



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**SAFKAN ARAP YARIŞ ATLARINDA
TÜKÜRÜKTE YARIŞ ÖNCESİ VE SONRASI
LİPİD METABOLİZMASINI ETKİLEYEN
miRNA'LARIN GEN EKSPRESYONUNUN
BELİRLENMESİ**

Seda EKİCİ

**GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özge ÖZMEN**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SAFKAN ARAP YARIŞ ATLARINDA
TÜKÜRÜKTE YARIŞ ÖNCESİ VE SONRASI
LİPİD METABOLİZMASINI ETKİLEYEN
miRNA'LARIN GEN EKSPRESYONUNUN
BELİRLENMESİ**

Seda EKİCİ

GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Özge ÖZMEN

**Bu araştırma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
(TAGEM)'in TAGEM/HAYSÜD/A/19/A4/P1/999 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

ANKARA

2019

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Safkan Arap Yarış Atlarında Tükürükte Yarış Öncesi ve Sonrası Lipid Metabolizmasını Etkileyen mikroRNA’ların Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Seda EKİCİ

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Genetik Anabilim Dalında

Seda EKİCİ tarafından hazırlanan

“Safkan Arap Yarış Atlarında Tükürükte Yarış Öncesi ve Sonrası Lipid Metabolizmasını Etkileyen mikroRNA’ların Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak Oy Birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/12/2019

Doç. Dr. Selim KUL
Fırat Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU
Ankara Üniversitesi
Üniversitesi
Üye

Doç.Dr. Emel ÖZKAN ÜNAL
Tekirdağ Namık Kemal
Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL
Ankara Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Özge ÖZMEN
Ankara Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. RNA'ların sınıflandırılması ve miRNA'lar	2
1.2. miRNA'ların tarihçesi	4
1.3. miRNA'ların biogenezi	7
1.4. miRNA'ların genomik organizasyonu	10
1.4.1. İntergenik miRNA'lar	11
1.4.2. İntronik miRNA'lar	12
1.4.3. Eksonik miRNA'lar	12
1.5. Ekstraselüler miRNA'lar	13
1.6. At genomunda belirlenen miRNA'lar	13
1.6.1. miRNA'ların atlarda dokulara göre profili	15
1.6.2. miRNA'ların atlarda kromozomal dağılımları	16
1.6.3. miRNA'larında atlarda nükleotid dağılımı	17
1.6.4. Polisistronik miRNA'ların atlarda kromozomal lokalizasyonları	18
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1. Örneklerin alınması	21
2.2. miRNA izolasyonu protokolü	23
2.3. Total RNA kalite ve kantite analizi	25
2.4. cDNA eldesi	26
2.4.1. Primerler	26
2.5. miRNA ekspresyon analizi	28
2.6. İstatistiksel analizler	30
3. BULGULAR	31
3.1. Genetik analiz bulguları	31
3.2. İstatistiksel bulgular	33
4. TARTIŞMA	36
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	47
ÖZET	50
SUMMARY	51
KAYNAKLAR	52
EKLER	69
Ek.1. Etik kurul raporu	69
Ek.2. TJK'dan izin yazısı	70

Ek.3.Yarış ve öncesi ve sonrası tükürükte safkan Arap yarış atlarına ait Ct değerleri	71
Ek.4. eca-miR-122 ve eca-miR-370'e ait primerlerin qPCR görüntüleri	73
Ek.5. Primerlere ait baz dizilimlerindeki insan, at ve fare türleri arasında görülen sekans homolojisi	74
ÖZGEÇMİŞ	76



ÖNSÖZ

MikroRNA'lar (miRNA) protein kodlamayan fakat hücre içerisinde biyolojik aktivitelerin gerçekleşmesinden, hücresel yanıtı kadar pek çok önemli fonksiyonel görevi olan küçük 18-25 nükleotit (nt) uzunluğunda RNA molekülleridir. miRNA'lar, küçük boyutları, kendi üzerlerinde saç tokası şeklinde katlanmalarından dolayı sahip oldukları sap-ilmik (hairpin) yapısı, bu yapının dizi içeriği ve termodinamik özelliklerinden ötürü çevresel faktörlerden minimum derecede etkilendikleri için oldukça dayanıklıdırlar. miRNA'ların hücre içinde oldukça dayanıklı moleküller olmasına ilaveten türler arasında yüksek homoloji göstermeleri sebebiyle miRNA'lar iyi birer biyo-belirteçdir.

MiRNA'ların gen düzenlenmesindeki aktif rollerinin olması fizyolojik ve patolojik süreçlerin incelenmesinde miRNA'ları bilim dünyası için kilit noktası haline getirmiştir. Safkan Arap yarış atları yarış pistlerinde sergiledikleri performans seviyeleri için gerekli olan enerjiyi karbonhidrat oksidasyonundan ve yağdan sağlarlar. Bu nedenle safkan Arap yarış atlarında yarış performansı için yağ asitlerinin oksidatif kapasitesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada Şanlıurfa Hipodromunda aynı yarışta koşan (1200 m. kum pist) 3 yaşlı safkan Arap yarış atlarından (n=13) yarış öncesi (at dinlenme halinde iken) ve hemen yarış sonrası alınan tükürük örneklerinde (n=26) lipid metabolizması üzerinde etkinliği bilinen 8 adet miRNA'nın (*eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125a*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335*, *eca-miR-378a*) ifade seviyeleri incelenmiştir.

Çalışmalarımın başlangıcından son aşamasına kadar fikirlerini ve ilgisini esirgemediğim çalışmalarına yön veren danışmanım, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Özge ÖZMEN'e bana olan güveni ve bilimsel desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Bu süreçte desteklerini her daim yanımda hissettiğim eşim Hüsamettin EKİCİ'ye ve kızım Aybike Bahar EKİCİ'ye fedakarlıkları ve bana duydukları güven için minnetle teşekkür ederim.

Projenin örnek alımı aşamasında bize kapılarını açan Türkiye Jokey Kulubu, Şanlı Urfa Hipodromuna ve yardımlarını esirgemeyen Mehmet Eşref TAŞKIN ve Oğuz ÖZELCANAT'a emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Projenin yürütülmesine mali destek sağlayan Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'ne (Proje No: TAGEM/HAYSÜD/A/19/A4/P1/999) teşekkür ederim.

Bu süreçte bana laboratuvarlarını açarak çalışmama destek olan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL'a, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Faruk BOZKAYA ile Dr. Öğr. Ü. Akın YİĞİN'e ve yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. M. Yenal AKKURT ile Özge Şebnem ÇILDIR'a emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Celcius türünden derece, santigrat derece
%	Yüzde
Δ	Delta
Ago-2	Argonuate-2
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi (Analysis of Variance)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
circRNA	circular RNA
Ct	Eşik döngüsü (Threshold cycle)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
dsRNA	Çift zincirli RNA
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
Exportin 5	Nüklear transport reseptör-5
GYS1	Glikojen sentez 1
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
LDHA	Laktat dehidrojenaz A
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LincRNA	Long intergenic non-coding
m	Metre
μ	Mikro
μl	Mikrolitre
MikroRNA	miRNA
ncRNA	Kodlanmamış RNA
nt	Nükleotit
ORF	Open reading frame
piwiRNA	P-element induced wimpy testis RNA
pri-miRNA	Birincil-miRNA
pre-miRNA	Öncü miRNA
RISC	RNA teşvikli susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
siRNA	Short interfering RNA
S	Saniye
tiRNA	Transkripsiyon başlatıcı
UTR	Translasyona uğramayan bölge
YND	Yeni nesil dizileme metodu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	RNA'ların sınıflandırılması	3
Şekil 1.2.	Tipik miRNA yolağı	8
Şekil 1.3.	MiRNA'ların genomik organizasyonu	11
Şekil 1.4.	Atlarda miRNA'ların uzunluk dağılımı	14
Şekil 1.5.	Atlarda 29. ve 31. kromozomlar hariç 292 bilinen miRNA'nın diğer kromozomlardaki dağılımı	17
Şekil 1.6.	Atta polisistronik miRNA'ların kromozomal lokasyonları	19
Şekil 2.1.	Numune alma safhası	22
Şekil 2.2.	Yarış öncesi ve yarış sonrası safkan yarış atlarından alınan tükürük örneklerinde <i>eca-miR-27a</i> , <i>eca-miR-27b</i> , <i>eca-miR-33a</i> , <i>eca-miR-33b</i> , <i>eca-miR-125b</i> , <i>eca-miR-143</i> , <i>eca-miR-335</i> , <i>eca-miR-378a</i> ile normalizasyonda kullanılan <i>UniSp6</i> genine ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri	29
Şekil 3.1.	<i>eca-miR-27a</i> 'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri	31
Şekil 3.2.	<i>eca-miR-27b</i> 'ye ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri	31
Şekil 3.3.	<i>eca-miR-33a</i> 'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri	32
Şekil 3.4.	<i>eca-miR-33b</i> 'ye ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri	32
Şekil 3.5.	<i>eca-miR-125b</i> 'ye ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri	32
Şekil 3.6.	<i>eca-miR-143</i> 'e ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri	32
Şekil 3.7.	<i>eca-miR-335</i> 'e ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri	33
Şekil 3.8.	<i>eca-miR-378a</i> 'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası	33

- amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri
- Şekil 3.9.** *Unisp6*'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri. 33
- Şekil 3.10.** Yarış öncesi ve yarış sonrası safkan Arap yarış atlarında tükürükte belirlenen *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a* ait relatif gen ifade seviyelerindeki kat değişimleri ($p < 0.05$). 37



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Safkan Arap yarış atlarına ait veriler	23
Çizelge 2.2.	Yarış öncesi ve yarış sonrası tükürük örneklerinin kalite ve kantitesi	25
Çizelge 2.3.	RT için reaksiyon içeriği	26
Çizelge 2.4.	RT sıcaklık protokolü	26
Çizelge 2.5.	Çalışmada kullanılan primer assayler	27
Çizelge 2.6.	miRNA ekspresyon analizi için PCR içeriği	28
Çizelge 2.7.	miRNA ekspresyon analizi için reaksiyon şartları	29
Çizelge 3.1.	Yarış öncesi ve yarış sonrası safkan Arap atlarında tükürükte elde edilen <i>eca-miR-27a</i> , <i>eca-miR-27b</i> , <i>eca-miR-33a</i> , <i>eca-miR-33b</i> , <i>eca-miR-125b</i> , <i>eca-miR-143</i> , <i>eca-miR-335</i> ve <i>eca-miR-378a</i> 'nın gen ifadelerinin karşılaştırılması (p <0.05).	34

1. GİRİŞ

Canlılarda, bütün yaşamsal olayların gerçekleşmesi ve kontrolü genler tarafından sağlanmaktadır. Günümüzde memeli genomunda hücrel gen ifade seviyelerinin düzenlenmesinin yaklaşık olarak %60'ından fazlasının mikroRNA'ların (miRNA'ların) kontrolü altında olduğu bilinmektedir (Melo ve Melo, 2014). miRNA'ların gen ifade seviyelerinin düzenlenmesinde aktif olarak rollerinin olması, fizyolojik veya patolojik süreçlerin incelenmesinde miRNA'ları bilim dünyasında odak noktası haline getirmektedir (Gebert ve Macrae, 2019). Gün geçtikçe miRNA'lar ile ilgili yapılan çalışma sayısı artmaktadır (Buza ve ark., 2014; Fiorucci ve ark., 2012). miRNA'lar üzerine yapılan çalışmaların sayısının artması ile birlikte farklı genomik organizasyona sahip organizmalarda belirlenen miRNA'ların sayısı da artmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen verilere göre, 2019 yılında miRBase veri tabanında (www.mirbase.org); 271 farklı türe ait 38.589 miRNA lokusu ve 48.860 olgun miRNA tanımlanmaktadır (Kozomara ve ark., 2019).

miRNA'lar, küçük boyutları (18-25 nt), kendi üzerlerinde saç tokası şeklinde katlanmalarından dolayı sahip oldukları saç-tokası (hairpin) yapısı, bu yapının dizi içeriği ve Argonaute-2 (Ago-2) proteinlerinin termodinamik özellikleri sayesinde çevresel faktörlerden minimum derecede etkilenmektedirler (Bala ve ark., 2012; Kosaka ve ark., 2010; Kowal ve ark., 2019; Su ve ark., 2012).

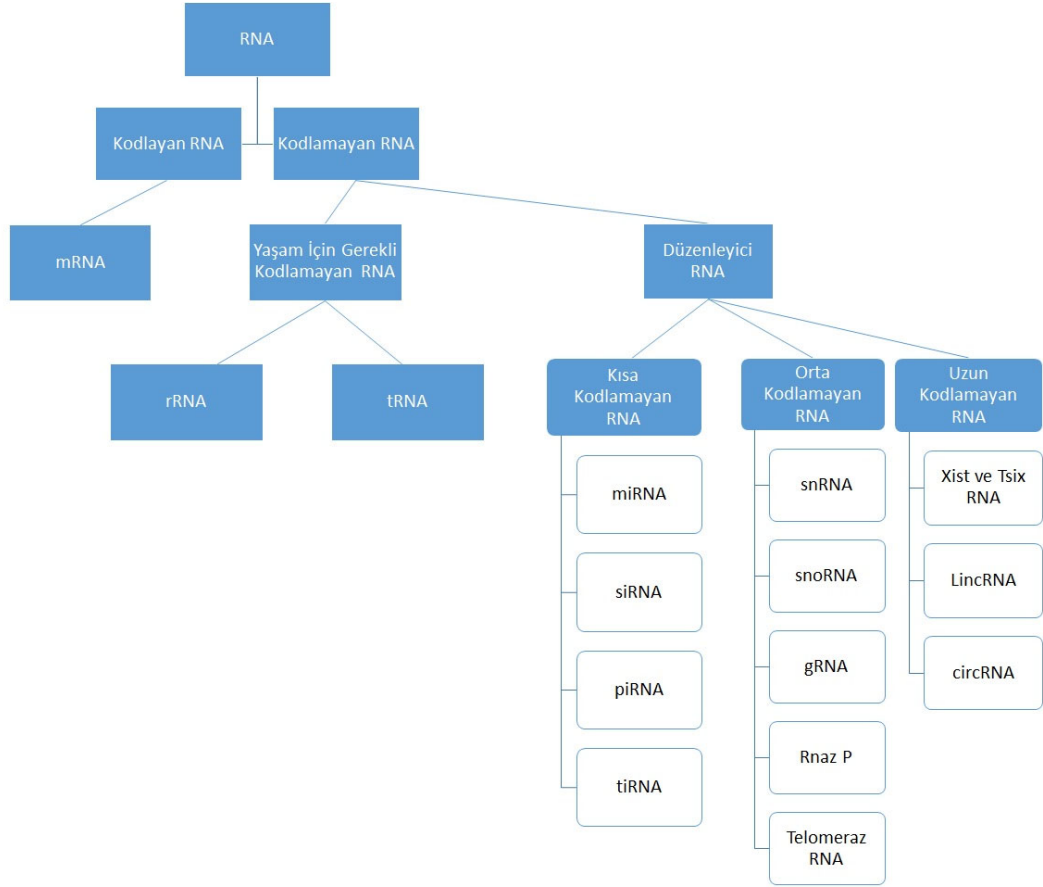
miRNA'lar, dayanıklı moleküller olmaları yanında türler arasında yüksek homoloji göstermeleri sebebiyle de iyi birer biyo-belirteçlerdir (Duttagupta ve ark., 2011; Michlewski ve Caceres, 2019; Zen ve Zhang 2012). Biyo- belirteçler normal ya da patolojik sürecin incelenmesine yardımcı olan biyokimyasal, hücrel, moleküler ve genetik değişkenlerdir. miRNA, RNA ve benzeri moleküler yapılar veya protein molekülleri biyo-belirteçlere en iyi örneklerdir. Bu moleküller doku, hücre, kan ya da tükürük gibi vücut sıvılarından ölçülebilmektedir (Bartel, 2009; Pappa ve ark., 2019; Rapado-González ve ark., 2019; Weber ve ark., 2010).

Günümüzde, teknolojinin çok hızlı bir şekilde ilerlemesi sayesinde Yeni Nesil Dizileme Metodu (YND) ile yapılan büyük ölçekli genom dizileme analizlerinden elde edilen veriler şaşırtıcı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmalar sayesinde çok hücreli karmaşık yapıya sahip gelişmiş organizmalarda daha fazla gen olabileceği beklentisinin aksine mikroskobik tek hücreli basit yapıli organizmalarda daha fazla protein kodlayan genin mevcut olduğu anlaşılmıştır (Taft ve ark., 2007). Yani genom için oldukça önemli olan gen ifade seviyelerinin düzenlemesinde sadece protein kodlayan genlerin sorumlu olmadığı belirlenmiş ve genomun protein kodlamayan karmaşık mekanizması hızla araştırılmaya başlanmıştır. Bunun neticesinde; memeli genomunun yaklaşık olarak %2'lik kısmının protein kodlayan mesajcı RNA'lerden (mRNA), diğerk % 98' lik kısmının ise protein kodlamayan uzun ve kısa RNA' lardan oluştuğu tespit edilmiştir (Birney ve ark., 2007; Kung ve ark., 2012).

1.1. RNA'ların sınıflandırılması ve miRNA'lar

Proteine çevirisi yapılmayan RNA'lara kodlanmayan RNA (non-coding RNA: ncRNA) adı verilmektedir (Akkaya ve Dinçer, 2013; Carninci ve ark., 2005). ncRNA'lar hücreyel savunmadan hücre içerisindeki biyolojik aktivitelerin gerçekleşmesine, hücreyel yanıtıtan hücrenin gelişimsel süreçlerinin tamamlanmasına kadar hücre içinde pek çok önemli fonksiyona sahiptirler (Kapranov ve ark., 2007). Ayrıca evrimsel açıdan korunmuş dizelere sahip olan bu ncRNA'ların diğerk görevleri arasında kromozomların yeniden modellenmesi ile transkripsiyonel ve post transkripsiyonel gen susturumu da bulunmaktadır (Kaikkonen ve ark., 2011).

Genom içinde yaptıkları görevler esas alınarak canlıların bütün dokularında bulunan ncRNA'lar, yaşam için gerekli ncRNA'lar ve düzenleyici ncRNA'lar olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadırlar (Akkaya ve ark., 2013). Bununla birlikte; gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu olan düzenleyici ncRNA'lar kendi aralarında nükleotit (nt) sayılarına (uzunluklarına) göre uzun ncRNA, orta ncRNA ve kısa ncRNA olmak üzere üç alt sınıfa ayrılmaktadırlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. RNA'ların sınıflandırılması.

X kromozomunun inaktivasyonunu gerçekleştiren Xist ve Tsix RNA, embriyonik pluripotent hücrelerinin üreme hücrelerine farklılaşmasında ve transkripsiyonunda görevli Long intergenic non-coding RNA (LincRNA) ve mRNA'nın post transkripsiyonel düzenleyicisi olan circular RNA (circRNA)'lar uzun düzenleyici ncRNA'lardır. Uzun düzenleyici ncRNA'ların nt sayısı 200' den büyüktür (Akkaya ve ark., 2013; Güzelgöl ve Aksoy, 2015; Kulcheski ve ark., 2016).

Post-transkripsiyonel modifikasyondan ve DNA replikasyonundan sorumlu olan orta uzunluğa sahip düzenleyici ncRNA'ların uzunlukları ise 40-200 baz çifti arasında değişmektedir. Bu ncRNA'lara küçük nüklear RNA (snRNA), küçük nükleolar RNA (snoRNA), ribonükleaz P (RNaz P), rehber RNA (gRNA), ve telomeraz RNA'lar örnek olarak verilebilir (Malone ve Hannon, 2009).

ncRNA'ların 15-40 baz çifti arasında değişen uzunlukta olanlarına kısa düzenleyici ncRNA'lar denir. mRNA'nın transkripsiyonel düzenleyicisi olan small interfering RNA (siRNA), miRNA, eşey hücrelerinde transpozon ve retroelementlerin baskılanmasından sorumlu olan PIWI-etkileşimli RNA'lar (piRNA)'lar ve transkripsiyon başlatıcı RNA (tiRNA) kısa kodlanmayan RNA'lar arasındadır (Erson ve Petty, 2008).

miRNA'ların ve siRNA'ların birbirlerinden fonksiyonel ve biyokimyasal olarak ayırt edilemezler fakat orjinlerine göre ayırt edilebilirler (Pauli ve ark., 2011). miRNA'lar çift zincirli RNA (dsRNA)'ların saç tokası şekilli öncü moleküllerden meydana gelirken, siRNA'lar uzun dsRNA'lardan oluşmaktadırlar (Güzelgöl ve Aksoy, 2015).

1.2. miRNA'ların tarihçesi

Lee ve ark. (1993) tarafından yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) üzerinde yaptıkları hücresel gelişimi inceleyen çalışmada, lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir proteini kodlamamasına rağmen 22 nt uzunluğunda küçük bir RNA'yı transkribe etmesiyle ilk miRNA, tanımlanmıştır. miRNA'lar İlk keşfedilen küçük RNA'lardır (Jha ve ark., 2011; Lee ve ark., 1993; Reinhart ve ark., 2000). *C. elegans* üzerinde yapılan daha sonraki çalışmalarda lin-4 adı verilen miRNA'nın aslında lin-14 geninin negatif düzenleyicisi olduğu anlaşılmıştır (Ruvkun ve Guisto, 1989; Almeida ve ark., 2011; Wei ve ark., 2011).

İlk olarak lin-4'ün lin-14'ü baskıladığını bildirildiğinde, lin-4'ün kodladığı yeni bir proteinin düzenleyici bir görevi olduğu düşünülmüştür. Ancak, Ambros ve ark. (1989), lin-4 genini içeren bölgeyi klonladıklarında, klonlanan bölgenin normalden daha küçük olduğunu ve bu bölgenin kodlama dizisi içermediğini ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte lin-4 gen ürününün, kısa saç tokası öncü molekülden oluşan, 22'nt lik, kodlama yapmayan küçük bir RNA olduğunu keşfetmişlerdir (Ambros, 1989).

Heterokronik genler olarak tanımlanan lin-4 ve lin-14 genleri, gelişimsel süreçte zamanlamayı kontrol eden genlerdir. Ruvkun ve ark. (1989), bu heterokronik genler üzerinde yaptıkları çalışmalarda lin-14 geninin 3'ucundaki translasyona uğramayan (UTR) bölgesinde korunmuş diziler bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışmalarda lin-4 geni ile lin-14 geninin korunmuş dizileri arasında tamamlayıcılık olduğunu ve lin-4 geninin lin-14 geninin transkripsiyon kontrolünden sorumlu olduğunu göstermişlerdir (Ruvkun ve ark., 1989).

Moss ve ark. (1997), tarafından yapılan çalışmada ise lin-4 geninin sadece lin-14 genini kontrol ettiği değil aynı zamanda lin-28 genini de kontrol ettiği bulunmuştur. *C. elegans* üzerinde yine Reinhart ve ark. (2000), yaptıkları diğer bir çalışmada larva döneminden erişkin döneme geçişten sorumlu let-7 adı verilen (21 nt) ikinci küçük RNA bulunmuştur.

Let-7 geni üzerinde yapılan daha sonraki çalışmalarda let-7 genindeki aktivasyon kaybında erişkin dönemden larva dönemine geçişin olduğu tespit edilmiş ve let-7 geninin gelişimsel zamanlamayı düzenleyen başka bir gen olan lin-41 genini kontrol ettiği belirlenmiştir (Reinhart ve ark., 2000).

Ruvkun ve ark. (2001), yaptıkları çalışmalar ile, let-7 geninin deniz kestanesinden insana kadar birçok hayvan türünde korunduğunu göstermişlerdir (Pasquinelli ve ark., 2000; Zadeoğulları ve Genç, 2011). Bilim dünyası için devrim niteliğinde olan let-7 geninin keşfi ile kısa kodlamayan RNA sınıfında bulunan ve gen ifadesinin düzenlenmesinde görevli olan bu küçük fonksiyonel RNA'lara miRNA adı verilmiştir (Almeida ve ark., 2011).

miRNA ailesinin ilk keşfedilen üyeleri ilk zamanlar geçici RNA'lar olarak adlandırılmıştır ve bulunan bu genetik molekül için miRNA terimi ilk kez 2001 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Lagos-Quintana ve ark., 2003; Lau ve ark., 2001; Lee ve Ambros, 2001). Daha önceden 2 adet tanımlanan miRNA'ların 50'den fazla

çeşidi olduğu 2000’li yıllarda tanımlanmıştır. (Zadeoğulları ve Genç, 2011).

Bilim dünyasının oldukça ilgisini çeken miRNA’lar üzerinde yapılan çalışma sayısı hızlı bir şekilde artmış ve gün geçtikçe yeni miRNA’lar bulunmuştur. Bununla beraber miRNA’ların biogenezi araştırılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalarda Hammond ve ark. (2001), küçük çift iplikli RNA’yı kesen bir enzim bulmuşlardır ve bu enzime DICER ismini vermişlerdir. Ayrıca Ruvkun ve ark. (2001), RNA interferans alanında yaptıkları çalışmalarda, DICER enziminin miRNA’nın işlenmesi, aktivasyonunda etkin bir rol oynadığını bildirmişlerdir ve bu ekipte 2006 yılında Nobel ödülünü alacak olan Antony Fire ve Creg Mello’da yer almaktadır (Bernstein ve ark., 2001; Fire ve ark., 1998; Grishok ve ark., 2001).

2000 yılında ise RISC kompleksi içinde yer alan argonat proteinlerinin RNA interferans için gerekli olduğu belirlenmiştir (Hammond ve ark., 2000). siRNA moleküllerinin hedef RNA’yı nükleaz aktivitesi içeren RNA teşvikli susturma kompleksi (RISC) aracılığı ile yıkımladığı bulunmuştur (Ketting ve ark., 2001).

İlerleyen yıllarda miRNA biyogeneze katılan enzimler ve bu enzimlerle ilişkili proteinler tanımlanmıştır (Denli ve ark., 2004; Lee ve ark., 2004). RISC’in en önemli bileşeni Argonaute protein ailesinin bir üyesidir. İki korunmuş domain yapısı ihtiva eden Argonaute proteinleri yüksek derecede korunmuş olan *Arabidopsis Ago1* veya *Drosophila* Piwi proteinleriyle olan homoloji derecelerine göre iki alt sınıfa ayrılmaktadırlar (Lund ve ark., 2004).

mRNA kesimi için temel katalitik bölge olan RISC’in temel bileşeni Argonaute proteini PAZ domaini rehber zincirin 3' ucuna bağlanmada görevlidir. PIWI domain ise yapısal olarak RNase H’in aktif bölgesine benzeyen hedef mRNA’nın kesiminde rol almaktadır (Filipowicz ve ark., 2005; Hutvagner ve ark., 2008).

miRNA’ların temel işlevleri *D. melanogaster* ve insanda let-7 keşfedilene kadar belirlenememiştir. Let-7 miRNA’sının zamana bağlı ifade modeli insanlarda

evrimsel olarak korunmuştur (Griffiths-Jones, 2004).

Çeşitli miRNA'ların farklı dokularda ve belli zaman aralıklarındaki gen ifadeleri karşılaştırılarak miRNA gen ifade modelleri ile belirlenebilir. Örneğin farede ve insanda yapılan miRNA profillemeye çalışmaları, her iki canlıda da %50'ye yakın miRNA'nın doku spesifik gen ifadesinin olduğu bulunmuştur. Doku spesifik miRNA gen ifadesi arttırıldığı takdirde öncül hücrelere özgün mRNA'ların baskılandığı ve hücrenin farklılaşma kararlılığının arttığı gözlemlenmiştir (Karp ve ark., 2011).

Daha sonraki yıllarda sineklerde, bitkilerde ve memelilerde çeşitli gelişimsel ve fizyolojik süreçleri düzenleyen ve farklı ekspresyon kalıplarına sahip olan birçok miRNA genleri belirlenmiştir (Bodur ve ark., 2010; Filipowicz ve ark., 2008).

1.3. miRNA'ların biogenezi

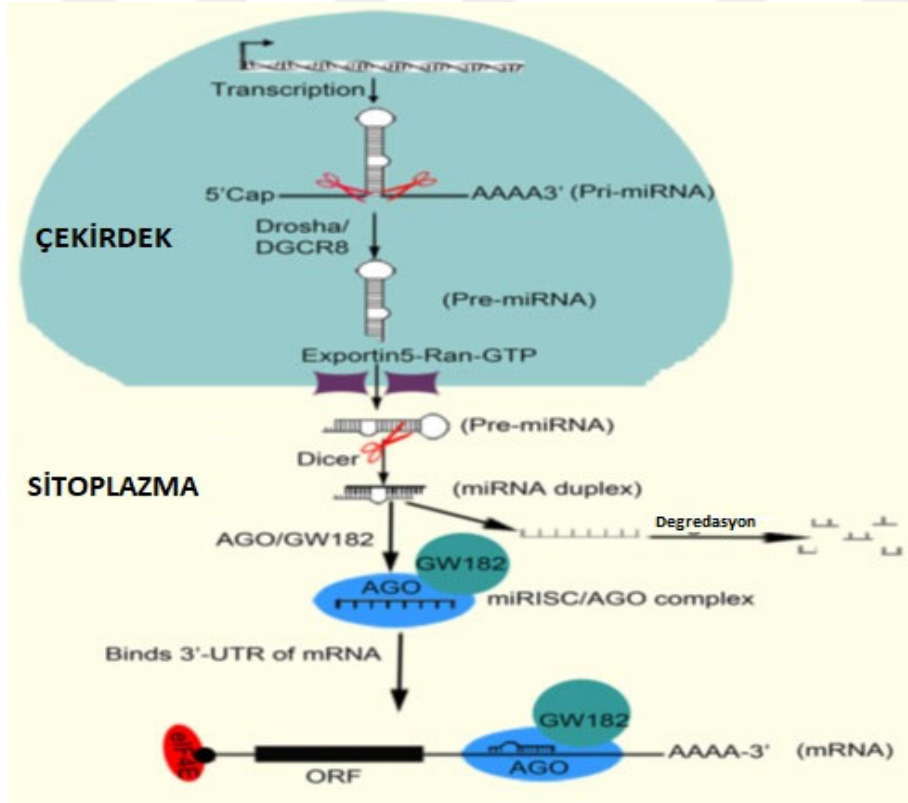
miRNA'lar, sıklıkla mRNA'nın 3' UTR'ye bağlanarak, nadiren de 5' UTR, ORF (open reading frame) ya da promotör bölgelerine bağlanarak translasyonu baskırlar veya mRNA degradasyonunu arttırırlar (Curtis ve ark., 2012). Bu mekanizmada miRNA'ların 2-8 nt uzunluğundaki “çekirdek dizisi” (seed sequence) olarak ifade edilen ana dizileri, hedef mRNA'ya tam uyumluluk sağlayarak bağlandıkları için oldukça önemlidirler (Ha ve ark., 2014; Krol ve ark., 2010; Treiber ve ark., 2012).

DNA'dan sıklıkla RNA polimeraz II ya da nadiren RNA polimeraz III enzimleri tarafından yaklaşık olarak 1000 nt uzunluğunda olgun miRNA'nın öncül transkripti birincil-miRNA (pri-miRNA) meydana gelir (Borchert ve Davidson, 2006; Kim ve ark., 2009; Lee ve ark., 2004). Karakteristik bir mRNA gibi pri-miRNA'ların da kendilerine ait 5' ucunda 7 metilguanozin başlığı ve 3' ucunda poli A kuyruğu vardır. Tek zincirden oluşan bu pri-miRNA'lar kendi üzerinde kıvrılarak

saç tokası yapısını meydana getirirler (Okamura ve ark., 2013).

RNAaz III endonükleaz olan Drosha enzimi, pri-miRNA'yı kırparak 70-100 nt uzunluğunda öncü miRNA'yı (pre-miRNA) oluştururlar. Pre-miRNA'lar (Exportin 5) proteini ile çekirdekten sitoplazmaya taşınırlar ve sitoplazmada RNAaz III ailesinin bir üyesi olan DICER enzimi, pre-miRNA'nın saç tokası yapısını keser. Kesilen RNA'lar 3' uçlarında 2 nt'lik çıkıntı kalacak biçimde 18-25 nt uzunluğunda olgun miRNA'lara dönüşürler (Güzelgöl ve ark., 2009; Pencheva ve ark., 2013; Wei ve ark., 2019). Bu gerçekleşen işlemler tipik bir miRNA yolağıdır (Şekil 1.2.).

Çift iplikli miRNA'ların bir ipliği Ago-2 bağlı RISC enzim kompleksine bağlanarak hedef mRNA'nın 3' UTR, 5' UTR, ORF bölgelerine ya da promotör bölgelerine bağlanarak translasyonu ya mRNA'yı baskılayarak ya da mRNA'yı parçalayarak engeller (Güzelgöl ve ark., 2015; Hansen ve ark., 2011; He ve Hannon, 2004; Hussain 2012; Jacques ve ark., 2019).



Şekil 1.2. Tipik miRNA yolağı (Hussain, 2012).

miRNA oluşumunda tipik yollar dışında atipik yollar da tanımlanmıştır. Atipik yollar, Drosha-bağımsız yollar ve DICER bağımsız yollar olmak üzere ikiye ayrılırlar.

En çok bilinen yolak mirtron yolağıdır. Mirtron yolağı miRNA yolağının alternatifidir ve ilk olarak *D. melanogaster* ve *C. elegans*'ta gözlenmiştir (Ladewig ve ark., 2012). Tipik pri-miRNA'lar ile kıyaslandığında mirtron yolağının öncüllerinin daha kısa olduğu bilinmektedir (Fan ve ark., 2013; Havens ve ark., 2012; Westholm ve Lai, 2011).

Bu miRNA'lar mRNA kodlayan genlerin intronlarında yer almaktadır. İtronlar Drosha enzimi tarafından kesilmeden "splicing" mekanizması ile kısa saç tokası yapısını oluşturur. DBR1 (insanda) enzimi oluşan bu yapının uçları ile kesilerek Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınır ve DICER enzimi ile kesilerek olgun miRNA'lar oluşturulur (Vedanayagam ve ark., 2019).

Klasik mirtron yolağının dışında 3' veya 5' bölgelerinde uzantıları olan mirtron yolları da mevcuttur. *miR-1017* en iyi bilinen 3' uzantılı bir mirtron tipidir ve *D. melanogaster*'da bulunur. 3' uzantılı mirtronların oluşumunda ilk aşama intronların kırılma yaparak saç tokası şeklini oluşturmasıdır. Ldbr enzimi ile bu saç tokası yapısı kesimine uğrayarak 3' ucunda 100 nt'lik bir uzantısı olan 3', uzantılı mirtronları oluştururlar. 3'→5' ekzonükleazlar ile bu 3' uzantılı mirtronların 3' ucundaki uzantılar uzaklaştırılır. Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınan bu mirtronlar, DICER enziminin kesimiyle olgun miRNA'ları oluştururlar (Perron ve ark., 2008; Westholm ve Lai, 2011).

Memelilerde ve kuşlarda çok sayıda 5' uzantılı mirtron tipi olduğu belirlenmiştir. Memelilerde 5' uzantılı mirtron tipi olan *miR-1982* tanımlanmıştır ve Drosha enzimi tarafından kesime uğramayan bu mirtron tipinin 5' ucunda 11 nt'lik overhang çıkıntısı mevcuttur. Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınmadan önce henüz tanımlanamayan bir ekzonükleaz ile bu mirtron tipinin 5' ucundaki uzantının

kesildiği belirlenmiştir (Güzelgöl ve ark., 2015).

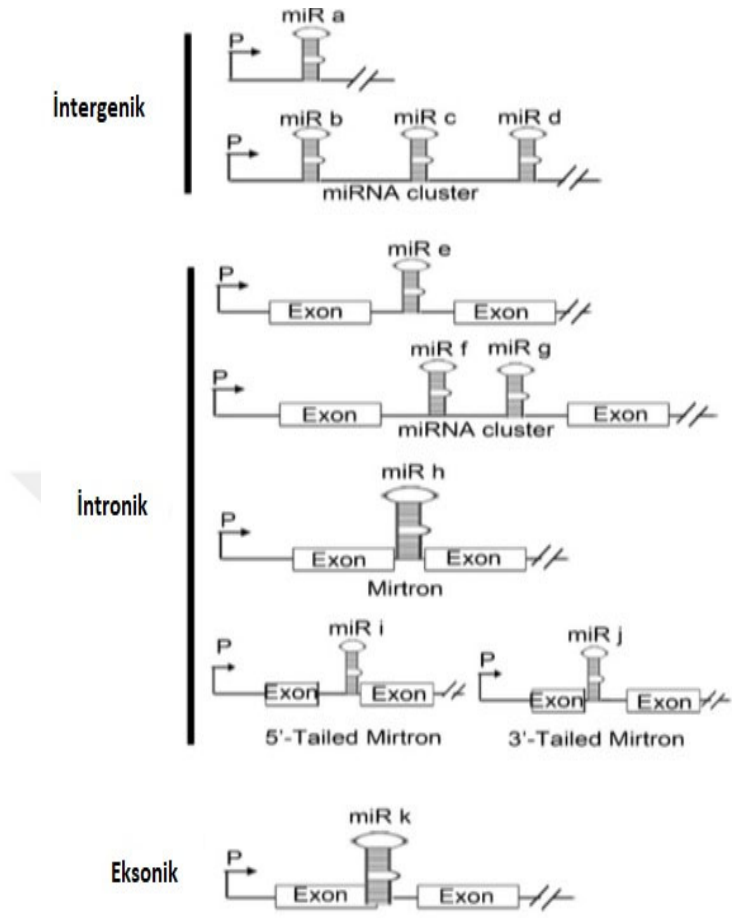
Drosha bağımsız atipik yollara *miR-320* ve *miR-484* örnek olarak verilebilir. Bu yollarda RNA'lar kırılma yapılmaksızın kendiliğinden kısa pre-miRNA benzeri saç tokası yapısı oluştururlar ve direk olarak DICER enzimi tarafından kesime uğrarlar (Curtis ve ark., 2012). Ayrıca tRNA benzeri yapılar, pre-tRNA ve endo-siRNA yapıları da Drosha enzimine gerek duymadan olgun miRNA'yı oluşturmaktadırlar (Curtis ve ark., 2012).

pre-miR-451 ve pre-tRNA' larda DICER-bağımsız miRNA yollarını kullanmaktadır. DICER-bağımsız atipik miRNA yollarının arasından en çok günümüzde bilinen simtron yolağıdır. Simtron yolağında; miRNA öncülleri DGCR8' i (DiGeorge syndrome critical region gene 8: çift zincirli RNA-bağlayıcı; doublestranded RNA-binding domain; dsRBD) ya da kırılma mekanizmasını kullanmayarak Drosha tarafından direk olarak kesilip pre-miRNA'yı oluştururlar (Hentze ve Preiss, 2013). Exportin 5, Dicer ve Ago 2 olmadan bu yollarda pre-miRNA' lardan olgun miRNA' lar sentezlenmektedir (Curtis ve ark., 2012).

miRNA'nın bazı tipleri tarafından circRNA'ların işlevlerinin bloke edildiği son zamanlarda yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Hansen ve ark. (2013) ile Memczak ve ark. (2013), circRNA tipi olan CIRS-7 (CDR1az), miR-7'nin "sponge"u olarak görev aldığını ve böylece miRNA'ların hedef mRNA yerine circRNA'ya bağlanarak miRNA'ların translasyonu inhibe etmesini engellediğinden söz etmektedirler (Broderick ve ark., 2014; Cheng ve Lin, 2013; Hentze ve ark., 2013; Ledford, 2013).

1.4. miRNA'ların genomik organizasyonu

miRNA'lar Y kromozomu hariç tüm kromozomlarda bulunmaktadır. Genom üzerinde yerleşimlerine göre intergenik, intronik ve eksonik olmak üzere üç grupta incelenirler (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. miRNA'ların genomik organizasyonu. (miR a), İntergenik miRNA; (miR b-miR c-miR d), İntergenik miRNA kümesi; (miR e), intronik miRNA; (miR f, miR g) intronik miRNA kümesi; (miR h) mirtron; (miR I, miR j). 3've 5' intronik miRNA 'lar; (miRk) Eksonik miRNA) (Hussain, 2012).

1.4.1. İntergenik miRNA'lar

Bilinen miRNA fonksiyonel transkripsiyon ünitelerinin dışında yer alırlar. Kendilerine ait promotor ve diğer düzenleyici faktörlerine sahiptirler. Monosistronik olabildiği gibi polisistronik de olabilmektedir (Lagos-Quintana ve ark., 2003).

1.4.2. İntronik miRNA'lar

İntronik miRNA'lar protein kodlayan ya da kodlamayan genlerin intron kısımlarında bulunurlar. Bu miRNA'lar kendi promotor bölgelerine sahip olabilir ya da ev sahipliği yapan gen ile birlikte transkribe edilip pre-mRNA'dan elde edilebilirler (Lagos-Quintana ve ark., 2003). Bazı özel durumlarda protein kodlayan genin intronunun tamamı tam olarak bu intronik miRNA'lar için pre-miRNA görevi görmektedirler. Bu gibi intronlar mirtron olarak isimlendirilir (Okamura ve ark., 2007).

1.4.3. Eksonik miRNA'lar

Eksonik miRNA'lar genom içinde çok nadir görülmektedirler. Kendilerine ait promotor bölgeleri mevcut değildir. Bulundukları ilgili genin promotoru ile transkribe edildikleri düşünülmektedir (Rodriguez ve ark., 2004).

1.5. Ekstraselüler miRNA'lar

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ekstraselüler miRNA'ların hücreler arası iletişimde önemli görevlerinin olduğu tespit edilmiştir (Kosaka ve ark., 2010). Bununla beraber, miRNAların hücreler arası genetik bilginin aktarımındaki rolü araştırılmaktadır (Bala ve ark., 2012).

Genom üzerinde miRNA'ların hücre dışına çıkışı ve hücre dışı dolaşımında bulunan RNaz yıkımından etkilenmeden stabil kalabilmesi ile ilişkili çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmalar, miRNA'ların ekzosom ve mikroveziküller gibi ekstraselüler veziküller aracılığıyla membranla çevrili olarak hücreden sekrete edilebilmesi, AGO2 gibi RNA bağlayıcı proteinlerle, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) gibi lipoproteinlerle

kompleks oluşturarak hücreden aktif olarak salınabilmesi ya da apoptotik/nekrotik hücrelerden pasif olarak salınabilme özellikleridir (Valadi ve ark., 2007; Vickers ve ark., 2012). Bu nedenle miRNA'lar dolaşım sisteminin yanı sıra tükürük, serebrospinal sıvı, idrar, gözyaşı, seminal sıvı ve anne sütü gibi diğer biyolojik sıvılarda da bulunurlar (Courts ve ark., 2011; Weber ve ark., 2010; Zaiou, 2019).

1.6. At genomunda belirlenen miRNA'lar

Equus caballus (evcil at) insan uygarlığının çok önemli bir parçası olup taşıma ve eğlence için kullanılmaktadır ve ekonomik açıdan önemlidir (Wade ve ark., 2009; Vila ve ark., 2001). Ayrıca insan ile at arasında tıbbi açıdan alerji ve osteoartrit gibi kalıtsal olan doksandan fazla hastalık ortaklıdır (Chowdhary ve ark., 2008; Nicholas ve ark., 2003).

Egzersiz fizyolojisi ve biyomekanik çalışmak için en iyi model organizma attır. Ayrıca eğlence dünyası için ülkemizde dahil bir çok toplumda at, ekonomik olarak oldukça önemli bir konumda olmasına rağmen, atlar üzerinde miRNA'lar ve miRNA'ların klinik kondüsyonlar üzerine etkisi hakkındaki çalışmalar oldukça azdır (Lacourt ve ark., 2012; Yang ve ark., 2010).

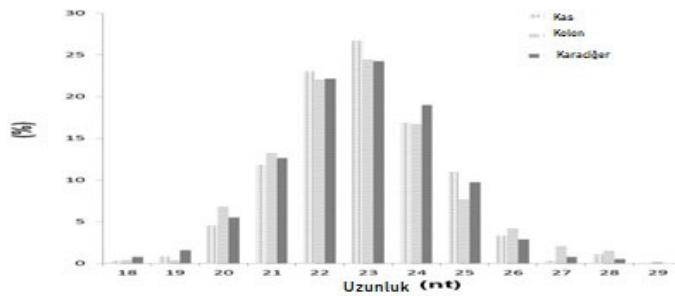
Zhou ve ark. (2009), tarafından 354 olgun at miRNA'sı in silico analitik yöntem kullanılarak tanımlanmıştır. Bu çalışma atlar üzerinde yapılan ilk miRNA çalışmasıdır. Bu çalışmanın sonucunda fertilite ve üremenin düzenlenmesinde sperm fonksiyonlarında, miRNA'ların rolünün olduğu düşünülmüş ve 82 adet yeni miRNA at sperminde tespit edilmiştir.

Direkt klonlama teknolojisi kullanılarak Barrey ve ark. (2010), tarafından miyopatik ve sağlıklı atlarda kas dokusunda miRNA'ların ifade profilinin belirlenmesi için yapılan çalışma ise at miRNA'sı hakkında yapılan ikinci önemli çalışmadır. Bu çalışmada Barrey ve ark. (2010), kalıtsal kas hastalığına sahip olan

atların kan örneklerinde kas için spesifik olan miRNA'ların varlığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen veriler neticesinde atlarda kas patoloji tanısı için yeni miRNA'ların bulunmasına olanak sağlanmıştır. Ayrıca daha ileri çalışmalar ile kandaki dokuya özel miRNA'ların profillemesinin yapılabilceği bu şekilde organ hasarları ve çeşitli hastalıkların tanımlanmasında miRNA'ların önemli biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği ispatlanmıştır.

miRNA'ların fonksiyonlarının tam olarak anlaşılması için miRNA'ların normal dokulardaki karakterizasyonunun belirlenmesi oldukça önemlidir. Kim ve ark. (2014), tarafından YND teknolojisi kullanılarak, 8 safkan attan aldıkları iskelet kasından, karaciğerden ve kolondan elde ettikleri örnekler ile yaptıkları çalışmada; 292 adet bilinen miRNA ve bunlardan hariç 329 adet yeni miRNA tanımlamışlardır. Bu çalışmada; yüksek verimlilikte miRNA'ların kısa okuma sekanslarının 21.838.589 ile 11.973.300 arası değişen sayılarda okuma sonucu ile elde edilen yaklaşık % 100 yüksek kalitede cDNA'ların küçük RNA kütüphanesi elde edilmiştir. Ayrıca 18 nt ve 30 nt arasında değişen ve en çok 22 nt uzunluğunda küçük RNA'lar tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışma sonrası atlarda kas, kolon ve karaciğer dokularında tespit edilen miRNA'ların uzunlukları ve dağılımları belirlenmiştir. At dokularında belirlenen bütün miRNA'ların yaklaşık % 83'nün sekansları 20-24 nt aralığında yoğunlaşmaktadır. Tespit edilen bu miRNA'larda en sık gözlenen uzunluğun tüm dokularda 23 nt olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Atlarda miRNA'ların uzunluk dağılımı (Kim ve ark., 2014).

Kim ve ark. (2014), yaptıkları bu çalışma neticesinde; miRNA'ların ana dokularda ekspresyon modelleri dâhil, at miRNA özellikleri, sırası, bileşimi ve kromozomal dağılımları belirlenmiştir. Bu nedenledir ki Kim ve ark. (2014), yaptıkları bu çalışma, atlarda patolojik ve fizyolojik durumlarda miRNA'ların rolü üzerine araştırmalara ışık tutacak önemli bir bilgi kaynağıdır.

1.6.1. miRNA'ların Atlarda dokulara göre profili

Atlar barsaklarda boğumlanma, tıkanma ve volvulus dahil olmak üzere birçok sendromla sonuçlanan ölümcül bir hastalık kompleksi olan koliğin gelişmesine yatkın hayvanlardır. Laparotomi operasyonu geçiren atların yaklaşık %34'ünde karın boşluğunda geniş alan olması nedeniyle serbest hareketlilikten dolayı büyük kolonun yer değiştirmesi ya da volvulus görülmüştür (Mair ve ark., 2005). Ne yazık ki, atlarda kolik büyük bir sorun olmasına rağmen kolik nedenleri hakkında kesin bilgiler mevcut değildir. Ayrıca atlar, atların anatomisi ve insan kullanımı sonucunda, çeşitli kas hastalıkları miyopatiler dahil kronik yorgunluk sendromu ve beslenme miyopatileri gibi hastalıklar nedeniyle sürekli hasta olurlar (Freestone ve ark., 1991).

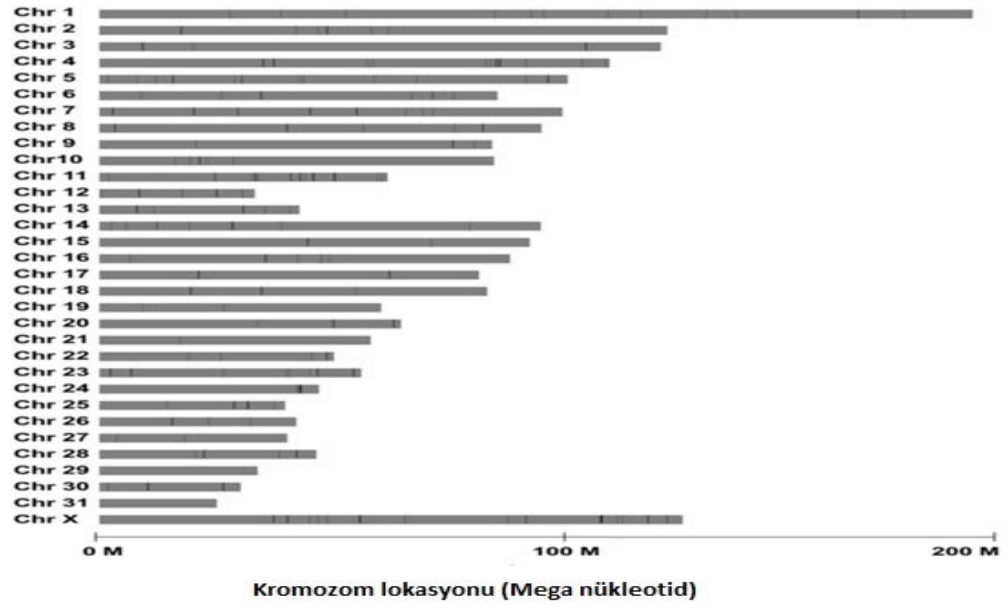
Organ spesifik miRNA'ların belirlenmesi hastalıklar açısından oldukça önemlidir. Atlarda, başlıca organlarda (iskelet kası, karaciğer ve kalın bağırsak) belirlenen miRNA'ların karakterizasyonu önemli at hastalıkları ile doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir (Kim ve ark., 2014).

Kim ve ark. (2014), tarafından yapılan çalışmada at dokularında, daha önceden belirlenen miRNA'lar ve o miRNA'lara ait öncü miRNA'lar için miRBase veri tabanı ile hizalama yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda at dokularında belirlenen miRNA'lar analiz edilmiş ve alt kümeler şeklinde kas dokusunda 36 adet, kolon örneklerinde 99 adet ve karaciğerde 31 adet miRNA tespit edilmiştir. Ayrıca atlarda yeni aday miRNA'ların belirlenmesi için Mireap yazılımı

(<http://sourceforge.net/projects/mireap/>) kullanılmıştır ve ikincil yapılarda ve DICER kesilme mevkilerinin ve bu miRNA'ların minimum serbest enerjileri tespit edilmiştir. Yapılan bu analitik analiz veri sonuçlarına göre atlarda 329 adet bilinmeyen miRNA sekansı yeni aday miRNA olarak tanımlanmıştır. Bu belirlenen miRNA'ların uzunluğu 20-24 nt aralığında tespit edilmiştir. Ayrıca bu belirlenen miRNA'lar arasında en sık rastlanan uzunluk 21 ile 22 nt. olarak belirlenmiştir. Bununla beraber atlarda miRNA'ların dokuya özel (kas örneklerinde 31 adet, kolon örneklerinde 123 adet ve karaciğer örneklerinde 45 adet) bir biçimde eksprese edilmiş olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre hem bilinen hem de yeni miRNA'ların kolonda diğer dokulara göre daha fazla oranda olduğu tespit edilmiştir. Diğer memelilerinin aksine atlarda kalın bağırsağın karmaşık olan anatomik yapısı ve fizyolojik fonksiyonu sürekli olarak sindirim akışını kolaylaştırmaktadır (Galuppo ve ark., 1995). Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, kolon özgü miRNA'ların kolonun düzenleyici sisteminde oldukça önemli görevlerinin olduğunu ortaya koymuştur (Jin ve ark., 2009).

1.6.2. miRNA'ların atlarda kromozomal dağılımları

Atlarda 29. ve 31. kromozomlar hariç diğer kromozomlar arasında bilinen 292 adet miRNA haritalanmıştır. Bu haritalama aşamasında, yaklaşık olarak bu miRNA'ların 160 tanesinin 3 kb yakınlıkta kümeler halinde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Birbirine 3 kb yakınlıkta iki miRNA mevcut ise aynı küme içinde olarak kabul edilmektedir (Liang ve ark., 2007). At genomunda bilinen 51 adet miRNA kümesi vardır ve bu miRNA kümeleri bireysel kromozomların üzerinde değişik bölgelerde lokalize olmuştur. Örneğin, 6., 12., 14., 16., 18. ve 20. kromozomlarda 2 adet miRNA geni bulunurken 24. kromozomda 4 miRNA kümesinde 40 miRNA geni olduğu bildirilmektedir (Kim ve ark., 2014) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Atlarda 29. ve 31. kromozomlar hariç 292 bilinen miRNA'nın diğer kromozomlardaki dağılımı (Siyah dikey çizgiler miRNA genini, renk derinliğini bu bölgede miRNA gen sayısını temsil eder) (Kim ve ark., 2014).

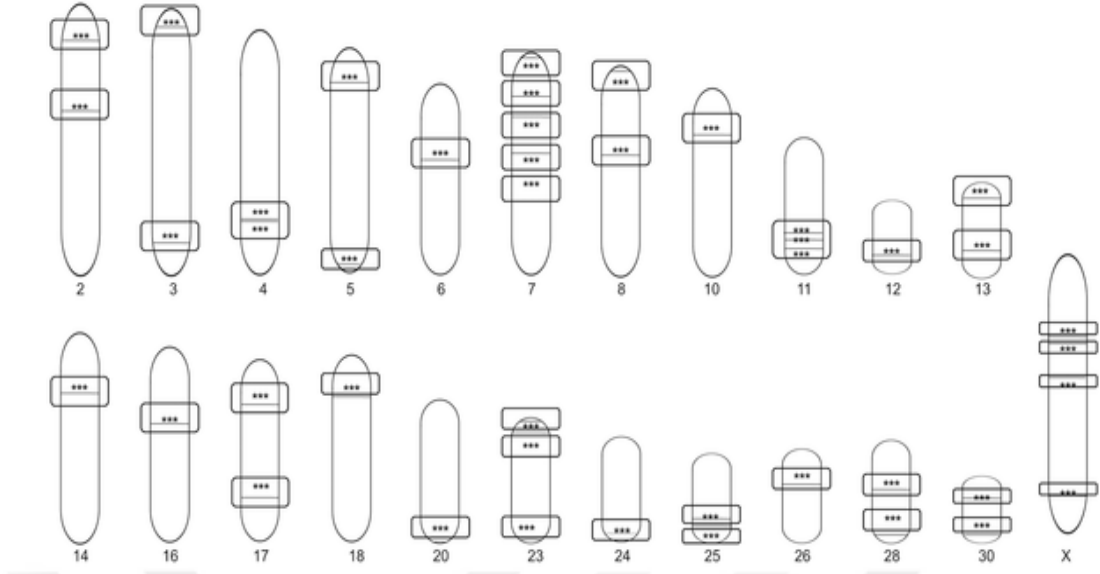
1.6.3. miRNA'ların Atlarda Nükleotid Dağılımı

miRNA'ların çekirdek sekansı miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanmasında oldukça önemli olduğu için miRNA'ların 5' uç dizilerinin karakterizasyonu önemlidir (AI ve ark., 2010; Engels ve Hutvagner, 2006). Ökaryotlarda miRNA'ların nükleotid sekans analizinin 5' pozisyonunun açık bir şekilde U ve A için eğilimli olduğu bilinmektedir (Frank ve ark., 2010). At genomunda Kim ve ark. (2014)'nın yaptıkları çalışma sonucunda dokuya özel miRNA'ların 5' ucunda en sık U nükleotidin olduğunu ve onun ardından da A nükleotidin geldiği belirlenmiştir. Bu bulgular diğer organizmalar ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile tutarlıdır (AI ve ark., 2012). Ayrıca Kim ve ark. (2014), yapmış oldukları çalışmada, tüm doku miRNA'larında üçüncü ve altıncı pozisyonlarda C+G yüzdeleri yüksek olduğu belirlenmiştir. miRNA çekirdeğindeki 6. pozisyonadaki C+G içeriği oldukça önemlidir çünkü bu bölgenin miRNA için fonksiyon düzenleyici ve uyarıcı etkisi vardır. Kolonun farklı fonksiyonlarından kaynaklı olduğu düşünürerek, kolondaki miRNA'ların diğer organ dokularına göre bütün çekirdek nükleotidlerinde C+G nin oranının daha yüksek olduğu bulunmuştur (AI ve ark., 2012).

Kas, kolon ve karaciğer dokularında (% 40, % 35 ve % 43 frekans sırasıyla) organ-spesifik miRNA'ların 5' ucunun sonundaki ilk nükleotidi ağırlıklı olarak "U" nükleotididir. Aynı şekilde, at genomunda sayısı az olmasına rağmen 18-19 nükleotid uzunluktaki miRNA'ların "G" ve "A" nükleotidi sadece kolonda 18 ve 19 nükleotid uzunluğundaki miRNA'ların 5' ucunun sonunda görülmektedir. At genomunda tüm dokulardaki miRNA sekanslarına ait baz kompozisyonu her pozisyonda tüm olgun miRNA'larda açık bir şekilde "U" için spesifik bölgelerde (1, 9, 21, 23, 26 ve 28. kromozomlarda) en sık rastlanan nükleotid olduğunu ve "C"nin spesifik bölgelerde (3, 7, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 21, 24 ve 25. kromozomlarda) rastlanan en az nükleotid olduğunu göstermiştir. A+U dağılımı, ortalama % 72 olarak hesaplanmıştır, C+G genelde tüm dokularda mevcuttur. Ancak tüm dokularda 3'den 6'ya kadar olan nükleotid pozisyonunda C+G , A+U' dan daha fazladır. Dahası kolon miRNA'sında 2 den 8'e kadar olan miRNA çekirdeğine sahip olan nükleotid pozisyonlarında C+G'nin A+U'ya göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Creighton ve ark., 2009).

1.6.4. Polisistronik miRNA'ların atlarda kromozomal lokalizasyonları

Zhou ve ark. (2009), at genomunda yaptıkları çalışma sonucunda 2. kromozom üzerindeki *miR-302a*, *miR -302b*, *miR -302c*, *miR -302d* ve *miR -367* ve X kromozomu üzerindeki *miR-1912* ve *miR -1264*'i, polisistronik miRNA'lar olarak bildirmiştir. Kim ve ark., (2014), yaptıkları çalışma sonucunda bulunan polisistronik miRNA'lar Zhou ve ark. (2009), tarafından bildirilen miRNA'lar ile örtüşmektedir (Şekil 1.6). Bu çalışmalardan elde edilen veriler, at genomundaki miRNA'ların kümelenme özelliğinin ortaya çıkarılması için daha fazla çalışma yapılmasının gerekliliğini göstermektedir.



Şekil 1.6. Atta polisistronik miRNA'ların kromozomal lokasyonları (Bireysel siyah yatay çizgiler polisistronik miRNA transkripti, yıldız ise birden fazla miRNA genlerini temsil etmektedir) (Kim ve ark., 2014).

Bu araştırmanın ilk basamağı, safkan yarış atlarında tükürükten miRNA izolasyonunun yapılmasıdır. Tükürük, içindeki sıvı kısım lokal damar ağından elde edildiğinden, sistemik dolaşımda bulunan birçok molekül tükürük içinde mevcuttur. Bu nedenle tükürüğün içerisindeki sıvı kısımda çeşitli mineraller, elektrolitler, hormonlar, enzimler, immünglobulinler, sitokinler, DNA, RNA da dahil diğer komponentler bulunmaktadır ve bu komponentlerin tamamı homojen değildir (Diaz-Arnold ve Marek, 2002; Mese ve Matsuo, 2007).

Tükürük gibi hücre dışı sıvılardaki miRNA'ların varlığının nedeni ekzosomlardır. Ekzosomlar, mRNA'ları ve miRNA'ları paketlemek ve taşımak için 30-100 nm uzunluğunda hücreyle sızdırılmış veziküllerdir (Valadi ve ark., 2007). Bu hücrel veziküllerdeki miRNA'ların tutulması ve bu veziküllerin, miRNA'ları ribonükleazlar tarafından parçalanmaya karşı korumaları nedeniyle tükürükte çok sayıda miRNA mevcuttur (Palanisamy ve ark.,2010; Sirker ve ark., 2017; Stahl ve Rapaso, 2019). Tükürük üzerinde yapılan miRNA çalışmaları incelendiğinde insan tükürüğünde 458'den fazla miRNA tespit edilmiştir (Arunachalam ve ark., 2019; Matse ve ark., 2015).

Lipidler, memelilerde birçok metabolik olay için en önemli yapı taşlarından birisidir ve vücutta birçok önemli rolleri mevcuttur (Pagan ve ark., 2002). Hücre membranının yapısında bulunurlar, hücresel iletimde sinyalleri taşıyıcı ve iskelet kası metabolizmasında en önemli enerji stoklarıdır (Hinchcliff ve ark., 2004). Beşeri hekimlikte atletler üzerinde tükürükte yapılan egzersiz öncesi ve sonrası çalışmalarda miRNA'ların kolesterol ve lipid metabolizmasında önemli rolleri olduğu ortaya konulmuş ve bunların bir kısmının lipid metabolizmasını direk olarak aktif bir şekilde etkilediği tespit edilmiştir (Fernández ve ark., 2011; Sacco ve ark., 2012).

Safkan Arap yarış atları egzersiz için yüksek kapasiteli hayvanlardır ve yüksek performans seviyeleri için gerekli olan enerjinin çoğunu yağ oksidasyonundan sağlarlar. Bu nedenle safkan Arap yarış atlarında yarış performansı için yağ asitlerinin oksidatif kapasitesi oldukça önemlidir.

Bu araştırmada safkan yarış atları için önemli olan lipid metabolizmasını etkilediği bilinen 8 adet miRNA'nın (*eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335*, *eca-miR-378*) yarış öncesi ve yarış sonrası tükürükte ifade seviyelerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin Alınması

Çalışmanın etik raporu, “Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu” 2017/04 numaralı kararı ile alınmıştır (Ek 1). Çalışma 10 adet safkan Arap yarış atında planlanmıştır. Ancak örnek alınan yarışta 13 adet safkan Arap yarış atının koşması sebebiyle örneklem 13 adet safkan Arap yarış atı olarak genişletilmiştir. Mevcut çalışmada Şanlıurfa Hipodromun’da aynı yarışta koşan (1200 m kum pist) 3 yaşlı safkan Arap atlarından (n=13) yarış öncesi (at dinlenme halinde iken) ve hemen yarış sonrası tükürük örnekleri; ağız boşluğunun dilaltı ve parotis bölgelerinden mümkün olduğunca dişlere değmemeye özen göstererek Hicks ve ark. (2019), tarafından belirtildiği şekilde 5-10 saniyelik süreçte pamuk swab yardımı ile alınmıştır (Şekil 2.1).

Türkiye Jokey Kulübü’nün’den alınan izin yazısına istinaden safkan yarış Arap atlarının isimleri ifşa edilmeden sayısal rakamlar ile kodlanmıştır (Ek 2). Atlardan alınan örnekler yarış öncesini temsilen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ve 13 olacak şekilde, yarış sonrası alınan tükürük örneklerini temsilen ise (1-2, 2-2, 3-2, 4-2, 5-2, 6-2, 7-2, 8-2, 9-2, 10-2, 11-2, 12-2, 13-2 olacak şekilde kodlama yapılmıştır (Çizelge 2.1).

Tükürük örnekleri alınmadan 2 saat önce ağız boşluğundaki tükürüğün içindeki miRNA konsantrasyonunun bozulmaması için atlarda yeme içme durdurulmuştur. Atlardan alınan tükürük örnekleri (n=26) hemen buz üzerine yerleştirilip Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı’nın moleküler laboratuvarlarına ulaştırılmıştır. Alınan örneklerde miRNA’ların yapısının bozulmaması için miRNA eldesi hemen örnek alımından sonra Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir



Şekil 2.1. Numune alma safhası.

Çizelge 2.1. Safkan Arap yarış atlarına ait veriler.

Atın kodu	Cinsiyet	Yarış Bitirme Derecesi	Jokey ağırlığı (kg)	Yarış Bitirme Süresi (sn)
1	Erkek	7	57.00	1.35.23
2	Erkek	1	53.00	1.27.66
3	Erkek	4	57.00	1.30.02
4	Erkek	8	57.00	1.35.29
5	Erkek	5	54.00	1.30.78
6	Dişi	6	55.00	1.35.07
7	Dişi	3	53.00	1.29.50
8	Dişi	12	52.00	1.44.23
9	Dişi	11	55.00	1.42.82
10	Dişi	9	55.00	1.35.70
11	Dişi	13	55.00	1.44.38
12	Dişi	2	55.00	1.28.03
13	Dişi	10	55.00	1.37.94

2.2. miRNA izolasyonu protokolü

Tüm örneklerin izolasyonu miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Almanya, Kat. No: 217184) ile miRNA izolasyonu kit protokolüne göre Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışılmıştır. miRNA izolasyonu örneklem alımından hemen sonra gerçekleştirildiği için örneklerin dondurulmasına gerek duyulmamıştır. İlgili kit protokolüne göre;

- miRNeasy Serum/Plasma Kit Protokolüne göre izolasyonu yapılacak her örneğin üzerine 1000 µl QIAzol Lysis Reagent ve 1,25 µl carrier RNA (Qiagen) eklenerek, örnekler hafif bir şekilde vorteksledikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika (dk) süreyle el ile alt üst edilerek bekletilmiştir.
- Bekleme süresi sonunda örnekler yeni 2 ml'lik steril tüplere aktarılmıştır. Ardından her örneğe 200 µl kloroform eklenmiş ve 15 saniye (s) boyunca iyice vortekslenmiştir. Faz ayırımın düzgün olması için vorteksleme işleme özen gösterilmiştir.
- Örnekler oda sıcaklığında 3 dk beklendikten sonra +4°C ve 12 000 g kuvvetinde (G Force: g) 15 dk santrifüj uygulanmıştır. Üstte ortaya çıkan ve miRNA'yı da içeren

saydam kısımdan 600 µl alınarak yeni 2 ml'lik steril tüplere aktarılmıştır. Bu aşamada ortadaki beyaz fazın alınması DNA ve alttaki kırmızı fazın alınması organik madde kontaminasyonuna sebep olabileceğinden sadece üst fazın alınmasına dikkat edilmiştir.

- Oda sıcaklığında yeni steril 2 ml'lik tüplerin her birinin içerisine 900 µl %100' lük saf Etanol eklenerek, el ile hafif bir şekilde alt üst edilmiştir.
- Oluşan bu karışımdan 700 µl alınarak RNeasy MinElute Spin kolonlara yüklenmiştir. Daha sonra oda ısısında 8 000 g kuvvetinde 15 sn boyunca santrifüj uygulanmıştır. Kolon altındaki tüpler süzülen kısım ile birlikte atılıp yenileriyle değiştirilmiştir. Örneğin tamamı bitinceye kadar bu basamak tekrar edilmiştir.
- Daha sonra RNeasy MinElute Spin kolon üzerine 700 µl RWT tamponu eklenmiş ve 15 sn 8 000 g kuvvet ile santrifüj uygulanmıştır.
- Daha sonra 500 µl RPE tamponu RNeasy MinElute Spin kolona eklenmiş ve yine aynı şekilde 15 sn 8 000 g kuvvet ile santrifüj uygulanmıştır.
- Daha sonra %80' lik etanolden 500 µl alınarak RNeasy MinElute Spin kolona yüklenmiştir. RNeasy MinElute Spin kolona 2 dk boyunca 8000 g kuvvet ile santrifüj uygulanmıştır. RNeasy MinElute Spin kolonun altında bulunan toplama tüpü atılarak RNeasy MinElute Spin kolon yeni steril bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Bu işlem elde edilen miRNA örneklerinde trizol kalıntısı kalmaması için 2 kez tekrarlanmıştır.
- RNeasy MinElute Spin kolon tekrar yeni steril bir toplama tüpüne yerleştirilip tüplerin kapakları dönme yönünün tersi yönde açılarak maksimum hızda 5 dk boyunca RNeasy MinElute Spin kolonun membranı kuruyana dek santrifüj edilmiştir. Uygulanan bu aşama ile yıkama işleminde kullanılan Etanol

uzaklaştırmıştır.

- Son olarak kolon altında kalan tüpler tekrar değiştirildikten sonra her kolona 12 µl RNase-free su direk olarak spin merkezine gelecek şekilde eklenmiş ve 5dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekletilen tüplere en yüksek hızda 1 dk sürede santrifüj uygulanması ile miRNA stokları hazır hale getirilmiştir. Elde edilen örnekler -80 °C de saklanmıştır.

2.3. Total RNA kalite ve kantite analizi

İzole edilen yarış öncesi ve yarış sonrası tükürük örneklerin, total RNA kalite ve kantitesi NanoDrop spektrofotometre p360 (Implen) (mikrohacim spektrofotometre) kullanılarak ölçülmüştür (Çizelge 2.2.) Ölçümlerde her bir örnek için 2 µl RNA kullanılmıştır. Elde edilen verilere ait 260 nm ve 280 nm'deki optik dansite (OD) değerleri birbirleriyle oranlandırılmıştır. A260/A280 nm dalga boyu oranının 2.0 ve üstü olması durumunda RNA saf olarak değerlendirilmiştir. Protein, fenol veya diğer kirleticiler 280 nm'de absorbe edildikleri için bu kimyasalların varlığı A260/A280 oranında düşmeye neden olmaktadır.

Çizelge 2.2. Yarış öncesi ve yarış sonrası tükürük örneklerinin kalite ve kantitesi.

Yarış Öncesi				Yarış Sonrası			
Örnek	Konsantrasyon	Birim	260/280	Örnek	Konsantrasyon	Birim	260/280
1-1	40	ng/µl	2,4	1-2	69	ng/µl	2,08
2-1	35	ng/µl	2,6	2-2	43,3	ng/µl	2,6
3-1	25	ng/µl	2,4	3-2	14,4	ng/µl	2,24
4-1	29	ng/µl	2,5	4-2	22	ng/µl	2,3
5-1	37	ng/µl	2,6	5-2	38	ng/µl	2,4
6-1	22	ng/µl	2,4	6-2	47	ng/µl	2,5
7-1	18	ng/µl	2,5	7-2	35	ng/µl	2,5
8-1	23	ng/µl	2,56	8-2	41,3	ng/µl	2,15
9-1	12	ng/µl	2,3	9-2	42,1	ng/µl	2,12
10-1	8	ng/µl	2,5	10-2	29	ng/µl	2,32
11-1	37	ng/µl	2,3	11-2	52	ng/µl	2,12
12-1	55	ng/µl	2,3	12-2	59	ng/µl	2,6
13-1	45	ng/µl	2,3	13-2	41	ng/µl	2,3

2.4. cDNA eldesi

İzole edilen miRNA'örnekleri -80 °C'den çıkarıldıktan sonra 4 °C'de bir miktar (10-15 dk.) bekletirerek çözündürülmüştür. Daha sonra bu miRNA örneklerinden miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, ABD, Kat. No:339340) kullanılarak reverse/ters transkripsiyon (RT) işlemi gerçekleştirilmiş ve miRNA'ya göre daha stabil olan cDNA elde edilmiştir (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. RT için reaksiyon içeriği.

5x miRCURY RT Reaction Buffer	2 µl
RNase-free water	4,5 µl
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µl
UniSp6 RNA spike-in	0,5 µl
RNA	2 µl
Toplam hacim	10 µl

Hazırlanan karışımlar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalında bulunan, C1000 ısı döngü cihazına (BioRad) konulmuş ve protokole uygun olarak sırasıyla 42°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk, 4°C'de ∞ bekletilerek cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. RT sıcaklık protokolü

RT Basamağı	60 dk	42 °C
Reaksiyonun İnaktive Edilmesi	5 dk	95 °C
Örneklerin Saklanması	∞	4 °C

2.4.1. Primerler

Araştırmada miRNA primerleri olarak miRCURY LNA TM miRNA PCR Assay (Qiagen) kullanılmıştır. Bu Assayler; Serum/plazma, tükürük örnekleri gibi düşük derecede miRNA içeren örnekler için hazırlanmış eşsiz hassasiyete sahip, 1 pg toplam RNA'dan bile miRNA nicelemesini sağlayan özel olarak üretilen spesifik primerlerdir. Bu primer setleri yakın ilişkili miRNA'ları ve olgun miRNA'ları öncülerinden ayırt edebilecek yüksek özgüllük derecesine sahiptirler. miRNA'lar

türler arasında oldukça korunmuştur ve homoloji gösterir, bu homolojiden yararlanarak mevcut çalışmada *Homo sapiens*'e (hsa) ve *Mus musculus*'a (mmu) ait primerler de kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 2.5'de sekans homolojisi ise Ek 5'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan primerler.

	miRNA	Katalog No, Nükleotid Dizisi	Mirbase Erişim Numarası
1-	<i>eca-miR-27a</i>	hsa-miR-27a-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay, (Qiagen, Kat No: YP00206038) MIMAT0000084: 5'UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	miRBase Tracker: MI0012739
2-	<i>eca-miR-27b</i>	hsa-miR-27b-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Kat No: YP00205915) MIMAT0000419: 5'UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	miRBase Tracker: MI0012865
3-	<i>eca-miR-33a</i>	hsa-miR-33a-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Kat No: YP00205690) MIMAT0000091: 5'GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA	miRBase Tracker: MI0012935
4-	<i>eca-miR-33b</i>	hsa-miR-33b-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Kat No: YP00205860) MIMAT0003301: 5'GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC	miRBase Tracker: MI0012782
5-	<i>eca-miR-125b</i>	hsa-miR-125b-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Kat No: YP00205713) MIMAT0000423: 5'UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	miRBase Tracker: MI0012733
6-	<i>eca-miR-143</i>	hsa-miR-143-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Kat. No: YP00205992) MIMAT0000435: 5'UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	miRBase Tracker: MI0012807
7-	<i>eca-miR-335</i>	hsa-miR-335-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Kat. No: YP02119293) MIMAT0000765: 5'UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	miRBase Tracker: MI0012696
8-	<i>eca-miR-378a</i>	mmu-miR-378a-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Kat. No: YP00204179) MIMAT0003151: 5'ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	miRBase Tracker: MI0012812
9-	UniSp6	miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen Kat. No: YP00203954)	

2.5. miRNA Ekspresyon Analizi

Safkan Arap yarış atlarından yarış öncesi ve yarış sonrası alınan tükürük örneklerinden elde edilmiş olan cDNA'ların qPCR analizleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalında bulunan CFX 96 Real-Time PCR (Biorad, ABD) cihazı ile miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen, ABD Kat. No: 339347) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SYBR Green ile işaretlenmiş cDNA dizisine, analiz edilecek *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-335*, *eca-miR-378a* ile normalizasyonda kullanılan *UniSp6* genine ait miRNA primerlerinin bağlanması sonucunda oluşan floresan ışıma miktarının saptanması ile kantitatif veriler (Ct değerleri) elde edilmiştir. Her bir miRNA'ya ait elde edilen Ct değerleri Ek.3.'de tablo halinde sunulmuştur.

Ct değerleri hedef örneklerdeki miRNA miktarının tam tersine göre değerlendirilmektedir ve Ct değerleri, PCR reaksiyonundaki kopya sayısı ile ilişkilendirilmektedir. Yüksek miktarlarda hedeflenmiş miRNA varlığı düşük Ct değerlerinin bir göstergesidir. Yine aynı şekilde yüksek Ct değerleri de düşük miktarda hedeflenmiş miRNA'yı ifade etmektedir.

Reaksiyon koşulları her örnek için; 5 µL 2X miRCURY SYBR Green Master Mix, 1 µL primer mix, 1 µL nükleaz içermeyen su ve 3 µL cDNA (1/30 dilüsyonlu) kullanılarak total hacim 10 µl'ye optimize edilmiş ve çalışılmıştır (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6. MiRNA ekspresyon analizi için PCR içeriği.

2X miRCURY SYBR Green Master Mix	5 µl
Primer mix	1 µl
cDNA	3 µl (1/30 dilüsyonlu)
RNase-free water	1 µl
Toplam hacim	10 µl

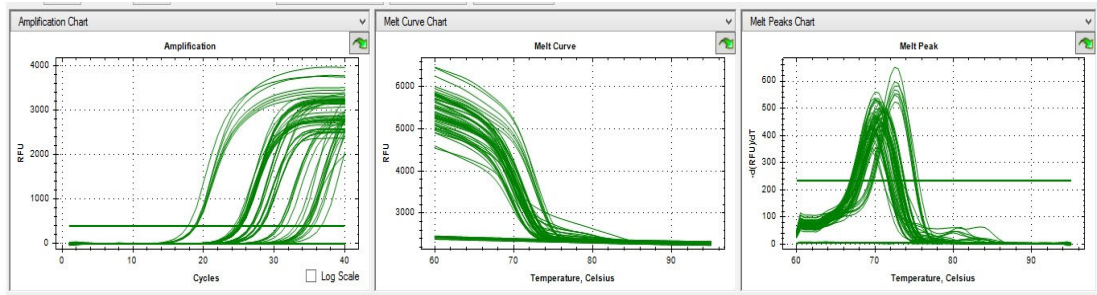
PCR şartları; 95°C’de 10 dakika 1 döngü, (95°C’de 10 saniye/60°C’de 10 saniye) 40 döngü şeklinde kurulmuştur ve 55°C-90°C arası 0,1°C hassasiyette erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Normalizasyon için *UniSp6* geni kullanılmıştır (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.7. miRNA ekspresyon analizi için reaksiyon şartları.

Enzim Aktivasyonu	10 dk	95 °C
Denatürasyon	10 sn	95 °C
Bağlanma	60 sn	60 °C

Elde edilen erime eğrisi analizleri sonucunda örneklerde non-spesifik bağlanma oluşmadığı yalnızca tek bir bağlanma olduğu gözlemlenmiştir. Her örnek ve her gen için iki teknik replika uygulanmıştır (Şekil 2.2).

Analizlerin sonunda gen ifade seviyesi tespit edilebilen her miRNA için birer Ct (cycle threshold/eşik siklus=oluşan her logaritmik eğride, miRNA ekspresyon miktarının eşik değeri geçtiği ilk siklus sayısı) değeri elde edilmiştir. Tüm örneklerde her gen için ayrı ayrı ΔCt ($\Delta Ct = \text{ilgili genin Ct değeri} - \text{normalizatör genin (UniSp6) Ct değeri}$) hesaplanmıştır. Yarış öncesi ve yarış sonrası grubuna ait sonuçlar ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) değerleri oranlanarak kat değişimi şeklinde verilmiştir.



Şekil 2.2. Yarış öncesi ve yarış sonrası safkan Arap yarış atlarından alınan tükürük örneklerinde *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335*, *eca-miR-378a* ile normalizasyonda kullanılan *UniSp6* genine ait optimizasyon çalışmalarında elde edilen amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri

2.6. İstatistiksel Analizler

Yarış öncesi ve yarış sonrası safkan yarış Arap atlarından alınan tükürük örneklerinde *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a* ile normalizasyonda kullanılan *UniSp6* için önemlilik testlerine geçilmeden önce elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov normalite testleri ile incelenmiştir.

Normalizasyon için kullanılan *UniSp6*'nın data veri analizlerinin normal dağılım yaptığı belirlenmiştir. Ayrıca normal dağılıma uygun bulunan *eca-miR-27a* ve *eca-miR-143* değişkenlerine ilişkin yarış öncesi ve yarış sonrası veriler arası istatistiksel değerlendirme Paired-Samples- T Test ile normal dağılıma uygunluk göstermeyen *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a* değişkenlerine ait yarış öncesi ve yarış sonrası elde edilen verilere ilişkin istatistiksel değerlendirme ise Wilcoxon Signed Ranks Testi ile incelenmiştir.

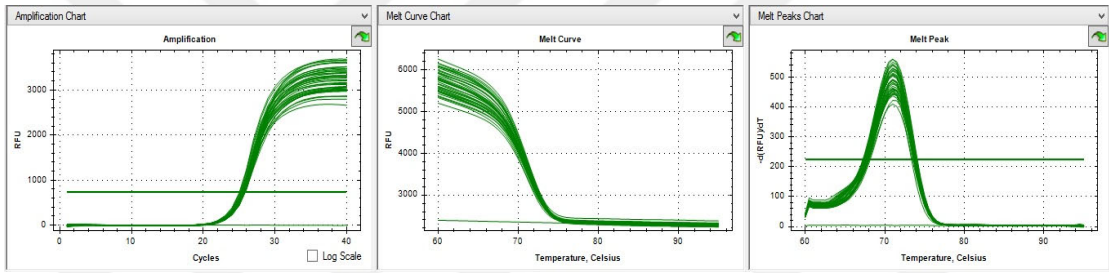
İstatistiksel değerlendirmeler için ($P < 0,05$) kriterinden yararlanılmıştır. İstatistik hesaplamalarda (SPSS 14.01 (Lisans No: 9869264) paket programı kullanılmıştır.

eca-miR-27a, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a*'nın ifade seviyeleri farklılıkları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eşitliği kullanılarak kat değişimi (fold changes) olarak verilmiştir.

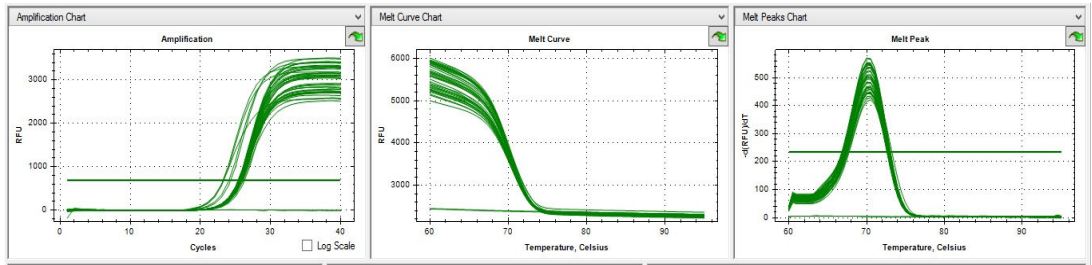
3. BULGULAR

3.1. Genetik Analiz Bulguları

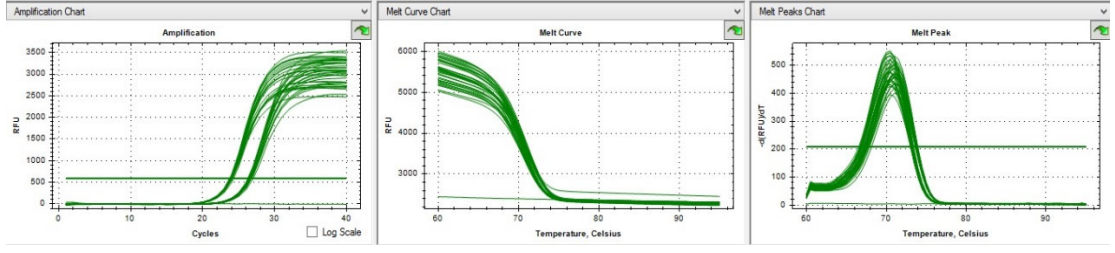
Safkan Arap yarış atlarında tükürükte *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a* ile normalizasyonda kullanılan *UniSp6*'nın yarış öncesi ve yarış sonrası ifade seviyelerinin gösterilmesi amacıyla qPCR yöntemi kullanılmıştır. Bu miRNA'lara ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri aşağıda sunulmuştur (Şekil 3.1-Şekil 3.9).



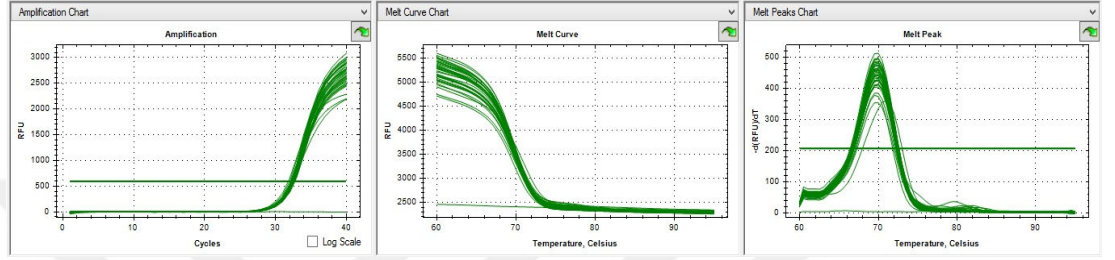
Şekil 3.1. *eca-miR-27a*'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri.



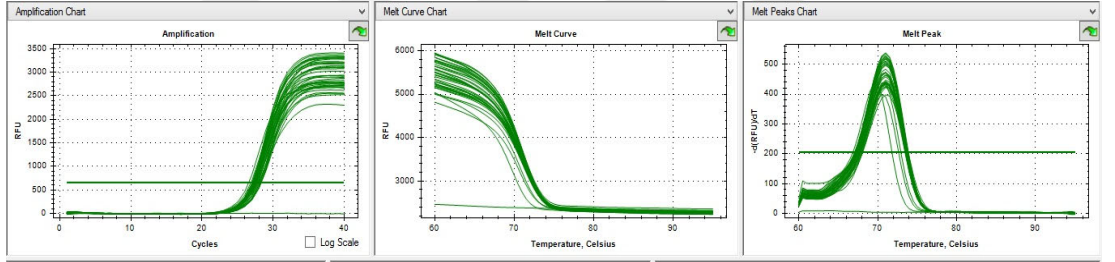
Şekil 3.2. *eca-miR-27b*'ye ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri.



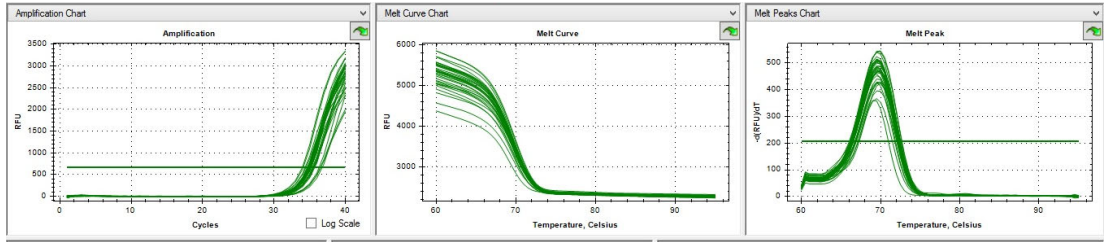
Şekil 3.3. *eca-miR-33a*'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri.



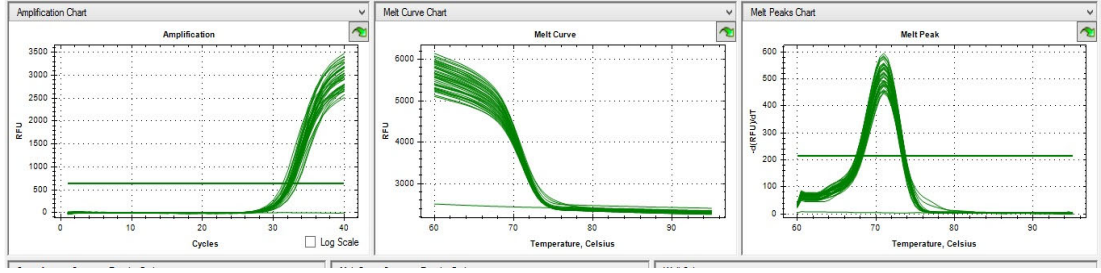
Şekil 3.4. *eca-miR-33b*' ye ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri.



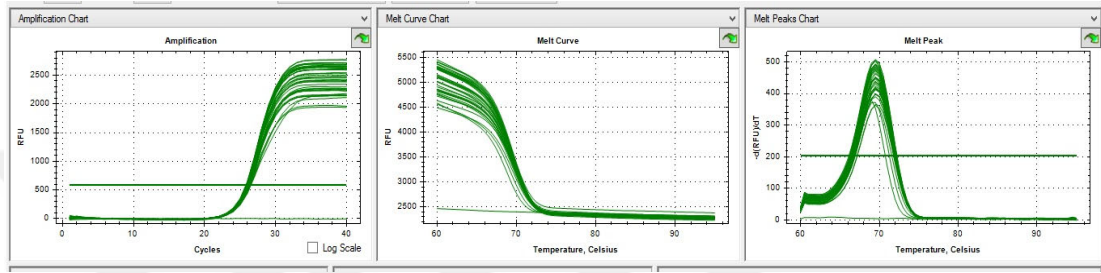
Şekil 3.5. *eca-miR-125b*' e ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri.



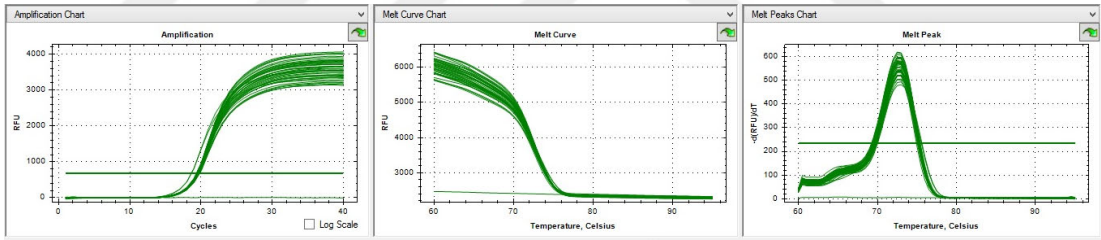
Şekil 3.6. *eca-miR-143*'e ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri.



Şekil 3.7. *eca-miR-335*'e ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri.



Şekil 3.8. *eca-miR-378a*'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri.



Şekil 3.9. *UniSp6*'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri.

3.2. İstatistiksel Bulgular

Yarış öncesi ve yarış sonrası *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a*'nın normalizasyonu *UniSp6* ile yapılmıştır.

UniSp6'nın normal dağılım gösterdiği belirlendikten sonra istatistiksel olarak yarış öncesi ve sonrası *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a*'nın ifade seviyelerindeki

relatif gen ifadesi farklılıkları Livak ve Schmittgen (2001) tarafından tasarlanan metod uyarınca $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile miRNA'lara ait kat değişimleri hesaplanmıştır.

($tCt = Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ UniSp6}$ ve $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ yarış sonrası} - \Delta Ct \text{ yarış öncesi}$) yarış öncesi ve sonrası *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a*'nın ifade seviyelerindeki relatif gen ifadesi farklılıklarının gen ifadesi yönünden anlamlı farklar oluşup oluşmadığı SPSS 14.01 paket programı ile tespit edilmiştir (Lisans No: 9869264).

Çizelge 3.1. Yarış öncesi ve yarış sonrası safkan Arap atlarında tükürükte elde edilen *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a*'nın ifadelerinin karşılaştırılması ($p < 0.05$).

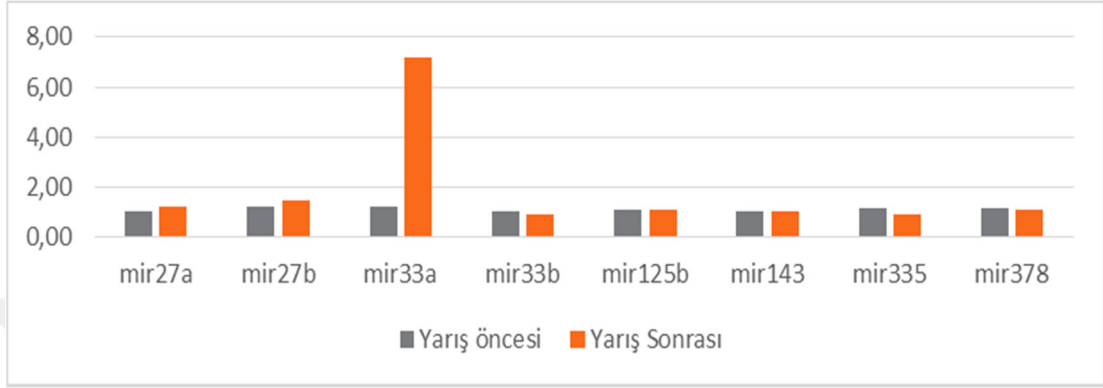
miRNA	Kat Değişimi (Fold Change)	p değeri
<i>eca-miR-27a</i>	0,15	0,031
<i>eca-miR-27b</i>	0,29	0,013
<i>eca-miR-33a</i>	5,97	0,001
<i>eca-miR-33b</i>	-0,1	0,196
<i>eca-miR-125b</i>	-0,01	0,249
<i>eca-miR-143</i>	0,02	0,228
<i>eca-miR-335</i>	-0,29	0,196
<i>eca-miR-378a</i>	-0,1	0,002

eca-miR-27a, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a*'dan sadece 4 tanesinde (*eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a* ve *eca-miR-378a*) yarış öncesi ve sonrası ifade seviyelerine ait kat değişim analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmasına rağmen sadece *eca-miR-33a*'ya ait kat değişiminin 2 den büyük olduğu gözlemlenmiştir.

eca-miR-33b, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143* ve *eca-miR-335*'de ise yarış öncesi ve yarış sonrası ifade seviyelerine ait kat değişim analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($P < 0.05$).

Çalışmada kat değişim analizlerinde gen ifadelerin kat değişimi için Warden ve ark. (2013), refans alınarak kriter $(\log FC) > 2$ veya < -2 ve P değeri < 0.05 olarak belirlenmiştir.

$2^{-\Delta\Delta C}$ analiz sonucuna göre yarış öncesi ve yarış sonrası tükürük örnekleri karşılaştırıldığında *eca-miR-33a*’ya ait ifade seviyelerinin yarış sonrası değerinin yarış öncesine göre yaklaşık olarak 6 kat arttığı (Şekil 3.10) tespit edilmiştir (P=0,001).



Şekil 3.10. Yarış öncesi ve yarış sonrası safkan Arap yarış atlarında tükürükte belirlenen *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a*’ya ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri (P <0.05).

4. TARTIŞMA

Atlar ilk olarak insanoğlu tarafından yaklaşık 6.000 yıl önce Avrasya bozkırlarında evcilleştirilmişlerdir (Levine, 1999). Bu süreç içerisinde atlar son 400 yıldır, atletik performans fenotipleri göz önünde bulundurularak çok sıkı bir şekilde seleksiyona tabi tutulmuşlardır (Bugno-Poniewierska ve ark., 2019). Bu sıkı seleksiyonlar neticesinde günümüz yarış atları hem yüksek anaerobik hem de aerobik metabolik yetenekleri barındıran bir dizi yüksek fizyolojik özelliğe (gelişmiş kardiyovasküler sistem, maksimum oksijen alımı, büyük bir akciğer hacmi, yüksek hemoglobin konsantrasyonu, vücut ağırlığına oranla büyük bir kas kütlesi, yüksek iskelet kası mitokondriyal yoğunluğu vb) sahip olmuşlardır (Constantinopol ve ark., 1989; Gurgul ve ark., 2019; Hodgson ve ark., 2013; Jones ve Lindstedt, 1989; Jones ve ark., 1993).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar ışığı altında; yarış atlarında, fiziksel ve fizyolojik adaptasyonlar çok iyi bir şekilde tanımlanmış olsa da, ne yazık ki atletik bir fenotipe katkıda bulunan genler henüz tam anlamıyla tanımlanmamıştır (Brooks ve ark., 2010; Hill ve ark., 2010a; Ropka-Molik ve ark., 2017; Stefaniuk-Szmukier ve ark., 2019). Bununla beraber, yarış atlarında fenotipik özelliklerin yarış performansı için güçlü bir seleksiyon kriteri olmasına rağmen yarış atlarında performanstaki değişimin % 35'inin genotipik özelliklerden kaynaklandığı, yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir (Gaffney ve Cunningham 1988; Hill ve ark., 2010b; Mota ve ark., 2005; Petersen ve ark., 2013).

Atların iskelet kasları, glikojen olarak depolanan yüksek miktarda enerji içermektedir. Kaslardaki bu glikojeni egzersiz sırasında atlar kolaylıkla kullanabilirler ve bu yüzden atlar için glikojenin en önemli enerji kaynağı olduğu düşünülmektedir. Fakat yağ asitleri karbonhidratlar kadar hızlı bir şekilde enerji sağlayamamaları ve oksijenden faydalanmada daha az etkin olmalarına rağmen gram ağırlık başına karbonhidratlardan çok daha fazla enerji sağlarlar. Bu nedenle yağ

asitlerinin oksidatif kapasitesi attaki egzersiz performansı için oldukça önemlidir ve yapılan birçok çalışmada yarış atları için, aerobik ve anaerobik egzersizlerde lipit metabolizmasının son derece önemli olduğu ortaya konulmuştur (Hodgson ve ark., 2014; Piccione ve ark., 2014a; Piccione ve ark., 2014b).

Arap atlarının sahip oldukları kas dokusu yapısında oksidatif tip I lif oranı diğer yarış atı ırklarına kıyasla daha yüksek miktarda bulunmaktadır. Oksidatif tip I lif tipi kas, düşük glikojen içeriği ve yüksek trigliserit depolama kabiliyeti ile karakterizedir. Bu nedenle bir Arap atı, kasında bulunan oksidatif tip I lifleri sayesinde diğer yarış atı ırklarına kıyasla daha yüksek oranlı enerji için daha fazla yağ kullanabilme kabiliyetine sahiptir (Diaz ve ark., 2008; Prince ve ark., 2002; Ropka-Molik ve ark., 2017; Ropka-Molik ve ark., 2019b). Yarış atları sahip oldukları bu farklı kas yapılarından kaynaklı farklı performans özellikleri nedeniyle farklı pistlerde yarışır (Ropka-Molik ve ark., 2019a).

Prince ve ark. (2002), Arap atları ve diğer ırk yarış atlarında (Thoroughbred) egzersiz sırasında bazı kan parametrelerini inceledikleri çalışmada, diğer ırk yarış atlarına kıyasla Arap atlarının kanlarında daha yüksek miktarda serbest yağ asitinin olduğu göze çarpmaktadır. Bu çalışma sonucunda, Arap yarış atlarının safkan diğer ırk atlara kıyasla daha fazla yağ asidini enerji kaynağı olarak kullandığı anlaşılmaktadır. Ayrıca, her iki ırkta da egzersiz sırasında, daha fazla miktarda yağ ve daha az miktarda glikozda oksitleme meydana gelirken, Arap atlarında bu değişikliklerin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmalardan elde edilen veriler, safkan Arap yarış atlarında yarış performansı için lipit metabolizmasının oldukça önemli olduğu hipotezini destekler niteliktedir. Fakat ne yazık ki literatür taramalarına bakıldığında safkan Arap yarış atlarında lipid metabolizması ile ilgili yapılan çalışma sayısının çok az olduğu görülmektedir.

Atlarda yapılan çalışmalarda, fiziksel aktivitenin oluşumunun, sıklığının ve yoğunluğunun lipid profili üzerine etkileri incelendiğinde cinsiyetin egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası kanda lipid metabolizmasını etkileyen kan değerleri üzerinde etkin olmadığı rapor edilmiştir (Arfuso ve ark., 2016; Carreón ve ark., 2013; Nazifi ve ark., 2005; Perez ve ark., 1997). Benzer bir çalışmada Gim ve ark. (2014), 3 adet emekli yarış atında yaptıkları çalışmada, kanda egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası Glikoz metabolizmasına etki eden *LDHA*, *GYS1*, *eca-miR-33a* ve *eca-miR-17*'nin ifade seviyeleri belirlenmiştir. Çalışma sonucuna göre egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası Glikoz metabolizmasına etki eden *LDHA*, *GYS1*, *eca-miR-33a* ve *eca-miR-17*'nin ifade seviyeleri üzerinde cinsiyetin etkili olmadığını gözlemlenmiştir. Yine uzun koşu koşan (Endurance) Arap atlarında (13 dişi ve 28 kastrasyon edilmiş) Mach ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada dayanıklılık egzersizlerinde egzersiz öncesi ve sonrası miRNA ifade seviyeleri incelenmiş cinsiyetin etkili olmadığı görülmüştür.

Mevcut çalışmada da yarış öncesi ve yarış sonrası tükürük örneği alınan 13 adet safkan Arap yarış atına ait *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* ve *eca-miR-378a*' ya ait verilerin tüm atlarda birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Daha önce atlarda yapılan bu çalışmalar referans alınarak yapılan istatistiksel analizlerde cinsiyet ayrımı göz ardı edilmiştir.

İnsanlarda yapılan bir çok bilimsel çalışmada *miR-33a*'nın lipid metabolizması üzerinde düzenleyici bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Davalos ve ark., 2011; Davalos ve ark., 2013; Erhartova ve ark., 2019; Fasolo ve ark., 2019; Flowers ve ark., 2013; Massart ve ark., 2016; Rayner ve ark., 2012). Ayrıca Mennigen ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada *miR-33*'nin insülin mekanizmasında aktif olarak rol oynadığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalara ek olarak *miR-33a*'nın çeşitli hücrelerde bir tümör baskılayıcısı olduğu bilinmektedir (Najafi-Shoushtari ve ark., 2010; Thomas ve ark., 2012).

Fareler ve hücre kültürü üzerinde yapılan çalışmalarda *miR-33a* ve *miR-33b* 'nin lipid metabolizmasından sorumlu *SREBP* geni ile *ABCA1* proteini üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Horie ve ark., 2014; Marquart ve ark., 2013). Ayrıca insanlarda 22. kromozom üzerinde bulunan *SREBP2* geninin kolesterol, fosfolipit ve yağ asidi sentezinde etkin olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiş ve *miR-33a*'nın *SREBP2* geninin intronik bölgesinden köken alan bir mirtron olduğu tespit edilmiştir (Gerin ve ark., 2010; Najafi-Shoushtari ve ark., 2010).

Evrimsel açıdan korunmuş *SREBP2* geni at genomunda, 28. Kromozom üzerinde bulunmaktadır ve bu genin intronunda intronik miRNA olan *eca-miR-33a* yer almaktadır. *SREBP2* geninin, yağ asidi ve kolesterol sentezini indüklediği ve hücrelipit seviyelerini korumak için *eca-miR-33a* ile işbirliği yaparak *eca-miR-33a*'yı inhibe ettiği tespit edilmiştir (Ono ve ark., 2014; Ono, 2016; Rayner ve Hennessy, 2013). Ayrıca *eca-miR-33a* kolesterol metabolizmasında direk olarak etkin olan ve yağ asidi sentezinde görevli olan *ABCA1* geni, *CPT1A* geni, *HADHB* geni ve *CROT* genide dahil olmak üzere birçok lipid metabolizmasını etkileyen genler üzerinde aktif olarak etkili olduğu belirlenmiştir (Gerin ve ark., 2010; Jeon ve Osborne, 2012; Konstantinidou ve ark., 2016; Wijesekara ve ark., 2012).

Araştırma sonucunda, safkan Arap yarış atlarında yarış öncesi ve yarış sonrası tükürükten lipid metabolizmasına etkinliği bilinen *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-335*, *eca-miR-378a*'nın ifade seviyelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan qPCR analizlerinde yarış öncesi ve yarış sonrası en belirgin farkların tespit edildiği miRNA *eca-miR-33a* olarak bulunmuştur. Safkan Arap yarış atlarında yarış öncesi ve yarış sonrası hemen alınan tükürük örneklerinde *eca-miR-33a*'nın ifade seviyeleri karşılaştırıldığında yarış sonrası *eca-miR-33a*'nın ifade seviyesinin yaklaşık olarak 6 kat arttığı tespit edilmiştir (P=0,001). Konstantinidou ve ark. (2016), 19 sporcu üzerinde yaptıkları çalışmada akut egzersiz (eğirme) modelini kullanarak lipid metabolizmasına dâhil olan tükürük miRNA'larının ifade seviyeleri araştırılmıştır. Bu çalışmada egzersiz öncesi ve hemen egzersiz sonrası alınan tükürük örneklerinde *hsa-miR-33a'* nın ifadesinin egzersiz sonrası yaklaşık olarak 8 kat arttığı saptanmıştır. Bu çalışmada tükürük

örnekleri hemen egzersiz sonrası alınmıştır. Bu çalışma da elde edilen bulgular ile bizim çalışmamıza ait bulgular benzerlik göstermektedir.

Benzer bir şekilde Gim ve ark. (2014), 3 adet (yarış hayatı bitmiş) yarış atında egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası Glikoz metabolizmasına etki eden *LDHA*, *GYSI* genlerinin ifade seviyelerini ve bu genlere etki eden *eca-miR-33a* ve *eca-miR-17*'nin ifade seviyelerini incelemişlerdir. Çalışmada atlar egzersiz olarak 30 dk boyunca tırıs yürütülmüşlerdir. Atlardan egzersiz öncesi ve hemen egzersiz sonrası kan örnekleri alınmıştır. Bu çalışmada *eca-miR-33a* ve *eca-miR-17*'nin 3' UTR dizilerine bağlanma yoluyla *LDHA* ve *GYSI* ekspresyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, çalışma sonucu olarak *eca-miR-33a*'nın egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası ifade seviyesinde önemli farkların olduğu belirlenmiştir. Egzersiz sonrası *eca-miR-33a*'nın ifade seviyesinin at kanında yaklaşık olarak 10 kat artmış olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma da mevcut çalışma bulgularını destekleyen diğer bir çalışmadır.

İlginç bir şekilde Kim ve ark. (2018), dört adet Alman Warmblood ırkı yarış atlarında (7 ila 15 yaşları arasında değişen) yapmış oldukları çalışmada uyguladıkları 1 saat egzersiz programı öncesi ve sonrasında Alman Warmblood ırkı atlardan aldıkları kan örneklerinde *eca-miR-33a*'nın ifade seviyesinde bir azalmanın olduğunu ileri sürülmüştür. Gim ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada kan örnekleri hemen egzersiz sonrası alınmıştır. Bizim çalışmamızda yine aynı şekilde tükürük örnekleri hemen yarış sonrası alınmıştır. Kim ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada ise örnek alımı egzersizden 1 saat sonra gerçekleştirilmiştir. *eca-miR-33a*'nın ifade seviyelerindeki farklılığın örneklerin alınma zamanından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca uygulanan egzersiz programlarındaki farklılık, egzersizin süresi ve atlardaki ırk farklılığının da *eca-miR-33a*'nın ifade seviyesini etkilediği Kim ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada bildirilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen bilgiler bu çalışmayla paralellik göstermektedir.

Rayner ve ark. (2011), Afrika yeşil maymunu üzerinde yaptıkları çalışmada;

miR-33a ve *miR-33b*'nin susturulması ile yağ asidi oksidasyonunda yer alan genlerde indüklenme ve yağ asidi sentezinde yer alan genlerde baskılanma meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu çalışma verileri esas alınarak, yarış sonrası *eca-miR-33a* genine ait gen ifade seviyesindeki artışın yarış sonrası yağ asidi oksidasyonunun azalmasından ve karaciğerde yağ asitlerinin sentezinin artmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

İnsan genomunda *hsa-miR-33a* ve *hsa-miR-33b* *SREBP* geninin intronlarında bulunur ve *hsa-miR-33a* ve *hsa-miR-33b* aynı çekirdek yapısına sahiptirler. Ancak aynı çekirdek dizisine sahip olmalarına rağmen olgun formlarının nükleotit dizilimindeki iki nükleotit farklıdır (Andreou ve ark., 2015). *miR-33a* insan, kemirgenler, primatlar dâhil birçok türde bulunmasına rağmen *miR-33b*, kemirgenlerde sentezlenmemektedir (Najafi-Shoushtari ve ark., 2010; Rayner ve ark., 2011).

At genomunda *eca-mir-33a* *SREBP2* geninin intron bölgesinde, *eca-mir-33b* ise *SEBPR1* geninin intron bölgesinde yer almaktadır. Çalışmamızda safkan Arap atlarında tükürükte *eca-mir33a*'nın yarış öncesi ve yarış sonrası ifade seviyesi kat değişimi analizlerindeki farkın belirgin bir şekilde olmasına rağmen (yaklaşık olarak 6 kat) *eca-mir-33b*'nin yarış öncesi ve yarış sonrası ifade seviyesi kat değişimi analizinde önemli bir artış ya da azalma tespit edilmemiştir ($P=0,196$).

Adipogenik farklılaşmanın düzenlenmesinde miRNA'ların etkin olduğu Lin ve ark. (2009), tarafından fareler üzerinde yaptıkları çalışmada araştırılmış ve *miR-27* ailesinin ifadesinin adipogenez sırasında azaldığı ve tam tersi *miR-27*'nin ifadesinde aşırı bir artış olduğunda adipositif etkinin spesifik olarak inhibe olduğu anlaşılmıştır.

Yang ve ark. (2015), tarafından farelerde yapılan çalışmada *miR-27*'nin ifadesinin artması, yağ metabolizması için önemli olan *PPARc* geninin salınımını bloke etmiştir ve adipogenezin iki ana düzenleyicisi olan *C/EBPa* geninin salınımını arttırmıştır. Ayrıca sığır, fare ve domuzlarda yapılan çalışmalarda *miR-27a*'nın iskelet

miyogenezinin kritik bir önleyicisi olan *Miyostatin* geninin (*MSTN*) 3'UTR'sine bağlanarak genin salınımını baskıladığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2012; Huang ve ark., 2012; Karbiener ve ark., 2009; Liu ve ark., 2013; Yang ve ark., 2014)

miRNAların egzersiz dinamiği üzerine etkileri Tonevitsky ve ark. (2013), tarafından incelenmiştir. Çalışmada, sekiz yüksek eğitimli sporcunun tam kan örneklerinde 30 dakikalık orta dereceli egzersizin (koşu) sonucunda *hsa-miR-27a-5p*'nin ifade seviyesinin egzersiz sonunda 1,5 kat artmış olduğunu tespit edilmiştir. Çalışma verilerinde, *hsa-miR-27a*'nın ifade seviyesinin zamanla arttığı raporlanmıştır. Ayrıca *hsa-miR-27a*'nın egzersiz sırasında zaman içinde yükselme grafiği verilmiştir. Bu çalışma verileri bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Mevcut çalışmada safkan Arap yarış atlarında yarış öncesi ve sonrası hemen alınan tükürük örneklerinde *eca-mir-27a*'nın gen ifade seviyeleri karşılaştırıldığında yarış sonrası *eca-mir-27a*'nın ifade seviyesinin kat değişim farkı 0,15 olarak bulunmuştur ($P=0,031$). *eca-miR-27a*'ya ait 0.15 kat değişim farkının yarış süresinin kısa (1-2 dk) olmasından ve tükürük örneğinin hemen yarıştan sonra alınmasından kaynaklı olacağı düşünülmektedir.

Bununla beraber, Mach ve ark. (2017), tarafından yapılan çalışmada, 41 adet Arap yarış atı üzerinde dayanıklılık egzersizlerinde egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası bazı miRNA ların gen ifade seviyeleri analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda, egzersiz sonrası bazı miRNA'ların gen ifade seviyelerinde önemli farklar olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lardan biri de *eca-miR-27a*'dır ($p < 0.10$). Ayrıca, Konstantinidou ve ark. (2016), 19 sporcunun üzerinde yaptıkları çalışmada, 50 dakikalık akut egzersiz sonucunda (eğilme) egzersiz öncesi ve sonrası alınan tükürük örneklerinde *hsa-miR-27a* 'nın ifade seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca çalışma verilerinde *hsa-miR-27a*'ya ait egzersiz öncesi ve sonrası kat değişim farkının da 1'den küçük olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen veriler bu çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

miRNA'ların, kas dokusunda mitokondriyal biyogenez gibi birçok biyolojik işlemin düzenlenmesinde yer aldığı daha önce yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir. *miRNA-27b*' de bu miRNA'lerden biridir (Jiang ve ark., 2014; Tak ve ark., 2014). Kang ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada *miRNA-27b*'nin, insan adipoz türevli kök hücrelerinde inhibitini hedefleyerek adiposit farklılaşmasını ve mitokondri fonksiyonunu bozabileceğini rapor etmişlerdir. İlave olarak, Shen ve ark. (2016), fareler üzerinde yapmış oldukları in vivo çalışmada, *rsa-miRNA-27b*'nin mitokondri biyogenezinde miyositlerde önemli bir rol oynadığını tespit etmişlerdir. Fareler üzerinde yapılan bu çalışmada aerobik egzersiz sonucu kalpte *rsa-miR-27a* ve *rsa-miR-27b*'nin ifade seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, Barber ve ark. (2019), yetişkin insanlarda (n: 20) yaptıkları çalışmada, düzenli egzersiz sonucu kandaki *hsa-miR-27b*'nin 1,5 kat anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışma verileri mevcut çalışma sonuçlarını desteklemektedir.

Mevcut çalışmada safkan Arap yarış atlarında yarış öncesi ve sonrası hemen alınan tükürük örneklerinde *eca-mir-27b*'nin ifade seviyeleri karşılaştırıldığında yarış sonrası *eca-mir-27b*'nin gen ifade seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğu tespit edilmiştir ($P=0,013 < P 0,05$). Fakat *eca-mir-27b*'ye ait yarış öncesi ve yarış sonrası kat değişim farkı 0,29 (< 2) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, Konstantinidou ve ark. (2017), sporcular üzerinde yaptıkları çalışmada (n: 19), 50 dakikalık akut egzersiz sonucunda (eğilme) egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası alınan tükürük örneklerinde *hsa-miR-27b*'nin egzersiz öncesi ve sonrası gen ifade seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışma verilerinde *hsa-miR-27b* genine ait egzersiz öncesi ve sonrası kat değişim farkının 1 den küçük olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada çalışmamızı destekler bir çalışmadır.

Lipid metabolizması için önemli bir diğer miRNA, monositlerde yağ birikiminde etkin olan *eca-miR-125b*'dir. Cheng ve ark. (2016), tarafından yapılan çalışmada domuzlar üzerinde *miR-125b*'nin adipogenetik mekanizmada etkili olmasından dolayı arteoskleroz ve kolesterol homeostazında etkili olduğu bildirilmiştir. Enerji metabolizmasında etkin olan *miR-125b* üzerinde Gonzalo-Calvo

ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada, 10 km'lik koşu öncesi ve sonrası 9 amatör koşucuya ait kan örneklerinde *hsa-miR-125b*'nin ifade seviyesinde 10 km'lik koşu sonrası herhangi bir atışın yada azalmanın olmadığı tespit edilmiştir. Fakat aynı çalışmanın maraton koşusu (20km), öncesi ve sonrası alınan kan örneklerinde *hsa-miR-125b*'e ait koşu sonrası ifade seviyelerinde önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmamız ile kısmen uyumaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada, safkan Arap atlarında tükürükte *eca-mir125b* genine ait yarış öncesi ve yarış sonrası gen ifade seviyesi kat değişimi analizinde önemli bir artış ya da azalma tespit edilmemiştir (P=0.249).

Esau ve ark. (2004), fareler üzerinde yaptıkları çalışmada ve An ve ark. (2016), yaptıkları domuz kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürü çalışmalarında *miR-143*'ün adipogenik farklılaşmayı artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca *miR-143*, yağ asitleri ve kolesterol üzerindeki düzenleyici etkisinden dolayı kalp hastalıkları için önemli bir biyobelirteçtir (Boettger ve ark., 2009; Kılıç ve ark., 2015). İlave olarak Zuo ve ark. (2015), domuzlarda yaptıkları çalışmada domuz iskelet kası uydu hücresinde *ssc-miR-143-3p*'nin ifadesinin artması yada azalmasında *MYH7* genini hedef alarak kas lifinde farklılaşma yaptığı tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda domuzlarda *ssc-miR-143-3p*'nin domuz kas lifi içeriği, miyofit kimliği ve kas performansı üzerinde etkili olduğu saptanmıştır.

Kas performansı üzerinde etkin olan *mir-143* üzerinde Nielsen ve ark. (2014), 32 sağlıklı atlet üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda, akut dayanıklılık egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası atletlerden alınan kan örneklerinde miRNA ifade seviyeleri karşılaştırıldığında *hsa-miR-143*'nin ifade seviyesinde artış olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada atlerlerden kan örnekleri egzersizden 1 saat sonra alınmıştır. Ayrıca, Gonzalo-Calvo ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada maraton koşusu öncesi ve sonrası (20 km) 9 amatör koşucuya ait kan örneklerinde koşu sonrası *hsa-miR-143* ifade seviyesinde önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir (P< 0.050). Fakat Gonzalo-Calvo ve ark. (2015), yaptıkları bu çalışmanın bir parçası olan 9 amatör koşucuya ait 10 km'lik koşu öncesi ve sonrası alınan kan örneklerinde *hsa-miR-143* ifade seviyesinde bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca Konstantinidou ve ark. (2016), 19

sporcunun üzerinde yaptıkları çalışmada, egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası hemen alınan tükürük örneklerinde *hsa-miR-143*'ün ifade seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışma verileri bizim çalışma verilerimizi desteklemektedir. Çalışmamızda safkan Arap atlarında tükürükte *eca-mir-143-3p*'e ait yarış öncesi ve yarış sonrası ifade seviyesi kat değişimi analizinde önemli bir artış ya da azalma tespit edilmemiştir ($p=0,228$).

Adipogenik farklılaşmada etkili olan bir diğer miRNA da *miR-335* dir. Obez farelerde yapılan çalışmada obezite ile miRNA'ların ilişkisi incelenmiş ve *miR-335*'in karaciğerde yağ birikiminde kritik role sahip olduğu ortaya konulmuştur. Karaciğer ve beyaz adipoz dokudaki (WAT) *miR-335* ifadeleri obez farelerde artmıştır. Artan *miR-335* ifadeleri vücut, karaciğer ve WAT ağırlığı artışı ve hepatik trigliserit ve kolesterol ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, *miR-335* seviyeleri, 3T3-L1 adipositlerinde *PPAR γ* , *aP2* ve *FAS* gibi adiposit farklılaşma belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri ile yakından ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Bu bulgular, obez farelerin karaciğerinde ve WAT'ında *miR-335*' in artan ifadelerinin obezitenin patofizyolojisine katkıda bulunabileceğinin ilk kanıtıdır (Fernandez-Hernando ve ark., 2011; Nakanishi ve ark., 2009).

hsa-miR-335'in 50 dakikalık akut egzersiz sonucunda Konstantinidou ve ark. (2016), sporcular üzerinde yaptıkları çalışmada, egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası hemen alınan tükürük örneklerinde ifade seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışma verileri bizim çalışma verilerimizi desteklemektedir. Çalışmamızda safkan Arap atlarında tükürükte *eca-mir-335*'e ait yarış öncesi ve yarış sonrası ifade seviyesi kat değişimi analizinde önemli bir artış ya da azalma tespit edilmemiştir ($p=0.196$).

miR-378 peroksizom proliferatörü ile aktive reseptör gama koaktivatörü-1 alfa (*PGI α*) da dahil lipid metabolizmasını düzenleyen bir çok proteine etki eden önemli bir intronik miRNA'dır ve *PPARGC1B* geninin ilk intronunda yer almaktadır (Carrer ve ark., 2012; Eichner ve ark., 2010). *miR-378a*'nın enerji homeostazisine katkıda

bulunduğu ve lipogenez ve adiposit farklılaşmasını düzenlediği yapılan birçok in vivo ve in vitro çalışmalarda tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda fareler üzerinde *rsa-miR-378a*'nın adiposit farklılaşma sırasında indüklendiği belirlenmiştir. Ayrıca Adipogenez sırasında *miR-378*'in aşırı ekspresyonunun triaçilgliserol birikimini arttırdığı saptanmıştır (Carrer ve ark., 2012; Gerin ve ark., 2010; Kulyte ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016; Zhou ve ark., 2017). Ayrıca, yapılan çalışmalarda gelişmekte olan ve erişkin sıçan, murin ve domuzların *miR-378a* ifadesinin iskelet kasi farklılaşması sırasında arttığı tespit edilmiştir (Gagan ve ark., 2011; Hou ve ark., 2012; Liu ve ark., 2015; Makarova ve ark., 2014; Mericskay, 2014).

hsa-miR-378a'nın akut egzersiz sonucunda Konstantinidou ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası hemen alınan tükürük örneklerinde belirlenen ifade seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olduğu ve *hsa-miR-378a* ifade seviyesinin egzersiz sonrası % 21 oranında azaldığı belirlenmiştir. Mevcut çalışmada Konstantinidou ve ark. (2016), bulguları ile uyumlu olarak safkan Arap atlarında tükürükte *eca-mir-378a*'ya ait yarış öncesi ve sonrası ifade seviyesi kat değişimi analizinde istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmiştir (P=0,002). Ayrıca *eca-miR-378a*'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası gen ifadelerindeki kat değişimi -0,1 olarak belirlenmiştir. Çalışma bulgularımız *eca-miR-378a*'nın adiposit farklılaşma üzerinde etkin olduğunu düşündürmektedir.

İlginçtir ki, Hicks ve ark. (2018), tarafından yapılan 25 koşucudan koşu öncesi ve koşu sonrası aldıkları tükürük örneklerinde *hsa-miR-378a* ifade seviyeleri arasında herhangi bir fark belirlenmemiştir. Koşu sonrası tükürük örnekleri 10-20 dk arası alınmıştır. Ayrıca, bu çalışmada *hsa-miR-378a* ile özdeş bir SEED REGION dizisini (UCCUGAC) paylaşan *hsa-miR-378f*'nin ifade seviyesinde koşu sonrası bir artış saptanmıştır. Bu farklılıkların kullanılan materyalden, materyalin alınma zamanından, uygulanan egzersiz programından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Safkan Arap yarış atları yarış yeteneği, sağlamlık, toparlanma ve dayanıklılık ile ilgili birçok genetik özelliğe sahiptirler. Bu özellikler yapılan birçok çalışmada SNP (tek nükleotid polimorfizmi) veya marker gen kullanılarak ayırt edilebilmektedir. Günümüzde, miRNA'ların gen düzenlenmesindeki aktif rollerinin olması fizyolojik ve patolojik süreçlerin incelenmesinde miRNA'ları kilit noktası haline getirmiştir. Ne yazık ki miRNA'lar iyi birer biyo-belirteç olarak tanımlanmalarına rağmen atlar üzerinde miRNA'lar ile ilgili çalışma sayısı çok azdır.

Arap yarış atları, sahip oldukları karakteristik kas yapısı nedeniyle lipid metabolizmasını diğer yarış ırkı atlara göre daha etkin kullanabilmektedirler. Bundan dolayıdır ki Arap yarış atları için lipid metabolizmasına etkin genler ve bu genlerin ifade seviyelerinde etkili miRNA'lar oldukça önemli olmasına rağmen bu konu ile ilgili yayınlanmış az sayıda çalışma mevcuttur. Ek olarak literatür taramasına bakıldığında atlarda tükürükten miRNA eldesinin yapıldığı bir çalışma tespit edilememiştir. Çalışma bulgularımız, Arap atlarında lipid metabolizmasının daha fazla araştırılması için bir temel oluşturmaktadır.

Yaptığımız çalışmada ilk kez atlarda tükürükten miRNA izolasyonu ve eldesi sağlanmıştır. Yarış atlarının çok değerli hayvanlar olması nedeniyle örnek alımı sırasında sıkıntılar yaşanmaktadır ve atlar üzerindeki stresin minimum olması istenmektedir. Tükürük alınımı noninvazif bir yöntem olması nedeniyle atlarda endişe ve rahatsızlık oluşturmamaktadır. Tükürük materyali alınma, muhafaza etme, toplama, gönderme ve hacimli örnekleme açısından kan ve idrara göre oldukça ekonomiktir. Ayrıca kanın pıhtılaşması gibi durumlar tükürükte olmadığından tükürüğün alınması ve taşınması daha kolaydır ve bu özelliklerin yanısıra, tükürük testlerinde sağlık çalışanları için hastalığın bulaşma riski olmadığından diğer vücut materyallerine göre daha güvenilirdir.

Tükürüğün fizyolojik kriterler ve hastalık yönünden materyal olarak teşhis için kullanılması, temininin kan ya da idrara göre kolay ve ucuz olması iş gücünü azaltacaktır ve alımından sonra enfeksiyon gelişme riskini düşürecektir. Bu nedenle çalışmanın, ilerde atlarda yapılması planlanan miRNA izolasyonu ve gen ifadelerinin belirleneceği çalışmalar için önemli bir ön veri oluşturacağı ve bu tarz çalışmaların sayısını arttıracığı düşünülmektedir.

Çalışma sonucunda safkan Arap atlarında yarış öncesi ve yarış sonrası alınan tükürük örneklerinde, daha önceden insanlarda lipid metabolizmasında etkinliği bilinen 8 adet miRNA'nın (*eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335*, *eca-miR-378a*) ifade seviyeleri incelenmiştir. Bu miRNA'lardan sadece 4 tanesinde (*eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a* ve *eca-miR-378a*) yarış öncesi ve sonrası ifade seviyelerine ait kat değişim analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmasına rağmen sadece *eca-miR-33a* genine ait kat değişiminin (yaklaşık 6 kat) 2'den büyük olduğu gözlemlenmiştir. Yarış atları için yağ asitlerinin oksidatif kapasitesinin yarış performansı ile doğru orantılı olduğu bilinmektedir. Mevcut çalışma sonunda elde etmiş olduğumuz veriler *eca-miR-33a*'nın yağ asidi oksidasyonunu ile olan ilişkisini destekler niteliktedir.

Diğer yandan çalışma sonuçları, *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b* ve *eca-miR-378a*'ya ait yarış sonrası ifade seviyelerindeki kat değişiminin 2'den küçük olması bu miRNA'ların *eca-miR-33a* kadar etkili olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca tükürük alım zamanının miRNA'ların ifade kat değişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada, *eca-miR-122* ve *eca-miR-370*'inde yarış öncesi ve yarış sonrası qPCR ile ifade seviyelerinin belirlenmesinin de amaçlanmasına rağmen bu genlere ait primerler çalışmamıştır (Ek 5). Bu primerlerin çalışmama sebebinin *eca-miR-122* ve *eca-miR-370*'e ait baz dizilimindeki özellikle seed region bölgesinden ki nükleotit

farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda sekans analizi yapılarak *eca-miR-122* ve *eca-miR-370*'e ait nükleotit dizi yapısının ortaya çıkarılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; bir sonraki aşamada lipid metabolizması üzerinde etkili olan ve özellikle *eca-miR-33a*'nın hedef genleri üzerinde daha kapsamlı benzer çalışmaların yapılması ve atların yarış performansı ile ilişkilendirilerek yolak analizlerinin yapılmasıyla atlarda koşu performansında lipid mekanizmasının etkisinin daha net şekilde belirleneceği düşünülmektedir.



ÖZET

Safkan Arap Yarış Atlarında Tükürükte Yarış Öncesi ve Sonrası Lipid Metabolizmasını Etkileyen mikroRNA'ların Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi

Araştırma, safkan Arap atlarında yarış öncesi ve yarış sonrası alınan tükürük örneklerinde, daha önceden insanlarda lipid metabolizmasında etkinliği bilinen 8 adet miRNA'nın (*eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335*, *eca-miR-378a*) ifade seviyelerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada Şanlıurfa hipodromunda aynı yarışta koşan (1200 m. kum) 3 yaşlı safkan Arap yarış atları (n=13) kullanılmıştır ve yarış öncesi (at dinlenme halinde iken) ve hemen yarış sonrası örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Alınan tükürük örneklerinde (n=26) qPCR analizleri gerçekleştirilerek *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125a*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335*, *eca-miR-378a* ve normalizasyonda kullanılan *Unisp6* geni ifade seviyeleri yönünden yarış öncesi ve yarış sonrası yönünden incelemeye alınmıştır.

eca-miR-33a'ya ait yarış öncesi ve yarış sonrası ifade seviyesi incelendiğinde *eca-miR-33a*'nın yarış öncesi ve yarış sonrası ifade seviyesinin yaklaşık olarak 6 kat artmış olduğu görülmüş ve diğer tüm miRNA'lardan daha belirgin bir farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b* ve *eca-miR-378*'e ait yarış öncesi ve yarış sonrası gen ifade seviyelerinde yarış öncesi ve yarış sonrası anlamlı bir fark olmasına rağmen bu miRNA'lara ait kat değişim farkının 2'den küçük olduğu gözlenmiştir. *eca-miR-125a*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335*'e ait yarış öncesi ve yarış sonrası ifade seviyelerinde ise herhangi bir fark olmadığı görülmüştür.

Bu araştırma ile *eca-miR-33a* ve bu miRNA'nın hedef genlerinin lipid metabolizması için dolayısıyla safkan Arap yarış atlarında yarış performansının belirlenmesinde önemli bir belirteç olabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte çalışma ile at genomundan ilk kez tükürükten miRNA eldesi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Arap atı, *eca-miR-33a*, miRNA, qPCR.

SUMMARY

Determination of Gene Expression of MicroRNAs Affecting Lipid Metabolism in Saliva Before and After Race in Purebred Arabian Racing Horses

The aim of this study was to investigate the 8 miRNAs (*eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125b*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335*, *eca-miR-378a*) previously known to be effective in lipid metabolism in pre-race and post-race saliva samples of purebred Arabian horses gene expression levels.

In the study, 3 years old purebred Arabian race horses (n= 13) running in the same race (1200 m. Sand) in Şanlıurfa Racecourse were used and the sample was made before the race (while the horse was at rest) and immediately after the race. qPCR analyzes were performed at the saliva samples (n = 26) at the molecular level and carried out with *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b*, *eca-miR-33a*, *eca-miR-33b*, *eca-miR-125a*, *eca-miR-143*, *eca -miR-335*, *eca-miR-378a* and *Unispi6* genes used in normalization were examined in terms of gene expression levels before and after the race.

When the pre-race and post-race gene expression levels of the *eca-miR-33a* gene were examined, it was found that the pre-race and post-race gene expression levels of the *eca-miR-33a* gene increased approximately 6-fold and showed a more significant difference than all other genes. Although there was a significant difference in pre-race and post-race gene expression levels of *eca-miR-27a*, *eca-miR-27b* and *eca-miR-378* genes, the fold change of these genes was less than 2. There was no difference in pre-race and post-race gene expression levels of *eca-miR-125a*, *eca-miR-143*, *eca-miR-335* genes.

It was concluded that the *eca-miR-33a* gene and the target genes of this miRNA could be an important marker for lipid metabolism and thus for determining race performance in purebred Arabian race horse. However, for the first time, miRNA was obtained from saliva from the horse genome.

Keywords: Arabian horse, *eca-miR-33a*, miRNA, qPCR.

KAYNAKLAR

- AI J, ZHANG R, LI Y, PU J, LU Y, JIAO J, LI K, YU B, LI Z, WANG R, WANG L, LI Q, WANG N, SHAN H, LI Z, YANG B (2010). Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391(1)**: 73-77.
- AI L, XU M, CHEN M, ZHANG Y, CHEN S (2012). Characterization of microRNAs in *Taenia saginata* of zoonotic significance by Solexa deep sequencing and bioinformatics analysis. *Parasitol Res.*, **110**: 2373-2378.
- AKKAYA Z, DİNÇER P (2013). Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal*, **26**: 5-10.
- ALMEIDA MI, REIS RM, CALIN GA (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat. Res.*, **717**: 1-8.
- AMBROS V (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to- adult developmental switch in *C. Elegans*. *Cell. Apr.*, **7**; **57(1)**: 49-57
- AN X, MA K, ZHANG Z, ZHAO T, ZHANG X, TANG B, LI Z (2016). miR-17, miR-21, and miR-143 enhance adipogenic differentiation from porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *DNA and Cell Biology*, **35(8)**: 410-416.
- ANDREOU I, SUN X, STONE PH, EDELMAN ER, FEINBERG MW (2015). miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture. *Trends in Molecular Medicine*, **21(5)**: 307-318.
- ARFUSO F, GIANNETTO C, GIUDICE E, FAZIO F, PICCIONE G (2016). Dynamic modulation of platelet aggregation, albumin and nonesterified fatty acids during physical exercise in Thoroughbred horses. *Research in Veterinary Science*, **104**: 86-91.
- ARUNACHALAM SR, TANG KD, PUNYADEERA C (2019). Isolation and quantification of microRNAs from human saliva. *Theranostics*, **(pp)**: 105-114. Humana, New York, NY.
- BALA S, PETRASEK J, MUNDKUR S, CATALANO D, LEVIN I, WARD J, (2012). Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology*, **56**: 1946-57 10.1002/hep.25873.
- BARBER JL, ZELLARS KN, BARRINGHAUS KG, BOUCHARD C, SPINALE, FG, SARZYNSKI MA (2019). The effects of regular exercise on circulating cardiovascular-related microRNAs. *Scientific Reports*, **9(1)**: 7527.

- BARREY E, BONNAMY B, BARREY E, MATA X, CHAFFAUX S (2010). Muscular microRNA expressions in healthy and myopathic horses suffering from polysaccharide storage myopathy or recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet. J*, **42**: 303-310.
- BARTEL DP (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**: 215-233.
- BERNSTEIN E, CAUDY AA, HAMMOND SM, HANNON GJ (2001). Role for a bidendate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**: 363-66.
- BIRNEY E, STAMATOYANNOPOULOS JA, DUTTA A, GUIGÓ R, GINGERAS TR, (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**: 799-816.
- BRODERICK JA, ZAMORE PD (2014). Competitive endogenous RNAs cannot alter microRNA function in vivo. *Molecular Cell*, **54(5)**: 711-713.
- BODUR E, DEMIRPENÇE E (2010). Kodlanmayan RNA'lar ve gen susturulması. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **41(2)**: 82-9.
- BOETTGER T, BEETZ, N, KOSTIN, S, SCHNEIDER, J, KRÜGER, M, HEIN, L BRAUN T. (2009). Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *The Journal of Clinical Investigation*, **119(9)**: 2634-2647.
- BORCHERT GW, DAVIDSON BL (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol*, **13**:1097-101.
- BROOKS SA, MAKVANDI-NEJAD S, CHU E, ALLEN JJ, STREETER C, GU E, SUTTER NB (2010). Morphological variation in the horse: defining complex traits of body size and shape. *Animal Genetics*, **41**:159-165.
- BUGNO-PONIEWIERSKA M, STEFANIUK-SZMUKIER M, PIESTRZYŃSKA-KAJTOCH A, FORMAL A, PIÓRKOWSKA K, ROPKA-MOLIK K (2019). Genetic screening for cerebellar abiotrophy, severe combined immunodeficiency and lavender foal syndrome in Arabian horses in Poland. *The Veterinary Journal*, **248**: 71-73.
- BUZA T, ARİCK M, WANG H, PETERSON DG (2014). Computational prediction of disease microRNAs in domestic animals. *BMC Research Notes*, **7**: 403.
- CARNİCİ P, KASUKAWA T, KATAYAMA S (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, **309**: 1559-63

- CARRER M, LIU N, GRUETER CE, WILLIAMS AH, FRISARD MI, HULVER MW, OLSON EN. (2012). Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109(38)**: 5330-15335.
- CARREÓN V, MACEDO R, DE LA PEÑA C (2013). Effect of physical activity and other factors on serum levels of total cholesterol and triglycerides in horses in Colima, Mexico. *J. Vet. Adv.*, **3(7)**: 215-219.
- CHEN WJ, YIN K, ZHAO GJ, FU YC, TANG, CK (2012). The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **222(2)**:314-323.
- CHENG EC, LIN H (2013). Repressing the repressor: a lincRNA as a MicroRNA sponge in embryonic stem cell self-renewal. *Developmental Cell*, **25(1)**:1-2.
- CHENG X, XI QY, WEI S, WU D, YE RS, CHEN T, ZHU XT (2016). Critical role of miR-125b in lipogenesis by targeting stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *Journal of animal science*, **94(1)**:6:5-76.
- CHOWDHARY BP, PARIA N, RAUDSEPP T (2008). Potential applications of equine genomics in dissecting diseases and fertility. *Anim Reprod Sci*, **107**: 208-218.
- CURTIS HJ, SIBLEY CR, WOOD MJA (2012). Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. *Wiley Interdiscip Rev. RNA*, **3**: 617-32.
- CREIGHTON CJ, REID JG, GUNARATNE PH (2009). Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief Bioinform*, **10**: 490-497.
- CONSTANTINOPOL M, JONES JH, WEIBEL ER, TAYLOR CR, LINDHOL A, KARAS RH (1989). Oxygen transport during exercise in large mammals. II. Oxygen uptake by the pulmonary gas exchanger. *Journal of Applied Physiology*, **67(2)**: 871-878.
- COURTS C, MADEA B (2011). Specific micro-RNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. *Journal of Forensic Sciences*, **56(6)**:1464-1470.
- DÁVALOS, A, GOEDEKE, L, SMIBERT, P, RAMÍREZ, C. M, WARRIER, N. P, ANDREO, U, ESPLUGUES, E. (2011). miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9232-9237.
- DÁVALOS A, FERNÁNDEZ-HERNANDO C (2013). From evolution to revolution: miRNAs as pharmacological targets for modulating cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Pharmacological Research* **75**: 60-72.
- DENLI AM, TOPS BB, PLASTERK R, KETTING RF, HANNON GJ (2004). Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*, **432**: 231-35.

- DIAZ-ARNOLD, AM, MAREK, CA (2002). The impact of saliva on patient care: A literature review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, **88(3)**: 337-343.
- DIAZ CC, PLAZA CE, CHIMOY EP (2008). Niveles séricos de Triglicéridos y colesterol en caballos peruanos de paso bajo dos sistemas de crianza. *Rev. Inv. Vet. Perú.*, **9**: 134-139.
- DUTTAGUPTA R, JIANG R, GOLLUB J, GETTS RC, JONES, KW (2011). Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PloS one*, **6(6)**: e20769.
- EICHNER LJ, PERRY MC, DUFOUR CR, BERTOS N, PARK M, ST-PIERRE J, GIGUÈRE V (2010). miR-378* mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1 β /ERR γ transcriptional pathway. *Cell Metabolism*, **12(4)**: 352-361.
- ENGELS B, HUTVAGNER G (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene*, **25**: 6163-6169.
- ERHARTOVA D, CAHOVA M, DANKOVA H, HECZKOVA M, MIKOVA I, STICOVA E, TRUNECKA P (2019). Serum miR-33a is associated with steatosis and inflammation in patients with non-alcoholic fatty liver disease after liver transplantation. *PloS one*, **14**: 11.
- ERSON AE, PETTY EM (2008). MicroRNAs and in development and disease. *Clin. Genet.* **74**: 296-306.
- ESAU, C, KANG, X, PERALTA, E, HANSON, E, MARCUSSE, EG, RAVICHANDRAN, SUN Y, KOO S, PERERA RJ, JAÏN R, DEAN NM, FREIER SM, BENNETT CF, LOLLO B, GRIFFEY R, DEAN NM. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, **279**: 52361–52365
- FAN P, CHEN Z, TIAN P, LIU W, JIAO Y, XUE Y (2013). miRNA biogenesis enzyme drosha is required for vascular smooth muscle cell survival. *PLoS one*. **8**: 1-11.
- FASOLO F, DIGREGOLI K, MAEGDEFESSEL L, JOHNSON JL (2019). Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, **115(12)**: 1732-1756.
- FERNÁNDEZ-HERNANDO C, MOORE KJ (2011). MicroRNA modulation of cholesterol homeostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **31(11)**: 2378-2382.
- FERNÁNDEZ-HERNANDO C, SUÁREZ Y, RAYNER KJ, MOORE KJ (2011). MicroRNAs in lipid metabolism. *Current opinion in lipidology*, **22(2)**: 86.
- FILIPOWICZ W, JASKIEWICZ L, KOLB FA, PILLAI RS (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct Biol.* **15(3)**: 331-41.

- FILIPOWICZ W, BHATTACHARYYA SN, SONENBERG N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight. *Nature Reviews Genetics*, **9(2)**: 102.
- FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-11.
- FIORUCCI G, CHIANTORE MV, MANGINO G, PERCARIO ZA, AFFABRIS E, ROMEO G. (2012). Cancer regulatuar microRNA: potential relevance in diagnosis, prognosis and treatment of cancer. *Curr. Med. Chem.* **19 (4)**: 461-474.
- FLOWERS E, FROELICHER ES, OUIZERAT BE (2013). MicroRNA regulation of lipid metabolism. *Metabolism*, **62(1)**: 12-20.
- FRANK F, SONENBERG N, NAGAR B (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, **465** 818-822.
- FREESTONE J, CARLSON G (1991). Muscle disorders in the horse: a retrospective study. *Equine Vet. J.* **23**: 86-90.
- GAFFNEY B, CUNNINGHAM EP (1988). Estimation of genetic trend in racing performance of thoroughbred horses. *Nature*, **332**: 722.
- GALUPPO L, SNYDER J, PASCOE J (1995). Laparoscopic anatomy of the equine abdomen. *Am. J. Vet. Res.* **56**: 518-531.
- GAGAN J, DEY BK, LAYER R, YAN Z, DUTTA A (2011). MicroRNA-378 targets the myogenic repressor MyoR during myoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, **286(22)**: 19431-19438.
- GEBERT LFR, MACRAE IJ. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **20**: 21-37
- GERIN I, CLERBAUX LA, HAUMONT O, LANTHIER N, DAS AK, BURANT CF, BOMMER GT (2010). Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, **285(44)**: 33652-33661.
- GIM JA, AYARPADIKANNAN S, EO J, KWON YJ, CHOI Y, LEE HK, KIM HS. (2014). Transcriptional expression changes of glucose metabolism genes after exercise in thoroughbred horses. *Gene*, **547(1)**: 152-158.

- GONZALO-CALVO D, DAVALOS A, MONTERO A, GARCIA-GONZALEZ A, TYSHKOVSKA I, GONZÁLEZ-MEDINA A, DIAZ-MARTINEZ AE (2015). Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. *Journal of Applied Physiology*, **119**(2): 124-134.
- GRIFFITHS-JONES S (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res, Database Issue* **32**: 109-11.
- GRISHOK A, PASQUINELLI AE, CONTE D, LI N, PARRISH S, HA I (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, **106**: 24-34.
- GURGUL A, JASIELCZUK I, SEMIK-GURGUL E, PAWLINA-TYSZKO K, STEFANIUK-SZMUKIER M, SZMATOŁA T, BUGNO-PONIEWIERSKA M (2019). A genome-wide scan for diversifying selection signatures in selected horse breeds. *PloS one*, **14**(1): e0210751.
- GÜZELGÜL F, AKSOY K (2009). Kodlanmayan RNA'ların işlevi ve tıpta kullanım alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **18**: 141-55.
- GÜZELGÜL F, AKSOY K (2015). Bir gen ifade düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **24**(4): 472-493.
- HA M, KIM VN (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**(8): 509-524.
- HANSEN TB, WIKLUND ED, BRAMSEN JB, VILLADSEN SB, STATHAM AL, CLARK, SJ, KJEMS J (2011). miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *The EMBO Journal*, **30**(21): 4414-4422.
- HANSEN KF, KARELINA K, SAKAMOTO K, WAYMAN GA, IMPEY S, OBRIETAN K (2013). miRNA-132: a dynamic regulator of cognitive capacity. *Brain Structure and Function*, **218**(3): 817-831.
- HAMMOND SM, BERNSTEIN E, BEACH D, HANNON GJ (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**: 293-296.
- HAMMOND SM, CAUDY AA, HANNON GJ (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics*, **2**(2): 110-119.
- HAVENS MA, REICH AA, DUELLI DM, HASTINGS ML (2012). Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res*, **40**: 4626-40.

- HE L, HANNON GJ, (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet*, **5**: 522-31.
- HENTZE MW, PREISS T (2013). Circular RNAs splicing's enigma variations. *EMBO J*. **32**: 923-5.
- HICKS SD, JACOB P, MIDDLETON FA, PEREZ O, GAGNON Z (2018). Distance running alters peripheral microRNAs implicated in metabolism, fluid balance, and myosin regulation in a sex-specific manner. *Physiological Genomics*, **50(8)**: 658-667.
- HICKS SD, CARPENTER RL, WAGNER KE, PAULEY R, BARROS M, TIERNEY-AVES C, MIDDLETON FA. (2019). Saliva microRNA differentiates children with autism from peers with typical and atypical development. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*.
- HINCHCLIFF KW, GEOR RJ (2004). Integrative physiology of exercise. *Equine sports medicine and surgery*, **pp**: 3-8. WB Saunders.
- HILL EW, EIVERS SS, MCGIVNEY BA, FONSECA RG, GU J, SMITH NA, KATZ LM (2010a). Moderate and high intensity sprint exercise induce differential responses in COX4I2 and PDK4 gene expression in Thoroughbred horse skeletal muscle. *Equine Veterinary Journal*, **42**: 576-581.
- HILL EW, GU J, EIVERS SS, FONSECA RG, MCGIVNEY BA, GOVINDARAJAN P, MACHUGH D (2010b). A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PloS one*, **5(1)**: e8645.
- HODGSON DR, MCGOWAN CM, MCKEEVER K (2013). The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine. *Elsevier Health Sciences*. 2.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 396p.
- HODGSON DR (2014). Thermoregulation. In *The Athletic Horse* **pp**: 108-124. WB Saunders.
- HORIE T, NISHINO T, BABA O, KUWABARA Y, NAKAO T, NISHIGA M, KOYAMA S (2014). MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. *Scientific Reports* **4**: 5312.
- HOU X, TANG Z, LIU H, WANG N, JU H, LI K (2012). Discovery of microRNAs associated with myogenesis by deep sequencing of serial developmental skeletal muscles in pigs. *PloS one*, **7(12)**;; e52123.
- HUANG Z, CHEN X, YU B, HE J, CHEN D (2012). MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **423(2)**: 265-269.

- HUSSAIN MU (2012). Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell and Tissue Research*, **349(2)**: 405-413.
- HUTVAGNER G, SIMARD MJ. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9(1)**: 22-32.
- JACQUES M, HIAM D, CRAIG J, BARRES R, EYNON N, VOISIN S (2019). Epigenetic changes in healthy human skeletal muscle following exercise. a systematic review. *Epigenetics*, **14(7)**: 633-648.
- JEON TI, OSBORNE TF (2012). SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **23(2)**: 65-72.
- JHA A, MEHRA M, SHANKAR R (2011). The regulatory epicenter of miRNAs. *J Biosci*, **36**: 621-8.
- JIANG J, LV X, FAN L, HUANG G, ZHAN Y, WANG M, LU H (2014). MicroRNA-27b suppresses growth and invasion of NSCLC cells by targeting Sp1. *Tumor Biology*, **35(10)**: 10019-10023.
- JIN W, GRANT JR, STOTHARD P, MOORE SS, GUAN LL (2009). Characterization of bovine miRNAs by sequencing and bioinformatics analysis. *BMC Mol Biol*, **10(1)**: 90.
- JONES JH, LINDSTEDT SL (1993). Limits to maximal performance. *Annu Rev Physiol*, **55**: 547-569.
- JONES JH, LONGWORTH KE, LINDHOLM A, CONLEY KE, KARAS R.H (1989). Oxygen transport during exercise in large mammals. I. Adaptive variation in oxygen demand. *J. Appl. Physiol*, **67**: 862-870.
- KANG BK, HWANG IK, LEE YS, KIM J, HWANG JH (2014). MicroRNA-27b as a prognostic marker in pancreatic neuroendocrine tumor. *American Society of Clinical Oncology*. (2014): 251-251.
- KAIKKONEN MU, LAM MT, GLASS CK, (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res.*, **90**: 430-40.
- KAPRANOV P, WILLINGHAM AT, GINGERAS TR, (2007). Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nature Reviews Genetics*, **8(6)**:413.
- KARBIENER M, FISCHER C, NOWITSCH S, OPRIESSNIG P, PAPAK C, AILHAUD G, SCHEIDELER M (2009). microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPAR γ . *Biochemical and Biophysical Research Communications* **390(2)**: 247-251.

- KARP X, HAMMELL M, OW MC, AMBROS V (2011). Effect of life history on microRNA expression during *C. elegans* development. *RNA Society Apr*; **17(4)**: 639-51.
- KETTING RF, FISCHER SEJ, BERSTEIN E, SIJEN T, HANNON GJ, PLASTERK RHA (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**: 2654-59.
- KILIC ID, DODURGA Y, ULUDAG B, ALIHANOGLU YI, YILDIZ BS, ENLI Y, BOSTANCI HE (2015). MicroRNA-143 and-223 in obesity. *Gene*, **560(2)**: 140-142.
- KIM VN, HAN J, SIOMI MC (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*, **10**:126-139.
- KIM MC, LEE SW, RYU DY, CUI FJ, BHAK J, KIM Y (2014). Identification and Characterization of MicroRNAs in Normal Equine Tissues by Next Generation Sequencing. *PLoS one* **9(4)**: e93662.
- KIM HA, KIM MC, KIM NY, RYU DY, LEE HS, KIM Y (2018). Integrated analysis of microRNA and mRNA expressions in peripheral blood leukocytes of Warmblood horses before and after exercise. *Journal of Veterinary Science* **19(1)**: 99-106.
- KONSTANTINIDOU A, MOUGIOS V, SIDOSSIS LS (2016). Acute exercise alters the levels of human saliva miRNAs involved in lipid metabolism. *International Journal of Sports Medicine* **37(07)**: 584-588.
- KOSAKA N, IGUCHI H, YOSHIOKA Y, TAKESHITA F, MATSUKI Y, OCHIYA T (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *Biol. Chem. J.*, 4: 285(23).
- KOWAL J, TKACH M (2019). Dendritic cell extracellular vesicles. *International Review of Cell and Molecular Biology* **349**: 213-249.
- KOZOMARA A, BIRGAOANU M, JONES-GRIFFITHS S (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.*, **47**: 155-162.
- KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, **11(9)**: 597.
- KULCHESKI FR, CHRISTOFF AP, MARGIS R (2016). Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker. *Journal of Biotechnology* **238**: 42-51.
- KULYTÉ A, LORENTE-CEBRIÁN S, GAO H, MEJHERT N, AGUSTSSON T, ARNER P, DAHLMAN I (2013). MicroRNA profiling links miR-378 to enhanced adipocyte lipolysis in human cancer cachexia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **306(3)**: E267-E274.

- KUNG JT, COLOGNORI D, LEE JT (2012). Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*, **193**(3):651-69.
- LACOURT M, GAO C, LI A, GIRARD C, BEAUCHAMP G (2012). Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, **20**: 572-583.
- LADEWIG E, OKAMURA K, FLYNT AS, WESTHOLM JO, LAI EC (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res.*, **22**: 1634-45.
- LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, MEYER J, BORKHARDT A, TUSCHL T (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA* **9**: 175-179.
- LAU NC, LIM LP, WEINSTEIN EG, BARTEL DP (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**:858-62.
- LEDFORD H (2013). Circular RNAs throw genetic for a loop. *Nature*, **28**: 415-494.
- LEE RC, AMBROS V (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**: 862-64.
- LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.*, **75**: 843-54.
- LEE Y, KIM M, HAN J, YEOM KH, LEE S, BAEK SH, KIM NV (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.*, **23**: 4051-60.
- LEVINE MA (1999) Botai and the origins of horse domestication. *J Anthropol Archaeol* **18**(1):29–78
- LIANG Y, RIDZON D, WONG L, CHEN C (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, **8**: 166.
- LIN Q, GAO Z, ALARCON RM, YE J, YUN Z (2009). A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *The FEBS Journal*, **276**(8): 2348-2358.
- LIU G, CAO P, CHEN H, YUAN W, WANG J, TANG X (2013). MiR-27a regulates apoptosis in nucleus pulposus cells by targeting PI3K. *PLoS One*, **8**(9): e75251.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**(4): 402-408.

- LIU SY, ZHANG YY, GAO Y, ZHANG LJ, CHEN HY, ZHOU Q, DAI LS (2015). MiR-378 plays an important role in the differentiation of bovine preadipocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **36(4)**: 1552-1562.
- LUND E, GUTTINGER S, CALADO A, DAHLBERG JE, KUTAY U (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **303**: 95-8.
- MACH N, RAMAYO-CALDAS Y, CLARK A, MOROLDO M, ROBERT C, BARREY E, LE MOYEC L (2017). Understanding the response to endurance exercise using a systems biology approach: combining blood metabolomics, transcriptomics and miRNomics in horses. *BMC Genomics* **18(1)**: 187.
- MAIR T, SMITH L (2005). Survival and complication rates in 300 horses undergoing surgical treatment of colic. Part 1: Short-term survival following a single laparotomy. *Equine Vet. J.*, **37**: 296–302.
- MALONE C, HANNON G (2009). Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*, **136**:656-68.
- MAKAROVA JA, MALTSEVA DV, GALATENKO VV, ABBASI A, MAXIMENKO DG, GRIGORIEV AI, NORTHOFF H (2014). Exercise immunology meets MiRNAs. *Exercise Immunology Review*. **20**: 135-164.
- MARQUART TJ, WU J, LUSIS AJ, BALDÁN Á (2013). Anti-miR-33 therapy does not alter the progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **33(3)**: 455-458.
- MATSE JH, YOSHIZAWA J, WANG X, ELASHOFF D, BOLSCHER JG, VEERMAN EC, BLOEMENA E (2015). Human salivary micro-RNA in patients with parotid salivary gland neoplasms. *PloS one*, **10(11)**: e0142264.
- MASSART J, KATAYAMA M, KROOK A (2016). microManaging glucose and lipid metabolism in skeletal muscle: role of microRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1861(12)**: 2130-2138.
- MELO CA, MELO SA (2014): Biogenesis and physiology of microRNAs. Springer. **5**:24
- MENNIGEN JA, PANSEERAT S, LARQUIER M, PLAGNES-JUAN E, MEDALE F, SEILIEZ I, SKIBA-CASSY S (2012). Postprandial regulation of hepatic microRNAs predicted to target the insulin pathway in rainbow trout. *PloS one*, **7(6)**: e38604.
- MERICSKAY, M. (2014). Proteome modulation in H9c2 cardiac cells by microRNAs miR-378 and miR-378. *Molecular & Cellular Proteomics*, **13(1)**:18-29.
- MESE H, MATSUO R (2007). Salivary secretion, taste and hyposalivation. *Journal of Oral Rehabilitation*, **34(10)**: 711-723.

- MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, TORTI F, KRUEGER J, RYBAK A, LOEWER AL (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, **495**:333-338.
- MICHALEWSKI G, CÁCERES JF (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*, **25**(1): 1-16.
- MOSS EG, LEE RC, AMBROS V (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. Elegans* and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell*, **7**;88(5): 637-46.
- MOTA MDS, ABRAHÃO AR, OLIVEIRA HN (2005). Genetic and environmental parameters for racing time at different distances in Brazilian Thoroughbreds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **122**(6): 393-399.
- NAJAFI-SHOUSHTARI SH, KRISTO F, LI Y, SHIODA T, COHEN DE, GERSZTEN RE, NÄÄR, AM (2010). MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science*, **328**(5985): 1566-1569.
- NAKANISHI N, NAKAGAWA Y, TOKUSHIGE N, AOKI N, MATSUZAKA T, ISHII K, SUZUKI H (2009). The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **385**(4): 492-496.
- NAZIFI S, SAEB M, RATEGH S, KHOJANDI A (2005). Serum lipids and lipoproteins in clinically healthy Caspian miniature horses. *Veterinarsky Arhiv.*, **75**: 175-182.
- NICHOLAS FW (2003). Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA): a comparative knowledgebase of genetic disorders and other familial traits in non-laboratory animals. *Nucleic Acids Res.*, **31**: 275-277.
- NIELSEN S, ÅKERSTRÖM T, RINNOV A, YFANTI C, SCHEELE C, PEDERSEN BK, LAYE MJ (2014). The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PloS one*, **9**(2): e87308.
- OKAMURA K, HAGEN JW, DUAN H, TYLER DM, LAI EC (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, **130**(1): 89-100.
- OKAMURA K, LADEWIG E, ZHOU L, LAI EC (2013). Functional small RNAs are generated from select miRNA hairpin loops in flies and mammals. *Genes & Development*, **27**(7):778-792.
- ONO K, HORIE T, NISHINO T, BABA O, KUWABARA Y, YOKODE M, KIMURA T (2014). MicroRNA-33a/b in lipid metabolism. *Circulation Journal*, **14**: 1252.

- ONO K (2016). Functions of microRNA-33a/b and microRNA therapeutics. *Journal of Cardiology*, **67(1)**: 28-33.
- PAGAN JD, GEOR RJ, HARRIS PA, HOEKSTRA K, GARDNER S, HUDSON C, PRINCE A (2002). Effects of fat adaptation on glucose kinetics and substrate oxidation during low-intensity exercise. *Equine Veterinary Journal*, **34(S34)**: 33-38.
- PALANISAMY V, SHARMA S, DESHPANDE A, ZHOU H, GIMZEWSKI J, WONG DT (2010). Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PloS one*, **5(1)**: e8577.
- PASQUINELLI AE, REINHART B J, SLACK F, MARTINDALE MQ, KURODA MI, MALLER B, SPRING J (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, **408**: (6808) 86.
- PAPPA E, KOUSVELARI E, VASTARDIS H (2019). Saliva in the “Omics” era: A promising tool in paediatrics. *Oral Diseases*, **25(1)**: 16-25.
- PAULI A, RINN JL, SCHIER AF, (2011). Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nat Rev Genet*, **12**: 136-49
- PENCHEVA N, TAVAZOIE SF (2013). Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nature cell biology*, **15(6)**: 546-554.
- PÉREZ R, GARCIA M, CABEZAS I, GUZMÁN R, MERINO V, VALENZUELA S, GONZÁLEZ C (1997). Actividad física y cambios cardiovasculares y bioquímicos del caballo chileno a la competencia de rodeo. *Arch. Med. Vet.*, **29**: 221-234.
- PERRON MP, PROVOST P (2008). Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* **13**: 2537-2547.
- PETERSEN JL, MICKELSON JR, RENDAHL AK, VALBERG SJ, ANDERSSON LS, AXELSSON J, BRAMA P (2013). Genome-wide analysis reveals selection for important traits in domestic horse breeds. *PLoS genetics*, **9(1)**: e1003211.
- PICCIONE G, ARFUSO F, FAZIO F, BAZZANO M, GIANNETTO C (2014a). Serum lipid modification related to exercise and polyunsaturated fatty acid supplementation in jumpers and thoroughbred horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, **34(10)**: 1181-1187.
- PICCIONE G, MARAFIOTI S, GIANNETTO C, PANZERA M, FAZIO F (2014b). Effect of dietary supplementation with omega 3 on clotting time, fibrinogen concentration and platelet aggregation in the athletic horse. *Livestock Science*, **161**:109-113.

- PRINCE R, GEOR P, HARRIS P, HOEKSTRA K, GARDNER S, HUDSON C, PAGAN J, (2002). Comparison of the metabolic responses of trained Arabians and thoroughbreds during high- and low-intensity exercise. *Equine Veterinary Journal*, **34**: 95-99.
- RAYNER KJ, ESA, CC, HUSSAIN FN, MCDANIEL AL, MARSHALL SM, VAN GILS JM, KHATSENKO OG (2011). Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*, **478**: 404.
- RAYNER KJ, FERNÁNDEZ-HERNANDO C, MOORE KJ (2012). MicroRNAs regulating lipid metabolism in atherogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*, **107(04)**: 642-647.
- RAYNER KJ, HENNESSY EJ (2013). Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. *Journal of Lipid Research*, **54(5)**: 1174-1181.
- RAPADO-GONZÁLEZ Ó, MAJEM B, ÁLVAREZ-CASTRO A, DIAZ-PEÑA R, ABALO A, SUÁREZ-CABRERA L, SUAREZ-CUNQUEIRO MM (2019). A novel saliva-based miRNA signature for colorectal cancer diagnosis. *Journal of Clinical Medicine*, **8(12)**: 2029.
- REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, PASQUINELLI AE, BETTINGER JC, ROUGVIE AE, Ruvkun G (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **403**: 901-6.
- RODRIGUEZ A, GRIFFITHS-JONES S, ASHURST JL, BRADLEY A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, **14(10a)**: 1902-1910.
- ROPKA-MOLIK K, STEFANIUK-SZMUKIER M, ZUKOWSKI K, PIÓRKOWSKA K, BUGNO-PONIEWIERSKA M (2017). Exercise-induced modification of the skeletal muscle transcriptome in Arabian horses. *Physiological genomics* **49(6)**: 318-326.
- ROPKA-MOLIK K, STEFANIUK-SZMUKIER M, MUSIAŁ AD, VELIE BD (2019a). The Genetics of Racing Performance in Arabian Horses. *International Journal of Genomics* 2019.
- ROPKA-MOLIK K, STEFANIUK-SZMUKIER M, ZUKOWSKI K, PIÓRKOWSKA K, BUGNO-PONIEWIERSKA M (2019b). The use of the SLC16A1 gene as a potential marker to predict race performance in Arabian horses. *BMC Genetics*, **20(1)**: 73.
- RUVKUN G, GIUSTO J (1989). The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature*. **23**: 338 (6213)313-9
- RUVKUN G (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, **294**: 797-799.

- SIRKER M, FIMMERS R, SCHNEIDER PM, GOMES I (2017). Evaluating the forensic application of 19 target microRNAs as biomarkers in body fluid and tissue identification. *Forensic Science International: Genetics*, **27**: 41-49.
- STEFANIUK-SZMUKIER M, ROPKA-MOLIK K, PIÓRKOWSKA K, BUGNO-PONIEWIERSKA M (2019). The expression profile of genes involved in osteoclastogenesis detected in whole blood of Arabian horses during 3 years of competing at race track. *Research in Veterinary Science* **123**: 59-64.
- STAHL PD, RAPOSO G (2019). Extracellular vesicles: exosomes and microvesicles, integrators of homeostasis. *Physiology*, **34(3)**: 169-177.
- SACCO J, ADELI K (2012). MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, **23(3)**: 220-225.
- SHEN L, CHEN L, ZHANG S, DU J, BAI L, ZHANG Y, ZHU L. (2016). MicroRNA-27b regulates mitochondria biogenesis in myocytes. *PloS one* **11(2)**: e0148532.
- SU YW, CHEN X, JIANG ZZ, WANG T, WANG C, ZHANG Y (2012). A panel of serum microRNAs as specific biomarkers for diagnosis of compound- and herb-induced liver injury in rats. *PLoS one* **7**: e37395.
- TAFT RJ, PHEASANT M, MATTICK JS (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays*, **29**: 288-299.
- TAK H, KIM J, JAYABALAN AK, LEE H, KANG H, CHO DH, LEE EK (2014). miR-27 regulates mitochondrial networks by directly targeting the mitochondrial fission factor. *Experimental & Molecular Medicine*, **46(11)**: e123
- THOMAS M, LANGE-GRÜNWELLER K, WEIRAUCH U, GUTSCH D, AIGNER A, GRÜNWELLER A, HARTMANN RK (2012). The proto-oncogene Pim-1 is a target of miR-33a. *Oncogene*, **31(7)**: 918.
- TREIBER T, TREIBER N, MEISTER G (2012). Regulation of microRNA biogenesis and function. *Tromb Haemotology*, **107**: 605-10.
- TONEVITSKY AG, MALTSEVA DV, ABBASI A, SAMATOV TR, SAKHAROV DA, SHKURNIKOV MU, NORTHOFF H (2013). Dynamically regulated miRNA-mRNA networks revealed by exercise. *BMC Physiology*, **13(1)**: 9-13.
- WADE C, GIULOTTO E, SIGURDSSON S, ZOLI M, GNERRE S (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, **326**: 865-867.
- WARDEN CD, YUAN YC, WU X (2013). Optimal calculation of RNA-Seq fold-change values. *International Journal of Computational Bioinformatics and In Silico Modeling*, **2(6)**: 285-292.

- WEBER JA, BAXTER DH, ZHANG S, HUANG DY, HUANG KH, LEE MJ (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem*, **56**: 1733-1741
- WEI F, YUE F (2011). MicroRNAs in neural cell development and brain diseases. *Sci China Life Sci*. **54**: 1103-12.
- WEI L, WANG X, LV L, ZHENG Y, ZHANG N, YANG M (2019). The emerging role of noncoding RNAs in colorectal cancer chemoresistance. *Cellular Oncology*, **2019**: 1-12.
- WIJESEKARA N, ZHANG LH, KANG MH, ABRAHAM T, BHATTACHARJEE A, WARNOCK GL, HAYDEN MR (2012). miR-33a modulates ABCA1 expression, cholesterol accumulation, and insulin secretion in pancreatic islets. *Diabetes*, **61(3)**: 653-658.
- WESTHOLM JO, LAI EC (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, **93**: 1897-904.
- VEDANAYAGAM J, CHATILA WK, AKSOY BA (2019). Cancer-associated mutations in DICER1 RNase IIIa and IIIb domains exert similar effects on miRNA biogenesis. *Nat. Commun*, **10(1)**: 1-14.
- VICKERS KC, REMALEY AT (2012). Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Current Opinion in Lipidology*, **23(2)**: 91.
- VILÀ C, LEONARD JA, GÖTHERSTRÖM A, MARKLUND S, SANDBERG K (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science*, **291**:474-477.
- VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, SJÖSTRAND M, LEE JJ, LÖTVALL JO (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, **9(6)**: 654-659.
- YANG H, MA Y, LI B, DUGARJAVIIN M (2010). Progress on horse genome project. *Yi chuan*, **32**: 211-218.
- YANG T, CHEN XL, HUANG ZQ, WEN WX, XU M, CHEN DW, MAO XB (2014). MicroRNA-27a promotes porcine myoblast proliferation by downregulating myostatin expression. *Animal*, **8(11)**: 1867-1872.
- YANG Z, CAPPELLO T, WANG L (2015). Emerging role of microRNAs in lipid metabolism. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **5(2)**: 145-150.
- ZADEOĞULLARI Z, GENÇ K (2011). Tarihçe. In: MikroRNA ve Sinir Sistemi, Ed: Genç Ş. TÜBA, Ankara, 16-18.

- ZAIYOU M (2019). Circular RNAs as potential biomarkers and therapeutic targets for metabolic diseases. In *Reviews on Biomarker Studies of Metabolic and Metabolism-Related Disorders* (pp. 177-191). Springer, Cham.
- ZEN K, ZHANG CY (2012). Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med. Res. Rev.* **32**: 326-348.
- ZHANG Y, LI C, LI H, SONG Y, ZHAO Y, ZHAI L, ZHU D (2016). miR-378 activates the pyruvate-PEP futile cycle and enhances lipolysis to ameliorate obesity in mice *EBioMedicine*, **5**: 93-104
- ZHOU M, WANG Q, SUN J, LI X, XU L (2009). In silico detection and characteristics of novel microRNA genes in the *Equus caballus* genome using an integrated ab initio and comparative genomic approach. *Genomics*, **94**: 125-131.
- ZHOU G, WANG X, YUAN C, KANG D, XU X, ZHOU J, CHEN Y. (2017). Integrating miRNA and mRNA expression profiling uncovers miRNAs underlying fat deposition in sheep. *BioMed Research International*, **2017**: 1-11.
- ZUO J, WU F, LIU Y, XIAO J, XU M, YU Q, FENG D (2015). MicroRNA transcriptome profile analysis in porcine muscle and the effect of miR-143 on the MYH7 gene and protein. *PloS one*, **10(4)**: e0124873.

EKLER

Ek.1. Etik Kurul Raporu

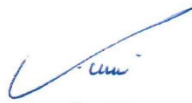
VETERİNER KONTROL MERKEZ ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ YEREL ETİK KURULU

DENEY HAYVANLARI İLE ÇALIŞMA İZİN FORMU

KARAR TARİHİ: 07.03.2017

KARAR NO: 2017/04

Talepte Bulunan Bölüm	Gıda Kontrol Laboratuvarı
Yapılacak Deney Çalışma	Safkan arap yarış atlarında tükrükte yarış öncesi ne sonrası lipit metabolizmasını etkileyen mikroRNA'ların gen ekspresyonunun belirlenmesi
Kullanılacak Deney Hayvanı Türü, Miktarı, Cinsi	-
Deney Hayvanlarının Temin Edildiği Yer	-
Talepte Bulunan Bölüm Yetkilisi	Seda EKİCİ Veteriner Hekim
Talep Tarihi	07.03.2017
KARAR	“Safkan arap yarış atlarında tükrükte yarış öncesi ne sonrası lipit metabolizmasını etkileyen mikroRNA'ların gen ekspresyonunun belirlenmesi” ile ilgili Yerel Etik Kurulu başvurunuz incelenmiş olup konuyla ilgili 15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Orman ve Su İşleri Bakanlığının HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULLARININ ÇALIŞMA USUL VE ESASLARINA DAİR YÖNETMELİĞİN HADYEK'in kuruluşu ve çalışma yöntemini anlatan 8.maddesi K bendinin 5. fıkrasında ‘Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar, süt sağma, dışkı veya altlık örneği toplama, sürüntü ile örnek alma ile yapılan prosedürler’ HADYEK iznine tabi değildir hükmü bulunmaktadır. Bu hüküm çerçevesinde söz konusu çalışmada Etik Kurul İznine gerek yoktur.


Dr. Ufuk ÜLKER
Etik Kurul Başkanı

Ek.2. TJK'dan izin yazısı

TÜRKİYE JOKEY KULÜBÜ



At Sağlığı ve Veterinerlik
Hizmetleri Müdürlüğü
Ekrem Kurt Bulvarı 34144
Bakırköy / İstanbul / TÜRKİYE
Tel : (0212) 444 0 855
Faks : (0212) 414 69 33
web : www.tjk.org

02/02/2017

Sayı :
Konu : Veteriner Hekim Seda Ekici'nin tez çalışması hk.

İLGİLİ MAKAMA;

T.C. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı doktora öğrencisi Veteriner Hekim Seda EKİCİ'nin, *"Safkan Arap Yarış Atlarında Tükürükte Yarış Öncesi ve Sonrası Lipid Metabolizmasını Etkileyen MiRN'ların Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi"* başlıklı doktora tezi çalışması için Kulübümüze bağlı Şanlıurfa At Hastanesinde, personelimiz ile koordineli olarak ihtiyaç duyulan materyalin toplanması uygun görülmüştür.

Bilgilerinize sunarız.

Saygılarımızla,

Dr. N. Emre GÜR
At Sağlığı ve Veterinerlik
Hizmetleri Müdürü

Ek.3.Yarış ve öncesi ve sonrası tükürükte safkan Arap yarış atlarına ait Ct değerleri.

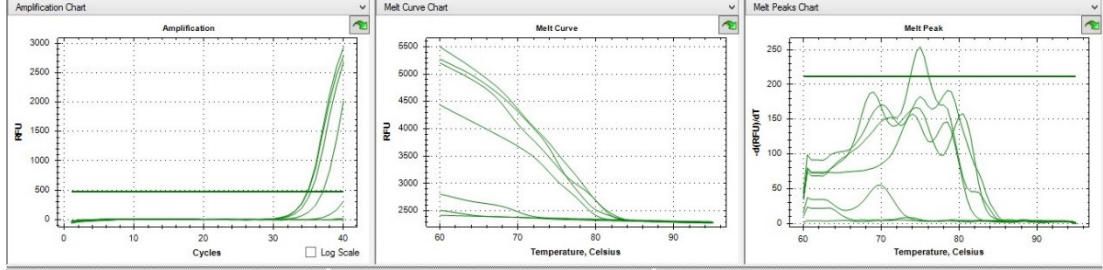
At ların kodu	<i>Unispi6</i>		<i>eca-mir-27a</i>		<i>eca-mir-27b</i>		<i>eca-mir-33a</i>		<i>eca-mir-33b</i>	
	Ct 1	Ct 2	Ct 1	Ct 2	Ct 1	Ct 2	Ct 1	Ct 2	Ct 1	Ct 2
1	19,39	19,41	26,1	26,13	25,84	25,77	28,49	28,56	32,46	31,81
2	19,11	19,13	25,76	25,58	25,09	25,64	27,32	27,36	31,07	31,14
3	19,54	19,33	25,74	27,74	26,08	25,88	27,02	26,81	32,62	32,39
4	19,45	19,41	25,66	25,38	25,89	25,9	26,76	26,67	32,36	32,19
5	19,47	19,42	25,5	26,41	25,8	25,74	29,35	30,74	32,24	32,29
6	19,47	19,69	25,35	25,39	25,8	25,65	26,62	26,64	32,35	32,51
7	19,49	19,48	25,26	25,28	25,63	25,61	26,38	26,27	32,2	32,14
8	19,37	19,45	25,84	25,54	25,51	25,48	26,46	26,45	32,4	32,33
9	19,4	19,56	25,56	25,38	25,88	26,61	26,55	26,36	32,24	32,61
10	19,44	19,55	25,6	25,43	25,71	25,79	26,29	26,32	32,46	32,64
11	19,61	19,64	25,72	25,8	25,68	25,74	26,39	26,59	32,72	32,45
12	19,72	19,63	25,64	25,68	26,26	26,05	26,56	26,66	31,76	31,80
13	19,66	19,63	25,61	25,8	24,04	23,28	26,34	26,41	32,57	32,51
1-2	19,25	19,12	26,14	26,07	25,7	25,73	25,87	25,86	32,3	32,16
2-2	19,32	19,31	25,67	25,83	25,15	25,15	25,32	24,85	31,39	31,35
3-2	19,4	19,36	25,49	25,38	25,77	25,74	24,11	24,08	32,19	32,32
4-2	19,5	19,42	25,54	25,43	25,6	25,55	24,02	24,02	32,27	32,25
5-2	19,54	19,75	26,41	25,51	26,79	25,73	24,02	24,11	32,62	32,6
6-2	19,43	19,49	25,06	25,14	25,39	25,37	24,01	23,76	32,13	32,42
7-2	19,49	19,36	25,28	25	25,35	25,48	25,25	25,32	32,36	32,4
8-2	19,9	19,49	25,7	25,29	25,33	25,38	23,93	24	32,41	32,58
9-2	18,64	19,56	25,23	25,21	24,47	25,45	24,07	23,97	32,54	32,99
10-2	19,61	19,62	25,6	25,43	25,55	25,59	23,78	23,96	32,39	32,6
11-2	19,76	19,81	25,79	25,46	25,69	25,67	24,12	24,28	32,27	33,95
12-2	19,56	19,52	25,34	25,32	26,26	26,15	23,95	23,92	32,33	32,51
13-2	19,56	19,62	25,51	25,77	23,20	23,30	23,8	23,87	32,38	32,51

Ek.3. Devam

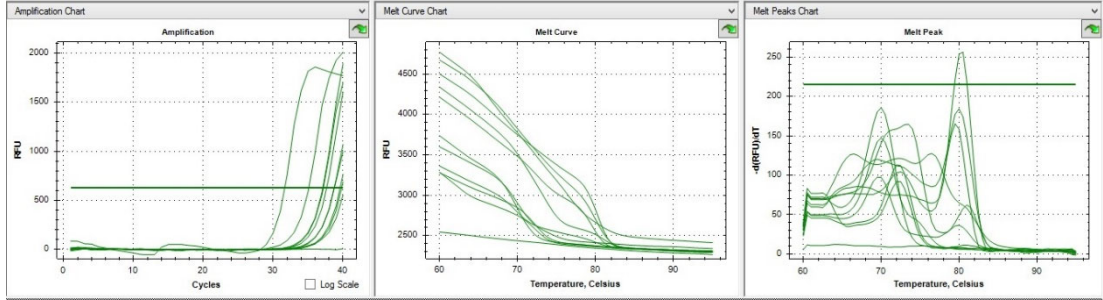
At ların kodu	<i>eca-mir-125b</i>		<i>eca-mir-143</i>		<i>eca-mir-335</i>		<i>eca-mir-378a</i>	
	Ct 1	Ct 2	Ct 1	Ct 2	Ct 1	Ct 2	Ct 1	Ct 2
1	27,18	27,12	34,73	35,01	35,77	34,54	28,67	28,76
2	25,59	25,62	37,15	33,95	33,38	34,77	28,01	27,99
3	27,76	26,56	34,87	34,8	33,06	32,38	26,39	26,19
4	27,52	27,56	35,66	34,84	31,56	32,39	26,14	26,16
5	27,99	27,64	35,13	35,27	32,56	32,26	26,24	26,32
6	27,32	27,56	35,08	35,34	32,41	32,54	26,18	26,12
7	27,21	27,34	35,14	34,99	31,77	32,21	25,82	25,94
8	27,14	27,27	34,85	35,0	31,67	32,21	25,78	25,94
9	27,41	27,26	35,09	34,65	32,31	32,21	26,17	26,01
10	31,07	27,44	34,98	33,45	32,79	32,53	26,06	26,05
11	27,86	28,19	35	35,55	32,61	32,42	25,96	26,05
12	27,22	27,37	34,99	34,99	32,41	32,17	25,85	26,07
13	28,29	28,1	35,53	34,55	32,17	32,41	25,94	25,82
1-2	27,08	27,12	34,5	35,16	34,61	36,08	28,8	28,77
2-2	25,74	25,84	34,73	35,25	35,01	34,77	28,08	28,12
3-2	27,3	27,39	34,7	34,98	33,39	33,3	26,32	26,35
4-2	27,4	27,49	35,66	36,3	32,32	32,57	26,27	26,28
5-2	28,29	28,02	35,26	35,45	32,26	32,7	26,87	26,46
6-2	27,18	27,2	35,2	33,95	32,36	32,34	26,03	26,07
7-2	27,73	27,06	34,08	34,82	33,18	32,41	26,01	25,97
8-2	27,12	28,03	35,40	35,48	32,15	34,22	26,46	25,91
9-2	27,26	27,34	35,05	34,65	32,05	32,25	26,08	26,04
10-2	26,89	28,29	34,63	35,16	32,3	32,29	26,21	26,17
11-2	28,33	28,29	34,45	36,47	32,45	32,37	26,5	26,22
12-2	27,06	27,21	34,79	34,79	32	32,02	26	26,08
13-2	28,12	28,87	34,76	34,35	32,4	32,08	25,92	25,86

Ek.4. eca-miR-122 ve eca-miR-370'e ait primerlerin qPCR görüntüleri

eca-mir-122'e ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri



eca-mir-370'e ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme görüntüleri



Ek.5. Primerlere ait baz dizilimlerindeki İnsan, at ve fare türleri arasında görülen sekans homolojisi

eca-miR-27a: 1-21

score: 105

evaluate: 0.002

eca-miR-27a	1	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	21
hsa-miR-27a-3p	1	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	21

eca-miR-27b: 1-21

score: 105

evaluate: 0.002

eca-miR-27b	1	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	21
hsa-miR-27b-3p	1	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	21

eca-miR-33a: 1-21

score: 105

evaluate: 0.002

eca-miR-33a	1	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA	21
hsa-miR-33a-5p	1	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA	21

eca-miR-33b: 1-20

score: 100

evaluate: 0.006

eca-miR-33b	1	GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC	20
hsa-miR-33b-5p	1	GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC	20

eca-miR-122: 1-22

score: 110

evaluate: 9e-04

eca-miR-122	1	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	22
hsa-miR-122-5p	1	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	22

Ek.5. Devam

eca-miR-125b-5p: 1-22
score: 110
evalue: 9e-04

eca-miR-125b-5p	1	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	22
hsa-miR-125b	1	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	22

eca-miR-143: 1-21
score: 105
evalue: 0.002

eca-miR-143	1	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	21
hsa-miR-143	1	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	21

eca-miR-335: 1-23
score: 115
evalue: 3e-04

eca-miR-335	1	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	23
hsa-miR-335	1	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	23

eca-miR-370: 1-22
score: 110
evalue: 9e-04

eca-miR-370	1	GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU	22
hsa-miR-370	1	GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU	22

eca-miR-378a: 1-21
score: 105
evalue: 0.002

eca-miR-378a	1	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	21
mmu-miR-378a-3p	1	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	21

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı :Seda
Soyadı :EKİCİ
Doğum yeri ve tarihi :ANKARA, 1981
Uyruğu :T. C.
Medeni durumu :EVLİ
İletişim adresi ve telefonu : Vet. Kont. Merk. Araşt. Enstitüsü Müdürlüğü
Ahmet Şefik Kolaylı C. No : 21/21 A -
ESERTEPE/ANK.
0 537 894 66 36

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

İlkokul : 1992 yılında Telsizler İlköğretim okulu

Ortaokul-Lise : 1996 yılında Atıfbey Ortaöğretim okulu

Lisans: 2004-Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Yüksek Lisans : 2011-Ankara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Ens.
Farmakoloji ve Toksikoloji ABD.

Doktora : 2019 Ankara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Ens.
Genetik ABD

Yabancı dili :İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru)

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2006- Tarım ve Köyişleri Bakanlığı
2007 Bolu/ Göynük İlçe Tarım Müd.
2007- Tarım ve Köyişleri Bakanlığı
2009 Bolu İl Müd.
2009- Veteriner Kontrol Merkez
2015 Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgili Alanları

Yayınları: (ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap ya da kitap bölümü vb.)

EKİCİ Seda, ÖZMEN Özge (2016). MikroRNA lar ve Atlarda MikroRNA lar ile ilgili Yapılan Çalışmalar. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 27(1), 48-52. (Ulusal) (Hakemli) (MAKALE Derleme Makale) (Yayın No: 2844968)

EKİCİ Seda, ÖZMEN Özge (2019). Safkan Yarış Arap Atlarında Yarış Öncesi ve Yarış Sonrası Tükürükte *eca-mir-27a* ve *eca-mir-27b*'nin Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi. 1. International Livestock Science Kongresi

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

Ödüller

Projeleri

Verdiği konferans ya da
seminerler

Katıldığı paneller (panelist
olarak)

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı
kurslar ve
Katıldığı eğitim seminerleri

Organizasyonunda katkıda
bulunduğu bilimsel toplantılar

Diğer üyelikleri