



T. C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI BAŞKALAŞIM YAŞAM DÖNGÜSÜNE SAHİP
BÖCEKLERİN MITOGENOMUNDA MİKRORNA' LARIN
TRANSKRİPSİYONDAKİ OLASI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Habeş Bilal AYDEMİR
(201492022260)

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ertan Mahir KORKMAZ

SİVAS
NİSAN 2021



Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek şartıyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

©Habeş Bilal AYDEMİR, 2021



Ali Asaf a...

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Ertan Mahir KORKMAZ' a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının olgunlaşması ve başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Doç. Dr. Mahir BUDAK' a ve Doç. Dr. Musa SARI' ya teşekkür ederim.

Bu tezin her aşamasında ve hayatımın her alanında maddi ve manevi hep yanımda olan hem çalışma hem de hayat arkadaşım ve Ali Asaf' ımın biricik annesi Merve Nur AYDEMİR' e minnettarım.

Hayatım boyunca her daim yanımda olan annem, babam ve ablama sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Bu çalışma, TÜBİTAK 117Z020 numaralı proje ve Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Birimi (CÜBAP) F-566 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE ROLE OF MICRORNAS IN MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTION OF INSECTS WITH DIFFERENT LIFE CYCLES

Habeş Bilal AYDEMİR

Doctor of Philosophy Thesis

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Ertan Mahir KORKMAZ

2021, 121+xiv pages

miRNAs are non-coding RNA molecules and regulates gene expression post-transcriptionally. miRNAs have been studied with increased interest in model organisms especially in human in gene expression studies since its first identification in *C. elegans* and the importance of miRNAs is understood with the human genome project. Mitochondria are essential for maintaining important cellular functions especially OXPHOS and miRNAs exhibit tissue and time-specific patterns in mitochondria. Therefore, in this study, miRNAs of two, differentially developed insect species *Syriza parreyssi* (Hymenoptera) and *Lepisma saccharina* (Zygentoma) were investigated for the first time. By using the deep sequencing method, the identification and characterization of known and possible novel miRNAs in these two species and their possible effects on mitochondrial transcription were investigated. For each species, miRNAs that are involved in mitochondrial processes such as apoptosis and signaling and affect genes encoding subunits of OXPHOS complexes have been identified. In this study, 81 and 161 novel mature miRNA candidates were bioinformatically predicted in *S. parreyssi* and *L. saccharina*, respectively. It has been speculated that novel miRNAs, which originated from or targeted mitochondria, are effected rRNA genes or positively selected mitochondrial protein coding genes. This may provide a new perspective in terms of evaluating miRNAs for maintaining mitochondrial function and mitochondrial transcription.

Keywords: miRNA, mitomiR, bioinformatics, target gene identification, non-coding RNA

ÖZET

FARKLI BAŞKALAŞIM YAŞAM DÖNGÜSÜNE SAHİP BÖCEKLERİN MİTOGENOMUNDA MİKRORNA' LARIN TRANSKRİPSİYONDAKİ OLASI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Habeş Bilal AYDEMİR

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ertan Mahir KORKMAZ

2021, 121+xiv sayfa

miRNA' lar kodlamayan RNA molekülleridir ve transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenler. miRNA' lar, *C. elegans*' ta ilk tanımlanmasından bu yana, özellikle insanda gen ekspresyon çalışmalarında model organizmalara artan ilgi ile çalışılmış ve miRNA' ların önemi insan genom projesiyle anlaşılmıştır. Mitokondri, önemli hücresel işlevleri sürdürmek için gereklidir, özellikle OXPHOS ve miRNA' lar, mitokondride doku ve zamana özgü modeller sergiler. Bu nedenle, bu çalışmada, farklı gelişmiş iki böcek türü *Syriza parreyssi* (Hymenoptera) ve *Lepisma saccharina* (Zygentoma) miRNA' ları ilk kez araştırılmıştır. Derin dizileme yöntemi kullanılarak, bu iki türdeki bilinen ve olası yeni miRNA' ların tanımlanması ve karakterizasyonu ve bunların mitokondriyal transkripsiyon üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır. Her tür için, apoptoz ve sinyal verme gibi mitokondriyal süreçlerde yer alan ve OXPHOS komplekslerinin alt birimlerini kodlayan genleri etkileyen miRNA' lar tanımlanmıştır. Bu çalışmada, 81 ve 161 yeni olgun miRNA adayları sırasıyla *S. parreyssi* ve *L. saccharina*' da biyoinformatik yaklaşımlarla tahmin edilmiştir. Mitokondriden kaynaklanan veya hedeflenen yeni miRNA' ların, etkilenen rRNA genleri veya pozitif olarak seçilmiş mitokondriyal protein kodlama genleri olduğu tahmin edilmektedir. Bu, mitokondriyal işlevi ve mitokondriyal transkripsiyonu sürdürmek için miRNA' ları değerlendirmek açısından yeni bir bakış açısı sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: miRNA, mitomiR, biyoinformatik, hedef gen belirlenmesi, kodlama yapmayan RNA.

İÇİNDEKİLER

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR	iii
ABSTRACT	iv
ÖZET	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xii

1. GİRİŞ	1
1.1 mikroRNA (miRNA)' lar	1
1.1.1. miRNA' ların isimlendirilmesi	4
1.1.2. miRNA' ların Tarihçesi.....	4
1.1.3. miRNA biyogenezi.....	5
1.1.3.1. miRNA' ların Gen İfadesi Üzerine Etkisi	7
1.1.3.2. miRNA Hedefleme ve Özgüllük	8
1.1.4. miRNA' ları kodlayan genomik bölgeler.....	10
1.1.5. miRNA evrimi.....	11
1.1.5.1. miRNA biyogenezinin evrimi	12
1.1.5.2. miRNA Genomik Organizasyonun Evrimi	13
1.1.5.3. İntra-Spesifik miRNA Evrimi	14
1.1.6. Hayvan ve bitkilerde miRNA' lar	15
1.2. Böceklerde miRNA' lar	16
1.3.1. Mitokondri.....	20
1.3.1.2. Mitokondriyal Transkripsiyon	22
1.3.2. Mitokondriyal KodlamaYapmayan RNA' lar.....	24
1.3.3. Mitokondriyal miRNA (mitomiR)'lar	25
1.3.3.1. mitomiR' lerin Fonksiyonu	29
1.4. Çalışmanın Amacı	30
2. MATERYAL- METOD	32
2.1. Saha çalışmaları ve örneklerin teşhisi	32
2.2. Mitokondriyal miRNA uygulamaları	32

2.2.1. Mitokondri izolasyonu	32
2.2.2. Mitokondriyal RNA izolasyonu	35
2.2.3. Mitokondriyal miRNA izolasyonu	36
2.3. Total miRNA izolasyonu	38
2.4. Dizileme uygulamaları	38
2.5. Biyoinformatik analizler	40
2.5.1. Ham veri analizleri	40
2.5.2. Budanmış veri analizleri	41
2.5.3. Olgun miRNA analizleri	42
2.5.3.1. Bilinen olgun miRNA analizleri	42
2.5.3.2. Yeni olgun miRNA analizleri	42
2.5.3.3. Yeni miRNA' ların üçüncül yapılarının çizilmesi	43
2.5.4. Yeni miRNA' lar üzerine yapılan ileri mitokondriyal tanımlamalar ...	44
2.5.4.1. Geneious programı ile referans mitogenom üzerine eşleştirme	44
2.5.4.2. RNAhybrid programı ile mitokondriye hedeflenen miRNA' ların saptaması	44
3. BULGULAR	45
3.1. Örneklerin teşhisi	45
3.2. Mitokondriyal miRNA uygulamaları	45
3.2.1. Mitokondri izolasyonu	45
3.2.2. Mitokondriyal RNA izolasyonu	46
3.2.3. Mitokondriyal miRNA izolasyonu	46
3.3. Total miRNA izolasyonu	47
3.4. Dizileme uygulamaları	47
3.4.1. Ham veri analizleri	48
3.4.2. Budanmış veri analizleri	48
3.4.3. Olgun miRNA analizleri	49
3.4.3.1. Bilinen olgun miRNA analizleri	49
3.4.3.2. Yeni miRNA analizleri	53
3.4.4. Yeni miRNA' lar üzerine yapılan mitokondriyal tanımlamalar	61
3.4.4.1. Geneious programı ile referans mitogenom üzerine eşleştirme	61
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
4.1. Bilinen miRNA analizleri	66
4.2. Yeni miRNA analizleri	70

KAYNAKLAR	75
------------------------	----

EKLER	98
--------------------	----

EK-1	<i>L. saccharina</i> türünün haritalandığı miRNA'ların listesi	98
EK-2	<i>S. parreyssi</i> türünün haritalandığı miRNA'ların listesi	102
EK-3	<i>L. saccharina</i> ' da saptanan yeni miRNA'ların genomik özellikleri ...	104
EK-4	<i>S. parreyssi</i> türünde saptanan yeni miRNA'ların genomik özellikleri	108
EK-5	Tespit edilen yeni miRNA' ların <i>S. parreyssi</i> mitogenomunda olası etkileşimlerinin RNAhybrid analizi sonuçları	110
EK-6	Tespit edilen yeni miRNA' ların <i>L. saccharina</i> mitogenomunda olası etkileşimlerinin RNAhybrid analizi sonuçları	115



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Hayvan ncRNA' larının (a. miRNA, b. endo-siRNA, c. piRNA, d.snoRNA) biyogenezinin ve işlevlerinin şematik gösterimi (Qureshi ve Mehler, 2012).....	2
Şekil 1.2	let-7d miRNA' sını kodlayan pre- miRNA saç tokası yapısı.	5
Şekil 1.3	miRNA lokuslarının olası genomik organizasyonu. İntergenik miRNA lokusları yeşil, intronik miRNA' lar mavi ile gösterilmiştir. Daha nadir durumlarda, miRNA lokusları bir ekzon (gri) içinde veya intronun tamamı (miRTron) olarak bulunabilir.....	11
Şekil 3.1	Örnekleme dahilinde saptanan mitomiR' ler.....	52
Şekil 3.2	Okuma sayıları yüksek olan bilinen miRNA' lar	52
Şekil 3.3	<i>S. parreyssi</i> ve <i>L. saccharina</i> türleri small RNA kompozisyonunun özeti.....	53
Şekil 3.4	<i>L. saccharina</i> türünde tanımlanmış yeni miRNA' lardan bir örneğin RNAfold' da değerlendirilmesi	54
Şekil 3.5	<i>S. parreyssi</i> yeni miRNA'larının üç boyutlu yapıları (a) ve 58- 81 numaralı yeni miRNA'larının üç boyutlu yapıları (b).....	56
Şekil 3.6	<i>L. saccharina</i> türü yeni miRNA' larının üç boyutlu yapıları (a), 56-110 numaralı yeni miRNA' larının üç boyutlu yapıları (b) ve 111-164 numaralı yeni miRNA' larının üç boyutlu yapıları (c)	60
Şekil 3.7	RNAhybrid sonuçlarına göre mitokondriye hedeflenebilecek yeni miRNA' ların sayıları ve etkilediği alt üniteler (Görsel KEGG pathway' den değiştirilerek alınmıştır).	63
Şekil 3.8	Mitokondriyede hedeflenen miRNA' ların mitogenom üzerindeki olası hedefleri	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Böcek gelişimiyle ilgili detaylı çalışmalarla bulunmuş temel miRNA' lardan bazıları ve hedefledikleri genler ile olası etkileri.	18
Çizelge 3.1	miRNA örneklerinin izolasyon ve izolatlarının konsantrasyon ve saflık	46
Çizelge 3.2	Örneklerin QC ölçüm sonuçları.....	47
Çizelge 3.3	Budanmış verilerin okuma sürecinin özeti	49
Çizelge 3.4	miRBase veritabanında bulunan referansların olgun miRNA' larına.	49
Çizelge 3.5	Hexapoda grubu türleri ile gerçekleştirilmiş haritalama analizleri sonucu. Sıralama, haritalama değerleri en yüksekten en düşüğe gidecek şekilde verilmiştir.....	50
Çizelge 3.6	Tanımlanmış bilinen olgun miRNA' lar	51
Çizelge 3.7	Nvit_2.1 ve LocustGenomeV1 referansına haritalanan okumalar	54
Çizelge 3.8	<i>S. parreyssi</i> türünde yeni saptanan miRNA' ların mitogenoma hizalanması sonucunda elde edilen veriler.	61
Çizelge 3.9	<i>L. saccharina</i> türünde yeni saptanan miRNA' ların mitogenoma hizalanması sonucunda elde edilen veriler.	62

SİMGELER DİZİNİ

a.a.	Aminoasit
bç/kb	Baz çifti/kilo baz
C	Celcius
kDa	Kilodalton
mM	Milimolar
ms	Milisaniye
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
ns	Nanosaniye
pmol	pikomol
U	Ünite
V	Volt
μ L	Mikrolitre
μ s	Mikrosaniye
μ m	Mikrometre

KISALTMALAR DİZİNİ

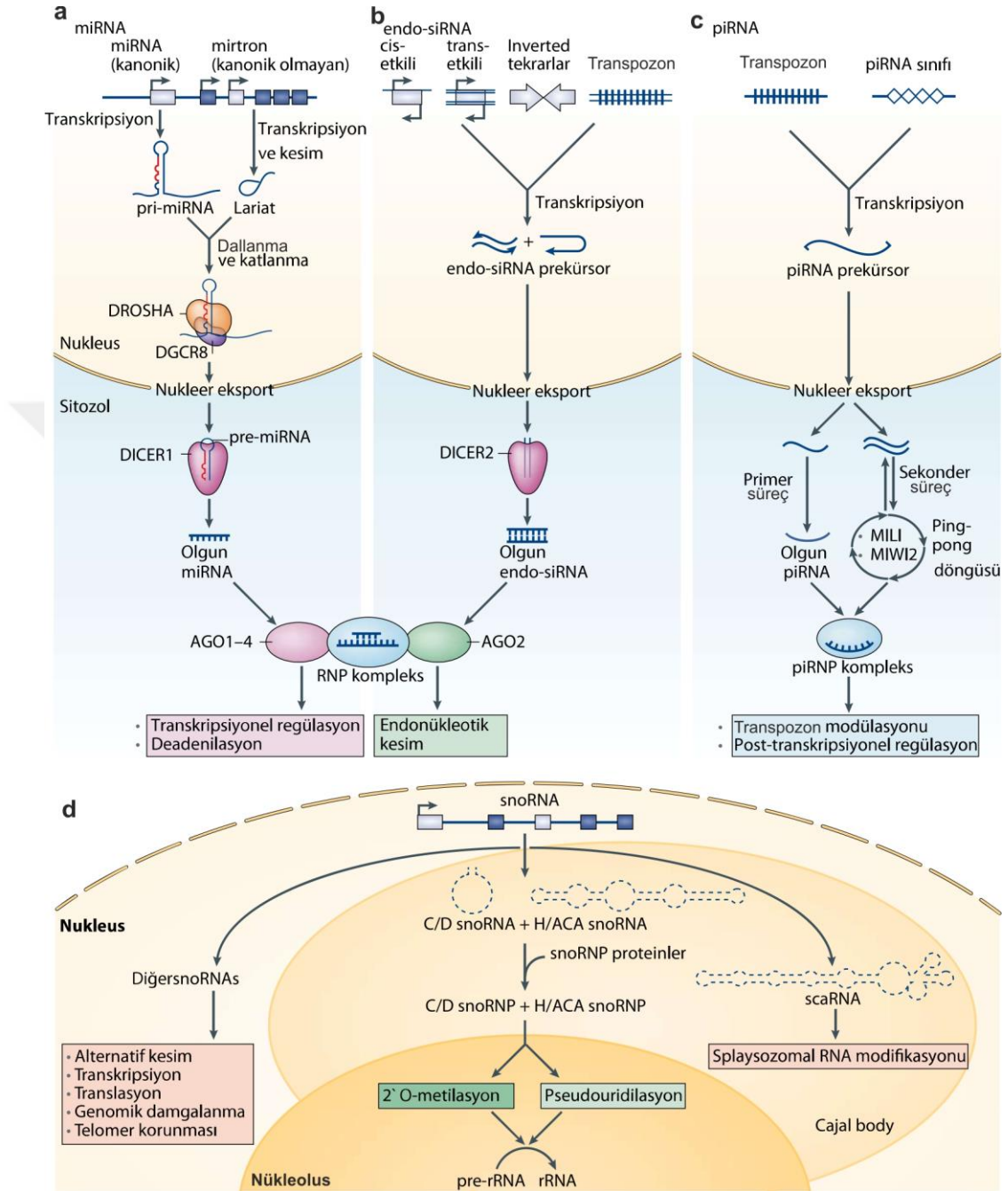
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	:	Çift zincirli DNA
RNA	:	Ribonükleik asit
tRNA	:	Transfer RNA
snRNA	:	Küçük nükleer RNA
rRNA	:	Ribozomal RNA
snoRNA	:	Küçük nükleolar RNA
piRNA	:	piwi etkileşimli RNA
siRNA	:	Küçük susturucu RNA
lncRNA	:	Uzun kodlanmayan RNA
miRNA	:	mikroRNA
pri-miRNA	:	Birincil miRNA
pre-miRNA	:	miRNA prekürsörü
5`UTR	:	5` Çevrilmemiş bölge
3`UTR	:	3` Çevrilmemiş bölge
miR	:	mikroRNA kısaltma biçimi
GO	:	Gen Ontolojisi
RISC	:	RNA-indüklenmiş susturma kompleksi
bç	:	baz çifti
SNP	:	Tek nükleotid polimorfizmi
IAP	:	Apoptoz inhibitörleri
CI	:	Sitoplamik uyumsuzluk
EBV	:	Epstein Barr virüsü
ORF	:	Açık okuma çerçevesi
NUMTs	:	mitokondriyal DNA'nın nükleer kopyaları
MFE	:	Minumum serbest enerji
BOLD	:	“Barcode of life database”
hsa	:	<i>Homo sapiens</i> miRNA isimlendirmesi
dre	:	<i>Danio rerio</i> miRNA isimlendirmesi
dme	:	<i>Drosophila melanogaster</i> miRNA isimlendirmesi
ath	:	<i>Arabidopsis thaliana</i> miRNA isimlendirmesi
cel	:	<i>Caenorhabditis elegans</i> miRNA isimlendirmesi

1. GİRİŞ

1.1 mikroRNA (miRNA)' lar

Uzun bir süre boyunca, canlı organizmaların genomlarındaki proteine kodlanmayan bölgelerin önemsiz ya da atıl DNA olduğu düşünülmektedir. Ancak, son yirmi yılda moleküler biyoloji alanındaki metodolojik ilerlemeler, hücre ve organizmal biyolojinin çeşitli süreçlerinde önemli roller oynayan genomları ve bunların proteine dönüştürülmeyen fakat kodlanan RNA' larını anlamamızı büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. İnsan genom projesinin ardından (Craig Venter vd., 2001; Lander vd., 2001), birçok bilim insanı, organizmanın karmaşıklığı ile genomundaki protein kodlayan genlerin sayısı arasındaki belirgin uyumsuzluk nedeniyle şaşkınlığa uğramıştır. Sonrasında tüm transkriptlerin protein ürünlerine çevrilmediği, protein kodlayan transkriptlerden daha fazla oranda kodlamayan transkript olduğu saptanmıştır (Feingold vd., 2004). Bu fazlalığın daha iyi anlaşılması için; DNA Elementleri Ansiklopedisi (ENCODE) ve Fare/Memeli Genomunun İşlevsel Annotasyonu (FANTOM) projelerinden (Feingold vd., 2004; Carninci vd., 2005) oluşturulan konsorsiyum sonucunda, insan ve fare genomunun %70'ten fazlasının aktif olarak transkribe edildiği, fakat proteine çevrilmediği sonucunu destekleyen kanıtlar elde edilmiştir. Transkript çeşitliliği alternatif kesip-çıkarma (alternatif splayz) ile açıklanabilse de, proteine çevrilmeyen RNA'nın böylesine yüksek oranlarda bulunması beklenmedik bir durumdur. Bu beklenmedik fazlalık genomun "karanlık maddesi" olarak ifade edilmektedir ve bilim insanları büyük bir ilgi ile bu molekülleri araştırmaya başlamıştır. Araştırmalar sonucunda, klasik moleküler biyoloji teknikleri ve ileri genetik analizlere dayanarak birçok kodlayıcı olmayan RNA sınıfı tanımlanmıştır. Bunlar transfer RNA' ları (tRNA' lar), ribozomal RNA' lar (rRNA' lar), mikroRNA' lar (miRNA' lar), küçük nükleer RNA' lar (snRNA' lar) ve küçük nükleolar RNA' lardır (snoRNA' lar). Sonrasında, yüksek verimli ve yüksek okuma sayısı üreten dizileme teknolojilerinin ortaya çıkışı ile kodlayıcı olmayan RNA' ların birçok farklı yeni sınıfı keşfedilmiştir. Bunlar PIWI etkileşimli RNA' lar (piRNA' lar), endojen küçük etkileşimli RNA' lar (endo-siRNA' lar) ve uzun kodlayıcı olmayan RNA' lardır (lncRNA' lar) (Şekil 1.1). Hala araştırmaya muhtaç olmalarına rağmen, bu RNA' ların önemli biyolojik rollerde görevli

olduğunu öneren hipotezler bulunmaktadır (Pang vd., 2006; Mercer vd., 2008; Guttman vd., 2009; Mattick, 2009).



Şekil 1.1 Hayvan ncRNA'larının (a. miRNA, b. endo-siRNA, c. piRNA, d.snoRNA) biyogenezinin ve işlevlerinin şematik gösterimi (Qureshi ve Mehler, 2012).

Çoğu bilim insanı tarafından ökaryotik hücrelerde bulunan kodlanmayan RNA'lar transkripsiyonel düzenleme için "buzdağının görünmeyen kısmı" olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, transkripsiyonel sistemin muazzam karmaşıklığı

ve memeli hücrelerinde transkripsiyonun düzenlenmesi alanlarında bu moleküllerin araştırıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Saxena ve Carninci, 2011). Kodlama yapmayan ve transkripsiyonel düzenlemede fonksiyonel olan RNA gruplarından biri, yaklaşık 22 nükleotid büyüklüğünde, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan mikroRNA' lardır (miRNA) ve ilk olarak *Caenorhabditis elegans*' ta gelişim zamanlamasını düzenlemede görevli olduğu rapor edilmiştir (Lee vd., 1993). Bu konuda yapılan araştırmaların artmasıyla, bitkilerden, hayvanlardan ve bunları enfekte eden virüslerden binlerce farklı miRNA'nın sentezlendiği rapor edilmiştir. Biriken bu miRNA verileri, miRBase (www.mirbase.org) veritabanında depolanmaktadır. Bu veritabanı, miRNA'ların dizi ve anotasyonları hakkında kapsamlı bilgiler içeren, çeşitli karşılaştırmaların ve taramaların yapılabileceği, bununla birlikte miRNA'ların olası fonksiyonları hakkında kanıtlar/ varsayımlar içeren bir platformdur (Kozomara ve Griffiths-Jones, 2011).

miRNA' ların ana işlevi, hücrelerde bulunan karmaşık yollara yeni bir kontrol katmanı ekleyerek transkripsiyon sonrası düzeyde gen ekspresyonunun düzenlenmesidir. Birçok durumda, miRNA' lar hedef genlerinin transkripsiyon düzeyinin ayarlanması ve optimal ekspresyon seviyeleri için gereklidir (Bartel ve Chen, 2004). miRNA' lar yaygın olarak, gelişim sırasında farklı zamanlarda ve farklı dokularda hedef genlerin transkriptlerini düzenlemede pleiotropik rol oynadıklarından oldukça özgül moleküllerdir. Nispeten yeni bir çalışma alanı olması nedeniyle, miRNA biyogenezi ve hedef gen- miRNA etkileşimlerinin dinamikleri hakkında hala bilinmeyenler bulunmaktadır. Bununla birlikte, bilinenlerden farklı olarak elde edilmiş yeni bulgular da vardır: Örneğin, miRNA biyogenezinin kanonik olmayan birkaç yolu olabileceği önerilmiştir (Miyoshi vd., 2009) ve mitokondriyal miRNA metabolizması da bu kategoride yer almaktadır; miRNA' lar hedef transkript seviyelerinin aşağı yönlü regülasyonunun yanı sıra hedeflerinin transkript seviyelerini yukarı yönlü de düzenleyebilir (Hussain vd., 2011, 2012a) ve 3' UTR dışındaki yerlere bağlanabilir (Bartel, 2009; Rigoutsos, 2009). Bu yeni bulgular, miRNA' ların önceki fonksiyonlarına ve işlevlerine sürekli meydan okumakta ve bu da miRNA araştırmalarında kullanılan moleküler ve biyoinformatik yaklaşımları etkilemekte, değiştirmekte ve geliştirmektedir.

1.1.1. miRNA' ların isimlendirilmesi

Tutarlı bir adlandırma şemasına sahip olmak genler, kromozomlar gibi moleküllere benzer olarak miRNA' ların isimlendirilmesinde de önemlidir. Bununla birlikte, bazı miRNA ailelerinin türler arasında yüksek derecede korunmuş olması nedeniyle de uygun miRNA sınıflandırma yönergeleri ve adlandırma şeması oluşturulmuştur (Ambros vd., 2003). Sınıflandırma yönergeleri, miRNA' ları siRNA' lardan ayıran bir dizi kural tanımlamaya çalışmaktadır.

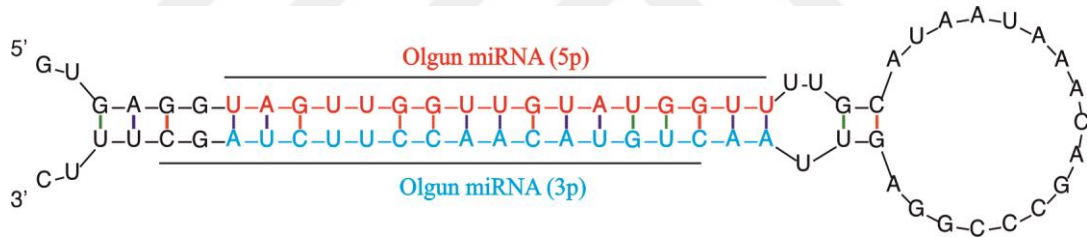
Hayvan miRNA adları "mir-" ve ardından benzersiz bir sıralı sayısal tanımlayıcıdan oluşur. Aynı miRNA' nın aynı genomda birden fazla kopyada bulunan farklı varyantları isme eklenen bir harfe sahip olabilirken (örneğin, mir-1a), paralog miRNA' ların isimlerinin ardında paralog numarasının belirtildiği bir çizgi (örneğin, mir-2-1) bulunmaktadır. Olgun miRNA' ya işaret edilmek istendiğinde, miR'de büyük harf 'R' kullanılmalıdır. miRNA adlandırmasından önce üç harfli bir tür tanımlayıcısı gelmekte ve burada ilk harf cins ismine, diğer iki harf ise tür ismine işaret etmektedir (örneğin, *H. sapiens* için hsa).

1.1.2. miRNA' ların Tarihçesi

İlk miRNA, lin-4, 1993 yılında, *C. elegans*'ta RBCC (ring finger-B box-coiled coil) proteinin kodlayan *lin-41*' in bir düzenleyicisi olarak tespit edilmiştir (Lee vd., 1993; Wightman vd., 1993). Her ne kadar lin-4 ve uğradığı mutasyonlar önceden bilinse de (Ambros ve Horvitz, 1987), bu çalışma ile ilk kez lin-4'ün doğrudan *lin-41* genini düzenleyen ve proteine çevrilmeyen bir RNA olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu RNA' nın *lin-41* transkriptinin 3' UTR' sine antisens bağlanarak fonksiyonel olduğu ve bu düzenlemenin transkripsiyon sonrası gerçekleştiği saptanmıştır (Lee vd., 1993; Wightman vd, 1993). Bu düzenlemenin, *Caenorhabditis* cinsinin en az dört türünde gelişim aşamalarından birinin tamamlanması için gerekli olduğu bilinmektedir (Reinhart vd., 2000). Bu çalışma ile miRNA' ların varlığı, 2000 yılında *C. elegans* türünde larval geçişlerin kontrollü gelişimsel zamanlamasında (heterokronik metabolik yolla) gerekli let-7 miRNA' sının tanımlanması sonucunda, nematodlara özgü alışılmadık bir düzenleme mekanizması olarak yorumlanmıştır (Reinhart vd., 2000). let-7, lin-4' ten farklı olarak; omurgalılar, tulumlular, yarıkordalılar, yumuşakçalar ve eklembacaklılar dahil geniş bir hayvan grubu aralığında tespit

İlginç bir şekilde, let-7'nin, *C. elegans*'taki gelişim fazlarının ayrılmasında da rol oynadığı saptanmıştır. Gelişimsel süreçlerdeki görevleri göz önünde bulundurulduğunda şu anda miRNA' lar olarak adlandırılan bu moleküller, küçük temporal RNA' lar (stRNA) olarak isimlendirilmiştir (Lee, 2001). Sonrasında, miRNA araştırma alanı hızla genişlemiştir.

Yeni miRNA lokuslarının araştırılmasına paralel olarak, miRNA olgunlaşma ve işleme mekanizmalarının bileşenlerini tanımlamak için yapılan çalışmalar da artmıştır. Birincil miRNA transkriptleri (pri-miRNA' lar), RNA Polimeraz II tarafından kopyalanmakta, 5' ucuna başlık eklendikten sonra 3' ucu poliadenillenmektedir (CAI, 2004). Pri-miRNA' lar, pre- miRNA' lara (öncül miRNA' lar) kalıp olmakta ve bir veya daha fazla kök-ilmek ikincil yapısını kodlayabilmektedir (Şekil 1.2).



pre- miRNA lokusları yaklaşık 70 bç uzunluğundadır. Kanonik miRNA işlenmesi, Drosha benzeri RNaz III tarafından pri-miRNA kök-ilmek yapılarının tanınması ve kesilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Lee vd., 2002). Drosha, çift sarmallı RNA'ya bağlanan protein olan Pasha/ DGCR8 (DiGeorge Sendromu Critical Region 8) ile bir kompleks oluşturarak işlev sergilemektedir (Gregory vd., 2004).pre- miRNA'nın ilk sindiriminden oluşan ilkin heliks, RanGTP'ye bağlı bir şekilde Eksporthn5 tarafından çekirdekten sitoplazmaya aktarılmaktadır (Bohnsack vd., 2004). Sitoplazmada pre-miRNA, TRBP (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü Transaktivasyon Tepkisi RNA-Bağlama Proteini) dahil olmak üzere diğer proteinlerle bir kompleks içinde hareket eden başka bir RNaz III benzeri enzim olan Dicer tarafından kesilmektedir. Bu kesimin sonucunda, olgun miRNA ve miRNA* molekülünü (sırasıyla kılavuz iplik ve yolcu iplik olarak da bilinmektedir) içeren yaklaşık 22 bç uzunluğunda çift iplikli

bir dubleks oluşmaktadır. Bu dubleks, RNaz ailesinin karakteristik özelliği olan, genellikle 5` hidroksil grubu içeren 2 baz uzunluğunda 3` çıkıntılara sahiptir (Grishok vd., 2001; Hutvagner vd., 2001). Her öncülde, dubleks ipliklerden sadece birinin işlevsel olarak Ago ailesinin bir proteini olan Ago2' ye yükleneceği varsayılmaktadır (Matranga vd., 2005). Bu yükleme, olgun miRNA (kılavuz iplik) ile degrade miRNA* (yolcu iplik) arasındaki ayrımı sağlamaktadır. Dizileme uygulamalarıyla, dupleksteki hangi ipliğin protein kompleksine dahil edileceğinin hücrenel koşullara bağlı olarak değişebileceği bulunmuştur (Marco vd., 2010; Li vd., 2012). Dicer / TRBP kompleksi tarafından kesilmesinden sonra olgun miRNA, daha sonra RISC kompleksinin (Sontheimer, 2005) diğer unsurlarıyla beraber Ago2' ye yüklenmektedir. Sonrasında, miRNA dubleksinin miRNA* (yolcu iplik) kolu genelde degrade olurken, olgun miRNA (kılavuz iplik) Ago' ya bağlı kalmakta ve hedef tanımayaya aracılık etmektedir.

Bu süreç anlaşılmaya çalışılırken, bilim insanlarını önemli bir soru işareti beklemektedir. Bunlardan ilki, Dicer kesiminden sonra oluşan yaklaşık 22 bp' lik dubleksin hangi ipinin RISC kompleksine (olgun miRNA dizisi) dahil edileceğini ve hangi ipliğin degradasyon için hedefleneceğini (yıldız dizisi) tahmin etmek güncel bilgilerle pek de mümkün değildir. Sekansın 5` ucunun görece kararlılığının bir rol oynayacağına dair bazı kanıtlar bulunmaktadır (Jazdzewski vd., 2008; Sun vd., 2009). Yine de bu bulgular, hangi iplikçiğin dahil edileceğini tahmin etmede yeterli doğruluk sağlamaz. Güncel çalışmalarda, iplik seçimi ile hedef kullanılabilirliği arasında bir korelasyon olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur (Chatterjee vd., 2011). Bu modelde, her iki sarmalın da benzer bir şekilde fonksiyonel olma olasılıklarına sahip olduğu, bununla birlikte potansiyel bir hedef bölgesinin varlığı, miRNA' nın degrade olmadan korunmasını sağlayarak, dizileme çalışmalarında daha sık yakalanmasına neden olduğu iddia edilmektedir. Her iki iplik de işlevsel olabildiğinden, pre-miRNA heliksinin hangi kolundan olgun dizinin üretildiğini gösteren ve önceki miRNA* açıklamasını geçersiz kılan yeni bir adlandırma şeması tasarlanmıştır. MiRBase19' un (Kozomara ve Griffiths-Jones, 2011) yayınlanmasından itibaren, tüm olgun formlar heliksinin 5` kolundan üretiliyorsa 5p, 3` kolundan üretiliyorsa 3p olarak adlandırılmaktadır.

Yükleme süreci ve RISC oluşumu türler arasında kısmen farklılık sergilemektedir (Yoda vd., 2010). Bu protein kompleksi miRNA ile yüklendiğinde, hedef tanımadan, hedef transkriptin etkisiz hale getirilmesinden veya degradasyonundan sorumludur.

İşleme süreci hakkındaki literatür verisinin artmasıyla, bazı miRNA ailelerinin kanonik olmayan bir şekilde işlendiğine dair istisnalar da bildirilmiştir. Örneğin, miRNA yalnızca intronik bir diziden oluşuyorsa, pre-miRNA ekleme işlemi kullanılarak Drosha' dan bağımsız bir şekilde oluşturulabilmektedir (Okamura vd., 2007; Ruby vd., 2007). Bir diğer istisna ise, miR-45` in Dicer kesimi adımının Ago2 ile eşlenikli gerçekleştirilebileceğinin rapor edilmesiyle elde edilmiştir (Cheloufi vd., 2010; Cifuentes vd., 2010).

1.1.3.1. miRNA' ların Gen İfadesi Üzerine Etkisi

Her ne kadar başlangıçta *C. elegans*' taki gelişim zamanlamasını düzenlediği tespit edilmiş olsa da, yakın geçmişte miRNA' ların potansiyel etki aralığının daha geniş olduğu ortaya çıkmıştır. Çoğu biyolojik işlem sınıfını kapsayan insan protein kodlayan genlerinin %30' undan fazlasının miRNA' lar için hedef bölgelere sahip olduğu tahmin edilmektedir (Lewis vd., 2005). Daha sonra, dokuya özgü miRNA' ların (miR-1 ve miR-124), mikroyarray yöntemi kullanılarak HeLa hücrelerinde transfekte edilmesiyle, bu miRNA' ların aşırı ekspresyonu sonucunda yüzlerce genin ekspresyon profillerinin değiştiği saptanmıştır (Lim vd., 2005).

Gen ifadesinin düzenlenmesinde miRNA' ların etki profilleri özetlenmiş (Bartel ve Chen, 2004) ve üç ana model önerilmiştir: anahtar benzeri etkileşim, ayarlama etkileşimi ve nötr etkileşim. Anahtar gibi hareket ederek etki gösteren bir miRNA örneği, lin-4' ü baskılayan geliştirme düzenleyicisi let-7' dir. Ayarlama etkileşimi, hedefin hücre içinde optimal bir seviyede tutulması gereken ancak ortadan kaldırılmaması gereken bir etkileşim olarak tanımlanabilmektedir. miRNA, protein translasyonunu azaltma görevi görmektedir, ancak hücrede hala aktif bir protein havuzu bulunmaktadır. Son olarak, nötr etkileşimler, önemli bir biyolojik rol oynayacağı varsayılmayan etkileşimlerdir. Bu bölgeler, normalde seçici baskı altında olmadıkları için diğer miRNA/ hedef etkileşim tiplerine katılan hedef bölgeler kadar korunmaz (Bartel ve Chen, 2004).

miRNA hedef bölgelerini etkileyen seçim baskısı farklılık sergileyebilmektedir. Nötr olarak evrimleşen miRNA hedef bölgelerinin yanı sıra, saflaştırıcı ve pozitif seçim ile evrimleşme de gözlenebilmektedir. Saflaştırıcı seçimin, miRNA ve hedef arasındaki eşleşmenin korunmasının elzem olduğu, önemli bir fonksiyonel sınırlama içeren korunmuş hedef bölgeler üzerine işlemesi beklenir. Tersine, bazı

transkriptlerin miRNA' lar için potansiyel hedef bölgelerin oluşumuna karşı güçlü bir saflaştırıcı seçim baskısı sergilediği de gösterilmiştir (Farh vd., 2005). Anti hedefler olarak adlandırılan bu hedefler, özellikle yüksek ifade ve doku özgüllüğü gösteren miRNA' lar için belirleyicidir.

Her miRNA ailesinin biyolojik işlevi, hedeflerine bağlıdır. Başlangıçta miRNA' ların hedeflerinin belirlenebilmesi için, klasik mutasyona dayalı çalışmalar sonucunda elde edilen fenotipik profiller analiz edilerek hedef tanımlaması yapılabileceği öngörülmüştür. Sonrasında, *C. elegans*' ta yapılan bir çalışmada, miRNA' ların oldukça azının mutasyon üzerine saptanabilir fenotiplere sahip olduğu gösterilmiştir (Miska vd., 2007). Bu, miRNA' ların fenotipte kendini göstermesi için miRNA' nın silinmesine ek olarak genelde spesifik bir strese ihtiyaç duyan gen ekspresyonunun ince ayarlayıcıları olduğu varsayımıyla açıklanmıştır. Ayrıca, miRNA' nın etki kapsamının organizma içindeki az sayıda hücreye özgü olması muhtemeldir ve bu da tespitini zorlaştırmaktadır. Mutasyon çalışmalarıyla miRNA' ların fonksiyonlarının deneysel olarak tahmin edilememesi nedeniyle tamamen hesaplamalı hedef tahminine dayandırılmasının birkaç potansiyel sorunu bulunmaktadır. Hedef tahminindeki kirlilik, belirli fonksiyonel sınıflar için istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde etmeyi zorlaştırmaktadır. Ayrıca bu sınıflar sıklıkla gen ontolojisine (GO) göre tanımlanır. Bu, bazı miRNA' ların istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, ontoloji içinde tanımlanan sınıflara uymayan çeşitli hücresel işlevlere sahip olabileceğinden bazı zorluklar ortaya çıkarabilmektedir.

1.1.3.2. miRNA Hedefleme ve Özgüllük

miRNA-hedef etkileşiminin çoğunluğu, genlerin 3'UTR bölgelerine bağlanma yoluyla gerçekleşirken (Lewis vd., 2005), protein kodlayan genlerin ekzonlarına (Lewis vd., 2005; Tay vd., 2008) ve 5' UTR bölgelerine de bağlanma için örnekler mevcuttur (Lee vd., 2009). Bununla birlikte, ekzonlara ve 5'UTR bölgelerine hedeflenme daha nadirdir ve bu bölgelere etki eden ribozomların RISC kompleksi ile rekabet edeceği ve miRNA aracılı düzenlemenin etkisini azaltacağı varsayılmıştır (Bartel, 2009). Bir miRNA ile yüklenmiş RISC kompleksinin hedef transkripte bağlanmasının birçok etkisi olabilir. Tipik olarak hedef transkriptin translasyonu, ribozomal düşüş ve yeni oluşan peptidin degradasyonuna neden olarak, ribozom düzeneğini bloke ederek veya başlatma işlemi engellenerek inhibe edilebilir. Ayrıca,

hedef mRNA adenillenebilir, 5` başlığı kaldırılabilir ve böylece degradasyon için işaretlenebilir (Giraldez vd., 2006; Fabian vd., 2010). Bu yolların herhangi biri kullanarak gerçekleştirilen miRNA aracılıklı post- transkripsiyonel gen susturma prosedürü RNAi (RNA interferansı) olarak adlandırılmaktadır ve 1998'deki yayınlarının bu süreci işaret ettiğinin farkedilmesi nedeniyle Andrew Fire ve Craig C. Mello'ya 2006 Nobel Fizyoloji ve Tıp dln kazandırmıştır (Fire vd., 1998). miRNA ile gen ifadesinin düzenlenmesinin olası, genel etkisi transkripsiyonun inhibe edilmesi iken, insan hücre kültürü sisteminde miRNA' lar tarafından transkripsiyonun aktive edildiğine dair çalışmalar da bulunmaktadır (Vasudevan vd., 2007).

miRNA tabanlı düzenlemenin bir başka yönü, hedef bölgelerin her zaman bağımsız olmamasıdır (Doench ve Sharp, 2004). İki hedef bölge birbirinden 8 ila 40 nükleotid uzaklıkta konumlandırıldığında, bu bölgeler işbirliği içinde etkilenecek ve iki bölgenin bağımsız olarak hedeflenmesine göre daha dramatik etkili bir gen düzenlenmesine neden olacaktır (Grimson vd., 2007).

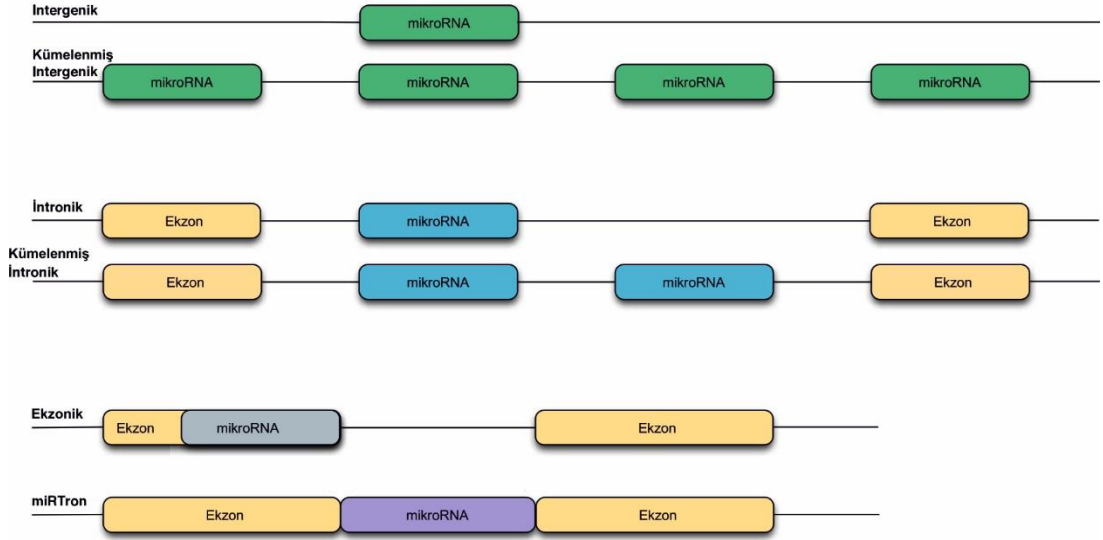
miRNA- hedef tanınmasının, genellikle, hedef transkriptin 3` UTR' sinde bulunan hedef bölge ile Watson-Crick bağı oluşturan miRNA' nın merkez etkileşim bölgesi (seed dizileri) (5` uçtan 2 ile 8. nükleotid arasında kalan dizi) arasında gerçekleştiği varsayılmaktadır. miRNA' nın hedefine mkemmел bir şekilde tamamlayıcı olduğu durumlarda, miRNA, genin geçici inhibisyonuna neden olmak yerine hedef transkriptin degradasyonuna neden olan bir siRNA gibi davranmaktadır. Bu inhibisyon mekanizmasının bitki miRNA' larında yaygın olduğu ve bazen doğrudan kodlama bölgesini hedeflediği görülmektedir. Başlarda hayvan miRNA' larında doğrudan hedef degradasyonunun nadir olduğu düşünülürken, günümüzde ise düşünülenden daha yaygın olduğunu gösteren bulgular bulunmaktadır (Pillai vd., 2007). miRNA' nın ilk nükleotidi, miRNA'nın argonaute-2 (Ago2) proteinine yüklenmesine aracılık ediyor gibi görünse de, mutlaka hedef bölgeye eşlenik olmak zorunda değildir. Bu pozisyonda bir urasil bazına sahip olan miRNA' ların diğer bazlara sahip olanlara göre, ilk nükleotidde Watson-Crick dışı eşleşme sergileyerek transkript hedeflerinin inhibisyonunda daha etkili olduğu düşünülmektedir (Baek vd., 2008).

Olgun miRNA' nın 3` ucunun işlevsel rolü halen tartışılmaktadır fakat bazı durumlarda daha zayıf olan miRNA-hedef eşleşmelerini telafi edebileceği varsayılmıştır (Bartel ve Chen, 2004). Hedef tahmin algoritmalarındaki yanlış pozitif

bulguları azaltmak için, daha uzun çekirdek eşleşmeleri gerektiren ve çekirdek bölgedeki G:U çiftlerini oluşturan etkileşimler hariç tutularak varsayılan hedef bölgelerin filtrelenmesi önerilmektedir (Friedman vd., 2009). Bu kriterlere göre filtrelenen bazı hedef etkileşimlerin işlevsel olduğu da gösterilmiştir (örneğin, let-7 / *lin-41* düzenlenmesi) (Brennecke vd., 2005). Hedef bulma algoritmaları için türler arasında benzerlik ve korunmuşluğu kullanmak da, yanlış pozitiflerin sayısını azaltmaya yardımcı olmaktadır. Biyolojik olarak ilgili lokusların, korunmamış varsayılan hedef bölgeler ile karşılaştırıldığında, saflaştırıcı seçim altında olma ve dolayısıyla biyolojik olarak aktif bir hedef bölge olma ihtimalinin daha yüksek olduğu varsayılmaktadır. Öte yandan, korunmamış tahmini hedef bölgelerin işlevsel olabileceği de bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Farh vd., 2005; Ellwanger vd., 2011). Zamanla çok sayıda miRNA tanımlanmasıyla, miRNA sentezi için aday lokusların ve miRNA' ların olası hedeflerinin hesaplamalı olarak bulunması yoluna gidilmiştir. Bunun için, alternatif biyoinformatik yöntemler bir araya getirilerek deneysel tekniklerin pahalı ve zaman alıcı işleyişinden kaçınılmıştır.

1.1.4. miRNA' ları kodlayan genomik bölgeler

miRNA' ların kodlandığı bölgeler, genom boyunca rastgele dağılmamaktadır. miRNA' ların genom içinde tanımlanmış kümelerden oluşan polisistronik transkriptler oluşturabildiği erken dönemde keşfedilmiştir (Lagos-Quintana vd., 2003). Çoğunlukla kümelerin, var olan bir miRNA lokusunun kopyalanmasıyla oluştuğu bulunmuştur. Bununla birlikte, farklı genomik konumlarda paraloglara sahip birçok miRNA ailesi tanımlanmıştır ve ayrıca çok çeşitli miRNA aileleri içeren miRNA kümeleri de bulunmaktadır (Olena ve Patton, 2010). Bu lokuslar, birkaç farklı genomik organizasyon modelinde bulunabilmektedir (Şekil 1.3). miRNA lokusları intergenik olabileceği gibi, monosistronik veya polisistronik transkriptlerde de kodlanabilmektedir. Ayrıca protein kodlayan genlerin intronlarında da sıklıkla bulunmaktadır. Nadir durumlarda miRNA' lar protein kodlayan genlerin ekzonlarında da bulunabilmekte (Rodriguez vd., 2004) veya diğer kodlamayan RNA sınıflarından köken alabilmektedir.



Şekil 1.3 miRNA lokuslarının olası genomik organizasyonu. İntergenik miRNA lokusları yeşil, intronik miRNA' lar mavi ile gösterilmiştir. Daha nadir durumlarda, miRNA lokusları bir ekzon (gri) içinde veya intronun tamamı (miRTron) olarak bulunabilir.

Genomik miRNA kümeleri nispeten küçük olma eğilimindedir ve nadiren beş veya altıdan fazla farklı lokus içermektedir. İnsanda 14. kromozom, altı farklı miRNA ailesine ait 37 miRNA lokusu içererek, birçok tür arasında korunmuş, bilinen en büyük miRNA lokusu kümesini içermektedir. Bir diğer örnek de, insanda 19. kromozomda bulunan ve primatlarda korunmuş olarak bulunan miRNA kümesidir. Tekrarlı dizilerden transkribe edilen miRNA' lar, genom boyunca farklı bölgelerde duplike halde (örneğin, miR-427 ve miR-430) bulunabilecekleri gibi neredeyse rastgele bir şekilde de yayılabilmektedir (örneğin, miR-548). Birkaç miRNA ailesinin, özellikle memeli türlerinde tekrarlı elementlerden türetildiği gösterilmiştir (Piriyapongse ve Jordan, 2007; Borchert vd., 2011).

1.1.5. miRNA evrimi

Yeni nesil dizileme teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla farklı organizmaların genomları oldukça kısa sürede dizilenebilmektedir, böylece, mRNA ve miRNA transkriptomları ile ilgili veri miktarı da hızla artmaktadır. Literatürde miRNA' ların ve diğer küçük düzenleyici kodlamayan RNA' ların evriminin birkaç yönü bildirilmiş olsa da, (Tanzer ve Stadler, 2004, 2006; Hertel vd., 2006; Murphy vd., 2008) bu çalışmalar küçük ölçekli, birkaç yakın akraba tür için az sayıda miRNA

ailesinin evrimini anlamaya çalışmaktadır. Yine de, aşağıda birkaç farklı açıdan miRNA evrimine başlıklar halinde değinilmiştir.

1.1.5.1. miRNA biyogenezinin evrimi

miRNA işleme mekanizmasının farklı öğeleri farklı evrimsel örüntüler barındırmaktadır. miRNA işleme mekanizmasının içerdiği proteinlerin çoğu küçük düzenleyici RNA işlemeyle ilgili olmasa da, prokaryotlarda da bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu proteinlerin aktif merkezlerinin bakteri ve arkealarda zaten mevcut olduğu kabul edilmektedir (Shabalina ve Koonin, 2008).

Birçok basit ökaryot, RNAi mekanizmasını aktif şekilde kullanmasa da, işleme mekanizmasının proteinlerini koruyor görünmektedir. İlginç bir şekilde, kanonik miRNA' lar mantarlarda saptanmamıştır (Drinnenberg vd., 2009). Böylece, RNAi mekanizmasının bir maya türü olan *Schizosaccharomyces pombe*' deki rolünü anlamak için çalışmalar yapılmıştır. Dicer proteini için yapılan çalışmada, fisyon mayası olarak da bilinen *S. pombe*' nin hayatta kalması için elzem olmasa da, Dicer protein sentezinin inhibe edilmesinin yavaş büyümeye, anafaz sırasında kromozomların gecikmesine ve sentromerik tekrarların susturulmamasına neden olduğu anlaşılmıştır (Provost vd., 2002). Dicer' ın, RNA dublekslerini yaklaşık 22 bp fragmanlara kesmesinin RNAi işleme yollarındaki bilinen rolü, mayada korunmuş gibi görünmektedir (Dang vd., 2011). Ayrıca, fisyon mayasına insan Dicer' ının aktarılmasıyla, evrimsel olarak korunmuş bir işlevi destekleyerek, mayanın endojen Dicer delesyonundan kısmen kaçındığı da gösterilmiştir (Provost vd., 2002). Fisyon mayasında, bu proteinin sentromerlerde ve lokuslarda heterokromatin oluşumu ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynadığı saptanmıştır ve bu proteinin kaybı sentromerlerdeki kohezin kaybı ile ilişkilendirilmektedir (Hall vd., 2003). Ago proteininin restriksiyon aktivitesinin bu süreçte anahtar rol oynadığı da gösterilmiştir (Zofall ve Grewal, 2006). Dicer mRNA' sını eksprese eden türler genellikle tek bir *Dicer* kodlama genine sahiptir. Tuhaf bir şekilde, filogenetik ağaçta eklem bacaklıların ayrımından sonra, iki *Dicer* homologuna sahip türler görülmektedir. *Drosophila melanogaster*' de yapılan araştırmalar, Dcr1 proteininin miRNA işlemesinden sorumlu görüldüğünü, ancak dsRNA işlemesi için gerekli olmadığını gösterirken, Dcr2 proteini zıt fenotip sergilemektedir (Lee vd., 2004).

Pasha/DGCR8 proteini, doğrudan, bire bir ortolog ilişkiye sahip miRNA işleme yolunun birkaç bileşeninden biri gibi görünmektedir. Farklı paraloglar, balıklar gibi omurgalı gruplarında saptanmıştır ve büyük ölçekli protein kopyalarından ortaya çıkmıştır. Ago proteinlerinin bitkilerde geniş taksonomik kategorilerde temsil edilmesi gibi, Pasha/DGCR8 proteini de sınırlı evrimsel zaman aralıklarında bazı türe özgü değişiklikler içermektedir (Mallory vd., 2009).

Eksportin ailesi proteinlerinden birinden yoksun organizmalar, ncRNA ailelerinin taşınmasına izin vererek protein özgüllüğünü esnetiyor gibi görünmektedir (Murphy vd., 2008).

miRNA işleme enzimleri verileri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar genel olarak, bitkilerin ve hayvanların gruplar temelinde spesifik adaptasyonlar geliştirdiği fikrini desteklemektedir. Bir deuterostom olan *Ciona intestinallis*, miRNA işleme enzimlerinin her birinin tek bir kopyasına sahiptir. Genellikle diğer türlerde çoklu genomik kopyalarda bulunan Ago proteinin durumu bu türde oldukça dikkat çekicidir: *C. intestinallis*' in Ago dizisi, omurgalılarıdaki Ago ortologlarının atası gibi görünmektedir (Murphy vd., 2008). Diğer organizmalarda bulunan farklı Ago paraloglarının ayrışması ve farklılaşması, tam olarak bilinmeyen belirli fonksiyonlara sahip başka kodlamayan RNA sınıfları olabileceğini işaret etmektedir (Ender ve Meister, 2010). Tüm bu enzimlerin moleküler fonksiyonlarının karakterizasyonu konusundaki çalışmalar devam etmektedir. Bu proteinlerin evrimi ve miRNA/siRNA yolağının dışındaki fonksiyonları hakkında bazı ilginç bilgiler vermesi muhtemeldir.

1.1.5.2. miRNA Genomik Organizasyonun Evrimi

Mevcut dizileme verileri hızla artsa da, geniş bir tür yelpazesinde miRNA' ların genomik organizasyonuna ve evrimsel ilişkilerine dair genel bir bakış açısı henüz oluşturulamamış ve dolayısıyla çıkarsamalar yapılamamaktadır. Önceki çalışmaların çoğu, küçük bir tür havuzunda belirli miRNA kümelerine odaklanarak gerçekleştirilmiştir (Olena ve Patton, 2010). Bir miRNA kümesi genellikle tek bir pri-miRNA olarak kopyalanmakta, bu nedenle tüm üyeleri birlikte transkribe olup, muhtemelen benzer biyolojik işlevlere katılmaktadır (Ooi vd., 2011). Dolayısıyla, halihazırda var olan kümelerde yeni miRNA' lar ortaya çıkarsa, bunlar önceden tanımlanmış bir ifade modeline sahip olacak ve hücresel düzenleyici ağa daha kolay

entegre edilebilecektir. Yukarıda, miRNA Biyogenezi başlığı altında bahsedildiği üzere, miRNA repertuarının gelişimi statik bir süreç olmaktan uzaktır. Pek çok miRNA, benzer zamanlarda farklı türlerde ortaya çıkmış gibi görünürken, miRNA'ların oransal olarak daha azı belirli türlerde kaybolmuş gibi görünmektedir. Mevcut miRNA kümeleri içindeki bölgesel tekrarlar, yeni miRNA paraloglarının oluşturulması için evrimsel süreçlerin üzerine işleyebileceği bir materyaldir. Evrimsel bir ilişkinin başarılı bir şekilde analiz edilebilmesi için, belirli miRNA ailelerinin üyeleri arasında kesin homoloji bağlantılarının olması beklenmektedir. Evrimsel değişiklikler, aynı küme içindeki bölgesel tekrarlardan tüm küme tekrarlarına kadar çeşitli şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Bazı miRNA ailelerinin tekrarlayan dizilerden türetildiği de bilinmektedir. Bunlar, genom boyunca çeşitli paternlerde yayılmaktadır ve bu da gen düzeni analizini zorlaştırmaktadır. Bazı durumlarda ise, bir dizi bölgesel tekrarlardan türetilen tüm tekrarlar bir arada kümelenmiş gibi görünebilmektedir (örneğin, dre-miR-430). Tekrarlı dizilerden türetilmiş miRNA'lar için kesin bir evrimsel senaryo çıkarsamanın güç olması nedeniyle, bu miRNA'lar genellikle evrimsel ilişki analizlerinin dışında tutulmaktadır. Bu fenomenlerin ve genel olarak miRNA kümelerinin korunmasının dikkatli bir şekilde araştırılması, miRNA genomik organizasyonunun evrimsel korunmuşluğuna ve yeni lokusların mevcut miRNA düzenleyici ağı entegre olma yollarına ilişkin öngörü sağlayabilecektir (Bartel, 2018).

1.1.5.3. İntra-Spesifik miRNA Evrimi

Mutasyonlar, kendilerine hangi sürecin neden olduğuna ve genom üzerindeki etkilerine bağlı olarak farklı kategorilerde gerçekleştirilmektedir. Bu kategorilerden ilki, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak da adlandırılan, nokta mutasyonları ya da in-del (insersiyon- delesyon) mutasyonlarıdır. Bir diğer mutasyon kategorisinde ise daha büyük genomik değişimler gözlenmektedir, bunlar tüm genom yeniden düzenlemeleri, gen kazanımları veya kayıplarıdır. Bu mutasyonlar, SNP'lerden daha nadirdir ancak genellikle daha dramatik etkilere neden olmaktadır. Her iki mutasyon kategorisi için de, mutasyonların etkileri, seçim güçleri ile kontrol edilmektedir. Negatif seçim olarak da bilinen saflaştırıcı seçim, zararlı mutasyonların popülasyondan uzaklaştırılmasına karşılık gelmektedir. Pozitif seçim ise, avantaj

sağlayan mutasyonların popülasyonda frekansının artmasını sağlamaktadır (Brest vd, 2011).

Konumuna bağlı olarak, bir miRNA lokusundaki bir SNP, bir dizi farklı etkiler oluşturabilmektedir. Mutasyonların en dramatik etkiye sahip olanı ise, olgun bir miRNA'nın merkez etkileşim bölgesinde açığa çıkan ve miRNA'nın düzenlediği hedef kümesini önemli ölçüde değiştirme potansiyeline sahip olan mutasyonlardır. Olgun dizinin diğer bölgelerindeki SNP'ler, muhtemelen miRNA'nın hedef bölgelerine bağlanma afinitesini değiştirmekte, ancak potansiyel olarak daha az zararlı olmaktadır. Pre-miRNA'ların olgun miRNA oluşturanlar dışındaki kısımlarında oluşan mutasyonlar, heliksin yapısal stabilitesini değiştirebilir ve bu da potansiyel olarak miRNA işlenmesini etkileyecektir. miRNA lokuslarını etkileyen çoğu mutasyonun degradasyona neden olma olasılığı yüksek olsa da (Jazdzewski vd., 2008), miRNA lokuslarındaki bazı mutasyonlar avantajlı görünmektedir ve pozitif seçim işaretleri göstermektedir (Quach vd., 2009; Hu vd., 2012).

1.1.6. Hayvan ve bitkilerde miRNA'lar

İşlevsel olarak benzer olsalar da, miRNA'ların bitkilerde ve hayvanlarda işlenmesi ve etki mekanizmaları çeşitli farklılıklar içermektedir. Bitkilerde, her miRNA saç tokasının uzunluğu oldukça değişkendir ve 70 ila yüzlerce nükleotit arasında varyasyon sergilemektedir. Bununla birlikte, hayvanlarda her bir miRNA lokusu sadece bir olgun miRNA / degrade miRNA dubleksi oluşturma eğilimindeyken, bazı bitki miRNA'ları aynı heliksten çoklu dubleksler üretebilmektedir (Voinnet, 2009; Axtell vd., 2011). miRNA'ların uzunluklarında gözlenen farklılıklara benzer olarak, işleme mekanizmaları da farklılıklar sergileyebilmektedir. Örneğin, *Arabidopsis thaliana*, bir Drosha homologuna sahip değildir. Bunun yerine, fonksiyonel miRNA olgunlaşma adımları çekirdekte ve DCL1 tarafından gerçekleştirilir (Kurihara ve Watanabe, 2004). Olgun miRNA/ degrade miRNA dubleksi, bir Eksporin5 homologu olan HASTY tarafından sitoplazmaya iletilmektedir. Sitoplazmada, olgun miRNA Ago1'e yüklenmektedir. Hayvanların aksine, bitkilerde hedefin degradasyonu genellikle Ago'nun restriksiyon aktivitesi ile gerçekleştirilir. Ayrıca, hayvanlardaki miRNA hedef bölgeleri çoğunlukla transkriptlerin 3' UTR' siyle sınırlı olsa da, bitki miRNA'ları sıklıkla protein kodlayan bölgeleri (ekzonları) doğrudan hedeflemektedir.

miRNA aracılıklı gen ifadesinin düzenlenmesi de iki grup arasında farklılık göstermektedir. İnsan transkriptlerinin %30' unun miRNA' lar tarafından hedeflendiği tahmin edilmektedir. Buna karşın, *A. thaliana* transkriptlerinin %1' inden daha azının miRNA' lar tarafından hedeflendiği saptanmıştır (Fahlgren vd., 2007). Bitki ve hayvan miRNA' larının bağımsız olarak evrimleştiği düşünülse de, bitkiler ve hayvanlar tarafından paylaşılan miRNA' lar da bulunmuştur (Arteaga-Vázquez vd., 2006). Bu miRNA' lar arasında en bilinen ve ilgi çekenini insanda bulunan pirinç miRNA' larıdır (Zhang vd., 2012).

1.2. Böceklerde miRNA' lar

Yıllar boyunca birçok çalışma çeşitli böceklerin miRNA profillerini açıklamaya ve bu miRNA'ların gelişim ve konak-mikroorganizma etkileşimleri gibi çeşitli işlevlerdeki rollerini aydınlatmaya odaklanmıştır (Aravin vd., 2003; Mead ve Tu, 2008; Yu vd., 2008; Chawla ve Sokol, 2011). Böcek biyolojisindeki diğer alanlarla karşılaştırıldığında, miRNA' ların böcek gelişimindeki rolü, esas olarak hayvanların gelişimindeki korunmuş fonksiyonları nedeniyle oldukça dikkat çekicidir. Böceklerde ilk olarak miRNA çalışmaları yapılan türler şunlardır; *Drosophila* türleri (Stark vd., 2007), Hymenoptera takımına ait türler olan; *Apis mellifera* (Behura ve Whitfield, 2010), *Nasonia giraulti*, *N. longicornis* ve *N. vitripennis* (Weaver vd., 2007; Wei vd., 2010), Diptera takımına ait 3 sivrisinek türü olan; *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Behura ve Severson, 2012), *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* (Winter vd., 2007; Skalsky vd., 2010), *Acyrtosiphon pisum* (Legeai vd., 2010), *Bombyx mori* (He vd., 2008), *Heliconius melpomene* (Surridge vd., 2011), *Locusta migratoria* (Chi vd., 2011), *Tribolium castaneum* (Luo vd., 2008), *Blattella germanica* (Cristino vd., 2011), *Spodoptera litura* (Rao vd., 2012) ve kahverengi bitki zararlısı *Nilaparvata lugens* (Chen vd., 2012) bu alanda çalışılan türlerden bazılarıdır. Elde edilen miRNA' ların karakterizasyonu ve hedef gen dizilerinin saptanması çalışmaları hala devam etmektedir. miRNA' lar, böceklerde kodlamayan transkriptlerden, intronlardan ve hatta kodlama bölgelerinden kodlanabilmektedir. Genel olarak miRNA biyogenezi diğer ökaryotlardakine benzer olsa da bazı farklılıklar içerebilmektedir. Örneğin, *Drosophila*'da gösterildiği gibi, olgun miRNA' ya dönüşmeyecek olan 3' veya 5' miRNA, düzenleyici bir fonksiyona sahip olabilmektedir (Okamura vd., 2008; Czech vd., 2009). Gen

ifadesinin inhibe edilmesindeki rollerine ek olarak, Ago proteinlerinin miRNA stabilitesini arttırdığı da gösterilmiştir (Winter ve Diederichs, 2011).

Başlangıçta, miRNA'ların hedef sekanslarının sadece hedef mRNA'ların 3' UTR'inde bulunduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, toplanan veriler, hedef sekansların açık okuma çerçevesi ve 5' UTR ile 3' UTR arasında konumlanabileceğini düşündürmektedir (Bartel, 2009; Rigoutsos, 2009). miRNA-hedef baz eşleştirmesinde, miRNA merkez etkileşim bölgesinin mRNA ile tamamlayıcılığının önemli olduğuna inanılmaktadır, ancak bunun genel bir kural olmadığını gösteren birkaç çalışma da bulunmaktadır (Didiano ve Hobert, 2006). Her miRNA, bir ila birkaç genden mRNA'ları hedefleyebilmekte ve bazen bir mRNA' da birden fazla hedef bölge bulunabilmektedir (Brodersen ve Voinnet, 2009; Shin vd., 2010). Bir hedefle miRNA etkileşiminin sonucu, mRNA degradasyonundan (Hussain ve Asgari, 2010), translasyonun bastırılmasından (Zdanowicz vd., 2009), hedef transkript düzeylerindeki artışlara (Hussain vd., 2012a) kadar değişmektedir. İlginç bir şekilde, değişken 3'UTR' lere sahip bir mRNA' nın farklı türleri, embriyodaki farklı bölgelerde, farklı dokularda bir genin diferansiyel ifadenmesine izin veren farklı miRNA hedef bölgeleri setleri ile üretilebilmektedir (Thomsen vd., 2010).

Böceklerde, gelişim süreçlerini ve sinir sistemi gibi sistemlerin gelişimini düzenleyen birkaç korunmuş miRNA vardır. Bu miRNA' lardan bazıları detaylı olarak çalışılmış ve büyük ölçüde aydınlatılmıştır. Bunların her birinin önemli fonksiyonları vardır ve yoklukları önemli sınırlamalara neden olabilmektedir. Bu miRNA' lardan bazıları, hedeflendikleri genler ve gen ifadesine olası etkileri Çizelge 1.1' de verilmiştir. Bazı miRNA'ların hedefleri bulunamasa da, hücre kültürü çalışmalarıyla bazı yolları etkiledikleri saptanmıştır. Bununla birlikte bazı miRNA'ların da dizileme çalışmalarıyla hangi genleri hedefledikleri bulunabilmiş fakat olası etkilerinin belirlenebilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmuştur (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Böcek gelişimiyle ilgili detaylı çalışmalarla bulunmuş temel miRNA’ lardan bazıları ve hedefledikleri genler ile olası etkileri.

Gelişim evreleri	Referanslar	miRNA	Olası etkisi	Etkilediği gen/genler
Nörogenez	(Li vd., 2009)	miR-7	Eksikliğinde/yokluğunda, nörodejenerasyon, nöral kimlik ve farklılaşma eksikliği, nöromüsküler kavşaklarda anormal sinaptik aktiviteler, daha kısa ömür ve diğer gelişimsel ve davranışsal kusurlar	<i>yan, enhancer of split (E(spl))</i>
	(Loya vd., 2009)	miR-8		<i>atrophin, enabled (ena)</i>
	(Y. Li vd., 2006)	miR-9a		<i>senseless (sens)</i>
	(F. Liu vd., 2012)	miR-34		
	(K. Sun vd., 2012)	miR-124		<i>anachronism (ana), saxophone (sax), wishful thinking (wit), Mad, thickveins (tkv), Medea</i>
	(Tsurudome vd., 2010)	miR-310-313		<i>Khc-73</i>
	(M. Yang vd., 2008)	bantam		<i>Akt kinase</i>
	(Y. C. Wu vd., 2012)	let-7		<i>chinmo</i>
Kas Gelişimi	(Qian vd., 2011)	miR-1	Varlığında, hızlı larva büyümesi sırasında kas bütünlüğünün korunması	<i>Notch ligand Delta, Rho-GTPase Cdc42</i>
	(Biryukova vd., 2009)	miR-9a		<i>Drosophila LIM-only (dLMO)</i>
	(Ronshaugen vd., 2005)	iab-4		<i>ultrabithorax (Ubx)</i>
Eşey Hüce Gelişimi	(Iovino vd., 2009)	miR-184	Varlığında, oogene ve erken embriyogenezin düzenlenmesi	<i>saxophone, gurken transport factor K10, Tramtracks69</i>
	(Y. Z. Pan vd., 2009)	miR-7	Varlığında, çevresel değişimlere karşı gelişim evrelerinin doğru programlanması ve tamponlanması	<i>Bag-of-marbles (Bam), (Dap)</i>
	(Y. Yang vd., 2009)	bantam		Interacts with dFmr1 protein
	(Y. Wang ve Lee, 2008)	miR-278	Varlığında, hücre döngüsünün düzenlenmesi	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo (Dap)</i>
	(Y. Z. Pan vd., 2009)	miR-309	Varlığında, hücre döngüsünün düzenlenmesi	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo (Dap)</i>
Kanat Gelişimi	Biryukova vd., 2009	miR-9a	Eksikliğinde/ yokluğunda, önemli ölçüde kanat dokusu kaybı	<i>Drosophila LIM (dLMO)</i>
	Ronshaugen vd., 2005	iab-4	Varlığında, kanatlarda homeotik bir dönüşüm	<i>Ultrabithorax (Ubx)</i>
	Caygill ve Johnston, 2008	let-7	Varlığında, daha küçük kanat oluşumu, kanat imajinal disklerinde hücre bölünmesi zamanlamasının kontrolü	

	Becam vd., 2011	bantam	Varlığında, azalmış hücre proliferasyonu	<i>enabled (ena)/ Notch</i>
Gelişimsel Zamanlama	Victor Ambros, 2011	let-7	Yokluğunda/ eksikliğinde, erişkinlerde hareketliliğin azalması, nöro-dolaşım defektleri ve doğurganlığın azalması	<i>abrupt (ab)</i>
Apoptoz	Xu, Guo ve Hay, 2004	miR-14	Varlığında, Drosophila'da hücre ölümünün inhibitörleri	
	Brennecke vd., 2003	bantam		
	Enright vd., 2003	miR-2		<i>lid, grim, reaper, sickle</i>
	Stark vd., 2003	miR-13		
	Nairz vd., 2006	miR-278		
	Truscott vd., 2011	miR-11		
Konak Patojen Etkileşimi	Winter vd., 2007	miR-34	Varlığında, Plasmodium oosit sayılarında düşüş, konakçı vektör etkileşiminde bağışıklıkla ilişkili genlerin düzenlenmesi	<i>katapsin, betaTub60D, dgll</i>
		miR-1174		
		miR-1175		
		miR-309a-2		
	Hussain vd., 2011	miR-2940	Varlığında, Wolbachia enfeksiyonunun önlenmesi	<i>metaloproteaz m41 ftsh</i>
Konak Virüs Etkileşimi	Singh ve Nagaraju, 2012	miR-8	Yokluğunda/ eksikliğinde, virüs replikasyonunda önemli bir artış	<i>immediate-early-1 (ie-1)</i>
İmmün Sistem	Choi ve Hyun, 2012	miR-8	Varlığında, enfeksiyon dışı koşullar altında, immün sistem proteinlerinin düşük ekspresyon seviyesinde tutulması	antimikrobiyal peptitler
	Sempere vd., 2003	let-7	Varlığında, antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonunun kolaylaştırılması, doğal immün yanıtın aşırı uyarılmasının önlenmesi	<i>Dipterisin</i>
	Liu vd., 2010	miR-148a		<i>Kalsiyum / kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII)</i>
		miR-148b		
		miR-152		

Detaylı olarak çalışılan bu biyolojik süreçler dışında, henüz detaylandırılmamış olsa da miRNA' ların diğer biyolojik süreçlerde de gen regülasyonuna katıldığı saptanmıştır. Bunlar, sivrisineklerde yumurta gelişimi (Mead ve Tu, 2008; Bryant vd., 2010), sirkadiyen ritim (Kadener vd., 2009), fizyolojik olayların düzenlenmesi (sindirim ve sıvı atılımı gibi) (Yang vd., 2008; Luo ve Sehgal, 2012), koku alma (Hartl vd., 2011; McCann vd., 2011), hormon sinyali (Varghese ve Cohen, 2007; Varghese vd., 2010), hematopoezin düzenlenmesi ve hemosit farklılaşması (Tokusumi vd., 2011), maternal-zigotik geçiş sırasında maternal mRNA' ların döngüsü (Bushati vd., 2008), stres direnci ve yağ metabolizması (Xu vd., 2004), pigmentasyon ve eklüzyon (Kennell vd., 2012) ve yaşa bağlı davranış değişiklikleridir (Behura ve Whitfield, 2010).

Böceklerde miRNA araştırmalarının önündeki en büyük engellerden biri, birkaç böcek dışında tüm genom dizilerinin olmamasıdır. Tüm genom dizileri bulunmayan türlerin miRNA hedeflerinin belirlenmesi ve olası etkilerinin aydınlatılması mümkün olamamaktadır. Bu nedenle, çoğu çalışma mevcut tüm genom dizileri olan model böcek türlerine odaklanmıştır (örneğin, *Drosophila* ve *Bombyx* türleri).

1.3.1. Mitokondri

Mitokondri kendi genetik materyaline sahiptir ve neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. Hücrelerin çoğuna ATP sağlamasına ek olarak hücre döngüsünün kontrolü ve hücre büyümesi gibi farklı birçok anahtar süreçlerde görevlidir (McBride vd., 2006). Mitokondri içeren ökaryotik alemler karşılaştırıldığında, metazoan mitokondrisinin genetik yapısının oldukça büyük bir kısmını indirgediği saptanmıştır. Tipik bir metazoan mitogenomu, 13 intron içermeyen protein kodlayan gen, mitokondriyal rRNA' ların iki alt ünitesi ve lösin ve serin dışında her amino asitten birer tane içeren 22 tRNA'dan oluşan tek bir halkasal DNA içermektedir. Metazoanların neredeyse tüm proteomları nükleustan organelere aktarılmaktadır (Chacinska vd., 2009; Szklarczyk ve Huynen, 2010). mtDNA tarafından kodlanan birkaç proteinin ekspresyonu kendi transkripsiyon sisteminde işlenmektedir ve genetik kodunda genelde soy hattına özgü varyasyonlar içermektedir.

Tipik bir metazoan mitogenomu solunum zincirinde görevli 4 enzim kompleksine ait 13 protein kodlamaktadır: sitokrom b, ATP sentazın iki alt ünitesi, sitokrom c oksidazın 3 alt ünitesi, NADH dehidrojenazın 7 alt ünitesi. Dahası, mitogenom küçük ve büyük mitokondriyal ribozomal alt ünitelerini de içermektedir.

Tipik olarak 22 tRNA da mitokondriyal DNA'dan kodlanmaktadır. Serin ve lösin dışında her aminoasit için tek bir tRNA vardır. Bazı durumlarda bir ya da birkaç mitokondriyal tRNA kaybolabilir ya da fonksiyonel olarak nükleer tRNA' larla yerdeğiştirebilir (Alfonzo ve Söll, 2009). Farklı bir özelliği ise eklem bacaklılarda trnC ve trnW' de gözlenen üst üste gelen tRNA' lardır (Satta vd., 1987). Mitokondriyal tRNA' lar, diğer genetik sistemlerdeki tRNA' lara zıt olarak, bilindik yonca yaprağı yapısında bulunmak zorunda değildirler, buna rağmen %90' ından fazlası bu standart yapıyı kazanmaktadır. En çok gözlenen farklılık korunmuş D-kolunun (DHU-kolu) ve T-kolunun (TψC-kolu) olmayışıdır. Normal olmayan tRNA yapıları, yeniden düzenlenmiş mitokondriyal tRNA' ların yaygın etkisinin bir parçası olarak sistematik olarak çalışılmakta ve toplanmaktadır (Jühling vd., 2012).

Çoğu metazoan mitogenomunun sadece küçük bir kısmı proteinlerinin, tRNA' larının veya rRNA' larının birini kodlamamaktadır. Gen içeriği hayvanlarda oldukça korunmuşken, metazoalar arasında replikasyon ve transkripsiyonda görevli birkaç elementin düzenlenmesi açısından büyük farklılıklar bulunabilmektedir (Bernt vd., 2013).

Eklem bacaklılar ve muhtemelen nematodlarda da, A+T' ce zengin kodlama yapmayan bölge tek bir tanedir ve hem hafif hem de ağır zincir için replikasyon orjinini içermektedir (Zhang ve Hewitt, 1997; Saito vd., 2005).

Çekirdek ve mitokondri arasındaki DNA değişimleri ökaryotlar arasında iyi bilinen bir olgudur. Mitokondriyal dizilerin nükleer genoma aktarılması beklenenden çok daha fazla oranlarda gerçekleştirilmektedir. Bazı mitokondriyal genler nükleer genoma aktarıldıktan sonra genelde kodlama yapmayan ya da tipik olarak fonksiyonel olmayan dizilere neden olmaktadır. Bu diziler NUMT' lar (mitokondriyal DNA' nın nükleer kopyaları) olarak bilinmektedir. NUMT' lar filogenetik açıdan verilerin yanlış değerlendirilmesine neden olabilmektedir. PCR tabanlı yaklaşımlarda, fark edilemeyen değişken NUMT' lar arka plan kirliliğine ve fark edilemeyen bir eğilime neden olmaktadır. Dahası DNA barkotlama yaklaşımında, tür sayılarının sistematik olarak artmasına neden olmaktadır (Song vd., 2008).

1.3.1.2. Mitokondriyal Transkripsiyon

Memeli mitokondriyal genomundaki iki zincirin kendi nükleotid kompozisyonları açısından, asimetrik anlamda farklı oldukları saptanmıştır. Bir zincir G bazı bakımından zenginken, diğer zincir G açısından fakirdir. Bu farklılık fiziksel olarak ölçüldükten sonra (Anderson vd., 1981), G içeriği fazla olan zincire ağır zincir (H-zincir) ve diğer zincire de hafif zincir (L-zincir) olarak adlandırılmıştır.

Asimetrinin sonucunda da asimetrik mutasyon süreci işlemektedir. Buna göre transisyonlar, transversiyonlara kıyasla daha fazla sayıda olacaktır (Hassanin vd., 2005). Bunun olası kaynağı H-zincirde A ve C bazlarının hidrolitik deaminasyonudur. H- zinciri, replikasyon boyunca tek zincirli haldedir ve bu durumda mutasyonlara oldukça açıktır.

Mitokondriyal genom özelleşmiş bir sistem kullanarak transkribe olmaktadır. Bu sistemde monomerik RNA polimeraz POLRMT ve spesifik mitokondriyal transkripsiyon faktörleri (mtTFA ve paralog proteinleri mtTFB1 ve mtTFB2) kullanılmaktadır. İlginç olarak, POLRMT, DNA süper sarmal oluşumuna bağlı olan promotor bağımsız aktivite göstermektedir (Fukuoh vd., 2009).

Birincil transkript, polisistronik bir öncüdür. Nükleer düzenleyici faktörler, transkripsiyonun başlama ve sonlanma evrelerinin her ikisinde de etkindir (Scarpulla, 2008). Memelilerde, ağır zincirde alternatif iki tane ve hafif zincirde de D-loop' un içine konumlanmış bir tane promotor bulunmaktadır (Fukuoh vd., 2009). Bunlar 3 tane ilkin transkript oluşturmaktadır. trnF içindeki HSP2 promotorü, D-TERM lokusun distal kısmında sonlanan büyük bir transkript oluşturmaktadır. Bu transkript, trnF'nin yukarısında bulunan A+T' ce zengin bölgeyi de kapsamaktadır (Camasamudram vd., 2003). Daha çok bulunan, daha kısa transkript ise trnF' nin yukarısında bulunan HSP1 promotoründen başlamakta ve 2 rRNA ile 2 tRNA genini kodlamaktadır. Bu transkript, mtTERM olarak da adlandırılan trnL geninin yakınında bulunan rrnL rRNA geninin içindeki sinyalle sonlanmaktadır (Christianson ve Clayton, 1986). D-loop'da konumlanmış dizi kutusu II, transkripsiyon için hafif zincir promotoründe dizi bağımlı sonlanma elementi olarak işlev görmektedir (Xuan vd., 2006). Bu durum omurgalılarda oldukça korunmuştur (Coucheron vd., 2011). Kutu II dizisi memeliler için korunmuştur (Sbisà vd., 1997). *Drosophila*' da RNA sentezi, ağır zincirdeki iki promotordan ve hafif zincirdeki üçüncü promotordan başlanmaktadır, sırasıyla ağır ve hafif zincirde konumlanmış sıralı gen blokları büyük

ölçüde eşleştirilmektedir (Berthier vd., 1986). Genlerin geniş-ölçekli yeniden düzenlenmeleri mitokondriyal transkriptom yapısını da etkileyen olacaktır.

İlkin transkriptten olgun rRNA veya mRNA oluşması süreci 3` ve 5` uçlarındaki mitokondriyal tRNA` ların çıkartılmasıyla başlamaktadır. RNA sınırlama modeli (Ojala vd., 1981) olarak da bilinen bu süreç 5` ucu uzaklaştırması için RNaz P ve 3` ucunun uzaklaştırılması için ise tRNazZ endonükleazları kullanılarak işletilmektedir (Levinger vd., 2004). Çok sayıda tRNA genleri bulunduğu, *Drosophila`* da *nd3* ve *nd5* arasında olduğu gibi, sırasıyla 3` uçtan başlanarak uzaklaştırılmaktadır (Stewart ve Beckenbach, 2009). Hem omurgalılarda hem de *Drosophila`* da, *nd4/nd4l* ve *atp8/atp6* bisistronik mesajları dışındaki tüm olgun mitokondriyal mRNA` lar monosistroniktir. Dizilenmiş mitogenomların %90` ında *atp6* ve *atp8`* nin yan yana olmasına rağmen birkaç istisna vardır. mRNA` lar tipik olarak poliadenilasyonlanmıştır (Bobrowicz vd., 2008), fakat poli(A) içermeyen mRNA` lar da saptanmıştır (Mercer vd., 2011). Mitokondriyal mRNA` ların ilginç bir özelliği çoğu stop kodonlarının poliadenilasyonla tamamlanmasıdır, bu nedenle 3` UTR` lerden tamamen yoksundurlar (Stewart ve Beckenbach, 2009). Bu durum çok sık gözlenmektedir.

cox1, yanındaki trnS genine 3` UTR eşleniği özelliği göstermektedir ve bazı mRNA` lar hücre tiplerine bağlı olarak heterojen 3` UTR` lere sahiptir (Temperley vd., 2010). Bu durum birkaç ufak farklılıklarla omurgalılarda korunmuştur (Coucheron vd., 2011). 5` UTR` ler genelde bulunmaz. Daha detaylı dizileme çalışmaları transkriptlerin sonlandırıldığı ve sürdürüldüğü bölgenin haritalarını çıkartmaya çalışmaktadır (Lopez Sanchez vd., 2011). Sonuçlara göre mRNA fazlalığı büyük ölçüde post-transkripsiyonel süreçlerle kontrol edilmektedir (Mercer vd., 2011) ve standart olmayan süreçlerin ürünleri olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yaklaşım özellikle tRNA` ların ikincil yapısıyla bağlantılıdır çünkü standart olmayan süreçlerin işlediği bölgeler mRNA` lar içindeki RNA ikincil yapı kümeleriyle ilişkilendirilmiştir (Mercer vd., 2011).

Mitokondriyal rRNA` lar da poliadenilasyona tabii tutulur ya da *Drosophila* rrnS` de olduğu gibi en azından birkaç kodlama yapmayan adenine sahiptirler (Stewart ve Beckenbach, 2009). Bakteriyel rRNA` larda olduğu gibi, oldukça korunmuş pozisyonlar hem metilasyon hem de psödoüridilasyonla modifiye edilmektedir (Ofengand ve Bakin, 1997). Tüm mitokondriyal tRNA` ların 3` uçlarına mitokondriyal tRNA nükleotidil transferaz ile CCA dizisi eklenmektedir (Nagaike

vd., 2005). Sonrasında tRNA' lar katlanmalarının, tanınmalarının ve baz eşleşmelerinin doğruluğunu garantilemek için kimyasal olarak modifiye edilmektedir (Messmer vd., 2009). Antikodon düğümündeki modifikasyonlar, örneğin 34' üncü pozisyonun 5-metilaminometil-2-tiyouridilat ile hipermodifikasyonu, çoklu kodonların wobble baz eşleşmesini garantilemek için elzemdir (Agris vd., 2007).

1.3.2. Mitokondriyal KodlamaYapmayan RNA' lar

Bilinen genlere ek olarak kodlama yapmayan RNA' ların farklı tipleri de mitokondride mevcuttur (Lung vd., 2006). Bunlardan bazıları mitokondride kodlanırken bazıları nükleer genomda kodlanıp mitokondri içerisine alınmaktadır. Mitokondriden kodlananlara aşağıda belirtilen birkaç örnek verilebilir. Kısa RNA' ların iki farklı tipi, tRNA 5' - 3' işleme bölgelerinin aşağısındaki gen bölgelerinden oluşturulmaktadır (Mercer vd., 2011). RNA tiplerine özgü poliadenile olmuş, fonksiyonu bilinmeyen küçük bir kontrol bölgesi (7S RNA) (Ojala vd., 1981) L-zincir ilkin transkriptinden köken almaktadır. Fare mitokondrisinde 3 adet büyük kodlama yapmayan RNA' nın (lncRNA) mitokondriyal gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı saptanmıştır (Rackham vd., 2011). Düzenlenmiş antisens transkriptler dışında farklı olarak ters tekrarların birlikte rrnL RNA'ya bağlanmasıyla insan normal hücrelerinin tümör hücrelerine dönüştüğü rapor edilmiştir (Burzio vd., 2009). Mitokondriyal transkripsiyon sistemi, sonuç olarak, ağır zincirin DNA sentezini başlatabilmek için RNA primerlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu sonuca bağlı olarak memelilerde hafif zincir promotorleri, G-tersinir yapıyı transkripsiyonu sonlandırmak için kullanmaktadır (Wanrooij vd., 2010).

50 yıl önce mitokondride sitozolik transfer RNA' larının (tRNA' ların) ilk keşfinden bu yana (Suyama, 1967), nükleer DNA'dan kopyalanan birçok RNA türünün aktif olarak mitokondriye aktarıldığı fikrini destekleyen kanıtlar biriktirilmiştir.

Mitokondri içerisine alınan RNA' lar, tRNA' lar, 5S rRNA, MRP RNA (RMRP) ve RNase P RNA (RPPH1) (Chang ve Clayton, 1989; Holzmänn vd., 2008) gibi farklı tipte kodlayıcı olmayan (nc)RNA' ları ve mikroRNA' ları (mitomiR' ler) içermektedir (Bandiera vd., 2011; Sripada vd., 2012). Mitokondrilere mobilizasyonları bir dizi protein faktörü gerektirmektedir (Kamenski vd., 2007; Noh vd., 2016), ancak RNA' ları mitokondriye seçen ve aktaran mekanizmalar ve ayrıca

mitokondriye gönderilen RNA' ların mitokondriyal gen ifadesinin düzenlenmesi üzerindeki etkisi henüz büyük ölçüde bilinmemektedir.

Son zamanlarda, iki farklı çalışmada saflaştırılmış insan mitokondri ve mitoplastlarının tam transkriptom analizlerini rapor edilmiştir (Mercer vd., 2011; Rackham vd., 2011). Çalışmalar sonucunda, mitokondriyal genomdan kopyalanan çok sayıda küçük RNA ve uzun kodlayıcı olmayan RNA (lncRNA) tanımlanmıştır. Bunlar arasında, lncRNA' lar lncND5, lncND6 ve lncCytB, sırasıyla mitokondriyal *nd5*, *nd6* ve *cytb* mRNA' ların antisens transkriptleri olarak tanımlanmıştır (Mercer vd., 2011). lncND5 ve lncCytB 'in, L ipliğinden ve lncND6' nın, mitokondriyal DNA'nın H ipliğinden kopyalandığı bulunmuştur. İlginç bir şekilde, bilinen mitokondriyal RNA işleme proteinlerinden biri olan mitokondriyal RNaz P proteini 1'in (MRPP1) (Lopez Sanchez vd., 2011), lncRNA transkriptlerinin olgunlaşmasını ve miktarını etkileyen benzersiz bir RNA işleme fonksiyonuna sahip olduğu ileri sürülmüştür (Rackham vd., 2011).

Mitokondri kendi mitokondriyal DNA' sından düzinelerce RNA sentezlese de, bazı nükleer DNA kodlu RNA' lar mitokondriye transfer edilebilir. Yukarıda belirtildiği gibi, sitoplazmik proteinlerin mitokondriye aktarım mekanizması ayrıntılı olarak incelenmiştir, ancak nükleer DNA kodlu RNA' ları mitokondriden içeri alan mekanizmalar net değildir (Entelis vd., 2001). Sadece birkaç kodlamayan transkript seçici olarak mitokondriyal matrikse taşınmaktadır (Wang vd., 2010; Rackham vd., 2011).

1.3.3. Mitokondriyal miRNA (mitomiR)'lar

MikroRNA' lar potansiyel olarak geniş bir dizi hedef mRNA ile etkileşime girebilmekte ve bu nedenle hayatta kalma, ölüm, bölünme, farklılaşma ve yaşlanma gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer alan güçlü posttranskripsiyonel düzenleyiciler olarak dikkat çekmektedir (Kloosterman ve Plasterk, 2006; Rottiers ve Nää, 2012). Buna karşın miRNA' lar, kanser, kardiyovasküler hastalık, nörodejenerasyon, yaşlanma, iltihaplanma ve diyabet gibi fizyolojik süreçleri ve hastalıkları etkilemektedir (Rottiers ve Nää, 2012; Saeidimehr vd., 2016). Son zamanlarda mitokondride bulunan miRNA' ların keşfi, miRNA' ların olası posttranskripsiyonel fonksiyonlarının spektrumunu genişletmiştir ve mitokondriye miRNA translokasyon mekanizmalarının araştırılmasına yol açmıştır.

Mitokondriye protein alımı için farklı mekanizmalar olduğu anlaşılmaktadır (Becker vd., 2009). Son yıllarda, RNA'nın mitokondri içerisine alınmasında yer alan mekanizmalar belirlenmeye başlanmıştır (Wang vd., 2012). Örneğin, mitokondriyal intermembran boşluğuna yerleştirilmiş 3' den 5' ye kadar bir ekzoribonükleaz ve poli-A polimeraz poli-nükleotit fosforilaz (PNPASE), mtDNA replikasyonu ve mtRNA için gerekli küçük RNA bileşenlerinin mitokondriye aktarılmasında önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir. Ek olarak, PNPASE, elektron taşıma zinciri (ETS) bileşenlerinin miktarını kontrol etmek için kısmen RNA girişini düzenleyerek adenin nükleotit seviyelerini ve mitokondriyal homeostazı düzenlemektedir (Wang vd., 2012). Bu çalışmalar, PNPASE' in ve/veya henüz bilinmeyen taşıyıcıların miRNA' ların mitokondriyal trafiğine dahil olabileceğini düşündürmektedir. Importin 8' in fiziksel olarak Ago2 ile ilişkili olduğu ve olgun miRNA' ların hücre çekirdeğine taşınmasını sağladığı bilinmektedir (Wei vd., 2014). Çekirdekteki olgun miRNA' lar için potansiyel fonksiyonel rol(ler), şimdiye kadar tanınmayan bir gen ifadesi düzenlemesi oluşturmaktadır (Zisoulis vd., 2012). Mitokondri, hücresel homeostazın korunmasında anahtar organelidir. Mitokondriyal ve nükleer kodlanmış protein ve RNA' ların kapsamlı dizisiyle birlikte mitokondri, miRNA aracılı gen ifadesinin düzenlenmesi için kritik bir alanı temsil edebilir. RNAi bileşenlerinin mitokondriye konuştuklarına dair ilk kanıt, insan Ago2' nin mitokondriyal trnM ile etkileşime girdiğinin bulunması ile elde edilmiştir (Maniataki ve Mourelatos, 2005). Son zamanlarda, Ago2 ve Ago3' ün, bu ilk gözlemleri genişleten ve RNAi aracılı gen susturma için yeni bir alt hücre nişi olarak mitokondrinin potansiyel ilişkisini arttırdığı, mitokondriye eş-lokalize olduğu bulunmuştur (Bian vd., 2010). Yeni nesil dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle kodlamayan küçük RNA' lar, mitokondri ve kloroplastta tespit edilmeye başlanmıştır (Lung vd., 2006). O zamandan beri, miRNA' ların sıçan (Kren vd., 2009) ve fare karaciğeri (Bian vd., 2010), insan iskelet primer kas hücreleri (Barrey vd., 2011), insan kanser hücre hatları HeLa (Bandiera vd., 2011), HEK293' ten izole edilen mitokondride mevcut olduğu bildirilmiştir. Olgun miRNA' lara ek olarak, pre- miRNA' ların mitokondride tanımlanmış olması şaşırtıcı değildir (Barrey vd., 2011).

İnsan hücrelerinde mitokondriyal miRNA' ların saptanmasını bildiren ilk çalışmalar 2011 yılında yapılmıştır ve insan iskelet primer kas hücrelerinden (Barrey vd., 2011) ve HeLa kanser hücre hattından (Bandiera vd., 2011) mitokondriler izole edilmiştir. Toplam 46 miRNA insan iskelet kasından mitokondrilerde tanımlanmış ve potansiyel

olarak miyogenez, infiltrasyon, fibrozis, onkogenesis ve tümör baskılanmasında rol oynadığı bulunmuştur. Önemli olarak, ilk kez pre-miRNA' ların da mitokondriye konumlandığı gösterilmiştir (Barrey vd., 2011; Bandiera vd., 2011).

miRNA' ların varsayılan hedeflerinin *in siliko* analizinde, bazı varsayılan miRNA hedef genleri birden fazla olası miRNA hedef etkileşimi sergilemiştir. *nd6* geni, *cytb* ve *nd1*' in iki katı olan 38 varsayılan miRNA hedef bölgesi gösterilmiştir. Ek olarak, *nd4l*, *nd4* ve *cox1* gibi diğer genlerin de çoklu potansiyel miRNA bağlanma dizisine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca miRNA let-7b' nin, *atp6*, *atp8*, *cox2* ve *nd5* dahil olmak üzere bir dizi potansiyel mitokondriyal gen ürününü hedeflediği tahmin edilmiştir. Mitokondride saptanan bazı miRNA' ların, örneğin let-7 ailesi miRNA' ları (let-7b, c, d, e, f, i) ve miR-133a' nın mitokondriyal düzenlemeye dahil olabileceği önerilmektedir (Barrey vd., 2011).

Başka bir çalışmada (Bandiera vd., 2011), insan HeLa kanser hücrelerinden izole edilen mitokondrilerde, yüksek düzeylerde 13 nükleer kodlanmış miRNA tanımlanmıştır. Bu miRNA' lar, dış mitokondriyal membran ile ilişkili kontamine edici miRNA' ları uzaklaştırmak için RNase A ile muamele edilerek, uzun bir saflaştırma prosedüründen sonra saptanmıştır. Ayrıca, bu mitokondriyal miRNA' ların dördünün, miR-328, miR-494, miR-513 ve miR-638, hedeflerinin *in siliko* analizinde mitokondriyal homeostazın düzenlenmesine dahil oldukları gösterilmiştir.

Son zamanlarda, 143B osteosarkom hücrelerinden insan mitokondriyal transkriptomu, mitokondriyal olmayan RNA' lardan kontaminasyonu önlemek için RNase A ile muamele edilen izole mitokondrilerden RNA' nın derin sekanslanması ile analiz edilmiştir. Sonuçlar mitokondrinin, miRNA' lar dahil hücre içi küçük RNA popülasyonunun %3' ünü içerdiğine işaret etmektedir (Mercer vd., 2011). Ayrıca, saflaştırılmış mitokondriyal RNA' nın derin sekanslanması sonucunda, sadece nükleer genom ile hizalanan ve bu nükleer RNA' ların mitokondriye alındığını düşündüren çok sayıda okuma elde edilmiştir. Bununla birlikte, protein translasyonu ile ilişkili genlerde, dış mitokondriyal membrana bağlı ribozomlarla potansiyel bir kontaminasyonu gösteren ve böylece verilerin geçerliliği ile ilgili endişeleri artıran güçlü bir varsayımda bulunulmuştur (Mercer vd., 2011). Deneysel olarak ekarte edilemeyen bu durum biyoinformatik araçlardaki filtreleme basamaklarıyla uzaklaştırılmaya çalışılmaktadır.

Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, insan kanser hücreleri, HEK293 ve HeLa hücrelerinden izole edilen mitokondrilerden RNA derin sekanslama

uygulamaları ile küçük RNA çeşitleri dizilenmiş ve yine mitokondri ile ilişkili benzersiz küçük RNA moleküllerinin varlığı gösterilmiştir. Potansiyel hedeflerin *in silico* analizinde, mitokondrilerle ilişkili miRNA' nın, mitokondrinin önemli rol oynadığı RNA döngüsü, apoptoz, hücre döngüsü ve nükleotit metabolizması gibi kritik hücresel süreçleri düzenleyebildiği gösterilmiştir. Bilinen miRNA' ların, genom ile hizalanmasıyla *nd4l*, *nd5*, L-ORF ve *rrnL* mitokondriyal genleriyle eşleştiği bildirilmiştir. Ayrıca, varsayılan yedi yeni miRNA' nın kodlamayan bölgelere, tRNA, *rrnS*'ye ve ayrıca *atp6*, *nd2*, HVRI, *cox1*, *cytb* ve *nd1* genlerine hizalandığı bildirilmiştir (Sripada vd., 2012).

Mitokondri, dinamikleri önemli biyolojik etkiye sahip olan son derece hareketli hücresel organeldir ve bu özellikle nöronlarla ilgilidir (Du vd., 2010). Nöronlar enerji homeostazını sürdürmede çeşitli zorluklarla karşı karşıya kalmaktadır, bu nedenle mitokondriyi enerjinin yüksek talep olduğu hücre altı bölgelere etkili bir şekilde dağıtmak için özel mekanizmalar gerektirmektedir. Bunlar arasında, nöronal gelişim sırasında ve sinaptik aktiviteye yanıt olarak dinamik bir şekilde yeniden yapılanmaya uğrayan sinaptik terminaller ve aksonal dallar bulunmaktadır, bu sayede mitokondriyal trafik çarpışma dinamikleri değişmektedir. Bu nedenle, mitokondriyal trafik sıkışmasının ve sabitlenmesinin etkili bir şekilde düzenlenmesi, yaşlı ve hasarlı mitokondrileri çıkarmanın ve değiştirmenin yanı sıra değiştirilmiş metabolik gereklilikleri yerine getirmek için işe alım ve taşınma için esastır (Sheng, 2014). İlginç bir şekilde, mitokondrinin aynı zamanda ekzomlar ve tünelleme nanotüpleri yoluyla hücreler arası aktarıma maruz kaldığını ve böylece hedef hücrelerin düzenlenmesini etkilediğini gösteren artan kanıtlar bulunmaktadır (Ahmad vd., 2014). Kümülatif olarak bu, mitokondriyal miRNA' ların etkileşim düzeyini önemli ölçüde genişletebilir. Bu hücre içi ve hücreler arası dinamikler, biyolojik olarak önemli olabilmektedir, çünkü mitokondri, hücre sağkalımı ve hücre ölümünün önemli düzenleyicileridir ve ayrıca homeostazdaki bozulmaların neden olduğu sinyal yollarının düzenlenmesinde belirgin bir şekilde yer almaktadır (Galluzzi vd., 2012). Deneysel doğrulama gerektirmekle birlikte, mitokondri ile taşınan miRNA' ların, organel hasarına ve RNAi proteinlerinin salınımına neden olan mitokondri miRNA' larında lokal zenginleşmeye yol açabileceği düşünülmektedir. Buna karşılık, varsayılan bir biyolojik etkiye dönüşebilme potansiyelindeki transkript hedeflemesinde bir kaymaya yol açabilmektedir. Organizma homeostazını etkileyen değişiklikler, mitokondri ile ilişkili miRNA ekspresyonunun yanı sıra, tüm dokuyu

değiştirebilmektedir. Örneğin, tip 1 diyabet ve mitokondri disfonksiyonu indüklenen farelerin streptozotosin tedavisi, karaciğer miRNA' larının ve ayrıca mitokondri ile ilişkili miRNA' ların ekspresyon paternlerini değiştirmekte ve bunların mitokondriyal disfonksiyona potansiyel olarak dahil olduklarını ortaya koymaktadır (Bian vd., 2010).

1.3.3.1. mitomiR' lerin Fonksiyonu

mitomiR' ler (Bandiera vd., 2013) olarak bilinen mitokondrilerde bulunan mikroRNA' ların büyük çoğunluğu, genelde nükleer DNA ile kodlanmaktadır, ancak birkaç mikroRNA' nın (özellikle miR-1974, miR-1977 ve miR-1978) mitokondriyal DNA (Bandiera vd., 2011) tarafından kodlandığı bilinmektedir. Çoğu mitomiR'nin fonksiyonunun bilinmemesine rağmen, hücrelerin hayatta kalması, hücre bölünmesi ve enerji metabolizmasında ve kanser gibi hastalık süreçlerinde rol oynadığı öne sürülmektedir (Duarte vd., 2014). İşlevsel olarak incelenen az sayıdaki mitomiR arasında, nükleer DNA' dan kodlanan miR-181c' nin mitokondriye konuşlandığı ve mitokondriyal gen ekspresyonunu düzenlediği saptanmıştır. Kemirgenlerde, *cox1* mRNA' sını hedefleyen ve aşağı yönde düzenleyen miR-181c' nin aşırı ekspresyonu, daha yüksek ROS üretimine, daha düşük egzersiz kapasitesine ve kalp fonksiyon bozukluğunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Das vd., 2014). İlginç bir şekilde, kas farklılaşması sırasında miR-1' in Ago2 ile mitokondriye translokasyonunun, *nd1* geninin translasyonunun artmasına yol açtığı saptanmıştır (Zhang vd., 2014). Yeni nesil dizileme (NGS) ile mitokondri içine aktarılan ve nükleer DNA'dan transkribe edilip mitokondri içinde birçok potansiyel hedefi olan miR-181c-5p ve miR-146a-5p gibi birkaç miRNA tespit edilmiştir (Das vd., 2014). Mitokondride lokalize miR-34a' nın, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu ve adenosin trifosfat ve sitokrom c seviyelerini azaltarak kültürlenmiş serebrovasküler endotelial hücrelerde kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü kontrol ettiği bulunmuştur (Bukeirat vd., 2016). Yapılan bir çalışmada, diyabetik kalbe sahip fare modelinde ve HL-1 hücrelerinde diyabet sonrası mitokondriye taşınan ve kardiyak pompa fonksiyonu için gerekli olan *atp6* yı aşağı yönde regüle eden miR-378 içeren bir mitomiR havuzu belirlenmiştir (Jagannathan vd., 2015).

Bu çalışmalar miRNA' ların önemli bir kısmının mitokondri içine alındığına ve mitokondriyal gen ekspresyonunu geniş ölçüde etkileyebileceğine dair kanıtlar

sunmaktadır. MitomiR' ler, mitokondriyal ve nükleer transkripsiyondan kaynaklanan mRNA' ların ekspresyonunu arttırabilmekte veya azaltabilmektedir ve bunun sonucunda mitokondriyal metabolik aktivite ve hücre homeostazını etkilemektedir. Mitokondride miRNA konumlanmasını yöneten, taşıma ve etkileşim faktörleri (örn. RBP' ler ve lncRNA' lar)' nin mitokondriye konumlanmasını, miRNA' ları mitokondriye (örn. RNA motifleri) taşınmasını ve bunları sağlayan olası sinyallerin açıklanması önem arz etmektedir. Ek olarak, mitomiR' lerin mitokondriyal fonksiyonlarını mümkün kılan mitokondriyal etkileşim ortaklarının (Ago2 ve muhtemelen diğer RBP' ler) tanımlanması da büyük önem arz etmektedir (S. Fan vd., 2019).

Büyük ölçüde omurgalıları üzerinden yapılan mitomiR çalışmaları omurgasızlar açısından değerlendirildiğinde farklı sonuçların elde edilebileceği varsayılmaktadır. Özellikle çalışma kapsamında böcek grupları mitomiR' ler açısından değerlendirildiğinde, böcek mitogenomları gen içeriği açısından memelilerle neredeyse aynı olmasına rağmen, organizasyonları açısından memeli mitogenomlarından oldukça farklılık sergilemektedir. Genom organizasyonundaki bu farklılık, hem replikasyon hem de transkripsiyon mekanizmalarında gözlenen farklılaşmaların ana kaynağı olabilir. Memeli mitogenomlarının tersine, böcek mitokondri genleri her iki zincire de neredeyse eşit oranda dağılmış ve her iki zincirde alternatif olarak konumlanmış dört transkript kümesi oluşturmaktadır (Bruni vd., 2012). Her iki zincirin de tamamının kodlama yapmamasına karşın çok büyük bir kısmının transkribe olması mRNA, rRNA ve tRNA' ların haricinde kodlama yapmayan düzenleyici RNA molekülerinin de mitokondri genomu tarafından oluşturulabileceğine işaret etmektedir.

1.4. Çalışmanın Amacı

Bu doktora çalışması ile *Syriza parreyssi* (Insecta: Hymenoptera) ve *Lepisma saccharina* (Insecta: Zygentoma) türlerinin total miRNA derin dizileme verileri ilk kez elde edilmiştir.

Bu çalışma ile,

- Bu iki farklı başkalaşım paterni sergileyen böcek türlerinin bilinen ve yeni miRNA' larının tanımlanması,

amaçlanmıştır.

Özelde, bilinen miRNA' ların çalışılması ile,

- Bilinen miRNA'lar için transkript yoğunluğunun ve benzerlik sergilediği organizmaların belirlenmesi ile geniş taksonomik gruplarca korunmuş miRNA'ların belirlenmesi,
- Daha önceki çalışmalarla tanımlanmış mitomiR'lerin bu iki böcek türünde araştırılması ve korunmuş ve özgül mitomiR'lerin saptanması,

amaçlanmıştır. Böylece, kümülatif olarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sürecini etkilemese de mitokondrinin görevli olduğu apoptoz gibi süreçlerdeki miRNA'ların olası etkilerinin değerlendirilmesi ve iki böcek türü için sergilediği varyasyon hakkında bilgi edinilebilmiştir.

Yeni miRNA'ların keşfi ile ise,

- Özellikle mitokondri içerisine hedeflendiği varsayılan miRNA'ların biyoinformatik olarak test edilmesi ve mitokondrideki olası hedeflerinin tahmin edilmesi,
- Mitokondriden köken alabilecek miRNA'ların ve olası transkripsiyon yoğunluklarının belirlenmesi,
- Böcek gruplarında daha önce çalışılmamış olan mitomiR'lerin kantitatif olarak saptanması,

amaçlanmıştır. Böylece indirgenmiş doğasına rağmen mitogenomun neden birden çok kodlama yapan ve yapmayan transkripsiyon ünitesine sahip olduğu ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda görevli olabilecek miRNA'ların hangi genleri neden etkilediğinin bulunması hedeflenmiştir.

2. MATERYAL- METOD

2.1. Saha çalışmaları ve örneklerin teşhisi

Gül filiz arısı olarak da bilinen *Syrista parreyssi* (Spinola, 1843) (Insecta: Hymenoptera; Symphyta: Cephidae) türü bireyleri 2018-2019 yılı Haziran ayında; Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Kampüsü, Sivas, Türkiye’ de gül bitkileri üzerinden toplanmış ve RNA uygulamaları için RNAlater solüsyonuna alınmıştır. Mitokondri izolasyonu için ise sıvı azot içerisinde azot tankında saklanmıştır. Gümüşçün olarak adlandırılan *Lepisma saccharina* (Insecta: Zygentoma: Lepismatidae) örnekleri ise 2018-2019 yılları boyunca; Sivas ve Tokat illerinden temin edilmiş ve RNAlater ve sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Her bir türden birer birey, EBRG laboratuvarlarında kontrol koleksiyon materyali olarak saklanmaktadır. *S. parreyssi* ve *L. saccharina* bireylerinin tür teşhisleri barkodlama uygulamalarıyla (*cox1* Folmer bölgesi, LCO1490 ve HC02198 primerleri) (Folmer vd., 1994) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen amplikonlardan standart Sanger dizileme yapılarakve BOLD sistem v.4 (<http://www.boldsystems.org>) ve NCBI veritabanında BLASTn taramaları (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) sonrasında tür teşhisi doğrulanmıştır.

2.2. Mitokondriyal miRNA uygulamaları

Mitokondriyal miRNA izolasyonu için öncelikle yüksek konsantrasyonlarda mitokondri elde edilmeye çalışılmış, sonrasında ise miRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşımın tercih edilmesindeki ana amaç, mitokondriden sentezlenen ve mitokondride fonksiyonel olan/ olabilecek miRNA’ ların belirlenebilmesidir.

2.2.1. Mitokondri izolasyonu

İlk olarak, mitokondri eldesi için manuel mitokondri izolasyon yöntemine başvurulmuştur. Bu uygulamada, Stewart ve Beckenbach (2009) tarafından önerilen ve aşağıda modifikasyonları ile birlikte detaylandırılmış yöntem izlenmiştir.

1. Öncelikle örneklem dahilindeki her bir türe ait bireyin kirlilik oluşturmayacak dokularından 200-300mg başlangıç dokusu alınmıştır. *S. parreyssi* türünde kas dokusu tercih edilmiş olup abdomen kısmından, iç organlar

ve bağırsaklardan, özellikle mikrobiyotadan uzaklaşmak amacıyla, kaçınılmıştır. *L. saccharina* türünde organizma küçüklüğü nedeniyle doku ayrımı yapılmadan total birey kullanılmıştır.

2. Başlangıç dokusu 2 kez soğuk MSB tamponu (210mM mannitol, 70mM Sükroz, 50mM Tris-Cl pH 7.5, 10mM EDTA) ile yıkanıp santrifüj ile geri kazanılmıştır.
3. Doku, öncelikle bistüri ile olabildiğince küçültülmüş ve sonrasında homojenizatör yardımıyla fiziksel olarak tümüyle parçalanmış ve 50 mL hacimli falkon tüplere alınmıştır.
4. Her 1 gram doku üzerine 10 mL soğuk MSB tamponu (210 mM mannitol, 70 mM sukroz, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 10mM EDTA) eklenmiş ve tüm doku tamponla homojenize olana dek işlem sürdürülmüştür.
5. Organizmal ve hücresel debris mitokondriyal fazdan 4 °C' de 1300xg hızda 5 dk santrifüjleme işlemiyle uzaklaştırılmıştır.
6. Üst faz 4°C' de 1650xg hızda tekrar 5dk santrifüj edildikten sonra kalıntı haldeki hücresel debris ortamdan uzaklaştırılmıştır.
7. Beşinci ve altıncı adımdan adımlardan elde edilen süpernatant sitozolik fraksiyonu içermektedir.
8. Üst faz ultrasantrifüj tüplerine aktarılarak 18000xg hızda 20 dk santrifüj edilerek mitokondri peletinin oluşması sağlanmıştır.
9. Kirlilik durumu saptanan peletler tekrardan 1 mL MSB tamponuyla süspanse edilerek 18000xg hızda 20 dk yeniden santrifüj edilmiştir. Bu işlem peletler tümüyle şeffaf oluncaya dek tekrarlanmıştır. Genelde konsantrasyon kaybına neden olmamak için üçten daha fazla sayıda yıkama yapılmamıştır.
10. Oluşan mitokondriyal peletler 100µL RNAlater' da çözülerek RNA ve miRNA izolasyonunda kullanımına dek -80 °C' de saklanmıştır.

Bu aşamadan sonra izole mitokondrinin saflığını ve kalitesini ölçmek amacıyla mitokondriyal fazdan DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu aşamanın gerekliliği saf mitokondri eldesinin *ITS2* (çekirdek) ve *cox1* (mitokondriyal) amplifikasyonları yapılarak kontrollü olarak sağlanmasıdır. Bunun için tuzla çöktürme yöntemi kullanılmıştır (Sunnucks ve Hales, 1996). Buradaki beklenti, mitokondriyal fazda *cox1* ürününün elde edilip *ITS2* ürününün elde edilememesidir.

Böylelikle önemli ölçüde saf halde mitokondri izolasyonunun sağlanıp sağlanmadığı anlaşılabilir olacaktır. Fakat *ITS2* çekirdek gen bölgesinin amplifikasyonu mitokondriyal fazda görüldüğü için kit ile mitokondri izolasyonu yöntemine başvurulmuştur. Bu kapsamda mitokondri izolasyonu “dokudan mitokondri izolasyon kiti” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada kit içeriğinde önerilen “reajan tabanlı sert dokudan mitokondri izolasyonu” protokolü uygulanmıştır. Tüm aşamalar buz üzerinde ve aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Öncelikle başlangıç doku miktarına karar verebilmek için doku gradiyenti uygulanmıştır. Bunun için 70, 100, 200 ve 270 mg dokular kullanılmış ve kit ile RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu uygulamanın amacı hem nanodrop ve Qubit ölçümlerinin yapılması hem de total mitokondriyal RNA izolatından miRNA’ların kazanılmasıdır. Bu amaçla izlenen protokol 2.2.2. numaralı “Mitokondriyal RNA izolasyonu” başlığı altında verilmiştir. RNA izolatlarının nanodrop ölçümleri sonucunda saflık ve konsantrasyon değerleri üzerinden optimum doku miktarının ortalama 250 mg olduğu saptanmıştır.
2. Sonrasında ortalama 250mg doku RNA later’ın uzaklaştırılması amacıyla iki kez PBS tamponu ile yıkanmıştır.
3. Doku üzerine 4mg/mL içeren 800µL PBS tamponu (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4) eklenmiştir ve homojenizatör yardımıyla parçalanmıştır. Önerildiği şekilde birkaç darbe sonrası işlem durdurulmuştur.
4. Doku +4°C’ de 1000xg’ de 3 dk santrifüj edilmiş ve üst faz dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
5. Pelet 800µL BSA/Reajan A solüsyonunda süspanse edilmiştir.
6. Ortalama hızda 5sn vortekslenildikten sonra 2 dk buzda inkübe edilmiştir.
7. 10µL mitokondri izolasyon Reajan B eklenmiştir ve maksimum hızda 5sn vortekslenmiştir.
8. 800µL Reajan C eklenerek vortekslenmeden birkaç kez alt üst edilmiştir.
9. Örnek +4°C’ de 700xg’ de 10dk santrifüj edilmiş ve üst faz dikkatlice yeni bir tüpe aktarılmıştır, pelet uzaklaştırılmıştır.
10. Süpernatant +4 °C’ de 12000xg’ de 15 dk santrifüj edilmiştir.

11. Sitozolik fraksiyonu içermesi beklenen süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır ve DNA barkodlama uygulamaları için bu fraksiyondan DNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir.
12. Mitokondriyal fraksiyonu içerdiği varsayılan pelet üzerine 500 µL yıkama tamponu eklenmiş ve peletin yüzeyi muhtemel kontaminasyonlardan uzaklaştırılması amacıyla yıkanmıştır.
13. Tüp +4 °C’ de 12000xg’ de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
14. Elde edilen mitokondriyal pelet, 1mL RNAlater’da RNA ve miRNA izolasyonu uygulamalarında kullanılabilecek şekilde saklanmıştır.

2.2.2. Mitokondriyal RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) kullanılmıştır. İzolasyon öncesinde, RNA izolasyonunda kullanılacak laboratuvar ekipmanları otoklavlanıp, UV Crosslinker’ da sterilize edilmiştir. Sterilize edilen ekipman ayrıca DEPC (dietilpirokarbonat) içeren suyla yıkanmış ve olası RNaz kontaminasyonunun engellenmesi amaçlanmıştır. Mitokondriyal peletten 100 µL başlangıç materyali olarak kullanılmıştır ve aşağıda belirtilen protokol uygulanmıştır:

1. RNA içermeyen pipet uçları kullanılarak örnek üzerine 2-merkaptoetanol ile hazırlanmış Lizis tamponundan 300µL hacimde eklenmiştir.
2. Oda sıcaklığında 2600xg’ de 5 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir.
3. Süpernatant temiz bir RNaz içermeyen tüpe aktarılmıştır.
4. Doku homojenatına %70 etanolden bir hacim eklenmiştir.
5. Etanol ekledikten sonra oluşabilen herhangi bir gözle görülür çökeltiyi gidermek için karışım iyice karıştırılmıştır.
6. Spin kolona 700µl örnek aktarılmıştır.
7. Oda sıcaklığında 12000xg’ de 15 sn santrifüj gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpü boşaltılıp aynı toplama tüpü spin kolona yeniden yerleştirilmiştir.
8. Bütün lizat hacmi işleme tabi tutulana kadar 7. ve 8. basamaklar tekrar edilmiştir.
9. 700µl Yıkama Tamponu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 12000 xg’ de 15 sn santrifüj gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpü atılıp spin kolona yeni bir toplama tüpü yerleştirilmiştir.

10. 500µl Yıkama Tamponu etanol ile birlikte eklenmiştir.
11. Oda sıcaklığında 12000xg' de 15 sn santrifüj gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpü boşaltılmış ve aynı toplama tüpleri spin kolona yeniden yerleştirilmiştir.
12. Bütün yıkama hacmi işleme tabi tutulana kadar 10. ve 11. basamaklar tekrar edilmiştir.
13. RNA ekli kuru membran oda sıcaklığında 12000xg' de 1dk santrifüj edilmiştir.
14. Akış geçişi atılıp geri dönüştürme tüpleri spin kolona yeniden yerleştirilmiştir.
15. Spin kolonun merkezine 30µl RNaz içermeyen su eklenmiştir.
16. Oda sıcaklığında 1dk inkübasyona bırakılmış ve sonrasında oda sıcaklığında ≥ 12000 xg' de 2 dk santrifüj edilip RNA izolatu elde edilmiştir.
17. Saflaştırılmış RNA'nın kantitesi NanoDrop (Maestrogen, Inc., Las Vegas, NV, U.S.A.) ve Qubit ile analiz edilmiştir.

Uygulama sonrasında, mitokondriyal RNA izolatından kısa RNA' ların (özellikle 200 nt' den daha kısa olanların) saflaştırılması amaçlanmıştır. Bunun için, 10µg total mitokondriyal RNA 8M üre içeren %15 akrilamit: bisakrilamit PAGE jeli uygun miRNA belirteçleri eşliğinde yüklenmiştir. Boyutu belirlenen fakat konsantrasyonu oldukça düşük olan miRNA' lar jelden kazanılamamıştır. miRNA' ların yüksek oranlarda kazanımı için fenol içerikli mirVana miRNA izolasyon kitine (Invitrogen) başvurulmuştur.

2.2.3. Mitokondriyal miRNA izolasyonu

Mitokondriyal RNA uygulamaları ile başlangıç doku miktarı optimize edilmesinin ardından, 100µL mitokondriyal peletlerden başlanarak mirVana kiti kullanılarak miRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

mirVana miRNA izolasyon kiti prosedürü

Bu prosedür, küçük skalalı RNA' ların izolasyonu için dizayn edilmiştir. Başlamadan önce dikkat edilmesi gerekenler:

- Elüsyon tamponunun çözme işlemi öncesinde 95 °C'ye ısıtılmalıdır.

- Alkol ekleme gerektiren yıkama solüsyonlarına alkol eklenip uygun yerler işaretlenmelidir.
- Saf etanolde oda sıcaklığına getirilmelidir.

- **Hücre lizisi ve doku parçalanması**

1. Mitokondriyal peletler, RNA laterdan uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine 400µL lizis/bağlanma tamponu eklenmiştir.
2. Vortekslenerek veya pipetajlanarak homojenat elde edilmiştir. Mekanik homojenizatörler RNA'ya zarar verdiğiinden kullanılmamıştır.

- **Organik ekstraksiyon**

1. Lizatın üzerine 1/10 hacimde “miRNA homojenat additive” solüsyonu eklenmiştir. Vorteklenmiş veya tüp birkaç kere alt üst edilerek iyice karıştırılmıştır.
 2. Karışım buz üzerinde 10 dk inkübe edilmiştir.
 3. 1. aşamadaki lizat hacmi kadar asidik-fenol: kloroform eklenmiştir. Bu aşamada asidik fenol: kloroformun alt kısmından alınmalıdır, üstteki sulu faz alınmamalıdır. Karıştırmak için 30-60 sn vortekslenmiştir.
1. Oda sıcaklığında 10000xg' de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası interfaz kompakt olmalıdır olmadığı durumlarda tekrar santrifüj edilmiştir.
 2. Üst faz hacmi ölçülerek yeni bir tüpe aktarılmıştır.

- **Kısa RNA' ların zenginleştirilmesi**

Bu yöntem geleneksel kolon filtresi kullanarak yapılan RNA saflaştırma yönteminin özellikle 200 bazdan küçük RNA' ların saflaştırılması için veriminin artırılması açısından farklılaştırılmıştır. Bu zenginleştirme ilkinde nispeten düşük alkol konsantrasyonlarıyla büyük RNA' ların immobilize edilmesiyle kısa RNA' ların büyük kısmının eldesini sağlamaktadır. Daha fazla etanolün eklenmesiyle de ikinci kolondan geçirilen kısa RNA' lar immobilize edilmektedir. İkinci filtre birkaç kez yıkandıktan sonra kısa RNA açısından zengin örnek çözdürülür.

1. Organik ekstraksiyondan elde edilen üst faza 1/3 hacminde oda sıcaklığındaki %100 etanol eklenmiştir ve birkaç kez alt üst edilmiştir.

2. Karışım kolona aktarılmış ve 10000xg' de 15 sn santrifüjlenmiştir. Filtre total RNA içermektedir. Sonraki RNA çalışmaları için filtre saklanabilir.
3. Filtrata 2/3 hacimde oda sıcaklığında %100 etanol eklenmiştir. Homojen olarak karışması sağlanarak birkaç kez alt üst edilmiştir.
4. Karışım yeni bir filtreye aktarılmıştır.
5. 10000xg' de 15 sn santrifüjlenmiştir, daha yüksek değerlerde santrifüjlemek filtreye zarar verebilir. Alternatif olarak vakumlanabilir.
6. Filtrat uzaklaştırılmış ve filtre aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
7. 700µL "miRNA yıkama solüsyonu 1" eklenmiştir. 10000xg' de 15 sn santrifüjlenmiştir. Filtrat uzaklaştırılmış ve filtre aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
8. 500µL "miRNA yıkama solüsyonu 2/3" eklenmiştir. 10000xg' de 15sn santrifüjlenmiştir. Filtrat uzaklaştırılmış ve filtre aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Bu aşama bir kez daha tekrarlanmıştır.
9. Boş kolon 1 dk kalıntılardan uzaklaştırmak amacıyla santrifüjlenmiştir.
10. Filtre yeni bir toplama tüpüne alınmış ve önceden 95 °C' ye ısıtılmış 30µL elüsyon tamponunda üç seferde filtrenin merkezine aktarılmıştır. Maksimum hızda 20-30 sn santrifüjlenerek RNA geri kazanılmış ve -80 °C saklanmaktadır.

Elde edilen izolatların tamamı dizileme reaksiyonu için DEPC ile muamele edilmiş 0.1 hacim 3M NaOAc (pH 5.5) ve 2 hacim etanol ile süspanse edilmiştir.

2.3. Total miRNA izolasyonu

Elde edilen mitokondriyal miRNA' ların dizileme için gereken konsantrasyonlarda olmaması ve çekirdek DNA' sından sentezlenip mitokondri içerisinde fonksiyonel olan/ olabilecek miRNA' ların da yakalanması amacıyla total bireyden başlanarak da, yukarıda bahsedilen protokoller uygulanarak RNA izolasyonu ve sonrasında bu izolattan kit ile miRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Karışımın 2/3` ü mitokondriyal miRNA olacak şekilde bir miRNA havuzu oluşturulmuş ve dizilemeye gönderilmiştir.

2.4. Dizileme uygulamaları

Dizileme reaksiyonları her bir örnek için 40 milyon okuma elde edilecek şekilde HiSeq2500 50 baz tek zincirli okuma platformunda gerçekleştirilmiştir. İzole edilen

miRNA örneklerinin dizileme reaksiyonları, MacroGen Inc. (Korea) firmasına hizmet alımı kapsamında yaptırılmıştır. Burada analizler dört temel basamakta gerçekleştirilmiştir:

1. QC analizleri,
2. Kütüphane hazırlama,
3. Kütüphane örneklerinin QC analizleri
4. Dizileme.

QC analizleri sonucunda, hem büyüklük hem de konsantrasyon ve saflık değerleri açısından dizilemeye uygun örneklerden “TruSeq Small RNA Library Prep Kit” kiti ve “TruSeq Small RNA Library Prep Guide, Part # 15004197 Rev.G” protokolü kullanılarak kütüphane hazırlanmıştır. Kütüphane hazırlanması protokolünün temeli aşağıdaki gibidir:

Dizileme adaptörleri RNA moleküllerine bağlanır, bu adaptörler ters transkripsiyon ve PCR amplifikasyonu sürecinde primer bağlanma bölgesi olarak görevlidir. Adenillenmiş ssDNA 3' adaptörü ve sonrasında da 5' adaptörü kısa RNA'ya T4 RNA ligaz 2 gibi bağlayıcı enzimler kullanılarak bağlanır. Adaptörler, mikro RNA'nın karakteristik özelliği olan 5' fosfat grupları sayesinde smallRNA'ları yakalayabilecek özellikte tasarlanmıştır. Böylece 5' uçlarında hidroksil grubu bulunan degrade RNA fragmanlarının bağlanması engellenir. Adaptör eklenmiş miRNA fragmanları, sonrasında dizileme reaksiyonlarında kullanılacak cDNA fragmanlarına dönüştürülür. cDNA havuzu PCR uygulamalarıyla çoğaltılır. Amplifiye edilmiş cDNA fragmanları agaroz jelde yürütülür ve miRNA fragmanları olarak elde edilmesi beklenen bant büyüklüğüne sahip ürünler jelden geri kazanılır. Kütüphane büyüklüğünün 145 ila 160 baz arasında değiştiği göz önünde bulundurulmaktadır. Sonrasında adaptör eklenmiş diziler tekrardan QC analizlerinde değerlendirilmiş ve dizileme reaksiyonuna geçilmiştir.

miRNA dizileme reaksiyonları, hizmet alımı kapsamında MacroGen Inc. (Korea) firmasına yaptırılmıştır. Dizileme, okuma uzunluğu prosedürüyle, *HiSeq 2500 System User Guide Document # 15035786 v02HCS 2.2.70* protokolü takip edilerek HiSeq 2500 platformunda yaptırılmıştır.

2.5. Biyoinformatik analizler

Dizileme sonrası, ham dizileme verileri kalitelerine bağlı olarak filtrelendi. Adaptör diziler (RNA adaptör RA5 5' *GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC*, RNA adaptör RA3 5' *TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG*) de ham dizilerden uzaklaştırılarak ham dizileme verileri elde edilmiştir. Budanmış okumalar, özgün kümeler oluşturacak şekilde birleştirilmiştir. Bu kümeler, hem dizi uzunluğu hem de dizi benzerliği açısından %100 benzerlik sergileyen okumaları içermektedir. Özgün kümelerde bulunan okumalar, bilinen miRNA' ları sınıflandırmak amacıyla tüm türlerde miRBase v21 (Kozomara vd., 2019) ile hizalanmıştır. Her bir miRNA için okuma sayıları, haritalanmış miRNA' lardan çıkarsanmıştır. Buradaki amaç, her bir miRNA'nın miktarını belirleyebilmektir.

miRNA analizinin bileşenleri aşağıda belirtilen dört temel içeriğe ayrılmaktadır:

1. miRNA ifadenme miktarının belirlenmesi
2. Diferansiyel ifadenmeye sahip miRNA' ların filtrelenmesi
3. Bilinen ve/veya yeni miRNA' ların tahmini
4. smRNA kategorilerinin sınıflandırılması

2.5.1. Ham veri analizleri

Elde edilen ham veriden, bazların toplam sayısı, okumaların toplam sayısı, %GC oranı ve kalite değerleri üretilmiştir. Bazların toplam sayısı, okuma uzunluğu ve total okuma sayısının çarpımına eşittir. Üretilen ham verinin kalitesi her döngüden üretilen phred kalite skorları ile belirlenmiştir. Bu skor, baz çağırma hata olasılıkları ile ilişkili olarak tanımlanmış ve dizilemenin gerçekleştirildiği cihaz tarafından üretilen logaritmik bir orandır. Phred kalite skoru 20 ifadesi (Q20) %99 doğruluğa işaret etmektedir ve ortalama 100 baz uzunluğundaki bir okuma için 1 bazın yanlış okunduğu varsayılmaktadır. Phred kalite skoru 30 ifadesi (Q30) %99.9 doğruluğa ve neredeyse hatasız bir okuma olduğuna işaret etmektedir. Ortalama 1000 baz uzunluğundaki bir okuma için 1 bazın yanlış okunma olasılığı bulunmaktadır. Okuma kalitesinin Q30'a ulaşması, yeni nesil dizileme sistemleri için beklenen ve kabul gören önemli bir kalite belirtecidir.

2.5.2. Budanmış veri analizleri

Okumalar 5' dizileme adaptörünün ilk bazından başlamakta ve genellikle Illumina tabanlı dizilemede 51 baz sonrasında sonlanmaktadır (51 baz SE (single-end: tek taraflı) dizileme yapıldığı durumlarda). Olgun miRNA' ların büyüklüğü 25 baz' a kadar olabildiğinden, okumalar uzaklaştırılması gereken 3' adaptör dizisinin de bir kısmını içermektedir.

Dizilenen okumalar budanmış okumalar, adaptör-olmayan okumalar, kısa okumalar ve düşük kaliteli okumalar olarak sınıflandırılmaktadır. Okumalarda bulunan adaptör dizilerinin uzaklaştırılması Cutadapt programı (Martin, 2011) kullanılarak yapılmıştır. Eğer okuma 3' adaptör dizisinin en az 5 bazıyla eşleşiyorsa, ilgili kısım adaptör dizi olarak kabul edilmiş ve okumalardan budanmıştır. Budanmış okumaların analiz açısından güvenilir olarak değerlendirilmesi için en az 18 baz uzunluğunda olmalıdır. Sonrasında, her bir okumanın 3' ucu kalite açısından Cutadapt programında -q10 öncülü kullanılarak budanmıştır. Ek olarak, budanmış veya adaptör olmayan fakat N nükleotidi içeren okumalar düşük kaliteli okumalar olarak kabul edilmiş ve değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Dört okuma tipinin tanımı aşağıdaki gibidir.

1. *Budanmış okumalar:* adaptör dizileri uzaklaştırılmış okumalar
2. *Adaptör olmayan okumalar:* adaptör dizi içermeyen okumalar
3. *Kısa okumalar:* adaptör budaması sonrasında ortalama 17 baz okuma uzunluğuna sahip okumalar
4. *Düşük kaliteli okumalar:* budanmış veya adaptör olmayan okumalarda bir veya daha fazla N bazı içeren okumalar

Kısa hedef dizi (<50 baz) analizi durumunda, budanmış okumalar işlenmiş okumalar olarak kullanılmıştır. Diğer durumlarda, uzun hedef dizi (≥50 baz) analizi durumunda, hem budanmış okumalar hem de adaptör olmayan okumalar işlenmiş okumalar olarak kullanılmıştır.

2.5.3. Olgun miRNA analizleri

2.5.3.1. Bilinen olgun miRNA analizleri

Öncelikle olgun miRNA miktarları belirlenmiştir. Miktar tayini aşaması üç prosedüre ayrılmaktadır. İlk olarak, ilgili türün olgun miRNA dizileri öncül miRNA dizileri ile miRBase v21’de (Kozomara ve Griffiths-Jones, 2011) Bowtie hizalayıcı (Langmead ve Salzberg, 2012) kullanılarak default ayarları ile (bowtie opsiyonu: -f -v 0 -a -best -strata -norc priorleri ile) hizalanmıştır. İkinci adımda, özgün kümelenmiş okumalar öncül dizi ile (bowtie opsiyonu: -f -v 1 -a -best -strata -norc priorleri ile) hizalanmıştır. Sonrasında her bir miRNA referans organizmaların bilinen miRNA’ larıyla karşılaştırılmıştır. Üçüncü adımda, haritalanmış iki sonuç arasında üstüste gelen olgun miRNA bölgeleri belirlenmiştir. Sonrasında, olgun miRNA’ ların okuma sayısı üstüste gelen bölgelerden miRDeep2 (Friedländer vd., 2012) Quantifier modülü kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Eğer bir okuma çok sayıda olgun miRNA içerisinde haritalanıyorsa, okuma sayısının her bir olgun miRNA’nın ekspresyon düzeyiyle eşit olduğu kabul edilmiştir. Haritalanmış okumalar için Hexapoda grubu miRBase verisi mevcut türler ve beş temel model organizma referans olarak kullanılmıştır: *Homo sapiens* (insan), *Danio rerio* (zebra balığı), *Drosophila melanogaster* (meyve sineği), *Caenorhabditis elegans* (iplik kurdu) ve *Arabidopsis thaliana* (farekulağı teresi).

Haritalanmış miRNA’ lar ve okuma sayıları kullanılarak literatürde daha önce saptanmış mitomiR’ ler tespit edilmiş ve listelenmiştir. Bununla birlikte, her iki türde de yüksek okuma sayılarında temsil edilen miRNA’ lar da belirlenmiş ve olası fonksiyonları *in siliko* yaklaşımlar ile araştırılmıştır.

2.5.3.2. Yeni olgun miRNA analizleri

L. saccharina ve *S. parreyssi* türleri için miRBase veritabanında (Griffiths-Jones vd., 2008) mevcut en yakın akraba türler olan sırasıyla *Locusta migratoria* (Orthoptera: Caelifera) (LocustGenomeV1) ve *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Apocrita)

(Nvit_2.1) referans genom verileri kullanılarak, yeni miRNA' ların tanımlanması için biyoinformatik analizlere başvurulmuştur.

Bunun için öncelikle kısa RNA kompozisyonları belirlenmiştir. Her bir örnek için, işlenmiş son okumalar, tRNA ve rRNA gibi RNA tiplerini sınıflandırmak için referans genomla ve kodlama-yapmayan RNA veritabanında (RNAcentral release 10.0) (Petrov vd., 2017) taranmıştır. Genom haritalama Bowtie paket yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yeni miRNA dizileri miRDeep2 RNAcentral (Petrov vd., 2017) ile eşleşen diğer smRNA' lar Bowtie (hedef smRNA < 50 nt) ve Bowtie2 (Langmead vd., 2009) (hedef smRNA ≥ 50nt) kullanılarak tahmin edilmiştir. “MirDeep Score” değeri sayısal olarak ne kadar büyükse RNA' nın miRNA olma olasılığı hesaplamalı olarak o derece fazladır. -10 ile 10 arasında değerler genel olarak yeni miRNA belirlenmesinde kabul görmektedir (Friedländer vd., 2012b). Doğruluğun artırılması açısından “cut-off” değeri 0 kabul edilmiş olup, bu değer üzerindeki skorlara sahip miRNA' lar yeni potansiyel miRNA olarak sonraki analizlere tabi tutulmuştur.

Yeni miRNA' ların tahmini için, kümelenmiş okumalar referans genomla hizalanmıştır. Yeni miRNA' lar miRDeep2 içerisinde RNAfold (Lorenz vd., 2011) algoritması kullanılarak; olgun (mature), star ve loop dizileri belirlenerek tahmin edilmiştir. RNAfold algoritmasında, en yakın komşu (nearest-neighbour) termodinamik modeli kullanılarak minimum serbest enerjiye sahip sekonder yapıyı kazanan RNA dizisi tahmin edilmektedir. Yeni miRNA' ların tanımlanmasında miRDeep2 kullanılmasının bir diğer nedeni ise miRNA oranlarının da belirlenebilmesine olanak tanımasıdır.

Ayrıca, her bir örnek için kısa RNA ekspresyon kantitesini belirlemek için RNAcentral 10.0 DB veritabanı (Petrov vd., 2017) kullanılmıştır. İşlenmiş ve son haline getirilmiş okumalar, 50 nt' den küçük piRNA gibi kısa RNA' lar ile Bowtie'de “-f -l 15 --norc -v1 -a” opsiyonu ile, 50 nt'den büyük tRNA, snoRNA gibi kısa RNA' lar ile bowtie2' de “-f -L 15 --norc -a” opsiyonu ile DB ile hizalanmıştır. İlgili RNA ile %90 veya daha fazla kapsama sahip sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

2.5.3.3. Yeni miRNA' ların üçüncül yapılarının çizilmesi

Yukarıdaki parametreler kullanılarak tanımlanan tüm yeni miRNA'ların üçüncül yapıları tahmin edilmiştir. Precursor miRNA dizisinin kararlı bir katlanmaya ve olgun miRNA dizisine dönüşebilecek uygun heliks yapısına sahip olup olmadığının anlaşılması için üçüncül yapıların tahminine ihtiyaç duyulmuştur. Üç boyutlu yapıların tahmini için öncelikle miRNA'ların birincil ve ikincil dizileri RNAComposer v1.0 programına yüklenmiş ve .pdb uzantılı üç boyutlu yapı dosyaları oluşturulmuştur (<http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>) (Popenda vd., 2012; Antczak vd., 2016; Biesiada vd., 2016). Sonrasında, bu dosyalar kullanılarak elde edilen üç boyutlu yapılar PyMOL v2.0 programı ile görselleştirilmiştir (DeLano, 2002).

2.5.4. Yeni miRNA' lar üzerine yapılan ileri mitokondriyal tanımlamalar

Mitokondriden köken alan veya mitokondriye hedeflenen yeni miRNA dizilerinin tanımlanabilmesi için, her bir türü temsil eden veya en yakın akrabasını temsil eden mitogenom dizisi kullanılmıştır. Bunun için, *S. parreyssi* türü KX907847 NCBI erişim numaralı kısmi mitogenomu ve *L. saccharina* türü NC_047445 NCBI erişim numaralı total mitogenomu referans olarak kullanılmıştır.

2.5.4.1. Geneious programı ile referans mitogenom üzerine eşleştirme

Mitokondriden köken alan veya mitokondriye hedeflenen miRNA' ların saptanması için öncül ve olgun miRNA dizileri referans mitogenomlar kullanılarak hizalanmaya çalışılmıştır. Bunun için, işlenmiş ve olgun miRNA dizileri Geneious v9 programında (Kearse vd., 2012) “map to reference” opsiyonu kullanılarak hizalanmıştır. Hizalamaların yönelimine bağlı olarak ileri yönelimli olanların mitokondriden köken aldığı, geri yönelimli olanların ise mitokondriye hedeflendiği veya mitokondrinin antisense zincirinden köken aldığı varsayılmıştır.

2.5.4.2. RNAhybrid programı ile mitokondriye hedeflenen miRNA' ların saptaması

Minimum serbest enerji değerine (MFE) sahip miRNA ve hedef dizi hibridizasyonunun hesaplanabilmesi için RNAhybrid programı (Rehmsmeier vd., 2004) default ayarlarıyla kullanılmıştır. Program çıktısından minimum enerji değeri - 20 kcal/mol' den küçük olanlar değerlendirmeye alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Örneklerin teşhisi

Morfolojik teşhisleri danışman hocam E. Mahir KORKMAZ tarafından yapılan türlerin moleküler teşhisleri *cox1* barkod bölgesi ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre her bir örnekten *cox1* ampliconu elde edilmiş ve standart Sanger dizileme ile dizilenmiştir. Diziler işlendikten sonra BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ve BOLD system v.4 (<http://www.boldsystems.org>) veritabanlarında kontrol edilmiştir ve tür isimleri tanımlanmıştır. Buna göre, *Syrista parreyssi* ve *Lepisma saccharina* türünün morfolojik teşhisi doğrulanmıştır.

3.2. Mitokondriyal miRNA uygulamaları

3.2.1. Mitokondri izolasyonu

Manuel mitokondri izolasyonu protokolü izlenerek gerçekleştirilen izolasyonda, mitokondriyal fraksiyonda beklenmeyen çekirdek ITS2 amplifikasyonunun gerçekleştirilmesinin ardından kit ile mitokondri izole edilmesine karar verilmiştir. Kit ile mitokondri izolasyonu sonrasında beklenildiği şekilde *cox1* (pozitif) ve *ITS2* (negatif) amplifikasyon ürünlerinin elde edilmesi sonucunda diğer örnekler için de bu yöntem ile devam edilmesine karar verilmiştir. Fakat başlangıç dokusuna karar verebilmek için *S. parreyssi* türünde konsantrasyon gradiyent uygulamasına gidilmiştir. Başlangıç olarak 70, 100, 200 ve 270 mg doku kullanılarak gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonucunda, özellikle en yüksek saflık oranı (A260/A280 değerinin 2' ye en yakın olduğu) 200 mg doku ile gerçekleştirilen aşamada sağlanmıştır (A260/A280= 2,097). Ancak, en yüksek konsantrasyon ise 270 mg doku kullanılan denemede elde edilmiştir (726,82 ng/μL). Bu doğrultuda 200-270 mg arasında bir doku miktarı ile uygulamaların yürütülmesinin daha sağlıklı olacağı planlanmıştır. Ayrıca RNA izolatlarının uygun markerlar eşliğinde agaroz jelde koşturulması sonucunda da 270 mg başlangıç dokusunda mRNA ve 28S rRNA bantları gözlemlenmiştir. Bu nedenle, 200-270 mg aralığında ve 270 mg' a yakın bir değer olan 250 mg ile devam edilmesine karar verilmiştir. Optimizasyon sonrasında *S. parreyssi* örneğinden 250 mg total birey (abdomen, bacak ve toraks kısımları kullanılırken, kafa ve kanat kısımları ise kullanılmamıştır), *L. saccharina* türüne ait

total bir bireyden 240 mg başlangıç dokusu alınarak yüksek yoğunlukta mitokondriyal peletler elde edilmiştir. Bu örneklerle de *S. parreyssi* türünde olduğu gibi *cox1* ve *ITS2* denemeleri kontrollü olarak yapılmış ve herhangi bir problemle karşılaşılmamıştır. Bu şekilde ilgili türlere ait mitokondriyal peletler elde edildikten sonra, her bir mitokondriyal peletten mitokondriyal RNA izolasyonu uygulamasına geçilmiştir.

3.2.2. Mitokondriyal RNA izolasyonu

Mitokondriyal peletten saflaştırılmış RNA'nın kantitesi NanoDrop (Maestrogen, Inc., Las Vegas, NV, U.S.A.) ve Qubit ile analiz edilmiştir. Fakat, kalitatif olarak poliakrilamit jele yüklenmesi sonucunda miRNA' lar jelden dizileme için elzem olan 1µg konsantrasyonda saflaştırılamamıştır. Bu nedenle de mitokondriyal peletten doğrudan miRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Mitokondriyal miRNA izolasyonu

Kit ile gerçekleştirilen miRNA izolasyonu sonucunda, *S. parreyssi* örneğinden 11 ng/ µL konsantrasyonda mitokondriyal miRNA lizatu ekstrete edilmiştir. A260/A280 değeri 2,142 olup RNA izolatları için beklenen optimum değer üzerinde bulunmuştur (Çizelge 3.1). Örnekte RNA kalitesine işaret eden RIN değeri (RNA integrity number) ise 4,2 olarak ölçülmüştür. *L. saccharina* örneğinden ise, daha düşük hacimde ancak daha yüksek konsantrasyonda (17 ng/ µL) miRNA lizatu elde edilmiştir (Çizelge 3.1). Buna rağmen, RNA saflık derecesi (1,464) ve RIN değeri (4,5) beklenenden düşük ölçülmüştür.

Çizelge 3.1 miRNA örneklerinin izolasyon ve izolatlarının konsantrasyon ve saflık

Örnek	Başlangıç mitokondri miktarı (µL)	Elüsyon hacmi (µL)	Konsantrasyon	A260/A280	A260/A230	RIN değeri (RNA integrity number)
<i>S. parreyssi</i>	70	130	11 ng/µL	2.142	0.323	4.2
<i>L. saccharina</i>	20	80	17 ng/µL	1.464	0.210	4.5

3.3. Total miRNA izolasyonu

miRNA izolatlarının dizileme reaksiyonlarında kalite kontrolden (QC) geçebilmesi için elzem olan ve izolatlarındaki RNA degradasyon düzeyi hakkında bilgi verici olan RIN-IQ (RNA integrity number) değerinin minimum değer olan 7' den küçük olması (*S. parreyssi* ve *L. saccharina* için sırasıyla 4,2 ve 4,5) nedeniyle total dokudan miRNA izolasyonu da gerçekleştirilmiştir. Mitokondriden izolasyon prosedüründe çok fazla saflaştırma ve dolayısıyla da kayıp aşamasının bulunması ve organizma sayısının sınırlı olması nedeniyle bu yola başvurulmuştur. Bununla birlikte çekirdek DNA'sından sentezlenip mitokondri içerisinde fonksiyonel olan/olabilecek miRNA'ların da yakalanması amacıyla total organizmal doku kullanılmıştır. Karışımın 2/3' ü mitokondriyal miRNA olacak şekilde bir miRNA havuzu oluşturulmuş ve dizilemeye gönderilmiştir.

3.4. Dizileme uygulamaları

Dizileme reaksiyonlarının başlatılabilmesi için kuru buz ile MacroGen Inc. (Korea) firmasına gönderilen miRNA havuzları QC analizlerine tabii tutulmuştur. QC analizleri sonucunda *S. parreyssi* ve *L. saccharina* türleri için sırasıyla 28,386 ve 44,641 µg RNA içerdiğinin ve RIN değerinin her iki örnek için de 7'nin üzerinde olduğunun (sırasıyla 7.4 ve 7.9) saptanması sonrasında kütüphane hazırlama aşamasına geçilmiş ve kütüphane verisi QC analizleriyle dizileme uygunluğu açısından değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2). QC analizleri sonucunda, *S. parreyssi* ve *L. saccharina* örnekleri için sırasıyla 48,44 ve 67,03 nM konsantrasyona sahip yaklaşık 150 bp büyüklüğünde diziler içeren kütüphanelerin elde edilebildiği belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Bu değerler, dizileme aşamasına geçilebilmesi için uygun değerler olduğundan uygulamanın dizileme aşamasına geçilmesine onay verilmiştir.

Çizelge 3.2 Örneklerin QC ölçüm sonuçları

Örnek adı	Konsantrasyon (ng/µL)	Son hacim (µL)	Total miktar (µg)	RIN değeri (RNA integrity number)
<i>S. parreyssi</i>	915.675	31	28.386	7.4
<i>L. saccharina</i>	1312.968	34	44.641	7.9

Örnek adı	Konsantrasyon (ng/μL)	Konsantrasyon (nM)	Büyüklik (baz)	
<i>S. parreyssi</i> kütüphane	4.56	48.44	145	
<i>L. saccharina</i> kütüphane	6.1	67.03	140	

3.4.1. Ham veri analizleri

Okumaların toplam baz uzunluğu, okumaların toplam sayısı, %GC içeriği, %Q20 değeri ve %Q30 değeri *S. parreyssi* ve *L. saccharina* türleri için hesaplanmıştır. *S. parreyssi* türünde; 78,160,663 okuma üretilmiştir ve total okuma uzunluğu 3,9 Gb' dir. %GC içeriği 55.89 ve Q20, Q30 değerleri ise sırasıyla %98.96 ve değeri %97.87' olarak hesaplanmıştır. *L. saccharina* türünde; 74,006,184 okuma üretilmiştir ve total okuma uzunluğu 3. Gb'dir. %GC içeriği 52.67 olup Q20 değeri %98.90 ve Q30 değeri %97.82 bulunmuştur.

3.4.2. Budanmış veri analizleri

Dizilenen okumalar; budanmış okumalar, adaptör-olmayan okumalar, kısa okumalar ve düşük kaliteli okumalar olarak sınıflandırılmıştır. miRNA' ların ortalama uzunluklarının 22 baz olması ve büyüklük aralığının minimum 18 baz olması nedeniyle, budanmış okumaların 18 bazdan büyük olanları güvenilir olarak değerlendirilmiştir. Bu analizde miRNA profillerinin saptanabilmesi için kısa hedefler analiz edilmiştir. Bu kapsamda, *S. parreyssi* türünde, toplamda 78,160,663 okuma üretilmiştir (Çizelge 3.3). Bu okumaların 63,244,427 tanesi adaptör içeren ve budama sonrası uzunluğu ≥ 18 baz olan okumaları içerir. 2,888,620 okuma ise adaptör içermemektedir ve 11.967.534 okuma, adaptör budama işlemi sonrasında 18 bazdan küçük olarak bulunmuştur. *L. saccharina* türünde toplamda 74,006,184 okuma üretilmiştir (Çizelge 3.3). Bu okumaların 44,087,806 tanesi adaptör içeren ve budama sonrası uzunluğu ≥ 18 baz olan okumaları içerir. 436,507 okuma adaptör içermemekte iken, 29,442,363 okuma ise adaptör budama işlemi sonrasında 18 bazdan küçük olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.3 Budanmış verilerin okuma sürecinin özeti

Örnek	Total okuma sayısı	Budanmış okuma sayısı	Adaptör olmayan okuma sayısı	Kısa okuma sayısı	Düşük kaliteli okuma sayısı
<i>S. parreyssi</i>	78,160,663	63,244,427 (%80.92)	2,888,620 (%3.7)	11,967,534 (%15.31)	60,082 (%0.08)
<i>L.saccharina</i>	74,006,184	44,087,806 (%59.57)	436,507 (%0.59)	29,442,363 (%39.78)	39,508 (%0.05)

3.4.3. Olgun miRNA analizleri

3.4.3.1. Bilinen olgun miRNA analizleri

İstenmeyen kaynaklardan (bakteri, virüs, konak vs.) elde edilmiş dizilerin uzaklaştırılması ve okumaların budanması sonrasında *S. parreyssi* ve *L. saccharina* türlerinde sırayla 63,244,427 ve 44,087,806 adet okuma elde edilmiştir (Çizelge 3.4) ve bu okumalar işlenmiş okumalar olarak adlandırılmıştır. Bu okumalardan model organizmalara haritalamalar gerçekleştirilmiş ve haritalanan okuma sayıları belirlenmiştir. Buna göre, örneğin, *Drosophila melanogaster* türüne *S. parreyssi* türünün 1,393,868 ve *L. saccharina* türünün de 3,919,714 okuması haritalanabilmiştir. Çizelge 3.5 ise model organizmalar haricinde örneklemdeki türlerle aynı sınıf içerisinde yer alan diğer takımlara ait türlerin haritalama değerlerini göstermektedir.

Çizelge 3.4 miRBase veritabanında bulunan referansların olgun miRNA'larına haritalanmış okumalar

Örnek	İşlenen okumalar	hsa miRNA'sına haritalanmış okumalar	dre miRNA'sına haritalanmış okumalar	dme miRNA'sına haritalanmış okumalar	cel miRNA'sına haritalanmış okumalar	ath miRNA'sına haritalanmış okumalar
<i>S. parreyssi</i>	63,244,427	280,320	288,896	1,393,868	50,850	1,004
<i>L.saccharina</i>	44,087,806	1,299,524	1,322,522	3,919,714	238,646	537

Çizelge 3.5 Hexapoda grubu türleri ile gerçekleştirilmiş haritalama analizleri sonucu. Sıralama, haritalama değerleri en yüksekten en düşüğe gidecek şekilde verilmiştir.

Tür kodu	<i>Lepisa saccharina</i>	<i>Syrsta parreyssi</i>	Tür adı	Taksonomisi
ame	4,545,072	1,439,770	<i>Apis mellifera</i>	Hexapoda; Insecta; Hymenoptera
tca	4,366,057	1,420,909	<i>Tribolium castaneum</i>	Hexapoda; Insecta; Coleoptera
bmo	4,327,368	2,536,640	<i>Bombyx mori</i>	Hexapoda; Insecta; Lepidoptera
aae	4,281,514	1,401,044	<i>Aedes aegypti</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
cqu	4,024,149	1,380,200	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
mse	3,962,923	1,404,221	<i>Manduca sexta</i>	Hexapoda; Insecta; Lepidoptera
hme	3,948,069	1,361,494	<i>Heliconius melpomene</i>	Hexapoda; Insecta; Lepidoptera
dme	3,919,741	1,393,868	<i>Drosophila melanogaster</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
dvi	3,895,620	1,393,074	<i>Drosophila virilis</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
dgr	3,881,176	1,380,711	<i>Drosophila grimshawi</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
dan	3,881,161	1,380,747	<i>Drosophila ananassae</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
dse	3,881,160	1,380,751	<i>Drosophila sechellia</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
der	3,881,156	1,380,751	<i>Drosophila erecta</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
dmo	3,878,248	1,380,590	<i>Drosophila mojavensis</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
dya	3,872,008	1,379,172	<i>Drosophila yakuba</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
dwi	3,869,159	1,380,811	<i>Drosophila willistoni</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
nvi	3,801,279	1,407,058	<i>Nasonia vitripennis</i>	Hexapoda; Insecta; Hymenoptera
dps	3,733,860	1388075	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
dpe	3,695,732	1374801	<i>Drosophila persimilis</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
dsi	3,488,774	1,361,116	<i>Drosophila simulans</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
api	3,438,884	1,358,931	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Hexapoda; Insecta; Hemiptera
aga	3,002,010	1,374,320	<i>Anopheles gambiae</i>	Hexapoda; Insecta; Diptera
nlo	2,127,852	1,325,382	<i>Nasonia longicornis</i>	Hexapoda; Insecta; Hymenoptera
ngi	1,576,476	1,312,049	<i>Nasonia giraulti</i>	Hexapoda; Insecta; Hymenoptera

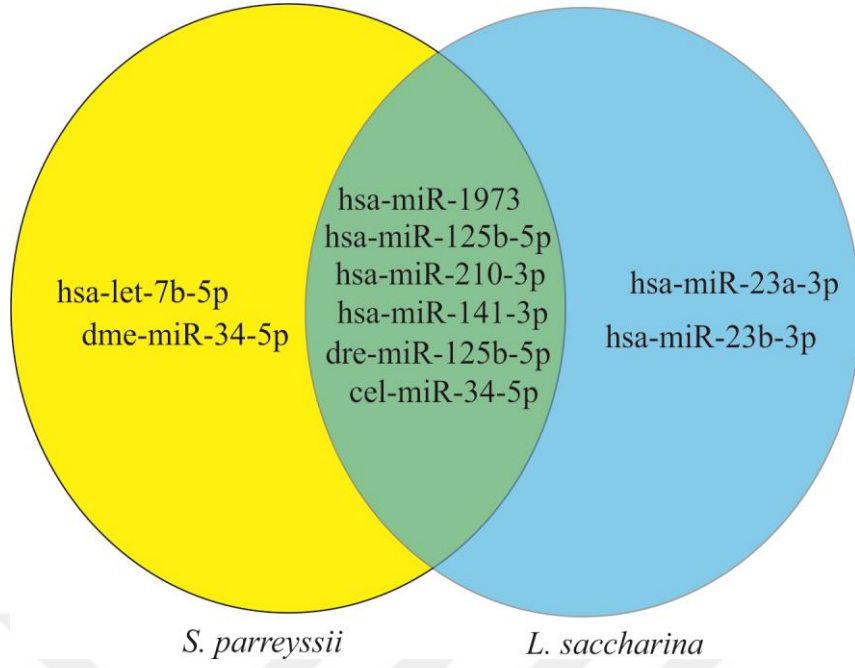
Model organizmalar üzerinden tanımlanan haritalanmış okumalarının saptanmasının ardından, bilinen miRNA içerikleri araştırılmıştır. Buna göre, *S. parreyssi* türü *D. melanogaster*'da tanımlanmış 466 miRNA'nın 70 tanesini (% 15.02) ve *L. saccharina* türü ise 92 tanesini (% 19.74) paylaşmaktadır (Çizelge 3.6). Buna karşın, *S. parreyssi* ve *L. saccharina* türleri, model organizmalar arasında en uzak akraba olduğu *A. thaliana* türüyle sırasıyla yalnızca sekiz ve 26 miRNA paylaşmaktadır. Ayrıca, *L. saccharina* ve *S. parreyssi* türlerinin bu beş model organizma miRNA'ları ile haritalanmış bilinen miRNA'ların detaylı listesi sırasıyla EK-1 ve EK-2' de verilmiştir.

Çizelge 3.6 Tanımlanmış bilinen olgun miRNA' lar

Örnek	örnekteki hsa miRNA sayısı	örnekteki dre miRNA sayısı	örnekteki dme miRNA sayısı	örnekteki cel miRNA sayısı	örnekteki ath miRNA sayısı
<i>L. saccharina</i>	96 / 2,588 (%3.71)	49 / 350 (%14.00)	92 / 466 (%19.74)	27 / 434 (%6.22)	26 / 427 (%6.09)
<i>S. parreyssi</i>	39 / 2,588 (%1.50)	29 / 350 (%8.28)	70 / 466 (%15.02)	14 / 434 (%3.22)	8 / 427 (%1.87)

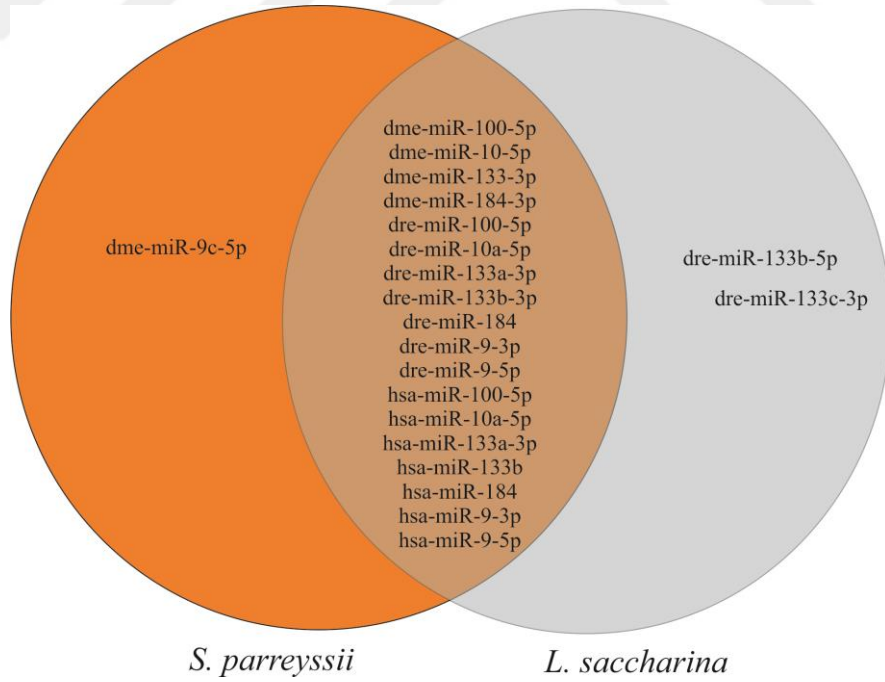
Literatürde nöroenez ile ilgili böceklerde tespit edilen miRNA' lar; miR-7, miR-8, miR9a, miR124, miR-310-313, bantam ve let-7' dir. *L. saccharina* ve *S. parreyssi* türlerinde miR-310-313 hariç, diğer miRNA' lar bulunmuştur. Böceklerde kas gelişimi ile ilişkili miRNA' lar; miR-1, miR-9a, iab-4' olup üçü de *L. saccharina* ve *S. parreyssi* türlerinde de bulunmuştur. Eşey hücre gelişimi ile ilişkili miRNA' lar; miR-184, miR-7, bantam, miR-278, miR-309' dur. Bunlardan miR-309 haricinde diğer miRNA' lar çalıştığımız iki türde de tespit edilmiştir. Kanat gelişiminde ve gelişimsel zamanlamada görev alan bantam ve let-7 her iki türde de tespit edilmiştir. Apoptozda görev alan miRNA' lar; miR-14, bantam, miR-2, miR-13, miR-278, miR-11' dir. Bu miRNA' ların tamamı her iki türde de tespit edilmiştir. Konak patojen etkileşiminde görevli miRNA' lar; miR-34, miR-1174, miR-1175, miR-309a-2, miR-2940' tır. Bunlardan miR-34 her iki türde de tespit edilmiştir. Konak-virüs etkileşimiyle ilişkili miRNA' lar; miR-8, let-7, miR-148a, miR-148b, miR-152' dir. Bunlardan miR-8 ve let-7' nin her iki türde de varlığı ve ifade edildiği saptanmıştır.

Model organizma miRNA' ları ile haritalanmış bilinen miRNA'ların mitomiR'ler açısından incelenmesi sonucunda miR-210, miR-1973, miR-34-5p ve miR-125b miRNA' larının *L. saccharina* ve *S. parreyssi* türlerinde de bulunduğu saptanmıştır (Şekil 3.1). Bununla birlikte let-7b miRNA'ları yalnızca *L. saccharina*' de; miR-23a ve miR-23b miRNA'ları ise yalnızca *S. parreyssi* türünde saptanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Örneklem dahilinde saptanan mitomiR' ler

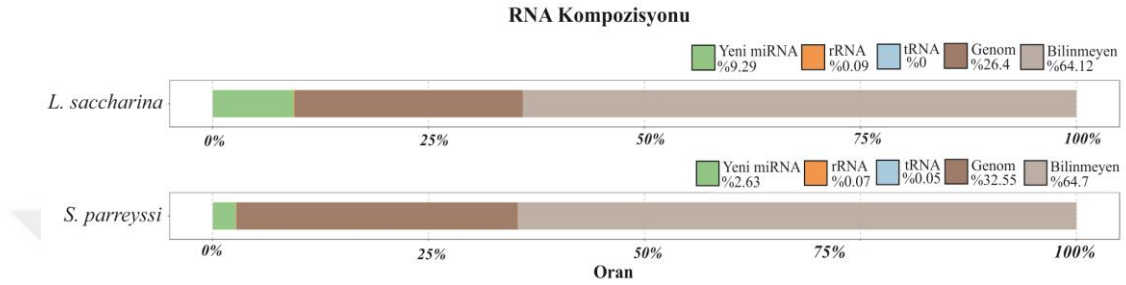
Diğer taraftan, beş model organizmada da okuma sayıları en yüksek olan miRNA' lar, miR-10a-5p, miR-100-5p, miR-184-3p, miR-9* (a/ b/ c/ d) ve miR-133* (a/ b/ c) miRNA' larıdır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Okuma sayıları yüksek olan bilinen miRNA' lar

3.4.3.2. Yeni miRNA analizleri

Dizileme verisinden, miRBase veritabanında bulunan ve *S. parreyssi* ile nispeten yakın akraba olan *Nasonia vitripennis* (Nvit_2.1) referans miRNA verisi kullanılarak örneklem türlerinin smRNA içeriği tanımlanmıştır. *S. parreyssi* ve *L. saccharina* türlerinde miRNA, rRNA, tRNA, snRNA ve snoRNA gibi smRNA aday tiplerinin oranlarını belirleyen smRNA kompozisyonunu Şekil 3.3’ te gösterilmiştir.



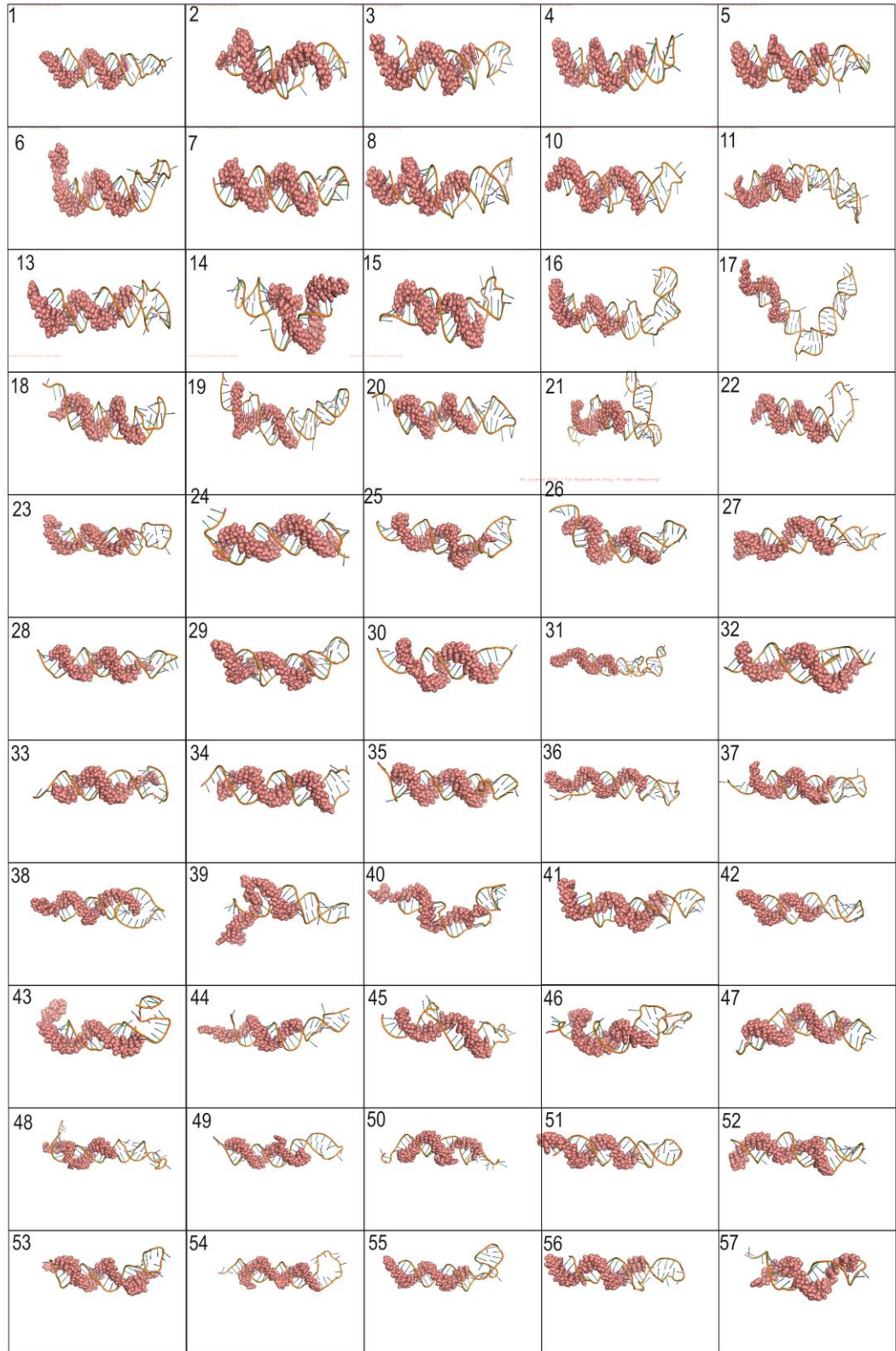
Şekil 3.3 *S. parreyssi* ve *L. saccharina* türleri small RNA kompozisyonunun özeti

Kümelenmiş okumaların referans genoma hizalanması sonucunda yeni miRNA’ lar tahmin edilebilmiştir. Bu yeni miRNA’ ların uygun miRNA sekonder yapı karakteristiklerine sahip olduğunun doğrulanması için RNAfold programı kullanılmıştır. Yeni miRNA’ lar için RNAfold tarafından üretilen grafik, hairpinin her bir kısmı için okuma sayılarını, minimum serbest enerji skorunu, randfold skorunu ve korunmuş dizi skorunu içeren *in siliko* ortamda katlanmış hairpin yapıyı vermektedir. Şekil 3.4’ te RNA fold tarafından yeni tanımlanmış bir miRNA için üretilmiş grafik verilmiştir.

L. saccharina türünde saptanan yeni miRNA'ların 92 tanesi sense zincirden kodlanırken, kalan 69 tanesi antisens zincirden kodlanmaktadır. miRNA okuma sayıları maksimum 1,015,993 (mature 52) ve minimum 7 (mature 72) olarak saptanırken, miRNA büyüklüklerinin 18 ila 25 baz arasında değiştiği belirlenmiştir (EK-3).

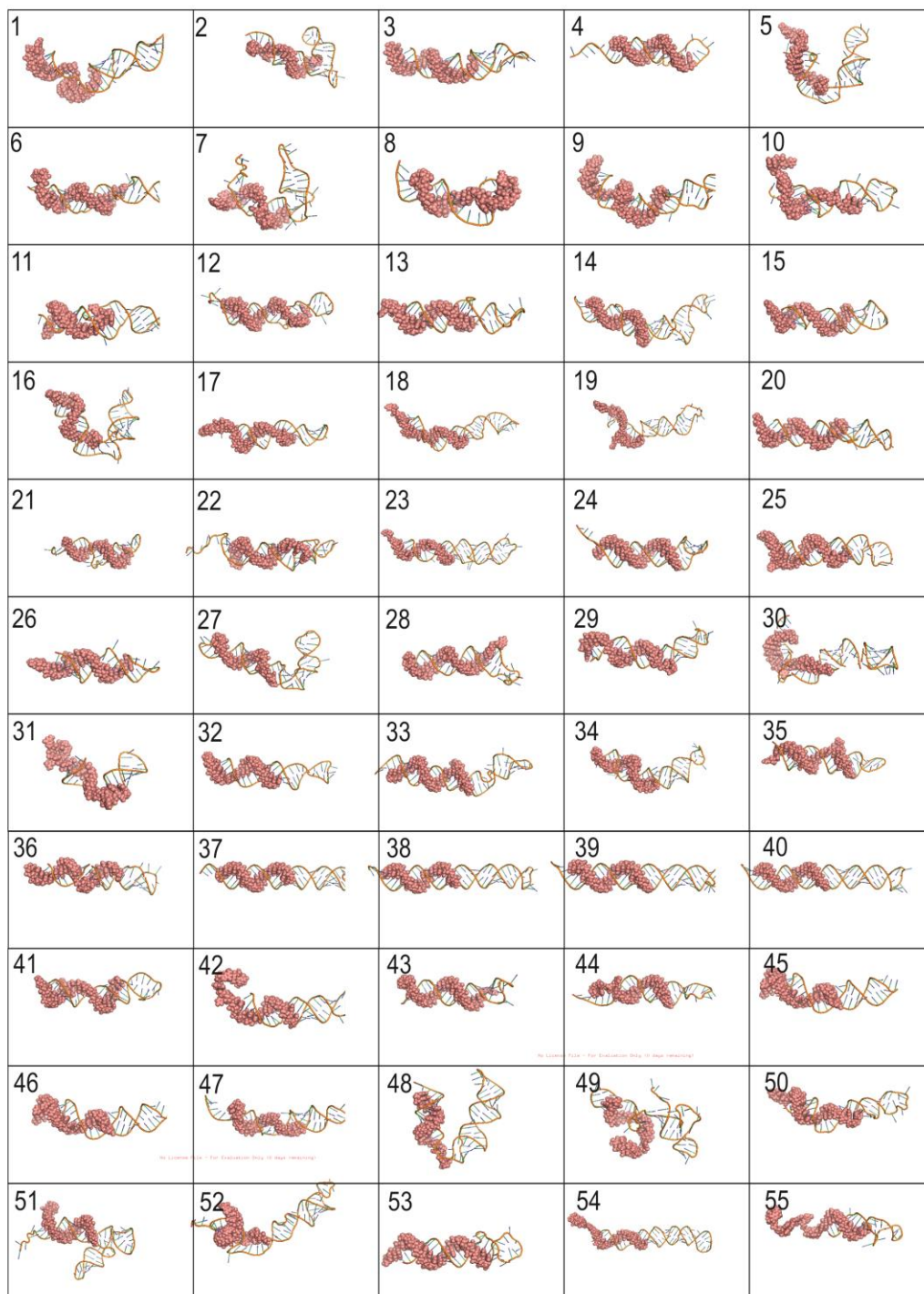
S. parreyssi türünde saptanan 81 yeni miRNA'nın 44 tanesi sense zincirden kodlanırken, kalan 37 tanesi antisens zincirden kodlanmaktadır. miRNA okuma sayıları maksimum 929,853 (mature 29) ve minimum 8 (mature 51) olarak saptanırken, miRNA büyüklüklerinin 18 ila 24 baz arasında değiştiği belirlenmiştir (EK-4).

RNA composer ve PyMOL programları kullanılarak elde edilen *S. parreyssi* üç boyutlu miRNA yapıları Şekil 3.5' de, *L. saccharina* üç boyutlu miRNA yapıları Şekil 3.6' da verilmiştir.

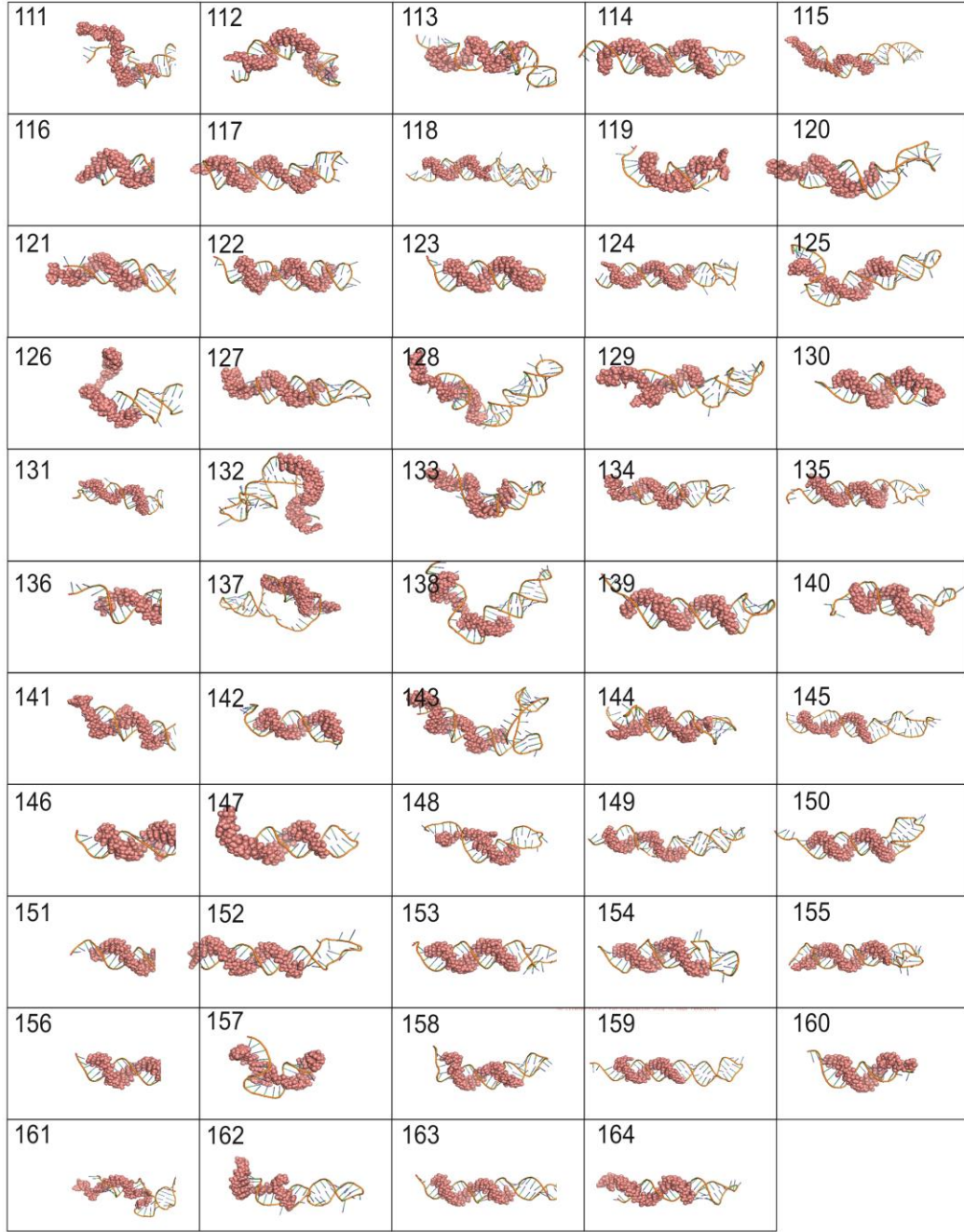


Şekil 3.5 *S. parreyssi* yeni miRNA'larının üç boyutlu yapıları (a) ve 58- 81 numaralı yeni miRNA'larının üç boyutlu yapıları (b)

58	59	60	61	62
63	64	65	66	67
68	69	70	71	72
73	74	75	76	77
78	79	80	81	



56	57	58	59	60
61	62	63	64	65
66	67	68	69	70
71	72	73	74	75
76	77	78	79	80
81	82	83	84	85
86	87	88	89	90
91	92	93	94	95
96	97	98	99	100
101	102	103	104	105
106	107	108	109	110



Şekil 3.6. *L. saccharina* türü yeni miRNA' larının üç boyutlu yapıları (a), 56-110 numaralı yeni miRNA' larının üç boyutlu yapıları (b) ve 111-164 numaralı yeni miRNA' larının üç boyutlu yapıları (c)

3.4.4. Yeni miRNA' lar üzerine yapılan mitokondriyal tanımlamalar

3.4.4.1. Geneious programı ile referans mitogenom üzerine eşleştirme

Mitokondriden köken alan veya mitokondriye hedeflenen miRNA' ların saptanması için öncül ve olgun miRNA dizileri referans mitogenomlar kullanılarak hizalanmaya çalışılmıştır. Hizalama sonucunda, *S. parreyssi* türü için saptanan dokuz miRNA'dan 1' i *cox1*, 2' si *cox2*, 1'i *nd5*, 1' i *nd4*, 1' i *nd6*, 1' i *nd1*, 1' i *rrnS* ve 1 tanesi de *trnM* geni ile hizalanmıştır. Bu miRNA'lar ve mitogenomdaki ilişkili bölgeleri Çizelge 3.8'de verilmiştir. Bunlardan *cox1*, *cox2*, *nd5* ve *nd6* genlerine hizalananlar antisens yönelimlidir. En yüksek okuma sayısına sahip olan mature_8 miRNA' sı *cox2* geni içerisinde sense hizalanmıştır.

Çizelge 3.8 *S. parreyssi* türünde yeni saptanan miRNA' ların mitogenoma hizalanması sonucunda elde edilen veriler.

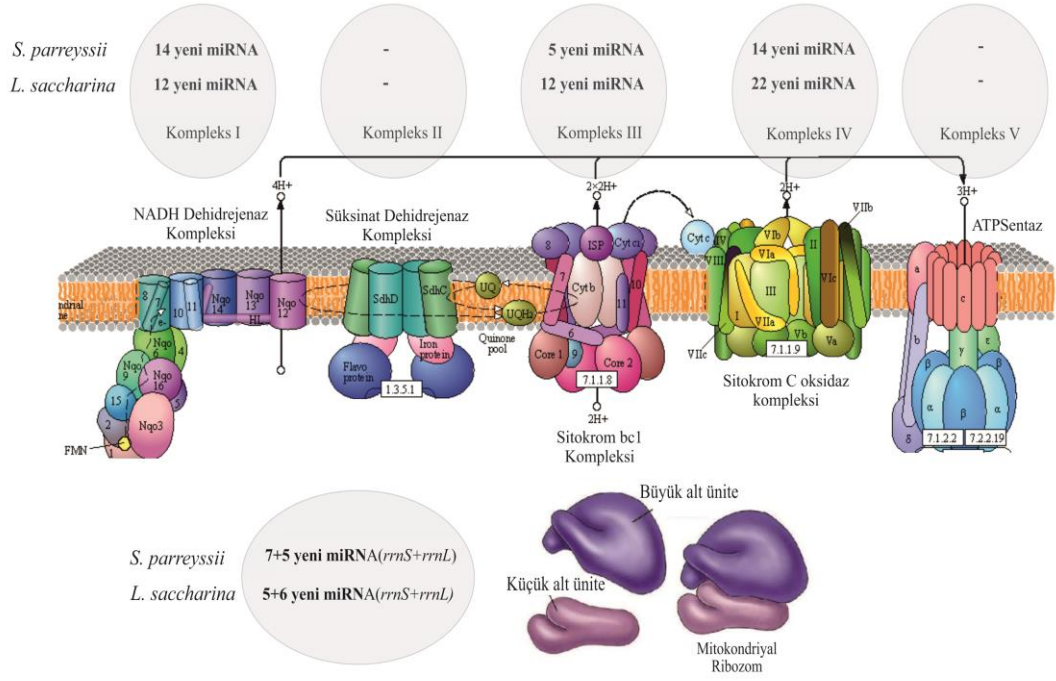
miRNA	miRNA okuma sayısı	mitokondriyal gen	gen sınırı	miRNA etkileşim sınırı	miRNA etkileşim yönelimi
mature_71	231	<i>cox1</i>	1476-3011	1689-1710	antisens
mature_8	39559	<i>cox2</i>	3096-3776	3215-3235	sense
mature_63	1578	<i>cox2</i>	3096-3776	3521-3541	antisens
mature_23	6610	<i>nd5</i>	6518-8209	7644-7665	antisens
mature_77	35	<i>nd4</i>	8284-9639	9010-9030	sense
mature_21	10236	<i>nd6</i>	10001-10591	10568-10587	antisens
mature_47	302	<i>nd1</i>	11959-12915	12546-12568	sense
mature_51	9	<i>rrnS</i>	14416-15446	14912-14932	sense
mature_14	1897	<i>trnM-intergenik-trnA</i>	15515-15802	15543-15564	-

L. saccharina türü için ise, 1' i *nd3*, 2' si *nd4*, 1' i *nd6*, 1' i *trnS*, 1' i *nd1*, 1' i *rrnL*, 4' ü *nd5*, 3' ü *rrnS*, 3' ü D-loop, 1' i *trnQ*, 2' si *nd2*, 1' i *cox1*, 1' i *atp8* ve 1' i *cox3* içerisinde olmak üzere 24 miRNA hizalama bölgesi saptanmıştır (Çizelge 3.9). Bunlardan *nd1*, *nd5* ile hizalananlardan bir tanesi, D-loop ile hizalananlardan iki tanesi, *nd2*, *atp8* ve *cox3* ile hizalananlar antisens yönelimli olarak belirlenmiştir. En yüksek okuma sayısına sahip olan mature_95 miRNA' sı *cox3* geni içerisinde antisens hizalanmıştır.

Çizelge 3.9 *L. saccharina* türünde yeni saptanan miRNA' ların mitogenoma hizalanması sonucunda elde edilen veriler.

miRNA	miRNA okuma sayısı	mitokondriyal gen	gen sınırı	miRNA etkileşim sınırı	miRNA etkileşim yönelimi
Mature_127	50	<i>nd3</i>	38-391	233-250	sense
Mature_82	65	<i>nd5</i>	803-2546	1857-1877	sense
Mature_104	3643	<i>nd5</i>	803-2546	1652-1671	antisens
Mature_118	19	<i>nd5</i>	803-2546	2180-2197	sense
Mature_120	40	<i>nd5</i>	803-2546	1177-1194	sense
Mature_89	16157	<i>nd4</i>	2625-3977	2946-2967	sense
Mature_98	37744	<i>nd4</i>	2625-3977	3038-3061	sense
Mature_116	1035	<i>nd6</i>	4428-4923	4595-4618	sense
Mature_15	20	<i>trnS</i>	6065-6130	6086-6103	sense
Mature_57	31	<i>nd1</i>	6157-7107	6235-6252	antisens
Mature_61	18	<i>rrnL</i>	7175-8443	8099-8116	sense
Mature_25	332	<i>rrnS</i>	8552-9341	8757-8778	sense
Mature_117	16	<i>rrnS</i>	8552-9341	8853-8870	sense
Mature_146	4068	<i>rrnS</i>	8552-9341	8991-9008	sense
Mature_88	46	D-loop	9342-9742	9478-9496	sense
Mature_125	13	D-loop	9342-9742	9712-9730	antisens
Mature_156	51	D-loop	9342-9742	9423-9440	antisens
Mature_154	92662	<i>trnQ</i>	9810-9878	9843-9864	sense
Mature_100	46	<i>nd2</i>	9955-10968	10212-10229	antisens
Mature_135	21	<i>nd2</i>	9955-10968	10368-10386	antisens
Mature_21	13	<i>cox1</i>	11169-12705	12340-12358	sense
Mature_38	239	<i>cox1</i>	11169-12705	12252-12269	sense
Mature_132	25	<i>atp8</i>	13599-13757	13594-13611	antisens
Mature_95	291935	<i>cox3</i>	14427-15214	14446-14467	antisens

Bu sonuçlara ek olarak miRNA etkileşimi merkez etkileşim diziler ile etkili bir şekilde gerçekleştiği için ve “map to reference” yöntemi ile tüm bu etkileşimlerin belirlenmesi mümkün olmadığından RNAhybrid kullanılarak miRNA-mitogenom hedef saptanması gerçekleştirilmiştir. Bu program kullanılarak Watson-Crick dışı (G:U) eşleşmelerin dahil edilmesi, minimum serbest enerjisinin -20kcal/mol’ den daha büyük olanlar hesaplanması ve uygun sekonder yapı kazananların filtrelenmesi sonucunda *S. parreyssi* türü için 51, *L. saccharina* türü için 69 tane mitogenom içerisinde potansiyel hedef dizi tespit edilmiştir (EK-5 ve EK-6). *S. parreyssi* türünde, hipotetik olarak en çok hedeflenen genler *cox1* (11), *nd5* (8), *rrnS* (7), *rrnL* (5) ve *cytb* (5); *L. saccharina* türünde ise *cox1* (15), *cytb* (12), *rrnL* (6), *nd2* (6) ve *rrnS* (5) genleridir (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8).



Şekil 3.7 RNAhybrid sonuçlarına göre mitokondriye hedeflenebilecek yeni miRNA'ların sayıları ve etkilediği alt üniteler (Görsel KEGG pathway' den değiştirilerek alınmıştır).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan genom projesinin tamamlanması ile birlikte, genomdan büyük oranlarda proteine çevrilmeyen veya bilinen bir regülatör fonksiyonu olmayan RNA'ların kodlandığı saptanmıştır (Craig Venter vd., 2001). Bu farklı büyüklüklere ve özelliklere sahip geniş ölçekli RNA'lar öncelleri “atıl” olarak değerlendirilse de, sonrasında özellikle gen ekspresyonunun düzenlenmesinde elzem olabildikleri açıklanmıştır (Mercer vd., 2011). Bu durum, giderek artan bir ilgiyle kodlama-yapmayan RNA'ların çalışılmasına yol açmış ve 2000' li yıllarla birlikte birçok bilim insanı tarafından odak noktası haline gelmiştir. Buna rağmen, bu RNA molekülleri hakkında bildiklerimiz bilmediklerimizin yanında okyanusta bir damla gibidir. Bu çalışmada, özellikle hücrelerin enerji merkezleri olan mitokondriden sentezlenen ve/veya mitokondriye hedeflenen miRNA'lar farklı başkalaşım örüntüsü (ametabol ve holometabol) sergileyen iki farklı böcek takımını temsilen birer türde incelenmiştir. Mitokondri endosimbiyotik kökeni, hücrenin enerji üretiminden apoptoza kadar birçok elzem süreçte görevli olması, nükleer genoma hem bağımlı hem de bağımsız olması gibi birçok önemli özelliği nedeniyle araştırmanın ana materyali olmuştur. Hem ametabol hem de holometabol böceklerden birer temsilcinin seçilmesiyle ise yüksek çeşitlilik, plastisite ve adaptasyon özelliklerine sahip olan böcekler sınıfının anlaşılmasının kolaylaşması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, bir ametabol böcek olan *L. saccharina* (Zygentoma: Lepismatidae) ve bir holometabol böcek olan *S. parreyssi* (Hymenoptera: Cephidae) türlerinin derin total miRNA dizilemeleri gerçekleştirilmiş ve ilk defa literatüre kazandırılmıştır. miRNA dizilenmesi aşamasında TruSeq Small RNA kütüphanesi hazırlanmış ve her bir örnek için yaklaşık dört milyar baz büyüklüğünde okuma yapılmıştır.

miRNA araştırmalarında kullanılan kitlerin, cihazların ve biyoinformatik yaklaşımların sürekli olarak geliştirilmesi, bununla birlikte veritabanlarında artan kodlama yapan ve yapmayan RNA dizileme verilerinin artması araştırmacıların miRNA tarafından düzenlenen sayısız süreçleri çözebilmelerini sağlayacaktır. Şu anda bildiğimiz şey belki de sadece buzdağının görünen kısmından ibarettir.

4.1. Bilinen miRNA analizleri

S. parreyssi türü için miRNA dizilenmesinin sonucunda, 78,160,663 ham okuma üretilmiş, bunların 63,244,427 tanesi (%80.92' si) ileri analizler için uygun budanmış diziler olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Bilinen miRNA'ların saptanması aşamasında miRBase veritabanında bulunan tüm türler ile haritalamalar yapılmış ve bu dizilerin maksimum %4.01' inin en az bir organizma ile (*Bombyx mori*) birden fazla okuma açısından benzerlik sergilediği saptanmıştır (Çizelge 3.5). *L. saccharina* türü için ise, 74,006,184 ham okuma üretilmiş, bunların 44,087,806 tanesi (%59.57' si) ileri analizler için uygun budanmış diziler olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Bilinen miRNA'ların saptanması aşamasında miRBase veritabanında bulunan tüm türler ile haritalamalar yapılmış ve bu dizilerin maksimum %10.31' inin en az bir organizma ile (*Apis mellifera*) birden fazla okuma açısından benzerlik sergilediği saptanmıştır (Çizelge 3.5).

Beş model organizma ile yapılan haritalama sonuçlarına göre en yüksek miRNA sayıları *D. melanogaster* türünden elde edilmiştir. Buna göre, *L. saccharina* türü, *D. melanogaster* miRNA'larının %19.74' üne; *S. parreyssi* türü ise %15.02' sine sahiptir (Çizelge 3.6). Bu bulgu, *D. melanogaster*' in böcekleri temsil eden bir referans olması nedeniyle beklenendir. Diğer taraftan, en uzak akraba olan *A. thaliana* ile paylaşılan miRNA sayısının minimum olması beklenirken, *H. sapiens* ile elde edilmiştir. Bu sonucun olası nedeni ise, miRNA sayıları daha fazla gibi görünse de temsil eden okuma sayısının düşük olmasıdır (Çizelge 3.4).

Bilinen miRNA' lar açısından yapılan ilk değerlendirme, mitomiR' lerin değerlendirilmesidir. Özellikle insanda tanımlanmış, bilinen mitomiR' ler (Srinivasan ve Das, 2015; Giuliani vd., 2018; Ortega vd., 2020) incelendiğinde bazı önemli bulgular elde edilmiştir. Bunlardan ilki, *L. saccharina* türünde 168, *S. parreyssi* türünde ise yedi okuma sayısına sahip olan (EK-1 ve EK-2) ve mitokondriyal OXPHOS kompleks 4' ün nükleer altünitelerinden biri olan *sitokrom oksidaz 10 (cox10)* geninin regülasyonunda görevli miR-210' dan elde edilmiştir (Colleoni vd., 2013). *cox10* geni üzerine farelerde yapılan bir çalışma sonucunda, bu genin yalnızca kompleks 4' ün entegrasyonunda değil, aynı zamanda kompleks 1' in de oluşturulması ve stabilitesinde görevli olduğu bulunmuştur (Diaz vd., 2006). Bu bulgu, kompleks 1' in mitokondriyal OXPHOS sisteminde ilk elektron alıcısı olarak görevli olması açısından önemlidir. Buna göre, bu genin ifadesindeki farklılık

doğrudan enerji üretimi ile ilişkilendirilebilir ve hücrenin enerji ihtiyacına göre artan veya azalan miR-210 ifadesi ile düzenlendiği öngörülebilir. Bu da böceklerden memelilere kadar geniş bir skalada bu miRNA'nın bulunduğu ve mitokondrinin en elzem fonksiyonu olan oksidatif fosforilasyonda görevli olduğuna işaret ediyor olabilir. Her iki türde de saptanan bir diğer insan mitomiR' i ise miR-173' tür. Bu miRNA'nın mitokondriyal bir lncRNA olan ve 16S rDNA geninden türemiş ASncmtRNA-2' den türediği düşünülmektedir ve dolaylı olarak epitel hücrelerinin yaşlanmasında upregüle edildiği bilinmektedir (Bianchessi vd., 2015; Lobos-González vd., 2016). Bu mitomiR, miR-173' ün ne nükleer ne de mitokondriyal protein kodlayan genlerden üretilmemesi ve mitokondriden sitoplazmaya taşınıp orada regülatör olarak görevli olması açısından önemli ve farklıdır. Polisistronik üniteler halinde transkribe olan mitokondriyal genom, insanda büyük oranda ağır zincirden kodlanmaktadır ve olası üç polisistronik birimin olduğu varsayılmaktadır. Hafif zincir geni olan *nd6* gibi genlerin gen regülasyonu açısından antisens ifadelenmelerinin olduğu da bilinmektedir (Mercer vd., 2011). Bu bilgiler ışığında, insan mitogenomu ile karşılaştırıldığında, böcek mitogenomları ağır ve hafif zincire neredeyse homojen dağılmış ve büyük olasılıkla beş farklı antisens polisistronik ünite içermektedir (Shutt vd., 2010; Peralta vd., 2012). Bu da, lncRNA ve/ veya miRNA birimlerinin böceklerde daha yüksek yoğunlukta üretilebiliyor olmasına işaret ediyor olabilir.

Bir diğer mitomiR olan miR-34-5p miRNA' sı ile insanda haritalanma saptanmasa da *L. saccharina* için *D. melanogaster* ve *C. elegans*' ta; *S. parreyssi* türünde ise yalnızca *C. elegans*' ta haritalanma saptanmıştır. Bu miRNA' nın sayısı her iki türde de oldukça yüksek okuma sayılarına sahiptir (EK-1 ve EK-2). SRA01/04 hücre kültürlerinde, miR-34' ün ROS üretimini arttırdığı ve apoptozu indüklediği bilinmektedir. miR-34a' nın aşırı ekspresyonunun mitokondri-aracılıklı apoptozu promote ettiği ve mitokondriyal enerji metabolizmasını bloke ettiği bilinmektedir. Dahası, miR-34a' nın olası bir hedefi olan *Notch2* (nörojenik lokus çentik homolog protein 2) geninin mitokondri-aracılıklı apoptozu tetiklediği saptanmıştır (Fan vd., 2017). Buna göre, mitokondride ROS birikimi gibi bir doğrudan ve mitokondri-aracılıklı apoptoz gibi bir dolaylı etkiye sahip miR-34 ekspresyonu böcekleri de etkiliyor görünmektedir. *L. saccharina*' de saptanan dme-miR-34-5p sayısı 23027, cel-miR-34-5p sayısı ise 11784' dir. *S. parreyssi* türünde saptanan cel-miR-34-5p sayısı ise 4853 olarak hesaplanmıştır (EK-1 ve EK-2). Sayısal olarak oldukça fazla

bulunmaları da bu varsayımı güçlendirmektedir. hsa-miR-125b' nin apoptoz yolağında görevli olduğu in-vivo çalışmalarda kanıtlanmıştır (Keane vd., 2015). Bununla birlikte mitokondrinin hücresel görevlerinden olan hücre yaşlanmasında da görevli olduğu bilinmektedir (Nyholm vd., 2014; Yuan vd., 2018). Bu miRNA'nın hem *H. sapiens*' te hem de zebra balığında (*Danio rerio*) yüksek okuma sayılarında haritalandığı bulunmuştur (EK-1 ve EK-2). ATP üretimini modüle eden ve oksidatif stresi indükleyen miR-141-3p mitomiR molekülü her iki türde de düşük okuma sayılarda da olsa saptanmıştır (Ji vd., 2015).

Her iki türde de saptanan ortak mitomiR' ler dışında türlerden birinde bulunmayan mitomiR' ler de saptanmıştır (Şekil 3.1). Bunların *D. melanogaster*' de de bulunma durumuna bağlı olarak farklı başkalaşım paternlerine sahip böceklerdeki durum ile ilgili ipuçları vermesi beklenmektedir. Çalışma kapsamında yalnızca *S. parreyssi* türünde saptanan bir mitomiR grubu, miR-23a ve miR-23b' dir (EK-2). Bu miRNA grubu, doğrudan oksidatif fosforilasyonda görevli olmasa da mitokondriyal glutaminaz ekspresyonunda görevli olan *GLS2* (*glutaminaz 2*) geninin ekspresyon düzeyinin ve dolayısıyla glutamin metabolizmasının düzenlenmesinde görevlidir (Gao vd., 2009). *GLS2*, glutamat ve alfa-keto glutarat sentezini katalizleyerek hücrelerde mitokondriyal respirasyonu promote etmekte ve ATP üretimini arttırmaktadır. NADH ve glutatyon üretimi ile hücresel antioksidan fonksiyonunu arttırmaktadır ve tümör baskılanmasında da görevli olduğu düşünülmektedir (W. Hu vd., 2010). Bu enzim ve/ veya izoformlarının geniş taksonomik gruplarda bulunması (Pasquali vd., 2017), böceklerde de bu genin bulunduğuna ve miRNA ile ekspresyonunun düzenlendiğine işaret ediyor olabilir. Bununla birlikte, *S. parreyssi* türünde saptanıp *L. saccharina* türünde bulunmaması miRNA ifade yoğunluğu ile ilişkili olabilir. Hâlihazırda *S. parreyssi* türünde de yalnızca iki kez temsil edilmesi bu varsayımı güçlendirmektedir.

İnsanda tanımlanmış ve bu çalışma ile böcek türlerinde de bulunduğu anlaşılan bir diğer mitomiR let- 7b' dir. Let-7b miRNA' larından hsa-let-7b-5p ve dre-let-7b miRNA'sı yalnızca *L. saccharina* türünde saptanmıştır. Farelerde yapılan son çalışmaya göre, let-7b-5p miRNA'sının *cytb*' ye hedeflendiği ve *cytb* ekspresyonunu pozitif modüle ettiği saptanmıştır (H. Li vd., 2019). *In siliko* analizler ile yapılan olası hedef taramalarına göre let-7b miRNA'sı *atp6*, *atp8*, *cox2* ve *nd5* gibi genlerini hedefleyebilmektedir (Barrey vd., 2011). Bununla birlikte, bu miRNA' nın çeşitli organizmalarda ROS (reaktif oksijen bileşenleri: superoksit, oksijen peroksit ve diğer

oksijen radikalleri) bileşenlerine karşı hücrel yanıtta görevli olduğu Gene Ontology veritabanında GO:0034614 erişim numarası altında kanıtlanmıştır.

Özellikle *H. sapiens*' te genellikle bir hastalığa sebep olduğu için tanımlanabilmiş bilinen mitomiR' lerin böcek türlerinde de bulunması şaşırtıcıdır. Mitokondrinin oksidatif fosforilasyon dışındaki tüm hücrel fonksiyonlarının genleri nükleer genomdan kodlansa da mitokondriye alınması veya fonksiyonel olması aşamasında mitokondri ile ilişkilendirilmesi önemlidir. Örneğin, apoptoz süreci mitokondriyal bir gen aracılıklı bir süreç olmasa da apoptozun mitokondride özellikle *cytC*' nin ilişkili olduğu genleri doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyen miRNA' lar mitomiR' ler olarak tanımlanabilir. Bu nedenle, diğer tüm miRNA'ların da en azından in vitro olarak tanımlanması yapılabilir. Fakat yine aynı sebepten, paradoksal olarak, bu sonsuz bir kombinasyon bağlantısı gerektirecektir. Bununla birlikte, ökaryotik her bir hücrel yolağın bir şekilde mitokondri ile ilişkilendirilebilmesi nedeniyle de mitomiR çalışmaları yanıltıcı olabilir. Bu nedenle, şimdilik yalnızca insanda bir hastalığa sebep olduğu için bulunan mitomiR' ler incelenebilmiştir. Bu anlamda bilinen mitomiR' ler bu iki farklı başkalaşım modelini izleyen organizmanın farklılığında ya da genel olarak böceklerin çeşitliliği gibi konularda varsayımlarda bulunmak için yetersiz kalmaktadır.

Diğer taraftan, nükleer genomdan kodlanan mitokondriyal altünite genini etkileyen ve mitokondriyal lncRNA' dan türemiş miRNA' ların varlığı mitokondriyal transkripsiyon açısından değerlendirildiğinde farklı bakış açıları kazandırabilecektir. tRNA' ların düzgün katlanması, mRNA' ların translokasyonu ve translasyonu gibi süreçlerin mitomiR' ler tarafından regüle edildiği gösterilmektedir (Ro vd., 2013). Alternatif olarak, mitoRNA' lar mitokondriyal DNA metilasyonunu modüle ederek mitokondriyal gen ekspresyonunu etkileyen bir epigenetik düzenleyici olarak işlev görebilir (Shock vd., 2011). Bu ilginç hipotezler gelecekte daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir. İleride başka çalışmaların konusu olarak dizileme reaksiyonları gerçekleştirilebilecek antisens-RNA veya lncRNA dizileme sonuçları ile birlikte yeni bakış açıları geliştirilebilir.

mitomiR' ler dışında bilinen miRNA' lar beş model organizma açısından incelendiğinde, özellikle beş miRNA' nın yüksek temsil sayıları dikkat çekicidir: miR-10a-5p, miR-184, miR-100-5p, miR-9 (a/ b/ c/ d) gen ailesi ve miR-133 (a/ b/ c) gen ailesi (EK-1 ve EK-2). mtDNA veya ncDNA' dan kodlanan miRNA' lar mitokondriyal OXPHOS gen ifadesini doğrudan etkilemese de mitokondriyal

transkripsiyonda görevli TFAM (transkripsiyon faktörü A) ve WARS (triptofanil-tRNA sentetaz) gibi spesifik fonksiyonları olan proteinlerin gen regülasyonunda görevli olabilir (Borralho vd., 2015). Bunlar içerisinde mitokondri açısından en dikkat çekici olanları miR-9 ve miR-133 gen aileleridir. miR-9/9*’ un mitokondrinin nükleusa sinyal iletiminde en kritik göreve sahip moleküllerden biri olduğu bilinmektedir (Borralho vd., 2015). Daha da önemlisi, miR-9/9*, mitokondrinin fonksiyonel durumundaki değişikliklere yanıt olarak nükleer genlerin ekspresyonunu regüle etmektedir (Borralho vd., 2015). miR-133a üzerine yapılan *in silico* çalışmalar sonucunda bu miRNA’ nın mitokondriyal mRNA’ ları hedefleyebildiği ve dolayısıyla da mitokondriyal gen ekspresyonunun regülasyonunda görevli olabileceği önerilmiştir (Barrey vd., 2011). miR-10a-5p’nin yüksek temsili “housekeeping” miRNA olmasına bağlı olabilir (Link vd., 2019) ve miR-100-5p ve miR-184’ ün de mitokondriyal apoptozda görevli olduğu bilgisi literatürde mevcuttur (G. Wu vd., 2018). Tüm ökaryotik organizmaların apoptoz yolağı genlerini içermesi nedeniyle bu veri uyumlu bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bilinen miRNA’lar açısından yapılan değerlendirmede, miR-9 gibi mitokondriyal regülasyonda doğrudan ya da dolaylı olarak görevli miRNA’ lar veya mitomiR’ ler dışında önemli bulgular elde edilememiştir. Bunun olası nedeni model organizmalarda belirlenen her bir miRNA’ nın diğerinden farklı olmasıdır. Genellikle fonksiyonel olması açısından q-RT-PCR ile değerlendirilen miRNA’ lar türe özgüdür. Dolayısıyla q-RT-PCR ile validasyonu diğer tüm türlerde yapılmamış her miRNA, diğer türlerde yok görünmektedir. Yalnızca let-7 gibi kronolojik önemi olan ve bütün organizmalarda bulunan miRNA’ lar saptanabilmiştir. Bu nedenlerden dolayı, bilinen miRNA’ lar açısından yapılan değerlendirmede sınırlı varsayım yapılabilmektedir.

4.2. Yeni miRNA analizleri

Yeni miRNA çalışmaları sonucunda, *L. saccharina* türünde 164 öncül, 161 olgun; *S. parreyssi* türünde ise 81 yeni öncül ve olgun miRNA saptanmıştır (EK-3 ve EK-4). Tanımlanan yeni miRNA’ lara ait dikkat çeken bulgulardan ilki, hiçbir miRNA’nın mitokondriyal kromozom içerisinde haritalanmamasıdır (EK-3 ve EK-4). Veritabanlarında mitokondriden köken alan miRNA’ ların az sayıda bulunmasının nedeni, organizmadan bağımsız olarak, mitogenomdan sentezlendiği düşünülen miRNA’ ların q-RT-PCR ve mitoplast (dış zarı uzaklaştırılmış mitokondri)

çalışmalarıyla doğrulanmasının oldukça zor olmasıdır. Bunun temel nedeni, çoğu mitokondriyal gen bölgesinin nükleer genomda NUMT dizilerinin (*mitokondriyal DNA'nın nükleer kopyaları*) bulunmasıdır (Bernt, Brabant, Schierwater vd., 2013). Dolayısıyla, ortalama 22 baz uzunluğundaki bir miRNA molekülünün nükleerden mi yoksa mitokondriden mi sentezlendiğinin ayrımının yapılmasını güçleştirmektedir. Bununla birlikte, mitokondriyal dış zarda yerleşik bulunan özellikle ribozom ve ER gibi organeller de bu saptamayı zorlaştırmaktadır (Borralho vd., 2015). Böylece miRNA'nın kökeninin anlaşılması mitoplast çalışmaları yapılmadan doğrulanamamaktadır. Bir diğer neden ise mitokondri içine ve dışına RNA trafik süreçlerinin dinamik ve çift yönlü olmasıdır (Mercer vd., 2011; Sripada, Tomar, ve Singh, 2012). Mitokondrinin hücrel küçük RNA populasyonunun %3' ünü kapsamamasına rağmen, saflaştırılmış mitokondri ve mitoplast RNA derin dizilemeleri sonucunda okumaların yalnızca nükleer genomla hizalandığı saptanmıştır (Mercer vd., 2011). Ayrıca, miRNA biyogenezinin mitokondri için kanonik olmayan yollarla gerçekleşmesi de bu saptamayı zorlaştırmaktadır (Kim vd., 2016). Tüm bu sebeplerden dolayı mitokondriden köken aldığı düşünülen miRNA bulguları şüphelidir. Buna rağmen, en azından hipotetik olarak miRNA kaynağı ve/ veya hedefi olabilecek gen bölgelerinin bulunması amacıyla, türlerin referans mitogenomları ile yeni miRNA' lar hizalanmıştır. Bu analizin sonuçlarına göre, antisens mitokondriyal gen bölgelerine hizalanan miRNA' ların kaynağı ve hedefine ait birkaç varsayımda bulunulmuştur. Eğer Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9' da belirtilen mitokondriyal genler bu miRNA' ların kaynağı ise her bir mitokondriyal gen için yalnızca sense zincirin değil, aynı zamanda antisens zincirin de transkribe olduğu ve miRNA üretimine katkı sağladığı söylenebilir. Antisens zincirin transkribe olduğu bilinmesine rağmen (Mercer vd., 2011), bu transkriptin yıkım süreci ve işlevi bilinmemektedir. Dolayısıyla bu transkripsiyon ürünlerinden miRNA üretiliyorsa, bu ürünlerin üzerine post-transkripsiyonel süreçlerin de işlediği düşünülebilir. Diğer taraftan, mitokondriyal replikasyon ve transkripsiyonun karakteristik özelliği olan, transkripsiyonun duraksaması gibi fonksiyonlar için bu bölgelerin dupleks yapı, interferans tepkisini tetikleyebilen çift iplikli RNA (dsRNA) oluşturup fork bariyerleri gibi davrandığı düşünülebilir (Chakrabarti vd., 2011; Korkmaz vd., 2016). Buna göre *L. saccharina* türünde D-Loop (AT zengin bölge)' u hedefleyen mature 88, mature 125, mature 156, *S. parreyssi* türünde ise trnM ile trnA arasında bulunan intergenik bölgeyi hedefleyen mature 14 miRNA' sının bulunması bu varsayımı

desteklemektedir. Böylece sterik engel oluşacak ve buradaki ifade regüle edilebilecektir. Diğer taraftan sense zincirle hizalanan miRNA' ların kaynağı eğer mitogenomik genler ise, bu bulgu aynı polisistronik üniteden kodlanan genlerin farklı ifadelenme profillerini açıklayabilir. Buna göre aynı polisistronik üniteden kodlanan genlerin RNA-seq verilerinde farklı RPKM değerlerinde elde edilmesi ve/ veya q-RT-PCR' da farklı Ct (Döngü eşiği) değerlerine sahip olması anlamlandırılabilir. Polisistronik birimlerin içinde yalnızca proteine dönüşecek ve hem proteine dönüşüp hem de miRNA üretimine aracılık edecek genlerin ifade düzeyleri, beklendiği üzere farklılık sergileyecektir. Eğer bu genler bu miRNA' ların hedefi ise, genel fonksiyonu olan gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde görevli olabilir.

Olası mitokondriyal miRNA' lardan sense etkileşim sergileyenler 3' veya 5' ucuna yakınlığı açısından incelendiğinde önemli bir bulgu elde edilememiştir fakat *S. parreyssi* mitogenomunda trnM ve trnA arasındaki intergenik bölgede bulunan miRNA' nın zincir değiştirici pozisyonda bulunması fonksiyonel olabileceğini düşündürmektedir (Çizelge 3.8). *S. parreyssi* türü mitogenomunda trnM' nin ağır zincirden, trnA' nın ise hafif zincirden kodlanmakta ve bu iki tRNA arasında intergenik bölge bulunmaktadır (Korkmaz vd., 2018). İntergenik bölgelerin de polisistronik üniteler içerisinde transkribe olduğu hipotezi ile birlikte değerlendirildiğinde, polisistronik ünite birimlerinin 3' veya 5' ucunda bulunan intergenik bölgeyle etkileşecek bir miRNA, tüm polisistronik ünitenin transkripsiyonunu regüle ediyor olabilir. Bu varsayıma göre, intergenik bölgeler mitogenomun UTR' leri gibi davranıyor olabilir. miRNA' ların nükleer genomda genlerin genelde 3' UTR bölgelerine bağlandığı bilinmesine rağmen (Lewis vd., 2005), mitokondriyal genlerin 3' UTR' lerden genellikle yoksun olması (Gagliardi vd., 2004), miRNA' lar ile gen ekspresyon düzeyinin ayarlanmasında mitokondri içerisinde farklı, kendine özgü bir yol izlediğini düşündürmektedir.

Hedef belirlenmesi için gerçekleştirilen RNAhybrid analizi sonuçlara göre, her iki türde de en yüksek olası hedeflenme sayılarına sahip olan gen *cox1*' dir (EK-5 ve EK-6). *cox1* geninin birkaç açıdan diğer mitokondriyal genlerden farklılık içerdiği bilinmektedir. Kompleks 4 içerisinde COX1 proteini nihai alıcı olan moleküler oksijene elektron taşınmasını katalizlemektedir. Mitokondriden kodlanan diğer 2 protein olan, COX2 ve COX3 de kompleksin kor bölgesinde görevlidir, nükleer

eşlenikler ise genelde eksternal bölgelerde bulunmaktadır (Castellana vd., 2011). Mayada tanımlanmış ve memelilerde de olduğu düşünülen TACO1 translasyonel aktiviteörü özellikle mitokondriyal *cox1* geninin etkin translasyonu için gereklidir ve diğer mt- mRNA'ları için fonksiyonel değildir (Fox, 1996; Weraarpachai vd., 2009). *cox1* geni daha düşük farklılaşma oranlarına sahiptir, bu da COX1 proteininin evriminde önemli fonksiyonel sınırlamaların olduğuna işaret etmektedir (Meiklejohn vd., 2007). Bu üç özelliğe göre, *cox1* geni üzerine işleyen seçilim baskısının çok daha yoğun olduğu ve bu genin doğru translasyonunun oldukça elzem olduğu söylenebilir. Dolayısıyla bu genin doğru ve kompakt bir şekilde transkribe olması miRNA-aracılıklı post-transkripsiyonel mekanizmalarla düzenleniyor olabilir. Diğer taraftan, transkripsiyonel olarak da *cox1* geninin önemli farklılıklar içerdiği bilinmektedir. Bu özelliklere ek olarak, RNA-seq çalışmaları sonucunda farklı büyüklüklerde *cox1* transkriptlerinin bulunduğu saptanmıştır (Szczesny vd., 2009; Temperley vd., 2010). Buna göre ise, *cox1* geni içerisinde birçok miRNA bağlanma bölgesinin bulunduğu söylenebilir. Her bir etkileşim bölgesinden, proteinin ilerleyememesine bağlı olarak farklı büyüklüklerde transkripsiyon ürünleri oluşuyor olabilir. Bu da, *cox1* içerisinde oldukça yüksek sayıda miRNA etkileşim bölgesinin bulunmasına bir açıklama olabilir. Ayrıca, *cox1* ile olasılıklı olarak etkileşen miRNA'ların okuma sayıları dikkate değer şekilde yüksektir (EK-5 ve EK-6).

Yüksek sayıda olası miRNA etkileşim bölgesi içeren diğer protein kodlayan genler *cytb*, *nd5* ve *nd2*'dir (EK-5 ve EK-6). Bu üç genin ortak özelliği, pozitif seçilim baskısı altında olmalarıdır (Garvin vd., 2015). Dolayısıyla bu genlerin ifadelerindeki farklılıklar ve/veya gen editing mekanizmalarına açık olmasına bağlı olarak içerebileceği alternatif formlar seçiliyor olabilir. Bu da, miRNA etkileşimini tetikleyebilir. Genler ayrı ayrı incelendiğinde ise, *nd5* ve *nd2*'nin dört ana proton pompasının iki temel hidrofobik alt ünitesi olmasıdır (Garvin vd., 2015). Bununla birlikte, *nd5* geninin C-terminalinden lateral heliks HL olarak uzanan ve coupling rod (Efremov ve Sazanov, 2011) gibi davranan uzun bölgesi kompleks 1'in fonksiyonu için elzemdir. Dolayısıyla bu genin ifadesindeki herhangi bir farklılaşmanın kompleks oluşumu üzerine dramatik etkileri olabilir. Bu da önemli fonksiyonel sınırlamalar içerdiğine işaret etmektedir. *cytb* geni, önemli katalitik aktiviteye (sitokrom c redüksiyonu) sahip olan ve kompleks 3'ün mtDNA'dan türetilen tek genidir. Ayrıca, yüksek korunmuşluk oranlarına da sahip olduğu bilinmektedir (Colin D Meiklejohn vd., 2007; Castellana vd., 2011). Dolayısıyla

içerdiği önemli fonksiyonel sınırlamalar nedeniyle transkripsiyonu miRNA'larca kontrol ediliyor olabilir.

RNAhybrid programından elde edilen sonuçlara göre, her iki türde de yüksek olası hedeflenme sayılarına sahip olan diğer gen grubu rRNA genleridir (EK-5 ve EK-6). Bu genlerin de ribozom altüniteleri olması nedeniyle diğer protein kodlayan genlerde de olduğu gibi önemli fonksiyonel sınırlamalar içermektedir. Ayrıca bu genler için miRNA hedefi olmaktan ziyade miRNA kaynağı oldukları da önerilmektedir (Lambert vd., 2019). Bu da yüksek hibridizasyon sayılarını ve okuma sıklığını açıklayabilir. Yüksek sayılarda miRNA hibridizasyonu sergileyen mitokondriyal genlerin ortak noktası ise, önemli fonksiyonel sınırlamalar içermeleridir.

Sonuç olarak, miRNA'ların keşfi ve çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde fonksiyonel plastisiteleri, transkripsiyon ile birlikte gen regülasyonunun anlaşılmasında yeni bir karmaşıklık katmanı eklemiştir. Her miRNA'nın onlarca veya yüzlerce hedef geni potansiyel olarak hedefleyebilmesi ve tek bir miRNA'nın inhibisyonu/ silinmesi bir dizi hedef genin transkriptlerinin etkilenmesine yol açabileceğinden, işlevlerini incelemenin karmaşıklığına neden olmaktadır.

miRNA'ların metazoanlarda korunması göz önüne alındığında farklı böcek gruplarında yeni miRNA'ların tanımlanması fonksiyonel çalışmalara ek olarak, evrimsel çalışmalarda ve çeşitli taksonların filogenetik ilişkilerinin çözülmesinde mitokondriyal veya genomik DNA gibi diğer moleküller ile birlikte kullanılabilir. Çalışmamızın böcek model organizmaları dışındaki türlerde yapılmış olması bu tür çalışmalara katkı sağlayacak olması açısından önemlidir. Ayrıca farklı başkalaşım yaşam döngüsüne sahip böcek türleri kullanılarak bilinen ve/veya yeni miRNA'ların tanımlanması biyoçeşitliliği yüksek ve karmaşık olan bu gruplarda referans olma potansiyeli yüksektir. Böylelikle olası bir miRNA'nın ileriki çalışmalarla gelişim sırasındaki zamansal düzenlemeleri göz önünde bulundurularak yaşlanmanın belirteçleri olarak kullanılması olasıdır. miRNA'lar gelecekte haşere kontrolünde de kullanılabilir. İnsan ve hayvanların ölümcül patojenlerinin vektörleri, çoğalmalarını ve dolayısıyla vektör kaynaklı hastalıkların bulaşmasını sınırlamak için anti-viral veya anti-parazit miRNA'ları üretmek üzere genetik olarak modifiye edilebilir. Ayrıca, ipekböceği ve bal arıları gibi yararlı böceklerde hastalıkların önlenmesinde de benzer yaklaşımlar kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Agris, P.F., Vendeix, F.A.P., and Graham, W.D.** (2007). tRNA's Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification. *Journal of Molecular Biology*.
- Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., vd.** (2014). Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO Journal*.
- Alfonzo, J.D., and Söll, D.** (2009). Mitochondrial tRNA import - The challenge to understand has just begun. *Biological Chemistry*.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., vd.** (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA*.
- Ambros, V., and Horvitz, H.R.** (1987). The lin-14 locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes & Development*.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L.L., Coulson, A.R., vd.** (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Antczak, M., Popenda, M., Zok, T., Sarzynska, J., Ratajczak, T., vd.** (2016). New functionality of RNAComposer: An application to shape the axis of miR160 precursor structure. *Acta Biochimica Polonica* 63, 737–744.
- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., vd.** (2003). The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Developmental Cell* 5, 337–350.
- Arteaga-Vázquez, M., Caballero-Pérez, J., and Vielle-Calzada, J.P.** (2006). A family of microRNAs present in plants and animals. *Plant Cell*.
- Axtell, M.J., Westholm, J.O., and Lai, E.C.** (2011). Vive la différence: Biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*.
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P.** (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*.
- Bandiera, S., Matégot, R., Girard, M., Demongeot, J., and Henrion-Caude, A.** (2013). MitomiRs delineating the intracellular localization of microRNAs at mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Bandiera, S., Rüberg, S., Girard, M., Cagnard, N., Hanein, S., vd.** (2011).

- Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS ONE* 6.
- Barrey, E., Saint-Auret, G., Bonnamy, B., Damas, D., Boyer, O., and Gidrol, X.** (2011). Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS ONE* 6, e20220.
- Bartel, D.P.** (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*.
- Bartel, D.P.** (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*.
- Bartel, D.P., and Chen, C.Z.** (2004). Micromanagers of gene expression: The potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature Reviews Genetics*.
- Becker, T., Gebert, M., Pfanner, N., and van der Laan, M.** (2009). Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 484–493.
- Behura, S.K., and Severson, D.W.** (2012). Comparative Analysis of Codon Usage Bias and Codon Context Patterns between Dipteran and Hymenopteran Sequenced Genomes. *PLoS ONE* 7, e43111.
- Behura, S.K., and Whitfield, C.W.** (2010). Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. *Insect Molecular Biology*.
- Bernt, M., Braband, A., Schierwater, B., and Stadler, P.F.** (2013). Genetic aspects of mitochondrial genome evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69, 328–338.
- Berthier, F., Renaud, M., Alziari, S., and Durand, R.** (1986). RNA mapping on *Drosophila* mitochondrial DNA: Precursors and template strands. *Nucleic Acids Research* 14, 4519–4533.
- Bian, Z., Li, L.M., Tang, R., Hou, D.X., Chen, X., Zhang, C.Y., and Zen, K.** (2010). Identification of mouse liver mitochondria-associated miRNAs and their potential biological functions. *Cell Research*.
- Bianchessi, V., Badi, I., Bertolotti, M., Nigro, P., D'Alessandra, Y., vd.** (2015). The mitochondrial lncRNA ASncmtRNA-2 is induced in aging and replicative senescence in Endothelial Cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 81, 62–70.
- Biesiada, M., Purzycka, K.J., Szachniuk, M., Blazewicz, J., and Adamiak, R.W.**

- (2016). Automated RNA 3D structure prediction with RNA Composer. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1490, pp. 199–215).
- Biryukova, I., Asmar, J., Abdesslem, H., and Heitzler, P.** (2009). *Drosophila* mir-9a regulates wing development via fine-tuning expression of the LIM only factor, dLMO. *Developmental Biology*.
- Bobrowicz, A.J., Lightowers, R.N., and Chrzanowska-lightowers, Z.** (2008). Polyadenylation and degradation of mRNA in mammalian mitochondria : a missing link ? 517–519.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Görlich, D.** (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185–191.
- Borchert, G.M., Holton, N.W., Williams, J.D., Hernan, W.L., Bishop, I.P., vd.** (2011). Comprehensive analysis of microRNA genomic loci identifies pervasive repetitive-element origins. *Mobile Genetic Elements* 1, 8–17.
- Borralho, P.M., Rodrigues, C.M.P., and Steer, C.J.** (2015). microRNAs in mitochondria: An unexplored niche. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 887, pp. 31–51).
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M.** (2005). Principles of microRNA-target recognition. In *PLoS Biology*.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., vd.** (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nature Genetics*.
- Brodersen, P., and Voinnet, O.** (2009). Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 141–148.
- Bruni, F., Manzari, C., Filice, M., Loguercio Polosa, P., vd.** (2012). D-MTERF5 is a novel factor modulating transcription in *Drosophila* mitochondria. *Mitochondrion* 12, 492–499.
- Bryant, B., Macdonald, W., and Raikhel, A.S.** (2010). microRNA miR-275 is indispensable for blood digestion and egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Budak, M., Güler, M., Korkmaz, E.M., Hastaoğlu Örgen, S., and Başibüyük,**

- H.H.** (2016). The characterisation and taxonomic utility of ITS2 in *Tenthredopsis* Costa, 1859 (Tenthredinidae: Hymenoptera) with some new records from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*.
- Bukeirat, M., Sarkar, S.N., Hu, H., Quintana, D.D., Simpkins, J.W., and Ren, X.** (2016). MiR-34a regulates blood-brain barrier permeability and mitochondrial function by targeting cytochrome c. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36, 387–92.
- Burzio, V.A., Villota, C., Villegas, J., Landerer, E., Boccardo, E., vd.** (2009). Expression of a family of noncoding mitochondrial RNAs distinguishes normal from cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9430–9434.
- Bushati, N., Stark, A., Brennecke, J., and Cohen, S.M.** (2008). Temporal Reciprocity of miRNAs and Their Targets during the Maternal-to-Zygotic Transition in *Drosophila*. *Current Biology*.
- CAI, X.** (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957–1966.
- Camasamudram, V., Fang, J.K., and Avadhani, N.G.** (2003). Transcription termination at the mouse mitochondrial H-strand promoter distal site requires an A/T rich sequence motif and sequence specific DNA binding proteins. *European Journal of Biochemistry* 270, 1128–1140.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., vd.** (2005). Molecular biology: The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*.
- Castellana, S., Vicario, S., and Saccone, C.** (2011). Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in Metazoa: Exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein-coding genes. *Genome Biology and Evolution* 3, 1067–1079.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N.** (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell*.
- Chang, D.D., and Clayton, D.A.** (1989). Mouse RNAase MRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondrial RNA substrate. *Cell* 56, 131–139.
- Chatterjee, S., Fasler, M., Büssing, I., and Großhans, H.** (2011). Target-Mediated

- Protection of Endogenous MicroRNAs in *C. elegans*. *Developmental Cell*.
- Chawla, G., and Sokol, N.S.** (2011). MicroRNAs in *Drosophila* development. In *International Review of Cell and Molecular Biology*.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J.** (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*.
- Chen, Q., Lu, L., Hua, H., Zhou, F., Lu, L., and Lin, Y.** (2012). Characterization and comparative analysis of small RNAs in three small RNA libraries of the brown planthopper (*nilaparvata lugens*). *PLoS ONE*.
- Chi, W., Tong, C., Gan, X., and He, S.** (2011). Characterization and comparative profiling of miRNA transcriptomes in bighead carp and silver carp. *PLoS ONE* 6.
- Christianson, T.W., and Clayton, D.A.** (1986). In vitro transcription of human mitochondrial DNA : Accurate termination requires a region of DNA sequence that can function bidirectionally 83, 6277–6281.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., vd.** (2010). A novel miRNA processing pathway independent of dicer requires argonaute2 catalytic activity. *Science*.
- Colleoni, F., Padmanabhan, N., Yung, H., Watson, E.D., Cetin, I., vd.** (2013). Suppression of Mitochondrial Electron Transport Chain Function in the Hypoxic Human Placenta: A Role for miRNA-210 and Protein Synthesis Inhibition. *PLoS ONE* 8, e55194.
- Coucheron, D.H., Nymark, M., Breines, R., Karlsen, B.O., Andreassen, M., J. vd.** (2011). Characterization of mitochondrial mRNAs in codfish reveals unique features compared to mammals. *Current Genetics* 57, 213–222.
- Craig Venter, J., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., vd.** (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351.
- Cristino, A.S., Tanaka, E.D., Rubio, M., Piulachs, M.D., and Belles, X.** (2011). Deep sequencing of organ- and stage-specific micrornas in the evolutionarily basal insect *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *PLoS ONE*.
- Czech, B., Zhou, R., Erlich, Y., Brennecke, J., Binari, R., vd.** (2009). Hierarchical Rules for Argonaute Loading in *Drosophila*. *Molecular Cell*.
- Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., and Liu, Y.** (2011). RNA interference in fungi: Pathways, functions, and applications. *Eukaryotic Cell*.

- Das, S., Bedja, D., Campbell, N., Dunkerly, B., Chenna, V., vd.** (2014). miR-181c regulates the mitochondrial genome, bioenergetics, and propensity for heart failure in vivo. *PLoS ONE* 9.
- DeLano, W.L.** (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography* 40, 82–92.
- Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S., and Moraes, C.T.** (2006). Cytochrome c Oxidase Is Required for the Assembly/Stability of Respiratory Complex I in Mouse Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 26, 4872–4881.
- Didiano, D., and Hobert, O.** (2006). Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Doench, J.G., and Sharp, P.A.** (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes and Development*.
- Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., vd.** (2009). RNAi in budding yeast. *Science*.
- Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., and Yan, S.S. Du.** (2010). Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Duarte, F. V., Palmeira, C.M., and Rolo, A.P.** (2014). The role of microRNAs in mitochondria: Small players acting wide. *Genes*.
- Efremov, R.G., and Sazanov, L.A.** (2011). Structure of the membrane domain of respiratory complex i. *Nature* 476, 414–421.
- Ellwanger, D.C., Büttner, F.A., Mewes, H.-W., and Stümpflen, V.** (2011). The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics* 27, 1346–1350.
- Ender, C., and Meister, G.** (2010). Argonaute proteins at a glance. *Journal of Cell Science*.
- Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P., and Tarassov, I.A.** (2001). 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria: Comparison of in vitro requirements. *Journal of Biological Chemistry*.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W.** (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry* 79, 351–379.
- Fahlgren, N., Howell, M.D., Kasschau, K.D., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., vd.**

- (2007). High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE*.
- Fan, F., Zhuang, J., Zhou, P., Liu, X., and Luo, Y.** (2017). MicroRNA-34a promotes mitochondrial dysfunction-induced apoptosis in human lens epithelial cells by targeting Notch2. *Oncotarget* 8, 110209–110220.
- Fan, S., Tian, T., Chen, W., Lv, X., Lei, X., vd.** (2019). Mitochondrial miRNA Determines Chemoresistance by Reprogramming Metabolism and Regulating Mitochondrial Transcription. *Cancer Research* 79, 1069–1084.
- Farh, K.K.-H., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B.P., Johnston, W.K., Lim, L.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P.** (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution (Supporting Online Material). *Science*.
- Feingold, E.A., Good, P.J., Guyer, M.S., Kamholz, S., Liefer, L., vd.** (2004). The ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) Project. *Science*.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Folmer, O., BLACK, M., HOEH, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R.** (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294–299.
- Fox, T.D.** (1996). Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: Regulation and membrane targeting. *Experientia* 52, 1130–1135.
- Friedländer, M.R., MacKowiak, S.D., Li, N., Chen, W., and Rajewsky, N.** (2012). MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research* 40, 37–52.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.H., Burge, C.B., and Bartel, D.P.** (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*.
- Fukuoh, A., Ohgaki, K., Hatae, H., Kuraoka, I., Aoki, Y., vd.** (2009). DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase. *Genes to Cells* 14, 1029–1042.
- Gagliardi, D., Stepien, P.P., Temperley, R.J., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A.A.** Messenger RNA stability in

- mitochondria: Different means to an end, 20 Trends in Genetics § (2004).
- Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G.** (2012). Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 780–788.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., vd.** (2009). C-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762–765.
- Garvin, M.R., Bielawski, J.P., Sazanov, L.A., and Gharrett, A.J.** (2015). Review and meta-analysis of natural selection in mitochondrial complex I in metazoans. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53, 1–17.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., vd.** (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*.
- Giuliani, A., Micolucci, L., Olivieri, F., Procopio, A.D., and Rippo, M.R.** (2018). MitomiRs in Human Inflamm-Aging. In *Handbook of Immunosenescence* (pp. 1–29). Cham: Springer International Publishing.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., vd.** (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., Van Dongen, S., and Enright, A.J.** (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*.
- Grimson, A., Farh, K.K.H., Johnston, W.K., Garrett-Engle, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P.** (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., vd.** (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*.
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., vd.** (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458, 223–227.
- Hall, I.M., Noma, K. ichi, and Grewal, S.I.S.** (2003). RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Hartl, M., Loschek, L.F., Stephan, D., Siju, K.P., Knappmeyer, C., and Kadow,**

- I.C.G.** (2011). A new prospero and microRNA-279 pathway restricts CO 2 receptor neuron formation. *Journal of Neuroscience*.
- Hassanin, A., Léger, N., and Deutsch, J.** (2005). Evidence for multiple reversals of asymmetric mutational constraints during the evolution of the mitochondrial genome of metazoa, and consequences for phylogenetic inferences. *Systematic Biology* 54, 277–298.
- He, P., Nie, Z., Chen, J., Chen, J., Lv, Z., vd.** (2008). Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 9, 248.
- Hertel, J., Lindemeyer, M., Missal, K., Fried, C., Tanzer, A., vd.** (2006). The expansion of the metazoan microRNA repertoire. *BMC Genomics*.
- Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K.L., Gerner, C., and Rossmanith, W.** (2008). RNase P without RNA: Identification and Functional Reconstitution of the Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme. *Cell* 135, 462–474.
- Hu, M., Ayub, Q., Guerra-Assunção, J.A., Long, Q., Ning, Z., vd.** (2012). Exploration of signals of positive selection derived from genotype-based human genome scans using re-sequencing data. *Human Genetics*.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., and Feng, Z.** (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 7455–7460.
- Hussain, M., and Asgari, S.** (2010). Functional Analysis of a Cellular MicroRNA in Insect Host-Ascovirus Interaction. *Journal of Virology*.
- Hussain, M., Frentiu, F.D., Moreira, L.A., O'Neill, S.L., and Asgari, S.** (2011). Wolbachia uses host microRNAs to manipulate host gene expression and facilitate colonization of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Hussain, M., Torres, S., Schnettler, E., Funk, A., Grundhoff, A., vd.** (2012). West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Research*.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, É., Tuschl, T., and Zamore, P.D.** (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*.
- Iovino, N., Pane, A., and Gaul, U.** (2009). miR-184 Has Multiple Roles in *Drosophila* Female Germline Development. *Developmental Cell*.

- Jagannathan, R., Thapa, D., Nichols, C.E., Shepherd, D.L., Stricker, J.C., vd.** (2015). Translational Regulation of the Mitochondrial Genome Following Redistribution of Mitochondrial MicroRNA in the Diabetic Heart. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 8, 785–802.
- Jazdzewski, K., Murray, E.L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D.R., and De La Chapelle, A.** (2008). Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Ji, J., Qin, Y., Ren, J., Lu, C., Wang, R., D. vd.** (2015). Mitochondria-related miR-141-3p contributes to mitochondrial dysfunction in HFD-induced obesity by inhibiting PTEN. *Scientific Reports* 5.
- Jühling, F., Pütz, J., Bernt, M., Donath, A., Middendorf, M., vd.** (2012). Improved systematic tRNA gene annotation allows new insights into the evolution of mitochondrial tRNA structures and into the mechanisms of mitochondrial genome rearrangements. *Nucleic Acids Research* 40, 2833–45.
- Kadener, S., Menet, J.S., Sugino, K., Horwich, M.D., Weissbein, U., vd.** (2009). A role for microRNAs in the *Drosophila* circadian clock. *Genes and Development*.
- Kamenski, P., Kolesnikova, O., Jubenot, V., Entelis, N., Krasheninnikov, I.A., vd.** (2007). Evidence for an Adaptation Mechanism of Mitochondrial Translation via tRNA Import from the Cytosol. *Molecular Cell* 26, 625–637.
- Keane, J., Tajouri, L., and Gray, B.** (2015). The Effect of Growth Hormone Administration on the Regulation of Mitochondrial Apoptosis in-Vivo. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 12753–12772.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., vd.** (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649.
- Kennell, J.A., Cadigan, K.M., Shakhmantsir, I., and Waldron, E.J.** (2012). The microRNA miR-8 is a positive regulator of pigmentation and eclosion in *Drosophila*. *Developmental Dynamics*.
- Kim, D., Sung, Y.M., Park, J., Kim, S., Kim, J., vd.** (2016). General rules for functional microRNA targeting. *Nature Genetics* 48, 1517–1526.
- Kloosterman, W.P., and Plasterk, R.H. a.** (2006). The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Developmental Cell* 11, 441–

- Korkmaz, E.M., Dogan, Ö., Durel, B.S., Temel Altun, B., Budak, M., vd.** (2018). Mitogenome organization and evolutionary history of the subfamily Cephinae (Hymenoptera: Cephidae). *Systematic Entomology*.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S.** (2019). MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research* 47, D155–D162.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S.** (2011). MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*.
- Kren, B.T., Wong, P.Y.P., Sarver, A., Zhang, X., Zeng, Y., and Steer, C.J.** (2009). microRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biology*.
- Kurihara, Y., and Watanabe, Y.** (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T.** (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA*.
- Lambert, M., Benmoussa, A., and Provost, P.** (2019). Small non-coding RNAs derived from eukaryotic ribosomal RNA. *Non-Coding RNA*.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., vd.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L.** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9, 357–359.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L.** (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10.
- Lee, I., Ajay, S.S., Jong, I.Y., Hyun, S.K., Su, H.H., vd.** (2009). New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Research*.
- Lee, R.C.** (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862–864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V.** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N.** (2002). MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO Journal*.

- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., vd.** (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*.
- Legeai, F., Rizk, G., Walsh, T., Edwards, O., Gordon, K., vd.** (2010). Bioinformatic prediction, deep sequencing of microRNAs and expression analysis during phenotypic plasticity in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Genomics* 11, 281.
- Levinger, L., Mörl, M., and Florentz, C.** (2004). Mitochondrial tRNA 3' and metabolism and human disease. *Nucleic Acids Research*.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P.** (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*.
- Li, H., Dai, B., Fan, J., Chen, C., Nie, X., vd.** (2019). The Different Roles of miRNA-92a-2-5p and let-7b-5p in Mitochondrial Translation in db/db Mice. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 17, 424–435.
- Li, S.C., Liao, Y.L., Ho, M.R., Tsai, K.W., Lai, C.H., and Lin, W.C.** (2012). MiRNA arm selection and isomiR distribution in gastric cancer. In *Series on Advances in Bioinformatics and Computational Biology*.
- Li, X., Cassidy, J.J., Reinke, C.A., Fischboeck, S., and Carthew, R.W.** (2009). A MicroRNA Imparts Robustness against Environmental Fluctuation during Development. *Cell*.
- Li, Y., Wang, F., Lee, J.A., and Gao, F.B.** (2006). MicroRNA-9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Genes and Development*.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., vd.** (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*.
- Link, F., Krohn, K., and Schumann, J.** (2019). Identification of stably expressed housekeeping miRNAs in endothelial cells and macrophages in an inflammatory setting. *Scientific Reports* 9.
- Liu, F., Peng, W., Li, Z., Li, W., Li, L., vd.** (2012). Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: Comparison between nurses and foragers. *Insect Molecular Biology*.
- Lobos-González, L., Silva, V., Araya, M., Restovic, F., Echenique, J., vd.** (2016).

- Targeting antisense mitochondrial ncRNAs inhibits murine melanoma tumor growth and metastasis through reduction in survival and invasion factors. *Oncotarget* 7, 58331–58350.
- Lopez Sanchez, M.I.G., Mercer, T.R., Davies, S.M.K., Shearwood, A.-M.J.M.J., Nygård, K.K.A., vd.** (2011). RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle* 10, 2904–2916.
- Lorenz, R., Bernhart, S.H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P.F., and Hofacker, I.L.** (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology* 6.
- Loya, C.M., Lu, C.S., Van Vactor, D., and Fulga, T.A.** (2009). Transgenic microRNA inhibition with spatiotemporal specificity in intact organisms. *Nature Methods*.
- Lung, B., Zemann, A., Madej, M.J., Schuelke, M., Techritz, S., Ruf, S., vd.** (2006). Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts. *Nucleic Acids Research* 34, 3842–3852.
- Luo, Q., Zhou, Q., Yu, X., Lin, H., Hu, S., and Yu, J.** (2008). Genome-wide mapping of conserved microRNAs and their host transcripts in *Tribolium castaneum*. *Journal of Genetics and Genomics* 35, 349–355.
- Luo, W., and Sehgal, A.** (2012). Regulation of circadian behavioral output via a MicroRNA-JAK/STAT circuit. *Cell*.
- Mallory, A.C., Hinze, A., Tucker, M.R., Bouché, N., Gascioli, V., vd.** (2009). Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing. *PLoS Genetics*.
- Maniatakis, E., and Mourelatos, Z.** (2005). Human mitochondrial tRNA^{Met} is exported to the cytoplasm and associates with the Argonaute 2 protein. *RNA*.
- Marco, A., Hui, J.H.L., Ronshaugen, M., and Griffiths-Jones, S.** (2010). Functional shifts in insect microRNA evolution. *Genome Biology and Evolution* 2, 686–696.
- Martin, M.** (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D.** (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607–620.
- Mattick, J.S.** (2009). The Genetic Signatures of Noncoding RNAs. *PLoS Genetics* 5,

e1000459.

- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S.** (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* 16, R551–R560.
- McCann, C., Holohan, E.E., Das, S., Dervan, A., Larkin, A., vd.** (2011). The ataxin-2 protein is required for microRNA function and synapse-specific long-term olfactory habituation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Mead, E.A., and Tu, Z.** (2008). Cloning, characterization, and expression of microRNAs from the Asian malaria mosquito, *Anopheles stephensi*. *BMC Genomics*.
- Meiklejohn, C.D., Montooth, K.L., and Rand, D.M.** (2007). Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends Genet* 23, 259–263.
- Meiklejohn, C.D., Montooth, K.L., and Rand, D.M.** (2007). Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends in Genetics* 23, 259–263.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., Sunkin, S.M., Mehler, M.F., and Mattick, J.S.** (2008). Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 716–721.
- Mercer, T.R., Neph, S., Dinger, M.E., Crawford, J., Smith, M.A., vd.** (2011). The Human Mitochondrial Transcriptome. *Cell* 146, 645–658.
- Messmer, M., Pütz, J., Suzuki, T.T., Suzuki, T.T., Sauter, C., Sissler, M., and Catherine, F.** (2009). Tertiary network in mammalian mitochondrial tRNA^{Asp} revealed by solution probing and phylogeny. *Nucleic Acids Research* 37, 6881–6895.
- Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Abbott, A.L., Lau, N.C., Hellman, A.B., vd.** (2007). Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genetics*.
- Miyoshi, K., Okada, T.N., Siomi, H., and Siomi, M.C.** (2009). Characterization of the miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in the *Drosophila* miRNA pathway. *RNA*.
- Murphy, D., Dancis, B., and Brown, J.R.** (2008). The evolution of core proteins involved in microRNA biogenesis. *BMC Evolutionary Biology*.
- Noh, J.H., Kim, K.M., Abdelmohsen, K., Yoon, J.H., Panda, A.C., vd.** (2016). HuR and GRSF1 modulate the nuclear export and mitochondrial localization of the lncRNA RMRP. *Genes and Development* 30, 1224–1239.

- Nyholm, A.M., Lerche, C.M., Manfé, V., Biskup, E., Johansen, P., vd.** (2014). miR-125b induces cellular senescence in malignant melanoma. *BMC Dermatology* 14, 8.
- Ofengand, J., and Bakin, A.** (1997). Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eukaryotes, prokaryotes, archaeobacteria, mitochondria and chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* 266, 246–268.
- Ojala, D., Montoya, J., and Attardi, G.** (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470–474.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C.** (2007). The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y.T., and Lai, E.C.** (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Olena, A.F., and Patton, J.G.** (2010). Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*.
- Ooi, C.H., Oh, H.K., Wang, H.Z.A., Tan, A.L.K., Wu, J., vd.** (2011). A densely interconnected genome-wide network of micrnas and oncogenic pathways revealed using gene expression signatures. *PLoS Genetics*.
- Ortega, M.A., Fraile-Martínez, O., Guijarro, L.G., Casanova, C., Coca, S., vd.** (2020). The regulatory role of mitochondrial micrnas (Mitomirs) in breast cancer: Translational implications present and future. *Cancers* 12, 1–27.
- Pan, Y.Z., Gao, W., and Yu, A.M.** (2009). MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. *Drug Metabolism and Disposition* 37, 2112–2117.
- Pang, K.C., Frith, M.C., and Mattick, J.S.** (2006). Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends in Genetics* 22, 1–5.
- Pasquali, C.C., Islam, Z., Adamoski, D., Ferreira, I.M., Righeto, R.D., vd.** (2017). The origin and evolution of human glutaminases and their atypical C-terminal ankyrin repeats. *Journal of Biological Chemistry* 292, 11572–11585.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., vd.** (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7

- heterochronic regulatory RNA. *Nature*.
- Peralta, S., Wang, X., and Moraes, C.T.** (2012). Mitochondrial transcription: lessons from mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819, 961–9.
- Petrov, A.I., Kay, S.J.E., Kalvari, I., Howe, K.L., Gray, K.A., vd.** (2017). RNACentral: A comprehensive database of non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Research* 45, D128–D134.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., and Filipowicz, W.** (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology*.
- Piriyapongsa, J., and Jordan, I.K.** (2007). A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements. *PLoS ONE* 2.
- Popenda, M., Szachniuk, M., Antczak, M., Purzycka, K.J., Lukasiak, P., vd.** (2012). Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Research* 40.
- Prefecture, C., Nagaike, T., Suzuki, T., Katoh, T., and Ueda, T.** (2005). Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* 280, 19721–19727.
- Provost, P., Silverstein, R.A., Dishart, D., Walfridsson, J., Djupedal, I., vd.** (2002). Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Qian, L., Wythe, J.D., Liu, J., Cartry, J., Vogler, G., vd.** (2011). Tinman/Nkx2-5 acts via miR-1 and upstream of Cdc42 to regulate heart function across species. *Journal of Cell Biology*.
- Quach, H., Barreiro, L.B., Laval, G., Zidane, N., Patin, E., vd.** (2009). Signatures of Purifying and Local Positive Selection in Human miRNAs. *American Journal of Human Genetics*.
- Qureshi, I.A., and Mehler, M.F.** (2012). Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Rackham, O., Shearwood, A.-M.J., Mercer, T.R., Davies, S.M.K., Mattick, J.S., and Filipovska, A.** (2011). Long noncoding RNAs are generated from the mitochondrial genome and regulated by nuclear-encoded proteins. *RNA* 17, 2085–2093.

- Rao, Z., He, W., Liu, L., Zheng, S., Huang, L., and Feng, Q.** (2012). Identification, expression and target gene analyses of MicroRNAs in *Spodoptera litura*. *PLoS ONE*.
- Rehmsmeier, M., Steffen, P., Höchsmann, M., Giegerich, R., and Ho, M.** (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Spring* 10, 1507–1517.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquienell, A.E., Bettlinger, J.C., vd.** (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*.
- Rigoutsos, I.** (2009). New tricks for animal micrornas: Targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Research*.
- Ro, S., Ma, H.Y., Park, C., Ortogero, N., Song, R., vd.** (2013). The mitochondrial genome encodes abundant small noncoding RNAs. *Cell Research* 23, 759–774.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A.** (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*.
- Ronshaugen, M., Biemar, F., Piel, J., Levine, M., and Lai, E.C.** (2005). The *Drosophila* microRNA *iab-4* causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. *Genes and Development*.
- Rottiers, V., and Näär, A.M.** (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *NRottiers, V., & Näär, A. M. (2012). MicroRNAs in Metabolism and Metabolic Disorders. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 13(4), 239–250. doi:10.1038/nrm3313ature Reviews Molecular Cell Biology 13, 239–250.*
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P.** (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*.
- Saeidimehr, S., Ebrahimi, A., Saki, N., Goodarzi, P., and Rahim, F.** (2016). MicroRNA-based linkage between aging and cancer: From epigenetics view point. *Cell Journal*.
- Saito, S., Tamura, K., and Aotsuka, T.** (2005). Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics* 171, 1695–705.
- Satta, Y., Ishiwa, H., and Chigusa, S.I.** (1987). Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. *Molecular Biology and Evolution* 4, 638–650.
- Saxena, A., and Carninci, P.** (2011). Whole transcriptome analysis: what are we

still missing? *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 3, 527–543.

Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., and Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: Identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. In *Gene* (Vol. 205, pp. 125–140).

Scarpulla, R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function, 88 *Physiological Reviews* § (2008).

Shabalina, S.A., and Koonin, E. V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology and Evolution*.

Sheng, Z.H. (2014). Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications. *Journal of Cell Biology*.

Shin, C., Nam, J.W., Farh, K.K.H., Chiang, H.R., Shkumatava, A., and Bartel, D.P. (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular Cell*.

Shock, L.S., Thakkar, P. V., Peterson, E.J., Moran, R.G., and Taylor, S.M. (2011). DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Shutt, T.E., Lodeiro, M.F., Cotney, J., Cameron, C.E., and Shadel, G.S. (2010). Core human mitochondrial transcription apparatus is a regulated two-component system in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Skalsky, R.L., Vanlandingham, D.L., Scholle, F., Higgs, S., and Cullen, B.R. (2010). Identification of microRNAs expressed in two mosquito vectors, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *BMC Genomics* 11, 119.

Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F., and Crandall, K.A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13486–13491.

Sontheimer, E.J. (2005). Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 127–138.

Srinivasan, H., and Das, S. (2015). Mitochondrial miRNA (MitomiR): a new player in cardiovascular health. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*

- Sripada, L., Tomar, D., Prajapati, P., Singh, R.R., Singh, A.K., and Singh, R.R.** (2012). Systematic Analysis of Small RNAs Associated with Human Mitochondria by Deep Sequencing: Detailed Analysis of Mitochondrial Associated miRNA. *PLoS ONE* 7.
- Sripada, L., Tomar, D., and Singh, R.** (2012). Mitochondria: One of the destinations of miRNAs. *Mitochondrion*.
- Stark, A., Kheradpour, P., Parts, L., Brennecke, J., Hodges, E., vd.** (2007). Systematic discovery and characterization of fly microRNAs using 12 *Drosophila* genomes. *Genome Research* 17, 1865–1879.
- Stewart, J.B., and Beckenbach, A.T.** (2009). Characterization of mature mitochondrial transcripts in *Drosophila*, and the implications for the tRNA punctuation model in arthropods. *Gene* 445, 49–57.
- Sun, G., Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, H., vd.** (2009). SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*.
- Sun, K., Westholm, J.O., Tsurudome, K., Hagen, J.W., Lu, Y., vd.** (2012). Neurophysiological Defects and Neuronal Gene Deregulation in *Drosophila* mir-124 Mutants. *PLoS Genetics* 8, e1002515.
- Sunnucks, P., and Hales, D.F.** (1996). Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution* 13, 510–524.
- Surridge, A.K., Lopez-Gomollon, S., Moxon, S., Maroja, L.S., Rathjen, T., vd.** (2011). Characterisation and expression of microRNAs in developing wings of the neotropical butterfly *Heliconius melpomene*. *BMC Genomics* 12, 62.
- Suyama, Y.** (1967). The Origins of Mitochondrial Ribonucleic Acids in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochemistry* 6, 2829–2839.
- Szczesny, R.J., Borowski, L.S., Brzezniak, L.K., Dmochowska, A., Gewartowski, K., vd.** (2009). Human mitochondrial RNA turnover caught in flagranti: Involvement of hSuv3p helicase in RNA surveillance. *Nucleic Acids Research* 38, 279–298.
- Szklarczyk, R., and Huynen, M.A.** (2010). Mosaic origin of the mitochondrial proteome. *Proteomics*.
- Tanzer, A., and Stadler, P.F.** (2004). Molecular evolution of a microRNA cluster. *Journal of Molecular Biology*.

- Tanzer, A., and Stadler, P.F.** (2006). Evolution of MicroRNAs. In *MicroRNA Protocols*.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I.** (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*.
- Temperley, R.J., Wydro, M., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-lightowlers, Z.M.** (2010). Biochimica et Biophysica Acta Human mitochondrial mRNAs — like members of all families , similar but different 1797, 1081–1085.
- Thomsen, S., Azzam, G., Kaschula, R., Williams, L.S., and Alonso, C.R.** (2010). Developmental RNA processing of 3'UTRs in Hox mRNAs as a context-dependent mechanism modulating visibility to microRNAs. *Development*.
- Tokusumi, T., Tokusumi, Y., Hopkins, D.W., Shoue, D.A., Corona, L., and Schulz, R.A.** (2011). Germ line differentiation factor bag of marbles is a regulator of hematopoietic progenitor maintenance during drosophila hematopoiesis. *Development*.
- Tsurudome, K., Tsang, K., Liao, E.H., Ball, R., Penney, J., vd.** (2010). The Drosophila miR-310 Cluster Negatively Regulates Synaptic Strength at the Neuromuscular Junction. *Neuron* 68, 879–893.
- Varghese, J., and Cohen, S.M.** (2007). microRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in Drosophila. *Genes and Development*.
- Varghese, J., Lim, S.F., and Cohen, S.M.** (2010). Drosophila miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, sugarbabe. *Genes and Development*.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A.** (2007). Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. *Science*.
- Voinnet, O.** (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*.
- Wang, G., Chen, H.W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., vd.** (2010). PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell*.
- Wang, G., Shimada, E., Koehler, C.M., and Teitell, M.A.** (2012). PNPASE and RNA trafficking into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*.
- Wang, Y., and Lee, C.G.L.** (2008). MicroRNA and cancer - focus on apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 12–23.

- Wanrooij, P.H., Uhler, J.P., Simonsson, T., Falkenberg, M., and Gustafsson, C.M.** (2010). G-quadruplex structures in RNA stimulate mitochondrial transcription termination and primer formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 16072–7.
- Weaver, D.B., Anzola, J.M., Evans, J.D., Reid, J.G., Reese, J.T., vd.** (2007). Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome. *Genome Biology* 8, R97.
- Wei, S.-J.J., Shi, M., Chen, X.-X.X., Sharkey, M.J., van Achterberg, C., vd.** (2010). New views on strand asymmetry in insect mitochondrial genomes. *PLoS ONE* 5, e12708.
- Wei, Y., Li, L., Wang, D., Zhang, C.Y., and Zen, K.** (2014). Importin 8 regulates the transport of mature microRNAs into the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry*.
- Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., vd.** (2009). Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nature Genetics* 41, 833–837.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G.** (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Winter, F., Edaye, S., Hüttenhofer, A., and Brunel, C.** (2007). Anopheles gambiae miRNAs as actors of defence reaction against Plasmodium invasion. *Nucleic Acids Research* 35, 6953–6962.
- Winter, J., and Diederichs, S.** (2011). Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biology*.
- Wu, G., Zhou, W., Pan, X., Sun, Y., Xu, H., vd.** (2018). miR-100 Reverses Cisplatin Resistance in Breast Cancer by Suppressing HAX-1. *Cellular Physiology and Biochemistry* 47, 2077–2087.
- Wu, Y.C., Chen, C.H., Mercer, A., and Sokol, N.S.** (2012). Let-7-Complex MicroRNAs Regulate the Temporal Identity of Drosophila Mushroom Body Neurons via *chinmo*. *Developmental Cell*.
- Xu, P., Guo, M., and Hay, B.A.** (2004). MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends in Genetics*.

- Xuan, H.P., Farge, G., Shi, Y., Gaspari, M., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M.** (2006). Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 281, 24647–24652.
- Yang, M., Lee, J.E., Padgett, R.W., and Edery, I.** (2008). Circadian regulation of a limited set of conserved microRNAs in *Drosophila*. *BMC Genomics*.
- Yang, Y., Xu, S., Xia, L., Wang, J., Wen, S., vd.** (2009). The bantam microRNA is associated with *drosophila* fragile X mental retardation protein and regulates the fate of germline stem cells. *PLoS Genetics* 5.
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y.** (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Yu, X., Zhou, Q., Li, S.C., Luo, Q., Cai, Y., vd.** (2008). The silkworm (*Bombyx mori*) microRNAs and their expressions in multiple developmental stages. *PLoS ONE*.
- Yuan, M., Da Silva, A.C.A.L., Arnold, A., Okeke, L., Ames, H., vd.** (2018). MicroRNA (miR) 125b regulates cell growth and invasion in pediatric low grade glioma. *Scientific Reports* 8.
- Zdanowicz, A., Thermann, R., Kowalska, J., Jemielity, J., Duncan, K., vd.** (2009). *Drosophila* miR2 Primarily Targets the m7GpppN Cap Structure for Translational Repression. *Molecular Cell*.
- Zhang, D.-X., and Hewitt, G.M.** (1997). Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology* 25, 99–120.
- Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., vd.** (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*.
- Zhang, X., Zuo, X., Yang, B., Li, Z., Xue, Y., vd.** (2014). MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. *Cell* 158, 607–619.
- Zisoulis, D.G., Kai, Z.S., Chang, R.K., and Pasquinelli, A.E.** (2012). Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute. *Nature* 486, 541–544.
- Zofall, M., and Grewal, S.I.S.** (2006). RNAi-mediated heterochromatin assembly in

fission yeast. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.



EKLER

EK-1 *L. saccharina* türünün haritalandığı miRNA'ların listesi

Mature_ID	L. saccharina okuma sayısı	Mature_ID	L. saccharina okuma sayısı
hsa-miR-10a-5p	485863	hsa-miR-4448	10
hsa-miR-184	288752	hsa-let-7d-5p	7
hsa-miR-100-5p	248806	hsa-miR-141-3p	5
hsa-miR-133a-3p	112830	hsa-miR-3191-5p	5
hsa-miR-9-5p	55988	hsa-miR-3149	4
hsa-let-7a-5p	48749	hsa-miR-3662	4
hsa-miR-125b-5p	19861	hsa-miR-1284	3
hsa-miR-92a-3p	13676	hsa-miR-139-5p	2
hsa-miR-375	12687	hsa-miR-3935	2
hsa-miR-1-3p	4145	hsa-miR-4286	2
hsa-miR-124-3p	2893	hsa-miR-4693-5p	2
hsa-miR-133b	2023	hsa-miR-6124	2
hsa-miR-7-5p	1041	hsa-miR-6838-5p	2
hsa-let-7c-5p	922	hsa-miR-922	2
hsa-miR-200b-5p	670	hsa-miR-103a-2-5p	1
hsa-miR-10b-5p	489	hsa-miR-1204	1
hsa-miR-1260a	440	hsa-miR-1255a	1
hsa-miR-1260b	440	hsa-miR-1304-3p	1
hsa-miR-99a-3p	380	hsa-miR-143-3p	1
hsa-miR-98-5p	213	hsa-miR-148b-5p	1
hsa-miR-210-3p	168	hsa-miR-193b-5p	1
hsa-miR-7975	119	hsa-miR-203a-5p	1
hsa-miR-1973	109	hsa-miR-206	1
hsa-let-7f-5p	80	hsa-miR-214-5p	1
hsa-miR-99a-5p	68	hsa-miR-2682-5p	1
hsa-let-7e-5p	63	hsa-miR-29c-3p	1
hsa-miR-8485	53	hsa-miR-31-5p	1
hsa-miR-574-5p	51	hsa-miR-3118	1
hsa-miR-33a-5p	48	hsa-miR-3185	1
hsa-miR-29b-3p	45	hsa-miR-3683	1
hsa-let-7b-5p	40	hsa-miR-371a-3p	1
hsa-miR-92b-3p	35	hsa-miR-3914	1
hsa-miR-183-5p	31	hsa-miR-3915	1
hsa-miR-153-3p	29	hsa-miR-4273	1
hsa-miR-219a-5p	13	hsa-miR-4300	1
hsa-let-7g-5p	12	hsa-miR-4328	1
hsa-miR-3190-3p	12	hsa-miR-4484	1
hsa-miR-4426	12	hsa-miR-4496	1
hsa-miR-9-3p	12	hsa-miR-4521	1

Mature_ID	L. saccharina okuma sayısı	Mature_ID	L. saccharina okuma sayısı
hsa-miR-4647	1	dme-miR-981-3p	7418
hsa-miR-516a-5p	1	dme-miR-252-5p	6488
hsa-miR-5191	1	dme-miR-317-3p	6428
hsa-miR-5580-3p	1	dme-miR-278-3p	5092
hsa-miR-5693	1	dme-miR-2c-3p	4606
hsa-miR-628-3p	1	dme-miR-281-3p	3931
hsa-miR-646	1	dme-miR-283-5p	3621
hsa-miR-6502-5p	1	dme-miR-13a-3p	3314
hsa-miR-6739-5p	1	dme-miR-927-5p	3295
hsa-miR-6757-3p	1	dme-miR-9a-3p	3226
hsa-miR-6873-3p	1	dme-miR-124-3p	2893
hsa-miR-7151-3p	1	dme-miR-263b-5p	2695
hsa-miR-7158-3p	1	dme-miR-1000-5p	2298
hsa-miR-7704	1	dme-miR-79-3p	2298
hsa-miR-8065	1	dme-miR-276a-5p	2288
hsa-miR-8071	1	dme-miR-276b-5p	2288
dme-bantam-3p	973380	dme-miR-927-3p	1948
dme-miR-10-5p	490899	dme-miR-190-5p	1927
dme-miR-184-3p	293395	dme-miR-993-3p	1821
dme-miR-305-5p	281487	dme-miR-2b-3p	1446
dme-miR-8-3p	205587	dme-miR-965-3p	1121
dme-miR-276a-3p	201080	dme-miR-995-3p	1100
dme-miR-263a-5p	187375	dme-miR-7-5p	1041
dme-miR-100-5p	185816	dme-miR-210-3p	869
dme-miR-281-2-5p	180763	dme-miR-137-3p	762
dme-miR-279-3p	142222	dme-miR-993-5p	538
dme-miR-14-3p	122000	dme-miR-iab-4-5p	382
dme-miR-133-3p	112823	dme-miR-10-3p	323
dme-miR-277-3p	77517	dme-miR-929-5p	267
dme-miR-9a-5p	55987	dme-miR-282-5p	255
dme-miR-275-3p	44327	dme-miR-276b-3p	141
dme-miR-307a-3p	41464	dme-miR-iab-4-3p	132
dme-let-7-5p	40663	dme-miR-87-3p	94
dme-miR-315-5p	37750	dme-miR-iab-8-5p	65
dme-miR-2a-3p	31244	dme-miR-285-3p	37
dme-miR-34-5p	23027	dme-miR-281-1-5p	28
dme-miR-9c-5p	20011	dme-miR-929-3p	25
dme-miR-125-5p	19853	dme-miR-998-3p	22
dme-miR-1-3p	18231	dme-miR-4968-3p	18
dme-miR-8-5p	17214	dme-miR-33-5p	15
dme-miR-92b-3p	11914	dme-miR-219-5p	13
dme-miR-306-5p	11266	dme-miR-190-3p	10
dme-miR-92a-3p	9593	dme-miR-2491-3p	10
dme-miR-193-3p	9337	dme-miR-980-3p	10

Mature_ID	L. saccharina okuma sayısı		
dme-miR-13b-3p	6	dre-let-7g	13
dme-miR-2492-3p	4	dre-miR-219-5p	13
dme-miR-31a-5p	3	dre-miR-9-3p	12
dme-miR-1010-5p	2	dre-miR-31	7
dme-miR-4939-3p	2	dre-let-7e	5
dme-miR-4942-3p	2	dre-miR-125c-5p	4
dme-miR-iab-8-3p	2	dre-miR-196d	2
dme-miR-1008-5p	1	dre-let-7d-5p	1
dme-miR-1014-5p	1	dre-miR-133b-5p	1
dme-miR-210-5p	1	dre-miR-133c-3p	1
dme-miR-2497-3p	1	dre-miR-15a-5p	1
dme-miR-289-5p	1	dre-miR-203a-5p	1
dme-miR-307a-5p	1	dre-miR-206-3p	1
dme-miR-4910-5p	1	dre-miR-29a	1
dme-miR-4949-5p	1	dre-miR-430a-11-5p	1
dme-miR-4967-5p	1	dre-miR-430a-12-5p	1
dme-miR-6-2-5p	1	dre-miR-430a-13-5p	1
dme-miR-961-5p	1	dre-miR-430a-14-5p	1
dre-miR-10a-5p	485777	dre-miR-430a-15-5p	1
dre-miR-184	302349	dre-miR-430a-16-5p	1
dre-miR-100-5p	248805	dre-miR-430a-17-5p	1
dre-miR-133a-3p	112830	dre-miR-430a-4-5p	1
dre-miR-9-5p	55989	dre-miR-430i-5p	1
dre-miR-99	50345	dre-miR-7b	1
dre-let-7a	48747	cel-miR-87-3p	92565
dre-miR-375	25199	cel-let-7-5p	47992
dre-miR-125b-5p	19894	cel-miR-81-3p	30694
dre-miR-92a-3p	13501	cel-miR-2-3p	23806
dre-miR-1	4145	cel-miR-1-3p	17711
dre-miR-124-3p	2893	cel-miR-34-5p	11784
dre-miR-133b-3p	2018	cel-miR-82-3p	6475
dre-miR-7a	1041	cel-miR-124-3p	2892
dre-let-7c-5p	924	cel-miR-46-3p	2861
dre-miR-10b-5p	489	cel-miR-71-5p	2644
dre-miR-210-3p	190	cel-miR-79-3p	1696
dre-miR-10c-5p	104	cel-miR-236-3p	1500
dre-let-7f	72	cel-miR-252-5p	90
dre-miR-29b	45	cel-miR-2207-5p	87
dre-let-7b	40	cel-miR-228-5p	19
dre-miR-92b-3p	35	cel-miR-72-5p	4
dre-miR-183-5p	31	cel-miR-1022-3p	2
dre-miR-153a-3p	29	cel-miR-237-3p	2
dre-miR-10d-5p	16	cel-miR-47-3p	2
		Mature_ID	L. saccharina okuma sayısı
		cel-miR-8210-3p	2

cel-miR-2217b-3p	1	ath-miR166g	2
cel-miR-356b-5p	1	ath-miR397b	2
cel-miR-74-5p	1	ath-miR837-5p	2
cel-miR-8190-5p	1	ath-miR156h	1
cel-miR-8200-3p	1	ath-miR156i	1
cel-miR-8207-3p	1	ath-miR156j	1
cel-miR-90-3p	1	ath-miR159a	1
ath-miR5658	63	ath-miR159b-3p	1
ath-miR841b-5p	9	ath-miR398b-3p	1
ath-miR414	7	ath-miR398c-3p	1
ath-miR5021	7	ath-miR5015	1
ath-miR166a-3p	2	ath-miR5630a	1
ath-miR166b-3p	2	ath-miR5630b	1
ath-miR166c	2	ath-miR781a	1
ath-miR166d	2	ath-miR781b	1
ath-miR166e-3p	2	ath-miR861-3p	1
Mature_ID	L. saccharina okuma sayısı		
ath-miR166f	2		

EK-2 *S. parreyssi* türünün haritalandığı miRNA'ların listesi

Mature_ID	S. parreyssiokuma sayısı	dme-miR-10-5p	41003
Mature_ID	S. parreyssiokuma sayısı	dme-miR-14-3p	39523
hsa-miR-184	207999	dme-miR-277-3p	26103
hsa-miR-10a-5p	40555	dme-miR-31a-5p	20581
hsa-miR-100-5p	15643	dme-miR-2a-3p	19140
hsa-miR-133a-3p	6445	dme-miR-8-3p	17118
hsa-miR-9-5p	4402	dme-miR-275-3p	17072
hsa-let-7a-5p	2349	dme-miR-34-5p	7869
hsa-miR-125b-5p	1006	dme-miR-133-3p	6444
hsa-miR-375	475	dme-bantam-3p	6414
hsa-miR-1260b	183	dme-miR-965-3p	6365
hsa-miR-1260a	182	dme-miR-100-5p	5959
hsa-miR-1-3p	169	dme-miR-252-5p	5675
hsa-miR-7975	161	dme-miR-263a-5p	4884
hsa-miR-133b	138	dme-miR-281-2-5p	4673
hsa-miR-7-5p	107	dme-miR-9a-5p	4402
hsa-miR-124-3p	79	dme-let-7-5p	2541
hsa-miR-10b-5p	44	dme-miR-8-5p	2316
hsa-miR-92a-3p	33	dme-miR-305-5p	1869
hsa-let-7c-5p	24	dme-miR-1-3p	1811
hsa-miR-200b-5p	18	dme-miR-12-5p	1579
hsa-miR-92b-3p	12	dme-miR-281-3p	1551
hsa-miR-1973	9	dme-miR-2c-3p	1361
hsa-miR-98-5p	7	dme-miR-279-3p	1129
hsa-miR-210-3p	7	dme-miR-125-5p	1009
hsa-miR-31-5p	5	dme-miR-317-3p	890
hsa-miR-8485	4	dme-miR-276b-3p	817
hsa-let-7f-5p	3	dme-miR-2b-3p	478
hsa-miR-99a-5p	3	dme-miR-283-5p	451
hsa-miR-9-3p	3	dme-miR-278-3p	411
hsa-miR-6873-3p	3	dme-miR-315-5p	384
hsa-let-7e-5p	2	dme-miR-190-5p	292
hsa-miR-574-5p	2	dme-miR-306-5p	272
hsa-miR-33a-5p	2	dme-miR-13a-3p	233
hsa-miR-29b-3p	2	dme-miR-92b-3p	218
hsa-let-7g-5p	2	dme-miR-981-3p	216
hsa-let-7d-5p	2	dme-miR-10-3p	213
hsa-miR-23a-3p	2	dme-miR-993-3p	169
hsa-miR-23b-3p	2	dme-miR-276a-5p	159
hsa-miR-7977	2	dme-miR-276b-5p	159
hsa-miR-141-3p	1	dme-miR-193-3p	157
dme-miR-276a-3p	929789		
dme-miR-184-3p	212047		

dme-miR-282-5p	146
dme-miR-263b-5p	126
Mature_ID	S. parreyssiokuma sayısı
dme-miR-993-5p	88
dme-miR-124-3p	79
dme-miR-210-3p	48
dme-miR-927-5p	35
dme-miR-92a-3p	33
dme-miR-iab-8-5p	32
dme-miR-1000-5p	30
dme-miR-932-5p	24
dme-miR-307a-5p	23
dme-miR-9a-3p	17
dme-miR-iab-4-5p	11
dme-miR-929-5p	9
dme-miR-9c-5p	6
dme-miR-87-3p	5
dme-miR-307a-3p	4
dme-miR-4968-3p	4
dme-miR-79-3p	3
dme-miR-137-3p	3
dme-miR-2491-3p	3
dme-miR-iab-8-3p	2
dme-miR-210-5p	2
dme-miR-9369-3p	2
dme-miR-252-3p	1
dme-miR-4962-3p	1
dre-miR-184	213875
dre-miR-10a-5p	40544
dre-miR-100-5p	15643
dre-miR-133a-3p	6445
dre-miR-9-5p	4404
dre-miR-375	3947
dre-let-7a	2347
dre-miR-99	1669
dre-miR-125b-5p	1010
dre-miR-1	168
dre-miR-133b-3p	137
dre-miR-7a	105
dre-miR-124-3p	79
dre-miR-10b-5p	44
Mature_ID	S. parreyssiokuma sayısı
dre-miR-31	35
dre-miR-92a-3p	34
dre-let-7c-5p	24

dre-miR-92b-3p	12
dre-miR-210-3p	9
dre-miR-10c-5p	7
dre-let-7g	3
dre-miR-9-3p	3
dre-miR-29b	2
dre-miR-23a-3p	2
dre-miR-23b	2
dre-let-7f	1
dre-miR-10d-5p	1
dre-miR-107a-5p	1
dre-miR-144-5p	1
cel-miR-72-5p	20719
cel-miR-2-3p	15794
cel-miR-34-5p	4853
cel-let-7-5p	2349
cel-miR-87-3p	2327
cel-miR-1-3p	1735
cel-miR-46-3p	703
cel-miR-236-3p	295
cel-miR-81-3p	180
cel-miR-82-3p	128
cel-miR-124-3p	79
cel-miR-71-5p	60
cel-miR-252-5p	9
cel-miR-228-5p	1
ath-miR166a-3p	12
ath-miR166b-3p	12
ath-miR166c	12
ath-miR166d	12
ath-miR166e-3p	12
ath-miR166f	12
ath-miR166g	12
ath-miR5658	1

EK-3. *L. saccharina* türünde saptanan yeni miRNA'ların genomik özellikleri

Mature_ID	Kromozom	miRDeep2 skor	Zincir yönelimi	Uzunluk	<i>Lepisma saccharina</i> okuma sayısı
Mature_52	AVCP010374385.1	1.6	+	22	1015993
Mature_95	AVCP010702715.1	2.8	-	22	291935
Mature_27	AVCP010219223.1	143535.9	-	22	281353
Mature_42	AVCP010282600.1	143535.9	-	22	281353
Mature_153	AVCP011079699.1	127121.2	-	21	248861
Mature_14	AVCP010133932.1	103689.2	-	22	201091
Mature_148	AVCP011067628.1	2.3	+	23	188346
Mature_121	AVCP010873132.1	2.9	-	23	187357
Mature_24	AVCP010194777.1	68693.7	-	23	117545
Mature_154	AVCP011088019.1	47433.6	-	22	92662
Mature_35	AVCP010256346.1	2.5	-	22	77101
Mature_23	AVCP010160419.1	1.6	-	21	52886
Mature_136	AVCP010995093.1	1.6	+	21	52886
Mature_147	AVCP011067628.1	2.0	+	22	49291
Mature_152	AVCP011079699.1	25104.2	-	22	48890
Mature_28	AVCP010219223.1	2.7	-	22	44248
Mature_8	AVCP010096795.1	20283.1	+	23	38945
Mature_98	AVCP010723435.1	1.8	-	24	37744
Mature_94	AVCP010689525.1	2.5	+	23	30213
Mature_91	AVCP010689525.1	2.2	+	22	30204
Mature_90	AVCP010689525.1	15295.2	+	23	29970
Mature_93	AVCP010689525.1	2.6	+	23	27780
Mature_34	AVCP010256344.1	11739.5	-	22	23013
Mature_110	AVCP010815770.1	0.3	-	21	16774
Mature_89	AVCP010689525.1	9799.4	+	22	16157
Mature_55	AVCP010415181.1	2.8	+	20	14949
Mature_103	AVCP010768643.1	2.6	+	19	14390
Mature_75	AVCP010619696.1	6558.6	-	22	12859
Mature_123	AVCP010877660.1	2.5	-	20	12173
Mature_138	AVCP011007464.1	2.5	+	23	9408
Mature_9	AVCP010096795.1	1.1	+	21	8624
Mature_92	AVCP010689525.1	2.1	+	23	7927
Mature_76	AVCP010631497.1	2.7	+	21	5086
Mature_10	AVCP010101942.1	0.7	+	18	4947
Mature_12	AVCP010109664.1	1.8	-	18	4814
Mature_150	AVCP011067628.1	2.3	+	21	4564
Mature_146	AVCP011065185.1	2054.4	+	18	4068
Mature_104	AVCP010768643.1	2.3	+	20	3643
Mature_99	AVCP010724791.1	1.8	+	21	2729
Mature_149	AVCP011067628.1	1725.8	+	21	2272
Mature_11	AVCP010109594.1	988.9	+	24	1927

Mature_16	AVCP010135838.1	1204.1	-	23	1768
Mature_19	AVCP010139780.1	2.5	-	21	1660
Mature_46	AVCP010320431.1	0.7	+	18	1507
Mature_145	AVCP011053726.1	1.5	+	19	1415
Mature_31	AVCP010229155.1	3	-	18	1248
Mature_109	AVCP010812125.1	2.5	-	20	1208
Mature_97	AVCP010715102.1	1.5	+	21	1119
Mature_116	AVCP010830978.1	609.8	-	23	1035
Mature_83	AVCP010657524.1	0.6	-	18	1020
Mature_124	AVCP010880437.1	2	-	23	882
Mature_113	AVCP010824284.1	2.1	+	22	875
Mature_40	AVCP010270058.1	2.4	-	21	869
Mature_58	AVCP010433078.1	0.5	+	18	792
Mature_47	AVCP010341251.1	1.8	-	18	585
Mature_20	AVCP010142688.1	0.5	+	18	582
Mature_66	AVCP010541325.1	0	+	18	408
Mature_50	AVCP010364337.1	1.9	-	20	384
Mature_48	AVCP010359598.1	153.8	+	18	334
Mature_25	AVCP010200753.1	160.3	-	20	332
Mature_107	AVCP010806048.1	138.1	+	20	271
Mature_84	AVCP010663772.1	1.5	-	20	269
Mature_85	AVCP010663772.1	0.3	-	20	269
Mature_36	AVCP010263823.1	3.1	+	18	239
Mature_37	AVCP010263823.1	3.1	-	18	239
Mature_38	AVCP010263823.1	3.1	+	18	239
Mature_39	AVCP010263823.1	3.1	-	18	239
Mature_129	AVCP010936081.1	1	-	19	201
Mature_51	AVCP010370429.1	1.4	+	18	179
Mature_22	AVCP010156282.1	2.2	+	18	153
Mature_119	AVCP010858257.1	1.4	+	18	150
Mature_32	AVCP010235015.1	1.7	-	22	113
Mature_59	AVCP010443002.1	26.3	+	19	105
Mature_7	AVCP010073593.1	1.2	+	19	104
Mature_157	AVCP011105000.1	1.6	-	18	100
Mature_87	AVCP010677552.1	1.1	+	20	87
Mature_151	AVCP011069675.1	1.5	-	21	81
Mature_115	AVCP010827402.1	1.5	+	18	79
Mature_78	AVCP010637292.1	0.6	+	18	76
Mature_30	AVCP010225717.1	0.8	+	18	72
Mature_29	AVCP010223771.1	1.2	-	18	68
Mature_82	AVCP010657475.1	1.6	+	20	65
Mature_102	AVCP010760488.1	1.1	+	19	53
Mature_140	AVCP011011558.1	2.9	+	25	51
Mature_156	AVCP011103364.1	2.4	+	18	51
Mature_127	AVCP010923413.1	0.5	-	18	50

Mature_133	AVCP010968188.1	1.6	+	21	48
Mature_6	AVCP010048374.1	1.7	+	19	47
Mature_18	AVCP010139358.1	0.9	-	18	47
Mature_54	AVCP010412076.1	2	+	22	46
Mature_88	AVCP010682849.1	1.5	+	19	46
Mature_100	AVCP010741896.1	0.1	-	18	46
Mature_141	AVCP011021579.1	1.2	+	20	44
Mature_120	AVCP010864555.1	0.3	-	18	40
Mature_68	AVCP010574927.1	1.2	+	18	37
Mature_134	AVCP010969915.1	2.8	+	20	35
Mature_101	AVCP010748231.1	0.4	-	19	34
Mature_4	AVCP010041116.1	1.3	-	18	32
Mature_144	AVCP011048218.1	0.2	+	20	32
Mature_57	AVCP010427938.1	3.5	+	18	31
Mature_112	AVCP010818399.1	1.2	+	19	30
Mature_137	AVCP010997999.1	0.5	+	20	30
Mature_44	AVCP010288916.1	1.6	-	19	28
Mature_126	AVCP010902562.1	1.3	+	19	27
Mature_1	AVCP010005239.1	1.7	+	18	25
Mature_132	AVCP010948917.1	1.5	-	18	25
Mature_160	AVCP011123235.1	0.7	+	19	25
Mature_5	AVCP010045016.1	0	+	23	24
Mature_45	AVCP010305784.1	10.2	-	18	24
Mature_62	AVCP010479890.1	2.3	-	18	24
Mature_65	AVCP010511360.1	1.3	-	18	24
Mature_33	AVCP010245081.1	0.9	-	18	23
Mature_67	AVCP010549034.1	2.5	+	20	22
Mature_74	AVCP010614993.1	2.4	+	18	21
Mature_96	AVCP010703383.1	2.5	-	19	21
Mature_135	AVCP010979046.1	2.2	+	19	21
Mature_15	AVCP010134735.1	1.8	+	18	20
Mature_73	AVCP010589270.1	1.1	+	18	20
Mature_161	AVCP011149994.1	2	-	20	20
Mature_13	AVCP010117415.1	1.6	-	18	19
Mature_17	AVCP010136587.1	0.5	-	20	19
Mature_106	AVCP010782624.1	2.2	+	18	19
Mature_114	AVCP010825650.1	2	+	20	19
Mature_118	AVCP010841328.1	1.9	-	18	19
Mature_128	AVCP010933114.1	1.6	+	19	19
Mature_53	AVCP010408273.1	1.4	+	20	18
Mature_61	AVCP010464644.1	0.5	+	18	18
Mature_142	AVCP011023671.1	0.3	+	20	18
Mature_41	AVCP010270343.1	1.9	+	20	17
Mature_143	AVCP011045400.1	0.6	+	18	17
Mature_159	AVCP011115505.1	0.6	+	18	17

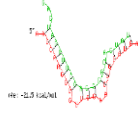
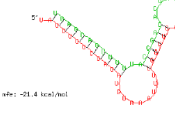
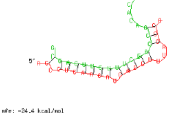
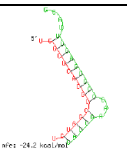
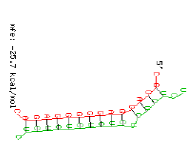
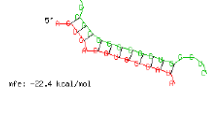
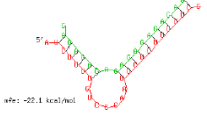
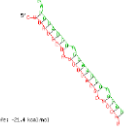
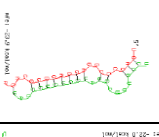
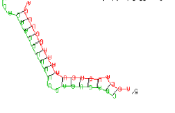
Mature_26	AVCP010207269.1	1.5	-	18	16
Mature_71	AVCP010583726.1	1.2	+	18	16
Mature_117	AVCP010840070.1	0.6	-	18	16
Mature_56	AVCP010424017.1	1.6	-	18	15
Mature_80	AVCP010646466.1	1.6	+	19	14
Mature_111	AVCP010818344.1	1.0	-	20	14
Mature_130	AVCP010943327.1	1.0	-	18	14
Mature_21	AVCP010149092.1	2.3	+	19	13
Mature_43	AVCP010285816.1	1.2	+	20	13
Mature_49	AVCP010362292.1	0.5	-	23	13
Mature_64	AVCP010502377.1	0.2	+	19	13
Mature_86	AVCP010675503.1	2.4	+	19	13
Mature_122	AVCP010875152.1	2.0	-	18	13
Mature_125	AVCP010882630.1	2.0	-	18	13
Mature_139	AVCP011010950.1	1.7	-	18	13
Mature_79	AVCP010646007.1	1.3	+	18	12
Mature_155	AVCP011102887.1	1.2	+	19	12
Mature_70	AVCP010583722.1	1.1	+	19	11
Mature_77	AVCP010636611.1	0.6	+	19	11
Mature_108	AVCP010811610.1	1.8	-	18	11
Mature_2	AVCP010013273.1	0.7	+	19	10
Mature_3	AVCP010026566.1	2.1	+	19	10
Mature_81	AVCP010646915.1	1.4	-	18	10
Mature_105	AVCP010777027.1	0.2	+	21	10
Mature_63	AVCP010497773.1	0.5	-	19	9
Mature_69	AVCP010579569.1	0.4	+	18	9
Mature_131	AVCP010946041.1	0.1	-	18	9
Mature_158	AVCP011106152.1	0.0	-	19	9
Mature_60	AVCP010459267.1	1.0	+	18	8
Mature_72	AVCP010587062.1	0.1	+	19	7

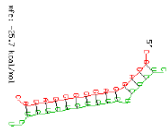
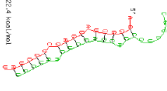
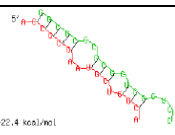
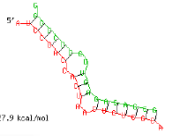
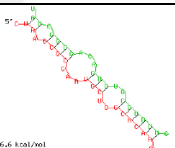
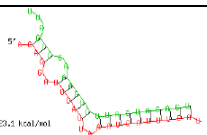
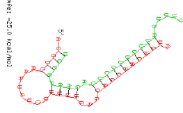
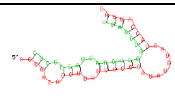
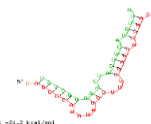
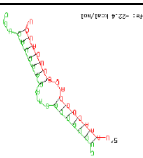
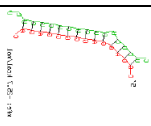
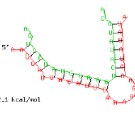
EK-4. *S. parreyssi* türünde saptanan yeni miRNA'ların genomik özellikleri

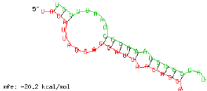
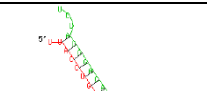
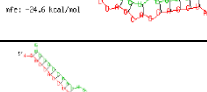
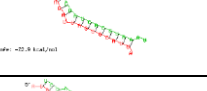
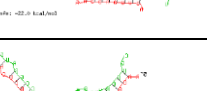
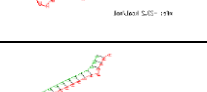
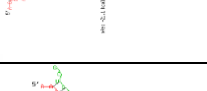
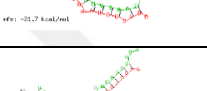
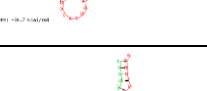
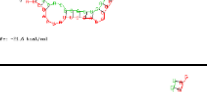
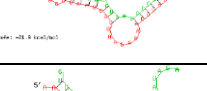
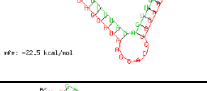
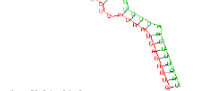
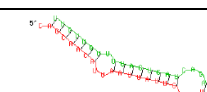
Mature_ID	Kromozom	miRDeep2 skor	Zincir yönelimi	Büyüklik	<i>S.parreyssi</i> okuma sayısı
Mature_29	NC_015870.2	474144.9	-	22	929853
Mature_60	NW_001815170.1	1.6	-	20	212703
Mature_35	NC_015870.2	21004.9	+	22	40985
Mature_8	NC_015867.2	2.4	+	22	39559
Mature_38	NC_015870.2	13311.4	-	23	26101
Mature_54	NW_001814682.1	2	+	23	21629
Mature_2	NC_015867.2	9754.7	+	22	19129
Mature_79	NW_001820527.3	9908.8	-	23	17118
Mature_27	NC_015870.2	2.3	+	22	16955
Mature_65	NW_001816259.1	7976.8	+	22	15634
Mature_21	NC_015869.2	5220.1	+	19	9600
Mature_37	NC_015870.2	2.6	-	22	7869
Mature_23	NC_015869.2	3370.6	+	23	6605
Mature_13	NC_015868.2	3288.8	-	22	6447
Mature_48	NC_015871.2	2903.7	+	21	5678
Mature_33	NC_015870.2	2.4	+	19	5612
Mature_1	NC_015867.2	2792.6	+	22	5407
Mature_52	NW_001814682.1	3482.1	-	22	5274
Mature_20	NC_015868.2	1.8	-	22	4856
Mature_24	NC_015869.2	2326.2	+	23	4402
Mature_80	NW_001820527.3	1.9	+	22	4283
Mature_30	NC_015870.2	2.4	+	21	2624
Mature_81	NW_001820749.1	2.5	+	22	2599
Mature_66	NW_001816259.1	2.6	+	21	2314
Mature_11	NC_015867.2	1.4	-	18	2197
Mature_28	NC_015870.2	1.7	+	22	1870
Mature_39	NC_015870.2	949	-	21	1856
Mature_14	NC_015868.2	968.7	-	22	1811
Mature_69	NW_001817560.1	1.6	-	18	1735
Mature_63	NW_001815237.1	2.1	+	21	1578
Mature_41	NC_015870.2	2.5	+	22	1125
Mature_62	NW_001815237.1	573.9	+	22	1107
Mature_67	NW_001816259.1	2.2	+	22	1008
Mature_3	NC_015867.2	475.7	+	22	874
Mature_75	NW_001818015.1	2	-	21	756
Mature_58	NW_001815126.1	2.2	-	20	724
Mature_74	NW_001818015.1	369	-	22	720
Mature_70	NW_001817792.1	2.4	+	23	664
Mature_6	NC_015867.2	312.7	+	24	607
Mature_61	NW_001815237.1	1.7	+	21	452
Mature_73	NW_001818015.1	2.1	-	23	442

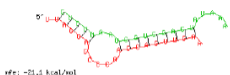
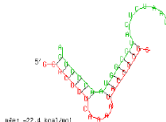
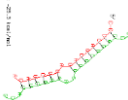
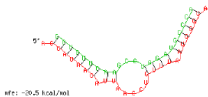
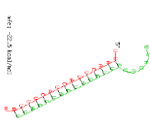
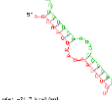
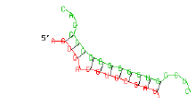
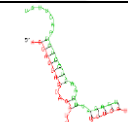
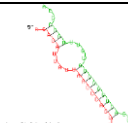
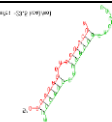
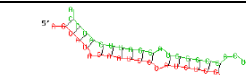
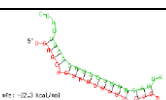
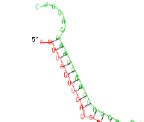
Mature_42	NC_015870.2	1.9	+	21	427
Mature_25	NC_015869.2	199.2	-	24	387
Mature_5	NC_015867.2	194.6	+	24	378
Mature_59	NW_001815126.1	2.4	-	22	357
Mature_32	NC_015870.2	1.7	+	18	309
Mature_17	NC_015868.2	2	+	18	308
Mature_47	NC_015871.2	1.9	+	23	302
Mature_4	NC_015867.2	1.8	+	23	299
Mature_50	NC_015871.2	1.8	-	24	292
Mature_45	NC_015871.2	1.1	-	18	281
Mature_19	NC_015868.2	2	+	18	280
Mature_26	NC_015869.2	2.4	-	24	248
Mature_71	NW_001817792.1	119	+	24	226
Mature_76	NW_001820404.1	1.9	-	18	193
Mature_16	NC_015868.2	2.3	-	21	188
Mature_56	NW_001815126.1	2.3	+	22	187
Mature_36	NC_015870.2	142.1	-	23	169
Mature_15	NC_015868.2	79.4	+	22	152
Mature_43	NC_015871.2	97.5	-	22	133
Mature_44	NC_015871.2	0.8	-	22	126
Mature_40	NC_015870.2	62.7	+	23	115
Mature_53	NW_001814682.1	2.1	+	24	105
Mature_78	NW_001820460.1	0.4	+	18	68
Mature_68	NW_001817459.1	1.6	-	18	54
Mature_18	NC_015868.2	2.1	-	22	51
Mature_22	NC_015869.2	26.4	-	23	47
Mature_9	NC_015867.2	2.3	-	18	42
Mature_31	NC_015870.2	1.2	+	21	40
Mature_10	NC_015867.2	1.7	-	22	36
Mature_7	NC_015867.2	22	-	21	35
Mature_77	NW_001820427.1	0.2	-	22	35
Mature_72	NW_001818015.1	1.2	-	22	34
Mature_55	NW_001815126.1	1.2	+	22	33
Mature_49	NC_015871.2	2.4	-	23	24
Mature_57	NW_001815126.1	2.4	-	18	18
Mature_12	NC_015868.2	2.1	+	20	15
Mature_64	NW_001816014.1	0.7	+	21	14
Mature_34	NC_015870.2	1.4	-	22	11
Mature_46	NC_015871.2	8.6	+	21	9
Mature_51	NW_001814682.1	4.6	+	21	8

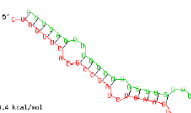
EK-5. Tespit edilen yeni miRNA' ların *S. parreyssi* mitogenomunda olası etkileşimlerinin RNAhybrid analizi sonuçları

miRNA	miRNA Okuma Sayıları	Uzunluk	MFE (kcal/mol)	Pozisyon	miRNA- Hedef Dizi Sekonder Yapısı
mature_2	19129	22	-21.5	1824- <i>cox1</i>	
mature_4	299	23	-21.4	10837-trnS	
mature_5	378	24	-24.4	8974- <i>nd4</i>	
mature_7	35	21	-24.2	13091-16S	
mature_9	42	18	-25.7	2135- <i>cox1</i>	
mature_11	2197	18	-22.4	14493-12S	
mature_12	15	20	-22.1	286- <i>nd2</i>	
mature_14	1811	22	-21.4	11463-trnW	
mature_15	152	22	-23.9	2129- <i>cox1</i>	
mature_16	188	21	-22.8	12733-trnY	

mature_17	308	18	-25.7	2135- <i>cox1</i>	
mature_18	51	22	-22.4	7595- <i>nd5</i>	
mature_19	280	18	-22.4	15110-12S	
mature_21	9600	19	-27.9	4581- <i>cox3</i>	
mature_22	47	23	-26.6	15107-12S	
mature_23	6605	23	-23.1	4910- <i>cox3</i>	
mature_25	387	24	-25	11038- <i>cytb</i>	
mature_27	16955	22	-23.5	11005- <i>cytb</i>	
mature_28	1870	22	-21.2	11037- <i>cytb</i>	
mature_30	2624	21	-22.4	14641-12S	
mature_32	309	18	-25.7	2135- <i>cox1</i>	
mature_34	11	22	-22.1	5028- <i>cox3</i>	

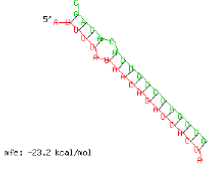
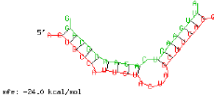
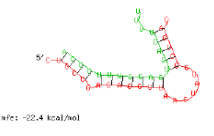
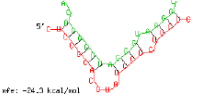
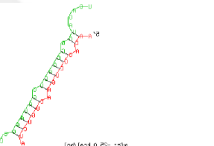
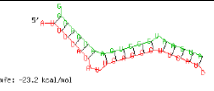
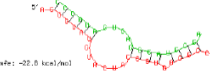
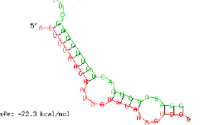
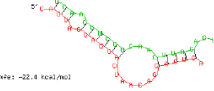
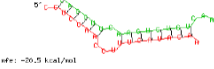
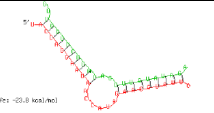
mature_35	40985	22	-20.2	2513- <i>cox1</i>	 energy: -20.2 kcal/mol
mature_36	169	23	-24.6	2064- <i>cox1</i>	 energy: -24.6 kcal/mol
mature_37	7869	22	-30.6	7455- <i>nd5</i>	 energy: -30.6 kcal/mol
mature_38	26101	23	-22.9	3033- <i>trnL</i>	 energy: -22.9 kcal/mol
mature_39	1856	21	-22	11647- <i>cytb</i>	 energy: -22 kcal/mol
mature_40	115	23	-23.2	13074-16S	 energy: -23.2 kcal/mol
mature_44	1125	22	-21.1	7573- <i>nd5</i>	 energy: -21.1 kcal/mol
mature_45	126	18	-21.7	15109- <i>trnM</i>	 energy: -21.7 kcal/mol
mature_46	281	21	-24.7	7550- <i>nd5</i>	 energy: -24.7 kcal/mol
mature_48	9	21	-21.6	3026- <i>cox1</i>	 energy: -21.6 kcal/mol
mature_49	5678	23	-21.9	7616- <i>nd5</i>	 energy: -21.9 kcal/mol
mature_50	24	24	-22.5	12070- <i>nd1</i>	 energy: -22.5 kcal/mol
mature_51	292	21	-23.2	14476-12S	 energy: -23.2 kcal/mol
mature_53	8	24	-22.5	2389- <i>cox1</i>	 energy: -22.5 kcal/mol
mature_57	105	18	-23.1	7171- <i>nd5</i>	 energy: -23.1 kcal/mol

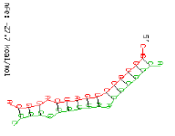
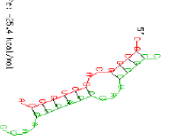
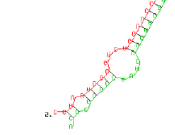
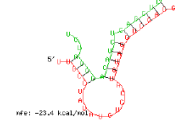
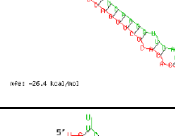
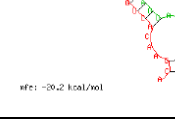
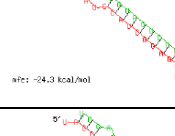
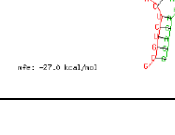
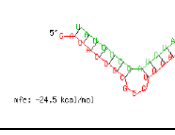
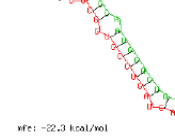
mature_61	18	21	-21.1	11645- <i>cytb</i>	
mature_62	452	22	-22.4	13491-16S	
mature_64	1107	21	-25.3	12237- <i>nd1</i>	
mature_65	14	22	-20.5	15371-12S	
mature_66	15634	21	-22.5	1209-trnC	
mature_67	2314	22	-21.7	3810- <i>nd2</i>	
mature_69	1008	18	-22.4	14493-12S	
mature_71	1735	24	-24.6	8533- <i>nd4</i>	
mature_72	226	22	-21.9	7751- <i>nd5</i>	
mature_73	34	23	-23.5	7596- <i>nd5</i>	
mature_75	442	21	-26.6	13075-16S	
mature_77	756	22	-22.3	2025- <i>cox1</i>	
mature_79	35	23	-20.8	2018- <i>cox1</i>	

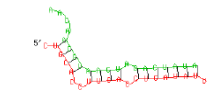
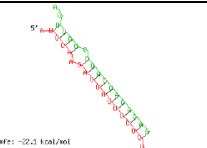
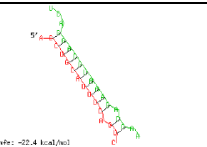
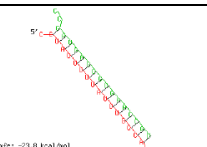
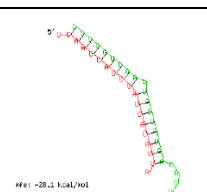
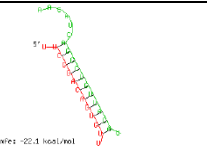
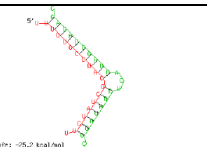
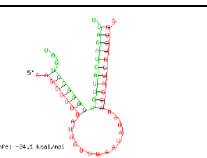
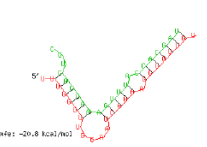
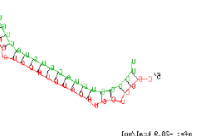
mature_80	17118	22	-23.4	13090-16S	 ref: -23.4 kcal/mol
-----------	-------	----	-------	-----------	--

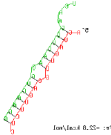
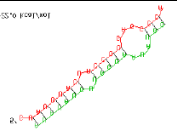
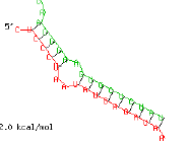
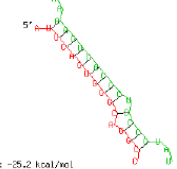
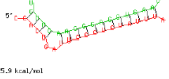
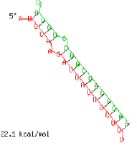
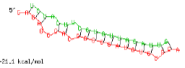
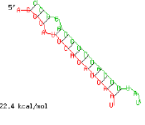
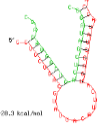
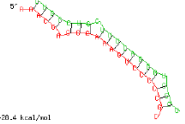
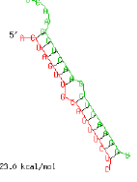


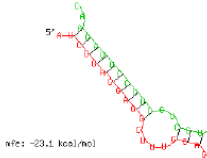
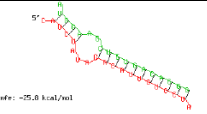
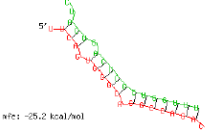
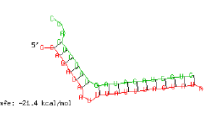
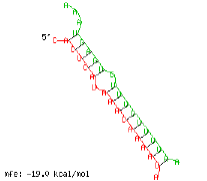
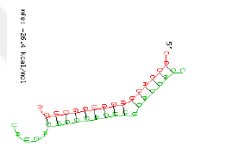
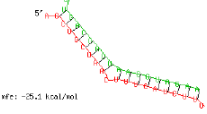
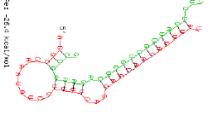
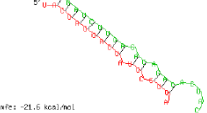
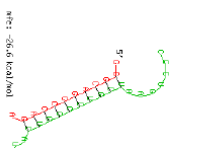
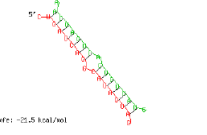
EK-6. Tespit edilen yeni miRNA' ların *L. saccharina* mitogenomunda olası etkileşimlerinin RNAhybrid analizi sonuçları

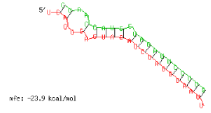
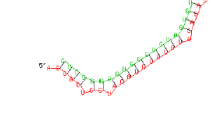
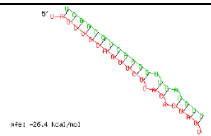
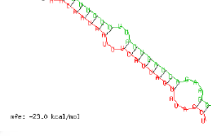
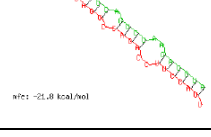
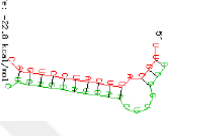
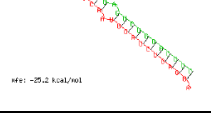
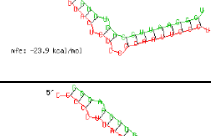
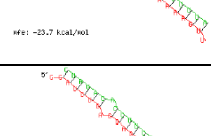
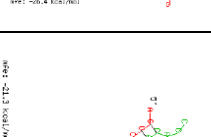
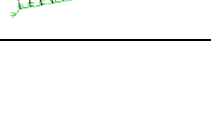
miRNA	miRNA Okuma Sayısı	Uzunluk	MFE (kcal/mol)	Pozisyon	miRNA- Hedef Dizi Sekonder Yapısı
mature_1	25	18	-23.2	4802-nd6	
_mature_2	10	19	-24	14829-cox3	
mature_3	10	19	-22.4	5133-cytb	
mature_4	32	18	-24.3	178-nd3	
mature_5	24	23	-25	11531-cox1	
mature_6	47	19	-23.2	10816-nd2	
mature_7	104	19	-22.8	5313-cytb	
mature_8	38945	23	-22.3	11502-cox1	
mature_9	8624	21	-22.4	12208-cox1	
mature_10	4947	18	-20.5	7676-16S	
mature_11	1927	24	-23.8	11680-cox1	

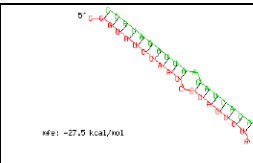
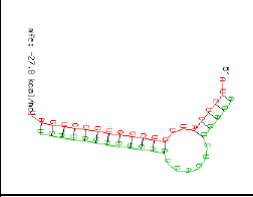
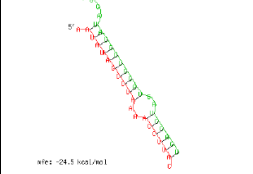
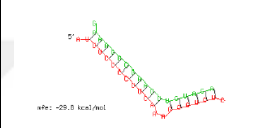
mature_12	4814	18	-27.7	11228-cox1	
mature_13	19	18	-25.4	9157-12S	
mature_14	201091	22	-22.9	8879-12S	
mature_16	20	23	-23.4	5202-cytb	
mature_17	19	20	-26.4	12547-cox1	
mature_19	1660	21	-20.2	6072-trnS	
mature_21	13	19	-24.3	10424-nd2	
mature_22	153	18	-27	10505-nd2	
mature_23	52886	21	-24.5	10034-trnC	
mature_24	117545	23	-22.3	11226-cox1	

mature_25	332	20	-20.2	8760-12S	 mfe: -20.2 kcal/mol
mature_26	16	18	-22.1	10526-nd2	 mfe: -22.1 kcal/mol
mature_29	68	18	-22.4	11146-trnY	 mfe: -22.4 kcal/mol
mature_30	72	18	-23.8	14552-cox3	 mfe: -23.8 kcal/mol
mature_34	23013	22	-28.1	13044-cox2	 mfe: -28.1 kcal/mol
mature_36	239	18	-22.1	13348-cox2	 mfe: -22.1 kcal/mol
mature_49	13	23	-25.2	5750-cytb	 mfe: -25.2 kcal/mol
mature_52	1015993	22	-24.1	4268- intergenik+trn T	 mfe: -24.1 kcal/mol
mature_54	46	22	-20.8	416-trnA	 mfe: -20.8 kcal/mol
mature_55	14949	20	-28.9	5238-cytb	 mfe: -28.9 kcal/mol

mature_56	15	18	-22.8	12545-cox1	
mature_59	105	19	-22	5316-cytb	
mature_60	8	18	-22	6030-cytb	
mature_64	13	19	-25.2	7762-16S	
mature_66	408	18	-25.9	12344-cox1	
mature_71	16	18	-22.1	10526-nd2	
mature_72	7	19	-21.1	8611-12S	
mature_74	21	18	-22.4	12118-cox1	
mature_75	12859	22	-28.3	13237-cox2	
mature_76	5086	21	-28.4	6269-nd1	
mature_77	11	19	-23	12545-cox1	

mature_78	76	18	-23.1	5416-cytb	 wfe: -23.1 kcal/mol
mature_79	12	18	-25.8	12244-cox1	 wfe: -25.8 kcal/mol
mature_81	10	18	-25.2	7763-16S	 wfe: -25.2 kcal/mol
mature_85	269	20	-21.4	15208-cox3	 wfe: -21.4 kcal/mol
mature_88	46	19	-20	6381-nd1	 wfe: -19.0 kcal/mol
mature_91	30204	22	-26.4	13460-cox2	 wfe: -26.4 kcal/mol
mature_96	21	19	-25.1	615-trnS	 wfe: -25.1 kcal/mol
mature_98	37744	24	-26.4	5331-cytb	 wfe: -26.4 kcal/mol
mature_99	2729	21	-23.6	5033-cytb	 wfe: -23.6 kcal/mol
mature_103	14390	19	-26.6	7769-16S	 wfe: -26.6 kcal/mol
mature_108	11	18	-21.5	11234-cox1	 wfe: -21.5 kcal/mol

mature_110	16774	21	-23.9	728-trnE	 wfe: -23.9 kcal/mol
mature_111	14	20	-30	5237-cytb	 wfe: -30.0 kcal/mol
mature_114	19	20	-26.4	12547-cox1	 wfe: -26.4 kcal/mol
mature_116	1035	23	-23	8378-16S	 wfe: -23.0 kcal/mol
mature_117	16	18	-21.8	7770-16S	 wfe: -21.8 kcal/mol
mature_118	19	18	-22.8	750-trnF	 wfe: -22.8 kcal/mol
mature_119	150	18	-25.2	5405-cytb	 wfe: -25.2 kcal/mol
mature_126	27	19	-23.9	5369-cytb	 wfe: -23.9 kcal/mol
mature_132	9	18	-23.7	9834-trnQ	 wfe: -23.7 kcal/mol
mature_131	25	18	-26.4	5414-cytb	 wfe: -26.4 kcal/mol
mature_145	1415	19	-21.3	1710-nd5	 wfe: -21.3 kcal/mol

mature_146	4068	18	-27.5	8990-12S	
mature_148	188346	23	-27.8	11218-cox1	
mature_152	48890	22	-24.5	6994-nd1	
mature_156	51	19	-29.8	9423-intergenik	
mature_159	17	18	-20	10523-nd2	