

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YABANI ZEYTİNDE (*Olea europaea L. subsp. oleaster*) YÜKSEK VERİMLİ RNA
DİZİLEMESİ İLE YAPRAK VE PEDİSEL DOKULARINDAKİ KORUNMUŞ VE
YENİ MİRNA VE HEDEF GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

MUHAMMET YUSUF PEKMEZCİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2015**

Her Hakkı Saklıdır.

TEZ ONAYI

Muhammet Yusuf Pekmezci tarafından hazırlanan “Yabani Zeytinde (Olea europaea L. subsp. oleaster) Yüksek Verimli RNA Dizilemesi ile Yaprak ve Pedisel Dokularındaki Korunmuş ve Yeni miRNA ve Hedef Genlerinin Karakterizasyonu” adlı tez çalışması 17.08.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç.Dr. Turgay Ünver

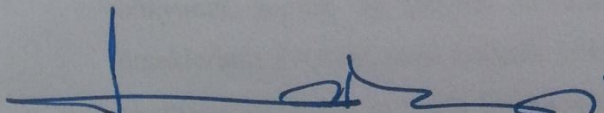
Jüri Üyeleri :

Başkan: Doç.Dr. Turgay Ünver

Üye: Doç.Dr. Mine Türkteş

Üye: Yrd.Doç.Dr. Mehmet Cengiz Baloğlu

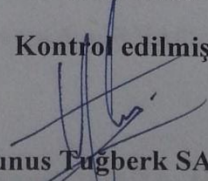
Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Sezgin ÖZDEN

Enstitü Müdürü

01/09/2015

Kontrol edilmiştir.


Yunus Tuğberk SANALP

Bilgisayar İşletmeni

ÖZET

YABANI ZEYTİNDE (*Olea europae* L. subs. *oleaster*) YÜKSEK VERİMLİ RNA DİZİLEMESİ İLE YENİ VE KORUNMUŞ MİRNA TAYİNİ VE HEDEF GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Muhammet Yusuf Pekmezci

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Turgay Ünver

Zeytin bitkisi Akdeniz havzasına özgü ve iklimin tipik bitkilerinden birisi olup, sağlık, gıda, kozmetik gibi alanlarda yüksek ekonomik değeri olan ve ülkemizin de önemli miktarda yetiştiriciliğini üstlendiği bir ağaçtır. mikroRNAlar 18-22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan ancak gen ifadesi düzenlenmesinde post-transkripsiyonel olarak rol oynayan tek zincirli RNA dizileridir ve stres dayanıklılığı, gelişim gibi süreçlerde miRNAların işlevleri bilinmektedir. Bu çalışmada yabani zeytin bitkisinin yaprak ve pedisel dokularının Temmuz ve Kasım aylarında alınan örneklerinin RNAları izole edilerek yüksek verimli dizileme teknolojisiyle elde edilen okumalar üzerinden ve küçük RNA kütüphanesi kullanılarak yeni ve korunmuş miRNA tespiti biyoinformatik olarak yapılmış, katlanma yapıları RNAfold ile belirlenmiştir. Analizler sonucu toplamda 20 korunmuş, 23 yeni miRNA bulunmuştur. Hedef mRNAların gen ontolojisi Blast2GO ile yapılmış, miRNAlar ve hedefleri eş zamanlı PCR deneyi yapılmış ve 7 örnekten 5 miRNA/hedef arasındaki ilişki doğrulanmıştır.

2015, 106 Sayfa

Anahtar kelimeler: Biyoinformatik, miRNA, Transkriptom, Yabani zeytin

ABSTRACT

Master of Science Thesis

IDENTIFICATION OF NOVEL AND CONSERVED MIRNAS AND THEIR TARGETS IN WILD OLIVE (*Olea europaea* L. subs. *oleaster*) VIA HIGH THROUGHPUT RNA SEQUENCING

Muhammet Yusuf Pekmezci

Cankiri Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Turgay Ünver

Olive is a tree that is specific to Mediterranean basin and one of the typical plants of the climate and has high values on fields like health, food, cosmetics and our country bears the production in significant amounts. microRNAs are 18-22 nucleotide long non-coding, single-stranded RNA sequences that regulates gene expression on post-transcriptional level and are known to be involved in various biological processes such as stress tolerance and development. In this study samples were taken on July and November from wild olive tree's pedicel and leaf tissues and their RNA extracted to identify conserved and novel miRNAs bioinformatically on the RNA sequence and small RNA deep-seq and novel and conserved miRNAs were obtained via bioinformatics. As a result 20 conserved and 23 novel miRNAs were detected. Gene ontologies of target mRNAs were done via Blast2GO and the expression levels of miRNAs and their target genes were quantified by qRT-PCR. 5 out of 7 miRNA/target gene relationship were verified.

2015, 106 Pages

Keywords: Bioinformatics, miRNA, Transcriptome, Wild olive

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yürüttüğümüz tüm deneylerde değerli bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek daima yol gösterici olan danışman hocam sayın Doç.Dr. Turgay Ünver'e,

Çalışmalarımız boyunca bizimle laboratuvar tecrübelerini paylaşan ve tartışma ortamını canlı tutan kıymetli hocam sayın Doç.Dr. Mine Türkteş'a,

Program kodlarını yazarak işlerimi hızlandıran, kolaylaştıran ve doğruluğunu artıran değerli eski dostum Erman Gülhan'a,

Laboratuvar ortamını neşelendiren, deneylerimde ve çalışmalarımnda katkılarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Ümmügülsüm Tanman Zıplar ve Günseli Babaoğlu'ya,

Laboratuvar ve ders çalışma dışındaki zamanlarımda bana daima eşlik eden ev arkadaşlarım Emrah Polat, Furkan Deveci, Mekin Tufan ve tavsiyelerini eksik etmeyen Merve Banu Koç'a,

Hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her ihtiyacıma cevap veren ve sabırla arkamda duran aileme, özellikle babama ve Aslı Kurden'e sonsuz teşekkürleri, minnet ve şükranları borç bilirim.

Bu tez Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Yüksek Lisans tez projesi ile desteklenmiştir. Bu tez Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri FF12035L17 nolu projesi olarak desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. KURAMSAL TEMELLER	1
1.1. mikroRNA (miRNA)	1
1.1.1. miRNA'ya Giriş.....	1
1.1.2. miRNA biyogenezinin düzenlenmesi	2
1.1.3. Bitki microRNA hedeflerinin tespiti.....	7
1.1.4. Yeni miRNAların tahmini.....	8
1.2. Zeytin (<i>Olea europaea L.</i>)	9
2. MATERYAL VE YÖNTEM	11
2.1. Pre-miRNA Data Setleri Oluşturma.....	11
2.2. Total RNA İzolasyonu	11
2.3. Transkriptom Okumaları	12
2.4. BLAST ve RNAfold Aracılığıyla Biyoinformatik Analizler	12
2.5. miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi ve Gen Ontolojisi	14
2.6. miRNA Dizilerinin qRT-PCR ile Doğrulanması.....	14
2.7. Hedef mRNAların qRT-PCR ile Doğrulanması	15
3. BULGULAR	16
3.1. mikroRNA Katlanma Yapıları	22
3.2. miRNA Ekspresyon RPKM.....	25
3.3. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Sonuçları	26
3.4. Blast2GO Anotasyon Sonuçları	30
3.4.1. Temmuz yaprak kütüphanesi.....	31
3.4.2. Temmuz pedisel kütüphanesi	35
3.4.3. Kasım yaprak kütüphanesi	39
3.4.4. Kasım pedisel kütüphanesi.....	43
3.5. KEGG Yolakları	47
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR.....	53
EK BİLGİLER	60

1. MikroRNA Katlanma Yapıları.....	60
2. PCR reaksiyonları için kullanılan primerler listesi	94
2.1. miRNA primerleri	94
2.2. Hedef Primerleri.....	94
ÖZGEÇMİŞ.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

miRNA	mikroRNA
pri-miRNA	primary miRNA- ilkel miRNA
pre-miRNA	precursor miRNA- öncül miRNA
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribo nükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
tRNA	Taşıyıcı RNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Bir dakikadaki devir sayısı
μ L	mikrolitre
$^{\circ}$ C	Santigrad derece
NGS	Yeni Nesil Dizileme
mg	miligram
ml	mililitre
dk	dakika

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 miRNA Biyogenezi Görsel Özeti (Voinnet 2009)	2
Şekil.3.1.1 miR156 RNAfold katlanma yapısı	22
Şekil 3.1.2. miR171 RNAfold katlanma yapısı	23
Şekil 3.1.4. Novel_01 RNAfold katlanma yapısı.....	23
Şekil 3.1.6. Novel_03 RNAfold katlanma yapısı.....	24
Şekil 3.1.7. Novel_04 RNAfold katlanma yapısı.....	24
Şekil 3.2.1. miRNA RPKMlerinin Heatmap Grafiği	25
Şekil 3.3.1. Novel_01 miRNA Yaprak dokusunda ekspresyonu ve hedef geni "RubisCO subunit 4" mRNA seviyeleri	26
Şekil 3.3.2. Novel_01 miRNA pedisel dokusunda ifadesi ve hedef geni "CCA tRNA Nucleotidyl transferase 2" mRNA seviyeleri	26
Şekil 3.3.3. Novel_02 miRNA Temmuz ayı ifadesi ve hedef geni "Chloroplastic Pentatricopeptide Repeat-Containing" mRNA seviyeleri	27
Şekil 3.3.4 miR156 miRNA ifade seviyeleri.....	27
Şekil 3.3.5. miR156 hedef geni "Squamosa promoter binding-like protein 2" mRNA ifade seviyeleri	28
Şekil 3.3.6. miR156 hedef geni "Ethylene insensitive 3 " mRNA ifade seviyeleri	28
Şekil 3.4.1. Dört kütüphanedeki hedef adayı genlerin katıldığı biyolojik proseslerin yüzdeleri.....	30
Şekil 3.4.2. Dört kütüphanedeki hedef adayı genlerin moleküler fonksiyonlarının yüzdeleri.....	30
Şekil 3.4.1.1. Temmuz yaprak kütüphanesi hedeflerinin katıldığı biyolojik prosesler...	31
Şekil 3.4.1.2. Temmuz yaprak kütüphanesi hedef proteinlerinin hücre içi konumları ...	32
Şekil 3.4.1.3. Temmuz yaprak kütüphanesi hedef proteinlerinin katıldığı moleküler fonksiyonlar	33
Şekil 3.4.1.4. Temmuz yaprak kütüphanesi hedef proteinlerine veritabanında karşılık gelen organizmalar	34
Şekil 3.4.2.1. Temmuz pedisel kütüphanesi hedeflerinin katıldığı biyolojik prosesler ..	35
Şekil 3.4.2.2. Temmuz pedisel kütüphanesi hedef proteinlerinin hücre içi konumları ...	36
Şekil 3.4.2.3. Temmuz pedisel kütüphanesi hedef proteinlerinin katıldığı moleküler fonksiyonlar	37
Şekil 3.4.2.4. Temmuz pedisel kütüphanesi hedef proteinlerine veritabanında karşılık gelen organizmalar	38
Şekil 3.4.3.2. Kasım yaprak kütüphanesi hedef proteinlerinin hücre içi konumları	40
Şekil 3.4.3.3. Kasım yaprak kütüphanesi hedef proteinlerinin katıldığı moleküler fonksiyonlar	41
Şekil 3.4.3.4. Kasım yaprak kütüphanesi hedef proteinlerine veritabanında karşılık gelen organizmalar.....	42
Şekil 3.4.4.1. Kasım pedisel kütüphanesi hedeflerinin katıldığı biyolojik prosesler	43
Şekil 3.4.4.2. Kasım pedisel kütüphanesi hedef proteinlerinin hücre içi konumları	44
Şekil 3.4.4.3. Kasım pedisel kütüphanesi hedef proteinlerinin katıldığı moleküler fonksiyonlar	45
Şekil 3.4.4.4. Kasım pedisel kütüphanesi hedef proteinlerine veritabanında karşılık gelen organizmalar	46

Şekil 3.5.1. Fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyon yolağındaki Novel_20 mirnasının hedeflediğı enzim Malat Dehidrojenaz	47
Şekil 3.5.2. Pürin metabolizması yolağındaki Novel_03'ün hedeflediğı DNA aracılıklı RNA polymerase enzimi ve Novel_04'ün hedeflediğı Adenilat kinaz enzimleri	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Temmuz Yaprak Sonuçları.....	16
Tablo 3.2. Temmuz Pedisel Sonuçları.....	17
Tablo 3.3. Kasım Yaprak Sonuçları.....	19
Tablo 3.4. Kasım Pedisel Sonuçları.....	20

1. KURAMSAL TEMELLER

1.1. mikroRNA (miRNA)

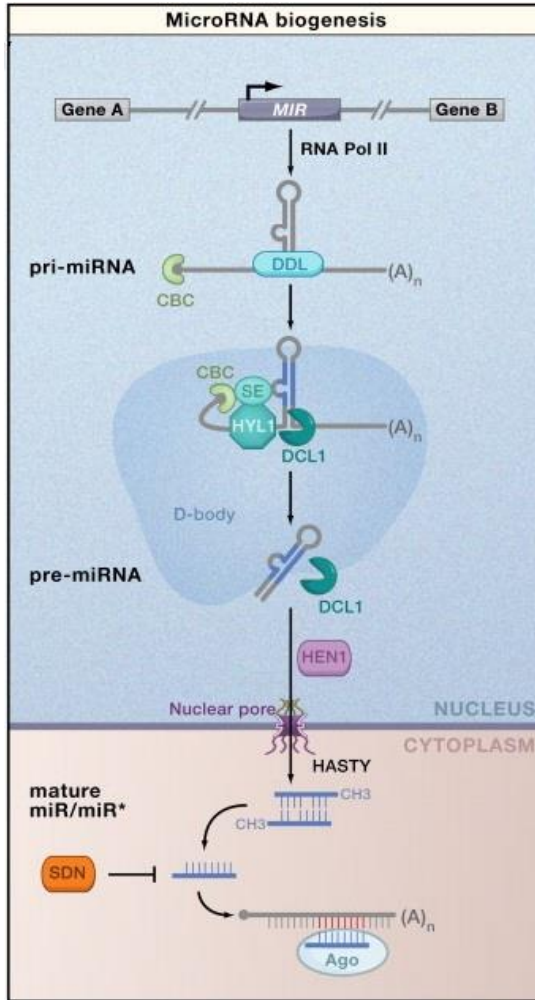
1.1.1. miRNA'ya Giriş

mikroRNAlar (miRNA) 20-25 nükleotid uzunluğunda, gen ifadesini transkripsiyon sonrası seviyede düzenleyen, proteine kodlanmayan RNA dizileridir(Kong and Han 2005; Chiou et al. 2006). İlk kez 2001 yılında *Caenorhabditis elegans* üzerinde keşfedilmiş(Lee and Ambros 2001), ve 2002 yılında Science dergisinde yılın çığır açan buluşu olarak seçilmiştir(Kennedy 2002). MiRNAlar çift zincirli sap-ilmik yapısında öncül olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenir ve bu diziler pri-miRNA adını alır(Lee et al. 2004). Çift zincir yapısındaki miRNA rehber dizisi argonaute proteini (AGO) ile etkileşimdedir ve böylece hedef geni keserek veya transkripsiyonunu engelleyerek inhibe ederken komplementer dizi miRNA* (taşınan dizi) çoğunlukla parçalanır(Valencia-Sanchez et al. 2006). 2002 yılında ilk bitki miRNAları tanımlanmaya başladığından beri(Reinhart et al. 2002), derin dizileme veya genetik yaklaşımlarla binlerce yeni miRNA tanımlandı(Kozomara and Griffiths-Jones 2013). miRNAlar kök büyüme başlangıcı, yaprak gelişimi, damar büyümesi, faz geçişleri ve tohum gelişimi gibi birçok büyüme evresini düzenlemede rol alırlar(Mallory and Vaucheret 2006). Bunlara ilaveten miRNAlar kuraklık, tuzluluk, soğuk, oksidatif stres, besin eksikliği, parazitler gibi çok çeşitli stres koşullarına değişken cevaplar verdikleri bilinmektedir(Mallory and Vaucheret 2006; Sunkar et al. 2012). miRNA biyogenezi ve fonksiyonunun genel hatları *Arabidopsis thaliana* üzerinde tanımlanmıştır (Figür 1). *Arabidopsis*'te miRNA/miRNA* çift zincirli yapısını nükleusta sentezlenen birincil miRNA'dan (pri-miRNA) dicer-benzeri enzim (DCL1; RNAz III sınıfı bir enzim) tarafından kesilir(Fang and Spector 2007). Daha sonra küçük RNA metiltransferaz hua enhancer (HEN1) enzimi miRNA/miRNA* çift zincir yapısının 3' ucuna metil ekleyerek kararlı hale getirir(Yu et al. 2005). miRNAlar nükleustan sitoplazmaya, exportin 5'in bir homoloğu olan hasty (HST) proteini yardımıyla taşınır(Vaucheret et al. 2004). *Arabidopsis*'te ve pirinçte miRNAların en önemli efektörü gen ifadesini hedef mRNAları keserek veya translasyonu engelleyerek baskılayan ve endonükleaz faaliyeti olan AGO1'dir (Vaucheret et al. 2004; Baumberger and Baulcombe 2005). Yakın

zamanda yapılan çeşitli çalışmalarda, bitki gelişim süreci ve fizyolojisinde miRNA seviyelerinin ve aktivitelerinin sıkıca kontrol edildiğine yönelik kanıtlar mevcuttur.

1.1.2. miRNA biyogenezinin düzenlenmesi

Günümüze kadar miRNA biyogenezinde rol alan birçok transkripsiyon faktörü ve yardımcı etkenler tanımlanmıştır. Çalışmalara göre miRNA yoğunluğu; transkripsiyon, stabilite ve pri-miRNA süreçlerinde kontrol ediliyor.



Şekil 1.1 miRNA Biyogenezi Görsel Özeti (Voinnet 2009)

Korunmuş mikroRNAların (miRNA) prosesi ve kararlı hale gelmesindeki moleküler yolak. Bitki pri-miRNAları çoğunlukla RNAPolimeraz II (Pol II) tarafından protein kodlayan genlerin arasında kalan bölgeden transkribe olurlar. RNA'ya bağlanan protein olan DAWDLE (DDL) büyük ihtimalle pri-miRNAları stabilize ederek pre-miRNA

yapısı adı verilen “sap-ilmik” haline geçişlerine yardımcı olurlar. D-body adı verilen ve bu süreçten sorumlu olan kompleks C2H2-çinko parmak proteini SERRATE (SE), çift zincirli RNaya bağlanan protein HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) ve Dicer-like1 (DCL1) proteinine ilaveten Nükleer Cap bağlanma proteini olan CBC’yi içerir. Pre-miRNAlar ve olgun miRNAlar DCL1 aracılığıyla üretilir ve bitki exportin 5 ortoloğu olan HASTY ve diğer –henüz- bilinmeyen faktörler aracılığıyla sitoplazmaya salınır. Olgun miRNA dupleksleri pre-miRNA ilmik yapısından kesilerek HEN1 aracılığıyla metillenir ve böylece küçük RNA parçalayıcı mükleaz (SDN) enziminden korunur. Rehber miRNA dizisi daha sonra AGO proteinleriyle işbirliği içersinde susturma tepkimelerini gerçekleştirirler.

1.1.2.1. miRNA kodlayan genlerin (MIR) transkripsiyonel düzenlenmesi

miRNAlar MIR adı verilen endojen genler tarafından kodlanır ve bu genlerden birçoğu değişik bitki türleri arasında korunmuşlardır(Nozawa et al. 2012; Coruh et al. 2014). Şimdiye kadar binlerce MIR tanımlanmıştır (<http://www.mirbase.org/>) (Kozomara and Griffiths-Jones 2013). MIRler çoğunlukla genler arası bölgede yer alırlar ve protein kodlayan genler gibi transkripsiyona maruz kalırlar(Xie et al. 2005). Bazı MIRler bağımsız transkripsiyon üniteleri değildir. Bunun yerine host genlerinin intronik veya exonik dizilerine gömülü olarak bulunabilirler(Yang et al. 2012). Ayrıca, Arabidopsis ve pirinçte transpoze elementlerden (TE) üretilen birkaç miRNA da mevcuttur(Piriyapongsa and Jordan 2008).

Bitki MIRlerinin büyük çoğunluğu DNA'ya bağımlı RNA polimeraz II tarafından pri-miRNA yapısına transkribe olurlar(Borchert et al. 2006). pri-miRNAları stabilize etmek için transkripsiyon sonrasında 5' ucuna 7-metilguanozin başlığı ve 3' ucuna poliadenillenmiş kuyruk eklenir(Katoh et al. 2009).Yapılan bir çalışmada Pol II'nin C-terminal domainlerini düzenleyen siklin-bağımlı kinaz F'i (CDKF) geni eksik olan mutant bireyde pri-miRNAlar başlıklarını kaybettiler ve sayıca azaldılar, bu da başlıkların pri-miRNA stabilizasyonunu sağladığını gösteriyor(Hajheidari et al. 2012). Protein etkenler de pri-miRNA stabilizasyonuna katkıda bulunurlar. Çatal-başlı asosiye domain (FHA)-içeren protein olan Dawdle (DDL), pri-miRNA birikimi için gereklidir(Yu et al. 2008). Ancak, DDL; MIR transkripsiyonunu etkilememektedir.

DDL'in pri-miRNAlara bağlanması sebebi, pri-miRNA stabilitesini sağlamakta olabilir (Figür 1)(Mallory et al. 2008).

Protein kodlayan genler gibi MIR promotorları da TATA box ve 21 *cis*-düzenleyici motifler içerir, yani MIR ifadesi transkripsiyonel düzenlenmeye maruz kalmaktadır(Cui et al. 2009). Bu durum bazı miR transkripsiyon faktörlerinin kimliklendirilmesi ve karakterizasyonu sonu ortaya çıkmıştır(Figür 1). Çok alt üniteli korunmuş genel transkripsiyon ko-aktivatörü mediyatörün eksikliği durumunda Pol II, MIR promotorlarına daha az bağlanarak pri-miRNA ve miRNA seviyesinde düşmeye sebep olmaktadır(Kim et al. 2011). NOT2b; Pol II C-terminal domaini ile etkileşimdedir ve etkili bir MIR transkripsiyonu için gereklidir(Wang et al. 2013). NOT2a ve NOT2b ayrıca protein kodlayan genlerin de transkripsiyon seviyesini etkilediği için NOT2'nin genel bir transkripsiyon faktörü olma olasılığı yüksektir(Wang et al. 2013). Hücre bölünme siklusunu 5 (CDC5) proteini hayvan ve bitkilerde korunmuş bir DNA bağlama proteini(Zhang et al. 2013). CDC5 hem MIR promotorlarıyla hem de Pol II ile etkileşimdedir(Kim et al. 2011). Böylelikle CDC5 MIRlerin pozitif transkripsiyon faktörüdür(Zhang et al. 2013). Ancak CDC5'in protein kodlayan genlerin de transkripsiyon faktörü olup olmadığı kesin değildir.

1.1.2.2. DCL1 aktivitesinin düzenlenmesi

Transkripsiyondan sonra pri-miRNAlar, nükleusta DCL1 aracılığıyla sap-ilmik yapısı halindeki pre-miRNAlara dönüşür. DCL1'e ilaveten homoloğu olan DCL4 de bazı pri-miRNAların dönüşümünde rol almaktadır(Gascioli et al. 2005). Pirinçte bazı 24 nükleotidlik miRNAların üretimi için DCL1 ve DCL3'ün koordine çalışması gerekmektedir(Liu et al. 2007). Bu duruma bakarak miRNA biyogenezinin farklı bitki türlerinde çeşitliliğe sebep olabileceği söylenebilir.

Bitki pri-miRNA ilmikleri boy uzunlukları ve miRNA/miRNA* pozisyonları açısından çeşitlilik göstermektedirler. DCL1 aktivitesinin düzenlenmesi açısından pri-miRNA'nın yapısı çok önemlidir(Kurihara and Watanabe 2004). Pri-miRNAların ilk kesim yeri olan miRNA/miRNA* dupleksinin alt kolunun yaklaşık 15 nükleotidlik kısmının kısmen eşleşmesi etkili bir sürecin başlangıcıdır(Werner et al. 2010). Bir çalışmada DCL1'in bazı pri-miRNAları yapısal çeşitliliği sonucu çoklu dal

oluşturmasından ötürü iki yönden işlediği ortaya çıkmıştır(Zhu et al. 2013). Bunları hesaba katınca pri-miRNAların ikincil yapılarının miRNA olgunlaşması için çok önemli olduğu sonucu çıkarılabilir.

Etkili ve kesin pri-miRNA prosesi bir çok protein faktörünün de yardımıyla gerçekleşir (Figür 1). Çinko parmak proteini Serrate (SE), çift zincirli RNA'ya bağlanan hyponastic leaves1(HYL1) ve G-patch domain tough (TGH) hep birlikte DCL1 ile etkileşime girerler ve miRNA birikimi için gereklidirler(Vazquez et al. 2004). In vitro bir biyokimyasal çalışma sonucuna göre HYL1 ve SE pri-miRNA prosesinin etkinliğini ve kesinliğini arttırmaktadır(Dong et al. 2008). Bu sonuçlarla uyumlu olarak *hyl1* mutant bitkide pri-miRNAların parçalanmamış ürünlerine ve DCL1'in helikaz ve RNase III domainlerinde mutasyonlar tespit edilmiştir ki bu kısımlar kesilecek kısmın seçilmesi ve DCL1'in katalitik aktivite kısımlarıdır(Dong et al. 2008). HYL1 çift zincirli-RNA'ya bağlanan bir proteindir. N-terminal kısmı iki RNA bağlanma domaini içerirken, C-terminal kısmı 28 aminoasitin altı tekrarını içerir. miRNA biyogenezinde iki tane RNA-bağlanma bölgesi HYL1'in çalışması için yeterlidir(Han et al. 2004). SE, N-terminal aracılığıyla tek zincirli-RNAlara bağlanır(Yang et al. 2006). SE'nin çinko parmak domaini DCL1 ile etkileşime girer ve optimal bir DCL1 aktivitesi için gereklidir. Bu iskele benzeri yapı ve RNA-bağlanma kapasitesi ile SE bir pre-miRNA'yı miRNA proses kompleksindeki DCL1'in katalitik bölgesine taşıyabilmektedir(Machida et al. 2011).

1.1.2.3. microRNA'nın stabilizasyonu ve sitoplazmaya taşınması

DCL1, SE ve HYL1'e ilaveten Hua Enhancer (HEN1) de miRNA olgunlaşmasında önemli yere sahiptir. HEN1'deki mutasyonların sonucu miRNAların 3'-ucunda uridilasyonu ve dolayısıyla daha az miRNA birikimi ve fonksiyonel eksiklik tespit edilmiştir(Park et al. 2002; Vazquez et al. 2004; Vilkaitis et al. 2010).HEN1 metiltransferaz domaini içerir ve miRNA/miRNA* dupleksini in vitro olarak metilleyebilir(Saito et al. 2007). Endojen miRNAların 3'-ucu 2'hidroksil grubunun yabancı bitkilerde metillendiği ancak hen1 mutasyonuna maruz bırakılan bitkide ise metillenmediği ortaya çıktı(Yu et al. 2005).

DCL1-aracılığıyla kesilme ve HEN1 metillemesi sonrası miRNAlar nükleus dışına

çıkarak sitoplazmaya sızarlar. Bu taşınma işlemi Hasty (HST) adı verilen importin β ailesinin bir üyesi olan nükleo-sitoplazmik taşıyıcı protein tarafından sağlanır(Vaucheret et al. 2004). Benzer bir mekanizma hayvanlarda HST ortoloğu olan Exportin-5 ile yapılır(Bollman et al. 2003). *hst* mutant bitkilerdeki miRNA birikimi tamamen engellenmediyse de önemli oranda düşmüştür(Bollman et al. 2003), yani HST'nin miRNA ihracında önemli bir yeri olmasına karşın diğer bileşenler veya yollar da yerini alabilir.

1.1.2.4. AGO proteinleri

miRNAlar esas olarak, hedef RNAyı kesen ve/veya translasyonu engelleyen AGO efektör proteinleri yoluyla işlev görürler(Valencia-Sanchez et al. 2006). AGO dört ana domain içerir; N-terminal domain, PAZ domain, MID domain ve PIWI domain(Peters and Meister 2007). Bunların arasında, PAZ domaini miRNAların 3' uçlarına bağlanır, MID domain ise miRNAnın 5' fosfatıyla etkileşimde bulunur(Hutvagner and Simard 2008). PIWI domaini RNase H'inkine benzer bir yapı geliştirmiştir ve miRNAların onuncu ve onbirinci nukleotidlerine zıt bir pozisyondaki hedefi kesmek için slicer olarak rol oynar(Parker et al. 2005). Fakat, bitkiler ve hayvanlardaki bazı AGOlarda katalitik merkezdeki bazı anahtar aminoasitler mutasyona uğradığı için, bütün AGOlarda endonuclease aktivitesine sahip değildir(Hutvagner and Simard 2008). Arabidopsis 10 çeşit AGO'yu kodlar(Vaucheret 2008). Bunların herbiri farklı bir alttip küçük RNAya bağlanır ve farklı görevleri vardır(Mi et al. 2008). Bu kısmen küçük RNAların 5' nukleotidi tarafından belirlenir. Mesela, AGO1; 5' ucunda Urasil olan miRNAları tercih eder(Mi et al. 2008). Ek olarak, AGOlarda, fonksiyonel ayrılıklarına çeşitlilik katkı sağlayabilen mekana özel ekspresyon şekilleri sergilerler(Mallory and Vaucheret 2010). Arabidopsis'te, AGO miRNAlar için başlıca efektör proteindir, AGO7 ve AGO10, sırasıyla, özellikle miR390 ve miR165/166'ya bağlanırlar(Hutvagner and Simard 2008).

AGO1'in seviyeleri ve aktivitesi, onun doğru işlevinden emin olmak için düzenlenir. AGO1 miR168in bir hedefidir(Vaucheret 2009). Dolayısıyla, AGO1in kendisi geribildirim regülasyonunun bir parçasıdır.

Bir F-box proteini olan FBW2nin aşırı ekspresyonu AGO1 protein seviyesini düşürür, ama transkriptleri değil. Bunun aksine, *fbw2* mutasyonu AGO1 protein

seviyelerini artırır, bu FBW2'nin AGO1'in negatif regülatörü olduğunu gösterir(Earley et al. 2010). AGO1, AGO1-miRNA birleşmesi bozulduğu zaman, otofaji yoluyla da degrade edilebilir(Gibbins et al. 2012). AGO1den gelen miRNAları ayırmak onların fonksiyonlarını düzenleyebilir. Örneğin, AGO10, AGO1-miR165/166 kompleksinin oluşumunu engellemek için gövde apikal meristemde miR165/166'ya bağlanır, bu da miR165/166'nın fonksiyonunu sınırlar ve meristemin düzgün gelişimini garantiye alır(Zhu et al. 2011).

1.1.2.5. miRNA aracılığıyla hedef kesimi

Bitki miRNAları substatlarını tanımak için yüksek benzerliğe ihtiyaç duyarlar ancak tam eşleşme olması zorunlu değildir(Rhoades et al. 2002; Carrington and Ambros 2003). Arabidopsis üzerinde yapılan bir çalışmaya göre miRNA'nın dizi benzerliğinin yanı sıra dizi içeriği ve ifade seviyesi de hedef tanımlamaya yönelik katkıda bulunduğunu göstermiştir(Li et al. 2014). AGO proteini aracılığıyla hedef kesimi 5' RNA karşısındaki 3' ucunda hidroksil grubu bağlı bir parça ve 3' RNA parçası bırakır(Cheloufi et al. 2010).

miRNA aracılığıyla yapılan hedef mRNA kesimlerini düzenleyen ayrı bir mekanizma olarak endojen miRNA olmayan ancak miRNA'ya benzeyen mimik RNAlar gösterilebilir. Arabidopsis'te kodlanmayan IPS1 isimli miR399'la eş dizi içeren ancak kesim bölgesi içermeyen bir RNA dizisi vardır. IPS1 AGO1'e miR399 gibi bağlanabilir ancak kesilmediği için AGO1'i tutsak alır ve sonuç olarak hedef mRNA olan PHO2'nin birikimine sebep olur(Franco-Zorrilla et al. 2007).

1.1.3. Bitki microRNA hedeflerinin tespiti

Bitki miRNAlarının hedeflerinin tespitini zorlaştıran kısım yanlış tahminleri doğrularından ayırt edebilmekteki zorluk olmuştur. Bu zorluğu aşmak için ilk ipucu miR171'i genomu haritalayınca geldi. Bu miRNA Arabidopsis genomunda dört bölgeye karşılık geliyordu. Bunlardan birisi protein kodlayan genlerin arasında yer alıyordu ve öngörülen sap-ilmik yapısını gösteriyordu. Ancak diğer üçü SCL adı verilen proteinin antisens'iydi ve sap-ilmik yapısından yoksundular. Bu sonuç da genler arasındaki lokusların karşılık gelen SCL mRNAlarını kesmek için bir miRNA ürettiğini

düşündürdü(Llave et al. 2002; Reinhart et al. 2002).

Tüm diğer Arabidopsis miRNAları tam olarak mRNA hedefiyle eşleşme de tamamına yakını eşleşecek şekilde karşılık gelmektedir. Genom çapında miRNA hedeflerinin taramasında miRNA'ya karşılık gelen boşluksuz,0-3 nükleotid kaçakla, antisens mRNA hizalanmaları bulunmuştur. Karşılık gelen kısmının az veya çok olması büyük ihtimalle şans eserdir(Rhoades et al. 2002).

miRNAlar mRNA stabilizasyonunu etkilediklerinden ötürü mRNA veya miRNA ekspresyon arrayleri genom çapında miRNA seviyeleri ve hedeflerini bulmak için kullanılabilir. Örneğin; miR319'un fazla sentezlendiği bir ekspresyon arrayinde beş farklı TCP transkripsiyon faktörünün kontrol grubuna göre az ifade olduğu gözlemlendi(Schommer et al. 2008). Bu tarz bir deney laboratuvarımızca 2014 yılında yapılmış olup birisi tuz stresine dayanıklı diğeri hassas olan iki farklı buğday ailesinin tuz stresi sonucu miRNA ekspresyonlarının seviyesi ölçülmüş ve anlamlı seviyede değişim gösteren miRNAların stresle ilişkileri konusunda ön çalışma olarak kaydedilmiştir(Eren et al. 2015).

1.1.4. Yeni miRNAların tahmini

Biglisayar temelli yeni miRNA bulma yöntemleri MIR gen kimliklendirmesi etrafında yoğunlaşıyor. miRNA tahmini için çeşitli yöntemler uygulanmış ve geliştirilmiştir. Geleneksel metot; boylarına göre parçalara ayrılmış RNAların klonlanması ve Sanger sekanslama ile dizilemek ve deneysel doğrulamaktır. Ancak bu süreç çok zaman harcar ve miRNA olmayan RNAların parçalanması sonucu yanlış pozitif sonuç verebilir ve düşük seviyedeki ekspresyonları tespit edemez(Carrington and Ambros 2003). Diğer denenen Northern blotlama, mikroarray ve in situ hibrisizasyon gibi yöntemler ise aynı şekilde çok zaman alan yöntemlerdi. Yeni nesil dizileme(NGS) teknolojisindeki gelişmeler deney masraflarını önemli miktarda düşürerek az yoğunluktaki miRNAların tespitine de olanak sağlamıştır. Ayrıca bilinen miRNAlar için daha güvenilir ve nicel bir tekniktir. Buna ilaveten yeni miRNAları NGS verisinden tespit etmek için özel algoritmalar kullanarak bilgisayar üzerinde çeşitli hesaplamalar yapmak gerekmektedir. Yüksek çıktılı platformlardan miRNA doğrulamak için çeşitli programlar geliştirilmiştir(Friedländer et al. 2008).

miRNA'yı bilgisayar üzerinde tespit etmek için kullanılan karakterlerinden en önemlileri; türler arasında yüksek dizi benzerliği, sap ilmik yapısına uygun katlanma ve minimal katlanma serbest enerjisi (MFE) gibi değerlerdir(Bonnet et al. 2004; Wang et al. 2005; Zhang et al. 2006a). RNAfold ve Mfold gibi programlar ikincil yapıyı ve MFE değerlerini hesaplayarak miRNA tespitine olanak sağlayan, sıklıkla kullanılan yazılımlardır(Hofacker 2003; Zuker 2003). Ancak bu yazılımlar daha çok bulunan dizinin miRNA olup olmadığını kontrol için kullanılır.

Yeni miRNA bulmak için geliştirilen bir çok yazılım içerisinde miRDeep* yazılımı küçük RNA dizileme sonuçlarından miRNA çıktısı bulmak için geliştirilmiş, Java kodlamasını kullanan ve yapısında çeşitli alt programlarını barındıran bir uygulamadır. miRDeep*; FastQ, sekans hiza haritası (SAM), binary hiza haritası (BAM) gibi ham veriyi girdi olarak kabul eder. Çıktı olarak bilinen ve yeni miRNAların ekspresyon seviyelerini okumadaki sayılarına göre hesaplayarak vermesine ilaveten haritaladığı genom üzerindeki yerin pre-miRNA sap-ilmik katlanma yapısını verir. Ayrı bir görselde pre-miRNA'nın genom üzerindeki konumunu gösterir. Ayrıca TargetsScan algoritmasını kullanarak potansiyel hedef genlerini de sıralar(An et al. 2013).

1.2. Zeytin (*Olea europaea* L.)

Dikotiledonlardan olan Oleaceae ailesi, 30 takım yaprak dökken ağaç ve zeytin ağacını ve akrabalarını da içine alan yaklaşık 600 türü içerir(Cronquist 1981). *Olea* türü ismini Yunanca "elaia" veya Latince "oleum" kökünden almıştır ve dünya çapında yaklaşık 80 farklı isimle bilinir ve *Olea europaea* L.'nin de içinde bulunduğu 30 farklı türü barındırır. *Olea europaea* Akdeniz havzasının tipik bitkisidir ve genellikle sahil kesiminde bulunmakla beraber güneydoğa Avrupa, kuzey İran, Hazar Denizi güneyi, batı Asya ve kuzey Afrika dolaylarında yetişebilmektedir(Ryan and Robards 1998; Kaniewski et al. 2012). Zeytin üretiminde en üstlerdeki ülkeler sırasıyla, İspanya, İtalya, Yunanistan, Tunus, Suriye ve Türkiye'dir. (TÜİK 2013)

Aşırı acı tadından dolayı zeytin bitkisi ilk haliyle tüketilemediği için, salamura yapılarak veya yağı çıkarılarak faydalanılmaktadır. Zeytin yağı piyasası tüm zeytin endüstrisinin %90'lık kısmını kapsar ve çok önemli bir market payına sahiptir(Vossen 2007)

Türkiye İstatistik Kurumu 2013 Zeytin ve Zeytinyağı Raporuna göre ülkemiz zeytin ağacı varlığı yaklaşık 158 milyon adet olup, son 10 yılın zeytinyağı üretimi ortalaması yıllık yaklaşık 149 bin ton ve sofralık zeytin üretim ortalaması ise 453 bin tondur. (TÜİK 2014)

Zeytin yeryüzünde yetiştirilen en eski ağaçlardan birisidir(Foxhall 2007). Bilinen en eski zeytin yağı üretimine dair kalıntılar ise 6500 yıl öncesinin bugünkü İsrail topraklarında kalan Haifa şehrinde bulunmuştur(Galili et al. 1997).

Zeytin bitkisi içeriğinde çok çeşitli biyokimyasallar barındırır. Bunlardan öne çıkanlar flavonoidler, fenolik bileşikler, sekoiridoidler ve sekoiridoid glikozitleri, triterpenler, biyofenoller, benzoik asit türevleri ve şekerlerdir(Gariboldi et al. 1986; Le Tutour and Guedon 1992; Ryan et al. 2002).

Zeytin yağı hem geleneksel hem de modern tıpta önemli bir yere sahiptir. Laksatif özelliğinden dolayı içilerek veya açık yaralara sürülerek enflamasyonu engelleme özelliğinden uzun süredir faydalanılmıştır(Al-Khalil 1995; Hashmi et al. 2015). Antik Yunanistan'da zeytin yaprağı kaynatılarak yüksek tansiyona ilaç olarak kullanılmıştır(Lawrendiadis 1961). Geleneksel yöntemlere ilaveten zeytin yağının antidiyabetik(Jemai et al. 2009), anti kanser(Owen et al. 2000), antimikrobiyal(Capasso et al. 1995), antioksidan(Baldioli et al. 1996), anti hipertansif(Ferrara et al. 2000), anti enflamatuar(Bogani et al. 2007) etkileri olduğuna yönelik birçok yayın ve araştırma mevcuttur.

Literatürdeki ve zeytinin ve zeytinyağının insan sağlığına katkılarını doğrulayan çalışmalar dikkate alındığında, yapılan farmakolojik araştırmaların büyük çoğunluğunun zeytinin farklı kesimlerinin ham ekstraktı üzerinde yoğunlaştığı, ancak çok nadir çalışmaların izole edilen ve zeytine özgü olan oleuropein, maslinik asit, olenolik asit gibi saf bileşiklerin etkilerini araştırdığı görülür(Hashmi et al. 2015).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Pre-miRNA Data Setleri Oluşturma

Çalışmanın başladığı tarihte güncel halleriyle miRBase versiyon 21 (Kozomara and Griffiths-Jones 2013) ve PMRD (Plant microRNA Database)(Zhang et al. 2010) Ocak 2015 üzerinden pre-miRNA dizileri indirilerek tek bir fasta dosyasında birleştirildi.

Bunlara ilaveten yeni ve zeytine özgü miRNA data seti için daha önce okuması Pekin Genom Enstitüsü (BGI)'dan hizmet alımı olarak sağlanmış *Olea europaea cv. Ayvalık* bitkisinin küçük RNA deep-seq(Yanik et al. 2013) sonuçları kullanıldı. Temmuz yaprak, Temmuz pedisel, Kasım yaprak ve Kasım pedisel örneklerinin adaptörleri kesilmiş okumaları miRDeep* yazılımı aracılığıyla zeytin genom survey sekansına (GSS) haritalandı(An et al. 2013). Bu haritalama işlemi için ilk önce miRDeep* yazılımının alt paketi olan ve Bowtie algoritmasına(Langmead 2010) göre genomu indeksleyen "build_bwt_index" yazılımı ile GSS formatlandı. Daha sonra Linux tabanlı işletim sistemi üzerinde miRDeep* yazılımında minimum skor "0" ve minimum okuma sayısı "10" olarak ayarlandı. Program küçük RNA okumalarını yabancı zeytin genomuna haritaladı ve çıktı olarak pre-miRNA dizilerini ve küçük RNA ekspresyon seviyelerini verdi.

Dört kütüphanenin analizi sonucu miRDeep* yazılımının verdiği pre-miRNA dizileri toplanarak tek bir fasta dosyasında birleştirildi. Birleşik halinde birden fazla kopya barındıran diziler fastX_collapser isimli umuma açık lisanslı komut satırı kullanılarak silindi (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Daha sonra veritabanlarından alınan fasta dosyası ile birleştirilerek tüm veri setleri tek bir dosyada toplandı ve premirna.fa olarak isimlendirildi.

2.2. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonunda ambion firmasına ait trizol reaktifi kullanılmıştır ve (Hummon et al. 2007) protokolüne göre şu şekilde yapılmıştır:

Her bir örnek için 1ml % 75 konsantrasyonda etanol çözeltisi, 0,5 ml saf isopropilalkol

çözeltisi, 0.2 ml kloroform kullanılacak şekilde çözeltiler hazırlanarak -20°C 'de muhafaza edildi. 2ml'lik ependorf tüplere 1ml trizol reaktifi eklendi ve örneklere ait dokulardan yaklaşık 100 mg alınarak havanda sıvı azot kullanılarak toz haline getirildi. Toz numuneler hızlıca trizol reaktifi bulunan tüplere eklenip vortexlenerek iyice karışması sağlandı. Bu tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Daha sonra tüplerin üzerine 0.2 ml chloroform eklendi. Tüpler nazikçe ters-düz yapılarak karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 15 dk 4°C 'de 15.000 rpm'de santrifüj edilerek ve süpernatant faz yeni 2 ml'lik ependorf tüplere alındı. Üzerine 0,5 ml isopropilalkol eklenip, yumuşakça karıştırılarak 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 15.000 rpm'de 10 dakika 4°C 'de santrifüj edilerek süpernatanttan kurtulundu. Bu aşamada dipte çöken RNA görülebiliyordu. Dipte çökmüş olan RNA ya 1ml % 75 konsantrasyonda etanol eklenerek bir kez yıkama işlemi uygulandı. Tüpler 5 dakika 4°C 'de 8000 rpm'de santrifüj edildi ve hemen ardından etanol uzaklaştırıldı. Tüplerde etanol kalıntısı kalmaması için 10 dakika ağzı açık ve ters konumda bekletilerek etanolün uçması sağlandı. Tüpler kurduktan sonra oluşan RNA peletinin durumuna göre yaklaşık 40-50 ml steril su eklenerek RNAların çözülmesi sağlandı. Tüpler ısı bloğunda 57°C 'de 2-3 dk bekletilerek RNA'nın daha iyi çözünmesi sağlandı. Nanodrop 2000C model spektrofotometre cihazı (Thermoscientific) ile RNA konsantrasyonları belirlendi. %2'lik agaroz jel üzerinde yürütülerek RNAların bütünlüğü kontrol edildi.

2.3. Transkriptom Okumaları

Temmuz yaprak (TY), Temmuz pedisel (TP), Kasım yaprak (KY) ve Kasım pedisel (KP) olmak üzere dört ayrı RNA kütüphanesinin Illumina Hi-Seq cihazında okumaları BGI (Beijing Genome Institute) tarafından yapıldı. Elde edilen okumalar Trinity yazılımı (Grabherr et al. 2011) ile birleştirilerek, birleştirilmiş dosyalar TYb.fa, TPb.fa, KYb.fa, KPb.fa, olarak isimlendirildi.

2.4. BLAST ve RNAfold Aracılığıyla Biyoinformatik Analizler

NCBI Blast 2.2.28(Johnson et al. 2008) üzerinde pre-miRNA data setlerini içeren fasta dosyası premirna.fa veritabanı olarak tanımlandı. Linux terminal üzerinde gerçekleştirilen bu işlemde

\$ makeblastdb -in premirna.fa -dbtype nucl

komutu kullanıldı.

TYb.fa, TPb.fa, KYb.fa, KPb.fa kütüphaneleri bu veritabanı baz alınarak hizalandı. Bu işlemi yapmak için Linux terminal üzerinde “query” kısmı değişken olmakla beraber şu komut satırı uygulandı:

\$ blastn -db premirna.fa -query TYb.fa -outfmt 6 -out TY_premirna.xlsx

Çıkan sonuçlar arasından 65 nükleotidden kısa sonuç verenler ve aynı diziye denk gelenler manuel olarak silindi ve geriye kalan diziler katlanma yapısı ve MFE (Minimum Free Energy) değerlerini tespit etmeye yeni bir fasta dosyasında toplandı. Bu dosyaların isimleri iste sırasıyla TY_katlanma.fa, TP_katlanma.fa, KY_katlanma.fa, KP_katlanma.fa olarak verildi. Dizilerin MFE değeri ve katlanma yapıları iki boyutlu görüntüleri RNAfold(Hofacker 2003) yazılımı ile tayin edildi. Linux terminal üzerinde uygulanan bu işlem için girdi kısmı değişken olmakla beraber şu komut satırından faydalanıldı:

\$ RNAfold <TY_katlanma.fa >TY_MFE.txt -c

-C alt komutu katlanma yapılarının sıkı olarak yapıldığı algoritmadır, yanlış pozitif sonuçları azaltmak için bu alt komut tercih edildi. Bu komut satırı uygulandıktan sonra program aldığı fasta dosyasının içindeki tüm pre-miRNA dizilerinin MFE değerlerini hesaplayarak çıktı olarak tanımladığımız .txt uzantılı dosyada verir. Buna ilavete .ps uzantısıyla tüm dizilerin iki boyutlu katlanma yapılarının tahminini verir.

İkinci bir eleme işlemi yine manuel olarak gerçekleştirildi ve uygun katlanma yapısını göstermeyen diziler silindi. Geriye kalan dizilerin MFEI (MFE index) değerleri:

$$MFEI = \frac{(-MFE)}{Dizi\ uzunlu\u{g}u} \times 100 \quad (1.1)$$

GC yoğunluğu

formülüne göre hesaplandı(Bonnet et al. 2004). MFEI değeri 0,66'dan küçük olanlar üçüncü bir eleme ile silindi ve geriye kalan diziler pre-miRNA dizisi olarak kabul edildi.

2.5. miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi ve Gen Ontolojisi

Son eleme işlemi sonucu kalan pre-miRNAların korunmuş miRNAların olgun dizileri internet veritabanlarından, yeni miRNAlarınkiler ise miRDeep* yazılımının sonuçlarından temin edilerek her RNA kütüphanesinin ayrı ayrı olgun dizilerinin fasta dosyaları oluşturuldu. miRNAlar dizi benzerliğine dayanan tanıma mantığıyla mRNAları hedefleyerek keserler. Bu mantıkla hazırlanmış <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/> web tabanlı yazılımı, olgun miRNA dizilerini temel alarak, karşılık gelen birleştirilmiş RNA okuması üzerinde hedef gen araması yaptı ve miRNAların potansiyel olarak hedeflediği genler bir fasta dosyasında toplandı(Dai and Zhao 2011). Bu diziler Blast2GO-pro yazılımı aracılığıyla NCBI veritabanı üzerinde hizalandı, haritalandı, gen ontolojileri ve bazılarının enzim yolları belirlendi(Conesa et al. 2005).

2.6. miRNA Dizilerinin qRT-PCR ile Doğrulanması

Biyoinformatik çalışmalar sonrası seçilen miRNA'ların stem-loop reverse transkripsiyon analizi (Kantar et al. 2010) 'de belirtildiği gibi yapıldı. Bunun için yaprak ve pedisel kütüphanelerinden transkriptomda kullanılan aynı RNAlar kullanıldı. Seçilen miRNAların olgun dizilerinin 3' uçlarından itibaren 6 nükleotid stem-loop reverse transkripsiyon primer dizisinin (GTTGGVTCTTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC) sonuna eklendi. Kontrol olarak miR168 mikroRNAsı kullanıldı.(Ferdous et al. 2015) 1 µg RNA; 0.5µL 10 mM dNTP, 1µL stem-loop RT primer ile karıştırılarak üzerine 13.65 µL'ye tamamlayacak şekilde nüklaz-içermeyen distile su eklendi ve karışım hibridizasyon için 65 °C'de 5 dakika ve buz içerisinde 2 dakika bekletildi. Daha sonra 4 µL First Strand buffer (5X), 2 µL 0,1 M dithiothreitol (DTT), 0.1 µL RNaseOUT (40 ünite/µL) ve SuperScript III (200 ünite/µL) eklendi. Reverse transkripsiyon reaksiyonu 30 dakika 16°C'yi takip eden 60 döngülük 30 saniye 30°C, 30 saniye 42°C ve 1 saniye 50°C olacak şekilde ve son olarak 5 dakika 85°C'ye ayarlandı. Reverse transkripsiyon ürünleri SYBR Green I Master Kit (Roche, Almanya) kullanılarak LightCycler 480 II Real-Time PCR cihazı ile yükseltgenerek ifade ölçümleri yapıldı. Karışıma 10 µL 2X Master mix, 0.1 µL (100 pmol) miRNA dizisine özel ileri primer, 0.1 µL (100 pmol)

üniversal geri primer, 7.8 µL nüklaz-içermeyen distile su ve taslak dizi olarak 2.0 µL RT ürünü konuldu. qRT-PCR şartları 5 dakika 95 °C, 50 döngü boyunca 10 saniye 95 °C, 20 saniye 55 °C olarak tanımlandı ve erime eğrisi de 5 saniye 95 °C, 1 dakikaya 55 °C'ye ayarlanarak 30 saniye 40 °C'de soğutuldu. Her örnek için 3 teknik tekrar hazırlanarak bağıl katsayı değişimi $1,9^{-\Delta cT}$ olarak hesaplandı.

2.7. Hedef mRNAların qRT-PCR ile Doğrulanması

Seçilen miRNAların belirlenen potansiyel hedef dizilerinin ifade seviyelerini ölçmek için yaprak ve pedisel dokularından izole edilen RNA örnekleri kullanıldı. CDNA ilk dizisi oligo(dT) primer kullanılarak 20 µL reaksiyon karışımı ile M-MuLV reverse transkriptaz (Thermo Scientific, ABD) kiti ile üreticinin prosedürü takip edilerek hazırlandı. Hedef genlerin primerleri primer3 yazılımı v4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3>) aracılığıyla belirlendi. 2 µL cDNA taslak olarak kullanılarak 0.1 µL hedefe özel primerler, SYBR Gren I Master kit ile karıştırılarak LightCycler 480 II Real Time PCR sistemi (Roche, Almanya) aracılığıyla yükseltildi. Kontrol olarak zeytin 18S rRNA geni kullanıldı ve teknik tripliketler hazırlanarak ifade seviyeleri ölçüldü. qRT-PCR şartları 5 dakika 95 °C, 50 döngü boyunca 10 saniye 95 °C, 20 saniye 55 °C olarak tanımlandı ve erime eğrisi de 5 saniye 95 °C, 1 dakikaya 55 °C'ye ayarlanarak 30 saniye 40 °C'de soğutuldu. Her örnek için 3 teknik tekrar hazırlanarak bağıl katsayı değişimi $1,9^{-\Delta cT}$ olarak hesaplandı.

3. BULGULAR

Tablo 3.1. Temmuz Yaprak Sonuçları

miRNA Adı	MFEI	RPKM	Olgun miRNA	Hedef Açıklama	Hedef RPKM
miR156	0.844	3.06	TGACAGAA- GAGAGTGAGCAC	Squamosa Promoter- Binding Like Protein 16	1.26
pre-miRNA	GGGTAAAGGAGGTGACAGAAGAGAGTGAGCACACATGGTGTTTTCTTGTATGATATTCTCCATGCTTGAAGCTATGGGTGCTCACCTCTTTCTGTACACCCACCACTCTCTCTCTCTC				
Novel_06	0.847	1.64	TAACCTGAGAA- GAACCGTCGGG	NCBI'da bulunmayan dizi	1.81
pre-miRNA	CCGAACCATAACCGTCGGTCTTGATTCAAATACCGTTCGGGTATTTA- ACTTGAGAAGAACCGTCGGGTTCGGTCT				
Novel_02	0.661	0.91	TGTGGTATTGGT- TTCGGCTCAT	Chloroplastic- pentat- ricopeptide repeat containing	0.95
pre-miRNA	ACAAGAGTGATATTGATTCGGCTCATTTTTGCAGAAGCTGCATGATTAT- GAGCCGAAACCAATACCACACCATGTGTGT				
Novel_07	1.342	1.96	TTTTCAGATTTTTGGG- CGACT	inactive Leucine rich repeat receptor-like protein	3.55
pre-miRNA	TTGCCTTAAAAGTCGCCCAAAAAATCTGAAAATCTGGGCAGATTTTCAGA- ATTTTTGGGCAAATTTTAAGGCAATTT				
miR396	0.757	1.23	TTCCA- CAGCTTCTTGAAGTT	Growth-regulating factor 1-like protein	1.19
pre-miRNA	ATGCTTTTCCACAGCTTTCTTGAAGTTCTACTGCTGTTTTTTTCATTTCAAAA- ACATAAGAGGTTCAAGAAAGCTGTGGGAGAACATAGAAATTTAGGGCTTCT				
Novel_08	0.683	2.45	GAAAAGTTT- GGTTCGGTTCGGTT	Translational Initia- tion Factor	3.83
pre-miRNA	TAGGGGCGGGCGCGGGTTCGGTTCGGTTCGGTTCCTTTAGAACCGA- ACCGAACCAAATTTTCGGGTATCTA				
Novel_03	0.9	3.11	TCTGAATTGAGA- ACCGACGGGTA	Metal-nicotinamide transporter	34.06
pre-miRNA	AACCGAACCGTACCGTCGGTTCCTCAATTCAGATACCGTTCGGGTATTTA- ATTTGACAAGAACCGTCGGGTTCGGATCGGT				
miR529	0.698	4.96	AGAAGAGAGAGAG- CACAACCC	Squamosa Promoter- Binding Like Protein 16	1.26
pre-miRNA	GATGACAGAAGACGAAAGAGCACACTCCACCATAAACAAAGACCCTTTT- GCCGATGCCGGGTGTGCTCTCTCTTCTGTCAACAAATTTCTC				
Novel_01	0.765	24.49	TGGAAT- GGAGTTCTGCGGAAGG	CCA tRNA Nucleo- tidyl transferase 2	1.75
pre-miRNA	ATGAAGTTATTGGAATGGAGTTCTGCGGAAGGAAGGAATTTCTT- CCTGTTTCTTTCCGAGTCTCCCATTTCAACAATT				

Tablo 3.2. Temmuz Pedisel Sonuçları

miRNA Adı	MFEI	RPKM	Olgun miRNA	Hedef Açıklama	Hedef RPKM
miR166	0.896	73.52	TCGGAC-CAGGCTTCATTCCTC	Leucine zipper protein	-
pre-miRNA	GTGTTTGAGGGGATGTTGGCTGGCTCGAAGCAATCACAGTTTGCTGTTA-ACAGTGAGAATGTGAAGGCATCGGACCAGGCTTCATTCCTCTCAAA				
Novel_04	0.803	4.94	GGTGGGCGTGGGT-CGGTTCGGTT	Predicted: Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid-oxydase GLO4	4.1
pre-miRNA	TTAGAGGTGGACGTGGGTCGGTTCGGTTCGGTTCTAAAGAGAACCGAACCGAAC-CAAAATTTTCGGGTATCTAGTAAA				
Novel_10	0.8	7.17	TTGAATTGAGA-ACCGACGGGTA	NCBI'da bulunmayan dizi	0.554
pre-miRNA	AACTGAACTGTACCCGTCGGTTATCAATTCAGATACTCGTTCGGGTATTTAATTT-GACAAGAACCGTCGGGTTTCGGTTCAG				
Novel_01	0.765	5.52	TGGAATGGAGTTCTGCG-GAAGG	CCA tRNA Nucleotidyl transferase 2	3.192
pre-miRNA	ATGAAGTTATTGGAATGGAGTTCTGCGGAAGGAAGGAATTTTCCT-CCTGTTTCTTTCCGAGTCTCCCATTCACAACAATT				
Novel_05	0.755	0.81	AACAGAGGCCGGTGT-TACACA	NCBI'da bulunmayan dizi	0.444
pre-miRNA	ACGGCTTGAGAACAGAGGCCGCTTGTTACACAAAAATGTACATTTTTTATA-ACGACCCTGCCTTTGTTTCCAAGTCATTA				
Novel_12	0.724	3.73	TTCCAGAAATTCT-CGACGGCC	O-acyl Transferase	1.39
pre-miRNA	AAGGGAGCCCTTCCAGAAATTCTCAACGGCCAGGGCGAACCAGGCCGAA-GAGGGGTTTGGAATAGTTTTCAAC				
miR166	0.721	8.32	TCGGAC-CAGGCTTCATTCCTC	Hedef bulunamadı	-
pre-miRNA	TTTTGAGGGGAATGTTGTCTGGCTCGAGGCCACCAACAAGCTCATCGGATCA-ACGGCCTTATGTTAGTGTGTCGTCGGACCAGGCTTCATTCCTCCCAATT				
miR160	0.693	2.22	TGCCTGGCTCCCTGTAT-GCCA	Hedef bulunamadı	-
pre-miRNA	GTATACGTATATGCCTGGCTCCCTGTATGCCATTTGCAGAGCCCACCGAA-GAACCATGGCCCTCCGTGTATGGCGTATGAGGAGCCAAGCATATTCACATATCGT				
miR172	0.68	0.26	TGAATCTTGATGATGC-TACGC	Ethylene Responsive Transcription Factor	0.349
pre-miRNA	AGTCGTTTATTGCCGATGCAGCATCATCAAGATTCTCACCATCAAAGCTTTGGTA-GAGAGAGAGAGAGAGAGACTATATCAGTTTACCATCTTGCCTTTATATGTGAAT-CTTGATGGTGCTAC				

Tablo 3.2. Temmuz Pedisel Sonuçları (devamı)

miRNA Adı	MFEI	RPKM	Olgun miRNA	Hedef Açıklama	Hedef RPKM
miR319	1.09	3.21	UUGGACUGAAGGGAGCUCCC	TCP4 Transcription Factor	0.329
pre-miRNA	GAAGAGAGCTTTCTTCAGTCCAGTTATGGGAGGCCGTAGGATTCAATTTGCTGTT-GACTCATTTCATCCAAATGCTGTGTAGTTGATGAGTTTTACACGGTAACTGAGTGAAT-GATGCGAGAGTCAAGTTGAATCTTAAGCTTTCTGTACTTGGACTGAAGG-GAGCTCCCTT				
Novel_09	1.07	0.59	TCACATGGAGGGGGGCCAC	Hedef bulunamadı	-
pre-miRNA	ACACCCCCTTCACATGAAGGAGGGCCACACACAATAAAATGTTTCGTGGG-CCCCCTCCATGTGAGGGGGGTTGT				
miR156	1.07	1.18	UUGACAGAAGAUAGA-GAGCAC	Ethylene Insensitive 3	0.51
pre-miRNA	TTGTTGACAGAAGATAGAGAGCACAACCTGAACATATCCATGGTTGTTTTGT-GAATGAGCAGCTTGTGCTCTCTAATCTTCTGTCAATTAATTTTCT				
Novel_11	0.96	2.91	TCACATGGAGGGGGGCCAC	Hedef bulunamadı	-
pre-miRNA	CACCCCCTCACATGGAGGGAGGGGCCACATACAATAAAATATTCGTGGG-CCCCCTCCATGTGAGAGGAGTGT				
miR171	0.95	0.6	UGAUUGAGCCGUG-CCAAUAUC	A-b-hydrolase domain containing protein	2.95
pre-miRNA	CATACGGGATATTAGTGCGGTTCAATTAGAAAGCCGTGCTCTTTATATTTA-GAGCTCAGTTATTTGATTGAGCCGTGCCAATATCACGTAC				
miR390	0.94	2.12	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC	4-alpha glucanotransferase DPE 2	15.53
pre-miRNA	AGTATAGAAGAATCTTTAAAGCTCAGGAGGGATAGCGCCGTAAGGATCTATATTT-TACATCATTAGTGGCGCTATCTATCCTGAGTTTCATGGGTTGTTCTTGCT				
Novel_03	0.9	1.83	TCTGAATTGAGAACCGACGGTA	NCBI'da bulunmayan dizi	2.56
pre-miRNA	AACCGAACCGTACCCGTCGGTTCTCAATTCAGATACCCGTTCCGGTATTTA-ATTTGACAAGAACCGTCGGGTTCCGGATCGGT				
Novel_02	0.88	0.52	TGTGGTATTGGTTTCGGCTCAT	Pentatricopeptide containing protein	1.25
pre-miRNA	ACACACATGGTGTGGTATTGGTTTCGGCTCATAATCAT-GCAGCTTCTGCAAAAATGAGCCGAATCAATATCACTCTTGT				
miR159	0.85	2.86	GAGCUCCUUGAAGUCCAAUU	Nuclear Valosin containing protein	34.93
pre-miRNA	GAGCTCCTTGAAGTCCAAAAGAGGTTCTTTCCGGGAAAATTGAGCTGCTAATCCAT-GGATCCCCTCAACCCTATCCATATCTATAGATCCATATTGGATAGGTTTGTGGGTT-GCATGTATCAGGAGCCTGCATTTCTCAAGTTGGATCCTTCTTTGGATTGAAGG-GAGCTCTACAC				
miR167	0.84	0.4	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUU	Probable GTP diphosphokinase RSH3	1.24
pre-miRNA	ATCGTGCACCACTAGCAGATGAAGCTGCCAGCATGATCTTAACTCGCCTTT-GATCAACATCGACTCGGGGAGAGATCAGATCATGCGGCAGCTTACCTGTT				

Tablo 3.3. Kasım Yaprak Sonuçları

miRNA Adı	MFEI	RPKM	Olgun miRNA	Hedef Açıklama	Hedef RPKM
miR156	0.9829	3.352	TTGACAGAAGATAG AGAGCAC	Ethylene insensitive 3	20.978
pre-miRNA	AGAAAATTAATTGACAGAAGATTAGAGAGCACAAGCTGCTCATTACAAAACAACCA TGGATATGTTTCAGTTGTGCTCTCTATCTTCTGTCAACAA				
Novel_03	0.9000	1.225	TCTGAATTGAGAAC CGACGGTA	NCBI'da bulunmayan dizi	0.558
pre-miRNA	AACCGAACCGTACCCGTCGGTTCTCAATTCAGATACCCGTTCCGGGTATTTAATTTGAC AAGAACCCTCGGGTTCGGATCGGT				
miR166	0.8958	27.681	TCGACCAGGCTTC ATTCTC	NCBI'da bulunmayan dizi	0.337
pre-miRNA	GTGTTTGAGGGGGATGTTGGCTGGCTCGAAGCAATCACAGTTTGCTGTAA CAGTGAGAATGTGAAGGCATCGGACCAGGCTTCATTCCTCTCAA				
Novel_14	0.8615	1.296	GAAAATTTTGGTT CGTTTCGGTT	Oxysterol-binding protein- related protein 1C-like	0.206
pre-miRNA	AATTAGAGGTGGGTGCGGGTCGGTTCGGTTCGGTTCCTAAAGAGAACCGAACCGAAC CGAACTTTTCGGGTATCTAG				
Novel_16	0.8512	2.164	TATCTGAATTGAGA ACCGACGGG	Putative membrane bound NAC transcription factor 2	3.473
pre-miRNA	CCGAACCGTACCCGTCGGTTCTCAATTCAGATACCCGTTCCGGGTATTTAATTTGACAA GAACCGTCCGGTTCGGATCGGT				
Novel_06	0.8474	3.361	TAAGTTGAGAAGA ACCGTCGGG	NCBI'da bulunmayan dizi	1.308
pre-miRNA	CCGAACCATACCCGTCGGTTCTTGATTCAAATACCCGTTCCGGGTATTTAAGTTGAGAA GAACCGTCCGGTTCGGTTC				
miR166	0.8333	4.121	TCGACCAGGCTTC ATTCCCC	NCBI'da bulunmayan dizi	0.337
pre-miRNA	TTTTTTGAGGGGAATGTTGTCTGGCTCGAGAATCTTTTGTTTGATCAATTCATAGAC AAATTAGATCTGTTGCAAGTGTGTGCGGACCAGGCTTCATTCCTCCCAATTA				
Novel_13	0.7951	3.776	CCGTCGGAGTGTAT ACGGCCGCC	Hedef bulunamadı	-
pre-miRNA	GACTTGACCGTCCGAGTGTATACGGCCGCCACCACCGTTGGTTCGGGCCGT GTGCGCCTGAC				
Novel_01	0.7647	0.819	TGGAATGGAGTT CTGCGGAAGG	pentatricopeptide repeat- containing protein	2.340
pre-miRNA	ATGAAGTTATTGGAATGGAGTTCTGCGGAAGGAAGGAATTTCTCTGTTTC TTCCGAGTCCTCCCATTCACAATT				
miRfl2309	0.7637	449.479	CACCAAAGGCCT CTGCCCTC	Hedef bulunamadı	-
pre-miRNA	TGGAGGGGACACCAAAGGCCTCTGCCCTCCATCCCTGGATGGATAGAGAGGGAG GGCAGAGCTTTTGGTTTTT				
Novel_15	0.6956	3.263	ATGGATTGCTGA AGGATTTAT	mitochondrial substrate carrier family protein-B-like	0.247
pre-miRNA	GGAACTTCTATTAATTTCTTGAGTCCATAGAAATTAATATTGCTATGGATTGTTGAA GGATTTATAGAGAAAGTT				

Tablo 3.4. Kasım Pedisel Sonuçları

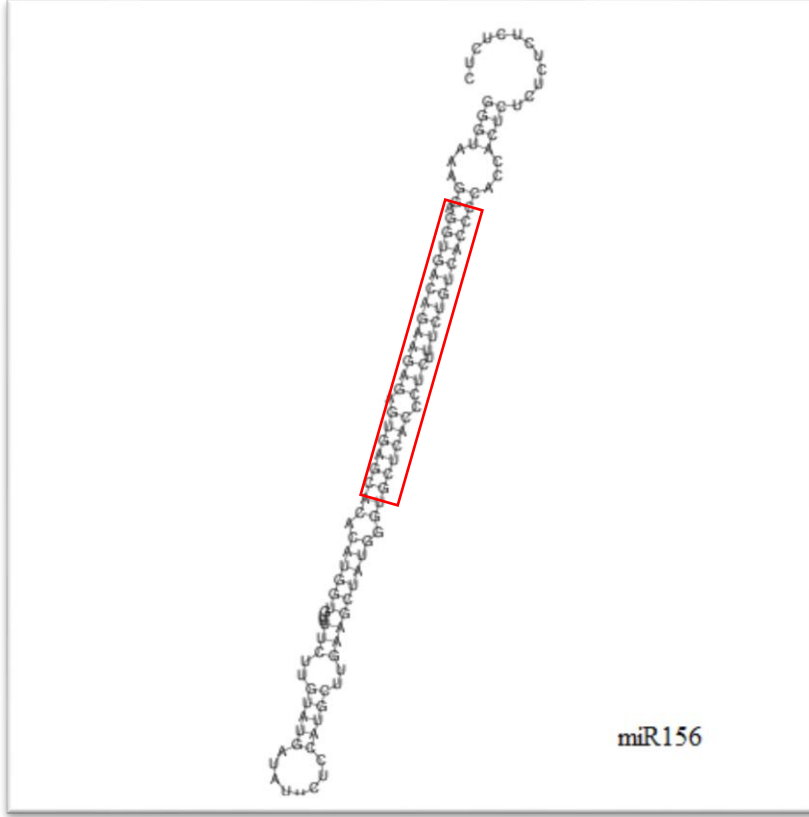
miRNA Adı	MFEI	RPKM	Olgun miRNA	Hedef Açıklama	Hedef RPKM
Novel_20	1.3500	4.63	TTTTCAGATTTT TGGGCGACT	Inactive Leucine-rich repeat receptor-like protein	0.86
pre-miRNA	GCCTTAAAAGTCGCCCAAAAATTCTGAAAATCTGCCCAGATTTTCAGATTTTTTGGGC GAGTTTTAAGGCAA				
Novel_21	1.3409	2.23	TCACATGGAGGG GGGCCAC	Hedef Bulunamadı	-
pre-miRNA	TTACACCCCCCTCACATGGAGGGGGCCACGAACATTTATTGTGTGTGGGCCCTC CTCCATGTGAAGGGGGTGT				
miR156	0.9829	0.463	TTGACAGAAGAT AGAGAGCAC	Hedef-1 Squamosa Promoter binding like protein Hedef-2 Ethylene Insensitive 3	2.684 2.983
pre-miRNA	AGAAAATTAATTGACAGAAGATTAGAGAGCACAAGCTGCTCATTACAAAA CAACCATGGATATGTTCAAGTTGTGCTCTCTATCTTCTGTCAACAA				
Novel_18	0.9756	12.555	TCACATGGAGGG GGGCCAC	Hedef Bulunamadı	-
pre-miRNA	TTACACCCCCCTCACATAGAGGGGGCCACACACAATAAAAATATTCATGGGCCCCCT CCATGTGAGAGGGGTGA				
Novel_22	0.9410	7.628	TCTGAATTGAGA ACCGACGGGTA	NCBI'da bulunmayan dizi	0.871
pre-miRNA	AACCGTACCCGTCGGTCTCAATTCAGATACCCGTTTCGGGTATTTAATTTGAC AAGAACCGTCGGGTTTCGGTTCAGTTTCG				
miR159	0.8355	8.121	TTTGGATTGAAG GGAGCTCTA	Post-GPI attachment to proteins factor 3	16.319
pre-miRNA	GAGCTCCTTGAAGTCCAAAAGAGGTTCTTTCGGGGAAAATTGAGCTGCTAATCCATG GATCCCTCAACCCTATCCATATCTATAGATCCATATTGGATAGGTTTGTGGGTTGCATGT ATCAGGAGCCTGCATTTCTCAAGTTGGATCCTTCTTGGATTGAAGGGAGCTCTA				
miR164	0.8279	3.302	TGGAGAAGCAGG GCACGTGCA	NAC-domain containing protein	0.455
pre-miRNA	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCATTAACCTCATGCAAGAGATGTCCATTTTC ACTTGATAAATGAGTTAGTCCTTCATGTGCCCTTCTTCCCCATC				
Novel_19	0.8032	1.802	TCTGAATTGAGA ACCGACGGGTA	NCBI'da bulunmayan dizi	0.871
pre-miRNA	AACCGAACCTAACTGTTCTTATCAAATTAATACCGGAACGGGTATTTAAAT TGAGAACCGACGGGTATGGTTCGGTT				
Novel_17	0.7730	1.908	GAGGTGTAAAGT GGGTTGGGTTG	GTP binding protein OBGM	0.554
pre-miRNA	CGAGCCATGCCAACCAACCCACTTTACACCTCTAGTACAAATAGAGGTGTAAAGTT GGTTGAGCTAGTATGACTAGACAC				
Novel_01	0.7647	14.29	TGGAATGGAGTTCT GCGGAAGG	CCA tRNA nucleotidyltransferase 2	0.327
pre-miRNA	ATGAAGTTATTGGAATGGAGTTCTGCGGAAGGAAGGAATTCCTCCTGTTTCTTTCCG AGTCTCCCATCCAACAAT				

Tablo 3.4. Kasım Pedisel Sonuçları (devamı)

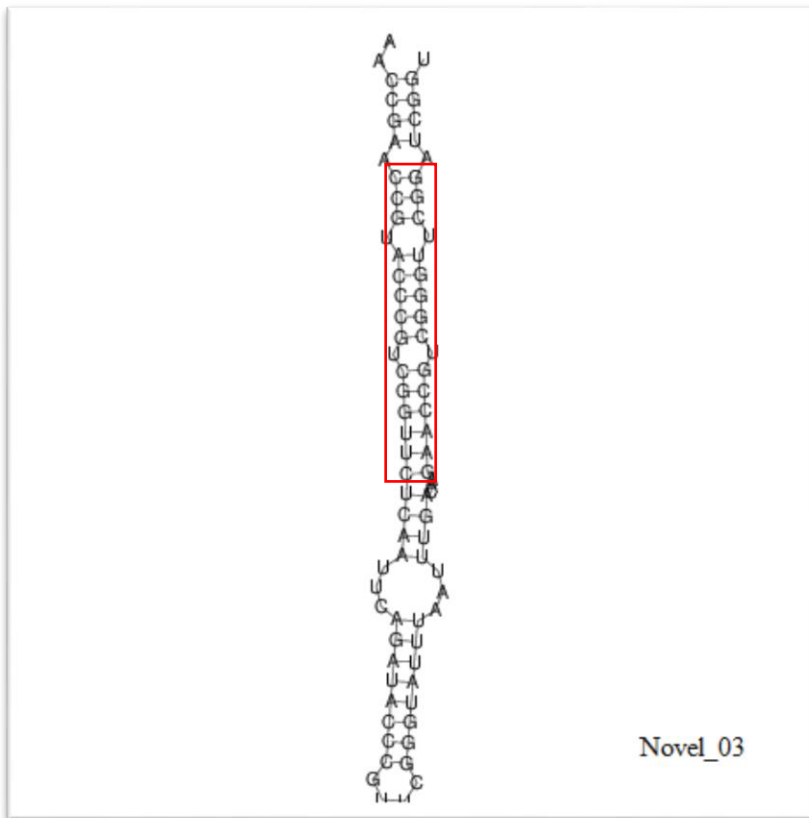
miR319	0.7586	6.569	TTGGACTGAAGG GAGCTCCCT	Hedef Bulunamadı	
pre-miRNA	AAGGGAGCTCCCTTCAGTCCAAGTACAGGAAACTTAAGATTCAACCTGACTCTCGCA TCATTCATTACAGTTACGATGCATAATTAATCAACTACACAGTATTGGATGAATGAGTC GACAGCAAATTGAATCCTACTGTCCCCATAACTGGACTGAAGAAAGCTCTTTTC				
Novel_05	0.7545	1.458	AACAGAGGCCGG GTTGTTACACA	Protein phosphatase 2C 6	2.92
pre-miRNA	ACGGCTTGAGAACAGAGGCCGCGTTGTTACACAAAAATGTACATTTTTTATA ACGACCCTGCCTTTGTTTCCAAGTCATTA				
miRf12309	0.7537	860.653	CACCAAAGGCCT CTGCCCTTC	Hedef Bulunamadı	
pre-miRNA	TGGAGGGGACACCAAAGGCCTCTGCCCTTCCATCCCTTGGATGGATAGAGA GGGAGGGCAGAGCTTTTGGTTTTTTT				
miR166	0.7391	2.788	TCGGACCAGGCT TCATTCCCC	Hedef Bulunamadı	
pre-miRNA	TAATTGGGGGGAATGAAGCCTGGTCCGACAACGCTTGCAAGAGATCTATTT TGTTTATGAATTGATCGAAACAAAAGAGTTCTCGAGCCAGACAACATTCCC CTCAA				
miR160	0.7062	1.533	TGCCTGGCTCCCT GTATGCCATT	Hedef Bulunamadı	
pre-miRNA	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCATTTGCAGAGCCACCGAAGAACCGATGGCC CTCCGTGTATGGCGTATGAGGAGCCAAGCATAT				
miR171	0.7029	1.162	TTGAGCCGTGCC AATATCACG	Scarecrow-like protein	5.897
pre-miRNA	GTACGTGATATTGGCACGGCTCAATCAAATAACTGAGCTCTAAATATAAAGA GCACGGCTTTCTAATTGAACCGTACTAATATCCCGTAT				
Novel_23	0.7000	3.32	AGAACCGAAGAA CCGAATAAGAA	Magnesium transporter NIPA2-like	9.569
pre-miRNA	GATTCGGTTCTTATTCGGTTCTTCGGTTCTTGGTCTAGAACCGAGAACCGAA CCGTACCCGTCGGTTCTCAATTC				
Novel_02	0.6606	2.365	TGTGGTATTGGTT TCGGCTCAT	Exosome complex component RRP43	3.18
pre-miRNA	ACAAGAGTGATATTGATTCGGCTCATTTTTGCAGAAGCTGCATGATTATGAG CCGAAACCAATACCACACCATGTGTGT				

3.1. mikroRNA Katlanma Yapıları

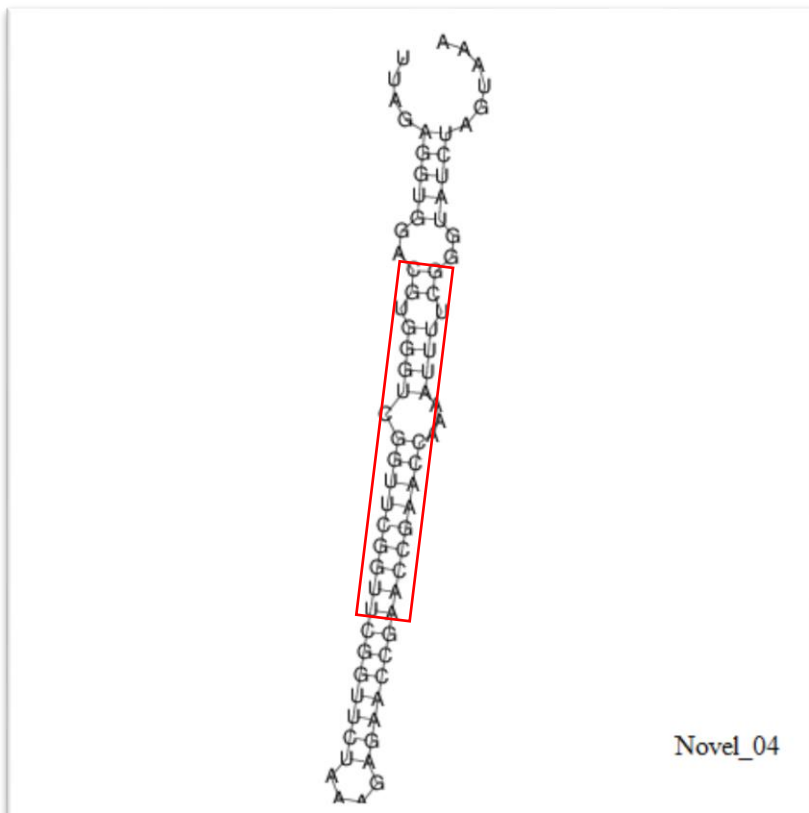
Aşağıda şekilleri verilen mikroRNAların pre-miRNA yapıları RNAFold yazılımı ile elde edilmiş olup her bir şekil bir miRNA'yı veya miRNA ailesini temsil etmektedir. Kırmızı çerçevesi ise miRNAların olgun kısımlarını işaret etmektedir.



Şekil.3.1.1 miR156 RNAfold katlanma yapısı



Şekil 3.1.6. Novel_03 RNAfold katlanma yapısı



Şekil 3.1.7. Novel_04 RNAfold katlanma yapısı

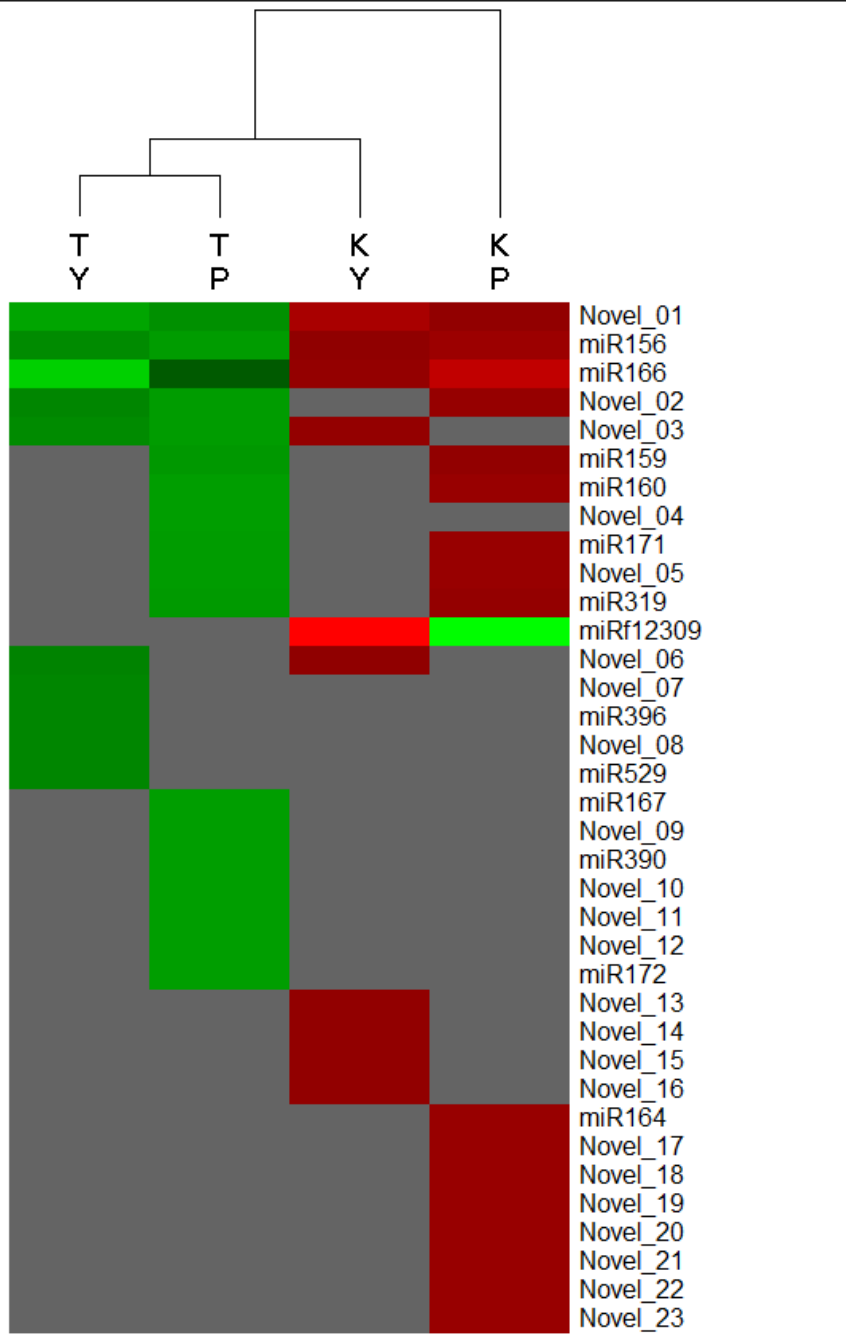
3.2. miRNA Ekspresyon RPKM

Rows : - Objective function : R=-1.#QO
- Sum of all pairwise distances of neighboring rows (path length): S=139.020

Columns : - Objective function : R=0.268
- Sum of all pairwise distances of neighboring columns (path length): S=1649.936
- Linkage rule: McQuitty's criteria

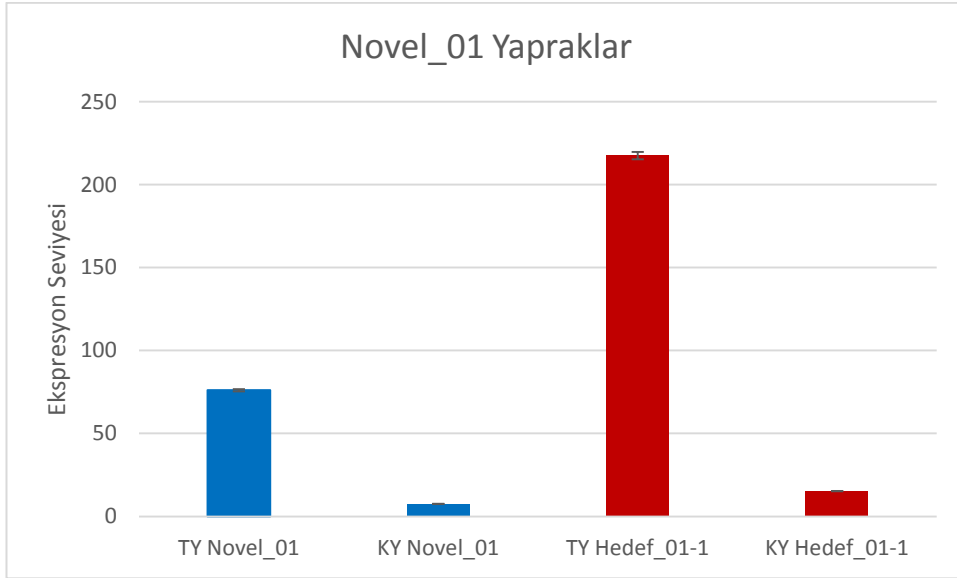
Dissimilarity : - Euclidean distance

The colors scale:
Min = -226.66 0.00 Max = 226.66

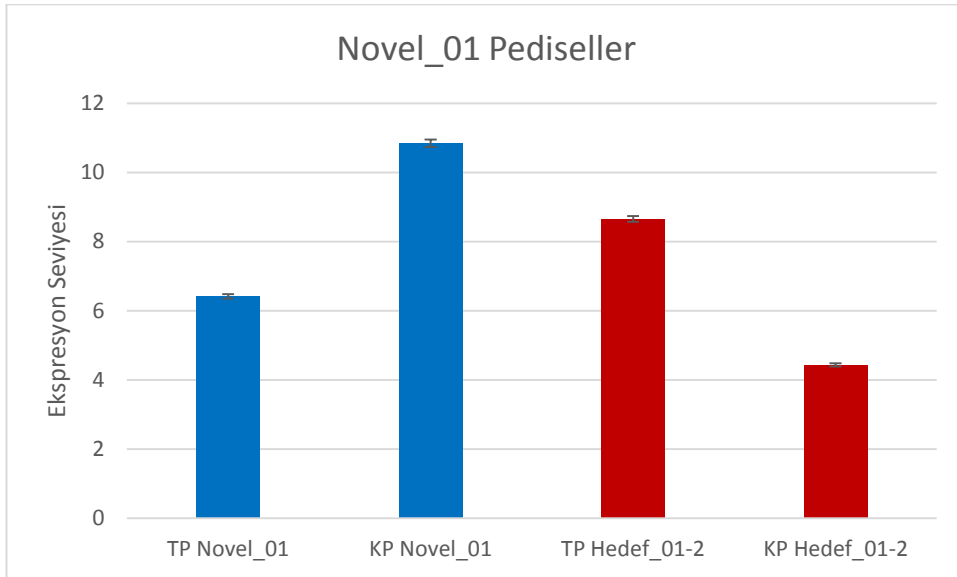


Şekil 3.2.1. miRNA RPKMlerinin Heatmap Grafiği

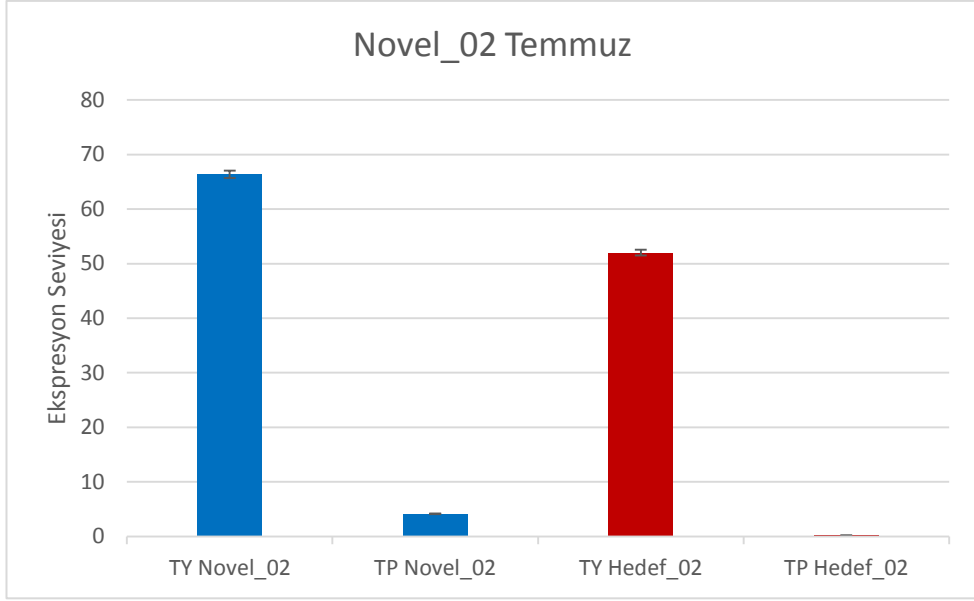
3.3. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Sonuçları



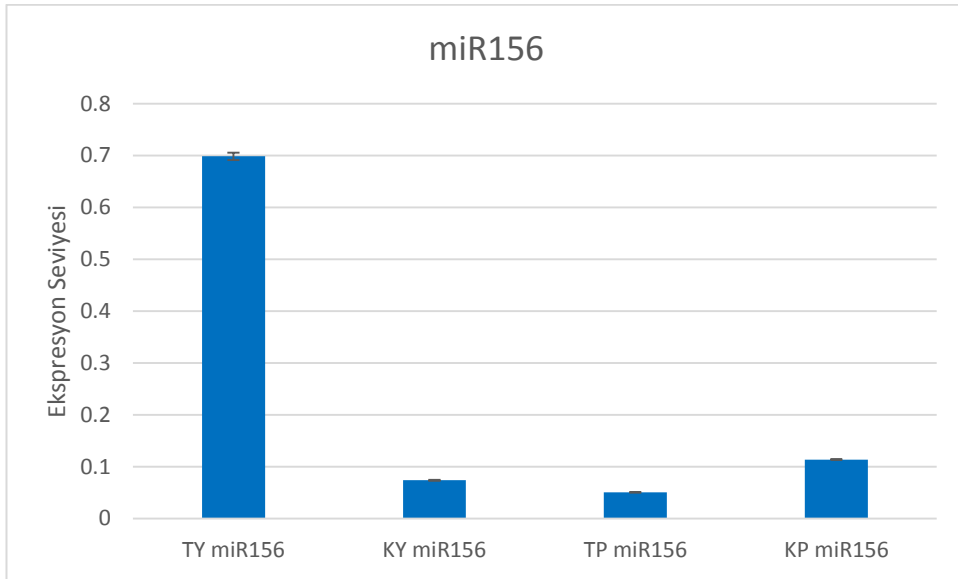
Şekil 3.3.1. Novel_01 miRNA Yaprak dokusunda ekspresyonu ve hedef geni "RubisCO subunit 4" mRNA seviyeleri



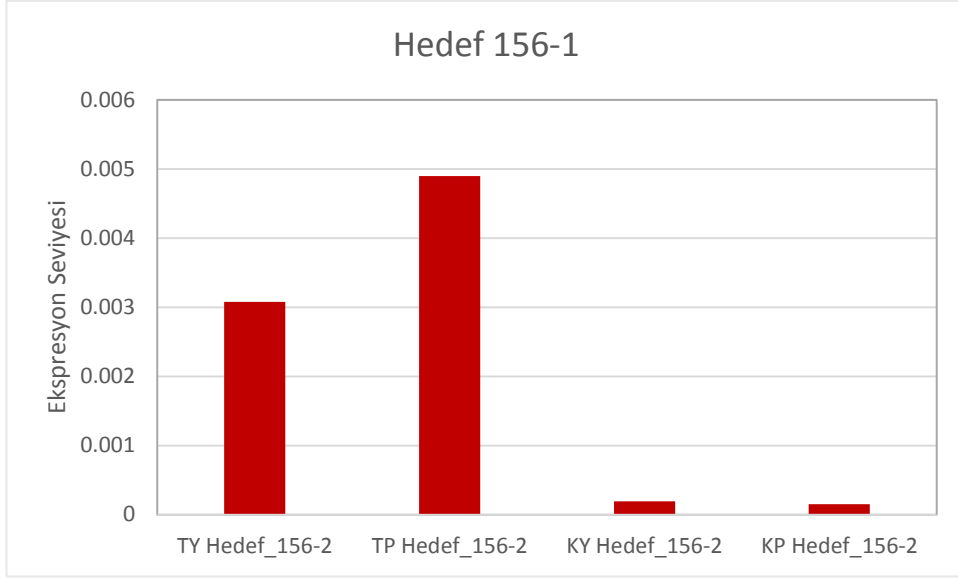
Şekil 3.3.2. Novel_01 miRNA pedisel dokusunda ifadesi ve hedef geni "CCA tRNA Nucleotidyl transferase 2" mRNA seviyeleri



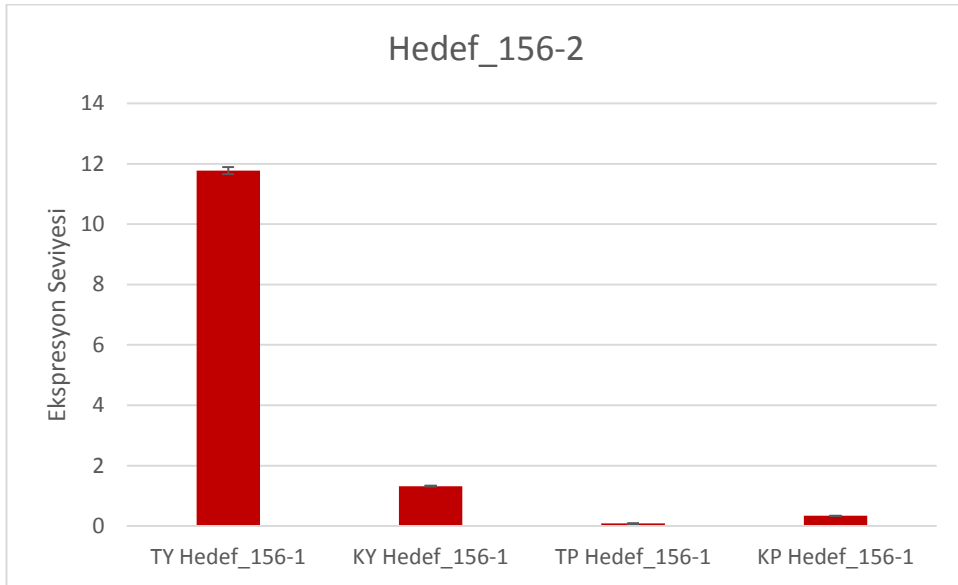
Şekil 3.3.3. Novel_02 miRNA Temmuz ayı ifadesi ve hedef geni "Chloroplastic Pentatricopeptide Repeat-Containing" mRNA seviyeleri



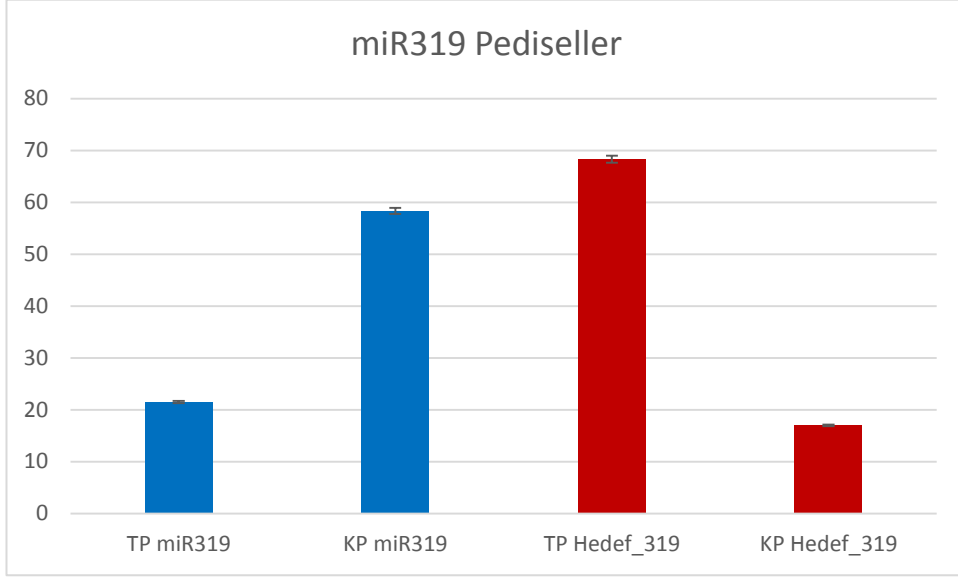
Şekil 3.3.4 miR156 miRNA ifade seviyeleri



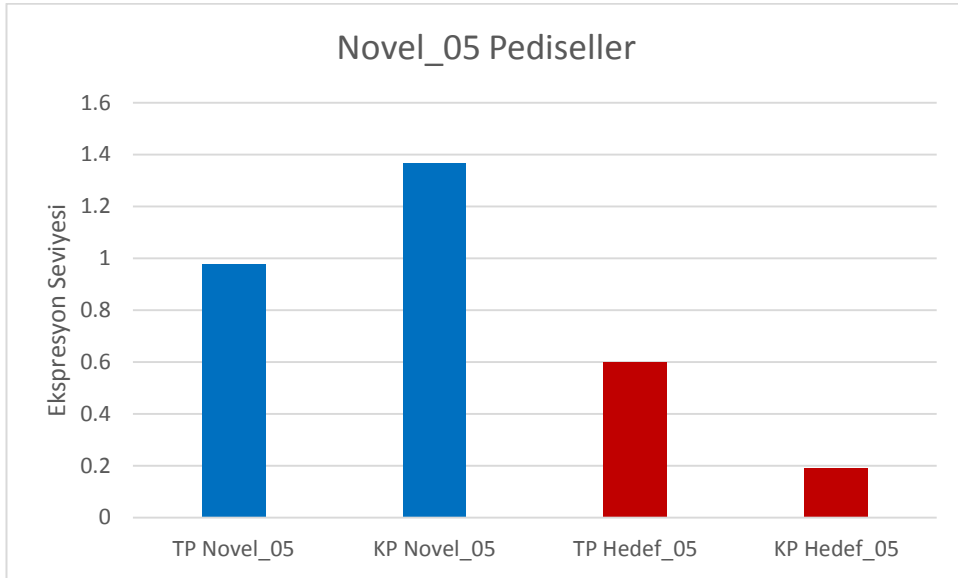
Şekil 3.3.5. miR156 hedef geni "Squamosa promoter binding-like protein 2" mRNA ifade seviyeleri



Şekil 3.3.6. miR156 hedef geni "Ethylene insensitive 3 " mRNA ifade seviyeleri



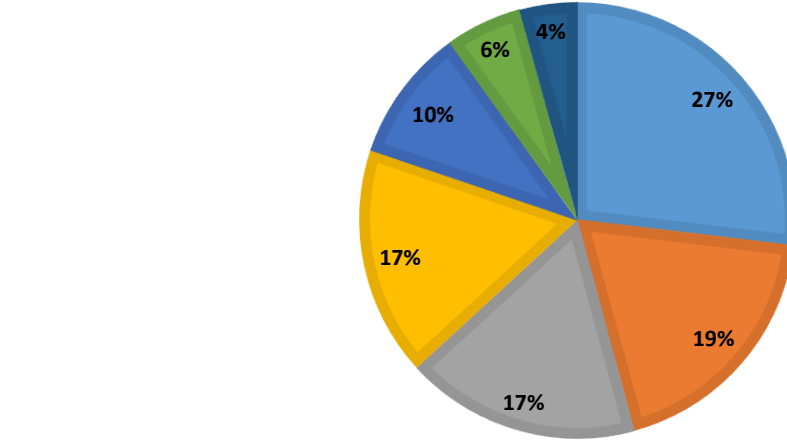
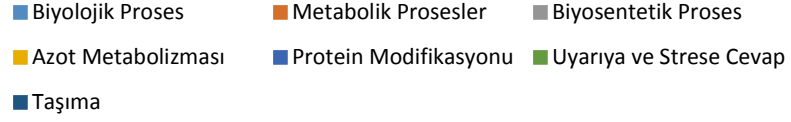
Şekil 3.3.7. miR319 Pedisel dokularında miRNA ifadesi ve hedef geni “TCP 4” mRNA ifade seviyeleri



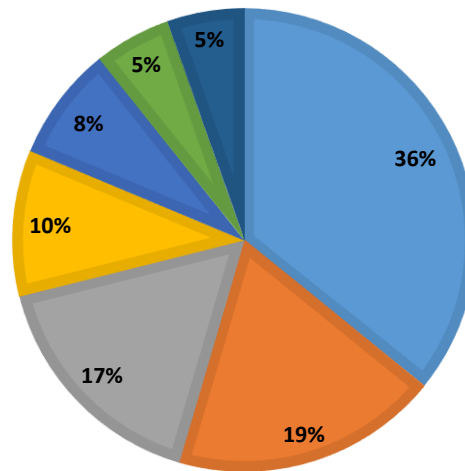
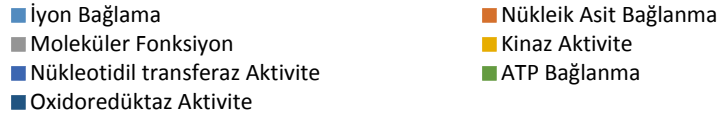
Şekil 3.3.8. Novel_05 pedisel dokularında miRNA ifadesi ve hedef geni “Protein Phosphatase 2C 6” mRNA ifade seviyeleri

3.4. Blast2GO Anotasyon Sonuçları

Aşağıdaki pasta grafiklerinde Blast2GO gen onyoloji analiz sonuçlarına göre dört kütüphanedeki potansiyel hedef genlerin katıldığı biyolojik prosesler ve genlerin moleküler fonksiyonların yüzdeleri verilmiştir.



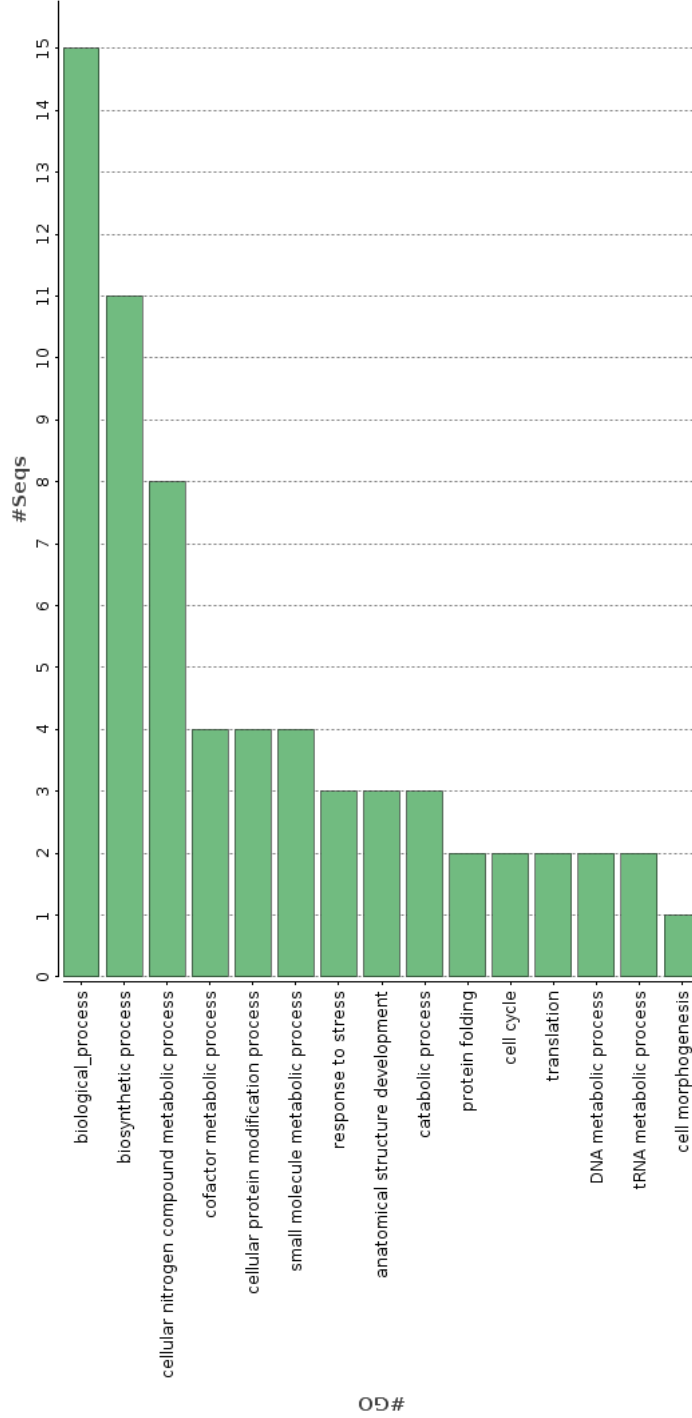
Şekil 3.4.1. Dört kütüphanedeki hedef adayı genlerin katıldığı biyolojik proseslerin yüzdeleri



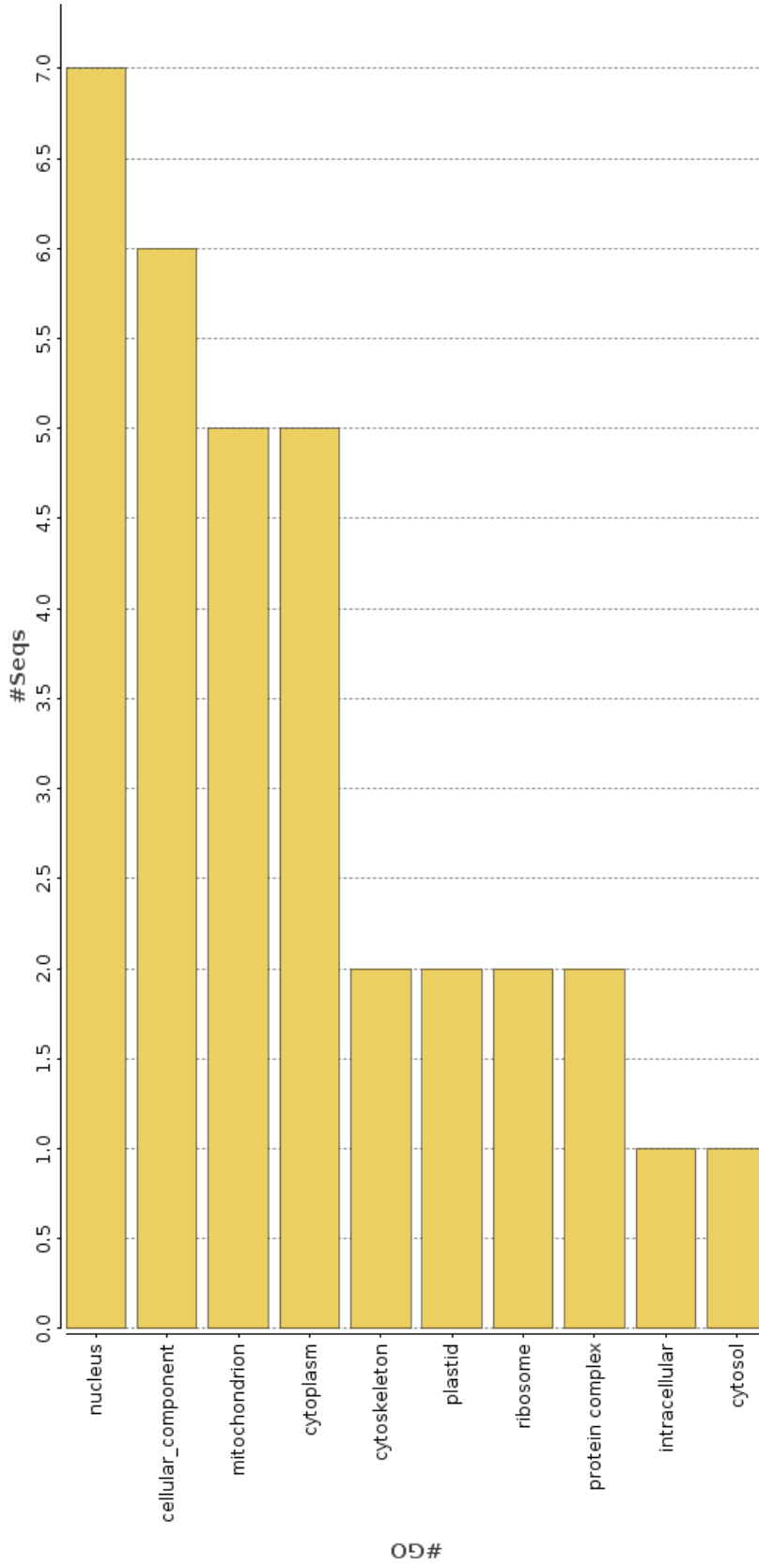
Şekil 3.4.2. Dört kütüphanedeki hedef adayı genlerin moleküler fonksiyonlarının yüzdeleri

Aşağıdaki sütun grafiklerinde tüm kütüphanlerin hedef genlerinin ayrı ayrı biyolojik prosesleri, moleküler fonksiyonları, hücre içinde buldukları konumlar ve mRNA dizisinin NCBI veritabanında eşleştiği en yakın organizmaların bilgileri ayrıntılı olarak verilmiştir.

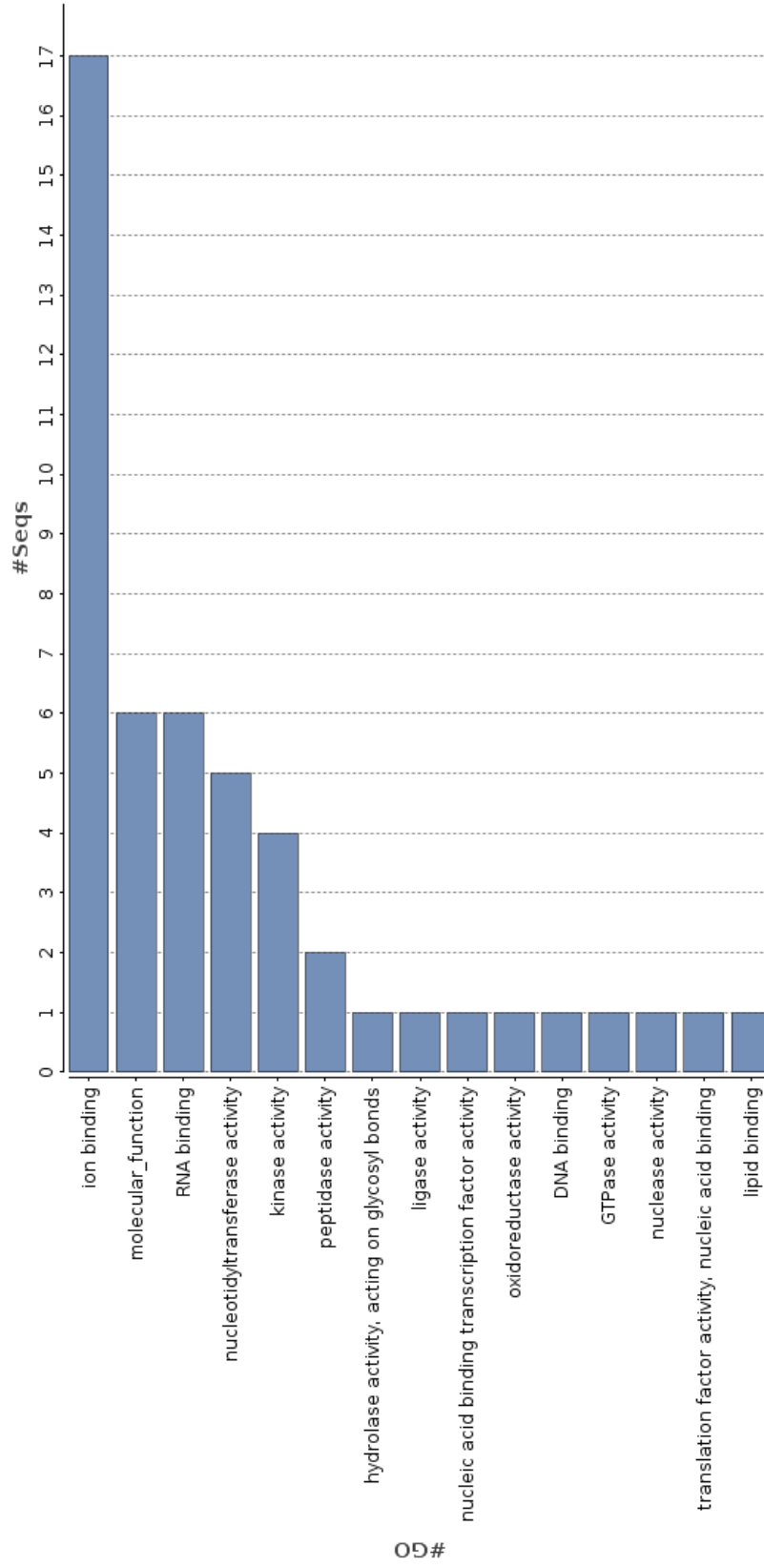
3.4.1. Temmuz yaprak kütüphanesi



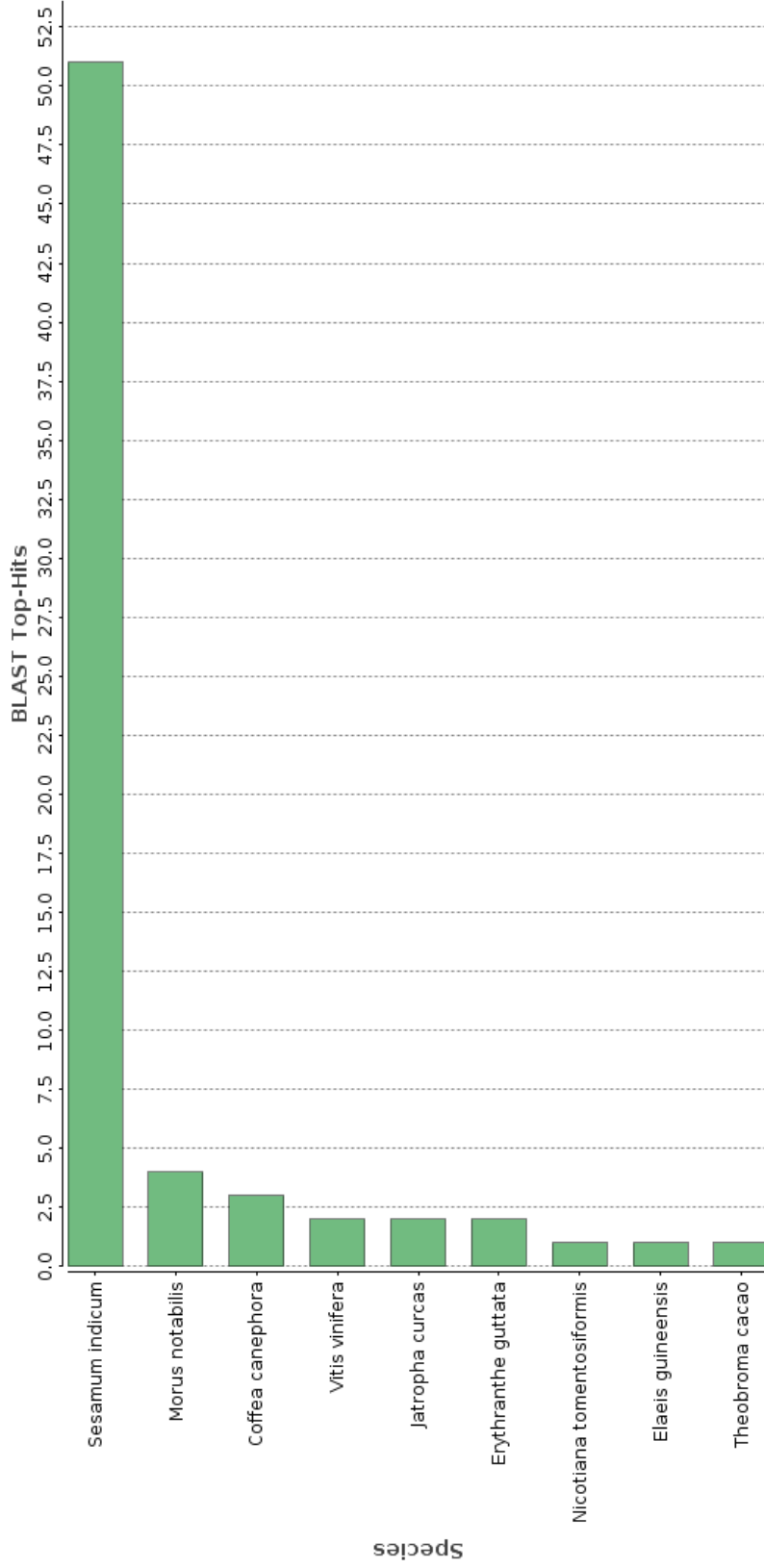
Şekil 3.4.1.1. Temmuz yaprak kütüphanesi hedeflerinin katıldığı biyolojik prosesler



Şekil 3.4.1.2. Temmuz yaprak kütüphanesi hedef proteinlerinin hücre içi konumları

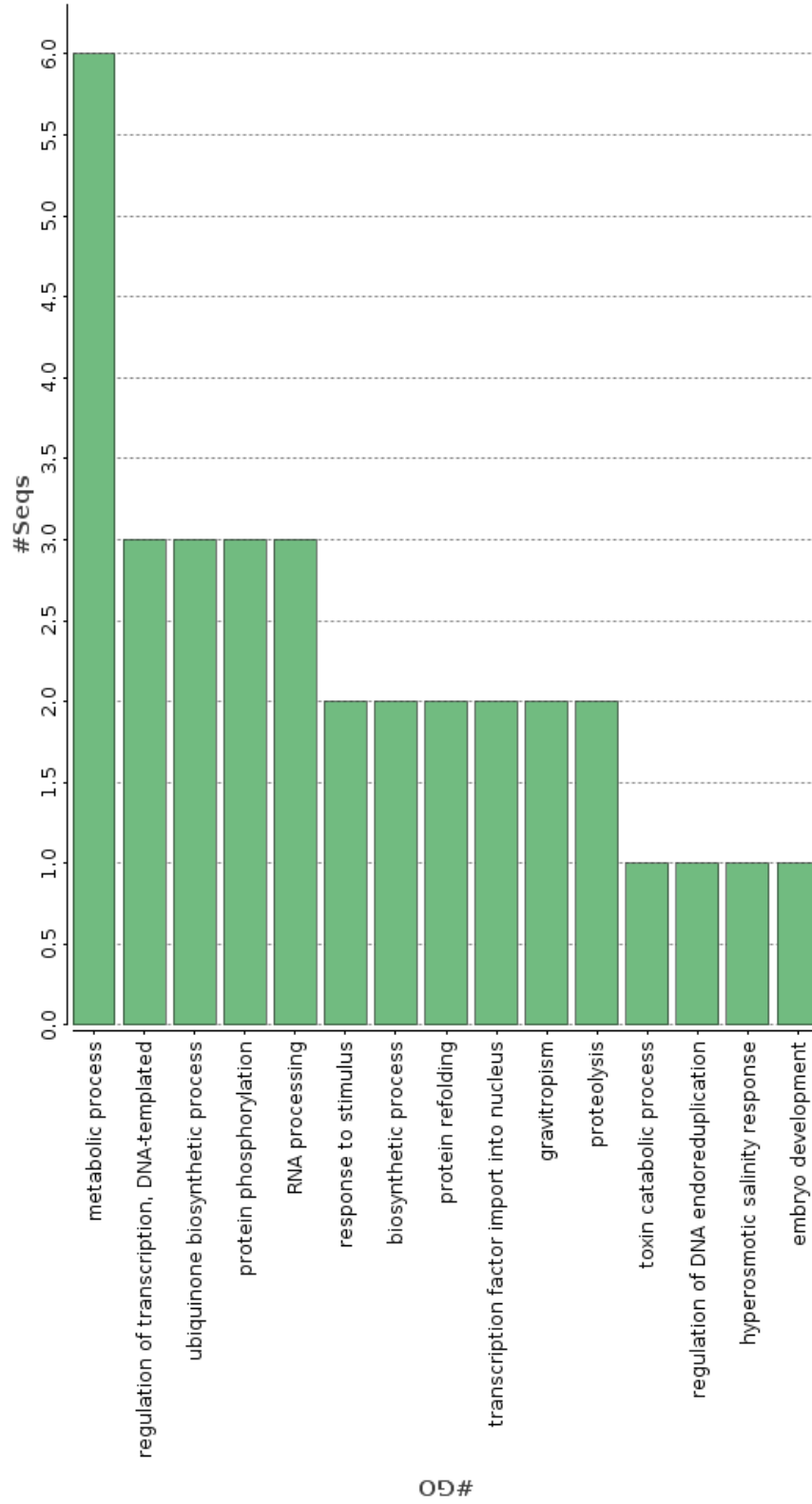


Şekil 3.4.1.3. Temmuz yaprak kütüphanesi hedef proteinlerinin katıldığı moleküler fonksiyonlar

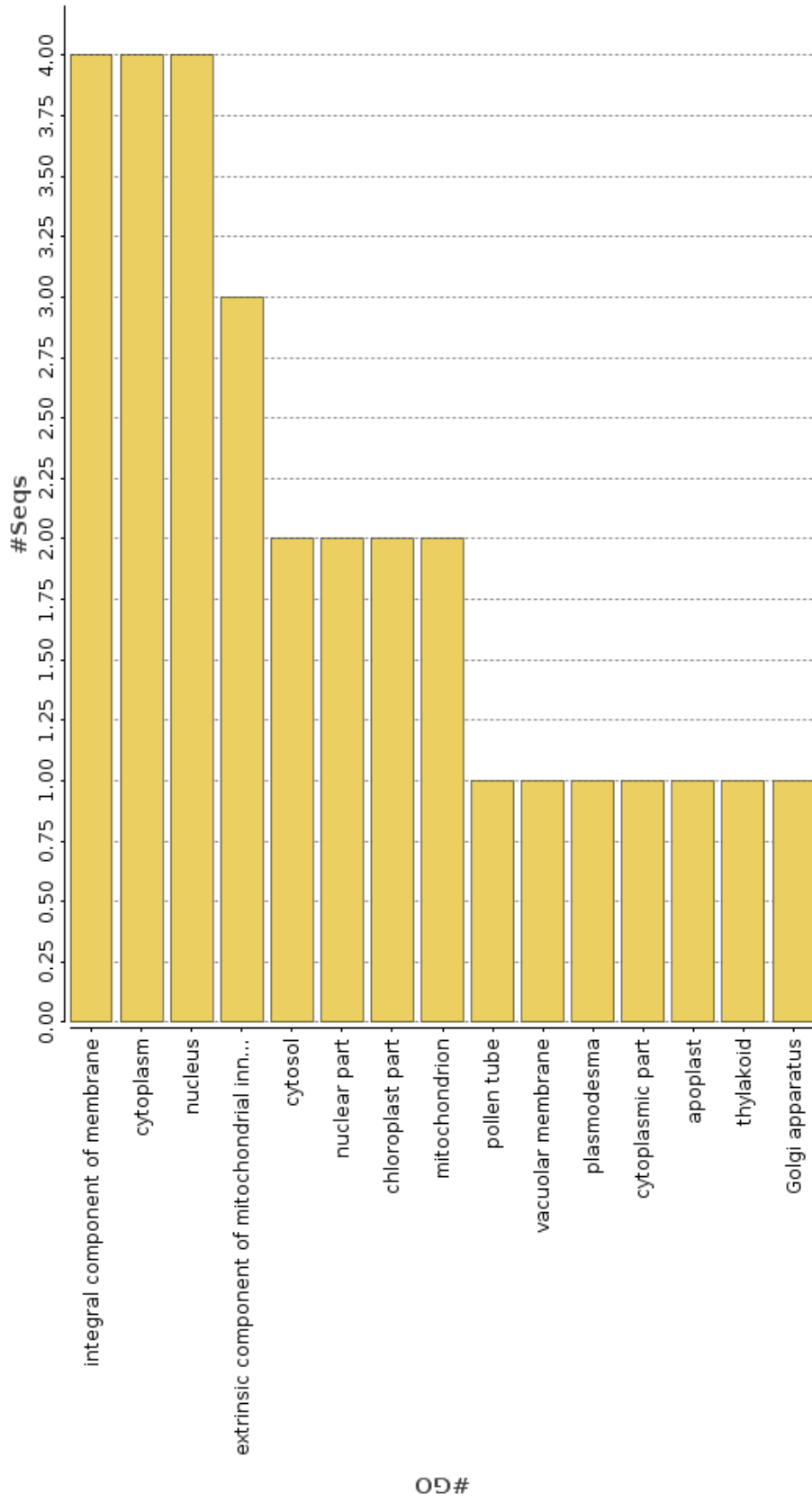


Şekil 3.4.1.4. Temmuz yaprak kütüphanesi hedef proteinlerine veritabanında karşılık gelen organizmalar

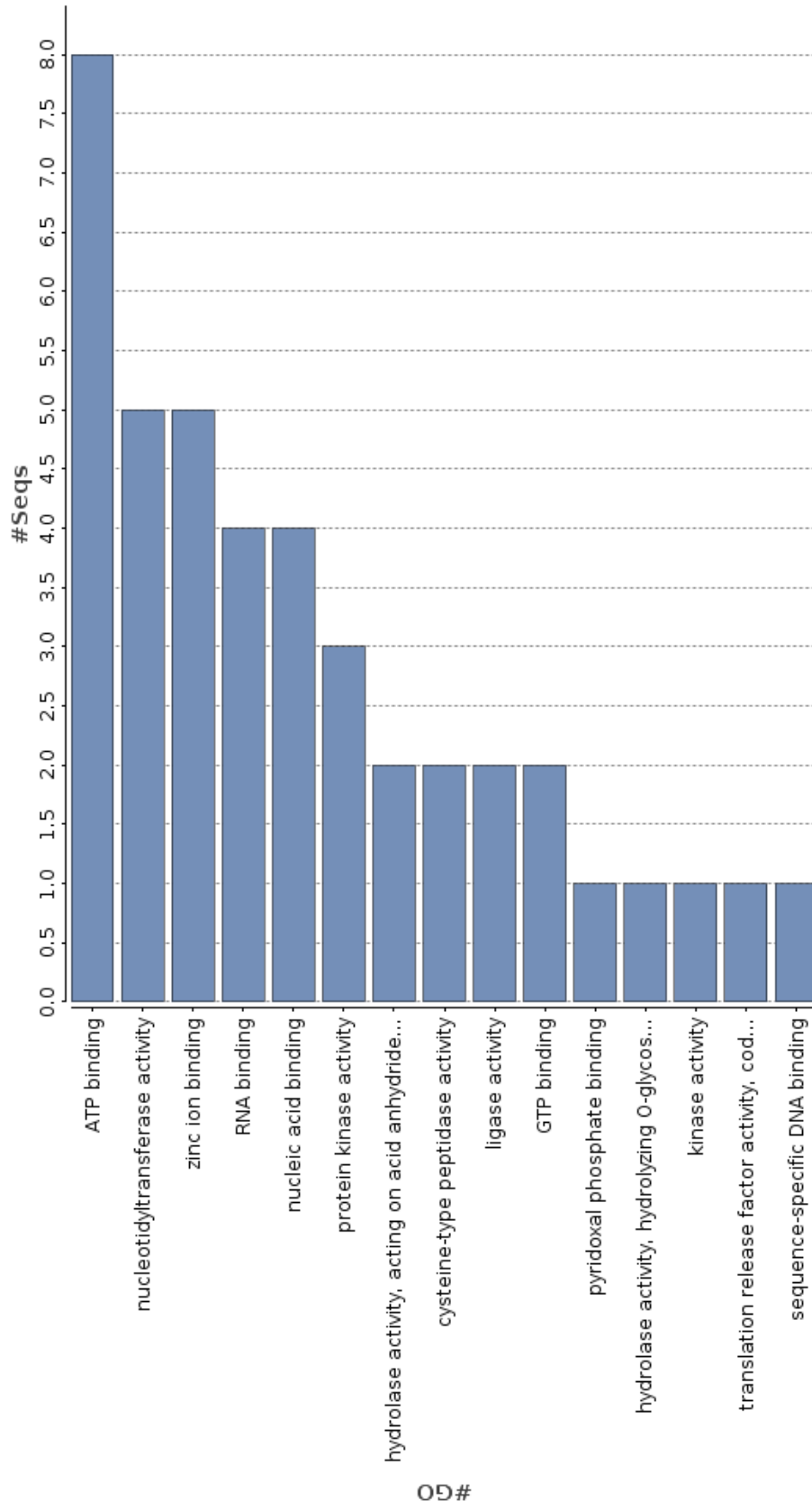
3.4.2. Temmuz pedisel kütüphanesi



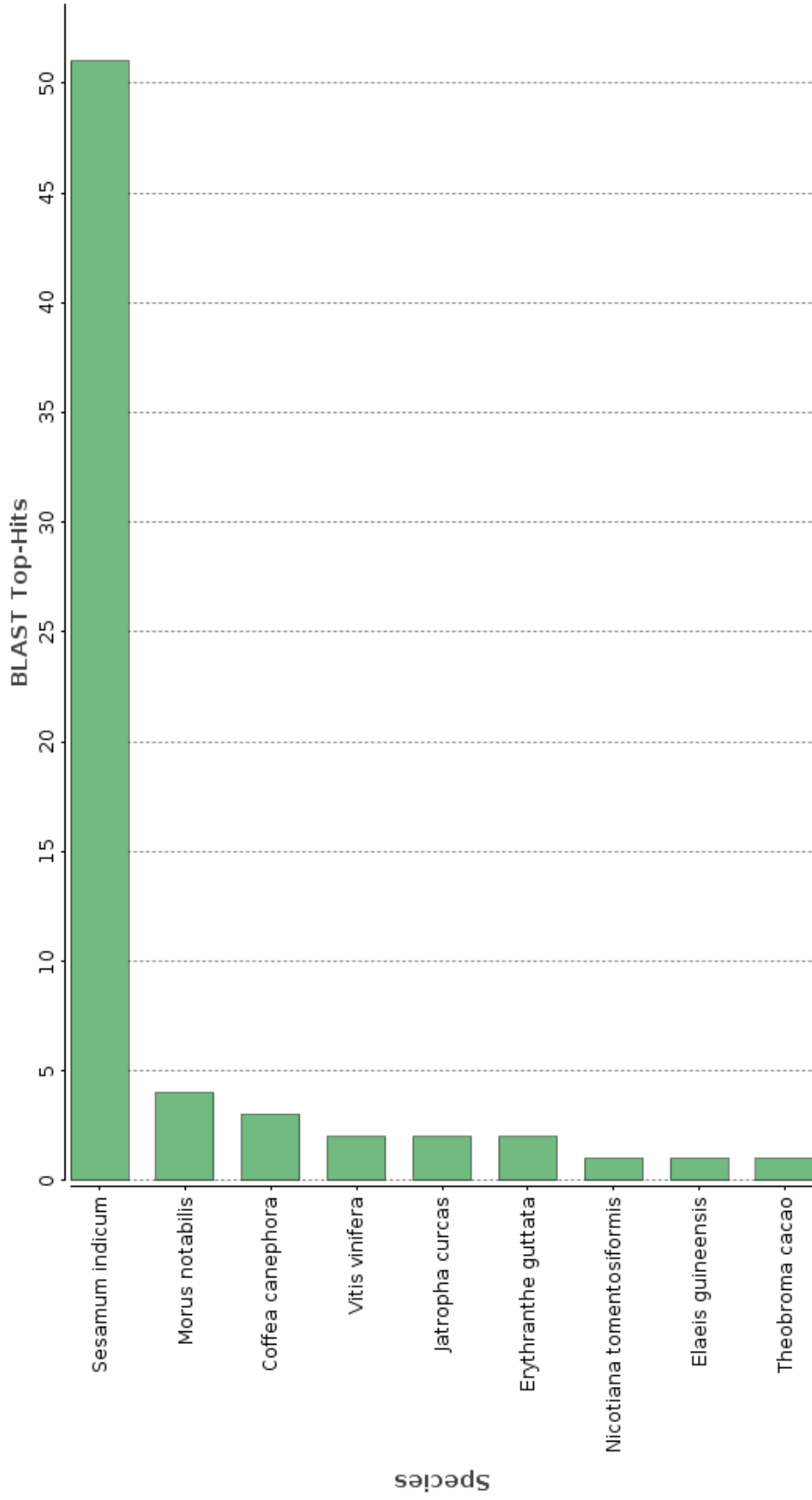
Şekil 3.4.2.1. Temmuz pedisel kütüphanesi hedeflerinin katıldığı biyolojik prosesler



Şekil 3.4.2.2. Temmuz pedisel kütüphanesi hedef proteinlerinin hücre içi konumları

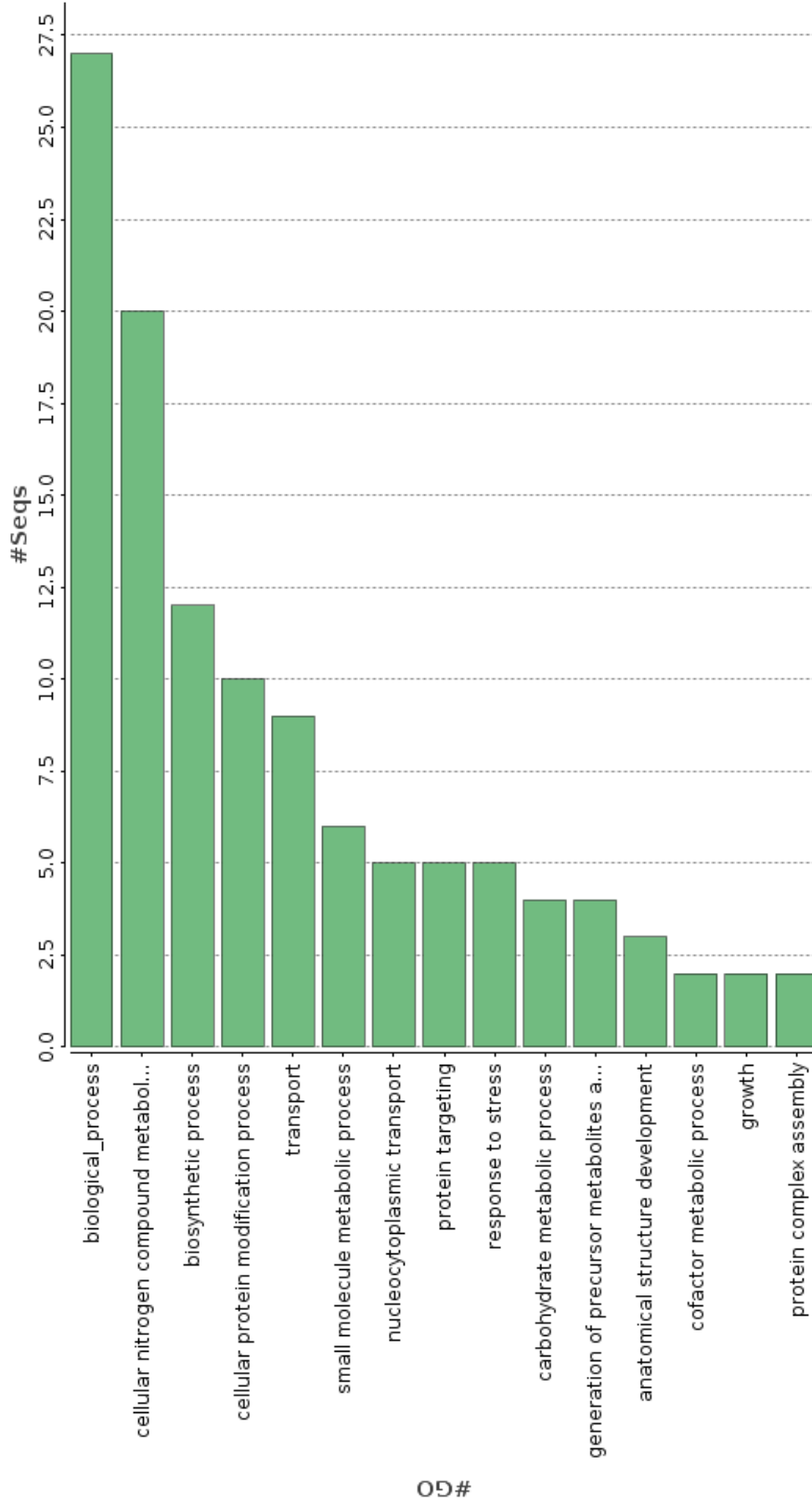


Şekil 3.4.2.3. Temmuz pedisel kütüphanesi hedef proteinlerinin katıldığı moleküler fonksiyonlar

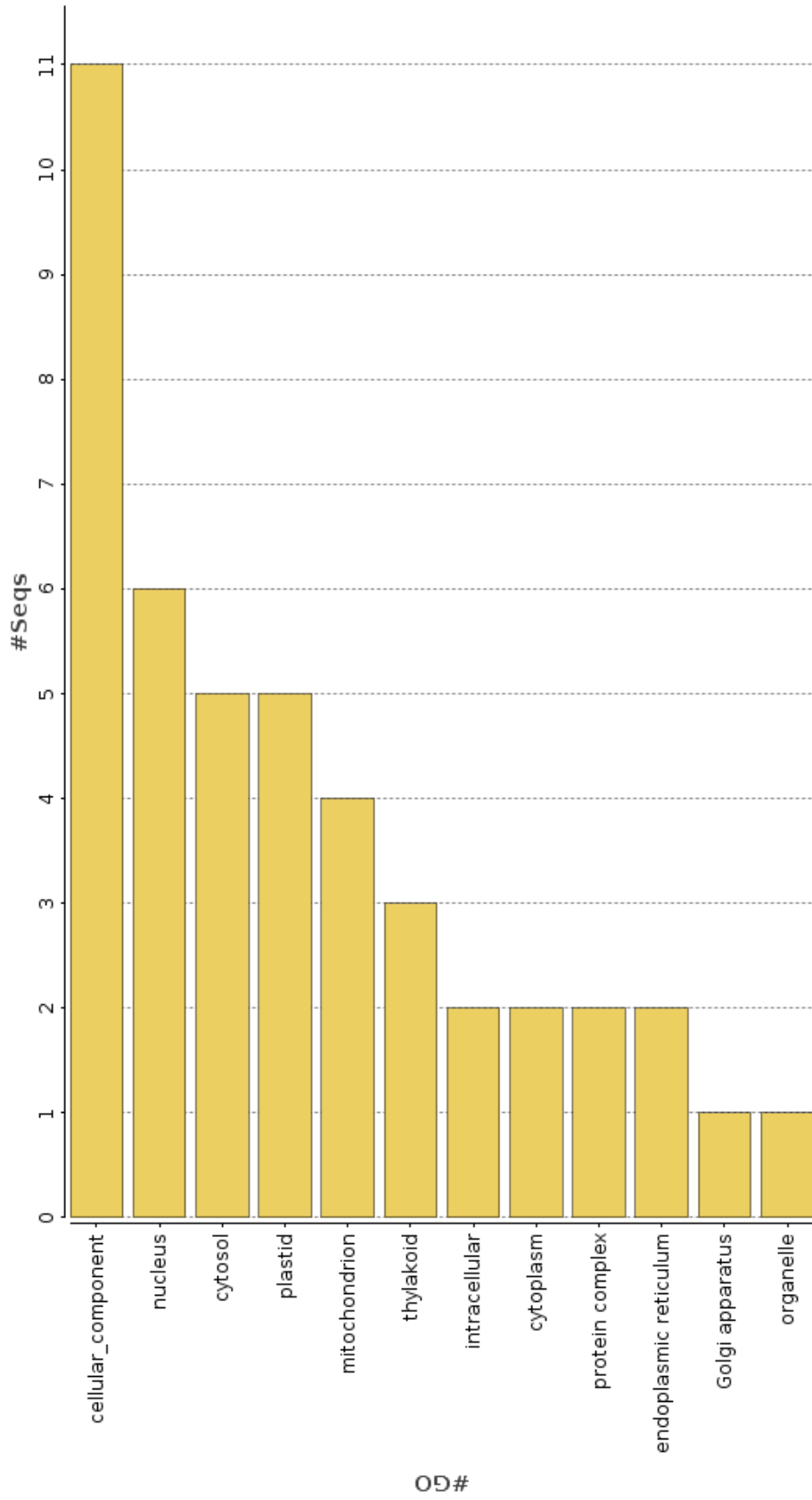


Şekil 3.4.2.4. Temmuz pedisel kütüphanesi hedef proteinlerine veritabanında karşılık gelen organizmalar

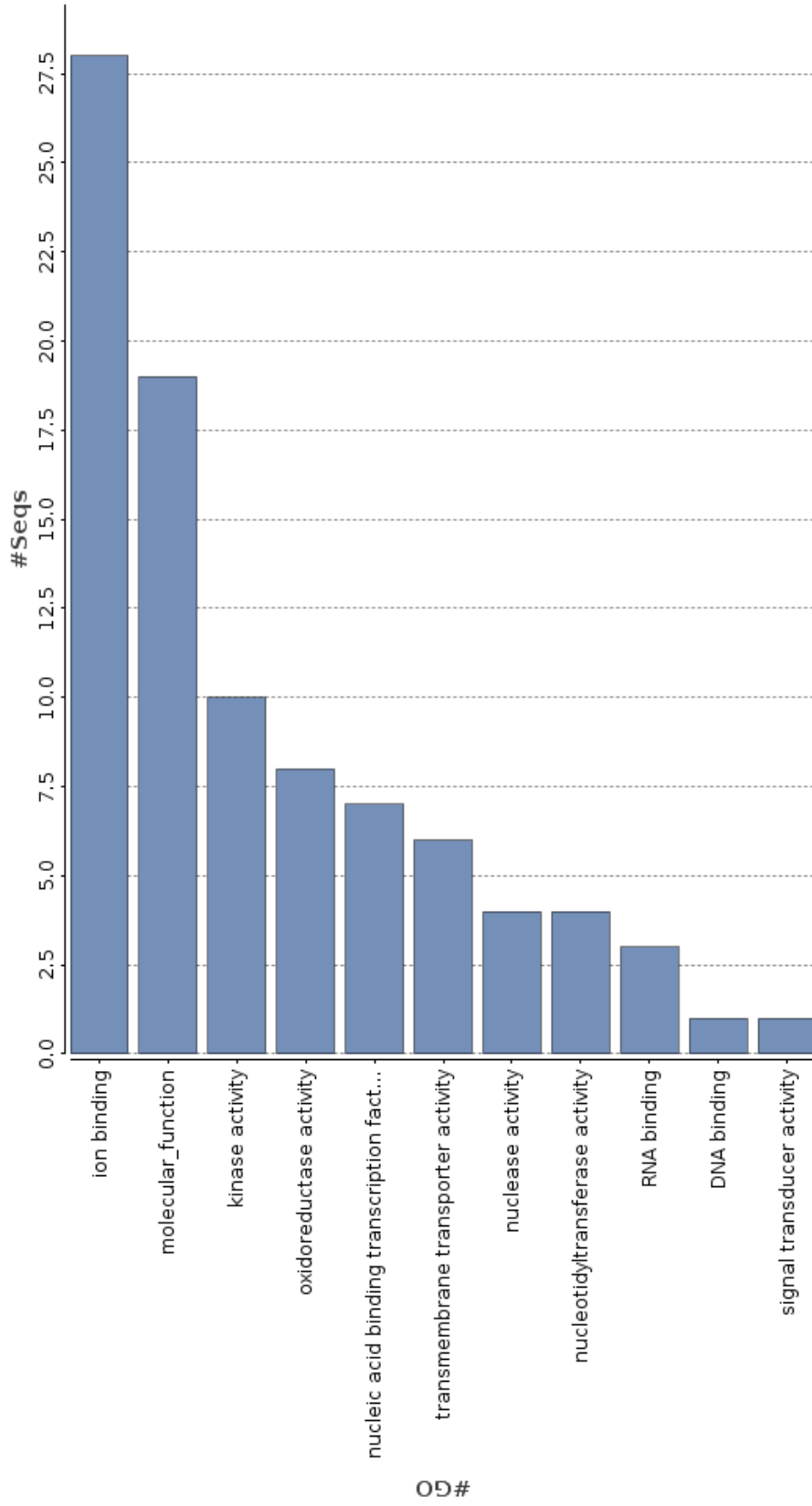
3.4.3. Kasım yaprak kütüphanesi



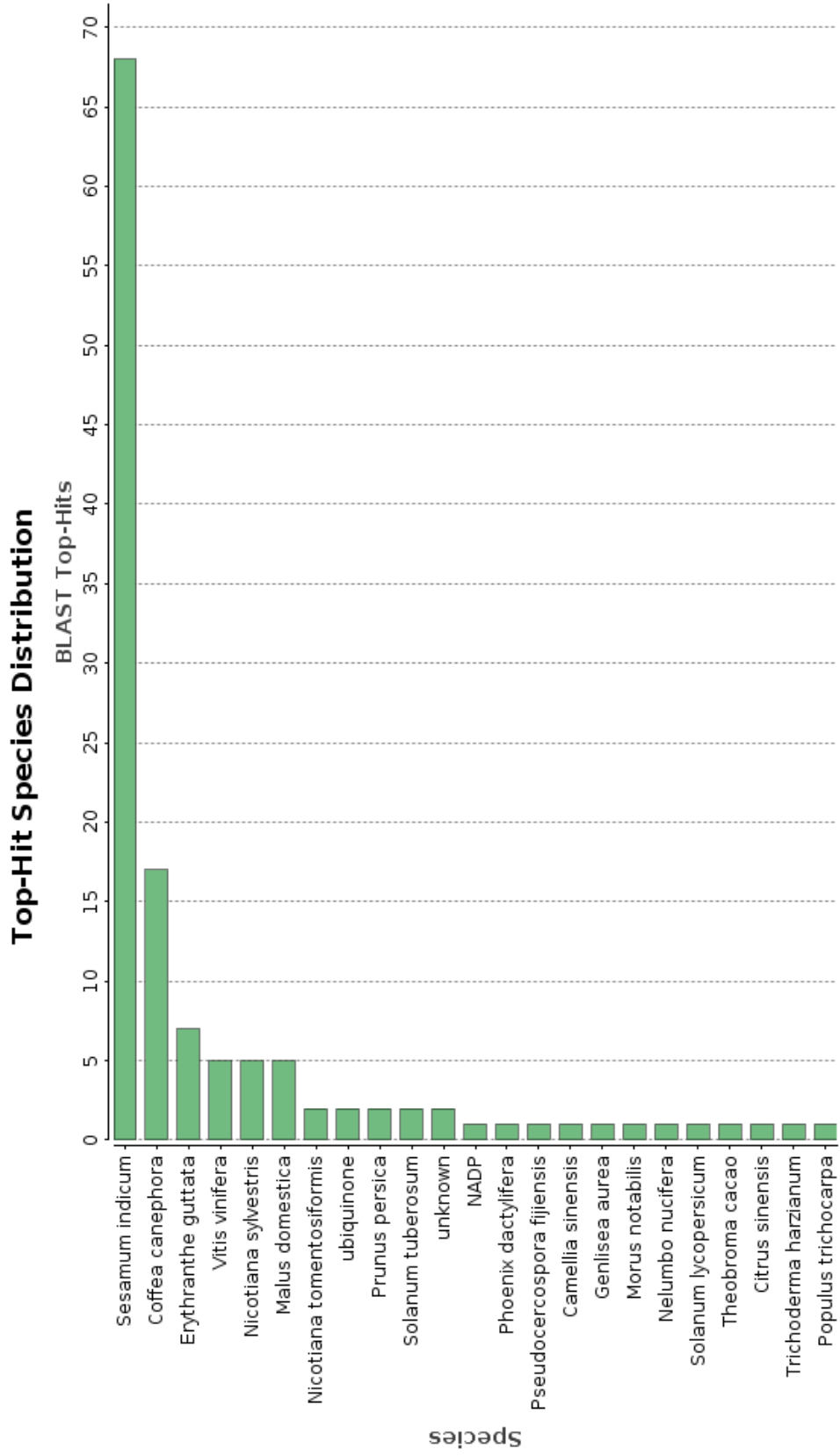
Şekil 3.4.3.1. Kasım yaprak kütüphanesi hedeflerinin katıldığı biyolojik prosesler



Şekil 3.4.3.2. Kasım yaprak kütüphanesi hedef proteinlerinin hücre içi konumları

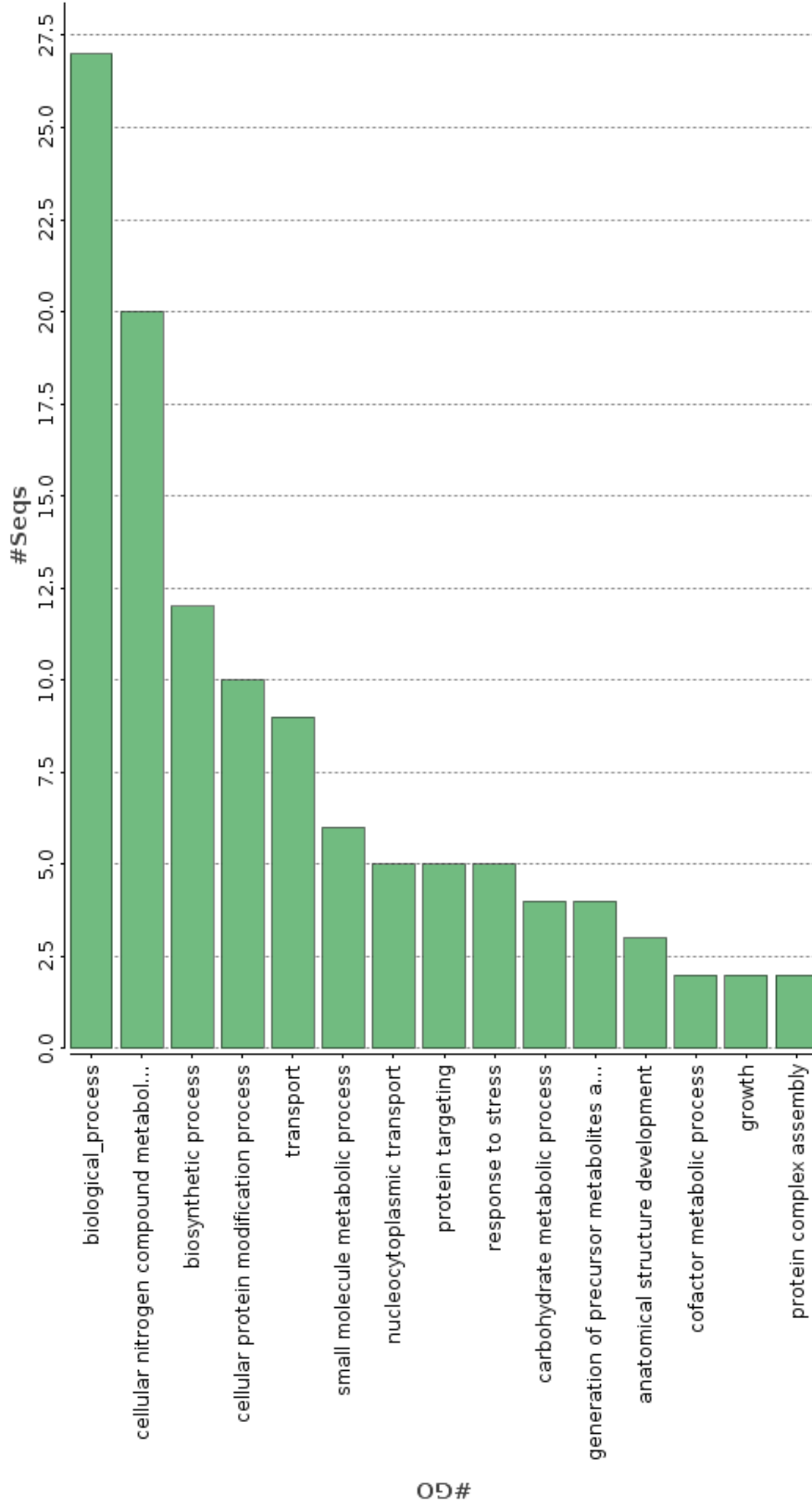


Şekil 3.4.3.3. Kasım yaprak kütüphanesi hedef proteinlerinin katıldığı moleküler fonksiyonlar

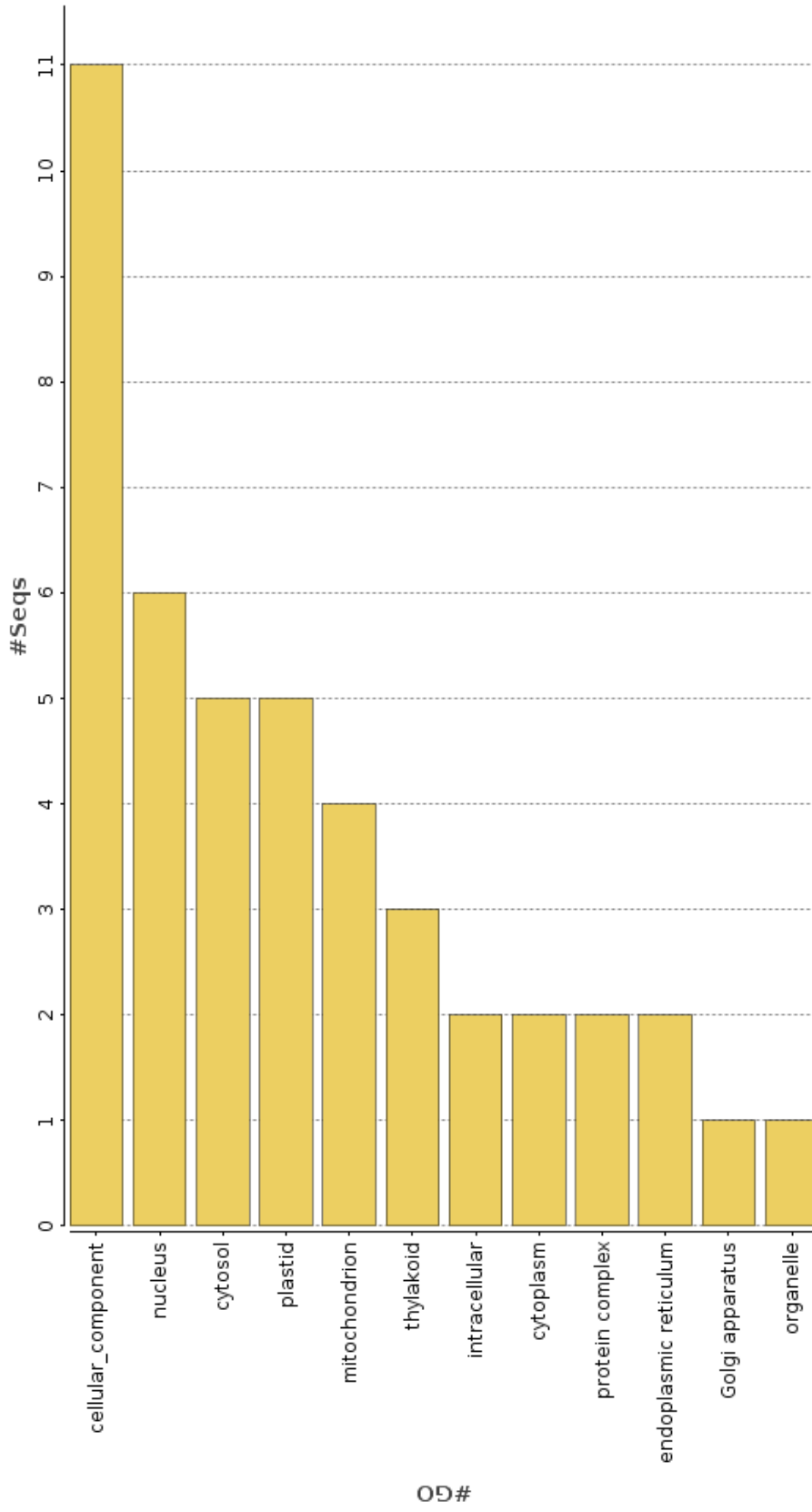


Şekil 3.4.3.4. Kasım yaprak kütüphanesi hedef proteinlerine veritabanında karşılık gelen organizmalar

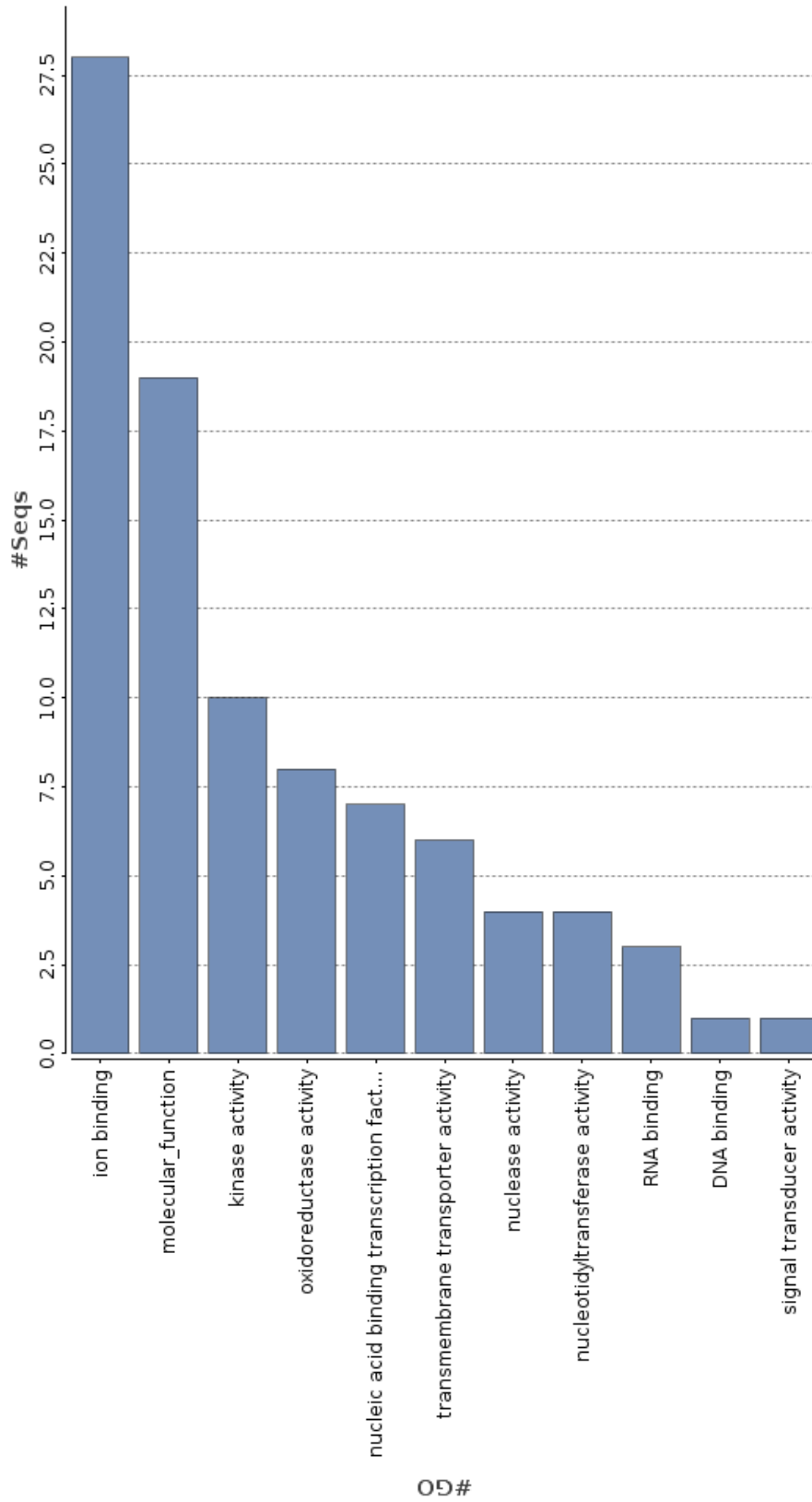
3.4.4. Kasım pedisel kütüphanesi



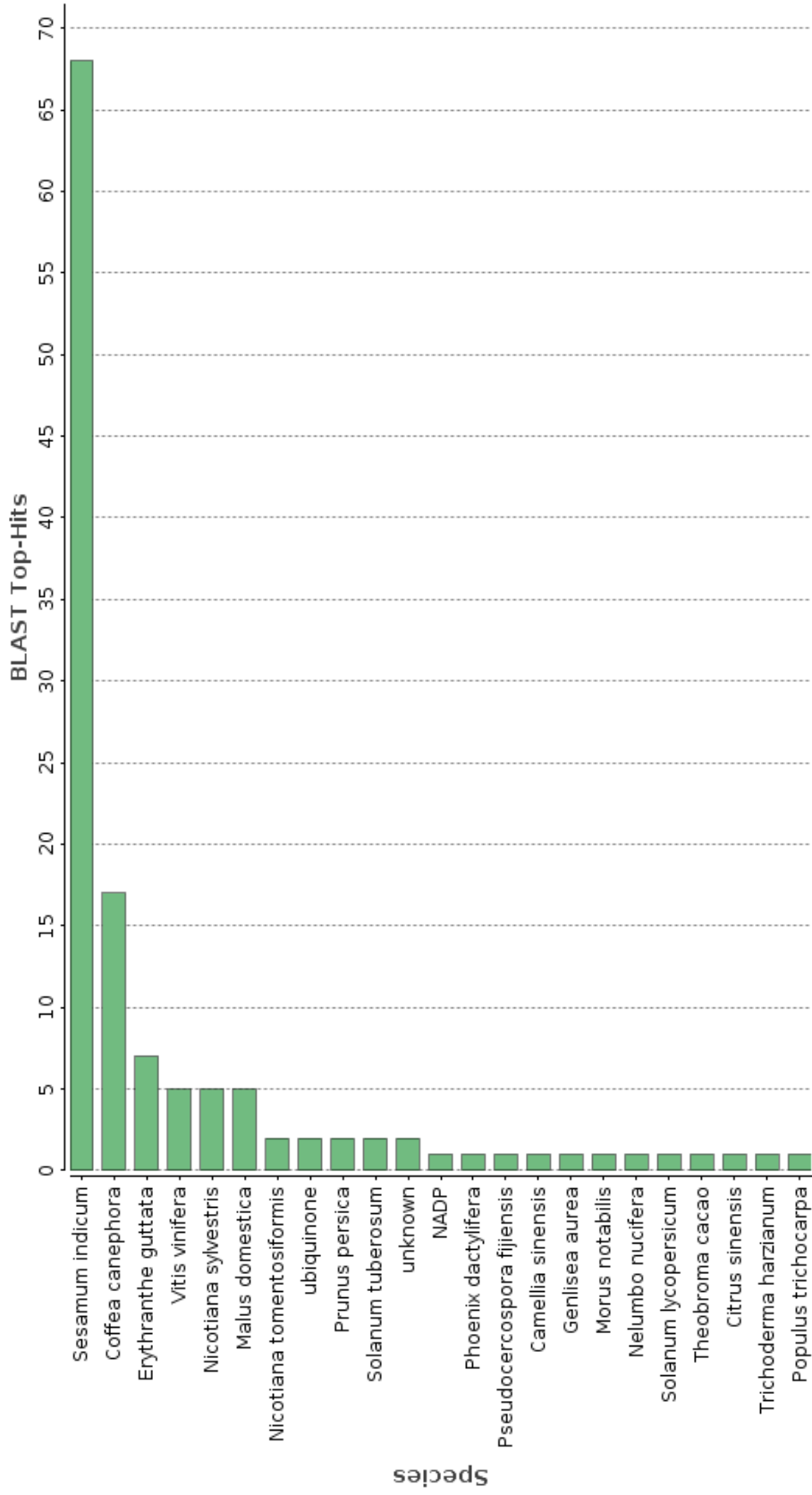
Şekil 3.4.4.1. Kasım pedisel kütüphanesi hedeflerinin katıldığı biyolojik prosesler



Şekil 3.4.4.2. Kasım pedisel kütüphanesi hedef proteinlerinin hücre içi konumları

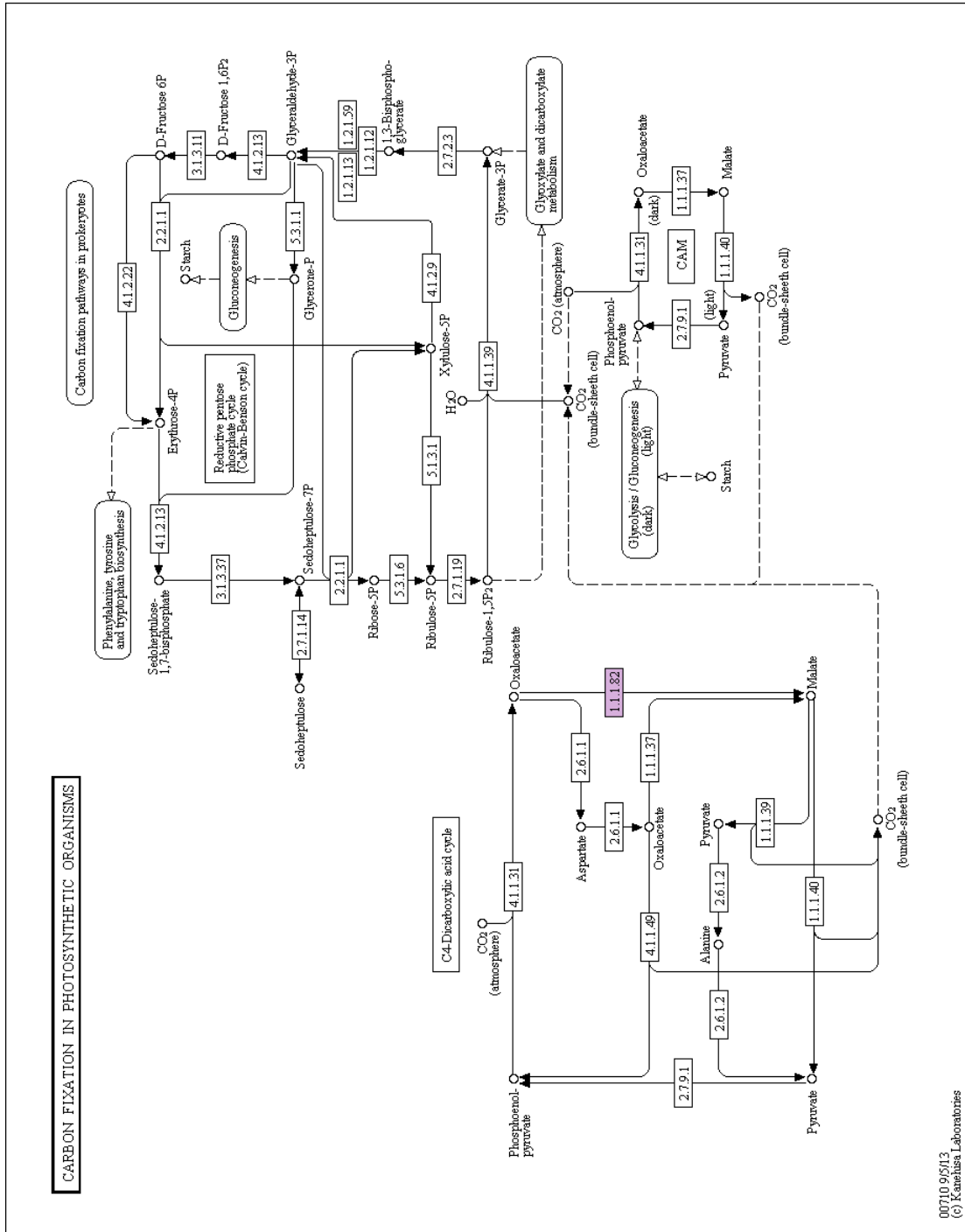


Şekil 3.4.4.3. Kasım pedisel kütüphanesi hedef proteinlerinin katıldığı moleküler fonksiyonlar

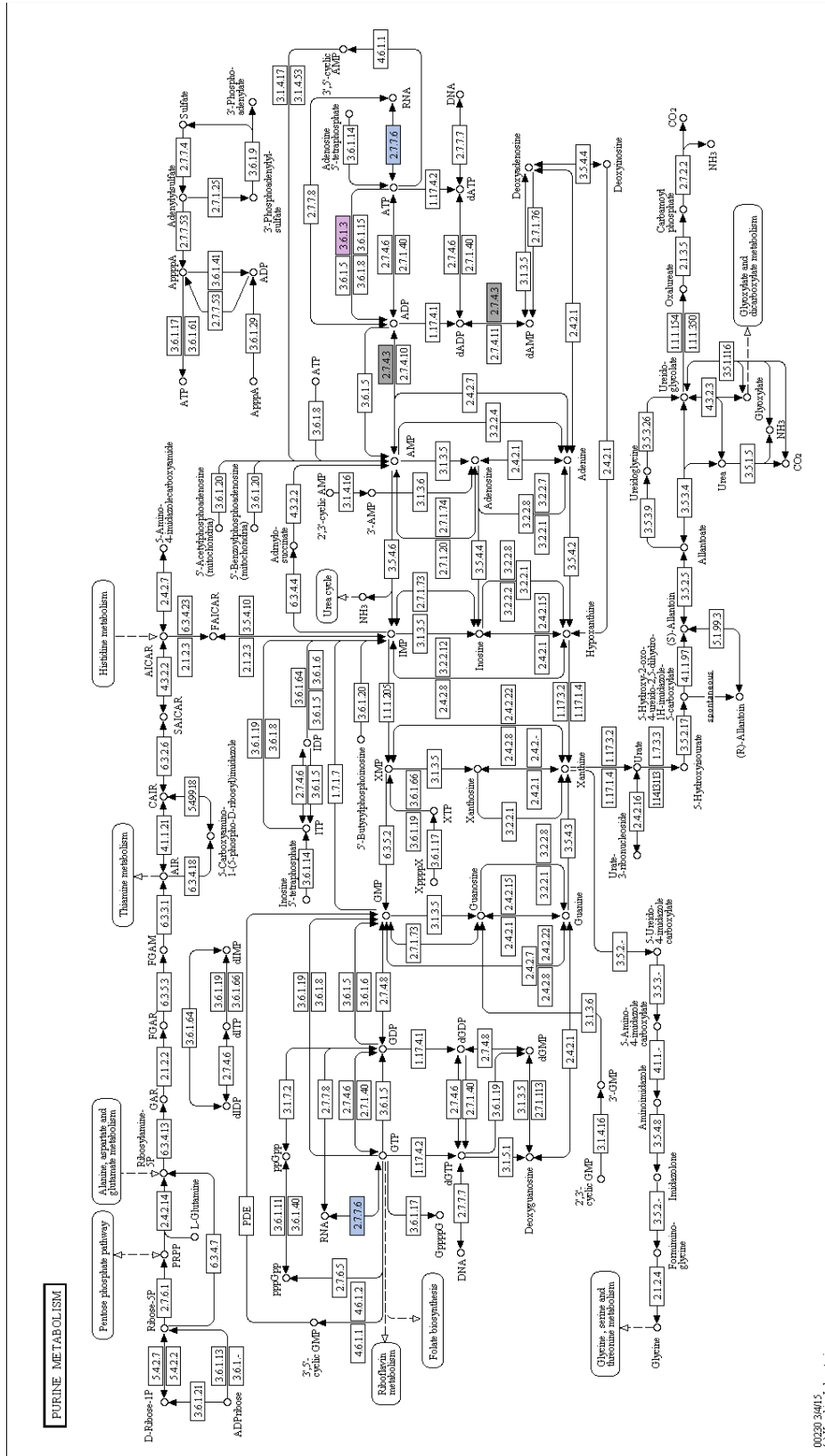


Şekil 3.4.4.4. Kasım pedisel kütüphanesi hedef proteinlerine veritabanında karşılık gelen organizmalar

3.5. KEGG Yolakları



Şekil 3.5.1. Fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyon yolağındaki Novel_20 mirnasının hedeflediğı enzim Malat Dehidrojenaz



00280 34/15
© Kamisha, Laboratuvas

Şekil 3.5.2. Pürin metabolizması yolğındaki Novel_03'ün hedeflediğı DNA aracılıklı RNA polymerase enzimi ve Novel_04'ün hedeflediğı Adenilat kinaz enzimleri

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Zeytin hem yağının içerdiği yüksek oranda sağlığa faydalı maddeleri açısından hem de günlük tüketim bakımından besin değeri ve ekonomik potansiyeli oldukça yüksek bir bitkidir. Ülkemiz coğrafyasının önemli bir kısmında başlıca gelir kaynağı olarak dahi nitelendirilebilir. Ancak Türkiye İstatistik Kurumunun 2013 verilerine göre mevcut hacim diğer zeytin üretimine ev sahipliği yapabilen ülkelere kıyasla potansiyelimizin oldukça altındadır ve bu yüzden zeytin üzerinde yapılan ve üretime aktarılan her çalışma ülke ekonomisine doğrudan katkı sağlayacaktır.

mikroRNAlar transkripsiyon sonrası gen ifadesini düzenleyen önemli ajanlardır ve mevsimsel döngüler, stres faktörleri, meyve olgunlaşması gibi yollarda aktif olarak rol almaktadırlar(Moxon et al. 2008; Eldem et al. 2013).

Yaptığımız çalışmada yabani zeytin (*Olea europaea subs. Sylvestris*) türünün yaprak ve pedisel dokularından elde edilen RNAlar Illumina Hi-Seq cihazında okunmuş ve olgun ve pre-miRNA dizilerini tespit etmek için Ayvalık türü zeytin için yapılan küçük RNA okumaları ve Yabani zeytin genom survey sekansı kullanılmıştır. Biyoinformatik analizle sonucu veri tabanlarından henüz bulunmayan 23 tane yeni miRNA dizisine ilaveten 15 korunmuş miRNA tespit edilmiştir. Temmuz yaprak kütüphanesinde toplamda 6 yeni miRNA ve 4 korunmuş miRNA, Temmuz pedisel kütüphanesinde 9 yeni miRNA, 9 korunmuş miRNA, Kasım yaprak kütüphanesinde 7 yeni miRNA, 4 korunmuş miRNA ve son olarak da Kasım pedisel kütüphanesinde 9 yeni ve 9 korunmuş miRNA tespit edilerek katlanma yapıları ve MFEI değerleri doğrulanmıştır. Bu miRNAlardan yeni bulunmuş olanlara Novel_ ön eki kullanılarak diğerlerinden ayrılmış ve kütüphanelerde bulunma sayılarına göre 1'den 23'e sıralanmıştır. Bulunan miRNAlardan miR156, miR166 ve Novel_01 kütüphanelerin 4ünde de doğrulanmıştır, bunun sebebi bu miRNAların sürekli devam eden süreçte veya kesintisiz stres gibi koşullarda sorumlu olduğunu gösterebilir ve büyük olasılıkla canlı için oldukça büyük öneme sahiptir.

miR156'nın hedef geni olan Squomosa Promoter Binding-like proteini bizim bulduğumuz hedef gen analizi sonuçlarıyla örtüşmekte(Wu and Poethig 2006) ancak temmuz-kasım aylarındaki miRNA ifade seviyesi ile hedef gen ifade seviyesi ilişkisinde qRT-PCR sonuçlarında ters ilişki gözlemlenememiştir. Yapılan bir çalışmada bu

proteinin mutasyonu sonucu pirinç bitkisinde geç çiçeklenme ve cücelik görülmüştür, yani bu protein büyüme ve meyve oluşumu süreçlerinde rol almaktadır(Zhang et al. 2006b). Benzer şekilde miR156'nın aday hedef genlerinden olan Ethylene Insensitive3 geninin ifade seviyesi ile miRNA ifadesi arasında korelasyon bulunamamıştır.

Diğer bir önemli bulgu olan ve 4 kütüphanenin tamamında ifade edilen Novel_01 ismini verdiğimiz miRNA'nın biyoinformatik analiz sonucunda yaprak ve pedisel transkriptom kütüphanelerinde farklı mRNAları hedeflediğini bulduk. Yapraktaki hedef geni RuBisCO alt ünitesi olan Novel_01 miRNAsı pedisellerde ise CCA tRNA nucleotidyltransferase isimli geni hedeflemekte. qRT-PCR analizine göre yaprak kütüphanesinde miRNA/hedef gen ters ilişkisi bulunamamışken (Grafik 2), pedisel kütüphanesinde Kasım ayında artış gösteren miRNA seviyesine rağmen, hedef gen olan CCA tRNA nucleotidyltransferase geni kasım ayında temmuz ayına kıyasla daha az ifade göstermiştir (Grafik 3). Protein sentezi için olgun tRNA üretimi, 3' ucuna sitidin-sitidin-adenozin (CCA) eklemek gibi önemli modifikasyon aşamalarını içerir ve bu diziyi CCA tRNA nucleotidyltransferase enzimi ekleyerek protein sentezini devam ettirir(Hopper and Phizicky 2003). Literatürde bu proteinin mevsimsel döngü veya stresle bir ilişkisine dair bir çalışma bulunamamıştır. Bu proteinin dizi benzerliği ve miRNA ifadesiyle ters orantılı oluşu, miRNA tarafından hedeflendiğini kesin olarak göstermez.

miR319'un TCP transkripsiyon faktörü ailesini hedeflediğini literatürdeki çeşitli çalışmalarda bulunmuş ve bizim çalışmamızda da doğrulanmıştır(Nag et al. 2009). miR319'un pedisel dokularındaki ifadesi hedef geni olan TCP4 transkripsiyon faktörü proteininin ifadesi ile ters orantı göstermiştir (Grafik 8). miR319-TCP ilişkisinin petal gelişimi ve yaprak olgunlaşması için kritik olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur(Efroni et al. 2013).

miRNA-hedef ters ilişkisi tespit edilen bir diğer örnek ise Novel_05 olarak isimlendirilen miRNA ve tahmini hedef geni Protein Phosphatase 2C(PP2C). Temmuz ve Kasım aylarının pedisel dokularında miRNA miktarının tam tersi yönünde ifade gösteren bu protein bitki stres hormonu olan Absisik asitin (ABA) düzenlenmesinde rol oynamakta(Sheen 1998). PP2C, ABA sinyal yolağının negatif kontrolcüsü olarak rol almakta ve artan PP2C miktarı ABA miktarını azaltmakta, bu durumda bizim örneklerimizde Kasım ayında artan Novel_05 miktarıyla ters orantılı olarak PP2C

miktarı azalmış, dolayısıyla da ABA sinyal iletimi artmış olabilir. Literatürde ABA sinyal yolağının stres toleransı ve yaprak dökümüyle ilgili karmaşık yollarda rol aldığına yönelik çalışmalar vardır (Xue-Xuan et al. 2010).

Bir miRNA'nın birden fazla hedefi olabildiği gibi bir mRNA birden fazla miRNA veya transkripsiyon düzenleyici elemanlar tarafından kontrol ediliyor olabilir. Yani bulduğumuz veya hedefi ile ters ilişki göstermeyen miRNAlar o mRNA'yı hedeflemiyor olabildiği gibi aslında dizi benzerliğine dayanarak çıkardığımız bu tahmin doğru olabilir, ancak hedef mRNA geçici veya kalıcı olarak başka faktörlerin etkisindedir ve de bunu tespit etmek çok zordur.

Transkriptom sonrasında bulunan genlerin ifade düzeyini tespit etmek çok zor olduğu ve qRT-PCR gibi ikinci bir deney düzeneği gerektirdiği için tüm miRNA ve hedeflerinin ifade düzeylerini tespit edemedik, ancak bulunan ve literatürle eşleşerek doğrulanan bazı örneklerin ışığında elde edilen bilgiler bir adım ileriye götürülerek yeni miRNAlar üzerinde daha derinlemesine çalışmalar yapılabilir.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) yolak haritasını tespit ettiğimiz miRNA hedef genleri arasında Novel_20, Novel_03 ve Novel_04 vardır. Yukardaki yolak haritalarında (Şekil 3.5.1, Şekil 3.5.2) görüldüğü gibi bu enzimler buldukları yolak için önemli işleve sahipler. İlk enzim olan ve Novel_20 miRNAsının hedeflediğini tahmin ettiğimiz "Malat dehidrojenaz" (EC 1.1.1.82) enzimi malat'ı ve NADP⁺'yü substrat olarak kullanır ve NADPH üretimini sağlayarak hücrenin enerji döngüsünü sürdürür. Fotosentetik organizmalarda yer alan bu yolla karbon fiksasyonu sağlanır ve organik bileşikler sentezlenir. Novel_20 miRNAsının bu yolak üzerindeki etkisi Kasım pedisel kütüphanesinde tespit edilmiştir.

Diğer bir yolak olan pürin metabolizması yolağında ise Novel_03 ve Novel_04 miRNalarının hedefleri bulunmuştur. Novel_03'ün hedeflediği DNA aracılıklı RNA polimeraz enzimi (EC 2.7.7.6) RNA sentezini yapan anahtar enzimdir ve bu yolla nükleosit trifosfatlardan (NTP) bir fosfat kopararak nükleosit difosfat (NDP)ye dönüştürür ve RNA zincirini uzatır. Devam eden yolla ise miR_04'ün hedeflediği Adenilat kinaz enzimi (EC 2.7.4.3) bulunur. Bu enzim ATP'den bir fosfat grubu kopararak bunu AMP'ye aktarır ve 2 adet ADP üretimini yapmış olur. Bu iki miRNA'nın hedeflediği enzimleri hesaba katınca purin metabolizması üzerinde miRNA ifade seviyelerinin etkisi olduğu söylenebilir. Pürinler nükleik asitlerin monomeri, enerji

kaynağı, polisakarit, fosfolipit, sukroz gibi primer metabolitlerin ve bazı sekonder metabolitlerin üretiminde hammadde olarak kullanılan yapıtaşlarıdır {Stasolla, 2003 #133}

Çalışmanın sonucunda bulunan potansiyel hedef genlerin tamamı Blast2GO programında çalıştırıldıktan sonra elde edilen bulgulara göre potansiyel hedeflerin moleküler fonksiyonları başta iyon bağlanma, ATP bağlanma, RNA bağlanma, nükleer işlevler, nükleotidil transferaz aktivitesi, kinaz aktivitesi gibi yolaklar olmak ve bunlara ilaveten az miktarda peptidaz aktivitesi, oksido-redüktaz aktivite, hidrolaz ve transkripsiyon faktörü aktivitesi gözlemlenmiştir (Grafikler 12,16,20,24).

Yine Blast2GO sonuçlarına göre tüm kütüphanelerdeki transkriptom dizilerinin karşılığı veri tabanında en benzer dizi olarak Susam (*Sesamum indicum L.*) bitkisi denk gelmiştir. Bu sonuçlar ışığında susam ve zeytin bitkisinin mRNA düzeyinde, dolayısıyla da protein düzeyinde birçok ortaklıklar barındırdığını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak 4 farklı kütüphaneden elde edilen transkriptom okumalarından, küçük RNA okumaları ve Genom Survey Sekansı yardımıyla 23 yeni, 15 korunmuş miRNA tespit edilerek bu miRNAların 7sinin varlığı qRT-PCR aracılığıyla doğrulanmıştır. Bu çalışmanın miRNA tespitine özel olarak yapılmamasına, total RNA havuzunun dizilenmesiyle elde edilen kütüphanelerden faydalanılmasına rağmen pre-miRNA dizileri tespit edilerek doğrulanmıştır. Elde edilen bulgular ışığında hangi miRNA'nın veya hedeflerinin mevsimsel döngülerde ne aktivite gösterdiği tam olarak tespit edilememiş olsa da, sonraki çalışmalar için basamak teşkil edecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Al-Khalil, S. (1995). A survey of plants used in Jordanian traditional medicine. *Pharmaceutical Biology* 33, 317-323.
- An, J., Lai, J., Lehman, M.L., and Nelson, C.C. (2013). miRDeep*: an integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data. *Nucleic acids research* 41, 727-737.
- Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., and Montedoro, G. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 1589-1593.
- Baumberger, N., and Baulcombe, D. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11928-11933.
- Bogani, P., Galli, C., Villa, M., and Visioli, F. (2007). Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 190, 181-186.
- Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.-Y., Hunter, C., Berardini, T.Z., and Poethig, R.S. (2003). HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* 130, 1493-1504.
- Bonnet, E., Wuyts, J., Rouzé, P., and Van de Peer, Y. (2004). Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics* 20, 2911-2917.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* 13, 1097-1101.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M., and Cristinzio, G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 393-398.
- Carrington, J.C., and Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301, 336-338.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584-589.
- Chiou, T.-J., Aung, K., Lin, S.-I., Wu, C.-C., Chiang, S.-F., and Su, C.-I. (2006). Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 18, 412-421.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674-3676.
- Coruh, C., Shahid, S., and Axtell, M.J. (2014). Seeing the forest for the trees: annotating small RNA producing genes in plants. *Current opinion in plant biology* 18, 87-95.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants* (Columbia University Press).
- Cui, X., Xu, S.M., Mu, D.S., and Yang, Z.M. (2009). Genomic analysis of rice microRNA promoters and clusters. *Gene* 431, 61-66.
- Dai, X., and Zhao, P.X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server.

- Nucleic acids research *39*, W155-W159.
- Dong, Z., Han, M.-H., and Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 9970-9975.
- Earley, K., Smith, M., Weber, R., Gregory, B., and Poethig, R. (2010). Research An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*.
- Efroni, I., Han, S.-K., Kim, H.J., Wu, M.-F., Steiner, E., Birnbaum, K.D., Hong, J.C., Eshed, Y., and Wagner, D. (2013). Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Developmental cell* *24*, 438-445.
- Eldem, V., Okay, S., and Unver, T. (2013). Plant microRNAs: new players in functional genomics. *Turk J Agric For* *37*, 1-21.
- Eren, H., Pekmezci, M., Okay, S., Turktas, M., Inal, B., Ilhan, E., Atak, M., Erayman, M., and Unver, T. (2015). Hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) root miRNome analysis in response to salt stress. *Annals of Applied Biology*.
- Fang, Y., and Spector, D.L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Current Biology* *17*, 818-823.
- Ferdous, J., Li, Y., Reid, N., Langridge, P., Shi, B.-J., and Tricker, P.J. (2015). Identification of Reference Genes for Quantitative Expression Analysis of MicroRNAs and mRNAs in Barley under Various Stress Conditions. *PloS one* *10*, e0118503.
- Ferrara, L.A., Raimondi, A.S., d'Episcopo, L., Guida, L., Russo, A.D., and Marotta, T. (2000). Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Archives of Internal Medicine* *160*, 837-842.
- Foxhall, L. (2007). *Olive cultivation in ancient Greece* (Oxford University Press).
- Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J.A., and Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics* *39*, 1033-1037.
- Friedländer, M.R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., Knäuper, S., and Rajewsky, N. (2008). Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature biotechnology* *26*, 407-415.
- Galili, E., Stanley, D.J., Sharvit, J., and Weinstein-Evron, M. (1997). Evidence for earliest olive-oil production in submerged settlements off the Carmel coast, Israel. *Journal of Archaeological Science* *24*, 1141-1150.
- Gariboldi, P., Jommi, G., and Verotta, L. (1986). Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry* *25*, 865-869.
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P., and Vaucheret, H. (2005). Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Current Biology* *15*, 1494-1500.
- Gibbings, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P., and Voinnet, O. (2012). Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nature cell biology* *14*, 1314-1321.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., and Zeng, Q. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology* *29*, 644-652.

- Hajheidari, M., Farrona, S., Huettel, B., Koncz, Z., and Koncz, C. (2012). CDKF; 1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of Arabidopsis RNA polymerase II. *The Plant Cell* *24*, 1626-1642.
- Han, M.-H., Goud, S., Song, L., and Fedoroff, N. (2004). The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 1093-1098.
- Hashmi, M.A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U., and Perveen, S. (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* *2015*.
- Hofacker, I.L. (2003). Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic acids research* *31*, 3429-3431.
- Hopper, A.K., and Phizicky, E.M. (2003). tRNA transfers to the limelight. *Genes & development* *17*, 162-180.
- Hummon, A.B., Lim, S.R., Difilippantonio, M.J., and Ried, T. (2007). Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques* *42*, 467.
- Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews Molecular cell biology* *9*, 22-32.
- Jemai, H., El Feki, A., and Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of agricultural and food chemistry* *57*, 8798-8804.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., and Madden, T.L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research* *36*, W5-W9.
- Kaniewski, D., Van Campo, E., Boiy, T., Terral, J.F., Khadari, B., and Besnard, G. (2012). Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews* *87*, 885-899.
- Kantar, M., Unver, T., and Budak, H. (2010). Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. *Functional & integrative genomics* *10*, 493-507.
- Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S.-i., Baba, T., and Suzuki, T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly (A) polymerase GLD-2. *Genes & development* *23*, 433-438.
- Kennedy, D. (2002). Breakthrough of the year. *Science* *298*, 2283-2283.
- Kim, Y.J., Zheng, B., Yu, Y., Won, S.Y., Mo, B., and Chen, X. (2011). The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO journal* *30*, 814-822.
- Kong, Y., and Han, J.-H. (2005). MicroRNA: biological and computational perspective. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *3*, 62-72.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2013). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, gkt1181.
- Kurihara, Y., and Watanabe, Y. (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 12753-12758.

- Langmead, B. (2010). Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current protocols in bioinformatics*, 11.17. 11-11.17. 14.
- Lawrendiadis, G. (1961). Contribution to the knowledge of the medicinal plants of Greece. *Planta medica* 9, 164-169.
- Le Tutour, B., and Guedon, D. (1992). Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* 31, 1173-1178.
- Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.
- Li, J., Reichel, M., and Millar, A.A. (2014). Determinants beyond both complementarity and cleavage govern microR159 efficacy in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 10, e1004232.
- Liu, B., Chen, Z., Song, X., Liu, C., Cui, X., Zhao, X., Fang, J., Xu, W., Zhang, H., and Wang, X. (2007). *Oryza sativa* dicer-like4 reveals a key role for small interfering RNA silencing in plant development. *The Plant Cell* 19, 2705-2718.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., and Carrington, J.C. (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell* 14, 1605-1619.
- Machida, S., Chen, H.-Y., and Yuan, Y.A. (2011). Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. *Nucleic acids research*, gkr428.
- Mallory, A., and Vaucheret, H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant Cell* 22, 3879-3889.
- Mallory, A.C., Elmayan, T., and Vaucheret, H. (2008). MicroRNA maturation and action—the expanding roles of ARGONAUTES. *Current opinion in plant biology* 11, 560-566.
- Mallory, A.C., and Vaucheret, H. (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature genetics* 38, S31-S36.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., and Long, C. (2008). Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116-127.
- Moxon, S., Jing, R., Szittyá, G., Schwach, F., Pilcher, R.L.R., Moulton, V., and Dalmay, T. (2008). Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome research* 18, 1602-1609.
- Nag, A., King, S., and Jack, T. (2009). miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 22534-22539.
- Nozawa, M., Miura, S., and Nei, M. (2012). Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome biology and evolution* 4, 230-239.
- Owen, R., Giacosa, A., Hull, W., Haubner, R., Spiegelhalder, B., and Bartsch, H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer* 36, 1235-1247.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 12, 1484-1495.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA

- recognition from a PIWI domain–siRNA guide complex. *Nature* *434*, 663-666.
- Peters, L., and Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular cell* *26*, 611-623.
- Piriyapongsa, J., and Jordan, I.K. (2008). Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements. *Rna* *14*, 814-821.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & development* *16*, 1616-1626.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *cell* *110*, 513-520.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., and Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae* *92*, 147-176.
- Ryan, D., and Robards, K. (1998). Critical Review. Phenolic compounds in olives. *Analyst* *123*, 31R-44R.
- Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2007). Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes & development* *21*, 1603-1608.
- Schommer, C., Palatnik, J.F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E.E., Nath, U., and Weigel, D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol* *6*, e230.
- Sheen, J. (1998). Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 975-980.
- Sunkar, R., Li, Y.-F., and Jagadeeswaran, G. (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in plant science* *17*, 196-203.
- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., and Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & development* *20*, 515-524.
- Vaucheret, H. (2008). Plant argonautes. *Trends in plant science* *13*, 350-358.
- Vaucheret, H. (2009). AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b. *PLoS One* *4*, e6442.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., and Bartel, D.P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development* *18*, 1187-1197.
- Vazquez, F., Gascioli, V., Crété, P., and Vaucheret, H. (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current Biology* *14*, 346-351.
- Vilkaitis, G., Plotnikova, A., and Klimašauskas, S. (2010). Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1: the catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA. *RNA* *16*, 1935-1942.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* *136*, 669-687.
- Vossen, P. (2007). Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *HortScience* *42*, 1093-1100.
- Wang, L., Song, X., Gu, L., Li, X., Cao, S., Chu, C., Cui, X., Chen, X., and Cao, X.

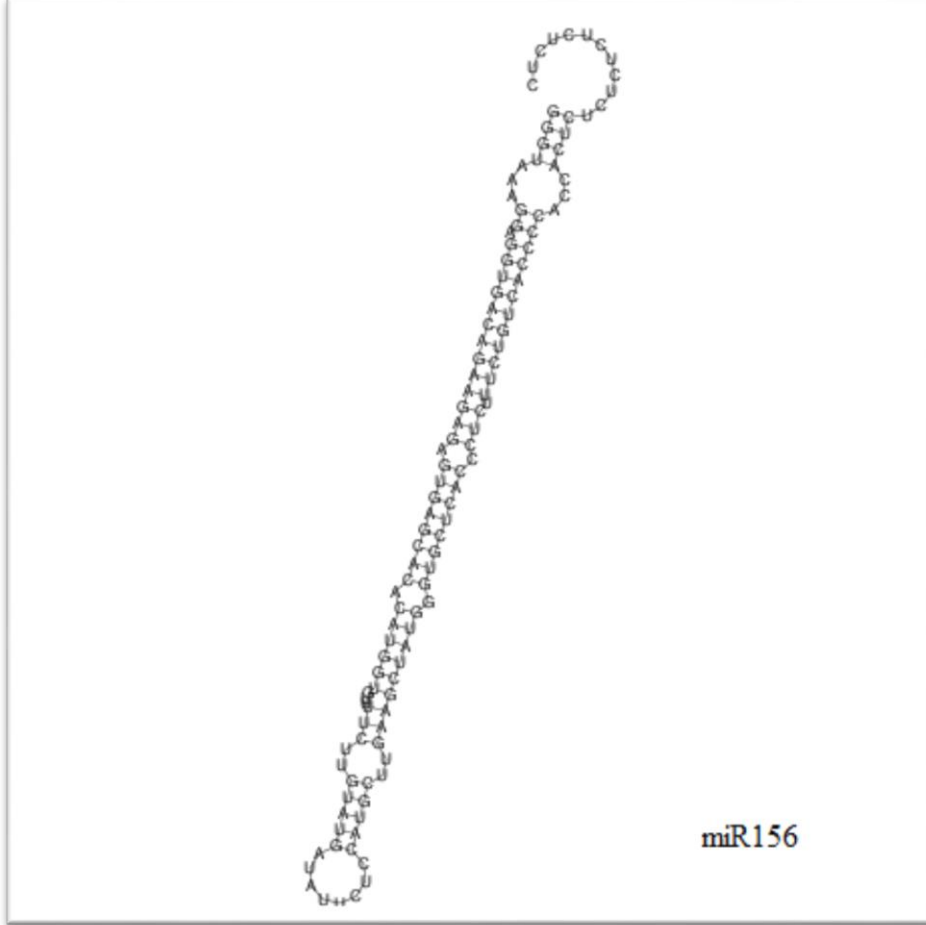
- (2013). NOT2 proteins promote polymerase II–dependent transcription and interact with multiple microRNA biogenesis factors in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25, 715-727.
- Wang, X., Zhang, J., Li, F., Gu, J., He, T., Zhang, X., and Li, Y. (2005). MicroRNA identification based on sequence and structure alignment. *Bioinformatics* 21, 3610-3614.
- Werner, S., Wollmann, H., Schneeberger, K., and Weigel, D. (2010). Structure determinants for accurate processing of miR172a in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 20, 42-48.
- Wu, G., and Poethig, R.S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133, 3539-3547.
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S.A., and Carrington, J.C. (2005). Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiology* 138, 2145-2154.
- Xue-Xuan, X., Hong-Bo, S., Yuan-Yuan, M., Gang, X., Jun-Na, S., Dong-Gang, G., and Cheng-Jiang, R. (2010). Biotechnological implications from abscisic acid (ABA) roles in cold stress and leaf senescence as an important signal for improving plant sustainable survival under abiotic-stressed conditions. *Critical reviews in biotechnology* 30, 222-230.
- Yang, G., Yan, K., Wu, B., Wang, Y., Gao, Y., and Zheng, C. (2012). Genomewide analysis of intronic microRNAs in rice and Arabidopsis. *Journal of genetics* 91, 313-324.
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., and Huang, H. (2006). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *The Plant Journal* 47, 841-850.
- Yanik, H., Turktas, M., Dundar, E., Hernandez, P., Dorado, G., and Unver, T. (2013). Genome-wide identification of alternate bearing-associated microRNAs (miRNAs) in olive (*Olea europaea* L.). *BMC plant biology* 13, 10.
- Yu, B., Bi, L., Zheng, B., Ji, L., Chevalier, D., Agarwal, M., Ramachandran, V., Li, W., Lagrange, T., and Walker, J.C. (2008). The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10073-10078.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, 932-935.
- Zhang, B., Pan, X., Cox, S., Cobb, G., and Anderson, T. (2006a). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63, 246-254.
- Zhang, J., Li, C., Wu, C., Xiong, L., Chen, G., Zhang, Q., and Wang, S. (2006b). RMD: a rice mutant database for functional analysis of the rice genome. *Nucleic acids research* 34, D745-D748.
- Zhang, S., Xie, M., Ren, G., and Yu, B. (2013). CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 17588-17593.
- Zhang, Z., Yu, J., Li, D., Zhang, Z., Liu, F., Zhou, X., Wang, T., Ling, Y., and Su, Z. (2010). PMRD: plant microRNA database. *Nucleic acids research* 38, D806-D813.

- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S.-H., Liou, L.W., Barefoot, A., Dickman, M., and Zhang, X. (2011). Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell* *145*, 242-256.
- Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-González, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y.-T., Duan, L., Li, Z., Axtell, M.J., and Wang, X.-J. (2013). Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by Arabidopsis Dicer-like1. *Nature structural & molecular biology* *20*, 1106-1115.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* *31*, 3406-3415.

EK BİLGİLER

1. MikroRNA Katlanma Yapıları

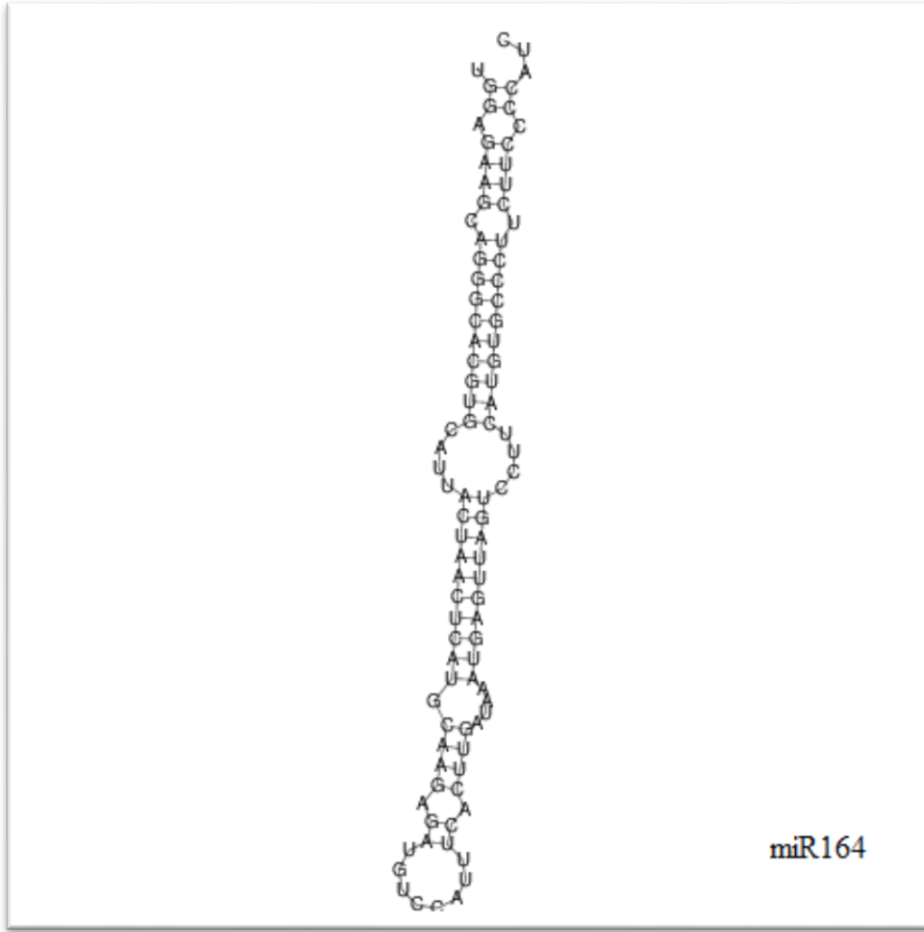
Aşağıda şekilleri verilen mikroRNAların pre-miRNA yapıları RNAFold yazılımı ile elde edilmiş olup her bir şekil bir miRNA'yı veya miRNA ailesini temsil etmektedir.



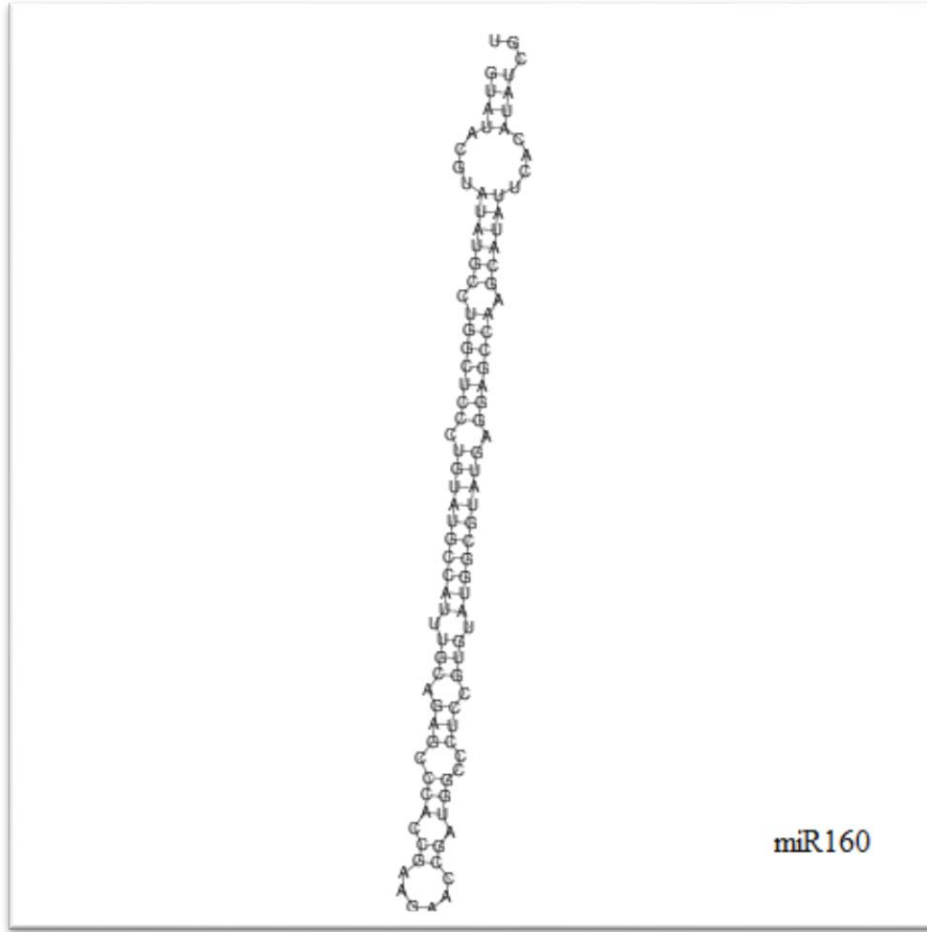
Şekil 1.1. miR156 RNAfold katlanma yapısı



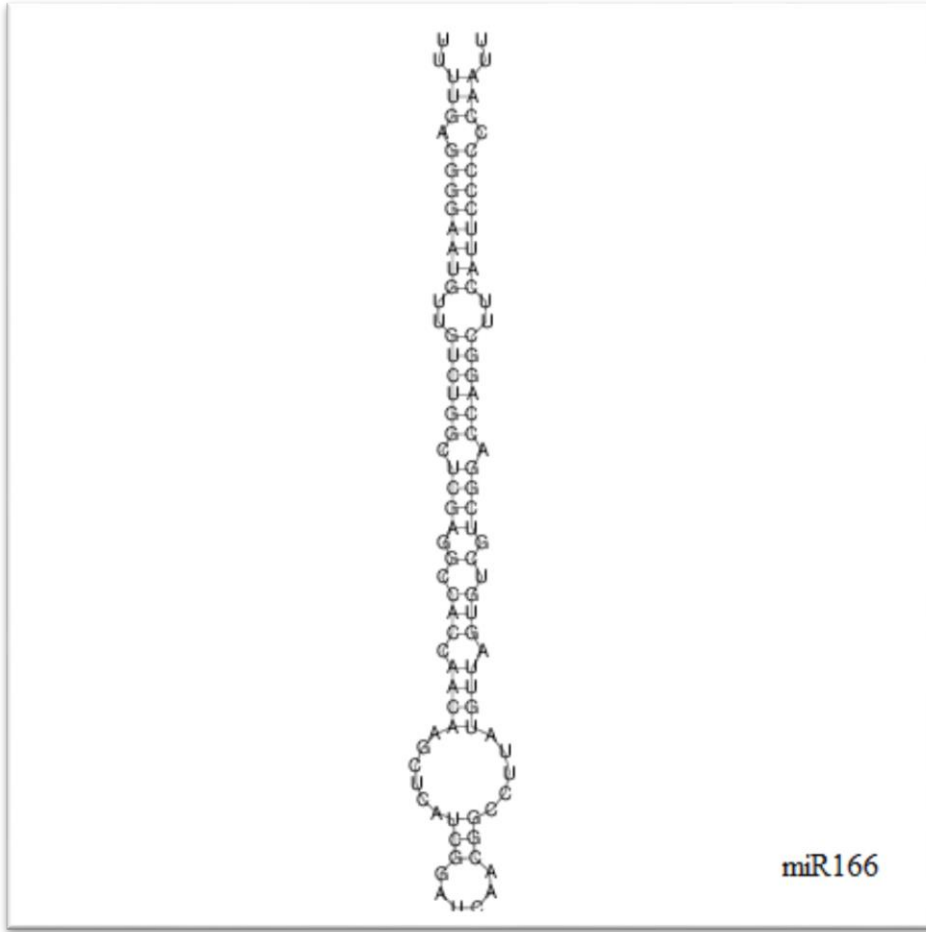
Şekil 1.2. miR 159 RNAfold katlanma yapısı



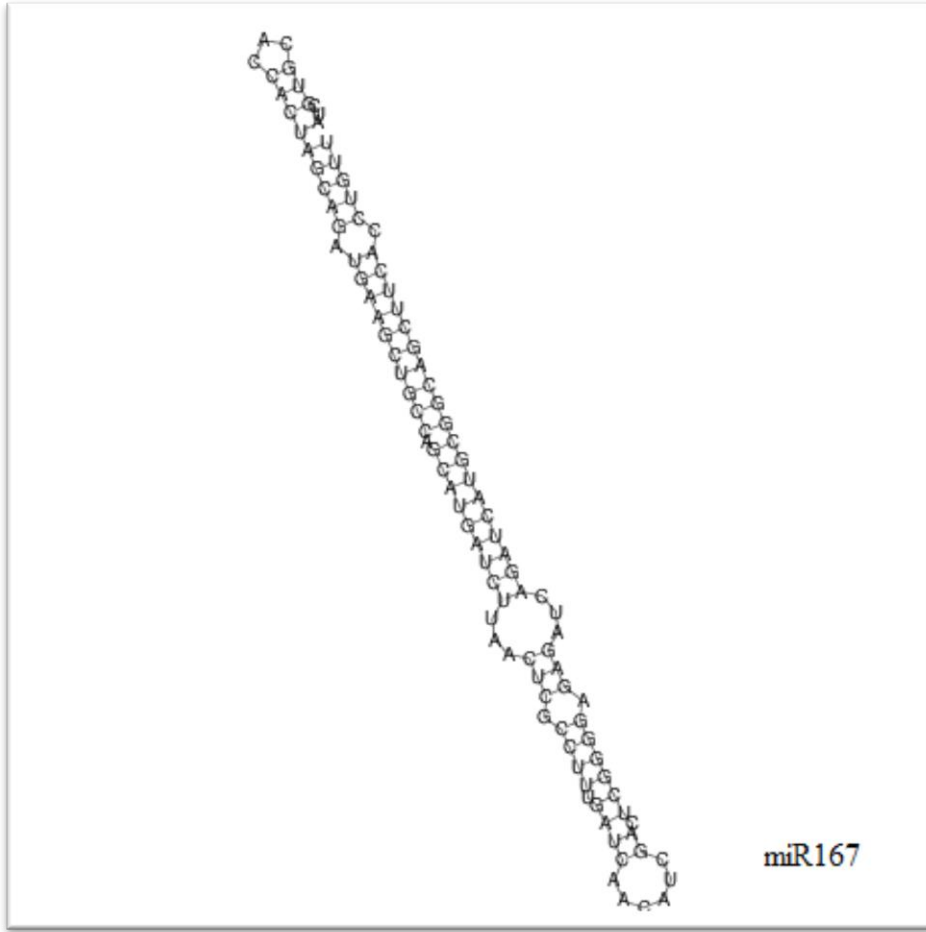
Şekil 1.3. miR164 RNAfold katlanma yapısı



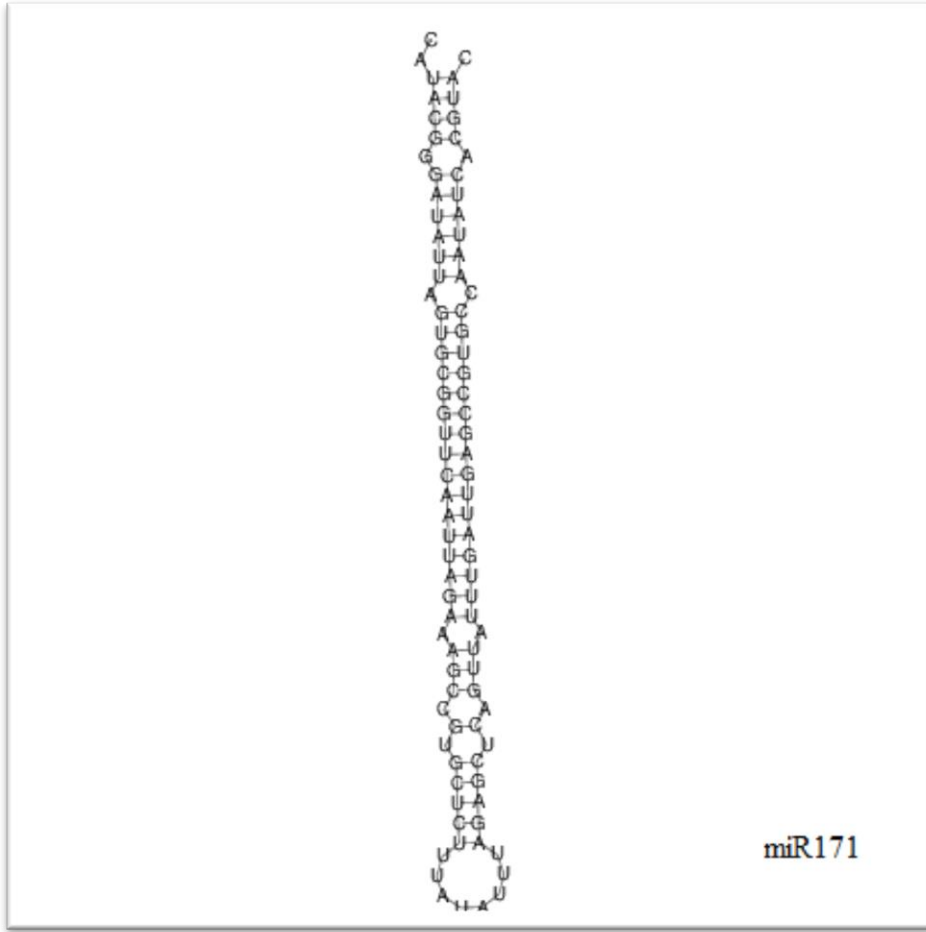
Şekil 1.4. miR160 RNAfold katlanma yapısı



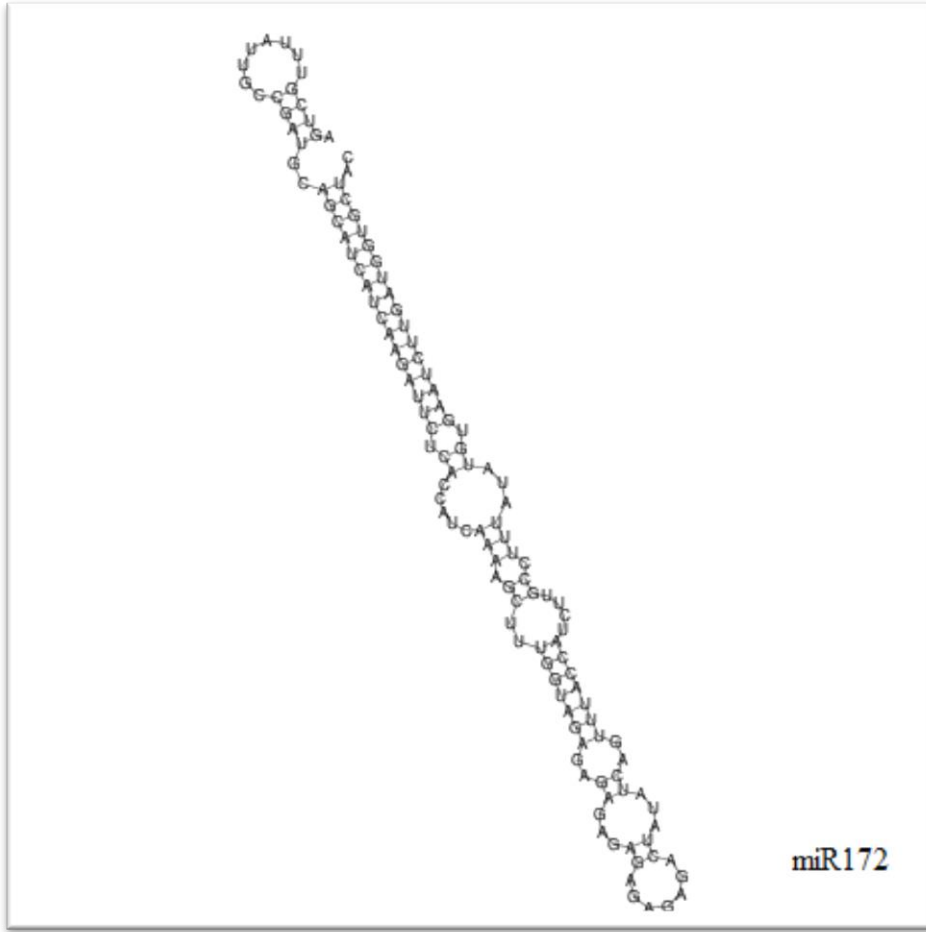
Şekil 1.5. miR166 RNAfold katlanma yapısı



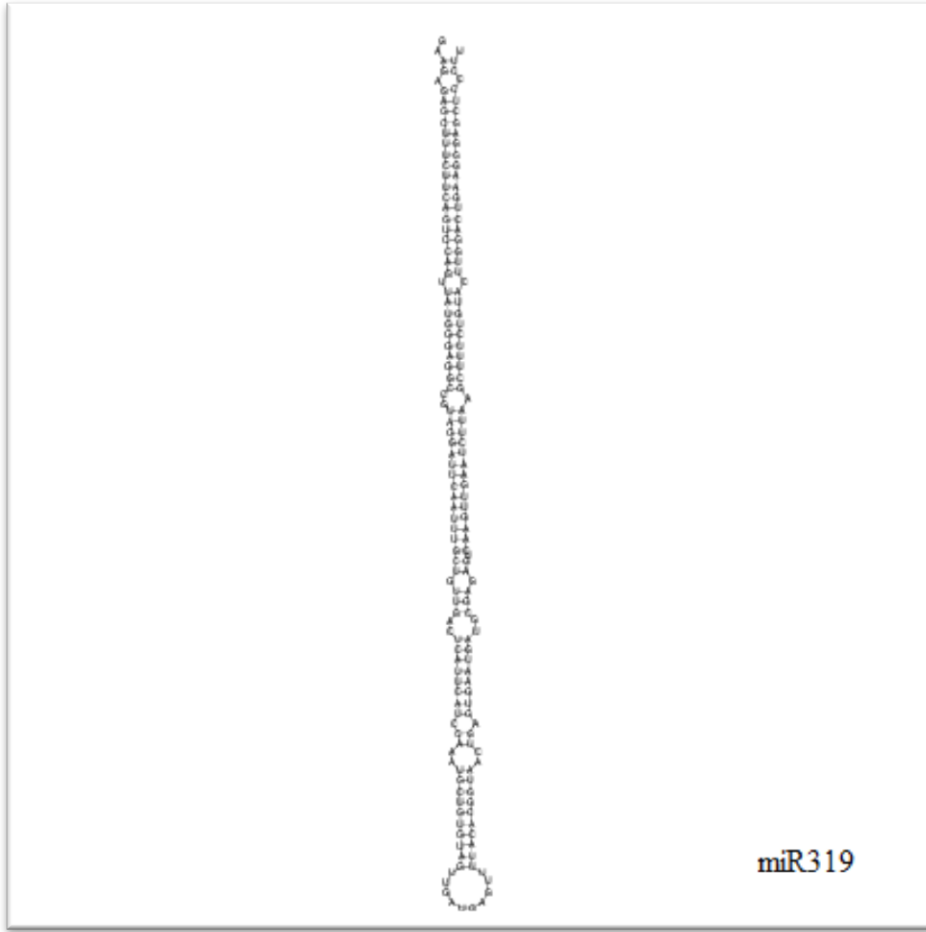
Şekil 1.6. miR167 RNAfold katlanma yapısı



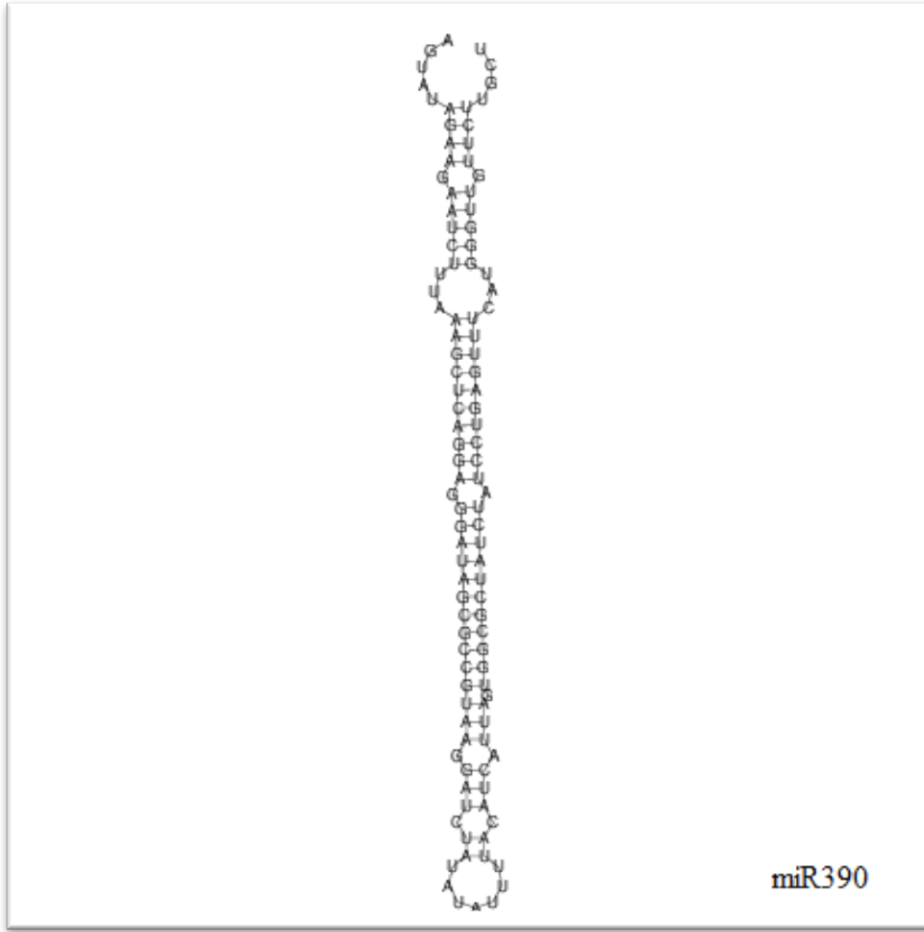
Şekil 1.7. miR171 RNAfold katlanma yapısı



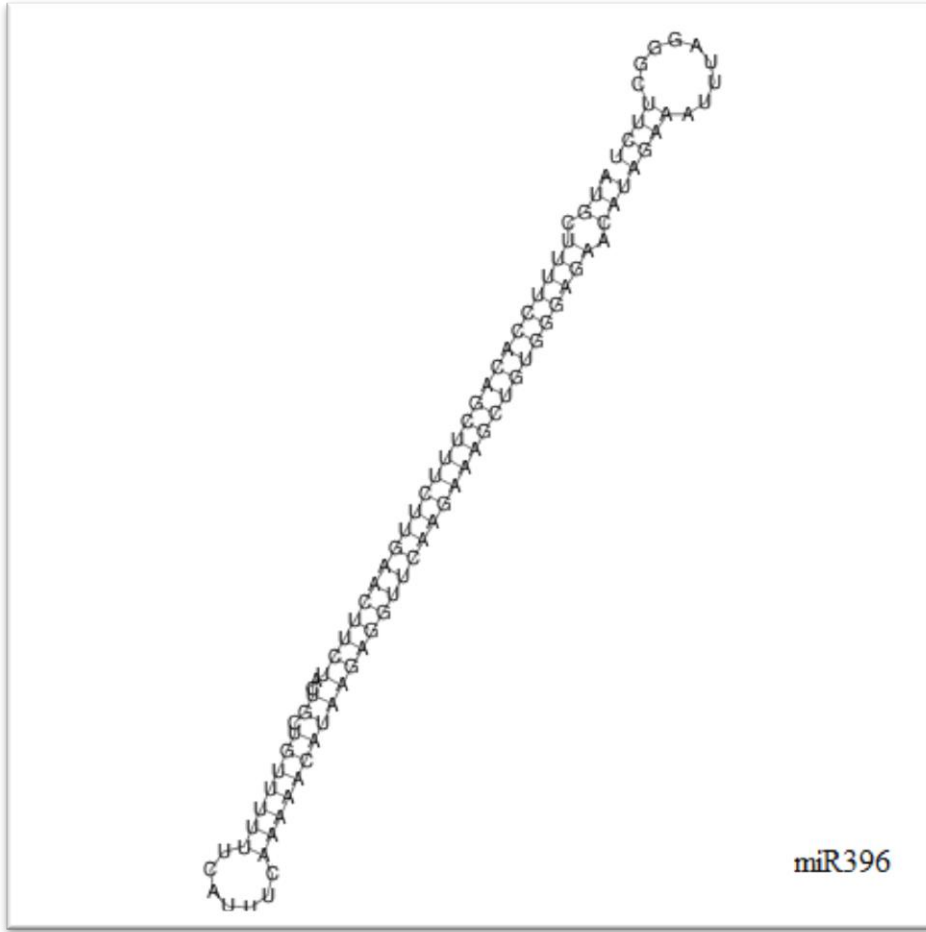
Şekil 1.8. miR172 RNAfold katlanma yapısı



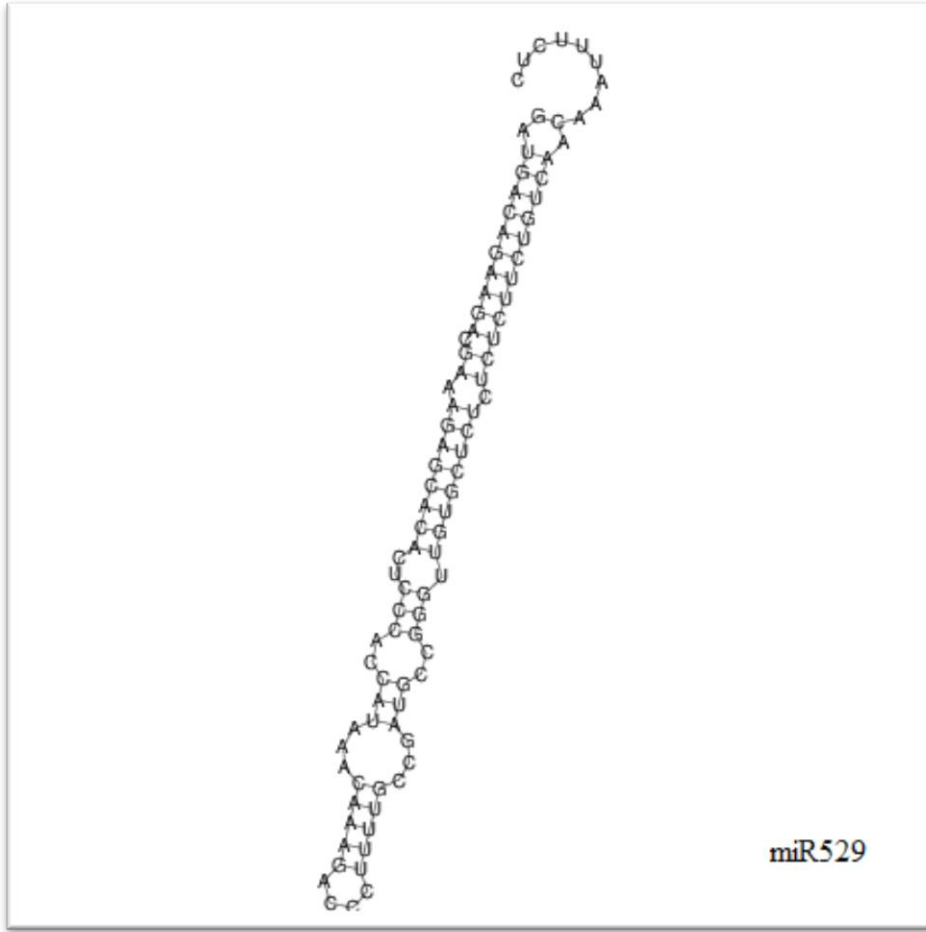
Şekil 1.9. miR319 RNAfold katlanma yapısı



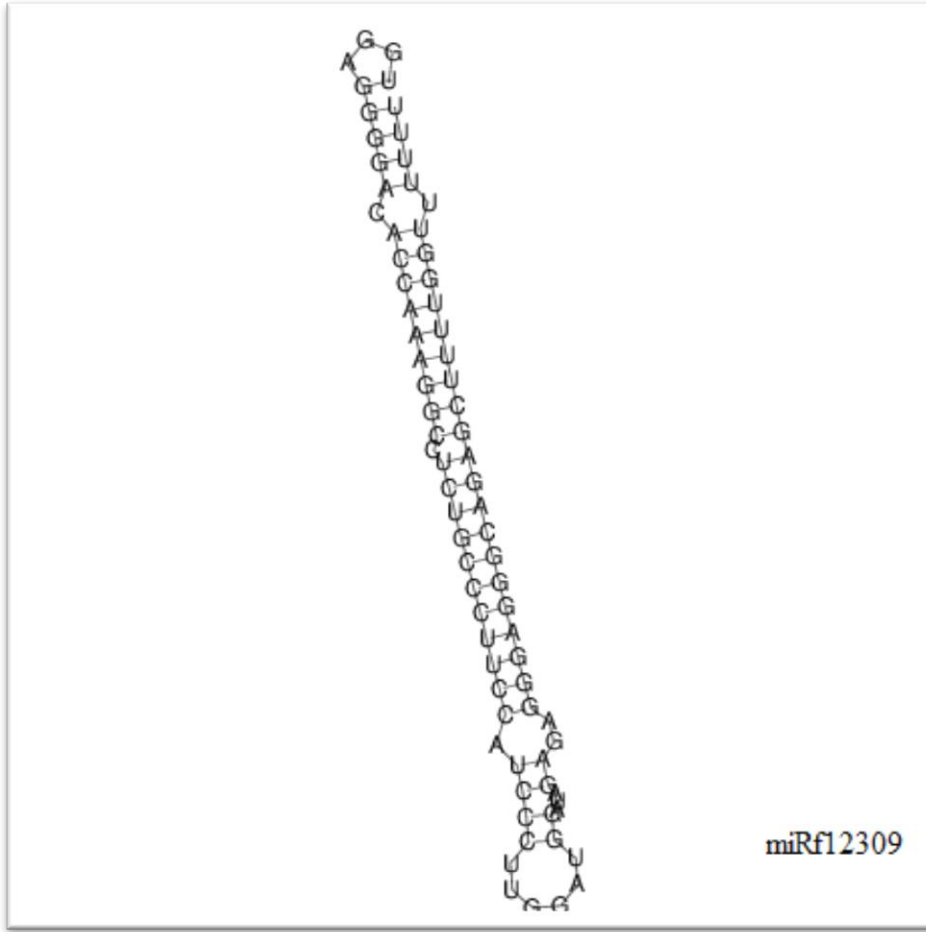
Şekil 1.10. miR390 RNAfold katlanma yapısı



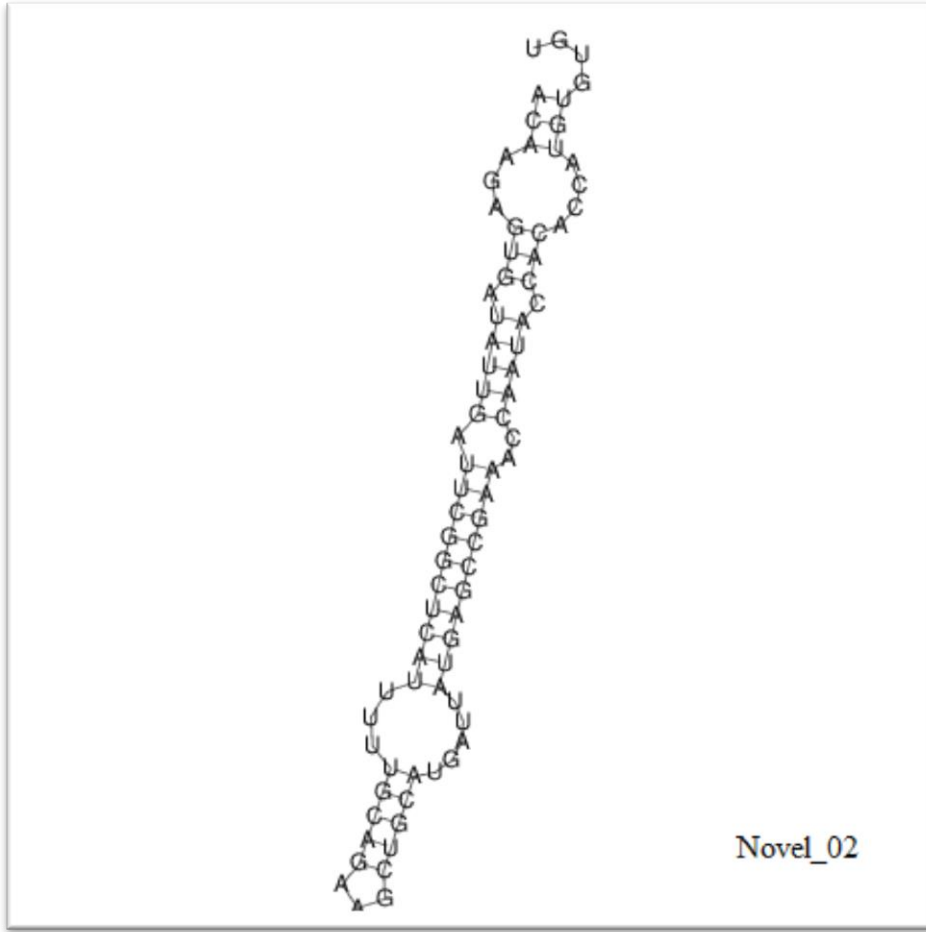
Şekil 1.11. miR396 RNAfold katlanma yapısı



Şekil 1.12. miR529 RNAfold katlanma yapısı



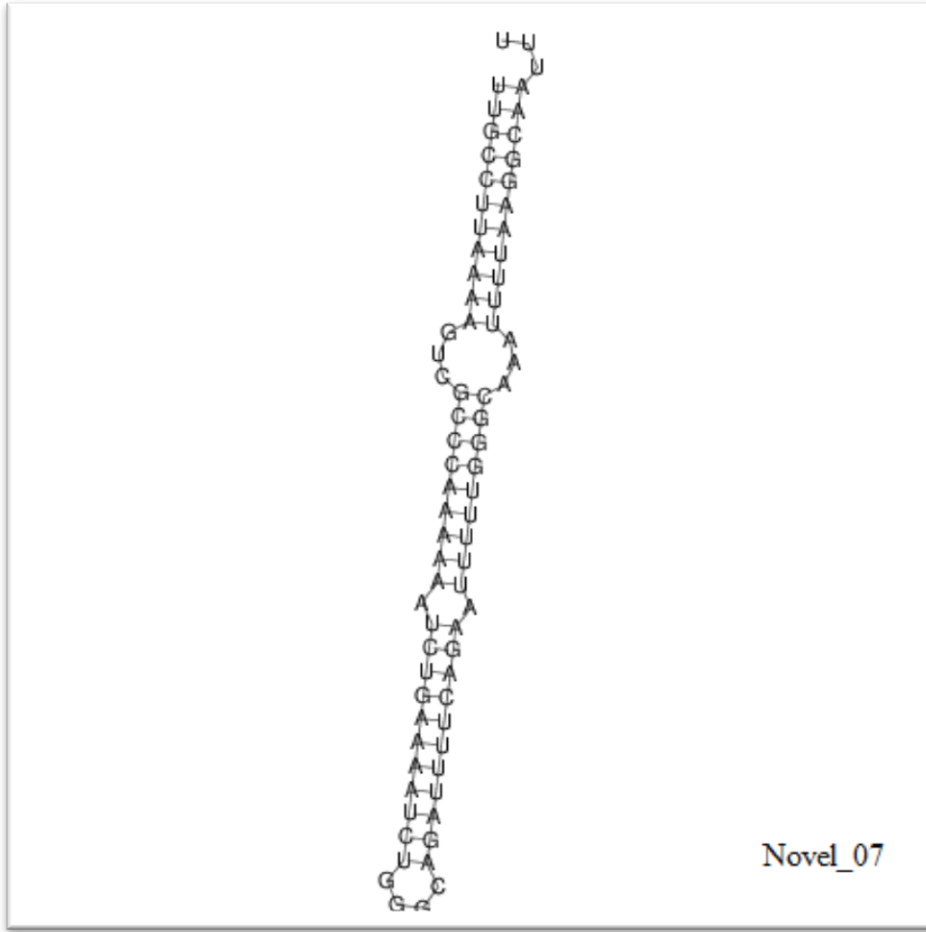
Şekil 1.13. miRf12309 RNAfold katlanma yapısı



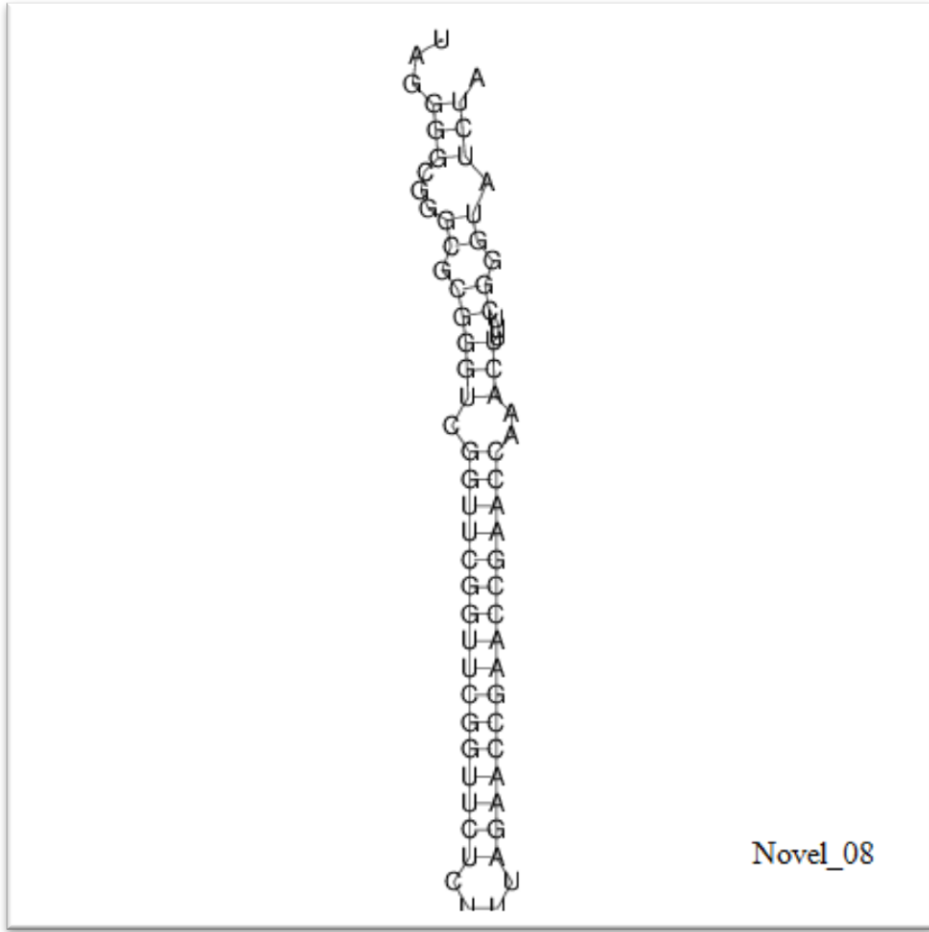
Şekil 1.15. Novel_02 RNAfold katlanma yapısı



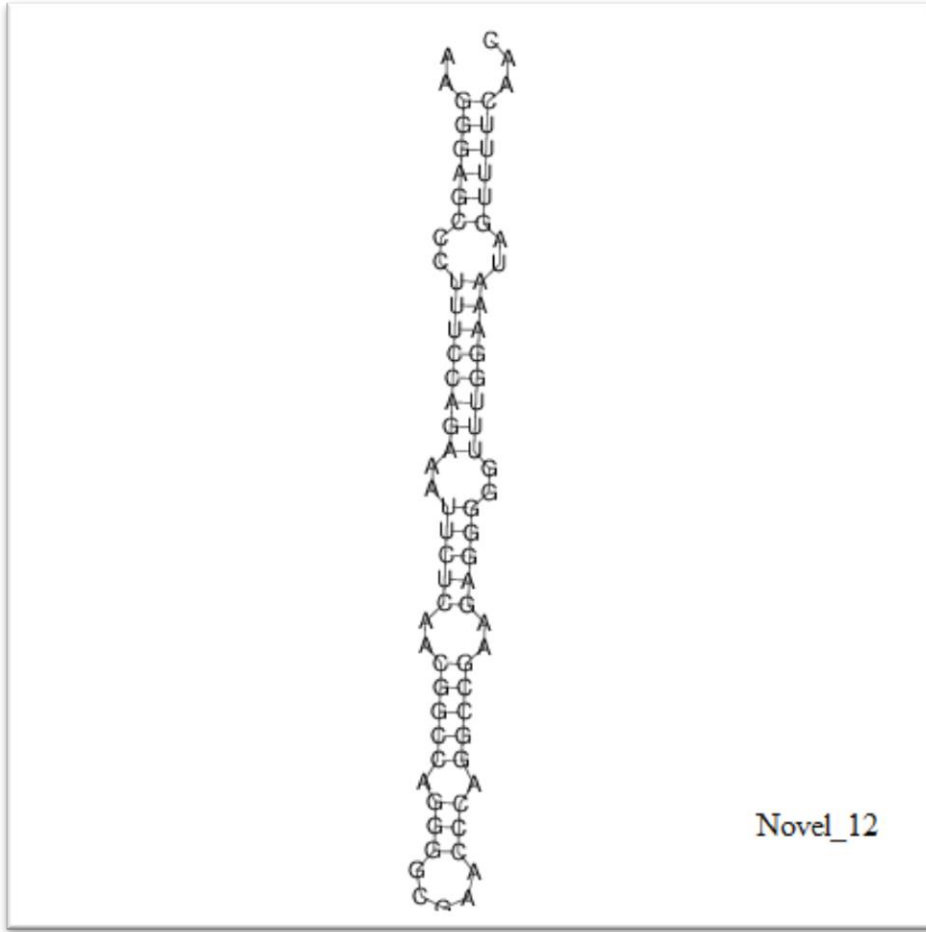
Şekil 1.16. Novel_03 RNAfold katlanma yapısı



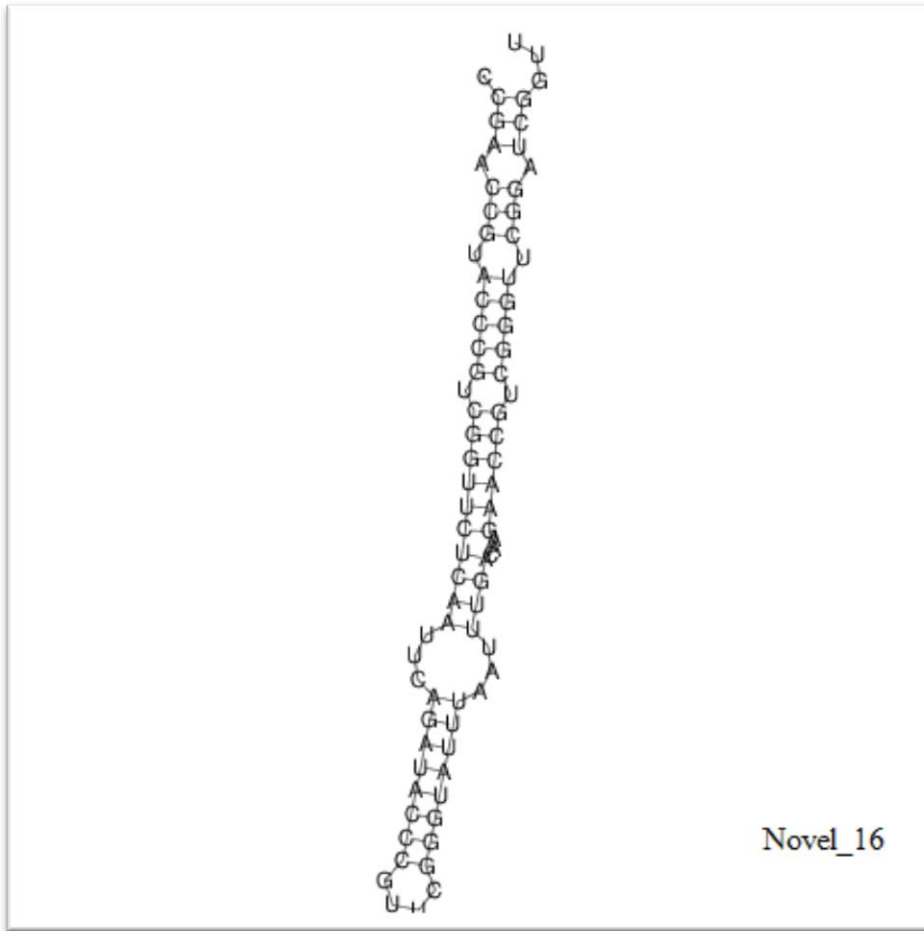
Şekil 1.20. Novel_07 RNAfold katlanma yapısı



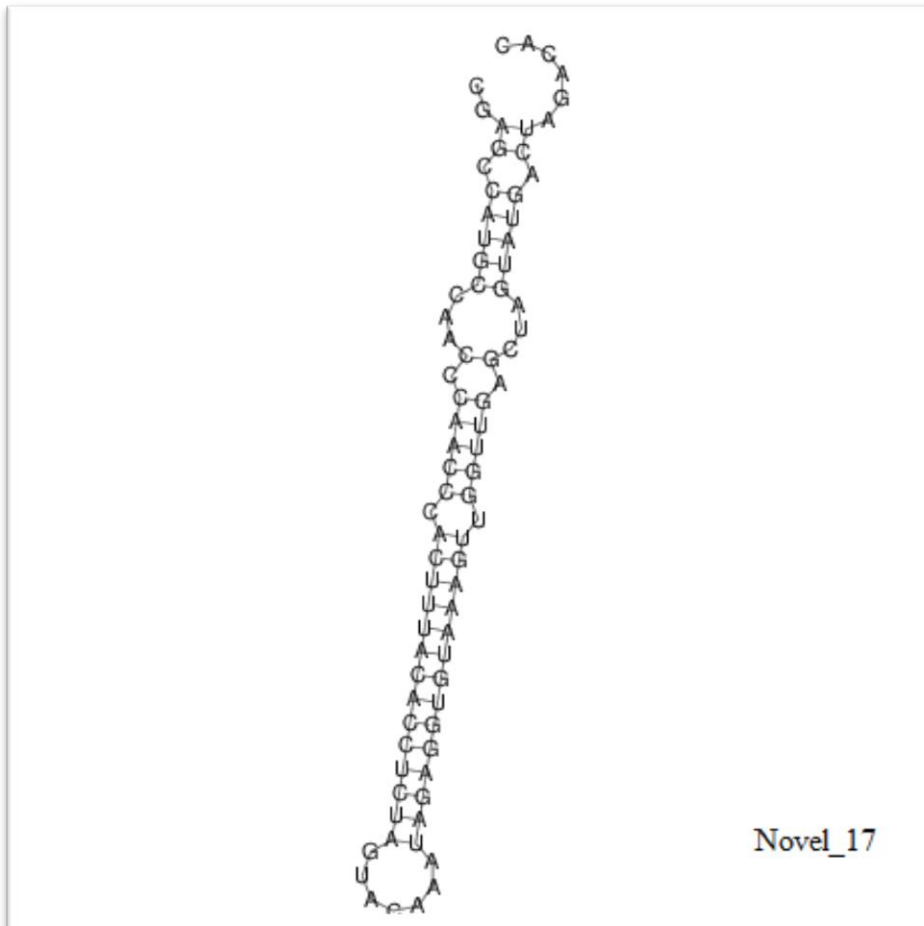
Şekil 1.21. Novel_08 RNAfold katlanma yapısı



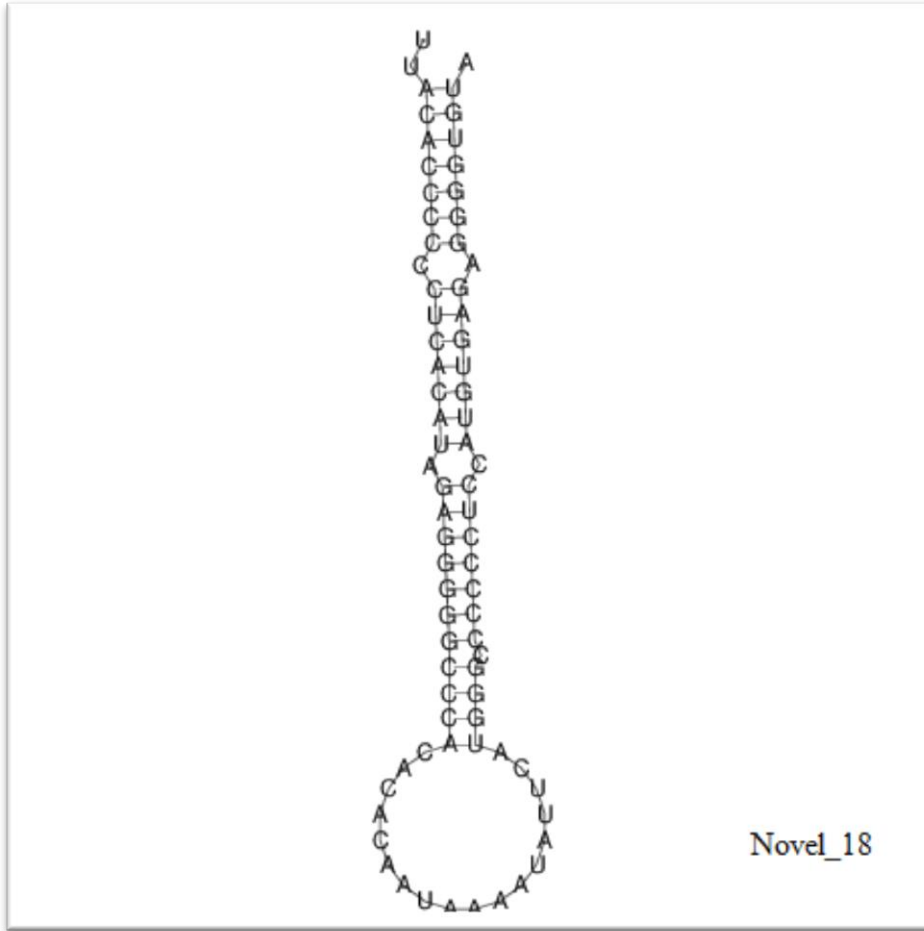
Şekil 1.25. Novel_12 RNAfold katlanma yapısı



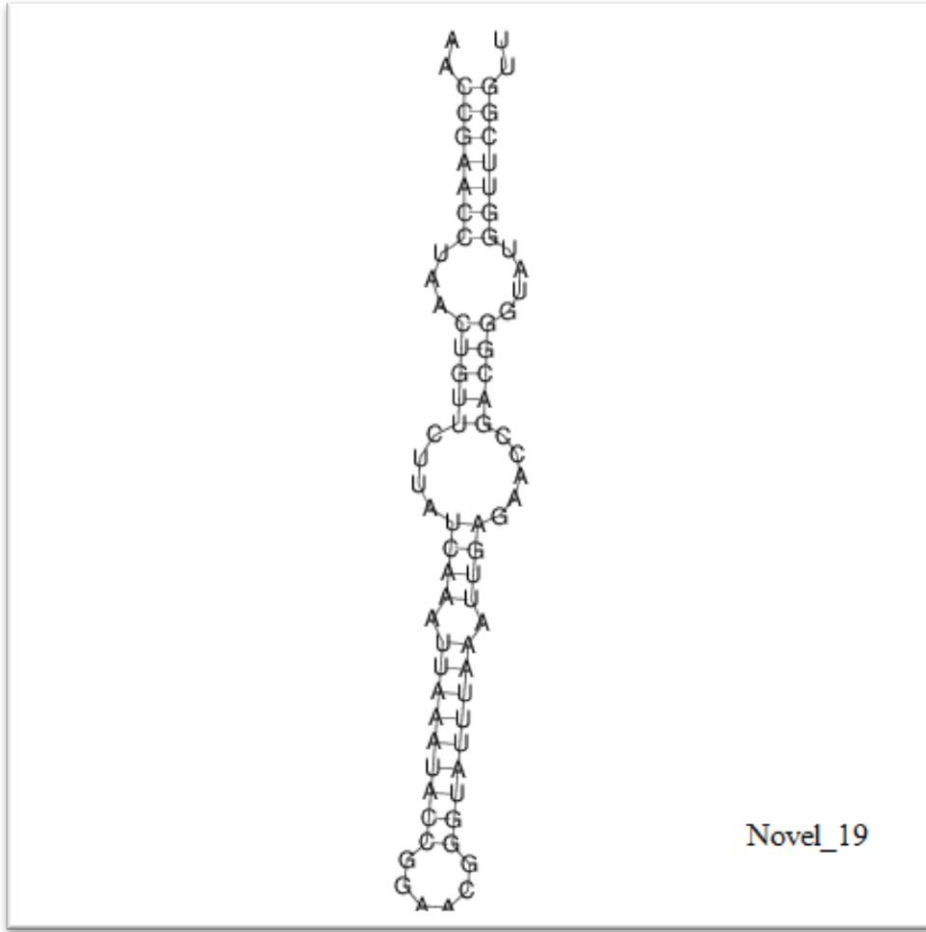
Şekil 1.29. Novel_16 RNAfold katlanma yapısı



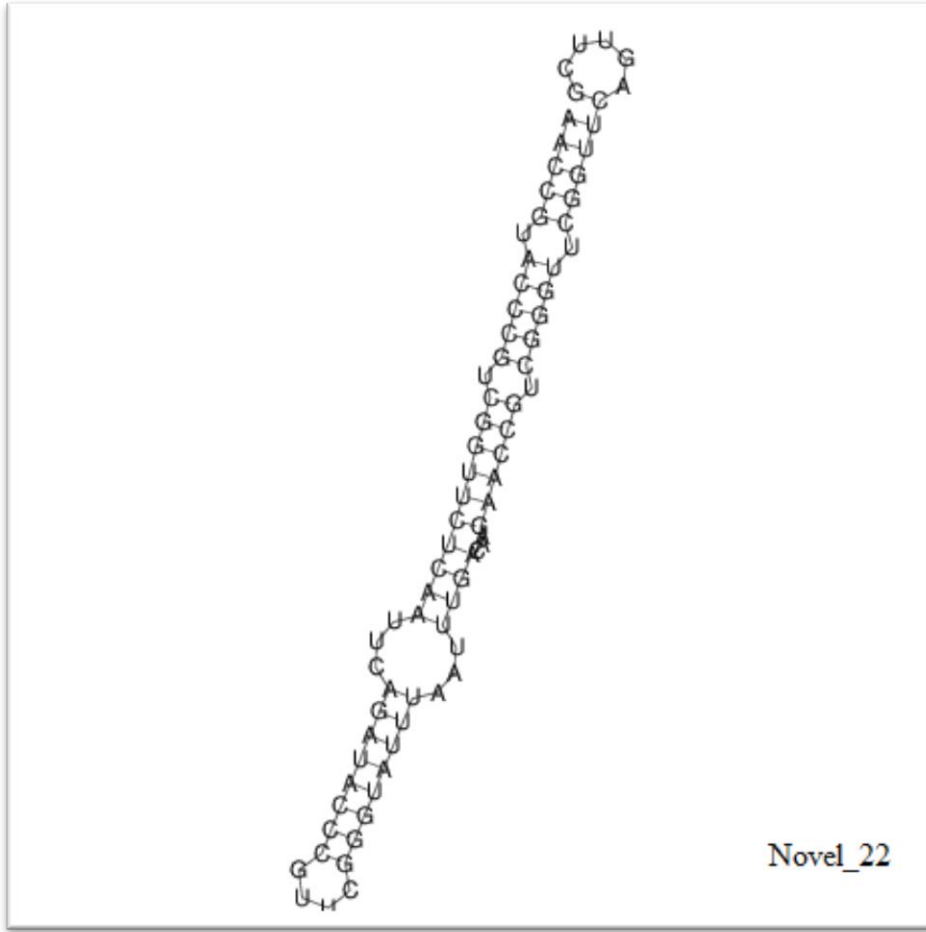
Şekil 2.30. Novel_17 RNAfold katlanma yapısı



Şekil 1.31. Novel_18 RNAfold katlanma yapısı



Şekil 1.32. Novel_19 RNAfold katlanma yapısı



Şekil 1.35. Novel_22 RNAfold katlanma yapısı

2. PCR reaksiyonları için kullanılan primerler listesi

2.1. miRNA primerleri

ID	Forward	Stem-loop
miRN_01	TGGAATGGAGTTCTGCG AAGG	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACC CTTCG
miRN_02	TGTGGTATTGGTTTCGG CTCAT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACA TGAGC
miR529	AGAAGAGAGAGAGCAC AACCC	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACG GGTTG
MiRN_05	AACAGAGGCCGGGTTG TTACACA	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACT GTGTA
miRN_12	TTCCAGAAATTCTCGAC GGCC	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACG GCCGT
MiR156	TGACAGAAGAGAGTGA GTAC	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACG TACTC
miR319a	TTGGACTGAAGGGTGC TCCCT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACA GGGAG

2.2. Hedef Primerleri

ID	Forward	Reverse
N_01-ruBisCO	ACCCACCACCAACCACAA	GGAGCACACAAGAGGCAGTAA
N_01-CCAtRNA	GCAGCGGGGTCACTATTTTTTC	ACAGCAAGGATGCGCCTTTTT
156/529-SQM	TCATCTGGTCAAATGTGCCT	GAACCTGCTACACTGTTGGC
156-Ethylene	ATCCAAGTCGCTCATTGCTC	GGCTTCCTTCTCCGTCTATTG
N_02-pnttrc	AAGCAAGCAGTAGGCTCACC	TGACATCCACCAAGTCCTCA
319-TCP4	GGTGGAGCAGCAGGATATCT	TTGCGATGATGATGCTGGTG
N_05-oacyl	CCTGATGGCCCAATCACAAA	AAGCTTCTCTCGTGGGCAT
N_12-pfstaz	TGGAGGTGGAGGACAATGAG	GGTACAGAGGCCAGGTCATT

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Muhammet Yusuf PEKMEZCİ
Doğum Yeri : Osmangazi / BURSA
Doğum Tarihi : 24 / 02 / 1990
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce
Adres : Soğukkuyu Mah. Aydın Sok. No:45 Osmangazi BURSA
16170
Tel : 0090 546 204 9717
E-posta : myusufpekmezci@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise	: Şükrü Şankaya Anadolu Lisesi	2004-2008
Lisans	: Fatih Üniversitesi İngilizce Biyoloji (Burslu)	2008-2012
Yüksek Lisans	: ÇKÜ FBE Biyoloji Anabilim Dalı	2013-2015

Yayınları (SCI ve diğer)

- Eren, H., Pekmezci, M., Okay, S., Turktas, M., Inal, B., Ilhan, E., Atak, M., Erayman, M., and Unver, T. (2015). Hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) root miRNome analysis in response to salt stress. *Annals of Applied Biology*

Ulusal Kongrelerde Sözlü Sunum

- 4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos 2015, Afyon, Türkiye