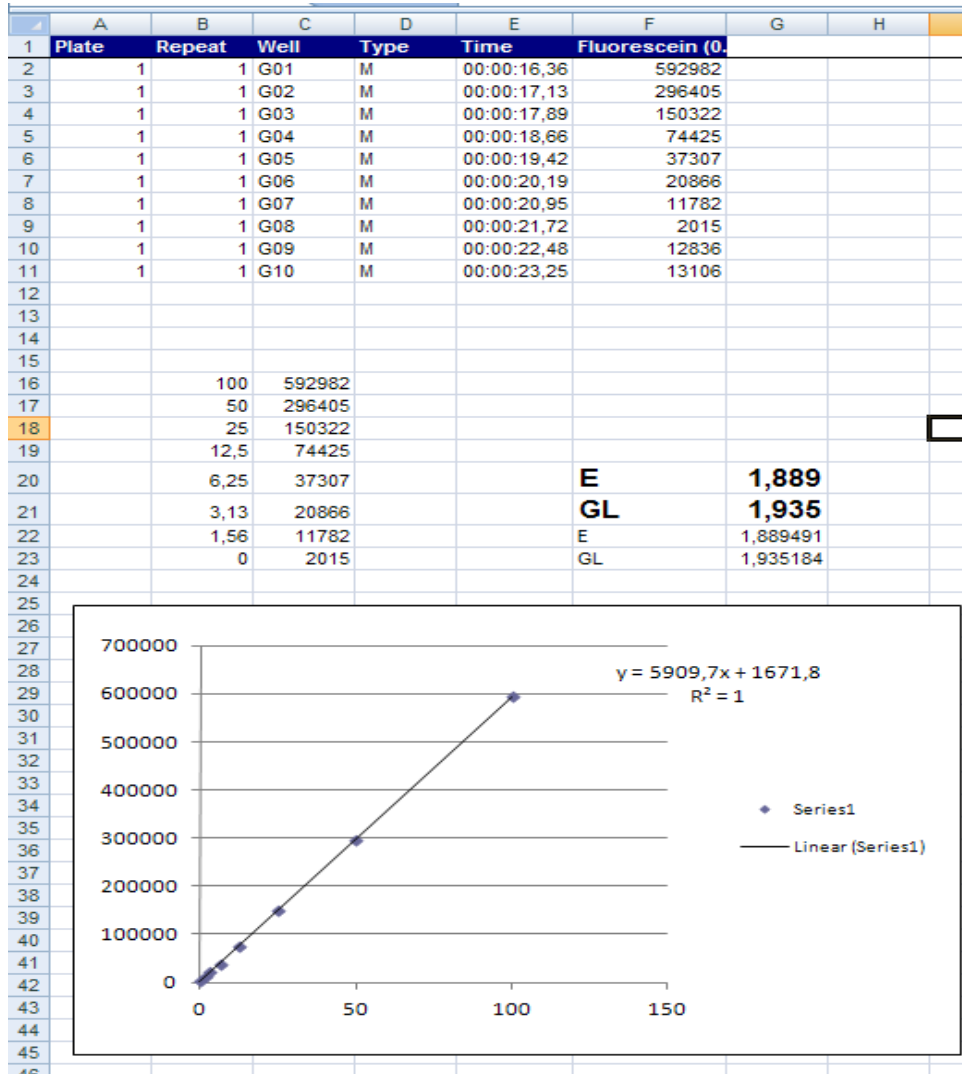
#### ***Amplikon kütüphanesi saflaştırılması***

Hannon protokolü sonunda 30 µl suda çözülen DNA örnekleri (*fog-2(q71)* oositleri ve *fog-2(q71)* erken evre embriyolar) yapılan son PCR sonrası ortamda kalan primer, nükleotit kalıntılarından arındırılmak üzere Ampure boncuk kullanılarak yöntem kısmında anlatıldığı üzere saflaştırılmıştır.

### cDNA kütüphanesinin konsantrasyonunun belirlenmesi

Ampure boncukları ile 70-100 bp uzunluğundaki ampliconlar saflaştırılmıştır. Çift zincirli DNA'ya bağlanan Picogreen belirteciyle hazırlanan standart grafik aracılığıyla örneklerin DNA miktarı VICTOR<sup>3</sup>V 1420 Multilabel Counter cihazı (Perkin Elmer) kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Standart grafik için dilüsyonlar ve örneklerin hazırlanması yöntem kısmında belirtildiği üzere gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.9'da ölçüm sonuçları Excel dosyasına kaydedilmiş, standart grafik çizilmiş ve hesaplanan örnek konsantrasyonları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.



**Çizelge 4.3.** Standart grafik ile hesaplanan örnek konsantrasyonları

<b>Örnek</b>	<b><math>y = 5909x + 1671</math></b>	<b>Konsantrasyonu <math>ng/\mu l</math></b>	<b>Molekül miktarı/<math>\mu l</math></b>
Embriyo	$(12836-1671) / 5909$	1.889	$1,57 \cdot 10^{10}$
Germline (oosit)	$(13106-1671) / 5909$	1.935	$1,61 \cdot 10^{10}$

Örnek konsantrasyonları aşağıdaki formüle yerleştirilmiş ve DNA miktarı molekül olarak hesaplanmıştır. Kit protokolünde önerildiği üzere aşamalı şekilde  $10^7$  molekül/ $\mu l$  DNA olacak şekilde örnekler seyreltilmiştir.

$$\frac{\text{Örnek konsantrasyonu (ng/\mu l)} \times 6,02 \cdot 10^{23}}{656,6 \cdot 10^9 \times \text{Amplikon uzunluğu}} = \text{Molekül / } \mu l$$

### **Emülsiyon PCR**

Emülsiyon PCR yöntem kısmında anlatıldığı üzere kit talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. emPCR sonucu amplifiye olmuş DNA kütüphanesi çözülmüştür. 230  $\mu l$ 'de  $6,8 \cdot 10^6$  molekül boncuk vardır.

$$\text{Kütüphanedeki DNA miktarı (\mu l)} = \frac{\text{Boncuk başına tutunan DNA miktarı (4-6) x } 6,8 \cdot 10^6}{\text{Kütüphane konsantrasyonu (molekül/\mu l)}}$$

$$\text{DNA miktarı} = \frac{5 \text{ molekül/boncuk} \times 6,8 \cdot 10^6 \text{ boncuk}}{10^7 \text{ molekül/\mu l}} = 3,4 \mu l \text{ DNA}$$

Boncuklar üzerine 3,4  $\mu l$  DNA eklenmiştir (4 tüp: 2 tane Embriyo-A ve B, 2 tane GL-A ve B). Amplifikasyon kokteyllerinden 875  $\mu l$  örnek tüpleri üzerine eklenmiştir.

### ***Emülsifikasyon***

Yağın bulunduğu 4 tüpün ikisi Embriyo, ikisi Germline olarak isimlendirilmiştir. İçinde kokteyl bulunan eppendorf tüplerden yaklaşık 500'er µl iki tüpe bölündüğünde bir tüpte hem boncuk A hem boncuk B bulunmuş olmaktadır. Tüpler 12 Hz'te 5 dakika çalkalanmıştır.

### ***Amplifikasyon***

İki örnek için iki ayrı 96'lık PCR plakaya her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde örnekler yüklenmiştir. Yaklaşık 6 saat süren PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra her bir kuyudaki faz ayrımı kontrol edilmiştir. Faz ayrımı belirgin olmayan, bulutsu görünüme sahip olan kuyucuklardaki örnekler ilerleyen aşamalarda kullanılmamıştır.

### ***Boncuk kazanımı ve DNA kütüphanesi boncuk zenginleştirilmesi***

Boncuk kazanımı protokolü uygulandıktan sonra yüzdesi hesaplanmıştır. Bunun için 500 µl annealing tamponu içindeki örnek vortekslenmiş ve Beckman Coulter Particle Counter cihazında boncuk sayımı yapılmıştır. 10 ml izoton çözeltilisine 3 µl boncuklardan eklenip cihazda sayım yapılmıştır. % 85'in üzerindeki kazanımlar prosedüre devam etmek için yeterli sayılmıştır.

Boncuk sayımı yapıldıktan sonra kit kullanım kitapçığında belirtilen formül kullanılarak % boncuk kazanımı hesap edilmiştir. Örnekler için boncuk sayısı ve % boncuk kazanımı Çizelge 4.4'te belirtilmiştir.

$$\% \text{ Boncuk Kazanımı} = \frac{\text{Kazanılan boncuk sayısı}}{\text{Toplam boncuk sayısı (13,6 x 10}^6)} \times 100$$

**Çizelge 4.4.** Örnekler için boncuk sayısı ve % boncuk kazanımı

<b>Örnek ve boncuk türü</b>	<b>Boncuk sayısı</b>	<b>% Boncuk kazanımı</b>
Oosit-A	$1.437 \times 10^7$	105
Oosit-B	$1.793 \times 10^7$	131
Embriyo-A	$1.37 \times 10^7$	100
Embriyo-B	$1.62 \times 10^7$	119

### ***Sekans primerinin bağlanması***

Sekans primerleri boncuklara yöntem kısmında anlatıldığı şekilde bağlanmış ve 10 ml izoton çözeltisine 3 µl boncuk eklenip partikül sayım cihazında boncuklar sayılmış, % boncuk kazanımı hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). % 5-20 arasındaki kazanımlar ileri aşamalara geçmek için yeterli kabul edilmektedir.

**Çizelge 4.5.** Sekans primeri eklenmiş örnekler için % boncuk kazanımı

<b>Örnek ismi</b>	<b>Boncuk sayısı</b>	<b>% Boncuk kazanımı</b>
Embriyo (A ve B)	$3.21 \times 10^6$	23
Oosit (A ve B)	$4.17 \times 10^6$	30

### **GS FLX cihaz ve pikotitre plaka hazırlığı**

Protokol talimatlarınca cihazın ön yıkamaları yapılmış, örnekler pikotitre plakaya yüklenmiştir. Sırası ile önyıkama, çeşitli tamponların hazırlanması, boncukların hazırlanması ve pikotitre plakaya yüklenmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kullanılan pikotitre plaka barkod numarası 754727 kaydedilmiştir. Sistemde her biri ayrı hazırlanma prosedürüne ihtiyaç duyan 4 çeşit boncuk bulunmaktadır. DNA boncukları, sekansı yapılacak DNA örneğini taşır. Enzim boncukları, immobilize enzim bileşenlerini taşır. PPIase boncukları her bir nükleotid akışından sonra kalıntıları ortadan kaldırır ve paketleme (packing) boncukları sekanslama sırasında tüm immobilize bileşenleri dengeler.

Çalışmada kullanılan pikotitre plaka boyutu 70x75 mm'dir, 2 bölgeden (region) oluşmaktadır ve her bir bölgeye 2.000.000 boncuk (DNA kütüphanesi) yüklenmiştir. Her bölge için 20 µl kontrol boncuk eklenmiştir., Örneklerden alınacak hacimler Çizelge 4.6'da belirtilmiştir.

**Çizelge 4.6.** DNA boncukları için örneklerden alınacak hacim

<i>Örnek adı</i>	<i>Embriyo (A ve B)</i>	<i>Oosit (A ve B)</i>
<i>Örnek bağlanmış boncuk sayısı</i>	3.21 x 10 <sup>6</sup>	4.17 x 10 <sup>6</sup>
<i>Kullanılacak son hacim (µl)</i>	30	30
<i>Örneğin bulunduğu hacim (µl)</i>	48	60

Örnekler 30 µl'de yaklaşık 2 milyon boncuk olacak şekilde hazırlanmış ve pikotitre plakanın her bölgesine her örnekten 2 milyon boncuk yüklenecek şekilde üzerine tampon çözeltiler ve enzimler eklenerek son hacim her bölge için 2020 µl'ye getirilerek örnekler yüklenmeye hazır hale gelmiştir.

### ***Sekanslama***

“Sequencing Method Manual GSFLX Titanium Series October 2009” talimatlarınca Piko titre plaka ve kamera koruyucu önyüzü temizlenmiş, sekans programı ve diğer çalıştırma parametreleri ayarlanmıştır. Pikotitre plaka barkod numarası girilmiş, reaksiyon (run) ismi kaydedilmiştir. “XLR70 Ti” (XLR70 Ti kit 70x75 PicoTiterPlate) sekans kiti seçilmiştir. Pikotitre plaka tipi “2 Region” seçilmiştir. mikroRNA sekansı yapılacağı için döngü sayısı “100 (yaklaşık 250 baz)” seçilmiştir. Örneklerin plakaya yüklenmesi ve plakanın cihaza yerleştirilmesi, gerekli parametrelerin belirlenmesinin ardından sekans başlatılmıştır.

### *Sekans datasının cihazdan alınması ve işlenmesi*

Pirosekanslama bittikten sonra ertesi gün, öncelikle reaksiyon verimi kontrol edilmiştir (Şekil 4.10). Buna göre her iki bölgede toplamda 1,275,747 başarılı sekans reaksiyonu gerçekleştiği, toplamda %74 başarı ile sekans dataları toplandığı, ortalama okunan fragment uzunluğunun 56 baz, en uzun sekans reaksiyonunun 604 baz (kontrol boncuklar), en kısanın da 41 baz olduğu görülmektedir.

TCAG (Library)		Region		
		1	2	Total
Raw Wells		728,525	622,015	1,350,540
Key Pass Wells		690,498	585,249	1,275,747
Failed	Dot	62,810	50,751	113,561
	Mixed	102,087	117,823	219,910
	Short Quality	342,299	225,470	567,769
	Short Primer	135,953	148,887	284,840
Passed Filter Wells		47,349	42,318	89,667
	% Dot + Mixed	23.88	28.80	26.14
	% Short	69.26	63.97	66.83
	% Passed Filter	6.86	7.23	7.03

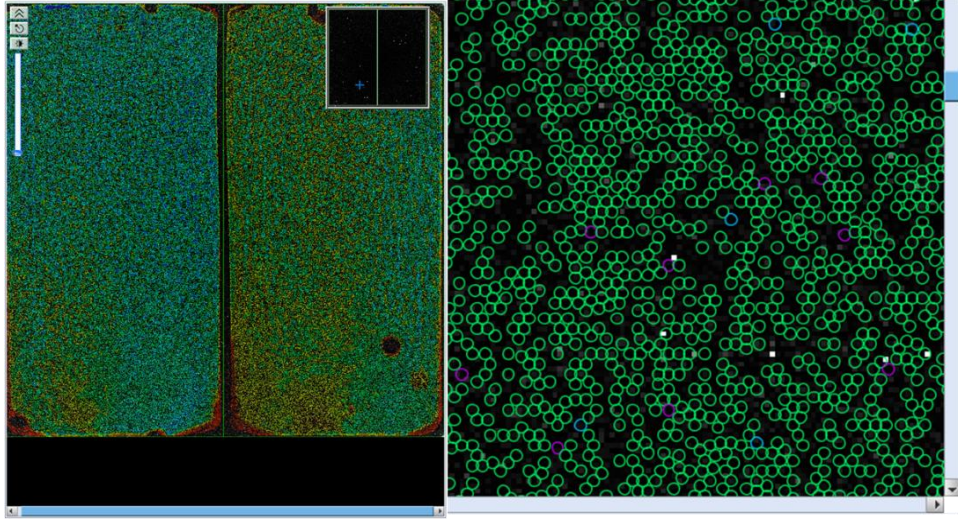
  

TCAG (Library)		Region		
		1	2	Total
Length Average		54.93	57.55	56.36
Length Std Deviation		12.96	9.61	
Longest Reads Length		604	477	604
Shortest Reads Length		41	41	41
Median Reads Length		55.0	57.0	56.0

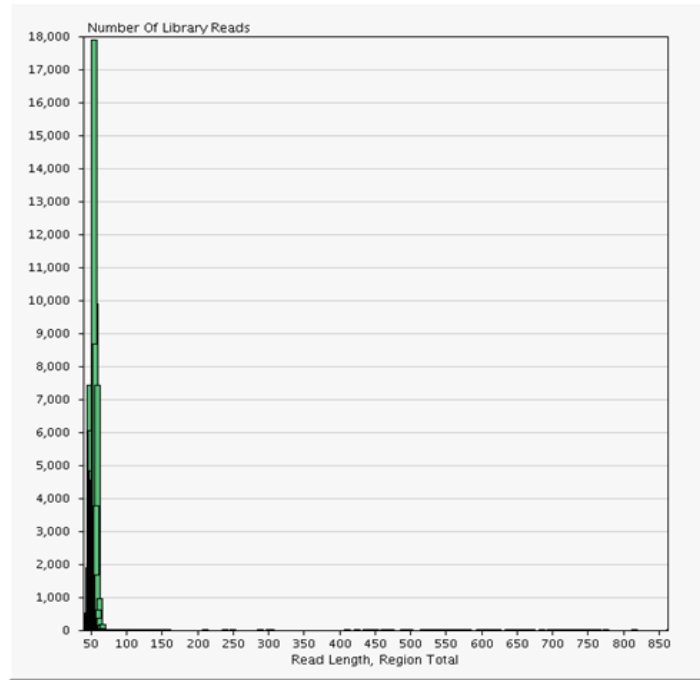
**Şekil 4.10.** GS FLX reaksiyon raporu

Pikotite plakadan alınan sinyal görüntüsüne bakıldığında, reaksiyonun başarılı olduğu, belli bir bölge büyütüldüğünde her bir pikotitre kuyudan gelen sinyal görüntüsünün çoğunluğunun yeşil renkte olduğu ve pirosekanslamanın başarılı olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.11). Reaksiyon uzunluklarını gösteren rapor ise Şekil 4.12’de gösterilmektedir.



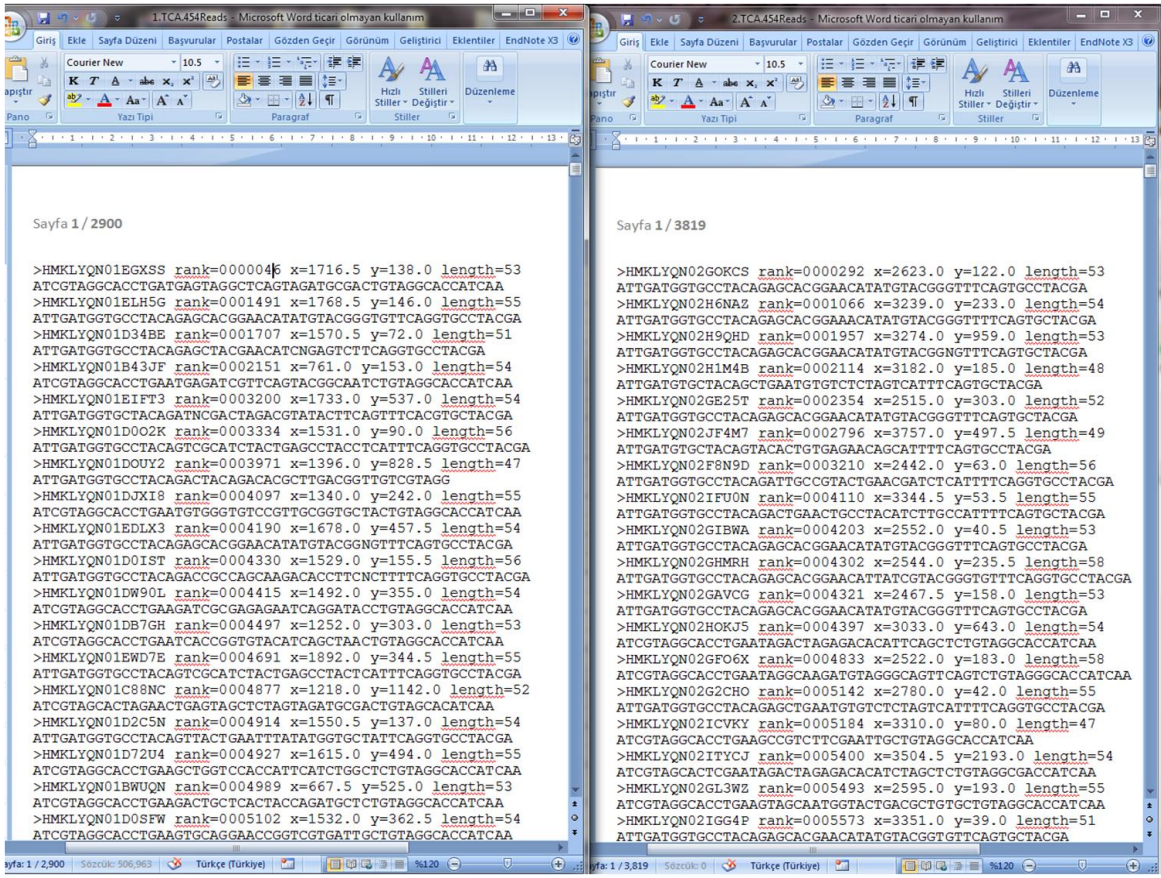


**Şekil 4.11.** Pirosekanslama sonrası pikotitre plakadan alınan sinyal görüntüsü. Sol panel tüm plakayı, sağ panel ise kuyucuk rezolüsyonunda görüntüyü kapsamaktadır. Yeşil daireler başarılı reaksiyonları, mor ve mavi olanlar ise sinyal alınamayan ve başarısız dizilere karşılık gelmektedir.



**Şekil 4.12.** GS FLX reaksiyon raporu. Reaksiyon uzunluklarına bakıldığında 50 bp civarındaki dizilerin çokluğu -ki miRNAom çalışması olduğu için beklenen sonuçtur-görülmektedir.

GS FLX cihazından işlenecek olan data iki word dosyası halinde alınmıştır, cihaz her bölgede okunan veri için bir dosya üretir. Veriler FASTA formatındadır. Bu tez çalışmasında iki bölgeyi pikotitre plaka kullanıldığı için veriler 1.TCA.454Reads ve 2.TCA.454Reads olmak üzere iki word dosyası halinde alınmıştır. Dosyaların genel görünümü Şekil 4.13’de görülmektedir. Oosit verileri 2900 sayfa iken erken evre embriyo verileri 3819 sayfa tutmaktadır.



Şekil 4.13. Oosit ve erken embriyo ham verisi (sırasıyla soldan sağa)

İki tarafta bulunan linker sekanslar da ham veride bulunduğu için anotasyondan önce ham verinin işlenmesi gerekmektedir. Şekil 4.14’te pirosekanslama için kullanılan linker diziler ve ham veride buldukları kısımlar görülmektedir. Hatırlanacağı üzere yaklaşık 20 bazçifti civarındaki miRNA bandı kesilmiş, iki ucuna MODBAN ve Chimer linkerleri takılmış ve aynı son BanI ve BanII primerleri ile amplifiye edildikten sonra 100 bazçifti civarındaki amplicon kütüphaneleri pirosekanslama için kullanılmıştır. Şekil 4.14’te

gösterildiği üzere, 5' ve 3' linkerlarda görülen üstü çizili kısımlar pirosekanslama verisinde yoktur çünkü enzim, kırmızı ile işaretli TCAG motifini takiben okuma yapmaya başlar. Dolayısıyla okunan diziler ortada miRNA, iki yanda da MODBAN ve Chimer dizilerini içermektedir.

5' linker- CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCGTAGGCACCTGAAA (42 bp) (banII,17bp)

3' linker- CTATCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATTGATGGTGCCTACAG (42 bp) (banI,17bp)

>HMKLYQN01EGXSS rank=0000046 x=1716.5 y=138.0 length=53

ATCGTAGGCACCTGATGAGTAGGCTCAGTAGATGCGACTGTAGGCACCATCAA

>HMKLYQN01ELH5G rank=0001491 x=1768.5 y=146.0 length=55

ATTGATGGTGCCTACAGAGCACGGAACATATGTACGGGTGTTTCAGGTGCCTACGA

**Şekil 4.14.** Pirosekanslamada kullanılan linker diziler ve ham veride yer aldıkları kısımlar (Alttaki veri oosit verisinin ilk iki sekansıdır. Dizinin pikotitre plaka üzerindeki lokasyonuna ait bilgiler, dizi uzunluğu görülmektedir ve iki taraftaki linker diziler koyu olarak işaretlenmiştir.)

miRNA anotasyonu yapılmadan önce linker diziler uzaklaştırılmış ve bazı istatistikler gerçekleştirilmiştir. Linker dizilerin temizlenmesi (trimming) işleminin gerçekleştirilebilmesi için **Perl** program dili kullanılarak yazılan bir script kullanılmış ve böylelikle FASTA formatındaki sekans dosyasında bulunan her bir sekansın baş ve son uçlarındaki linker sekanslar çıkartılarak sadece miRNA sekanslarını içeren yeni bir FASTA formatlı dosya elde edilmiştir. Şekil 4.15'te iki dosyanın da ilk sayfaları görülmekte, linker diziler temizlendikten sonra hangi diziden kaç adet bulunduğu gösterilmiştir.

Şekil 4.16'da ise anotasyon öncesi tüm veriyi özetleyen istatistikleri bulunduran rakamlar mevcuttur. Burada en popüler diziler, kaç dizinin işlendiği, kaç tanesinin linkerlarının temizlenemediği ve hangi diziden kaç adet olduğunun özeti yer almaktadır.



AGCACGGAAACATATGTACGGGTG	4094
TCGCATCTACTGAGCCTACCTCA	3415
TGAGGTAGGCTCAGTAGATGCGA	2617
ATTGCCGTACTGAACGATCTCA	1690
CACCCGTACATATGTTTCCGTGCT	1637
TCACCGGGTGTACATCAGCTAA	1334
TTAGCTGATGTACACCCGGTGA	1058
ACTGAACTGCCTACATCTTGCCA	1025
ATGAGTAACGGTTCTAGTCA	805
TTAGCTGATGTANACCCGGTGA	673
AGCACGGAAACATATGTACGGGTG	659
TGAGATCGTTTCAGTACGGCAAT	612
TTACATGTTTCCGGGTAGGAG	518
CACCGTACATATGTTTCCGTGCT	516
TGACTAGAACC GTTACTCAT	487
TGGCAAGATGTAGGCAGTTCAGT	444
AGCACGGAAACATATNTACGGGNG	443
TCACCGGTGTACATCAGCTAA	439
AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	416
TCAGCTATGCCAACATCTTGCC	324
CATGACACTGATTAGGGATGTGA	320
AGCTGAATGTGTCTCTAGTCA	314
TCGCATCTACTGAGCTACCTCA	313
TCAACGTGATATGGTCGTAAGC	302
TCACATCCCTAATCAGTGTCCANG	292
TTGCCGTACTGAACGATCTCA	264
TGGCGACCACGGCA	254
TGGCGACCACGGCAGGATTCGA	252
ACTGGCTTTACGATGATCTCA	229
AACATGGATAGGAGCTACGGGTA	222
AGCACGGAAACATATNTACGGGNG	215
CTCCTACCCGAAACATGTAA	208
ACTAGCTTTACGATGATCTCA	185
AGATGAGTAACGGTTCTAGTCA	174
CTATGCCAACATCTTGCC	173
AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	172
AGCTATGCCAACATCTTGCC	170
TGACTAGAGACATTTCAGCT	167
AACATGGATAGGAGCTACGGGA	159
CACCCGTACATATGTTTCCGTGCT	159
AGCACGGAAACAAATGTACGGGTG	159
GCTTACGACCATATCACGTTGA	158
TCGAAATCCTGCCGTGGTCGCCA	158
TTCAACGTGATATGGTCGTAAGC	156
TGCCGTGGTCGCCA	145
TCACATCCCTAATCAGTGTCCATG	144
TGGCGACCAGGACAGGACTCGA	136
GGCAAGATGTTGGCATAGCTGA	129
TGAGGTAGCTCAGTAGATGCGA	129
TCGCATCTACTGAGCCTACTCA	128
AGCACGGAAACATATGTACGGGTG	124
GGCAAGATGTTGGCATAG	123

AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	9416
CACCCGTACATATGTTTCCGTGCT	6747
AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	6726
ACTGAACTGCCTACATCTTGCCA	5050
AGCACGGAAACATATGTACGGGTG	4801
TGGCAAGATGTAGGCAGTTCAGT	3223
CACCCGTACATATGTTTCCGTGCT	3219
AGCACGGAAACATATNTACGGGGNG	3075
ACTGAAACTGCCTACATCTTGCCA	2240
ATTGCCGTACTGAACGATCTCA	1902
TCACCGGGTGTACATCAGCTAA	1731
AGCTGAAATGTGTCTCTAGTCA	1521
AGCTGAATGTGTCTCTAGTCA	1486
TGACTAGAGACACATTTCAGCT	1382
AGCACGGAAACATATNTACGGGGNG	1278
ACTGAAACTGCCTACATCTTGCCA	1028
CACCCGTACATATGTTTCCGTGCT	984
TGAGATCGTTCAGTACGGCAAT	795
CACGTTACAATGAAAGGGTAG	763
TGTGGGTGTCCGTTGCGGTGCTA	676
TTAGCTGATGTANACCCGGTGA	670
AGCACGGAAACATATGTACGGGTG	663
TTAGCTGATGTACACCCGGTGA	582
AGCACGGAAACATATGTACGGGTG	563
GTAGCAATGGTACTGACGCTGT	529
TTGCCGTACTGAACGATCTCA	520
CTCAGCGGAAACATTACGGGGA	390
CTGAAATGTGTCTCTAGTCA	370
TTAGCTGATGTACACCCGGTGA	339
CTCAGCGGAAACATTACGGGGTA	339
TGACTAGAACC GTTACTCAT	320
TCACCGGGTGGAAACTAGCAGT	317
TCACCGGGTGAATAATTCGCATG	307
CTGAAATGTGTCTCTAGTCA	303
ATGAGTAACGGTTCTAGTCA	301
TGGCAAGATGTAGGCAGTTCAGT	292
ACTGAACTGCCTACATCTTGCCA	290
TCACCGGGTGAATAATTCGCATG	289
TGACTAGAGACACATTTCAG	277
ACTGGCTTTTACGATGATCTCA	273
CACCGTACATATGTTTCCGTGCT	258
TAGCACCGCAACGGACACCCCA	242
TGAGATCGTTCAGTACGGCAA	240
AGCACGGAAACATATGTACGGGNG	240
TCACCGGGTGTAAATCAGCTTG	232
AGCACGGAAACATATNTACGGGGNG	226
AGCACGGAAACATATNTACGGGNG	220
ACAGCGTCAGTACCATTGCTAC	217
ACTGAACTGCCTACANCTTGCCA	212
ATTTGCCGTACTGAACGATCTCA	210
TACCCGTAATGTTTCCGTGAG	200
TCACCGGTGTACATCAGCTAA	198

Şekil 4.15. Linker diziler temizlenmesi sonrası istatistikler

(Sol panel oosit verisi, sağ panel erken evre embriyo verisi)



Average length of miRNA sequences: 20.97 bases		Average length of miRNA sequences:23.50	
# of sequences: 77582		# of sequences: 103128	
# of sequences that are filtered: 72315		# of sequences that are filtered: 98519	
Missing sequences: 5267 (6.79%)		Missing sequences: 4609 (4.47%)	
10 bases	45 times	10 bases	23 times
11 bases	130 times	11 bases	33 times
12 bases	273 times	12 bases	86 times
13 bases	456 times	13 bases	108 times
14 bases	1139 times	14 bases	329 times
15 bases	1585 times	15 bases	345 times
16 bases	2535 times	16 bases	374 times
17 bases	3417 times	17 bases	574 times
18 bases	5002 times	18 bases	1134 times
19 bases	5261 times	19 bases	1982 times
20 bases	8088 times	20 bases	2406 times
21 bases	8416 times	21 bases	7323 times
22 bases	15517 times	22 bases	13727 times
23 bases	14049 times	23 bases	18625 times
24 bases	8651 times	24 bases	17368 times
25 bases	2011 times	25 bases	21933 times
26 bases	713 times	26 bases	13598 times
27 bases	181 times	27 bases	2499 times
28 bases	51 times	28 bases	514 times
29 bases	37 times	29 bases	85 times
30 bases	13 times	30 bases	37 times
31 bases	6 times	31 bases	15 times
32 bases	3 times	32 bases	3 times
33 bases	1 times	33 bases	3 times
34 bases	1 times	34 bases	1 times
37 bases	1 times	36 bases	2 times
		56 bases	1 times
Total number of unique sequences: 31079		Total number of unique sequences: 10627	
The most popular sequences:		The most popular sequences:	
AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	4094	AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	9416
TCGCATCTACTGAGCCTACCTCA	3415	CACCCGTACATATGTTTTCCGGTGCT	6747
TGAGGTAGGCTCAGTAGTCGA	2617	AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	6726
ATTGCCGTAAGTGAACGATCTCA	1690	ACTGAACTGCCTACATCTTGCCA	5050
CACCCGTACATATGTTTTCCGGTGCT	1637	AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	4801
TCACCCGGGTGTACATCAGCTAA	1334	TGGCAAGATGTAGGCAGTTCAGT	3223
TTAGCTGATGTACACCCGGTGA	1058	CACCCGTACATATGTTTTCCGGTGCT	3219
ACTGAACTGCCTACATCTTGCCA	1025	AGCACGGAAACATATNTACGGGGNG	3075
ATGAGTAAACGGTCTAGTCA	805	ACTGAACTGCCTACATCTTGCCA	2240
TTAGCTGATGTANACCCGGTGA	673	ATTGCCGTAAGTGAACGATCTCA	1902
AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	659	TCACCCGGGTGTACATCAGCTAA	1731
TGAGATCGTTCAGTAGTCAAT	612	AGCTGAAATGTGTCTCTAGTCA	1521
TTACATGTTTTCCGGTAGGAG	518	AGCTGAAATGTGTCTCTAGTCA	1486
CACCGTACATATGTTTTCCGGTGCT	516	TGACTAGAGACACATTCAGCT	1382
TGACTAGAACCCTTACTCAT	487	AGCACGGGAAAACATATNTACGGGGNG	1278
TGGCAAGATGTAGGCAGTTCAGT	444	ACTGAACTGCCTACATCTTGCCA	1028
AGCACGGAAACATATNTACGGGGNG	443	CACCCGTACATATGTTTTCCGGTGCT	984
TCACCCGGGTGTACATCAGCTAA	439	TGAGATCGTTCAGTACGGCAAT	795
AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	416	CACGTTACAATGAAAGGGTAG	763
TCAGCTATGCCAACATCTTGCC	324	TGTGGGTGTCCGTTGCGGTGCTA	676
CATGACACTGATTAGGGATGTGA	320	TTAGCTGATGTANACCCGGTGA	670
AGCTGAAATGTGTCTCTAGTCA	314	AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	663
TCGCATCTACTGAGCTACCTCA	313	TTAGCTGATGTACACCCGGTGA	582
TCAACGTGATATGGTCGTAAGC	302	AGCACGGAAACATATGTACGGGGTG	563
TCACATCCCTAATCAGTGTCAAG	292	GTAGCAATGGTACTGACGCTGT	529
TTGCCGTAAGTGAACGATCTCA	264	TGCGCTACTGAACGATCTCA	520
TGGCGACCACGGCA	254	CTCAGCGGAAAACATTACGGGGGA	390
TGGCGACCACGGCAGGATTCGA	252	CTGAAATGTGTCTCTAGTCA	370
ACTGGCTTTCACGATGATCTCA	229	TTAGCTGATGTACACCCGGTGA	339
AACATGGATAGGAGCTACGGGTA	222	CTCAGCGGAAAACATTACGGGGTA	339

**Şekil 4.16.** Linker dizilerin temizlenmesi sonrası en popüler dizilerin sıralanması

(Sol panel oosit verisi, sağ panel erken evre embriyo verisi)

#### 4.5. Yeni Nesil Sekans Datasının MiRanalyzer Programı ile Analiz Sonuçları

Linker dizilerden temizlenen yeni nesil sekanslama datası miRanalyzer programı ile analiz edilmiştir (<http://bioinfo2.ugr.es/miRanalyzer/miRanalyzer.php>). Program arayüz görüntüsü Şekil 4.17'de görülmektedir. Mevcut miRBase sürümünde anote edilmiş miRNAları ve okuma sayılarını (read count) vermekle kalmayıp aday yeni miRNA dizilerini belirlemekte ayrıca farklı grupları da kıyaslayabilmektedir.

A microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments

Computational Genomics and Bioinformatics Group  
Universidad de Granada  
Contact us

Genome Analysis Platform  
CIC bioGUNE

[Restart](#)

[Tutorial and test Data](#)

[Differential Expression](#)

[Download](#)

[How to cite](#)

[FAQs](#)

Coming soon

Target genes and functional analysis

miRanalyzer news

12/02/2011: miRanalyzer version 0.2

12/02/2011: Prediction of target genes for differentially expressed new microRNAs

18/12/2010: miRanalyzer v2 (beta)

Queing & Execution		Parameters		Brief Summary					
Analysis completed		Species:	cel	Assembly:	ce	unique reads:	10627	read count:	103135
You can bookmark this page		Input:	arzuSelen	Mismatches (known):	1	filtered unique reads:	2105	filtered read count:	12568
Download all results in plain text here		Mismatches (libraries):	1	Mismatches (genome):	1	No. known microRNA	90	No. known microRNA*	—
		Score threshold:	0.9	Min. positives:	3	No. new microRNAs (not miRBase)	3	No. new microRNAs	52
		Type:	Full analysis	Solid		no unique reads (after known)	7820	read count (after known):	65043
						unique reads (after lib)	7801	read count (after lib):	65024
						unique reads matched	4607	read count matched:	50553
						unique reads not-matched	3194	read count not-matched:	14471

Mapping to known microRNA (miRBase 16)									
Library/Parameters	mature	ambiguous mature	mature-star	ambiguous mature-star	unobs. mature-star	ambiguos unobs. mature-star	hairpin	ambiguous hairpin	
No. microRNA	90	2	0	0	3	0	20	1	
fraction (number) of known microRNAs	24.5% (367)	---	0.0% (57)	---	1.8% (165)	---	9.0% (223)	---	
unique reads	630	8	0	0	4	0	59	4	
fraction of unique reads	7.4%	0.094%	0.000%	0.000%	0.047%	0.000%	0.692%	0.047%	
read count	25260	84	0	0	5	0	322	4	
fraction of read count	27.9%	0.093%	0.000%	0.000%	0.006%	0.000%	0.356%	0.004%	
links to detail pages	<a href="#">details</a>	<a href="#">details</a>	no results	no results	<a href="#">details</a>	no results	<a href="#">details</a>	<a href="#">details</a>	

Library/Parameters	RefSeq_genes	Rfam
number of unique reads	404	19
fraction of unique reads	4.74%	0.22%
number of reads	455	19
fraction of reads	0.50%	0.02%
Links	<a href="#">details</a>	<a href="#">details</a>

Predicted candidate microRNAs			
No. of read clusters:	4075		
No. of checked candidates:	1020		
No. new microRNAs :	52	Unique reads (read count):	696 (32280) <a href="#">details</a>
No. new microRNAs (trans filtered):	51	Unique reads (read count):	695 (32279) <a href="#">details</a>

Şekil 4.17. miRanalyzer programının rapor sayfası

Her iki pirosekanslama grubu miRanalyzer programına yüklenmiş ve "differential expression" analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu iki farklı örnekte tespit edilen miRNAlar ve okuma sayıları Çizelge 4.7’de görülmektedir. Oosit spesifik 84, erken evre embriyo için de 90 miRNA anote edilmiştir.

**Çizelge 4.7.** Yeni nesil sekanslama ile tespit edilen miRNAların okunma sayıları

miRNA adı	Oosit (okuma sayısı)	Embriyo (okuma sayısı)	Oosit/embriyo (oran)
cel-miR-124-3p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-124-5p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-2217-3p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-228-3p	0.00	6.67	0.00
cel-miR-233-3p	0.00	3.81	0.00
cel-miR-236-3p	0.00	3.81	0.00
cel-miR-2-3p	0.00	3.81	0.00
cel-miR-242	0.00	0.95	0.00
cel-mir-252	0.00	0.95	0.00
cel-miR-2-5p	0.00	3.81	0.00
cel-miR-35-5p	0.00	1.91	0.00
cel-miR-44-5p	0.00	14.30	0.00
cel-miR-46-5p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-49-3p	0.00	14.30	0.00
cel-miR-49-5p	0.00	1.91	0.00
cel-mir-51	0.00	0.95	0.00
cel-mir-54	0.00	2.86	0.00
cel-miR-54-3p	0.00	1.91	0.00
cel-miR-54-5p	0.00	4.77	0.00
cel-miR-56-5p	0.00	33.37	0.00
cel-miR-57-3p	0.00	5.72	0.00
cel-miR-61-5p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-62	0.00	21.93	0.00
cel-miR-67-3p	0.00	1.91	0.00
cel-miR-67-5p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-73-5p	0.00	6.67	0.00
cel-miR-74-5p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-75-5p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-792-3p	0.00	1.91	0.00
cel-miR-800-3p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-86-5p	0.00	0.95	0.00
cel-miR-90-5p	0.00	5.72	0.00
cel-miR-52-3p	5.24	1011.62	0.01
cel-miR-41-3p	7.34	417.62	0.02
cel-miR-42-3p	3.15	108.69	0.03
cel-miR-37-5p	63.98	726.54	0.09
cel-miR-44-3pcel-miR-45-3p	225.49	1833.51	0.12
cel-miR-46-3p	12.59	96.30	0.13
cel-miR-73-3p	486.65	3493.49	0.14
cel-miR-37-3p	39.85	273.64	0.15
cel-miR-52-5p	2075.59	10105.75	0.21
cel-miR-36-3p	72.37	343.25	0.21
cel-miR-55-3p	15.73	61.02	0.26

cel-miR-50-5p	25.17	95.35	0.26
cel-miR-35-3p	102.78	373.76	0.28
cel-miR-57-5p	6.29	21.93	0.29
cel-miR-228-5p	5.24	14.30	0.37
cel-miR-83-3p	7.34	17.16	0.43
cel-miR-229-5p	2.10	4.77	0.44
cel-miR-39-3p	127.95	268.88	0.48
cel-miR-74-3p	2.10	3.81	0.55
cel-miR-79-3p	1.05	1.91	0.55
cel-miR-65-5p	2.10	2.86	0.73
cel-miR-87-5p	2.10	2.86	0.73
cel-miR-47-3p	18.88	24.79	0.76
cel-miR-58-3p	895.68	1175.62	0.76
cel-miR-40-3p	1514.48	1916.46	0.79
cel-miR-229-3p	22.02	27.65	0.80
cel-miR-36-5p	43.00	51.49	0.84
cel-miR-60-3p	7.34	8.58	0.86
cel-miR-53-5p	125.86	137.30	0.92
cel-miR-87-3p	5.24	5.72	0.92
cel-miR-58-5p	10.49	10.49	1.00
cel-miR-1829b	1.05	0.95	1.10
cel-miR-244-5p	1.05	0.95	1.10
cel-miR-43-3p	1.05	0.95	1.10
cel-miR-51-3p	12.59	11.44	1.10
cel-miR-72-3p	2.10	1.91	1.10
cel-miR-72-5p	409.04	317.50	1.29
cel-miR-82-3p	109.08	71.51	1.53
cel-miR-66-5p	421.62	274.60	1.54
cel-miR-38-3p	7.34	4.77	1.54
cel-miR-65-3p	3.15	1.91	1.65
cel-miR-64-5p	5.24	2.86	1.83
cel-miR-56-3p	87.05	45.77	1.90
cel-miR-61-3p	721.58	370.90	1.95
cel-miR-80-3p	48.25	24.79	1.95
cel-miR-81-3p	87.05	40.05	2.17
cel-miR-1-3p	2.10	0.95	2.20
cel-miR-51-5p	148.93	56.25	2.65
cel-miR-795-5p	3.15	0.95	3.30
cel-miR-90-3p	3.15	0.95	3.30
cel-miR-47-5p	7.34	1.91	3.85
cel-miR-237-5p	4.20	0.95	4.40
cel-miR-253-3p	4.20	0.95	4.40
cel-miR-59-3p	13.63	2.86	4.77
cel-miR-34-5p	46.15	8.58	5.38
cel-miR-250-3p	6.29	0.95	6.60
cel-miR-70-3p	9.44	0.95	9.90
cel-miR-78	65.03	4.77	13.64
cel-lin-4-5p	44.05	1.91	23.10
cel-miR-48-5p	2824.44	43.86	64.40
cel-miR-246-3p	808.63	0.95	848.10
cel-let-7-5p	1.05	0.00	INF
cel-miR-1829c	1.05	0.00	INF
cel-miR-230-3p	2.10	0.00	INF
cel-miR-238-3p	6.29	0.00	INF
cel-miR-239a-3p	1.05	0.00	INF
cel-miR-239a-5p	2.10	0.00	INF
cel-miR-241-3p	5.24	0.00	INF
cel-miR-241-5p	44.05	0.00	INF



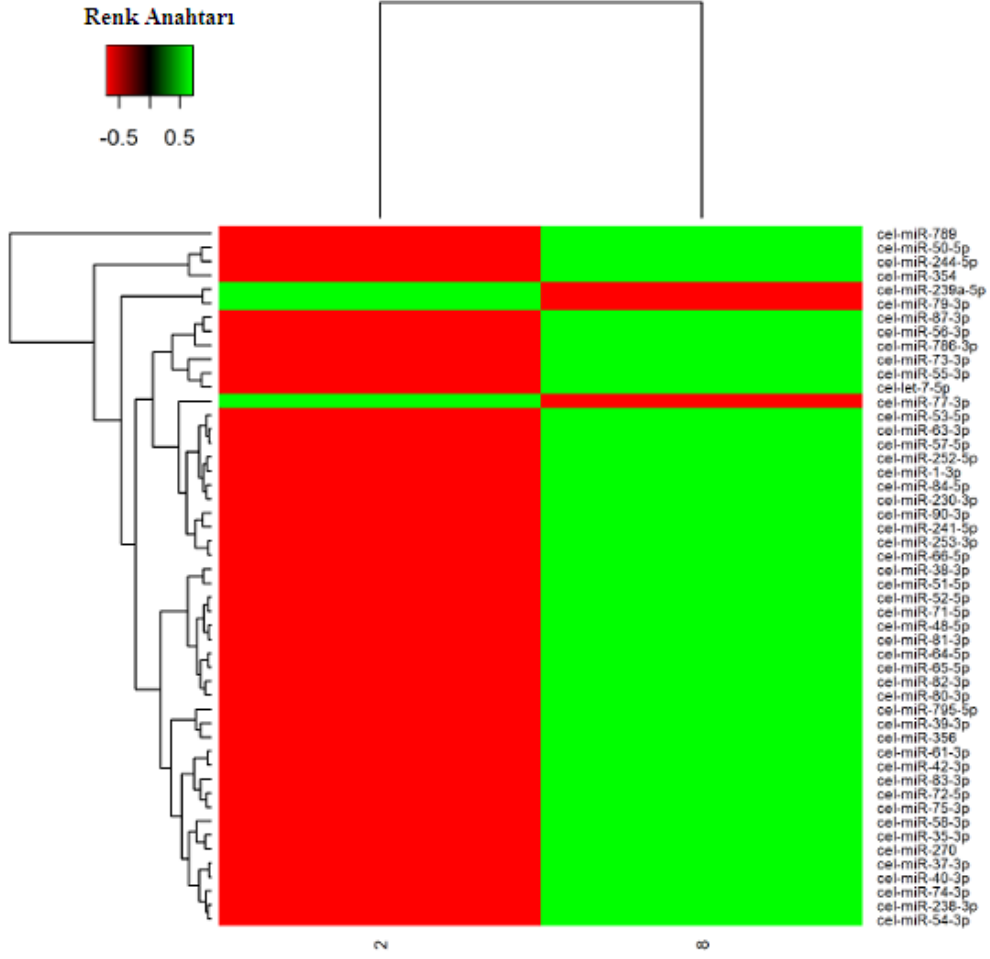
cel-mir-253	1.05	0.00	INF
cel-miR-41-5p	2.10	0.00	INF
cel-miR-4816-3p	1.05	0.00	INF
cel-miR-4936	2.10	0.00	INF
cel-miR-4937	1.05	0.00	INF
cel-miR-5592-3p	11.54	0.00	INF
cel-miR-5592-5p	7.34	0.00	INF
cel-mir-64	1.05	0.00	INF
cel-miR-71-5p	11.54	0.00	INF
cel-miR-77-3p	4.20	0.00	INF
cel-miR-77-5p	1.05	0.00	INF
cel-miR-786-3p	4.20	0.00	INF
cel-miR-794-5p	1.05	0.00	INF
cel-miR-81-5p	1.05	0.00	INF
cel-miR-84-3p	3.15	0.00	INF
cel-miR-84-5p	2.10	0.00	INF
cel-miR-85-3p	1.05	0.00	INF

#### 4.6. Exiqon MikroRNA Mikroarray Sonuçları

*C.elegans*'ta zigotik genom aktivasyonu 4 blastomer aşamasında gerçekleşmekte ve zigotik genom aktivasyonu öncesi ve sonrası farklı ifade edilen miRNAları tanımlamak için Exiqon firmasından miRNA mikroarray hizmeti alınmıştır. N2 suşundan 2 ve 8 blastomer embriyolar toplanmış, total RNA izole edilmiş, Agilent Bioanalyzer cihazında RNA bütünlüğü kontrol edilmiş ve RIN değerleri 8'in üzerinde çıktığı için mikroarray hizmeti için kullanılmaya uygun olduklarına karar verilmiştir. Kuru buzda her örnekten 2.5 µg total RNA Danimarka'ya yollanmıştır. Örnekler miRCURY LNA microRNA Hi-Power labelling kit ile Hy3/Hy5 ile işaretlenmiş ve miRCURY LNA microRNA Other Species Array (v11)'e hibridize edilmiştir. Hibridizasyon ve data analizi Exiqon tarafından gerçekleştirilmiş ve sonuçta 2 ve 8 blastomer arasında farklı ifade gösteren 19 miRNA Şekil 4.18'de gösterilmiştir (log fold change>0.58). Şekil 4.19'da listede en yüksek farklılık gösteren 50 miRNA'nın normalize log oran değerleri kullanılarak oluşturulan heat map gösterilmektedir. 2 ve 8 hücreli *C. elegans* embriyolarında analiz edilen farklılık gösteren mikroRNAlar Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Prob no.	Anotasyon	Ortalama Hy3	2	8	log FC
49022	cel-miR-789	12.843	-2.052	-0.036	2.016
50463	cel-miR-64-5p	8.908	-0.720	0.300	1.021
49676	cel-miR-65-5p	8.482	-0.701	0.267	0.968
49675	cel-miR-80-3p	9.175	-0.754	0.175	0.929
50164	cel-miR-71-5p	8.742	-0.645	0.244	0.889
50229	cel-miR-82-3p	8.620	-0.686	0.194	0.881
49507	cel-miR-51-5p	7.874	-0.822	0.055	0.877
48920	cel-miR-52-5p	8.022	-0.612	0.259	0.871
50247	cel-miR-38-3p	9.710	-0.739	0.095	0.834
49707	cel-miR-73-3p	6.396	-0.414	0.413	0.827
50293	cel-miR-81-3p	8.641	-0.608	0.187	0.795
50055	cel-miR-48-5p	8.105	-0.581	0.190	0.770
49055	cel-miR-356	6.322	-0.848	-0.187	0.661
49250	cel-miR-35-3p	8.754	-0.648	-0.001	0.647
50288	cel-miR-40-3p	8.358	-0.592	0.030	0.622
50226	cel-miR-37-3p	8.685	-0.571	0.038	0.609
50385	cel-miR-270	6.263	-0.677	-0.071	0.606
49206	cel-miR-238-3p	7.289	-0.510	0.084	0.594
49635	cel-miR-55-3p	7.482	-0.288	0.295	0.583

**Şekil 4.18.** 8 blastomerli *C.elegans* embriyolarında 2 blastomerlilere kıyasla artış gösteren 19 miRNA. (Hy3: referans işaret) Logaritmik ifade seviyesi 0.58'den büyük olan, ifade farklılığı gösteren mikroRNAlar listelenmiştir.



**Şekil 4.19.** En yüksek farklılık gösteren 50 miRNA'nın gruplandırılması. Her satır bir miRNA'yı her kolon bir örneği göstermektedir. Yeşil renk, referans RNA'ya göre ifadesi yüksek olan miRNA'ları, kırmızı ise ifadesi daha düşük olan miRNA'ları göstermektedir.

**Çizelge 4.8.** Exiqon mikroarray ile analiz edilen miRNAların 2 ve 8 blastomerli embriyolar arasındaki ifade farklılıkları

<i>miRNA adı</i>	<i>2 blastomer</i>	<i>8 blastomer</i>	<i>logFC 2/ 8</i>
cel-miR-79-3p	-0.16	-0.68	1.43
cel-miR-239a-5p	-0.23	-0.61	1.29
cel-miR-77-3p	-0.14	-0.27	1.09
cel-miR-47-3p	0.21	0.16	1.04
cel-miR-237-5p	-0.23	-0.28	1.04
cel-miR-272	0.32	0.31	1.01
cel-miR-46-3p	-0.04	-0.02	0.99
cel-miR-34-5p	-0.01	0.03	0.98
cel-miR-36-3p	-0.40	-0.36	0.97
cel-miR-1824-5p	0.66	0.72	0.96
cel-miR-60-3p	-0.24	-0.16	0.95
cel-miR-85-3p	-0.19	-0.11	0.94
cel-miR-229-5p	-0.14	-0.05	0.94
cel-miR-44-3p/cel-miR-45-3p	-0.37	-0.25	0.93
cel-miR-786-3p	0.01	0.17	0.90
cel-miR-61-3p	-0.43	-0.27	0.89
cel-miR-354	0.22	0.39	0.89
cel-miR-244-5p	0.33	0.50	0.89
cel-miR-253-3p	-0.26	-0.08	0.89
cel-miR-63-3p	-0.12	0.06	0.88
cel-miR-42-3p	-0.47	-0.28	0.88
cel-miR-66-5p	-0.29	-0.09	0.87
cel-miR-83-3p	-0.36	-0.16	0.87
cel-miR-57-5p	-0.15	0.06	0.87
cel-miR-50-5p	0.39	0.61	0.86
cel-miR-53-5p	-0.12	0.11	0.85
cel-miR-84-5p	-0.20	0.04	0.85
cel-miR-1-3p	-0.17	0.08	0.84
cel-miR-230-3p	-0.26	0.06	0.80
cel-miR-252-5p	-0.19	0.13	0.80
cel-miR-75-3p	-0.46	-0.13	0.79
cel-miR-90-3p	-0.32	0.03	0.78
cel-miR-87-3p	-0.04	0.32	0.78
cel-miR-72-5p	-0.46	-0.07	0.76
cel-miR-795-5p	-0.73	-0.33	0.76
cel-miR-58-3p	-0.58	-0.17	0.75
cel-let-7-5p	-0.24	0.19	0.74
cel-miR-56-3p	-0.13	0.31	0.74
cel-miR-241-5p	-0.42	0.03	0.73
cel-miR-39-3p	-0.72	-0.20	0.70
cel-miR-74-3p	-0.45	0.09	0.69
cel-miR-54-3p	-0.51	0.05	0.68
cel-miR-55-3p	-0.29	0.30	0.67
cel-miR-238-3p	-0.51	0.08	0.66
cel-miR-270	-0.68	-0.07	0.66
cel-miR-37-3p	-0.57	0.04	0.66

cel-miR-40-3p	-0.59	0.03	0.65
cel-miR-35-3p	-0.65	0.00	0.64
cel-miR-356	-0.85	-0.19	0.63
cel-miR-48-5p	-0.58	0.19	0.59
cel-miR-81-3p	-0.61	0.19	0.58
cel-miR-73-3p	-0.41	0.41	0.56
cel-miR-38-3p	-0.74	0.09	0.56
cel-miR-52-5p	-0.61	0.26	0.55
cel-miR-51-5p	-0.82	0.06	0.54
cel-miR-82-3p	-0.69	0.19	0.54
cel-miR-71-5p	-0.65	0.24	0.54
cel-miR-80-3p	-0.75	0.17	0.53
cel-miR-65-5p	-0.70	0.27	0.51
cel-miR-64-5p	-0.72	0.30	0.49
cel-miR-789	-2.05	-0.04	0.25

#### **4.6. Maternal RNAların Yıkımından Sorumlu Olabilecek MikroRNAların Belirlenmesi**

*C.elegans*'ta maternal RNA yıkımında mikroRNAların rolü olup olmadığını anlamak için elde edilen iki veri birikimi kıyaslanmıştır. Yeni nesil sekanslama verisi ile miRNAlar oositten gelen yani maternal ve erken evre embriyonik olarak gruplandırılırken, mikroarray verisi de zigotik genom aktivasyonu öncesi ve sonrası olarak sınıflandırılmıştır. Yüzlerce miRNA hem bu iki veri setinde, hem de literatürdeki diğer çalışmalarla kıyaslanmış ve Çizelge 4.9'da daha ileri analizlerde kullanılabilir miRNA listesi bulunmaktadır.

Yeni nesil sekanslama ve mikroarray verilerimize göre totipotensi ile ilgili ve maternal yüklenen başlıca miRNAlar şunlardır: cel-miR-48-5p, lin4-5p, cel-miR-246-3p, cel-miR-241-5p. Öte yandan zigotik genom aktivasyonunu takiben artan zigotik miRNAlar ise cel-miR-52-3p, cel-miR-52-5p, cel-miR-37-3p, cel-miR-46-3p, cel-miR-42-3p, cel-miR-73-3p, cel-miR-55-3p, cel-miR-35-3p'dir.

**Çizelge 4.9.** İleri analizlerde kullanılmak üzere seçilen miRNA listesi

<i>miRNA adı</i>	<i>Yeni Nesil Sekanslama</i>				<i>miRNA Mikroarray</i>		
	<i>oosit</i>	<i>embriyo</i>	<i>oosit/embriyo</i>	<i>embriyo/oosit</i>	<i>2blastomer</i>	<i>8blastomer</i>	<i>logFC 2/8</i>
Cel_miR_52_3p	5.24	1011.62	0.01	192.91	---		
Cel_miR_52_5p	2075.59	10105.75	0.21	4.87	-0.61	0.26	0.87
Cel_miR_239a_5p	2.10	0.00	Inf	0.00	-0.23	-0.61	0.37
Cel_miR_48_5p	2824.44	43.86	64.40	0.02	-0.58	0.19	-0.77
Cel_lin-4_5p	44.05	1.91	23.10	0.04	---		
Cel_miR_71_5p	11.54	0.00	Inf	0.00	-0.65	0.24	-0.89
Cel_miR_241_5p	44.05	0.00	Inf	0.00	-0.42	0.03	-0.45
Cel_miR_59_3p	13.63	2.86	4.77	0.21	-0.42	-0.55	0.13
Cel_miR_237_5p	4.20	0.95	4.40	0.23	-0.23	-0.28	0.05
Cel_miR_51_5p	148.93	56.25	2.65	0.38	-0.82	0.06	-0.88
Cel_miR_64_5p	5.24	2.86	1.83	0.55	-0.72	0.30	-1.02
Cel_miR_56_5p	0.00	33.37	0.00	Inf	0.28	0.50	-0.22
Cel_miR_37_3p	39.85	273.64	0.15	6.87	-0.57	0.04	-0.61
Cel_miR_46_3p	12.59	96.30	0.13	7.65	-0.04	-0.02	-0.01
Cel_miR_42_3p	3.15	108.69	0.03	34.55	-0.47	-0.28	-0.19
Cel_miR_1829b	1.05	0.95	1.10	0.91	0.11	-0.03	0.14
Cel_miR_246_3p	808.63	0.95	848.10	0.00	0.03	0.05	-0.02
Cel_miR_82_3p	109.08	71.51	1.53	0.66	-0.69	0.19	-0.88
Cel_miR_79_3p	1.05	1.91	0.55	1.82	-0.16	-0.68	0.52
Cel_miR_73_3p	486.65	3493.49	0.14	7.18	-0.41	0.41	-0.83
Cel_miR_55_3p	15.73	61.02	0.26	3.88	-0.29	0.30	-0.58
Cel_miR_35_3p	102.78	373.76	0.28	3.64	-0.65	0.00	-0.65

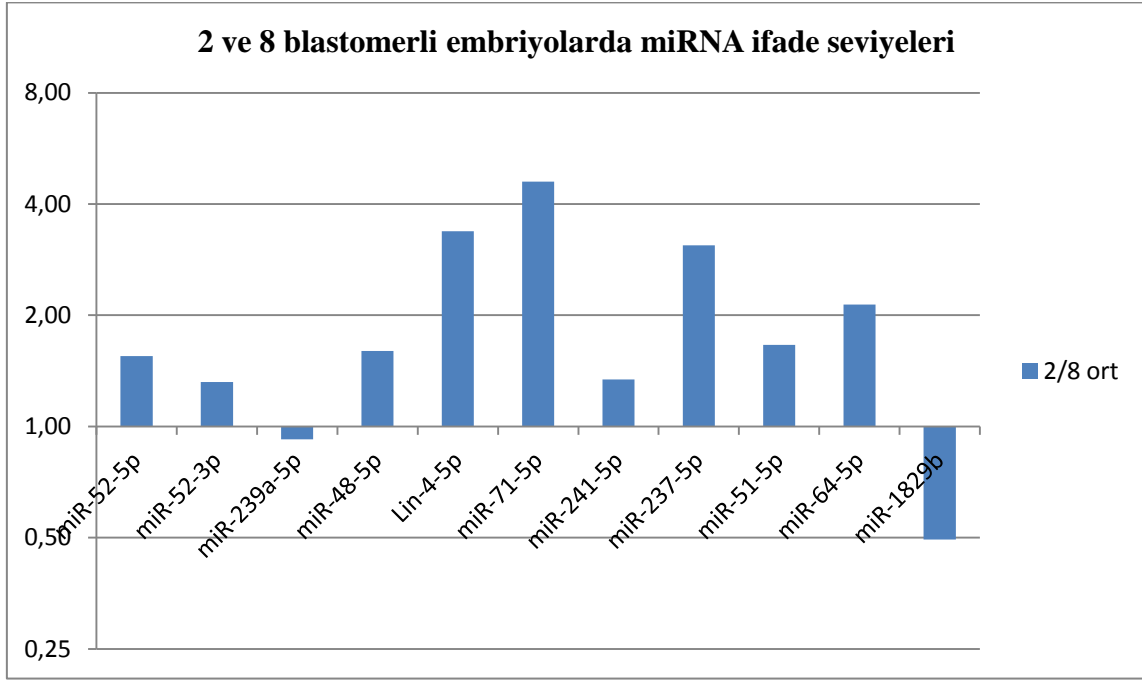
#### 4.7. QRT-PCR Sonuçları

Çizelge 4.9'da seçilen miRNAlardan bazıları için 3 biyolojik tekrarlı gerçekleştirilen qRT-PCR deney sonuçları, Cp değerleri EK 2'de verilmiştir. EK 3'de ise U18 ile normalize edilmiş Cp değerleri bulunmaktadır.

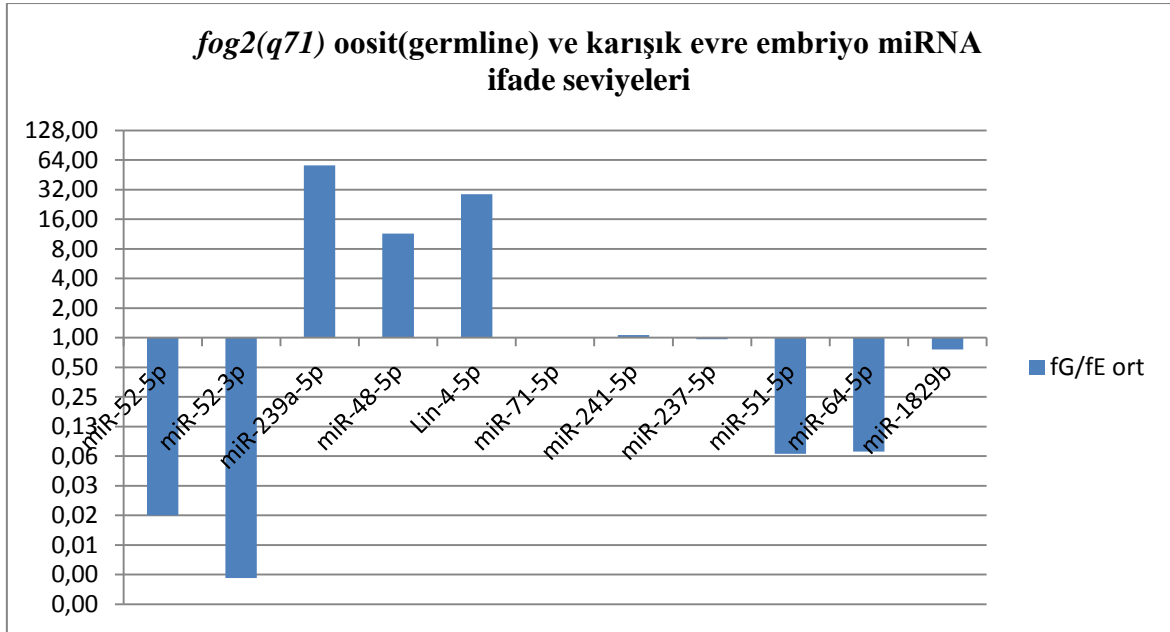
Şekil 4.20'de toplu olarak QRT-PCR ile analiz edilen N2 2 ve 8 hücreli embriyolardaki miRNAların, Şekil 4.21'de ise *fog-2(q71)V* oosit ve embriyolarındaki mikroRNAların arasındaki ifade farklılıkları analiz sonuçları grafik üzerinde yer almaktadır. Bu grafiklerin standart sapmayı da gösteren formları Ek 4'te yer almaktadır. Daha detaylı analiz edilen bir kaç örnek miRNA'nın ifade seviyeleri ise Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te gösterilmiştir.

Yeni nesil sekanslama verilerimize göre lin-4-5p ve miR-48-5p maternal ifade olmaktadır, yani oositte ifadesi yüksekken embriyoda düşmüştür. Şekil 4.22'de 2 ve 8 blastomerli embriyolar ile gastrula öncesi erken evre embriyolardan elde edilen QRT-PCR sonucu bu miRNAların 2 blastomerli embriyolarda 8 blastomerli embriyolara göre yüksek olduğu, karışık evre embriyolara kıyaslandığında ise hem 2 blastomerde hem 8 blastomerde ifadesinin azaldığı görülmektedir.

Şekil 4.23'te ise miR-239a'nın QRT-PCR ile analiz edildiğinde maternal olduğu görülmektedir, Pirosekanslamada okuma sayısı düşük çıkmasına karşın, mikroarray verisinden dolayı aday olarak seçilmiş ve QRT-PCR sonucu bu iki veri setini de doğrulamıştır. miR-52-5p ve miR-52-3p erken embriyoda yüksektir ve pirosekanslama verisini doğrulamaktadır. Öte yandan miR-51-5p 'nin QRT-PCR ile de artması mikroarray verisini doğrulamaktadır.

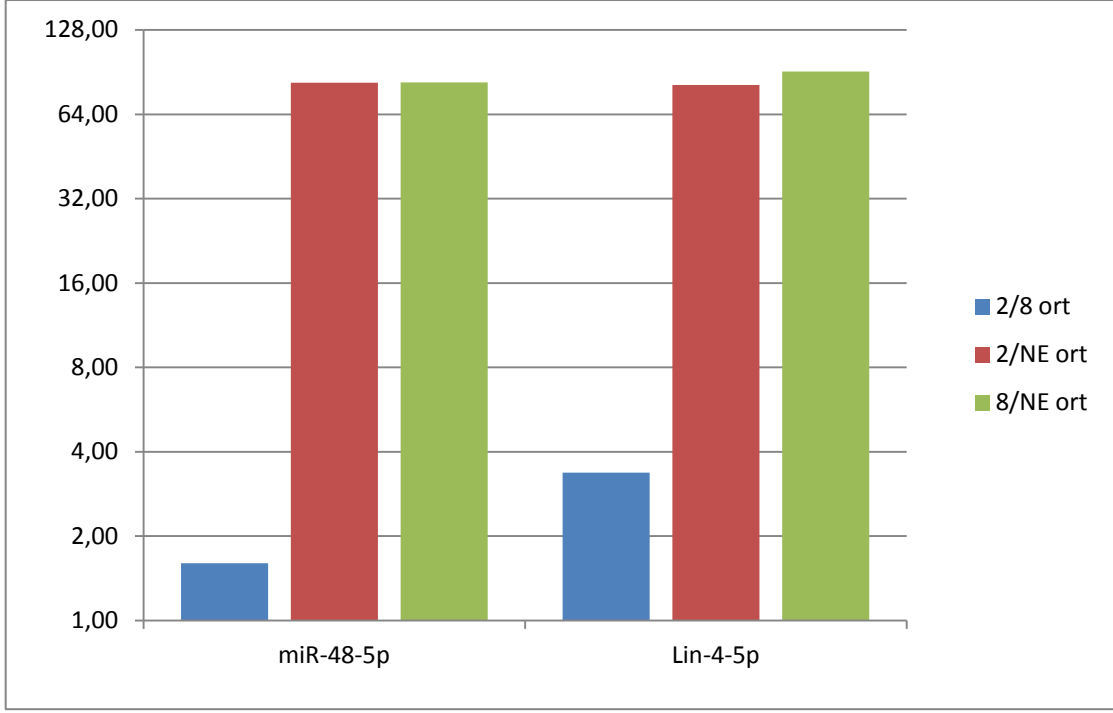


**Şekil 4.20.** Üç biyolojik tekrarlı N2 2 ve 8 blastomerli embriyolar için seçilen miRNAların QRT-PCR sonucu

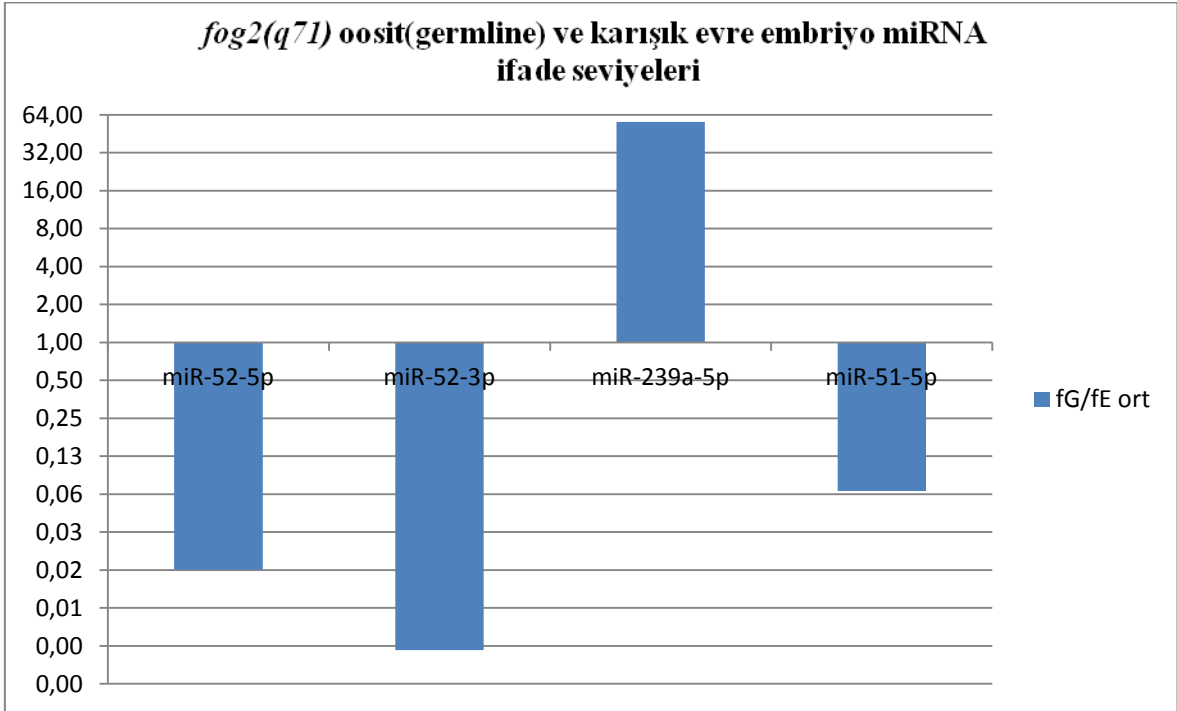


**Şekil 4.21.** İki biyolojik tekrarlı *fog-2(q71)* oosit (germline) ve embriyolarından seçilen miRNAlar için QRT-PCR sonucu





**Şekil 4.22.** miR-48-5p ve lin-4-5p ifade seviyelerinin 2,8 ve (NE) erken evre karışık N2 *C.elegans*'ta QRT-PCR ile analizi



**Şekil 4.23.** Dört farklı miRNAnın QRT-PCR ile oosit ve embriyolarda ifade seviyesi analizi

#### 4.8. miRNAlar Tarafından Hedeflenen mRNAların *In Silico* Tayini

Çizelge 4.9'da seçilen miRNAların bazılarının hedef mRNAlarını belirlemek için microRNA.org web veri tabanı kullanılmıştır. Bir miRNAnın yüzlerce mRNA'yı regüle edebileceği ve bir transkriptin onlarca miRNA tarafından regüle edilebileceği bilinmektedir. Görüldüğü üzere bir miRNA yüzlerce geni potansiyel olarak regüle edebilmektedir. Daha detaylı incelendiğinde microRNA.org web yazılımı sayesinde ilgili mikroRNAnın hedef transkript ile eşleştiği kısımlar, komplementerite derecesi ve aynı bölgeye bağlanabilen diğer mikroRNAlar da görülmektedir (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25). Şekil 4.24'te miR-52-5p'nin 508 adet potansiyel mRNA hedefi olduğu görülmektedir. Öte yandan Şekil 4.25'te ise miRNAnın hedef transkriptteki bağlanma bölgesi görülmektedir.

microRNA.org web yazılımı Ağustos 2010 versiyonunu henüz güncellemediği için önemi daha çok son yıllarda anlaşılan miRNA-3p'lerin hedef mRNAlarının tayininde eksiklikler bulunmaktadır.

Şekil 4.26'da miRNAlar tarafından hedeflenen mRNAların microRNA.org Ağustos 2010 sürümü ile *in silico* tayini kısmi görüntüsü bulunmaktadır.

mikroRNAların hedeflediği mRNAların Genecodis 3.0 veritabanı ile gerçekleştirilmiştir. Program, hedef mRNAların yüklenmesinin ardından o mikroRNAnın hedeflerinin diğer mikroRNAlarla olan ilişkisini, moleküler fonksiyonunu, hangi yolaklarda etkili olduğunu, hücresel bileşenlerini gösterebilmektedir. Aynı yolakta etkili gen sayısını grafiklerle de gösterebilmektedir.



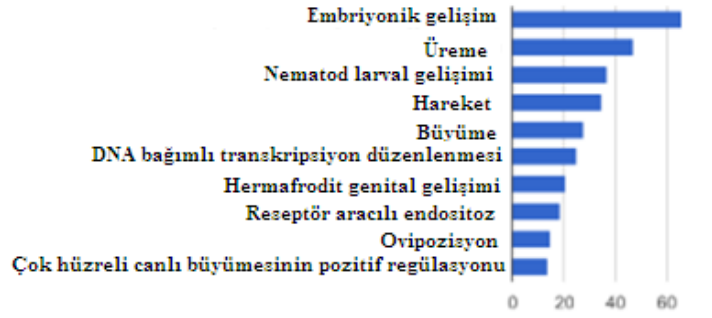
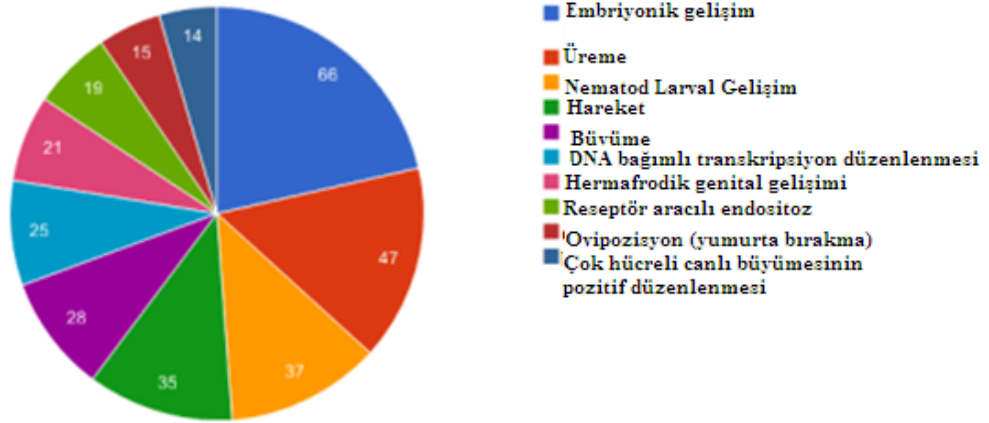
1	Ce_miR_52_5p	Ce_miR_239a_5p	Ce_miR_48_5p	Ce_lin-4_5p	Ce_miR_71_5p	Ce_miR_241_5p	Ce_miR_237_5p	Ce_miR_51_5p	Ce_miR_64_5p	Ce_miR_56_5p
2	T12A2.3	F13H10.3	mt-1	B0491.6	odr-2	mt-1	B0491.6	odr-2	pps-1	odr-2
3	odr-2	R04D3.3	daf-16	let-502	etr-1	daf-16	let-502	H41C03.3	SR-famC	H41C03.3
4	H41C03.3	K11H12.3	daf-16	C37H5.6	T03F1.8	daf-16	C37H5.6	ZC376.7	C44B11.6	C06B3.6
5	ZC376.7	ZC449.4	daf-16	nhr-47	T03F1.8	daf-16	nhr-47	plx-1	F14F11.1	ZC376.7
6	plx-1	ZK154.6	dpy-2	T21C9.3	unc-5	dpy-2	T21C9.3	F55H12.3	nhr-137	plx-1
7	F55H12.3	F44E7.5	nipi-3	ZK1025.4	p1d-1	nipi-3	ZK1025.4	ZK154.6	ftt-2	F55H12.3
8	ZK154.6	sqv-1	cog-1	skr-21	C34D4.4	cog-1	skr-21	tag-256	DH11.5	ZK154.6
9	tag-256	nipi-3	vit-6	hlh-30	plx-2	vit-6	F11E6.3	F44E7.5	jmjd-2	tag-256
10	F44E7.5	nipi-3	F29B9.2	ptp-2	pmk-3	clp-7	hlh-30	sqv-1	K02G10.5	F44E7.5
11	unc-49	nhr-137	die-1	W01A11.7	pmk-3	col-170	ptp-2	lin-12	ccf-1	sqv-1
12	sqv-1	C05E11.7	ntl-3	unc-103	ser-1	jmjd-2	W01A11.7	lin-12	ttyh-1	lin-12
13	lin-12	T25B2.1	F32B5.6	ace-3	ZK792.4	Y17G7B.20	unc-103	cnd-1	nhr-14	lin-12
14	lin-12	F58B4.3	dod-6	twk-11	ZK792.4	F29B9.2	mlp-1	ZC123.4	tag-49	cnd-1
15	cnd-1	egl-36	unc-18	R12E2.1	rpn-12	die-1	ace-3	beta-transducin	abl-1	ZC123.4
16	ZC123.4	tag-93	K04H4.2	K09E4.2	fm-2	ntl-3	twk-11	T06A1.5	K10C9.1	beta-transducin
17	beta-transducin	cyc-2.1	Y39G10AR.18	Y97E10AR.1	ZK643.3	F32B5.6	K09E4.2	nrx-1	M02E1.1	T06A1.5
18	T06A1.5	ZK355.2	sptl-3	Y18D10A.1	dpy-2	unc-18	Y97E10AR.1	T14G10.7	ulp-1	nrx-1
19	nrx-1	myo-3	scpl-3	ttr-37	T07C12.12	Y39G10AR.18	Y18D10A.1	egl-5	M04G7.3	T14G10.7
20	T14G10.7	acl-5	ceh-18	B0286.1	flp-24	C24A3.2	ttr-37	unc-43	hrpf-1	egl-5
21	egl-5	hif-1	H04M03.3	Y82E9BR.16	F26G1.5	ceh-18	B0286.1	gly-20	cyc-2.1	unc-43
22	unc-43	gln-3	F35G12.2	D1009.3	sqv-1	prl-1	Y82E9BR.16	Y87G2A.11	C47G2.5	T03D3.5
23	phospholipase	C46C11.1	col-167	Y43F4B.9	sqv-1	H04M03.3	D1009.3	tag-335	T14G10.7	gly-20
24	gly-20	B0395.2	nhr-4	F31D5.5	W05F2.4	F35G12.2	Y43F4B.9	C39E9.10	ZK355.2	Y87G2A.11
25	Y87G2A.11	Y54E10A.16	flh-1	T07C4.3	W05F2.4	cbd-1	F31D5.5	T10G3.1	W04B5.3	C39E9.10
26	C39E9.10	shn-1	sox-2	cct-6	W05F2.4	col-167	T07C4.3	K07A12.2	flp-27	T10G3.1
27	T10G3.1	F35G12.2	mod-1	C34D10.2	Y73E7A.3	nhr-4	fkf-1	tlp-1	unc-115	K07A12.2
28	K07A12.2	phat-4	rpl-22	C27D6.4	R10E11.6	flh-1	cct-6	K10D6.4	hid-1	tlp-1
29	tlp-1	T22B7.3	F45E4.3	T21C9.3	nipi-3	sox-2	C34D10.2	ugt-58	cpt-1	K10D6.4
30	K10D6.4	alfh-11	glr-4	Y62E10A.20	ifb-1	mod-1	C27D6.4	F16C3.2	his-2	ugt-58

Şekil 4.26. miRNAlar tarafından hedeflenen mRNAların microRNA.org Ağustos 2010 sürümü ile *in silico* tayini

Çalışmadaki mikroRNAların hedeflediği mRNAların Genecodis veritabanı ile yapılan yolak analizinde genel olarak yüklenen hedef genlerin %40-53'ünün belirli yollarda tanımlandığı görülmektedir (Çizelge 4.10). Program, hedef mRNAların yüklenmesinin ardından o mikroRNAnın hedeflerinin diğer mikroRNAlarla olan ilişkisini, moleküler fonksiyonunu, hangi yollarda etkili olduğunu, hücrenel bileşenlerini gösterebilmektedir. Aynı yolda etkili gen sayısını grafiklerle de göstermektedir. Şekil 4.27'de miR-48-5p hedeflerinin yolak analizi sonucunda kaç tane genin hangi süreçte etkili olduğunu gösteren pasta dilimi ve sütun grafiği gösterimi bulunmaktadır. Çalışılan miRNA hedeflerinin ilişkilendirildiği gen sayıları ve fonksiyonel oldukları biyolojik işlevler gruplarına göre Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Çalışılan mikroRNAlar için microRNA.org'da tespit edilen hedef mRNA sayısı ve Genecodis'te ilişkilendirilen mRNA sayısı

<i>mikroRNA Adı</i>	<i>microRNA.org'da tespit edilen hedef mRNA sayısı</i>	<i>Genecodis'te ilişkilendirilen mRNA sayısı</i>
Cel-miR-52-5p	364	143
Cel-miR-239a-5p	486	189
Cel-miR-48-5p	407	128
Cel-lin-4-5p	78	36
Cel-miR-71-5p	1853	552
Cel-miR-241-5p	461	147
Cel-miR-237-5p	84	37
Cel-miR-51-5p	327	130
Cel-miR-64-5p	707	256
Cel-miR-56-5p	357	137



**Şekil 4.27.** cel-miR-48-5p'nin hedef genlerinin Genocodis yolak analizi sonucunun pasta dilimi ve sütun grafiği gösterimi. Kaçhedef genin hangi biyolojik süreçlerde rol aldığını belirtmektedir.

**Çizelge 4.11.** Genecodis yolak analizine göre her bir miRNAnın regüle ettiği mRNAların ilgili olduğu biyolojik süreçler

<i>mRNAların etkili olduğu biyolojik süreçler</i>	<i>miR-52-5p</i>	<i>miR-239a-5p</i>	<i>miR-48-5p</i>	<i>Lin-4-5p</i>	<i>miR-71-5p</i>	<i>miR-241-5p</i>	<i>miR-237-5p</i>	<i>miR-51-5p</i>	<i>miR-64-5p</i>	<i>miR-56-5p</i>
<i>Embriyonik gelişim</i>	30	46	66		240	74	11		97	33
<i>Üreme</i>	23	36	47	10	197	55	11		66	27
<i>Hareket</i>	23		35	10	173	40	11	20	60	24
<i>Yumurta bırakma (oviposition)</i>	14	15	15		57	16		12		13
<i>Nematod larval gelişimi</i>		33	37	11	161	42	12		56	
<i>Büyüme</i>		32	28	7	115		8			
<i>Hermafrodit genital gelişimi</i>		32	21		78	23				
<i>Reseptör aracılı endositozis</i>			19			21				
<i>Yetişkin ömür uzunluğunun belirlenmesi</i>				8	73		9			
<i>Büyüme oranının pozitif düzenlenmesi</i>					110					
<i>Vücut morfogenezi</i>					84					
<i>DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu</i>			25			28				
<i>Vulva gelişimi</i>	6							6		7
<i>Hareketin pozitif regülasyonu</i>	8							7		
<i>Kuyruk morfogenezi</i>	8							7		7
<i>Hücre göçünün düzenlenmesi</i>	5							5		
<i>Vulval gelişimin düzenlenmesi</i>	5							5		5
<i>Asimetrik hücre bölünmesinin düzenlenmesi</i>	3							3		
<i>Çok hücreli canlı büyümesinin pozitif kontrolü</i>			14	4		16	4			
<i>Apoptotik Süreçler</i>				4			4			

<i>Hatching (embriyonun larva olarak açılması)</i>				2						
<i>Çok hücreli canlı büyümesinin regülasyonu</i>				2			2			
<i>Vulval gelişimin negatif regülasyonu</i>							13			
<i>Gelişimin düzenlenmesi, heterokronik</i>							2			
<i>Çok hücreli canlı büyümesi</i>								4		
<i>Oogenez</i>										
<i>Mitotik spindle organizasyonu</i>										
<i>Cinsiyet farklılaşması</i>										
<i>Embriyonik gelişim, üreme</i>									48	
<i>Embriyonik gelişim, nematod larval gelişim</i>									45	
<i>Embriyonik gelişim, hareket</i>									35	
<i>Nematod larval gelişimi, hareket</i>									32	
<i>Üreme, hareket</i>									30	
<i>Embriyonik gelişim, nematod larval gelişim, hareket</i>									27	
<i>Ovipozisyon, hareket</i>										9
<i>Hermafrodit genital bölge gelişimi, vulval gelişim düzenlenmesi</i>										4
<i>Hücre migrasyonunun regülasyonu, kanonikal wnt reseptör yolağı</i>										3
<i>Hücre migrasyonunun regülasyonu, vulvak gelişimin düzenlenmesi</i>										3
<i>Hermafrodit genital bölge gelişimi, vulval gelişimin düzenlenmesi, epitelyum doku morfogenezi</i>										3
<i>Embriyonik gelişim, ömür uzunluğunun belirlenmesi</i>				7						
<i>Erişkin ömür uzunluğunun belirlenmesi, nematod larval gelişim</i>				6						
<i>Embriyonik gelişim, erişkin ömür uzunluğunun belirlenmesi, nematod larval gelişim</i>				5						
<i>Embriyonik gelişim, erişkin ömür uzunluğunun belirlenmesi, üreme</i>				5						
<i>Embriyonik gelişim, erişkin ömür uzunluğunun belirlenmesi, hareket</i>				5						
<i>Embriyonik gelişim, erişkin ömür uzunluğunun belirlenmesi, üreme, apoptotik süreç</i>				4						



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyolojideki en karmaşık farklılaşmalardan birisi döllenmiş bir oositin totipotent (tam erkil) bir zigota dönüşmesidir. Bu esnada transkripsiyon durduğu için döllenme ve erken embriyonik bölünmeler, oogeneze sırasında sentezlenerek depolanan maternal RNA ve proteinlerle sağlanır. Oosit-embriyo geçişi sırasında kromatinin yeniden düzenlenmesi, epigenetik modifikasyonlar, maternal RNA ve proteinlerin yıkımı ve zigotik genom aktivasyonu gibi pek çok biyolojik süreç aynı anda gerçekleşir. Totipotent olan embriyonun farklılaşarak somatik hücreler de oluşturması için oosit sitoplazmasından gelen totipotentlik imzasının somatik blastomerlerde silinmesi gerekir. *Caenorhabditis elegans*'ta oosit sitoplazmasından gelen proteinlerin nasıl yıkıldığı bilinmemekte, ancak maternal RNAların nasıl yıkıldıkları bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında oosit ve zigotik genom aktivasyonu öncesi ve sonrası aşamadaki *C. elegans* erken embriyolarının “miRNAom” profilleri tanımlanmış ve oosit-embriyo geçişi sırasında rol alan aday mikroRNAlar belirlenmiştir.

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

Farklı canlılarda miRNAların maternal RNA yıkımına olan etkileri bilinmektedir. Zebra balığında embriyoda maternal RNA yıkımından miR-430 sorumludur, zigotik genom aktivasyonunu takiben miR-430 yüzlerce maternal transkriptin degradasyonunu düzenler (Giraldez *et al*, 2006). Zebra balığında oluşturulan maternal ve zigotik Dicer enzimi mutantlarında gastrulasyon ve beyin gelişiminde defektler gözlenmiştir. Sonradan embriyoya dışarıdan enjekte edilen miR-430'un bu hasarları giderdiği de tespit edilmiştir. Fare erken embriyogenezinde mikroRNAların maternal kalıtımının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, büyüyen oositte Dicer enziminin (mikroRNA biyogenezinde etkili

anahtar enzimdir) fonksiyonu engellendiğinde maternal mikroRNA kalıtımının olmadığı gözlenmekte ve mutant oositlerde hücre bölünmesi ve eksen oluşumunun gerçekleşmediği belirtilmektedir. Normal ve Dicer mutanlı oositler ile 8 blastomer evresine dek spesifik aşamalardaki embriyolarda gerçekleştirilen kapsamlı mikroRNA mikroarray profillemeye çalışmaları sonrası maternal genlerin direkt ya da dolaylı olarak mikroRNAlar tarafından kontrol edildiği, fare erken embriyogenezinin erken aşamaları için maternal mikroRNAların gerekliliği gösterilmiştir (Tang, Kaneda 2007).

*C. elegans* embriyogenez çalışmalarında avantajlı bir model sistemdir ve embriyogenezin doğru olarak anlaşılabilmesi için evreye özgü gen ifadesinin belirlenmesi önem taşımaktadır. *C. elegans*'ta zigotik genom aktivasyonu 4-blastomer aşamasında gerçekleşmektedir. Literatürde pek çok çalışmada farklı evrelerdeki *C. elegans* embriyolarının transkriptom seviyeleri ağırlıklı olarak mikroarray çalışmaları ile analiz edilmiştir. Ancak yeni nesil sekanslama ile bu analizleri gerçekleştirmek biraz daha zordur, çünkü bu tekniğin gerektirdiği başlangıç materyali için binlerce embriyo toplanması gerekmektedir. Söz konusu transkriptom değil de miRNAom olduğunda ise çok daha fazla sayıda embriyo toplanması gerekmektedir, literatürdeki çalışmalar PCR temelli tekniklerle gerçekleştirilmiştir. Evre spesifik embriyo toplamanın en yaygın yolu ise manuel olarak diseksiyondan sonra ağız pipeti ile tek tek stereomikroskop altında embriyoları toplamaktır. Bu sorunun üstesinden gelebilmek, spesifik aşamalardaki embriyoları toplamak için Stoeckius ve arkadaşları tarafından 2009 yılında eFACS (**E**mbryo **F**louresence **A**ctivated **C**ell **S**orting) metodu tasarlanmıştır eFACS ile 1-blastomerli embriyoda ifade olan GFP proteini sayesinde karışık evre embriyolardan 1-blastomerli embriyo ayrıştırılabilmektedir ve yeni nesil sekanslama ile embriyonik olarak ifade olan mikroRNAlar da dahil olmak üzere küçük RNAların ifadelerindeki değişiklikler belirlenmiştir (Stoeckius, Maaskola *et al.* 2009). Ancak yine de tam olarak zigotik genom aktivasyon öncesi ve sonrası evreler yoktur. Literatürdeki bu çalışmalar, bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçları kıyaslamak açısından bize yardımcı olmuştur.

Bu tez çalışmasında evre spesifik embriyolar tek tek ağız pipetlemesi ile elde edilmiştir. Yeni nesil sekanslama çalışmasında başlangıç materyalinin yüksek olması gerekliliği, mikroarray için, biyolojik tekrarlı doğrulama deneylerinde kullanılacak örnek materyalinin

sağlanması için onbinlerce embriyonun gerekliliği, çalışmanın zorlayan kısımlarını oluşturmuştur. N2 yabancı suştan elde edilen 2 ve 8 blastomerli embriyoların mikroarray ile, sperm üretmeyen ve döllenme olmadığı için olgun oosit sayısı germline'da oldukça yüksek sayıda olan *fog-2(q71)V* mutant *C. elegans* suşundan elde edilen oositlerin de yeni nesil sekanslama ile miRNAom profilleri belirlenmiştir. Böylece *C.elegans* oositlerinden (mitotik ve mayotik), zigotik genom aktivasyon öncesi erken embriyolardan (2 blastomer), zigotik genom aktivasyonu sonrası (8 blastomer) ve gastrula öncesi karışık evre erken embriyolarından elde edilen miRNAom profilleri analiz edilmiş ve literatür ile de kıyaslanmıştır. Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler miRBase'in yeni sürümü ile yapıldığı için veri setlerimizde bu süreçte rol alan yeni miRNAlar da tanımlanmıştır. İfadesi anlamlı olarak değişen miRNAlar daha ileri *in vitro* ve *in silico* analizler için seçilmiş, QRT-PCR yöntemi ile bu miRNAlardan bir kısmının ifade seviyeleri biyolojik tekrarlarla incelenmiş ve biyoinformatik veritabanları ile bu mikroRNAların hedef mRNAları ve rol oynadıkları yollar belirlenmiştir.

Özetle oosit-embriyo geçişinde rol oynayan miRNAları tanımlamayı hedefleyen bu tez çalışmasında;

- Elde edilen yeni nesil sekanslama verilerine göre maternal ifade edilen, yani oositte ifade edilip, embriyo geliştikçe ifadesi azalan, çoğunluğu totipotensi ilgili başlıca miRNAlar şunlardır: cel-miR-48-5p, lin4-5p, cel-miR-246-3p, cel-miR-71-5p, cel-miR-241-5p.

-Öte yandan zigotik genom aktivasyonunu takiben embriyoda artan başlıca zigotik miRNAlar ise cel-miR-52-5p, cel-miR-52-3p, cel-miR-37-3p, cel-miR-46-3p, cel-miR-42-3p, cel-miR-73-3p, cel-miR-55-3p, cel-miR-35-3p'dir.

**Cel-miR-52-3p**, yeni nesil sekans okuma sayısına göre embriyonik ifade olan bir miRNA'dır. Yeni nesil sekanslama sonucuna göre karışık evre erken embriyoda oosite göre 193 kat artış gözlenirken, bu sonuç ile tutarlı olan QRT-PCR datasına göre de embriyonik ifadesinde artış görülmektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.23). Mikroarray üzerinde ve 2009 yılında yapılan miRNA profil çalışmasında tespit edilmemiş olan bu miRNA'nın ileri analizleri gerçekleştirilecektir.

**Cel-miR-237-5p**, sekans dizisi lin-4'e çok benzemektedir. Fazla ifade olması durumunda gonad ve vulva gelişiminde anormallikler görüldüğü belirtilmiştir (Kerscher and Slack 2005), vulva ve gonadın normal gelişimi için gereklidir. Yeni nesil sekans sonuçlarına göre az okunma sayısına rağmen maternal görünen miR-237-5p, Stoeckius, 2009 miRNAom profillemesi çalışmasında sadece 1 kez, 1 hücreli embriyoda tespit edilmiştir. Mikroarray datasına göre ifade farklılığına göre 5. sırada yer almasından dolayı QRT-PCR ile ifade seviyesi kontrol edilmiş ve sonuçlar mikroarray datasını doğrulamış, zigotik genom aktivasyonu öncesi 2 blastomerli embriyoda daha fazla ifade olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.20). Literatürde varolan bilgilerin yanı sıra ileride yapılacak fonksiyonel analizler, miR-237-5p'nin erken embriyodaki fonksiyonunun aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

**Cel-miR-52-5p**, yeni nesil sekans okuma sayısına ve mikroarray datasına göre embriyonik ifade olan bir miRNA'dır. Bu sonuç literatürdeki mevcut bir çalışma (Stoeckius 2009) ile olduğu gibi, yapılan QRT-PCR deneyleri ile de uyumludur; embriyonik ifade seviyesinde artış görülmektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.23). miR-52'nin, *C. elegans* L1 larvasında en yüksek seviyede olduğu belirtilmesine rağmen gelişimin farklı aşamalarında da tespit edilmiştir. Biyokimyasal çalışmalar, miR-52'nin ribonükleoprotein kompleksleri ile etkileştiğini belirtmektedir (Lee ve Ambros 2001, Caudy *et al.*, 2003) mikroRNAlar ribonükleoprotein kompleksleri ile entegre olarak RISC kompleksi (RNA-induced silencing complex) oluşturmakta ve bu kompleks ile spesifik mRNAların translasyonel represyonu veya yıkımı gerçekleşmektedir.

**Cel-Lin-4-5p**, yeni nesil sekans okuma sayılarına göre maternal bir miRNA'dır. QRT-PCR sonuçları da bununla uyumlu çıkmıştır (Şekil 4.20; Şekil 4.22). Lin-4-5p önemli bir gelişimsel düzenleyicidir ve memeli ve *Drosophila*'da da miR-125 adı ile bilinmektedir.

**Cel-miR-48-5p (lin-58)**, elde ettiğimiz mikroarray verilerine göre 8-blastomer aşamasında, zigotik olarak biraz artış göstermesine karşın -ki bu literatür ile uyumludur (Literatürde 1 blastomerde yer alıp, 2-4 blastomerde yıkıldığı ve hemen sonrasında ifadesinin tekrar arttığı rapor edilmiştir. Stoeckius 2009)- gerçekleştirdiğimiz yeni nesil sekans çalışmasındaki okuma sayısına göre maternal ifade olduğu gözlenen Cel-miR-48-

5p'in maternal ifade edildiği, yapılan QRT-PCR deneyi ile de doğrulanmaktadır (Şekil 4.22). Cel-miR-48-5p (lin-58), miR-84 ve miR-241 ile birlikte let-7 ailesine ait bir mikroRNAdır. Aynı aileye ait olduğu bilinen bu mikroRNAların, elimizdeki yeni nesil sekans datasında hepsinin maternal artış gösteriyor olması da literatür ile elimizdeki verinin tutarlı olduğunu göstermektedir.

**Cel-miR-71-5p**, mikroarray sonucuna göre 2 ve 8 hücreli embriyolarda en yüksek ifade farklılığı gösteren ilk 5 mikroRNAdan biridir, yeni nesil sekanslama sonucuna göre maternal olan miR-71-5p'nin QRT-PCR sonucu da pirosekanslama datasını desteklemektedir (Şekil 4.20). *C. elegans* larval evrelerinde daha çok bulunduğu belirtilen bu miRNA'nın *C. elegans* ömür uzunluğunu arttırdığı, geç erişkin kurtlarda daha fazla bulunduğu, sıcaklık ve oksidatif strese dayanıklılık sağladığı belirtilmiştir (De Lencastre *et al.* 2010, Boulias and Horvitz 2012). Germline baskılanmasında etkili olduğu gösterilen miR-71'in bu şekilde ömür uzunluğunda artışa sebep olduğu belirtilmiştir. İleride gerçekleştirilecek olan fonksiyonel analizler, miR-71'in bu görevlerinin yanı sıra erken embriyodaki rolünün aydınlatılmasına da katkı sağlayacaktır.

**Cel-miR-241-5p**, yukarıda bahsedildiği üzere miR-48-5p (lin-58) ve miR-84 ile birlikte let-7 ailesine ait mikroRNAlardan biridir. Bu familyaya ait diğer miRNAlar gibi yeni nesil sekans okuma sayılarına göre ve literatürdeki *C. elegans* erken embriyo miRNAom profillemeye çalışmasına (Stoeckius 2009) göre maternal ifade olduğu, 2 blastomerli embriyoda yıkılıp postgastrulasyonda yeniden sentezlendiği görülmektedir. Ancak mikroarray verisinde 2 blastomere kıyasla 8 blastomerde ifadesinde artış gözlenmektedir. QRT-PCR sonucunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemektedir. 2007 yılında yapılan bir çalışmada, fare erken embriyolarının mikroRNA profillemesinde, let-7 ailesine ait mikroRNAların 1 ile 2 blastomer aşamasında yıkıldığı, 2 ile 4 blastomer aşamasında ise yeniden sentezlendiği belirtilmektedir (Tang 2007). Bu literatür bilgisi ile elimizdeki veriler birlikte değerlendirildiğinde, miR-241-5p'nin *C. elegans*'ta maternal olarak ifade olduğu ancak embriyogenezin ilerleyen aşamalarında yeniden sentezlenerek ifade edildiği öngörülmektedir.

**Cel-miR-239a-5p**, yeni nesil sekans ve mikroarray verilerine göre maternal ifade olan bir miRNA'dır. Bu sonuç QRT-PCR sonuçları ile de uyumludur (Şekil 4.21). Stoeckius ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı evre spesifik mikroRNA profillemesi çalışmasına göre ise, 1 blastomer aşamasında gözlenen miR-239a'nın devam eden birkaç bölünmede yıkıldığı ancak sonra ifade seviyesinin geç embriyogenezde yeniden yükseldiği gözlenmektedir. Fonksiyonu henüz net olarak bilinmeyen miR-239a-5p için ileride yapılması planlanan fonksiyonel analizler, erken embriyogenezdeki rolünün anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

**Cel-miR-51-5p**, yeni nesil sekans okuma sayısına göre maternal ifade olduğu gözlenen bu mikroRNA, mikroarray sonucuna ve literatürdeki *C. elegans* erken embriyo miRNAom profillemesi çalışmasına (Stoeckius 2009) göre embriyonik ifade edilmektedir. QRT-PCR ile 2 ve 8 blastomer arasındaki ifade seviyesinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir ancak oosit ve karışık evre erken embriyolar kıyaslandığında zigotik ifade profili sergilemektedir (Şekil 4.21, Şekil.23). Farklı biyolojik tekrarlar ile QRT-PCR tekrarlanmalıdır. miR-51-5p'nin fonksiyonu net değildir, ancak yapılan bir çalışmada mid-embriyoda varlığı tespit edilmiş ve geç embriyoda da bölgesel bir dağılım gösterdiği, ventralde ya da çoğunlukla anterior bölgede görülmesiyle dikkat çekmektedir. Geç embriyodan L1 larval evresine dek kanal hücrelerinde ve kanal sinirlerinde sinyal vermektedir. Ayrıca kafa kaslarında, barsakta da sinyal alınması bu mikroRNA'nın pek çok fonksiyonunun olduğuna işaret etmektedir. Bu bilgiler ışığında, ileride gerçekleştirilecek fonksiyonel analizlerde bu mikroRNA'nın incelenmesi, erken embriyodaki rolünün anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

**Cel-miR-64-5p**, mikroarray verilerine göre zigotik olarak ifade farklılığı gösteren en yüksek ikinci mikroRNA olması nedeniyle incelenmeye değer bulunmuştur. Yeni nesil sekans okuma sayısı çok düşük olmakla birlikte, literatürdeki *C. elegans* erken embriyo miRNAom profillemesi çalışmasına (Stoeckius 2009) göre de zigotik genom aktivasyonundan sonra ifadesinin arttığı görülmektedir. QRT-PCR sonuçlarına göre ise 2 ve 8 hücreli blastomerler kıyaslandığında mikroarraydeki gibi zigotik olduğu doğrulanamamıştır (Şekil 4.20). Ancak *fog-2(q71)V* oosit ve embriyo arasındaki ifade farklılığı bu miRNA'nın zigotik olduğunu göstermektedir. miR-64-5p'nin diğer türlerde ortoloğunun bulunmaması, embriyodan erişkinliğe pek çok aşamada bulunması ve

fonksiyonunun henüz bilinmemesi nedeniyle *C. elegans*'a özgü bir miRNA olmasının muhtemel oluşuyla ileri analizlerle değerlendirilecektir.

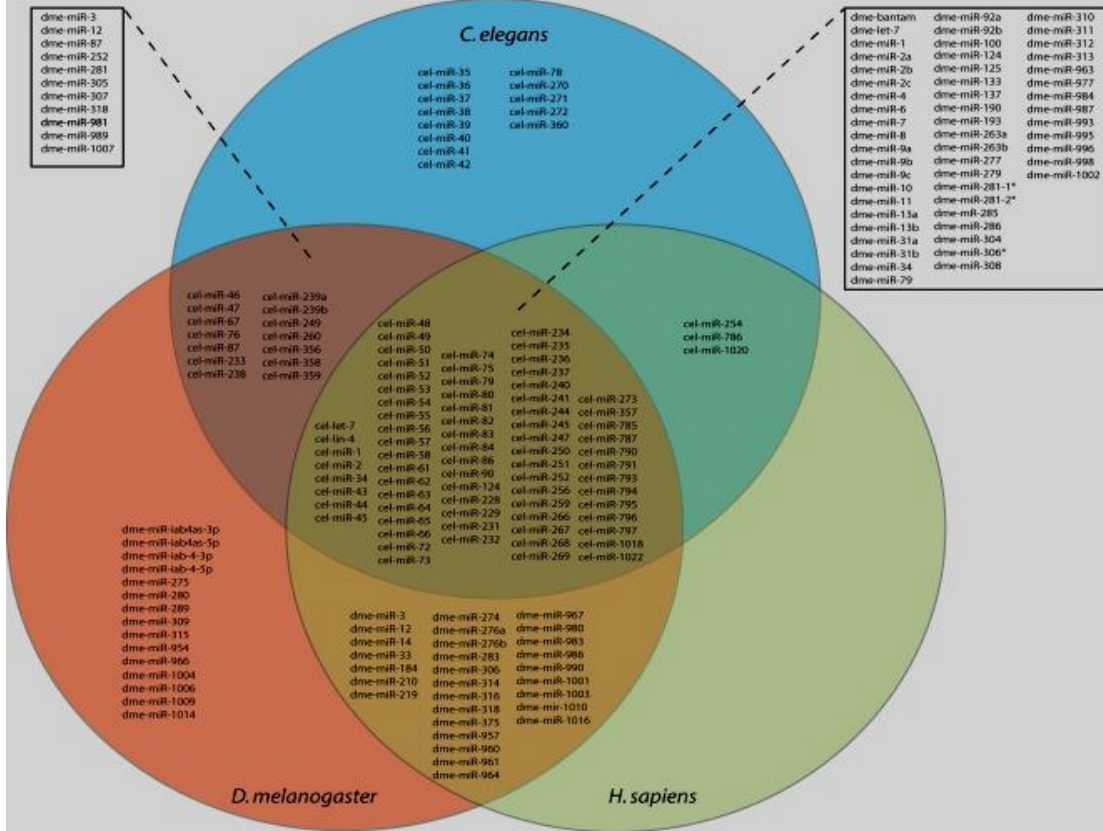
**Cel-miR-1829b**, mikroarray datasına göre maternal ifade olmaktadır ancak yeni nesil sekans okuma sayısı çok düşüktür. Stoeckius ve arkadaşları tarafından 2009 yılında oluşturulan miRNAom profillemesinde ise tanımlanmamıştır. Ayrıca mikroarray ve QRT-PCR sonuçları tutarlı değildir. Farklı biyolojik tekrarlar ile QRT-PCR tekrarlanmalıdır.

**Cel-miR-59-3p**, yeni nesil sekanslama ve mikroarray verilerine göre maternal ifade olan bir miRNA'dır. Literatürde daha önce tanımlanmadığı için gelecekte gerçekleştirilecek QRT-PCR doğrulamasının ardından ileri fonksiyonel ve transgenik çalışmalarla analiz edilecek ve bu mikroRNA'nın *C. elegans* erken embriyogenezindeki rolü aydınlatılmaya çalışılacaktır.

İleri analizler için seçilen miRNAların bazıları aynı aileye mensuptur ve aynı "seed region"ı içermekle kalmayıp, pek çok organizmada da korunmuştur (Ruby and Jan 2006) miR-52, miR-51, miR-55 ve miR-56 ACCCGU motifini taşımakta ve *C.briggsae*, *D.melanogaster*, *D.rerio* ve memeli homologları bulunmaktadır. Benzer şekilde lin-4 ve miR-237 CCCUGA motifini taşırlar ve yukarıda anılan tüm canlılarda homologları vardır. miR-48 ve miR-241 GAGGUA motini taşır ve yine tüm canlılarda homologları bulunmaktadır. GGCAAG motifi taşıyan miR-73 zebra balığı hariç bahsedilen tüm türlerde mevcuttur ve literatürde tümör baskılayıcı özelliği vurgulanmaktadır. CACCGG motifini taşıyan miR-35, miR-37 ve miR-42 ailesi ve CGAAUC motifi taşıyan miR-59, GAAAGA motifi taşıyan miR-71, UACAUG motifi taşıyan miR-246 sadece *C.elegans* ve *C.briggsae* 'de mevcuttur. UUGUAC motifi taşıyan miR-239a, GAGAUC motifi taşıyan miR-82, GUCAUG motifi taşıyan miR-46, UAAAGC motifi taşıyan miR-79 ise *C.elegans*, *C.briggsae* ve *D.melanogaster* 'de korunmuştur.

2008 yılında gerçekleştirilen *C. elegans*, *D. melanogaster* ve *H.sapiens* mikroRNAlarının 5' uç homolojisi analizlerinde 3 canlıda da korunan miRNAlardan bazılarının bu tez

çalışmasında ifade farklılığı gösterdiği belirlenen mikroRNAlar ile aynı olduğu görülmüştür (Şekil 5.1). Bu miRNAlar; miR-48, lin-4, miR-51, miR-52, miR-73, miR-79, miR-237, miR-241'dir. Belirlenen miRNAlardan miR-239a'nın ise bu çalışmaya göre *Drosophila*'da homoloğu vardır. (Ventoso, Vera 2008).



Şekil 5.1. *Drosophila*, insan ve *C. elegans*'ta mikroRNA 5' uç homolojisi analizine göre homoloji gösteren miRNAlar (Ibanez-Ventoso *et al.* 2008)

Bu tez çalışmasında N2 yabancı tip nematodlardan izole edilen 2 ve 8 blastomerli embriyoların (zigotik genom aktivasyonu öncesi ve sonrası olmak üzere) mikroRNA mikroarray çalışması ve *fog-2(q71)V* mutant nematod oosit ve erken karışık evre embriyolarının mikroRNA ifade profilleri yeni nesil sekanslama ile oluşturulmuştur. İki deney verilerine göre ifade farklılıkları tutarlılık gösteren, literatür bilgisi ile desteklenen ve bu süreçte yeni tanımlanan bazı mikroRNAlar için spesifik primerler ile QRT-PCR doğrulama deneyleri gerçekleştirilmiştir. MikroRNAların hücre içerisinde zamansal ve mekansal olarak ifadelerinin değişiklik göstermektedir. miRNA mutantlarında



miRNA hedeflerinin veya maternal RNAların ifade seviyelerinin *in situ* hibridizasyon veya QRT-PCR ile belirlenmesi gerekmektedir. Bir diğerk alternatif de miRNA promotor GFP füzyonlarını içeren transgenik suşlardır. İlerleyen zamanda bu analizler gerçekleştirilecektir. Bazı mikroRNAların hedefledikleri genlerin microRNA.org veritabanı ile *in silico* analizleri yapılmış ve belirlenen tahmini hedef genler kullanılarak da Genecodis veri tabanı ile yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde miRNAların ağırlıklı olarak *C. elegans* erken embriyo gelişimi, üreme ve larval gelişim gibi yollaklarda fonksiyonel olduğu belirlenmiştir. Gelecekteki çalışmalarda, bu miRNAların maternal mRNA yıkımı üzerine fonksiyonlarına ilişkin en önemli veri, belirlenen bu miRNAların transgenik ve mutant suşlarının ileri analizleri ile elde edilebilecektir.

Bu tez çalışmasında belirlenen bu aday miRNAlarla gerçekleştirilecek ileri çalışmalar, oosit-embriyo geçişine ışık tutacak, germline-soma farklılaşması ve gen ifadelerinin miRNA ile regülasyonu hakkında daha fazla bilgi sağlayacaktır. Bu tez çalışmasında *C. elegans* erken embriyosunda zigotik genom aktivasyonu öncesi ve sonrası ifade farklılığı gösteren mikroRNAlara yoğunlaşmıştır ancak ifade farklılığı göstermeyen miRNAlar da literatüre yeni katkıdır ve ileride yapılacak araştırmalarla yeni soruların cevaplanmasına kolaylık sağlayacaktır. mikroRNAların zamansal ve mekansal olarak dinamik ifade göstermeleri fonksiyonlarının anlaşılmasını güçleştirmektedir. Elde edilecek sonuçlar embriyonik kök hücrelerde totipotentin nasıl idame ettirildiği/sonlandırıldığı, erken embriyodaki gen regülasyonu, oositin embriyoya programlanması, kök hücre biyolojisi ve gelişim biyolojisi alanlarında önemli katkılarda bulunacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

Ambros, V. 2001. microRNAs: Tiny Regulators with Great Potential. *Cell*, (107); 823-826.

Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, (431); 350-355.

Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell Metab*, (116); 281-297.

Baugh, L. R. 2003. Composition and dynamics of the *Caenorhabditis elegans* early embryonic transcriptome. *Development*, 130(5); 889-900.

Boulias K and Horvitz HR. 2012. The *C. elegans* microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO. *Cell Metab*. 15(4):439-50.

Brenner, S. 1973. The genetics of *C. elegans*. *Genetics*, (77); 71-94

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

Caudy AA, Ketting RF *et al.* 2003. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature*, 425(6956):411-4.

De Lencastre A, Pincus Z. *et al.* 2010. MicroRNAs both promote and antagonize longevity in *C. elegans*. *Curr Biol*. 20(24):2159-68.

DeRenzo, C. and G. Seydoux 2004. A clean start: degradation of maternal proteins at the oocyte-to-embryo transition. *Trends Cell Biol*, 14(8); 420-426.

Esquela-Kerscher A, Johnson SM, Bai L, Saito K, Partridge J, Reinert KL, Slack FJ. 2005. Post-embryonic expression of *C. elegans* microRNAs belonging to the lin-4 and let-7 families in the hypodermis and the reproductive system. *Dev Dyn.* 234(4):868-77.

Fielenbach, N. and A. Antebi 2008. *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes Dev*, 22(16); 2149-2165.

Giraldez, A. J., Y. Mishima, *et al.* 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312(5770); 75-79.

Gunaratne, P. H., C. Coarfa, *et al.* 2012. miRNA data analysis: next-gen sequencing. *Methods Mol Biol*, (822);273-288.

Ibáñez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. 2008. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One*, 3(7):e2818

Kaletta T, Hengartner MO. 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov.* 5(5):387-98.

Kloosterman, W. P. ve R. H. Plasterk 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development ve disease. *Dev Cell*, 11(4); 441-450.

Lai CH., Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS, Lin W., 2000. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res.* May;10(5):703-13.

Lee RC, Ambros V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 26;294(5543):862-4.

Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11(1); 31-46.

Pritchard, C. C., H. H. Cheng, *et al.* 2012. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*, 13(5); 358-369.

Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, Nusbaum C, Ge H, Bartel DP. 2006. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*. Dec 15;127(6):1193-207.

Schier, AF. 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science*, 20;316(5823):406-7.

Seydoux, G. 1996. Mechanisms of translational control in early development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6; 555-561.

Seydoux, G. ve A. Fire 1994. Soma-germline assymetry in the distrubutions of embryonic RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Development*.

Stoeckius, M., J. Maaskola, *et al.* 2009. Large-scale sorting of *C. elegans* embryos reveals the dynamics of small RNA expression. *Nat Methods* 6(10);745-751.

Sudhir Nayak, J. G., Tim Schedl 2005. fog-2 ve the Evolution of Self-Fertile Hermaphroditism in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS BIOLOGY*.

Sun, W., Y. S. Julie Li, *et al.* 2010. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu Rev Biomed Eng*, 12; 1-27.

Tadros, W. ve H. D. Lipshitz 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136(18); 3033-3042.

Tang, F., M. Kaneda, *et al.* 2007. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 21(6); 644-648.

Vallabhaneni, S. C. J. a. S. 2011. MicroRNAs as post-transcriptional machines and their interplay with cellular networks.

Walser, C. B. ve H. D. Lipshitz 2011. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. *Curr Opin Genet Dev*, 21(4); 431-443.

<http://www.mirbase.org/>

<http://genecodis.cnb.csic.es/>

<http://bioinfo2.ugr.es/miRanalyzer/miRanalyzer.php>

## 7. EKLER

### EK 1. Çalışmada kullanılan primer bilgileri

Analiz edilen miRNAlar	Primer adı (Qiagen)	Katalog no (Qiagen)	Amplifiye ettiği miRNA dizisi
miR-239a	Ce_miR-239a_1	MS00019446	UUUGUACUACACAUAGGUACUGG
miR-48	Ce_miR-48_1	MS00019852	UGAGGUAGGCUCAGUAGAUGCGA
Lin-4	Ce_lin-4_1	MS00018900	UCCCUGAGACCUCAAGUGUGA
miR-71	Ce_miR-71_1	MS00020006	UGAAAGACAUGGGUAGUGAGACG
miR-241	Ce_miR-241_1	MS00019467	UGAGGUAGGUGCGAGAAAUGA
miR-237	Ce_miR-237_1	MS00019432	UCCCUGAGAAUUCUCGAACAGCU
miR-51	Ce_miR-51_1	MS00019873	UACCCGUAGCUCCUAUCCAUGUU
miR-64	Ce_miR-64_2	MS00028714	UAUGACACUGAAGCGUUACCGAA
miR-52	Ce_miR-52_1	MS00019880	CACCCGUACAUAUGUUUCCGUGCU
miR-1829b	Ce_miR-1829b_1	MS00019040	AAGCGAUCUUCUAGAUGGUUGUA
miR-77*	cel-miR-77-3p	MIMAT0000049	UUCAUCAGGCCAUAGCUGUCCA
miR-52*	cel-miR-52*	MIMAT0020311	CACGUUACAAUGAAAGGGUAGC
<b>Primer adı</b>		<b>Dizi (5'-3')</b>	
U18F		ATAGAAAACCGGCTGAGCCA	
U18R		TGGCTCAGCCGGTTTTCTAT	

**EK 2.** qRT-PCR ile analiz edilen mikroRNAların Cp değerleri tablosu

miRNA adı	N2 2BL e1	N2 2BL e2	N2 2BL e3	N2 8BL e1	N2 8BL e2	N2 8BL e3	N2 E e1	N2 E e3	<i>Fog-2</i> GL e1	<i>Fog-2</i> GL e3	<i>Fog-2</i> E e1	<i>Fog-2</i> E e3
<b>Ce_miR_52_5p</b>	18.38	18.84	24.77	19.68	20.68	26.84	21.27	19.87	20.91	26.07	16.9	19.32
<b>Ce_miR_52_3p</b>	34.89	34.02	22.18	34.98	33.25	41.09	32.08	31.88	36.07	39.49	29.74	30.9
<b>Ce_miR_239a_5p</b>	29.09	28.55	35.26	31.44	28.93	32.88	38.26	36.08	29.44	38.16	37.92	36.88
<b>Ce_miR_48_5p</b>	21.89	22.89	26.86	22.99	24.68	29.38	32.73	31.79	25.11	29.28	30.80	31.67
<b>Ce_lin-4_5p</b>	24.55	25.12	30.14	25.15	28.50	32.57	34.84	35.27	27.67	31.73	35.02	34
<b>Ce_miR_71_5p</b>	22.65	24.25	29.87	30.78	27.06	32.16	29.14	29.02	26.26	31.08	28.57	29.55
<b>Ce_miR_241_5p</b>	32.93	31.96	37.33	32.24	33.97	38.65	38.37	36.55	34.60	37.13	35.91	37.21
<b>Ce_miR_237_5p</b>	27.58	28.91	33.28	29.28	31.78	36.63	36.79	33.29	30.99	34.19	32.84	33.51
<b>Ce_miR_51_5p</b>	19.02	19.72	26.38	20.07	22.04	26.61	22.71	20.86	20.40	28.90	19.13	19.58
<b>Ce_miR_64_5p</b>	19.77	20.17	28.52	20.87	22.90	29.17	23.10	22.49	23.58	28.04	21.81	23.28
<b>U18</b>	18.02	17.44	21.59	19.63	17.75	23.72	22.96	19.79	16.55	21.80	18.22	21.45
<b>Ce_miR_1829b</b>	30.3	29.62	32.35	30.76	29.36	32.64	31.10	30.67	28.52	36.03	31	32.77
<b>U18</b>	18.15	17.63	22.86	20.46	17.67	24.50	22.93	20.58	16.72	21.02	18.65	21.95

(**2BL**: 2 blastomerli embriyo, **8BL**: 8 blastomerli embriyo, **E**: gastrula öncesi karışık evre erken embriyo, **GL**: germline/oosit popülasyonu,

**e1**: deney 1, **e2**:deney 2, **e3**:deney 3)

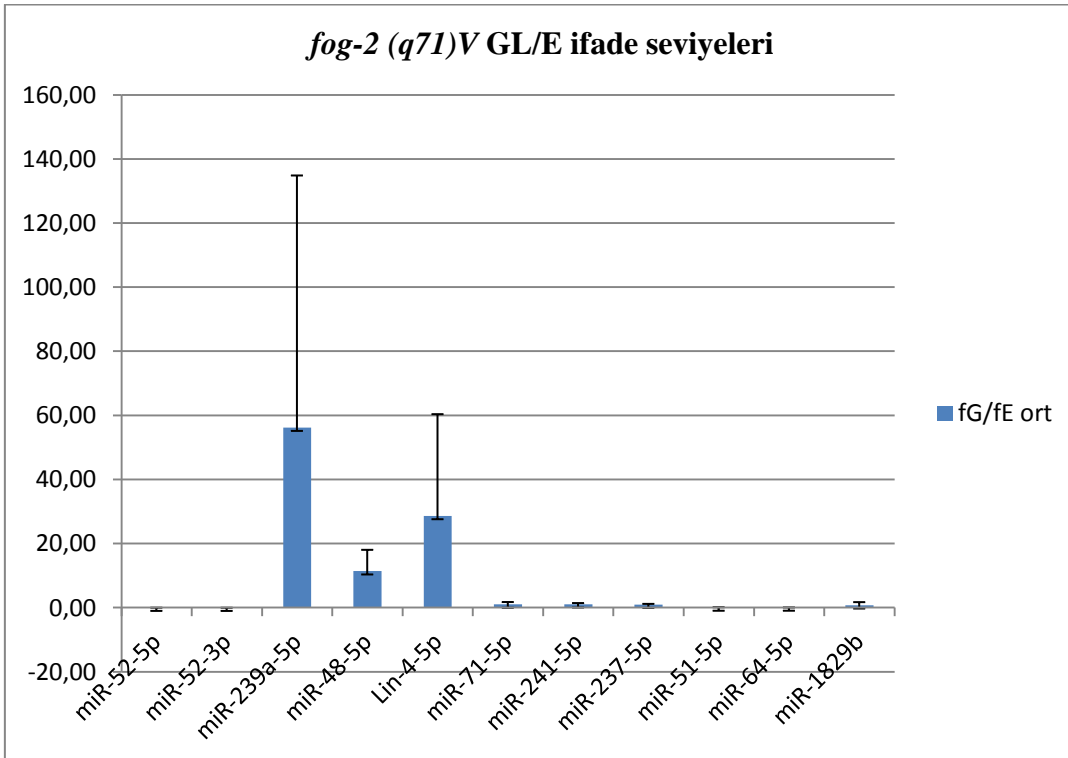
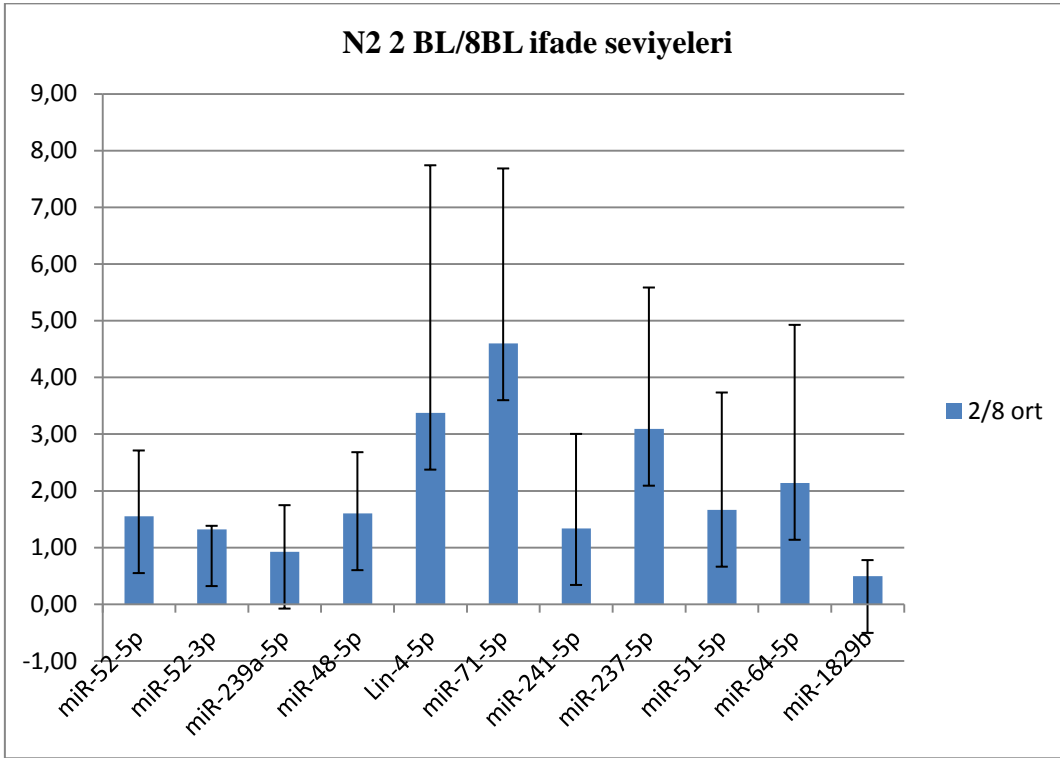
**EK 3.** QRT-PCR ile analiz edilen mikroRNAların U18 transkripti ile Cp değerleri normalizasyon sonuçları

<b>miRNA adı</b>	<b>N2 2 BL</b>	<b>N2 8 BL</b>	<b>N2 E</b>	<b><i>Fog-2</i> GL</b>	<b><i>Fog-2</i> E</b>
<b>Ce_miR_52_5p</b>	1.65	2.03	-0.80	5.28	-1.73
<b>Ce_miR_52_3p</b>	11.35	16.08	10.61	19.82	10.49
<b>Ce_miR_239a_5p</b>	11.95	10.72	15.80	16.51	17.57
<b>Ce_miR_48_5p</b>	4.87	5.32	10.89	8.99	11.40
<b>Ce_lin-4_5p</b>	7.59	8.37	13.69	11.23	14.68
<b>Ce_miR_71_5p</b>	6.57	9.64	7.71	10.37	9.22
<b>Ce_miR_241_5p</b>	15.06	14.59	16.09	17.16	16.73
<b>Ce_miR_237_5p</b>	10.91	12.20	13.67	13.88	13.34
<b>Ce_miR_51_5p</b>	2.69	2.54	0.41	5.46	-0.48
<b>Ce_miR_64_5p</b>	3.80	3.94	1.42	7.35	2.71
<b>Ce_miR_1829b</b>	11.21	10.05	9.13	13.02	11.58

(**2BL**: 2 blastomerli embriyo, **8BL**: 8 blastomerli embriyo, **E**: gastrula öncesi karışık evre erken embriyo, **GL**: germline/oosit popülasyonu)



**EK 4. QRT-PCR sonuçlarının standart sapmalarını gösteren grafikler**



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Selen GÜÇLÜ

Doğum Yeri: Ankara-Altındağ

Doğum Tarihi: 16.02.1987

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu Lise: Mamak Cumhuriyet Anadolu Lisesi (2001-2005)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2005-2010)