

**Genomik Profilleme Yöntemiyle T Lenfositlerinde Apoptozu
Düzenleyen mikroRNA'ların Tanımlanması**

Proje No: 107T475

**Yrd. Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL
Yrd. Doç. Dr. Ayten NALBANT
Ar. Gör. Hatice YİĞİT**

KASIM 2010 İZMİR

ÖNSÖZ

Evrimsel olarak oldukça muhafaza edilmiş olan hücre ölümü, ihtiyaç fazlası hücreler ile sağlığı tehdit eden antijenlerin vücuttan uzaklaştırılması için oldukça gerekli bir hücrel işlemdir (DANIAL ve KORSMEYER, 2004). Fizyolojik bir süreçte oluşması gereken hücre ölümünün yavaşlaması sonucu kanser ve otoimmün hastalıklar, hızlanması durumunda ise nörodejenaratif ve AIDS gibi hastalıklar şekillenebilmektedir (FEARNHEAD, 2004; MATTSON, 2000; VAUX ve FLAVELL, 2000). Bu sebeplerden dolayı hücre ölüm mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması, insan sağlığının korunması için çok önemlidir.

Apoptozun sinyal iletim yolağında rol oynayan bir dizi protein tanımlanmış ve çeşitli hastalıklarla olan bağlantıları ortaya çıkarılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, apoptozun sadece proteinler tarafından değil, mikroRNA (miRNA) adı verilen ve boyutları 17-25 nükleotit arasında değişen çok küçük kodlamayan RNA'lar tarafından düzenlenebileceğini göstermiştir. Özellikle kanser gelişimi ve metastaz üzerinde çalışmalar hız kazanırken, immün sistemin en önemli bileşenlerinden birisi olan T lenfositlerinin apoptozunu düzenleyen miRNA'lar sistematik bir şekilde incelenmemiştir.

TÜBİTAK tarafından desteklenen 107T475 No.lu ve "Genomik Profilleme Yöntemiyle T Lenfositlerinde Apoptozu Düzenleyen MikroRNA'ların Tanımlanması" isimli bu projede Jurkat T hücreleri model olarak kullanılarak T lenfositlerinin apoptozunda rol oynayan miRNA'ların tanımlanması hedeflenmiştir. Mikroarray analizi kullanılarak yapılan genomik taramayla apoptozda daha önce hiç tanımlanmamış yeni miRNA'lar belirlemiştir. Ayrıca, proje kabul edildikten sonra geliştirilen derin sekanslama yöntemi kullanılarak daha kapsamlı kodlamayan küçük RNA taraması yapılmıştır. Derin sekanslama sonuçlarımız, ilave miRNA adayları belirlemekle kalmayıp, miRNA nükleotit değişikliklerinin de apoptozu düzenleyebileceğine işaret etmiştir. Derin sekanslama analizinin belkide en ilginç sonucu, daha önce yapısal olarak kabul edilen tRNA'lardan üretilen küçük fragmanlarında apoptozu düzenleyebileceğidir.

İmmün sistemin önemli oyuncularından birisi olan T hücrelerinde apoptozu düzenleyen miRNA ve diğer küçük kodlamayan RNA'ların tanımlanması apoptoz çalışma alanına yeni bir boyut kazandıracaktır. Zira bu mekanizmaların ortaya çıkarılması, kanser, otoimmün ve nörodejenaratif hastalıklar gibi bir dizi kompleks hastalıkların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| i. Özet (Türkçe)..... | 5 |
| ii.Özet (İngilizce)..... | 6 |
| 1. Giriş | 7 |
| 2. Genel Bilgiler | 7 |
| 2.1 Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü) | 7 |
| 2.2. Çok Küçük RNA'lar..... | 9 |
| 2.3. mikroRNA'lar..... | 9 |
| 2.3.1. mikroRNA Tanımı ve Fonksiyonları..... | 9 |
| 2.3.2. MikroRNA Biyogenezi ve Gen Regülasyonu | 10 |
| 2.3.3 Apoptozda Rol Oynayan MikroRNA'lar | 12 |
| 3. Gereç ve Yöntem | 14 |
| 3.1. Memeli Hücrelerin Apoptoza Uğratılması ve Tranfeksiyonu | 14 |
| 3.2. Toplam RNA İzolasyonu..... | 14 |
| 3.3. Mikrodizi Analiziyle Apoptotik miRNA İfade Profillerinin İncelenmesi..... | 15 |
| 3.4. Derin Sekanslama İle miRNA Profilinin Çıkartılması | 15 |
| 3.5. Kantitatif PCR İle miRNA İfadelerinin Kontrol Edilmesi | 16 |
| 3.6. Küçük RNA'ların Klonlanması | 17 |
| 3.7. Biyoinformatik Analizlerle miRNA Hedeflerinin Belirlenmesi | 17 |
| 4. Bulgular | 17 |
| 4.1. Kamptotesin Doz ve Zaman Optimizasyonu..... | 17 |
| 4.2. Apoptotik Hücrelerin Ayırımı ve Toplam RNA İzolasyonu | 21 |
| 4.3. Mikroarray İle miRNA Profilinin Çıkartılması..... | 23 |
| 4.4. Mikroarray Sonuçlarının qPCR İle Doğrulanması | 30 |
| 4.5. Derin Sekans Analiziyle miRNA Profilinin Çıkartılması | 30 |
| 4.6. miRNA Nükleotit Değişimlerinin Belirlenmesi | 35 |
| 4.7. Mikroarray ve Derin Sekanslama Sonuçlarını qPCR İle Doğrulanması | 47 |
| 4.8. miRNA Aşırı İfadesinin Kamptotesin İle İndüklenen Apoptoza Etkisi..... | 47 |
| 4.9. Biyoinformatik Analizlerle Aday miRNA Hedeflerinin Belirlenmesi..... | 48 |
| 4.10. Diğer Küçük RNA Profillerinin Belirlenmesi | 48 |
| Tartışma/Sonuç | 58 |

ŞEKİLLER

| Şekil | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 1. Apoptotik Mekanizmada Rol Oynayan İç (İntrinsic) Faktörler | 8 |
| Şekil 2. MikroRNA Biyogenez ve Fonksiyonu İçin Modeller | 11 |
| Şekil 3. Apoptotik Yolda Rol Oynayan Proteinler ve MiRNA'lar | 12 |
| Şekil 4. Jurkat T Lenfosit Hücre Hattında 16 Saat Kamptotesin Doz Optimizasyonu | 18 |
| Şekil 5. Jurkat T Lenfosit Hücre Hattında 4 Saat Kamptotesin Doz Optimizasyonu | 18 |
| Şekil 6. Jurkat T Hücrelerinde Kamptotesin İlacına Direnç Analizi | 19 |
| Şekil 7. Kamptotesin İle Muamele Edilen Jurkat T Hücrelerin Apoptoz Oranları. | 20 |
| Şekil 8. Kamptotesin İle Muamele Edilmiş ve Ayırıştırılmış Jurkat Hücrelerinden Toplam RNA İzolasyonu | 21 |
| Şekil 9. Jurkat Hücrelerinden İzole Edilen Toplam RNA'ların Bioanalyzer İle Kalite Kontrol Analizi | 22 |
| Şekil 10. Kamptotesin Dozuna Bağlı MiRNA İfadesi | 31 |
| Şekil 11. Kamptotesin İle Muamele Edilen Jurkat Hücrelerinde MikroRNA Sekanslarında Görülen Nükleotit Değişiklikleri | 37 |
| Şekil 12. Kamptotesin İle Muamele Edilen Jurkat Hücrelerinde mikroRNA Sekanslarında Görülen Nükleotit Değişikliklerinin Pozisyonları | 37 |
| Şekil 13. Apoptotik Jurkat Fraksiyonunda (JAP) Edit Edilmiş hsa-miR-142-p miRNA'sının Analizi | 43 |
| Şekil 14. miR-17*, 18a ve 128 İle Transfekte Edilen Jurkat Hücrelerinde Kamptotesine Cevaben Oluşan Apoptoz Oranları | 46 |
| Şekil 15. miR-17*, 18a ve 128 İle Transfekte Edilen Jurkat Hücrelerinde GroEL Proteinine Cevaben Oluşan Apoptoz Oranları | 46 |
| Şekil 16. miR-17*, 18a ve 128 İle Transfekte Edilen HeLa Hücrelerinde Apoptoz Oranları.. | 47 |
| Şekil 17. tRNA Fragmanlarının Köken Aldığı Sekanslar | 50 |
| Şekil 18. tRNA Fragmanlarının 3' Kesim Noktası | 50 |

TABLolar

| Tablo | Sayfa |
|--|--------------|
| Tablo 1. Biyolojik Replikaların Kalite Kontrol Analizi..... | 22 |
| Tablo 2. Kamptotesin İle Muamele Edilen Jurkat T Hücre Fraksiyonlarında Farklı İfade Edilen miRNA'ların Özeti | 23 |
| Tablo 3. Kamptotesin İle Muamele Edilen Jurkat T Hücre Fraksiyonlarında Farklı İfade Edilen miRNA'ların Ayrıntılı Listesi..... | 29 |
| Tablo 4. Kamptotesin İle İndüklenen Apoptozda Rol Oynayan miRNA'ların qPCR İle Doğrulanması..... | 29 |
| Tablo 5. Derin Sekanslama Kalite Kontrol Analizi..... | 32 |
| Tablo 6. JNN, JAN ve JAP Fraksiyonlarında miRNA İfade Miktarları..... | 34 |
| Tablo 7. Ergin miRNA Sekansıyla Bir Nükleotit Fark Gösteren Sekansların Klonlanma Sıklıkları | 42 |
| Tablo 8. Ergin miRNA Sekansıyla Bir Nükleotit Fark Gösteren ve Genomda Tek Yere Eşleşen Sekansların Klonlanma Sıklıkları..... | 44 |
| Tablo 9. Kamptotesinle Muamele Edilen Jurkat Hücrelerinde miRNA İfadesi..... | 46 |
| Tablo 10. TargetScan Programıyla miR-128'in Hedef Genlerinin Belirlenmesi..... | 49 |
| Tablo 11. TargetScan Programıyla miR-128'in Hedef Genlerinin Belirlenmesi..... | 57 |

ÖZET

Biyolojik homeostazın temin edilmesinde temel bir işlevi olan ve evrimsel olarak oldukça muhafaza edilmiş olan hücre ölümü, ihtiyaç fazlası hücreler ile sağlığı tehdit eden antijenlerin vücuttan uzaklaştırılması için oldukça önemlidir. Apoptoz sinyal iletim yolağında rol oynayan ilk molekülün tanımladığı 1992 yılından bu yana bir dizi protein tanımlanmıştır. Ancak apoptoz sadece proteinler tarafından değil, mikroRNA (miRNA) adı verilen ve boyutları 17-25 nükleotit arasında değişen çok küçük kodlamayan RNA'lar tarafından da düzenlenmektedir. Apoptozu düzenleyen miRNA'ların tanımlanması, hücre ölümünün moleküler mekanizmasının anlaşılması ve insan sağlığının korunması için oldukça önemlidir.

T lenfositlerinde apoptozu düzenleyen miRNA'ları tanımlamak amacıyla Jurkat hücreleri genel apoptoz indükleyici kamptotesin ilacıyla muamele edilmiştir. Kamptotesin muamelesi sonrası, apoptozu duyarlı ve dirençli hücreler birbirinden ayrıştırılmıştır. Mikroarray, derin sekanslama ve qPCR teknikleri kullanılarak her iki grubun miRNA profilleri kamptotesinle muamele edilmeyen negatif örneklerin miRNA profiliyle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalı profil analizi sonrası her üç grup hücrede ifade edilen miRNA miktarına göre beş grup miRNA belirlenmiştir. miR-18a, 26a ve 92a-1* ölen hücrelerde baskılanmakta miR-7, 106b*, 221, ve 1268 ise ölmeyen hücrelerde aşırı ifade edilmektedir. Dolayısıyla bu grup miRNA anti-apoptotik olarak görev yapmaktadırlar. miR-128 ve 720, ölmeyen hücrelerde aşırı ifade edilirken ölen hücrelerde baskılanmakta dolayısıyla anti-apoptotik miRNA grubunda bulunmaktadır. miR-24 ve 766 sadece dirençli hücrelerde baskılandığından apoptotik miRNA olabilirler. miR-30c, 186, 142-5p ve 320 hem duyarlı hem de dirençli hücrelerde baskılandığından muhtemelen apoptozla ilgileri olmayıp ilaç metabolizması veya stres gibi diğer hücrel yanıtarda rol oynuyor olabilirler.

Elde edilen profile göre miR-17*, 18a ve 128 Jurkat ve HeLa hücrelerinde aşırı ifade edilmiştir. Derin sekanslama sonuçlarıyla uyumlu bir şekilde, miR-17* ve 18a çok azda olsa Jurkat hücrelerinde kamptotesinle indüklenen apoptozda anti-apoptotik etki göstermiştir. Ancak, miR-17* HeLa hücrelerinde apoptozu indüklerken miR-18a ve 128'in apoptotik bir fark yaratmadığı tespit edilmiştir.

Derin sekans profili miRNA yanında apoptozda rol oynayan diğer küçük RNA'ların analiz edilmesine olanak tanımıştır. Mevcut çalışma sonucunda biyoinformatik analizler miR-17, 20a ve 20b'nin değişik pozisyonlarında nükleotit değişimlerinin olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, kamptotesinle muamele sonrası tRNA'lardan fragmanlar üretildiği belirlenmiştir. Fragmanlar tRNA'ların özellikle 5 üssü uçlarından üretilmekte olup bütün tRNA'lardan değil seçici bir şekilde bazı tRNA'lardan üretilmektedir.

ABSTRACT

Cell death, which is evolutionarily conserved and has a fundamental role in the maintenance of biological homeostasis, is important for the removal of excessive cells and the antigens that threaten the health. Since 1992 when the first molecule that plays a role in the apoptotic signalling pathway was identified, a number of proteins have been characterized. However, apoptosis is regulated not only by proteins but also by small non-coding RNAs, named miRNA (miRNA) 17-25 nt in size. Identification of apoptosis-regulating miRNAs is highly important for the elucidation of the molecular mechanism of apoptosis and the protection of human health.

In order to identify miRNAs that regulate T lymphocyte apoptosis, Jurkat cells were treated with camptothecin. Following the camptothecin treatment, apoptosis-sensitive and –resistant cells have been separated from each other. By using microarray, deep-sequencing and qPCR methods, the miRNA profiles of both groups were compared to that of the control group that was not treated with camptothecin. Comparative profile analysis has identified in the three cell populations five groups of miRNA based on the miRNA amounts in cells. miR-18a, 26a and 92a-1* are suppressed in the apoptotic cells whereas miR-7, 106b*, 221, and 1268 are induced in the non-apoptotic cells. Thus, this groups of miRNAs serve to be anti-apoptotic. miR-128 and 720 are induced in the non-apoptotic cells and serve to be anti-apoptotic as a result. Since miR-24 and 766 are suppressed only in the resistant cells, they might be apoptotic. Since miR-30c, 186, 142-5p and 320 are suppressed in both sensitive and resistant cells, they might not be associated with apoptosis and might play a role in drug metabolism or other cellular responses such as stress.

Based on the profiling results, miR-17*, 18a and 128 were over-expressed in Jurkat and HeLa cells. In parallel to the deep-sequencing results, miR-17* and 18a have displayed anti-apoptotic effect in the camptothecin-treated Jurkat cells. However, miR-17* induced apoptosis in HeLa cells whereas miR-18a and 128 had no effects on apoptosis.

Deep-sequencing profiling has enabled the analysis of other small RNAs in addition to miRNAs. Bioinformatic analyses revealed the potential editings in the various positions of miR-17, 20a and 20b. Additionally, it was shown that various fragments are generated from tRNAs following the camptothecin treatment. The fragments are generated particularly from the 5'-ends of tRNAs and are synthesized not from all tRNAs but from a sub-set of them.

1. GİRİŞ

Evrimsel olarak oldukça muhafaza edilmiş olan hücre ölümü biyolojik homeostazın sağlanması için temel bir fonksiyona sahiptir. Nitekim, apoptoz ihtiyaç fazlası hücreler ile sağlığı tehdit eden antijenlerin vücuttan uzaklaştırılması için oldukça gerekli bir hücre işlevidir (DANIAL ve KORSMEYER, 2004). Vücutta dengenin sağlanması için hücre ölümünün fizyolojik bir süreçte oluşması gerekmektedir. Bu sürecin yavaşlaması sonucu kanser ve otoimmün hastalıklar, hızlanması durumunda ise nörodejenaratif hastalıklar ve AIDS gibi hastalıklar şekillenebilmektedir (FEARNHEAD, 2004; MATTSON, 2000; VAUX ve FLAVELL, 2000). Bu sebeplerden dolayı hücre ölümünün mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması, insan sağlığının korunması için çok önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 APOPTOZ (PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ)

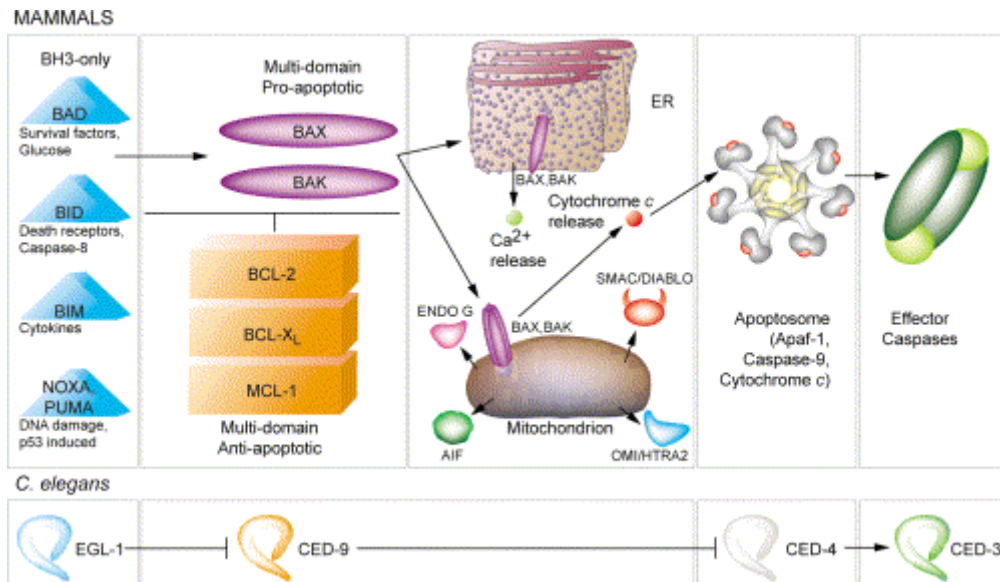
Programlı hücre ölümü ilk defa 1965 yılında belirlenmesine rağmen (GOLDSTEIN ve KROEMER, 2007), apoptozun kontrolünde rol oynayan ilk molekül, morfolojik tanımlamadan ancak 20 yıl sonra tespit edilebilmiştir (THORNBERRY ve ark., 1992). Hücre ölümünde oluşan bozuklukların hastalıklara yol açtığından sonra, bu alandaki çalışmalar ivme kazanmıştır. Bazen sınırları tam olarak çizilememekle birlikte, hücre ölümleri üç grup altında toplanmaktadır: nekroziz (GOLDSTEIN ve KROEMER, 2007), otofaji (YOSHIMORI, 2007) ve apoptoz (DANIAL ve KORSMEYER, 2004; HENGARTNER, 2000). Membran bariyerlerinin ya da hücre içi enerji kaynaklarının çok hızlı ve kitle halinde kaybedilmesi sonucu oluşan nekroz, organellerin ve hücrenin şişmesi, parçalanması ve sitoplazmik içeriğin dışarıya taşması ile karakterizedir. Otofaj ise çeşitli hücre organellerinin ve kompartmanlarının lizozomlar vasıtasıyla parçalanması anlamına gelmektedir.

Apoptoz hücre içinden ve dışından gelen değişik sinyaller vasıtasıyla başlatılan biyokimyasal olaylar tarafından orkastre edilen programlı hücre ölümüdür (DANIAL ve KORSMEYER, 2004). *C. elegans*, *Drosophila* ve memelilerde yapılan çalışmalar, apoptozun bütün türlerde benzerlikler gösterdiğini ancak hücre türüne göre farklı kontrol noktalarının olduğunu göstermiştir. Proteomik analizlerle yüzden fazla proteinin miktarında değişiklik olduğu gösterilmiştir (THIEDE ve RUDEL, 2004). Genetik ve biyokimyasal çalışmalar, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki apoptotik yolak belirlemiştir (Şekil 1). Her iki yolakta da ortak yaşam (BAD) ve ölüm sinyalleri (BID, BIM, NOXA/PUMA) vardır. Apoptotik BAK/BAX (WEI ve ark., 2001) proteinleri ile antiapoptotik BCL-2 (BAKSHI ve ark., 1985) grubu proteinlerinin oranı apoptozu belirler. Değişik intrinsik ve/veya ekstrinsik faktörler BAD (ZHA ve ark., 1996), BID (WANG ve ark., 1996), BIM (PUTHALAKATH ve ark., 1999) ve NOXA/PUMA (NAKANO ve VOUSDEN, 2001) gibi apoptotik proteinleri aktive ederler. Bu proteinlerde, normalde BCL-2 (BAKSHI ve ark., 1985), BCL-X_L (BOISE ve ark., 1998) ve MCL-1 (KOZOPAS ve ark., 1993) gibi antiapoptotik proteinler tarafından inaktif halde tutulan BAK ve BAX proteinlerini aktive ederler. BAX/BAK endoplazmik retikuluma girerek kalsiyum salınmasına ve dolayısıyla hücre şişmesine ve mitokondriye girerek ölüm sinyallerinin amplifikasyonuna neden olurlar. MCL-1 önemli bir kontrol noktası olup, BIM'e bağlı apoptozu önleyici etkisi vardır (OPFORMAN ve ark., 2003). BAX ve BAK proteinlerinin mitokondride oluşturduğu deliklerden sitokrom *c* salınmasından sonra, APAF-1, cyt c (APAF-2) ve caspase-9 (APAF-3) birleşerek apoptozomu oluştururlar (LI ve ark., 1997). Başlatıcı (initiator) caspase-9, efektör caspase enzimlerini aktive eder ve bu enzimlerde

hücrede ki değişik proteinleri parçalayarak apoptoza yol açarlar (THORNBERRY *ve ark.*, 1992). Caspase aktivitesi değişik proteinler tarafından kontrol edilebilir. Örneğin *Drosophila*'da caspase enzimlerini inaktive eden değişik IAP (inhibitor of apoptosis) proteinleri (SALVASEN *ve DUCKETT*, 2002), memelilerde de SMAC/DIABLO (DU *ve ark.*, 2000) ve OMI/HTRA2 (SUZUKI *ve ark.*, 2001) isimli 2 adet IAP proteini izole edilmiştir.

Apoptoza uğrayan hücrelerde çekirdek koyulaşması ve DNA parçalanması gibi morfolojik değişiklikler olmaktadır. Memelilerde DNA parçalanması kaspaz tarafından aktive edilen CAD (caspase activated DNase) ve fagositlerin lizozomunda ki DNase II proteinleri tarafından gerçekleştirilir (ENARI *ve ark.*, 1998). Caspase aktivitesine bağlı olmayan endonukleaz G ve AIF (apoptosis-interacting factor) proteinleri de DNA parçalanmasına yol açabilir (LI *ve ark.*, 2001). Bütün bu olaylar zincirinden sonra, apoptotik hücre üzerinde bulunan fosfatidilserin reseptörleri sayesinde bu hücreler “yenilmek” üzere tanınırlar ve fagositoz ile berteraf edilirler.

Ektrinsik faktörler üç önemli reseptör grubunu etkileyerek sinyal iletim yolunu aktive ederler; TNF (tumor necrosis factor), Fas ve TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) reseptörleri (ASHKENAZI *ve DIXIT*, 1998; LI *ve ark.*, 2001; TARGALIA *ve ark.*, 1993; TRAUTH *ve ark.*, 1998). Her üç yoldaki ortak nokta, ligandın bağlanması sonrası konformasyon değişikliğine uğrayan reseptörlerin sitoplazmik kısmında DISC (death inducing silencing complex) kompleksi oluşmasıdır. Bu kompleks, reseptörlerin sitoplazmik yarısında yer alan DD (death domain) ve DED (death effector domain) kısımları ile FADD adaptör proteini ve caspase-8 enzimi arasında oluşur. Lokal konsantrasyonu artan caspase-8'in otoproteolitik aktivasyonu diğer caspase enzimlerinin (örneğin caspase-3 ve -7) aktivasyonuna yol açar.



Şekil 1. Apoptotik mekanizmada rol oynayan iç (intrinsic) faktörler. Apoptoz mekanizmasını tetikleyen değişik faktörler mavi üçgenlerle gösterilmiştir. Apoptozu tetikleyen/önleyen faktörler ve buna muteakip aktive edilen caspase enzimleri metin içerisinde açıklanmıştır (DANIAL *ve KORSMEYER*, 2004).

T lenfosit homeostazında ve immun fonksiyonların düzenli olarak yerine getirilmesinde apoptozun düzenlenmesi kritik bir aşamayı teşkil etmektedir (ARNOLD ve ark., 2006). Örneğin, enfeksiyon sonrası görevini tamamlayan T lenfositlerinin periferal kandan eliminasyonu apoptozu gerektirmektedir. Bu eliminasyon işlemi ya aktivasyon-tetiklenmiş hücre ölümü (activation-induced cell death, AICD) (GREEN ve ark., 2003) veya aktive edilmiş T hücresi otonom ölümü (activated T cell autonomous death, ACAD) (HILDEMAN ve ark., 2001) mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Genel bağlamda, AICD dışsal faktörler (CD95 ve/veya TNF-R1 reseptörü), ACAD ise içsel faktörler (antiapoptotik ve apoptotic Bcl-2 proteinlerinin oranı) tarafından düzenlenmektedir. Şu ana kadar T hücre apoptozu (ve genel olarak apoptoz) üzerine yapılan çalışmalar, her iki mekanizmayı düzenleyen çok sayıda protein kodlayan gen belirlenmiştir. Ancak, hücre siklusu ve kanser üzerine yapılan çalışmalar T hücre apoptozunun protein kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) tarafından da düzenlenebileceğini işaret etmektedir (BAEHRECKE, 2002).

2.2 ÇOK KÜÇÜK KODLAMAYAN RNA'LAR

Çok küçük RNA'lar 17-25 nükleotit uzunluğunda olup RNA stabilitesinin düzenlenmesi, translasyon, transkripsiyon sonrası gen regülasyonu, kromatin modifikasyonu ve transpozon düzenlenmesi gibi bir dizi işlemlere sahiptirler (COSTA, 2007). Kategorik olarak siRNA (silencing RNA) (FIRE ve ark., 1998), miRNA (mikroRNA) (LEE ve ark., 2002) ve piRNA (PIWI-interacting RNA) (ARAVIN ve ark., 2001) olarak üç ana grup altında toplanmakla birlikte, casiRNA (cis-acting siRNA) (HAMILTON ve ark., 2002), tasiRNA (trans-acting siRNA) (VAZQUEZ ve ark., 2004), natsiRNA (natural antisense transcript-derived siRNA) (BORSANI ve ark., 2005), exo-siRNA (exogenous siRNA), endo-siRNA (endogenous siRNA) (YANG ve KAZAZIAN, 2007), 21U ve 21G RNA (RUBY ve ark., 2006) gibi değişik alt gruplarında içermektedir. Ayrıca, tRNA parçalarından küçük RNA üretildiğine dair çalışmalarda vardır (LEE ve ark., 2009).

2.3 MİKRORNA'LAR

2.3.1 MikroRNA Tanımı ve Fonksiyonları

miRNA'lar, gen ifadesini özellikle transkripsiyon sonrası düzenleyen 17-25 nükleotit (nt) uzunluğunda protein kodlamayan küçük RNA'lardır (CARTHEW ve SONTHERMER, 2009). *C. elegans* gelişimini etkileyen heterokromik genlerin tanımlanması esnasında ilk kez 1979 yılında bulunan ancak protein kodlamayan RNA olduğu için 1993 yılına kadar bir genetik gizem olarak kalan *lin-4* ve *let-7*, miRNA'ların kurucu üyeleri olarak kabul edilmektedir (LEE ve ark., 1993). Gelişimin değişik aşamasındaki rollerinden dolayı, başlangıçta stRNA (small temporal RNA) olarak adlandırılmışlardır. 2001 yılında insan sinek ve soluncanda küçük RNA klonlama ve sekanslama yöntemiyle binlerce miRNA tanımlanmıştır (LAGOS-QUINTANA ve ark., 2001; LAU ve ark., 2001; LEE ve AMBROS, 2001). mirBASE verilerine göre, şu an itibarıyla Drozofila'da 171, insanda 940 miRNA rapor edilmiştir (www.mirbase.org). Genlerin mutasyonunda (knockdown) kullanılan RNAi (RNA interference; siRNA, silencing RNA olarakta bilinir) metodunun biyokimyasal mekanizmasının aydınlatılmasından sonra (MELLO ve CONTE, 2004), miRNA'ların, genlerin çalışmasını düzenleyen yeni bir grup RNA olduğu anlaşılmıştır.

Transkripsiyonu düzenleyen transkripsiyon faktörlerine benzer bir yaygınlıkta, miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen regülasyonunu düzenlemekte ve dolayısıyla bitki ve hayvanlarda temel biyolojik işlevlerden çevresel strese cevaba kadar bir dizi hücrel mekanizmalarda rol oynamaktadırlar (BARTEL ve CHEN, 2004; STEFANI ve SLACK, 2008). Biyogenezde rol oynayan Dicer ve argonaute proteinlerindeki mutasyonların hayvanlarda ölümcül olup, bitki ve hayvanlarda şiddetli gelişim bozukluklarına neden olması bu moleküllerin ne kadar önemli olduğunun bir göstergesidir (KNIGHT ve BASS, 2001). miRNA'ların gelişimin yanında metabolizma, kök hücre gelişimi ve farklılaşması, tümör oluşumu, apoptoz ve hücre döngüsü gibi çok değişik fonksiyonlarda rol oynadığı bildirilmiştir (KUMAR ve ark., 2007; STEFANI ve SLACK; 2008; LYNAM-LENNON ve ark., 2009; XIAO ve RAJEWSKY, 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların TGF-beta, Wnt, receptor tirozin kinaz, PTEN, p53 ve Notch gibi çok önemli sinyal iletim yollarını düzenledikleri rapor edilmiştir (INUI ve ark., 2010).

2.3.2 MikroRNA Biyogenezi ve Gen Regülasyonu

miRNA'lar RNA polimeraz II tarafından sentezlenen ve pri-miRNA (primary miRNA) adı verilen öncül transkriptlerden sentezlenmektedirler (Şekil 2, LEE ve ark., 2002). MiRNA genleri grup halinde iseler tek bir öncül transkript olarak üretilebilirler. Öncül miRNA'lar çekirdekte bir endonükleaz III grubu enzim olan Drosha tarafından yaklaşık 60-70 nükleotitlik pre-miRNA'ya dönüştürülür (LEE ve ark., 2003). Drosha bu kesim işlemi çift zincirli RNA'ya bağlanma özelliği olan bir protein ile (insanda DGRC8, sineklerde Pahsa) yapmaktadır (DENLI ve ark., 2004; HAN ve ark., 2004). Pre-miRNA'lar endonükleaz enzimlerinin substratlarında bıraktığı tipik özellik olarak 3' uçlarında 2 nükleotitlik fazlalık ve 5' uçlarında fosfat taşırlar. Pre-miRNA'lar Ran GTPaza bağlı çalışan exportin 5 proteini tarafından çekirdekte sitoplazmaya taşınırlar (YI ve ark., 2003).

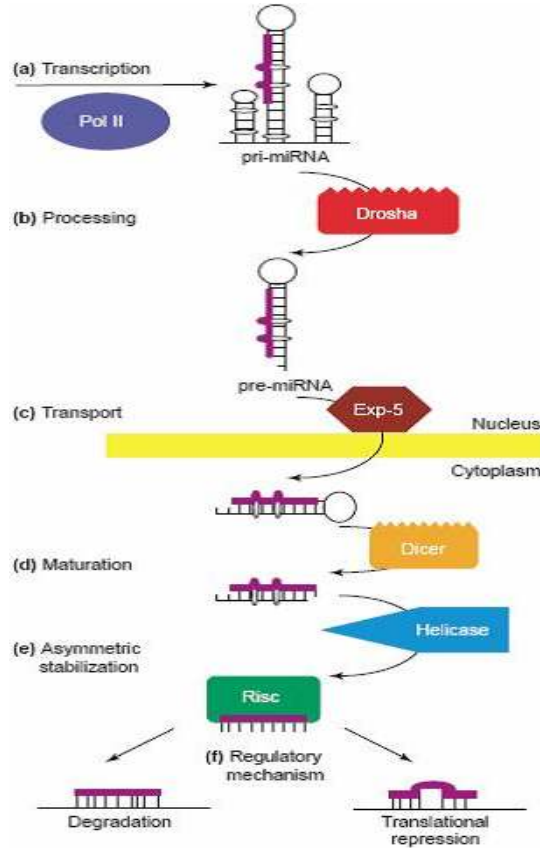
Sitoplazmaya taşınan ve halka içeren pre-miRNA, Drosha gibi endonükleaz III grubu enzim olan Dicer tarafından 17-25 nükleotitlik çift sarmallı RNA molekülüne dönüştürülür (HUTVANGER ve ark., 2001). Dicer Drosha'ya benzer şekilde pre-miRNA'nın halka kısmını tanıyan bir protein partneri ile (memelilerde TRBP ve sineklerde LOQS) kesim işlemi yapmaktadır (CHENDRIMADA ve ark., 2005; FORSTEMANN ve ark., 2005). Kesim sonrası oluşan çift sarmallı RNA molekülü miRNA (olgun miRNA) ve miRNA* (yıldız miRNA, miRNA'ya antisense) içermekte olup siRNA üretiminde oluşan "guide" ve "passenger" iplikçiklere benzemektedirler. Tam olmayan eşleşmeden dolayı her iki iplikciğin stabilitesi eşit olmadığından, 5' ucu daha az stabil olan miRNA iplikciği AGO proteinine yüklenirken diğer iplikcik ya parçalanır yada AGO2 ile assosiyasyon olarak miRNA (veya siRNA) olarak görev yapabilmektedir (SIOMI ve SIOMI, 2009). Seçilen iplikciklerden bir tanesi içerisinde argonaute (AGO) olacak şekilde bir miRNP (mikroribonükleoprotein) kompleksi olan RISC (RNA-induced silencing complex)'i oluşturur ve hedef mRNA'lara bağlanarak gen ifadesini düzenlerler (KHVOROVA ve ark., 2003; SIOMI ve SIOMI, 2009). Hayvanların aksine, bitkilerde siRNA'larda olduğu gibi miRNA'larda 3' uçlarında 2-O metilasyona uğramaktadır (YU ve ark., 2005).

Memeli ve solucanda tek bir Dicer enzimi bulunmasına rağmen *Drosophila*'da 2 tane Dicer enzimi bulunmaktadır (DCR-1 ve DCR-2) (HUTVAGNER ve ark., 2001; LEE ve ark., 2004). AGO proteinlerinde de çeşitlilik bulunmaktadır. Örneğin *Arabidopsis*'te 10 adet, *Drosophila*'da 5 adet, solucanda ise 27 adet AGO bulunmaktadır (GHILDIYAL ve MAZORE, 2009). *Drosophila*'da AGO1 ve DCR-1 miRNA yolağında görev yaparken, siRNA

yolağında AGO2 ve DCR-2 kullanılmaktadır (LEE ve ark., 2004).

Sinek, solucan ve memelilerde bazı miRNA'ların biyosentezi Drosha enzimi gerektirmemektir. Mirtron adı verilen bu pre-miRNA benzeri yapılar çekirdekte pre-mRNA kırılması esnasında intronlardan üretilmektedir (OKAMURA ve ark., 2005). İntron kırılması sonrası "lariat" olarak çekirdekte biriken pre-miRNA benzeri yapılar sitoplazmaya taşındıktan sonra konvansiyonel miRNA biyogenez yolağına girmektedirler.

Bazı miRNA'lar biyogenez sırasında veya biyogenez sonrası nükleotit değişimlerine tabi olmaktadır. Bir RNA molekülündeki bir veya birden fazla nükleotit başka nükleotitlere dönüştürülebileceği gibi, delesyon veya insersiyonlar olabilmektedir. Nükleotit değişiminde ADAR (A→I, dsRNA), ADAT (A→I, tRNA) ve APOBEC (C→U) gibi enzimler rol almaktadır (BASS, 2002). Nükleotit değişimiyle bir miRNA'nın üretilmesi azaltılabileceği gibi (KAWAHARA ve ark., 2007a) miRNA'nın biogenezi artabilir veya hiçbir değişime neden olmayabilir (KAWAHARA ve ark., 2008). miRNA sekanslarında oluşan değişikliklerin gen ifadesinde direkt etkisi bulunmaktadır. Örneğin, bir miRNA meydana gelen nükleotit değişiklikleri sonucu hedef mRNA'larla eşleşemeyeceğinden ilgili miRNA'nın baskıladığı hedef(ler) değişebilmektedir (KAWAHARA ve ark., 2007b).

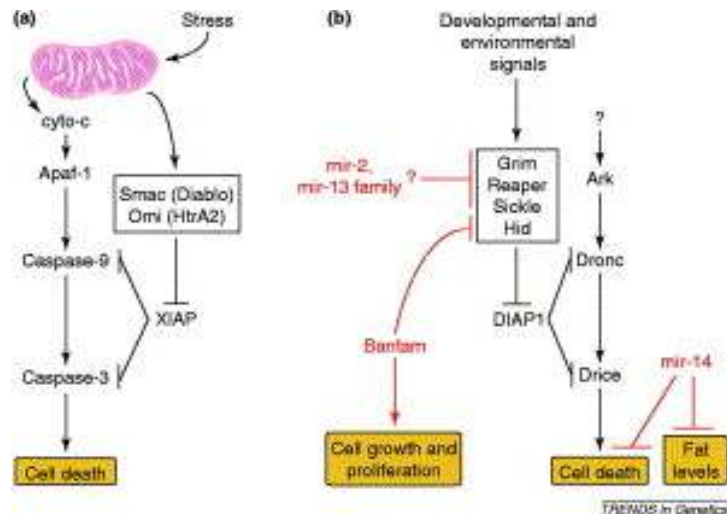


Şekil 2. MikroRNA biyogenez ve fonksiyonu için modeller. Çekirdekte Drosha, sitoplazmada Dicer enzimi öncül miRNA'yı keser ve ilgili miRNA AGO proteiniyle miRNP (mikroribonucleoprotein) kompleksini oluşturur. Çift sarmaldan birisi hedef mRNA'nın 3' UTR kısmına bağlanarak mRNA yok edilmesine veya translasyonel baskılanmasına neden olurlar (KIM ve NAM, 2006).

2.3.3 Apoptozda Rol Oynayan MikroRNA'lar

Genetik ve biyokimyasal tarama yöntemleri kullanılarak hücre ölümünü düzenleyen birçok protein tanımlanmıştır. Apoptotik hücrelerde yapılan proteomik çalışmalar, farklı şekilde ifade edilen yüzden fazla protein belirlemiştir (THIEDE ve RUDEL, 2004). Apoptoz alanında son yılların belki de en önemli gelişmelerinden biri, hücre ölümünün proteinler yanında, protein kodlamayan küçük miRNA'lar tarafından düzenlenebileceğidir (Şekil 3) (BAEHRECKE, 2002; JOVANOVIĆ ve HENGARTNER, 2006; XU ve ark., 2004). Aslında *Drosophila*'da doku gelişimini etkileyen genlerin taraması esnasında tespit edilen *bantam* lokusu (HIPFNER ve ark., 2002), apoptozu önleyen ilk miRNA örneği olarak tespit edilmiştir (BRENNECKE ve ark., 2003). *Drosophila* ve memelilerde kaspaz enzimleri tarafından gerçekleştirilen hücre ölümleri arasında büyük benzerlikler vardır. Şekil 3'te görüldüğü gibi memelilerde bulunan Apaf-1, caspase-9 ve caspase-3 proteinlerinin *Drosophila* homologları Ark, Dronc ve Drice proteinleridir (DEGTEREV ve ark., 2003). Grim, Reaper, Sickie ve Hid proteinleri, DIAP1 caspase inhibitörünü inaktif hale dönüştürerek apoptozu neden olurlar (XU ve ark., 2004). *bantam* miRNA'sı Hid ifadesini bloklayarak apoptozu önler. *Drosophila*'da apoptozun düzenlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülen diğer bir miRNA olan mir-14 normalde yağ metabolizmasını etkilemekte olup caspase-3 enziminin *Drosophila*'da ki homologu olan Drice enziminin ifadesini düzenlemektedir (XU ve ark., 2003).

mir-14 ve *bantam* miRNA'larının tanımlanması, miRNA'ların embryo gelişimi esnasında cereyan eden apoptotik olayların mekanizmalarını kısmen anlamamıza imkan tanımıştır. Memeli ve *Drosophila* hücre ölümleri arasındaki benzerlik ve protein kodlayan 25,000 memeli genlerinin %10'undan fazlasının potansiyel miRNA bağlanma bölgeleri içerdiği düşünüldüğünde (JOHN ve ark., 2004), memelilerde de apoptozu düzenleyen miRNA'ların olma ihtimali oldukça yüksektir. Nitekim, HeLa hücrelerinde yapılan bir çalışmada miR-1d, 7, 148, 204, 210, 216 ve 296'nın hücre ölümünü hızlandırdığı, mir-214'ün



Şekil 3. Apoptotik yolda rol oynayan proteinler ve miRNA'lar. (a) Memelilerde caspase aktivitesine bağlı olarak meydana gelen ana hücre ölüm yolu, (b) *Drosophila*'da caspase aktivitesine bağlı olarak meydana gelen ana hücre ölüm yolu. Her iki yolda da büyük benzerlikler vardır. *Bantam* miRNA'sı Hid proteinini bloklayarak apoptozu önler, *mir-14* miRNA'sının etkilediği caspase enzimlerinden birini etkilemektedir (XU ve ark., 2004).

ise hücre ölümünü yavaşlattığı gösterilmiştir (CHENG *ve ark.*, 2005). Değişik kanser hatlarında yapılan çalışmalarda Let-7, miR-1, miR-29, miR-34, miR-15/16 ve miR-101'in apoptozu indüklediği, miR-17-92, miR-21, miR-106b, miR-133, miR143, miR-145, miR-155, miR-206, miR-221/222 ve miR-330'un apoptozu önlediği bildirilmiştir (LYNAM-LENNON *ve ark.*, 2009; SUBRAMANIAN ve STEER, 2009).

Bu projenin teklif edilmesinden sonra yapılan çalışmalarda miRNA'ların immün sistemi kontrol ettiğine dair bir dizi yayınlar yapılmıştır (BALTIMORE *ve ark.*, 2008; XIAO ve RAJEWSKY, 2009). İmmün sistem fonksiyonunda miRNA ifadesinin önemini gösteren ilk çalışma 2004 yılında yayınlanmıştır (CHEN *ve ark.*, 2004). Farelerde yapılan bu çalışmada, B lenfosit farklılaşmasında rol oynayan miR-181'in timüste ifade edildiği ve ektopik olarak ifade edildiğinde CD8⁺ T hücrelerinin miktarında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Yine benzer şekilde CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerine farklılaşan kök hücrelerinden izole edilen küçük RNA'ların sırasıyla %67,8 ve %71,4'ünün miRNA olduğu belirtilmiştir (NEILSON *ve ark.*, 2007). Daha sonra yapılan çalışmalar daha ziyade lösemi oluşumu üzerine odaklanmıştır (ZHAO *ve ark.*, 2009). Apoptoz, hücre siklusu ve hücre proliferasyonu ayırt edilmeksizin yapılan bu çalışmalarda akut ve kronik T ve B lenfoblastik lösemi patogenezinde rol oynayan bir dizi miRNA tespit edilmiştir. Daha çok klinik tanı ve takip için markör araştırması amaçlı yapılan bu çalışmalar sonucu akut B lenfoblastik ve akut myeloid lösemi (MI *ve ark.*, 2007) ayırımı ve akut T ve B lenfoblastik lösemi (FULCI *ve ark.*, 2009) ayırımını yapmak mümkün olmuştur. Jurkat hücrelerinde yapılan aşırı ifade çalışmalarında miR-143'ün Fas ile başlatılan apoptozu düzenlediği gösterilmiştir (AKAO *ve ark.*, 2009). MOLT-4 hücre hattında yapılan bir çalışmada ise miR-17-92 ailesinin aktivasyonunun E2F1 ifadesini azaltarak apoptozu baskıladığı rapor edilmiştir (NAGEL *ve ark.*, 2009).

Özellikle lösemi hücre hatlarında ve insan örneklerinde yapılan bir dizi çalışma olmasına rağmen spesifik olarak T lenfositlerinde apoptozu tetikleyen miRNA'ları tespit etmek amacıyla genomik seviyede yapılmış bir tarama bulunmamaktadır. T hücre apoptozunun moleküler mekanizmasına ışık tutacak bu projede 4 amaç hedeflenmiştir:

1. Jurkat hücre hattında apoptozu düzenleyen miRNA'ları tespit etmek,
2. Yeni tanımlanan miRNA'ların T hücre hatlarında nakavt ve aşırı ifadesinin apoptoz üzerine etkisini araştırmak,
3. Biyoinformatik araçlar kullanarak, tanımlanan miRNA'ların potansiyel hedef mRNA'larını belirlemek ve deneysel olarak doğrulamak,
4. Hücre hatlarında tanımlanan miRNA'ların periferal kanda dolaşan T hücrelerindeki ifade profillerini incelemektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Memeli Hücrelerinin Apoptoza Uğratılması ve Transfeksiyonu

Bu çalışmada T lenfosit kaynağı olarak Jurkat hücre hattı kullanılmıştır (SCHNEIDER *ve ark.*, 1977). Gerekli durumlarda HeLa hücreleri kullanılmıştır. Hücre kültürleri, RPMI içerisinde (RPMI 1640, 2 mM L-Glutamine ve 10%FBS) sıvı süspansiyon halinde (2×10^6 hücre/mL), 37 °C’de ve %5 CO₂ ‘li bir ortamda büyütüldü. Hücrelerde apoptozu tetiklemek için kamptotesin ilacı kullanıldı (JOHNSON *ve ark.*, 1997). En uygun doz ve zaman aralığını tespit etmek için öncelikle kamptotesin doz ve zaman cevabı belirlendi. Bakteriyel antijen olarak olarak yeni tanımlanan *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL (A. Nalbant *ve ark.*, yayımlanmamış veri) proteini kullanıldı.

Kamptotesin muamelesi sonrası apoptoz oranları immunofloresan işaretleme yöntemiyle akım sitometresi kullanılarak belirlendi. Hücreleri erken apoptotik evrede yakalamak için, apoptozun bu döneminde hücre membranında meydana gelen fosfotidilserin eksternalizasyonu, Annexin V immunofloresan işaretlemesiyle tespit edildi (BD Bioscience). Anti-Annexin V antikoru konjuge manyetik partiküller kullanılarak (MACS Miltenyi Biotec) üretici firmanın protokolüne göre apoptoza uğramış hücreler ayrıştırıldı. Bu ayrıştırma sonrası üç hücre popülasyonu elde edildi; (1) Kamptotesin muamelesine tabi olmayan negatif hücreler (JNN, Jurkat negatif negatif); (2) Kamptotesin ile muamele edilen ancak apoptoza uğramayan hücreler (JAN, Jurkat apoptoz negatif) ve kamptotesin ile muamele edildiğinde apoptoza uğrayan hücreler (JAP, Jurkat apoptoz pozitif). JAN hücreleri ikinci defa kamptotesin muamelesine tabi tutularak kamptotesin ilacına karşı direnç belirlendi. Daha sonra kamptotesin muamelesi ve manyetik partikülle seçim işlemleri tekrarlanarak 3 replika elde edildi.

Hücre transfeksiyonunda su içerisinde katyonik lipidler ve ko-lipidler kullanıldı. 6 kuyucuklu plakada kuyucuk başına 2mL normal besiyeri (1640 RPMI + 10% FBS + 1% Pen/Strep) içinde 200,000 Jurkat hücresi aktarıldı. İki ayrı ependorftan birinde 2µg miRNA 100µL saf RPMI içinde çözülürken diğerinde 2µL MetafecteneTM Pro yine 100 µL saf RPMI içinde çözüldü. Hazırlanan solüsyonlar sadece bir kez pipetle çekilip bırakıldıktan sonra birbirleriyle nazikçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Daha sonra bekleme süresi çok fazla geçirilmeden miRNA-Lipid karışımı hücrelerin üzerine damlatıldı. HeLa hücre transfeksiyonunda her bir kuyucuğa 2 mL RPMI içerisinde 500,000 hücre yerleştirildi ve transfeksiyon öncesi 24 saat %5 CO₂ ve 37°C’de inkübe edildi. Hücreler gen aktarımın gerçekleşebilmesi ve aktarılan genin anlatım yapabilmesi için tekrar 24-48 saat süreyle inkübe (5% CO₂ 37°C) edildi.

3.2 Toplam RNA İzolasyonu

Elde edilen 3 hücre popülasyonundan mirVANA miRNA izolasyon (Ambion) kiti kullanılarak 200 nükleotitten küçük RNA’ları da içeren toplam RNA izolasyonu yapıldı. Toplam RNA’ların miktarı ve saflığı Nanodrop ND UV-Vis Spectrofotometre ile ölçüldü. Genomik DNA kontaminasyonunu minimize etmek için toplam RNA örnekleri RNaz içermeyen DNaz I (Ambion) ile muamele edildikten sonra fenol klorofom ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Genomik DNA içermediği agaroz jelde yürütülerek kontrol edilen RNA’ların kalitesi Bioanalyzer 2100 ile ölçüldü.

3.3 Mikrodizi Analiziyle Apoptotik miRNA İfade Profillerinin İncelenmesi

Kamptotesin muamalesi sonrası elde edilen 3 hücre popülasyonundan (JNN, JAN ve JAP) hazırlanan 3 toplam RNA replikası (3X3 toplam 9 örnek) Febit firması tarafından mikrodizi analiziyle profillenmiştir (Almanya). 0.9 µg toplam RNA mirVANA miRNA labeling kit (Ambion) ile işaretlendikten sonra miRNA hibridizasyon tamponunda genom çiplerle 42°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Yıkamaya müteakip streptavidin-PE kullanılarak okuma yapılmıştır.

Ham datanın spasiyal dağılımı incelendikten sonra kNN (k-nearest neighbour) background düzeltmesi yapılmıştır. Daha sonra data VSN (variance stabilizing normalization) metodu kullanılarak normalize edilmiştir. Hierarchical kümeleme, heatmap ve PCA (principal component analysis) analizlerine müteakip kat indüksiyon (fold of change) rakamları hesaplanmıştır. Student's T Test sonrası $P < 0,05$ değerlerine sahip miRNA adayları tespit edilmiştir.

3.4 Derin Sekanslama İle miRNA Profilinin Çıkartılması

Mikrodizi analizinde kullanılan 9 toplam RNA Illumina Genome Analyzer GAI ve chrysalis 36cycles v3.0 sekans kiti kullanılarak Fasteris firması tarafından sekans analizine tabi tutuldu (İsviçre). Her bir hücre popülasyonundan elde edilen 3 replika eşit miktarda karıştırılarak tek bir kanalda derin sekans analizine tabi tutulmuştur.

Sekans okumaya müteakip örnek kodlamada kullanılan adaptörler 3 aşamada elimine edildikten sonra sekanslar ilgili fraksiyon dosyasına "fastq" olarak kaydedilmiştir. Fraksiyonların kodlaması ise Jurkat Negatif Negatif (JNN); Jurkat Apoptoz Positive (JAP); Jurkat Apoptoz Negative (JAN) olacak şekilde yapılmıştır. Derin sekanslama sonucu elde edilen sekanslar arasında aynı sekanstan birden fazla sekans olduğu için her "unik" (özgül) sekans için indeksleme yapılmıştır. Bu indeksleme yapılırken bir "unik" sekansın 3 farklı örnekteki toplam klonlanma sıklığı (indeksi) belirlenmiştir. Derin sekanslama verisini *Homo sapiens* sekansları ile eşleştirmek için "nalign" programı kullanılmıştır (LASSMAN, unpublished; (<http://genome.gsc.riken.jp/osc/english/dataresource/>)).

Derin sekanslama çok büyük veri ürettiğinden, bu bilgilerle daha kolay ve hızlı işlem yapılması için data SAM (Sequence Alignment Map) formatına dönüştürülmüştür (LI ve ark., 2009). Bu dosyanın hazırlanması için sekansların genom ile eşleştirilip bir sekansın hangi kromozom üzerinde olduğu, kaçınıcı nüleotitten başladığı, hangi oriyantasyonda olduğu, sekansın eşleşme biçimi (tam eşleşme, 1 hata veya 2 mismatch vb) ve klonlanma frekansı gibi bütün bilgilerin belirlenmesi gerektiğinden, sekans datası *Homo sapiens* genomu (<http://genome.ucsc.edu/>, (Feb. 2009 (hg19, GRCh37)) ve tRNA (3' CCA eklenmiş) ile eşleştirilmiştir. Eşleşmede en fazla 2 nükleotit uyumsuzluğuna izin verilmiştir. tRNA sekansları "<http://gtadb.ucsc.edu/> [Homo sapiens (hg18 - NCBI Build 36.1 Mar 2006)]" den indirilmiştir ve koordinatları hg19'a çevrilmiştir.

miRNA ifade seviyelerini belirlemek amacıyla miRNA'nın olgun sekansı ile aynı sekans uzunluğunda ve aynı sekansa sahip olan sekanların her bir fraksiyondaki klonlanma sıklıkları hesaplanarak belirlenmiştir. Olgun miRNA sekansları "www.mirbase.org/" (Release 15)'den indirilmiştir. tRNA sekansları ile eşleşen sekansları belirlemek için genomda kodlanmayan fakat transkripsiyon sonrası olgun tRNA'lara eklenen 3'-CCA nükleotitleri

tRNA veritabanındaki olgun tRNA'lara eklendikten sonra bu olgun tRNA'lar ile tam eşleşen sekanslar ve klonlanma sıklıkları belirlenmiştir.

miRNA nükleotit değişim adayları belirlenirken öncelikle genomla 1 hatayla eşleşen sekanslar belirlenmiştir. Fakat genomda bir bölgeye bir hata ile eşleşen bir sekans genomda başka bir bölgeye aynı nükleotit pozisyonunda bir hata ile veya farklı bir nükleotit farklı bir pozisyonunda bir hata ile başka bölgelerle eşleşebilir. Bu sebeple, miRNA nükleotit değişim adayları belirlenirken genomla 1 hata ile eşleşen bir sekans eğer birden fazla bölge ile eşleşiyorsa Cross_mapping_correction programı kullanılarak hangi bölgeden gelebileceğinin olasılığı hesaplanmıştır (de HOON ve ark., 2010). Bu amaçla SAM formatındaki verilerden genomda sadece 50 ve 50'den az bölgeyle eşleşen sekanslar kullanılmıştır. Hesaplama sonucunda uyumsuzluk yüzdesi %10'nun üzerinde olan adaylar alınıp bu adayların nükleotit değişimine tabi olup olmadığı belirlenmiştir. Toplamda bir bölgeyle eşleşen bütün sekanslardan bir nükleotit uyumsuzluğuyla eşleşen sekanstaki uyumsuzluk belli bir pozisyonda ve belli bir nükleotitte dönüşümü fazla ise bu sekans nükleotit değişimi ("editing") adayı kabul edilmiştir.

3.5 Kantitatif PCR İle miRNA İfadelerinin Kontrol Edilmesi

Kamptotesin muamelesi sonrası elde edilen 3 grup hücreden miRVANA miRNA izolasyon kiti (Ambion) kullanılarak üretici firmanın prosedürüne göre 200nt'ten küçük RNA'lar izole edilmiştir. Daha sonra RT² miRNA qPCR Assays kiti (SABioscience) kullanılarak küçük RNA'lar cDNA'ya dönüştürüldü. 200ng küçük RNA, 1µL miRNA RT Primer ve ERC karışımı, 2µL 5XmiRNA RT buffer, 1µL miRNA reverse transkriptaz enzim karışımı ve 100mM DDT ile hazırlanan reaksiyon dH₂O ile 10µL'ye tamamlandıktan sonra 37°C'de 2s inkübasyona bırakıldı. RNA'ların parçalanması ve reverse transkriptazın inaktivasyonu için örnekler 95°C'de 5 dk kaynatıldı. cDNA reaksiyonuna 90µL dH₂O eklenerek kullanıma kadar -20°C'de saklandı.

Kantitatif PCR reaksiyonu 0.2µL cDNA, 10µL SYBR green qPCR karışımı, 0.5µM 5' küçük RNA primeri, 1µM 3' standart reverse primeri (TAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT) ve dH₂O ile 10µL'ye tamamlandı. PCR başlangıç denaturasyonu 94°C 10dk yapıldı. Daha sonra 40 tekrar süresince denaturasyon için 95°C 15sn, primerlerin bağlanması 60°C 40sn, zincirin uzaması 72°C 30sn koşullarında L480 Roche Lightcycler kullanılarak qPCR tamamlandı. Gerçek zamanlı qPCR'da elde edilen verilerin analizi için $\Delta \Delta C_t$ metodu kullanıldı. Bu metotta ilgilenilen küçük RNA'nın eşik değeri (threshold cycle, Ct) ile ifadesi arasındaki ters orantı bulunmaktadır. Bu nedenle, küçük RNA ifadesi $L=2^{-Ct}$ olarak tanımlanmaktadır. Küçük RNA ifadesi (gene of interest, GOI) hücrede ifadesi değişmeyen bir genin (housekeeping, HKG) ifadesine bölünerek aşağıdaki şekilde normalize edilmektedir;

$$\frac{2^{-Ct(GOI)}}{2^{-Ct(HKG)}} = 2^{-[Ct(GOI) - Ct(HKG)]} = 2^{-\Delta Ct}$$

Küçük RNA miktarındaki değişimi normalize edilmiş ilgilenilen genin normalize edilmiş kontrol örneğindeki aynı gene bölünmesi ile elde edilir.

$$\frac{2^{-\Delta Ct(\text{deney})}}{2^{-\Delta Ct(\text{kontrol})}}$$

3.6 Küçük RNA'ların Klonlanması

Küçük RNA klonlanması 2 amaçla yapılmıştır. miRNA sekanslarının küçük olması nedeniyle öncelikle çoğaltılan ürünlerin doğruluğunu teyit etmek amacıyla klonlama yapılmıştır. Derin sekanslama sonrası miRNA nükleotit değişimleriyle apoptoz arasında bağlantı kurabilmek için bazı miRNA'larda meydana geldiği düşünülen değişimleri deneysel olarak göstermek amacıyla klonlama yapılmıştır. Her iki amaç içinde qPCR ile çoğaltılan ürünler klonlanmıştır. qPCR analizi yukarıda ifade edildiği gibi yapılmıştır. Nükleotit değişimlerini belirlemek için kullanılan 5' ileri qPCR primerlerinin nükleotit değişim bölgelerini içermemesi sağlanmıştır.

qPCR ürünleri etanol presisipasyonu sonrası agaroz jelden pürifiye edildi (Invitrogen). 3U T4 DNA ligase (Promega), 1X T4 DNA ligase buffer (Promega), 50ng pGEM T easy vektor (Promega) ve 4,5ng DNA fragmanı ile kurulan 10µL reaksiyon oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Buz üzerinde eriyen 50µL *Escherichia coli* DH5α kompetent bakteri üzerine 5µL ligasyon reaksiyonundan bırakıldı ve 30dk buz üstünde inkübe edildi. 42°C 45sn, buz üstünde 2dk inkübe edildikten sonra üzerine 500µL SOC besi ortamı eklendi. Mavi beyaz koloni seçimi sonucunda fragman içeren beyaz kolonilerden Plazmit izolasyon kiti (Fermentas) ile plazmit izolasyonu yapıldı. Ligasyonu *EcoRI* restriksiyon kesimiyle doğrulanan klonlar İYTE Biyoteknoloji Merkezi'nde sekans analizine tabi tutuldu.

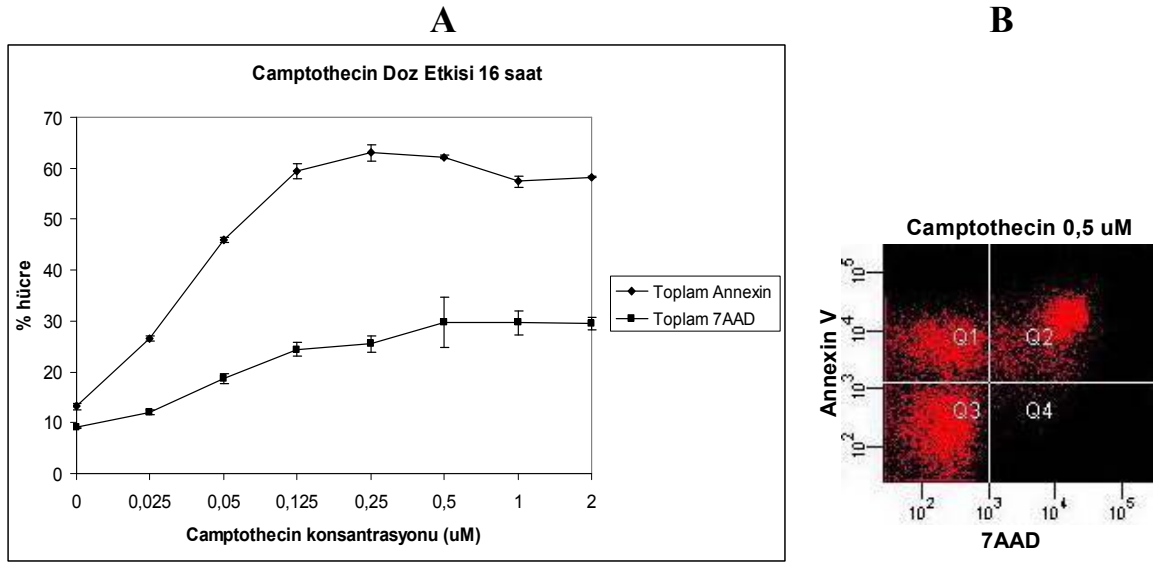
3.7 Biyoinformatik Analizlerle miRNA Hedeflerinin Belirlenmesi

Mikroarray ve derin sekans verilerinin analizi sonrası aday miRNA sekanslarının potansiyel hedef genlerini belirlemek için TargetScan programı kullanılmıştır (www.targetscan.org, LEWIS ve ark., 2005). Program yürütüldükten sonra en düşük serbest enerjiye (MFE, minimum free energy) sahip adaylar belirlenmiştir.

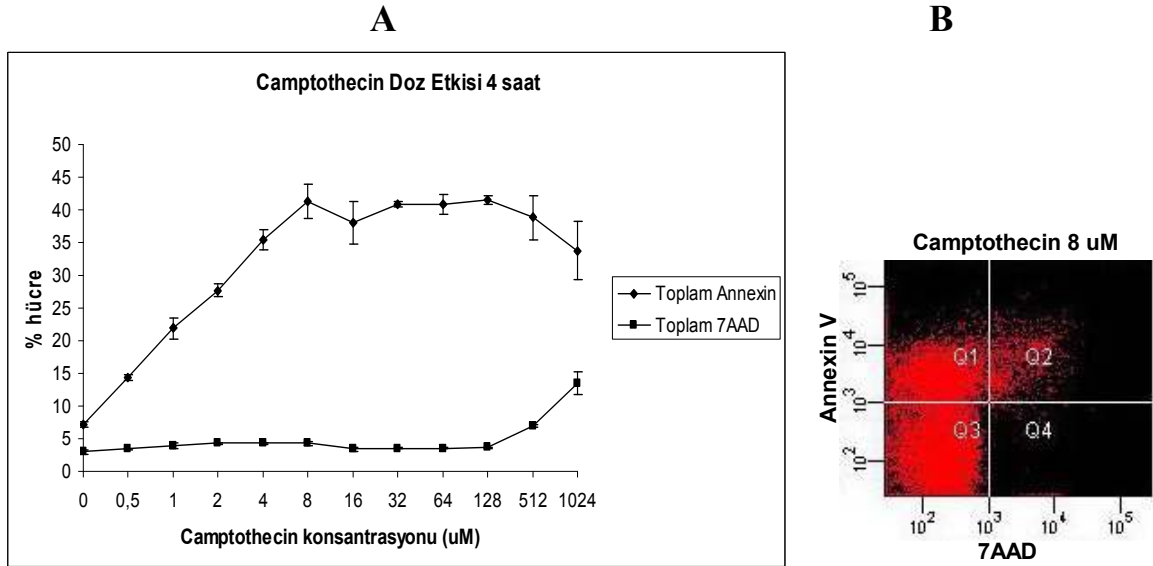
4. BULGULAR

4.1 Kamptotesin Doz ve Zaman Optimizasyonu:

Proje kapsamında Jurkat T lenfositlerinde apoptozun *erken safhasında* rol oynayan miRNA'ların tanımlanması amaçlandığından, apoptozu indüklemeye kullanılacak optimum kamptotesin konsantrasyon ve zaman aralığı tespit edilmesi gerekmektedir. Literatürdeki bilgiler doğrultusunda öncelikli olarak düşük dozlarda (0,025-2 µM arası) ve uzun zamanlı (16 saatlik) hücre kültürü denenmiştir. Annexin V (erken apoptotik hücreleri tespit etmek için) ve 7AAD (geç apoptotik hücreleri tespit etmek için) ile immunofloresan boyama yapılarak hücrelerin apoptoz oranı ve hangi apoptotik evrede oldukları akım sitometresi ile tespit edilmiştir.



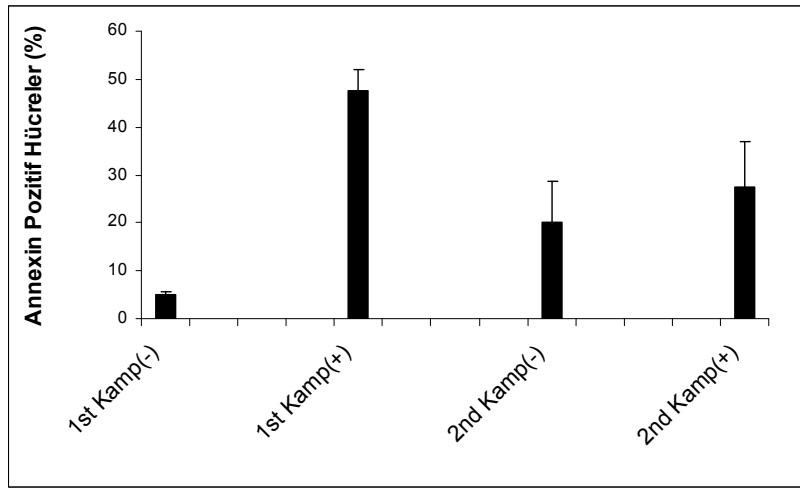
Şekil 4. Jurkat T lenfosit hücre hattında 16 saat kamptotesin doz optimizasyonu. Jurkat hücreleri 16 saat süreyle 0.025-2 µM kamptotesin ile muamele edilmiştir. Annexin V (erken apoptotik) ve 7AAD (geç apoptotik) ile immunofloresan işaretleme yapılarak akım sitometresi ile apoptoz oranları belirlenmiştir. *Panel A*, apoptoz oranları; *Panel B*, 0.5 µM kamptotesin kullanıldığında elde edilen akım sitometresi dot blot analizi. Q1, sadece annexin pozitif hücreler (erken apoptotik); Q2, hem annexin hem 7AAD pozitif hücreler; Q3, ölmeyen hücreler (Annexin ve 7AAD negatif); Q4, sadece 7AAD pozitif hücreler (geç apoptotik).



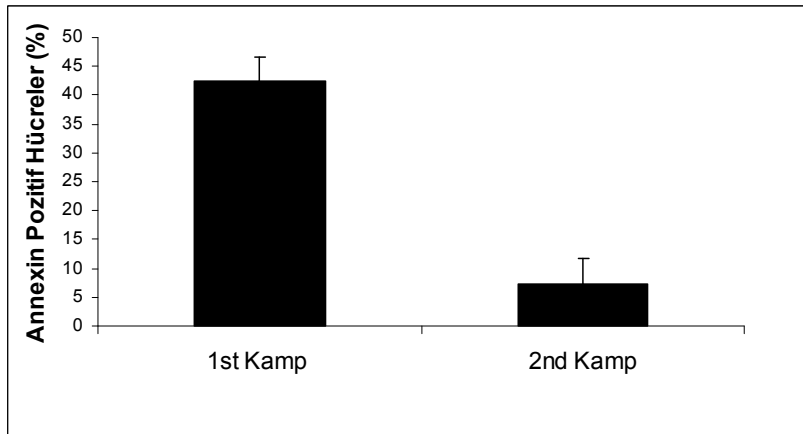
Şekil 5. Jurkat T lenfosit hücre hattında 4 saat kamptotesin doz optimizasyonu. Jurkat hücreleri 4 saat süreyle 0. 5-1024 µM kamptotesin ile muamele edilmiştir. Annexin V (erken apoptotik) ve 7AAD (geç apoptotik) ile immunofloresan işaretleme yapılarak akım sitometresi ile apoptoz oranları belirlenmiştir. *Panel A*, apoptoz oranları; *Panel B*, 8 µM kamptotesin kullanıldığında elde edilen akım sitometresi dot blot analizi. Q1, sadece annexin pozitif hücreler (erken apoptotik); Q2, hem annexin hem 7AAD pozitif hücreler; Q3, sağlıklı hücreler (Annexin ve 7AAD negatif); Q4, sadece 7AAD pozitif hücreler (geç apoptotik).

0,5 μ M kamptotesin ile 16 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek apoptoz oranı %62'ye ulaşmıştır (Şekil 4A). Kamptotesin daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında apoptoz oranının değişmediği gözlemlenmiştir. 16 saatlik inkübasyon hücrelerin apoptozun geç dönemine ulaşmasına neden olduğundan (Şekil 4B, 7AAD pozitif), hücreleri erken apoptotik evrede yakalamak için kamptotesin ile muamele zamanı kısaltılarak kullanılan doz arttırılmıştır. 0,5-1024 μ M kamptotesin kullanılarak 4 saatlik kültür yapılmıştır. 8 μ M kamptotesin ile en yüksek apoptoz oranı olan %41'e ulaşılmıştır (Şekil 5, Panel A). Şekil 5'de yer alan akım sitometrisi analizinde de görüldüğü gibi optimizasyon sonucu hücreler erken apoptotik evrede yakalanmıştır (Şekil 5, Panel B, Q1+Q2). Dolayısıyla, kamptotesin ile jurkat hücre kültüründe apoptoz indüksiyonu için optimum doz ve zaman aralığı 8 μ M ve 4 saat olarak belirlenmiştir.

A

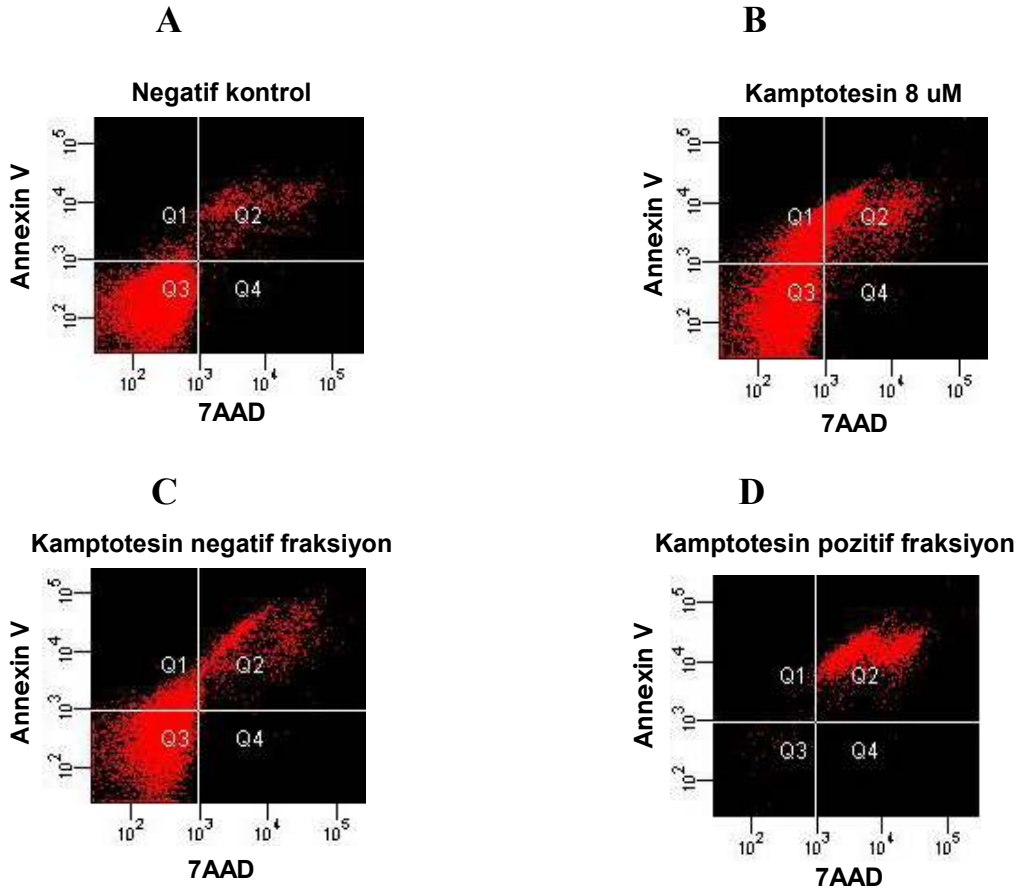


B



Şekil 6. Jurkat T hücrelerinde kamptotesin ilacına direnç analizi. A, 10 milyon hücre 8 μ M kamptotesin ile 4 saat muamele edilmiştir. 1st Kamp(-), muamele öncesi apoptoz oranı; 1st Kamp(+), muamele sonrası apoptoz oranı. Kamptotesin ile muamele edilen hücreler manyetik boncuklar ile seçildikten sonra annexin V negatif (non-apoptotik) hücrelerin yarısı 4 saat kamptotesinsiz inkübe edilirken (2nd Kamp(-)) diğer yarısı kamptotesin muamelesine tabii tutulmuştur (2nd Kamp(+)). Tüm hücrelerdeki apoptoz oranı Annexin V immunofloresan işaretleme yöntemiyle akım sitometresinde belirlenmiştir. $P < 0.0001$ (1st Kamp(-) ile 1st Kamp(+)); $P > 0.05$ (2nd Kamp(-) ile 2nd Kamp(+)). B, 1. ve 2. kamptotesin öncesi apoptoz oranları muamele sonrası oranlardan çıkarılarak elde edilen mutlak apoptoz oranları grafiğe yansıtılmıştır (1st Kamp= 1st Kamp(+)- 1st Kamp(-) ve 2nd Kamp= 2nd Kamp(+)- 2nd Kamp(-)). $P < 0.0001$.

Projenin kapsamında olmamasına rağmen, kamptotesin muamelesi sonrası ölmeyen hücrelerin durumu sorgulanmıştır. Jurkat T hücreleri bir lösemi kanser hattı olduğundan, bu hücrelerin kamptotesin ilacına dirençli olma ihtimalleri düşünülmüştür. Bu sebeple birinci kamptotesin muamelesi sonrası Variomacs manyetik parçacıkları ile ayrıştırılan ve ölmedikleri belirlenen negatif hücre topluluğu (Şekil 4B, Q3) 4 saat süreyle tekrar 8 μ M kamptotesine maruz bırakılmıştır. Şekil 5’de görüldüğü gibi, ikinci muameleye rağmen bu hücrelerin ölmedikleri ve dolayısıyla kamptotesin ilacına dirençli oldukları değerlendirilmiştir. Deneysel dizaynımız göz önüne alındığında, apoptoz pozitif fraksiyondaki mikroRNA ifade farklılıkları apoptotik mekanizmada rol oynayan mikroRNA’ları, apoptoz negatif fraksiyonlardaki mikroRNA ifade farklılıkları apoptoza dirençte rol oynayan mikroRNA’ları belirlememize yardımcı olacaktır. Bu nedenle kamptotesin muamelesi sonrası hücrelerin apoptoz negatif (JAN) ve apoptoz pozitif (JAP) olarak ayrıştırıldıktan sonra toplam RNA izolasyonuna ve mikroarray analizine karar verilmiştir.

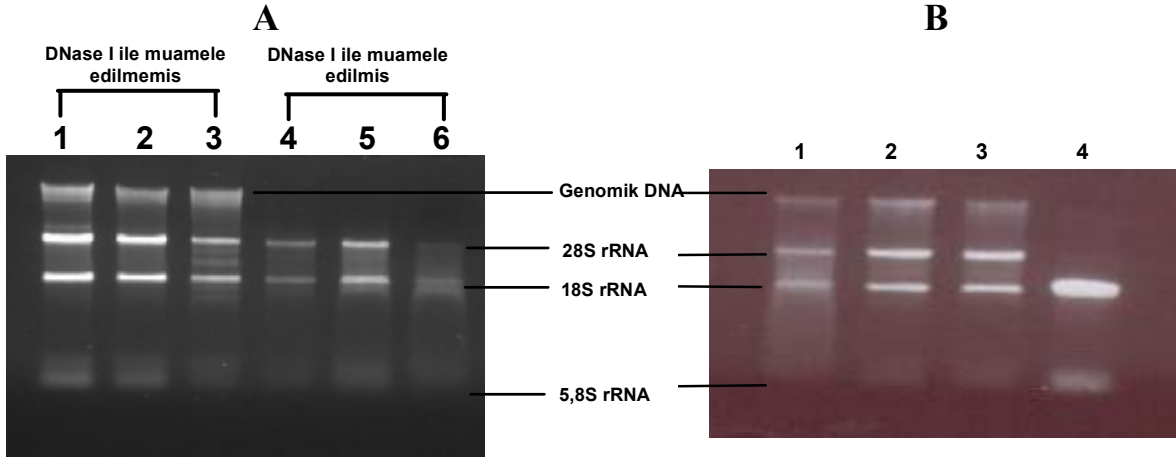


Şekil 7. Kamptotesin ile muamele edilen Jurkat T hücrelerin apoptoz oranları. 8 μ M kamptotesin ile 4 saat inkübe edilen hücreler Annexin V ile immunofloresan işaretleme yapılarak muamele öncesi (A) ve sonrası (B) apoptoz oranları belirlenmiştir. Kamptotesin ile muamele edilen hücreler (B) manyetik partikülle konjuge edilmiş Annexin boncukları kullanılarak apoptoza uğramayan negatif fraksiyon (C) ve apoptotik hücreleri içeren pozitif fraksiyon (D) olmak üzere iki gruba ayrılarak apoptotik hücreler açısından zenginleştirilmiştir. Q1, Annexin-pozitif preapoptotik hücreler; Q2, Annexin ve 7AAD-pozitif hücreler; Q3, canlı hücreler; Q4, 7AAD-pozitif geç apoptotik hücreler.

4.2 Apoptotik Hücrelerin Ayrımı ve Toplam RNA İzolasyonu

Akım sitometrisi analizi ile elde edilen verilerin gösterdiği gibi hücrelerin sadece % 40'ı (Şekil 5, Panel B, Q1+Q2) erken apoptoz evresinde bulunmaktadır. Oysaki mikroarray analizi için daha saf bir populasyon elde etmek gerekmektedir. Bunu başarmak amacıyla, 8 μ M kamptotesin (4 saat) ile apoptoza uğratılan hücreler VarioMacs manyetik hücre ayırma sistemi ve Annexin V microbead kit kullanılarak ayrıştırılmıştır. Kamptotesin muamelesi yapılmayan hücreler JNN (Şekil 7A, Jurkat negatif negatif) olarak adlandırılmıştır. Kamptotesin muamelesi sonrası manyetik kolondan geçirilen hücrelerden Annexin negatif (apoptotik olmayan canlı hücreler) hücreler JAN (Şekil 7C, Jurkat apoptoz negatif) ve Annexin pozitif (erken apoptotik evrede hücreler) hücreler JAP (Şekil 4D, Jurkat apoptoz pozitif) olarak adlandırılmıştır. Ayrıştırma sonrası her üç fraksiyondaki hücrelerin saflığı Annexin V ve 7AAD ile immunofloresan boyama yapılarak akım sitometrisinde ölçülmüştür. Şekil 7'de görüldüğü gibi ayırma sonrasında % 89 saflıkta apoptotik populasyon elde edilmiştir (Şekil 7 Panel B ile Panel D karşılaştırması). Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 biyolojik replika hazırlanmıştır.

mirVANA toplam RNA izolasyon kiti (Ambion) kullanılarak 9 numuneden toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu kit ile izole edilen toplam RNA, mikroRNA'lar dahil boyutları 200 nt'den küçük tüm RNA'ları içerdiğinden miRNA array analizi için direkt kullanılabilir. Toplam RNA örnekleri %1'lik agaroz jelde yürütüldüğünde görsel olarak RNA kaliteleri uygun görünmesine rağmen genomik DNA kontaminasyonu olduğu

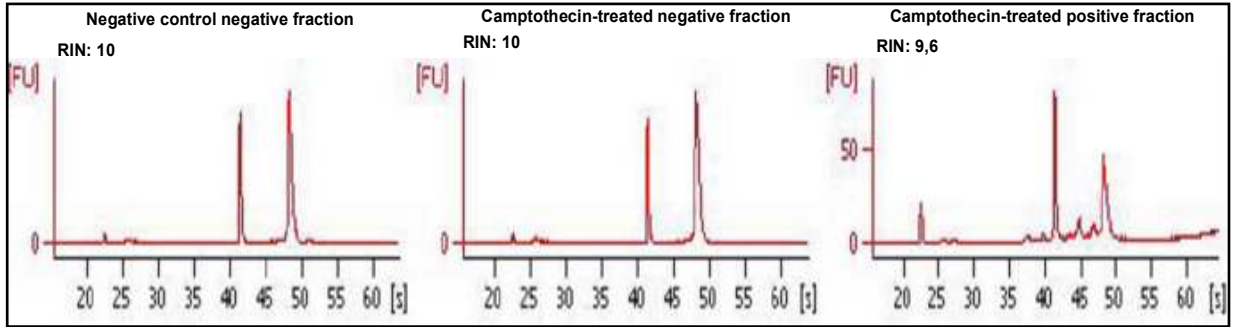


Şekil 8. Kamptotesin ile muamele edilmiş ve ayrıştırılmış Jurkat hücrelerinden toplam RNA izolasyonu. Jurkat hücreleri 4 saat süreyle 8 μ M kamptotesin ile muamele edilmiştir. Annexin V microbead kit kullanılarak hücreler annexin pozitif ve annexin negatif fraksiyonlara ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan fraksiyonlardan miRVANA kiti kullanılarak toplam RNA izole edilmiş ve %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Panel A, Sıralar 1 ve 4, kamptotesin ile muamele edilmemiş hücreler; Sıralar 2 ve 5, kamptotesin ile muamele edilmiş Jurkat hücrelerinin Annexin negatif fraksiyonları; Sıralar 3 ve 6, kamptotesin ile muamele edilmiş Jurkat hücrelerinin annexin pozitif fraksiyonları Panel B, Sıralar 1-3, Panel A'daki 1-3 ile aynıdır; Sıra 4, *Drosophila* embryo toplam RNA'sı. *Drosophila*'da 18 ve 28S rRNA'ların boyutları birbirine çok yakın olduğundan agaroz jelde tek bant olarak görünmektedirler.

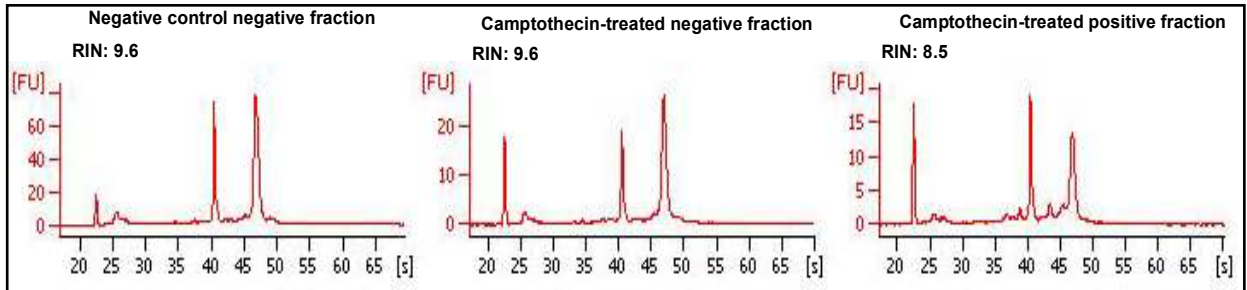
| Numune Adı | 260/280 | 260/230 | RIN |
|------------|---------|---------|-----|
| JNN1 | 1,89 | 1,73 | 9,4 |
| JNN2 | 1,85 | 1,77 | 9,8 |
| JNN3 | 1,79 | 1,8 | 8 |
| JAN1 | 1,91 | 1,96 | 10 |
| JAN2 | 1,81 | 1,97 | 9,8 |
| JAN3 | 1,87 | 2,16 | 8,6 |
| JAP1 | 1,92 | 1,82 | 10 |
| JAP2 | 1,88 | 1,82 | N/A |
| JAP3 | 1,78 | 1,84 | 8,8 |

Tablo 1. Biyolojik replikaların kalite kontrol analizi. Şekil 4’te açıklandığı gibi hazırlanan 3 grup hücreden toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. Her bir numuneden 1 µl nanodrop spektrofotometre ile analiz edilerek 230, 260 ve 280 nm dalgaboyunda abzorans değerleri okunmuştur. Ayrıca 1 µl örnek bioanalizer ile incelenmiştir. Bioanalizer elektroferogramları Şekil 6’da sunulmuştur. JNN, kamptotesin ile muamele edilmemiş negatif kontrol; JAN, kamptotesin ile muamele edilmiş örneklerin ayrıştırma sonrası negatif fraksiyonu; JAP, kamptotesin ile muamele edilmiş örneklerin ayrıştırma sonrası apoptotik fraksiyonu. 1, 2 ve 3, replika sayısı. RIN, RNA integrity number. N/A, değer tespit edilemedi.

A



B



Şekil 9. Jurkat hücrelerinden izole edilen toplam RNA’ların bioanalizer ile kalite kontrol analizi. Tablo 1’de açıklandığı gibi hazırlanan biyolojik replikalar “RNA Nano Kit” kullanılarak Bioanalizer aletinde kalite kontrolüne tabi tutulmuştur. A, DNase muamelesi öncesi kalite kontrol analizi; B, DNase muamelesi sonrası array analizine gönderilen numunelerin kalite kontrol analizi. 22, 42 ve 49 saniye elusyon değerlerine denk gelen pikler sırasıyla tRNA, 18S rRNA ve 28S rRNA piklerini göstermektedir. FU, Floresan ünitesi.

tespit edilmiştir (Şekil 8A, Sıralar 1-3). Hücre hattına spesifik olduğunu daha önce tespit ettiğimiz genomik DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için Turbo DNase (Ambion) muamelesi yapılmış ve agaroz jelde tekrar yürütülmüştür (Şekil 8A, Sıralar 4-6). Genomik DNA kontaminasyonun teknik veya deneysel bir hatadan kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek için, aynı numune seti ile beraber *Drosophila* embryosundan da toplam RNA izole edildiğinde, bu numunede böyle bir kontaminasyon gözlenmemiştir (Şekil 8, Panel B, Sıra 4).

Genomik DNA kontaminasyonu minimuma indirilen numunelerin array analizinde kullanılabilmesi için RNA kalite kontrolünü geçmesi gerekmektedir. Birinci aşama kalite kontrolünde Nanodrop spektrofotometre ile A260/230 ve A260/280 oranları tespit edilmiştir (Tablo 1). Bu aşamada kalite kontrolünü geçen numuneler Bioanalyzer aletinde yürütülerek ikinci aşama kalite kontrolüne tabi tutulmuştur. Şekil 9'da görüldüğü gibi, tüm numunelerin RNA Integrity Number (RIN) numaraları 0-10 skalasında minimum kriter kabul edilen 7 ve üzerindedir.

4.3 Mikroarray ile miRNA Profilinın Çıkartılması

Genomik DNA kontaminasyonu minimuma indirilen ve RNA kalite kontrolünü geçen 3 replika mikroarray analizine tabi tutulmuştur (Febit, Almanya). Herbir çip Sanger miRBase versiyon 12.0'da belirtilen miRNA problemlerini içermiştir. Scatter plot analizi, replikalar arası Pearson korrelasyon değerlerinin 0.871 ile 0.989 arasında değiştiğini dolayısıyla replikaların güvenilirliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermiştir. kNN ve varyans normalizasyon sonrası miRNA'lar var/yok kriterine göre filtre edilmiş ve t-test'inden geçen ($P < 0,05$) ve ifade edilen miRNA'lar tespit edilmiştir.

| JNN-JAP karşılaştırması | |
|--------------------------------|---------|
| JAP'ta artan miRNA'lar | 35 adet |
| JAP'ta azalan miRNA'lar | 59 adet |
| JNN-JAN karşılaştırması | |
| JAN'da artan miRNA'lar | 4 adet |
| JAN'da azalan miRNA'lar | 27 adet |
| JAN-JAP karşılaştırması | |
| JAP'da artan miRNA'lar | 60 adet |
| JAP'da azalan miRNA'lar | 66 adet |

Tablo 2. Kamptotesin ile muamele edilen Jurkat T hücre fraksiyonlarında farklı ifade edilen miRNA'ların Özeti. 8 μ M kamptotesin ile 4 saat muamele edilen hücreler Annexin V konjuge manyetik partiküller ile ayrıştırılmıştır. İzole edilen toplam RNA ile mikroarray analizi yapılmıştır (Febit, Almanya). Normalizasyon sonrası fraksiyonlar arasında 1.8 kattan fazla ($P < 0,05$) farklı ifade edilen miRNA'lar belirlenmiştir. JNN, kamptotesin ile muamele edilmemiş kontrol hücreler; JAN, kamptotesin ile muamele edilen ancak apoptoza uğramayan (Annexin negatif) hücreler; JAP, kamptotesin ile muamele edilmiş apoptotik (Annexin pozitif) hücreler. Farklı ifade edilen mikroRNA'ların isimleri ifade farklılıkları (FC) bir sonraki sayfalarda belirtilmiştir.

| JAN-JAP KARŞILAŞTIRMASI | | | |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| JAP'da Azalanlar | | | |
| miRNA | mean JAN | mean JAP | FC JAP/JAN |
| hsa-miR-363 | 66,17460317 | 8,380952381 | 0,126649077 |
| hsa-miR-185 | 141,3968254 | 18,95238095 | 0,134036821 |
| hsa-miR-210 | 128,6031746 | 17,33333333 | 0,134781535 |
| hsa-miR-361-5p | 72,25396827 | 10 | 0,138400703 |
| hsa-miR-720 | 67,38095238 | 10 | 0,148409894 |
| hsa-miR-130a | 59,46031746 | 10 | 0,168179391 |
| hsa-miR-128 | 97,76190479 | 16,47619048 | 0,168533853 |
| hsa-miR-106b | 529,984127 | 89,61904763 | 0,169097607 |
| hsa-miR-18b | 93,53968254 | 16 | 0,171050399 |
| hsa-miR-25 | 190,3650794 | 32,98412698 | 0,17326774 |
| hsa-miR-425 | 116,8888889 | 20,36507937 | 0,174225964 |
| hsa-miR-29c | 55,92063492 | 10 | 0,178824865 |
| hsa-miR-15a | 100,4444444 | 18,25396825 | 0,181731985 |
| hsa-miR-7 | 141,4603175 | 25,80952381 | 0,182450628 |
| hsa-miR-22 | 54,23809524 | 10 | 0,184372256 |
| hsa-miR-23b | 51,65079365 | 9,634920635 | 0,186539644 |
| hsa-miR-18a | 260,7777778 | 48,73015873 | 0,18686469 |
| hsa-miR-19b | 446,9523809 | 86,15873017 | 0,192769373 |
| hsa-miR-182 | 308,8571429 | 60,15873017 | 0,194778497 |
| hsa-miR-107 | 814,4444444 | 172,4126984 | 0,211693627 |
| hsa-miR-130b | 1319,36508 | 282,8253968 | 0,214364774 |
| hsa-miR-378 | 236,7619048 | 51,7142857 | 0,21842317 |
| hsa-miR-103 | 1261,047619 | 309,1111111 | 0,245122473 |
| hsa-miR-191 | 2035,142857 | 529,1587303 | 0,260010607 |
| hsa-miR-93 | 1312,444445 | 346,3174603 | 0,263872091 |
| hsa-miR-16 | 7689,904762 | 2064,253968 | 0,26843687 |
| hsa-miR-20b | 1778,603174 | 502,5873017 | 0,282574162 |
| hsa-miR-26a | 683,5238095 | 198,0952381 | 0,289814686 |
| hsa-miR-181a | 924,9206351 | 276,5555556 | 0,299004634 |
| hsa-miR-20a | 3060,190476 | 930,6031746 | 0,304099755 |
| hsa-miR-92a | 736,8571429 | 224,1269841 | 0,304166128 |
| hsa-miR-582-5p | 155,1428572 | 48,80952381 | 0,31461019 |
| hsa-miR-422a | 74,84126984 | 23,74603175 | 0,31728526 |
| hsa-miR-15b | 579,015873 | 184,0634921 | 0,317890235 |
| hsa-miR-324-5p | 20,57142857 | 6,761904762 | 0,328703704 |
| hsa-miR-200c | 30,36507937 | 10 | 0,329325666 |
| hsa-miR-17 | 3802,984127 | 1271,492064 | 0,334340618 |
| hsa-miR-222 | 29,31746032 | 10 | 0,341093665 |
| hsa-miR-320d | 1051,460318 | 385,0476191 | 0,366202711 |
| hsa-miR-886-5p | 63,23809524 | 23,49206349 | 0,371485944 |
| hsa-miR-98 | 100,063492 | 37,6984127 | 0,376744924 |
| hsa-miR-221 | 90,36507937 | 34,71428571 | 0,384155981 |
| hsa-miR-106a | 4751,904762 | 1847,936508 | 0,388883322 |
| hsa-miR-181b | 1437,904762 | 602,0952381 | 0,418730958 |
| hsa-let-7f | 2254,476191 | 1016,952381 | 0,451081446 |
| hsa-miR-532-5p | 22,04761905 | 10 | 0,453563715 |
| hsa-miR-1227 | 18,0952381 | 8,380952381 | 0,463157895 |
| hsa-miR-195 | 21,28571428 | 10 | 0,469798658 |

| | | | |
|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| hsa-let-7d | 5574,222222 | 2690,634921 | 0,482692439 |
| hsa-let-7b | 1885,301587 | 919,8730158 | 0,487918231 |
| hsa-miR-425* | 53,22222222 | 26,19047619 | 0,49209663 |
| hsa-miR-342-3p | 770,5079365 | 379,9047619 | 0,493057558 |
| hsa-miR-1280 | 18,1984127 | 9,095238095 | 0,499781945 |
| hsa-let-7i | 956,793651 | 478,2857143 | 0,499883871 |
| hsa-miR-30d | 163,015873 | 81,8888889 | 0,502336904 |
| hsa-miR-19a | 19,34920635 | 10 | 0,516817063 |
| hsa-miR-320b | 1941,809524 | 1009,793651 | 0,520027139 |
| hsa-miR-1274b | 19,15873016 | 10 | 0,521955261 |
| hsa-let-7e | 268,9206349 | 140,9365079 | 0,524082163 |
| hsa-miR-140-3p | 18,87301587 | 10 | 0,529857023 |
| | | | |
| JAP'da Artanlar | | | |
| miRNA | mean JAN | mean JAP | FC JAP/JAN |
| hsa-miR-572 | 23,98412699 | 43,23809524 | 1,802779616 |
| hsa-miR-298 | 193,9365079 | 353,9047619 | 1,824848584 |
| hsa-miR-1207-5p | 2360,126984 | 4337,238095 | 1,837713871 |
| hsa-miR-483-5p | 1388,063492 | 2583,365079 | 1,8611289 |
| hsa-miR-575 | 16,3968254 | 30,79365079 | 1,87802517 |
| hsa-miR-671-5p | 221,5555556 | 417,6190476 | 1,884940536 |
| hsa-miR-198 | 508,2857143 | 989,3333335 | 1,946411842 |
| hsa-miR-551b* | 236,5714286 | 465,1746032 | 1,966317767 |
| hsa-miR-150* | 341,3333334 | 673,0476191 | 1,971819196 |
| hsa-miR-675 | 97,1904762 | 192,7936508 | 1,983668136 |
| hsa-miR-638 | 3583,587301 | 7139,873016 | 1,992381493 |
| hsa-miR-135a* | 893,7777779 | 1793,460317 | 2,006606521 |
| hsa-miR-1915 | 1334,349207 | 2684,857143 | 2,01210982 |
| hsa-miR-223 | 150,2698413 | 303,2857143 | 2,018274004 |
| hsa-miR-1268 | 669,7777778 | 1387,365079 | 2,071381173 |
| hsa-miR-133b | 27,96825397 | 59,55555556 | 2,129398411 |
| hsa-miR-885-3p | 150,4603174 | 321,6507936 | 2,137778247 |
| hsa-miR-1225-3p | 42,65079365 | 91,20634922 | 2,138444362 |
| hsa-miR-1237 | 56,04761905 | 119,8571429 | 2,13848768 |
| hsa-miR-608 | 11,86507937 | 25,3968254 | 2,140468227 |
| hsa-miR-191* | 132,1904762 | 283,2063492 | 2,142411143 |
| hsa-miR-370 | 179,7777778 | 388,7936508 | 2,162634646 |
| hsa-miR-1913 | 50,50793651 | 112,6825397 | 2,230986801 |
| hsa-miR-1202 | 23,96825397 | 56,63492063 | 2,362913907 |
| hsa-miR-1292 | 118 | 279,7142857 | 2,370460049 |
| hsa-miR-486-5p | 14,9047619 | 35,50793651 | 2,382321619 |
| hsa-miR-767-3p | 11,82539683 | 29,04761905 | 2,456375839 |
| hsa-miR-1238 | 50,93650794 | 125,1825397 | 2,457619196 |
| hsa-miR-409-3p | 205,984127 | 509,5238095 | 2,473607151 |
| hsa-miR-939 | 153,3650793 | 380,3650794 | 2,480128338 |
| hsa-miR-1224-5p | 261,4920635 | 658,4761905 | 2,518149812 |
| hsa-miR-296-3p | 592,2222222 | 1499,142857 | 2,531385688 |
| hsa-miR-658 | 459,6825397 | 1172,15873 | 2,549930939 |
| hsa-miR-921 | 242,6666667 | 640,9523808 | 2,641287284 |
| hsa-miR-1228 | 49,47619048 | 131,3492063 | 2,654796278 |
| hsa-miR-1249 | 86,44444444 | 230,1428571 | 2,66232097 |

| | | | |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| hsa-miR-296-5p | 102,8571428 | 278,6031746 | 2,708641976 |
| hsa-miR-625* | 147,5238095 | 402,0317461 | 2,725199054 |
| hsa-miR-361-3p | 181,7777778 | 497,5873016 | 2,737338456 |
| hsa-miR-1182 | 423,3650794 | 1162,603175 | 2,74610078 |
| hsa-miR-665 | 226,0952381 | 626,0952381 | 2,769165965 |
| hsa-miR-518b | 66,06349207 | 186,9365079 | 2,829649207 |
| hsa-miR-1908 | 1313,777778 | 3721,396825 | 2,832592306 |
| hsa-miR-550 | 85,98412698 | 245,2063492 | 2,851762968 |
| hsa-miR-1226* | 33,93650794 | 97,00000001 | 2,858278766 |
| hsa-miR-611 | 26,11111111 | 74,96825396 | 2,87112462 |
| hsa-miR-129* | 10,42857143 | 30,14285714 | 2,890410958 |
| hsa-miR-634 | 42,57142857 | 124,5714286 | 2,926174497 |
| hsa-miR-1469 | 1142,31746 | 3344,031746 | 2,927410166 |
| hsa-miR-25* | 43,23809524 | 128,6349206 | 2,975036711 |
| hsa-miR-659 | 273,6507937 | 815,7460319 | 2,980974478 |
| hsa-miR-92b* | 736,2222222 | 2242,31746 | 3,045707386 |
| hsa-miR-1228* | 1135,777778 | 3652,825397 | 3,21614445 |
| hsa-miR-371-5p | 35 | 114,1587301 | 3,261678004 |
| hsa-miR-936 | 344,6666667 | 1199,238095 | 3,479414203 |
| hsa-miR-933 | 10 | 35,50793651 | 3,550793651 |
| hsa-miR-654-5p | 10 | 36,42857143 | 3,642857143 |
| hsa-miR-663 | 814,5714284 | 3075,52381 | 3,775634281 |
| hsa-miR-133a | 22,23809524 | 86,7936508 | 3,902926481 |
| hsa-miR-1236 | 17,68253968 | 70,66666666 | 3,996409335 |
| hsa-miR-30c-1* | 14,82539683 | 59,6984127 | 4,026766595 |
| hsa-miR-557 | 15,03174603 | 61,17460316 | 4,069693769 |
| hsa-miR-202 | 11,93650794 | 48,73015873 | 4,082446809 |
| hsa-miR-940 | 80,28571428 | 396 | 4,932384342 |
| hsa-miR-498 | 8,587301586 | 43,76190476 | 5,0961183 |
| hsa-miR-1909 | 33,84126984 | 188,8571428 | 5,580675421 |
| JNN-JAN KARŞILAŞTIRMASI | | | |
| JAN'da Azalanlar | | | |
| miRNA | mean JNN | mean JAN | FC JAN/JNN |
| hsa-miR-363* | 33,25714286 | 11,6952381 | 0,351660939 |
| hsa-miR-498 | 24,51428572 | 8,933333334 | 0,364413364 |
| hsa-miR-1202 | 68,71428572 | 27,04761905 | 0,393624394 |
| hsa-miR-371-5p | 74,05714286 | 40,32380952 | 0,544495885 |
| JAN'da Artanlar | | | |
| miRNA | mean JNN | mean JAN | FC JAN/JNN |
| hsa-miR-298 | 125 | 228,1142857 | 1,824914286 |
| hsa-miR-575 | 10 | 18,36190476 | 1,836190476 |
| hsa-miR-1225-3p | 26,51428572 | 49,16190476 | 1,854166666 |
| hsa-miR-634 | 26,02857143 | 48,55238095 | 1,865349433 |
| hsa-miR-130a | 38,94285715 | 72,81904763 | 1,86989484 |
| hsa-miR-181a | 584,7428572 | 1100,419048 | 1,881885403 |
| hsa-miR-15b | 354,5714286 | 708,9142857 | 1,999355358 |
| hsa-miR-1280 | 10 | 20,22857143 | 2,022857143 |
| hsa-miR-140-3p | 10 | 20,76190476 | 2,076190476 |
| hsa-miR-1274b | 10 | 21,2 | 2,12 |
| hsa-miR-196b | 64,4 | 138,7047619 | 2,153800651 |

| | | | |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| hsa-miR-98 | 51,6 | 119,5809524 | 2,317460318 |
| hsa-miR-1913 | 24,65714286 | 58,7047619 | 2,380842024 |
| hsa-miR-195 | 10 | 24,22857143 | 2,422857143 |
| hsa-miR-532-5p | 10 | 24,57142857 | 2,457142857 |
| hsa-miR-1234 | 5,514285715 | 13,79047619 | 2,500863558 |
| hsa-miR-361-5p | 31,88571429 | 85,61904761 | 2,685185185 |
| hsa-miR-1307 | 10 | 27,82857143 | 2,782857143 |
| hsa-miR-324-3p | 13,75714286 | 40,19047619 | 2,921426098 |
| hsa-miR-222 | 10 | 33,6952381 | 3,36952381 |
| hsa-miR-200c | 10 | 34,4 | 3,44 |
| hsa-miR-582-5p | 49,45714286 | 185,7142857 | 3,755054882 |
| hsa-miR-363 | 20,51428572 | 81,46666665 | 3,971216341 |
| hsa-miR-1227 | 4,742857143 | 20,09523809 | 4,236947791 |
| hsa-miR-128 | 22,85714286 | 116,4380953 | 5,094166668 |
| hsa-miR-22 | 10 | 65,56190477 | 6,556190477 |
| hsa-miR-23b | 8,6 | 62,53333333 | 7,271317829 |
| JNN-JAP KARŞILAŞTIRMASI | | | |
| JAP'da Azalanlar | | | |
| miRNA | mean JNN | mean JAP | FC JAP/JNN |
| hsa-miR-18b | 87,65714285 | 10,64761905 | 0,121468927 |
| hsa-miR-7 | 129,0857143 | 16,76190476 | 0,129850967 |
| hsa-miR-18a | 256,1142857 | 34,05714286 | 0,13297635 |
| hsa-miR-210 | 83,05714286 | 11,56190476 | 0,13920422 |
| hsa-miR-185 | 88,68571429 | 12,4 | 0,139819588 |
| hsa-miR-19b | 404,9714286 | 65,4857143 | 0,161704529 |
| hsa-miR-106b | 417,0857143 | 68,6857143 | 0,164680093 |
| hsa-miR-130b | 990,5714288 | 204,9333333 | 0,206883953 |
| hsa-miR-20b | 1715,428572 | 362,8380952 | 0,211514546 |
| hsa-miR-15a | 56,82857143 | 12,26666667 | 0,215853863 |
| hsa-miR-107 | 597,2571429 | 139,7714286 | 0,234022197 |
| hsa-miR-16 | 7010,742857 | 1642,057143 | 0,234220136 |
| hsa-miR-20a | 2993,085715 | 708,8761903 | 0,236837918 |
| hsa-miR-103 | 924,4571429 | 225,0857143 | 0,243478798 |
| hsa-miR-25 | 84,34285715 | 21,48571429 | 0,254742547 |
| hsa-miR-720 | 38,45714286 | 10 | 0,260029718 |
| hsa-miR-93 | 929,4857142 | 250,2285714 | 0,269211853 |
| hsa-miR-106a | 5154,4 | 1421,447619 | 0,275773634 |
| hsa-miR-26a | 520,9142857 | 151,4857143 | 0,290807372 |
| hsa-miR-182 | 149,6 | 45,14285713 | 0,301757066 |
| hsa-miR-886-5p | 48,6 | 14,87619048 | 0,306094454 |
| hsa-miR-17 | 3169,257143 | 975,7714285 | 0,307886481 |
| hsa-miR-191 | 1178,914286 | 402,5904762 | 0,341492576 |
| hsa-miR-425 | 37,4 | 13,39047619 | 0,358034123 |
| hsa-miR-378 | 103,9428571 | 38,55238095 | 0,370899762 |
| hsa-miR-29c | 26,17142857 | 10 | 0,38209607 |
| hsa-miR-320d | 668,9142857 | 292,6476191 | 0,437496441 |
| hsa-miR-92a | 362,5714286 | 166,8571429 | 0,460204886 |
| hsa-miR-425* | 36,42857143 | 17,40952381 | 0,477908497 |
| hsa-miR-130a | 20,14285715 | 10 | 0,496453901 |
| hsa-let-7f | 1542,342857 | 772,3047618 | 0,500734813 |
| hsa-let-7e | 206,8571429 | 104,6095238 | 0,505709024 |

| | | | |
|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| hsa-miR-181a | 373,7714286 | 200,7809524 | 0,537175763 |
| hsa-let-7i | 644,8 | 348,8 | 0,540942928 |
| hsa-miR-320c | 1264,228572 | 688,8380953 | 0,544868318 |
| | | | |
| JAP'ta Artanlar | | | |
| miRNA | mean JNN | mean JAP | FC JAP/JNN |
| hsa-miR-877 | 385,6571429 | 700,3428571 | 1,815972737 |
| hsa-miR-129* | 10 | 18,89523809 | 1,889523809 |
| hsa-miR-1224-5p | 249,8285714 | 484,2666667 | 1,938395853 |
| hsa-miR-498 | 13,08571429 | 25,44761905 | 1,944687045 |
| hsa-miR-638 | 3278 | 6391,961905 | 1,949957872 |
| hsa-miR-1908 | 1518,628571 | 2967,961905 | 1,954369857 |
| hsa-miR-767-3p | 10 | 19,63809524 | 1,963809524 |
| hsa-miR-572 | 12,34285715 | 25,14285714 | 2,037037037 |
| hsa-miR-423-5p | 223,0857143 | 456,7619047 | 2,047472677 |
| hsa-miR-296-3p | 568,7428572 | 1167,314286 | 2,052446498 |
| hsa-miR-671-5p | 159,3714286 | 327,7714285 | 2,056651129 |
| hsa-miR-575 | 10 | 20,64761905 | 2,064761905 |
| hsa-miR-658 | 434,1142857 | 907,7333335 | 2,091000834 |
| hsa-miR-675 | 67,4 | 141,5238095 | 2,099759785 |
| hsa-miR-371-5p | 34,62857143 | 73,92380952 | 2,134763476 |
| hsa-miR-1228* | 1326,685714 | 2847,733333 | 2,146501845 |
| hsa-miR-1915 | 1010,171428 | 2176,495238 | 2,154580081 |
| hsa-miR-518b | 63,31428572 | 138,1523809 | 2,182009627 |
| hsa-miR-1308 | 2708,4 | 5911,92381 | 2,182810445 |
| hsa-miR-150* | 218,9714286 | 494,4 | 2,25782881 |
| hsa-miR-659 | 267,8857143 | 609,9809524 | 2,27701934 |
| hsa-miR-486-5p | 10,14285715 | 23,18095238 | 2,285446009 |
| hsa-miR-665 | 198,3428572 | 458,2857143 | 2,310573322 |
| hsa-miR-933 | 10 | 23,18095238 | 2,318095238 |
| hsa-miR-1182 | 383,8285714 | 904,4190475 | 2,35630986 |
| hsa-miR-654-5p | 10 | 23,6 | 2,36 |
| hsa-miR-550 | 76,45714288 | 182,2095238 | 2,383158943 |
| hsa-miR-939 | 117,6 | 282,6285714 | 2,403304179 |
| hsa-miR-625* | 126,9142857 | 307,6571428 | 2,424133273 |
| hsa-miR-936 | 383,8285714 | 942,2476192 | 2,454865764 |
| hsa-miR-92b* | 725,7142858 | 1819,542857 | 2,507244094 |
| hsa-miR-1238 | 33,77142857 | 84,92380951 | 2,51466441 |
| hsa-miR-1249 | 65,34285714 | 172,2857143 | 2,636641889 |
| hsa-miR-921 | 182,4571429 | 484,1904762 | 2,653721683 |
| hsa-miR-361-3p | 133,6571429 | 369,7904762 | 2,76670942 |
| hsa-miR-133b | 15,77142857 | 44,03809523 | 2,792270531 |
| hsa-miR-453 | 136,7714286 | 393,3714286 | 2,876122833 |
| hsa-miR-1469 | 929,1428572 | 2673,6 | 2,877490775 |
| hsa-miR-1226* | 21,01428571 | 60,93333333 | 2,899614775 |
| hsa-miR-1227 | 2,571428572 | 7,580952381 | 2,948148148 |
| hsa-miR-1236 | 15,42857143 | 46,83809523 | 3,035802469 |
| hsa-miR-1225-5p | 90,62857144 | 303,3523809 | 3,347204707 |
| hsa-miR-202 | 10 | 34,05714286 | 3,405714286 |
| hsa-miR-1228 | 26,88571429 | 92,8952381 | 3,455189515 |
| hsa-miR-940 | 85,4 | 304,7619047 | 3,568640571 |

| | | | |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| hsa-miR-296-5p | 57,85714286 | 211,4666667 | 3,654979424 |
| hsa-miR-30c-1* | 10,37142857 | 38,51428571 | 3,713498623 |
| hsa-miR-557 | 10,6 | 40,19047619 | 3,791554358 |
| hsa-miR-611 | 13,42857143 | 53,8095238 | 4,007092198 |
| hsa-miR-298 | 63,77142857 | 257,2761905 | 4,034348865 |
| hsa-miR-1225-3p | 12,54285714 | 55,80952381 | 4,449506455 |
| hsa-miR-25* | 20,91428572 | 94,6857143 | 4,527322405 |
| hsa-miR-324-3p | 5,828571431 | 26,96190476 | 4,625816992 |
| hsa-miR-196b | 28,91428572 | 137,4095238 | 4,752305666 |
| hsa-miR-133a | 10,97142857 | 53,69523809 | 4,894097223 |
| hsa-miR-663 | 448,5714286 | 2460,533333 | 5,485265392 |
| hsa-miR-1913 | 13,02857143 | 74,66666667 | 5,730994153 |
| hsa-miR-1909 | 23,02857143 | 140,1142857 | 6,084367245 |
| hsa-miR-634 | 12,91428571 | 85,52380951 | 6,622418878 |

Tablo 3. Kamptotesin ile muamele edilen Jurkat T hücre fraksiyonlarında farklı ifade edilen miRNA'ların Ayrıntılı Listesi. 8 µM kamptotesin ile 4 saat muamele edilen hücreler Annexin V konjuge manyetik partiküller ile ayrıştırıldıktan sonra toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen toplam RNA ile mikroarray analizi yapılmıştır (Febit, Almanya). Normalizasyon sonrası fraksiyonlar arasında 1.8 kattan fazla (P< 0.05) farklı ifade edilen miRNA'lar belirlenmiştir. Mean, üç biyolojik replikanın ortalama floresan ünitesi; JNN, kamptotesin ile muamele edilmemiş kontrol hücreler; JAN, kamptotesin ile muamele edilen ancak apoptoza uğramayan (Annexin negatif) hücreler; JAP, kamptotesin ile muamele edilmiş apoptotik (Annexin pozitif) hücreler. FC, İki fraksiyon baz alındığında ilgili miRNA ifade oranı.

| | miRNA İfade Oranı | | |
|-----------|-------------------|---------|-------------------|
| | qPCR | Array | Array Yeni Analiz |
| | JAN/JNN | JAN/JNN | FC JAN/JNN |
| mir7 | 0,17 | 0,18 | 0,81 |
| mir25 | 0,19 | 0,17 | 1,50 |
| mir93 | 0,20 | 0,26 | 1,07 |
| mir196b | 0,08 | 1,59 | 2,15 |
| mir611 | 0,23 | 2,87 | 1,18 |
| mir370 | 0,24 | 2,16 | 0,71 |
| mir363 | 0,16 | 0,13 | 3,97 |
| mir582-5p | 0,22 | 0,31 | 3,76 |
| | JAP/JNN | JAP/JNN | FC JAP/JNN |
| mir7 | 0,38 | 0,13 | 0,13 |
| mir25 | 0,29 | 0,25 | 0,25 |
| mir93 | 0,30 | 0,27 | 0,27 |
| mir196b | 0,99 | 4,75 | 4,75 |
| mir611 | 0,49 | 4,01 | 4,01 |
| mir370 | 2,71 | 1,54 | 1,54 |
| mir363 | 0,30 | 0,72 | 0,72 |
| mir582-5p | 3,89 | 1,14 | 1,14 |

Tablo 4. Kamptotesin ile indüklenen apoptozda rol oynayan miRNA'ların qPCR ile doğrulanması. Kamptotesin muamelesi Tablo 1'de belirtildiği gibi yapıldıktan sonra fraksiyonlara ayrılan hücrelerden 200 nt'ten küçük RNA'lar izole edilmiştir. Hazırlanan cDNA'den qPCR analizi yapılmıştır. U6 küçükRNA'sı endojen kontrol olarak kullanılarak fraksiyonlar arası miRNA ifade farklılıkları belirlenmiştir. JNN, kamptotesin ile muamele edilmemiş kontrol hücreler; JAN, kamptotesin ile muamele edilen ancak apoptoza uğramayan (Annexin negatif) hücreler; JAP, kamptotesin ile muamele edilmiş apoptotik (Annexin pozitif) hücreler. qPCR, qPCR datası; Array, mikroarray datasının ilk analiz sonucu; Array update, mikroarray datasının yeniden analiz sonucu.

Her üç fraksiyonda ifade edildiği tespit edilen miRNA'lar 3 karşılaştırmaya tabii tutulmuştur (1) JNN-JAP; (2) JNN-JAN ve (3) JAN-JAP. JNN-JAP karşılaştırması sonrası apoptotik JAP hücrelerinde 35 miRNA'nın ifadesinde artış 59 miRNA'nın ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Kamptotesine dirençte rol oynayan miRNA'ları tespit etmemizi sağlayan JNN-JAN karşılaştırması JAN hücrelerinde 27 adet miRNA'nın ifadesinin baskılandığını göstermiştir. JAN-JAP karşılaştırması yapıldığında, JAP hücrelerinde 60 adet miRNA'nın miktarında artış 66 miRNA'nın ifadesinde azalma gözlemlenmiştir. Bu karşılaştırmalar sonucu farklı ifade edildiği belirlenen miRNA'ların sayısı Tablo 2'de, ilgili miRNA'ların detaylı değerleri Tablo 3'de sunulmuştur.

4.4 Mikroarray Sonuçlarının qPCR ile Doğrulanması

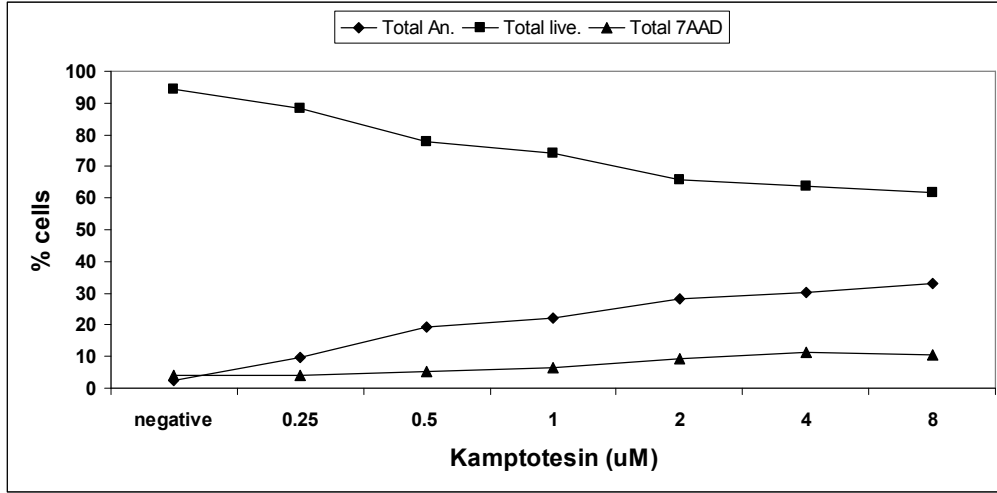
Array sonuçlarının bağımsız ikinci bir metot olan qPCR ile doğrulanması için öncelikli olarak ifade farklılığı yüksek ve *P* değerleri 0.05'ten küçük 7 adet miRNA aday olarak seçilmiştir. miRNA ifadelerini qPCR ile tespit etmek için cDNA hazırlanmasında toplam RNA yerine küçük RNA (200 nt'ten küçük, miRNA tarafından zenginleştirilmiş) kullanılması önerildiğinden, kamptotesin ile muamele sonrası 3 fraksiyona ayrıştırılan hücrelerden küçük RNA'lar elde edilmiştir. Poliakrilamid jelde görüntülemek için gerekli 200 ng küçük RNA'yı elde etmek çok pahalıya mal olduğundan toplam RNA kalitesi, küçük RNA nanodrop spektrofotometre değerleri ve qPCR'ın çalışması bu RNA'ların kalitesi için referans olarak alınmıştır. Hazırlanan RNA'lardan cDNA yapılarak miRNA ifadeleri qPCR ile belirlenmiştir (Tablo 4). Ancak qPCR sonuçları ile array sonuçları arasında bir tutarsızlık olduğu gözlemlenmiştir.

Bu uyumsuzluğu araştırmak için iki yol izlenmiştir. Öncelikli olarak, mikroarray datasına göre anlamlı olan miRNA'ların kamptotesin dozuna bağlı olarak ifadelerinde değişiklik olup olmadığı test edilmiştir. Şayet bu miRNA'lar kamptotesinle indüklenen apoptozda rol oynuyorsa, kamptotesin dozuna paralel bir şekilde ifadelerinde farklılıklar oluşmalıdır. Bu amaçla öncelikle olarak Jurkat hücreleri 0.25-8 μ M kamptotesin ile muamele edilmiştir. Bu hücrelerin apoptoz oranı Annexin V immunofloresan işaretleme yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 10A). Parasal kaynaklarımızın az olması nedeniyle, JAN (muamele sonrası ölmeyen hücreler) ve JAP (muamele sonrası apoptoza uğrayan hücreler) fraksiyonları ayrılmadan, 0.5, 2 ve 8 μ M kamptotesin ile muamele edilen örneklerden miRVANA kiti kullanılarak 200 nt'ten küçük RNA'lar izole edilmiştir. miRNA RT cDNA kiti (SabiöSciences) kullanılarak cDNA hazırlanmış ve qPCR yapılmıştır. JAN ve JAP fraksiyonları ayrılmadığı halde, kamptotesin ile muamele edilen örneklerde (JAN ve JAP fraksiyonunu içerir) bu miRNA'ların miktarlarında doza bağlı olarak azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 10B ve C). Ancak, bir sonraki kısımda anlatılacak derin sekanslama sonuçları incelendiğinde, derin sekanslamada klonlanma sıklığı %0,01'den yüksek olan miRNA'ların genel itibarı ile mikroarray ve qPCR ile daha uyumlu olduğu belirlenmiştir (Şekil 10C, miR-18a ve 106b).

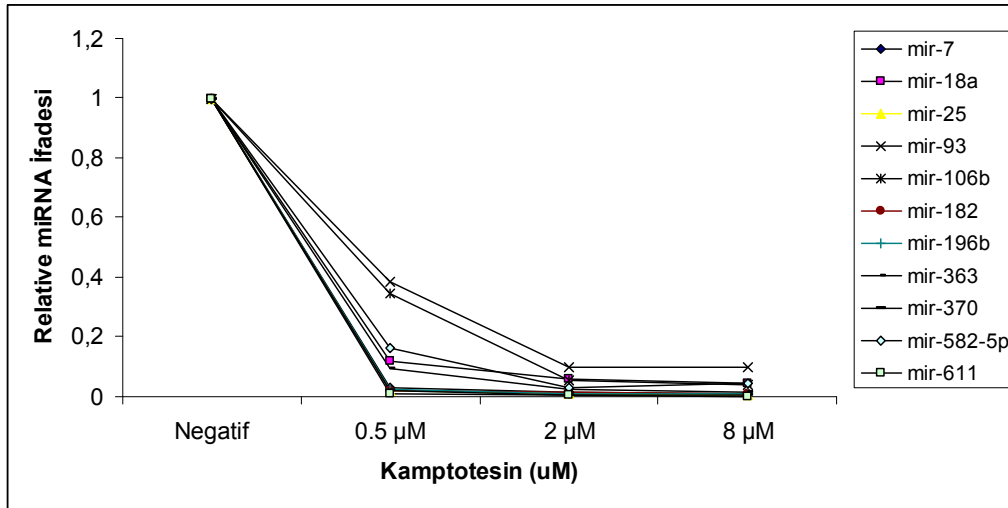
4.5 Derin Sekans Analiziyle miRNA Profilinin Çıkarılması

qPCR ile mikroarray analizi arasındaki uyumsuzluğu araştırmak için alternatif bir yol olarak adı geçen 3 fraksiyondaki küçük RNA'ların derin sekans analizleri çıkartılmıştır (Fasteris, İsviçre). Sekans analizinin kalite kontrol değerlendirmesi Tablo 5'te sunulmuştur. Adaptör içermeyen klonların oranı %12 ile 36,6 arasında değişmektedir. Adaptör içeren klonlardan %91,3-97,9 gibi oldukça yüksek bir oranı 15-26 bp uzunluğunda fragman

A



B



C

| | Negatif | 0.5 μM | 2 μM | 8 μM | Array JAP/JNN | Sekans JAP/JNN |
|----------------|---------|--------|-------|-------|---------------|----------------|
| Hsa-mir-7 | 1 | 0,032 | 0,016 | 0,010 | 0,130 | 1,152 |
| Hsa-mir-18a | 1 | 0,117 | 0,058 | 0,043 | 0,133 | 0,109 |
| Hsa-mir-25 | 1 | 0,022 | 0,010 | 0,007 | 0,255 | 1,023 |
| Hsa-mir-93 | 1 | 0,384 | 0,100 | 0,101 | 0,269 | 0,700 |
| Hsa-mir-106b | 1 | 0,344 | 0,056 | 0,042 | 0,165 | 0,166 |
| Hsa-mir-182 | 1 | 0,021 | 0,015 | 0,010 | 0,302 | 0,608 |
| Hsa-mir-196b | 1 | 0,022 | 0,010 | 0,010 | 4,752 | 0,331 |
| Hsa-mir-363 | 1 | 0,094 | 0,024 | 0,016 | 0,715 | NA |
| Hsa-mir-370 | 1 | 0,019 | 0,003 | 0,004 | 1,541 | NA |
| Hsa-mir-582-5p | 1 | 0,164 | 0,028 | 0,043 | 1,145 | NA |
| Hsa-mir-611 | 1 | 0,010 | 0,003 | 0,002 | 4,007 | NA |

Şekil 10. Kamptotesin dozuna bağlı miRNA İfadesi. *Panel A*, Jurkat hücreleri 0,25-8 μM kamptotesin ile muamele edildikten sonra Annexin V immunofloresan işaretleme ile apoptoz oranları belirlenmiştir. *Panel B*, Negatif, 0,25, 2 ve 8 μM kamptotesin ile muamele edilen hücrelerden küçük RNA'lar izole edildikten sonra cDNA hazırlanmıştır. Her bir numuneden 3 replika yapılarak Ct değerlerine göre rölatif miRNA miktarı hesaplanmıştır. *Panel C*, Relatif miRNA miktarları sayısal olarak verilmiştir. Negatif, 0,25, 2 ve 8 qPCR sonuçları; Array JAP/JNN, mikroarray oranı; Sekans JAP/JNN, derin sekanslama oranları. NA, bu metotla tanımlanamayan miRNA'lar.

| JNN | | | |
|----------------|---------|---------|-----------|
| Fragman Boyutu | Okuma | % Okuma | % Fragman |
| 0-15 bp | 207821 | 7,6 | 8,6 |
| 15-26 bp | 2192899 | 80,4 | 91,3 |
| Adaptörsüz | 327933 | 12 | |
| JAN | | | |
| Fragman Boyutu | Okuma | % Okuma | % Fragman |
| 0-14 bp | 65652 | 2,4 | 3,1 |
| 15-26 bp | 2065887 | 76,7 | 96,9 |
| Adaptörsüz | 561318 | 20,8 | |
| JAP | | | |
| Fragman Boyutu | Okuma | % Okuma | % Fragman |
| 0-14 bp | 40563 | 1,4 | 2,2 |
| 15-26 bp | 1875582 | 62 | 97,9 |
| Adaptörsüz | 1108038 | 36,6 | |

Tablo 5. Derin sekanslama kalite kontrol analizi. Kamptotesin ile muamele edilmemiş (JNN), 8 µM kamptotesin ile muamele edilmiş hücrelerin apoptoza uğramayan negatif (JAN) ve apoptoza uğrayan pozitif (JAP) fraksiyonlarından elde edilen toplam RNA'lar İsviçre'nin FASTERIS firması tarafından İllumina teknolojisi kullanılarak derin sekanslamaya tabii tutulmuştur. Okunan toplam sekans sayısı (Okuma), değişik uzunluktaki klonların toplam sekanstaki (%Okuma) ve insert içeren klonlar içerisindeki (%Fragman) oranları hesaplanmıştır.

| miRNA Adı | Derin Sekanslama | | | | | | Mikroarray | | |
|-----------------|--|---------|---------|----------|----------|---------|------------|---------|---------|
| | Grup 1 | | | | | | | | |
| | % JAN | % JAP | % JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN |
| | JAN>JNN>JAP, JAN yaşam ve apoptozla ilgili | | | | | | | | |
| hsa-let-7a | 1.48409 | 0.26163 | 0.91017 | 5.67252 | 1.63057 | 0.28745 | 1.63 | 1.23 | 0.77 |
| hsa-let-7b | 0.56561 | 0.04120 | 0.14757 | 13.72811 | 3.83285 | 0.27920 | 2.05 | 1.2 | 0.59 |
| hsa-let-7c | 0.00116 | 0.00016 | 0.00064 | 7.30286 | 1.81064 | 0.24794 | 1.76 | 1.4 | 0.83 |
| hsa-let-7d | 0.02246 | 0.00806 | 0.06881 | 2.78662 | 0.32639 | 0.11713 | 2.07 | 1.22 | 0.65 |
| hsa-let-7f | 4.14254 | 1.85982 | 2.94230 | 2.22738 | 1.40793 | 0.63210 | 2.21 | 1.14 | 0.5 |
| hsa-miR-16 | 0.04173 | 0.02015 | 0.02839 | 2.07075 | 1.46965 | 0.70972 | 3.73 | 1 | 0.23 |
| hsa-miR-17 | 2.15586 | 0.50910 | 5.17450 | 4.23465 | 0.41663 | 0.09839 | 2.99 | 0.97 | 0.31 |
| hsa-miR-19a | 0.03195 | 0.01257 | 0.20189 | 2.54214 | 0.15824 | 0.06225 | 1.93 | 0.65 | 0.57 |
| hsa-miR-19b | 0.02532 | 0.01299 | 0.24680 | 1.94867 | 0.10257 | 0.05264 | 5.19 | 0.84 | 0.16 |
| hsa-miR-26a | 0.11641 | 0.01066 | 0.08148 | 10.92250 | 1.42867 | 0.13080 | 3.45 | 0.96 | 0.29 |
| hsa-miR-29a | 0.00605 | 0.00138 | 0.00941 | 4.38874 | 0.64298 | 0.14651 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-92a | 0.44053 | 0.10260 | 0.24761 | 4.29350 | 1.77917 | 0.41439 | 3.29 | 1.59 | 0.46 |
| hsa-miR-98 | 0.00484 | 0.00058 | 0.00321 | 8.29871 | 1.50887 | 0.18182 | 2.65 | 2.32 | 1.06 |
| hsa-miR-106a | 0.06791 | 0.04115 | 0.30658 | 1.65044 | 0.22151 | 0.13422 | 2.57 | 0.86 | 0.28 |
| hsa-miR-196a | 0.06249 | 0.04465 | 0.09940 | 1.39964 | 0.62871 | 0.44919 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-210 | 0.01868 | 0.00361 | 0.05475 | 5.18181 | 0.34126 | 0.06586 | 7.41 | 1.03 | 0.14 |
| hsa-miR-223 | 0.03761 | 0.00742 | 0.01893 | 5.06636 | 1.98710 | 0.39221 | 0.5 | 0.69 | 1.4 |
| hsa-miR-15b | 0.00465 | 0.00270 | 0.00716 | 1.71832 | 0.64859 | 0.37745 | 3.15 | 2 | 0.64 |
| hsa-miR-128 | 0.36918 | 0.00027 | 0.00503 | ***** | 73.45617 | 0.05275 | 5.93 | 5.09 | 0.9 |
| hsa-miR-153 | 0.00106 | 0.00027 | 0.00438 | 4.01657 | 0.24289 | 0.06047 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-125a-5p | 0.01878 | 0.00069 | 0.00957 | 27.24529 | 1.96237 | 0.07203 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-150 | 0.04618 | 0.01140 | 0.02203 | 4.05054 | 2.09630 | 0.51754 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-185 | 0.02648 | 0.01161 | 0.04614 | 2.28006 | 0.57382 | 0.25167 | 7.46 | 1 | 0.14 |
| hsa-miR-320a | 0.01922 | 0.00323 | 0.09212 | 5.94106 | 0.20860 | 0.03511 | 1.76 | 1.14 | 0.62 |

| | | | | | | | | | |
|----------------|--|---------|---------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|
| hsa-miR-106b | 0.11336 | 0.03123 | 0.18842 | 3.62973 | 0.60166 | 0.16576 | 5.91 | 0.96 | 0.16 |
| hsa-miR-29c | 0.01520 | 0.00111 | 0.00674 | 13.64939 | 2.25612 | 0.16529 | 5.59 | 1.34 | 0.38 |
| hsa-miR-18b | 0.01244 | 0.00117 | 0.00492 | 10.66384 | 2.52899 | 0.23716 | 5.84 | 0.72 | 0.12 |
| hsa-miR-20b | 0.39842 | 0.10579 | 0.68507 | 3.76628 | 0.58157 | 0.15442 | 3.54 | 0.84 | 0.21 |
| hsa-miR-484 | 0.00145 | 0.00042 | 0.00770 | 3.42322 | 0.18861 | 0.05510 | 1.42 | 1.12 | 0.75 |
| hsa-miR-1268 | 0.04453 | 0.00095 | 0.00160 | 46.65717 | 27.76316 | 0.59505 | 0.48 | 0.72 | 1.54 |
| hsa-miR-1308 | 0.00939 | 0.00048 | 0.00267 | 19.67715 | 3.51264 | 0.17851 | 0.61 | 1.19 | 2.18 |
| hsa-miR-720 | 0.06607 | 0.00090 | 0.02058 | 73.29710 | 3.20977 | 0.04379 | 6.74 | 1.1 | 0.26 |
| hsa-miR-374b | 0.05262 | 0.00536 | 0.01743 | 9.82452 | 3.01866 | 0.30726 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-744 | 0.00576 | 0.00058 | 0.00369 | 9.87546 | 1.56135 | 0.15810 | 0.85 | 1.13 | 1.48 |
| hsa-miR-1301 | 0.00063 | 0.00021 | 0.00588 | 2.96679 | 0.10699 | 0.03606 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-542-5p | 0.00024 | 0.00011 | 0.00294 | 2.28214 | 0.08230 | 0.03606 | NC | NC | NC |
| | Grup 2 | | | | | | | | |
| | % JAN | % JAP | % JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN |
| | JAP=JNN, JAN yaşam, kaptotesin bağımsız | | | | | | | | |
| hsa-miR-15a | 0.05562 | 0.00604 | 0.00994 | 9.20064 | 5.59254 | 0.60784 | 5.5 | 1.05 | 0.22 |
| hsa-miR-21 | 0.35016 | 0.07026 | 0.07491 | 4.98386 | 4.67458 | 0.93794 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-24 | 0.00610 | 0.05218 | 0.06796 | 0.11689 | 0.08975 | 0.76780 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-25 | 0.43017 | 0.02418 | 0.02363 | 17.79071 | 18.20268 | 1.02316 | 5.77 | 1.5 | 0.26 |
| hsa-miR-28-3p | 0.03645 | 0.00573 | 0.00829 | 6.36465 | 4.39811 | 0.69102 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-33a | 0.00712 | 0.00117 | 0.00080 | 6.09955 | 8.87214 | 1.45456 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-101 | 0.06356 | 0.00848 | 0.01401 | 7.49114 | 4.53697 | 0.60564 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-30d | 0.01486 | 0.03240 | 0.02550 | 0.45867 | 0.58267 | 1.27035 | 1.99 | 1.35 | 0.7 |
| hsa-miR-7 | 0.42030 | 0.00191 | 0.00166 | ***** | ***** | 1.15170 | 5.48 | 0.81 | 0.13 |
| hsa-miR-221 | 0.04690 | 0.00371 | 0.00251 | 12.63656 | 18.66501 | 1.47706 | 2.6 | 1.44 | 0.69 |
| hsa-miR-9 | 0.22165 | 0.06862 | 0.08352 | 3.23027 | 2.65395 | 0.82159 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-362-5p | 0.01002 | 0.00159 | 0.00214 | 6.29872 | 4.68503 | 0.74381 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-345 | 0.00082 | 0.00435 | 0.00492 | 0.18925 | 0.16729 | 0.88395 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-181d | 0.01104 | 0.00196 | 0.00176 | 5.62518 | 6.25494 | 1.11195 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-766 | 0.00015 | 0.01893 | 0.02700 | 0.00767 | 0.00538 | 0.70109 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-542-3p | 0.00344 | 0.00658 | 0.00706 | 0.52268 | 0.48695 | 0.93164 | NC | NC | NC |
| | Grup 3 | | | | | | | | |
| | % JAN | % JAP | % JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN |
| | JAN=JNN, apoptozla ilgili | | | | | | | | |
| hsa-let-7e | 0.01384 | 0.00339 | 0.01807 | 4.07933 | 0.76604 | 0.18779 | 1.91 | 0.99 | 0.5 |
| hsa-miR-18a | 0.14270 | 0.01670 | 0.15393 | 8.54319 | 0.92702 | 0.10851 | 5.35 | 0.72 | 0.13 |
| hsa-miR-93 | 0.94031 | 0.48900 | 0.69903 | 1.92292 | 1.34517 | 0.69955 | 3.79 | 1.07 | 0.27 |
| hsa-miR-148a | 0.34614 | 0.08097 | 0.43747 | 4.27495 | 0.79124 | 0.18509 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-181a | 0.23312 | 0.66192 | 0.34727 | 0.35218 | 0.67129 | 1.90607 | 3.34 | 1.88 | 0.54 |
| hsa-miR-27b | 0.02861 | 0.00779 | 0.02818 | 3.67006 | 1.01526 | 0.27663 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-132 | 0.00368 | 0.00180 | 0.00342 | 2.04051 | 1.07507 | 0.52686 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-152 | 0.00547 | 0.00260 | 0.00551 | 2.10516 | 0.99322 | 0.47180 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-301a | 0.01031 | 0.00276 | 0.01139 | 3.73921 | 0.90532 | 0.24212 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-92b | 0.01549 | 0.00589 | 0.01433 | 2.63166 | 1.08098 | 0.41076 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-942 | 0.00373 | 0.00095 | 0.00262 | 3.90500 | 1.42265 | 0.36431 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-652 | 0.01007 | 0.00514 | 0.00941 | 1.95747 | 1.06992 | 0.54659 | NC | NC | NC |
| | Grup 4 | | | | | | | | |
| | % JAN | % JAP | % JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN |
| | JNN>JAP>JAN, JAN yaşam ve apoptozla ilgili | | | | | | | | |
| hsa-miR-32 | 0.00048 | 0.00085 | 0.00471 | 0.57054 | 0.10288 | 0.18032 | NC | NC | NC |

| | | | | | | | | | |
|----------------|------------------------------------|--------------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| hsa-miR-96 | 0.00039 | 0.00085 | 0.00513 | 0.45643 | 0.07544 | 0.16529 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-29b | 0.00378 | 0.00939 | 0.70999 | 0.40228 | 0.00532 | 0.01322 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-197 | 0.00048 | 0.00111 | 0.00471 | 0.43469 | 0.10288 | 0.23667 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-30c | 0.00324 | 0.02344 | 0.12682 | 0.13837 | 0.02557 | 0.18480 | NC | NC | NC |
| hsa-let-7g | 0.04255 | 0.28469 | 2.80612 | 0.14945 | 0.01516 | 0.10146 | 1.6 | 1.54 | 0.98 |
| hsa-miR-140-5p | 0.00198 | 0.00917 | 0.20200 | 0.21634 | 0.00982 | 0.04541 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-142-5p | 0.00208 | 0.02010 | 0.31198 | 0.10357 | 0.00667 | 0.06442 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-142-3p | 0.09918 | 0.57676 | 2.07666 | 0.17196 | 0.04776 | 0.27773 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-126 | 0.00436 | 0.01076 | 0.02042 | 0.40472 | 0.21330 | 0.52703 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-146a | 0.00058 | 0.00170 | 0.01219 | 0.34232 | 0.04765 | 0.13919 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-186 | 0.01113 | 0.09667 | 0.50174 | 0.11517 | 0.02219 | 0.19266 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-194 | 0.00165 | 0.00281 | 0.00845 | 0.58561 | 0.19482 | 0.33267 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-200c | 0.01530 | 0.02657 | 0.07624 | 0.57577 | 0.20062 | 0.34843 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-361-5p | 0.00218 | 0.00695 | 0.25354 | 0.31358 | 0.00859 | 0.02740 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-301b | 0.00000 | 0.00058 | 0.00299 | 0.00000 | 0.00000 | 0.19481 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-627 | 0.00015 | 0.00032 | 0.00315 | 0.45643 | 0.04603 | 0.10086 | NC | NC | NC |
| | Grup 5 | | | | | | | | |
| | % JAN | % JAP | % JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN | JAN/JAP | JAN/JNN | JAP/JNN |
| | JAN=JAP, ilaç metabolizması | | | | | | | | |
| hsa-miR-20a | 0.49683 | 0.49627 | 4.76397 | 1.00113 | 0.10429 | 0.10417 | 3.29 | 0.79 | 0.24 |
| hsa-miR-26b | 0.00116 | 0.00095 | 0.02625 | 1.21714 | 0.04425 | 0.03636 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-27a | 0.00339 | 0.00339 | 0.01551 | 0.99844 | 0.21853 | 0.21887 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-103 | 0.24532 | 0.19593 | 0.09913 | 1.25206 | 2.47474 | 1.97653 | 4.08 | 1.03 | 0.24 |
| hsa-miR-192 | 0.00983 | 0.01018 | 0.01823 | 0.96516 | 0.53894 | 0.55840 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-183 | 0.04569 | 0.06177 | 0.11608 | 0.73969 | 0.39365 | 0.53219 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-222 | 0.00068 | 0.00048 | 0.00471 | 1.42000 | 0.14403 | 0.10143 | NC | NC | NC |
| hsa-let-7i | 0.00290 | 0.00228 | 0.00524 | 1.27375 | 0.55428 | 0.43515 | 2 | 1.07 | 0.54 |
| hsa-miR-30b | 0.00058 | 0.00042 | 0.00358 | 1.36929 | 0.16215 | 0.11842 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-140-3p | 0.00218 | 0.00212 | 0.00722 | 1.02696 | 0.30177 | 0.29385 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-191 | 0.12092 | 0.10748 | 1.64957 | 1.12497 | 0.07330 | 0.06516 | 3.85 | 1.28 | 0.34 |
| hsa-miR-99b | 0.00750 | 0.00737 | 0.01235 | 1.01793 | 0.60747 | 0.59676 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-130b | 0.01626 | 0.01941 | 0.37341 | 0.83803 | 0.04355 | 0.05197 | 4.67 | 1.04 | 0.21 |
| hsa-miR-424 | 0.00048 | 0.00037 | 0.02738 | 1.30408 | 0.01768 | 0.01356 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-503 | 0.00121 | 0.00143 | 0.00551 | 0.84524 | 0.21974 | 0.25997 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-532-5p | 0.00760 | 0.00992 | 0.01684 | 0.76641 | 0.45122 | 0.58875 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-769-5p | 0.00092 | 0.00095 | 0.00353 | 0.96357 | 0.26062 | 0.27048 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-625 | 0.00077 | 0.00058 | 0.00294 | 1.32779 | 0.26337 | 0.19835 | NC | NC | NC |
| hsa-miR-590-3p | 0.00174 | 0.00143 | 0.00583 | 1.21714 | 0.29900 | 0.24566 | NC | NC | NC |

Tablo 6. JNN, JAN ve JAP fraksiyonlarında miRNA ifade miktarları. Derin sekanslama sonrası miRBase’de bulunan insan miRNA’larının JNN, JAN ve JAP fraksiyonlarındaki sayıları belirlenmiştir. Bu sayılar her bir fraksiyondaki toplam klon sayısına bölünerek her bir miRNA’nın klonlanma sıklığı (%JNN, %JAN ve %JAP) hesaplanmıştır. Bu değerlerin birbirine oranları hesaplanarak, JAN/JAP, JAN/JNN ve JAP/JNN oranları hesaplanmıştır. Her fraksiyondaki klonlanma sıklıkları benzerlik gösteren miRNA’lar aynı grup altında toplanmıştır. Mikroarray sonucu tablonun sağ tarafındaki kolonlara eklenmiş ve yön itibarı yada trend olarak derin sekanslama ile uyum içerisinde olanlar gri renk ile işaretlenmiştir. NC, ifadesi düşük olduğu için mikroarray analizinde filtre edilenler.

içermesi, RNA kalitesinin iyi ve derin sekanslama sırasında cDNA hazırlanma sürecinin oldukça başarılı olduğu anlamına gelmektedir (Tablo 5). Bilinen miRNA'ların klonlanma sıklığını belirlemek için, Fortran yazılım programı kullanılarak bir program yazılmıştır. Bu program ile, miRbase'de bulunan insan miRNA'larının sekansı ile %100 eşleşme gösteren klonların sayısı her bir fraksiyonda (JNN, JAN ve JAP) ayrı ayrı belirlenmiştir. Daha sonra, bu sayı toplam klon sayısına bölünerek ilgili miRNA'ların her bir fraksiyondaki *klonlanma sıklıkları* (klonlanma sıklığı=ifade miktarı) hesaplanmıştır. Klonlama sıklığı düşük olan miRNA'lar hesaplamaya katılmamıştır (~yaklaşık %0.01'den küçük). Fraksiyonlar arasındaki oranlar belirlendikten sonra, klonlanma sıklıklarına göre aynı pattern sergileyen miRNA'lar kümelerine ayrılmış ve mikroarray sonuçlarıyla karşılaştırılmalı olarak Tablo 6'da sunulmuştur.

Mikroarray ve derin sekanslama sonuçları yan yana karşılaştırılarak, mikroarray ile qPCR arasındaki uyumsuzluğa cevap aranmıştır (Tablo 6). Şekil 7C'de sunulan qPCR, mikroarray ve derin sekanslama sonuçlarına bakıldığında, ilk bakışta her üç metot arasında hala tam bir uyumun olmadığı görülmektedir. Mikroarray ve derin sekans verilerini detaylı incelediğimizde, derin sekanslamada klonlama sıklığı %0,01'den küçük olan miRNA'lar, muhtemelen yüksek background nedeniyle mikroarray analizinde yanıltıcı değerler verebilmektedir. Aynı şekilde, mikroarray analizinde floresan yoğunluğu 500'den küçük miRNA'larda derin sekanslama (ve qPCR) sonuçları ile uyumsuz görünmektedirler. Ancak, derin sekanslamada klonlanma sıklığı %0.01'in, mikroarray analizinde floresan yoğunluğu 500'ün üzerinde olan miRNA'ların bazılarında uyumsuzluk gözlemlenmiş bulunmaktayız (örneğin, miR-181a, miR-let-7g, miR-7). Bu uyumsuzluğun birçok sebebi olabilir. Örneğin, bu miRNA'lar mikroarray analizinde diğer miRNA sekansları ile hibridize oluyor olabilir (cross-hybridization). Ayrıca, bazı miRNA'ların nükleotit değişimi (editing) işlemine tabii olduğu bilinmektedir. Derin sekanslamada tam eşleşme yapan sekansları değerlendirmeye aldığımızdan, nükleotit değişimlerini kaçırıyor olabiliriz.

4.6 miRNA Nükleotit Değişimlerinin Belirlenmesi

Analiz edilen RNA sekanslarının çok kısa olması nedeniyle mikroarray ve qPCR analizi sırasında oluşabilecek hataların giderilememektedir. Derin sekanslama ile birlikte hücre içerisinde boyutu veya sekansı sadece 1 (veya birkaç) nükleotit değişen bir dizi RNA sekansı olduğu görülmüştür. Bu değişiklikler miRNA'ların özellikle 5' yada 3' üssüne yakın olursa, qPCR ve mikroarray analizinde önemli sorun teşkil edecektir. Ayrıca, genomun başka bölgesinden gelebilecek RNA kırıntılarında hataya neden olabilecektir. Zira sekans boyutlarının kısa olması nedeniyle qPCR için ikinci bir primer yada prob dizayn etme şansı bulunmamaktadır. Örneğin, aşağıda verilen 8 miRNA benzeri sekansı incelediğimizde,

1. AAT ATG GGC AGG CCT GCA
2. **T**AT ATG GGC AGG CCT GCA
3. AAT ATG GGC AGG CCT **GCC**
4. AAT ATG GGC AGG CCT GC
5. AT ATG GGC AGG CCT GCA
6. AAT ATG GGC AGG CCT GCA G
7. AT ATG GGC AGG CCT GCA G
8. AAT ATG GGC **GGG** CCT GCA

AAT ATG GGC AGG CCT GCA sekansı 5' primeri olarak kullanıldığında, sadece 1, 2, 5, 6 ve 7 nolu sekanslar qPCR ile çoğaltılabilirken, mikroarray analizinde muhtemelen ilk 7

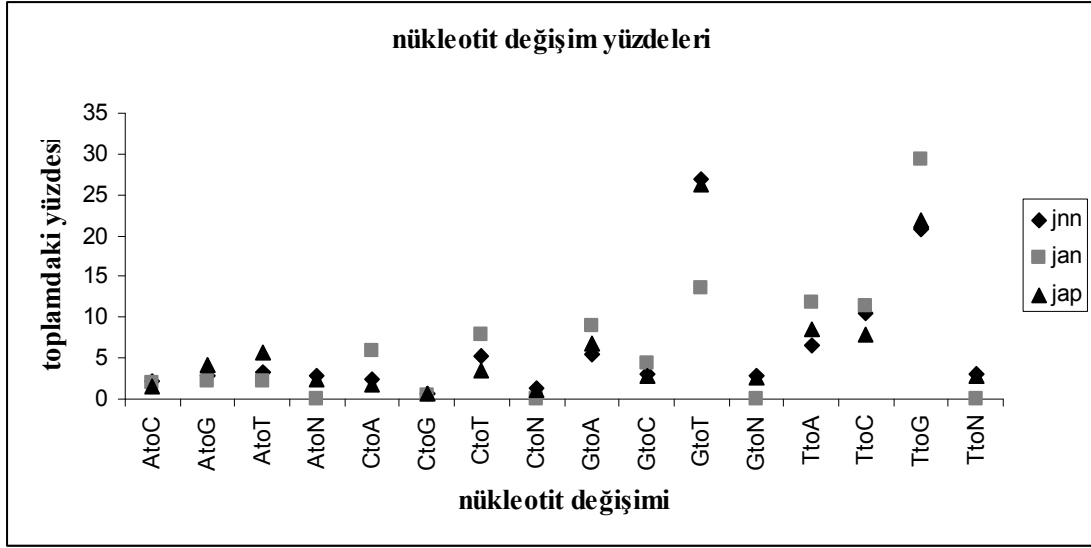
sekansın tamamı pozitif sinyal verebilmektedir. Buna karşın, derin sekans analizinde sekansla tam eşleşen klonlar değerlendirilmeye alındığından sadece 1 nolu sekans analize dahil edilmektedir. Bu nedenle mikroarray, qPCR ve derin sekanslama metotları arasında kısmi uyumsuzluk olmasının doğal olduğu değerlendirilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar miRNA'larda nükleotit değişim olaylarının (özellikle A→G) sanıldan daha sık görüldüğüne işaret ettiğinden, 5' ve 3' üsse yakın değişim olaylarının bu uyumsuzluğa dahada fazla katkı bulunmaktadır. RNA popülasyonundaki bu zenginliği algılamak için, öncelikle mirBASE'de mevcut tüm miRNA sekanslarına sadece 1 nükleotit farkla eşleşen (delesyon ve eklemeler hariç) klonlar tespit edilmiştir. Bu klonlar en az 3 nedenle oluşabilir (1) miRNA nükleotit değişimleri; (2) genomun başka bölgesinden gelen küçük RNA'lar veya mRNA kırıntıları ve (3) sekans hataları. Nükleotit farklılıklarının sekanslamadan kaynaklanan teknik bir hata olmadığından emin olmak için, öncelikli olarak nükleotit değişikliklerinin türü tespit edilmiştir (Şekil 11). Zira sekans hatasının her 3 fraksiyona (JNN, JAN ve JAP) eşit yanması ve fraksiyonlar arası fark görülmemesi beklenmektedir. Bu analize göre, her üç fraksiyonda G→T ve T→G değişimlerinde anlamlı bir farklılık görülmektedir (Şekil 11). JAN fraksiyonunda G→T diğer iki fraksiyona göre oldukça az iken, aynı fraksiyonda T→G değişimleri anlamlı bir şekilde artış göstermektedir.

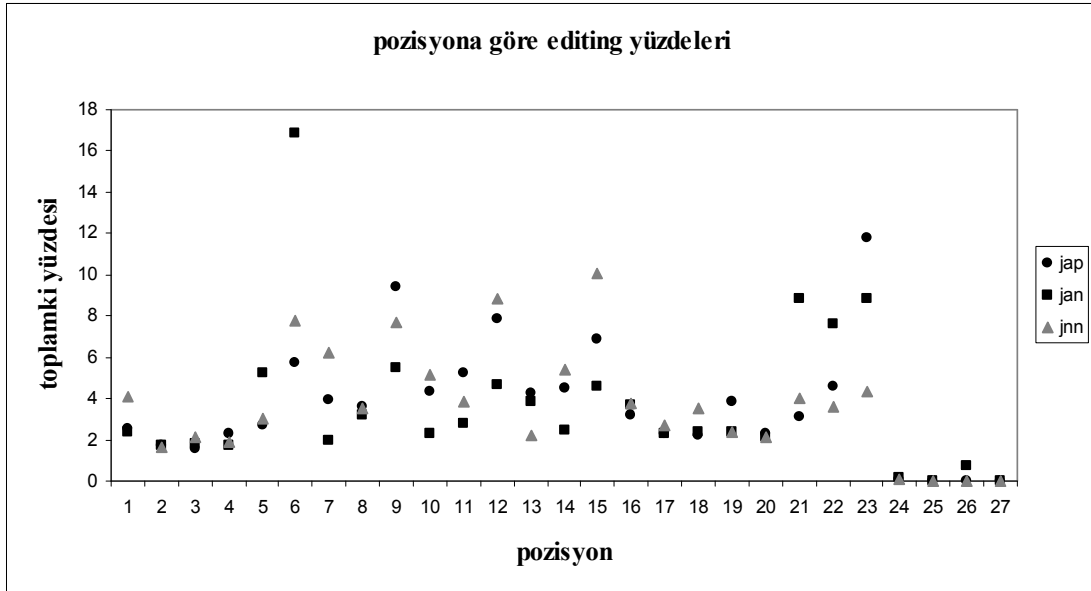
Ergin miRNA'lar ile aynı boyuta sahip ancak 1 nükleotit sekans farkı gösteren bu klonların biyolojik bir anlamı varsa, miRNA üzerinde belli pozisyonlarda yoğunlaşması beklenmektedir. Bu hipotezden yola çıkarak tespit edilen nükleotit değişimlerinin miRNA üzerindeki dağılımına bakıldığında (Şekil 12), bu değişimlerin belli pozisyonlarda yoğunlaştığını görmekteyiz. Özellikle 6. nükleotit pozisyonunda fraksiyonlar arası farklılık oldukça anlamlıdır. Bunun yanında, 15, 21, 22 ve 23. pozisyonlarda da popülasyonlar arası farklılık görülmektedir. miRNA'ların 5' üssü 5-8. nükleotitlerinin hedef mRNA ile eşleşmede temel önemi düşünüldüğünde, 6. pozisyonda meydana gelen potansiyel nükleotit değişikliklerinin hedef mRNA yelpazesini değiştirebileceğini düşünmekteyiz.

Bir hücre içerisindeki (mi)RNA popülasyonunda bu derece çeşitlilik olması bir yandan mikroarray ile olan uyumsuzluğu kısmen açıklamamıza yardımcı olurken, diğer yandan potansiyel nükleotit değişimlerinin apoptozu düzenleyebileceği ihtimalini düşündürmüştür. Bu nedenle, genomda kaç yere eşleştikleri dikkate alınmaksızın, ergin mikroRNA'larla aynı boyuta sahip ancak dizi olarak sadece bir nükleotit farklılığına sahip sekansların 3 popülasyondaki klonlanma sıklığı hesaplanmıştır (Tablo 7). İlginç bir şekilde, nükleotit değişiklikleri tüm miRNA'larda görülmemekte; ve kimi pozisyonlara spesifik olarak gerçekleşmektedir. Örneğin, kamptotesin ile muamele edilen ancak apoptotik olmayan JAN hücrelerinde hsa-miR-1308 miRNA'sında toplam 1169 nükleotit değişikliği gözlemlenmiş olup bunun 1138 adeti (%97,3) 5. pozisyonda G→T değişikliğidir. miRNA editing olaylarının varlığı bilinmekle birlikte ne kadar yoğun bir şekilde olduğu ve apoptozu düzenleyip düzenlemediği bilinmemektedir.

DeneySEL olarak gösterilmeyen nükleotit değişikliklerin gerçek olup olmadığını bilmek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, apoptozla ilintisi bilinmemekle birlikte, literatürde editing olayına tabii olduğunun gösterilmesi ve bizim listemizde (Tablo 7) sadece apoptotik örneklerde bulunması nedeniyle miR-142-3p miRNA'sında meydana gelen nükleotit değişikliğine öncelik verdik. Biyoinformatik analizlerimiz, bu miRNA'nın birden fazla pozisyonunda değişiklikler meydana gelebileceğini göstermektedir. Ancak bizim qPCR dizaynımızda sadece 3' uca yakın değişiklikleri belirleyebildiğimizden, bu miRNA'da



Şekil 11. Kamptotesin ile muamele edilen Jurkat hücrelerinde mikroRNA sekanslarında görülen nükleotit değişiklikleri. Derin sekanslama ile JNN, JAN ve JAP fraksiyonlarında bulunan miRNA klon sayıları belirlenmiştir. Ergin miRNA ile aynı uzunlukta olan ve sadece bir nükleotit farkla eşleşen sekanslardaki nükleotit değişiminin (örneğin A→T) toplam değişim içerisindeki (toplam 16 ihtimal) yüzdeleri hesaplanmıştır. İnsersiyon, delesyon, miRNA boyutundan kısa ve uzun boyuta sahip klonlar analize dahil edilmemiştir. (“AtoC”, genomda ‘A’ iken, sekanslama sonucunda ‘C’ olarak klonlanan, “AtoN”, genomda ‘A’ iken sekanslama sonucu nucleotit ‘N’ olarak klonlanmış ...vb). JNN, kamptotesin ile muamele edilmemiş negatif hücreler; JAN, kamptotesin ile muamele edilen non-apoptotik hücreler; JAP, apoptotik hücreler.



Şekil 12. Kamptotesin ile muamele edilen Jurkat hücrelerinde mikroRNA sekanslarında görülen nükleotit değişikliklerinin pozisyonları. Şekil 11’de belirlenen nükleotit farklılıklarının 27 nükleotitlik tipik bir miRNA üzerinde dağılımları hesaplanmıştır. 27 pozisyondan her birinde bulunan toplam sayıya göre yüzdeler hesaplanarak grafiğe dökülmüştür. JNN, kamptotesin ile muamele edilmemiş negatif hücreler; JAN, kamptotesin ile muamele edilen non-apoptotik hücreler; JAP, apoptotik hücreler.

| miRNA (JAN) | SEKANS | PSNT | FREQ | MM | %MM |
|--------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-----------|------------|
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 6; T->G | 1898 | 6745 | 28,1 |
| hsa-miR-1308 | GCATGGGTGGTTCAGTGG | 5; G->T | 1138 | 1169 | 97,3 |
| hsa-miR-30e* | CTTTCAGTCGGATGTTTACAGC | 22; C->T | 800 | 859 | 93,1 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 6; T->G | 678 | 3942 | 17,2 |
| hsa-miR-181b | AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT | 23; T->A | 659 | 794 | 83,0 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT | 6; T->G | 632 | 2468 | 25,6 |
| hsa-let-7e | TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT | 12; G->A | 598 | 843 | 70,9 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 9; T->G | 598 | 6745 | 8,9 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 23; G->A | 486 | 1526 | 31,8 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 21; T->G | 441 | 3942 | 11,2 |
| hsa-miR-93 | CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG | 23; G->A | 366 | 2207 | 16,6 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 6; T->C | 358 | 6745 | 5,3 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 16; T->G | 340 | 6745 | 5,0 |
| hsa-miR-93 | CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG | 6; T->G | 337 | 2207 | 15,3 |
| hsa-miR-181a | AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT | 23; T->A | 333 | 773 | 43,1 |
| hsa-miR-128 | TCACAGTGAACCGGTCTCTTT | 21; T->A | 263 | 936 | 28,1 |
| hsa-miR-1826 | ATTGATCATCGACACTTCGAACGCAAT | 26; A->C | 256 | 256 | 100,0 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 21; T->G | 243 | 6745 | 3,6 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 6; T->A | 242 | 6745 | 3,6 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 15; T->G | 240 | 3942 | 6,1 |
| hsa-miR-1290 | TGGATTTTTGGATCAGGGA | 13; T->G | 229 | 230 | 99,6 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 21; T->C | 222 | 3942 | 5,6 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 15; G->T | 212 | 6745 | 3,1 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 9; T->C | 205 | 6745 | 3,0 |
| hsa-miR-93 | CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG | 21; T->G | 201 | 2207 | 9,1 |
| hsa-let-7b | TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT | 6; T->G | 189 | 1167 | 16,2 |
| hsa-let-7b | TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT | 22; T->A | 182 | 1167 | 15,6 |
| hsa-miR-20b | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG | 23; G->A | 169 | 938 | 18,0 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 6; T->G | 168 | 1526 | 11,0 |
| hsa-miR-92a | TATTGCACTTGTCCCGGCTGT | 22; T->A | 162 | 966 | 16,8 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 9; T->A | 161 | 6745 | 2,4 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 20; G->T | 137 | 6745 | 2,0 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT | 13; T->G | 134 | 2468 | 5,4 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 8; G->T | 130 | 6745 | 1,9 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT | 6; T->C | 129 | 2468 | 5,2 |
| hsa-miR-20b | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG | 6; T->G | 127 | 938 | 13,5 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 21; T->A | 126 | 3942 | 3,2 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 21; T->C | 125 | 6745 | 1,9 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 6; T->C | 119 | 3942 | 3,0 |
| hsa-miR-93 | CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG | 23; G->T | 118 | 2207 | 5,3 |
| hsa-miR-184 | TGGACGGAGAACTGATAAGGGT | 22; T->C | 118 | 119 | 99,2 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT | 16; T->G | 114 | 2468 | 4,6 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 16; T->C | 114 | 6745 | 1,7 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 15; T->C | 114 | 3942 | 2,9 |
| hsa-miR-148a | TCAGTGCCTACAGAACTTTGT | 5; T->G | 114 | 606 | 18,8 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 17; C->T | 113 | 3942 | 2,9 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 23; G->A | 113 | 3942 | 2,9 |

| | | | | | |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 19; G->T | 112 | 3942 | 2,8 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 8; C->A | 107 | 3942 | 2,7 |
| hsa-miR-25 | CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA | 18; T->G | 105 | 774 | 13,6 |
| | | | | | |
| miRNA (JAP) | SEKANS | PSNT | FREQ | MM | %MM |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA | 23; A-->T | 675 | 2093 | 32,3 |
| hsa-let-7e | TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT | 12; G-->A | 583 | 638 | 91,4 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 9; T-->G | 583 | 3330 | 17,5 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 15; G-->T | 421 | 3330 | 12,6 |
| hsa-miR-1290 | TGGATTTTTGGATCAGGGA | 13; T-->G | 418 | 419 | 99,8 |
| hsa-miR-181a | AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT | 19; T-->G | 367 | 2012 | 18,2 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA | 23; A-->G | 325 | 2093 | 15,5 |
| hsa-miR-181a | AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT | 23; T-->A | 280 | 2012 | 13,9 |
| hsa-miR-181a | AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT | 23; T-->G | 270 | 2012 | 13,4 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 6; T-->G | 229 | 3330 | 6,9 |
| hsa-miR-425 | AATGACACGATCACTCCCGTTGA | 9; G-->T | 227 | 856 | 26,5 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 8; G-->T | 210 | 3330 | 6,3 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA | 1; T-->A | 200 | 2093 | 9,6 |
| hsa-miR-181b | AACATTCACTTGCTGTCGGTGGGT | 23; T-->G | 174 | 499 | 34,9 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 11; G-->T | 151 | 3330 | 4,5 |
| hsa-miR-181b | AACATTCACTTGCTGTCGGTGGGT | 23; T-->A | 137 | 499 | 27,5 |
| hsa-miR-30e* | CTTTCAGTCGGATGTTTACAGC | 22; C-->T | 132 | 162 | 81,5 |
| hsa-miR-181a | AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT | 11; G-->T | 118 | 2012 | 5,9 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 7; G-->T | 113 | 923 | 12,2 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 9; T-->C | 110 | 3330 | 3,3 |
| hsa-miR-181a | AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT | 20; G-->T | 107 | 2012 | 5,3 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 9; T-->A | 105 | 3330 | 3,2 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 15; G-->T | 100 | 706 | 14,2 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA | 7; G-->T | 100 | 2093 | 4,8 |
| | | | | | |
| miRNA (JNN) | SEKANS | PSNT | FREQ | MM | %MM |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 25; G-->T | 2014 | 9921 | 20,3 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 9; T-->G | 1547 | 9921 | 15,6 |
| hsa-let-7e | TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT | 22; G-->A | 1450 | 1759 | 82,4 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 9; T-->G | 1450 | 8441 | 17,2 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 25; G-->T | 1319 | 8441 | 15,6 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 7; G-->T | 1206 | 13450 | 9,0 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 7; G-->T | 1124 | 12674 | 8,9 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 25; T-->G | 1089 | 13450 | 8,1 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 25; T-->G | 1088 | 12674 | 8,6 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 6; T-->G | 1064 | 12674 | 8,4 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 24; G-->T | 1063 | 12674 | 8,4 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 24; G-->T | 997 | 13450 | 7,4 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 6; T-->G | 928 | 13450 | 6,9 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGTTTGTATAGTT | 28; T-->C | 759 | 3157 | 24,0 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 22; T-->G | 759 | 9921 | 7,7 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA | 23; A-->T | 710 | 6093 | 11,7 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 22; C-->T | 690 | 13450 | 5,1 |

| | | | | | |
|----------------|-------------------------|-----------|-----|-------|------|
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 1; T-->C | 690 | 12674 | 5,4 |
| hsa-miR-20b | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG | 10; C-->T | 690 | 2720 | 25,4 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA | 7; G-->T | 649 | 6093 | 10,7 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 26; G-->T | 559 | 13450 | 4,2 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 8; G-->T | 524 | 8441 | 6,2 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 1; C-->T | 515 | 13450 | 3,8 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 22; T-->C | 515 | 12674 | 4,1 |
| hsa-miR-106a | AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 1; A-->T | 515 | 1347 | 38,2 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 6; T-->G | 480 | 8441 | 5,7 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 6; T-->G | 467 | 9921 | 4,7 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 21; T-->G | 465 | 13450 | 3,5 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 26; G-->T | 455 | 12674 | 3,6 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 21; T-->G | 442 | 12674 | 3,5 |
| hsa-miR-191 | CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG | 27; G-->T | 412 | 3589 | 11,5 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 21; G-->T | 411 | 9921 | 4,1 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA | 1; T-->A | 410 | 6093 | 6,7 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA | 6; T-->G | 404 | 6093 | 6,6 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 8; G-->T | 396 | 9921 | 4,0 |
| hsa-miR-191 | CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG | 6; G-->T | 395 | 3589 | 11,0 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 10; T-->G | 389 | 13450 | 2,9 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT | 22; G-->T | 377 | 3157 | 11,9 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 22; A-->T | 377 | 8441 | 4,5 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 28; C-->T | 377 | 9921 | 3,8 |
| hsa-miR-181a | AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT | 23; T-->A | 374 | 1645 | 22,7 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 28; T-->C | 365 | 8441 | 4,3 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 22; T-->A | 365 | 9921 | 3,7 |
| hsa-miR-29b | TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT | 22; G-->T | 333 | 1348 | 24,7 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 25; T-->C | 328 | 13450 | 2,4 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 25; T-->C | 313 | 12674 | 2,5 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 26; T-->G | 296 | 8441 | 3,5 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT | 25; G-->T | 292 | 3157 | 9,2 |
| hsa-miR-181a | AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT | 29; T-->G | 290 | 1645 | 17,6 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 22; T-->C | 275 | 9921 | 2,8 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 21; G-->T | 264 | 8441 | 3,1 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 9; T-->G | 254 | 13450 | 1,9 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 5; G-->T | 251 | 12674 | 2,0 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA | 8; T-->G | 249 | 6093 | 4,1 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 21; T-->C | 242 | 13450 | 1,8 |
| hsa-miR-363 | AATTGCACGGTATCCATCTGTA | 10; G-->T | 242 | 1603 | 15,1 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 10; T-->C | 238 | 13450 | 1,8 |
| hsa-miR-20b | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG | 22; T-->C | 238 | 2720 | 8,8 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 25; T-->A | 236 | 13450 | 1,8 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 6; T-->C | 235 | 13450 | 1,7 |
| hsa-miR-191 | CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG | 23; G-->T | 231 | 3589 | 6,4 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 5; G-->T | 230 | 13450 | 1,7 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA | 23; A-->G | 227 | 6093 | 3,7 |
| hsa-miR-30e* | CTTTCAGTCGGATGTTTACAGC | 22; C-->T | 222 | 291 | 76,3 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 9; T-->C | 220 | 8441 | 2,6 |

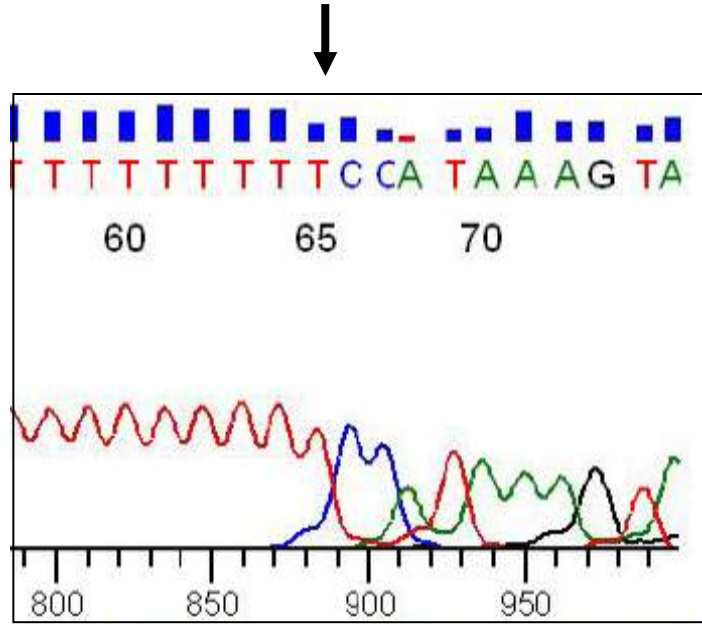
| | | | | | |
|----------------|--------------------------|-----------|-----|-------|-------|
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 26; T-->G | 217 | 9921 | 2, 2 |
| hsa-miR-181b | AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT | 23; T-->A | 216 | 526 | 41, 1 |
| hsa-miR-363 | AATTGCACGGTATCCATCTGTA | 21; T-->G | 214 | 1603 | 13, 3 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 9; T-->A | 211 | 8441 | 2, 5 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 6; T-->C | 210 | 12674 | 1, 7 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 10; T-->G | 210 | 12674 | 1, 7 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 21; T-->C | 209 | 12674 | 1, 6 |
| hsa-miR-191 | CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG | 23; G-->A | 207 | 3589 | 5, 8 |
| hsa-miR-20b | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG | 7; G-->T | 204 | 2720 | 7, 5 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 24; G-->A | 201 | 12674 | 1, 6 |
| hsa-miR-181a | AACATTCACGCTGTCGGTGAGT | 23; T-->G | 201 | 1645 | 12, 2 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 23; G-->T | 199 | 13450 | 1, 5 |
| hsa-miR-93 | CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG | 10; G-->T | 199 | 1939 | 10, 3 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 9; T-->C | 199 | 9921 | 2, 0 |
| hsa-miR-191 | CAACGGAATCCCAAAGCAGCTG | 9; T-->G | 194 | 3589 | 5, 4 |
| hsa-miR-363 | AATTGCACGGTATCCATCTGTA | 9; G-->T | 193 | 1603 | 12, 0 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 25; T-->A | 190 | 12674 | 1, 5 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 24; G-->A | 188 | 13450 | 1, 4 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 9; T-->A | 184 | 9921 | 1, 9 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA | 3; T-->A | 178 | 6093 | 2, 9 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 7; G-->A | 170 | 13450 | 1, 3 |
| hsa-miR-20b | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG | 25; T-->G | 166 | 2720 | 6, 1 |
| hsa-miR-93 | CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG | 6; T-->G | 165 | 1939 | 8, 5 |
| hsa-miR-181b | AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT | 23; T-->G | 164 | 526 | 31, 2 |
| hsa-miR-20b | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG | 6; T-->G | 154 | 2720 | 5, 7 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGTTTGTATAGTT | 23; T-->G | 151 | 3157 | 4, 8 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA | 8; T-->C | 148 | 6093 | 2, 4 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 6; T-->A | 146 | 12674 | 1, 2 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 7; G-->A | 145 | 12674 | 1, 1 |
| hsa-miR-182 | TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT | 10; G-->T | 142 | 902 | 15, 7 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 29; G-->T | 140 | 12674 | 1, 1 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 6; T-->C | 139 | 8441 | 1, 6 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 20; G-->T | 139 | 13450 | 1, 0 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGTTTGTATAGTT | 6; T-->G | 138 | 3157 | 4, 4 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 29; G-->T | 136 | 13450 | 1, 0 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA | 5; G-->T | 136 | 6093 | 2, 2 |
| hsa-miR-186 | CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT | 28; G-->T | 132 | 1033 | 12, 8 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 21; T-->A | 131 | 13450 | 1, 0 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 10; T-->C | 130 | 12674 | 1, 0 |
| hsa-miR-93 | CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG | 24; G-->T | 130 | 1939 | 6, 7 |
| hsa-miR-20b | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG | 1; C-->T | 130 | 2720 | 4, 8 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 6; T-->A | 128 | 13450 | 1, 0 |
| hsa-miR-363 | AATTGCACGGTATCCATCTGTA | 21; T-->C | 128 | 1603 | 8, 0 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 7; G-->C | 127 | 13450 | 0, 9 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 21; T-->A | 127 | 12674 | 1, 0 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGA | 22; G-->T | 126 | 6093 | 2, 1 |
| hsa-miR-186 | CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT | 22; T-->A | 126 | 1033 | 12, 2 |
| hsa-miR-1308 | GCATGGGTGGTTCAGTGG | 5; G-->T | 126 | 136 | 92, 6 |

| | | | | | |
|----------------|--------------------------|-----------|-----|-------|------|
| hsa-miR-92a | TATTGCACTTGTCCCGGCTGT | 21; G-->T | 125 | 918 | 13,6 |
| hsa-miR-93 | CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG | 7; G-->T | 124 | 1939 | 6,4 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 20; G-->T | 122 | 12674 | 1,0 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 22; T-->G | 121 | 12674 | 1,0 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 9; T-->G | 119 | 12674 | 0,9 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 8; C-->A | 118 | 13450 | 0,9 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 7; G-->C | 117 | 12674 | 0,9 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA | 2; G-->T | 115 | 6093 | 1,9 |
| hsa-miR-142-3p | TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA | 10; T-->G | 115 | 6093 | 1,9 |
| hsa-miR-130b | CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT | 22; T-->A | 114 | 1051 | 10,8 |
| hsa-miR-20a | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG | 23; G-->T | 113 | 12674 | 0,9 |
| hsa-miR-20b | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG | 24; G-->T | 113 | 2720 | 4,2 |
| hsa-miR-191 | CAACGGAATCCCAAAAGCAGCTG | 21; C-->A | 111 | 3589 | 3,1 |
| hsa-miR-130b | CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT | 28; G-->T | 109 | 1051 | 10,4 |
| hsa-miR-130b | CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT | 10; G-->T | 106 | 1051 | 10,1 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 5; G-->T | 105 | 9921 | 1,1 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 6; T-->C | 105 | 9921 | 1,1 |
| hsa-let-7g | TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT | 21; T-->G | 105 | 9921 | 1,1 |
| hsa-miR-17 | CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 9; T-->C | 104 | 13450 | 0,8 |
| hsa-miR-93 | CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG | 25; T-->G | 104 | 1939 | 5,4 |
| hsa-miR-361-5p | TTATCAGAATCTCCAGGGGTAC | 22; C-->T | 104 | 732 | 14,2 |
| hsa-let-7a | TGAGGTAGTAGTTTGTATAGTT | 8; G-->T | 102 | 3157 | 3,2 |
| hsa-let-7f | TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT | 21; T-->G | 102 | 8441 | 1,2 |
| hsa-miR-92a | TATTGCACTTGTCCCGGCTGT | 27; G-->T | 102 | 918 | 11,1 |

Tablo 7. Ergin miRNA sekansıyla bir nükleotit fark gösteren sekansların klonlanma sıklıkları. Derin sekanslama sonucu JNN, JAN ve JAP fraksiyonlarında belirlenen ergin miRNA'lar ile aynı boyutta olan ancak tek nükleotit fark gösteren klonlar ergin miRNA'lara BLAST yapılarak nükleotit farklılıklarının pozisyonu, türü ve klonlanma sıklığı belirlenmiştir. PSNT; miRNA üzerinde nükleotit farkının gözlemlendiği pozisyon ve değişikliğin türü; FREQ; ilgili sekansın klonlanma sayısı; MM, ilgili miRNA'da pozisyon ve tür bakımından görülen tek nükleotit değişimlerinin toplamı; %MM, ilgili pozisyon ve türde görülen değişikliğin toplam değişiklikler içerisindeki oranı. JNN, kamptotesin ile muamele edilmemiş negatif hücreler; JAN, kamptotesin ile muamele edilen non-apoptotik hücreler; JAP, apoptotik hücreler.

görülen toplam 2093 değişikliğin %30'unu temsil eden ve 23. pozisyonda görülen A→T değişikliğini deneysel olarak belirlemek istedik. Editing olmayan miRNA sayılarında hesaba katıldığında bu klonun görülme sıklığı %6,25 (1/16)'e düşmektedir. Şekil 10'da görüldüğü gibi, sekans analizine gönderilen 14 klondan hiçbirinde nükleotit değişimine rastlayamadık (Komplementer sekans okunduğundan A yerine T nükleotidi, poly(A) kuyruğunun bir parçası olarak görülmektedir).

Ergin miRNA sekanslarında görülen nükleotit değişikliklerini hesaplamada en temel sorun, ergin miRNA ile aynı boyuta sahip ancak bir nükleotit farklılık gösteren dizilerin genomda birden fazla yere eşleşmeleridir. Dolayısıyla, bu tür klonlar miRNA nükleotit değişim ürünleri olabilecekleri gibi, genomun farklı lokuslarından gelen küçük RNA veya mRNA kırıntıları olabilirler. Tek bir nükleotit farklılığı ile genomda birden fazla yere eşleşen sekansların nereden geldiğini hesaplamak için Nexalign genomik blastlama programı kendimize uyarlanmıştır (WIYAJA ve ark., 2009). Öncelikli olarak nükleotit değişimi



Şekil 13. Apoptotik Jurkat fraksiyonunda (JAP) edit edilmiş hsa-miR-142-3p miRNA'sının analizi. 8 µM kamptotesin ile 4 saat muamele edilen Jurkat hücreleri manyetik partiküller ile apoptotik (Annexin V pozitif) ve non-apoptotik (Annexin V negatif) fraksiyonlara ayrıştırılmıştır. Apoptotik fraksiyonlardan 200 nükleotitten küçük RNA'lar izole edilerek RT miRNA cDNA kiti ile cDNA'ya dönüştürülmüştür. RT miRNA qPCR assay (Forward primer, EC4_hsamir_1423p: 5'-GGGATTCCCGAGTGTAGTGTTCCTACTT-3' ve reverse primer EC4_3linkPri : 5'-GGGATTCCCGAGTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') ile çoğaltılan PCR ürünleri pGEM T easy vektörüne klonlanarak sekans analizine tabii tutulmuştur. Edit olmamış hsa-miR-142-3p miRNA'sının sekansı 5' TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA'dır. 23. pozisyonda A→T değişiminin belirlenmesi planlanmıştır. Forward primerde olgun miRNA ile eşleşen kısmın altı çizilmiştir. Komplementer sekansı görülen sekans dizisinde 23. pozisyon ok işareti ile belirtilmiştir.

| SEQUENCE | E PS | ERROR | JNN | JAN | JAP | MIRNAME |
|-------------------------|------|-------|------|-----|-----|-------------|
| CAAAGTTCTTACAGTGCAGGTAG | 6 | M6TG | 1206 | 72 | 113 | hsa-mir-17 |
| TAAAGTTCTTATAGTGCAGGTAG | 6 | M6TG | 1124 | 17 | 83 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTGCTTACAGGGCAGGTAG | 14 | M14GT | 1089 | 240 | 73 | hsa-mir-17 |
| TAAAGTGCTTATAGGGCAGGTAG | 14 | M14GT | 1088 | 58 | 72 | hsa-mir-20a |
| TAAAGGGCTTATAGTGCAGGTAG | 5 | M5GT | 1064 | 168 | 76 | hsa-mir-20a |
| TAAAGTGCTTATATTGCAGGTAG | 13 | M13TG | 1063 | 5 | 74 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTGCTTACATTGCAGGTAG | 13 | M13TG | 997 | 61 | 77 | hsa-mir-17 |
| CAAAGGGCTTACAGTGCAGGTAG | 5 | M5GT | 928 | 678 | 63 | hsa-mir-17 |
| CAAAGTGCTTACAGTTCAGGTAG | 15 | M15TG | 559 | 72 | 54 | hsa-mir-17 |
| CAAAGTGCTTACAGTGCAGGGAG | 20 | M20GT | 465 | 441 | 31 | hsa-mir-17 |
| TAAAGTGCTTATAGTTCAGGTAG | 15 | M15TG | 455 | 11 | 41 | hsa-mir-20a |
| TAAAGTGCTTATAGTGCAGGGAG | 20 | M20GT | 442 | 94 | 36 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTGCTGCAGTGCAGGTAG | 9 | M9GT | 389 | 82 | 20 | hsa-mir-17 |
| CAAAGTGCTTACAGCGCAGGTAG | 14 | M14CT | 328 | 114 | 23 | hsa-mir-17 |
| TAAAGTGCTTATAGCGCAGGTAG | 14 | M14CT | 313 | 21 | 17 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 8 | M8GT | 254 | 30 | 20 | hsa-mir-17 |
| TAAATTGCTTATAGTGCAGGTAG | 4 | M4TG | 251 | 12 | 34 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTGCTTACAGTGCAGGCAG | 20 | M20CT | 242 | 222 | 9 | hsa-mir-17 |
| CAAAGTGCTTACAGAGCAGGTAG | 14 | M14AT | 236 | 70 | 12 | hsa-mir-17 |

| | | | | | | |
|--------------------------|----|-------|-----|-----|----|--------------|
| CAAAGCGCTTACAGTGCAGGTAG | 5 | M5CT | 235 | 119 | 20 | hsa-mir-17 |
| CAAATTGCTTACAGTGCAGGTAG | 4 | M4TG | 230 | 9 | 25 | hsa-mir-17 |
| TAAAGCGCTTATAGTGCAGGTAG | 5 | M5CT | 210 | 26 | 19 | hsa-mir-20a |
| TAAAGTGCTGATAGTGCAGGTAG | 9 | M9GT | 210 | 6 | 17 | hsa-mir-20a |
| TAAAGTGCTTATAGTGCAGGCAG | 20 | M20CT | 209 | 55 | 12 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTTCTCATAGTGCAGGTAG | 6 | M6TG | 204 | 12 | 24 | hsa-mir-20b |
| TAAAGTGCTTATAATGCAGGTAG | 13 | M13AG | 201 | 13 | 17 | hsa-mir-20a |
| TAAAGTGCTTATAGAGCAGGTAG | 14 | M14AT | 190 | 17 | 17 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTACTTACAGTGCAGGTAG | 6 | M6AG | 170 | 47 | 14 | hsa-mir-17 |
| CAAAGTGCTCATAGGGCAGGTAG | 14 | M14GT | 166 | 36 | 19 | hsa-mir-20b |
| CAAAGGGCTCATAGTGCAGGTAG | 5 | M5GT | 154 | 127 | 17 | hsa-mir-20b |
| TAAAGAGCTTATAGTGCAGGTAG | 5 | M5AT | 146 | 21 | 16 | hsa-mir-20a |
| TAAAGTACTTATAGTGCAGGTAG | 6 | M6AG | 145 | 13 | 8 | hsa-mir-20a |
| TTTGGCAATTGTAGAACTCACACT | 9 | M9TG | 142 | 9 | 86 | hsa-mir-182 |
| TAAAGTGCTTATAGTGCATGTAG | 18 | M18TG | 140 | 34 | 16 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTGCTTACAGTGCAGTTAG | 19 | M19TG | 139 | 38 | 12 | hsa-mir-17 |
| CAAAGTGCTTACAGTGCAGGAAG | 20 | M20AT | 131 | 126 | 14 | hsa-mir-17 |
| CAAAGAGCTTACAGTGCAGGTAG | 5 | M5AT | 128 | 84 | 12 | hsa-mir-17 |
| TAAAGTGCTTATAGTGCAGGAAG | 20 | M20AT | 127 | 32 | 11 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTCCTTACAGTGCAGGTAG | 6 | M6CG | 127 | 23 | 10 | hsa-mir-17 |
| TAAAGTGCTTATAGTGCAGTTAG | 19 | M19TG | 122 | 14 | 12 | hsa-mir-20a |
| TAAAGTGCTTAGAGTGCAGGTAG | 11 | M11GT | 121 | 0 | 6 | hsa-mir-20a |
| TAAAGTGCATATAGTGCAGGTAG | 8 | M8GT | 119 | 6 | 13 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTGATTACAGTGCAGGTAG | 7 | M7AC | 118 | 107 | 11 | hsa-mir-17 |
| TAAAGTCCTTATAGTGCAGGTAG | 6 | M6CG | 117 | 1 | 6 | hsa-mir-20a |
| CAAAGTGCTCATATTGCAGGTAG | 13 | M13TG | 113 | 13 | 20 | hsa-mir-20b |
| CAGTGCAATGATGAAAGTGCAT | 17 | M17TG | 109 | 2 | 2 | hsa-mir-130b |
| CAGTGCAATTATGAAAGGGCAT | 9 | M9TG | 106 | 2 | 4 | hsa-mir-130b |
| CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG | 8 | M8CT | 104 | 28 | 6 | hsa-mir-17 |

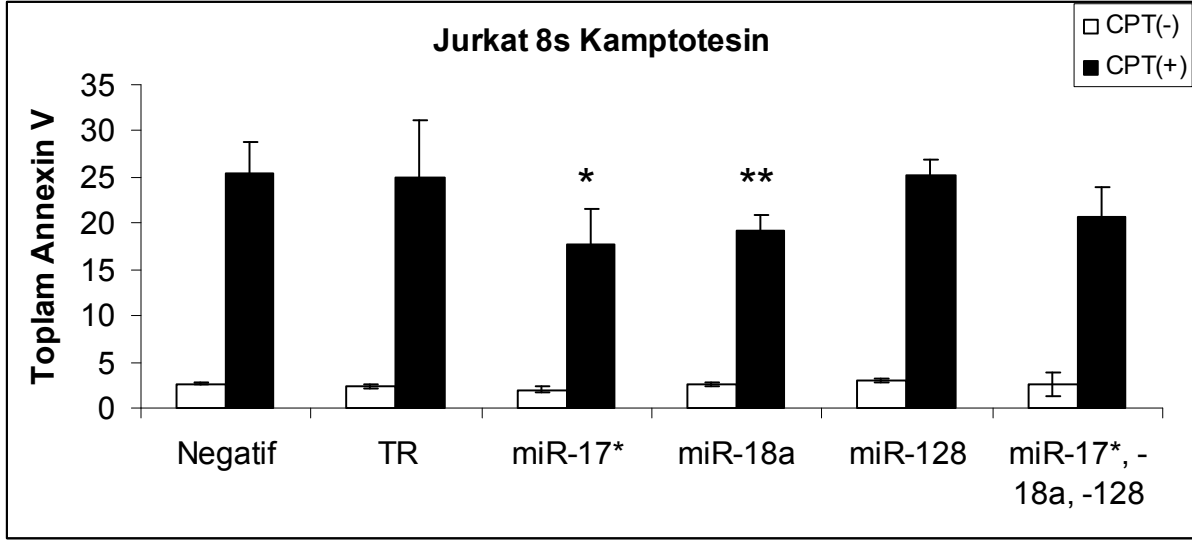
Tablo 8. Ergin miRNA sekansıyla bir nükleotit fark gösteren ve genomda tek yere eşleşen sekansların klonlanma sıklıkları. Derin sekanslama sonucu JNN, JAN ve JAP fraksiyonlarında belirlenen ergin miRNA'lar ile aynı boyutta olan ancak tek nükleotit fark gösteren klonlar ergin miRNA'lara BLAST yapılarak nükleotit farklılıklarının pozisyonu, türü ve klonlanma sıklığı belirlenmiştir. Daha sonra bu klonlar insan genomuna BLAST yapılarak, genomda tek yere eşleşenler filtrelenmiştir. E_PS; nükleotit değişikliğinin pozisyonu; ERROR; nükleotit değişikliğinin türü (örneğin M8CT, 8. pozisyonda normalde T olan editing sonrası C). JNN, kamptotesin ile muamele edilmemiş negatif hücreler; JAN, kamptotesin ile muamele edilen non-apoptotik hücreler; JAP, apoptotik hücreler.

gösteren adayları tüm genome blastlanarak kaç yere eşleştikleri belirlenmiştir. Klonlanma sıklığı 100'den fazla olan ancak genomda sadece tek yere eşleşen adaylar Tablo 8'de sunulmuştur. Biyoinformatik analizler genomda sadece tek lokustan geldikleri için, miR-17, 20a, 20b, 182 ve 130b'in değişik pozisyonlarında nükleotit değişimleri belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır.

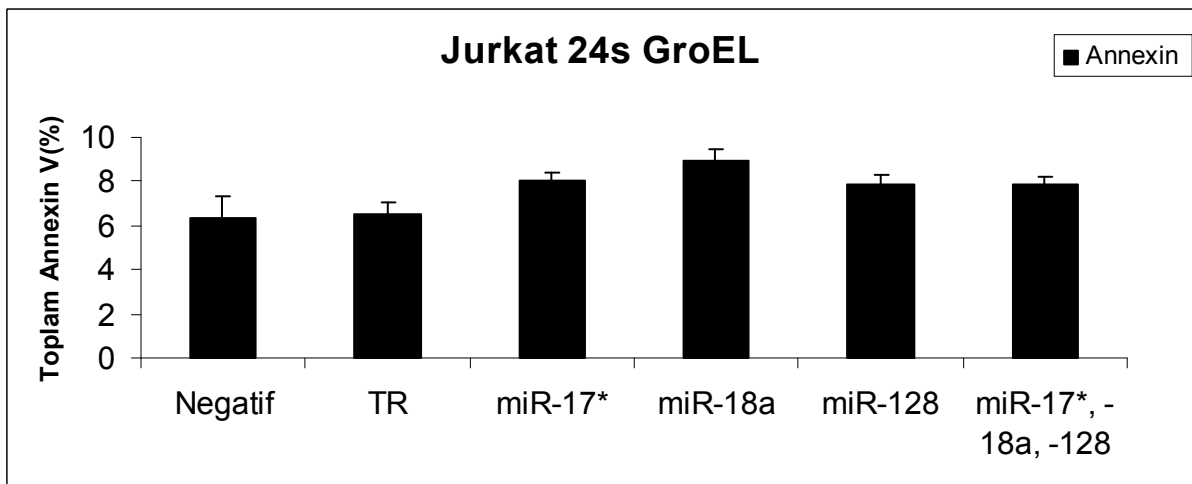
| MikroRNA Adi | JAN/JNN | | |
|-----------------|----------|-------|--------------|
| | qPCR | Array | Derin Sekans |
| miR-142-5p | 0,17 | NA | 0,01 |
| miR-186 | 0,26 | NA | 0,02 |
| miR-30c | 0,19 | NA | 0,02 |
| miR-766 | 0,28 | ND | 0,00 |
| miR-24 | 0,21 | ND | 0,08 |
| miR-7 | 0,14 | 0,81 | 221,45 |
| miR-1268 | 0,32 | 0,72 | 33,63 |
| miR-106b* | 0,20 | ND | 30,27 |
| miR-221 | 0,21 | 1,44 | 14,97 |
| miR-17 | 0,21 | 0,97 | 0,36 |
| miR-17* | 0,19 | ND | 450,84 |
| miR-92a-1* | 0,24 | NA | 0,54 |
| miR-26a | 0,21 | 0,96 | 1,26 |
| miR-18a | 0,21 | 0,72 | 0,79 |
| miR-720 | 0,30 | 1,10 | 3,89 |
| miR-128 | 0,27 | 5,09 | 88,98 |
| miR-425 | 0,25 | 1,74 | 0,21 |
| | JAP/JNN | | |
| miR-142-5p | 0,27 | NA | 0,08 |
| miR-186 | 0,33 | NA | 0,17 |
| miR-30c | 0,25 | NA | 0,16 |
| miR-766 | 0,43 | NA | 0,61 |
| miR-24 | 0,26 | ND | 0,73 |
| miR-7 | 0,22 | 0,13 | 1,01 |
| miR-1268 | 0,45 | 1,54 | 0,72 |
| miR-106b* | 0,20 | ND | 0,72 |
| miR-221 | 0,23 | 0,68 | 1,18 |
| miR-17 | 0,27 | 0,31 | 0,08 |
| miR-17* | 0,19 | ND | 3,32 |
| miR-92a-1* | 0,21 | NA | 0,01 |
| miR-26a | 0,21 | 0,29 | 0,12 |
| miR-18a | 0,25 | 0,13 | 0,09 |
| miR-720 | 1,52 | 0,26 | 0,05 |
| miR-128 | 0,22 | 0,90 | 0,06 |
| miR-425 | 0,18 | 0,36 | 4,44 |
| | JAPI/JAN | | |
| miR-142-5p | 1,58 | NA | 9,66 |
| miR-186 | 1,27 | NA | 8,68 |
| miR-30c | 1,31 | NA | 7,23 |
| miR-766 | 1,52 | ND | 130,37 |
| miR-24 | 1,25 | ND | 8,55 |
| miR-7 | 1,57 | 0,18 | 0,00 |
| miR-1268 | 1,40 | 2,07 | 0,02 |
| miR-106b* | 1,03 | ND | 0,02 |
| miR-221 | 1,08 | 0,38 | 0,08 |
| miR-17 | 1,31 | 0,33 | 0,24 |
| miR-17* | 0,96 | ND | 0,01 |
| miR-92a-1* | 0,86 | NA | 0,02 |

| | | | |
|---------|------|------|-------|
| miR-26a | 1,01 | 0,29 | 0,09 |
| miR-18a | 1,20 | 0,19 | 0,12 |
| miR-720 | 5,09 | 0,15 | 0,01 |
| miR-128 | 0,80 | 0,17 | 0,00 |
| miR-425 | 0,71 | 0,17 | 21,56 |

Tablo 9. Kamptotesinle muamele edilen Jurkat hücrelerinde miRNA ifadesi. Kamptotesinle muamele edilmemiş (JNN), edilmiş non-apoptotik (JAN) ve apoptotik (JAP) hücrelerden küçük RNA izolasyonu sonrası cDNA hazırlanmıştır. PolydT ve miRNA primeriyle qPCR analizi yapılmıştır. U6 küçük RNA'sı normalizasyon için kullanılmıştır. ND, çok az klonlar



Şekil 14. miR-17*, 18a ve 128 ile transfekte edilen Jurkat hücrelerinde kamptotesine cevaben oluşan apoptoz oranları. 6 kuyucuklu plakalarda Transfectamin TM (Invitrogen) ile miRNA aktarımı yapıldıktan sonra Jurkat hücreleri 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat inkübasyon sonrası hücreler yıkandıktan sonra 5 µM kamptotesin ile 8 saat muamele edilmiş ve Annexin-PE immunoboyaması yapılmıştır. Negatif, sadece hücre; TR, sadece transfeksiyon ajanı alan hücreler. Student's T Test TR ile karşılaştırılarak yapılmıştır (* P=0,08; ** P=0,09).



Şekil 15. miR-17*, 18a ve 128 ile transfekte edilen Jurkat hücrelerinde GroEL proteinine cevaben oluşan apoptoz oranları. 6 kuyucuklu plakalarda Transfectamin TM (Invitrogen) ile miRNA aktarımı yapıldıktan sonra Jurkat hücreleri 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat inkübasyon sonrası hücreler yıkandıktan sonra Negatif ve TR hücreler dahil hepsi 20 µg/mL *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL antijeni ile muamele edilmiş ve Annexin-PE immunoboyaması yapılmıştır. Negatif, sadece hücre; TR, sadece transfeksiyon ajanı alan hücreler.

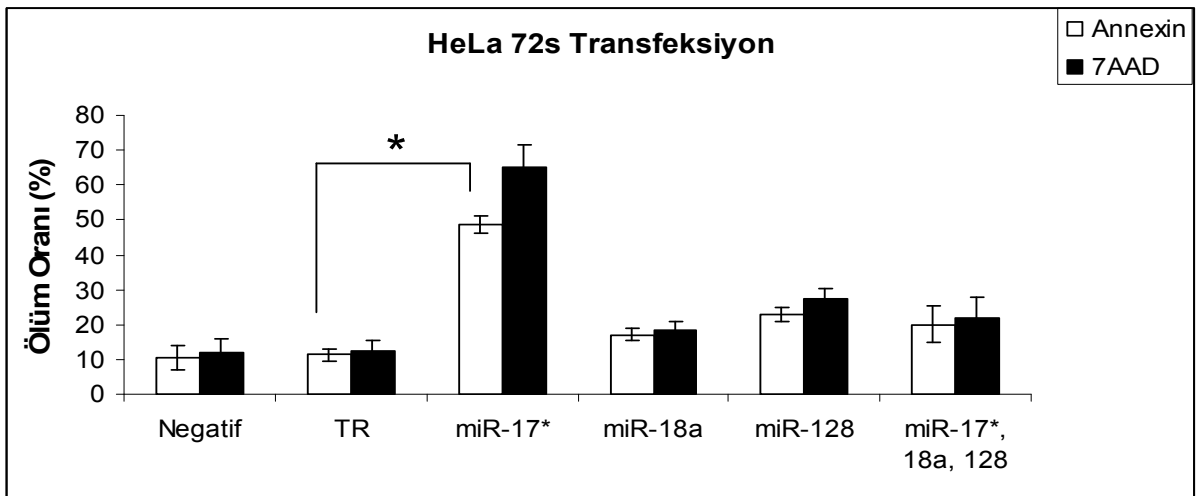
4.7 Mikroarray ve Derin Sekanlama Sonuçlarının qPCR ile Doğrulanması

Derin sekanslamada klonlama sıklığı % 0,02'den az ve mikroarray analizinde floresan miktarı 500 altında olan miRNA'lar elimine edildiğinde her iki metotla belirlenen miRNA'lar daha uyumlu olduğundan, bu kriterler baz alınarak toplam 17 miRNA belirlenmiş ve daha önce ifade edildiği gibi qPCR analizine tabi tutulmuştur (Tablo 9). Kısmen uyum sağlanan bu analiz sonucunda anti-apoptotik miRNA'lar olarak belirlenen hsa-miR-17*, -18a ve -128'in aşırı ifadesine karar verilmiştir.

4.8 miRNA Aşırı İfadesinin Kamptotesinle İndüklenen Apoptoza Etkisi

Belirlenen miRNA'ların tek başına apoptozu düzenlemekte yeterli olup olmadığını test etmek için hsa-miR-17*, -18a ve -128 (Ambion) öncelikle Jurkat hücrelerine aktarılmıştır. Transfeksiyon yapılmayan ve sadece transfeksiyon ajanı (TR) aktarılan hücreler karşılaştırma amaçlı negatif olarak kullanılmıştır. 48 saat transfeksiyon sonrası 8 saatlik kamptotesin muamelesi yapıldığında, kamptotesin yaklaşık %20-25 apoptoza neden olmuştur (Şekil 14, CPT(-) ve CPT(4) karşılaştırması). Bireysel miRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki kamptotesin oranı negatif hücrelerdeki kamptotesinle indüklenen apoptoz oranıyla karşılaştırıldığında (Şekil 14, Negatif ve TR) hsa-miR-17* ve 18a'nın çok azda olsa anlamlı bir anti-apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Adı geçen üç miRNA'nın antijenlerle indüklenen apoptozda rol oynayıp oynamadıklarını araştırmak için benzer bir deney *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL antijeni ile tekrarlanmıştır. Ancak GroEL proteinince indüklenen apoptoz oranlarında çok büyük farklar gözlenmemiştir (Şekil 15).

Jurkat hücrelerinde transfeksiyon oranlarının düşük olduğu rapor edildiğinden, bu hücrelere aynı zamanda GFP geni aktararak transfeksiyon verimliliği ölçülmüştür. Kalitatif analizler Jurkat hücrelerinde transfeksiyon oranının %5-10 arasında değiştiğini göstermiştir. Diğer T lenfosit hücre kaynaklarını transfekte etmekte zor olduğundan, transfeksiyonu kolay HeLa hücreleri alternatif hücreler olarak kullanılmıştır. Adı geçen miRNA'lar HeLa



Şekil 16. miR-17*, 18a ve 128 ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde apoptoz oranları. 6 kuyucuklu plakalarda Transfectamin TM (Invitrogen) ile miRNA aktarımı yapıldıktan sonra HeLa hücreleri 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. 72 saat inkübasyon sonrası Annexin-PE ve 7AAD immunoboyaması yapılmıştır. Negatif, sadece hücre; TR, sadece transfeksiyon ajanı alan hücreler.

hücrelerine aktarıldıktan 72 saat sonra apoptoz oranları ölçüldüğünde, miR-17* ile transfekte edilen hücrelerdeki apoptoz oranında sadece transfeksiyon ajanı aktarılan hücrelere göre anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 16, %11,37'ye karşı %48,6, $P < 0,0001$).

4.9 Biyoinformatik Analizlerle Aday miRNA Hedeflerinin Belirlenmesi

miRNA'ların boyutlarının kısa olması nedeniyle, potansiyel olarak yüzlerce hedef mRNA'ya bağlanabilme potansiyeline sahiptirler. Elde edilen ifade profillerini doğrulamanın indirekt yollarından bir tanesi de ifadelerinde farklılık tespit edilen miRNA'ların potansiyel hedef genlerini belirlemektir. Bu amaçla farklı ifade edilen miR-7, 17, 18a, 128, 186 ve 425 TargetScan programında analiz edilmiştir (LEWIS ve ark., 2005). miR-128 için elde edilen sonuçlar Tablo 10'da sunulmuştur. Bu analize göre PDE3A ve BAG2 apoptozla bağlantısı gösterilen genler olup miR-128'in potansiyel hedefleri arasındadır. Benzer şekilde ATM ve MAP3K1 genleri miR-18a'nın potansiyel genleri arasındadır. RAF1 ve SH3GLB1 ise miR-7'nin potansiyel hedeflerinden apoptozla bağlantısı olan genlerdir.

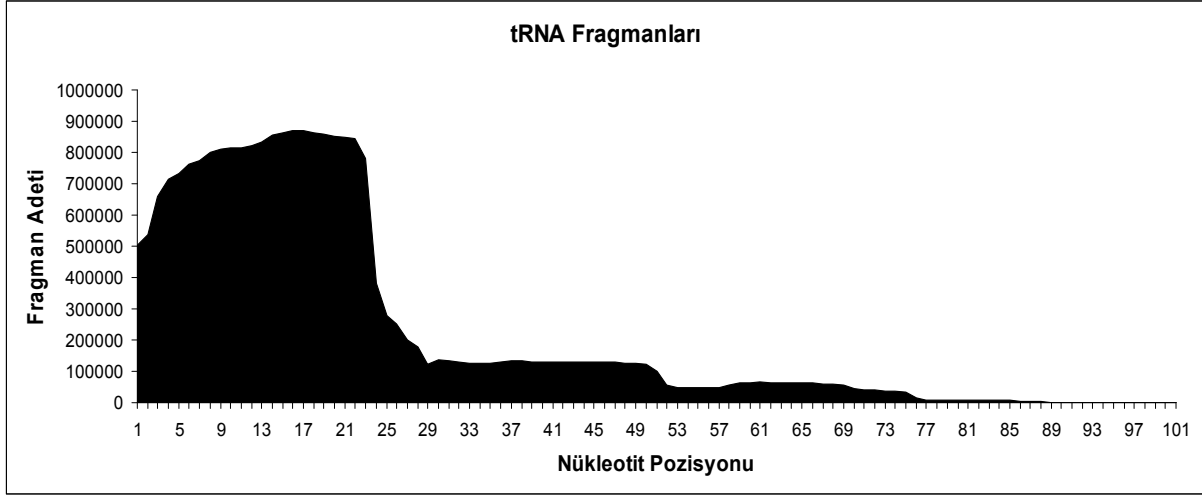
4.10 Diğer Küçük RNA Profillerinin Belirlenmesi

Protein sentezlenmesinde anahtar göreve sahip olan tRNA'lar moleküler detayları bilinmeyen mekanizmalarda kesilmekte ve küçük RNA üretiminde kullanılmaktadır (LEE ve ark., 2009). Sitokrom *c* ile etkileştikleri gösterilen ergin tRNA'lar ribonükleaz enzimleriyle parçalandıklarında apoptoz indüklendiğinden (MEI ve ark., 2010), tRNA'lardan üretilen bu fragmanların apoptozu düzenlemekte rol oynayıp oynamadıkları araştırılmıştır. Şayet tRNA fragmanları apoptozda rol oynuyorlarsa, kamptotesin muamelesi sonrası apoptozu uğrayan (JAP) ve uğramayan (JAN) hücrelerde farklı ifade edilmelidirler. Öncelikli olarak tRNA fragmanlarının tRNA'nın neresinden kökenlendiğini belirlemek için, fragmanlar köken aldıkları tRNA üzerindeki nükleotit pozisyonuna göre tek bir tRNA üzerinde grafiklenmiştir Şekil 17'de görüldüğü gibi, fragmanların baskın bir şekilde tRNA'ların 5' ucundan kökenlendiğini belirlemiş bulunmaktayız. Fragmanların 3' kesim noktasını belirlemek için köken aldıkları tRNA ile eşleştirilerek 5' uca mesafesi belirlenmiştir. Bu analize göre tRNA'lar ağırlıklı olarak 23. nükleotitten sonra kesilmektedirler (Şekil 18).

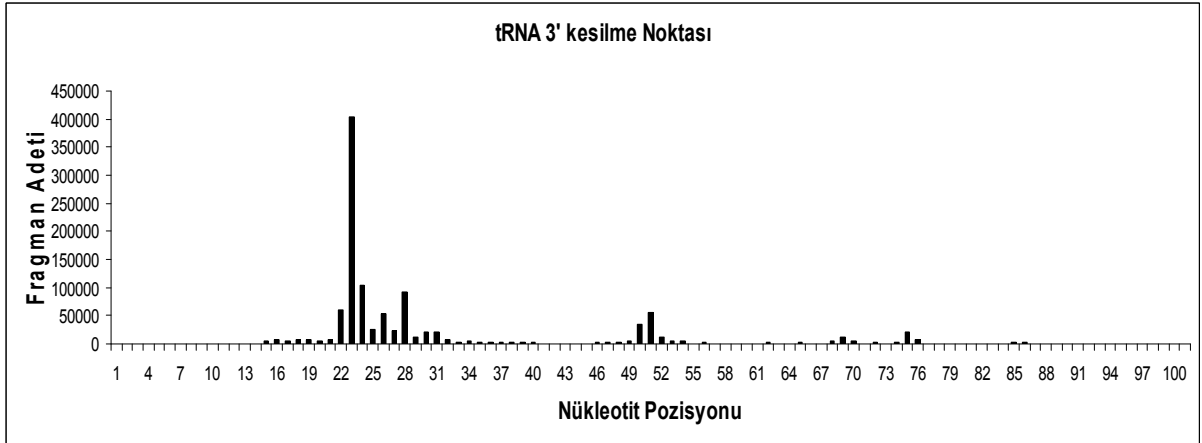
tRNA'lar yapısal nükleik asitler olup protein sentezi için temel işleve sahip olduklarından tüm tRNA'ların parçalanarak fragman üretiminde kullanılması hücre için ölümcül olacaktır. Dolayısıyla şayet üretilen fragmanlar ölüm sürecinin bir parçası olarak üretiliyorsa, baskın bir şekilde kamptotesin ile muamele edilen ve apoptozun indüklendiği JAP hücrelerinde bulunmalıdırlar. Bu noktayı açıklığa kavuşturmak için kamptotesin muamelesi sonrası elde edilen üç hücre grubunda ki tRNA fragman türleri ve her bir fragmanın klonlanma sıklığı hesaplanmıştır (Tablo 11). Elde edilen veriler 2 önemli bulguya işaret etmektedir. Birinci önemli bulgu fragmanlar tüm tRNA'lardan değil seçici bir şekilde bazı tRNA'lardan üretilmektedir. Örneğin Ser_chr2_minus_130749494_130749563 tRNA'sından her üç hücre popülasyonunda fragman üretilmezken, JNN, JAN ve JAP hücrelerinde Ser_chr6_minus_26420803_26420884 tRNA'sından üretilen fragmanlar toplam küçük RNA'ların %0,03915, %0,12198 ve %0,08447'sini oluşturmaktadır. İkinci önemli nokta ise fragmanlar sadece apoptotik hücrelerde (JAP) değil, tRNA fragmanının türüne göre kamptotesinle muamele edilmeyen kontrol hücrelerde (JNN) ve kamptotesinle muamele edilen ancak apoptozu uğramayan hücrelerde de (JAN) üretilmesidir.

| Hedef mRNA | mRNA Açık Adı | miRNA | MFE |
|------------|--|-------------|-------|
| C1orf144 | chromosome 1 open reading frame 144 | hsa-miR-128 | -0.95 |
| PRKY | protein kinase, Y-linked | hsa-miR-128 | -0.95 |
| FAM126A | family with sequence similarity 126, member A | hsa-miR-128 | -0.90 |
| RPS6KA5 | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5 | hsa-miR-128 | -0.87 |
| PRKX | protein kinase, X-linked | hsa-miR-128 | -0.86 |
| LOC402665 | hCG1651476 | hsa-miR-128 | -0.78 |
| RCOR3 | REST corepressor 3 | hsa-miR-128 | -0.75 |
| TMTC2 | transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 2 | hsa-miR-128 | -0.75 |
| GPAM | glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial | hsa-miR-128 | -0.73 |
| IRF4 | interferon regulatory factor 4 | hsa-miR-128 | -0.72 |
| SRGAP2 | SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2 | hsa-miR-128 | -0.71 |
| SEC22A | SEC22 vesicle trafficking protein homolog A (<i>S. cerevisiae</i>) | hsa-miR-128 | -0.70 |
| PAIP2 | poly(A) binding protein interacting protein 2 | hsa-miR-128 | -0.70 |
| PDE3A | phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited | hsa-miR-128 | -0.68 |
| AFF4 | AF4/FMR2 family, member 4 | hsa-miR-128 | -0.68 |
| CCDC4 | coiled-coil domain containing 4 | hsa-miR-128 | -0.67 |
| SS18 | synovial sarcoma translocation, chromosome 18 | hsa-miR-128 | -0.67 |
| SFXN2 | sideroflexin 2 | hsa-miR-128 | -0.66 |
| FAM105B | family with sequence similarity 105, member B | hsa-miR-128 | -0.65 |
| BAG2 | BCL2-associated athanogene 2 | hsa-miR-128 | -0.64 |

Tablo 10. TargetScan programıyla miR-128'in hedef genlerinin belirlenmesi. mirBASE'den elde edilen miR-128 sekansı TargetScan programında yürütüldükten sonra potansiyel genler en düşük serbest enerjiye (MFE, minimum free energy) göre sıralanmıştır.



Şekil 17. tRNA fragmanlarının köken aldığı sekanslar. Derin sekanslama analizi sonrası JNN, JAN ve JAP hücrelerinde belirlenen tüm tRNA fragmanları köken aldıkları tRNA ile eşleştirildikten sonra ilgili tRNA üzerindeki pozisyonlar belirlenmiştir. Tüm fragmanlar tek bir tRNA üzerinde grafiğe dönüştürülmüştür. X koordinatında 1, tRNA'nın 5' ucunu göstermektedir.



Şekil 18. tRNA fragmanlarının 3' kesim noktası. Derin sekanslama analizi sonrası JNN, JAN ve JAP hücrelerinde belirlenen tüm tRNA fragmanları köken aldıkları tRNA ile eşleştirildikten sonra ilgili tRNA üzerindeki pozisyonlar belirlenmiştir. İlligi fragmanların 5' uçtan olan uzunluğu belirlendikten sonra herbir nükleotit pozisyonunda sonlanan fragmanların sayısı hesaplanmıştır.

| tRNA Adi | tRNA Sekansi ve Klonlanan Sekans | JNN | JAN | JAP |
|-------------------------------------|---|---------|---------|---------|
| Val_chrf1_minus_16879088_16879160 | GTTTCTGTGGTGTAGTGGTATCAATGTTCCCTCACACGAGAAAAGTCCCTGATTCGAGACTGGGTGGAAACGCCA | 5 | 6 | 1 |
| Val_chrf1_minus_147561290_147561360 | GCACTGGTGGTTCAGTGGTAGAAATGTCGCTCACACGCGGACACCCGGGTTCAATTCCTGGTCAAGGCAACCA | 0.02662 | 0.01607 | 0.08002 |
| Val_chrf1_minus_147565179_147565251 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAACTGGGCGGAAAACACCA | 0.0038 | 0.39741 | 0.06098 |
| Val_chrf1_minus_147950712_147950785 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGTAAAGGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.0038 | 0.39741 | 0.06098 |
| Val_chrf1_minus_159636114_159636186 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.0038 | 0.39741 | 0.06098 |
| Val_chrf1_minus_178450899_178450971 | GTTCCATAGTGTAGTGGTATCAATTCACCTAACACGCGAAAAGTCCCTGGTTTGAACCCAGGCGAAAACACCA | 4.4E-05 | 0 | 0 |
| Val_chrf3_plus_170972712_170972784 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTAACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.0038 | 0.39741 | 0.06098 |
| Val_chrf5_minus_180548022_180548094 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTAACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.10024 | 0.00232 | 0.00016 |
| Val_chrf5_minus_180548022_180548094 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTAACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.00119 | 0.1153 | 0.0246 |
| Val_chrf6_minus_27281846_27281918 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTTGAACCCAGGCGGAAAACACCA | 0.03787 | 0.00934 | 0.0008 |
| Val_chrf6_minus_27356028_27356100 | GCTTCTGTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.03787 | 0.00934 | 0.0008 |
| Val_chrf6_minus_27726686_27726758 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTAACACGCGAAAAGTCCCTGGATCAAAACCCAGGCGGAAAACACCA | 0.0038 | 0.39741 | 0.06098 |
| Val_chrf6_minus_27756864_27756936 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTAACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.0038 | 0.39741 | 0.06098 |
| Val_chrf6_minus_27804306_27804378 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.0402 | 0.00053 | 0.01177 |
| Val_chrf6_minus_28811185_28811256 | GGGGTGTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTAACATTCATGAGGCTCTGGTTCGATCCCCAGCATCTCCACCA | 0.05548 | 0.14188 | 0.50848 |
| Val_chrf6_plus_27226001_27226073 | GTTTCTGTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGTTAGTCTCACACGTTGAAAGTCCCTGGTTCCGAAACACCA | 8.8E-05 | 0 | 0 |
| Val_chrf6_plus_27311267_27311339 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTAACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.0038 | 0.39741 | 0.06098 |
| Val_chrf6_plus_27366384_27366456 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTAACATTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0 | 0.00058 | 5.3E-05 |
| Val_chrf6_plus_27758467_27758540 | TTTTCTGTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGTTAAAGTTCCTGGTTGGATACAGATGAAATGCCA | 0.00154 | 0 | 5.3E-05 |
| Val_chrf10_minus_5935680_5935752 | GGTTCATAGTGTAGTGGTATCAATCTGCTTTACACGCGAAAAGTCCCTGGTTCAAGCCCCAGTGGAAACACCA | 8.8E-05 | 0.24391 | 0.00058 |
| Val_chrf11_minus_59074678_59074750 | GGTTCATAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCTGGTTCAAGCCCCAGTGGAAACACCA | 8.8E-05 | 0.24391 | 0.00058 |
| Val_chrf11_minus_59075036_59075108 | GGTTCATAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCTGGTTCAAGCCCCAGTGGAAACACCA | 0.00013 | 0.0894 | 0.00037 |
| Val_chrf19_minus_4675647_4675719 | GTTCCGTTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.00066 | 0.00024 | 0.02503 |
| Val_chrfM_plus_1604_1672 | CAGAGTGTAGTGTAAACAAAACCCCACTTACACTTAGAGATTTCAACTTAACCGGCTGTGACCA | 0.0004 | 0.03151 | 5.3E-05 |
| Tyr_chrf2_plus_27127154_27127242 | CCTTCGATAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.00433 | 0.00562 | 0.03463 |
| Tyr_chrf2_plus_218818794_218818886 | CCTTCAATAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 4.4E-05 | 4.8E-05 | 0 |
| Tyr_chrf6_plus_26677065_26677155 | CCTTCGATAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.00433 | 0.00562 | 0.03463 |
| Tyr_chrf6_plus_26683777_26683866 | CCTTCGATAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.00079 | 0.00102 | 0.01564 |
| Tyr_chrf6_plus_26685311_26685399 | CCTTCGATAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.00433 | 0.00562 | 0.03463 |
| Tyr_chrf6_plus_26703081_26703169 | CCTTCGATAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.00415 | 0.00053 | 0.05504 |
| Tyr_chrf7_plus_148886066_148886138 | GGGGTGTAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.00428 | 0 | 0 |
| Tyr_chrf8_minus_66772086_66772173 | TCCTCAATAGTGTAGTGGTATCAAGTTCGCTCACACGCGAAAAGTCCCGGTTCAAAACCGGCGGAAAACACCA | 0.01134 | 0.01186 | 0.00286 |

| | | | | |
|------------------------------------|---|---------|---------|---------|
| Tyr_chr8_plus_67188156_67188248 | CCCTCGATAGCTCAGCTGAGCGGAGGACTGTAGCTACTTCCCTCAGCAGGAGACATCCTTAGGTCGCTGGTTCCGATCCGGCTCGAAGGACCA | 0.00415 | 0.00053 | 0.05504 |
| Tyr_chr8_plus_67188777_67188865 | CCCTCGATAGCTCAGCTGAGCGGGAGGACTGTAGCGCGCCCGTGCCCATCCTTAGTTCGCTGGTTCCGATCCGGCTCGAAGGACCA | 0.00415 | 0.00053 | 0.05504 |
| Tyr_chr14_minus_20191088_20191191 | CCCTCGATAGCTCAGCTGAGCGGGAGGACTGTAGCCTGTAGAAACATTTGTGGACATCCTTAGTTCGCTGGTTCCGATCCGGCTCGAAGGACCA | 0.00415 | 0.00053 | 0.05504 |
| Tyr_chr14_minus_20195463_20195556 | CCCTCGATAGCTCAGCTGAGCGGGAGGACTGTAGATTGTATAGACATTTGGGAGATCCTTAGTTCGCTGGTTCCGATCCGGCTCGAAGGACCA | 0.00415 | 0.00053 | 0.05504 |
| Tyr_chr14_minus_20197957_20198050 | CCCTCGATAGCTCAGCTGAGCGGGAGGACTGTAGACTCGCGAAACGTTTGTGSACATCCTTAGTTCGCTGGTTCCGATCCGGCTCGAAGGACCA | 0.00415 | 0.00053 | 0.05504 |
| Tyr_chr14_minus_20201191_20201284 | CCCTCGATAGCTCAGCTGAGCGGGAGGACTGTAGATTGTACAGACATTTGGGACATCCTTAGTTCGCTGGTTCCGATCCGGCTCGAAGGACCA | 0.00415 | 0.00053 | 0.05504 |
| Tyr_chr14_plus_20221272_20221360 | CCCTCGATAGCTCAGCTGAGCGGGAGGACTGTAGTACTTAATGTGTGTCATCCTTAGTTCGCTGGTTCCGATCCGGCTCGAAGGACCA | 0.00415 | 0.00053 | 0.05504 |
| Tyr_chr14_minus_5827_5892 | GGTAAATGGCTGAGTGAAGCAATGGACTGTAAATCTAAAGACAGGGGTTAGGCCCTCTTTTACCACCA | 0.00031 | 0 | 0.00329 |
| Trp_chr6_minus_26427309_26427380 | GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGGCTGACTCCAGATCAGAAAGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGCGGGTCAACA | 0.0015 | 0.00039 | 0.58839 |
| Trp_chr7_plus_98905243_98905314 | GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGGCTGACTCCAGATCAGAAAGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGCGGGTCAACA | 0.0015 | 0.00039 | 0.58839 |
| Trp_chr9_plus_114656810_114656908 | GGCAGAGGAGGGTGCAGTTGGCAGCCTTCCAAAGTCCAGCCGTTGAGCACAGGATTTAGAATGGATGGTCTGGGTTCAAACCCAGCTCGCGCCCA | 0 | 0 | 0 |
| Trp_chr11_minus_45248776_45248849 | GGAAAGGATGGGCGCAACGCTGTGAAAGCCTGTGGCTCCACAGTCAATGTCCTGGGTTCAAATCCCAAGTTCTGCATCCA | 0 | 0 | 0 |
| Trp_chr12_plus_97422161_97422232 | GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGGCTGACTCCAGATCAGAAAGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGCGGGTCAACA | 0.00022 | 0.00048 | 0.13246 |
| Trp_chr17_minus_8064912_8064983 | GGCCTCGTCGCGCAACGGTAGCGGCTGACTCCAGATCAGAAAGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGCGGGTCAACA | 0.0015 | 0.00039 | 0.58839 |
| Trp_chr17_plus_19352086_19352157 | GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGGCTGACTCCAGATCAGAAAGTTGCGTGTTCAAATCACGTCGCGGGTCAACA | 0.0015 | 0.00039 | 0.58839 |
| Trp_chr18_plus_5513_5580 | AGAAATTAGGTTAAATACAGACAAAGCCCTCAAAGCCCTCAGTAAGTTGGAATCTAAATTTCTGCCA | 4.4E-05 | 0.00073 | 0 |
| Thr_chr1_plus_220704970_220705042 | GGCTCCATAGCTCAGTGGTTAGAGACTGGTCTGTTAAACAGGGGTCGCGAGTTCGATCCTCGCTGGGGCCCTCCA | 0.00013 | 0.00198 | 5.3E-05 |
| Thr_chr5_minus_180551293_180551364 | GGCTCCATAGCTCAGGGGTTAGAGCCTGCTGTTGTTAAACAGGGGTCGCGAGTTCGATCCTCGCTGGGGCCCTCCA | 0.01699 | 0.06607 | 0.0009 |
| Thr_chr6_minus_26641124_26641197 | GGCTCGGTGGCTTAGCTGGTTAAAGCCCTGCTAGTAAACAGGGGTCGCGAGTTCGATCCTCGCTGGGGCCCTCCA | 0.00163 | 0.00053 | 5.3E-05 |
| Thr_chr6_minus_27379547_27379618 | GGCAGAGTGGTGCAGGGAAGCTGTGGGCGCTAACCAGAGTCAATGGATCGAAGCCATCCTTGGCTACCA | 0.00022 | 9.7E-05 | 0 |
| Thr_chr6_minus_28550308_28550381 | GGCTCTATGGCTTAGTGGTTAAAGCCCTGCTTGTAAACAGAGAGATCCTGGGTTCCGAAATCCAGTACAGCCCTCCA | 0.00088 | 0.00024 | 0.00011 |
| Thr_chr6_minus_28564749_28564822 | GGCTCTATGGCTTAGTGGTTAAAGCCCTGCTTGTAAACAGAGAGATCCTGGGTTCCGAAATCCAGTACAGCCCTCCA | 0.00247 | 0 | 0 |
| Thr_chr6_minus_28723963_28724036 | GGCTCTATGGCTTAGTGGTTAAAGCCCTGCTTGTAAACAGAGAGATCCTGGGTTCCGAAATCCAGTACAGCCCTCCA | 0.00247 | 0 | 0 |
| Thr_chr6_plus_27238029_27238102 | GGCCCTGTGGCTTAGCTGGTCAAAGCCCTGCTAGTAAACAGAGATCCTGGGTTCCGAAATCCAGTACAGCCCTCCA | 0.00163 | 0.00053 | 5.3E-05 |
| Thr_chr6_plus_27694114_27694187 | GGCCCTGTAGCTCAGCGGTTGAGCGCTGCTCGTAAACCTTAGGGTGTGAGTTCAAATCTCACACAGGGCCCTCCA | 0 | 4.8E-05 | 0 |
| Thr_chr6_plus_27802452_27802525 | GGCTTCGTGGCTTAGCTGGTTAAAGCCCTGCTTGTAAACAGAGAGATCCTGGGTTCCGAAATCCAGGCGGCTCCA | 0.0011 | 0 | 0 |
| Thr_chr6_plus_28801774_28801847 | GGCTCGTAGCTTAGTGGTTAAAGCCCTGCTAGTAAACAGAGATCCTGGGTTCCGAAATCCAGGCGGCTCCA | 0.00044 | 0 | 0 |
| Thr_chr14_minus_20151861 | GGCTCCATAGCTCAGGGGTTAGAGCCTGCTTGTAAACAGGGGTCGCGAGTTCGATCCTCGCTGGGGCCCTCCA | 0.01699 | 0.06607 | 0.0009 |
| Thr_chr14_minus_20169159_20169231 | GGCTCCATAGCTCAGGGGTTAGAGCCTGCTTGTAAACAGGGGTCGCGAGTTCGAAATCTCGCTGGGGCCCTCCA | 0.01699 | 0.06607 | 0.0009 |
| Thr_chr14_plus_20219689_20219761 | GGCCCTATAGCTCAGGGGTTAGAGCCTGCTTGTAAACAGGGGTCGCGAGTTCGAAATCTCGCTGGGGCCCTCCA | 0.01699 | 0.06607 | 0.0009 |
| Thr_chr16_plus_14287251_14287322 | GGCCGGTGGCCAAAGTGGTAGGGCTCGTGTAAACAGGGGTTCCGAAATCCAGGCGGCTCCA | 0.00079 | 0.01157 | 0.00027 |
| Thr_chr17_minus_7983495_7983568 | GGCCGGTGGCTTAGCTGGTTAAAGCCCTGCTAGTAAACAGGAGATCCTGGGTTCCGAAATCCAGGCGGCTCCA | 0.00181 | 0.00126 | 5.3E-05 |
| Thr_chr17_minus_59957380_59957453 | AGCACCATGGCTTAGCTGTTAAAGCAGCTGCTAGTAAACAGGAGATCCTGAGTTCAAATCCAAATGGTGGCTCCA | 4.4E-05 | 9.7E-05 | 0 |

| | | | | |
|------------------------------------|---|---------|---------|---------|
| Pro_chr1_plus_165950586_165950657 | GGCTCGTTGGTCTAGGGGTATGATTCCTCGCTTCGGGTGCGAGAGTCCCGGGTTCAAATCCCGGACGAGCCGCCCA | 0 | 0.17987 | 0 |
| Pro_chr5_minus_180548460_180548531 | GGCTCGTTGGTCTAGGGGTATGATTCCTCGCTTCGGGTGCGAGAGTCCCGGGTTCAAATCCCGGACGAGCCGCCCA | 0 | 0.17987 | 0 |
| Pro_chr6_plus_27167500_27167571 | GGCTCGTTGGTCTAGGGGTATGATTCCTCGCTTCGGGTGCGAGAGTCCCGGGTTCAAATCCCGGACGAGCCGCCCA | 0 | 0.17987 | 0 |
| Pro_chr11_minus_75624517_75624588 | GGCTCGTTGGTCTAGGGGTATGATTCCTCGCTTCGGGTGCGAGAGTCCCGGGTTCAAATCCCGGACGAGCCGCCCA | 0 | 0.17987 | 0 |
| Pro_chr14_plus_20171005_20171076 | GGCTCGTTGGTCTAGGGGTATGATTCCTCGCTTCGGGTGCGAGAGTCCCGGGTTCAAATCCCGGACGAGCCGCCCA | 0.01911 | 0.14972 | 0.00658 |
| Pro_chr16_plus_3150387_3150481 | GGCTCGTTGGTCTAGGGGTATGATTCCTCGCTTCGGGTGCGAGAGTCCCGGGTTCAAATCCCGGACGAGCCGCCCA | 0.00137 | 0.22116 | 0.02524 |
| Pro_chr16_plus_3181990_3182061 | GGCTCGTTGGTCTAGGGGTATGATTCCTCGCTTCGGGTGCGAGAGTCCCGGGTTCAAATCCCGGACGAGCCGCCCA | 0 | 0.17987 | 0 |
| Pro_chr16_minus_15956_16024 | CAGAGAAATAGTAAATAGAAATCTAGCTTTGGGTGCTAAATGGTAAAGACTTTTCTCTGATCCA | 0.00115 | 0.00048 | 0.00636 |
| Phe_chr6_minus_28839353_28839426 | GCTGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCGTTAGACTGAAGATCTAAAGTTCCCTGGTTCAACCCCTGGTTTCAGCCCA | 0.00075 | 0.00097 | 0.00939 |
| Phe_chr6_minus_28866478_28866550 | GCCGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCGTTAGACTGAAGATCTAAAGTCCCTGGTTTCGATCCCGGGTTTCGGCACCA | 0.01006 | 0.0016 | 0.01633 |
| Phe_chr6_minus_28883589_28883661 | GCCGAGATAGCTCAGTTGGGAGAGCGTTAGACTGAAGATCTAAAGTCCCTGGTTTCGATCCCGGGTTTCGGCACCA | 0.01483 | 0.00015 | 0.00037 |
| Phe_chr6_minus_28899072_28899145 | GCCGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCGTTAGACTGAAGATCTAAAGTCCCTGGTTTCGATCCCGGGTTTCGGCACCA | 0.01006 | 0.0016 | 0.01633 |
| Phe_chr6_plus_27740524_27740599 | GCCGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCGTTAGACTGAAGATCTAAAGTCCCTGGTTTCGATCCCGGGTTTCGGCACCA | 0 | 0 | 5.3E-05 |
| Phe_chr6_plus_28840143_28840215 | GCCGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCGTTAGACTGAAGATCTAAAGTCCCTGGTTTCGATCCCGGGTTTCGGCACCA | 0.01483 | 0.00015 | 0.00037 |
| Phe_chr11_minus_59090429_59090501 | GCCGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGCGTTAGACTGAAGATCTAAAGTCCCTGGTTTCGATCCCGGGTTTCGGCACCA | 0.01006 | 0.0016 | 0.01633 |
| Phe_chr16_plus_579_649 | GTTATGATAGCTTACCTCCTCAAGCAATACACTGAAATGTTTTAGCGGGCTCACATCAACCCATAAACACCA | 0.0004 | 0.00029 | 0.00329 |
| Met_chr1_plus_151910350_151910421 | AGCAGAGTGGCGCAGCGGAAAGCGTCTGGGGCCATAACCCAGAGGTGCGATGGAATCGAAACCATCCTCTGCTACCA | 0.00689 | 9.7E-05 | 0.00021 |
| Met_chr6_minus_26843553_26843625 | GCCCTTAGCGCAGCGCGGAGCGGTCAGTCTCATAATCTGAAGTCTCTGAGTTCCGAGCCTCAGAGGGCACCA | 0.00102 | 0.00242 | 0.00658 |
| Met_chr6_minus_58276451_58276523 | GCCCTTAGCGCAGCGCGGAGCGGTCAGTCTCATAATCTGAAGTCTCTGAGTTCCGAGCCTCAGAGGGCACCA | 0 | 0 | 5.3E-05 |
| Met_chr6_plus_26809691_26809763 | GCCCTTAGCGCAGCGCGGAGCGGTCAGTCTCATAATCTGAAGTCTCTGAGTTCCGAGCCTCAGAGGGCACCA | 0.00102 | 0.00242 | 0.00658 |
| Met_chr6_plus_27853643_27853714 | AGCAGAGTGGCGCAGCGGAAAGCGTCTGGGGCCATAACCCAGAGGTGCGATGGAATCGAAACCATCCTCTGCTACCA | 0.00689 | 9.7E-05 | 0.00021 |
| Met_chr6_plus_29020331_29020403 | GCCCTTAGCGCAGCGCGGAGCGGTCAGTCTCATAATCTGAAGTCTCTGAGTTCCGAGCCTCAGAGGGCACCA | 0.00958 | 0.00015 | 0.00011 |
| Met_chr8_minus_124238651_124238723 | GCCCTTAGCGCAGCGCGGAGCGGTCAGTCTCATAATCTGAAGTCTCTGAGTTCCGAGCCTCAGAGGGCACCA | 0.00256 | 0.01859 | 0.01161 |
| Met_chr9_plus_19393996_19394070 | GCCCTTAGCGCAGCGCGGAGCGGTCAGTCTCATAATCTGAAGTCTCTGAGTTCCGAGCCTCAGAGGGCACCA | 0.00079 | 0 | 0 |
| Met_chr16_minus_85975129_85975201 | GCCCTTAGCGCAGCGCGGAGCGGTCAGTCTCATAATCTGAAGTCTCTGAGTTCCGAGCCTCAGAGGGCACCA | 0.00256 | 0.01859 | 0.01161 |
| Met_chr16_plus_70017897_70017969 | GCCCTTAGCGCAGCGCGGAGCGGTCAGTCTCATAATCTGAAGTCTCTGAGTTCCGAGCCTCAGAGGGCACCA | 0.00102 | 0.00242 | 0.00658 |
| Met_chr16_plus_4403_4470 | AGTAAAGTACGCTAAATTAAGCTATCGGGCCCATACCCGAAATGTTGGTTATACCTCCCGTACTACCA | 0.00022 | 0.00024 | 0.00058 |
| Lys_chr1_minus_55196130_55196202 | GCCAGCTAGCTCAGTGGGTAGAGCATGAGACTTTAATCTCAGGGTCTGGTTTGAGCCCACTGGTTGGTGCCA | 0.02247 | 0.09681 | 0.03659 |
| Lys_chr1_minus_144106879_144106951 | GCCCGGTAGCTCAGTGGGTAGAGCATGAGACTTTAATCTCAGGGTCTGGTTTGAGCCCACTGGTTGGTGCCA | 0.02247 | 0.09681 | 0.03659 |
| Lys_chr1_plus_202742278_202742350 | GCCCGGTAGCTCAGTGGGTAGAGCATGAGACTTTAATCTCAGGGTCTGGTTTGAGCCCACTGGTTGGTGCCA | 0.04626 | 0.40636 | 0.66241 |
| Lys_chr1_plus_203709894_203709966 | GCCCGGTAGCTCAGTGGGTAGAGCATGAGACTTTAATCTCAGGGTCTGGTTTGAGCCCACTGGTTGGTGCCA | 0.00265 | 0.0014 | 0.01453 |
| Lys_chr5_minus_26234296_26234368 | GCCCGACTACCTCAGTGGGTGGAGCATGGGACTCTTCATCCAGGGTTGTGGTTCCGAGCCCACTGGGACCA | 0 | 4.8E-05 | 0 |
| Lys_chr6_minus_27410748_27410820 | GCCTGGTAGCTCAGTGGGTAGAGCATGAGACTTTAATCTCAGGGTCTGGTTTGAGCCCACTGGTTGGTGCCA | 0.02247 | 0.09681 | 0.03659 |

| | | | | |
|------------------------------------|---|---------|---------|---------|
| Leu_chr6_minus_28554379_28554460 | GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGACCGCTGGATTAAAGGCTCCAGTCTCTCCGGGGCGGTGGGTTTGAATCCACCCACCGCTGCCACCA | 0,02251 | 0,00474 | 0,00292 |
| Leu_chr6_minus_28971979_28972084 | GTCAGGATGCCCGAGTGGTCTAAGGCCCGCAGACTCAAGCTAAGCTTCCTCCCGGTGGGATTCGGTCTCCTCAATGGAGGGTGGGTTGGAAATCCACCTTCTGACACCA | 0,01134 | 0,01186 | 0,00286 |
| Leu_chr6_plus_29016809_29016913 | GTCAGGATGCCCGAGTGGTCTAAGGCCCGCAGACTCAAGCTTGGCTTCCTCGTGTGAGGATTCCTGCTCCTCAATGGAGGGTGGGTTGGAATCCACCTTCTGACACCA | 0,01134 | 0,01186 | 0,00286 |
| Leu_chr6_plus_29064758_29064839 | GGTAGCGTGGCCGAGCGGTCTAAGCGCGTGGATTAAAGGCTCCAGTCTCTCCGGGGCGGTGGGTTCAAAATCCACCCCGCTGCCACCA | 0,00481 | 0,01501 | 0,00164 |
| Leu_chr6_plus_69971099_69971181 | ACTCATTTGGCTGAGTGGTTAAGGCAATGGACTTAAAGTCAATGGAGTAGTGGCTGTGGGTTAAACCCCACTACTGGTACCA | 0,00004 | 0,00087 | 5,3E-05 |
| Leu_chr6_plus_144579377_144579459 | ACCAGGATGCCCGAGTGGTCTAAGGCCCGTGGACTTAAAGGCTTGGACTTAAAGTCAATGGAGTAGTGGCTGTGGGTTAAACCCCACTACTGGTACCA | 0,00022 | 0,0031 | 0,00111 |
| Leu_chr11_plus_9253386_9253439 | GCCTCTTAGTCGAGTAGGAGGATGAGTCAAGTCTCAAAATCTGAATGGTCTGAGTTCGAAGCTCAGAGGGGACCA | 4,4E-05 | 0 | 0 |
| Leu_chr11_plus_59075804_59075886 | ACCAGAAITGCCGAGTGGTCTAAGGCCGTTGGACTTAAAGTCAATGGATTCAATCCGCGTGGTTCGAACCCCACTTCTGGTACCA | 0,00071 | 0,00044 | 0,00027 |
| Leu_chr14_plus_20163369_20163450 | GGTAGTGTGCCCGAGCGGTCTAAGGCCGCTGGATTAGGCTCCAGTCTCTCCGGGGCGGTGGGTTCCGAATCCCACTGCCACCA | 0,02251 | 0,00474 | 0,00292 |
| Leu_chr16_minus_22114533_22114614 | GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGGCCCGTGGACTTAAAGGCTTGGACTTAAAGTCAATGGAGTAGTGGCTGTGGGTTAAACCCCACTACTGGTACCA | 0,00433 | 0,00048 | 0 |
| Leu_chr16_plus_55891364_55891446 | GTCAGGATGCCCGAGTGGTCTAAGGCCCGTGGACTTAAAGGCTTGGACTTAAAGTCAATGGAGTAGTGGCTGTGGGTTAAACCCCACTACTGGTACCA | 0,01134 | 0,01186 | 0,00286 |
| Leu_chr17_minus_7964357_7964438 | GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGGCCGTTGGACTTAAAGGCTTGGACTTAAAGTCAATGGAGTAGTGGCTGTGGGTTAAACCCCACTACTGGTACCA | 0,00481 | 0,01501 | 0,00164 |
| Leu_chr20_minus_48385749_48385830 | GGTAGCGTGGCCGAGTGGTCTAAGGCCGTTGGACTTAAAGGCTTGGACTTAAAGTCAATGGAGTAGTGGCTGTGGGTTAAACCCCACTACTGGTACCA | 0,00075 | 0,00015 | 0 |
| Leu_chrM_plus_3231_3305 | GTTAAGATGGCAGAGCCCGTAATCGCATAAACTTAAAGTCAATGGAGTAGTGGCTGTGGGTTAAACCCCACTACTGGTACCA | 0,00004 | 0,00015 | 0,00233 |
| Leu_chrM_plus_12267_12337 | ACTTTAAAGGATAAAGCTATCCATTGGTCTTAGGCCCAAAATTTTGGTCAACTCCAAATAAAAGTACCA | 0,00026 | 0 | 0,00053 |
| Leu_chrX_minus_55224480_55224554 | GTTAAGATGGCAGAGCCCGCAATTCATAGACTTAAAGCTTAAAGTCAATGGAGTAGTGGCTGTGGGTTAAACCCCACTACTGGTACCA | 8,8E-05 | 4,8E-05 | 0 |
| lle_chr2_plus_42891180_42891272 | GCTCCAGTGGCCGAATCGGTTAGCGCGCGTACTTATACAGACTATACAGACTGATCGAGAGTGTGGAGTTGAGCTTCCACCTGAGCAGCA | 0,00018 | 0,0046 | 0,00021 |
| lle_chr6_minus_26829200_26829273 | GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTACAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACGGGCCACCA | 0,01037 | 0,00073 | 0 |
| lle_chr6_minus_26853234_26853307 | GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTACAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACGGGCCACCA | 0,01037 | 0,00073 | 0 |
| lle_chr6_minus_27350969_27351042 | GGCTGGTTAGCTCAGTTGGTACAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACTGGGCCACCA | 0,00031 | 0,00673 | 0,00016 |
| lle_chr6_plus_26862329_26862402 | GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTACAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACGGGCCACCA | 0,01037 | 0,00073 | 0 |
| lle_chr6_plus_27096104_27096197 | GCTCCAGTGGCCGAATCGGTTAGCGCGCGTACTTATATGGCAGTATGTGCGAGTATGCGGAGTTCGAGTTCCGATCCCGTACCGTGGGCCACCA | 0,00022 | 0,00024 | 0,00191 |
| lle_chr6_plus_27349718_27349791 | GGCTGGTTAGTTAGTTAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACTGGGCCACCA | 0,00013 | 0,00015 | 0 |
| lle_chr6_plus_27701719_2770272 | GCTCCAGTGGCCGAATCGGTTAGCGCGCGTACTTATATGGCAGTATGTGCGAGTATGCGGAGTTCGAGTTCCGATCCCGTACCGTGGGCCACCA | 0,00022 | 0,00024 | 0,00191 |
| lle_chr6_plus_27744341_27744414 | GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTACAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACGGGCCACCA | 0,01037 | 0,00073 | 0 |
| lle_chr6_plus_27763946_27764019 | GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTACAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACTGGGCCACCA | 0,01037 | 0,00073 | 0 |
| lle_chr6_plus_28613346_28613439 | GCTCCAGTGGCCGAATCGGTTAGCGCGCGTACTTATATGGCAGTATGTGCGAGTATGCGGAGTTCGAGTTCCGATCCCGTACCGTGGGCCACCA | 0,00018 | 0,0046 | 0,00021 |
| lle_chr6_plus_58257213_58257286 | GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTACAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACTGGGCCACCA | 0,01037 | 0,00073 | 0 |
| lle_chr17_minus_8071034_8071107 | GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTACAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACTGGGCCACCA | 0,01037 | 0,00073 | 0 |
| lle_chr19_minus_44594648_44594740 | GCTCCAGTGGCCGAATCGGTTAGCGCGCGTACTTATATGACAGTCCGAGGAGCAATGCCGAGGTTGAGTTCGATCCCGTACTGGAGCAGCA | 0,00018 | 0,0046 | 0,00021 |
| lle_chrM_plus_4264_4332 | AGAAATATGCTGATAAAGAGTTACTTTTATAGAGTAAATAAAGAGCTTAAACCCCTTATTTCTACCA | 0,00044 | 0 | 0,00392 |
| lle_chrX_minus_3766491 | GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTACAGAGCGTGGTCTAATAACGCCAAGTCCGCGGTTCCGATCCCGTACTGGGCCACCA | 0,01037 | 0,00073 | 0 |
| His_chr1_minus_144108238_144108309 | GCCGTGATGCTATAGTGGTTAGTACTTCCGTTGGCCGCGCAGCAACCTCGTTCCGAATCCGAGTACAGGCCACCA | 0,04017 | 0,00165 | 2,12596 |

| | | | | |
|------------------------------------|---|---------|---------|---------|
| His_chr1_minus_147422452_147422523 | GCCATCATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGGCTGTGGCCGCGAGCAACCTCGGTTGGAAATCCGAGTACAGGGCACCA | 0,00892 | 0,00063 | 0,1191 |
| His_chr3_minus_149799253_149799324 | GCAGTGAAGTATAGTGGTTAGCACTCTGTGGTGGCCACAGCAACCATGGTTCAAAATGAGTCAATGACACCA | 8,8E-05 | 0 | 0,00058 |
| His_chrM_plus_12139_12207 | GTAATAATAGTTTAAACAAAATCATGATTTGTGAATCTGACAAAGAGCTTACGACCCCTTATTACCCCA | 0,00026 | 0,00019 | 0,00663 |
| Gly_chr1_minus_16745021_16745091 | GCAITGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,07244 | 0,59306 | 0,27251 |
| Gly_chr1_minus_16877353_16877423 | GCGTTGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,02662 | 0,01607 | 0,08002 |
| Gly_chr1_minus_144109221_144109292 | GCGTTGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,06595 | 1,8835 | 1,34493 |
| Gly_chr1_minus_159676585_159676656 | GCGTTGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,06595 | 1,8835 | 1,34493 |
| Gly_chr1_minus_159760261_159760331 | GCAITGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,07244 | 0,59306 | 0,27251 |
| Gly_chr1_plus_16926367_16926437 | GCCITGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,02662 | 0,01607 | 0,08002 |
| Gly_chr1_plus_159679718_159679788 | GCAITGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,03213 | 0,25422 | 0,15187 |
| Gly_chr1_plus_159716980_159717050 | GCAITGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,00238 | 0,03935 | 0 |
| Gly_chr2_minus_70329627_70329697 | GCGCCGCTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,00199 | 0,25781 | 0,01946 |
| Gly_chr6_plus_142620469_142620539 | GCAITGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0 | 0 | 0,00011 |
| Gly_chr16_minus_69369615_69369685 | GCAITGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,07244 | 0,59306 | 0,27251 |
| Gly_chr16_plus_69380098_69380168 | GCAITGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,07244 | 0,59306 | 0,27251 |
| Gly_chr17_plus_8065591_8065662 | GCGTTGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,02256 | 0,65894 | 0,59952 |
| Gly_chr17_plus_19704767_19704837 | GCAITGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,01761 | 0,00218 | 0,00021 |
| Gly_chr19_plus_4675082_4675153 | GCGTTGGTGGTTCAGTGGTAGAAATTCCTGCCCTCCACCGCGGAGACCCCGGTTCAATTCGCCGCGCAATGCACCA | 0,02918 | 0,65972 | 0,61374 |
| Gly_chrM_plus_9992_10059 | ACTCTTTTAGTATAAATAGTACCGTTAACTTCCAATTAAGTTTGGACAACTTCAAAAAAGAGTACCA | 0 | 0 | 0,00042 |

Tablo 11. tRNA fragmanlarının klonlanma sıklıkları. BLAST analizi kullanılarak, derin sekanslama sonrası JNN, JAN ve JAP hücrelerinde belirlenen tüm tRNA fragmanlarının köken aldıkları tRNA'lar belirlenmiştir. Her bir fragmanın üç hücre topluluğundaki sayıları hesaplandıktan sonra toplam klon sayılarına bölünerek klonlanma sıklığı yüzde olarak yazılmıştır. tRNA'lardan klonlanan fragmanların sekansı altı çizili olarak belirtilmiştir

TARTIŞMA/SONUÇ

Mevcut proje kapsamında kamptotesin ilacı genel apoptoz indükleyici olarak kullanılmış ve T lenfositlerinde apoptozu düzenleyen yeni miRNA'ların tanımlanmıştır. Doğal olarak öncelikle model olarak kullanılan Jurkat hücrelerinin kamptotesin ile muamele edileceği optimum doz ve zaman belirlenmiştir. Erken apoptotik evrenin hedeflendiği bu yaklaşımda bir kanser hattı olan Jurkat hücrelerinden bazılarının ilacın dozu 100 kat arttırıldığı halde apoptoza uğramadıkları gözlemlenmiştir (Şekil 5A). Apoptoza uğramayan hücreler ayrıştırılıp kamptotesinle tekrar muamele edildiğinde hala apoptoza uğramadıkları tespit edilmiştir (Şekil 6A ve B). Bu hücrelerin apoptoza uğrayan hücrelerden farklı miRNA ifade profiline sahip olabilecekleri varsayılarak, her iki hücre grubu birbirinden ayrıldıktan sonra elde edilen miRNA profilleri kamptotesinle muamele edilmeyen kontrol hücrelerin miRNA profiliyle karşılaştırılmıştır.

Kamptotesine cevaben farklı ifade edilen miRNA'ları tanımlamak için mikroarray, derin sekanslama ve qPCR teknikleri kullanılmıştır. Floresan yoğunluğuna bakılmaksızın mikroarray sonuçları değerlendirildiğinde toplam 261 miRNA'nın farklı ifade edildiği görülmüştür (Tablo 2). Literatürle uyumlu olarak anti-apoptotik miR-17-92 ailesi (miR-18a, -19b ve -92) ve miR-106b apoptotik hücrelerde baskılanmaktadır (Tablo 3, SUBRAMANIAN ve STEER, 2010). Diğer yandan apoptotik miR-29 aşırı ifade edilmektedir. Ancak kanser hücrelerinde aşırı ifade edildiği rapor edilen apoptotik *let-7* ailesi miRNA'ların beklenenin aksine apoptotik hücrelerde baskılandığı görülmektedir. *Let-7* ailesi miRNA'lar arasında tek nükleotit farklılıklar görüldüğünden mikroarray analizinde güvenilir bir şekilde tespit edilemiyor olabilirler. Alternatif olarak, T hücre apoptozunda *let-7* üyeleri anti-apoptotik bir rol oynuyor olabilirler. Mikroarray analiziyle bilinen bu miRNA'lar yanında T lenfosit apoptozunu düzenleyen bir dizi yeni miRNA tanımlanmıştır (Tablo 2).

Mikroarray analizi genomik seviyede genel bir tarama yöntemi olup sonuçların alternatif metotlarla doğrulanması gerekmektedir. Proje ilk sunulduğunda qPCR için gerekli primerler ticari olarak satılmadığından, miRNA ifadelerinde oluşan farklılıkların RNase Protection Assay (RPA) yöntemiyle doğrulanacağı önerilmiştir. RPA yöntemi ile miRNA tespiti miRNA'nın ifade miktarına göre en az 2-5 µg toplam RNA gerektirmektedir. Dolayısıyla 20 miRNA'nın doğrulanması için gerekli toplam RNA 3 deneysel replika göz önünde tutulduğunda en az 100-150 µg toplam RNA'yı bulmaktadır. Gerekli RNA hazırlandıktan sonra qPCR 1 gün içerisinde yapılırken, RPA için gerekli riboprob DNA'sının hazırlanması (7-10 gün), *in vitro* transkripsiyon ile antisense RNA riboprobunun hazırlanması (3-4 gün) ve RPA deneyinin yapılması (4 gün) çok uzun sürmektedir. miRNA kantitasyonu için qPCR yöntemlerinin geliştirilmiş olması nedeniyle, zaman ve emek tasarrufu göz önüne alınarak qPCR metodu tercih edilmiştir. Mikroarray sonuçları dikkate alınarak 8 adet miRNA'nın qPCR ile doğrulanması yapılmıştır (Tablo 4, miR-7, 25, 93, 196b, 363, 370, 582-5p ve 611).

Tablo 4'te sunulan 8 miRNA adayını dikkate alındığında, bazı miRNA'lardan alınan floresan yoğunluğunun az olması ve bazı miRNA'ların qPCR ile doğrulanamaması nedeniyle, proje teklif edildikten sonra geliştirilen derin sekanslama yöntemi (METZKER, 2010) kullanılarak miRNA ifade profili tekrar elde edilmiştir (Tablo 6). Derin sekanslama iki kısa sekans arasında tek bir nükleotit fark olsa dahi bu iki sekansı birbirinden ayırt edebildiğinden, sekans hatası olmadığı sürece daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu

nedenle kamptotesine cevaben farklı ifade edilen miRNA'ları belirlerken derin sekanslama ve mikroarray sonuçları karşılaştırmalı analiz edilmiştir. Tablo 6'da sunulan sonuçlar incelendiğinde, belirgin olarak 5 değişik miRNA grubunun ortaya çıktığı görülmektedir. 1. grupta yer alan 36 miRNA'nın ifade miktarı JAN fraksiyonunda en fazla, JAP fraksiyonunda en azdır. Yani, apoptozun indüklenmesi için bu miRNA'ların baskılanması gerekmektedir. Ya JAN fraksiyonundaki hücreler bu miRNA'ların ifadesini arttırarak apoptoza direnç kazanmaktadırlar yada doğal olarak bu miRNA'ları aşırı ifade ettiklerinden ölmüyor olabilirler. 2. grupta yer alan 16 miRNA'nın ifade miktarı JNN ve JAP fraksiyonunda eşittir. Dolayısıyla bu miRNA'ların miktarı kamptotesinle ölen hücrelerde bir değişiklik göstermemektedir. JAN fraksiyonunda bulunan hücreler doğal olarak bu miRNA'ları farklı ifade ediyor olabilirler. Bizde bu veriyi, bu miRNA'ların *yaşam miRNA'ları* olabileceği şeklinde değerlendirmekteyiz. 3. grupta yer alan miRNA'lar JNN ve JAN grubunda eşit miktarda ifade edilip apoptoza uğrayan JAP hücrelerinde farklı ifade edilmektedir. Dolayısıyla, bu gruptaki miRNA'lar kamptotesin ile indüklenen apoptozda rol oynayan miRNA'ları içermektedir. 4. gruptaki miRNA'lar en fazla JNN en az JAN grubunda ifade edilmektedir. Bu miRNA'lar muhtemelen apoptozla ilintili olmayabilir. Çünkü hem JAN hemde JAP grubunda baskılanmaktadırlar. İlaç metabolizması veya farklı hücrese cevapta rol oynuyor olabilirler. 5. grupta bulunan miRNA'lar JAP ve JAP fraksiyonunda eşit miktarda ifade edilmektedir. Dolayısıyla kamptotesin ile indüklenen apoptozla bağlantıları yoktur. Muhtemelen ilaç metabolizmasında veya ilaca cevaben oluşan strese yanıtta rol oynuyor olabilirler.

Mikroarray ve derin sekanslama sonuçları yan yana karşılaştırılarak, toplam 17 aday qPCR yöntemiyle tekrar analiz edilmiştir (Tablo 9). Bu sonuçlara göre her üç metot arasında hala tam bir uyumun olmadığı görülmektedir. Mikroarray ve derin sekans verilerini detaylı incelediğimizde, derin sekanslamada klonlama sıklığı %0,01'den küçük olan miRNA'lar, muhtemelen yüksek arka plan (background) nedeniyle mikroarray analizinde yanıltıcı değerler verebilmektedir. Aynı şekilde, mikroarray analizinde floresan yoğunluğu 500'den küçük miRNA'larda derin sekanslama (ve qPCR) sonuçları ile uyumsuz görünmektedirler. Ancak, derin sekanslamada klonlanma sıklığı %0.01'in, mikroarray analizinde floresan yoğunluğu 500'ün üzerinde olan miRNA'ların bazılarında da uyumsuzluk gözlemlenmiş bulunmaktayız (örneğin, miR-181a, miR-let-7g, miR-7). Bu uyumsuzluğun birçok sebebi olabilir. Örneğin, bu miRNA'lar mikroarray analizinde diğer miRNA sekansları ile hibridize oluyor olabilir (cross-hybridization). Ayrıca, bazı miRNA'ların nükleotit değişimi (editing) işlemine tabii olduğu bilinmektedir (KAWAHARA ve ark., 2007a; KAWAHARA ve ark., 2008). Nükleotit değişimlerinin olduğu pozisyonlar 5' ve 3' üssü uçlara yakın olduğunda mikroarray ve qPCR ile ayırt edilmezken, derin sekanslamada tam eşleşme yapan sekanslar değerlendirmeye alındığından, nükleotit değişimlerinde uyumsuzluğa katkıda bulunuyor olabilir.

Tablo 9'da karşılaştırmalı olarak sunulan sonuçlar dikkate alınarak 3 adet miRNA (miR-17*, miR-18a ve miR-128) aday aşırı ifade için seçilmiştir. miR-18a, akut T lenfoblastik lösemide NK-benzeri "homeodomain" proteinleri tarafından aktive edilmekte ve E2F1 proteininin miktarını azaltarak apoptozu baskılamaktadır (NAGEL ve ark., 2009). Bu miRNA miR-17-92 ailesinin bir üyesi olup bu aile üyelerinin aşırı ifadesinin apoptozu baskılayarak çeşitli kanser oluşumlarında rol oynadıkları bilinmektedir (SUBRAMANIAN ve STEER, 2010). Bu nedenle, miR-18a pozitif kontrol olarak seçilmiştir. Bu çalışmayla tanımlanan miR-128 yeni aday olarak belirlenmiştir. miR-17*, miR-17'nin ters sekansı olup ölen hücrelerde ölmeyenlere göre 100 kat azalmaktadır. Şayet bu adayların miktarındaki azalma apoptozu indükleyorsa, aşırı ifade edildiklerinde kamptotesinle

muamele edilen hücrelerde apoptoza kısmi direnç oluşmalıdır.

Aday miRNA'lar öncelikle transfeksiyonu zor olan Jurkat hücrelerinde aşırı ifade edilmiştir. Bu miRNA'lar transfeksiyon verimliliği en fazla %25-35 arasında değişen Jurkat hücrelerinde (bizim verilerimize göre %5-10) aşırı ifade edildiğinde kontrol ve kamptotesinle muamele edilen hücreler arasında azda olsa bir fark görülmüştür. Örneğin, sadece transfeksiyon ajanı aktarılan hücrelerde %25 (SD, 6,1) apoptoz görülürken, miR-17* ve 18a aktarılan hücrelerde bu oran sırasıyla %17,6 ve 19,2'ye düşmüştür (Şekil 14). Aynı miRNA'lar bu kez transfeksiyonu daha kolay HeLa hücrelerinde aşırı ifade edilmiştir. İlginç bir şekilde 72 saat inkübasyon sonrası miR-17* HeLa hücrelerinde apoptoza neden olmuştur (Şekil 16). Aynı miRNA farklı hücre hatlarında ters etki yapabilmektedir. Örneğin, miR-191 HeLa hücrelerinde hücre büyümesini indüklerken A549 akciğer karsinoma hücrelerinde hücre büyümesini baskılamaktadır (CHENG *ve ark.*, 2005). Periferel kan tek çekirdekli hücrelerden elde edilen CD4+ hücreler sadece kalıcı transfeksiyon yöntemiyle transfekte edildiklerinden bu hücrelerde transfeksiyon denenmemiştir. GFP ile transfekte ettiğimiz deneyler sonucu CD4+ hücrelerde transfeksiyon oranının yaklaşık % 5 gibi çok düşük miktarda olduğunu tahmin etmekteyiz. Proje teklif edildiğinde farklı ifade edilen miRNA'ların aşırı ifade edilmesinin yanında susturularak fonksiyonel testlerin yapılacağı önerilmiştir. Ancak genel itibarıyla miRNA baskılanmasının apoptoza yol açması ve baskılamanın kamptotesinden bağımsız miRNA aşırı ifadesinden mi yoksa teknik bir hatadan mı kaynaklandığını ayırt etmek çok zor olduğundan, miRNA aşırı ifadesinin fonksiyonel testler için yeterli olduğu değerlendirilmiştir.

MiRNA'lar sadece ilaçlarla indüklenen apoptozu değil bakteriyel antijenlerle indüklenen apoptozu da düzenlemektedir (BALTIMORE *ve ark.*, 2008). Örneğin, miR-132, miR-146 ve özellikle miR-155 endotoksinlere cevaben Toll-benzeri sinyal ileti yolağını düzenlemektedirler (TAGANOV *ve ark.*, 2006). Aday miRNA'ların kamptotesin gibi genel apoptoz indükleyici ilaçlar yanında antijen ile indüklenen apoptozda rol oynayıp oynamadıkları test edilmiştir. Bu amaçla ilgili miRNA'lar Jurkat hücrelerinde aşırı ifade edilerek GroEL (A. Nalbant *ve ark.*, yayınlanmamış veri) ile indüklenen apoptoz oranlarında değişimler ölçülmüştür (Şekil 15). Şu andaki verilerimiz bu miRNA'nın GroEL ile tetiklenen apoptozda bir fark yaratmadığını göstermektedir.

miRNA profilini elde etmek için mikroarray yanında derin sekanslama teknolojisini kullanmamız proje sunulurken öngörülmeyen çok enteresan verilerin elde edilmesine olanak tanımıştır. Bu verilerden bir tanesi daha önce mRNA'larda rapor edilen ancak miRNA'larda da meydana geldiği belirtilen nükleotit değişimleridir (KAWAHARA *ve ark.*, 2007a ; OKAMURA *ve ark.*, 2005). JNN, JAN ve JAP hücreleri karşılaştırıldığında miRNA'ların özellikle 6. pozisyonunda anlamlı bir şekilde farklı nükleotit değişimleri olduğu görülmektedir (Şekil 12). miRNA'ların hedeflerini tanımları için 5' üsü uçta bulunun 2-8 nükleotitlik çekirdek eşleşme önemli olduğundan, 6. pozisyonda meydana gelen nükleotit değişimleri ilgili miRNA'ların hedef mRNA'larını değiştirerek apoptozu düzenleyebilirler (KAWAHARA *ve ark.*, 2007b). Derin sekanslama verisi değerlendirildiğinde onlarca miRNA'nın değişik pozisyonlarda nükleotit değişimine uğradığı ve bu değişimin her üç hücre popülasyonu arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 7). İlk analizler baz alınarak miR-142-3p'de bulunan nükleotit değişimi incelenmiştir. Görülme sıklığı %6,25 (1/16) olan bu değişimi tespit etmek için 14 klon Sanger sekans analizine tabi tutulmuş ancak hiçbir değişim görülmemiştir. Yeni yayımlanan bir çalışmaya göre bir miRNA'nın nükleotit değişimine uğradığı sonucuna

varmak için, tek nükleotitlik fark gösteren sekansın genomun başka yerinden gelmediğinin gösterilmesi gerekmektedir (de HOON *ve ark.*, 2010). "cross-mapping" analiz adı verilen bu programla aday miRNA'lar tekrar analiz edildiğinde miR-142-3p'nin minimum kriter olarak belirlenen %10 kriterini geçmediği tespit edilmiştir. Ancak özellikle miR-17, 20a ve 20b sekanslarından tek nükleotit farkla ayrılan, ilgili yabancı tip miRNA'nın %10'undan fazlasını oluşturan ve genomda tek yere eşleşen adaylar olduğu bulunmuştur (Tablo 8). Bu değişimlerin apoptozla bağlantısını daha fazla araştırılmamıştır.

Derin sekanslama analizi miRNA'ların yanında diğer küçük RNA'ları analiz etmemize de imkan vermiştir. Bu grup küçük RNA'lar arasında en iyi tanımlananlar siRNA (FIRE *ve ark.*, 1998) ve piRNA'lardır (ARAVIN *ve ark.*, 2001). Daha çok üreme hücrelerinde ifade edilen piRNA'lar ile apoptoz arasında bir bağlantı kurulamamıştır. Transpozonlar, mRNA kırıntıları ve transkripsiyon başlangıcı esnasında antisense transkriptlerden üretilen endo-siRNA'ların tam bir listesi olmadığı için bu gruba da öncelik verilmemiştir. Belkide bu grup küçük RNA'lar içerisinde apoptoz ile ilintisi olabilecek en ilginç RNA'lar tRNA'lardan üretilen fragmanlardır (LEE *ve ark.*, 2009). Henüz biyogenezleri ve gen regülasyonundaki rolleri tam olarak bilinmemekte birlikte, tRNA'lardan da küçük fragmanlar üretilmektedir. İlginç bir şekilde tRNA'ların fragmantasyonu indüklendiğinde apoptoz tetiklenmektedir (MEI *ve ark.*, 2010). Bu çalışmada tRNA'ların sitokrom c'ye bağlandığı ve ergin tRNA'lar enzimlerle parçalandıklarında apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir. Ancak apoptozun nedeninin tRNA parçalanması mı yoksa tRNA'lardan üretilen küçük fragmanların diğer fonksiyonları mı olup olmadığı bilinmemektedir. Ayrıca, tRNA parçalanması arasında bir seçicilik olup olmadığı araştırılmamıştır. Bu konulara ışık tutmak adına, deneysel dizayn sonrası elde edilen JNN, JAN ve JAP hücrelerinde bulunan tRNA fragman türü ve her bir fragmanın klonlanma sıklığı hesaplanmıştır. İlginç bir şekilde tRNA'lardan üretilen fragmanlar daha ziyade tRNA'ların 5' üssü ucundan üretilmektedir (Şekil 17). Apoptoza uğrayan ve uğramayan hücreler karşılaştırıldığında, fragman üretilen türü ve miktarı arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır (Tablo 11). Bu fragmanların apoptozla direkt bağlantısını kurabilmek için ilgili fragmanların hücrelerde aşırı ifade edilerek apoptoz oranlarının ölçülmesi gerekmektedir.

Özetle, mevcut proje kapsamında Jurkat hücreleri genel kapsamlı apoptoz tetikleyici kamptotesin ile muamele edilerek apoptozda rol oynayan yeni miRNA'lar belirlenmiştir. Kamptotesinle muamele sonrası ilaca duyarlı ve dirençli hücreler birbirinden ayırt edildiğinden, kamptotesin ilacına dirençte rol oynayan "yaşam miRNA" ları da tanımlanmıştır. Mikroarray ve derin sekanslama teknikleri kullanılarak yapılan genomik profillemeye yöntemiyle apoptozda rol oynayan miRNA'lar yanında miRNA nükleotit değişimleri ve tRNA fragmanlarının apoptozdaki potansiyel rolleri üzerine önemli biyoinformatiksel veriler elde edilmiştir.

İleriye Dönük Yapılması Gereken Çalışmalar

Mevcut proje kapsamında Jurkat T hücreleri model olarak kullanılarak genomik seviyede apoptozu düzenleyen miRNA taraması yapılmıştır. Sonuçlarımız daha önce literatürde yayınlanan apoptotik miRNA'lar yanında bir dizi yeni apoptotik ve anti-apoptotik miRNA olduğuna işaret etmektedir. Jurkat ve HeLa hücrelerinde görülen farklılıkların anlaşılması için daha detaylı analizler yapılmalı ve her iki hücre grubunda bulunan muhtemelen farklı hedef mRNA'lar belirlenmelidir. Kullandığımız hücre hattı bir kanser hücre hattı olmasına rağmen, sonuçların klinik uygulamaya açılabilmesi için yeni

çalışmalar yapılması gerekmektedir. Örneğin, farklı ifade edilen miRNA'ların akut T lenfosit lösemi tanı ve tedavi takibinde kullanılabilmesi için ilgili hasta ve kontrol gruplarıyla çalışmalar yapılarak bu miRNA'lerin ifadeleri belirlenmelidir. Böylece bu miRNA'ların markör olarak kullanılıp kullanılmayacağı değerlendirilmelidir.

Mevcut projenin ilginç çıktılarından birisi miRNA'larda gözlemlenen nükleotit değişim olaylarıdır. Proje kapsamında olmaması nedeniyle detaylı incelenmediğinden, belirlenen nükleotit değişim olaylarının apoptoz ile direkt bağlantısını kurabilmek için, Jurkat hücrelerinin heterojen bir genotipe sahip olması nedeniyle, (1) ilgili miRNA'larda SNP olmadığının ve (2) bu değişimlerin transkripsiyon sonrası oluştuğunun gösterilmesi gerekmektedir. Daha sonra yabancı tip ve nükleotit değişimine uğrayan miRNA'lar hücrelerde aşırı ifade edilerek apoptoz üzerine etkileri belirlenmelidir. Benzer bir şekilde, apoptoza uğrayan ve uğramayan hücrelerde ifadelerinde farklılık tespit edilen ve tRNA'lardan kökenlenen tRNA fragmanlarının daha kapsamlı araştırılması ve apoptozla ilgilerinin daha direkt yöntemlerle ortaya konması gerekmektedir.

REFERANSLAR

- AKAO, Y., Nakagawa, Y., Iio, A., Naoe, T., Role of microRNA-143 in Fas-mediated apoptosis in human T-cell leukemia Jurkat cells, *Leukemia Research*, 33, 1530-1538, (2009).
- ARAVIN, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.V., Vagin, V.V., Rozovsky, Y.M., Gvozdev, V.A., Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. Melanogaster* germline, *Current Biology*, 11, 1017-1027, (2001).
- ARNOLD, R., Brenner, D., Becker, M., Frey, C.R., Krammer, P.H., How T lymphocytes switch between life and death, *Eur. J. Immunol.*, 36, 1654-1658, (2006).
- ASHKENAZI, A., Dixit V.M., Death receptors: signaling and modulation, *Science*, 281, 1305-1308, (1998).
- BAEHRECKE, E.H., How death shapes life during development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3, 779-787, (2002).
- BALTIMORE, D., Boldin, M.P., O'Connell, R.M., Rao, D.S., Taganov, K.D., MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function, *Nature Immunology*, 9, 839-845, (2008).
- BARTEL, D.P., Chen, C.Z., Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs, *Nat. Rev. Genetics*, 5, 396-400, (2004).
- BASS, L.B., RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA, *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 817-846, (2002).
- BOISE, L.H., Gonzales-Garcia, M., Postena, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez C., Thompson, C.B., Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death, *Cell*, 74, 597-608, (1993).
- BORSANI, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., Zhu, J.K., Endogenous siRNAs derived from a pair of natural ciantisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*, *Cell*, 123, 1279-1291, (2005).
- BOUTLA, A., Delikadis, C., Tabler, M., Developmental defects by antisense-mediated inactivation of microRNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes, *Nucleic Acids Res.*, 31, 4973-4980, (2003).
- BRENNECKE, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S. M., *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*, *Cell*, 113, 25-36, (2003).
- CARTHEW, R.W., Sontheimer, E.J., Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs, *Cell*, 136, 642-655, (2009).

- CHEN, C.-Z., Li, L., Lodish, H.F., Bartel, D.P., MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation, *Science*, 303, 83-86, (2004).
- CHENG, A.M., Byrom, M.W., Shelton, J., Ford, L.P., Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis, *Nucleic Acids Research*, 33, 1290-1297, (2005).
- CHENDRIMADA, T.P., *ve ark.*, TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing, *Nature*, 436, 740-744, (2005).
- CHENG., A.M., Byrom, M.W., Shelton, J., Ford, L.P., Antisense inhibition of human miRNAs and indication for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis, *Nucleic Acids Research*, 33, 1290-1297, (2005).
- COSTA, F.F., Non-coding RNAs: Lost in translation?, *Gene*, 386, 1-10, (2007).
- DANIAL, N.N., Korsmeyer, S.J., Cell death: critical control points, *Cell*, 116, 205-219, (2004).
- De HOON., M.J., Taft, R.J., Hasimoto, T., Manamori-Katayama, M., Kawaji, H., Kawano, M. *ve ark.*, Cross-mapping and the identification of editing sites in mature microRNAs in high-throughput sequencing libraries, *Genome Res.*, 20, 257-264, (2010).
- DEGRETEV, A., *ve ark.*, "A decade of caspases, *Oncogene*, 22, 8543-8567, (2003).
- DENLI, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., Hannon, G.J., Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex, *Nature*, 432, 231-235, (2004).
- DU., C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition, *Cell*, 102, 33-42, (2000).
- ENARI., M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD, *Nature*, 391, 43-50, (1998).
- FEARNHEAD, H.O., Getting back on track, or what to do when apoptosis is de-railed: recoupling oncogenes to the apoptotic machinery, *Cancer Biol. Ther.* 3, 21-28, (2004).
- FIRE, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391, 806-811, (1998).
- FORSTEMANN, K. *ve ark.*, Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein, *PLoS Biol.*, 3, e236, (2005).
- FULCI, V., Colombo, T., Chiaretti, S., Cossina, M., Citaarella, F., Tavoraro, S., Guarini, A., Fao, R., Macino, G., Characterization of B- and T-lineage acute lymphoblastic leukemia by integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles, *Genes, Chromosomes*

and Cancer, 48, 1069-1082, (2009).

GREEN., D.R., Droin, N., Pinkoski, N., Activation-induced cell death in T cells, *Immunological Rev.*, 193, 70-81, (2003).

GHILDIYAL, M., Seitz, H., Horwich, M.D., Li, C., ve ark., Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells, *Science*, 320, 1077-1081, (2008).

GOLDSTEIN, P., Kroemer, G., Cell death by necrosis: towards a molecular definition, *Trends Biochem. Sci.*, 32, 37-43, (2007).

HAMILTON, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D., Two classes of short interfering RNA in RNA silencing, *EMBO J.*, 21, 4671-4679, (2002).

HAN, J., ve ark., The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing, *Genes & Dev.*, 18, 3016-3027, (2004).

HENGARTNER, M.O., The bochemistry of apoptosis, *Nature*, 407, 770-776, (2000).

HIPFNER, D.R., Weigmann, K., Cohen, S.M., The bantam gene regulates *Drosophila* growth, *Genetics*, 161, 1527-1537, (2002).

HILDEMAN., D.A., Zhu, Y.N., Mitchell, T.C., Kappler, J., Marrack, P., Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo, *Curr. Opin. Immunol.*, 14, 354-359, (2002).

HUTVANGER, G., LcLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D., A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA, *Science*, 293, 834-838, (2001).

INUI, M., Martello, G., Piccolo, S., MicroRNA control of signal transduction, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 252-263, (2010).

JOHN, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., Marks, D.S., Human microRNA targets, *PLOS Biology*, 2, E363, (2004).

JOHNSON, N., Ng, T.T., Parkin, J.M., Camptothecin causes cell cycle perturbations within T-lymphoblastoid cells followed by dose dependent induction of apoptosis, *Leuk. Res.*, 21, 961-972, (1997).

JOVANOVIC, M., Hengartner, M.O., miRNAs and apoptosis: RNAs to die for, *Oncogene*, 25, 6176-6187, (2006).

KAWAHARA, Y., Zinshtern, B., Chendimada, T.P., Shiekhattar, R., Nishikura, K., RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex, *EMBO Rep.*, 8, 763-769, (2007a).

KAWAHARA, Y., Zinshtern, B., Sethupathy, P., Iizasa, H., Hatzigeorgiou, A.G., Nishikura, K., Redirection of silencing targerers by adenosine-to-inosine editing of miRNAs, *Science*, 315, 1137-1140, (2007b).

- KAWAHARA, Y., Megraw, M., Kreider, E., Iizasa, H., Valente, L., Hatzigeorgiou, A.G., Nishikura, K., Frequency and fate of microRNA editing in human brain, *Nucleic Acids Res.*, 36, 5270-5280, (2008).
- KHVOROVA, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias, *Cell*, 115, 209-216, (2003).
- KIM, V.N., Nam, J.W., Genomics of miRNA, *Trends Genet.*, 22, 165-173, (2006).
- KOZOPAS, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., W. Craig, R.W., MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2, *PNAS*, 90, 3516-3520, (1993).
- KUMAR ve ark., M.S., Lu, J., Merver, K.L., Golub, T.R., Jacks, T., Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis, *Nat. Genet.*, 39, 673-677, (2007).
- LAGOS-QUINTANA, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., Identification of novel genes coding for small expressed RNAs, *Science*, 294, 853-858, (2001).
- LAU, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*, *Science*, 294, 858-862, (2001).
- LEE, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 75, 843-854, (1993).
- LEE R.C., Ambros, V., An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*, *Science*, 294, 862-864, (2001).
- LEE, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., Kim, V.N., microRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization, *EMBO J.*, 21, 4663-4670, (2002).
- LEE, Y., ve ark., The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, 425, 415-419, (2003).
- LEE, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., Carthew, R.W., Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways, *Cell*, 117, 69-81, (2004).
- LI, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X., Chk2 and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, 91, 479-489, (1997).
- LI, L.Y., Luo, X., Wang, X., Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature*, 412, 95-99, (2001).
- LYNAM-LENNON, N., Maher, S.G., Reynolds, J.V., The roles of microRNA in cancer and apoptosis, *Biol. Rev.*, 84, 55-71, (2009).

- MATTSON, M.P., Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 1, 120-129, (2000).
- MEI, Y., Yong, J., Liu, H., Shi, Y., Meinkoth, J., Dreyfuss, G., Yang, G., tRNA Binds to Cytochrome *c* and Inhibits Caspase Activation, *Molecular Cell*, 37, 668-678, (2010).
- MELLO, C.C., Conte, D., Jr., Revealing the world of RNA interference, *Nature*, 431, 338-342, (2004).
- METZKER, M.L., Sequencing technologies – the next generation, *Nature Review in Genetics*, 11, 31-46, (2010).
- MI, S., *ve ark.*, MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia, *PNAS*, 104, 19971-19976, (2007).
- NAGEL, S., *ve ark.*, Activation of miR-17-92 by NK-like homeodomain proteins suppresses apoptosis via reduction of E2F1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia and Lymphoma*, 50, 101-108, (2009).
- NAKANO., K., Vousden, K.H., PUMA, a novel pro-apoptotic gene, is induced by p53, *Mol. Cell*, 7, 683-694, (2001).
- NEILSON., J.R., Zheng, G.X.Y., Burge, C.B., Sharp, P.A., Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development, *Genes & Dev.*, 21, 578-589, (2007).
- OKAMURA, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., Lai, E.C., The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*, *Cell*, 130, 89-100, (2007).
- OPFORMAN, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M., Ong, C.C., Korsmeyer, S.J., Development and maintenance of B and T lymphocytes requires anti-apoptotic MCL-1, *Nature*, 426, 671-676, (2003).
- PUTHALAKATH, J., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A., The pro-apoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex, *Mol. Cell*, 3, 287-296, (1999).
- RUBY, J.G., Jan, C., Player, C., Axtell, M.J., Lee, W., Nusbaum, C., Ge, H., Bartel, D.P., Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*, *Cell*, 127, 1193-1207, (2006).
- SALVASEN, G.S., Duckett, C.S., IAP proteins: blocking the road to death's door,? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 401-410, (2002).
- SCHNEIDER, U., Schwenk, H.U., Bornkamm, G., Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma, *Int. J. Cancer*, 19, 621-626, (1977).
- SIOMI, H., Siomi, M.C., On the road to reading the RNA-interference code, *Nature*, 457, 396-404, (2009).

- STEFANI, G., Slack, F.J., Small non-coding RNAs in animal development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 219-230, (2008).
- SUBRAMANIAN, S., Steer, C.J., MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis, *J. Cell. Physiol.*, 223, 289-298, (2009).
- SUZIKI, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, T., Takahashi, R., A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death, *Mol. Cell* 8, 613-621, (2001).
- TAGANOV, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J., Baltimore, D., NF- κ B dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses, *PNAS*, 103, 12481-12486, (2006).
- TARTAGLIA, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., Goeddel, D.V., A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death, *Cell*, 74, 845-853, (1993).
- THIEDE, B., Rudel, T., "Proteome analysis of apoptotic cells, *Mass Spectrometry Reviews*, 23, 333-349, (2004).
- TRAUTH, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis, *Science*, 245, 301-305, (1989).
- VAUX, D.L., Flavell, R.A., Apoptosis genes and autoimmunity, *Curr. Opin. Immunol.* 12, 719-724, (2000).
- VAZQUEZ, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.L., Bartel, D.P., Crete, P., Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs, *Mol. Cell*, 16, 69-79, (2004).
- WANG, M.X., Yin, D.T., Chao, C.L. Milliman, Korsmeyer, S.H., BID: a novel BH3 domain-only death agonist, *Genes & Dev.*, 10, 2859-2869, (1996).
- WEI, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., Pro-apoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *Science*, 292, 727-730, (2001).
- WIJAYA, E., Frith, M.C., Suzuki, Y., Horton, P., Recount: expectation maximization based error correction tool for next generation sequencing data, *Genome Information*, 23, 189-201, (2009).
- XIAO, C., Rajewsky, K., MicroRNA control in the immune system; Basic principles, *Cell*, 136, 27-36, (2009).
- XU, P., Vernooy, S.Y., Guo, M., Hay, B.A., The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism, *Curr. Biol.*, 13, 790-795, (2003).

- XU, P., Guo, M., Hay, B.A., MicroRNAs and the regulation of cell death, *Trends in Genetics*, 20, 617-624, (2004).
- YANG, N., Kazazian, H.H.J., L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 763-771, (2006).
- YI, R., Qin, Y., Macara, I.G., Gullen, B.R., Exportin-5 is a RNA GTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of microRNA precursors, *Genes & Dev.*, 17, 3011-3016, (2003).
- YOSHIMORI, T., Autophagy: paying Charon's toll, *Cell*, 128, 833-836, (2007).
- YU, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., Chen, X., Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis, *Science*, 307, 932-935, (2005).
- ZHA. J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J., Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L), *Cell* 87, 619-628, (1996).
- ZHAO, H., Wang, D., Du, W., Gu, D., Yang, R., MicroRNA and leukemia: Tiny molecule, great function, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74, 149-155, (2009).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

| |
|---|
| Proje No: 107T475 |
| Proje Başlığı: Genomik Profilleme Yöntemiyle T Lenfositlerinde Apoptozu Düzenleyen mikroRNA'ların Tanımlanması |
| Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yrd. Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL Yrd. Doç. Dr. Ayten NALBANT Ar. Gör. Hatice YİĞİT |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü – Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Gülbahçeköyü Urla İZMİR 35430 |
| Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK TBAG |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01 Ekim 2007-01 Ekim 2010 |
| Öz (en çok 70 kelime) Kamptotesin muamelesi sonrası, apoptoza duyarlı ve dirençli hücreler birbirinden ayrıştırılarak mikroarray, derin sekanslama ve qPCR teknikleri kullanılarak her iki grubun miRNA profilleri kamptotesinle muamele edilmeyen negatif örneklerin miRNA profiliyle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalı profil analizi sonrası her üç grup hücrede ifade edilen miRNA miktarına göre beş grup miRNA belirlenmiştir. miR-18a ve miR-7 gibi bilinen miRNA'lar yanında apoptozu düzenleyen bir dizi yeni miRNA adayları belirlenmiştir. Derin sekas verisinin biyoinformatik analizi bazı miRNA'ların değişik pozisyonlarında nükleotit değişimlerinin olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, kamptotesinle muamele sonrası tRNA'lardan fragmanlar üretildiği belirlenmiştir. |
| Anahtar Kelimeler: mikroRNA, Jurkat, Lenfosit, Apoptoz, Mikroarray, Derin Sekanslama |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır. |
| Projeden Yapılan Yayınlar: Yayınlar yazılım aşamasındadır. |