T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANGAL AKKARAMAN KUZULARINDA BÜYÜMEYE BAĞLI mikro RNA'LARIN TANIMLANMASI

Araş. Gör. Gonca SÖNMEZ

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Şeref İNAL

KONYA-2021

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana destek veren, benimle bilgisini ve tecrübesini paylaşan, yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Şeref İNAL'a, bölüm hocalarımdan Prof. Dr. Orhan ÇETİN ve Prof. Dr. Kemal KIRIKÇI'ya, tez izleme komitemde olan Prof. Dr. Zafer BULUT'a, tezime ait örneklerinin toplanması sürecinde büyük katkıları olan Prof. Dr. Alparslan COŞKUN ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Buğra KIVRAK'a, gerek tez çalışmalarında gerek manevi konularda desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi A. Ezgi TELLİ, Dr. Öğr. Üyesi Yusuf BİÇER, Araş. Gör. Dr. Mustafa ÇAM, Araş. Gör. Hüdai ÇULHA ve Gamze TURKAL'a teşekkürlerimi sunuyorum. Hayatımın her alanında bana destek veren sevgili annem ve babama, beni motive eden eşim ve oğluma sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü tarafından 2016-ÖYP-009 kodlu proje olarak desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Gonca Sönmez

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ii
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET viii
SUMMARY ix
1.GİRİŞ 1
1.1.Türkiye'de Küçükbaş Hayvancılığın Durumu 1
1.2.Kangal Akkaraman 1
1.3.MikroRNA (miRNA) 3
1.3.1.miRNA Biyogenezi 3
1.3.2.miRNA'ların İsimlendirilmesi 4
1.3.3.miRNA Tespiti 5
1.4.miRNA Verim İlişkisi 16
1.5.Amaç 18
2.GEREÇ VE YÖNTEM 19
2.1.Gereç 19
2.1.1.Hayvan Materyali 19
2.1.2.Kan Numuneleri 19
2.2.Yöntem 19
2.2.1.GCAA Verilerin Elde Edilmesi 19
2.2.2.Gruplandırma 20
2.2.3.Total RNA İzolasyonu 21
2.2.4.Elde Edilen RNA'ların Miktar ve Kalite Tayini 22
2.2.5.RNA-seq 24
2.2.6.miRNA'dan cDNA (Komplementer DNA) Sentezi 28
2.2.7.Primer Dizaynı Primer Etkinlik Değerleri 29
2.2.8.RT-qPZR 30
2.3.Etik Kurul 31
3.BULGULAR 32
3.1.RNA-seq 32
3.1.1.Veri Kalite Kontrolü ve Uzunluk Filtreleme Sonuçları 32
3.1.2.Referans Genoma Haritalama 35
3.1.3.Bilinen ve Yeni miRNA Analizi 37
3.1.4.Kodlama Yapmayan RNA'ların Analizi 41

3.1.5.Tekrarlanan RNA’ların Analizi 42
3.1.6.Ekzon ve İntron Hizalamaları 44
3.1.7.Yeni (novel) miRNA tahmini 44
3.1.8.miRNA Ekspresyon ve Diferansiyel Ekspresyon Analizi 51
3.2.RT-qPZR 63
3.3.Korelasyon Analizi 68
4.TARTIŞMA 69
5.SONUÇ VE ÖNERİLER 77
6.KAYNAKLAR 78
7.EKLER 85
7.1.EK-B. Sivas İli Damızlık Koyun Keçi Yetiştiricileri Birliği İzin Belgesi 85
7.2.EK-C. Tarım ve Orman Bakanlığı İzin Belgesi 86
7.3.EK-D. miRNA'ların İkincil Yapıları 87
8.TURNİTİN RAPORU 92

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Derece
ΔCt	: Delta Cycle Threshold
A	: Adenin
AGO	: Argonaute protein kompleksi
ATP	: Adenozin Trifosfat
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
CA	: Canlı ağırlık
cDNA	: Komplementer DNA
Ct	: Cycle Threshold
DAA	:Düşük Ağırlık Artışı
ddH_2O	: Double Distile Su
DGCR8	: DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksiribo Nükleotid Trifosfat
dsDNA	: Çift iplikli DNA (Double Stranded DNA)
dk	: Dakika
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr	: Etidium Bromür

g : Gram

G : Guanin

Gbp : Gigabaz çiftleri

GCAA : Günlük Canlı Ağırlık Artışı

GO : Gen Ontolojisi

KEGG : Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi

kg : Kilogram

LNA : Kilitli Nükleik Asitler

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

ml : Mililitre

mM : Milimolar

$MnCl_2$: Mangan (II) Klorür

miRNA : Mikro RNA

mRNA : Mesajcı RNA

NFW : Nuclease-Free Water

ng : Nanogram

NGS : Yeni Nesil Sekanslama (Next-Generation Sequencing)

NH_4Cl : Amonyum Klorür

nM : Nanometre

PNA : Peptit Nükleik Asitler

qPZR : Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RISC : RNA kaynaklı susturma kompleksi

RNA : Ribo Nükleik Asit

rpm : Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)

rRNA : Ribozomal RNA

RT-qPZR : Kantitatif Revers Transkipsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

snRNA : Small nuclear RNA

snoRNA : Small nucleolar RNA

sRNA : Small RNA

T : Timin

Tm : Erime Sıcaklığı

TPM : Milyon Okuma Başına Transkript

tRNA : Taşıyıcı RNA

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

UV : Ultra Viyole

YDA :Yüşük Ağırlık Artışı

> : Büyük

< : Küçük

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kangal Akkaraman Kuzularında Büyümeye Bağlı mikro RNA'ların Tanımlanması

Gonca SÖNMEZ

Veterinerlik Zootekni Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2021

Türkiyedeki koyun varlığında önemli bir yere sahip Kangal Akkaraman koyun ırkı, Türkiye'nin yerli genetik kaynaklarındandır. MikroRNA'lar (miRNA'lar), ekspresyonlarını negatif olarak düzenlemek için hedef mRNA'larla eşleşen, küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır. miRNA'lar, transkriptomun büyük bir bölümünü etkilemekte ve hayvan gelişimi sırasında geniş bir yelpazede biyolojik süreçleri düzenlemektedirler.

Bu çalışmada Kangal Akkaraman kuzularına ait beyaz kan hücrelerinde miRNA varlığının araştırılması ve Kangal Akkaraman ırkı kuzularında günlük canlı ağırlık artışı ile ilişkili miRNA'ların tespitinin yapılması amaçlanmıştır. Günlük canlı ağırlık artışına göre düşük (DAA) (n = 17) ve yüksek (YAA) (n = 21) olarak iki grup oluşturulmuştur. Kuzulardan alınan kan örneklerinden beyaz kan hücreleri ayrılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. DAA ve YAA gruplarına ait miRNA kütüphaneleri hazırlanmış ve Illumina Novaseq ile sekanslanmıştır. Okumalar Oar_v3.1 koyun referans genomu kullanılarak Bowtie programı ile haritalanmıştır. İki grubun diferansiyel ekspresyon analizi DESeq R paketi (1.8.3) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. YAA grubunda yaklaşık 18 milyon sekans okuma verisi ve DAA grubunda yaklaşık 21 milyon sekans okuma verisi haritalanmıştır. Toplamda 129 bilinen miRNA'nın ekspresyon seviyeleri tespit edilmiş, 134 yeni miRNA tahmin edilmiştir. Anlamlı diferansiyel eksprese olmuş miRNA tanımlanmamıştır ($p<0,05$). RNA-seq verileri NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) veritabanına GSE168662 erişim numarası altında yüklenmiştir. RNA-seq verilerine göre kat artışı 0,66 (oar-miR-21) ve 0,61 (oar-miR-150) olan miRNA'lar seçilmiş, kantitatif PZR (qPZR) ile ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Elde edilen oar-miR-21, oar-miR-150'ye ait $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin normal dağılım gösterdiği Shapiro-Wilk testi ile doğrulanmıştır. Gruplar arası karşılaştırma yapmak için *Independent Samples T* Test kullanılmıştır. YAA grubundaki örneklere ait oar-miR-21 ekspresyonu DAA grubundaki örneklere ait ekspresyonu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0,05$). YAA ve DAA gruplarındaki örneklere ait oar-miR-150 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$).

Elde edilen verilerin, bu konuda yapılacak yeni çalışmalar ile birlikte, Kangal Akkaraman koyunlarında günlük canlı ağırlık artışı ile ilgili ıslah çalışmalarına katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Ekspresyon, Günlük Canlı Ağırlık Artışı, Kangal Akkaraman, miRNA, RNA-seq.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Identification of Growth Related microRNAs in Kangal Akkaraman Lambs

Gonca SÖNMEZ

Department of Animal Science

PhD THESIS/ KONYA-2021

The majority of sheep in Turkey is Akkaraman. Kangal is of Akkaraman sheep breed is one of Turkey's indigenous genetic resources. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that match target mRNAs to negatively regulate their expression. miRNAs affect large part of the transcriptome and regulate a wide range of biological processes during animal development.

In this study, it was aimed to investigate the presence of miRNA belonging to Kangal Akkaraman lambs and to determine the miRNAs associated with average daily gain in Kangal Akkaraman lambs. Depending on the average daily gain, two groups were formed as low daily gain (LDG) and high daily gain (HDG). White blood cells were separated from blood samples taken from lambs and RNA was isolated. miRNA libraries (LDG and HDG groups) were prepared and sequenced with Illumina Novaseq. Readings were mapped with the Bowtie program using the Oar_v3.1 sheep reference genome. Differential expression analysis of the two groups was performed using the DESeq R package (1.8.3). It was mapped about 18 million sequence reads in YAA and 21 million sequence reads in DAA samples. In total, 129 known miRNAs were identified, 134 novel miRNAs were predicted. No significant differential expressed miRNA was identified (p value <0.01). RNA-seq data has been deposited in NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (GSE168662). According to the RNA-seq data, miRNAs with a fold increase of 0,66 (oar-miR-21) and 0,61 (oar-miR-150) were selected, and their expression levels were tested by quantitative real-time PZR (qPZR). It was confirmed by Sharpiro-Wilk that the $2^{-\Delta Ct}$ values of the oar-miR-21, oar-miR-150 showed normal distribution. Independent Samples T Test was used to make comparisons between two groups. The expression of oar-miR-21 of the samples in the YAA group showed a statistically significant increase compared to the expression of the samples in the DAA group ($p<0,05$). The expression of oar-miR-150 of the samples in YAA and DAA groups did not show a statistically significant difference ($p>0,05$).

It is predicted that the obtained data, would shed light on breeding studies related to average daily gain in Kangal Akkraman sheep with further studies.

Keywords: Average daily gain, Expression, Kangal Akkaraman, miRNA, RNA-seq.

1. GİRİŞ

1.1. Türkiye'de Küçükbaş Hayvancılığın Durumu

Koyunculuk Türkiye'de tarih boyunca çiftçilerin uğraştığı en önemli hayvan yetiştiriciliği dallarından bir tanesi olmuştur. Et, süt, yün ve deri üretimi bakımından ülke ekonomisine önemli katkılar sağlamaktadır. Türkiye'de Akkaraman, Morkaraman, Kangal Akkaraman, Dağlıç, Kıvırcık, Sakız, Merinos, Karayaka, Herik, Acıpayam, Bafra, Sönmez ve Polatlı en fazla yetiştiriciliği yapılan yerli ırklardır. Ayrıca son yıllarda verim özellikleri yüksek olan kültür ırkı koyunların da yetiştiriciliği yapılmaktadır.

Dünyada ve ülkemizde bitkisel üretim yapılamayan kırsal alanlardan faydalanabilme yollarından en önemlisi hayvancılık ve bu sektör içerisinde de küçükbaş hayvan yetiştiriciliğidir. Ülkemiz kara alanlarının %18,8'ini (yaklaşık 14,6 milyon hektar) çayır-meralar oluşturmaktadır (TÜİK 2017). Türkiye'de özellikle kamu uygulamalarının da etkisiyle büyükbaş hayvan yetiştiriciliği artmakta, entansif yetiştiricilik yapılmasından dolayı da meralardan yararlanma oranı giderek azalmaktadır. Kısaca Türkiye'nin mera alanlarını değerlendirmek için küçükbaş hayvancılıktan başka bir seçeneği kalmamaktadır. Hayvancılık sektörü ülkemizde, istihdam sağlanması ve beslenmede oldukça önemli olan et ve süt gibi gıdaların üretiminin güvence altına alınması gibi oldukça önemli konularda stratejik öneme sahiptir. Küçükbaş hayvan yetiştiriciliği de ülkemizde kırmızı et tüketimini arttırmak için en önemli sektördür (Ertuğrul ve ark 2010). Türkiye'de 2020 TÜİK verilerine göre 42 712 508 baş koyun bulunduğu bildirilmiştir. Ülkemizde küçükbaş hayvan yetiştiriciliği önemli düzeyde verimleri düşük yerli ırklarla yapılmaktadır. Ayrıca üretim, ağırlıklı olarak otlatmaya dayalı ekstansif bir yapıya sahiptir. Kişi başı kırmızı et tüketimi 2017 yılında dünyada ortalama 20,5 kg iken ülkemizde 12,5 kg olarak hesaplanmıştır. Bunun da 8,3 kg'ı sığır etinden karşılanırken koyun etinin 4,1 kg'da kaldığı görülmektedir (Aktaş 2020).

1.2. Kangal Akkaraman

Kangal Akkaraman koyunlarının esas yetiştirme yerleri Sivas ve Malatya olmasına rağmen İç Anadolu Bölgesi'nde Sivas ve çevresindeki illere yayılmıştır.

Kombine (et ve süt) verimli bir koyun ırkıdır. Kangal Akkaraman koyunları genelde, iri vücut yapısına ve ince dudak yapısına sahiptirler. Kulakları geniş, uzun ve sarkıktır. Vucüt beyaz olmasına rağmen ayaklar, göz ve ağız çevresi siyahtır. Erkek kuzuların doğum ağırlığı ortalama 4,5 kg, sütten kesim yaşı 90 gün ve sütten kesim canlı ağırlığı ortalama 22,1 kg'dır. Günlük ağırlık artışı ortalama 300 g'dır (Resmi Gazete 2004).

Türkiye'deki koyun varlığının büyük bir bölümünü oluşturan Akkaraman koyun ırkının kendi içinde variyeteleri bulunmaktadır (Tufan ve Akmaz 2001, Karslı ve ark 2011). Uzun süre Akkaraman ırkının variyetelerinden birisi olarak bahsedilen Kangal Akkaraman koyun ırkı Türkiye'nin yerli genetik kaynaklarından olup (Kurar ve ark 2012); Sivas ilinin Kangal ilçesinden ismini almaktadır (Yilmaz ve ark 2011). Türkiye'deki koyun popülasyonunun neredeyse yarısını oluşturan Akkaraman ırkıyla büyük benzerlik gösterse de morfolojik olarak kafa yapısı, vücut büyüklüğü ve yapağı bakımından, ayrıca fizyolojik olarak süt ve karkas veriminin yüksek olması sebebiyle 2012 yılında ırk olarak kabul ve tescil edilmiştir (Koçyigit ve ark 2018). Genel olarak saf yetiştirilme alanı Sivas şehri civarında olmakla birlikte İç Anadolu bölgesinde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu ırk, yüksek rakımlı yarı kurak arazilerde yetişebildiğinden ve iyi bakım besleme koşullarında tatmin edici düzeyde ikizlik görülebildiğinden dolayı kasaplık kuzu üretiminde kullanılabilecek yerli ırk kaynaklarımızdandır. Bundan dolayı Kangal Akkaraman koçları damızlık olarak İç Anadolu Bölgesindeki Akkaraman sürülerinde kullanılmaktadır (Yilmaz ve ark 2011).

Genel olarak morfolojik yapısı Akkaraman ırkının tüm özelliklerini gösterse de kuyruğun geniş ve yukarıdan yapılı, bedenin yüksek, boynun daha uzun ve butların et yapısının daha iyi olması bakımından farklılık göstermektedir (Örkiz ve ark 1984).

Kangal Akkaraman kuzularının besi performansına yönelik sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Tufan ve Akmaz (2001) Kangal Akkaraman kuzularında besinin 40 kg canlı ağırlığa kadar sürdürülebileceğini bildirmişlerdir. Örkiz ve ark (1984) 90 günlük sütten kesim dönemine kadar Kangal Akkaraman kuzularının günlük canlı ağırlık artışlarını (GCAA) erkek ve dişilerde 207,5 ve 190,3 g olarak hesaplamışlardır. Sütten kesim sonrasında farklı yetiştirme metotuyla 60 gün kadar besiye alınan kuzuların GCAA'larının 153-181 g arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

1.3. MikroRNA (miRNA)

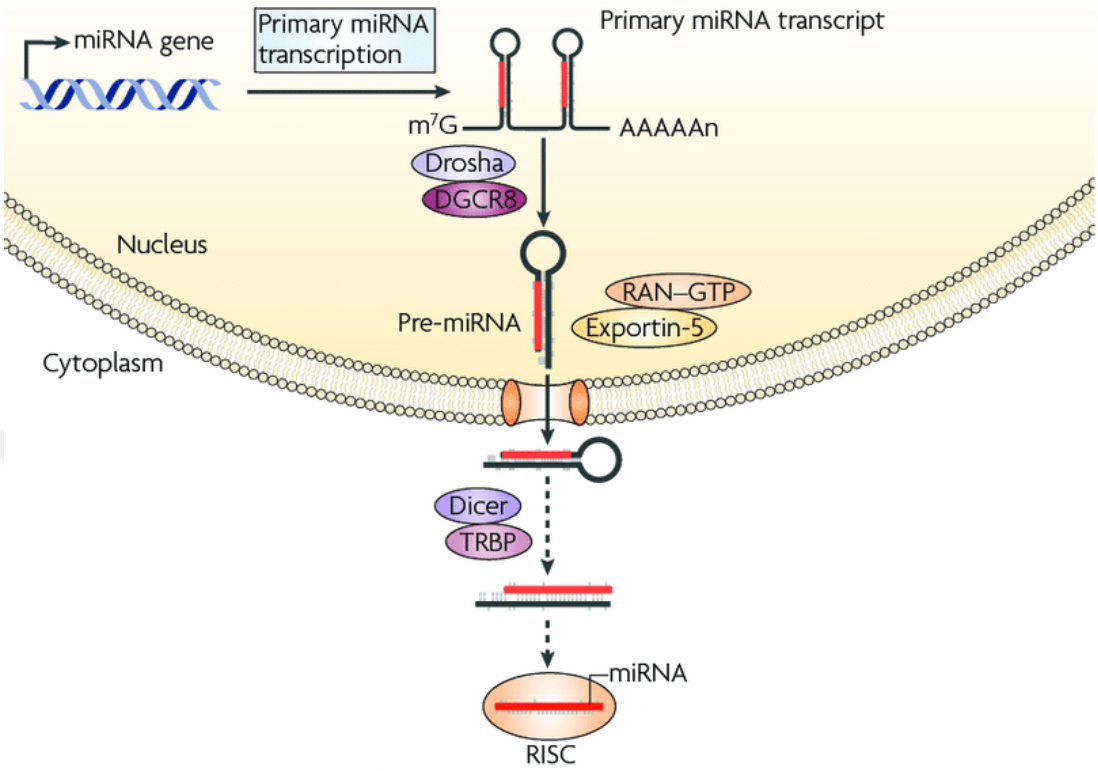
Yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda küçük kodlama yapmayan tek iplikli RNA molekülleri miRNA olarak isimlendirilmektedir. miRNA'nın 5’ uçlarında bir üridin bulunmaktadır ve 3’ uçları mRNA'nın çevrilmemiş bölgeleri ile kısmen tamamlayıcıdır. miRNA, Argonaute (AGO) protein kompleksi ile beraber mRNA'nın deadenilasyonu, degradasyonu veya translasyonun baskılanmasına neden olmaktadır (Wu ve ark 2006).

Günümüzde hemen hemen tüm hayvan model sistemlerinde tespit edilen mikroRNA (miRNA) ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'da gözlenmiştir (Lee ve ark 1993) ve canlılarda en çok bulunan küçük RNA'dır (Felekkis ve ark 2010). İkinci miRNA 2000 yılında keşfedilmiştir ve türler arasında korunduğu bulunmuştur (Reinhart ve ark 2000). Bu bulgu, miRNA keşif çalışmalarını hızlandırmıştır ve kısa süre sonra *Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster* ve insan genomlarında çok daha fazla miRNA bulunmuştur (Lagos-Quintana ve ark 2001, Lau ve ark 2001, Lee ve ark 2001). Organizmada bulunan miRNA sayıları organizmanın karmaşıklığı ile ilişkilendirilmiştir (Friedlander ve ark 2014). Memeli miRNA'larının tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unu düzenlediği bilinmektedir (Filipowicz ve ark 2008). Birden fazla miRNA aynı mesajcı RNA’yı (mRNA) hedeflediği için miRNA ve mRNA ekspresyonu arasında doğrusal bir korelasyon bulunmamaktadır (Saetrom ve ark 2007).

1.3.1. miRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi, nükleusta ve sitoplazmada geçen iki aşamalı bir süreçtir. Nükleusta miRNA'lar, kendi promotörleri tarafından pri-miRNA adı verilen uzun bir transkript olarak kopyalanırlar (Lee ve ark 2002). RNA pol II'nin pri-miRNA transkripsiyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Chen ve ark 2004). Pri-miRNA’ların kesimi nükleusta Drosha RNase III endonükleaz ve çift sarmallı RNA bağlayıcı protein DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8) tarafından gerçekleştirilir (Lee ve ark 2002). Bu pre-miRNA, exportin-5 ve Ran-GTP'nin etkileşimi yoluyla sitoplazmaya taşınır (Yi ve ark 2003). Sitoplazmada pre-miRNA olgunlaşması RNase III endonükleaz Dicer tarafından gerçekleştirilir (MacRae ve Doudna 2007, Lau ve ark 2012). Hem bitkilerde hem de hayvanlarda miRNA, RNA

kaynaklı susturma kompleksine (RISC) yüklenmektedir (Sanghvi ve Steel 2011) (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Hayvan hücrelerinde miRNA biyogenezi (Lodish ve ark 2008).

1.3.2. miRNA'ların İsimlendirilmesi

Bir miRNA adının ilk üç harfi, bulunduğu türleri göstermektedir. Örneğin, insan, fare ve sıçan miRNA'ları sırasıyla hsa-, mmu- ve rno- şeklinde adlandırılacaktır. Bilgiler, 'mir' veya 'miR'deki 'r' harfinin büyük / küçük olmasıyla kodlanmaktadır. Örneğin, hsa-mir- gibi küçük harfli bir 'r' ile etiketlenmiş bir sekans, birincil transkriptin miRNA genine ve / veya tahmin edilen stem-loop kısmına karşılık gelmektedir. Büyük bir 'R", hsa-miR ise olgun miRNA'ları göstermektedir (Bernardo ve ark 2012).

Genlerin sahip olduğu tanımlayıcı adların aksine, miRNA'lar basitçe sıralı olarak adlandırılmaktadır. Örneğin, son yayınlanan yeni insan miRNA'sı hsa-miR-400 ise, bir sonraki yayınlanan insan miRNA'sı hsa-miR-401 olarak adlandırılır. Bununla birlikte, fareden bir miRNA, hsa-miR-400 ile aynı sekansta bulunursa, şimdiye kadar sadece 200 fare miRNA atanmış olsa bile, mmu-miR-400 olarak adlandırılacaktır.

Bunlara ek olarak miRNA'lar dizinin hangi ucunda bulunduğuna göre isimlendirilmektedir. Örneğin, 3'miRNA hsa-miR-400-3p ve 5'miRNA hsa-miR-400-5p olarak adlandırılacaktır. Yakından ilişkili miRNA'ları belirtmek için ada daha fazla son ek eklenebilmektedir. Örneğin, hsa-miR-XXa ve hsa-miR-XXb, sadece bir veya iki nükleotit farklı dizilere sahip miRNA'ları gösterecektir. Aynı olan, ancak farklı genlerden kopyalanan ve dolayısıyla farklı bir öncü sekansa sahip olgun miRNA sekanslarını göstermek için numaralandırılmış bir son ek atanabilmektedir. Bunun bir örneği, hsa-miR-XX-1 ve hsa-miR-XX-2 olarak adlandırılan özdeş olgun miRNA'lardan işlenmiş miRNA'lar hsa-mir-XX-1 ve hsa-mir-XX-2 şeklinde adlandırılmaktadır (Bernardo ve ark 2012).

Yukarıdaki kuralların istisnaları vardır. Örneğin, bitkiler ve viral miRNA'lar biraz farklı adlandırma kurallarına sahiptir. Ayrıca, bazı miRNA'lar let-7 ve lin-4 gibi tarihsel nedenlerle sayısal olmayan isimlerini korumuştur. Bu nedenlerden ötürü, isimlerinden alıntı yapmak yerine miRNA erişim numaraları her zaman sabit kalır, bu nedenle daha iyi bir referans görevi görmektedirler (Bernardo ve ark 2012).

1.3.3. miRNA Tespiti

Bir numuneden ekstrakte edildikten sonra miRNA'lar çeşitli yollarla ölçülebilir. En popüler yöntemler mikroarray analizi, RNA-seq, Kantitatif Revers Transkipsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR), northern blot ve in situ hibridizasyondur. Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın, başka bir tekniği kullanarak sonuçların doğrulanması önerilmektedir (Baker 2010).

Mikroarray Analizi

Oligo mikroarray teknolojisi, nükleik asitlerin Watson-Crick baz eşleştirme doğası üzerine kuruludur. Sentezlenmiş antisens problar tespit edilir ve tespit cihazı kullanılarak naylon destek platformuna sabitlenir (Krichevsky ve ark 2003). Mikroarray tabanlı teknikler, aynı anda çok sayıda miRNA'yı tarayabildikleri için miRNA profili oluşturmak için caziptirler. Mikroarray teknolojisi ilk olarak 1995 yılında (Schena ve ark 1995), cam veya kuvars destek platformuna önceden tespit edilmiş oligo probların paralel olarak birden fazla hibridizasyon gerçekleştirme kabiliyetine dayanarak geliştirilmiştir (Dalma-Weiszhausz ve ark 2006, Kreil ve ark 2006, Wolber ve ark 2006).

Mikroarray teknolojisinin uygulanması, miRNA'ların çeşitli özellikleri yüzünden oldukça zordur. Bu özelliklerin başında miRNA'ların kısa uzunluğu bulunmaktadır. Özgüllükten ödün vermeden maksimum bağlanma afinitesi ile optimize edilmiş hibridizasyon koşullarında probları bulmak oldukça zordur. Ayrıca probların karşı geniş erime sıcaklığı (Tm) aralığı bulunmaktadır. Probun tasarımı sadece miRNA'nın özgül dizisine bağlı olmalıdır, bu da her prob-miRNA etkileşimi için farklı bir erime sıcaklığı gerektirir. Birçok farklı miRNA, tek bir nükleotit kadar az farklılık gösteren benzer sekansları paylaşan ailelere aittir. Bu sorunları çözmek için, DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) bazlı problara kıyasla daha uygun hibridizasyon özellikleri gösteren birkaç nükleik asit analogu ortaya çıkmıştır. Peptit nükleik asitler (PNA) (Gershon 2005) ve kilitli nükleik asitler (LNA) dahil olmak üzere bazı analoglar klasik mRNA mikroarraylerde kullanılmıştır. Ayrıca karışık LNA / DNA ile modifiye edilmiş problarının uygulanmasını tarif etmiş ve geleneksel DNA bazlı miRNA dizilerine göre üstün hassasiyet bildirmiştir (Castoldi ve ark 2006, Castoldi ve ark 2007).

Dizideki noktaların yoğunluğunu arttırma yeteneği, aynı anda analiz edilebilecek daha fazla sayıda genle sonuçlanmıştır (Dalma-Weiszhausz ve ark 2006, Gershon 2005). Bir array platformunda nükleik asitleri tespit etmek için üç farklı teknoloji mevcuttur. Özel diziler için yaygın olarak kullanılan birincisi, cam slaytları kullanır ve değiştirilmemiş oligonükleotitlerin slayt üzerinde lekelenmesine dayanır (Hughes ve ark 2006). İkincisinde de cam slaytlar kullanır ancak probların slayt üzerinde birikmesi temeline dayanmaktadır. Bu slaytlarda bulunan probların sayısı bir öncekine göre çok daha yüksek olabilir. Problar doğrudan kuvarstan yapılan yüzey üzerinde fotokimyasal olarak sentezlenmektedir (Liu ve ark 2008). Son durumda, prob sayısı milyona yükselir (Wolber ve ark. 2006). İlk ikisi farklı renklerle boyanmış her cam için iki örneğin karşılaştırılmasına dayanır. Üçüncüsü ise, her slaydın sadece bir örnekle hibritlendiği tek renk hibridizasyonu kullanır. miRNA mikroarray, aynı anda yüzlerce miRNA'nın araştırılmalarını sağladığı için popüler bir yöntemdir (Planell-Saguer ve Rodicio 2013).

RNA-Seq

RNA-seq, biyolojik örneklerdeki RNA dizilerinin kimliğini ve varlığını belirlemek için deneysel yöntemlerin ve hesaplama yöntemlerinin bir birleşimidir. Deneysel yöntemler, RNA'nın hücre, doku veya hayvan örneklerinden izole

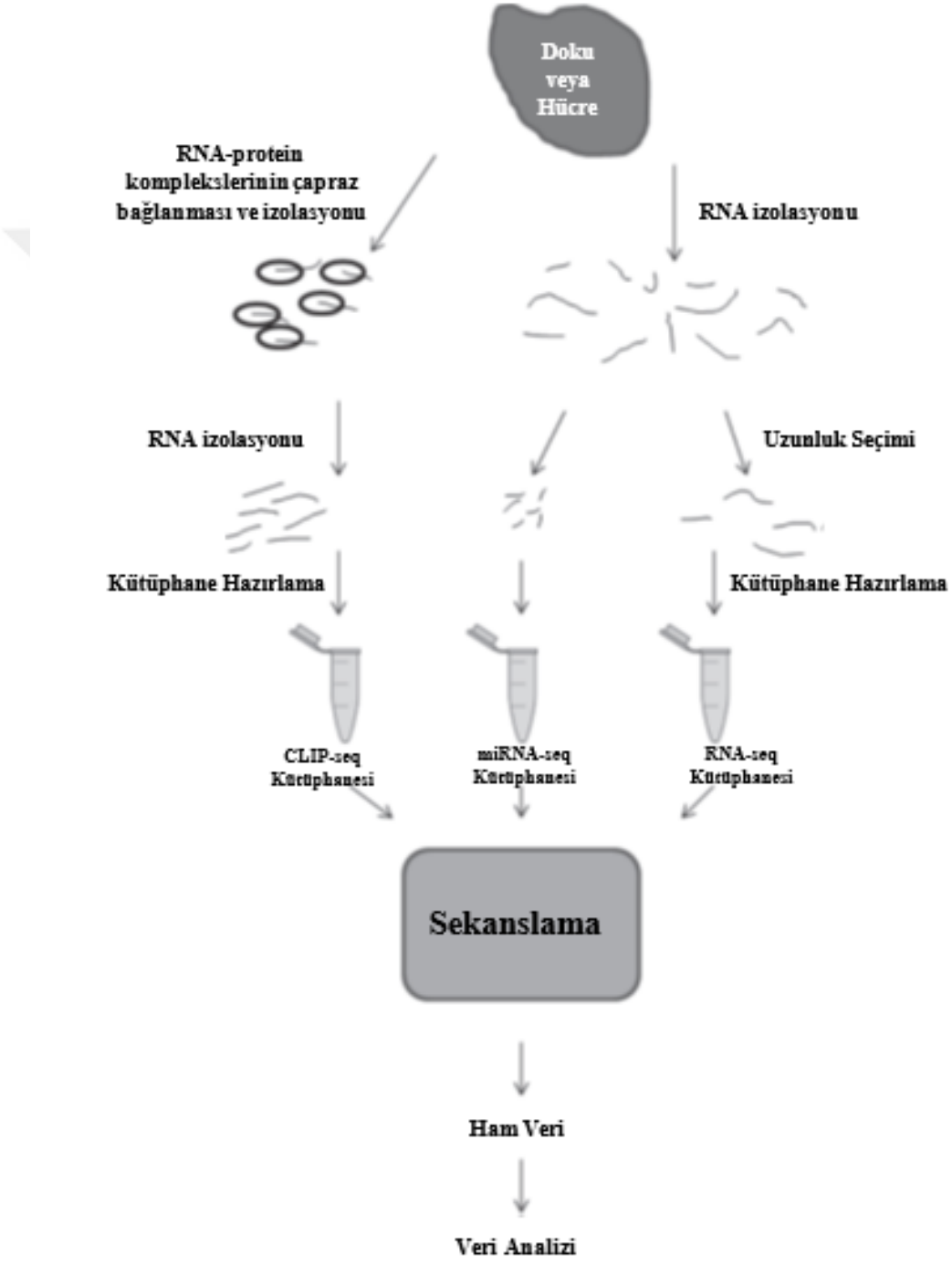
edilmesini, örneklerde RNA türlerini temsil eden kütüphanelerin hazırlanmasını, kütüphanenin kimyasal sekanslanmasını ve daha sonra biyoinformatik veri analizini içerir. RNA-seq analizinin mikroarray gibi önceki yöntemlerden farkı, mevcut RNA-seq platformlarının yüksek verimi, yeni teknolojilerin sağladığı hassasiyet ve yeni transkriptleri, gen modellerini ve küçük kodlanmayan RNA türlerini keşfetme yeteneğidir (Korpelainen ve ark 2014).

RNA-seq yöntemleri, sekanslama teknolojisindeki gelişmeler ile türetilmiştir. Birinci nesil yüksek verimli sekanslama Sanger Dideoksi sekanslamasını ifade eder. Bu yöntem nükleik asit fragman uzunluklarını çözmek için kapiller elektroforezi kullanır; standart bir çalışmada 96'lı kapiller sistem kullanıldığından yaklaşık 100 000 baz dizisi veren 600-1000 bazlık dizi uzunlukları çalışılabilir. Yeni nesil sekanslama (NGS) olarak da bilinen ikinci nesil sekanslama, benzer olarak sentez bazlı sekanslama yöntemini kullanır ancak paralel biçimde gerçekleştirilir. Böylece tek bir çalışmadaki sekanslama sayısı milyonları bulabilmektedir. Standart bir NGS çalışması, 600 milyar baz dizisi bilgisi sağlayan, 100 nükleotidin 6000 milyon kere sekanslanmasından oluşabilir. Üçüncü nesil dizileme, sentez bazlı sekanslama ve paralel sekanslamayı kullanmasına ek olarak DNA veya RNA moleküllerini sekanslayabilir. Üçüncü nesil sekanslama platformları, çalışma başına daha az sekanslama reaksiyonuna sahiptir, ancak reaksiyon başına sekans uzunluğu 1500 nükleotid uzunluğuna kadar çıkabilir (Korpelainen ve ark 2014).

RNA-seq analizinden elde edilen veriler, çalışılan hücrelerdeki protein kodlayan yeni transkriptlerin keşfini ve belli bir durumda değişen ekspresyon verilerini sağlayabilir. Örneğin normal ve kanser hücrelerindeki gen ekspresyon farklılıklarına veya beyin gelişimi sırasında düzenlenen genlere ait veriler bu yöntem ile elde edilebilir (Korpelainen ve ark 2014).

RNA-seq teknolojileri, zayıf olan gen bilgisi için artan beklentiler yaratmıştır. RNA-seq platformlarından elde edilen yeni veriler; yeni gen yapılarını ve bilinmeyen genleri tanımlamıştır. Ayrıca kısa ve uzun kodlama yapmayan transkriptlere veri sağlamıştır (Nagalakshmi ve ark 2008, Sultan ve ark 2008,Wilhelm ve ark 2008, Wang ve ark 2009). RNA-seq çalışmaları, sınırlı transkript dizisi bilgisine sahip birçok yeni tür için büyük miktarda veri sağlamıştır. RNA-seq iş akış şeması Şekil 1.2.'de gösterilmiştir. Şemanın başlangıcı laboratuvar adımlarını gösterirken, alt kısım veri

işleme ve analiz adımlarını göstermektedir. RNA-seq üç temel aşamadan oluşmaktadır; kütüphane hazırlama, sekanslama, veri analizi (Korpelainen ve ark 2014).



Şekil 1.2. RNA-seq analizi genel şema (Korpelainen ve ark 2014).

Kütüphane Hazırlama

Sekanslamadan önce, örneklerdeki tüm RNA molekülleri komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmektedir. Bu adım, RNA molekülleri sekanslanamadığı için gerçekleştirilir, DNA'lar daha stabil olmaları nedeniyle sekanslanabilir. Kütüphane hazırlığının iki amacı vardır: birincisi örneklerdeki RNA'ları doğru şekilde temsil etmek ve ikincisi RNA'yı DNA'ya dönüştürmektir. Her RNA sekanslama platformu (örneğin, Illumina, Solid, Ion Torrent) kendi özel protokolüne sahiptir. Her ticari platform için kütüphane protokolleri, kitleri ile birlikte şirketlerin web sitelerinde mevcuttur (Tablo 1.1.). Çalışmanın amacına göre hangi platformun kullanılacağı belirlenir (Korpelainen ve ark 2014).

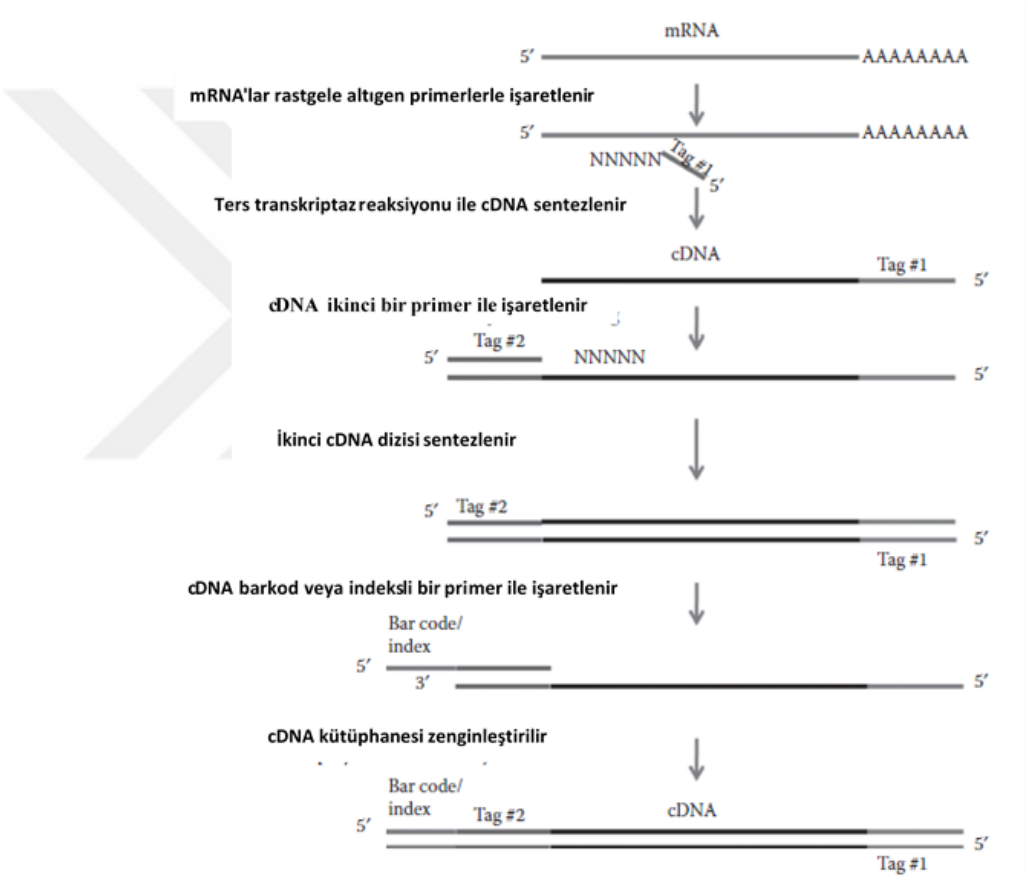
Tablo 1.1. Başlıca RNA-seq Platformları ve Genel Özellikleri.

Platform	Sekanslama Kimyası	Tespit Kimyası	Web Sitesi
Illumina	Sentez bazlı sekanslama	Floresan	www.illumina.com
SOLID	Sentez bazlı sekanslama	Floresan	www.invitrogen.com
Roche 454	Sentez bazlı sekanslama	Lüminesan	www.454.com
Ion Torrent	Sentez bazlı sekanslama	Proton salımı	www.iontorrent.com
Pacific biosciences	Sentez bazlı tek molekül sekanslama	Real-time Floresan	www.pacificbiosciences.com
Oxford nanopore	Sentez bazlı tek molekül sekanslama	Pordan geçen nükleotid başına düşen elektrik akımı farkı	www.nanoporetech.com

RNA-seq Illumina platformu için örnek kütüphane hazırlama adımları şu şekildedir (Şekil 1.3.) (Korpelainen ve ark 2014);

Uygulamaya ve platforma bağlı olarak 1-10 µg saf, sağlam ve kalite kontrol aşamasını geçmiş RNA elde edilir. mRNA total RNA'dan ayrılır. Fragmantasyon reaktifi ile inkübasyon yoluyla mRNA parçalara ayrılır. Bu işlem, mRNA'yı çok sayıda küçük parçaya böler. Parçalanmış mRNA'lar rastgele altıgen primerlerle işaretlenir. Ters transkriptaz reaksiyonu ile parçalanmış mRNA'lar cDNA'ya çevrilir. cDNA nükleotidlerden, enzimlerden, tampon çözeltilerden ve RNA'dan arındırılır. Saflaştırılmış cDNA üzerinde uç onarımı gerçekleştirilir. cDNA'nın 3' ucu adenilatlanır. cDNA'nın her iki ucuna adaptörler bağlanarak kütüphane oluşturulur. Kütüphane polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu ile zenginleştirilir. Bu

aşamada adaptörlerden gelen diziler primer olarak kullanılır. PZR ile zenginleştirilmiş, adaptörle bağlanmış, uçtan onarılan cDNA saflaştırılır. Bu aşamada, örneklerdeki orijinal mRNA'ları temsil eden kütüphane elde edilmiş olur. Kütüphane kalite kontrol aşamasından geçerek doğrulanır. Bu işlem kütüphanede bulunması gereken genlerin PZR ile çoğaltılması ile, kütüphanedeki cDNA'nın nicel ölçümü ile veya Agilent Biyoanalizör cihazında poliakrilamid jel elektroforezi veya kapiller elektroforez ile kütüphanenin bolluğu ve boyut dağılımı görselleştirilerek yapılır. Kütüphane normalize edilir ve havuz oluşturulur. Kütüphane sekanslamaya gönderilir (Illumina, Solid, 454, vb.).



Şekil 1.3. RNA-seq kütüphane hazırlığının şematik gösterimi (Korpelainen ve ark 2014).

Sekanslama

Çalışılan platforma göre farklı sekanslama stratejileri mevcuttur. Bu platformlardan en bilinenleri Illumina, SOLID, Roche 454, Ion Torrent, Pacific Biosciences ve Nanopore teknolojileridir.

Illumina platformu, sentez bazlı sekanslama stratejisini kullanan en popüler platformdur. Kütüphaneler oluşturulduktan sonra, cDNA adaptör dizileri ile tamamlayıcılığa dayalı tek molekül hibridize eden akış hücresinden geçirilir. Adaptörün her iki ucunda tutulan hibrit diziler akış hücresi tarafından bir köprü olarak çoğaltılır. Bu yeni oluşturulan diziler, akış hücresine yakın bir yerde hibritlenir ve birçok döngüden sonra akış hücresinin bir bölgesi, orijinal cDNA'nın birçok kopyasını içerir. Bu süreç küme üretimi olarak bilinir. Kümeler oluşturulduktan ve cDNA'nın bir zinciri çıkartıldıktan sonra, reaktifler sentez bazlı seekanslama gerçekleştirmek için akış hücresinden geçirilir. Sentez bazlı sekanslama, her sentez döngüsünde bir floresan sinyal ile işaretlenmiş adenin, guanin, sitozin veya timin olabilen tek bir nükleotidin eklenmesinin görüntülendiği bir reaksiyonu tanımlar. Oluşturulan cDNA kümesine karşılık gelen, akış hücresinde belirli bir konumda ekleme dizisinin yeniden sentezlenmesi, orijinal cDNA parçasının nükleotid dizisini verir (Korpelainen ve ark 2014).

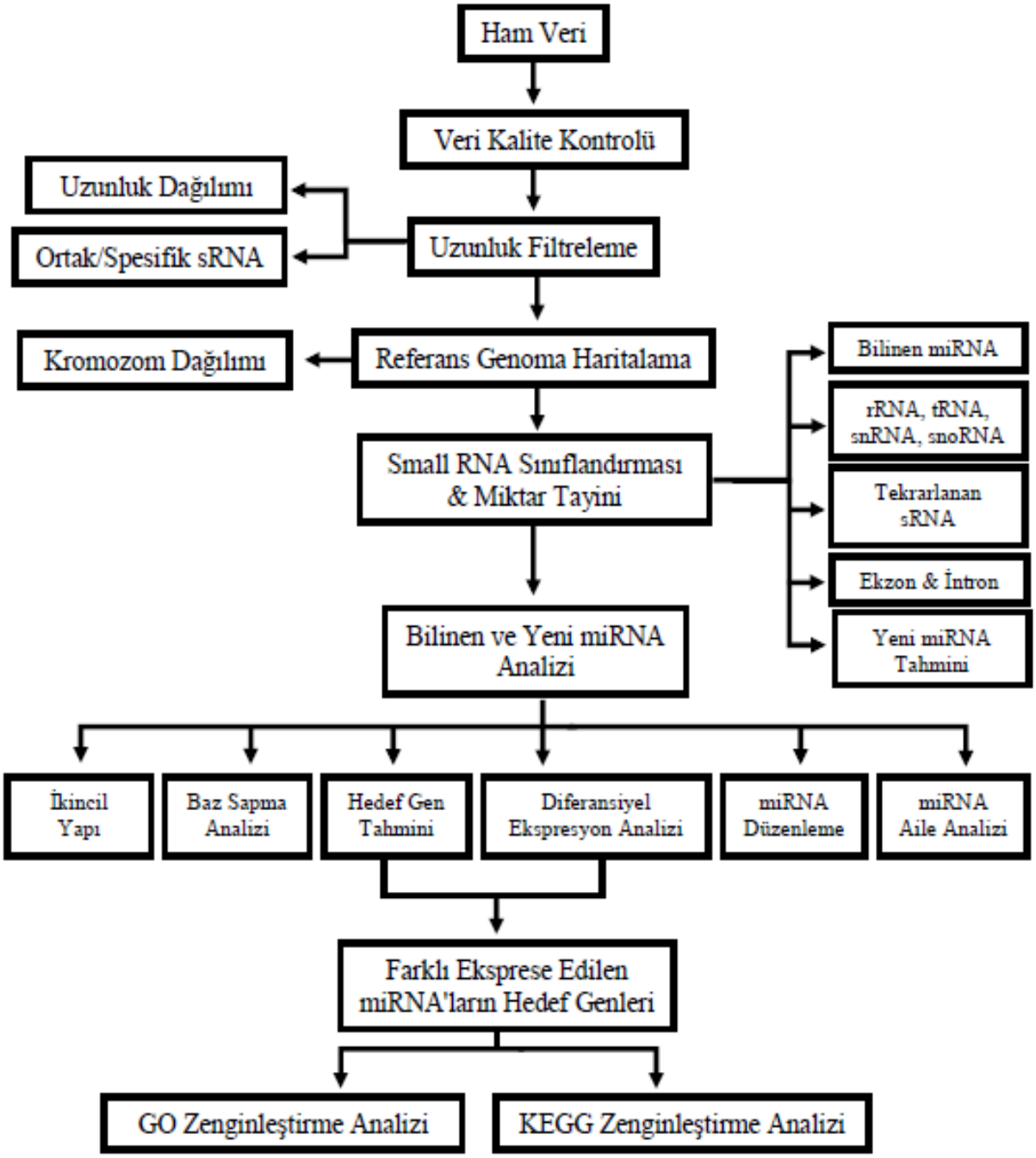
Sentez döngü sayısı, 50 nükleotitten 150 nükleotide kadar olabilir. Sekanslamanın gerçekleştirilebileceği iki mod vardır. Sekanslama cDNA'nın bir ucunda gerçekleştirilirse tek okuma modu, iki ucundan gerçekleştirilirse çift uçlu okuma modu adı verilir. Okuma türü ve uzunluğu için kısaltmalar kullanılır; tek okuma 50 nükleotid için SR50 veya çift uçlu okuma 100 nükleotid için PE100. Her döngü, kullanılan reaktiflerin yıkanmasını ve yeni reaktiflerin eklenmesini gerektirdiğinden tek bir sekanslama çalışması cihaz modeline ve sekanslama uzunluğuna bağlı olarak 3 ila 12 gün sürebilir.

Veri Analizi

Bu aşama sekanslamanın en karmaşık kısmıdır. RNA-seq analizinden milyonlarca okuma verisi elde edilmektedir. RNA-seq, gen ve varyantlarının keşfi, ekspresyon analizi ve füzyon genlerin tespiti gibi pek çok uygulama alanına sahip güçlü bir teknolojidir. Sonuç olarak, birçok veri analizi yolu mevcuttur ve bunları tek bir analiz iş akışı şemasında ele almak mümkün değildir. Veri analizi adımları, belirli veri formatlarına ve harici dosyalara ihtiyaç duyabilecek ayrı programlar tarafından gerçekleştirilir. RNA-seq veri analizinde her analiz adımı için birçok alternatif program mevcuttur. Bu programlara örnek olarak Unix, R, Galaxy (galaxyproject.org/) (Goecks ve ark 2010) ve Chipster (chipster.csc.fi) (Kallio ve ark 2011) verilebilir. Bu

programlardan ham RNA-seq verilerinden çalışma sonuçlarına kadar herşey elde edilebilir.

Bundan sonraki small RNA (sRNA) biyoinformatik analiz süreci çalışmada kullanılan olarak Şekil 1.4.'te özetlenmiştir.



Şekil 1.4. RNA-seq analiz basamakları (Korpelainen ve ark 2014).

RT-qPZR

RT-qPZR, miRNA ifadesini doğrulamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Küçük boyutları nedeniyle geleneksel qPZR, olgun miRNA'larda çalışmaz. Bu nedenle, revers transkripsiyon ve amplifikasyon gerçekleştirilmeden önce miRNA'lar uzatılmalıdır. Bu iki yöntem ile gerçekleştirilebilir: poli (A) yöntemi ve stem loop yöntemi. İlk yöntem, tüm miRNA'ların 3' ucuna ortak bir poli (A) kuyruğu ekler, ardından miRNA'yı cDNA'ya transkribe etmek için evrensel bir primer kullanır. cDNA, miRNA'ya özgü bir forward primer ve bir poli (A) ters primer kullanılarak amplifiye edilir. Kantifikasyon, BrightGreen veya SYBR Green gibi araya giren floresan boya kullanılarak ölçülür (Raymond ve ark 2005). İkinci yöntem, cDNA'ya transkribe etmek için ilgilenilen miRNA'ya özgü stem loop primeri kullanır. Amplifikasyon bir miRNA'ya özgü forward primer ve stem loop revers primeri kullanılarak gerçekleştirilir. Miktar belirleme, TaqMan floresan probu kullanılarak ölçülür (Chen ve ark 2005).

Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında miRNA qPZR, niceliksel ve oldukça hassas olma avantajına sahiptir. Bununla birlikte, bir seferde yalnızca birkaç miRNA ölçülebilir, bu nedenle qPZR büyük ölçekli çalışmalar için uygun değildir. Ayrıca, miRNA'nın uzunluğu, yalnızca bir veya iki nükleotid kadar farklılık gösteren miRNA'ları ayırt etmenin zor olabileceği anlamına gelir. Kilitli nükleik asitler gibi yeni teknolojiler, miRNA'ların özgünlüğünü iyileştirmek için geliştirilmiştir (Kauppinen ve ark 2006).

Northern Blot

Northern blot, bir örnekte RNA'nın (veya izole mRNA'nın) saptanmasıyla gen ekspresyonunu incelemek için moleküler biyoloji araştırmalarında kullanılan bir tekniktir (Kevil ve ark 1997, Alberts ve ark 2008). Northern blotlama ile farklılaşma, morfogenez ve anormal veya hastalıklı koşullar sırasında belirli gen ekspresyon seviyelerini belirleyerek yapı ve fonksiyon üzerinde hücresel kontrolü gözlemlemek mümkündür (Schlamp ve ark 2008). Küçük RNA türlerinin (miRNA gibi) Northern blot analizi, ilgilenilen miRNA'ların birikim seviyelerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Poliakrilamid jel elektroforezi ile birleştirilen bu teknik,

hedef miRNA'ların ekspresyon özelliklerinin incelenmesine, boyutlarının belirlenmesine ve öngörülen miRNA'ların validasyonuna izin vermektedir.

Northern blotting, RNA örneklerini boyutlarına göre ayırmak ve hedef dizinin bir kısmını veya tamamını tamamlayan bir hibridizasyon probu ile elektroforez kullanımını içermektedir. "Northern blotting" terimi aslında RNA'nın elektroforez jelinden membrana aktarımını ifade eder; ancak tüm uygulama bu şekilde ifade edilmektedir (Trayhurn 1996).

In Situ Hibridizasyon

In situ hibridizasyon, bir hücre veya doku içindeki miRNA ekspresyonunu görselleştirmek için kullanılır (Urbanek ve ark 2015). miRNA'ların saptanması için kullanılan yöntemde; hücre veya doku içeren slaytlar hazırlanır, RNA sabitlenir, hedef miRNA'ya hibridize olacak etiketli bir prob eklenir, problar radyoaktif, floresan veya kromojen olarak etiketlenebilir. Daha sonra slaytlar yıkanır ve örnek görselleştirilir.

Düşük miktarlı miRNA'ların saptanmasına izin veren bir dizi amplifikasyon adımı da yönteme eklenebilir. Sekans amplifikasyonu, özel problar kullanıldığında bir Rolling Circle Amplification aracılığıyla yapılabilir. Alternatif olarak, çok sayıda etiketli ikincil probun her bir spesifik birincil proba bağlanmasına dayanan dallı DNA teknikleri kullanılabilir (Babapoor ve ark 2016).

miRNA Tespit Tekniklerinin Karşılaştırılması

En yaygın miRNA tespit tekniklerinden bazılarının avantajları ve dezavantajları Tablo 1.2'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 1.2. miRNA tespit yöntemlerinin karşılaştırılması.

Yöntem	Veri	Avantaj	Dezavantaj
Mikroarray	İki durum arasında miRNA ifadesindeki göreceli değişikliği verir.	Büyük ölçekli tarama sağlar.	Kantitatif değildir.
RNA-seq	Mevcut tüm kısa RNA'lar için dizi bilgisi verir.	Baz dizilerini verir. Büyük miktarlarda RNA çalışılabilir	Analizi karmaşıktır.
RT-qPZR	Bir miRNA'nın miktarı belirlenir.	Hassasiyeti yüksektir. Kantitatiftir.	Küçük ölçeklidir.
Northern Blot	Bir miRNA'nın varlığı veya yokluğu tespit edilir.	Basit ve ucuzdur. Öncülleri olgun miRNA'dan ayırır.	Büyük miktarda RNA gerektirir. Küçük ölçeklidir.
In situ Hibridizasyon	Bir miRNA'nın lokalizasyonu verir.	Hücrelerde / dokularda miRNA'yı lokalize edebilir.	Kantitatif değildir. Küçük ölçeklidir.

1.4. miRNA Verim İlişkisi

miRNA'lar, birçok biyolojik yolakta mRNA'ların ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenleyen kısa RNA'lardır. Her bir miRNA'nın yaklaşık 200 hedef genin ekspresyonunu düzenlediği tahmin edilmektedir (Krek ve ark 2005). Son on yılda çiftlik hayvanlarının genomlarında kodlanan miRNA'ları karakterize eden profilleme çalışmalarıyla çok sayıda, korunmuş ve türe özgü miRNA'lar bulunmuştur (Liu ve ark 2010). Küçük ruminantlarda birkaç yüz miRNA tanımlanmıştır; bu miRNA'ların birçoğunun çeşitli düzenleyici sistemlerdeki işlevsel rolleri günümüzde belirsizliğini korumaktadır. Koyun ve keçilerde yapılan çalışmalar genellikle süt, et ve yün üretimi gibi ekonomik özelliklere odaklanmıştır (Clop ve ark 2006, Miao ve ark 2016, Wang ve ark 2018, Gu ve ark 2019, Zhai ve ark 2019).

Küçük ruminantlarda yapılan çalışmalarla, gebeliğin farklı evrelerinde meme bezi gelişiminde (Galio ve ark 2013), kolostrojenezde ve laktogenezde rol oynayan miRNA'lar tanımlanmıştır (Dong ve ark 2013, Hou ve ark 2017). Gebelik ve emzirme döneminde meme bezindeki miRNA'ların ekspresyon profillerini araştıran bir çalışmada 100 miRNA'nın farklı düzenlendiğini bulunmuştur. Gebeliğin başlangıcında, proliferasyonun en aktif olduğu zamanda, miR-21 normal meme bezinin epitel hücrelerinde, miR-205'in ise bazal hücrelerde güçlü bir şekilde eksprese edildiği bulunmuştur. Her iki miRNA'nın ekspresyonu gebelik ve emzirme döneminde artmış olup meme bezi gelişiminde rol oynadığı ve dolayısıyla süt verimine pozitif etkide bulundukları tespit edilmiştir (Galio ve ark 2013).

Süt keçilerinde kuru dönemde ve laktasyon sırasında miRNA ekspresyon profilleri rapor edilmiştir. miR-423-5p, miR-378 ve miR-7'nin laktasyon sırasında süt içeriğinin taşınmasında ve içerik sentezinde önemli düzenleyici işlevler uyguladığı tespit edilmiştir (Dong ve ark 2013). Hou ve ark (2017) laktasyonun en fazla olduğu dönemde toplanan sütün ve kolostrumun miRNA ekspresyon profillerini karşılaştırmış, miR-574'ün keçilerde östrojen, endokrin, adipositokin, oksitosin ve MAPK sinyal yolları aracılığıyla meme bezinin ve süt salgısının gelişiminde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir.

Sütten kesme stresi, yeni bir diyetle baş edememe nedeniyle ortaya çıkmakta ve büyümenin durmasıyla karakterizedir (Magistrelli ve ark 2013). Keçilerde sütten kesmeden 1 gün önce (44 günlük) ve sütten kesmeden 3 gün sonra (48 günlük) kanda miRNA'lar araştırılmıştır. Hücre proliferasyonu ile ilişkili miRNA'ların (miR-99b-3p, miR-224, miR-143-5p ve miR-10b-5p) ve iskelet kası gelişimi ile ilişkili iki miRNA'nın (miR-206 ve miR-133a/b) sütten kesilme sonrası hayvanlarda ekspresyonunun önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, sütten kesme stresinin, hücre proliferasyonunu baskılayarak hayvanlarda büyüme geriliğine yol açtığını ileri sürmüşler ve bu miRNA'ların önemli ölçüde değişen seviyelerinin, keçi üretiminde sütten kesme stresinin şiddetini değerlendirmek için potansiyel biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir (Liao ve ark 2019).

Hayvanların beslenmesi ile üreme performansları yakından ilişkilidir (Martin ve ark 2004). Yang ve ark (2018) farklı diyet uyguladıkları koyunların vücut kondisyon skoru, östrus oranı ve hipotalamus-ovaryum-beslenme ile ilişkili miRNA seviyelerini karşılaştırmışlardır. Hipotalamusta ekspresyonu olan 148 ve ovaryumda ekspresyonu olan 113 miRNA tanımlanmıştır. Hipotalamusta ve ovaryumda önemli farklı ekspresyonu olan miR-200a, miR-200b ve miR-200c tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Yang ve ark 2018). Bunun yanısıra, ad libitum ve yemden yoksun beslenen emziren keçilerin meme bezlerinde miRNA'lar araştırıldığı bir çalışmada, yedi miRNA'nın (miR-99a-5p, miR-126-3p, miR-140-3p, miR-222-3p, miR-223-3p, miR-204-5p ve miR-409-3p) ekspresyonunun değiştiği, potansiyel hedef genlerinin lipid metabolizması ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Mobuchon ve ark 2015).

miRNA'ların verim ile ilişkisinin yanısıra bakteriyel, viral ve paraziter etkenlere karşı moleküler yanıtlarını araştıran çalışmalar da mevcuttur. Maedi-Visna

virüsünün koyun akciğerlerinde moleküler yanıtının araştırıldığı bir çalışmada, klinik olarak etkilenen ve seronegatif koyunlar arasında 3 miRNA'nın (miR-21, miR-148a ve let-7f) konak-virüs etkileşimi için potansiyel etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar özellikle inflamasyon ve proliferasyon düzenleyicisi olan miR-21'in akciğer lezyonunun şiddeti için bir belirteç ve/veya terapötik müdahale için varsayılan bir hedef olabileceğini belirtmişlerdir (Bilbao-Arribas ve ark 2019). Parazitler inflamatuar ve immün yanıtlarda yer alan miRNA'ların ekspresyonunu modüle edebilmektedir. Echinococcus granulosusa dirençli ve dirençli olmayan iki grup koyun, Echinococcus granulosus yumurtaları ile enfekte edilmiş ve bağırsaktaki miRNA'lar karşılaştırılmıştır. Altısının (miR-21-3p, miR-542-5p, miR-671, miR134-5p, miR-26b ve miR-27a) dirençli koyunlarda dirençli olmayanlara kıyasla anlatımlarının arttığı tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların potansiyel hedef genleri, inflamasyon ve bağışıklık tepkileri ile ilişkilendirilmiştir (Jiang ve ark 2016).

1.5. Amaç

Bu çalışmada, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen ve "Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı Ülkesel Projesi" kapsamında koordine edilen yerli bir gen kaynağı olarak Kangal Akkaraman koyun ırkında GCAA ile ilişkili ekspresyonu değişen miRNA'ların tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan Materyali

Sivas ilinde, Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı Ülkesel Projesi kapsamında yer alan Kangal Akkaraman Koyun Irkı Halk Elinde Hayvan Islahı Alt Projelerinde (8 proje) Kangal Akkaraman ırkı ıslahı çalışmaları sürdürülmektedir. Bu projelerde yer alan 204 işletmede yaklaşık 48000 koyun, 2400 koç ve bu koyunlardan doğan binlerce kuzu kayıt altına alınmakta ve büyüme özellikleri belirlenmektedir. 2006 yılından bu yana sürdürülen bu projelere kayıtlı sürülerdeki Kangal Akkaraman koyunlarından 2019 yılında doğan 40 erkek kuzu bu projenin hayvan materyalini oluşturmuştur.

2.1.2. Kan Numuneleri

Projede yer alan kuzulardan EDTA'lı (Etilendiamin tetraasetik asit) tüplere kuzunun jugular veninden yaklaşık 10 ml kan örnekleri alınmıştır. Toplam 40 kuzudan kan örnekleri süt emme dönemi sonunda yaklaşık 4 aylık yaşta alınmıştır. Hali hazırda devam eden projeler gereğince yapılan çalışmalar sırasında kuzulardan kan örnekleri alımı gereksiz rahatsız edilmesinden kaçınılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. GCAA Verilerin Elde Edilmesi

GCAA belirli bir dönemdeki canlı ağırlık farkının gün sayısına bölünmesiyle elde edilmektedir. Halk elinde ıslah projelerinde yer alan işletmelerden, kuzulardan kan alınmasına izin veren ve damızlık özellikleri uygun koyunlara sahip olan 10 işletme belirlenmiştir. Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı projesi gereği 2019 yılında doğan kuzuların tümünün doğum ağırlıkları, 60. gün canlı ağırlıkları ve 120. gün canlı ağırlıkları belirlenmektedir. İşletmelerde yapılan ölçümler değerlendirilerek ana yaşı, cinsiyet ve doğum tipine göre hesaplanan etki payları ile düzeltilmiş canlı ağırlıklar ve düzeltilmiş GCAA hesaplanmaktadır.

2.2.2. Gruplandırma

Sivas ili Kangal Akkaraman koyun ırkı halk elinde hayvan ıslahı alt projelerinde yer alan 10 Yetiştiricinin sürüsünden, her sürüden iki yüksek GCAA'na sahip ve iki de düşük GCAA'na sahip 2019 yılında doğan 40 erkek kuzu bu çalışmada kullanılmıştır. Değerlendirilen GCAA değerleri etki payları elimine edilerek düzeltilmiş olan GCAA değerleridir.

Toplam 40 kuzudan alınan kanların işlenmesi sonucunda, yüksek GCAA'na sahip (YAA) gruptan 21 (bir işletmede 3 YAA ve 1 DAA) ve düşük GCAA'na sahip (DAA) gruptan bir hayvanın tartım ağırlığına ulaşılamadığı için, bir hayvanın da izolasyon sonucu RNA kalitesi yeterli olmadığı için toplam 17 erkek kuzuya ait kanların bu çalışmada kullanılabilir durumda olduğuna karar verilmiştir.

Çalışma gruplarında yer alan kuzuların küpe numaraları, doğum ağırlıkları, düzeltilmiş 120. gün canlı ağırlıkları ve düzeltilmiş GCAA'ları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada yer alan kuzulara ait veriler.

Grup	Küpe No	Doğum Ağırlığı (kg)	120. Gün Canlı Ağırlığı* (kg)	GCAA* (g)
YAA	19760695	6,55	55,9	412
YAA	19760699	4,99	53,5	404
YAA	19604229	5,49	50,3	373
YAA	19604265	7,14	49,0	349
YAA	19527839	4,43	46,0	346
YAA	19527676	4,6	45,3	339
YAA	19756109	7,43	47,4	333
YAA	19757609	6,08	45,6	329
YAA	19760415	6,96	46,1	326
YAA	19757844	3,92	42,3	320
YAA	19760378	7,57	45,4	315
YAA	19757865	5,97	43,3	311
YAA	19758961	6,27	42,5	302
YAA	19757610	4,53	40,5	300
YAA	19758819	5,08	40,8	297
YAA	19758825	5,27	40,5	294
YAA	19758956	6,53	41,8	294
YAA	19756100	6,35	41,3	291
YAA	19759183	4,44	39,1	289
YAA	19759175	4,85	39,2	286

Tablo 3.1 (Devam). Çalışmada yer alan kuzulara ait veriler.

YAA	**19756385**	**3,04**	**35,4**	**270**
DAA	19760636	5,07	28,3	193
DAA	19760448	5,54	26,1	171
DAA	19759294	5,07	25,6	171
DAA	19758829	5	24,2	160
DAA	19757576	3,94	21,9	150
DAA	19757597	3,14	20,7	147
DAA	19756159	2,85	19,6	139
DAA	19759172	4,16	20,9	139
DAA	19527947	4,04	20,3	135
DAA	19758028	3,95	20,2	135
DAA	19758930	4,15	20,1	133
DAA	19758967	4,5	20,2	131
DAA	19757814	4,9	19,7	123
DAA	19758955	4,34	18,6	118
DAA	19604270	3,32	16,7	112
DAA	19760449	5,25	18,6	111
DAA	19527859	4,33	15,1	90

* : Düzeltilmiş

Çalışma gruplarındaki kuzulara ait doğum ağırlığı, düzeltilmiş 120. gün canlı ağırlığı ve düzeltilmiş GCAA'a ait tanımlayıcı bilgiler Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kuzuların Verilerine Ait Tanımlayıcı Bilgiler.

	Grup	**n**	**Minimum**	**Maksimum**	**Ortalama**	**Standart Sapma**
Doğum Ağırlığı	YAA	21	3,04	7,57	5,59	1,23
	DAA	17	2,85	5,54	4,33	0,76
120. Gün Canlı Ağırlığı*	YAA	21	35,4	55,9	44,3	5,0
	DAA	17	15,1	28,3	21,0	3,4
GCAA*	YAA	21	270	412	323	38
	DAA	17	90	193	139	25

* : Düzeltilmiş

2.2.3. Total RNA İzolasyonu

Belirlenen kuzulardan EDTA içeren kan alma tüplerine yaklaşık 10 ml kan alınmıştır. Toplanan kanlar 15 dakika içinde 1900 x g'de (3000 rpm) ve 4 ° C'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Plazma ve kırmızı kan hücreleri arasında kalan beyaz kan hücrelerini ve plateletleri içeren tabaka 10 ml red blood cell lysis buffer (140 mM

NH_4Cl (Amonyum Klorür), 10mM Tris (Hidroksimetil) Aminometan) içine alınmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra 1900 x g'de (3000 rpm) ve 4 ° C'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz uzaklaştırılarak altta kalan beyaz kan hücrelerini içeren pelet sıvı azotta dondurulmuştur. Beyaz kan hücreleri RNA izolasyonuna kadar -80^{o}C'de bekletilmiştir. RNA izolasyonu ticari olarak satın alınan TRI Reagent (Sigma) protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Kısaca; örnekler 1 ml Tri Reagent içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenat ependorf tüpe alınmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Ependorf tüpe alınan 1000 µl solüsyon üzerine 200 µl kloroform eklenerek vorteksle karıştırılmıştır. Oda ısısında 10 dakika bekletilen örnekler soğutmalı santrifüjde +4°C sıcaklıkta 12000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım başka bir ependorf tüpe alınmıştır. Yaklaşık 500 µl süpernatant üzerine 500 µl isopropanol ilave edilmiştir. Karışım alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra soğutmalı santrifüjde 12000 rpm hızda 4°C sıcaklıkta 10 dakika santrifüj edilerek RNA peletinin dipte çöktürülmesi sağlanmıştır. Süpernatant tüpten uzaklaştırılmıştır. Pelet 3 defa (sırası ile %70, %70, %99) soğuk etanol ile +4°C'de 7500 rpm hızda 5 dakika yıkanmıştır. RNA peleti yeterince kurutulduktan sonra 50 µl NFW (nuclease-free water) içerisinde çözdürülmüştür.

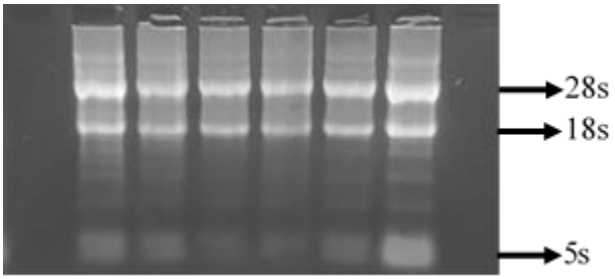
2.2.4. Elde Edilen RNA'ların Miktar ve Kalite Tayini

Çalışmada izole edilen RNA örneklerinin miktar ve kalitesi nanodrop cihazında ölçülerek analizler için uygunluğu değerlendirilmiştir. Blank solüsyonu olarak total RNA'ların içerisinde çözündürüldüğü NFW kullanılmıştır. RNA okunma modunda 2 µl RNA örneği ile ölçümler yapılmıştır. RNA miktarları ng/µl şeklinde belirlenmiştir. İzolasyon sırasında oluşabilecek fenol, protein ve genomik DNA kontaminasyonlarını belirlemek için A260/A280 ve A260/A230 oranları değerlendirilmiştir (Tablo 2.1.). Elde edilen total RNA'lardan A260/A280 oranları 1,8-2,0 arasında olanlar ve A260/A230 oranları 2,0-2,2 arasında olan RNA örnekleri çalışmanın devamı için uygun bulunmuştur.

Tablo 2.1. RNA'ların miktarları, A260/A280 ve A260/A230 oranları.

Grup	Konsantrasyon (ng/ul)	A260/280	A260/230
YAA	201,58	1,81	2,09
YAA	285,37	1,89	2,19
YAA	212,61	1,82	2,17
YAA	216,69	1,83	2,12
YAA	388,34	1,89	2,14
YAA	380,25	1,89	2,19
YAA	234,76	1,83	2,19
YAA	239,41	1,85	2,11
YAA	258,39	1,90	2,17
YAA	322,14	1,91	2,17
YAA	486,39	1,97	2,17
YAA	334,96	1,87	2,18
YAA	340,67	1,89	2,18
YAA	394,89	1,94	2,15
YAA	329,81	1,91	2,16
YAA	368,32	1,94	2,17
YAA	279,8	1,88	2,18
YAA	327,68	1,90	2,16
YAA	243,93	1,83	2,20
YAA	491,78	1,92	2,20
YAA	435,68	1,94	2,19
DAA	227,96	1,82	2,12
DAA	230,65	1,83	2,10
DAA	311,81	1,94	2,14
DAA	485,31	1,96	2,16
DAA	390,89	1,96	2,16
DAA	279,53	1,94	2,18
DAA	269,73	1,90	2,18
DAA	329,24	1,87	2,16
DAA	424,37	1,98	2,16
DAA	284,82	1,92	2,20
DAA	103,92	1,80	2,16
DAA	410,79	1,96	2,14
DAA	280,71	1,87	2,18
DAA	456,79	1,94	2,20
DAA	414,75	1,96	2,18
DAA	252,21	1,93	2,16
DAA	187,13	1,81	2,18

Seçilen RNA örneklerinin kalitesi %1'lik agaroz jelde belirlenmiştir. Etidium Bromür (EtBr) ile boyanan RNA bantlarının kalitesi UV translüminatör üzerinde değerlendirilerek yapılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Temsili RNA agaroz jel görüntüsü.

2.2.5. RNA-seq

İzole edilen RNA örneklerinden DAA (n = 17) ve YAA (n = 21) olarak iki gruba ait havuz oluşturulmuştur. Havuz örnekleri kalite kontrol aşamasını (Bioanalyzer) geçtikten sonra RNA-seq analizi Illumina Novaseq platformunda ticari olarak yapılmıştır.

Kütüphane Hazırlama

sRNA kütüphanesi için örnek başına 3 µg total RNA kullanılmıştır. Sekanslama kütüphanesi, NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (NEB, USA.) kullanılarak oluşturulmuştur. Kısaca, NEB 3 'SR Adaptörü doğrudan ve spesifik olarak miRNA'nın 3' ucuna bağlanmıştır. Ligasyon reaksiyonundan sonra, SR RT primerleri 3' SR adaptörüne (3 'ligasyon reaksiyonundan sonra serbest kalan adaptör kısmına) bağlanarak tek sarmallı DNA adaptöründen çift sarmallı DNA elde edilmiştir. Bu adımda adaptör-dimer oluşumunu önlemek önemlidir; dsDNA'lar (Çift iplikli DNA), T4 RNA Ligaz 1'in katalizlediği ligasyon reaksiyonu için substrat olarak kullanılamazlar bu nedenle sonraki ligasyon adımında 5′ SR Adaptörüne bağlanmazlar. 5' uçlarına ait adaptör miRNA'lann 5' uçlarına bağlanmıştır. Daha sonra M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H–) kullanılarak tek zincirli cDNA sentezlenmiştir. PZR amplifikasyonu, LongAmp Taq 2X Master Mix, Illumina'nın SR Primeri ve index (X) primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %8 poliakrilamid jel üzerinde saflaştırılmıştır (100 V, 80 dakika). Yaklaşık 140-160 bp uzunluğundaki DNA'lar (miRNA'nın uzunluğuna 3' ve 5' adaptörlerinin uzunluğu eklenmiştir) geri kazanılmış ve 8 µl elüsyon tamponunda çözündürülmüştür. Kütüphane kalitesi DNA High Sensitivity Chips kullanılarak Agilent Bioanalyzer 2100 sisteminde değerlendirilmiştir.

Kümeleme ve sekanslama

İndeks kodlu örneklerin kümelenmesi TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina) kullanılarak cBot Cluster Generation System cihazında üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Kümeler oluşturulduktan sonra, kütüphane Illumina platformunda sekanslanmıştır ve 50 bp tek uçlu okumalar oluşturulmuştur.

Veri Analizi

- **Ham Veri**

Yüksek verimli sekanslamanın (Illumina) orijinal görüntü veri dosyası, CASAVA baz tanıma ile sekans okumalarına dönüştürülmüştür. Ham veri veya ham okumalar olarak adlandırılır. Ham veriler, sekans dizilerini ve karşılık gelen baz kalitesini içeren FASTQ (fq) format dosyalarında saklanır. Her okuma aşağıdaki gibi dört açıklayıcı cümle içerir:

FASTQ file:
@HWI-ST1276:71:C1162ACXX:1:1101:1208:2458 1:N:0:CGATGT
NAAGAACACGTTCGGTCACCTCAGCACACTTGTGAATGTCATGGGAT
CCAT
+
#55???BBBBB?BA@DEEFFCFFHHFFCFFHHHHHHHFAE0ECFFD/AEHH
Satır 1: @ ve sekanslama tanımlayıcıları ve isteğe bağlı açıklama bilgileri
Satır 2: Baz dizileri [ham okuma, A (adenin), G (guanin), C (sitozin) ve T (timin)]
Satır 3: Artı işareti (+) ve isteğe bağlı olarak Satır 1 ile aynı Illumina sekans tanımlayıcıları ve açıklama bilgilerini içerir.
Satır 4: Satır 2'deki her bazın kalite değerleri

Illumina Casava 1.8 sürümü tarafından tahmin edilen Phred kalite puanları Q, logaritmik olarak baz tanıma hatası e ile bağlantıdır: kalite puanı 13 (Q13) için hata oranı %5, kalite puanı 20 (Q20) için hata oranı %1, kalite puanı 30 (Q30) için hata oranı %0,1, kalite puanı 40 (Q40) için hata oranı %0,01.

- **Veri Kalite Kontrolü**

Fastq formatındaki ham verileri, perl ve python scripts aracılığıyla işlenmiştir. Bu adımda 5' adaptör içeren, 3' adaptör veya işaretleyici içermeyen, poli-A/T/G/C içeren ve düşük kaliteli ham veriler kaldırılarak temiz veriler elde edilir. Aynı zamanda, ham verilerin Q20, Q30 ve GC içeriği hesaplanır. Daha sonra tüm analizleri yapmak için temiz verilerden belirli bir uzunluk aralığı seçilir.

- **Referans Genoma Haritalama**

sRNA okumaları, referans genom (Oar_v3.1) üzerindeki ekspresyonlarını ve dağılımlarını analiz etmek için Bowtie (Langmead ve ark 2009) programı ile referans sekanslarla eşleştirilmiştir.

- **Bilinen ve Yeni miRNA Analizi**

Haritalanmış sRNA etiketleri, bilinen miRNA'ları aramak için kullanılmıştır. miRBase 21 referans olarak kullanılmış, modifiye edilmiş mirdeep2 (Friedlander ve ark 2011) yazılımı ve srna-tools-cli potansiyel miRNA'yı elde etmek ve ikincil yapıları çizmek için kullanılmıştır. Verilerden miRNA sayımlarının yanı sıra belirli uzunlukta tanımlanmış miRNA'larının ilk pozisyonundaki ve tanımlanan tüm miRNA'nın her pozisyonundaki baz verisi elde edilmiştir.

- **Kodlama Yapmayan RNA'ların Analizi**

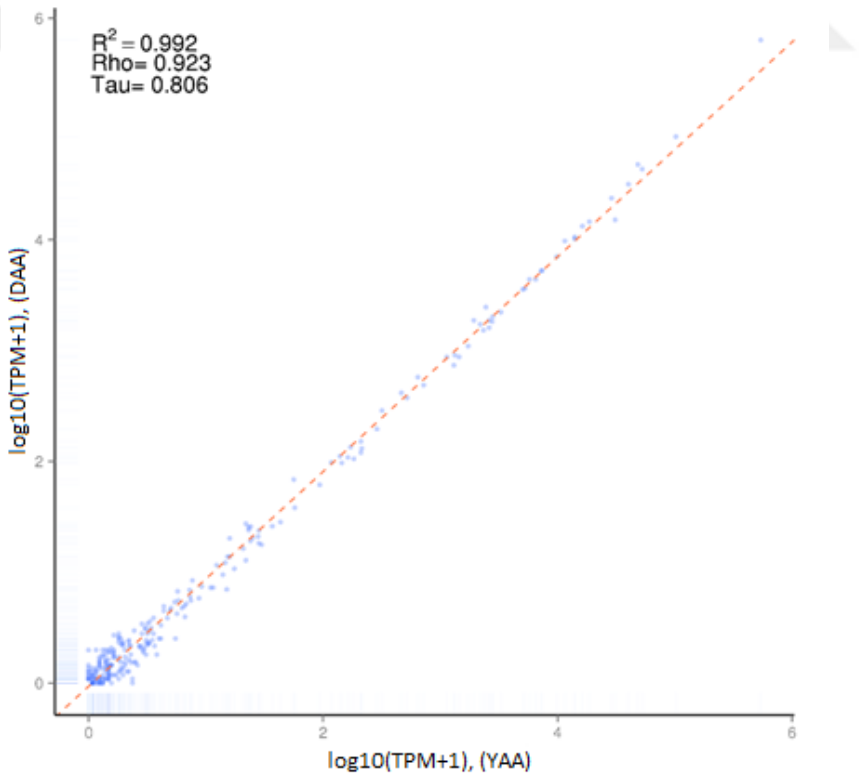
Okuma verilerinden protein kodlayan genlere, tekrar dizilerine, rRNA, tRNA, snRNA ve snoRNA'ya ait dizileri temizlemek için, sRNA işaretleri RepeatMasker, Rfam veritabanına ve koyun türüne ait verilerle eşleştirilmiştir.

- **Yeni miRNA tahmini**

Mevcut miREvo (Wen ve ark 2012) ve mirdeep2 (Friedlander ve ark 2011) yazılımları yeni miRNA'ları tahmin etmek için kullanılmıştır. Bu yazılımlar ikincil yapıyı, Dicer kesim bölgesini aramaktadır. Aynı zamanda, tanımlanan miRNA'ların sayılarını, birinci pozisyondaki ve tanımlanan tüm miRNA'nın her pozisyonunda bazları belirlemektedir.

- **miRNA Ekspresyon ve Diferansiyel Ekspresyon Analizi**

Gruplardaki bilinen ve benzersiz miRNA'ların ekspresyonu istatistiksel olarak analiz edilmiştir ve TPM (milyon okuma başına transkript) ile normalize edilmiştir (Zhou ve ark 2010). [Normalize edilmiş ekspresyon = (örneğe ait okuma sayısı * 1 000 000) / toplam okuma sayısı]. Okuma sayısı değeri miRNA ekspresyon düzeyini analiz etmek için kullanılmaktadır. İki grubun diferansiyel ekspresyon analizi, DESeq R paketi (1.8.3) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Anders ve Huber 2010). p değerleri Benjamini ve Hochberg (1995) yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Diferansiyel ekspresyon için, düzeltilmiş p değeri 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. TPM yoğunluk dağılımı, grupların gen ekspresyonunu temsil etmektedir. Korelasyon katsayısı 1'e ne kadar yakınsa, örneklerin benzerliği o kadar yüksektir. Pearson korelasyon katsayısının karesinin 0,92'den (ideal deney koşulları altında) daha büyük ve R^2'nin en az 0,8'den büyük olması önerilmektedir. DAA ve YAA ekspresyon verilerinin log10 (TPM+1) değerine göre karşılaştırılması "Scatter Plot" grafiğiyle Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2. DAA ve YAA ekspresyon verilerinin $\log_{10}$ (TPM+1) değerine göre "Scatter Plot" grafiği şeklinde karşılaştırılması.

- **Gen Ontoloji Zenginleştirme Analizi**

Gen Ontolojisi (GO), genlerin ve gen ürünlerinin özelliklerini kapsamlı bir şekilde tanımlamak için bir dizi kontrollü kelime dağarcığı sağlayan, gen işlevi için uluslararası standartlaştırılmış bir sınıflandırma sistemidir (Liu ve ark 2015). Moleküler fonksiyon, hücresel bileşen ve biyolojik süreç olmak üzere üç ontoloji içermektedir. Sonuçlar, bilinen ve yeni miRNA'ların öngörülen hedef gen adaylarıyla ilgili işlevleri ortaya çıkarabilmektedir. Bu yöntemde ilk olarak tüm hedef gen adaylarını veritabanındaki (//www.geneontology.org/) GO terimleriyle eşleştirilerek her terim için gen numaraları hesaplanmıştır. Daha sonra, referans gen arka planına göre hedef gen adaylarında önemli ölçüde zenginleştirilmiş GO terimlerini bulmak için Wallenius merkezi olmayan hiper-geometrik dağılımı kullanılmıştır (Young ve ark 2010).

- **Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) Yolak Analizi**

KEGG genomlar, biyolojik yollar, hastalıklar, ilaçlar ve kimyasal maddelerle ilgili manuel olarak seçilmiş veritabanlarının bir koleksiyonudur (Kanehisa ve ark 2008). KEGG yolak analizi, genomik, metagenomik, metabolomik ve diğer ilgili çalışmalarda veri analizi dahil olmak üzere biyoinformatik araştırma ve eğitimi için kullanılan bir yöntemdir. Yolak zenginleştirme analizi, önemli ölçüde zenginleştirilmiş metabolik yolakları veya tüm genom arka planıyla ilgili farklı şekilde ifade edilen miRNA hedef genleriyle ilişkili sinyal iletim yolaklarını tanımlamaktadır. KEGG yolaklarında hedef gen adaylarının istatistiksel zenginleşmesini test etmek için KOBAS yazılımı kullanılmıştır (Mao ve ark 2005).

2.2.6. miRNA’dan cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

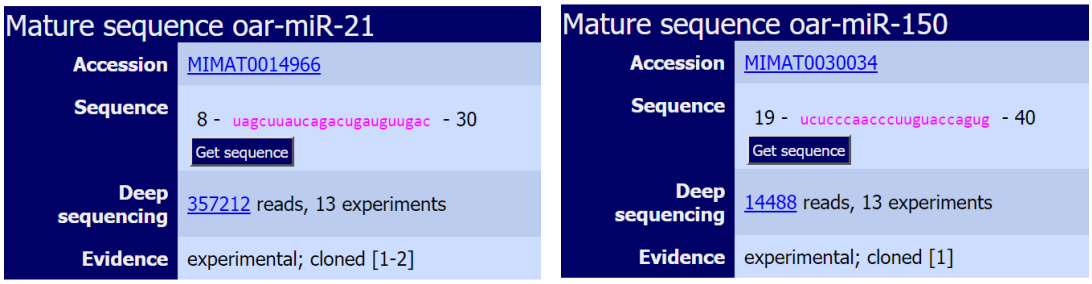
Total mRNA’dan, miRNA cDNA sentezlemek için Poly(A) Polymerase (ABM) ve OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit (ABM) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre Poly(A) Polymerase reaksiyonu toplam 25 µl hacimde olacak şekilde (5 µl 5X Poly(A) Polymerase Yeast Reaction Buffer, 1.25 µl, ATP (adebozin trifosfat) (10 mM), 1 µl, Poly(A) Polymerase, Yeast (1 U/µl), 2,5 µl 25 mM $MnCl_2$ (Mangan (II) Klorür), 0,3 µM RNA) nuclease-free water ile tamamlanmıştır. Örnekler soğuk blok üzerinde hazırlandıktan sonra santrifüjlenmiştir. Daha sonra 37ºC’de 20 dk ve 65ºC’de 20 dk inkübe edilmiştir.

Poly(A) Polymerase reaksiyonu tamamlandıktan sonra örneklerden 10 µl alınarak OneScript® Plus cDNA Synthesis kiti ile devam edilmiştir. Kit protokolüne göre Poly(A) Polymerase reaksiyon ürünlerinin üzerine 2 µl miRNA oligo (dT) adapter (10 µM) eklendikten sonra 65ºC'de 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerine 1 µl dNTP (Deoksiribo Nükleotid Trifosfat) (10 mM), 4 µl 5X RT Buffer, 1 µl OneScript® RTase (200 U/µl), 0,5 µl RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor (40U/µl), 1,5 µl RNase-free water eklenmiştir. Örnekler vortekslenmiştir ve santrifüjlenmiştir. Daha sonra 42ºC'de 15 dk ve 70ºC'de 10 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar 20 kat sulandırılarak -20ºC'de sonraki aşamalar için saklanmıştır.

2.2.7. Primer Dizaynı Primer Etkinlik Değerleri

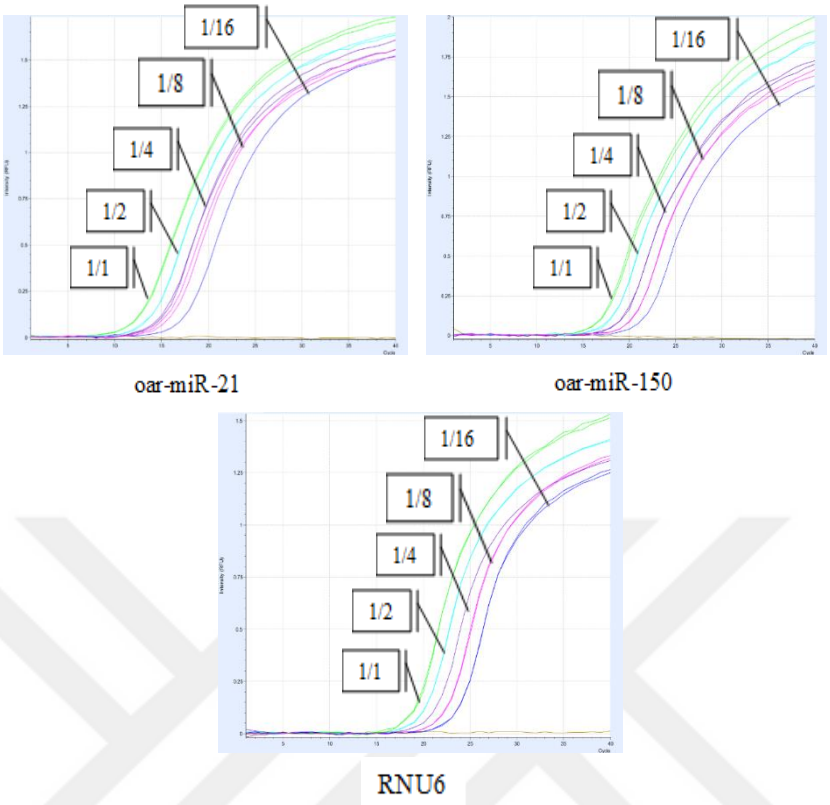
Çalışmada kullanılan primerlerin forward primerleri http://www.mirbase.org/ sitesindeki olgun formdaki miRNA dizilerindeki urasilin timin ile değiştirilmesiyle tasarlanmıştır (Şekil 2.3.). Housekeeping primerleri ticari olarak satın alınmıştır (RNU6 House Keeping Primers, ABM). oar-miR-21 (5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGAC-3') ve oar-miR-150 (5'-TCTCCCAACCCTTGTACCAGTG-3') forward primerleri ile ticari olarak alınan revers primer (Universal 3' miRNA Reverse Primer, ABM) kullanılmıştır.

Liyofilize haldeki primerler 300 nM konsantrasyonunda olacak şekilde sulandırılmıştır. Daha sonra her bir miRNA forward ve revers primerleri eşit miktarlarda karıştırılarak primer alt stoğu hazırlanmıştır. Örneklerden elde edilen cDNA havuzu 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 şeklinde sulandırılmıştır. Bu sulandırmalardan her primer için RT-qPZR yapılmıştır (Şekil 2.4.). Dilüsyonlar değerleri kullanılarak primerlerin etkinliği hesaplanmıştır (Rebrikov ve Trofimov 2006). RNU6, oar-miR-21 ve oar-miR-150 için sırasıyla 1,81, 1,98 ve 1,81 olarak bulunmuştur.



Şekil 2.3. oar-miR-21 ve oar-miR-150 dizileri

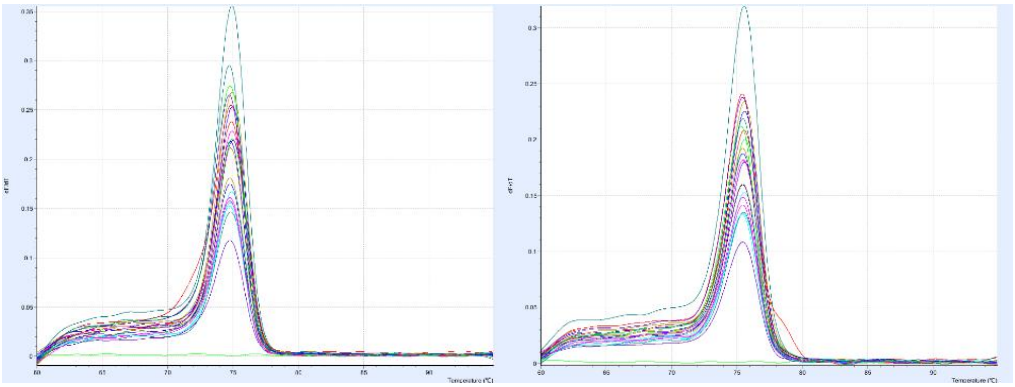
(http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0014116 , http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0025255) (Erişim tarihi: 19.01.2021)



Şekil 2.4. Primer dilüsyonu ve Cq (cycle threshold) grafikleri.

2.2.8. RT-qPZR

Elde edilen cDNA'lardan özgün primerler (RNU6, oar-miR-21, oar-miR-150) kullanılarak araştırılacak miRNA'lar RT-qPZR'da çoğaltılmıştır. Reaksiyon BrightGreen içeren 2X olan master miskten (BrightGreen miRNA qPZR MasterMix-mS, ABM) 1X olacak şekilde; 10 µl miks, 300 nM forward primer, 300 nM revers primer, 5 µl cDNA ve toplam volümü 20 µl olacak şekilde steril ddH_2O (Double Distile Su) ile tamamlanmıştır. Reaksiyon steril 8'li strip tüpler içinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun ısı profili 95°C'de 10 dakika, 40 döngü (95°C'de 10 saniye, 63°C'de 15 saniye, 72°C'de 30 saniye) olacak şekilde ayarlanmıştır. Optik ölçümler her siklusun 63°C'deki bağlanma ısısının hemen bitiminde cihaz tarafından otomatik olarak yapılmıştır. Daha sonra 63°C'den 95°C'ye kadar saniyede 0,1°C olacak şekilde kademeli olarak ısıtılmıştır ve bu ısılar içerisindeki her 1°C artışta optik ölçümler yapılarak erime eğrisi analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.5.). Optik analiz sonucu elde edilen veriler Cq olarak kaydedilmiştir. Negatif kontrol olarak cDNA yerine aynı miktarda ddH_2O kullanılmıştır.



Şekil 2.5. Primerlere ait erime eğrisi grafikleri.

2.3. Etik Kurul

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun 22.11.2018 tarihli ve 2018/154 sayılı kararı ile "Kangal Akkaraman kuzularında büyümeye bağlı mikroRNA'ların tanımlanması" başlıklı tez projesi başvurusu değerlendirilmiştir. Tez projesinde Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Çalışmada Sivas ilindeki kuzular kullanıldığı için Sivas İli Damızlık Koyun Keçi Yetiştiricileri Birliği'nden izin alınmıştır. Ayrıca 13.12.2011 tarih ve 28141 sayılı Resmi Gazete' de yayımlanarak yürürlüğe giren "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik" gereği Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından incelenmiş olup izin alınmasına gerek görülmemiştir.

3. BULGULAR

3.1. RNA-seq

Etki payları elimine edilerek düzeltilmiş GCAA değerlerine göre erkek kuzular yüksek ve düşük GCAA'na sahip olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Bu iki grubun izole edilen miRNA örneklerinden havuz oluşturulmuştur. Havuz oluşturulan örnekler kontrol aşamasını geçtikten sonra RNA-seq analizi Illumina Novaseq platformunda ticari olarak yapılmıştır. Havuz örneklerine ait kalite kontrol sonuçları Tablo 3.3.'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3. Havuz örneklerinin kalite kontrol sonuçları, miktarları, A260/A280 ve A260/A230 oranları.

Örnek	Konsantrasyon (ng/ul)	Hacim (ul)	Miktar (ug)	A260/A280	A260/A230	RIN
DAA	266	170	45.22	1.75	2.51	8.1
YAA	282	168	47.376	1.79	2.14	7.5

3.1.1. Veri Kalite Kontrolü ve Uzunluk Filtreleme Sonuçları

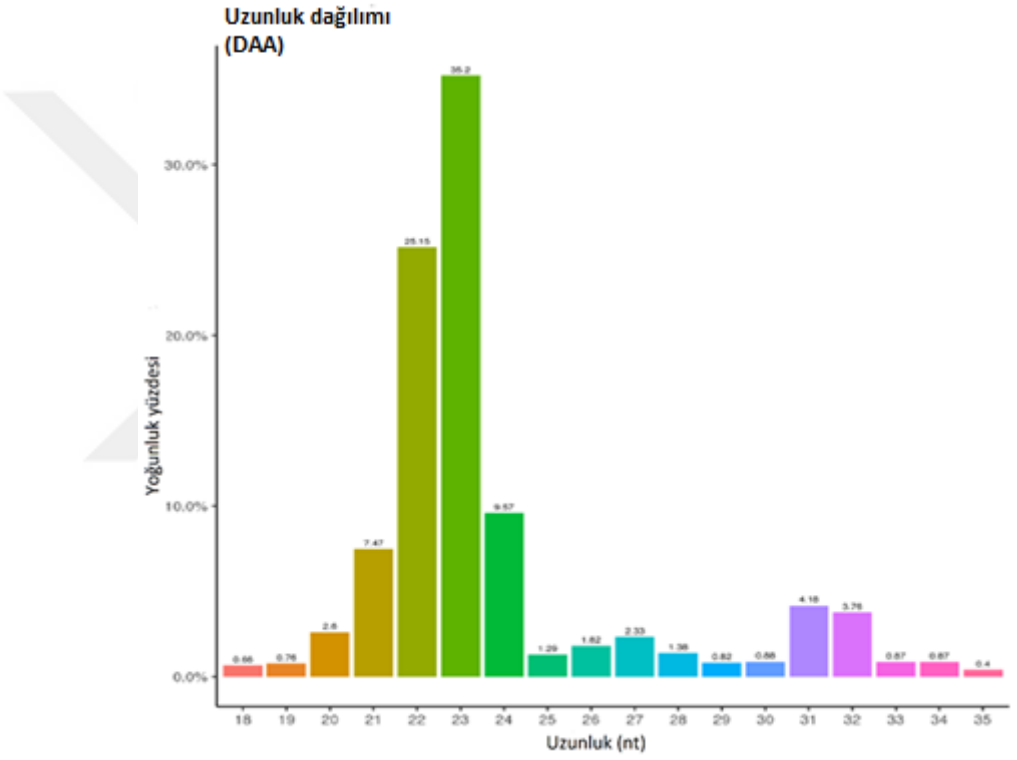
Orijinal sekans verilerinin istatistikleri (okuma), gigabaz çiftleri (Gbp) olarak ifade edilen sekans sayısının sekans uzunluğu ile çarpılarak elde edilen baz sayısı, sekanslamanın hata oranı, phred değerleri 20'yi (Q20) aşan bazların yüzdesi, phred değerleri 30'u (Q30) aşan bazların yüzdesi, tüm bazların yüzdesi olarak G ve C bazlarının oranı (GC içeriği) Tablo 3.4.'te verilmiştir. Filtreleme işleminden elde edilen 5' adaptör kontaminasyonu olanların okuma yüzdesi, 3' adaptör veya içermeyen okumaların yüzdesi, poli-A/T/G/C içeren okumaların yüzdesi ve temiz verilerin yüzdesi Tablo 3.5.'te verilmiştir. Elde edilen verilerin gruplara göre uzunluk dağılımı, apsis sRNA okumalarının uzunluğu, ordinat toplam sRNA için hesaplanan uzunluğun okumalardaki yüzdesi olarak Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de verilmiştir. İki grubun kütüphanelerindeki toplam sRNA okumalarının ve benzersiz sRNA okumalarının karşılaştırmaları Şekil 3.3. ve Şekil 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Ham verinin özeti veri kalite kontrolü özeti.

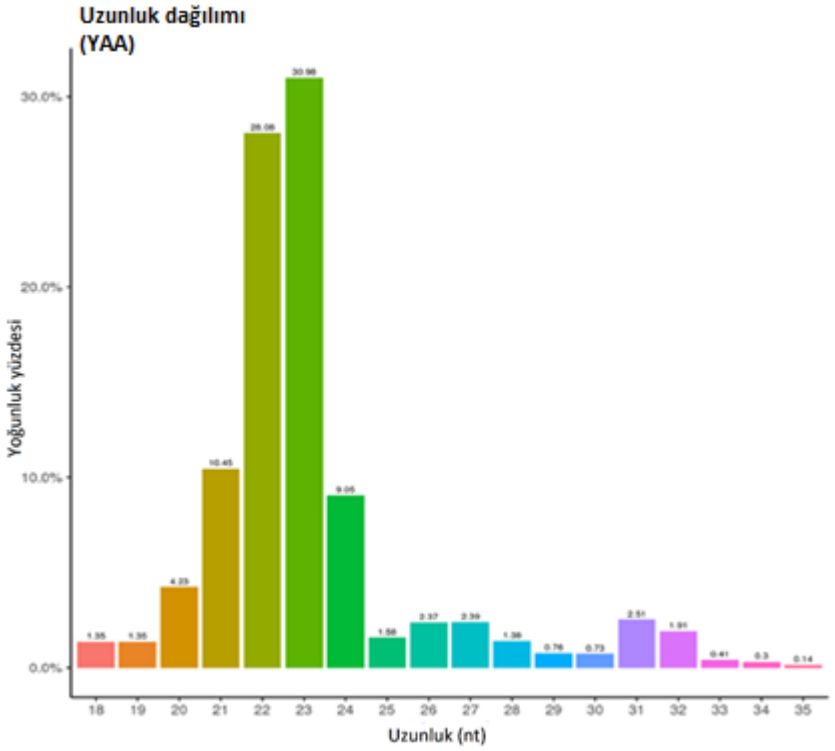
Örnek	Okuma	Baz (Gbp)	Hata Oranı	Q20 (%)	Q30 (%)	GC İçeriği (%)
DAA	20958420	1048	0,01	99,38	97,62	47,92
YAA	25466385	1273	0,01	99,42	97,83	48,22

Tablo 3.5. Veri filtreleme özeti.

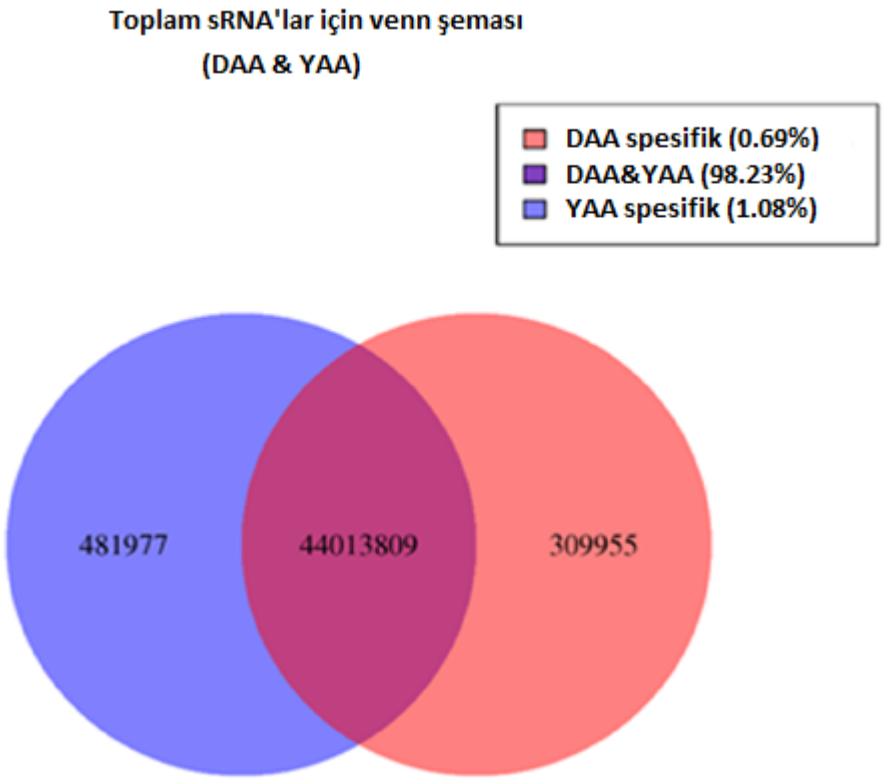
Örnek	5' Adaptör İçeren Okumalar	3' Adaptör/İşaretleyici İçermeyen Okumalar	Poli-A/T/G/C İçeren Okumalar	Temiz Veri
DAA	1595 (%0,01)	152519 (%0,73)	15424 (%0,07)	20788852 (%99,19)
YAA	1589 (%0,01)	106643 (%0,42)	20471 (%0,08)	25337648 (%99,49)



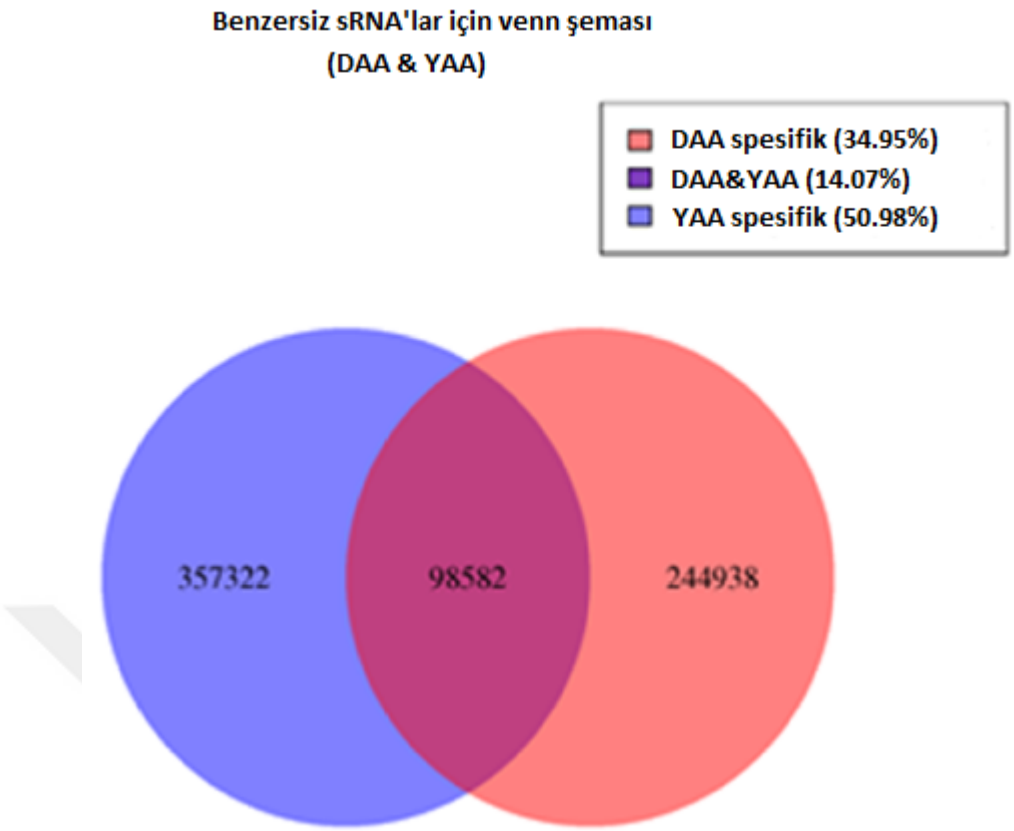
Şekil 3.1. sRNA'nın uzunluk dağılımı (DAA).



Şekil 3.2. sRNA'nın uzunluk dağılımı (YAA).



Şekil 3.3. Toplam sRNA okumalarının gruplara göre karşılaştırılması.



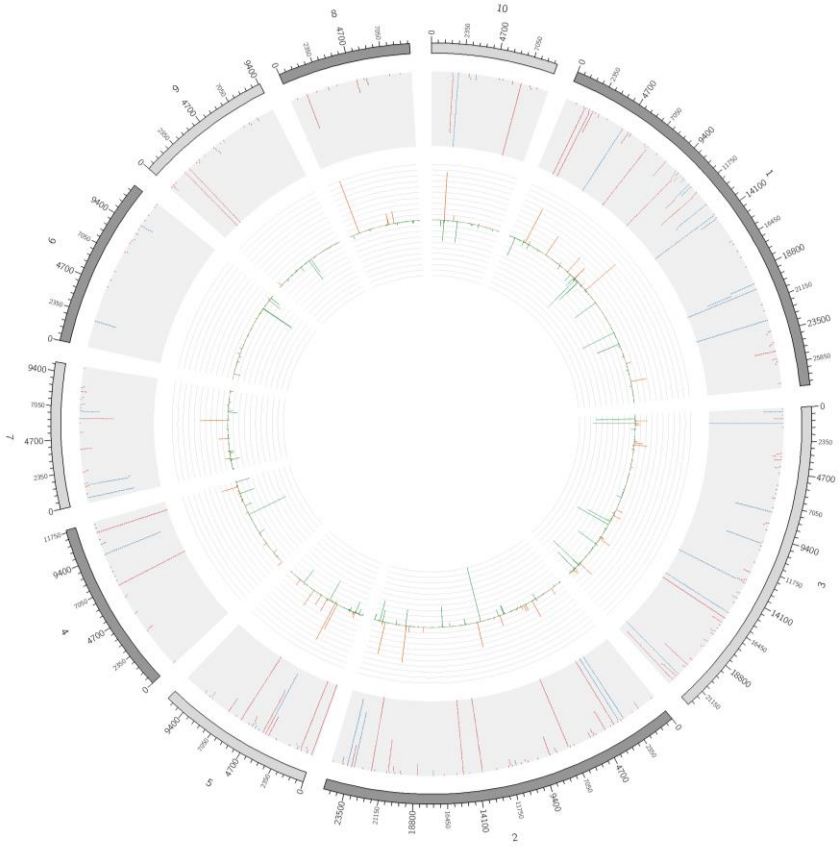
Şekil 3.4. Benzersiz sRNA okumalarının gruplara göre karşılaştırılması.

3.1.2. Referans Genoma Haritalama

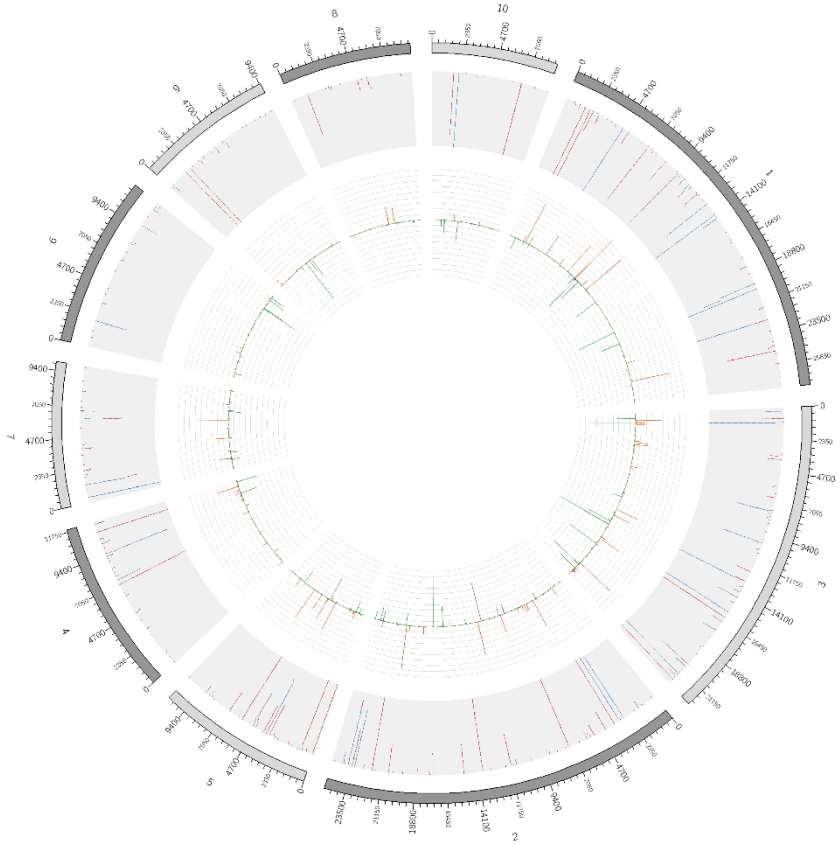
sRNA okumaları, ekspresyon seviyelerini ve genom üzerindeki dağılımlarını analiz etmek için Bowtie kullanılarak genomla eşleştirilmiştir. Genoma eşlenen sRNA sayısı ve yüzdesi (Haritalanmış sRNA), genom ile aynı yönde eşlenen sRNA sayısı ve yüzdesi ("+" Haritalanmış sRNA), genom ile ters yönde eşlenen sRNA sayısı ve yüzdesi ("-" Haritalanmış sRNA) Tablo 3.6.'da verilmiştir. DAA ve YAA gruplarındaki okumalarının 10 kromozomdaki dağılımı Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Haritalama sonuçları.

Örnek	Haritalanmış sRNA	"+" Haritalanmış sRNA	"-" Haritalanmış sRNA
DAA	18 003 036 (%87,90)	14 463 516 (%70,62)	3 539 520 (%17,28)
YAA	21 245 522 (%87,34)	15 608 019 (%64,17)	5 637 503 (%23,18)



Şekil 3.5. DAA grubundaki okumalarının 10 kromozomdaki dağılımı.



Şekil 3.6. YAA grubundaki okumalarının 10 kromozomdaki dağılımı.

3.1.3. Bilinen ve Yeni miRNA Analizi

Referans genoma eşlenen okumalar miRBase 21'deki özgün dizilerle karşılaştırılmıştır. Olgun miRNA sekanslarına hizalanan sRNA sayısı (haritalanmış olgun), miRNA hairpin sekanslarına hizalanan sRNA sayısı (haritalanmış hairpin), haritalanmış benzersiz sRNA sayısı (haritalanmış benzersiz), haritalanmış total sRNA sayısı (haritalanmış total) Tablo 3.7.'de özetlenmiştir. Bilinen olgun miRNA'lara ait ekspresyon profilleri ilgili miRNA'ya ait haritalanmış okuma sayısı şeklinde Tablo 3.8.'da gösterilmiştir.

Tablo 3.7. Haritalanmış bilinen RNA sayıları.

Örnek	Haritalanmış Olgun	Haritalanmış Hairpin	Haritalanmış Benzersiz	Haritalanmış Total
DAA	117	101	1366	11 225 268
YAA	125	103	1557	12 429 392
Total	129	103	2923	23 654 660

Tablo 3.8. Bilinen miRNA'lara ait ekspresyon profilleri.

miRNA	YAA	DAA
oar-let-7a	173955	113917
oar-let-7b	28966	17105
oar-let-7c	3556	2183
oar-let-7d	16474	10191
oar-let-7f	654789	486741
oar-let-7g	357634	266369
oar-let-7i	202064	148796
oar-miR-103	173651	118752
oar-miR-106a	1149	676
oar-miR-106b	34348	20442
oar-miR-107	17924	9818
oar-miR-10a	23955	21000
oar-miR-10b	276	258
oar-miR-1185-3p	3	0
oar-miR-1185-5p	5	1
oar-miR-1197-3p	28	15
oar-miR-1197-5p	2	0
oar-miR-125b	2123	1497
oar-miR-127	2262	1170
oar-miR-133	25	24
oar-miR-134-3p	1	0
oar-miR-134-5p	10	15
oar-miR-136	3	5
oar-miR-143	3938	3209
oar-miR-148a	599071	534808
oar-miR-150	383996	169644
oar-miR-152	8934	5463
oar-miR-154a-3p	18	6
oar-miR-154b-3p	0	1
oar-miR-154b-5p	30	24
oar-miR-16b	89709	58690
oar-miR-17-5p	32372	20976
oar-miR-181a	80625	49142
oar-miR-191	231154	163059
oar-miR-194	6437	4183
oar-miR-199a-3p	2596	1332
oar-miR-19b	30369	27610
oar-miR-200a	4	2
oar-miR-200b	4	4
oar-miR-200c	1720	1237
oar-miR-21	6701561	7123015
oar-miR-218a	685	757
oar-miR-221	27126	19358
oar-miR-22-3p	71379	49185

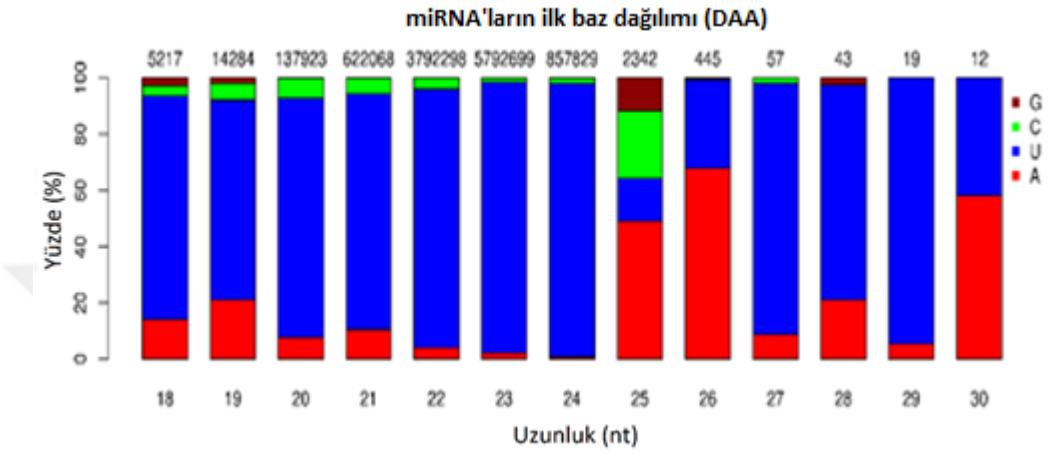
Tablo 3.8 (Devam). Bilinen miRNA'lara ait ekspresyon profilleri.

miRNA	YAA	DAA
oar-miR-23a	65377	40714
oar-miR-23b	16170	8250
oar-miR-25	122112	78909
oar-miR-26a	1266709	955861
oar-miR-26b	143048	109284
oar-miR-27a	91712	59129
oar-miR-299-3p	15	15
oar-miR-299-5p	27	20
oar-miR-29a	21412	12309
oar-miR-29b	2643	1455
oar-miR-30a-3p	31	16
oar-miR-30a-5p	1783	1075
oar-miR-30b	32362	18032
oar-miR-30c	62569	39898
oar-miR-30d	498622	355499
oar-miR-323a-3p	28	14
oar-miR-323b	1	3
oar-miR-323c	15	13
oar-miR-329a-3p	1	0
oar-miR-329b-3p	25	12
oar-miR-329b-5p	1	0
oar-miR-362	1447	1082
oar-miR-369-3p	102	72
oar-miR-369-5p	32	20
oar-miR-370-3p	46	32
oar-miR-370-5p	1	1
oar-miR-374a	14082	9787
oar-miR-374b	34651	22633
oar-miR-376a-5p	3	1
oar-miR-376b-3p	5	4
oar-miR-376c-3p	39	26
oar-miR-376c-5p	5	6
oar-miR-376d	4	1
oar-miR-376e-3p	29	22
oar-miR-376e-5p	6	10
oar-miR-377-3p	6	1
oar-miR-377-5p	0	1
oar-miR-379-3p	13	6
oar-miR-379-5p	2007	1204
oar-miR-380-3p	131	70
oar-miR-380-5p	1	2
oar-miR-381-3p	141	118
oar-miR-382-3p	83	83
oar-miR-382-5p	72	47

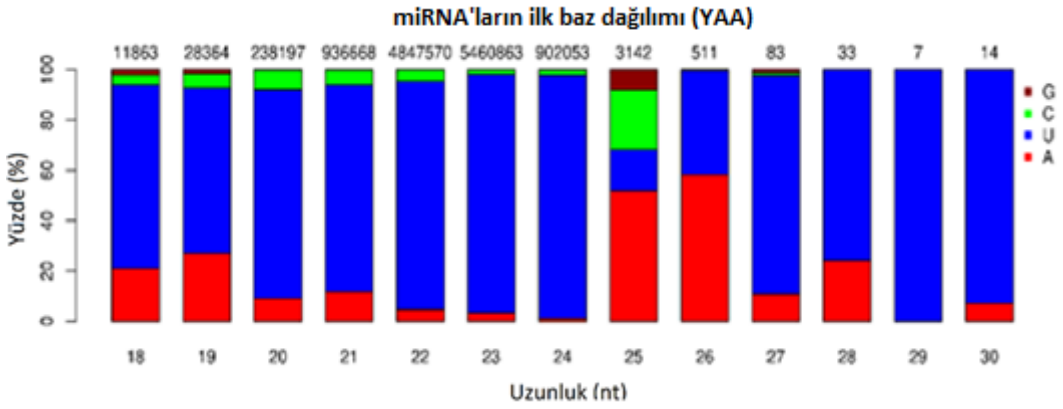
Tablo 3.8 (Devam). Bilinen miRNA'lara ait ekspresyon profilleri.

miRNA	YAA	DAA
oar-miR-3955-5p	5	6
oar-miR-3956-3p	3	0
oar-miR-3956-5p	1	1
oar-miR-3957-3p	7	2
oar-miR-3958-3p	525	306
oar-miR-3958-5p	1	0
oar-miR-3959-3p	10	3
oar-miR-3959-5p	59	64
oar-miR-409-3p	260	132
oar-miR-409-5p	49	39
oar-miR-410-3p	26	23
oar-miR-411a-3p	56	17
oar-miR-411a-5p	2595	1681
oar-miR-411b-3p	4	0
oar-miR-411b-5p	60	51
oar-miR-412-3p	26	9
oar-miR-412-5p	0	1
oar-miR-431	6	1
oar-miR-432	58	36
oar-miR-433-3p	19	6
oar-miR-485-3p	3	1
oar-miR-485-5p	15	7
oar-miR-487a-3p	2	3
oar-miR-487b-3p	70	33
oar-miR-487b-5p	1	0
oar-miR-493-3p	335	224
oar-miR-493-5p	175	67
oar-miR-494-3p	446	280
oar-miR-494-5p	1	1
oar-miR-495-3p	78	66
oar-miR-496-3p	2	0
oar-miR-539-3p	27	27
oar-miR-541-3p	0	1
oar-miR-541-5p	1	0
oar-miR-543-3p	35	9
oar-miR-543-5p	1	0
oar-miR-544-5p	9	2
oar-miR-655-3p	12	15
oar-miR-665-3p	2	1
oar-miR-758-3p	33	13
oar-miR-99a	40699	24909

Olgun miRNA’nın pre-miRNA olgunlaşması RNase III endonükleaz Dicer tarafından gerçekleştirilir (MacRae ve Doudna 2007, Lau ve ark 2012). Dicer enziminin özgüllüğü miRNA’nın ilk bazına göre değişmektedir, bu nedenle farklı uzunluklara sahip miRNA'ların ilk baz dağılım analizi Şekil 3.7. ve Şekil 3.8.’de gösterilmiştir (Apsis miRNA uzunluğunu ordinat yüzdeleri göstermektedir).



Şekil 3.7. miRNA’ların ilk baz dağılımı (DAA).



Şekil 3.8. miRNA’ların ilk baz dağılımı (YAA).

3.1.4. Kodlama Yapmayan RNA’ların Analizi

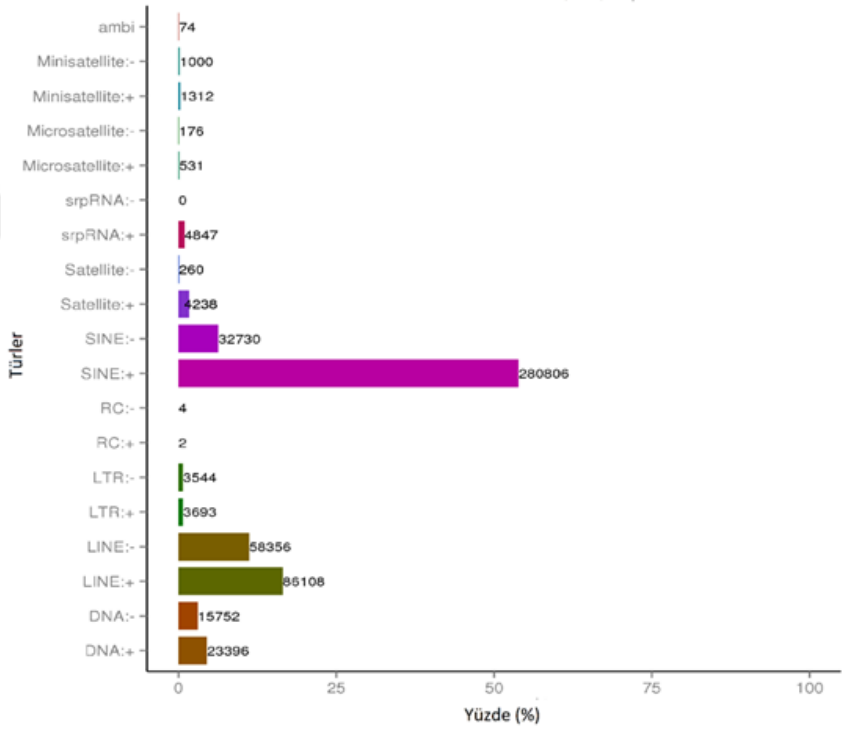
sRNA okumaları, referans türün kodlama yapmayan RNA dizileri ile haritalanmıştır. rRNA, tRNA, snRNA ve snoRNA'lar ile eşleşen okumalar kaldırılmıştır. Kodlama yapmayan RNA’lara ait veriler Tablo 3.9.’da verilmiştir.

Tablo 3.9. Kodlama yapmayan RNA'lara ait okuma sayıları.

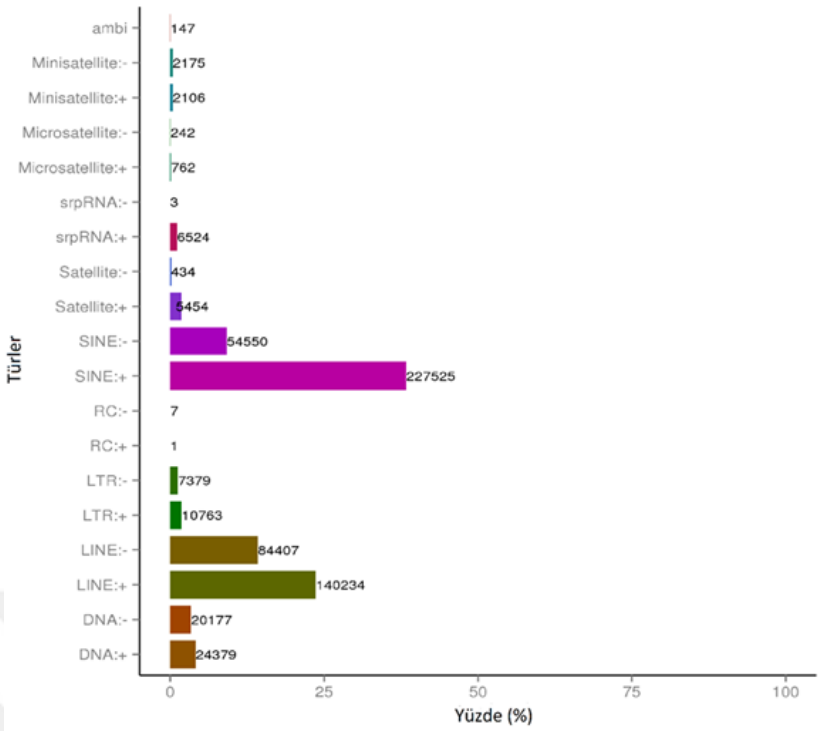
	YAA	DAA
rRNA	31 231	24 335
tRNA	37 903	23 054
snRNA	11 124	7 156
snoRNA	947 554	784 287

3.1.5. Tekrarlanan RNA'ların Analizi

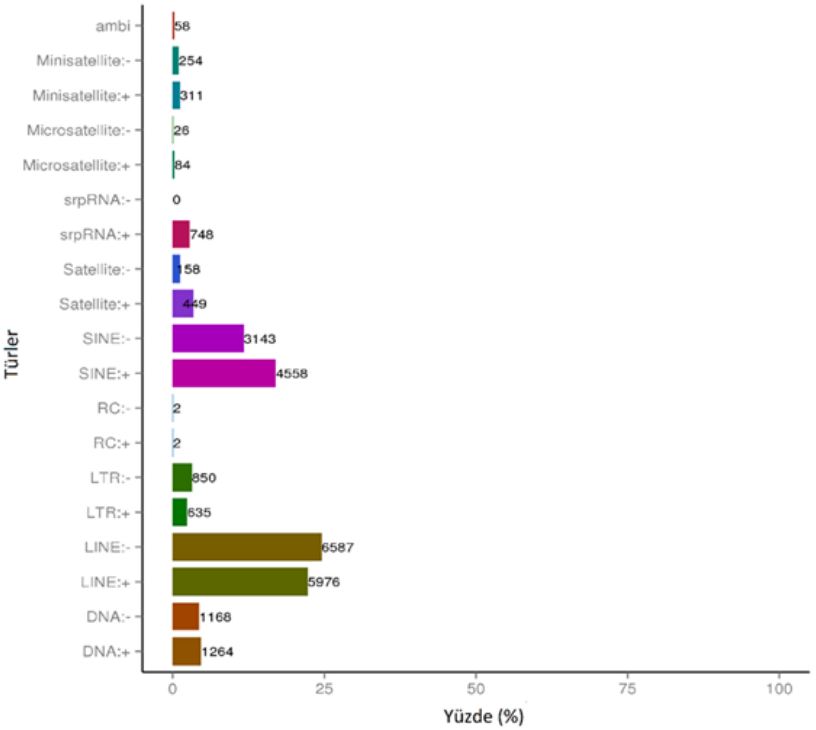
Türe ait tekrarlanan dizi bilgileri varsa, elde edilen sRNA verileri bu bilgiler kullanılarak eşleştirilir. Türe ait tekrarlanan dizi bilgileri yoksa tekrar dizileri referans genoma dayanarak tahmin edelir. sRNA verileri tahmin edilen tekrar eden dizilerle hizalanır ve sRNAverilerinden potansiyel tekrarlayan okumaları kaldırılır. Şekil 3.9. ve Şekil 3.10.'da toplam tekrarlanan dizi okumaları, Şekil 3.11. ve Şekil 3.12.'de benzersiz tekrarlanan dizi okumaları özetlenmiştir.



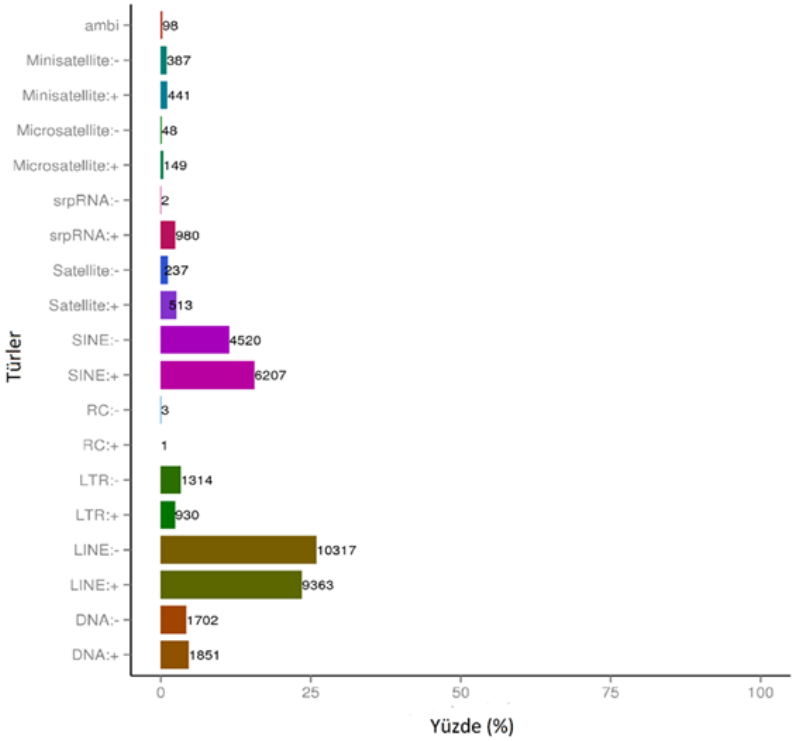
Şekil 3.9. Tekrarlanan dizilere ait toplam okuma verileri (DAA).



Şekil 3.10. Tekrarlanan dizilere ait toplam okuma verileri (YAA).



Şekil 3.11. Tekrarlanan dizilere ait benzersiz okuma verileri (DAA).



Şekil 3.12. Tekrarlanan dizilere ait benzersiz okuma verileri (YAA).

3.1.6. Ekzon ve İntron Hizalamaları

sRNA okumalarından mRNA'nın degrade olan parçalarını ayırmak için, veriler mRNA'ların ekzonları ve intronlarıyla hizalanmaktadır. Elde edilen veriler Tablo 3.10.'da gösterilmiştir.

Tablo 3.10. Ekzon ve intronlara haritalanan sRNA okumaları.

	YAA	DAA
Ekzon	6 222 531	4 802 716
İntron	666 302	387 691

3.1.7. Yeni (novel) miRNA tahmini

miRNA öncüllerinin hairpin yapısı, miREvo (Wen ve ark 2012) ve mirdeep2 (Friedlander ve ark 2011) yazılımları ile yeni miRNA'ları tahmin etmek için kullanılmıştır. Kısmi şematik eşleşmelerde bilinen miRNA'ların ikincil yapıları ve tahmin edilen miRNA'lara ait temsili 10 miRNA EK-D'de verilmiştir. Tüm dizi miRNA öncüsünü, kırmızı bölüm olgun diziyi göstermektedir. Elde edilen veriler Tablo 3.11.'de özetlenmiştir. Yeni miRNA'ların olgun form dizileri Tablo 3.12.'de

verilmiştir. Yeni miRNA'lara ait ekspresyon profilleri ilgili miRNA'ya ait haritalanmış okuma sayısı şeklinde Tablo 3.13.'te gösterilmiştir.

Tablo 3.11. Tahmin edilen yeni miRNA'lara ait veriler.

	Total	**YAA**	**DAA**
Haritalanmış olgun	134	127	127
Haritalanmış star	66	44	46
Haritalanmış hairpin	134	128	131
Haritalanmış benzersiz sRNA	1086	571	515
Haritalanmış total sRNA	38 031	21 424	16 607

Tablo 3.12. Yeni (Novel) miRNA'ların olgun formlarının baz dizileri.

miRNA	**Olgun diziler**
novel_1	ugaaaaugacgugacggacuucu
novel_10	uugcacaacucuagaagacaug
novel_100	auagaggcuguuggguugaau
novel_101	acaagucaggcucuugggaccua
novel_102	uggcuguacaacugguucauug
novel_103	augaggauuuugcuuguuuca
novel_104	aaaccuggauaaacuuuuuggc
novel_105	ugcugugcugggacuucccug
novel_106	ugauguuuaucuggauccucag
novel_107	uaggaaugaugauuucucagacu
novel_108	gaggaagucagucugcagaga
novel_109	gagagcccggauagcucagucggu
novel_11	uagucucccguugucacuggucu
novel_110	uuuuguuccagauuuccagcugu
novel_111	aaaaucugagugaacuuuuugg
novel_112	cuugccgguagugguccu
novel_113	ugugggaccucucaugucug
novel_114	uggagccuuccagcacacccacu
novel_115	aggucaucugcuugcuuaga
novel_116	aaaagagcuguugaugaacuagu
novel_117	cggcccaccaggacccaggcgg
novel_118	auagagcauguggaauuuuuuagu
novel_119	aagaaccugaacgaaccuuuug
novel_12	auagaucauucugaagcauagu
novel_121	ucauuaggauguugugagagga
novel_122	uaguucuguagucaaagugacu
novel_123	uguuaacguguucccucaagaa
novel_124	gccgggaguuguaguucugg
novel_125	uugucucuggucucccucugggu
novel_126	cgggcggggccgggggug
novel_127	aaaaucugaacgaacucuuuggc
novel_128	aaagccugaaugaacucuuugg

Tablo 3.12 (Devam). Yeni (Novel) miRNA'ların olgun formlarının baz dizileri.

miRNA	Olgun diziler
novel_129	accgccuuuguguugcccauucacu
novel_13	aaaucuacagauugucgaaaugg
novel_130	agacucagagagaaccca
novel_131	cauguccggucugcagagcuag
novel_132	aauugagguguaguuagcaaaca
novel_133	cauguccggucugcagagcuaga
novel_134	auaaaaacuauauguagagaua
novel_135	uuucacuguagaggaugcaagu
novel_136	aaaaguugauucaguuuuuucu
novel_137	aaaaccagaacgaacuuuuuga
novel_139	aguucauuuggguguuccauau
novel_14	aaacccugaacgaaggucuugg
novel_140	ccagaggaggugcugcccag
novel_141	uugauuuauuuuaaccuucaga
novel_142	caauaugaucaaaugugccaga
novel_143	ucauugugaagcagaauuca
novel_144	acgcgcgccuucucugccuugu
novel_15	acucccgguaggcaacgcgcc
novel_16	uggagagaacagguggcuuu
novel_17	ccucucucgguuagcuccauag
novel_18	uaaaaaguucguuuggguuuuu
novel_19	uuaauaucuggcauagaauguu
novel_20	auugauugauuuuaaccuuca
novel_21	uauggcaagacuccgagcuucu
novel_22	aucgagaacaggaaugaaugcu
novel_23	cauagccaguuggggaagaaug
novel_24	ccucugugucacuccugugcau
novel_25	ugugccauucgggaucuuuagu
novel_26	ucacugggcauccucugcuuu
novel_27	ccaggaguucuuuggauuguc
novel_28	ucagcaucauuguuaacuucacu
novel_29	ucccgauuuuauaaaugccuau
novel_3	acucggcguggcgucggucgugg
novel_30	uucgguggguuaggccucugug
novel_31	aaacaagaucacgccucucaga
novel_32	uccugcuugggcucuccucuaga
novel_33	uccguugucuguaaaguagaau
novel_35	acccugacgggcguggauugug
novel_36	ucgggcagcgcuguagucccagu
novel_37	caccuugucucuucccuacag
novel_38	acacccugcucagcuucaga
novel_39	gcugcuucuggucugggcucu
novel_4	ucccgggcuggaggagucugca
novel_40	ucaccuucuguaaagcucagu

Tablo 3.12 (Devam). Yeni (Novel) miRNA'ların olgun formlarının baz dizileri.

miRNA	Olgun diziler
novel_41	ugcucuaucucuguuuccaagu
novel_42	ugggaugagguccuagcgaggu
novel_43	aauuaaggugcuuguuugaaguu
novel_44	augaucauucaggguuuuuccauu
novel_45	ucagaguaggcaguagugaagc
novel_46	aaaaccucgaaugaacuuuuug
novel_47	uuucucauuguugggccaca
novel_48	ccugucaauaacauacacaca
novel_49	uggaggccugcaaacuguaggg
novel_5	gaaaaccugaaugaacuuaucg
novel_50	ugaaaaguuuguucgggguuuuu
novel_51	uccccgggcgggacgagacg
novel_52	gaccgcgcucucucccggcagu
novel_53	uccaggucuacgucugucuucu
novel_54	uggacaagacugagcgaguug
novel_55	aaaaucgaacaaaaauacuggc
novel_56	ccucauguggaaucuuuaguug
novel_58	uccgccucuccucagccuugg
novel_59	uucuacugcucucgacuguaacc
novel_60	uagauacuaggauagagacaaagu
novel_61	caccucaucccagcagugguc
novel_62	acaaaucugaaugaauuuucug
novel_63	uucucauuggccucacguccug
novel_64	uugcucccuccacacuuccaga
novel_65	augguucuuuggcgguuaaucca
novel_66	uuggcauuacugagcaucuagu
novel_67	aaaccggcaugaacuuuuugg
novel_68	ugaacucuagggcucgagagcu
novel_69	cacggcugcagacugggucaga
novel_7	aaaaccugaaugaacuuauugg
novel_70	aaaaccuugaugaacuuuuuga
novel_71	uacaguuaugucuaggcagugg
novel_72	ucagcaccauccuucccuggca
novel_73	aacggcgcugugcucaucagca
novel_74	aaugaauuuuguuuguuucucu
novel_76	uaaggggcugagaccuacucuguu
novel_77	ucagucauuccguuguguccga
novel_78	acuuugaccuguaacccaucugga
novel_79	uaauacugccugguaaugaugac
novel_8	cagcauguagaaucuuugguug
novel_80	ugacugucuggugucuucccag
novel_81	augcaaacgaacuuuuuggcca
novel_83	cuugaaauaaauuuggcuccaca
novel_84	aaugggcugugcuauaacc

Tablo 3.12 (Devam). Yeni (Novel) miRNA'ların olgun formlarının baz dizileri.

miRNA	Olgun diziler
novel_85	accguagcuuagaaaugcuuucu
novel_86	uauaaaguagcuguguucuuugu
novel_87	cacggaagaaccggguucuuug
novel_88	agaaacuagaaugaacuuuuug
novel_89	ucccugucuucaauccuguagu
novel_9	uuguugucaggagucacugcu
novel_90	ucacucagucgugcccgaauu
novel_91	guugucuguucagaauaucuau
novel_93	uaagaucgcagccuaugcuuc
novel_94	ucuggaucagucuaugcugacuu
novel_95	ucucgaccgucagagcacccuuc
novel_97	uuaaauuugugcagacugaugaga
novel_98	uuucucuuccucucuagugagc
novel_99	uccaaaugaucuuuucggccaa

Tablo 3.13. Yeni miRNA'lara ait ekspresyon profilleri.

miRNA	YAA	DAA
novel_1	7979	6434
novel_10	299	218
novel_100	1	2
novel_101	10	1
novel_102	14	3
novel_103	2	3
novel_104	6	5
novel_105	3	5
novel_106	10	7
novel_107	186	215
novel_108	8	9
novel_109	124	70
novel_11	186	144
novel_110	42	44
novel_111	286	203
novel_112	0	5
novel_113	69	44
novel_114	6	3
novel_115	1	0
novel_116	2	11
novel_117	6	2
novel_118	4	8
novel_119	169	125
novel_12	178	143
novel_121	8	11
novel_122	6	11

Tablo 3.13 (Devam). Yeni miRNA'lara ait ekspresyon profilleri.

miRNA	YAA	DAA
novel_123	7	0
novel_124	4	0
novel_125	3	4
novel_126	6	3
novel_127	6	4
novel_128	3	6
novel_129	24	11
novel_13	205	109
novel_130	17	1
novel_131	6	2
novel_132	55	49
novel_133	6	2
novel_134	8	8
novel_135	28	14
novel_136	2	4
novel_137	50	42
novel_139	0	4
novel_14	80	51
novel_27	11	17
novel_28	7	12
novel_29	10	8
novel_3	5757	4645
novel_30	12	4
novel_31	8	10
novel_32	10	17
novel_33	11	6
novel_35	5	5
novel_36	3	7
novel_37	8	2
novel_38	0	11
novel_39	1	2
novel_4	700	416
novel_40	4	1
novel_41	3	6
novel_42	2	1
novel_43	5	1
novel_44	4	0
novel_45	2	1
novel_46	3	0
novel_47	3	0
novel_48	3	1
novel_49	339	193
novel_5	274	274
novel_50	13	5

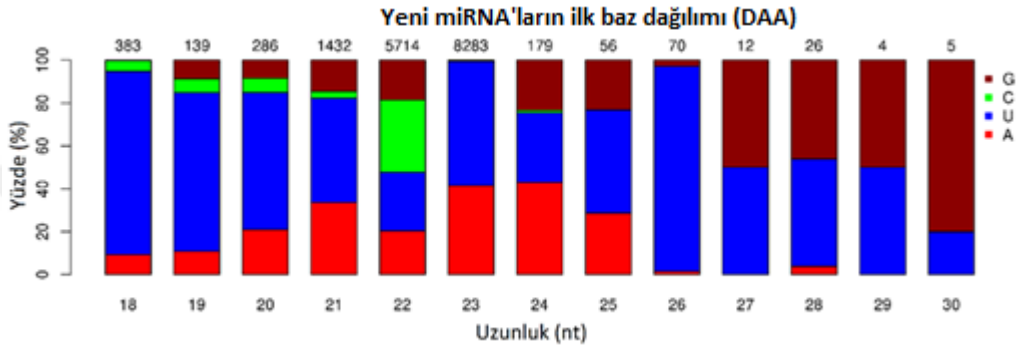
Tablo 3.13 (Devam). Yeni miRNA'lara ait ekspresyon profilleri.

miRNA	YAA	DAA
novel_51	79	56
novel_52	16	6
novel_53	16	9
novel_54	6	4
novel_55	6	5
novel_56	16	13
novel_58	10	20
novel_59	6	1
novel_60	39	17
novel_61	5	7
novel_62	21	13
novel_63	13	8
novel_64	5	9
novel_65	4	9
novel_66	32	32
novel_67	246	172
novel_68	5	11
novel_69	7	5
novel_7	340	255
novel_70	260	296
novel_71	0	2
novel_72	29	29
novel_73	7	5
novel_74	2	2
novel_76	26	16
novel_77	7	10
novel_78	6	4
novel_79	8	8
novel_8	287	278
novel_80	11	3
novel_81	11	14
novel_83	6	7
novel_84	20	5
novel_85	23	20
novel_86	4	11
novel_87	0	2
novel_88	1	4
novel_89	96	54
novel_9	359	187
novel_90	26	14
novel_91	11	4
novel_93	12	2
novel_94	65	42
novel_95	7	5

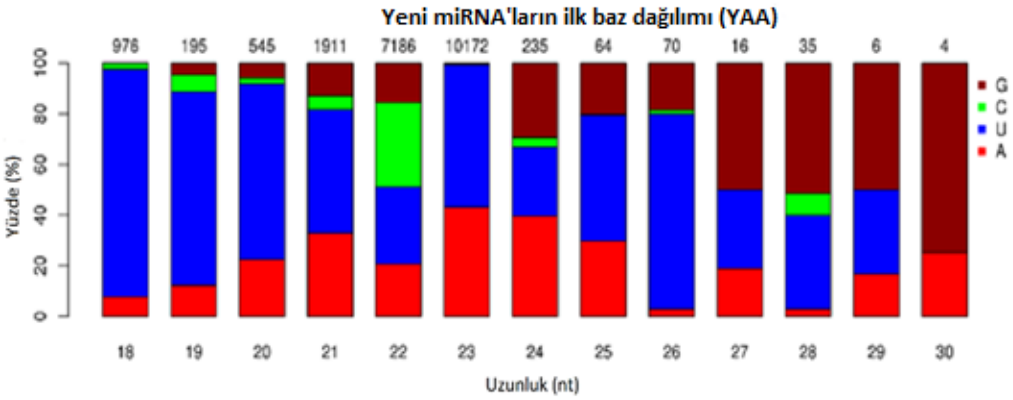
Tablo 3.13 (Devam). Yeni miRNA’lara ait ekspresyon profilleri.

miRNA	YAA	DAA
novel_97	3	8
novel_98	15	3
novel_99	42	39

Yeni miRNA'ların ilk baz dağılım analizi Şekil 3.13. ve Şekil 3.14.’te gösterilmiştir (Apsis miRNA uzunluğunu ordinat yüzdeleri göstermektedir).



Şekil 3.13. Yeni miRNA’ların ilk baz dağılımı (DAA).



Şekil 3.14. Yeni miRNA’ların ilk baz dağılımı (YAA).

3.1.8. miRNA Ekspresyon ve Diferansiyel Ekspresyon Analizi

Gruplardaki bilinen ve benzersiz miRNA'ların ekspresyonu istatistiksel olarak analiz edilmiştir ve TPM (milyon okuma başına transkript) ile normalize edilmiştir (Zhou ve ark 2010). [Normalize edilmiş ekspresyon = (örneğe ait okuma sayısı * 1 000 000) / toplam okuma sayısı]. Normalizasyon sonucu okuma değerleri Tablo 3.14.’te verilmiştir.

Tablo 3.14. Okuma sayılarının TPM normalizasyon sonucu.

miRNA	YAA	DAA
novel_1	643.05	573.94
novel_10	24.10	19.45
novel_100	0.08	0.18
novel_101	0.81	0.09
novel_102	1.13	0.27
novel_103	0.16	0.27
novel_104	0.48	0.45
novel_105	0.24	0.45
novel_106	0.81	0.62
novel_107	14.99	19.18
novel_108	0.64	0.80
novel_109	9.99	6.24
novel_11	14.99	12.85
novel_110	3.38	3.93
novel_111	23.05	18.11
novel_112	0.00	0.45
novel_113	5.56	3.93
novel_114	0.48	0.27
novel_115	0.08	0.00
novel_116	0.16	0.98
novel_117	0.48	0.18
novel_118	0.32	0.71
novel_119	13.62	11.15
novel_12	14.35	12.76
novel_121	0.64	0.98
novel_122	0.48	0.98
novel_123	0.56	0.00
novel_124	0.32	0.00
novel_125	0.24	0.36
novel_126	0.48	0.27
novel_127	0.48	0.36
novel_128	0.24	0.54
novel_129	1.93	0.98
novel_13	16.52	9.72
novel_130	1.37	0.09
novel_131	0.48	0.18
novel_132	4.43	4.37
novel_133	0.48	0.18
novel_134	0.64	0.71
novel_135	2.26	1.25
novel_136	0.16	0.36
novel_137	4.03	3.75
novel_139	0.00	0.36
novel_14	6.45	4.55

Tablo 3.14 (Devam). Okuma sayılarının TPM normalizasyon sonucu.

miRNA	YAA	DAA
novel_140	0.00	0.27
novel_141	0.40	0.27
novel_142	0.97	1.16
novel_143	12.98	8.47
novel_144	0.00	0.27
novel_15	1.85	2.41
novel_16	2.98	1.52
novel_17	1.21	1.43
novel_18	0.97	1.25
novel_19	1.45	1.96
novel_20	0.81	1.61
novel_21	1.37	0.00
novel_22	1.77	1.16
novel_23	1.93	0.89
novel_24	1.77	1.07
novel_25	0.64	1.69
novel_26	1.05	0.98
novel_27	0.89	1.52
novel_28	0.56	1.07
novel_29	0.81	0.71
novel_3	463.97	414.36
novel_30	0.97	0.36
novel_31	0.64	0.89
novel_32	0.81	1.52
novel_33	0.89	0.54
novel_35	0.40	0.45
novel_36	0.24	0.62
novel_37	0.64	0.18
novel_38	0.00	0.98
novel_39	0.08	0.18
novel_4	56.41	37.11
novel_40	0.32	0.09
novel_41	0.24	0.54
novel_42	0.16	0.09
novel_43	0.40	0.09
novel_44	0.32	0.00
novel_45	0.16	0.09
novel_46	0.24	0.00
novel_47	0.24	0.00
novel_48	0.24	0.09
novel_49	27.32	17.22
novel_5	22.08	24.44
novel_50	1.05	0.45
novel_51	6.37	5.00

Tablo 3.14 (Devam). Okuma sayılarının TPM normalizasyon sonucu.

miRNA	YAA	DAA
novel_52	1.29	0.54
novel_53	1.29	0.80
novel_54	0.48	0.36
novel_55	0.48	0.45
novel_56	1.29	1.16
novel_58	0.81	1.78
novel_59	0.48	0.09
novel_60	3.14	1.52
novel_61	0.40	0.62
novel_62	1.69	1.16
novel_63	1.05	0.71
novel_64	0.40	0.80
novel_65	0.32	0.80
novel_66	2.58	2.85
novel_67	19.83	15.34
novel_68	0.40	0.98
novel_69	0.56	0.45
novel_7	27.40	22.75
novel_70	20.95	26.40
novel_71	0.00	0.18
novel_72	2.34	2.59
novel_73	0.56	0.45
novel_74	0.16	0.18
novel_76	2.10	1.43
novel_77	0.56	0.89
novel_78	0.48	0.36
novel_79	0.64	0.71
novel_8	23.13	24.80
novel_80	0.89	0.27
novel_81	0.89	1.25
novel_83	0.48	0.62
novel_84	1.61	0.45
novel_85	1.85	1.78
novel_86	0.32	0.98
novel_87	0.00	0.18
novel_88	0.08	0.36
novel_89	7.74	4.82
novel_9	28.93	16.68
novel_90	2.10	1.25
novel_91	0.89	0.36
novel_93	0.97	0.18
novel_94	5.24	3.75
novel_95	0.56	0.45
novel_97	0.24	0.71

Tablo 3.14 (Devam). Okuma sayılarının TPM normalizasyon sonucu.

miRNA	YAA	DAA
novel_98	1.21	0.27
novel_99	3.38	3.48
oar-let-7a	14019.42	10161.94
oar-let-7b	2334.43	1525.85
oar-let-7c	286.59	194.73
oar-let-7d	1327.68	909.09
oar-let-7f	52770.90	43419.63
oar-let-7g	28822.52	23761.39
oar-let-7i	16284.79	13273.32
oar-miR-103	13994.92	10593.25
oar-miR-106a	92.60	60.30
oar-miR-106b	2768.18	1823.52
oar-miR-107	1444.54	875.81
oar-miR-10a	1930.59	1873.30
oar-miR-10b	22.24	23.01
oar-miR-1185-3p	0.24	0.00
oar-miR-1185-5p	0.40	0.09
oar-miR-1197-3p	2.26	1.34
oar-miR-1197-5p	0.16	0.00
oar-miR-125b	171.10	133.54
oar-miR-127	182.30	104.37
oar-miR-133	2.01	2.14
oar-miR-134-3p	0.08	0.00
oar-miR-134-5p	0.81	1.34
oar-miR-136	0.24	0.45
oar-miR-143	317.37	286.26
oar-miR-148a	48280.46	47707.43
oar-miR-150	30947.09	15133.06
oar-miR-152	720.01	487.33
oar-miR-154a-3p	1.45	0.54
oar-miR-154b-3p	0.00	0.09
oar-miR-154b-5p	2.42	2.14
oar-miR-16b	7229.85	5235.43
oar-miR-17-5p	2608.93	1871.16
oar-miR-181a	6497.75	4383.70
oar-miR-191	18629.21	14545.64
oar-miR-194	518.77	373.14
oar-miR-199a-3p	209.22	118.82
oar-miR-19b	2447.51	2462.94
oar-miR-200a	0.32	0.18
oar-miR-200b	0.32	0.36
oar-miR-200c	138.62	110.35
oar-miR-21	540093.70	635407.02
oar-miR-218a	55.21	67.53

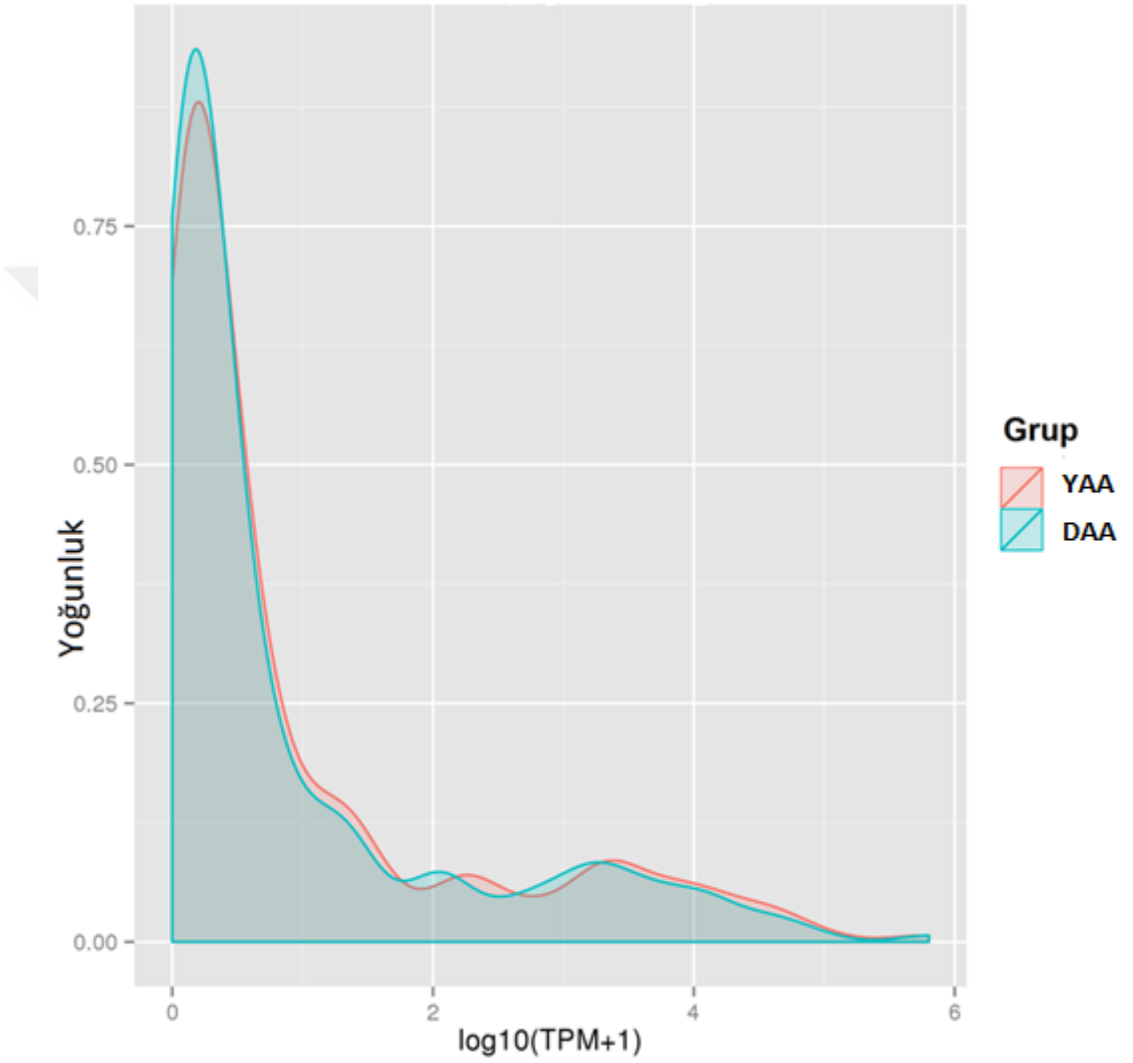
Tablo 3.14 (Devam). Okuma sayılarının TPM normalizasyon sonucu.

miRNA	YAA	DAA
oar-miR-221	2186.14	1726.83
oar-miR-22-3p	5752.59	4387.54
oar-miR-23a	5268.88	3631.88
oar-miR-23b	1303.18	735.94
oar-miR-25	9841.28	7039.06
oar-miR-26a	102086.90	85267.37
oar-miR-26b	11528.56	9748.66
oar-miR-27a	7391.27	5274.59
oar-miR-299-3p	1.21	1.34
oar-miR-299-5p	2.18	1.78
oar-miR-29a	1725.64	1098.02
oar-miR-29b	213.01	129.79
oar-miR-30a-3p	2.50	1.43
oar-miR-30a-5p	143.70	95.90
oar-miR-30b	2608.13	1608.54
oar-miR-30c	5042.57	3559.09
oar-miR-30d	40185.06	31712.21
oar-miR-323a-3p	2.26	1.25
oar-miR-323b	0.08	0.27
oar-miR-323c	1.21	1.16
oar-miR-329a-3p	0.08	0.00
oar-miR-329b-3p	2.01	1.07
oar-miR-329b-5p	0.08	0.00
oar-miR-362	116.62	96.52
oar-miR-369-3p	8.22	6.42
oar-miR-369-5p	2.58	1.78
oar-miR-370-3p	3.71	2.85
oar-miR-370-5p	0.08	0.09
oar-miR-374a	1134.90	873.05
oar-miR-374b	2792.60	2018.97
oar-miR-376a-5p	0.24	0.09
oar-miR-376b-3p	0.40	0.36
oar-miR-376c-3p	3.14	2.32
oar-miR-376c-5p	0.40	0.54
oar-miR-376d	0.32	0.09
oar-miR-376e-3p	2.34	1.96
oar-miR-376e-5p	0.48	0.89
oar-miR-377-3p	0.48	0.09
oar-miR-377-5p	0.00	0.09
oar-miR-379-3p	1.05	0.54
oar-miR-379-5p	161.75	107.40
oar-miR-380-3p	10.56	6.24
oar-miR-380-5p	0.08	0.18
oar-miR-381-3p	11.36	10.53

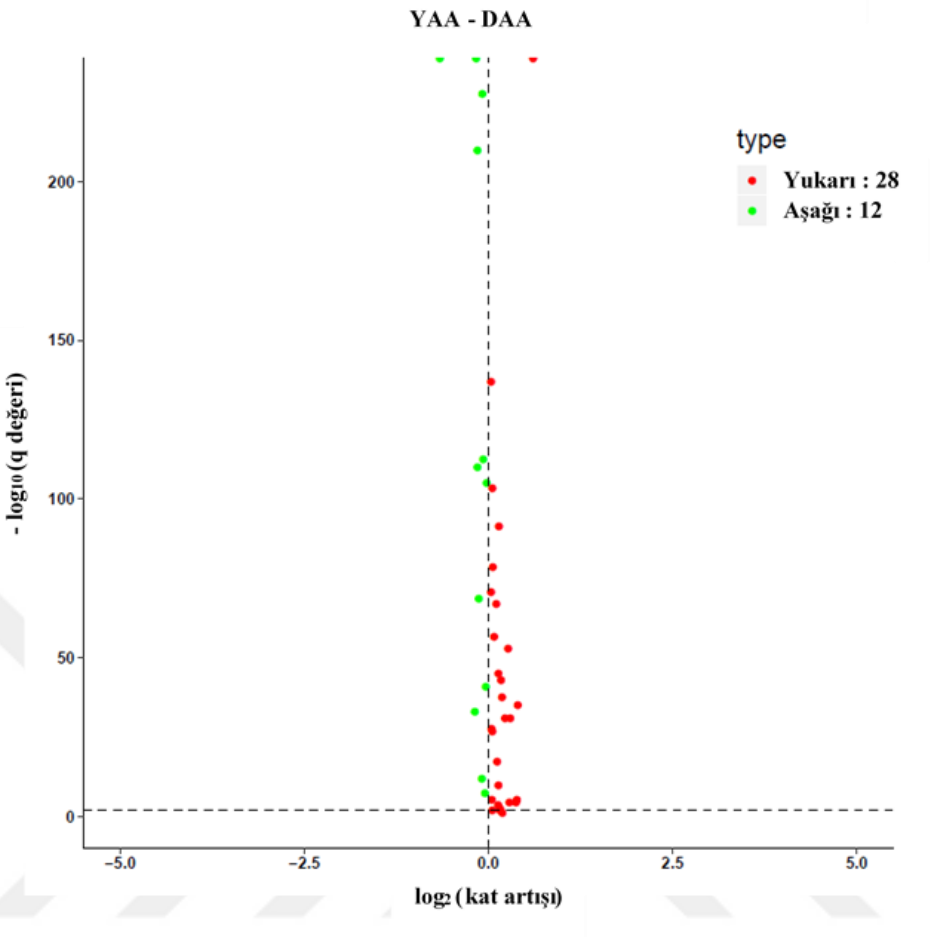
Tablo 3.14 (Devam). Okuma sayılarının TPM normalizasyon sonucu.

miRNA	YAA	DAA
oar-miR-382-3p	6.69	7.40
oar-miR-382-5p	5.80	4.19
oar-miR-3955-5p	0.40	0.54
oar-miR-3956-3p	0.24	0.00
oar-miR-3956-5p	0.08	0.09
oar-miR-3957-3p	0.56	0.18
oar-miR-3958-3p	42.31	27.30
oar-miR-3958-5p	0.08	0.00
oar-miR-3959-3p	0.81	0.27
oar-miR-3959-5p	4.75	5.71
oar-miR-409-3p	20.95	11.78
oar-miR-409-5p	3.95	3.48
oar-miR-410-3p	2.10	2.05
oar-miR-411a-3p	4.51	1.52
oar-miR-411a-5p	209.14	149.95
oar-miR-411b-3p	0.32	0.00
oar-miR-411b-5p	4.84	4.55
oar-miR-412-3p	2.10	0.80
oar-miR-412-5p	0.00	0.09
oar-miR-431	0.48	0.09
oar-miR-432	4.67	3.21
oar-miR-433-3p	1.53	0.54
oar-miR-485-3p	0.24	0.09
oar-miR-485-5p	1.21	0.62
oar-miR-487a-3p	0.16	0.27
oar-miR-487b-3p	5.64	2.94
oar-miR-487b-5p	0.08	0.00
oar-miR-493-3p	27.00	19.98
oar-miR-493-5p	14.10	5.98
oar-miR-494-3p	35.94	24.98
oar-miR-494-5p	0.08	0.09
oar-miR-495-3p	6.29	5.89
oar-miR-496-3p	0.16	0.00
oar-miR-539-3p	2.18	2.41
oar-miR-541-3p	0.00	0.09
oar-miR-541-5p	0.08	0.00
oar-miR-543-3p	2.82	0.80
oar-miR-543-5p	0.08	0.00
oar-miR-544-5p	0.73	0.18
oar-miR-655-3p	0.97	1.34
oar-miR-665-3p	0.16	0.09
oar-miR-758-3p	2.66	1.16
oar-miR-99a	3280.02	2222.00

DAA ve YAA gruplarının RNA-seq verisinin gen ekspresyon seviyesi dağılımı Şekil 3.15.'te gösterilmiştir. Bu grafiğe göre DAA ve YAA gruplarının gen ekspresyon dağılımlarının benzer olduğu görülmektedir. İki grup arasında her genin ekspresyon verilerinin karşılaştırıldığı grafik Şekil 3.16.'da "Volcano Plot" olarak gösterilmiştir. Bu grafiğe göre gruplar arası anlamlı diferansiyel eksprese olmuş miRNA'ların Tablo 3.15.'te kat artışları verilmiştir.



Şekil 3.15. Grupların TPM dağılımı.

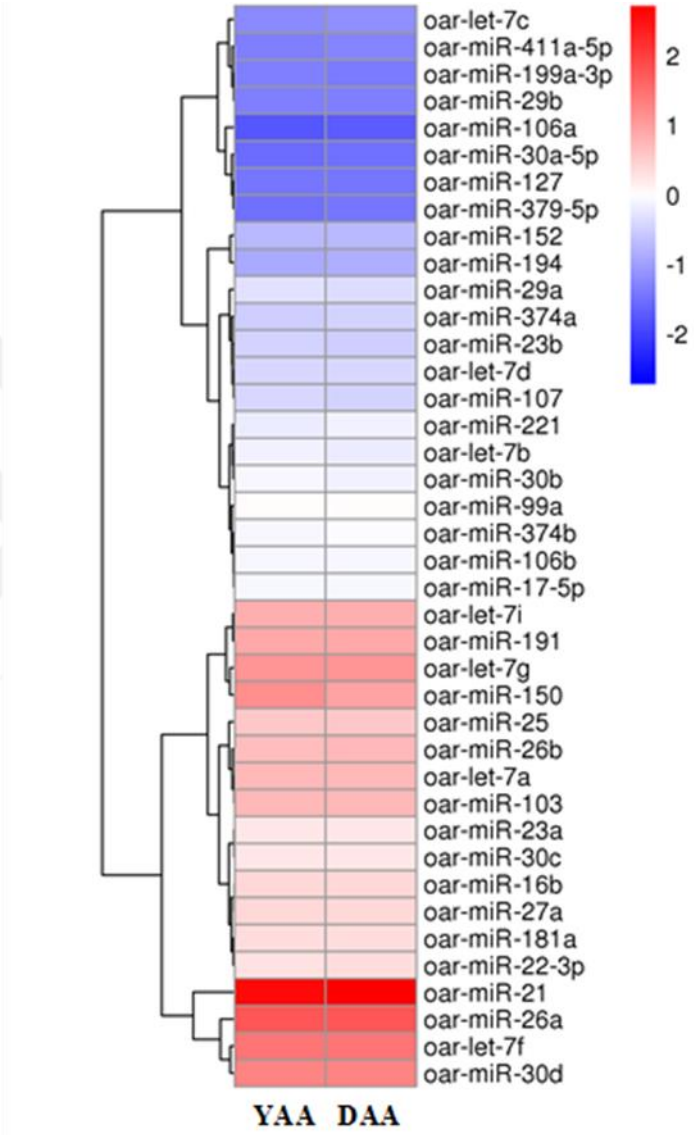


Şekil 3.16. DAA ve YAA grupları arasındaki gen ekspresyon dağılımlarının kat artışına (fold change) ve p-değerine göre “Volcano Plot” şeklinde gösterimi.

Tablo 3.15. DAA grubuna göre YAA grubunda artan (+) ve azalan (-) miRNA'lara ait kat artışları.

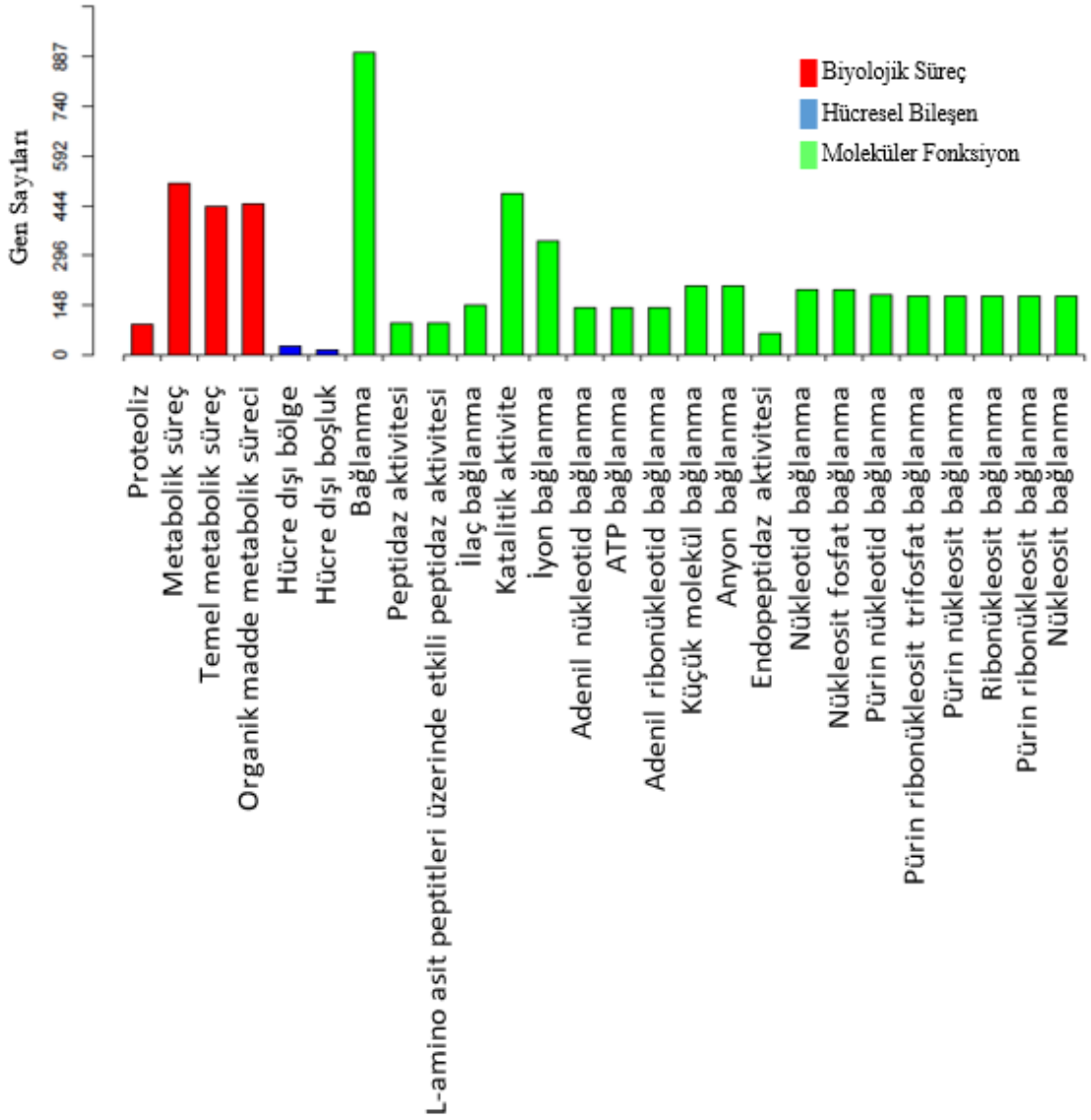
miRNA	|log2(kat artışı)|
oar-miR-21	(-) 0,66
oar-miR-150	(+) 0,61
oar-miR-23b	(+) 0,40
oar-miR-199a-3p	(+) 0,39
oar-miR-127	(+) 0,38
oar-miR-107	(+) 0,30
oar-miR-29b	(+) 0,29
oar-miR-30b	(+) 0,27
oar-miR-29a	(+) 0,23
oar-miR-106a	(+) 0,19
oar-let-7b	(+) 0,19
oar-miR-26b	(-) 0,18
oar-miR-106b	(+) 0,18
oar-miR-26a	(-) 0,17
oar-miR-379-5p	(+) 0,16
oar-miR-30a-5p	(+) 0,16
oar-let-7g	(-) 0,15
oar-let-7f	(-) 0,14
oar-miR-181a	(+) 0,14
oar-miR-152	(+) 0,14
oar-miR-99a	(+) 0,14
oar-let-7c	(+) 0,13
oar-let-7i	(-) 0,13
oar-let-7d	(+) 0,12
oar-miR-23a	(+) 0,11
oar-miR-221	(-) 0,09
oar-miR-30d	(-) 0,08
oar-miR-30c	(+) 0,08
oar-miR-191	(-) 0,07
oar-miR-27a	(+) 0,06
oar-miR-25	(+) 0,06
oar-miR-411a-5p	(+) 0,05
oar-miR-17-5p	(+) 0,05
oar-miR-194	(+) 0,05
oar-miR-374a	(-) 0,05
oar-miR-374b	(+) 0,04
oar-miR-16b	(+) 0,04
oar-let-7a	(+) 0,04
oar-miR-22-3p	(-) 0,04
oar-miR-103	(-) 0,02

Küme analizinde, farklı renkteki alanlar kümenin farklı gruplarını temsil etmektedir. Her gruptaki miRNA'lar benzer işlevlere sahip olabilir veya aynı biyolojik süreçte yer alabilirler. DAA ve YAA gruplarının küme analizi Şekil 3.17.'de verilmiştir. Bu grafiğe göre farklı anlatım gösteren miRNA'lar iki grupta benzer değişim eğilimine sahip oldukları görülmektedir.



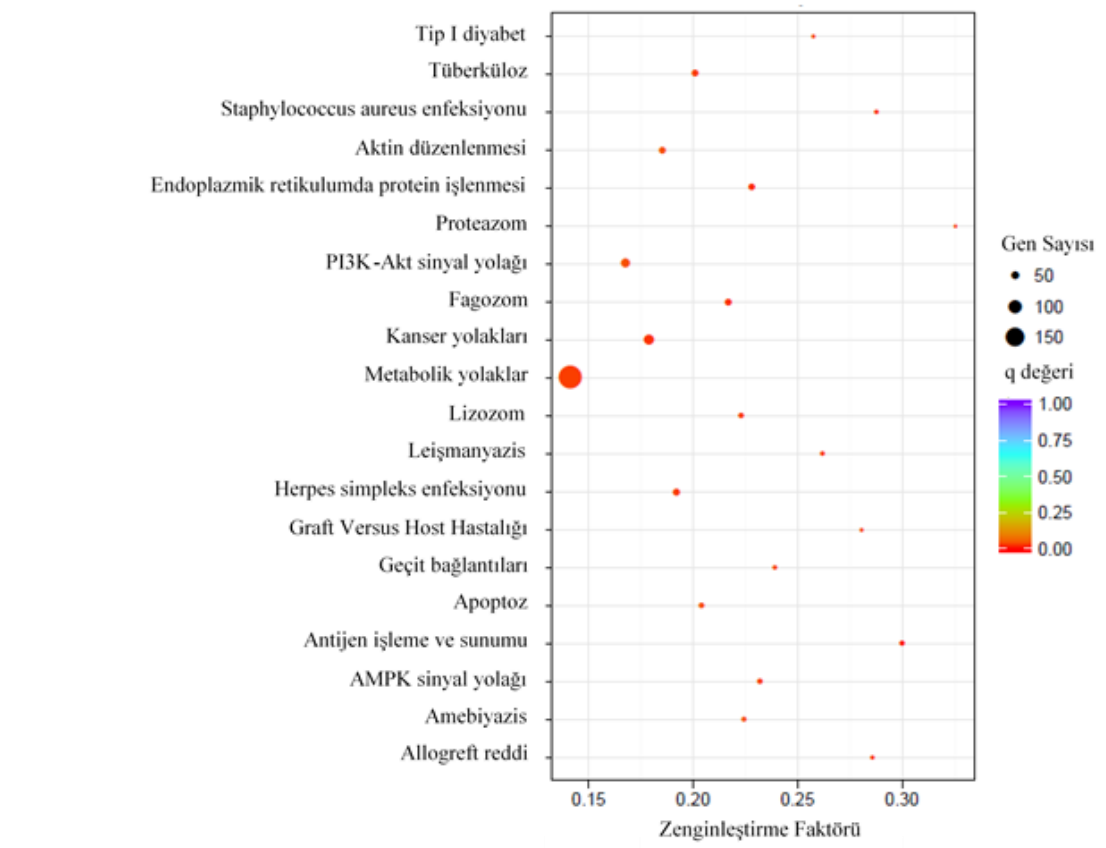
Şekil 3.17. Küme analizinde, DAA ve YAA'da anlatım farklılığı gösteren 7miRNA'larının ısı haritası.

GO analizi sonucunda elde edilen biyolojik süreç, hücresel bileşen ve moleküler fonksiyon kategorileri ile gen sayılarının ilişkisi Şekil 3. 18.'de verilmiştir. Buna göre özellikle metabolik fonksiyonlardan bağlanma ile ilişkili oldukça fazla sayıda (901) hedef gen tespit edilmiştir. Hücresel bileşenlerden hücre dışı bölge (25) ve hücre dışı boşlukla (16) ilişkili ise düşük sayıda hedef gen tespit edilmiştir.



Şekil 3.18. GO analizinde biyolojik süreç, hücresel bileşen ve moleküler fonksiyon kategorileri ile ilişkili hedef gen adaylarının histogram şeklinde gösterimi.

KEGG yolak analizlerindeki YAA-DAA arasında 4217 gen test edildi ve bunlardan 790 tanesi ile anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi. Bunlar içerisinde metabolik yolaklarla ilişkili genlerin en yüksek sayıda (187) olduğu ortaya konulmuştur. Şekil 3.19.'da KEGG yolaklarında hedef gen adaylarının istatistiksel zenginleşmesi gösterilmiştir.

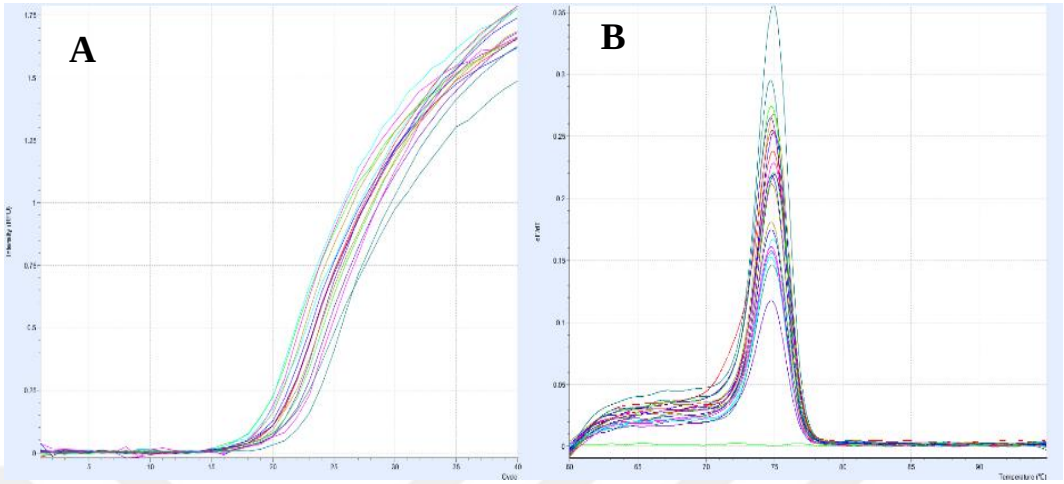


Şekil 3.19. KEGG yolaklarında hedef gen adaylarının istatistiksel zenginleşmesine ait grafik.

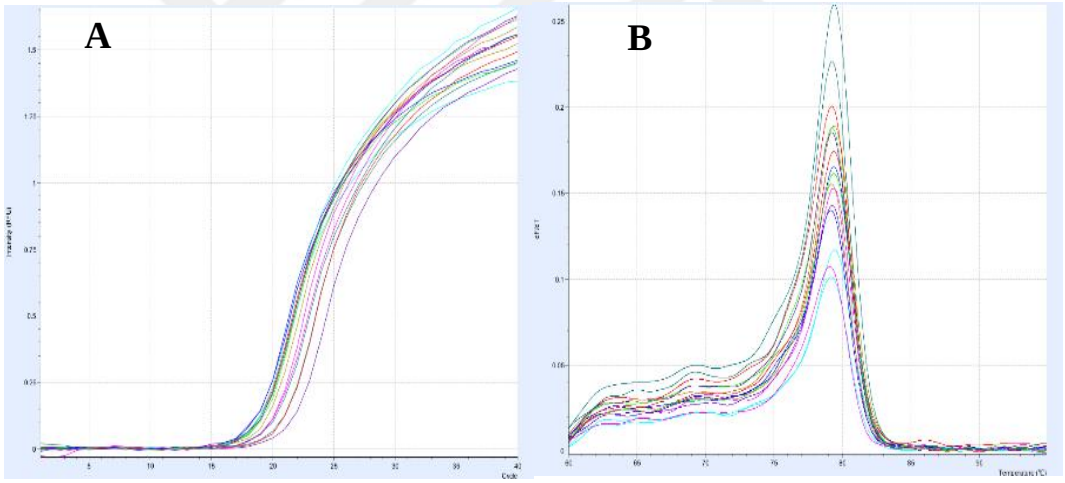
3.2. RT-qPZR

RNA-seq verilerine göre DAA ve YAA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon gösteren miRNA'lardan kat artışlarından en fazla artış gösteren iki miRNA seçilmiştir. Tüm örneklerde oar-miR-21 ve oar-miR-150 ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için qPZR yapılmıştır. Normalizasyon için RNU6 ekspresyon düzeyleri kullanılmıştır. qPZR sonucu DAA ve YAA grubu örneklerinde oar-miR-21, oar-miR-150, RNU6'ya ait amplifikasyon ve tm eğrileri Şekil 3.20, Şekil 3.21 ve Şekil

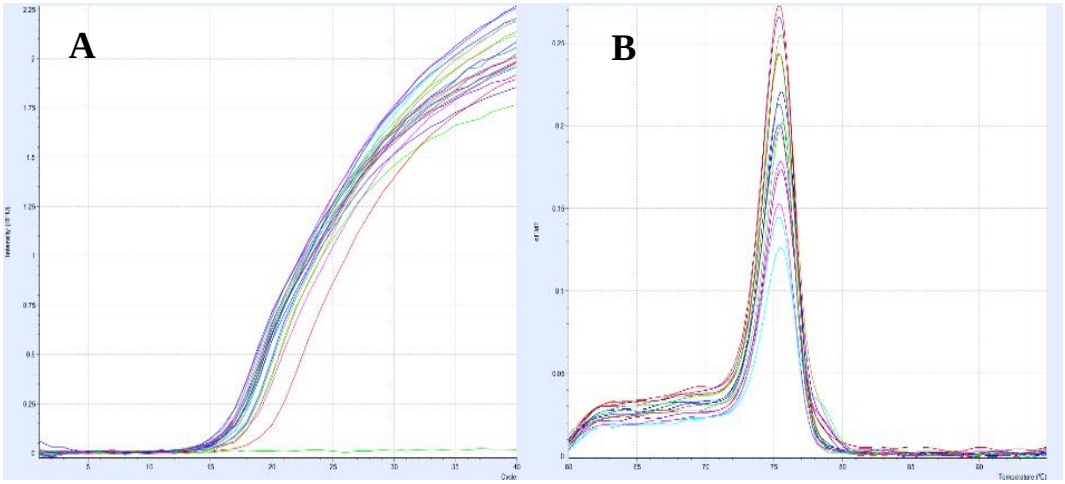
3.22’de gösterilmiştir. Çalışmada elde edilen oar-miR-21, oar-miR-150, RNU6’ya ait Ct (Cycle Threshold) ve $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Tablo 3.16’da gösterilmiştir.



Şekil 3.20. oar-miR-21’e ait amplifikasyon (A) ve Tm eğrisi (B).



Şekil 3.21. oar-miR-150’ye ait amplifikasyon (A) ve Tm eğrisi (B).



Şekil 3.22. RNU6'ya ait amplifikasyon (A) ve Tm eğrisi (B).

Tablo 3.16. oar-miR-21, oar-miR-150, RNU6'ya ait Ct ve $2^{-\Delta Ct}$ değerleri.

Grup	oar-miR-21 (Ct)	oar-miR-150 (Ct)	RNU6 (Ct)	oar-miR-21 ($2^{-\Delta Ct}$)	oar-miR-150 ($2^{-\Delta Ct}$)
YAA	19,9	14,87	16,88	8,12	0,25
YAA	19,63	15,45	17,08	5,87	0,32
YAA	20,52	16,47	17,78	6,64	0,4
YAA	22,59	18,71	20,4	4,56	0,31
YAA	18,71	15,71	16,86	3,6	0,45
YAA	18,83	15,75	17,01	3,52	0,41
YAA	20,05	15,34	17,19	7,22	0,28
YAA	22,45	16,93	19,43	8,1	0,18
YAA	19,24	16,89	17,91	2,52	0,49
YAA	19,2	15,71	18,33	1,83	0,16
YAA	19,57	14,92	17,22	5,12	0,2
YAA	19,52	15,96	17,18	5,08	0,43
YAA	19,14	15,48	18,03	2,15	0,17
YAA	19,07	15,45	17,23	3,6	0,29
YAA	19,54	15,3	17,05	5,63	0,3
YAA	20,62	15,33	18,46	4,47	0,11
YAA	19,52	15,18	16,6	7,55	0,37
YAA	19,87	15,7	17,13	6,67	0,37
YAA	19,46	15,78	18,39	2,1	0,16
YAA	20,6	16,55	18,01	6	0,36
YAA	20,46	17,02	18,7	3,38	0,31
DAA	19,95	15,5	18,16	3,46	0,16
DAA	19,26	16,23	17,89	2,6	0,32
DAA	19,61	16,34	18,48	2,18	0,23
DAA	19,22	14,84	17,63	3,01	0,14
DAA	18,93	16,02	17,62	2,47	0,33

Tablo 3.16 (Devam). oar-miR-21, oar-miR-150, RNU6'ya ait Ct ve $2^{-\Delta Ct}$ değerleri.

Grup	oar-miR-21 (Ct)	oar-miR-150 (Ct)	RNU6 (Ct)	oar-miR-21 ($2^{-\Delta Ct}$)	oar-miR-150 ($2^{-\Delta Ct}$)
DAA	17,87	15,71	17,97	0,93	0,21
DAA	20,71	15,86	19,09	3,08	0,11
DAA	19,32	17,48	19,86	0,69	0,19
DAA	18,55	16,07	18,07	1,4	0,25
DAA	19,86	17,55	20,67	0,57	0,12
DAA	21,54	18,06	19,8	3,34	0,3
DAA	17,85	15,75	18,02	0,89	0,21
DAA	18,42	16,05	17,81	1,53	0,3
DAA	20,52	16,91	19,2	2,51	0,2
DAA	20,44	16,38	18,86	2,99	0,18
DAA	18,31	15,46	18,95	0,64	0,09
DAA	20,31	15,73	18	4,97	0,21

Elde edilen oar-miR-21, oar-miR-150'ye ait $2^{-\Delta Ct}$ verilerine ait tanımlayıcı bilgiler Tablo 3.17.'de verilmiştir. Hesaplanan $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin normal dağılım gösterdiği Sharpiro-Wilk ile doğrulanmıştır. Gruplar arası karşılaştırma yapmak için Independent Samples T Test test kullanılmıştır (Tablo 3.18.). Analizler IBM SPSS Statistics 22 programı ile yapılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

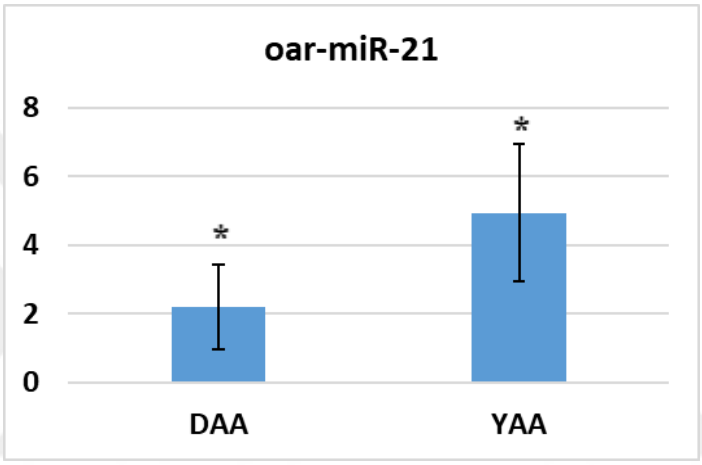
Tablo 3.17. oar-miR-21, oar-miR-150'ye ait $2^{-\Delta Ct}$ değerlerine ait tanımlayıcı bilgiler.

	Grup	n	Minumum	Maksimum	Ortalama	Varyans	Standart Sapma
oar-miR-21	DAA	17	0,57	4,97	2,19	1,55	1,24
	YAA	21	1,83	8,12	4,94	4,02	2,00
oar-miR-150	DAA	17	0,09	0,33	0,21	0,01	0,07
	YAA	21	0,11	0,49	0,30	0,01	0,11

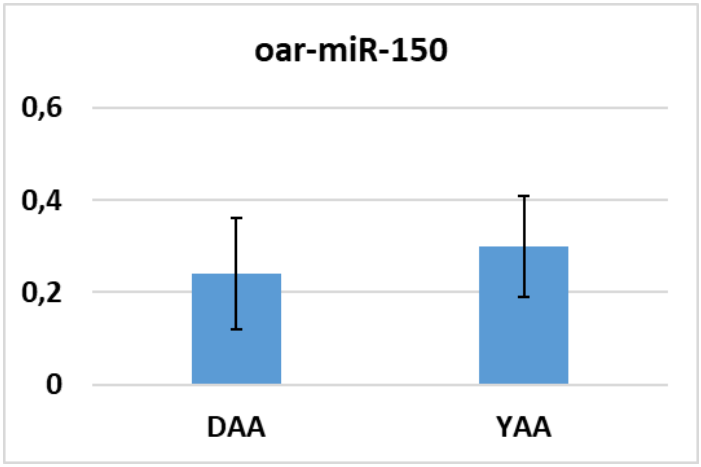
Tablo 3.18. DAA ve YAA gruplarında oar-miR-21, oar-miR-150 ifade düzeylerinin karşılaştırılması (Independent Sample T Test).

	Grup	n	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	p Değeri
oar-miR-21	DAA	17	2,19	1,24	0,30	<0,05
	YAA	21	4,94	2,00	0,44	
oar-miR-150	DAA	17	0,24	0,12	0,03	>0,05
	YAA	21	0,30	0,11	0,02	

YAA ve DAA gruplarında oar-miR-21 ve oar-miR-150 ekspresyonlarına ait elde edilen veriler, apsis grupları, ordinat göreceli ekspresyon değerleri olarak Şekil 3.23. ve Şekil 3.24.'te verilmiştir. Grafikler ortalama ± standart hata olarak çizilmiştir. YAA grubundaki örneklere ait oar-miR-21 ekspresyonu DAA grubundaki örneklere ait ekspresyonu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p < 0,05$) (Şekil 3.23.). YAA ve DAA gruplarındaki örneklere ait oar-miR-150 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 3.24.).



Şekil 3.23. Çalışma gruplarında oar-miR-21'e ait ortalama ekspresyon düzeyleri (* ; $p < 0,05$).



Şekil 3.24. Çalışma gruplarında oar-miR-150'ye ait ortalama ekspresyon düzeyleri.

3.3. Korelasyon Analizi

Kangal Akkaraman kuzularına ait GCAA ile oar-miR-21($2^{-\Delta Ct}$) ve oar-miR-150($2^{-\Delta Ct}$) değerleri karşılaştırılmıştır. Korelasyon analizi için Pearson Korelasyon analiz testi kullanılmıştır. GCAA ile oar-miR-21($2^{-\Delta Ct}$) arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur (Pearson korelasyon değeri=0,646, $p<0,01$). GCAA ile oar-miR-150($2^{-\Delta Ct}$) arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur (Pearson korelasyon değeri=0,504, $p<0,01$).

Tablo 3.19. GCAA ile oar-miR-21($2^{-\Delta Ct}$) ve oar-miR-150($2^{-\Delta Ct}$) değerleri arasındaki ilişkinin regresyon denklemleri ve R^2'leri.

		Regresyon Denklemi	**R^2**
oar-miR-21 (x) GCAA (y)	Üstel	$y = 124,24e^{0,1274x}$	0,39
	Doğrusal	$y = 26,396x + 120,4$	0,42
	Logaritmik	$y = 77,634\ln(x) + 133,07$	0,40
	Polinom	$y = -1,3889x^2 + 38,114x + 102,48$	0,42
	Üs	$y = 131,15x^{0,3811}$	0,38
oar-miR-150 (x) GCAA (y)	Üstel	$y = 112,3e^{2,2056x}$	0,27
	Doğrusal	$y = 430,43x + 106,38$	0,25
	Logaritmik	$y = 101,54\ln(x) + 363,76$	0,24
	Polinom	$y = 54,566x^2 + 400,1x + 110$	0,25
	Üs	$y = 422,44x^{0,5245}$	0,26

4. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan hesaplamalara göre dünya nüfusunun 2050 yılında 9,6 milyara ulaşması, et ve süt ürünlerine olan talebin ise 2050 yılına kadar %58 oranında artması beklenmektedir (FAO 2011). Gıda arzındaki artışı karşılamak için sınırlı doğal kaynaklar mevcuttur (Gerber ve ark 2013). Dünyada ve ülkemizde koyun yetiştiriciliğinin et, süt ve yapağı açısından önemli bir yeri vardır. Düşük maliyetli bir üretim dalı olması sebebiyle koyun yetiştiriciliği kırsal alanlarda tercih edilen hayvansal üretim alanıdır (Sönmez ve Kaymakçı 1979, Gürsoy 2005).

Türkiye'de yaygın bir biçimde yetiştiriciliği yapılan Akkaraman ırkından, vücut iriliği ve besi performansı açısından önemli oranda farklılaşan Kangal Akkaraman koyun ırkının Halk Elinde Islah Projeleri ile verimlerinin belirlenmesi ve geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Verimlerinin belirlenmesinde kullanılan parametrelerden bir tanesi GCAA'dır. Kangal Akkaraman kuzularının canlı ağırlık artışlarına yönelik hesaplanmış veriler olmakla birlikte (Garip ve ark 2010), literatürde Kangal Akkaraman ırkında yapılan miRNA çalışmalarına rastlanılmamaktadır. Bunun yanısıra, ırk içi genetik varyasyonun DNA düzeyinde tanımlanmasına yönelik çalışmalar mevcuttur (Cemal ve ark 1996, Karaca ve ark 1998, Sahin ve Akmaz 2004, Kurar ve ark 2012). Bu çalışmada Türkiye'nin genetik bir kaynağı olan Kangal Akkaraman kuzularında GCAA ile ilişkili olabilecek miRNA'ların tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Günümüzde farklı işlevlere sahip birçok RNA çeşidinin olduğu bilinmekte ve her geçen gün yeni RNA molekülleri keşfedilmektedir. Bu çeşitliliğin içerisinde kodlama yapmayan small RNA molekülleri önemli bir yer tutmaktadır. miRNA'lar small RNA moleküllerinin en önemlilerinden biridir. miRNA'lar ekspresyonlarını negatif olarak düzenlemek için hedef mRNA'larla eşleşen endojen, küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır (Bartel 2009). Yüzlerce miRNA, transkriptomun büyük bir bölümünü etkilemekte ve hayvan gelişimi sırasında geniş bir yelpazede biyolojik süreçleri düzenlemektedirler (Bushati ve Cohen 2007, Inui ve ark 2010).

Sonuçların kalitesini ve verilerin güvenilirliğini etkileyebilmesi nedeniyle nükleik asit izolasyon aşamasının optimizasyonu çalışmanın kritik adımlarından biridir (Bustin ve ark 2009, Becker ve ark 2010). Yüksek düzeyde protein içeren (örn.,

RNaz, albüminler ve globülinler) biyolojik numunelerden miRNA'nın başarılı bir şekilde izolasyonu oldukça fazla sayıda işlem basamağı gerektirmektedir. Bunun yanısıra, Trizol ile izole edilmiş miRNA'ların Ct değerlerinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Çalışmada total RNA izolasyonu için kullanılan trizol yöntemi altın standart RNA izolasyon yöntemi olarak kabul görmekte, dolaşımdaki miRNA izolasyonu için kit tabanlı protokollere göre daha olumlu sonuçlar ortaya koymaktadır (McDonald ve ark 2011, Duy ve ark 2015, Shirshova ve ark 2018).

Günümüzde miRNA'ları profillemek, etiketlemek, amplifiye etmek için northern blotting (Válóczi ve ark 2004), oligonükleotid makroarray (Krichevsky ve ark 2003), qPZR (Raymond ve ark 2005, Shi ve Chiang 2005, Duncan ve ark 2006), sıvı fazda tek molekül tespiti (Neely ve ark 2006), oligonükleotid mikroarray (Thomson ve ark 2004, Castoldi ve ark 2006, Davison ve ark 2006), in situ hibridizasyon (Kloosterman ve ark 2006) ve sekanslama (Morin ve ark 2008) gibi çeşitli yöntemler mevcuttur. Çalışmada yeni miRNA'ların tespit edilmesi ve ekspresyon farklılıklarının araştırılması için NGS yöntemlerinden biri olan RNA-seq tercih edilmiş örnekler havuz oluşturularak çalışılmıştır. RNA-seq analizlerinde, RNA örneklerinin havuz oluşturularak analiz edilmesi, maliyeti düşürmek ve tek örnekle yapılan çalışmalardaki sakıncaları en aza indirmek için kullanılmaktadır (Li ve ark 2016, Pan ve ark 2018).

Hi-Seq 2500 cihazı, bir çalışmada 6 milyara kadar çift uçlu okuma üretebilir. PE100'de, 600 Gb veriyi temsil eder. Bu, bir çalışma için gerekenden çok daha fazla dizi verisidir, pratikte kütüphaneler indekslenir ve birkaç kütüphane normalize edilir ve bir akış hücresinde çalıştırılmak üzere birleştirilir. Bu bir laboratuvar için çok fazla sekanslama kapasitesi ise, Illumina daha düşük iş hacmine sahip bir sekanslama cihazı daha sunmaktadır. MiSeq sistemi, PE250 modunda 2 günlük çalışma süresi içinde 8,5 Gb veriyi temsil eden 30 M okuma üretebilmektedir (Korpelainen ve ark 2014).

Bu, tek bir çalışma için tipik olarak gerekenden çok daha fazla dizi verisidir, böylece pratikte kütüphaneler dizine eklenir ve birkaç kütüphane normalleştirilir ve tek bir akış hücresinde çalışacak şekilde birleştirilir. 16 şeritli bir akış hücresinde toplamda yüzlerce kütüphaneye sahip olmak normal bir uygulamadır. Bu bir laboratuvar için çok fazla sıralama kapasitesi ise, Illumina ayrıca daha düşük verime sahip daha küçük, ancak daha kişisel bir sıralayıcı sağlar. Miseq sistemi, 2 günlük

çalışma süresi boyunca 8.5 Gb veriyi temsil eden PE250 modelinde 30 M okuma üretebilir. Ocak 2017'de piyasaya sürülen Novaseq, Illumina'nın en yeni yüksek çıkışlı cihazıdır. Cihaz, HiSeq sermaye maliyetlerini karşılayamayan araştırma laboratuvarları için tasarlanmıştır ve Hiseq cihazından 2-3 kat fazla veri elde edilebilir (Korpelainen ve ark 2014).

Sun ve ark (2019) Qianhua Mutton Merinosu ve Small Tail Han koyunlarının kas dokusunda büyüme ile ilişkili miRNA'ların tespitine yönelik yaptıkları araştırmada kütüphane başına 11,21 - 15,76 milyon okuma verisi elde ettiklerini bildirmişlerdir. Zhang ve ark (2013) iki farklı koyun ırkının kas dokusunda havuz oluşturarak yaptıkları analizde toplam elde ettikleri 35 700 772 ham okuma verisinden 34 964 457 okumayı haritalamışlardır. Chang ve ark (2015) koyun ovaryum ve testis dokularından Trizol ile miRNA ekstraksiyonu yapmışlar ve toplam 9 600 000 ham okumadan 18-30 nükleotit arasında 9 321 775 okuma verisi elde etmişlerdir. Bunlar içerisinden ise toplam okumanın %75'ini oluşturan 7 240 262 sekans verisinin *Ovis aries* genomu ile haritalandırıldığını bildirmişlerdir. Gu ve ark (2019) küçük kuyruklu Han koyunlarının üreme performansını düzenleyen moleküler mekanizmaları açıklığa kavuşturmak için yaptıkları çalışmada RNA-seq teknolojsini kullanmışlardır. Toplam 9,8 - 12,9 milyon okuma verisi elde ettiklerini bildirmişlerdir. Pokharel ve ark (2018) Finnsheep ve Texel koyunlarının ovaryum transkriptomlarındaki olası farklılıkları araştırmak için yaptıkları çalışmada toplam 595 743 784 okuma verisi elde etmişler ve bunlardan 291 954 185 okumayı koyun referans genomuna haritalamışlardır. Song ve ark (2021) Turpan kara koyunlarında foliküler-luteal faz geçişinin düzenleyici mekanizmasını araştırmak için, östrus siklusunun foliküler ve luteal fazları sırasında altı koyunun ovaryumlarında miRNA'ların ekspresyon profillerini araştırmışlardır. Adaptör-adaptör ligasyonu ile oluşan kontaminasyonlar giderildikten ve düşük kaliteli okuma verileri kaldırıldıktan sonra ovaryumların foliküler ve luteal fazlarından sırasıyla 11 133 001 ve 10 793 522 temiz okuma verisi elde edilmiştir. Araştırmacılar her kütüphane için temiz okuma verilerinin %86,80'ini ve %62,90'ını koyun genomu (Oar_v3.1) kullanılarak haritalamışlardır. Bu çalışmada ise Kangal Akkaraman kuzularına ait DAA ve YAA gruplarında sırasıyla 20 958 420 ve 25 466 385 ham okuma verisi elde edilmiştir. Filtreleme işleminden sonra DAA ve YAA gruplarında sırasıyla 20 788 852 ve 25 337 648 temiz okuma elde edilmiştir. Filtreleme işlemi sonrası okuma verilerinden DAA ve YAA gruplarında sırasıyla 18 003 036 ve 21 245

522 okuma verisi Oar_v3.1 genomuna haritalanmıştır. Elde edilen veriler daha önceki çalışmalarla benzer veri büyüklüğüne sahiptir. Ham ve temiz okuma verilerinin kullanılan materyale, analizin gerçekleştirildiği platforma ve örnek sayısına bağlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen ham verilerin analiz için yeterli olduğu düşünülmektedir.

Sun ve ark (2019), okuma verileri ile 153 tane bilinen miRNA tespit etmişler ve Oar 3.1 genomunda haritalanamayan 8076 yeni miRNA'nın olduğunu tahmin etmişlerdir. Gu ve ark (2019), 149 bilinen koyun miRNA'sını haritaladıklarını ve 20 yeni miRNA tahmini yaptıklarını bildirmişlerdir. Pokharel ve ark (2018) Tüm örneklerde ekpresyonu gözlenen 342 miRNA'nın 238'inin tahmin edilen yeni miRNA'lar olduğunu bildirmişlerdir. Song ve ark (2021), Turpan kara koyunlarında 139 bilinen ve 71 yeni miRNA'nın ekspresyonunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada Kangal Akkaraman kuzularına ait 129 bilinen miRNA tespit edilmiş ve 134 yeni miRNA tahmin edilmiştir.

Çalışmada RNA-seq verilerine göre differansiyel kat artışı en fazla olan iki miRNA'nın (oar-miR-21 ve oar-miR-150) ekspresyon profilleri RT-qPZR ile araştırılmıştır. miRNA'ların RT-qPZR ile tespitinde ilk adım, RNA'nın revers transkripsiyon ile cDNA'ya doğru ve tam dönüştürülmesidir. Ancak bu adım miRNA'nın sınırlı bir uzunluğa sahip olması, miRNA'ların zenginleştirilmesi ve amplifikasyonu için kullanılacak ortak bir dizinin olmaması ve olgun miRNA dizisinin pre- ve pri- miRNA'larda mevcut olması nedenleriyle zordur. Günümüzde miRNA'ların revers transkripsiyonu için iki farklı yaklaşım mevcuttur. İlk yaklaşımda miRNA'lar, miRNA'lara özgü revers transkripsiyon primerleri kullanılarak ayrı ayrı cDNA'ya çevrilirler. İkinci yaklaşımda, miRNA'lar önce ortak bir dizi ile kuyruklanır ve daha sonra evrensel bir primer kullanılarak cDNA'ya çevrilirler. miRNA'lara özgü revers transkripsiyon primerleri 3' ucunun miRNA'ya tamamlayıcı olması gerekirken, 5' ucu ya bir stem-loop (Chen ve ark 2005) ya da bir doğrusal yapı (Raymond ve ark 2005, Shi ve Chiang 2005) ile tasarlanmaktadır. Stem-loop primerlerinin dezavantajı isomiR dizilerinin revers transkripsiyonunu sağlama yeteneğinin azalmasıdır (Wu ve ark 2009). Çalışmada miRNA'ların cDNA'ya çevrilmesinde kullanılan yöntem, miRNA'ların 3' ucunun ortak bir kuyruk dizisi sağlamak için uzatılmasına dayanmaktadır. *E. coli* Poli (A) Polimeraz, şablondan bağımsız bir şekilde, RNA'nın

3’ ucuna adenozin nükleotidleri eklemek için kullanılmaktadır (Shi ve Chiang 2005). 5’ ucunda evrensel bir primer bağlama sekansı olan oligo (dT) sekansından oluşan bir primer, daha sonra revers transkripsiyon reaksiyonu için kullanılmaktadır.

RT-qPZR prensibi, sinyal yoğunluğu her amplifikasyon döngüsünde bulunan DNA miktarı ile ilişkili olan bir floresan molekülün gerçek zamanlı olarak saptanmasına dayanmaktadır (Nolan ve ark 2006). RT-qPZR için birçok floresan boya bulunmaktadır, SYBR Green (Shi ve Chiang 2005, Varkonyi-Gasic ve ark 2007) ve TaqMan probları (Kutyavin ve ark 2000) miRNA’ların tespitinde kullanılan boyalardır. Çalışmada miRNA’ların tespiti için kullanılan SYBR Green, dsDNA ile birleştiğinde yaklaşık 100 kat artan bir interkalasyon boyasıdır ve bu özellik, PZR döngüleri sırasında biriken amplifikasyon ürünlerini saptamak için kullanılmaktadır. SYBR Green farklı PZR ürünleri arasında ayrım yapamaz ve primer-dimer gibi özgün olmayan ürünler dahil olmak üzere tüm dsDNA'ya bağlanmaktadır (Zipper ve ark 2004). Hedef dizinin doğru tespitini sınırlandıran bir yöntem olduğundan amplifikasyon ürünlerinin özgüllüğünü değerlendiren farklı analizler gerektirmektedir. Bu amaçla SYBR Green kullanımı, erime noktası analizi yapılmasını gerektirmekte ve sıklıkla qPZR ürünlerinin homojenliğini izlemek için kullanılmaktadır. Bu prosedür sırasında, PZR ürünlerine eklenen SYBR Green tarafından yayılan floresans yoğunluğu, 65°C'den 95°C'ye küçük artışlarla yükselen sıcaklıklarda kaydedilir. Artan sıcaklığa bağlı olarak dsDNA’nın iki zincirinin tamamen ayrılması ile sinyal yoğunluğunda keskin bir düşüş oluşmaktadır. Bir DNA’nın Tm'si uzunluk ve baz bileşimine bağlı olduğundan, erime eğrisindeki bükülme noktalarının sayısı, üretilen PZR ürünlerinin (primer-dimerleri dahil) sayısını göstermektedir. Kabul edilebilir bir erime eğrisi, tek bir zirveye (yani bir PZR ürününe) sahipken, birden çok tepe noktasının meydana gelmesi, özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin varlığını göstermektedir. Bu çalışmada miRNA’ların RT-qPZR ile tespitinde SYBR Green kullanılmış ve elde edilen PZR ürünlerinin tek bir tepe noktasına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 3.19. Şekil 3.20. ve Şekil 3.21.).

Çalışmamızda RNA-seq verilerine göre gruplar arası kat artışı 0,66 olarak tespit edilen oar-mir-21’in RT-qPZR ile ekspresyon seviyeleri birey bazlı olarak araştırılmıştır. Yapılan literatür taramasında koyun modeli kullanılarak oar-miR-21’i araştıran çalışmalar tespit edilmiştir. McBride ve ark (2012), koyunlarda östrus

döngüsünün aşamalarında foliküler farklılaşma ile ilişkili genom düzeyindeki değişiklikleri belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmalarında miRNA kütüphaneleri oluşturmuşlardır. miR-21, miR-125b, let-7a ve let-7b en sık rastlanan miRNA'lar olmakla birlikte, sekanslanan tüm miRNA'ların % 40'ını oluşturduğu gözlenmiştir. Foliküler gelişim boyunca klonlama frekanslarındaki değişim incelendiğinde foliküler-luteal geçiş ile ilişkili dokuz farklı miRNA ekspresyonunun azaldığı, sekizinin ekspresyonunun ise arttığı tespit edilmiştir. Çalışmada ekspresyon profilleri northern blot ile doğrulanmış, deneysel olarak valide edilen hedefler miRTarBase ile belirlenmiştir. Tanımlanan 29 hedefin foliküler aşamalardaki ilişkileri ile bilinen genler olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak foliküler hücrelerin, invitro luteinizasyonunda miRNA düzeylerinde değişiklik olduğu, bu değişikliklerin granuloz hücrelerdeki hedef mRNA ekspresyonları ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Chang ve ark (2021), pulmoner arter daralmasına bağlı sağ ventrikül disfonksiyonunda miR-21'in rolünü araştırdıkları çalışmada koyun modelini kullanmışlardır. Sağ ventriküldeki yapısal ve fonksiyonel modellemesinde ultrasound görüntülemenin kullanıldığı araştırmada, oluşturulan disfonksiyonun miR-21 seviyelerinde artışla sonuçlandığı ifade edilmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak hem invivo hem de invitro verilerinin miR-21'in sağ ventrikül disfonksiyonu ile kritik bir ilişkisi olduğunu ve sağ ventrikül disfonksiyon tedavisinde yeni bir terapötik indeks olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuşlardır. Ni ve ark (2016), transgenik ve geleneksel koyunların plasentalarındaki miRNA ekspresyonunu belirlemeye yönelik çalışmalarında canlı transgenik (n=5), ölü transgenik (n=7) ve kontrol grubu olarak canlı geleneksel (n=10) koyunların plasentalarında büyüme ile ilişkili miR-127, miR-16, miR-21, miR-93 ve miR-182 olmak üzere beş miRNA'nın ekspresyonunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar ölü grubun plasentalarında miR-127, miR-21 ve miR-16 ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar sonuç olarak, ölü koyunların plasentalarında anormal miR-127, miR-21 ve miR-16 ekspresyonunun hedef genlerin disregulasyonu yoluyla, transgenik klonlanmış koyunlarda gelişimsel eksikliklere neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. He ve ark (2019), koyun çiçeği virüsü ile enfekte koyun testis hücreleri tarafından salınan eksozomlardaki miRNA'ların araştırıldığı çalışmalarında toplam 106 adet bilinen ve 279 yeni miRNA tanımlamışlardır. Enfekte olmayan eksozomların oluşturduğu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında enfekte hücrelerde bilinen toplam 34 miRNA'nın anormal derecede eksprese edildiği ortaya konulmuştur.

Sekanslama verileriyle uyumlu olarak virus ile enfekte olduktan 24 saat sonra oar-miR 21 ve oar-miR-10b ekspresyonunun, 72 saat sonra ise oar-let-7f ekspresyonunun ekzozomlarda en yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Bunun yanısıra, oar-let-7b ve oar-mir-221 ekspresyonunun 0. saate kıyasla 24 ve 72. saatlerden sonra önemli ölçüde azaldığını ifade etmişlerdir. Araştırmacılar bu sonuçlardan yola çıkarak, farklı şekilde ifade edilen miRNA'ların çoğunlukla bir bağışıklık sistemi sürecine ve uyarıcı tepkisine dahil olduğu sonucuna varmışlardır. Yapılan çalışmada Kangal Akkaraman kuzularında GCAA'ya bağlı beyaz kan hücrelerinde oar-miR-21'in ekspresyon seviyesi RT-qPZR ile araştırılmış ve iki grup arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (Şekil 3.23.). GCAA yüksek olan grupta oar-miR-21'in ekspresyon seviyesinin GCAA düşük olan gruba göre daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Kangal Akkaraman kuzularında GCAA ile ilişkili yapılacak çalışmalarla oar-mir-21'in hedef genlerinin ekspresyon seviyelerinin araştırılması, bu ırkın verim özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

oar-miR-150, koyun PBMC'lerinde eksprese olduğu bilinen bir miRNA'dır (Yang ve ark 2019). Çalışmamızda RNA-seq verilerine göre gruplar arası kat artışı 0,61 olarak tespit edilen oar-mir-150'nin RT-qPZR ile ekspresyon seviyeleri birey bazlı olarak araştırılmıştır. Yang ve ark (2019) in vivo küçük ruminant veba aşısı olan koyunların periferal kan lenfositlerinde ve in vitro aşılanan birincil koyun testis hücrelerinde miRNA ekspresyon profilinin değişimini incelemişlerdir. Bunun yanı sıra oar-miR-150'nin PBMC ve testis hücrelerinde farklı eksprese edildiğini RT-qPZR ile doğrulamışlardır. Zhou ve ark (2019) tarafından koyunlarda yürütülen başka bir çalışmada steroidojenik akut düzenleyici protein genini hedefleyen oar-miR-150'nin granüloza hücresinde apoptoza etkisi araştırılmıştır. oar-miR-150 ekspresyonunun foliküler fazda arttığı tespit edilmiştir. oar-miR-150'nin, steroidojenik akut düzenleyici proteinin 3'UTR'si içindeki bağlama bölgesi aracılığıyla transkripsiyon sonrası düzenleme yoluyla steroidojenik akut düzenleyici protein ekspresyonunu azaltarak granüloza hücrelerinin apoptozunu desteklediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda araştırılan oar-mir-150 ekspresonunda GCAA'ya bağlı olarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 3.24.).

Genetik düzenlemeler, sadece çiftlik hayvanlarının evcilleştirilmesine değil, aynı zamanda üstün ırkların (et kalitesi, verim, hastalık direnci vb.) seçilimine de

yardımcı olmaktadır. Verim özelliklerinden GCAA'nın kas dokusu gelişimi ile paralel seyrettiği bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, miRNA'ların kas gelişimi ile yüksek oranda ilişkili oldukları ortaya konulmuştur (Ge ve ark 2011, Miao ve ark 2015). Miao ve ark (2015) tarafından, Dorset koyunlarında miR-708-3p, miR-378, miR-125'in ekspresyonunun arttığı ve miR-1777b, miR-675-3p ve miR-103a'nın ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Gagan ve ark (2011) MyoD'nin miyojenik farklılaşma sırasında miR-378 ekspresyonunun arttığını bildirmiş ve MyoD'nin hem transaktivasyona hem de kromatin yeniden düzenlenmesine neden olan miR-378 dizisine yakın olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bazı miRNA'ların (miR-1, miR-133 ve miR-206 gibi) iskelet ve kalp kası gelişiminde doğrudan rol oynadığı tespit edilmiştir (Chen ve ark 2006, McCarthy 2008). miR-1 ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'in, kas hücresi büyümesine ve farklılaşmasına aracılık etmek için karşılıklı olarak birbirini düzenlediği bilinmektedir (Elia ve ark 2009). İskelet kası uydu hücresi farklılaşması sırasında, miR-1 ve miR-206 ekspresyonu artmaktadır, bu da transkripsiyon faktörü Pax7'nin inhibisyonuna yol açmakta, uydu hücresinin proliferatif potansiyelini sınırlamakta ve uydu hücresinin farklılaşmasına yol açmaktadır (Chen ve ark 2010). Chen ve ark (2009) tarafından MiR 125a-5p'nin lipid alımına ve enflamatuar tepkiye aracılık ettiği bulunmuştur. Ayrıca, miR-125a'nın paralogu olan miR-125b, insülin benzeri büyüme faktörü 2'yi düzenleyerek iskelet miyogenezinde ve kas rejenerasyonunda işlevsel olduğu kanıtlanmıştır (Ge ve ark 2011). Kasta ekspresyonu azaldığı tespit edilen miR-675-3p bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (Roberts ve ark 2012). Miao ve ark (2015) tarafından miR-675-3p, miR-378 ve miR-125a-5p'nin kas büyümesinde potansiyel düzenleyiciler olabilecekleri ifade edilmiştir. Yapılan literatür araştırmasında büyüme ile ilgili sıklıkla kas dokusu tercih edildiği görülse de GCAA ile ilişkili miRNA'ların tespitinde PBMC'nin de uygun bir biyolojik materyal olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada yerli bir gen kaynağı olan Kangal Akkaraman kuzularına ait miRNA'ların analizi, sRNA sekanslaması ile Illunina Novaseq platformunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) veritabanına GSE168662 erişim numarası altında yüklenmiştir. RNA-seq verilerine göre DAA ve YAA grupları arasında diferansiyel ekspresyon analizinde kat artışları 0,66 (oar-miR-21) ve 0,61 (oar-miR-150) olan iki miRNA seçilmiştir. Tüm örneklerde oar-miR-21 ve oar-miR-150 ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için RT-qPZR yapılmıştır. YAA grubundaki oar-miR-21 ekspresyonu, DAA grubundaki ekspresyon ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). YAA ve DAA gruplarındaki örneklere ait oar-miR-150 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p > 0,05$).

Elde edilen veriler literatürdeki Kangal Akaraman kuzularındaki miRNA varlığı ile ilişkili ilk NGS verilerini oluşturmaktadır. Bu çalışmanın, ileride Kangal Akkaraman koyunlarında gerçekleştirilecek kodlama yapmayan RNA araştırmaları için literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. oar-miR-21 GCAA ile ilişkili genlerin tespiti ve ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için iyi bir belirteç olarak değerlendirilebilir.

Sonraki çalışmalarda bakım ve beslemenin sabit tutulduğu gruplar oluşturularak yapılacak analizlerde sonuçların farklı olabileceği öngörülmektedir. Koyunlarda büyümenin ilk evresi olan doğum sonrası ve süt emme evrelerini içeren büyüme dönemi daha çok kemik ve kas büyümesinin gerçekleştiği bir dönemdir. Kemik ve kaslarda yapılacak miRNA çalışmalarının sonuçları merak uyandırmaktadır. Bundan sonraki çalışmalarda farklı miRNA'ların ve hedef genlerin analizlerinin ıslah çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Aktaş G, 2020. Canlı hayvan ve karkas ithalatının kırmızı et fiyatlarına etkisi: Türkiye'de ithalatın regülasyonu. Gümrük ve Ticaret Dergisi, 7(21), 12-29.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2008. Molecular Biology of the Cell, 5th ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, p. 538–539.

Anders S, Huber W, 2010. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol 11, R106.

Babapoor S, Horwich M, Wu R, Levinson S, Gandhi M, Makkar H, Kristjansson A, Chang M, Dadras SS, 2016. MicroRNA in situ hybridization for miR-211 detection as an ancillary test in melanoma diagnosis. Mod Pathol, 29(5), 461-75.

Baker M, 2010. MicroRNA profiling: separating signal from noise. Nature Methods, 7(9), 687-692.

Bartel DP, 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell, 136, 215-33.

Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW, 2010. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. Methods, 50(4), 237-243.

Benjamini Y, Hochberg Y, 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple hypothesis testing. J R Stat Soc B, 57, 289–300.

Bernardo BC, Charchar FJ, Lin RC, McMullen JR, 2012. A microRNA guide for clinicians and basic scientists: background and experimental techniques. Heart Lung Circ, 21(3), 131-42.

Bilbao-Arribas M, Abendaño N, Varela-Martínez E, Reina R, De Andrés D, Jugo BM, 2019. Expression analysis of lung miRNAs responding to ovine VM virus infection by RNA-seq. BMC Genomics.

Bushati N, Cohen SM, 2007. MicroRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol, 23, 175–205.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry, 55(4), 611-622.

Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Noerholm M, Kulozik AE, Hentze MW, Muckenthaler MU, 2006. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). RNA, 12(5), 913-920.

Castoldi M, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU, 2007. miChip: A microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes. Methods, 43, 146–152.

Cemal İ, Karaca O, Atay O, 1996. Koyunlarda döl verimine etkili major genler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 6, 31-48.

Chang W, Wang J, Tao D, Zhang Y, He J, Shi C, 2015. Identification of a novel miRNA from the ovine ovary by a combinatorial approach of bioinformatics and experiments. Journal of Veterinary Medical Science, 15-0289.

Chang WT, Fisch S, Dangwal S, Mohebali J, Fiedler AG, Chen M, Hsu CH, Yang Y, Qiu Y, Alexander KM, Chen FY, Liao R, 2021. MicroRNA-21 regulates right ventricular remodeling secondary to pulmonary arterial pressure overload. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 154, 106-114.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP, 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science, 303(5654), 83-86.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ, 2005. Real-time quantification of micro-RNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Research, 33(20), e179.

Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ, 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nature genetics, 38(2), 228-233.

Chen T, Huang Z,Wang L,Wang Y,Wu F, Meng S,Wang C, 2009. MicroRNA-125a- 5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages. Cardiovascular research, 83(1), 131-139.

Chen JF, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, Wang DZ, 2010. MicroRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. Journal of Cell Biology, 190(5), 867-879.

Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, 2016. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nat Genet, 38:813– 8.

Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG, 2006. The affymetrix Gene-Chip platform: an overview. Methods in Enzymolgy, 410, 3–28

Davison TS, Johnson CD, Andruss BF, 2006. Analyzing Micro-RNA Expression Using Microarrays. Methods in Enzymology, 411, 14-34.

Dong F, Ji Z-B, Chen C-X, Wang G-Z, Wang J-M, 2013. Target gene and function prediction of differentially expressed MicroRNAs in lactating mammary glands of dairy goats. Int J Genomics. 2013:917342.

Duncan DD, Eshoo M, Esau C, Freier SM, Lollo BA, 2006. Absolute quantitation of microRNAs with a PCR-based assay. Analytical Biochemistry, 359(2), 268-270.

Duy J, Koehler JW, Honko AN, Minogue TD, 2015. Optimized microRNA purification from TRIzol-treated plasma. BMC Genomics, 16(1), 1-9.

Elia L, Contu R, Quintavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, Cimino V, De Marinis L, Frustaci A, Catalucci D, Condorelli G, 2009. Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. Circulation, 120, 2377-85.

Ertuğrul M, Savaş T, Dellal G, Taşkın T, Koyuncu M, Cengiz F, Dağ B, Koncagül S, Pehlivan E, 2010. Türkiye küçükbaş hayvancılığının iyileştirilmesi. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler, 11-15, 667-85.

FAO, 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Felekkis K, Touvana E, Stefanou CH, Deltas C, 2010. MicroRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. Hippokratia, 14(4), 236-40.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N, 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. Nat Rev Genet, 9(2), 102–14.

Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N, 2011. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. Nucleic Acids Research, 40, 37-52.

Friedlander MR, Lizano E, Houben AJ, Bezdan D, Báñez-Coronel M, Kudla G, Mateu-Huertas E, Kagerbauer B, González J, Chen KC, LeProust EM, Marti E, Estivill X, 2014. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. Genome Biol, 15(4), R57.

Gagan J, Dey BK, Layer R, Yan Z, Dutta A, 2011. MicroRNA-378 targets the myogenic repressor MyoR during myoblast differentiation. Journal of Biological Chemistry, 286(22), 19431-19438.

Galio L, Droineau S, Yeboah P, Boudiaf H, Bouet S, Truchet S, 2013. MicroRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: spatial and temporal expression of miR-21, miR-205, and miR-200. Physiol Genomics, (2013) 45:151–61.

Garip M, Coşkun B, Polat ES, Yılmaz A, Tekin ME, Çağlayan T, Kılıç N, 2010. Kangal Akkaraman koyunlarında yapağı özellikleri. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 26(2), 93-99.

Ge Y, Sun Y, Chen J, 2011. IGF-II is regulated bymicroRNA-125b in skeletal myogenesis. Journal of Cell Biology, 192(1), 69-81.

Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, Tempio G, 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

Gershon D, 2005. More than gene expression. Nature, 437(7062), 1195-1196.

Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. Genome Biology, 11(8), 1-13.

Gu B, Liu H, Han Y, Chen Y, Jiang H, 2019. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles in 2-, 6-, and 12-month-old Small Tail Han Sheep ovaries reveals that oar-miR-432 downregulates RPS6KA1 expression. Gene, 710, 76-90.

Gürsoy O, 2005. Small ruminant breeds of Turkey. In characterization of small ruminant breeds in West Asia and North Africa. Small ruminants research, 1, 239-416.

He G, Wu J, Kong H, Zhang Y, Li Y, Cai M, Shaduhan G, Yan Y, Zheng Y, Ding J, 2019. Comparative analysis of miRNAs in exosomes released by sheeppox virus-infected ovine testicular cells. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 67, 101363.

Hou J, An X, Song Y, Cao B, Yang H, Zhang Z, 2017. Detection and comparison of microRNAs in the caprine mammary gland tissues of colostrum and common milk stages. BMC Genet, 18:38.

Hughes TR, Hiley SL, Saltzman AL, Babak T, Blencowe BJ, 2006. Microarray Analysis of RNA Processing and Modification. Methods in Enzymology, 410, 300-316.

Jiang S, Li X, Wang X, Ban Q, Hui W, Jia B, 2016. MicroRNA profiling of the intestinal tissue of Kazakh sheep after experimental Echinococcus granulosus infection, using a high-throughput approach. Parasite, 23:23.

Inui M, Martello G, Piccolo S, 2010. MicroRNA control of signal transduction. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 11(4), 252-263.

Kallio MA, Tuimala JT, Hupponen T, Klemelä P, Gentile M, Scheinin I, Koski M, Käki J, Korpelainen EI, 2011. Chipster: user-friendly analysis software for microarray and other high-throughput data. BMC Genomics, 12(1), 1-14.

Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, Katayama T, Kawashima S, Okuda S, Tokimatsu T, Yamanishi Y, 2008. KEGG for linking genomes to life and the environment. Nucleic Acids Res, 36(Database issue):D480-4.

Karaca O, Aygün T, Cemal İ, Bingöl M, 1998. Koyunlarda döl veriminin genetik ıslahında fizyolojik ölçütler. Ege Bölgesi I. Tarım Kongresi, 7-11.

Karslı T, Şahin E, Karslı BA, Eren MG, Balcıoğlu MS, 2011. An investigation of presence of FecB, FecXG, FecXH allele in Kangal and Güney Karaman sheep using PCR-RFLP method. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 51(2), 71-80.

Kauppinen S, Vester B, Wengel J, 2006. Locked nucleic acid: high-affinity targeting of complementary RNA for RNomics. RNA Towards Medicine, 405-422.

Kevil CG, Walsh L, Laroux FS, Kalogeris T, Grisham MB, Alexander JS, 1997. An Improved, Rapid Northern Protocol. Biochemical and Biophysical Research Communications, 238(2), 277-279.

Kloosterman WP, Wienholds E, de Bruijn E, Kauppinen S, Plasterk RH, 2006. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. Nature Methods, 3(1), 27-29.

Kreil DP, Russell RR, Russell S, 2006. Microarray oligonucleotide probes. Methods in Enzymology, Methods Enzymol 410, 73–98.

Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N, 2005. Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genet, May;37(5):495-500.

Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS, 2003. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. RNA, 9(10), 1274-1281.

Koçyiğit UM, Taslimi P, Gulçin İ, 2018. Characterization and inhibition effects of some metal ions on carbonic anhydrase enzyme from Kangal Akkaraman sheep. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 32(8), e22172.

Korpelainen E, Tuimala J, Somervuo P, Huss M, Wong G, 2014. Introduction to RNA-seq. In: RNA-seq data analysis: a practical approach. First ed. Boca Raton: CRC Press, p. 1-25.

Kurar E, Bulut Z, Çağlayan T, Garip M, Yılmaz A, Nizamlıoğlu M, 2012. Investigation of genetic diversity and paternity in Kangal White Karaman rams using microsatellite markers. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 18(6), 973-7.

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J, 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Research, 28(2), 655-661.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T, 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science, 294(5543), 853-58.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL, 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome biology, 10(3), 1-10.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP, 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science, 294(5543), 858-862.

Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ, 2012. The molecular architecture of human dicer. Nature Struct Mol Biol, 19(4), 436.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The c. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 75(5), 843-54.

Lee RC, Ambros V, 2001. An extensive class of small RNAs in caenorhabditis elegans. Science, 294(5543), 862-64.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN, 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. The EMBO Journal, 21(17), 4663-4670.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP, 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell, 120(1), 15-20.

Li J, Qu H, Jiang H, Zhao Z, Zhang Q, 2016. Transcriptome-wide comparative analysis of microRNA profiles in the telogen skins of liaoning cashmere goats (capra hircus) and fine-wool sheep (ovis aries) by solexa deep sequencing. DNA and Cell Biology, 35(11), 696-705.

Liao R, Lv Y, Zhu L, Lin Y, 2019. Altered expression of miRNAs and mRNAs reveals the potential regulatory role of miRNAs in the developmental process of early weaned goats. PLoS ONE, 14:e0220907.

Liu CG, Spizzo R, Calin GA, Croce CM, 2008. Expression profiling ofmicroRNA using oligo DNA arrays. Methods, 44, 22–30.

Liu GF, Cheng HJ, You W, Song EL, Liu XM, Wan FC, (2015). Transcriptome profiling of muscle by RNA-Seq reveals significant differences in digital gene expression profiling between Angus and Luxi cattle. Animal Production Science, 55(9):1172-1178.

Liu HC, Hicks JA, Trakooljul N, Zhao SH, 2010. Current knowledge of microRNA characterization in agricultural animals. Anim Genet, Jun;41(3):225-31.

Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ, 2008. Micromanagement of the immune system by microRNAs. Nature Reviews Immunology, 8, 120-30.

MacRae IJ, Doudna JA, 2007. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. Curr Opin Struct Biol, 17(1), 138-45.

Magistrelli D, Aufy AA, Pinotti L, Rosi F, 2013. Analysis of weaning-induced stress in Saanen goat kids. J Anim Physiol Anim Nutr, 97:732– 9.

Mao X, Cai T, Olyarchuk JG, Wei L, 2005. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. Bioinformatics, 1;21(19):3787-93.

Martin GB, Rodger J, Blache D, 2004. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. Reprod Fertil Dev, 16:491– 501.

McBride D, Carré W, Sontakke SD, Hogg CO, Law A, Donadeu FX, Clinton M, 2012. Identification of miRNAs associated with the follicular-luteal transition in the ruminant ovary. Reproduction, 144(2), 221.

McCarthy JJ, 2008. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1779(11), 682-691.

McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimnich A, 2011. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. Clinical chemistry, 57(6), 833-840.

Miao XY, Luo QM, 2013. Genome-wide transcriptome analysis between small-tail han sheep and poll dorset sheep using high-throughput RNA sequencing. Reproduction, 145(6), 587-596.

Miao X, Luo Q, Qin X, 2015. Genome-wide analysis reveals the differential regulations of mRNAs and miRNAs in dorset and small tail han sheep muscles. Gene, 562(2), 188-96.

Miao X, Luo Q, Zhao H, Qin X, 2016. Genome-wide analysis of miRNAs in the ovaries of Jining Grey and Laiwu Black goats to explore the regulation of fecundity. Sci Rep, 6:37983.

Mobuchon L, Marthey S, Le Guillou S, Laloë D, Le Provost F, Leroux C, 2015. Food deprivation affects the miRNome in the lactating goat mammary gland. PLoS ONE, 10:140111.

Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Eaves CJ, Marra MA, 2008. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. Genome Research, 18(4), 610-621.

Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M, 2008. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. Science, 320(5881), 1344–1349.

Neely LA, Patel S, Garver J, Gallo M, Hackett M, McLaughlin S, Nadel M, Harris J, Gullans S, Rooke J, 2006. A single-molecule method for the quantitation of microRNA gene expression. Nature Methods, 3(1), 41-46.

Ni W, You S, Cao Y, Li C, Wei J, Wang D, Qiao J, Zhao X, Hu S, Quan R. Aberrant expression of miR-127, miR-21 and miR-16 in placentas of deceased cloned sheep. Research in Veterinary Science, 105, 200-204.

Nolan T, Hands RE, Bustin SA, 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature Protocols, 1(3), 1559-1582.

Örkiz M, Fehmi K, Çalta H, 1984. Kangal tipi Akkaraman koyunlarının bazı önemli verim özellikleri. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 24(1-4), 15-33.

Pan Y, Jing J, Qiao L, Liu J, An L, Li B, Ren D, Liu W, 2018. MiRNA-seq reveals that miR-124-3p inhibits adipogenic differentiation of the stromal vascular fraction in sheep via targeting C/EBPα. Domestic Animal Endocrinology, 65, 17-23.

Planell-Saguer M, Rodicio MC, 2013. Detection methods for microRNAs in clinic practice. Clinical Biochemistry, 46(10-11), 869-878.

Pokharel K, Peippo J, Honkatukia M, Seppälä A, Rautiainen J, Ghanem N, Hamama TM, Crowe MA, Andersson M, Li MH, Kantanen J, 2018. Integrated ovarian mRNA and miRNA transcriptome profiling characterizes the genetic basis of prolificacy traits in sheep (Ovis aries). BMC Genomics, 19(1), 1-17.

Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, Lim LP, Johnson JM, 2005. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. RNA, 11(11), 1737-44.

Rebrikov DV, Trofimov DY, 2006. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. Applied Biochemistry and Microbiology, 42(5), 455-463.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G, 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in caenorhabditis elegans. Nature, 403(6772), 901-6.

Resmi Gazete, 12.12.2004. 25668 sayılı “Yerli Hayvan Irk ve Hatlarının Tescili Hakkında Tebliğ”. p. 125-127.

Roberts TC, Blomberg KEM, McClorey G, EL Andaloussi S, Godfrey C, Betts C, Coursindel T, Gait MJ, Smith CE, Wood MJ, 2012. Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 1, e39.

Saetrom P, Heale BS, Snove O Jr, Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ, 2007. Distance constraints between microRNA target sites dictate effi cacy and cooperativity. Nucleic Acids Res, 35(7), 2333–42.

Sanghvi VR, Steel LF, 2011. The cellular TAR RNA binding protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of double-stranded RNA-dependent kinase PKR. J Virol, 85(23), 12614-21.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO, 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 270(5235), 467-470.

Schlamp K, Weinmann A, Krupp M, Maass T, Galle PR, Teufel A, 2008. BlotBase: A northern blot database. Gene, 427, 47–50.

Shi R, Chiang VL, 2005. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. Biotechniques, 39(4), 519-525.

Shirshova AN, Shamovskaya DA, Boyarskikh UA, Kushlinskii NE, Filipenko ML, 2018. One-phase phenol-free method for microRNA isolation from blood plasma. MethodsX, 5, 737-743.

Song P, Yue Q, Fu Q, Li X, Li X, Zhou R, Chen X, Tao C, 2021. Integrated analysis of miRNA-mRNA interaction in ovaries of Turpan Black Sheep during follicular and luteal phases. Reproduction in Domestic Animals, 56(1), 46-57.

Sönmez R, Kaymakçı M, 1979. Koyun Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. p. 361.

Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, Seifert M, Borodina T, Soldatov A, Parkhomchuk D, Schmidt D, O'Keeffe S, Haas S, Vingron M, Lehrach H, Yaspo ML, 2008. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. Science, 321(5891), 956–960.

Sun L, Lu S, Bai M, Xiang L, Li J, Jia C, Jiang H, 2019. Integrative microRNA-mRNA Analysis of Muscle Tissues in Qianhua Mutton Merino and Small Tail Han Sheep Reveals Key Roles for oar-miR-655-3p and oar-miR-381-5p. DNA and Cell Biology, 38(5), 423-435.

Şahin EH, Akmaz A, 2004. Koyunlarda süt verim özellikleri ve kontrolü. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 20(1), 5-11.

Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM, 2004. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. Nat Methods, 1(1), 47-53.

Trayhurn P, 1996. Northern Blotting. Pro Nutrition Soc, 55, 583–589.

Tufan M, Akmaz A, 2001. Slaughter and carcass traits of Güney Karaman, Kangal-Akkaraman and Akkaraman lambs at different slaughter weights. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 25, 4, 495-504.

TÜİK, 2017. Tarım İstatistikleri. TC Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara.

TÜİK, 2020. Hayvansal Üretim İstatistikleri. TC Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara.

Urbanek MO, Nawrocka AU, Krzyzosiak WJ, 2015. Small RNA detection by in situ hybridization methods. International Journal of Molecular Sciences, 16(6), 13259-13286.

Válóczi A, Hornyik C, Varga N, Burgyán J, Kauppinen S, Havelda Z, 2004. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. Nucleic Acids Research, 32(22), e175-e175.

Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP, 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant Methods, 3, 12.

Wang H, Li X, Zhou R, Xi J, Wei Y, Li L, 2018. Genome -wide transcriptome profiling in ovaries of small-tail Han sheep during the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. Anim Reprod Sci, 197:212– 21.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M, 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics, 10(1), 57-63.

Wen M, Shen Y, Shi S, Tang T, 2012. MiREvo: an integrative microRNA evolutionary analysis platform for next-generation sequencing experiments. BMC Bioinformatics, 13(1), 1-10.

Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, Schubert F, Wood V, Goodhead I, Penkett CJ, Rogers J, Bähler J, 2008. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. Nature, 453(7199), 1239-1243.

Wolber PK, Collins PJ, Lucas AB, De Witte A, Shannon KW, 2006. The agilent in situ-synthesized microarray platform. Methods in Enzymology, 410, 28-57.

Wu L, Fan J, Belasco JG, 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(11), 4034-4039.

Wu H, Ye C, Ramirez D, Manjunath N, 2009. Alternative processing of primary microRNA transcripts by Drosha generates 5' end variation of mature microRNA. PLoS One, 4(10), e7566.

Yang H, Liu X, Hu G, Xie Y, Lin S, Zhao Z, 2018. Identification and analysis of microRNAs-mRNAs pairs associated with nutritional status in seasonal sheep. Biochem Biophys Res Commun, 499:321–7.

Yang Y, Qin X, Meng X, Zhu X, Zhang X, Li Y, Zhang Z, 2019. MicroRNA Expression Profile in Peripheral Blood Lymphocytes of Sheep Vaccinated with Nigeria 75/1 Peste Des Petits Ruminants Virus. Viruses, 11(11), 1025.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR, 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes & Development, 17(24), 3011-3016.

Yilmaz A, Tepeli C, Tekin ME, Akmaz A, Garip M, Polat ES, Coşkun B, Çağlayan T, 2011. Determination of live weights and body measurements of Kangal Type Akkaraman sheep in producers conditions. Journal of Food, Agriculture & Environment, 9(2), 366-70.

Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. Genome Biol, 11, R14.

Zhai B, Zhang L, Wang C, Zhao Z, Zhang M, Li X, 2019. Identification of microRNA-21 target genes associated with hair follicle development in sheep. PeerJ, 2019:e7167.

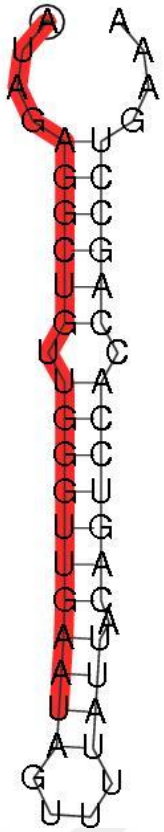
Zhang S, Zhao F, Wei C, Sheng X, Ren H, Xu L, Lu J, Liu J, Zhang L, Du L, 2013. Identification and characterization of the miRNA transcriptome of Ovis aries. PLoS One, 8(3), e58905.

Zhou L, Chen J, Li Z, Li X, Hu X, Huang Y, Zhao X, Liang C, Wang Y, Sun L, Shi M, Xu X, Shen F, Chen M, Han Z, Peng Z, Zhai Q, Chen J, Zhang Z, Yang R, Ye J, Guan H, Gui Y, Wang J, Cai Z, Zhang X, 2010. Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: microRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma. PloS One, 5(12), e15224.

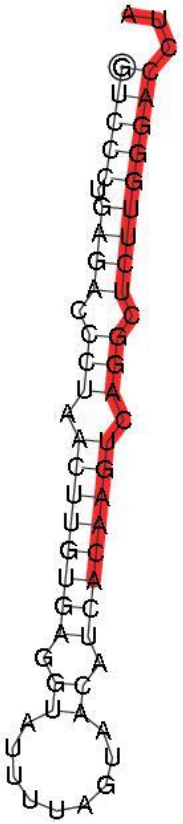
Zhou R, Miao Y, Li Y, Li X, Xi J, Zhang Z, 2019. MicroRNA-150 promote apoptosis of ovine ovarian granulosa cells by targeting STAR gene. Theriogenology, 127, 66-71.

Zipper B, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F, 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Res, 32(12), e103.

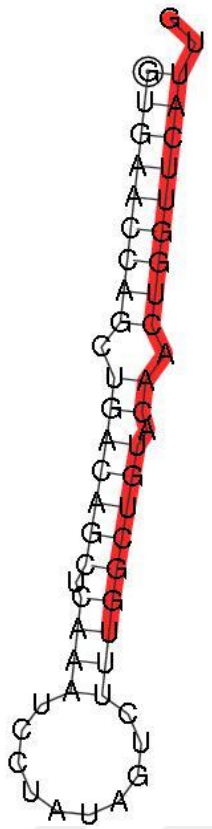
7.3. EK-D. miRNA'ların İkincil Yapıları



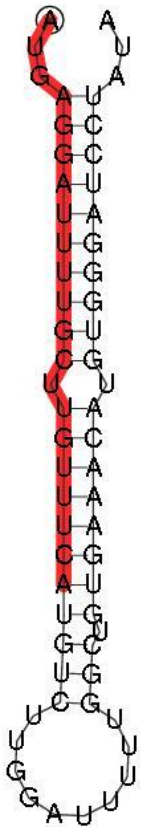
Şekil 7.1. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_100).



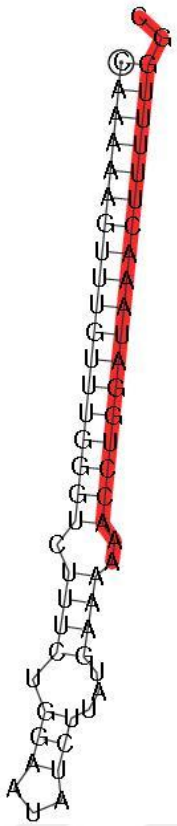
Şekil 7.2. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_101).



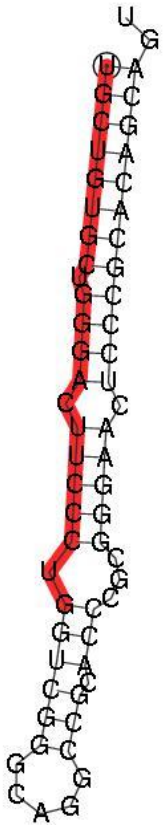
Şekil 7.3. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_102).



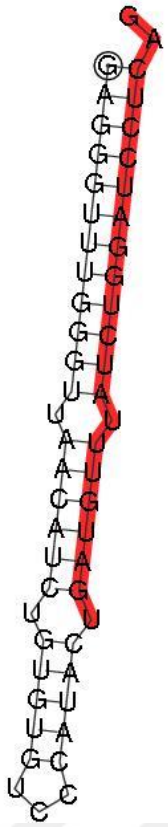
Şekil 7.4. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_103).



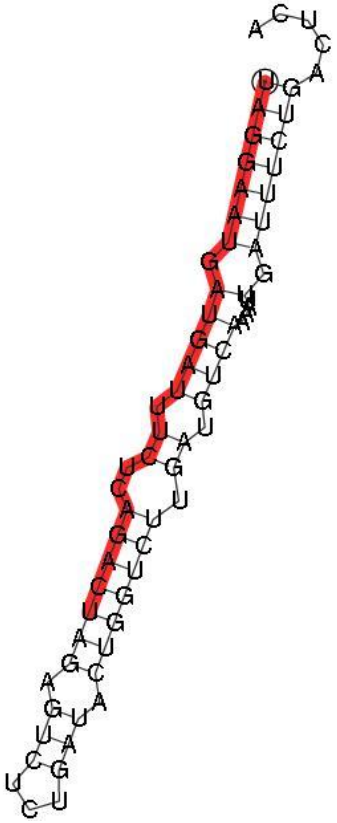
Şekil 7.5. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_104).



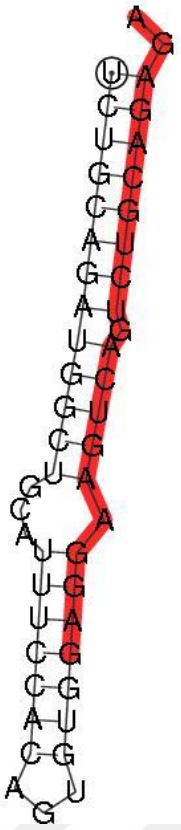
Şekil 7.6. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_105).



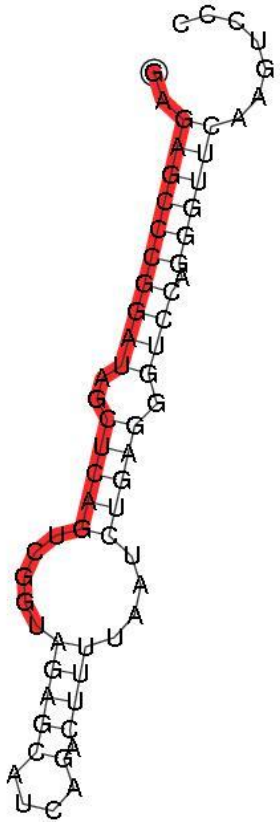
Şekil 7.7. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_106).



Şekil 7.8. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_107).



Şekil 7.9. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_108).



Şekil 7.10. Hairpinin ikincil yapısı (Novel_109).

8. TURNİTİN RAPORU

KANGAL AKKARAMAN KUZULARINDA BÜYÜMEYE BAĞLI mikro RNA'LARIN TANIMLANMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%6	%4	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	Ankita Sharma, Umesh K. Shandilya, Tianna Sullivan, Danielle Naylor, Angela Canovas, Bonnie A. Mallard, Niel A. Karrow. "Identification of Ovine Serum miRNAs Following Bacterial Lipopolysaccharide Challenge", International Journal of Molecular Sciences, 2020 Yayın	<%1
3	avropa.nu İnternet Kaynağı	<%1
4	Martin Bilbao-Arribas, Naiara Abendaño, Endika Varela-Martínez, Ramsés Reina, Damián de Andrés, Begoña M. Jugo. "Expression analysis of lung miRNAs responding to ovine VM virus infection by RNA-seq", BMC Genomics, 2019 Yayın	<%1
	Submitted to Selçuk Üniversitesi	