

**tRNA'lardan Kökenlenen Küçük RNA Fragmanlarının
Etkileştiği Komplekslerin Tanımlanması ve Gelişim Üzerine
Etkilerinin Araştırılması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 210T006

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL

Danışman:
Yard. Doç. Dr. Ayten NALBANT

Bursiyer:
Syed Muhammad Hamid

OCAK 2014
ANKARA

ÖNSÖZ

Canlı organizmaların transkriptomik seviyede genomlarının daha iyi algılanmasına paralel olarak ökaryotik bir hücrede var olan RNA çeşitliliğine bakış açımız oldukça değişmiştir. 15-26 nükleotit uzunluğunda küçük RNA'ları sekanslamaya imkan veren teknolojilerdeki ilerlemeler sayesinde daha önce "çöp DNA" olarak ileri sürülen genomik bölgelerden, miRNA ve piRNA'ların yanında, endojen siRNA'ların üretildiği tespit edilmiştir. Detaylı analizler, ökaryotik hücrelerde yapısal olarak bilinen mRNA, rRNA, snoRNA ve tRNA'lardan da küçük RNA'ların üretildiğini göstermiştir. TÜBİTAK tarafından desteklenen (210T006 No.lu) ve bir yürütücü, bir danışman ve bir bursiyer olmak üzere toplam üç kişilik bir ekip tarafından yürütülen bu projede *Drosophila* embriyo gelişimi model olarak alınmıştır. Embriyonik gelişim sırasında tRNA fragmanlarının ifadesi incelenmiştir. Ayrıca *Drosophila* S2 hücreleri kullanılarak, tRNA fragmanlarının etkileştiği muhtemel proteinler tanımlanmış, translasyon üzerine etkiler araştırılmıştır. Bu vesile ile projeye finansal katkıda bulunan TÜBİTAK'a ve projenin yürütüldüğü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ne teşekkür ederiz.

“

İÇİNDEKİLER

i. Özet (Türkçe).....	v
ii.Özet (İngilizce).....	vi
1. Giriş.....	1
2. Literatür Özeti	1
2.1. Kodlamayan RNA'lar	1
2.2. Çok Küçük Kodlamayan RNA'lar	1
2.3. tRNA'lar ve tRNA'lardan Kökenlenen Küçük RNA'lar.....	2
2.3.1. tRNA'ların Fonksiyonları	2
2.3.2. tRNA Biyogenezi	3
2.3.3. tRNA'lardan Kökenlenen Fragmanlar ve Biyogenezleri.....	3
2.3.4. tRNA'lardan Kökenlenen Fragmanların Gen Regülasyonundaki Rollerini.....	4
3. Gereç ve Yöntem	5
3.1. Embriyo Toplanması.....	5
3.2. Embriyo İçerisine Mikroinjeksiyon.....	6
3.3. S2 Hücrelerinin Bakımı ve Transfeksiyonu	6
3.4. Apoptoz ve Hücre Proliferasyonunun Ölçülmesi	6
3.5. Polizom Profil Analizi	7
3.6. RNA İzolasyonu.....	8
3.7. Northern Blotlama.....	8
3.8. İmmunopresipitasyon	9
3.9. Western Blotlama	9
3.10. Derin Sekans Analizi	10
4. Bulgular	10
4.1. tRNA Fragmanlarını Biyogenezi İle İlgili Çalışmalar.....	10
4.2. Sentetik tRNA Fragmanlarının S2 Hücrelerinde Aşırı İfadesi	13
4.3. tRF'lerin Sitoplazmik Lokasyonları	15
4.4. tRF'lerin Oluşturduğu Muhtemel Kompleksler.....	19
4.5. tRF'lerin Hücre Proliferasyonu ve Apoptoza Etkisi.....	28
4.6. tRF'lerin Global ve Reporter mRNA Translasyonun Etkisi	30
4.7. <i>Drosophila</i> Embriyolarında tRF'lerin Erken Gelişim Döneminde Ekspresyonu	33
4.8. Mutant Sinek Embriyolarında tRF İfade Miktarının Belirlenmesi.....	35
5. Tartışma/Sonuç.....	43

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 1. tRNA Fragmanlarının Kalıp tRNA Üzerinde Klonlanma Sıklıkları	10
Şekil 2. tRF'lerin 3' Kesim Bölgelerinin Biyoenformatik Analizi.....	11
Şekil 3. tRF:Gly: ^{GCC:5+8nt} 'in S2 Hücrelerinde İfadesi	12
Şekil 4. Glisin tRF'inin (tRF ^{Gly:GCC:5}) S2 Hücrelerde İfadesinin Northern Blot İle Analizi	13
Şekil 5. Biyotin İşaretli Sentetik Glisin tRF'inin Polizom Analizi	14
Şekil 6. Glisin tRF'inin S2 Hücrelerinde Hücre İçi Yerinin Belirlenmesi.	16
Şekil 7. Glisin tRF'inin S2 Hücrelerinde Hücreiçi Yerinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi.	17
Şekil 8. Kontrol Oligo ve tRF'lerin Sitoplazmik Konumları	18
Şekil 9. CR34080 tRF'inin S2 Hücrelerinde GFP ile Konjuge GW182 Proteiniyle Beraber Konumlanması	20
Şekil 10. Glisin tRF'inin S2 Hücrelerinde GFP Konjuge XRN1 (RFP-PCM) Proteiniyle Beraber Konumlanması.....	21
Şekil 11. Kontrol Oligo ve tRF'lerin PCM ile Beraber Sitoplazmik Konumları	22
Şekil 12. Kontrol Oligo ve Digoxigenin İşaretli tRF'lerin GW182 ile Beraber Sitoplazmik Konumları.....	23
Şekil 13. tRF:Gly:GCC'nin AGO Proteinleriyle Etkileşimi	24
Şekil 14. İmmunopresipitasyon Deneylerinde Kullanılacak Genlerin FLAG Tag ile İşaretlenip pAct-5C Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	26
Şekil 15. FLAG İşaretli LA ve ROX8 Proteinlerinin S2 Hücrelerinde Aşırı İfadesi.....	27
Şekil 16. tRF-LA ve tRF-ROX8 Etkileşiminin İmmünçöktürmeyle İncelenmesi.....	28
Şekil 17. tRF'lerin S2 Hücrelerinde Proliferasyon ve Apoptoz Üzerine Etkisi	29
Şekil 18. tRF'lerin S2 Hücrelerinde Global Translasyon Üzerine Etkisinin Polizom Profilleriyle İncelenmesi.....	31
Şekil 19. tRF Aşırı İfadesinin Raportör Lusiferaz Translasyonuna Etkisi.....	32
Şekil 20. Modifiye tRF Aşırı İfadesinin Raportör Lusiferaz Translasyonuna Etkisi.....	32
Şekil 21. Glisin tRF'inin (tRF ^{Gly:GCC:5}) <i>Drosophila</i> Embriyosunda İfadesi.....	33
Şekil 22. tRF'lerin <i>Drosophila</i> Embriyonik Gelişim Evrelerinde İfadesi.....	34
Şekil 23. Floresan işaretli RNA Oligolarının <i>Drosophila</i> Embriyolarındaki Konumları.....	36
Şekil 24. Mutant Embriyolardan Elde Edilen RNA'ların ve cDNA'ların Kalite Kontrol Analizi	37
Şekil 25. Derin Sekans Verisinin Kalite Kontrol Analizi	38
Şekil 26. Derin Sekans Verisinin UCSC/Dm3 <i>Drosophila</i> Genomuna Eşleşmesi	39
Şekil 27. Mutant Embriyolardan Elde Edilen Okumaların Küçük RNA'lara Göre Oranları	40
Şekil 28. Mutant Embriyolarda tRNA'lardan Kökenlenen Fragman İfadesi.....	41
Şekil 29. Mutant Embriyolarda tRNA'lardan Kökenlenen Fragman İfadesi.....	42

TABLULAR

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Lokalizasyon, Proliferasyon ve Apoptoz Deneylerinde Kullanılan Kontrol ve tRF Oligo RNA'larının Kimyasal Modifikasyonları	7
Tablo 2. Streptavidin Konjuge Sefaroz ile Çöktürülen tRF Komplekslerinde Tanımlanan Proteinlerin Listesi	23

ÖZET

Bir dizi genom projesinin tamamlanması ve sekanslama teknolojisinin gelişmesine paralel olarak ökaryotik bir hücrede bulunan transkriptomu algılayışımız oldukça değişmiştir. 15-26 nükleotit uzunluğunda küçük RNA'ları sekanslamaya imkan veren bu teknoloji sayesinde daha önce "çöp DNA" olarak ileri sürülen genomik bölgelerden endojen siRNA'ların üretildiği tespit edilmiştir. Detaylı analizler, ökaryotik hücrelerde yapısal olarak bilinen mRNA, rRNA, snoRNA ve tRNA'lardan da küçük RNA'ların üretildiğini göstermiştir.

Drosophila embriyonik gelişiminin model olarak kullanıldığı bu projede *drosophila* embriyo ve S2 hücre hattı sitozolik ekstraktları translasyonel statülerine göre fraksiyonlara ayrılarak tRNA'lardan kökenlenen fragmanların etkileştikleri komplekslerin tanımlanması amaçlanmıştır. Aşırı ifade ve *in situ* hibridizasyon yöntemleri kullanılarak ilgili tRNA fragmanlarının hücre içi konumları belirlenmiştir. Ayrıca, embriyolara mikroyeksiyon ve mutant sineklerde fragman analizleri yapılarak tRNA fragmanlarının gelişim üzerine etkileri incelenmiştir.

Elde ettiğimiz veriler, tRNA'lardan kökenlenen fragmanların büyük bir çoğunluğunun tRNA'ların spesifik olarak 5' uçlarından üretildiğini göstermektedir. Seçici olarak bazı tRNA'lardan kökenlenen bu fragmanlar hücre içerisinde translasyonel aktivitenin olmadığı ve mRNP adı verilen fraksiyonlarda bulunmaktadır. tRNA fragmanlarının ifadelerinde gelişime bağlı farklılık bulunması, bir parçalanma yan ürünü değil, muhtemelen hücresel duruma göre özel üretilen biyolojik moleküller olabileceğine işaret etmektedir. S2 hücrelerinde aşırı ifade edilen sentetik tRNA fragmanları sitoplazmada non-polizomal fraksiyonlarda lokalize olmakta ve hücre proliferasyonunu düzenlemektedirler. *In situ* lokalizasyon çalışmalarında, bu fragmanlar P cisimciklerinin markörü olan GW182 ile etkileşmekle birlikte, GW182'nin bulunmadığı sitoplazmik konumlara da yerleşmektedir. LA, GW182 ve ROX8 mutant embriyolarında yapılan derin sekans analizi, P2 (OR) kontrol sineklerine göre tRNA kaynaklı fragmanlarda en fazla farklılığın LA ve ROX8 mutantlarında olduğunu göstermektedir.

ABSTRACT

Our understanding of transcriptome present in a eukaryotic cell has changed dramatically in parallel to the completion of a series of genome projects and advances in sequencing technologies. Owing to this technology, which enables the sequencing of RNAs 15-26 bp in size, it has been discovered that endogenous siRNAs are biosynthesized from the genomic loci once referred to as junk DNA. Further analyses have shown that small RNAs are generated from mRNAs, rRNAs, snoRNAs and tRNAs, which were once known to be structural RNAs in eukaryotes.

The aim of this project, in which the *Drosophila* embryonic development was used as a model system, was to identify the complexes by which tRNA fragments are associated, by fractionating the cytosolic extracts of *Drosophila* embryos and S2 cells based on their translational status. Exploiting over-expression and *in situ* hybridization methods, the intracellular location of these tRNA fragments has been determined. In addition, by injecting into embryos and deep-sequencing tRNA fragments in mutant flies, the effects of tRNA fragments on development have been investigated.

The current data suggest that the majority of tRNA-derived fragments is generated specifically from the 5' ends of tRNAs. The fragments, which are produced from a selective set of tRNAs, are found in the non-polysomal fractions named mRNP. The developmental differential expression suggests that these fragments are not by products of tRNA degradation but probably biological molecules that are synthesized based on the state of mind of cells. The tRNA fragments over-expressed in S2 cells are also associated with non-polysomal fractions and modulate cell proliferation. *In situ* localization data have shown that these fragments co-localize with GW182, a marker for P bodies but also localize to sites devoid of GW182. Deep-sequencing analyses in LA, GW182 and ROX8 mutant embryos showed that the changes in the expression levels of tRNA-derived fragments are more prominent in LA and ROX8 embryos.

1. GİRİŞ

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, yapısal olarak kabul edildiği için miktarlarının değişmediği düşünülen tRNA'lardan çok küçük RNA fragmanlarının üretildiği gösterilmiştir (Kawaji vd., 2008). miRNA ve siRNA gibi küçük RNA'ların biyogenezi esnasında oluşan kompleksler ve düzenledikleri hedef genlerle ilgili önemli mesafe katedilirken tRNA'lardan kökenlenen küçük RNA'lar ile ilgili bilgi birikimi oldukça sınırlıdır. tRNA'lardan kökenlenen fragmanların miRNA'lara benzer şekilde gen ifadesini düzenleyebileceği ileri sürülmekle birlikte literatürde bu hipotezi destekleyecek hiçbir veri bulunmamaktadır. Nedeni henüz bilinmemekle birlikte, tRNA fragmanları tüm tRNA'lardan kökenlenmeyip seçici bir şekilde bazı tRNA'lardan kökenlenmektedir. Bu seçiciliğin fonksiyonla bağlantısı olabileceği düşünüldüğünde, tRNA'lardan kökenlenen fragmanların araştırılması, gen aktivitesini kontrol edebilen potansiyel yeni küçük RNA grubunun tanımlanması açısından oldukça önemlidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kodlamayan RNA'lar

Kodlamayan RNA'lar, genomik bölgelerin transkripsiyonu sonrası RNA'ya çevrilen, biyolojik olarak öneme sahip ancak proteine dönüştürülmeyen RNA molekülleridir (Costa, 2007). Bir hücre içerisinde bulunan kodlamayan RNA'ların boyutu 17-10,000 nükleotit arasında değişmektedir. Bilinen *tipik* kodlamayan RNA'lar arasında tRNA (taşıyıcı RNA), snRNA (küçük çekirdek RNA'ları), snoRNA (küçük çekirdekcik RNA'ları) ve rRNA (ribozomal RNA)lar yer almaktadır. Derin sekanslama, tilling mikroarray ve Chip-seq (chromatin immunoprecipitation sekanslama) çalışmaları "çöp DNA" olarak tanımlanan bölgelerden, genler arası bölgelerden ve bazen protein kodlayan genlerin içerisinde sense veya antisense yönde ve değişik boyutlarda kodlamayan RNA sentezlendiğini göstermiştir. Gen ifadesinin kontrolünde rol oynayabileceği ifade edilen bu RNA'ların çalışma mekanizmalarının ortaya çıkartılması, ökaryotik genomda mevcut bilgilerin ve gen ifadesinin anlaşılması açısından büyük bir öneme sahiptir.

2.2 Çok Küçük Kodlamayan RNA'lar

RNA stabilitesinin düzenlenmesi, translasyon, kromatin modifikasyonu ve transpozon düzenlenmesi gibi bir dizi işlevlere sahip olan çok küçük kodlamayan RNA'lar kategorik

olarak siRNA (silencing RNA) (Fire vd., 1998), miRNA (mikroRNA) (Lee vd., 2001) ve piRNA (PIWI-interacting RNA) (Aravin vd., 2001) olarak üç ana grup altında toplanmaktadır. Ayrıca, casiRNA (cis-acting siRNA) (Hamilton vd., 2002), tasiRNA (trans-acting siRNA) (Vazques vd., 2004), natsiRNA (natural antisense transcript-derived siRNA) (Borsani vd., 2005), exo-siRNA (exogenous siRNA), endo-siRNA (endogenous siRNA) (Yang ve Kazazian, 2007), 21U ve 21G RNA (Ruby vd., 2006) gibi alt gruplarda bulunmaktadır. Çok küçük kodlamayan RNA grubuna en son eklenen grup ise tRF (tRNA-derived RNA fragments) adı verilen ve tRNA'lardan kökenlenen fragmanlardır (Kawaji vd., 2008).

Gen ifadesini özellikle transkripsiyon sonrası düzenleyen miRNA'lar *drozofila*'da öncelikle RNA polimeraz II tarafından birincil transkript olarak sentezlenirler (Lee vd., 2002). Çekirdekte Drosha ve Pasha tarafından kırılan birincil transkriptler sitoplazmada Dicer ve LOQS tarafından 17-25 nükleotitlik çift sarmallı RNA molekülüne dönüştürülür (Hutvagner vd., 2001; Yi vd., 2003). AGO1 proteiniyle RISC kompleksine (RNA-induced silencing complex) katılan miRNA'lar translasyonunu baskılayarak veya mRNA stabilitesini azaltarak gen ifadesini düzenlerler (Carthew ve Sontheimer, 2009). Translasyonu başlama aşamasında baskılayan miRNA'lar hücrenin aktif protein sentezleme ünitesi olan polizomlarla assosiyasyon olmazken (Humphreys vd., 2005), translasyonu uzama aşamasında baskılayan miRNA'lar *polizomlarda bulunmaktadır* (Maroney vd., 2006).

mRNA'ların endonükleolitik olarak parçalanmasına yol açan siRNA'ların biyogenezini DCR-2, AGO2 ve Loquacious proteinlerini gerektirmektedir (Hammond vd., 2000; Kawamura vd., 2008; Okamura vd., 2008). Eksojen siRNA'lar viral enfeksiyonlara karşı savaşta rol oynarken, endojen siRNA'lar genellikle transkripsiyonel regülasyonda rol oynamaktadır (Borsani., 2005).

2.3 tRNA'lar ve tRNA'lardan Kökenlenen Küçük RNA'lar

2.3.1 tRNA'ların Fonksiyonları: tRNA'lar çekirdekte gerçekleşen transkripsiyon ile sitoplazmada gerçekleşen translasyon arasında köprü görevi gören kodlamayan RNA'lardır (Hopper ve Shaheen, 2008). Gen duplikasyonları nedeniyle, genomda aynı antikodonu taşıyan tRNA'nın birden fazla kopyası bulunduğu gibi, aynı aminoasiti taşıyan ancak farklı sekanslara sahip tRNA genleride bulunmaktadır. Nitekim mayada yapılan bir çalışmada genomun %1'den fazlasının öncül tRNA sentezinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Hopper ve Phisicky, 2003).

tRNA'ların en temel fonksiyonu translasyon sırasında aktive edilen aminoasitleri ribozomlara taşımaktır. Protein sentezindeki anahtar fonksiyonlarının yanında revers transkripsiyon ve porfirin sentezi gibi işlevlerde rol oynayan tRNA'larda bilinmektedir (Giege, 2008). tRNA'ların aynı zamanda apoptoz, hücre proliferasyonu ve hücre transformasyonunda rol oynayabilecekleri ifade edilmektedir (Marshall vd., 2008; Mei vd.,

2010). Bunlara ilaveten, aminoasit açlığı sırasında boş tRNA'lar GCN2 kinazı aktive etmektedirler (Wek vd., 1995). Dolayısıyla, translasyonun temel bir komponenti olmalarının yanında, tRNA'lar hücrede *sinyal molekülü* olarakta görev yapabilmektedirler.

2.3.2 tRNA Biyogenezi: Öncül tRNA'lar çekirdekte RNA polimeraz III tarafından sentezlenmektedir. Öncül tRNA'ların 5' ve 3' uçlarında bulunan sekanslar sırasıyla RNAz P ve Z enzimleriyle uzaklaştırılmaktadır (Dubrovsky vd., 2004; Spath vd., 2007). Kimi tRNA'lar intron içerdiğinden endonukleazlarca kırılmaktadırlar. (Hopper ve Shaheen, 2008). Ayrıca, her tRNA transkripsiyon sonrası 2-O metilasyon ve yalancı uridinilasyon gibi elliden fazla değişik modifikasyondan bir veya birkaçına tabi olmaktadır (Phizicky ve Alfonzo, 2009). Her bir tRNA'da ortalama olarak 8 modifikasyon olduğu ve bu modifikasyonların tRNA stabilitesi, fonksiyonu ve lokalizasyonunda belirleyici olduğu bildirilmekle birlikte modifikasyonların spesifik etkisi tam olarak bilinmemektedir (Sprinzl ve Vassilenko, 2005). Ran'e bağlanan GTPase Ran ve importin- β ailesine ait proteinler tarafından sitoplazmaya taşınan tRNA'lar aminoasilasyon sonrası translasyona katılmaktadırlar.

Son yıllarda yapılan çalışmalar çekirdek ve sitoplazma arasında tRNA dinamiğinin sanıldığı kadar basit olmadığını göstermiştir. Örneğin, tRNA intronları memelilerde çekirdekte, mayalarda ise sitoplazmada kırılmaktadır (Yoshihisa vd., 2003; Paushkin vd., 2004). Hipertemofilik bir parazit olan *Nanoarchaeum equitans*'ta değişik tRNA bölgelerinin sitoplazmada birleştirilmesiyle (trans-kırılma) sitoplazmada yeni tRNA'ların oluşturulduğu rapor edilmiştir (Randau vd., 2005). Konvansiyonel düşünüşte çekirdekte sentezlenen tRNA'lar sitoplazmaya taşınırken, kimi tRNA'ların sitoplazmadan çekirdeğe geri taşındığı ve çekirdekte translasyona katılabileceği gösterilmiştir (Iborra vd., 2001; Dahlberg vd., 2003; Takano vd., 2005; Shaheen vd., 2007).

2.3.3 tRNA'lardan Kökenlenen Fragmanlar ve Biyogenezi: *E. coli*'de bakteriyofaj enfeksiyonu sonucu tRNA'ların antikodon lupundan başlayarak tamamen parçalanması, tRNA'lardan küçük fragmanlar üretildiğine dair ilk yapılan çalışmalardan birisidir (Levitz vd., 1990). Daha sonra yapılan çalışmalar, *Tetrahymena*, maya, insan ve bitkilerde aminoasit açlığı ve/veya oksidatif strese bağlı olarak tRNA'ların yaklaşık 35-40 uzunluğunda fragmanlara ayrıldığını göstermiştir (Thompson ve Parker, 2009). Yanlış sentezlenen veya gerektiği kadar modifiye edilmeyen tRNA'lar 5' üssünden başlayarak sitoplazmada veya 3' üssünden başlayarak çekirdekte parçalanıp ortamdaki uzaklaştırılırlar (Chernyakon vd., 2008). Bu nedenle, stres koşullarında üretilen tRNA fragmanlarının bir kalite kontrol mekanizması olmayıp biyolojik fonksiyona sahip moleküller olduğu düşünülmektedir.

Konvansiyonel metotlarla miRNA klonlanması esnasında bir dizi tRNA fragmanları klonlanmış ancak boyutlarının 15-30 nükleotit olması nedeniyle teknik hatalardan

kaynaklanan artifakt olabilecekleri düşünülerek dikkate alınmamıştır (Aravin vd., 2003). Genomik seviyede miRNA ve siRNA profillenmesi esnasında, boyutları 20-30 nükleotit arasında değişen bir dizi tRNA fragmanları tespit edilmiştir (Kawaji vd., 2008; Lee vd., 2009; Cole vd., 2009; Haussecker vd., 2010; Liao vd., 2010). Liao vd., tRNA'lardan kökenlenen bu fragmanların sadece çekirdekte değil aynı zamanda sitoplamada da bulduklarını göstermiştir (Liao vd., 2010). Derin sekanslama ile tanımlanan bu tRNA fragmanlarının boyutları (20-30 nt) mayada stres koşullarında üretilen fragmanlardan (35-40 nt) daha kısa olması bakımından farklılık göstermektedirler. Özellikle tRNA'ların 5 ve 3' uçlarından kaynaklanan bu fragmanların yapımında bir tRNA endonükleaz olan ELAC2 (RNAz Z) enziminin rol oynadığı gösterilmiştir (Lee vd., 2009). Ayrıca miRNA biyogenezinde esansiyel olan Dicer enziminin susturulması tRNA fragman üretimini etkilemekle birlikte tamamen durdurmadığı rapor edilmiştir (Cole vd., 2009). Dolayısıyla tRNA fragman biyogenezi için gerekli enzimler ve biyogenez sırasında oluşan kompleksler tam bilinmemektedir.

2.3.4 tRNA'lardan Kökenlenen Fragmanların Gen Regülasyonundaki Roller: tRNA fragmanlarının biyolojik fonksiyonları açısından ilk değerlendirilen ihtimal, tRNA'ları yok ederek strese cevaben translasyonun baskılanmasıdır. Ancak ifade edilen fonksiyonel ergin tRNA miktarında değişiklik olmaması bu ihtimali ortadan kaldırmaktadır (Thompson vd., 2008). Sitoplazmada bulunmaları, miRNA'ların üretiminde rol oynayan Dicer enziminin biyogenezi etkilemesi ve boyutlardaki benzerlikler nedeniyle, tRNA fragmanlarının miRNA'lara benzer şekilde translasyonu baskılayabileceği ileri sürülmüştür (Cole vd., 2009; Thompson ve Parker, 2009).

Translasyonun tRNA fragmanları tarafından baskılanabileceğine dair 3 hipotez ileri sürülmektedir (Thompson ve Parker, 2009). *İlk hipoteze* göre, tRNA fragmanları RNAz P ve Z gibi enzimlerle kompleks oluşturarak mRNA'ların parçalanmasını indükleyebilirler. *İkinci hipotezde* tRNA fragmanları miRNA yolağı gibi bilinen yollara substrat olarak translasyonu indirekt olarak baskılayabilirler. Ancak, tRNA fragmanlarının miRNA'lardan farklı bir mekanizmayla çalışabileceğini ileri sürülmektedirler (Haussecker vd., 2010). *Üçüncü hipoteze* göre tRNA fragmanları henüz bilinmeyen proteinlerle kompleks oluşturarak translasyonu direkt olarak baskılayabilirler (örneğin monozomlarla etkileşerek translasyon başlaması veya polizomlarla etkileşerek elongasyon aşamasında). Her üç hipotezde teorik olarak mümkün görünmekle birlikte *literatürde bu hipotezlerden herhangi birini destekleyecek veri bulunmamaktadır.*

miRNA'ların gen regülasyonundaki rollerini araştırmayı ve yeni miRNA tanımlamayı hedefleyen 104T144 No.lu projede (Haziran 2010'da tamamlandı) 1 ve 8 saatlik *Drosophila* embriyoları translasyonel statülerine göre 4 fraksiyona ayrılmıştır. Bahsi geçen 8 örnek derin sekanslama analizine tabii tutulduğunda, (1) tRNA'ların özellikle 5' uçlarından kökenlenen

19-26 nt uzunluğunda fragmanlar olduğu; (2) Fragmanların bütün tRNA'lardan değil bazı tRNA'lardan üretildiği; (3) Aynı aminoasiti taşıyan ancak farklı antikodon içeren tRNA'ların bazılarında fragman üretilirken diğerinden üretilmediği ve (4) tRNA fragmanlarının translasyon açısından aktif monozom ve polizom fraksiyonlarında çok az bulunurken translasyon açısından inaktif olan mRNP ve 60S fraksiyonlarında yoğunlaştığı tespit edilmiştir. 104T144 No.lu proje kapsamında elde edilen bu bulgular, miRNA ve endojen siRNA'lardan bazılarının monozom ve polizomlarda bulunduğunu ve dolayısıyla genleri translasyonun elongasyonu aşamasında kontrol ettiklerini göstermektedir. Buna karşın, tRNA fragmanlarının ağırlıklı olarak mRNP ve 60S fraksiyonlarında bulunması, tRNA fragmanlarının çalışma mekanizmasının miRNA ve siRNA'lardan farklı olabileceğine işaret etmektedir. Nitekim, monozom ve polizomlarla etkileşmeyen mRNA'lar yok edilmek veya sonradan kullanım amaçla depolanmak üzere sitoplazmik P cisimlerini veya stres granüllerini oluştururlar (Sheth ve Parker, 2003; Brengues vd., 2005; Anderson ve Kedersha, 2009). Ancak gerek P cisimlerinde gerekse stres granüllerinde ergin tRNA veya tRNA fragmanlarının olup olmadığına dair literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Translasyonel regülasyonun yaygın olduğu embriyo gelişiminin model olarak kullanıldığı bu projede, yeni bir grup regülatör küçük RNA olarak tanımlanan tRNA fragmanlarının hücre içi konumları ve etkileşim halinde oldukları kompleksler tanımlanmıştır. Bazı tRNA fragmanlarının S2 hücrelerinde ve erken embriyonik dönemde ifade profilleri çıkarılmıştır. Ayrıca potansiyel aday genlerin mutant olduğu sineklerde tRNA ifadesine bakılarak bu fragmanların biyogenezi hakkında veriler toplanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Embriyo Toplanması

P2 hattı *Drosophila melanogaster* sinekler agar- maya-sukroz içeren besiyerinde 22-25°C'de süt şişelerinde yetiştirilmiştir (Roberts, 1998). Stoklar yeterli sayıya ulaştıktan sonra 2-3 günlük taze sinekler embriyo toplama düzeneğine aktarılmıştır. Embriyo toplama işlemini senkronize etmek için, ilk toplama kullanılmamıştır. 0-1 saatlik embriyo toplamak için, 2-3 günlük taze ergin sinekler düzenekte 1 saat bırakıldıktan sonra %0,07 NaCl (Applichem) ve %0,1 Triton-X (Applichem) ile yıkanıp Nitex filtreden geçirilmiştir. 2, 4, 8, 12 ve 24 saatlik embriyoları toplamak için 1 saat düzenekte bırakılan embriyo besiyeri 1. saatin sonunda düzenekten alınıp gerekli saat boyunca 25°C'de etüvde bekletilmiştir. Örneğin, 12 saatlik embriyo için, 1 saat embriyo toplama düzeneğinde toplanan embriyolar 11 saat etüvde tutularak 12 saatlik gelişimlerini tamamlamaları sağlanmıştır.

3.2 Embriyo İçerisine Mikroenjeksiyon

Değişik gelişim evresindeki embriyolara enjeksiyonlar daha önce yayınlanan bir prosedüre göre yapılmıştır (Tu ve Akgül, 2005). 3' uca denk gelen fragman (negatif kontrol 1), ve sadece su (negatif kontrol 3) enjeksiyonları negatif kontrol kullanılmıştır. 5' uca tam eşleşen sense fragman test fragmanı olarak kullanılmıştır. Mikroenjeksiyon için 45 dk boyunca embriyo toplama kabında toplanan embriyolar %2,5 sodyum hipoklorit ile muamele edilerek korion tabakası uzaklaştırılmıştır. Bol su ile yıkanan embriyolar diseksiyon mikroskobu altında heksanda eritilmiş yapışkan (selobant) ile kaplanmış mikroskop lamellerine teker teker dizilmiş ve tRNA fragmanları çift distile suda çözüldükten sonra inverted mikroskop altında embriyoların posterior kısmına enjekte edilmiştir (TU ve AKGÜL, 2005). Üzeri halokarbon 700 yağı (Sigma) ile kaplanan embriyolar larval gelişime ulaşincaya kadar 18 °C'de inkübe edilmiştir.

3.3 S2 Hücrelerinin Bakımı ve Transfeksiyonu

S2 hücreleri %10 FBS eklenmiş Schneider's besi yerinde (Life Technologies) 50 U/mL penisilin ve 50 ug/mL streptomisin varlığında 25 °C'de CO₂ içermeyen inkübatörlerde yetiştirilmiştir. Transfeksiyon için FuGENE HD transfeksiyon kiti (Promega) kullanılmış (DNA:FuGENE, 1:3) ve 6 kuyucuklu plaklarda üretici firmanın protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Aşırı ifade sonrası hücreler immunopresipitasyon (örneğin ROX8 ve LA aşırı edilenler) veya *in situ* hibridizasyon (örneğin GW182, FMR ve tRF aşırı ifade edilenler) için kullanılmıştır. *In situ* hibridizasyon için (Angshuman ve Cordula, 2007). S2 hücrelerinin mikroskop lamellerine yapışmasını sağlamak için lameller 0,2 mL %0,01 poly-L-Lysine ile 10 dakika kaplanmıştır. Kurutulan lameller üzerine 0,2 mL (5X10³ hücre/mL) hücre süspansiyonu konarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. PBS ile yıkanan lameller nemli inkübatörde 37 °C'de 30 dk 0,2 mL %4 paraformaldehitte muamele edilmiştir. PBS ile yıkama sonrası hücreler oda sıcaklığında 0,2 mL %0,2 triton-X ile 10 dakika muamele edilerek permeabilize edilmiştir. Floresan işaretli antisense tRNA riboproları floresan mikroskopuyla, biyotin işaretli olanlar ise streptavidin-HRP sistemi kullanılarak kemiluminesent yöntemlerle görüntülenmiştir.

3.4 Apoptoz ve Hücre Proliferasyonunun Ölçülmesi

Bütün embriyoda lokal apoptotik hücreleri işaretlemek oldukça zor olduğundan apoptoz ve hücre proliferasyonu deneyleri için bir *Drosophila* embriyonik hücre hattı olan S2 hücre hattı kullanılmıştır. FuGENE HD transfeksiyon kiti kullanılarak değişik tRF fragmanları S2 hücrelerine 48-72 saat apoptoz ölçümleri yapılmıştır. Her transfeksiyonda (1) Fragmansız negatif kontrol; (2) tRNA'nın 3' ucuna eşleşen negatif kontrol; (3) tRNA'nın 5' ucuna eşleşen

Tablo 1. Lokalizasyon, proliferasyon ve apoptoz deneylerinde kullanılan kontrol ve tRF oligo RNA'larının kimyasal modifikasyonları

tRF/Oligo Adı	tRNA Çeşidi	Kimyasal Modifikasyon
Ctrl-1-3'B	Kontrol RNA (tRNA değil)	3' terminal biyotinli
Ctrl-2-5'P-3'B	Kontrol RNA (tRNA değil)	5' fosfat, 3' terminal biyotinli
Ctrl-3-3'B	Kontrol RNA (tRNA değil)	3' terminal biyotinli
Ctrl-3-P-Intr.B	Kontrol RNA (tRNA değil)	5' fosfat, 3' internal biyotin
tRF:Gly:GCC-5'-3'B	tRNA:Glisin:GCC:5	3' terminal biyotinli
31667-5'-P-Int.B	tRNA:Glisin:GCC:5	5' fosfat, 3' internal biyotin
31667-5'-P-3'B	tRNA:Glisin:GCC:5	5' fosfat, 3' terminal biyotinli
31667-5'-TOG-3'B	tRNA:Glisin:GCC:5	5' fosfat, 3' terminal biyotinli
31667-3'-3'B	tRNA:Glisin:GCC:3	3' terminal biyotinli
31667-3'-P-3'B	tRNA:Glisin:GCC:3	5' fosfat, 3' terminal biyotinli
FBtr0080660-5'P-3'B	tRNA:Prolin:CCU:5	5' fosfat, 3' terminal biyotinli
CR32289-RA-5'-P-3'B	Bilinmiyor-5	5' fosfat, 3' terminal biyotinli

ancak ortasında 1 nükleotit farklılık gösteren negatif kontrol ve (4) tRNA'nın 5' ucuna tam eşleşen test örneği (4X3=12 farklı aşırı ifade) kullanılmıştır. Transfeksiyon sonrası örneklerde apoptoz oranı propidium iodide (PI) veya 7AAD boyamasıyla belirlenmiştir (Bond v., 2008). PI boyaması için 1×10^6 /mL hücre %70'lik etanolde $+4^\circ\text{C}$ 'de 16 saat inkübe edilmiştir. 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A içeren PBS ile 30 dakika muamele edilen hücreler akış sitometresinde analiz edilmiştir (FACSArray, Becton Dickinson). Hücre proliferasyonunu belirlemek için (We vd., 2007) 1×10^6 /mL hücre 15 μM BrdU (Sigma-Aldrich) ile 15 dakika inkübe edilmiştir. %70'lik etanol ve $+4^\circ\text{C}$ 'de fikse edilecek hücreler PBS ile 2 defa yıkanmıştır. 2 M HCl ile 30 dakika permeabilize edilen hücreler 2 defa PBS bir defa PBS-BT (PBS+%0.1 BSA+%0.2 Tween 20) ile yıkanmıştır. 2 μL monoklonal fare anti-BrdU (Becton Dickinson) ile 20 dakika karanlıkta inkübasyon sonrası 2 defa PBS-BT ile yıkanan hücre süspansiyonuna 1:10 dilüe FITC konjuge edilmiş tavşan anti-mouse antikor (DAKO) eklenerek FACSArray akım sitometresi ile analiz edilecektir. Her bir deney en az 3 defa tekrarlanarak Student's T test ile istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir.

3.5 Polizom Profil Analizi

Polizom analizleri daha önce rapor edilen protokollere göre yapılmıştır (Brakke ve Daly, 1965; Tu ve Akgül, 2005). Kısaca, 100mM NaCl₂ (Applichem), 10mM MgCl₂ (Applichem), 30mM Tris-HCl (pH 7, Applichem), 200U Superase RNase inhibitor (Ambion) içeren %5 ve %70'lik sükröz çözeltileri hazırlanmıştır. 10 milyon S2 hücresi 100mM NaCl₂, 10mM MgCl₂, 30mM Tris-HCl (ph 7), 1% Triton-X, 1% NaDOC, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide (Applichem) ve 30U/ml Superase RNase inhibitor (Ambion) içeren tampon çözeltisinde ezilip 8dk inkübasyon sonunda 12.000g 4°C koşullarında 10 dk santrifüj edilmiştir. 2 mL

süpernatant %5-70 lik gradientin üzerine yüklenip Beckman SW28 rotorda 27.000rpm 4°C koşullarında 2 saat 55dk santrifüj edilmiştir. Density Gradient Fractionation (ISCO) sistemi kullanılarak 254nm absorbandsda okuma yapılarak her tüpde 30 damla örnek olacak şekilde ependorf tüplere fraksiyonlar toplanmıştır. A_{254} te oluşan grafiğe göre örnekler mRNP, 60S, monozom ve polizom olmak üzere 4 grupta toplanmıştır.

3.6 RNA İzolasyonu

Fraksiyonasyon sonrası gruplandırılan örnekler fenol-kloroform ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Fraksiyonlar 150mM NaCl_2 ve %0,5 SDS içerecek şekilde ayarlandıktan sonra DEPC'li su ile hacimlerinin 2 katına tamamlanmıştır. Oluşan hacime eşit miktarda fenol/kloroform/izoamilalkol 25:24:1 (pH 4.5, Applichem) eklenip 2dk vortekslenmiştir. 3.000rpm 24°C koşullarında 5dk yapılan santrifüjden sonra hafif olan ve RNA içeren üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol 25:24:1 (pH 4.5) eklenip bir önceki basamakta belirtilen koşullarda santrifüj edilmiştir. Üst faza eşit hacimde kloroform eklenip aynı koşullarda ekstrakte edildikten sonra 3M NaOAC (ph: 7) ve 2 kat hacimde %100 ethanol eklenip, bütün gece -20°C'de inkübasyona bırakılmıştır. RNA'lar 30ml Corex tüplerinde Beckman Avanti JE JS13.1 rotor kullanılarak 12.000g 4°C koşullarında 20dk santrifüj edilerek pelet haline getirilmiştir. Son aşamada %70 etanol yıkamasından sonra etanolü kuruyan örnekler 50µl DEPC'li su içinde çözülmüştür. Elde edilen mRNP, 60S, monozom and polizom RNA'larının konsantrasyonu, 260/280 ve 260/230 değerleri Nanodrop ND UV-Vis Spectrophotometre ile ölçülmüştür. Embriyolardan veya S2 hücrelerinden toplam RNA izolasyonu Trizol (Life Technologies) üretici firmanın protokolüne uygun şekilde yapılarak NanoDrop ile kalite kontrol analizine tabi tutulmuştur.

3.7 Northern Blotlama

Boyutları sırasıyla 20-25 ve 70-75 nükleotit arasında değişen tRNA fragmanları ve ergin tRNA'ları içeren RNA'lar (polizom analizi veya toplam RNA izolasyonu sonrası) %12'lik denatüre edici poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra elektroblotter (Thermo) ile pozitif yüklü membranlara (Ambion) transfer edilmiştir. 80°C'de 25 dk inkübasyonla membrana "crosslink" edilmiştir. 10cm² membran için 1mL hibridizasyon tamponu (%7 SDS, 200mM Na_2HPO_4 pH 7.4) eklenerek 37°C'de 1 saat ön hibridizasyon yapılmıştır. Hibridizasyonda kullanılacak biyotin işaretli antisense riboprobler T7 RNA polimeraz ile *in vitro* transkripsiyonla hazırlanmıştır. Bu amaçla, T7 promotör sekansı içeren tRNA primerleri (Alpha DNA) 50µM konsantrasyonda 95°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra 30 dk oda sıcaklığında bırakılmıştır. Reaksiyona 0,5mM biotin ile işaretlenmiş UTP eklenerek T7 RNA polimeraz enzimiyle (Ambion) *in vitro* transkripsiyon reaksiyonu kurulmuştur. Biotin işaretli antisense riboprob eklendikten sonra ön hibridizasyon yapılan membran hibridizasyon fırınında 37°C'de 16 saat

inkübe edilmiştir. Membran 50mL %0,01 SDS içeren 2X SSPE buffer (0.3M NaCl, 0.02M NaH₂PO₄, 0.02M EDTA) ile 3 kez 37°C 10 dk koşullarında yıkanmıştır. Membran oda sıcaklığında 2 kez 50mL yıkama tamponu [1X PBS(137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄), %0.05 SDS9] ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika 50mL bloklama tamponuyla (%0.02 BSA içeren yıkama tapmonu) bloklanan membran 10mL bloklama tamponu ve 1µL streptavidin HRP (0.5µg/mL, İnvitrogene) ile 30 dk inkübe edilmiştir. 50mL bloklama tamponu ile 15 dk bloklanan membran 3 kez 50mL yıkama bufferi ile yıkanmıştır. 2 kez 50mL 1X assay tamponuyla (20mM Tris-HCl ph: 9.8, 1mM MgCl₂) inkübe edilen mebranın üzerine 1mL peroksidaz ve 1mL luminol enhancer (Thermo) bırakılarak 5 dk inkübe edilmiştir. Versa Doc görüntüleme sistemi (BioRad) ile chemiluminescent görüntü elde edilmiş ve RNA yüklemedeki normalizasyon için ergin tRNA miktarı kullanılmıştır.

3.8 Immunopresipitasyon

Immunopresipitasyon deneyleri için embriyo veya S2 hücreleri ekstratları kullanılmıştır. Soğuk 400 ul RIPA tamponunda (proteaz ve Rnaz inhibitör içeren) lize edilen örnekler buz üzerinde 45 dk inkübe edildikten sonra 14,000 RPM'de 4 °C'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldıktan sonra supernatant kullanıma kadar -80 °C'de saklanmıştır. Lisatlar RIPA tamponu ile 500 ul'e tamamlanmış ve 2-10 ul primer antikor ile 2 saat 4 °C'de inkübe edilmiştir. Protein A konjuge sefaroz boncukları 3 defa RIPA tamponu ile yıkandıktan sonra primer antikor ile inkübe edilen protein lisatlarına eklenmiştir. 2 saat inkübasyon sonrası karışım 1,000 g'de 15 dk santrifüj edilerek pelet ya RNA analizi için toplam RNA izolasyonuna yada western blot analizi için SDS-PAGE'e tabi tutulmuştur.

3.9 Western Blotlama

RIPA tamponu ile parçalanmış ekstratlar veya immünçöktürme sonucu elde edilen ekstratlar %10 SDS-PAGE ile yürütüldükten sonra eleltroblotlama yöntemiyle PVDF membranlarına aktarılmıştır. TBS-T (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl,%0,5 Tween 20) ile hazırlanan %5 süt tozunda 60 dk inkübasyon sonrası membran TBST tamponuyla bir kez yıkanmış ve primer antikor ile (1:10.000) 1 saat inkübe edilmiştir. Üç kez aynı tamponla yıkama sonrası 1 saat HRP konjuge sekonder antikor ile inkübe edilmiştir. TBST ile üç kez yıkanan membranlar kemiluminesent yöntemle (Thermo) üretici firmanın protokolüne göre yapılmıştır. Görüntüleme için İYTE BIYOMER'de bulunan VersaDoc görüntüleme sistemi kullanılmıştır. İkinci bir jel yürütülerek lisatın miktarı ve liziz şartları görsel olarak kontrol edilmiştir.

3.10 Derin Sekans Analizi

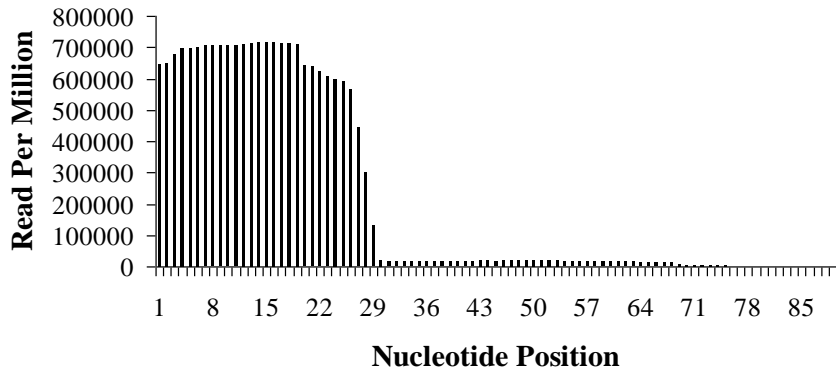
Derin sekans analizi için LA (immünçöktürme sonucu tRF ile etkileştiği için), GW182 (immunositokimya da tRF ile ko-lokalize olduğu için) ve ROX8 (stresle tetiklenen tRNA fragmanlarının etkileştiği rapor edildiği için) mutantları seçilmiştir. P2 sinekleri kontrol olarak kullanılmıştır. Derin sekans analizi ve biyoinformatik analizler Illumina platformu kullanılarak SourceBioScience (İngiltere) firması tarafından yapılmıştır.

4. BULGULAR

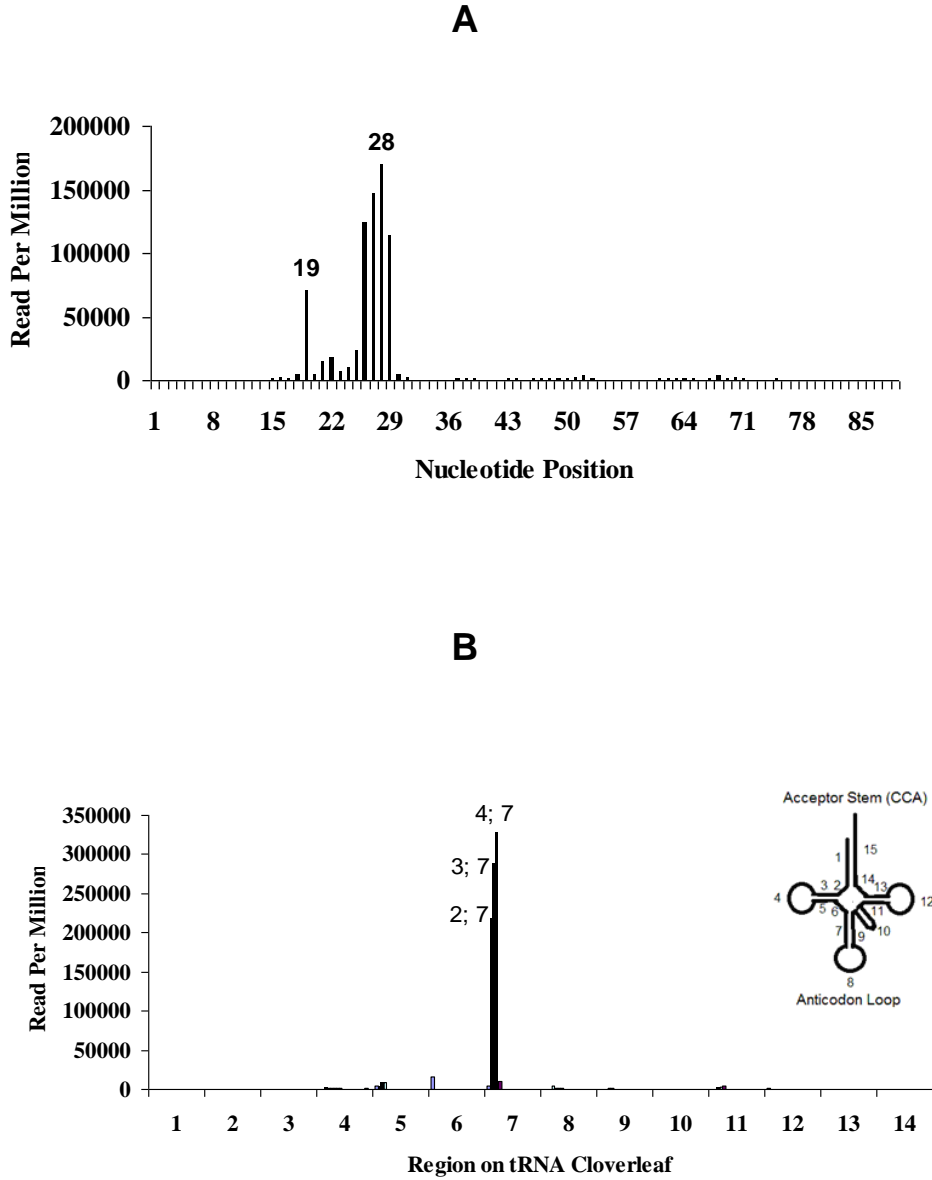
4.1 tRNA Fragmanlarının Biyogenezi İle İlgili Çalışmalar

tRF'lerin sentezlendiği tRNA bölgelerini genomik seviyede anlamak için öncelikle bazı biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda 104T144 No.lu proje kapsamında fraksiyona ayrılan ve ayrılmayan toplam 10 örnekte rapor edilen tRNA kökenli fragman verisi kullanılmıştır. tRNA kökenli bu fragmanlar 5' uca uzaklıkları dikkate alınarak örnek (kalıp) bir tRNA üzerine empoze edilmiştir. Elde edilen analiz sonucuna göre, fragmanların %95,7'si tRNA'ların 5' uçlarından kökenlenmektedir ki buda bize tRNA fragmanlarının spesifik olarak bazı bölgelerden üretildiğine ve tRNA degradasyon ürünleri olmaması gerektiğine işaret etmektedir.

Şekil 1'deki veri dikkate alındığında kalıp tRNA'nın 22-29. nükleotit bölgeleri arasında parçalanmaya benzer heterojen bir dağılımın bulunduğu görülmektedir. Sitoplazmik tRNA parçalanmasına benzer bu dağılımın daha detaylı incelenmesi planlanmıştır. Bu bağlamda, tRF'lerin 3' uçlarına denk gelen bu bölgede sitoplazmik random parçalanma veya biyogeneze



Şekil 1. tRNA Fragmanlarının Kalıp tRNA Üzerinde Klonlanma Sıklıkları. 104T144 No.lu proje kapsamında 10 adet *Drosophila* embriyo örneklerinden elde edilen tüm tRNA kökenli fragmanlar kalıp tRNA'nın 5' ucuna uzaklıkları dikkate alınarak örnek bir tRNA üzerine empoze edilmiştir. Daha sonra her bir nükleotit pozisyonundaki klonlanma sıklığı milyonda bir okuma (read per million) olarak hesaplanmıştır.

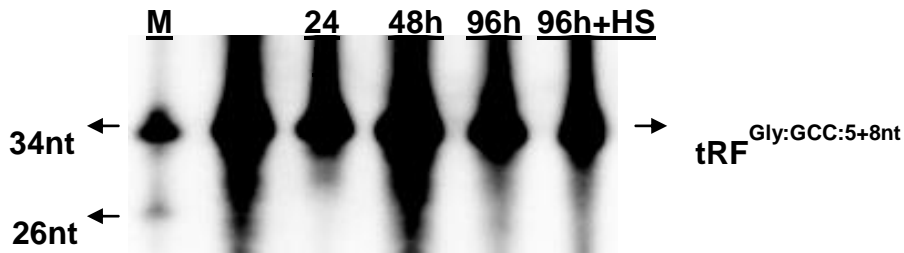


Şekil 2. tRF'lerin 3' Kesim Bölgelerinin Biyoenformatik Analizi. Penal A, tRF'ler köken aldıkları tRNA'lara blastlandıktan sonra 3' uçlarının pozisyonunun ilgili tRNA'nın 5' ucuna uzaklığı hesaplanmıştır. Panel B, Repräsent bir tRNA mfold programı ile katlanarak 15 koordinata bölünmüştür. tRF'in köken aldığı tRNA mfold ile katlandıktan sonra, ilgili tRF'in 3' kesim noktasının katlanmış tRNA üzerindeki 15 koordinattan hangisine denk geldiği hesaplanmıştır.

bağlı olan muhtemel bir endonukleolitik kesim bölgesinin var olup olmadığını incelemek için, klonlanan tRF'lerin 3' uçlarının 5' uca rölatif uzaklıkları hesaplanmıştır. Şekil 2A'da görüldüğü üzere, tRNA'ların 5' uçlarına mesafeleri dikkate alındığında klonlanan tRF'lerin 3' kesim bölgeleri 19 ve 28. nükleotitler noktasında yoğunlaşmaktadır. Özellikle 28. Nükleotit noktasındaki yoğunluk dikkat çekmektedir. Ancak bu noktada bile 26-29. nükleotitlere gelen bir dağılım olduğundan, bunun tRNA uzunluklarından kaynaklanan bir heterojenlik olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezden yola çıkarak, tRNA sekansları katlandığında tRNA'ların ikincil

yapılarının spesifik noktalarında kesim bölgelerinin olabileceği düşünülmüştür. Bu soruya yanıt bulmak için, katlana paternine göre model ergin bir tRNA 15 koordinata ayrılmıştır (Şekil 2B). Daha sonra tüm tRNA sekansları mfold programıyla katlanmıştır. tRF'lerin köken aldıkları tRNA'daki bu 15 bölgeye eşleşmesi dikkate alındığında, tRF'lerin 3' kesim noktalarının köken aldığı tRNA'nın antikodon stem yapısının 2-4 nolu nükleotitleri arasında yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 2B, 7 No.lu bölgede 2-4 numaralı nükleotitler).

tRF'lerin 3' uçlarının oluşumunda en az iki potansiyel mekanizma kullanılabilir. Birinci mekanizmada 5' uca uzaklık ve/veya ikincil yapılar dikkate alınarak spesifik bir noktada endonükleotilik bir kesim olabilir. Bu mekanizma kısmen miRNA'ların biyogenezinde Dicer aktivitesine benzer bir enzim tarafından gerçekleştirilebilir. İkinci mekanizmada ise yine ikincil yapılar benzer yapılar dikkate alınarak kısmen daha uzak bir noktadan kesim yapılabilir ve sonra ekzonükleotilik yıkımla 3' uç belirlenebilir veya 3' uçtan başlayarak ekzonükleotilik yıkımla 3' uçlar belirlenebilir. İkinci mekanizma baz alınarak, 3' uçta yapılacak herhangi bir kesim sonrası ekzonükleotilik yıkımın biyogenezde rol oynayıp oynamadığını test etmek için endojen glisin tRF'inden 8 nükleotit daha uzun biyotin işaretli sentetik bir glisin tRF'i (tRF:Gly:GCC:5+8nt) S2 hücrelerine aktarılmış ve 96 saate kadar geçen sürede ilgili tRF'in boyutunda meydana gelebilecek muhtemel değişiklikler izlenmiştir (Şekil 3). Stres şartlarında, tRF'lerden biraz daha uzun, 35-40 nükleotit uzunluğunda tRNA fragman yarıları oluşmaktadır. tRF'lerin biyogenezinde rol oynayan enzimlerin de benzer şekilde stres şartlarında aktive olabileceği hipotezinden yola çıkarak, tRF:Gly:GCC:5+8nt ile transfekte edilen hücrelerin bir kısmı transfeksiyondan 96 saat sonra 1 saat 42 °C'de ısı şokuna tabi tutulmuştur. Ancak bu muamelede transfekte edilen uzun tRF'lerin boyutlarında bir fark yapmamıştır.

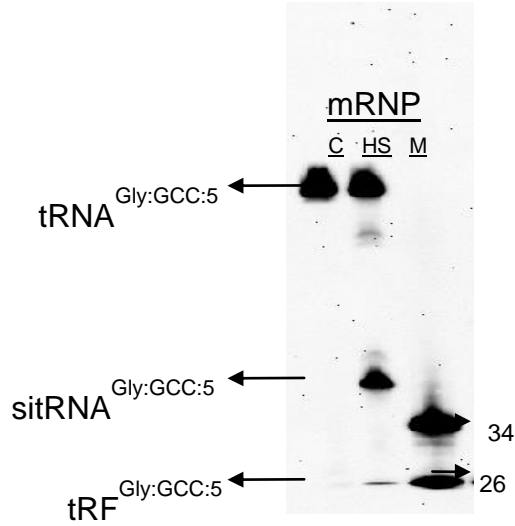


Şekil 3. tRF:Gly:GCC:5+8nt'in S2 Hücrelerinde İfadesi. 34 nükleotit uzunluğundaki biyotin işaretli tRF:Gly:GCC:5+8nt tRF'i (endojen tRF'ten 8nt daha uzun) S2 hücrelerine FuGENE HD transfeksiyon kiti ile aktarıldıktan sonra belirtilen aralıklarla hücrelerden Trizol yöntemiyle toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. Sentetik tRF'ler biyotik işaretli olduğu için, streptavidin konjuge HRP enzimi kullanılarak kemiluminesan görüntüleme yapılmıştır. M, Markör; hs, 1 saat 42 °C'de ısı şoku.

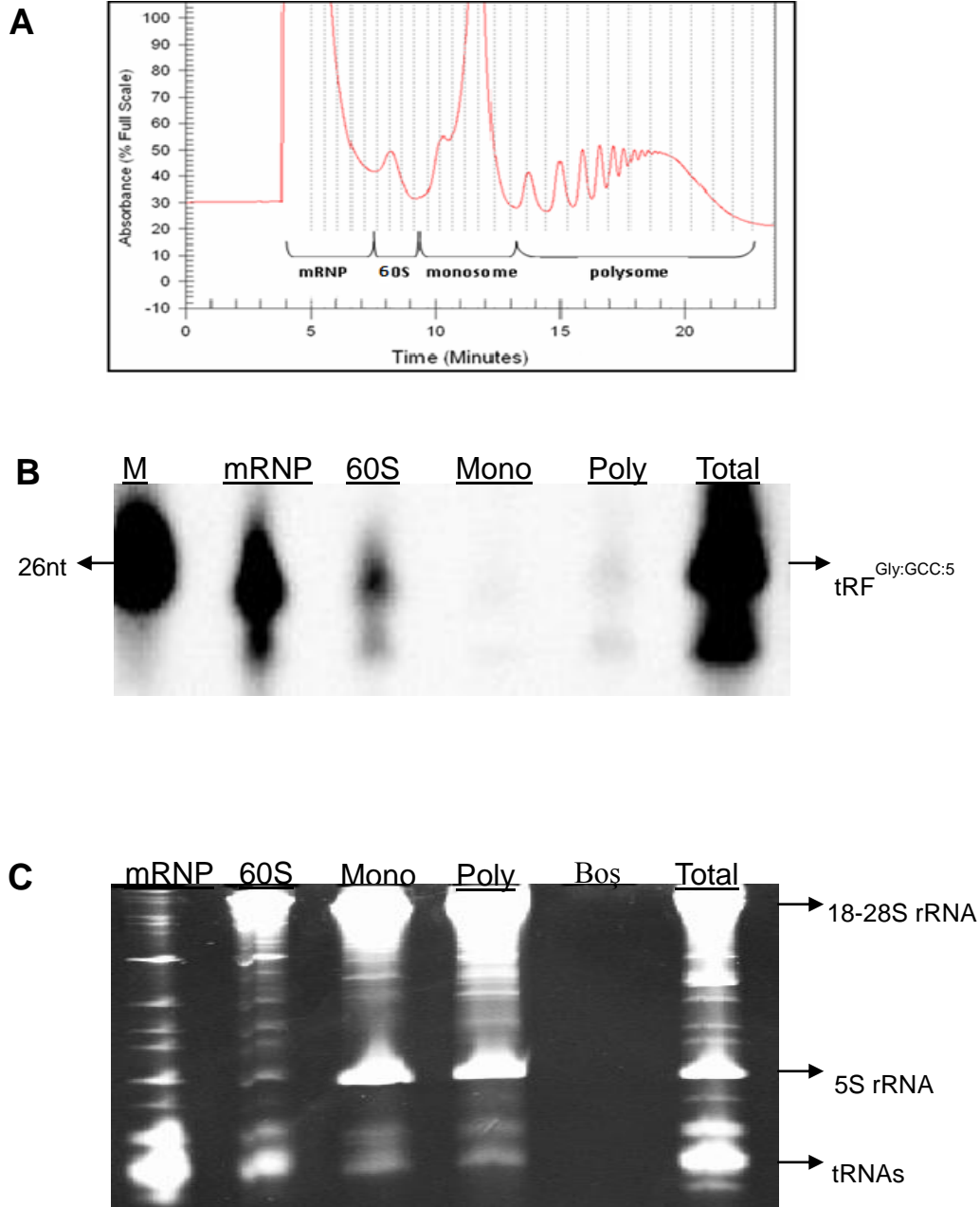
4.2 Sentetik tRNA Fragmanlarının S2 Hücrelerinde Aşırı İfadesi

tRF'lerin tranlasyondan uzak mRNP fraksiyonlarında lokalize olduğu gözlemimizi doğrulamak için sentetik tRF'leri *Drosophila* sineklerine verdikten sonra polizom analizine tabi tutarak ilgili tRF'lerin hangi fraksiyonlara gideceğinin incelenmesi gerekmektedir. Ergin sineklerde ve embriyolarda bu deneyim yapılmasındaki teknik güçlükler nedeniyle *Drosophila* hücreleri kullanılmıştır. Şekil 3'te görüldüğü üzere, transfekte edilen tRF'ler S2 hücrelerinde en az 96 saat stabil bir şekilde ifade edilmektedirler. Ancak bu deneylere başlamadan önce, S2 hücrelerinin bu analiz için uygun olduğuna karar vermek için, S2 hücrelerinde tRF'lerin var olup olmadığı incelenmiştir. Oda sıcaklığında tutulan ve ısı şokuna maruz bırakılan S2 hücreleri polizom analizine tabi tutularak protein sentezleme kapasitesine göre 4 fraksiyona ayrılmıştır. mRNP fraksiyonlarından izole edilen toplam RNA denatüre edici poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra biyotinle işaretli antisense glisin tRNA parçası kullanılarak Northern blotlama yapılmıştır. Şekil 4'te görüldüğü üzere test edilen glisin tRF'i S2 hücrelerinde translasyon ünitelerinin olmadığı mRNP fraksiyonunda (Şekil 5) azda olsa ifade edilmekte ve miktarı stres şartlarında daha da artmaktadır.

tRF'lerin S2 hücrelerinde ifade edildiğinin doğrulanmasından sonra, dışarıdan hücreler aktarılan sentetik tRF'lerin endojen tRF'lere benzer şekilde mRNP fraksiyonuna lokalize olup olmadığı araştırılmıştır. Bu bağlamda, biyotin işaretli sentetik glisin tRF'i (tRF^{Gly:GCC:5+8nt}) S2 hücrelerine aktarıldıktan 24 saat sonra polizom analizine tabi tutulmuştur.



Şekil 4. Glisin tRF'inin (tRF^{Gly:GCC:5}) S2 Hücrelerde İfadesinin Northern Blot İle Analizi. Oda sıcaklığında yetiştirilmiş (C) ve 42 °C'de 1 saat ısı şokuna tabi tutulmuş (HS) S2 hücreleri %5-70 sukroz gradyanı üzerinde polizom analizine tabi tutulmuştur. A254 absorbans değerine göre fraksiyonlar toplanarak tranlasyonal olarak inaktif mRNP, ribozom alt ünitesi 60S'i ihtiva eden 60S, translasyonun başlangıcını ifade eden monozom (80S) ve translasyonal olarak aktif polizom olmak üzere 4 fraksiyona ayrılmıştır. mRNP fraksiyonundan fenol ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen toplam RNA'lar ile Northern blotlama yapılmıştır. Blotlamada biyotin işaretli antisense glisin tRNA parçası kullanılmıştır. sitRNA, stress-induced tRNA yarı; M, Markör.

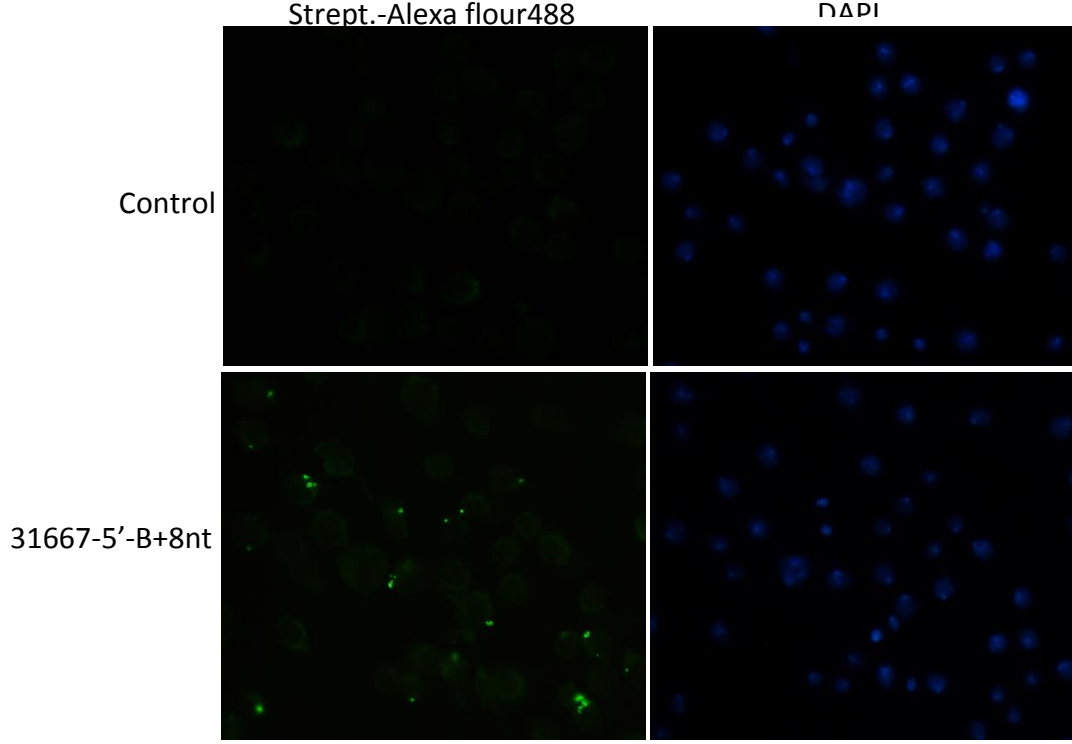


Şekil 5. Biyotin İşaretli Sentetik Glisin tRF'inin Polizom Analizi. Sentetik glisin tRF'i (tRF:^{Gly:GCC:5}) S2 hücrelerine aktarıldıktan 24 saat sonra sitozolik ektrat %5-70 sukroz gradyanı üzerinde polizom analizine tabi tutulmuştur. Panel A, Fraksiyanasyon sırasında elde edilen A254 okuması; Panel B, Fraksiyonlardan elde edilen RNA'ların poliakrilamid jelde yürütülmesi sonrası (Panel C) membranlara aktarılarak streptavidin konjuge HRP ile kemilüminesent görüntülenmesi. Mono, monozom fraksiyonu; poly, polizom fraksiyonu; total, polizom analizi yapılmayan kontrol S2 hücre RNA'sı.

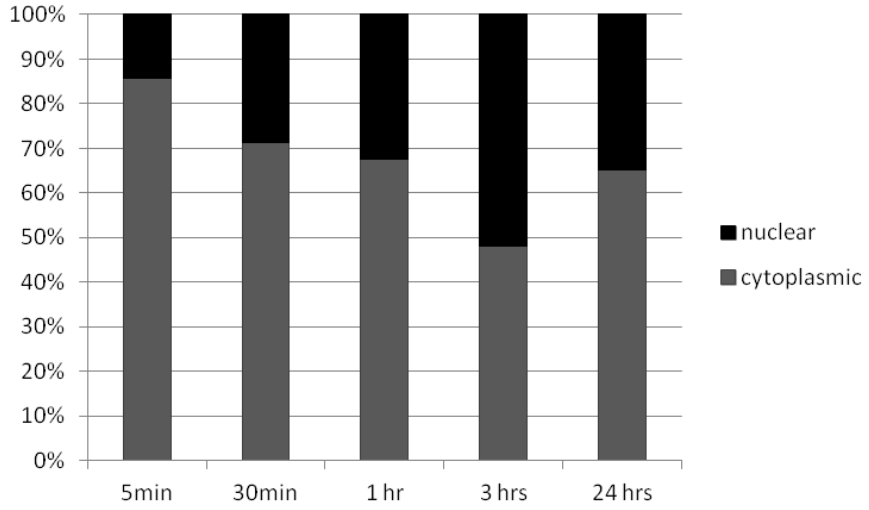
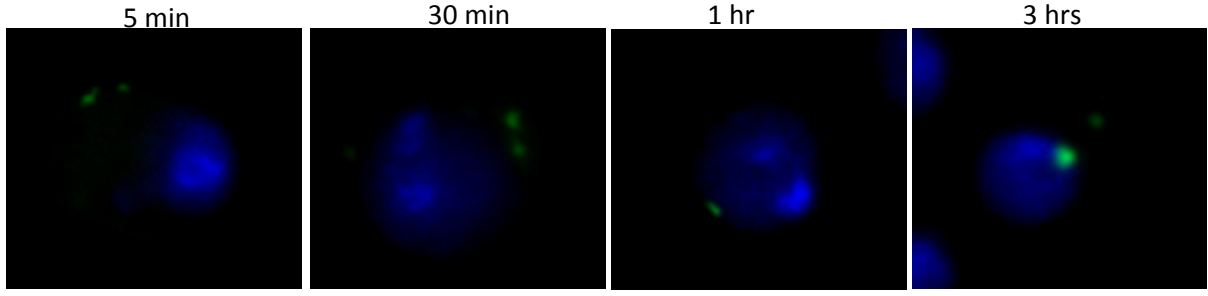
Polizom analizi sonrası sitozolik ekstrakt 4 fraksiyona ayrılmıştır: (1) translasyonel olarak inaktif mRNP fraksiyonu; (2) 60S ribozomal alt üniteyi içeren 60S fraksiyonu; (3) translasyon başlangıç aşamasındaki RNA'ları içeren monozom (80S) fraksiyonu ve (4) translasyonel olarak aktif RNA'ları içeren polizom fraksiyonu (Şekil 5A). Her fraksiyondan elde edilen toplam RNA denatüre edici poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra (Şekil 5C) membranlara aktararak streptavidin konjuge HRP ile sentetik tRF'ler görüntülenmiştir. Şekil 5B'de görüldüğü üzere, hücrelere aktarılan glisin tRF'inin büyük bir çoğunluğu mRNP fraksiyonunda yer almakta ve dolayısıyla hücrenin translasyonel aparatından uzakta bulunmaktadır.

4.3 tRF'ler Sitoplazmik Lokalizasyonu

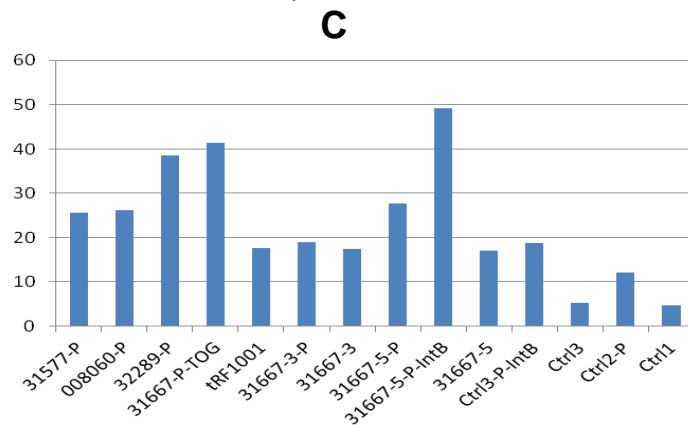
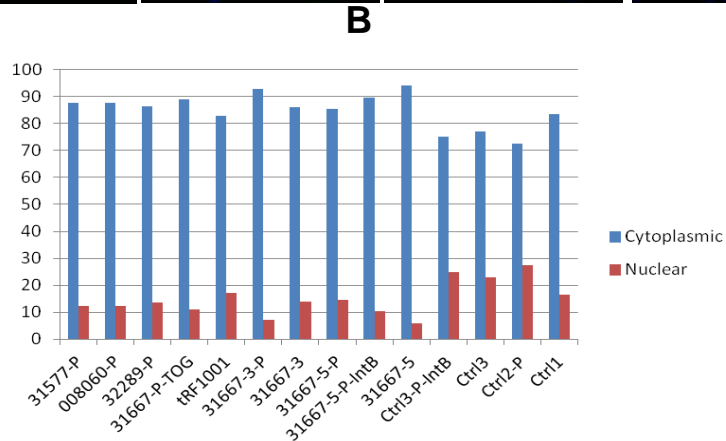
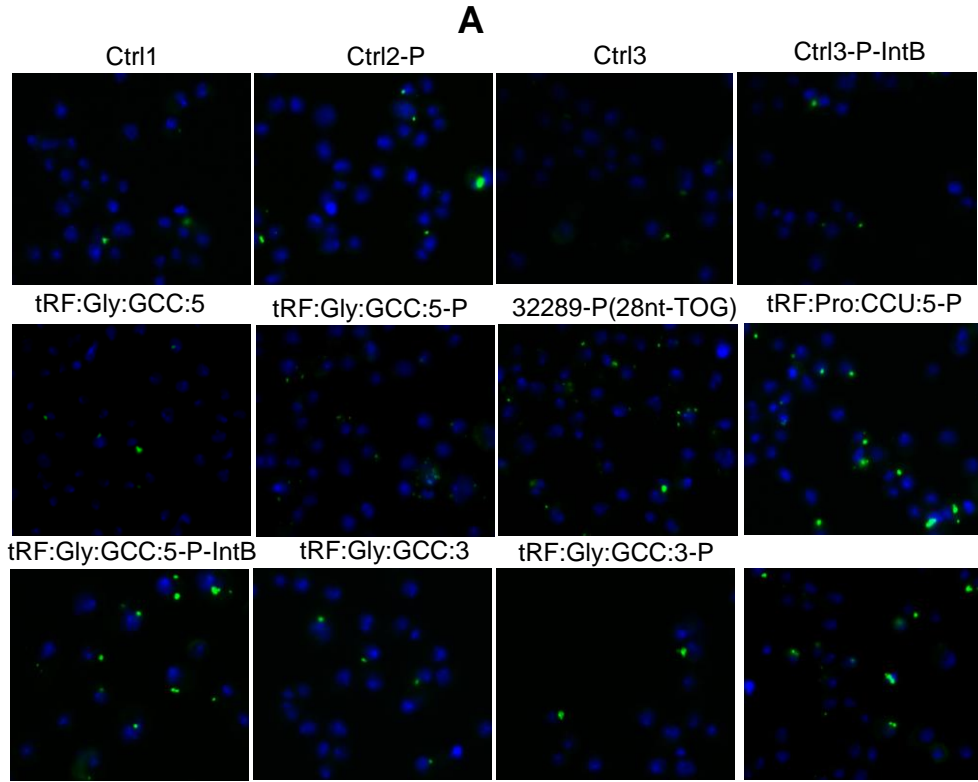
tRF'lerin polizom analizi sonrası mRNP fraksiyonunda tespit edilmesi, en azından bir kısım tRF'in sitoplazmada lokalize olduğunu işaret etmektedir. Ancak tüm tRF'lerin sitoplazmada olup olmadığı, ve sitoplazmik tRF'lerin hangi proteinlerle kompleks oluşturduğunun detayları bilinmemektedir. Bu sorulara yanıt bulmak için öncelikle sentetik tRF'ler S2 hücrelerine aktararak sitolojik konumlanmaları belirlenmiştir. Hücrelerin çekirdeklerini belirlemek için DAPI boyaması yapılmıştır. Sadece transfeksiyon rejanıyla transfeksiyon kontrol olarak kullanılmıştır. İmmunositokimyasal boyamalar S2 hücrelerine aktarılan sentetik tRF'in sitoplazmada konumlandığını göstermiştir (Şekil 6). tRF'lerin zamana bağlı olarak hücre içi dinamikleri incelendiğinde, yine benzer şekilde %70'den fazlasının sitoplazmik olarak konumlandığı belirlenmiştir (Şekil 7). tRF'lerin sitoplazmik konumlarında ki spesifiteyi test etmek için glisin tRF'i yanında diğer tRF'ler modifiye edilmiş ve edilmemiş olarak kontrol RNA'larıyla paralel olarak ayrı ayrı S2 hücrelerine aktararak hücrel konumları ve oluşan granüllerin sayıları belirlenmiştir (Şekil 8). Bu analiz sonucunda tRF'lerin sitoplazmik konumları teyit edilmiştir (Şekil 8B). Ayrıca, tRF'lerin kontrol RNA'lara göre daha fazla granül oluşturduğu (Şekil 8C) ve muhtemelen daha spesifik kompleksler oluşturduğu belirlenmiştir.



Şekil 6. Glisin tRF'inin S2 hücrelerinde hücre içi yerinin belirlenmesi. *Drosophila* S2 hücreler %60 confluent olacak şekilde yatırıldı. Gece boyu oda ısısında inkubasyon yapıldıktan sonra metafectane pro kullanılarak protokola uygun bir şekilde biyotin işaretli glisin tRF'yle (tRF^{Gly:GCC:5} yada 31667-5'-B+8nt) transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra AlexaFluor488 konjuge anti-streptavidin antikoru kullanılarak (1/500) görüntüleme yapıldı. Çekirdeğin yeri DAPI boyamasıyla belirlenmiştir.



Şekil 7. Glisin tRF'inin S2 Hücrelerinde Hücreiçi Yerinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi. *Drosophila* S2 hücreler %60 confluent olacak şekilde yatırıldı. Gece boyu oda ısısında inkubasyon yapıldıktan sonra metafectane pro kullanılarak protokola uygun bir şekilde biyotin işaretli glisin tRF'ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 5, 30, 60, 180 ve 1440 (24h) dakika sonra AlexaFluor488 konjuge anti-streptavidin antikorunu kullanarak (1/500) görüntüleme yapıldı. Çekirdek DAPI boyasıyla lokalize edilmiştir.

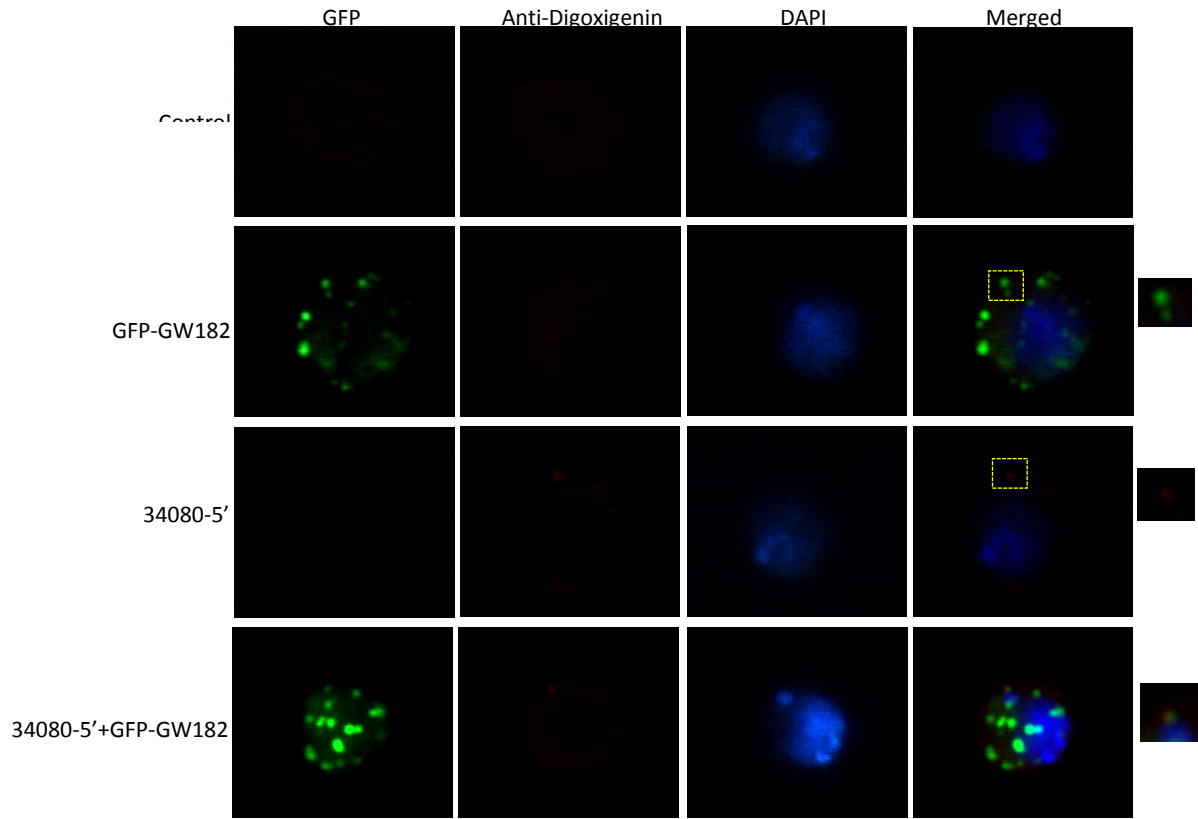


Şekil 8. Kontrol oligo ve tRF'lerin Sitoplazmik Konumları. Kontrol ve tRF oligolarıyla transfekte edilen S2 hücreleri 24 saat sonra metanol ile fikse edilmiş ve Streptavidin-AlexaFluor488 ile işaretlenmiştir. Çekirdekler DAPI ile ters boyanmıştır (mavi). Panel A, floresan boyamalar; Panel B, S2 hücrelerine transfekte edilen oligoların 24 saat sonra hücre içerisinde sitoplazma ve çekirdekte konumlanma oranları; Panel C, ilgili oligolarda tespit edilen granül sayısı. 31667, tRF:Gly:GCC

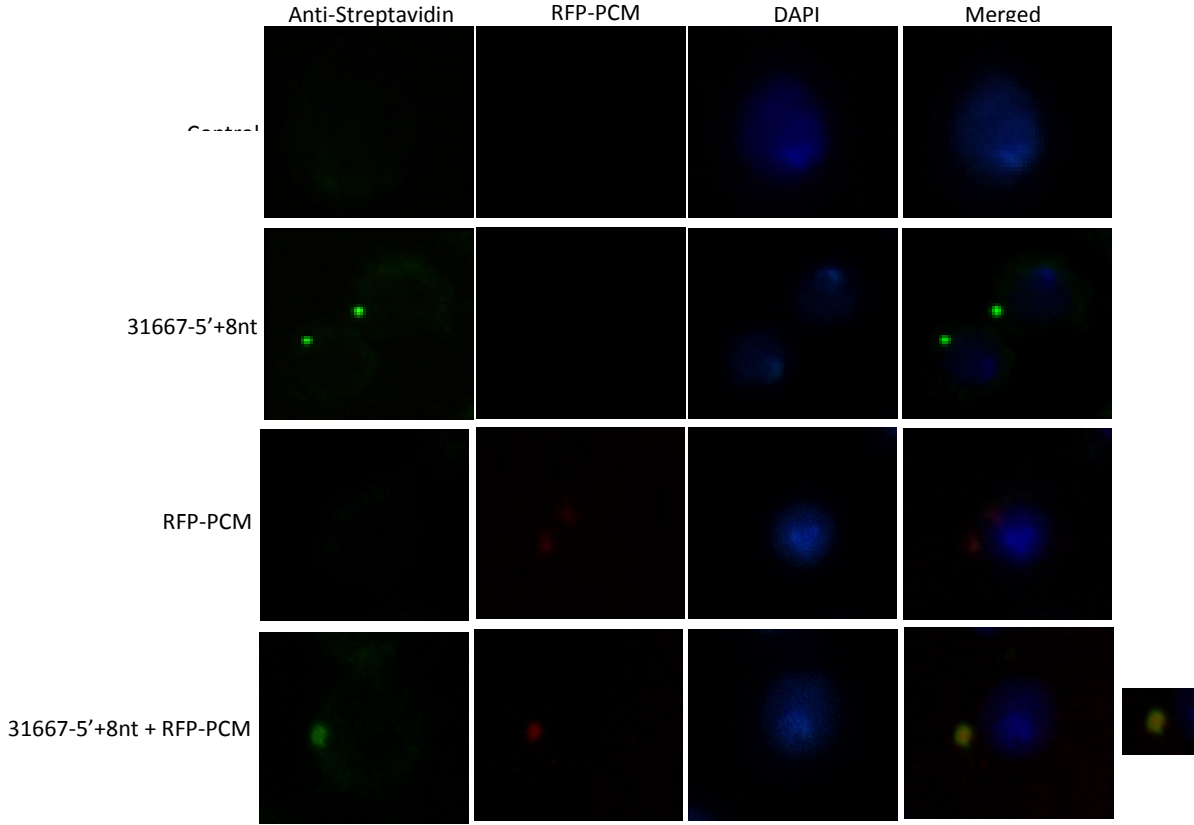
4.4 tRF'lerin Oluşturduğu Muhtemel Kompleksler

Gerek endojen tRF'lerin gerekse hücreye sonradan aktarılan sentetik tRF'lerin S2 hücrelerine aktarılması sonrası polizom analizleri yapıldığında, ilgili tRF'ler spesifik olarak sitoplazmada (mRNP'de) konumlanmaktadır. Hücrelere sonradan aktarılan tRF'ler immunositokimyasal yöntemle takip edildiğinde, yine sitoplazmada konumlanmaktadır. Bu gözlemler doğrultusunda bu moleküllerin sitoplazmada spesifik proteinlerle etkileşebileceği düşünülmüştür. RNA metabolizması ve translasyonel regülasyon kapsamında parçalanmış veya depo amaçlı kullanılan çoğu RNA'nın stres granüllerinde veya P cisimciklerinde buldukları bilgisinden yola çıkarak tRF'lerin bu komplekslerin bir parçası olup olmadığı araştırılmıştır.

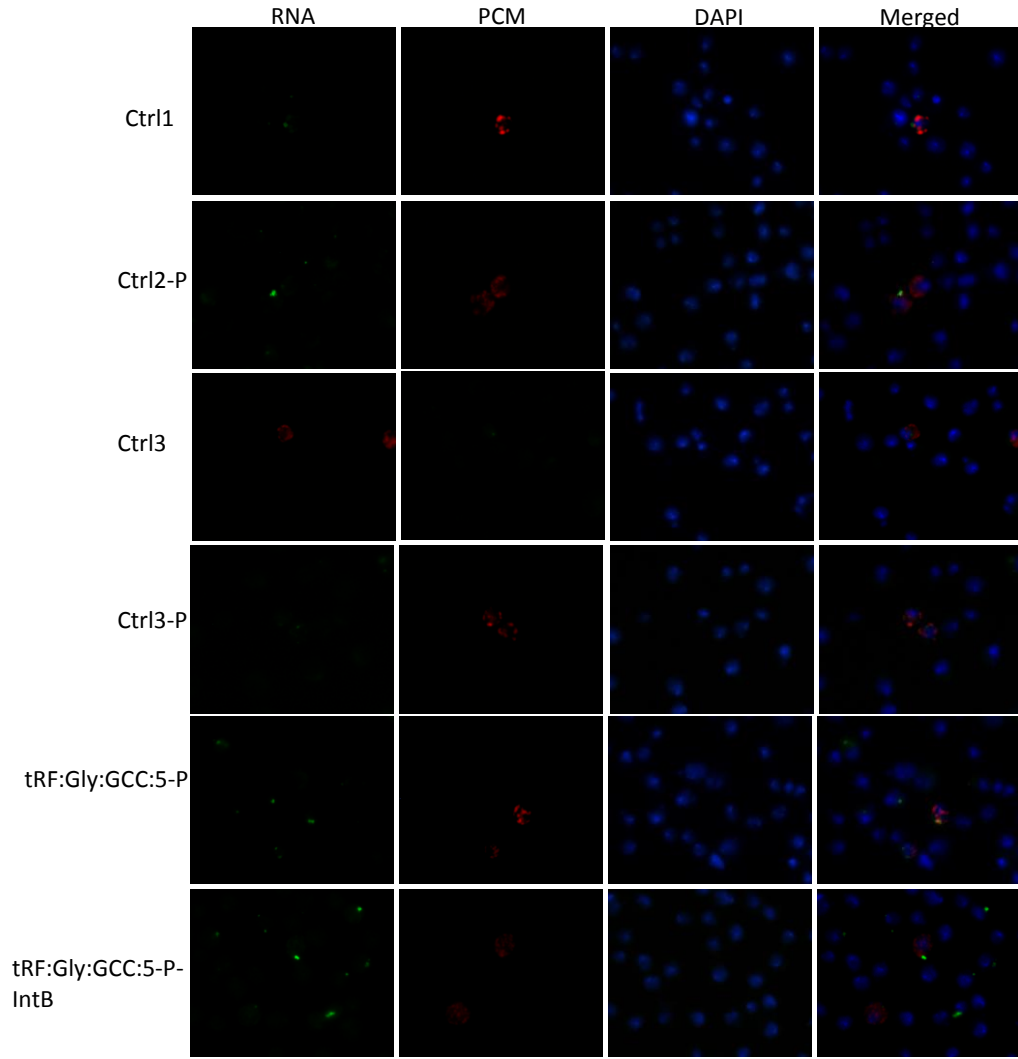
Stress granül markörü olarak PCM (XRN1) ve P cisimciği markörü olarak GW182 kullanılmıştır. Kullanılan tRF'ler 5'-monofosfatlı olup konumları kontrol RNA'lar ile karşılaştırmalı incelenmiştir. Şekil 9 ve 10'da görüldüğü üzere sitoplazmik konumlanan tRF'ler GFP ile kimerik ifade edilen GW182 ile etkileşmektedir. Aynı zamanda PCM proteiniyle de etkileşmektedir. Şekil 11 ve 12'de görüldüğü üzere, kontrol RNA'larda benzer konumlanma göstermektedir. Bu sonuçta, tRF'lerin bu şartlar altında PCM (veya GW182) ile non-spesifik olarak etkileşebileceğini düşündürmektedir. PCM proteiniyle non-specific etkileşim sonrası sorduğumuz önemli sorulardan bir tanesi ise, hücreye verilen herhangi bir RNA'nın spesifik olarak yerini tanıyor olup olmayacağıdır. Nitekim, hücreye verilen tRF'in fonksiyonel olabilmesi için, doğru hücresel konuma (çekirdek, sitoplazma veya mitokondri gibi) gitmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, glisin tRNA'sının 5' ve 3' kısmını farklı floresanla işaretleyerek GW182 ile konumlanmasını test ettik. GFP-GW182 konjuge protein ifade eden plasmid floresan işaretli glisin tRNA'sının 5' veya 3' ile S2 hücrelerine transfekte edilmiştir. Anti-Dig primer antikör ve AlexaFluor594 ile yapılan görüntülemelerde her iki tRF oligosunun sitoplazmik konumlandığı ve her iki tRF'in bir kısmının GW182 ile beraber konumlandığı görülmüştür (Şekil 12).



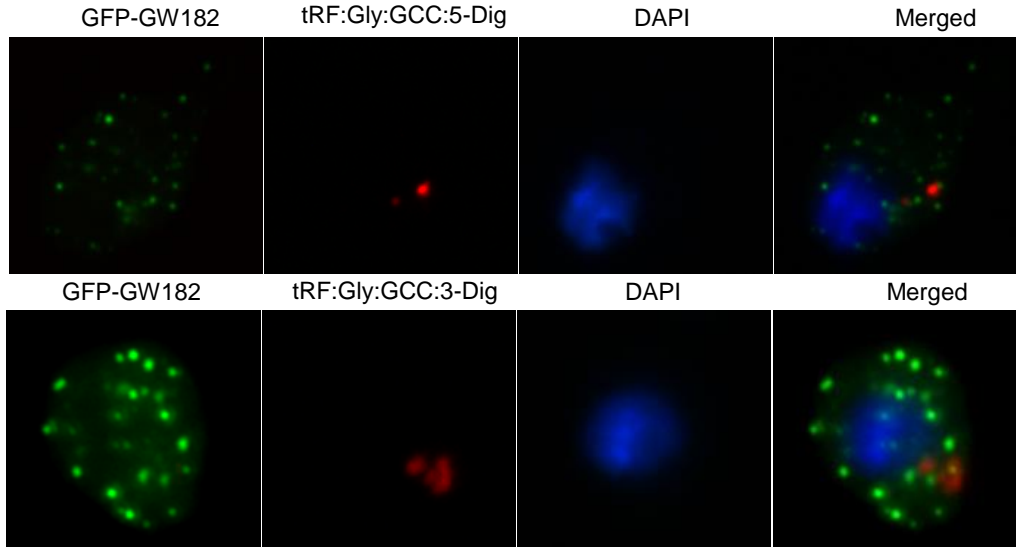
Şekil 9. CR34080 tRF'inin S2 Hücrelerinde GFP ile Konjuge GW182 Proteiniyle Beraber Konumlanması. *Drosophila* S2 hücreler %60 confluent olacak şekilde yatırıldı. Gece boyu oda ısısında inkubasyon yapıldıktan sonra metafektane pro kullanılarak protokola uygun bir şekilde GFP-GW182 kimerik proteinini ifade eden plasmid ve biyotin işaretli glisin tRF'iyle transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra AlexaFluor488 konjuge anti-streptavidin antikoru kullanılarak (1/500) görüntüleme yapıldı. Çekirdek DAPI boyasıyla lokalize edilmiştir.



Şekil 10. Glisin tRF'inin S2 Hücrelerinde GFP Konjuge XRN1 (RFP-PCM) Proteiniyle Beraber Konumlanması. *Drosophila* S2 hücreler %60 confluent olacak şekilde yatırıldı. Gece boyu oda ısısında inkubasyon yapıldıktan sonra metafectane pro kullanılarak protokola uygun bir şekilde XRN1 kimerik proteinini ifade eden plasmid ve biyotin işaretli glisin tRF'ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra AlexaFluor488 konjuge anti-streptavidin antikorunu kullanarak (1/500) görüntüleme yapıldı. Çekirdek DAPI boyasıyla lokalize edilmiştir.

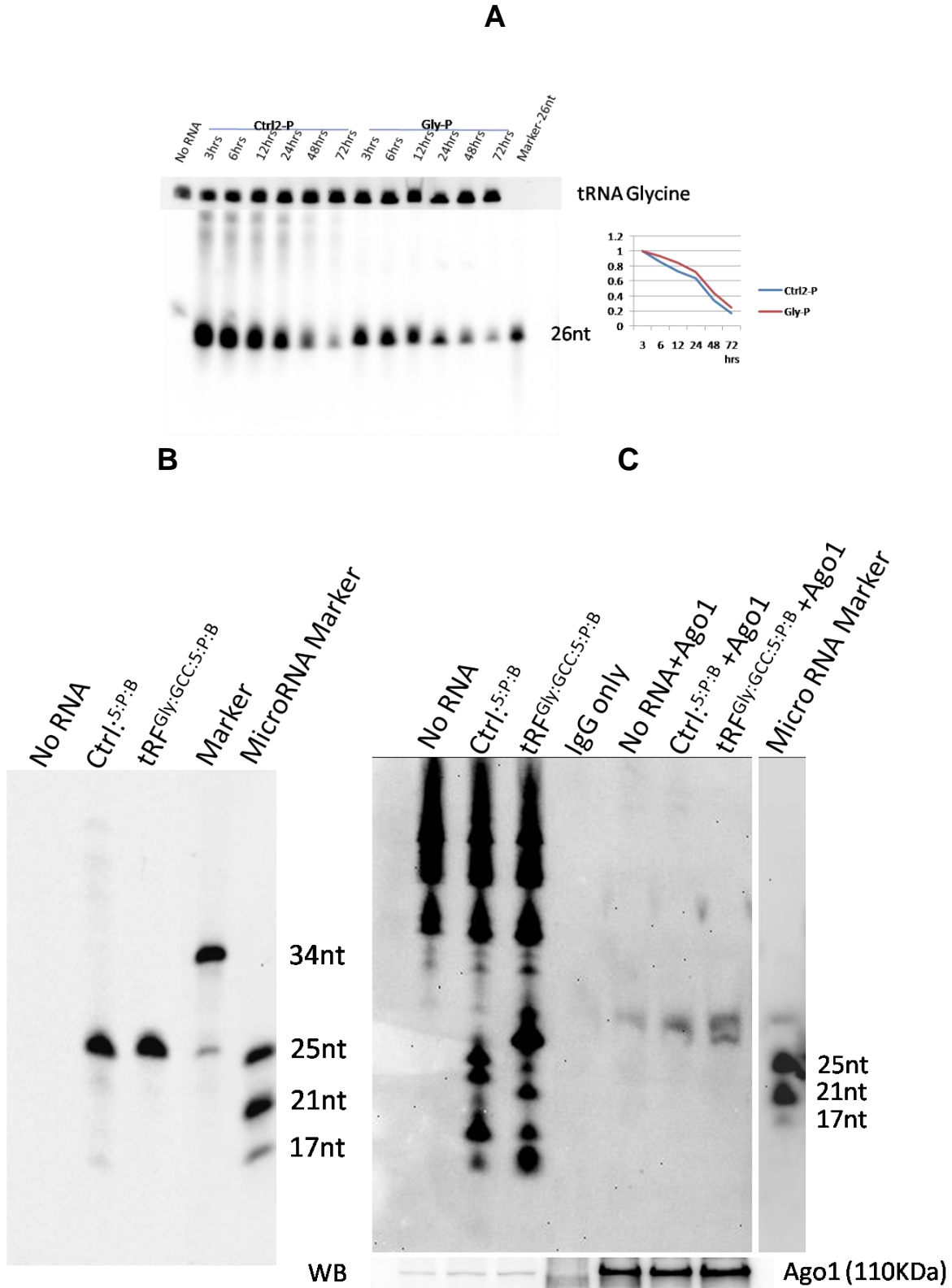


Şekil 11. Kontrol Oligo ve tRF'lerin PCM ile Beraber Sitoplazmik Konumları. Kontrol ve tRF oligolarıyla transfekte edilen S2 hücreleri 24 saat sonra metanol ile fikse edilmiş ve Streptavidin-AlexaFluor488 ile işaretlenmiştir. Çekirdekler DAPI ile ters boyanmıştır (mavi).



Şekil 12. Kontrol Oligo ve Digoxigenin İşaretli tRF'lerin GW182 ile Beraber Sitoplazmik Konumları. Kontrol ve tRF oligolarıyla transfekte edilen S2 hücreleri 24 saat sonra metanol ile fikse edilmiş ve Anti-digoxigenin antikorunu ve AlexaFluor488 ile işaretlenmiştir. Çekirdekler DAPI ile ters boyanmıştır (mavi).

Literatür bilgileri tRF'lerin spesifik olmasa da insanda AGO1-4 proteinleriyle etkileştiğini göstermektedir. Bu bilgidan yola çıkarak *Drosophila*'da miRNA ile tetiklenen gen regülasyonunda önemli rol oynayan AGO1 proteininin tRF'ler ile etkileşip etkileşmediği araştırılmıştır. Bu bağlamda S2 hücreleri glisin tRF'i ile transfekte edildikten sonra hem endojen tRF'in hemde transfekte edilen sentetik tRF'in AGO1 ile immunopresipitasyonla çöktürülüp çöktürülmediği araştırılmıştır. Ancak bu deneyi yapmadan önce hücreye aktarılan tRF'in stabil olarak hücre içerisinde kalıp kalmadığı incelenmiştir. Biyotin işaretli kontrol ve glisin tRF'i ile transfekte edilen hücrelerden belirgin zaman aralıklarında RNA izole edilerek zaman içerisinde bu iki RNA grubunun stabilitesi incelenmiştir. Şekil 13A'da görüldüğü üzere, glisin tRF'i 72 saate kadar hücre içerisinde kalmakta olup stabilitesi kontrol RNA'ya göre daha iyidir. Daha sonra bu hücrelerden AGO1 antikoruyla immunopresipitasyon yapılarak glisin tRF'inin AGO1 proteiniyle etkileşip etkileşmediği araştırılmıştır. Transfeksiyon sonrası hücrelerden toplam RNA izole edildikten sonra kemilüminesent görüntüleme yapılarak tRF'lerin hücre içerisinde oldukları doğrulanmıştır (Şekil 13B). Ayrıca, immunopresipitasyon ile AGO1 proteininin çöktüğü western blotlama ile doğrulanmıştır (Şekil 13C altında yer alan bantlar). Daha sonra AGO1 ile çöktürülen peletlerden RNA izole edilerek bu RNA içerisinde tRF varlığı dolayısıyla AGO1 ile etkileşimi araştırılmıştır (Şekil 13C). IgG antikorunu negatif kontrol olarak kullanılmıştır. IgG antikorunu karşılaştırıldığında, AGO1 antikorunuyla çöktürülen ekstraktlarda yaklaşık 26 nükleotit uzunluğunda tRF'ler görülmektedir. tRF transfekte



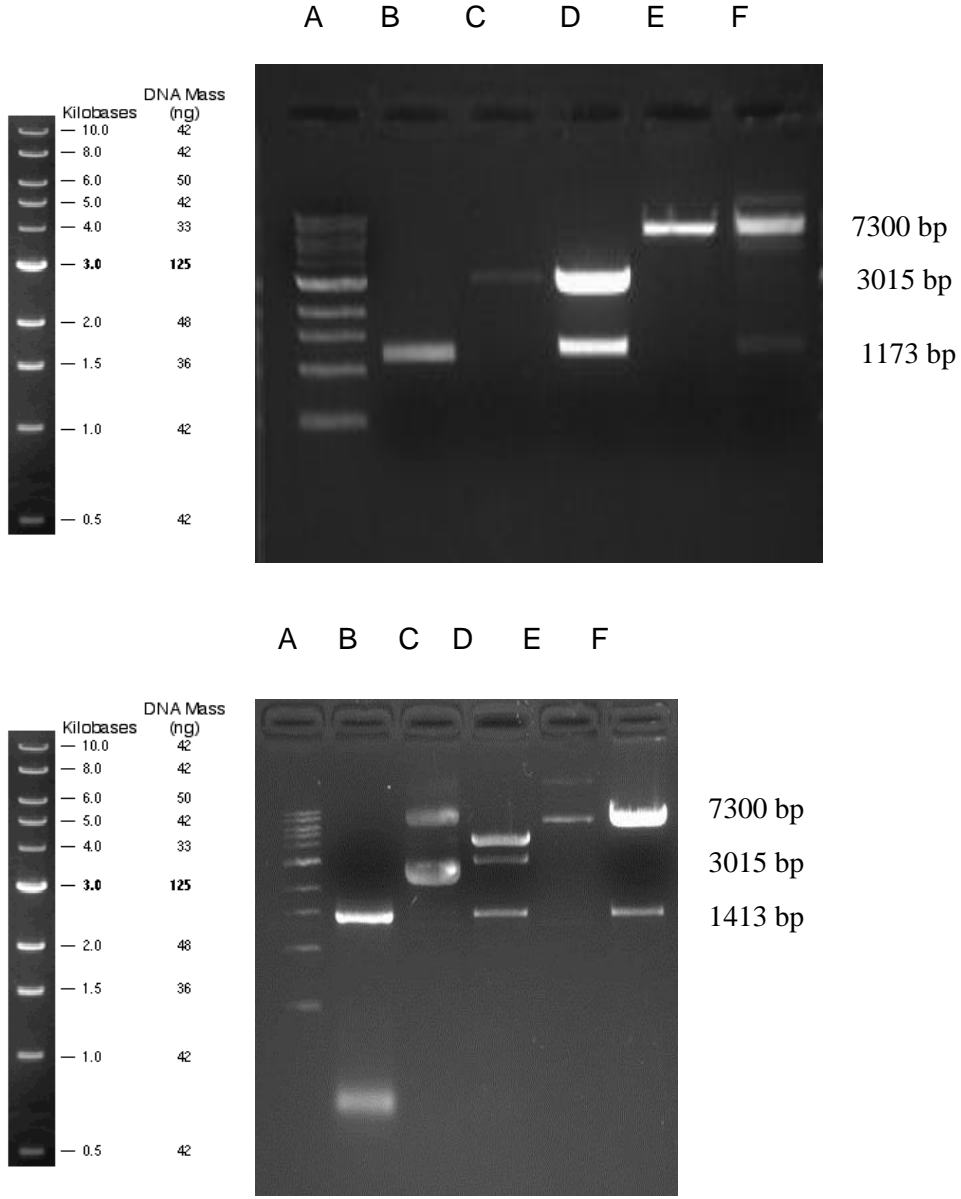
Şekil 13. tRF:Gly:GCC'nin AGO Proteinleriyle Etkileşimi. Panel A, biyotin işaretli kontrol ve tRF:Gly:GCC:5 (Gly-P) ile transfekte edilen hücrelerden belirtilen saatler sonra RNA izole edilmiş ve %12'lik denatüre edici jelde yürütüldükten sonra streptavidin konjuge HRP ile görüntülenmiştir. Panel B-C, S2 hücreleri tRF:Gly:GCC tRF'i ve kontrol oligolar ile transfekte edildikten sonra hücre lisatından AGO1 antikoruyla çöktürülmüştür. İmmunopresipitat %12'lik denatüre edici jelde yürütülerek ilgili antikorlar ile çöken kompleksler içerisindeki tRF'ler streptavidin konjuge HRP ile görüntülenmiştir.

edilmeyen hücrelerde de benzer bir RNA'nın çökmesi, endojen tRF'inde AGO1 proteiniyle etkileştiğini işaret etmektedir.

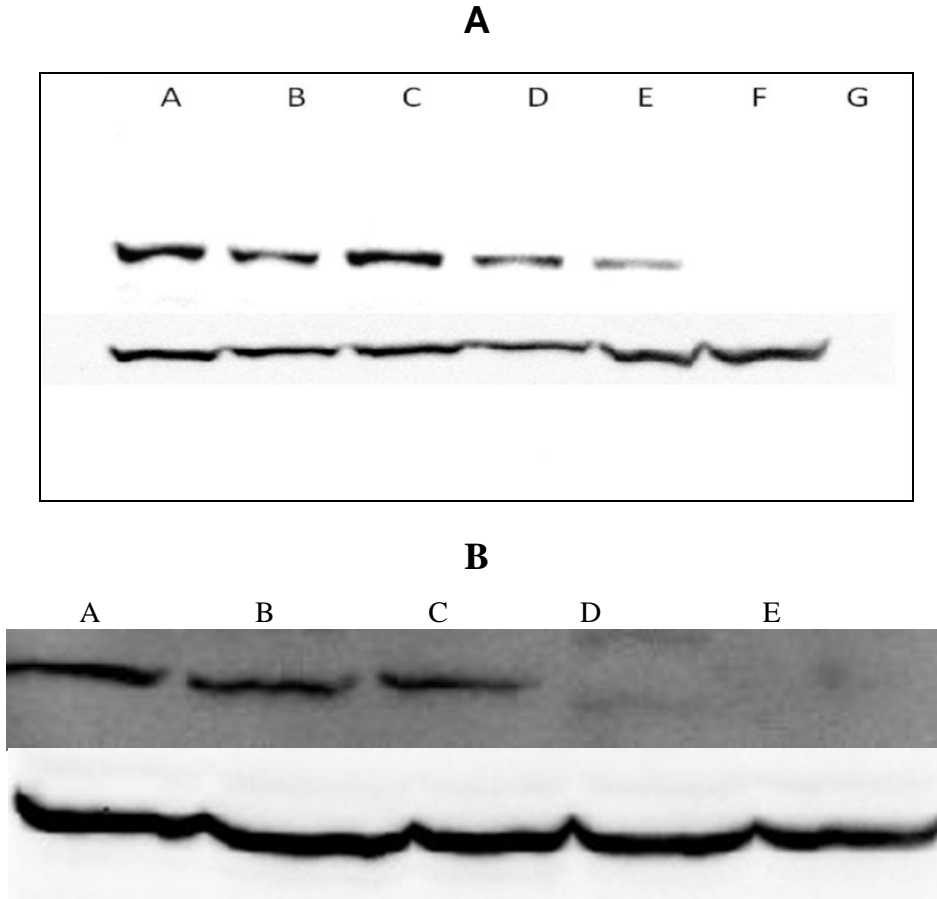
Proje önerisinde tRF'ler ile etkileşme ihtimali bulunan P cisimcikleri ve stres granülleri komponentlerine (GW182 ve XRN1) öncelik verilmesine rağmen, tRF'lerin etkileştiği yeni proteinleri tanımlamak için immunopresipitasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu bağlamda karakterizasyonda öncelik verdiğimiz tRF^{Gly:GCC:5} test amaçlı, tRF^{Gly:GCC:3} negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Biyotin işaretli tRF^{Gly:GCC:5} ve tRF^{Gly:GCC:3} S2 hücrelerine transfekte edildikten 24 saat sonra streptavidin konjuge sepharose boncukları kullanılarak ilgili tRF'lerin oluşturduğu kompleksler çöktürülmüştür. Çöktürme öncesi hücre ekstratları sepharose boncukları ile muamele edilerek boncuklara non-spesifik bağlanan proteinler elimine edilmiştir. Negatif tRF^{Gly:GCC:3} ve test tRF^{Gly:GCC:5} karşılaştırıldığında farklılık gösteren bantlar teker teker jelden kesilerek kütle analizine tabi tutulmuştur. Ayrıca tüm IP proteomu jelde yürütülmeksizin kütle analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre tRF'ler ile etkileşebilen yeni proteinler belirlenmiştir (Tablo 2). Bu proteinler içerisinde en ilginç olanı tRNA biyogenezinde ve stabilitesinde rol oynadığı bilinen LA otoantijen proteinidir. Bu proteinin sitRNA (stress-induced tRNA fragmanı) fragmanlarıyla da etkileştiği bilinmektedir.

Tablo 2. Streptavidin konjuge sepharoz ile çöktürülen tRF komplekslerinde tanımlanan proteinlerin listesi

Accession	Entry	Description	mW (Da)	PLGS Score
P48810	RB87_DROME	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 87F HRP36	39532	1146,304
P13469	MODU_DROME	DNA binding protein modulo	60273	1120,414
P07909	ROA1_DROME	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 hnRNP	39014	957,9683
P48809	RB27_DROME	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C hnRNP	41004	899,7316
Q27294	CAZ_DROME	RNA binding protein cabeza Sarcoma associated RNA	39117	493,8032
P22629	SAV_STRAV	Streptavidin precursor	18822	12513,47
P00974	BPT1_BOVIN	Pancreatic trypsin inhibitor precursor Basic prot	10895	7835,577
Q53532	SAV1_STRVL	Streptavidin V1 precursor SA V1	18852	6855,36
P31243	PORI_RHOCA	Porin	31516	5578,281
P00761	TRYP_PIG	Trypsin precursor EC 3 4 21 4	24393	4476,134
P95678	CH60_RHOCA	60 kDa chaperonin Protein Cpn60 groEL protein	57589	2701,566
P50566	H4_CHLRE	Histone H4	11319	2523,533
P40796	LA_DROME	La protein homolog La ribonucleoprotein La auto	44857	986,994



Şekil 14. İmmünpresipitasyon Deneylerinde Kullanılacak Genlerin FLAG Tag ile İşaretlenip pAct-5C Ekspresyon Vektörüne Klonlanması. S2 hücrelerinden izole edilen toplam RNA oligo-dT kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Tablo 1'de belirtilen primer çiftleri kullanılarak cDNA'dan amplifikasyon yapılmış ve fragmanlar öncelikle pGEM T Easy veya TOPO alt klonlama vektörüne aktarılmıştır. Sekans sonuçlarının validasyonu sonrası, ilgili restriksiyon enzimleri kullanılarak serbest bırakılan fragman ekspresyon vektörü olan pAct-5C'ye aktarılmıştır. Panel A, LA klonlaması; A, Markör; B, PCR fragmanı; C, kesilmemiş pGEM T Easy; D, kesilmiş pGEM T Easy ve fragman; E, kesilmemiş fragmanlı pAct-5C; F, kesilmiş fragmanlı pAct-5C. Panel B, ROX8 klonlaması. A, Markör; B, PCR fragmanı; C, kesilmemiş TOPO vektörü; D, kesilmiş fragmanlı TOPO vektörü; E, kesilmemiş fragmanlı pAct-5C; F, kesilmiş fragmanlı pAct-5C vektörü.



Şekil 15. FLAG İşaretli LA ve ROX8 Proteinlerinin S2 Hücrelerinde Aşırı İfadesi. pAct vektörüne klonlanan LA ve ROX genleri FuGENE HD ile S2 hücrelerine aktarılmıştır. Belirgin saatler sonrası sitozolik lisatlar %10 SDS-PAGE ile ayrıştırıldıktan sonra PVDF membranlarında anti-FLAG antikoruyla blotlanmıştır. Panel A, ROX8 protein aşırı ifadesi; A-E sırasıyla 72, 48, 36, 24 ve 12 saat ifade; F, boş vektör negatif kontrol; G, protein ladder; Yukarıdaki bant ROX8, aşağıdaki bant B-actin. Panel B, LA aşırı ifadesi. A-D, sırasıyla 48, 36, 24 ve 12 saat ifade; E, boş vektör negatif kontrol. Yukarıdaki bant LA, aşağıdaki bant B-actin.

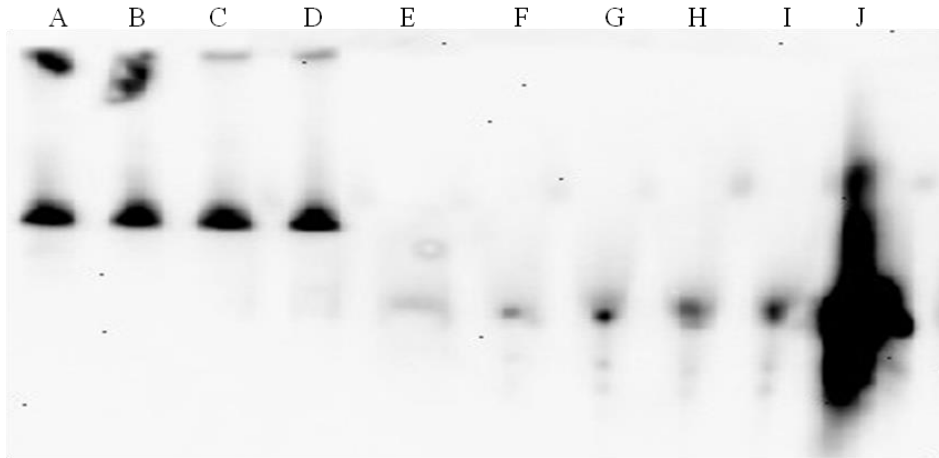
LA proteininin tRF'ler ile etkileşimini test etmek için, LA ve ayrıca sitRNA fragmanlarıyla etkileştiği bildirilen ROX8 (Ivanov vd., 2011) genleri S2 hücrelerinde aşırı ifade etmek amacıyla *Drosophila* pACT aşırı ifade vektörlerine klonlanmıştır (Şekil 14). Aşırı ifade edilen proteinleri endojen kopyalardan ayırt etmek için ilgili proteinlerin C-terminal uçlarına FLAG epitopu eklenmiştir. Transfeksiyon verimliliği hücelere GFP aktarılarak test edilmiştir (yaklaşık %50 verimlilik). Transfeksiyon sonrası değişik zaman aralıklarında protein ifade miktarı ölçülmüştür. Bu veriye göre 24-48 saatlik bir zaman diliminin yeterli olduğu belirlenmiştir (Şekil 15).

tRF'ler ile immünçöktürme deneylerine başlamadan önce FLAG antikoruyla ilgili proteinler çöktürülmüş ve lisatlarda ilgili proteinlerin varlığı western blot ile gösterilmiştir.

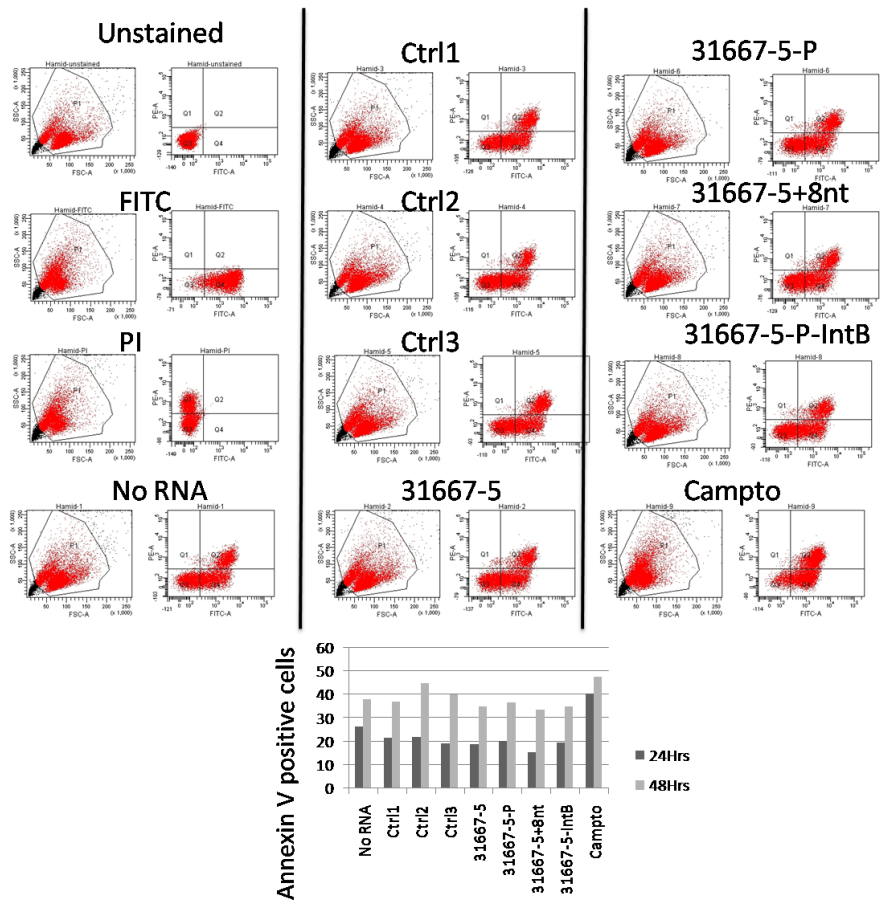
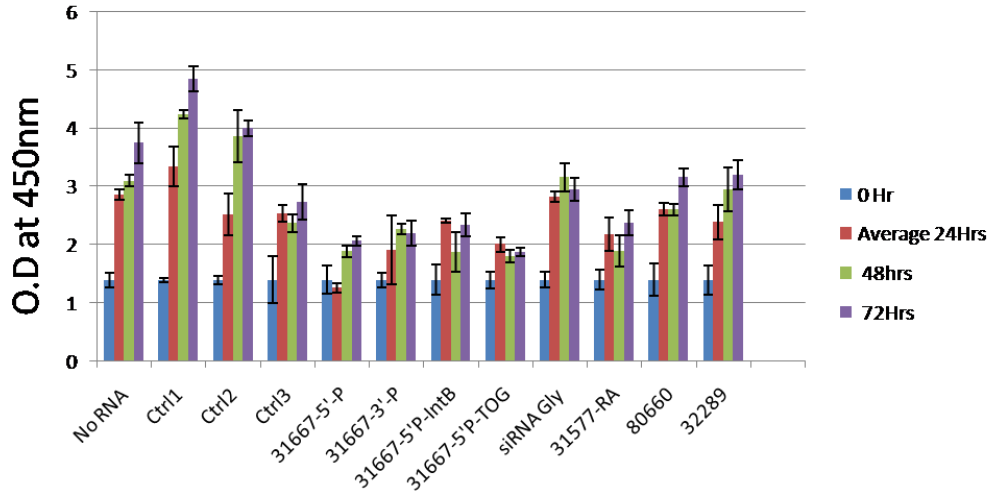
Daha sonra glisin tRF'i S2 hücrelerine aktarılarak anti-FLAG antikoruyla (LA ve ROX FLAG ile işaretli olduğundan bu proteinlerle) çöküp çökmedikleri incelenmiştir. İmmünçöktürme sonrası pelletlerden RNA izolasyonu yapılarak izole edilen toplam RNA içerisinde tRF olup olmadığı northern blotlamayla bakılmıştır (Şekil 16A-D). LA ve ROX8 ile transfekte edilen hücrelerde ilgili proteinlerle birlikte tRF'lerinde geldiği görülmüştür (Şekil 16H-I). Ancak kontrol örneklerinde tRF olması (Şekil 16E-G) tRF'lerin boncuklarla non-spesifik olarak etkileşebileceğini ve bu şartların optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.

4.5 tRF'lerin Hücre Proliferasyonu ve Apoptoza Etkisi

İnsan kanser hücrelerinde yapılan çalışmalar tRF'lerin hücre proliferasyonunu azalttığını göstermiştir. *Drosophila*'da benzer bir etkinin olup olmadığını araştırmak için bir dizi sentetik tRF ve kontrol RNA'lar S2 hücrelerinde aşırı ifade edilmiştir. Değişik zaman dilimlerinde alınan hücrelerde proliferasyon ve apoptoz oranları ölçülmüştür. Elde edilen veriler glisin tRF'inin (Şekil 17, üst panel) kontrol RNA'larla karşılaştırıldığında proliferasyonu azalttığını göstermiştir. Ancak hücrelerin apoptoz oranında belirgin bir değişiklik tespit edilememiştir (Şekil 17, orta ve alt paneller).



Şekil 16. tRF-LA ve tRF-ROX8 Etkileşiminin İmmünçöktürmeyle İncelenmesi. pAct vektörüne klonlanan LA ve ROX genleri ve glisin tRF'i FuGENE HD ile S2 hücrelerine aktarılmıştır. 24 saat sonra hücre sitozolik ekstratlarından FLAG antikoruyla çöktürme yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar membranlara aktarıldıktan sonra biyotin işaretli antisense glisin probuyla hibridize edilmiştir. A-D immünçöktürme öncesi hücrelerde RNA varlığının gösterilmesi (A, RNA transfekte edilmemiş kontrol hücreler; B, pAct vektörü; C, LA; D, ROX8). Northern blotlama olduğu için endojen tRF'lerdende sinyal alınmaktadır. E-I, immünçöktürme yapılan örneklerdeki RNA'lar (E, antikor kullanılmayan negatif kontrol; F, tRF transfekte edilmeyen negatif kontrol; G, pAct transfekte; H, LA; I, ROX8). J, RNA markör (26 ve 34 nt).



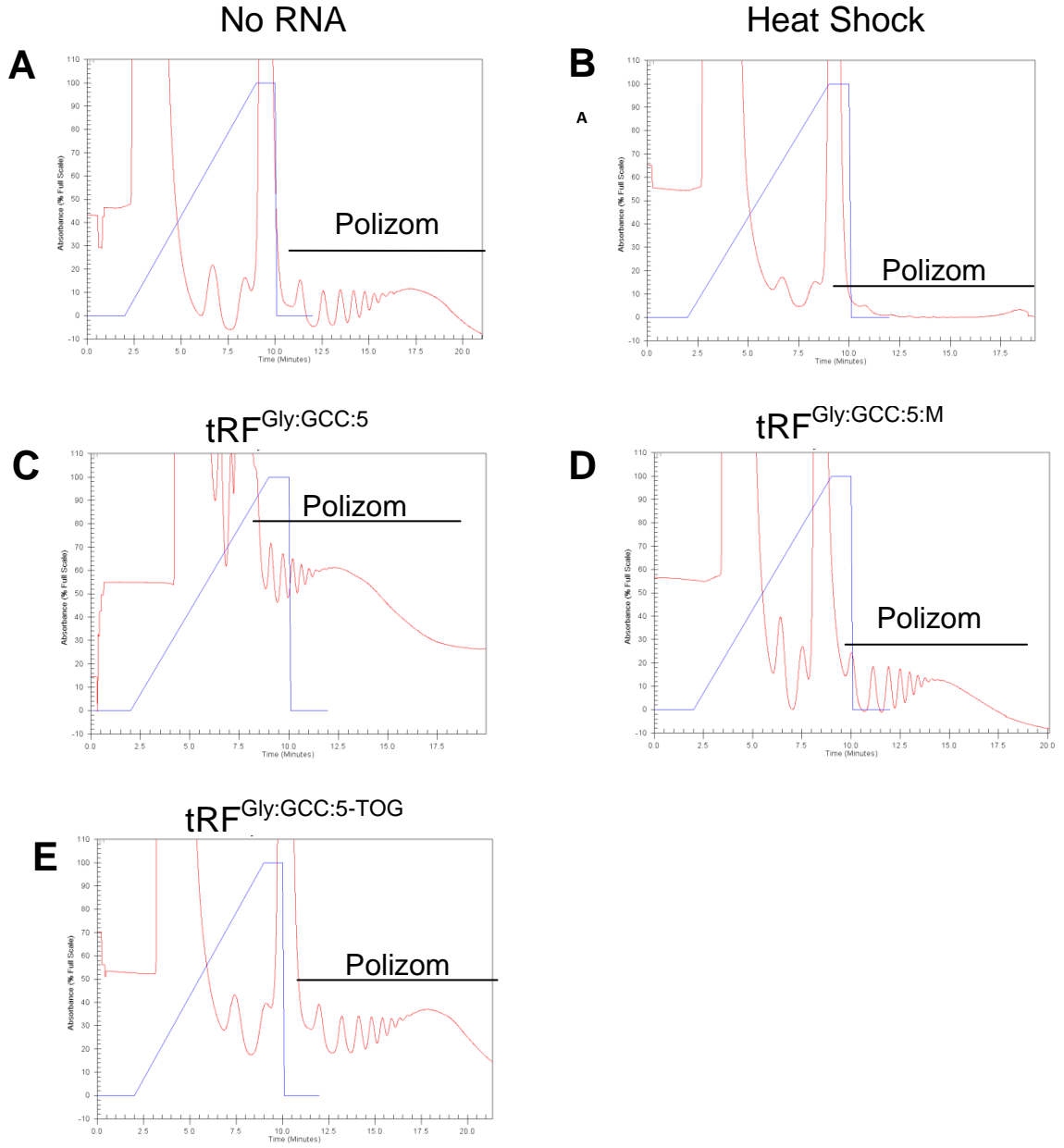
Şekil 17. tRF'lerin S2 Hücrelerinde Proliferasyon ve Apoptoz Üzerine Etkisi. Üst panel, S2 hücreleri sentetik tRF'ler ile trasfekte edilmiştir. "No RNA" ve Ctrl1, Ctrl1 ve Ctrl1 oligoları negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Transfeksiyon sonrası hücreler sayıldıktan sonra 96-kuyucuklu plakalar içerisine eşit yoğunlukta yerleştirilmiştir (0 hr). Bu saatten 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler WST1 rejanıyla 4 saat 25 C'de inkübe edilmiştir. Optik yoğunluk 450 nm'de okunarak hücrelerin proliferasyon oranları belirlenmiştir. 3 replikadan elde edilen standart deviasyon grafikler üzerinde gösterilmiştir. Orta ve Alt Panel, aynı hücrelerde Annexin V boyaması ile akım sitometresinde apoptoz oranları tespit edilmiştir. XXXXX-5', ilgili tRNA'nın 5' ucuna komplementer tRF; XXXXX-3', ilgili tRNA'nın 3' ucuna komplementer RNA (potansiyel negatif kontrol); XXXXX-5'-P, ilgili tRNA'nın 5' ucuna komplementer, ayrıca 5' monofosfat içeren tRF; IntB, internal biyotin işareti; TOG, 5' terminal oligo G içeren oligolar. Orta panelde gösterilen akım sitometri verileri alt panelde grafiksel olarak sunulmuştur.

4.6 tRF'lerin Global ve Reporter mRNA Translasyonuna Etkisi

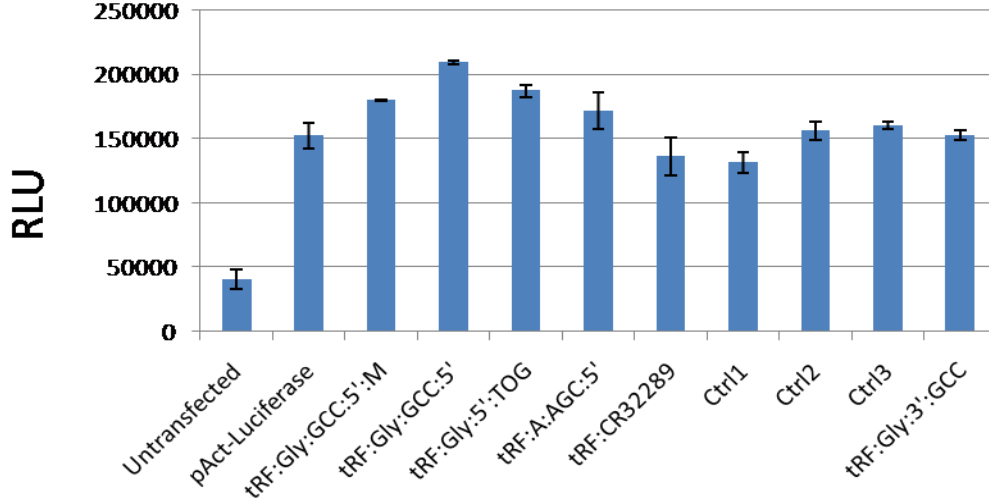
Mevcut proje önerisi yapılmadan önce literatür bilgileri, spesifik olmasada tRF'lerin AGO proteinleriyle etkileştiğini işaret etmektedir. Bu ve diğer bilgilere dayanarak tRF'lerin miRNA'lar gibi veya başka mekanizmalarla translasyonu direkt veya indirekt olarak kontrol edebilecekleri ileri sürülmüştür (Thompson ve Parker, 2009). Yürütülen bu proje kapsamında tRF'lerin hücrenin translasyon kapasitesine etkisini araştırmak için iki yaklaşım kullanılmıştır. İlk yaklaşımda sentetik tRF'ler S2 hücrelerine aktararak tRF'lerin global translasyon kapasitesine olan etkileri incelenmiştir. İkinci yaklaşımda ise, tRF'ler S2 hücrelerine raportör genlerle birlikte transfekte edilerek, tRF'lerin bireysel mRNA'ların translasyonunu baskılama yetenekleri araştırılmıştır.

tRF'lerin global translasyona etkilerini araştırmak için polizom deneyleri kullanılmıştır. Bu bağlamda öncelikle S2 hücreleri ısı şokuna tabi tutularak, stres şartlarında oluşan global translasyon baskılanması pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 18). "No RNA" tRF transfekte edilmeyen kontrol hücreleridir. Kontrol hücrelerde polizom hacminin ve dolayısıyla translasyon kapasitesinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. 1 saatlik ısı şoku uygulamasının beklendiği üzere neredeyse tüm polizom yapılarının kaybolmasına neden olduğu görülmektedir. Test amaçlı kullanılan hiç bir tRF'in polizom hacminde veya ribozom sayısında bir fark yapmadığı görülmektedir.

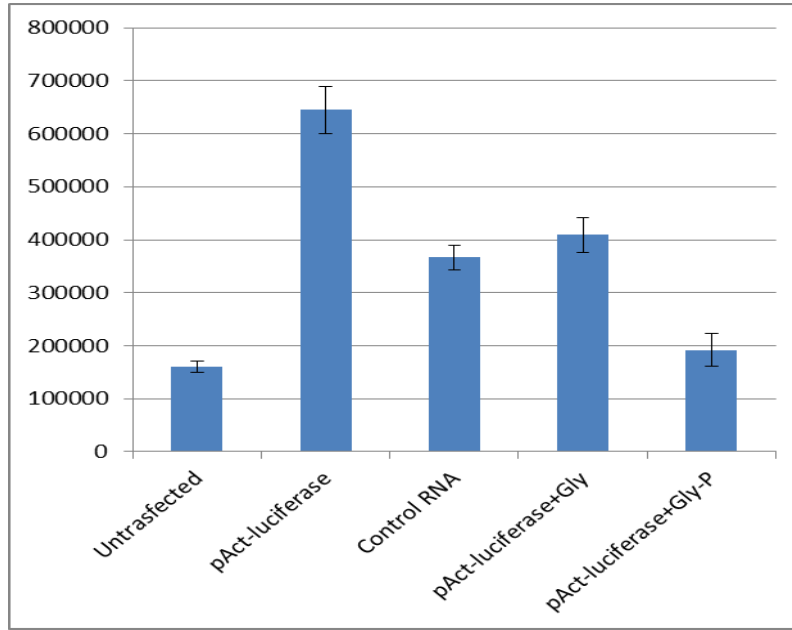
tRF'lerin bireysel gen translasyonuna etkisini incelemek için lusiferaz geni pAct ekspresyon vektörüne klonlanmış ve modifiye olmamış sentetik tRF ve kontrol RNA'larla ayrı ayrı S2 hücrelerine aktarılmıştır. RNA transfekte edilmeyen kontrol hücrelerle karşılaştırıldığında, hiç bir tRF bireysel olarak raportör lusiferaz aktivitesini baskılamamıştır (Şekil 19). Ivanov vd (2011) tarafından yapılan çalışmada 5' fosfatlanmış tRNA yarılarının (stresle tetiklenen ve tRF'lerden uzun olan tRNA fragmanları) fonksiyonel olabileceği bildirildiğinden, raportör genlerin 5' monofosfatlanmış tRF'ler ile baskılanıp baskılanmadığı analiz edilmiştir. Şekil 20'de görüldüğü üzere, kontrol ve modifiye olmamış sentetik tRF'ler ile transfekte edilen S2 hücrelerinde lusiferaz aktivitesi hiç tRF transfekte edilmemiş hücrelere yakın iken, 5' monofosfatlanmış glisin tRF'i ile transfekte edilen hücrelerde raportör aktivitesinde ciddi bir azalma görülmüştür.



Şekil 18. tRF'lerin S2 Hücrelerinde Global Translasyon Üzerine Etkisinin Polizom Profilleriyle İncelenmesi. S2 hücreleri 500 pmol RNA ile transfekte edildikten sonra 24 saat inkübe edilmiştir. 24s sonra, sitoplazmik ekstraktlar %5-70 sukroz gradyanı üzerinde 26,000 g'de 3 saat ultrasantrifüje edilmiştir. Tüplerin üzerinden ISCO fraksinasyon sistemi kullanarak fraksiyonlar toplanırken A_{254} okumaları yapılmıştır. No RNA, tRF içermeyen kontrol S2 hücreleri; tRF^{Gly:GCC:5}, test glisin tRF'i transfekte edilen S2 hücreleri; tRF^{Gly:GCC:5:M}, glisin tRF'inin ortasında bir mutasyon içermektedir; tRF^{Gly:GCC:5:TOG}, glisin tRF'inin 5' ucunda 4 adet G nükleotiti (TOG) içeren tRF'le transfekte edilen S2 hücreleri; Heat Shock, 1 saat 42 °C'de ısı şokuna tabi tutulan S2 hücreleri.



Şekil 19. tRF Aşırı İfadesinin Raportör Lusiferaz Translasyonuna Etkisi. S2 hücreleri 12-kuyucuklu tabaklarda 1×10^6 /mL yoğunlukta büyütülmüştür. Hücreler yayıldıktan 24 saat sonra pAct-Luc (2 ug) ile transfecte edilmiştir. Buna müteakip 24 saat sonra kontrol ve test tRF'leriyle transfeksiyon yapılmıştır. Promega dual luciferase assay kiti kullanılarak lusiferaz aktivitesi VarioScan (Thermo) luminometresiyle ölçülmüştür. Kullanılan tRF'lerin sekansları: tRF:Gly:GCC:5':M- 5' GCATCGGTGGTAAAGTGGTAGAATGC 3'; tRF:Gly:GCC:5':5' GCA UCG GUG GUU CAG UGG UAG AAU GC 3'; tRF:Gly:GCC:5':TOG- 5' GGG GGU GUG GUU CAG UGG UAG AAU GC 3'; tRF:A:AGC:5'-5' GGG GAU GUA GCU CAG AUG GUA GAG C 3'; tRF:CR32289-5' GGG GAU AUA GCU CAG UGG UAG AGC AUU C 3'; Ctrl1- 5' GCA UCG GCG UAG CCA CCA AGU UAG AA 3' Ctrl2- 5' GUU CGA UCG UAG AGU CCA AGU UAC AU 3'; Ctrl3- 5' GCA UUC ACU UGG AUA GUA AAU CCA AG 3'; tRF:Gly:GCC:3'- 5' GGGTTCGATTCCCGGCCGATGCACCA 3'

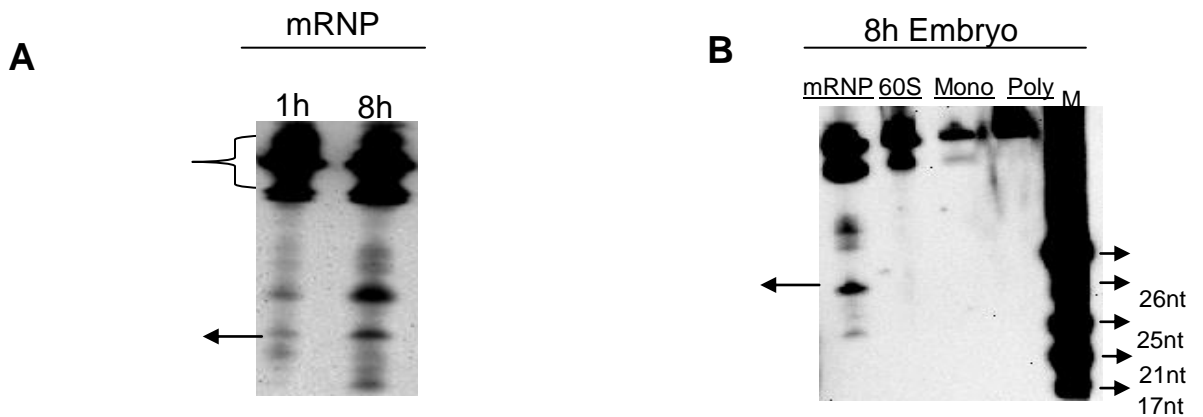


Şekil 20. Modifiye tRF Aşırı İfadesinin Raportör Lusiferaz Translasyonuna Etkisi. S2 hücreleri 12-kuyucuklu tabaklarda 1×10^6 /mL yoğunlukta büyütülmüştür. Hücreler yayıldıktan 24 saat sonra pAct-Luc (2 ug) ile transfecte edilmiştir. Buna müteakip 24 saat sonra kontrol ve test tRF'leriyle transfeksiyon yapılmıştır. Promega dual luciferase assay kiti kullanılarak lusiferaz aktivitesi VarioScan (Thermo) luminometresiyle ölçülmüştür. pAct-luciferase, raportör gen; Control RNA, tRF uzunluğunda karışık sekanslı kontrol RNA; Gly, modifiye edilmemiş glisin tRF; Gly-P, 5' monofosfatlanmış glisin tRF.

4.7 *Drosophila* Embriyolarında tRF'lerin Erken Gelişim Döneminde Ekspresyonu

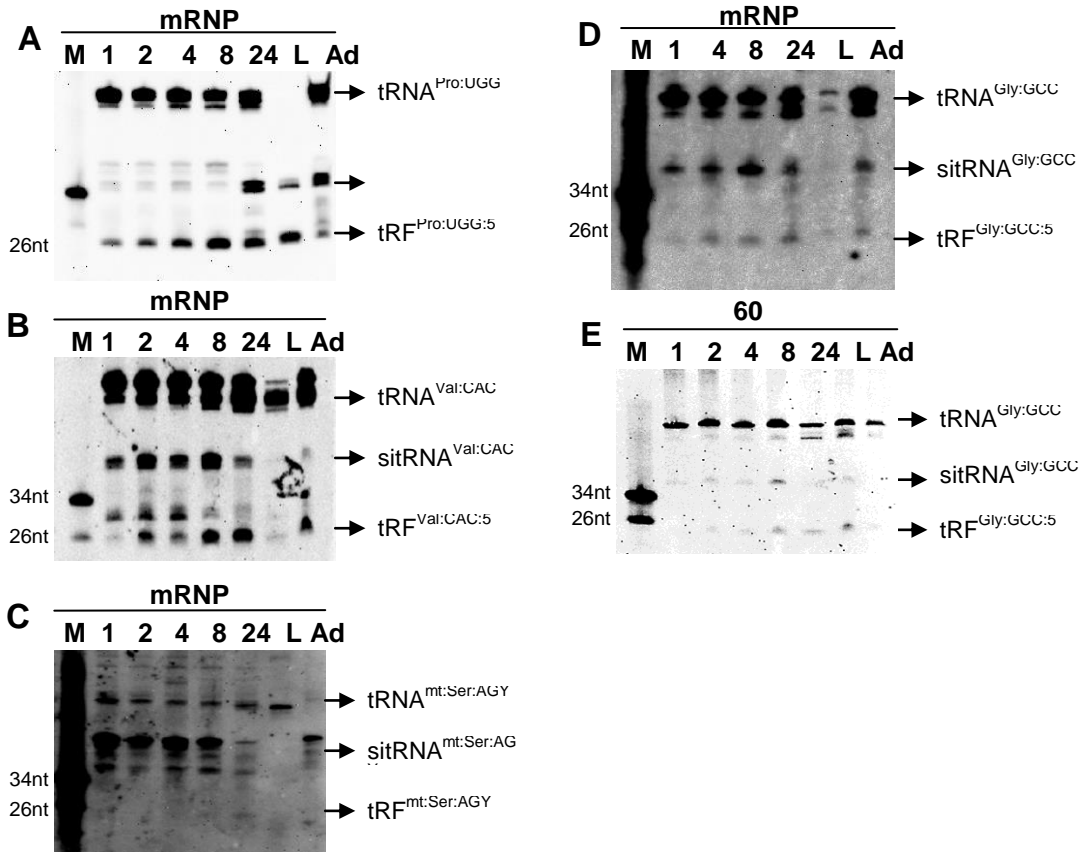
tRF'lerin özellikle kanser hücre hatlarında ifade edildiğine dair bilgiler bulunmasına rağmen, organizma seviyesinde özellikle fizyolojik şartlar altında gelişime bağlı olarak nasıl ifade edildikleri bilinmemektedir. tRF'lerin *Drosophila* embriyonik gelişimi sırasında ifade profilini belirlemek için 0-24 saat arasında değişik gelişim aşamasında bulunan embriyolardan Trizol yöntemiyle toplam RNA izole edildikten sonra glisin tRF'inin ifade miktarı belirlenmek istenmiştir. Ancak, muhtemelen tRF'lerin hücre içi konsantrasyonlarının az olması ve/veya kemiluminesen deteksiyon yönteminin yeterince hassas olmaması nedeniyle toplam RNA'da tRF'ler tespit edilememiştir. Buna alternatif çözüm olarak tRF'lerin hücre fraksiyonasyonu ile belirgin fraksiyonlarda zenginleşeceği hipotezinden yola çıkarak embriyolar polizom analizine tabi tutulmuştur. Şekil 21B'de görüldüğü üzere glisin tRF'inin büyük bir çoğunluğu mRNP fraksiyonunda yer almaktadır. 1 ve 8 saatlik embriyo ekstratlarından elde edilen mRNP fraksiyonlarında glisin tRF miktarı incelendiğinde, 8 saatlik embriyolarda bir artış olduğu görülmektedir (Şekil 21A).

Gelişime bağlı ifade farklılıklarını ortaya koymak için, 1, 2, 4, 8 ve 24 saatlik embriyolarla larva ve ergin sineklerde polizom analizleri yapılarak tRF'ler mRNP fraksiyonlarında zenginleştirilmiştir. Akabinde northern blotlama yapılarak 4 tRF ifade miktarındaki değişimler tespit edilmiştir (Şekil 22, tRF^{Pro:UGG:5}, tRF^{Val:CAC:5}, tRF^{mt:Ser:AGY:5} ve tRF^{Gly:GCC:5}). Northern blotlamada genel anlamda 3 tip sinyal alınmaktadır. Birinci sinyal yaklaşık 70 nt uzunluğundaki ergin tRNA molekülleridir. İkinci sinyal yaklaşık 35-40 nt uzunluğundaki stresle tetiklenen sitRNA fragmanlarıdır (stres-induced tRNA fragmanları). Üçüncü ve en ufak



Şekil 21. Glisin tRF'inin (tRF^{Gly:GCC:5}) *Drosophila* Embriyosunda İfadesi. 1 (1h) ve 8 (8h) saatlik *Drosophila* embriyo ekstratları %5-70'lik sukroz yoğunluk gradyanı üzerinde ultrasantrifüj edilerek moleküler ağırlıklarına göre mRNP, 60S, monozom (Mono) ve polizom (Poly) fraksiyonlarına ayrıştırılmıştır. Fraksiyonlarından fenol ekstraksiyon yöntemiyle RNA izole edilmiştir. %12 denatüre edici poliakrilamid jelde yürütülen örnekler naylon filtrele aktarıldıktan sonra biyotin işaretli antisense glisin tRNA riboprobuyla hibridize edilmiştir. HRP konjuge streptavidin kullanılarak görüntüleme yapılmıştır.

sinyal ise 19-26 nt uzunluğundaki tRF'lere aittir. tRF'lerin genel anlamda 1 saatlik embriyolarda daha az ifade edildiği gözlenmekte olup bu veri derin sekans verisiyle örtüşmektedir. Fragman oluşma paternlerinde genel anlamda benzerlik olmakla birlikte farklı biyogenez paterni gösteren tRF bulunmaktadır. Örneğin, yaklaşık 26-nt uzunluğundaki tRF^{Val:CAC:5'}in yanında 30-nt uzunluğunda ikinci bir tRF üretilmekte ve miktarı gelişime bağlı olarak tRF^{Val:CAC:5'}in tersine azalmaktadır. Mitokondriyel tRNA'lardan göreceli olarak daha fazla sitRNA fragmanları üzerilmektedir (Şekil 22C ile A,B,D karşılaştırması). Buda muhtemelen mitokondri içerisinde daha fazla stres bulunmasından kaynaklanmaktadır.



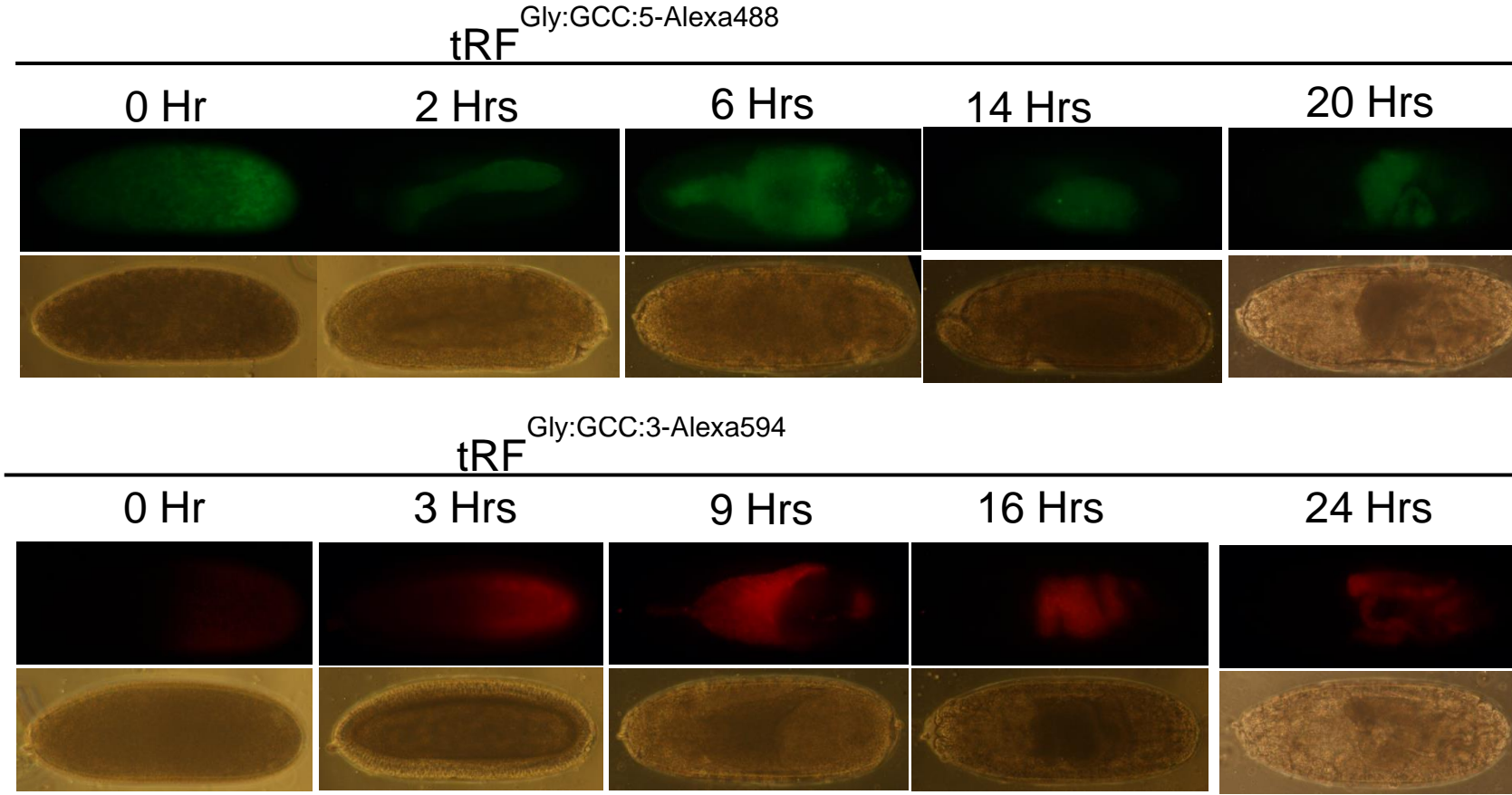
Şekil 22. tRF'lerin *Drosophila* Embriyonik Gelişim Evrelerinde İfadesi. 1,2,4,8,24 saatlik *Drosophila* embriyoları, larvaları (L) ve ergin sinekleri (Ad) %5-70'lik sukroz çözeltisi üzerinde polizom analizine tabi tutulduktan sonra mRNP (Panel A-D) ve 60S (Panel E) fraksiyonlarından fenol ekstraksiyon yöntemiyle toplam RNA izole edilmiştir. İzole edilen RNA'lar %12 denatüre edici poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra naylon filtrelere aktarılmış ve biyotin işaretli antisense tRNA riboprobuyla hibridize edilmiştir. HRP konjuge streptavidin kullanılarak görüntüleme yapılmıştır. Markör RNA boyutları sol tarafta işaretlenmiştir. sitRNA, stresle tetiklenen tRNA fragmanı; tRF, tRNA-kökenli tRNA fragmanı.

miRNA'ların gelişimde spesifik hücrelerde ifade edilmesi nedeniyle embriyoların özel bölgelerine lokalize oldukları bilinmektedir. tRF'lerin gelişime bağlı olarak ifadelerinde farklılıklar olduğu dikkate alındığında, tRF'lerinde embriyoların spesifik bölgelerinde lokalize olmaları beklenebilir. Bu nedenle floresan işaretli tRF'ler embriyolara enjekte edildikten sonra gelişim süresince belirgin noktalara lokalize olup olmadıkları araştırılmıştır. Glisin tRNA'sının 5 ve 3' ucuna denk gelen fragmanlar embriyolara enjekte edildiğinde, her iki fragmanında embriyoların mide (gut) kısmına denk gelen organlarında toplandığı görülmüştür (Şekil 23).

4.8. Mutant Sinek Embriyolarında tRF İfade Miktarının Belirlenmesi

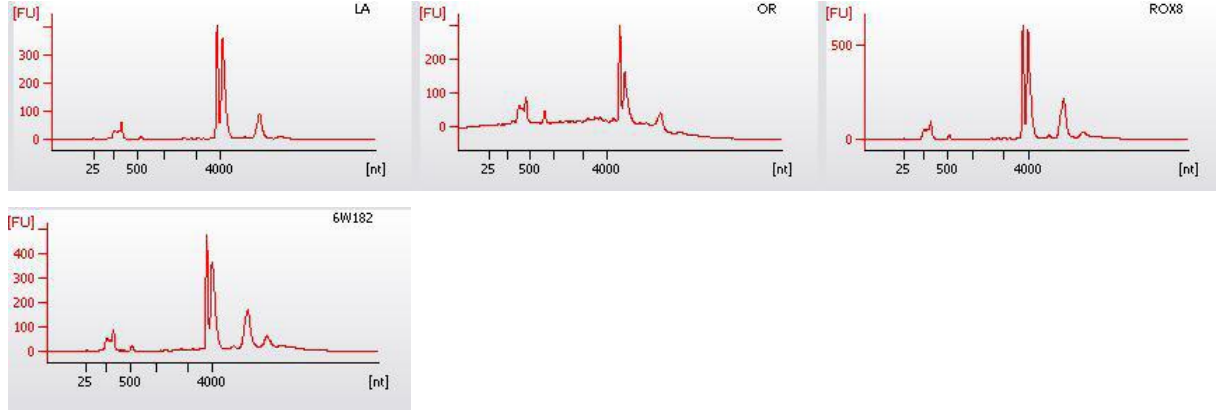
İmmünpresipitasyon ve immünositokimyasal boyamalar dikkate alındığında, tRF'lerin GW182 ve LA proteinleriyle etkileştiğini düşünmekteyiz. Ayrıca Ivanov vd (2011) yayınında bahsedilen ROX8 proteini dikkate alınarak 3 mutant sineklerde derin sekans yapılarak tRNA'lardan kökenlenen fragmanların ifade miktarlarının belirlenmesine karar verilmiştir. OR (P2) sinekleri kontrol olarak kullanılmıştır. Şayet bu proteinler tRF'lerin biyogenezinde, lokalizasyonunda ve/veya fonksiyonunda rol alıyorsa, mutant embriyolarda bazı tRF'lerin klonlanma sıklıklarında değişiklikler öngörülmektedir.

Öncelikle 8 saatlik embriyolardan Trizol yöntemiyle toplam RNA izolasyonu yapılarak Bioanalyzer ile kalite kontrolleri yapılmıştır (Şekil 24). *Drosophila*'da 18 ve 28S rRNA boyutlarının çok yakın olması nedeniyle her ikisi tek bir pik gibi çıkmaktadır. Bu nedenle insan RNA kontrollerinin aksine bir RIN numarası elde edilememektedir. Elektroferogramlardan görüldüğü üzere 18 ve 28S pikleri gayet keskin olup belirgin bir degradasyon veya genomik DNA kontaminasyonu görünmemektedir (Şekil 24A). "TrueSeq" küçük RNA kütüphanesi başarıyla oluşturulmuş olup her 4 örnekte 150 bp civarında cDNA ürünleri görünmektedir. MiSeq kontrol programı ile imajlar intensiteye dönüştürülmüş ve akabinde "real time analysis" ile bazlar tanımlanmıştır. Baz kalite kontrolü sonrası adaptörler kırılmış ve Bowtie2 kullanılarak UCSC/Dm3 *Drosophila melanogaster* genomuna eşleşme yapılmıştır. Her bir örnekte 4 milyon civarı baz okunmuş (Şekil 25A) ve okumaların büyük bir çoğunluğu beklendiği üzere 46-50 bp civarındadır (bu platformda 50 bp okuma yapılmaktadır). Bu verilerde elde edilen derin sekans verisinin ilk kalite kontrol aşamasını başarıyla geçtiğini göstermektedir. Ensemble (2012) ve küçük RNA'lara (miRNA, snoRNA, snRNA ve tRNA) blast sonrası "Deseq" normalizasyon yapılmış ve istatistiksel (multiple testing correction, Benjamini Hochberg FDR, maximum p value cutoff 0.01) olarak farklı ifade edilen küçük RNA'lar belirlenmiştir. *Drosophila* genomuna yapılan eşleme 4 örnekte okumaların büyük bir kısmının genoma eşleştiğini ancak benzer derecede eşleşmeyen okumalarında olduğunu göstermiştir (Şekil 26). Küçük RNA'ların dağılımına bakıldığında ise ROX8 mutant sineklerinde tRNA'dan kökenlenen okuma sayısının diğer örneklere göre daha

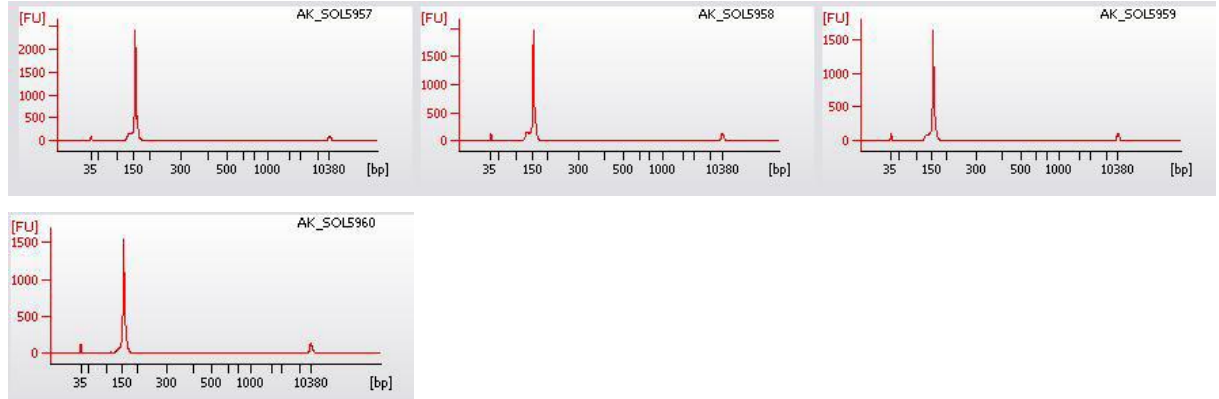


Şekil 23. Floresan işaretli RNA Oligolarının *Drosophila* Embriyolarındaki Konumları. P2 *Drosophila* embriyoları elma suyu içeren agar üzerinde 30 dakika süreyle toplanmıştır. Korion tabakası %50 çamaşır suyu ile 2dk muamele sonrası kaldırılmış ve embriyolar 2-3 dk su ile yıkanmıştır. Agaroz padi üzerinde dizilen embriyolar heptan ile karışık yapıştırıcı ile fikse edilmiş ve kısmen kurutulmuştur. Enjeksiyon posterior kısımdan Narshire enjeksiyon sistemi (IM-9C) kullanılarak yapılmıştır. Enjeksiyon sonrası embriyolar nemli petripler içerisinde 25 derecede muhafaza edilerek büyümelerine devam etmeleri sağlanmıştır. Tüm enjeksiyonlar 300 ng/uL konsantrasyonda yapılmıştır. Fotoğraflar Olympus floresan mikroskopta çekilmiş ve J software ile işlenmiştir.

A



B

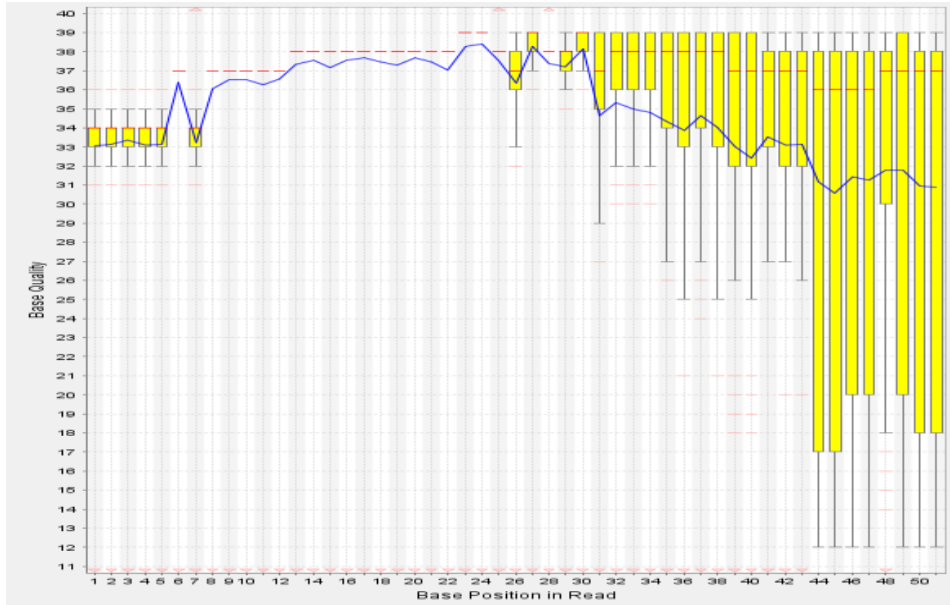


Şekil 24. Mutant Embriyolardan Elde Edilen RNA'ların ve cDNA'ların Kalite Kontrol Analizi. Sekiz saatlik OR, GW182, LA ve ROX8 mutant embriyolardan Trizol yöntemiyle toplam RNA izole edilmiş ve Bioanalyzer ile kalite kontrolüne tabi tutulmuştur (A). Derin sekans analizi için hazırlanan cDNA'lar benzer şekilde Bioanalyzer'da yürütülerek boyutları doğrulanmıştır (B).

A

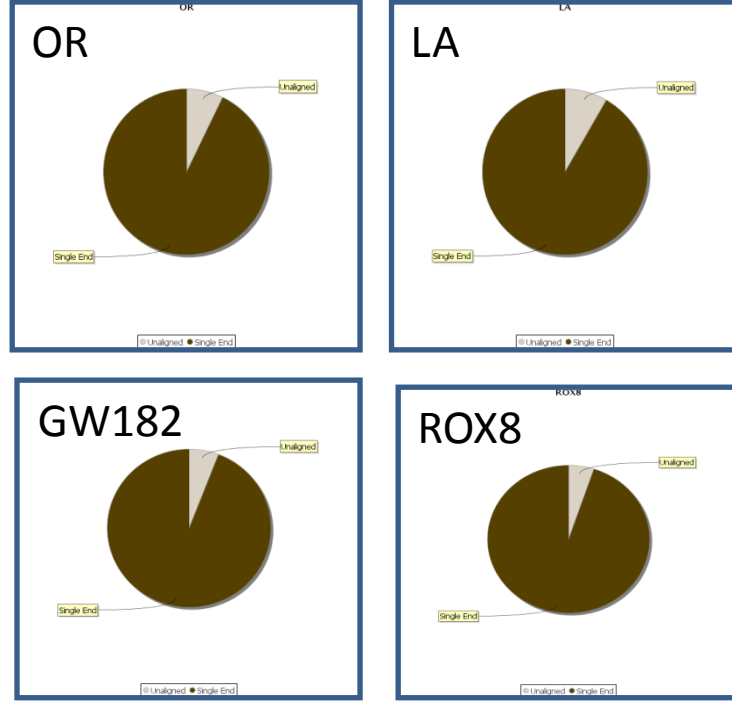
Sample ID	Sample_Name	I7_Index_ID	Index	Number of clusters (PF)	% Cluster (PF)	% Reads Identified (PF)
LA	SOL5957	RPI2	CGATGT	4398426	91.67%	23.95
OR	SOL5958	RPI9	GATCAG	4317981	91.22%	23.52
ROX8	SOL5959	RPI10	TAGCTT	4621467	93.06%	25.17
6W182	SOL5960	RPI11	GGCTAC	3430713	92.86%	18.68

B

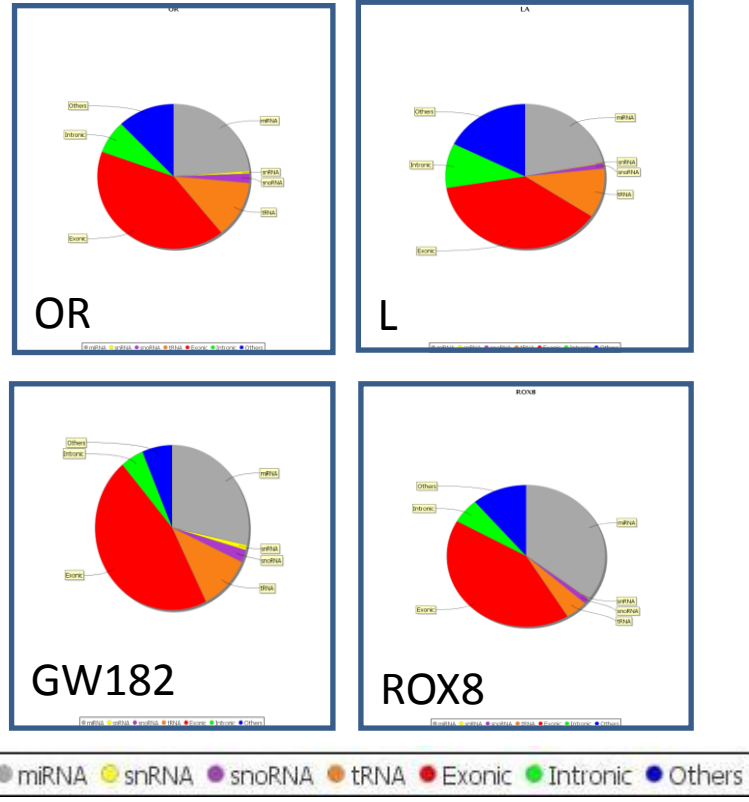


Şekil 25. Derin Sekans Verisinin Kalite Kontrol Analizi. Sekiz saatlik OR, GW182, LA ve ROX8 mutant embriyolardan Trizol yöntemiyle toplam RNA izole edilmiş ve cDNA'ye çevrildikten sonra Illumina platformu (MiSeq) kullanarak derin sekans analizi yapılmıştır. Elde edilen imajlar Miseq Kontrol ve Real Time Analysis programlarıyla sekans verisine dönüştürülmüştür (A). Adaptör kırılması sonrası ve filtreleme sonrası sekansların uzunlukları belirlenmiştir (B).

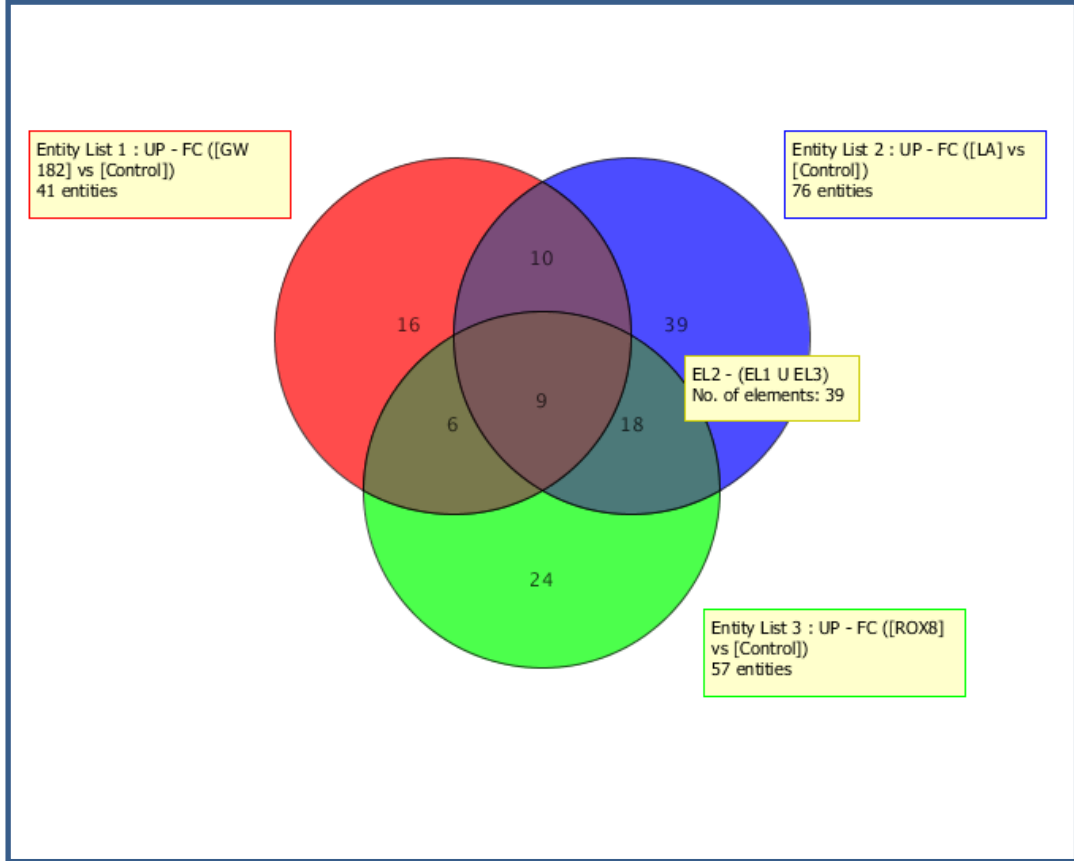
az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 27). tRNA'dan kökenlenen fragmanların ifadelerine bakıldığında, LA mutant sineklerinde diğer mutant sineklere göre bir miktar daha fazla differensiyal fark olduğu görünmektedir (Şekil 28, LA/OR 76 iken diğerlerinde 41 ve 57; Şekil 29, LA/OR 49 iken GW182/OR 38). LA proteininin tRNA biyogenezinde ve özellikle 3' uçlarının stabilitesinde ki önemi dikkate alındığında, bu proteinin tRF biyogenez ve/veya fonksiyonunda görev alması muhtemel görünmektedir.



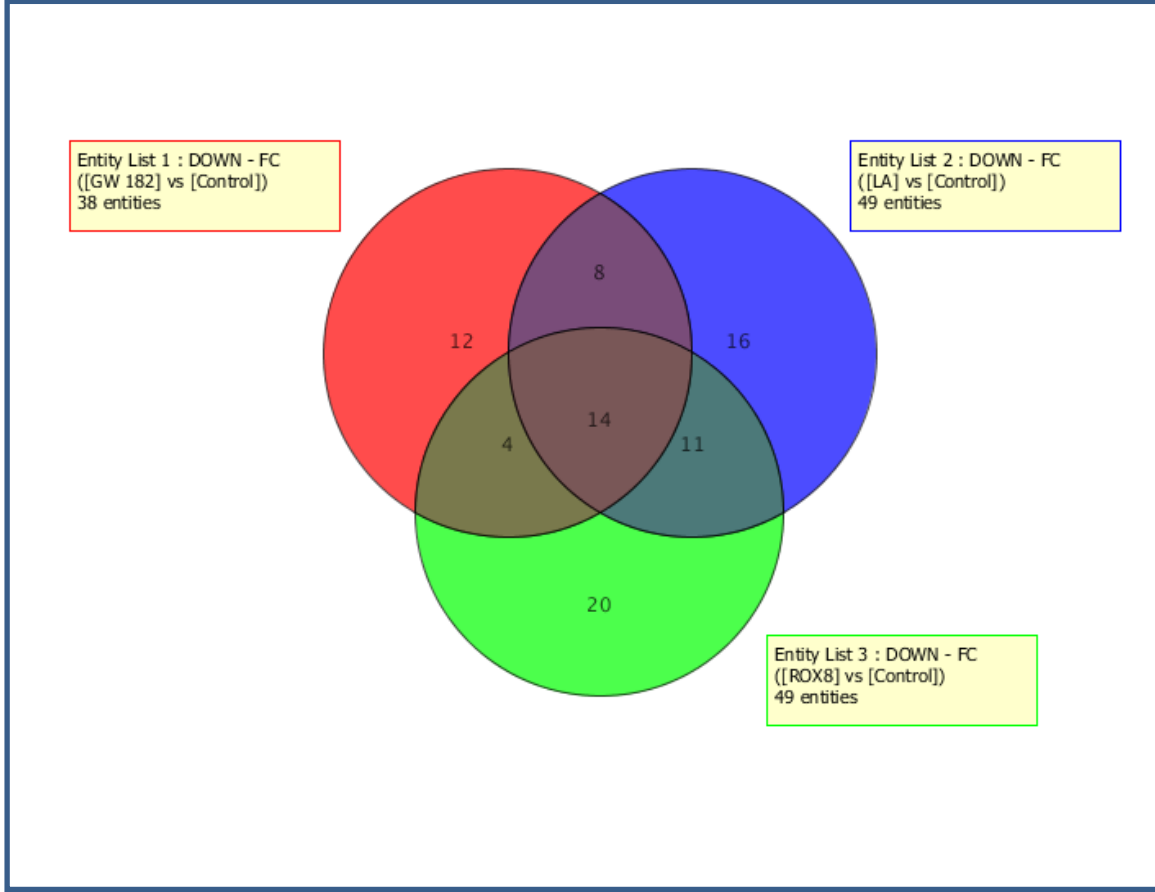
Şekil 26. Derin Sekans Verisinin UCSC/Dm3 Drosophila Genomuna Eşleşmesi. Sekiz saatlik OR, GW182, LA ve ROX8 mutant embriyolardan elde edilen okumalar Bowtie2 kullanılarak Drosophila UCSC/Dm3 genomuna eşleşmiştir. Koyu renk, eşleşen bölgeler; Açık renk, eşleşmeyen bölgeler.



Şekil 27. Mutant Embriyolardan Elde Edilen Okumaların Küçük RNA'lar Göre Oranları. Sekiz saatlik OR, GW182, LA ve ROX8 mutant embriyolardan elde edilen derin sekans verisi ilk kalite kontrolü geçtikten sonra normalize edilmiş ve içerdikleri küçük RNA grubuna göre kategoriz edilmiştir.



Şekil 28. Mutant Embriyolarda tRNA'lardan Kökenlenen Fragman İfadesi. Sekiz saatlik OR, GW182, LA ve ROX8 mutant embriyolarda tRNA'lardan köken alan ve kontrol OR grubuna göre ifadesinde artış olan tRNA fragmanı.



Şekil 29. Mutant Embriyolarda tRNA'lardan Kökenlenen Fragman İfadesi. Sekiz saatlik OR, GW182, LA ve ROX8 mutant embriyolarda tRNA'lardan köken alan ve kontrol OR grubuna göre ifadesinde azalma olan tRNA fragmanı sayıları.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Özellikle transkriptomik çalışmalarındaki hızlı ilerlemeler ökaryotik bir hücrede bulunan RNA çeşitliliğini ve bunların mutemmel fonksiyonunu anlamamıza büyük yardımcı olmaktadır. 15-26 nükleotit uzunluğunda küçük RNA'ları sekanslamaya imkan veren bu teknoloji sayesinde ökaryotik hücrelerde yapısal olarak bilinen mRNA, rRNA, snoRNA ve tRNA'lardan da küçük RNA'ların üretildiği gösterilmiştir. Halen muhtemel parçalanma ürünleri olabileceğine dair tartışmaların devam ettiği tRNA'lardan köken alan fragmanlarla ilgili çalışmalar genellikle hücre hatlarında yapılan çalışmalarla sınırlıdır. Yürütülen bu proje ile organizma seviyesinde gelişime bağlı tRF ifade farklılıkları ortaya çıkarılmış ve bu moleküllerin sitoplazmik konumları ve translasyon ile bağlantıları hakkında önemli veriler toplanmıştır.

tRNA fragmanları ilk olarak *Tetrahymena* ve *Aspergillus*'da tespit edilmiştir (Lee ve Collins, 2005; Jöckle vd., 2008). Daha sonra apoptoz ve oksidatif strese bağlı olarak tRNA'ların yarıya bölünerek tRNA fragmanları oluşturdukları tespit edilmiştir (Thompson ve Parker, 2009; Mei vd., 2010). Dolayısıyla tRNA'dan genellikle stres şartları altında fragman olduğu rapor edilmiş olup bu fragmanların uzunlukları genellikle 35-40 nt arasında değişmektedir. Tarafımızdan tanımlanan tRF'lerin uzunlukları 19-26 nükleotit arasında değişmekte olup stresle tetiklenen tRNA fragmanlarından çok daha küçüktür. Bizim verilerimiz tRF'lerin normal fizyolojik şartlar altında da (örneğin gelişim) ifade edildiğini göstermesi açısından önem arz etmektedir. tRF'lerin gelişim aşamasında farklı ifade edildikleri ve ifade profillerinde bireysel tRF'e göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Genellikle çok erken dönemde (1 saat) kısmen daha az ifade edilen tRF'ler daha sonraki dönemlerde (8 saat) daha fazla ifade edilmektedirler (Şekil 21 ve 22). miRNA'ların embriyo gelişimine göre farklı ifade edildiği ve gelişim aşamasına bağlı olarak farklı embriyonik bölgelerde lokalize olduğu bilinmektedir. Mevcut proje kapsamında yapılan enjeksiyonlarda glisin tRF'inin 5' ve 3' ucundan köken alan her iki fragmanın da embriyonun midgut kısmına gelen bölgesinde yoğunlaştığı tespit edilmiştir (Şekil 23). 3' uçtan kökenlenen fragmanların fonksiyonelliği ile ilgili bir bilgimiz olmadığı için bu gözlemin ne anlama geldiğini henüz tam bilememekteyiz.

tRF'lerin biyogenezi henüz tam bilinmemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda tRF'lerin 5' uçlarının belirlenmesinde RNAz P ve 3' uçlarının belirlenmesinde bir tRNA endonükleaz olan ELAC2 (RNAz Z) enziminin rol oynayabileceğini belirtilmiştir (Lee vd., 2009). Ayrıca miRNA biyogenezinde esansiyel olan Dicer enziminin susturulması tRNA fragman üretimini etkilemekle birlikte tamamen durdurmadığı rapor edilmiştir (Cole vd., 2009). Dolayısıyla tRNA fragman biyogenezi için gerekli enzimler ve biyogenez sırasında oluşan kompleksler tam bilinmemektedir. İlginç bir şekilde bizim embriyolarda tespit ettiğimiz

tRF'lerin %95'7 si tRNA'ların 5' ucundan kökenlenmekte (Şekil 1) ve 3' uçları antikodon halkasının kökündeki 1-3. nükleotitlere denk gelmektedir (Şekil 2). tRF'lerin üretimiyle ilgili en az iki mekanizma mevcuttur. Normalden uzun üretilen fragmanlar (tRNA'nın kendisi veya 35-nt uzunluğundaki stresle tetiklenen tRNA yarıları) 3' uçtan başlayarak kırılabilirler. Alternatif olarak, tam 3' uca denk gelen kısımdan miRNA biyogenezine benzer şekilde endonükleolitik olarak kesilebilirler. Normalde 26 nükleotit olan glisin tRF'inin 3' ucuna 8 nükleotit daha eklenip S2 hücrelerine aktarıldığında herhangi bir kısalma olmaması (Şekil 3), 3' uçtan başlayan bir kırılma (trimming) ihtimalini azaltmaktadır. Ancak biyogenezin moleküler mekanizmasını anlamak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

tRF'lerin moleküler fonksiyonlarına ilgili çalışmaların sayıları oldukça kısıtlıdır. İlk rapor edilen tRF fonksiyonu kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunda görülen bir azalmadır (Lee vd., 2009). Bizim yaptığımız çalışmalarda özellikle 5' ucunda monofosfat içeren glisin tRF'inin S2 hücrelerinde proliferasyonu azalttığını göstermiştir. Ancak yaptığımız araştırmalarda S2 hücrelerinde ki apoptoz oranlarında bir fark tespit edilememiştir. Bu çalışmaların yapılması esnasında karşılaştığımız en önemli zorluk "fonksiyonel" sentetik tRF sekansının (ve tam modifikasyonunun) belirlenmesidir. Bu bağlamda bir dizi 5' ve 3' modifikasyonlar yapılarak bu modifikasyonların fonksiyona yansımaları test edilmiştir. Stresle tetiklenen tRNA fragmanlarına benzer şekilde tRF'lerinde bazı modifikasyona uğrayabileceği tespit edilmiştir. Nitekim, 5' uçta monofosfat olması hem proliferasyon hemde translasyonel raportör gen baskılanmasında farklılık yaratmıştır. Elde ettiğimiz veriler hücre boyutunda hücre proliferasyonunun düzenlenmesi yanında organizmal boyutta gelişiminde düzenlenebileceğine işaret etmektedir.

Stresle tetiklenen tRNA fragmanlarının translasyonun başlangıç aşamasında gen regülasyonunu düzenlediğine dair bilgiler mevcuttur (Ivanov vd., 2011). Özellikle 5' ucu monofosfatlanmış 35-40 nt uzunluğundaki tRNA yarılarının translasyonun başlangıç aşamasını baskıladığı bildirilmiştir. Bizde tRF'lerin translasyondaki muhtemel moleküler fonksiyonlarını incelemek için glisin tRF'ini model olarak kullandık. S2 hücrelerine yapılan transfeksiyonlar sentetik glisin tRF'inin polizom hacmine veya mRNA üzerindeki ribozom sayısına bir etkisinin olmadığını göstermiştir (Şekil 18). Global translasyonel regülasyon genellikle hücrede enfeksiyon, gıda yetersizliği veya stres gibi büyük tehlikeler olduğunda kullanılan bir regülasyon modelidir. Bu bağlamda stres şartlarında oluşturulan tRNA yarılarının translasyon başlangıcını baskılayarak global translasyonu düzenlemesi (Ivanov vd, 2011) anlamlı görünmektedir. tRF'leri global translasyona etkisinin olmaması bir kez daha tRNA yarılarının ve tRF'lerin farkını ortaya çıkarmıştır. Bireysel mRNA translasyona olan etkiyi test etmek için lusiferaz geni raportör gen olarak klonlanmış ve 5' ucu monofosfatlı glisin tRF ile S2 hücrelerine aktarılmıştır. İlginç bir şekilde 5' ucunda bir fosfat grubu taşıyan

tRF raportör aktivitesinde azalmaya neden olurken monofosfatsız tRF'in bir etkisi görülmemektedir (Şekil 19 ve 20). tRF'lerin bu etkiyi nasıl gösterdiklerini anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Gerek endojen tRF'ler gerekse hücrelere sentetik olarak aktarılan tRF'ler oldukça stabil görünmektedirler. Hücreler aktarılan tRF'lerin en az 96 saate kadar hücrelerde kaldığını görmekteyiz (Şekil 3). Tek sarmallı nükleik asitlerin hücre içerisinde hızlı bir şekilde nükleazlar tarafından yıkıldığı dikkate alındığında, tRF'lerin bu kadar stabil kalması oldukça anlamlıdır. Hücreye aktarılan sentetik tRF'ler muhtemelen başka moleküllerle (örneğin RNA'ya bağlanan proteinler) etkileşmektedirler. Bu etkileşim stabilite için önemli olduğu gibi fonksiyon içinde gerekli olabilir. Hücreler veya embriyolar sukroz gradyanı üzerinde fraksiyonların ayrıldığı anda, tRFlerin sitoplazma içerisinde ve özellikle translasyondan uzak mRNP fraksiyonlarında lokalize oldukları görülmektedir (Şekil 21 ve 22). Benzer şekilde S2 hücrelerine aktarılan sentetik tRF'te sitoplazmada bulunmakta ve mRNP fraksiyonunda konumlanmaktadır (Şekil 5). Buda tRF'lerin translasyonel üniteden uzak proteinlerle etkileşebileceğini düşündürmektedir. İmmunositokimyasal ve immunopresipitasyon deneyleri, tRF'lerin GW182, AGO1 ve LA proteinleriyle etkileşebileceğini göstermektedir. GFP ile kimerik olarak ifade edilen GW182 proteininin biyotin işaretli sentetik tRF'ler ile benzer konumlanmalarına rağmen ilgili proteinle konumlanmayan tRF'lerinde olduğu görülmektedir (Şekil 9). Immunopresipitasyon deneyleri tRF'lerin AGO1 proteiniyle etkileşebileceğini göstermektedir. Sadece sentetik tRF değil endojen tRF'lerinde AGO1 antikoruyla çöktürülmesi, bu moleküllerin bir degradasyon ürünü değil, fonksiyonel molekül olabileceğini işaret etmesi açısından anlamlıdır. AGO1'in miRNA ile tetiklenen gen regülasyonuna etkisi detaylı bilinirken, tRF biyogenez veya fonksiyonuna katkısı henüz bilinmemektedir. Biyotin işaretli sentetik tRF'ler S2 hücrelerine aktarılıp streptavidin konjuge boncuklarla çöktürüldüğünde, çöken pelet içerisinde LA proteininin varlığı tespit edilmiştir. LA proteini tRNA'ların 3' uçlarının oluşturulmasında ve stabilitesinde önemlidir. Ancak LA proteininin, tRNA'ların 5' uçlarının oluşturulmasında da rol oynadığı bildirilmektedir (Fan vd., 1998). Dolayısıyla bu proteinin tRF'lere non-spesifik olarak bağlanıp bağlanmadığının araştırılması gerekmektedir. LA mutant embriyolarla yapılan derin sekans analizi, kontrol OR sineklerine göre LA embriyolarında tRNA'dan kökenlenen fragman sayısında anlamlı değişimler olduğunu göstermektedir (Şekil 28 ve 29). Bu değişikliğin LA proteininin tRF biyogenez veya fonksiyonunda rol oynayabileceği anlamına gelip gelmediğini söyleyebilmek için yeni bir dizi deneylerin yapılması gerekmektedir.

Özetle, TÜBİTAK tarafından desteklenen bu proje kapsamında tRNA'lardan kökenlenen fragmanlar (tRF) hakkında önemli veriler toplanmıştır. Daha ziyade tRNA'ların 5' uçlarından üretilen bu moleküller gelişim sırasında tüm tRNA'lardan değil selektif olarak bazı

tRNA'lardan üretilmektedir. Gelişim süresince farklı ifade gösteren tRF'ler larva ve ergin sineklerde de ifade edilmektedirler. Daha ziyade sitoplazmada konumlanan bu moleküller ağırlıklı olarak translasyon açısından inaktif olan mRNP fraksiyonunda yer almakta ve muhtemelen GW182, LA ve AGO1 proteinleriyle etkileşmektedir.

KAYNAKÇA

- Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T., Jewell, D. 2003. "MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. Elegans*", *Curr. Biol.*, 13, 807-818.
- Anderson, P., Kedersha, N. 2009. "RNA granules: post-translational and epigenetic modulators of gene expression", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 430-436.
- Angshuman, S., Cordula, A. 2007. "An approach for immunofluorescence of *Drosophila* S2 cells", *Cold Spring Harbor Protocols*, doi:10.1101.
- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Ionivo, N., et al. 2006. "A novel class of small RNAs bind to MILI protein in Mouse testes", *Nature*, 442, 203-207.
- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., Tuschl, T. 2003. "The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development", *Developmental Cell*, 5, 337-350.
- Aravin, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.V., Vagin, V.V., Rozovsky, Y.M., Gvozdev, V.A. 2002. "Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. Melanogaster* germline", *Current Biology*, 11, 1017-1027.
- Bashkirov, V.I., Scherthan, H., Solinger, J.A., Buerstedde, J.M., Heyer, W.D. 1997. "A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates", *J. Cell Biol.*, 136, 761-773.
- Bass, L.B. 2002. "RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA", *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 817-846.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Start, A., Bork, P., Izaurralde, E. 2006. "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes", *Genes and Development*, 20, 1885-1898.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. 2001. "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference", *Nature*, 409, 363-366.
- Bond, D., Primrose, D.A., Foley, E. 2008. "Quantitative evaluation of signalling events in *Drosophila* S2 cells", *Biol. Proced. Online*, 10, 20-28.
- Brakke, M.K., Daly, J.M. 1965. "Density-gradient centrifugation: Non-ideal sedimentation and the interaction of major and minor components", *Science*, 148, 387-389.
- Bregues, M., Teixeira, D., Parker, R. 2005. "Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies", *Science*, 310, 486-489.
- Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., Hannon, G.J. 2007. "Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*", *Cell*, 128, 1089-1013.
- Carthew, R.W., Sontheimer, E.J. 2009. "Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs", *Cell*, 136, 642-655.

- Ceriani, M.F. 2007. "Basic protocols for *Drosophila* S2 cell line: maintenance and transfection", *Methods Mol. Biol.*, 362, 415-422.
- Chernyakov, I., Whipple, J.M., Kotelawala, L., Grayhack, E.J., Phizicky, E.M. 2008. "Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and 5'→3' exonucleases Rat1 and Xrn1", *Genes & Development*, 15, 1369-1380.
- Coata, T., Scriver, C.R., Childs, B. 1985. "The effect of Mendelian disease on human health; a measurement", *Am. J. Genet.*, 4, 231-242.
- Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S.R., Bowman, A., Brown, J.W.S. et al. 2009. "Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs", *RNA*, 15, 2147-2160.
- Costa, F.F. 2007. "Non-coding RNAs: Lost in translation?", *Gene*, 386, 1-10.
- Czech, B., Malone, C.D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschelegel, J.A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., Brennecke, J. 2008. "An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*", *Nature*, 453, 798-804.
- Dahlberg, J.E., Lund, E., Goodwin, E.B. 2003. "Nuclear translation: what is the evidence?", *RNA*, 9, 1-8.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., Hannon, G.J. 2004. "Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex", *Nature*, 432, 231-235.
- Dubrovsky, E.B., Dubrovskaya, V.A., Levinger, L., Schiffer, S., Marchfelder, A. 2004. "*Drosophila* RNase Z processes mitochondrial and nuclear pre-tRNA 3' ends in vivo", *Nucleic Acids Research*, 32, 255-262.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T. 2001. "RNA interference is mediated by 21- and 23-nucleotide RNAs", *Genes & Dev.*, 15, 188-200.
- Eystahioy, T., Chan, E.K., Tenenbaum, S.A., Kene, J.D., Griffith, K., Fritzler, M.J. 2002. "A phosphorylated cytoplasmic autoantigen GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles", *Mol. Biol. Cell.* 13, 1338-1351.
- Fan, H., Goodier, J.L., Chamberlain, J.R., Engelke, D.R., Marais, R.J. 1998. "5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human Ia antigen phosphoprotein", *Molecular Cell. Biol.*, 6, 3201-3211.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. 1998. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, 391, 806-811.
- Giege, R. 2008. "Toward a more complete view of tRNA biology", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 1007-1014.
- Hamilton, A., Baulcombe, D.C.A. 1999. "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants", *Science*, 286, 950-952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D. 2002. "Two classes of short interfering RNA in RNA silencing", *EMBO J.*, 21, 4671-4679.

- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. 2000. "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells", *Nature*, 404, 293-296.
- Han, J., et al. 2004. "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing", *Genes & Dev.* 18, 3016-3027.
- Hassan, M.Q., Gordon, J.A.R., Lian, J.B., Wijnen, A.J.v., Stein, J.L., Stein, G.S. 2010. "Ribonucleoprotein immunoprecipitation (RNP-IP): A direct in vivo analysis of microRNA-targets", *J. Cellular Biochem.* 110, 817-822.
- Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Dire, A.Z., Kay, M.A. 2010. "Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing", *RNA*, 16, 1-23.
- Hopper, A.K., Shaheen, H.H. 2008. "A decade of surprises for tRNA nuclear-cytoplasmic Dynamics", *Trends Cell Biology*, 18, 98-104.
- Hopper, A.K., Phizicky, E.M. 2003. "tRNA transfers to the limelight", *Genes & Development*, 17, 162-180.
- Houwing, S., Kammings, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., vsn-den Elst, H., et al. 2007. "A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish", *Cell*, 129, 69-82.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I., Preiss, T. 2005. "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function", *PNAS*, 102, 16961-16966.
- Hutvanger, G., LcLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D. 2001. "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA", *Science*, 293, 834-838.
- Iborra, F.J., Jackson, D.A., Cook, P.R. 2001. "Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells", *Science*, 293, 1139-1142.
- Ivanov, P., Emara, M.M., Villen, J., Gygi, S.P., Anderson, P. 2011. "Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation", *Molecular Cell*, 43, 613-623.
- Jöckl, C. vd. 2008. "Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis", *Nucleic Acids Res*, 36, 2677-2689.
- Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada, T.N., Siomi, M.C., Siomi, H. 2008. "*Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells", *Nature*, 453, 793-797.
- Kawaji, H., Nakamura, M., Takahashi, Y., Sandelin, A., Katayama, S., Fukuda, S., Daub, C.O., Kai, C., Kawai, J., Yasuda, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y. 2008. "Hidden layers of human small RNAs", *BMC Genomics*, 9, 157.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D. 2003. "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias", *Cell*, 115, 209-216.
- Knight, S.W., Bass, B.L. 2001. "A role for the RNase III enzyme Dcr-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*", *Science*, 293, 2269-2271.

- Kols, A., Nguyen, T. 1997. "Infertility in developing countries," *PATH*, 15, 1-8.
- Koshkin, A.A., Singh, S.K., Nielsen, P., Rajwanski, V.K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C.E., Wdngel, J. 1998. "LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uraci bicyclonucleoside monomers, oligomerisation and unprecedented nucleic acid recognition", *Tetrahedron*, 54, 3607-3630.
- Kumar M.S., Lu, J., Merver, K.L., Golub, T.R., Jacks, T. 2007. "Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis", *Nat. Genet.* 39, 673-677.
- Lee R.C., Ambryos, V. 2001. "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*", *Science*, 294, 862-864.
- Lee, S.R., Collins, K. 2005. "Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophile*", *J Biol Chem*, 280, 42744-42749.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., Kim, V.N. 2002. "microRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization", *EMBO J.*, 21, 4663-4670.
- Lee, Y., et al. 2003. "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing", *Nature*, 425, 415-419.
- Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A., Dutta, A. 2009. "A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs)", *Genes & Development*, 23, 2639-2649.
- Levitz, R., Chapman, D., Amitsur, M., Green, R., Snyder, L., Kaufmann, G. 1990. "The optional *E. coli* prr locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease", *EMBO J.*, 9, 1383-1389.
- Liao, J.Y., Ma, L.M., Guo, Y.H., Zhang, Y.C., Zhou, H., Shao, P., Chen, Y.Q., Qu, L.H. 2010. "Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers", *PLoS one*, 5, e10563.
- Lynam-Lennon, N., Maher, S.G., Reynolds, J.V. 2009. "The roles of microRNA in cancer and apoptosis", *Biol. Rev.* 84, 55-71.
- Maroney, P.A., Yu Y., Fisher J., Nilsen T. 2006. "Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells", *Nature Structural & Molecular Biology*, 13, 1102-7.
- Marshall, L., Kenneth, N.S., White, R.J. 2008. "Elevated tRNA(iMet) synthesis can drive cell proliferation and oncogenic transformation", *Cell*, 133, 78-89.
- Mckusick, V.A. 1990. "Mendelian inheritance in man: catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes", 9th ed., Baltimore, Johns Hopkins University Press.
- Mei, Y., Yong, J., Liu, H., Shi, Y., Meinkoth, J., Dreyfuss, G., Yang, X. 2010. "tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation", *Molecular Cell*, 37, 668-678.
- Okamura, K., Balla, S., Martin, R., Liu, N., Lai, E.C. 2008. "Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 581-590.

- Okonofua, F.E. 1996. "The case against new reproductive technologies in developing countries," *Brit. J. Obstetrics & Gynecology*, 103, 957-962.
- Olsen, P.H., Ambros, V. 1999. "The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation", *Dev. Biol.*, 243, 215-225.
- Paushkin, S.V. et al. 2004. "Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation", *Cell*, 117, 311-321.
- Phizicky, E.M., Alfonzo, J.D. 2009. "Do all modifications benefit all tRNAs?", *FEBS Letters*, 584, 265-271.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., Filipowicz, W. 2005. "Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells", *Science*, 309, 1573-1576.
- Randau, L., Munch, R., Hohn, M.J., Jahn, D., Soll, D., 2005. "Nanoarchaem equitans creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves", *Nature*, 433, 537-541.
- Roberts, D.B. 1998. "Drosophila: A practical approach (Second Edition)", Oxford.
- Ruby, J.G., Jan, C., Player, C., Axtell, M.J., Lee, W., Nusbaum, C., Ge, H., Bartel, D.P. 2006. "Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*", *Cell*, 127, 1193-1207.
- Schneider, M.D., Najand, N., Chaker, S., Pare, J.M., Haskins, J., Hughes, S.C., Hobman, T.C., Locke, J., Simmonds, A.J. 2006. "Gawky is a component of cytoplasmic mRNA processing bodies required for early Drosophila development", *Journal of Cell Biology*, 174, 349-358.
- Shaheen, H.H., Horetsky, R.L., Kimball, S.R., Murthi, A., Jefferson, L.S., Hopper, A.K. 2007. "Retrograde nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in rat hepatoma cells in response to amino acid deprivation", *PNAS*, 104, 8845-8850.
- Siomi, H., Siomi, M.C. 2009. "On the road to reading the RNA-interference code", *Nature*, 457, 396-404.
- Spath, B., Canino, G., Marchfelder, A. 2007. "tRNAse Z: the end is not in sight", *Cell. Mol. Life Sci.*, 64, 2404-2412.
- Sprinzi, M., Vassilenko, K.S. 2005. "Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes", *Nucleic Acids Research*, 33, D139-D140.
- Stefani, G., Slack, F.J. 2008. "Small non-coding RNAs in animal development", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 219-230.
- Takano, A., Endo, T., Yoshihisa, T. 2005. "tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast", *Science*, 309, 140-142.
- Tautz, D., Pfeiffle, C. 1989. "A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translation control of the segmentation gene hunchback", *Chromosoma*, 98, 81-85.
- Thompson, D.M., Parker, R. 2008. "Stressing out over tRNA cleavage", *Cell*, 138, 215-219.

- Thompson, D.M., Lu, C., Green, P.J., Parker, R. 2008. "tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes", *RNA*, 14, 2095-2113.
- Tu, C.-P.D., Akgul, B. 2005. " *Drosophila* glutathione S-transferases", *Methods Enzymology*, 401, 204-226.
- Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., Zamore, P.D. 2006. "A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline", *Science*, 313, 320-324.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.L., Bartel, D.P., Crete, P. 2004. "Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs", *Mol. Cell*, 16, 69-79.
- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., et al. 2008. "Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in Mouse oocytes", *Nature*, 453, 539-543.
- Wek S.A., Zhu, S., Wek, R.C. 1995. "The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids", *Mol. Cell Biol.*, 15, 4497-44506.
- Wilhelm, E.J. 2005. "Mechanisms of Translational Regulation in *Drosophila*", *Biol. Cell*, 97, 235-252.
- Wu, M.Y.W., Cully, M., Andersen, D., Leever, S.J. 2007. "Insulin delays the progression of *Drosophila* cells through G2/M by activating the dTOR/dRaptor complex", *EMBO J.*, 26, 371-379
- Xiao, C., Rajewsky, K. 2009. "MicroRNA control in the immune system; Basic principles", *Cell*, 136, 27-36.
- Yang, N., Kazazian, H.H.J. 2007. "L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 763-771.
- Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N., Endo, T. 2003. "Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria", *Mol. Biol. Cell*, 14, 3266-3279.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P. 2000. "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals", *Cell*, 101, 25-33.