

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI



**KIL, TİFTİK, HONAMLI VE KİLİS KEÇİ IRKLARINDA
MİYOJENİK FAKTÖR 5 VE 6 GENLERİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Büşra BAYRAK

Danışman

Doç. Dr. Uğur ŞEN

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.ZRT.1904.21.017 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Büşra BAYRAK tarafından, **Doç. Dr. Uğur ŞEN** danışmanlığında hazırlanan **“KIL, TİFTİK, HONAMLI VE KİLİS KEÇİ IRKLARINDA MİYOJENİK FAKTÖR 5 VE 6 GENLERİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ”** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 3.3.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Mehmet KURAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Uğur ŞEN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Emre ŞİRİN Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

03/03/2023
Büşra BAYRAK

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : MİYOJENİK FAKTÖR 5 VE 6 GENLERİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN KIL, TİFTİK, HONAMLI VE KİLİS KEÇİ IRKLARINDA BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 25/01/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 24

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

03/03/2023
Doç. Dr. Uğur ŞEN

ÖZET

KIL, TİFTİK, HONAMLI VE KİLİS KEÇİ IRKLARINDA MİYOJENİK FAKTÖR 5 VE 6 GENLERİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Büşra BAYRAK
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji
Yüksek Lisans, Mart/2023
Danışman: Doç. Dr. Uğur ŞEN

Miyojenik düzenleyici faktörler ailesinden olan miyojenik faktör 5 (Myf5) ve miyojenik faktör 6 (Myf6) genleri, iskelet kası miyogenezinin ana düzenleyicisi olarak görev yapmakta olup kas lifi gelişimini ve farklılaşmasını düzenleyen genler arasında yer almaktadır. Dolayısıyla bu çalışmanın amacı, 90 günlük süttan kesim yaşındaki Honamlı (n=6), Kıl (n=6), Kilis (n=6) ve Tiftik (n=6) oğlaklarının longissimus dorsi (LD) ve semitendinosus (ST) iskelet kaslarındaki Myf5 ve Myf6 genlerinin ekspresyon seviyesinin belirlenmesidir. Kas örneklerinden DNA ve RNA ticari saflaştırma kiti ile izole edilmiştir. DNA ve RNA'nın saflığı ve miktarı NanoDrop™ 2000/2000c spektrofotometre kullanılarak ölçüldü ve kalitesi %1'lik agaroz jel ile kontrol edilmiştir. RNA, Thermal Cycler cihazında ticari cDNA kiti kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. LD ve ST iskelet kaslarındaki Myf5 ve Myf6 gen ekspresyon seviyesi, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlendi. LD ve ST kaslarında toplam DNA ve RNA miktarının Honamlı ırkı oğlaklarda en yüksek ($P < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. LD kasında Honamlı oğlakları daha fazla ($P < 0.05$) Myf5 gen ifade düzeyine ($159,8 \pm 14,6$ kat değişim) sahipken, Kıl oğlakları en düşük ($P < 0.05$) Myf5 gen düzeyine ($42,0 \pm 14,9$ kat değişim) sahipti. Benzer şekilde ST kasında Myf 5 geninin ekspresyon seviyeleri Kıl oğlaklarında ($57,2 \pm 6,6$ kat değişim), Tiftik oğlakları hariç, Honamlı ($98,4 \pm 9,2$ kat değişim) ve Kilis ırkına ($80,7 \pm 6,8$ kat değişim) göre daha düşük ($P < 0.05$) gen ekspresyon seviyesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Çalışmada LD kasında Myf 6 geninin ekspresyon seviyesi Kilis oğlaklarında ($12,0 \pm 2,9$ kat değişim), Honamlı ($44,5 \pm 11,3$ kat değişim), Kıl ($34,2 \pm 7,5$ kat değişim) ve Tiftik ($39,8 \pm 10,1$ kat değişim) oğlaklarına göre daha düşük ($P < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada ST kasında Myf 6 geninin ekspresyon seviyesi bakımında ırklar arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar olup, en yüksek ($P < 0.05$) Myf 6 gen ekspresyon seviyesi Honamlı ve Tiftik oğlaklarında, en düşük ($P < 0.05$) gen ekspresyon seviyesi ise Kıl ve Kilis oğlaklarında tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, Honamlı oğlaklarının Myf5 ve Myf6 gen ekspresyon seviyesinin daha yüksek olması nedeniyle daha yüksek kas büyümesine sahip olabileceğini ve bu ırkın daha verimli bir besi uygulaması için önerilebileceğini göstermiştir. Ayrıca, Kilis oğlak ırklarının Myf6 gen ekspresyon seviyelerinin düşük olması nedeniyle daha düşük kas büyümesine sahip olabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak, Türk yerli keçi ırklarının Myf5 ve Myf6 gen ekspresyon seviyelerine sahip olduğu ve bu farklılıkların besi uygulamaları için daha verimli ırklar seçmek için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Yerli ırklar, MDF gen ailesi, İskelet kası, Et üretimi, Oğlak

ABSTRACT

DETERMINATION OF EXPRESSION LEVELS OF MYOGENIC FACTOR 5 AND 6 GENES IN HAIR, ANGORA, HONAMLI AND KILIS GOAT BREEDS

Büşra BAYRAK

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Agricultural Biotechnology

Master, March/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Uğur ŞEN

Myogenic factor 5 (Myf5) and myogenic factor 6 (Myf6) genes, which are member of myogenic regulatory factors family, serve as the main regulators of skeletal muscle myogenesis and these genes that regulate muscle fiber development and differentiation. Therefore, the aim of this study was to investigate the expression level of Myf5 and Myf6 genes in longissimus dorsi (LD) and semitendinosus (ST) skeletal muscles of 90-day weaning age Honamli (n=6), Hair (n=6), Kilis (n=6) and Angora (n=6) kids. DNA and RNA were isolated from muscle samples with a commercial purification kit. The purity and amount of DNA and RNA was measured using the NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer and the quality was checked with a 1% agarose gel. RNA was converted to cDNA using a commercial cDNA kit in a Thermal Cycler device. The Myf5 and Myf6 gene expression level in LD and ST skeletal muscles was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. Total DNA and RNA amount in LD and ST muscles were found to be highest ($P < 0.05$) in Honamli kids. Honamli kids had higher ($P < 0.05$) Myf5 gene expression level (159.8 ± 14.6 fold change) in LD muscle, while Hair kids had the lowest ($P < 0.05$) Myf5 gene level (42.0 ± 14.9 fold change) in LD muscle. Similarly, expression levels of Myf 5 gene in ST muscle were lower ($P < 0.05$) in Hair kids (57.2 ± 6.6 fold), except for Angora, than those of Honamli (98.4 ± 9.2 fold change) and Kilis breeds (80.7 ± 6.8 fold change). In the study, the expression level of Myf 6 gene in LD muscle of Kilis kids (12.0 ± 2.9 fold change) were found lower ($P < 0.05$) compared to Honamli (44.5 ± 11.3 fold), Hair (34.2 ± 7.5 fold change) and Angora (39.8 ± 10.1 fold change) kids. In the study, there were statistically significant differences between breed in terms of the expression level of Myf 6 gene in ST muscle, the highest ($P < 0.05$) Myf 6 gene expression levels were found in Honamli and Angora kids, and the lowest ($P < 0.05$) gene expression levels were found in Hair and Kilis kids. The results of this study showed that Honamli kids can have higher muscle growth due to higher Myf5 and Myf6 genes expression level and this breed can be recommended for a more efficient fattening application. It also showed that Kilis kid breeds may have lower muscle growth due to low Myf6 gene expression levels. As a result, it was concluded that Turkish domestic goat breeds have Myf5 and Myf6 gene expression levels and these differences can be used to select more productive breeds for fattening practices.

Keywords: Native breeds, MDF gene family, Skeletal muscle, Meat production, Kid

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak yapılmıştır. " Kıl, Tiftik, Honamlı ve Kilis keçi ırklarında miyojenik faktör 5 ve 6 genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi" adlı tez çalışmamın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen, çalışmalarım süresince gerekli her türlü ortamı yaratan ve önemli fikirleriyle akademik anlamda gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Uğur ŞEN'e, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı olan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne çalışma materyalinin sağlanmasındaki desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmanın uygulama sürecinde desteğini ve yardımını esirgemeyen Yüksek Ziraat Müh. Dilek Niyan GÖKÇEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde beni destekleyen başta annem Hatun BAYRAK' a, babam Mustafa BAYRAK'a, ablam Kübranur GÖNEN'e ve son olarak çalışmamda bana destek ve yardımlarını esirgemeyen Ali GÜL'e minnet ve teşekkürlerimi sunar bu tez çalışmasının ülkeme bilimsel anlamda yararlı olmasını temenni ederim.

Büşra BAYRAK

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Türkiyede’ki Keçi Irkları	5
2.1.1. Kıl Keçisi	5
2.1.2. Tiftik Keçisi	6
2.1.3. Honamlı Keçisi	7
2.1.4. Kilis Keçisi	8
2.2. İskelet Kas Gelişimi Üzerine Etkili olan Faktörler	8
2.3. Amaç	9
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Çalışma Materyali	11
3.2. Kas Örneklerinde RNA İzolasyonu	11
3.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	16
3.4. Real time PCR	18
3.5. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini	20
3.6. İstatiksel Analiz	21
4. BULGULAR	22
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ	31
KAYNAKÇA	32
ÖZGEÇMİŞ	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

%	: Yüzde
<	: Küçüktür
µL	: Mikrolitre
g / mg / kg	: Gram, Miligram, Kilogram
L, ml	: Litre, Mililitre
mm	: Milimetre
ng/ml	: Nanogram/Mililitre
°C	: Santrigrat Derece
kb	: Kilobayt
dk	: Dakika
nm	: Nanometre
sn	: Saniye

KISALTMALAR

bHLH	: Temel Helix–Loop–Helix
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
GAPDH	: Sodyum Absorpsiyon Oranı
LD	: Longissimus Dorsi
MDF	: Miyojenik Düzenleyici Faktörler
MEF2s	: Miyosit Güçlendirici Faktörler
MSTN	: Myostatin Geni
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAW	: Yıkama Tamponu
RNA	: Ribonükleik Asid
ST	: Semitendinosus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kıl Keçisi	6
Şekil 2. 2. Tiftik Keçisi	7
Şekil 2. 3. Honamlı Keçisi	7
Şekil 2. 4. Kilis Keçisi	8
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan kas örnekleri	11
Şekil 3.2. Kas Örneklerinin havanda parçalanması	11
Şekil 3.3. Kas örneklerine trizol eklenmesi	12
Şekil 3.4. Kas örneklerinin santrifüj edilmesi	12
Şekil 3.5. Solüsyona kloroform eklenmesi	13
Şekil 3.6. Solüsyona etanol eklenmesi	13
Şekil 3.7. Örneklerle yıkama tamponu-1 (RAW1) eklenmesi	14
Şekil 3.8. Örneklerle yıkama tamponu-2 (RAW2) eklenmesi	14
Şekil 3.9. Örneklerle RNAase free su eklenmesi.....	15
Şekil 3.10. RNA miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ve örneklerin % 1,5'lik agaroz jelde yürütülmesi.....	15
Şekil 3.11. Örneklerin % 1'lik agaroz jel'de RNA görüntüsü	15
Şekil 3.12. Tamamlayıcı DNA çalışması	16
Şekil 3.13. Primer baz dizilerinin seyreltilmesi.....	18
Şekil 3.14. Universal SYBR Green Supermix ilavesi.....	18
Şekil 3.15. Real- Time PCR analizi	19
Şekil 3.16. DNA miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ve örneklerin agaroz 1,5'lik agaroz jelde yürütülmesi.....	21
Şekil 3.17. %1 lik Agaroz jelde DNA görüntüsü	21
Şekil 4. 1. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Longissimus-dorsi iskelet kasında miyojenik faktör 5 (Myf 5) geninin ekspresyon seviyeleri.....	23
Şekil 4. 2. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Semitendinosus iskelet kasında miyojenik faktör 5 (Myf 5) geninin ekspresyon seviyeleri.....	24
Şekil 4. 3. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Longissimus-dorsi iskelet kasında miyojenik faktör 6 (Myf6) geninin ekspresyon seviyeleri.....	25
Şekil 4. 4. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Semitendinosus iskelet kasında miyojenik faktör 6 (Myf 6) geninin ekspresyon seviyeleri.....	26

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Kas örnekleri için RNA ve Nükleaz içermeyen su miktarları.....	17
Tablo 3.2. Real-Time PCR’da kullanılan primer baz dizileri	19
Tablo 3.3. Real-Time PCR protokolü.....	20
Tablo 4.1. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarına ait Longissimus-dorsi (LD) ve Semitendinosus (ST) kaslarındaki toplam DNA ve RNA miktarları ve RNA-DNA oranı	22



1. GİRİŞ

İnsanoğlunun yaşam seviyesinin artırılması için mevcut kaynakların tamamından etkili ve verimli olarak faydalanmak mümkündür. Bu işlemi yaparken mevcut ekosistemi korumak, sürdürülebilir ekonomik kalkınma ve sürdürülebilir çevre yönetimi bir zorunluluktur. Korunması gereken ekosistem içerisindeki türlerden birisi de şüphesiz keçidir. Ülkemiz, dünyada nüfusu hızla artış gösteren ülkeler arasında yer almaktadır. Nüfusumuz süratli bir şekilde artış gösterirken önemli hayvansal protein kaynaklarımızdan olan keçi varlığımız ise son 33 yılda ekonomik sebeplerden dolayı % 48 civarında bir azalış göstermiştir (Everest ve Tan, 2019). Bu durum ülkemiz nüfusunun hayvansal protein talebini karşılayabilmek için birim hayvan başına elde edilen et miktarının artırılmasını zorunlu hale getirmektedir. Bu açıdan bakıldığında ülkemizdeki kırmızı et talebinin karşılanmasında keçi etinin büyük bir öneme sahip olduğu görülmektedir. Bir başka ifade ile insanlar biyolojik ihtiyaçlarını karşılamak ve yaşamsal faaliyetlerini sürdürmek için besin tüketmek zorundadırlar. Bu nedenle gıda tüketimi insanların en temel ihtiyaçlarından biridir. Bireylerin tükettiği gıdaların tüketim yeterliliği kadar çeşitlilik ve gerekli tüketim miktarı da son derecede önemlidir (Aydogdu and Kucuk, 2018). Dünyada ve Türkiye'de yükselen nüfusa bağlı olarak besin tüketimi de artmaktadır. Bu durum besinler üzerinde miktar, kalite ve yeterlilik yönünden baskı oluşturmaktadır. Günümüzde dünya nüfusunun yükselmesi sebebiyle beslenme ve gıda sorunu da giderek artmaktadır. Toplumun sağlıklı beslenmesinde etin, özellikle gelişme çağına olan bireyler için toplam et tüketiminde kırmızı etin yeri hayli önemlidir. Genel olarak artan nüfusun kırmızı et ihtiyacının karşılanması ve insanların yeterli derecede ve dengeli beslenmeleri için hali hazırda çiftlik hayvanları kaynaklarının daha verimli kullanılması gerekmekte ve gelecekte sürü yönetimine ilişkin etkin bilgi ile birlikte yeni teknik ve yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Braun et al., 1989).

Hayvan başına elde edilen et miktarı artırılırken aynı doğrultuda et kalitesinin artırılmasına ve geliştirilmesine de itina gösterilmelidir. Bu sayede insanların hayvansal protein gereksinimi karşılanırken aynı zamanda kaliteli hayvansal protein tüketmelerine de imkan sağlanacaktır. Proteinler vücutta depolanamayan ve dışarıdan alınması gereken besinlerdir. Sağlıklı ve dengeli beslenme için günlük alınması gereken proteinlerin en az yarısının veya 2/3'ünün hayvansal kaynaklı besinlerden olması gerekmektedir. Bu sebeple beslenme, toplumun tüm katılımcılarını ilgilendiren

bir konudur (Aydogdu and Kucuk, 2018). Türkiye'nin önemli kırmızı et üretim kaynaklarından biri de keçi ve oğlak etidir. Kıl, Tiftik, Honamlı ve Kilis'in yerli gen kaynakları Türkiye'deki mevcut keçi varlığının yaklaşık %92'sini oluştururken, diğer yerli ve kültürel ırkların payı oldukça azdır (Yilmaz et al., 2012). Bu sebeple Kıl, Tiftik, Honamlı ve Kilis yerli keçi ırkları ülkemizde en önemli ve en fazla yetiştirilen keçi ırklarıdır. Türkiye'de keçi yetiştiriciliği tamamen mera koşullarına dayalı yaygın yetiştirme sistemine göre yapılmakta, ek yemlik otlatma alanlarının kullanılmadığı durumlarda çok az (genellikle buğday samanı) yapılmakta, kesif yem hemen hemen hiç verilmemektedir (Daskiran and Koluman, 2014; Yilmaz et al., 2012). Ayrıca ülkemizde keçi yetiştiriciliğinde et üretimine özel (besleme materyali seçimi) herhangi bir ıslah uygulaması yapılmamakta veya kısıtlı düzeyde kalmaktadır. Bu sebeple yerli keçi ırklarımızın et üretiminde kullanılacak hayvanların kapalı besi (yoğun yetiştirme) potansiyeli hakkında çok kısıtlı bilgi bulunmaktadır.

Miyojenik düzenleyici faktörler (MDF) iskelet kası miyogenezinin ana düzenleyicileri olarak görev yaparak, kodlanmış genlerinin ekspresyonu ile iskelet kası öncü hücrelerinin gelişimini ve sonraki kas lifi farklılaşmasını ve gelişimi düzenlemektedir (Zhong et al., 2013). MDF'lerin kas liflerinin oluşması, gelişimi ve çoğalması sürecindeki aşamalardan doğum sonrası (postnatal) kas olgunlaşması, farklılaşması ve fonksiyonlarına kadar miyojenezi düzenledikleri bilinmektedir (Patel et al., 2014; Siqin et al., 2017; Zhong et al., 2013). MDF gen ailesi dört korunmuş temel helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon faktörü olan miyojenik faktör 5 (Myf5), miyojenik faktör 6 (Myf6), miyojenik farklılaşma faktörü (MyoD) ve myogenin (MyoG) den oluşmaktadır (Zhong et al., 2013). MDF'ler doğum sonrası dönemde büyüme, gelişme, et verimi vb. gibi ekonomik özellikler ile ilişkilendirilmiş birçok farklı genin (büyüme hormonu ve reseptörü, miyostatin; MSTN, miyosin ağır zincir; MyHC izoformları) ekspresyonunun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Huang et al., 2016; Polin and Abman, 2011). MDF ailesinden olan Myf5 ve Myf6 genleri kas hücrelerinin gelişimi ve farklılaşmasını sağlayan genler arasında olup iskelet kas dokusunun oluşumundaki ana düzenleyicilerdendir. İskelet kaslarındaki, DNA ve RNA içeriği ve RNA/DNA oranları gibi hücresel gelişim özellikleri büyüme ile doğrudan ilişkilidir. Dolayısıyla kas dokusunda DNA ve RNA'nın kantitatif analizi, çiftlik hayvanlarının büyüme ve gelişim potansiyelini tahmin etmek için iyi bir yol sağlamaktadır (Greenwood et al., 2006). Ayrıca, kas dokusunun sahip olduğu hücresel

özellikler, kas dokusundaki kas lifi sayısının, kas lifinin boyutunun, kas liflerinin transkripsiyonel ve translasyonel kapasitelerinin tahmin edilmesi için de önemli bir işaret olarak kullanılabilir (Greenwood et al., 2006; Kuran et al., 2012; Sen et al., 2015). MDF ailesine bağlı genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi iskelet kas kütlesini oluşturan kas liflerinin gelişim potansiyelinin ve besiye alınacak hayvanın potansiyel besi performansının belirlenmesine olanak tanıyabilmektedir.

Çiftlik hayvanlarında yapılacak gen ekspresyon analizleri ile besiye alınacak hayvanların iskelet kası gelişim profilleri (kas lifi çeşiti, çapı, kas içi yağ oranı) değiştirilerek, daha fazla miktarda et üretimi için yemden yararlanma oranı etkilenebilir ya da hayvanlardan daha düşük miktarlarda yem ile daha fazla miktarda et üretimi gerçekleştirilebilir. Ayrıca, kırmızı et üretiminde kullanılacak hayvan türlerinin ve ırkların iskelet kas dokusundaki hücresel ya da moleküler özelliklerin belirlenmesi besiye alınan hayvanların et üretim potansiyellerinin önceden belirlenmesi, et üretiminin artırılması, üretim maliyetlerinin azaltılması ve et fiyatının azaltılması yönünden büyük önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalarda sığır (Barth et al., 1993), koyun ve domuz (Soumillion et al., 1997), gibi çeşitli çiftlik hayvanı türlerinde MDF gen ailesi üyelerinin gelişim ve büyüme sürecindeki gen ekspresyon eğilimlerinin belirlenip tanımlanmasının yanı sıra kaslara özgü ekspresyon düzenlemeleri de tanımlanmış ve değerlendirilmiştir.

MDF gen ailesinin, domuzlarda kas içi yağ seviyesi ve büyüme hızı gibi ekonomik özelliklerle de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Verner et al., 2007). Dahası, Myf5 geninin polimorfizmlerinin koyunlarda (Nattrass et al., 2006), domuzlarda (Liu et al., 2008) ve sığırlarda (Robakowska-Hyżorek et al., 2010) büyüme ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. İskelet kas kütlesi omurgalı hayvanların büyüme süreci ile ilişkili en önemli dokular arasında yer almaktadır.

Sonuç olarak yapılan araştırmalarda MDF gen ailesinin fetal ve postnatal dönemde iskelet kası gelişimi ve hatta çiftlik hayvanlarında gelişim ve büyüme süreci üzerinde önemli etkilerinin olduğu, MDF gen ailesinin et verimi üzerinde etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Kıl, Tiftik, Honamlı ve Kilis keçi ırklarının büyüme, et verimi ve besi performansının belirlenmesine yönelik çalışmalar bu ırkların farklı fenotipik değerlere sahip olduğunu gösterse de, bu farklılığın temel mekanizması ortaya çıkmamış, irksal özelliklere yada çevresel faktörlere dayanmaktadır. Bu sebeple ülkemizde önemli bir kırmızı et kaynağı olan yerli keçi ırklarımızda iskelet kası

gelişimi üzerinde etkili olan MDF gen ailesinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi, yerli keçi ırklarımızın et üretim potansiyelinin daha açıklayıcı ve artan et veriminin net olarak belirlenmesi konusunda önemli bilgiler sağlayabilir. Ayrıca yerli keçi ırklarımızda kas lifi gelişiminden sorumlu gen ailelerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinin ilk defa yapılacak olması bu alanda olan bir eksikliğin giderilmesinin önünü açmakla birlikte yerli ırkların et üretim potansiyellerinin belirlenmesi bakımından hayvancılığın gelişmiş olduğu ülkelerle rekabetin sağlanmasına da katkı sağlayabilecektir.

Tüm bu gerçeklerden dolayı, mevcut çalışmada Türkiye'nin yerli keçi gen kaynaklarından olan ve keçi varlığının büyük bir kısmını oluşturan Kıl, Tiftik, Honamlı ve Kilis ırklarına ait 90 günlük süttten kesim yaşındaki oğlakların LD ve ST iskelet kaslarındaki miyojenik düzenleyici faktörlerden olan Myf5 ve Myf6 genlerine ait ekspresyon seviyelerinin ve hücrel özelliklerin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Türkiye’deki Keçi Irkları

Diğer çiftlik hayvanlarında olduğu gibi keçilerde de önceleri dış yapılarına göre (morfolojik) zaman içerisinde verim özelliklerine göre sınıflandırılmalarının daha uygun olacağı görüşü ağırlık kazanmıştır. Verim özellikleri dikkate alındığında, Dünya’da tanınmış bazı keçi ırklarının süt, et ve kıl (lif) verimlerine göre sınıflamak mümkündür. Ancak unutulmaması gerekli nokta, coğrafik bölgelerdeki farklılık ve ihtiyaçlara göre halen yeni ırkların geliştirilmesine devam edilmekte olduğudur. Türkiye içinde benzer durum söz konusu olup geliştirilecek yeni ırkların bölgenin coğrafi durumu ile işletmelerin ekonomik verim seviyelerinin dikkate alınması keçiciliğin daha etkin şekilde devamlılığını sağlayacaktır. Keçi ırkları ve verim özellikleri aşağıdaki gibidir (Daşkiran vd., 2012).

2.1.1. Kıl Keçisi

Türkiye keçi varlığın büyük çoğunluğu kıl keçisi ırkı oluşturmaktadır. Kıl keçisi ırkı mera şartlarına daha dayanıklıdır. Türkiye’de de meraya dayalı üretim olduğundan dolayı et ırkları yerine mera şartlarına daha uyumlu olan kıl keçisi kullanılmaktadır. Türkiye’de en yaygın olarak yetiştirilen (%81) keçi ırkıdır. Dağlık tepelik yerlerde yetiştiriciliği yaygındır. Kıl keçisi sıcak ve soğuğa toleranslı, yağsız, yüksek aromalı et veren, makiliklerden iyi yararlanabilen, hastalıklara dayanıklı, iri vücutlu bir keçi ırkıdır. Kıl keçiler kombine verimli yetersiz bakım besleme ile her türlü iklim koşullarına çok iyi uyabilen dayanıklı bir ırktır. Döl verimi çok yüksek değildir bir doğumda genellikle bir oğlak alınır. Laktasyon süreleri 180-235 gün ve laktasyon süt verimleri 100-130 kg arasındadır. Sütteki yağ oranı %5-5,5 arasındadır. Keçilerde canlı ağırlık 45-65 kg, tekelerde 60- 90 kilogramdır. Karkas randımanı %35-40 arasındadır. Kıl verimi tekelerde 1-2 kg, keçilerde 0,5-1 kg arasında değişmektedir (Şirin, 2019).



Şekil 2.1. Kıl Keçisi (Sözen, 2006)

2.1.2. Tiftik Keçisi

Ankara'ya has bir keçi türüdür. Ataları, 13. yüzyılda Orta Asya'dan Anadolu'ya göçen Türkler tarafından, Hazar Denizi'nin doğusundan getirilmiştir. İç Anadolu'nun iklim özelliklerine adapte olmuş ve zamanla Ankara'ya özgü bir hayvan olmuştur. Boynuzlu olmaları genel bir ırk özelliğidir, fakat boynuzsuz teke ve keçilere de rastlanır (Şekil 2.2). Ergin canlı ağırlık, erkeklerde 35-55 kg, dişilerde 30-40 kg arasında değişmektedir. Asıl verimleri olan tiftik, tekstil sanayisi için talep edilen bir ham maddedir. Tiftik verimleri dişilerde 3-4 kg, erkeklerde 4-6 kg'dır. Tiftik keçileri genellikle sağılmazlar. Sağıldığında bir laktasyon döneminde oğlağın emdiği hariç 25-50 kg'a kadar süt verebilirler. Etleri gevrek ve lezzetli olduğundan özellikle tiftik oğlaklarına talep fazladır. Ankara keçilerinin önemi bu keçilerin en kıymetli mahsullerinden biri olan tiftikten gelmektedir. Zira Ankara keçilerinin etinden, sütünden, derisinden ve gübresinden yararlanılsa da bu keçiler özellikle kıymetli bir tekstil ham maddesi olan tiftikleri için yetiştirilmektedir (Tamur, 2003). Ankara keçilerinden elde edilen tiftik; kolay boyanabilmesi, rengini koruyabilmesi, ince ancak bir o kadar da sağlam, ipeksi, parlak, elastik, ısıya dayanıklı ve nem çeken bir yapıya sahip olması gibi özellikleriyle diğer keçi kollarından ayrılmaktadır (Tamur, 2003; Yanar ve Akpınarlı, 2016). Ankara ve çevresinde yetişen Ankara keçilerinden elde edilen tiftik kalitesi Türkiye'nin diğer yerlerinde yetişenlerden farklılık göstermektedir (Gönenç, 2020; Tamur, 2003). Keza günümüzde dünyanın farklı yerlerinden elde edilen tiftik kalitesi de Ankara ve çevresinde yetişen Ankara keçilerinden elde edilen tiftik kalitesine sahip değildir (Yanar ve Akpınarlı, 2016).



Şekil 2. 2. Tiftik Keçisi (Sözen, 2006)

2.1.3. Honamlı Keçisi

Honamlı keçisi Akdeniz bölgesinde yetiştirilmektedir. Vücut büyük oranda siyah renklidir. Antalya ili çevresinde alın kısmında ve ayaklarda beyaz veya kahverengi lekeler mevcuttur (Şekil 2.3). Yüksek cüsseli, narin ve uzun vücut yapısı bulunmakta olup kemerli buruna sahiptir. Bu keçilerin varlığı 2000’li yıllara kadar fark edilememiş olup sayısal olarak varlıkları yapılan istatistiklerde Kıl keçi varlığı içinde değerlendirilmiştir. 2005 yılında Hayvan Gen Kaynaklarının Korunması kapsamında 2005/8503 sayılı tebliğe göre Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından korumaya alınan yerli ırklar kapsamına alınarak, gerekli çalışmalar da başlatılmıştır. Türkiye’nin önemli yerli gen kaynaklarından olan bu keçilerle ilgili şu ana kadar yapılmış çalışma sayısı az olup, saf olarak yetiştirilme olanakları diğer kıl keçileriyle melezlenmeleri nedeniyle günden güne azalmaktadır (Alizadehasl, 2011).



Şekil 2. 3. Honamlı Keçisi (Sözen, 2006)

2.1.4. Kilis Keçisi

Kilis keçisi Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz Bölgesinde geniş bir şekilde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu bölgelere geçmişte Halep keçisi getirilmiş ve bölgedeki Kıl keçileriyle melezleme yapılmıştır. Bu melez keçilerin kendi aralarında yetiştirilmesi sonucu Kilis keçileri meydana gelmiştir. Kilis keçileri küçük topluluklar halinde aile işletmelerinde yetiştirilmektedir. Kilis Keçisinin teke ve keçileri çoğunlukla boynuzludur. Kulakları uzun ve sarkıktır. Ayrıca Kilis Keçilerinde kısa dürük kulaklı olanlara da rastlanır. Vücut kılları düz ve uzundur. Kıl keçisi genotipi taşıdıklarından diğer süt keçilerine göre daha sağlamdırlar. Ayrıca sütü Halep Keçisi genotipi taşıdığından Kıl Keçilerine göre daha zarif, ince yapılıdır. Kilis Keçileri her türlü iklim koşulların iyi uyabilen, ekstansif ve entansif koşullarda, küçük aile işletmeleri halinde veya topluluklar halinde yetiştirilebilen, sağlam vücut yapılı, uzun yürüyüş yetenekli süt ve döl verimi yüksek bir keçi ırkıdır. Kilis keçilerinde vücut çok uzun ve çoğunlukla siyah renkli kıllarla kaplıdır. Kulaklar çok uzun, geniş ve sarkıktır. Kilis keçileri çoğunlukla boynuzludur (Şekil 2.4) Ancak boynuzsuz hayvanlar erkek ve dişide de bulunmaktadır. Meme iyi gelişmiş olup iki bacak arasında öne doğru uzanmaktadır. Kilis Keçisinde oğlak kayıpları çok düşüktür. Kilis süt keçileri, hastalıklara karşı dayanıklı keçilerdir (Alizadehasl, 2011).



Şekil 2. 4. Kilis Keçisi (Sözen, 2006)

2.2. İskelet Kas Gelişimi Üzerine Etkili olan Faktörler

Miyojenik düzenleyici (MDF) faktörler başta olmak üzere miyosit güçlendirici (MEF2s) faktörler, miyosin hafif ve ağır zincir izoformları (MYHs) ve myozenin ailesi (MYOZs) iskelet kası miyogenezinin ana düzenleyicileri olarak görev yaparak,

kodlanmış genlerinin ekspresyonu ile iskelet kası öncü hücrelerinin gelişimini ve sonraki kas lifi farklılaşmasını ve gelişimi düzenlemektedir (Zhong et al., 2013).

MDF gen ailesi dört korunmuş temel helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon faktörü olan Mfy 5, Mfy 6, MyoD ve myogenin (MyoG) den oluşmaktadır (Zhong et al., 2013). MDF faktörlerin başlıca görevleri aşağıdaki gibidir.

MyoD: kas liflerinin erken dönem oluşma sürecindeki büyüme ve çoğalma aşamasından sorumludur (Braun and Arnold, 1995).

MyoG: postnatal kas olgunlaşması ve farklılaşmasından sorumludur (Braun and Arnold, 1995).

Mfy5: ilk ifade edilen MDF olarak kabul edilmekte ve düzenleyici bölgesinde 140 kb lik bir güçlendirici kompleks tarafından düzenlenmektedir (Carvajal et al., 2008). Myf5 geninin kas liflerinin uzaması ve gelişmesi ile ilgili fizyolojik süreçle özellikle ilişkilidir.

Myf6: postnatal kas olgunlaşması ve farklılaşmasından sorumludur. Mfy6 nın da kas liflerinin erken dönem oluşma sürecindeki büyüme ve çoğalma aşamasında etkili olabildiğini göstermiştir (Kassar-Duchossoy et al., 2004).

Büyüme ve gelişme zigotun uterusu bağlanması ile başlayan hücresel artış ve hücresel özelleşmeyi de kapsayan kompleks bir süreçtir (Ujan et al., 2011). Bu süreçte MDF gen ailesinin çok önemli rolü vardır. Bunlardan Myf5 ve Myf6 genlerinin kas liflerinin uzaması ve gelişmesi ile ilgili fizyolojik süreçle özellikle ilişkilidirler. Miyojenik faktör 5 (Myf5) ve 6 (Myf6) genleri kas hücrelerinin gelişimi ve farklılaşmasını düzenleyen genler arasında olup iskelet kas dokusunun oluşumundaki ana düzenleyicilerdendir.

2.3. Amaç

Türkiye yaklaşık 11 milyon baş keçi varlığı ile keçi popülasyonu bakımından Avrupa ülkeleri arasında 1. sırada, dünyada ise 22. sıradadır. Türkiye'nin mevcut keçi varlığının büyük oranını Kıl, Tiftik, Honamlı ve Kilis yerli gen kaynakları oluştururken diğer yerli ve kültür ırkları çok az bir payı oluşturmaktadır. Oranı az olsa da keçi veya oğlak eti azımsanmayacak oranda ülkemizin kırmızı et kaynaklarından biridir. Türkiye'de keçi yetiştiriciliği hemen hemen tamamen mera şartlarına dayalı ekstansif yetiştiricilik sistemine göre yapılmakta olup ek yemleme çok az genellikle hiç yapılmamaktadır. Dolayısı ile keçi veya oğlak eti üretiminde kullanılacak besi materyallerinin besi potansiyeli hakkında yok denecek kadar az bilgi bulunmaktadır.

Kas kütlesindeki artış sahip olduğu hücre sayısı ve hücrelerin büyüme potansiyeline bağlıdır. Dolayısı ile besiye alınacak hayvanın et üretim potansiyeli iskelet kas kütlesinin sahip olduğu kas lifi veya kas hücresi özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. MDF ailesi iskelet kası miyogenezinin (kas dokusunun oluşumu) ana düzenleyicileri olarak görev yapmakta ve iskelet kası öncü hücrelerinin büyümesini ve sonraki kas lifi farklılaşmasını ve gelişimi düzenlemektedir. MDF ailesine bağlı genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi iskelet kas kütlesini oluşturan kas liflerinin büyüme potansiyelinin ve besiye alınacak hayvanın potansiyel besi performansının belirlenmesine olanak tanıyabilmektedir. Dahası iskelet kas liflerinin gelişimi, farklılaşması, çapı ve sayısı ile ilişkilendirilen MDF gen ailesi büyüme ve gelişimi de doğrudan etkileyebilmektedir. Dolayısıyla MDF gen ailesine bağlı genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler besiye alınacak hayvanın besi performansını doğrudan etkileyebilecektir. Ayrıca, kırmızı et üretiminde kullanılacak hayvan türlerinin ve ırkların iskelet kas dokusundaki hücresel ya da moleküler özelliklerin belirlenmesi besiye alınan hayvanların et üretim potansiyellerinin önceden belirlenmesi, et üretiminin çoğaltılması, üretim maliyetlerinin azaltılması ve et fiyatının azaltılması açısından büyük önem arz etmektedir. Tüm bu gerçeklerden dolayı, mevcut çalışmada Türkiye'nin yerli keçi gen kaynaklarından olan ve keçi varlığının büyük bir kısmını oluşturan Kıl, Tiftik, Honamlı ve Kilis oğlaklarının LD ve ST iskelet kaslarındaki MDF gen ailesi üyesi olan Myf 5 ve Myf 6 genlerinin ekspresyon seviyesi ile hücresel özelliklerin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca, mevcut çalışmada hangi yerli keçi ırkının daha yüksek büyüme ve gelişim potansiyeline sahip olabileceğinin belirlenmesi de amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışma Materyali

Çalışmada, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen “Yerli keçi ırklarımızın (Kıl, Tiftik, Honamlı ve Kilis) kas lifi karakterizasyonu” başlıklı ve “TAGEM/15/ARGE/24” numaralı proje kapsamında 3 aylık yaşta Honamlı (n=6), Kıl (n=6), Kilis (n=6) ve Tiftik(n=6) erkek oğlaklarından kesim sonrasında alınan Longissimus dorsi (LD) ve Semitendinosus (ST) iskelet kaslarına ait - 80 °C depolanan örnekler çalışma materyali olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan kas örnekleri

3.2. Kas örneklerinde RNA İzolasyonu

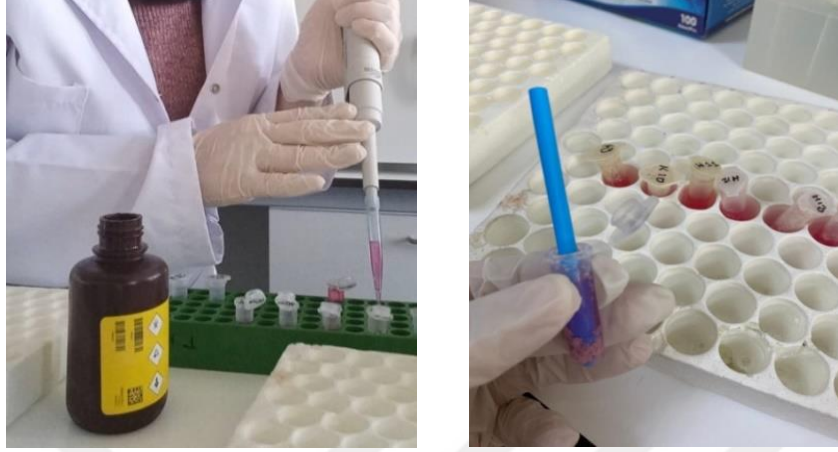
RNA izolasyonu için her bir kastan alınan 100 mg örnekler sıvı azot kullanılarak havanda toz haline gelinceye kadar ezilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kas örneklerinin havanda parçalanması

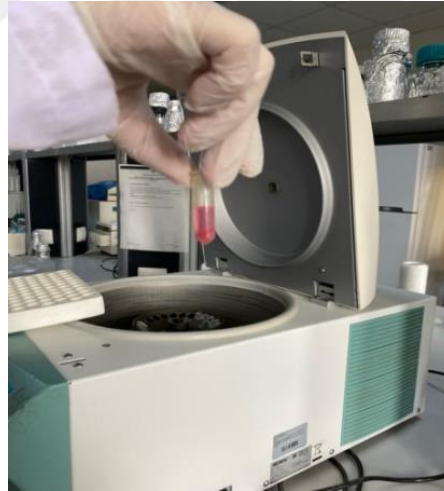
Parçalanmış kas örnekleri üzerine 1000 µL trizol eklemiş ve ezilerek homojenize edilmiştir (Şekil 3.3). Toplam RNA, Chomczynski ve Sacchi (1987)’ye göre Trizol

reaktifi kullanılarak kas örneklerinden izole edilmiştir. Elde edilen RNA, RNase içermeyen DNase ile muamele edilerek genomik DNA kontaminasyonu engellenmiştir.



Şekil 3.3. Kas örneklerine trizol eklenmesi

Örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiş ve 12000 xg 4°C 10 dk santrifüj edilip süpernant kısmı 1,5 ml tüplere alınmıştır.



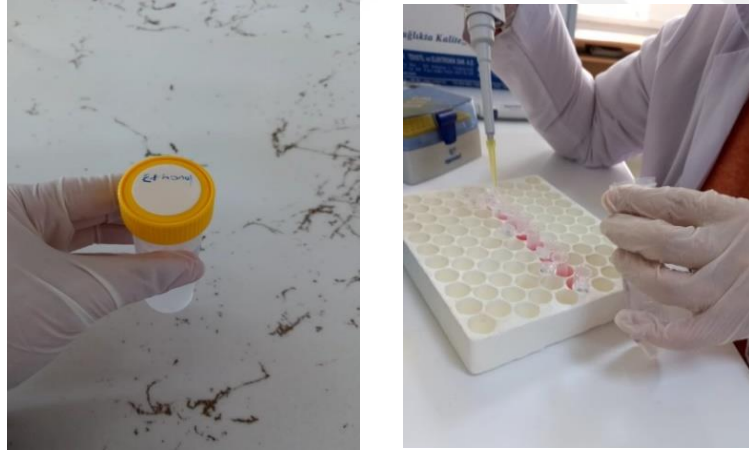
Şekil 3.4. Kas örneklerinin santrifüj edilmesi

Santrifüj işleminden sonra örneklerin üzerine 200 µL kloroform eklenip 1,5 ml mikro tüplere aktarılıp 8-9 sn vorteks kullanılarak karıştırılmıştır (Şekil 3.5). Sonrasında oda sıcaklığında 5 dk bekletilip 12.000 g'de 4 °C 'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 1,5 ml mikro tüplere transfer edilmiştir.



Şekil 3.5. Solüsyona kloroform eklenmesi

Çalışmada PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™) protokolü takip edilerek RNA izolasyonu yapılmıştır. Süpernatantların bulunduğu mikro tüplere 250 µL etanol (% 70'lik) ilave edilmiştir (Şekil 3.6). Örnekler 2 ml'lik filtreli RNA kolonuna (NucleoSpin kırmızı filtre) tranfer edilerek 12.000 g'de 4 °C sıcaklıkta 1 dk santrifüj edilmiştir.



Şekil 3.6. Solüsyona etanol eklenmesi

Santrifüj işleminden sonra toplama tüpündeki sıvı dökülüp kolona 500 µL yıkama tamponu-1 (RAW1) eklenerek 18.000 g'de 4 °C sıcaklıkta 1 dk tekrar santrifüj edilmiştir (Şekil 3.7). Altta kalan sıvı dökülüp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirilmiştir.



Şekil 3.7. Örneklere yıkama tamponu-1 (RAW1) eklenmesi

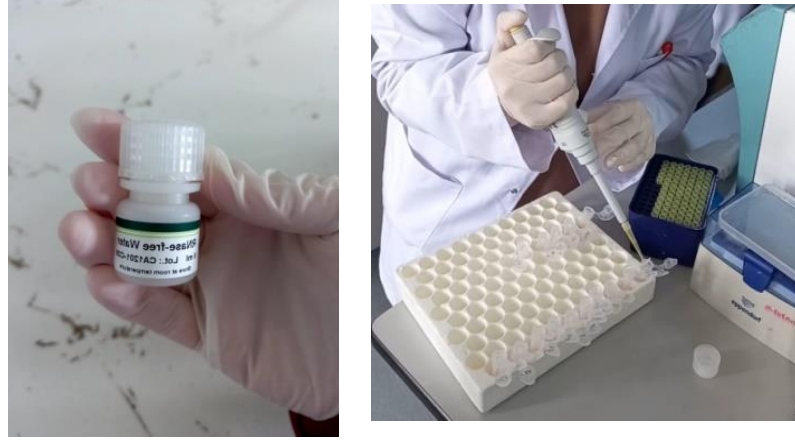
Tüpe 750 ml yıkama tamponu-2 (RAW2) eklenerek (Şekil 3.8) tekrar 18.000 g'de 4 °C sıcaklıkta 1 dk santrifüj edilmiştir ve toplama tüpünde altta kalan sıvı dökülüp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirilmiştir.



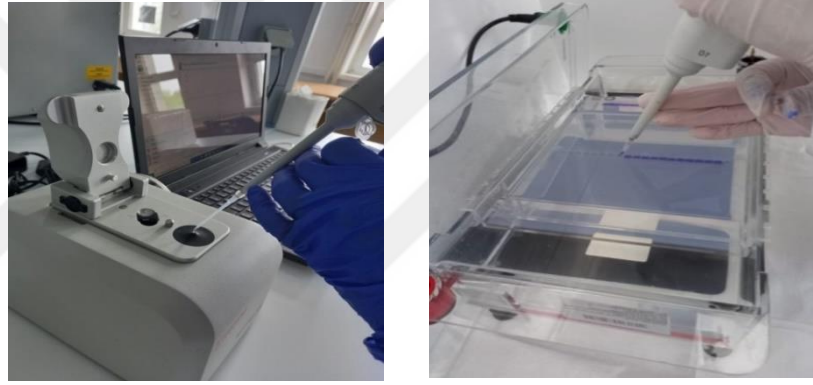
Şekil 3.8. Örneklere yıkama tamponu-2 (RAW2) eklenmesi

Örneklere tekrar 750 ml RAW2 eklenip 18.000 g'de 4 °C sıcaklıkta 1 dk santrifüj edilmiştir ve toplama tüpünde altta kalan sıvı dökülüp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen örnek 18000 g'de 4 °C sıcaklıkta 3 dk kurutmak için santrifüj yapılmıştır. Kurutma işleminden sonra örneklere 50 µl RNase-free su eklenip eklenip 1 dk bekletilmiş (Şekil 3.9) ve 18000 g'de 1 dk santrifüj edilip ve filtre atılmıştır. Toplam RNA preparatlarının miktarı ve kalitesi 260 nm dalga boyunda NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers – (ThermoFisherScientific) cihazı kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10). Toplam RNA'nın saflığı, A260/280 ve A260/230 oranı ile belirlenmiştir. RNA bütünlüğü ve varlığı % 1,5'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 3.10). Elde edilen bant görüntüleri incelenerek 28s - 18s RNA bantlarının (Şekil 3.11) jel görüntüsüne göre

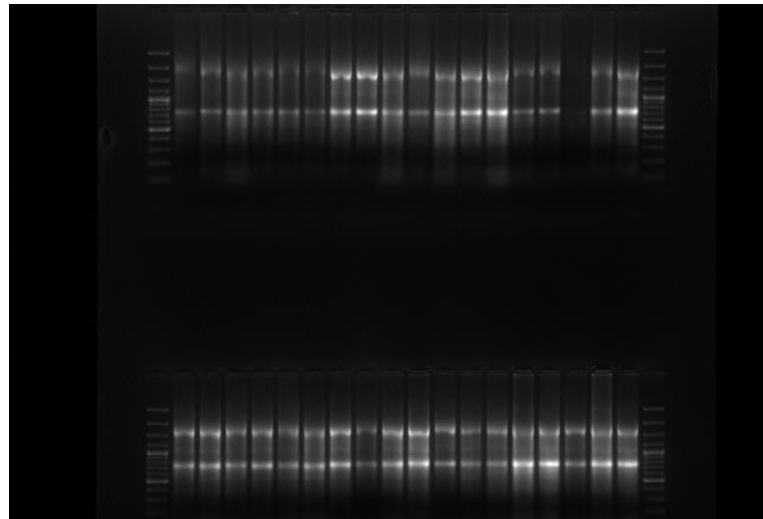
kalite kontrolü yapılmıştır (Huang vd., 2016). Elde edilen RNA örnekleri tamamlayıcı DNA (cDNA) oluşturulmasına kadar -80 °C ‘de depolanmıştır.



Şekil 3.9. Örnekler RNAase free su eklenmesi



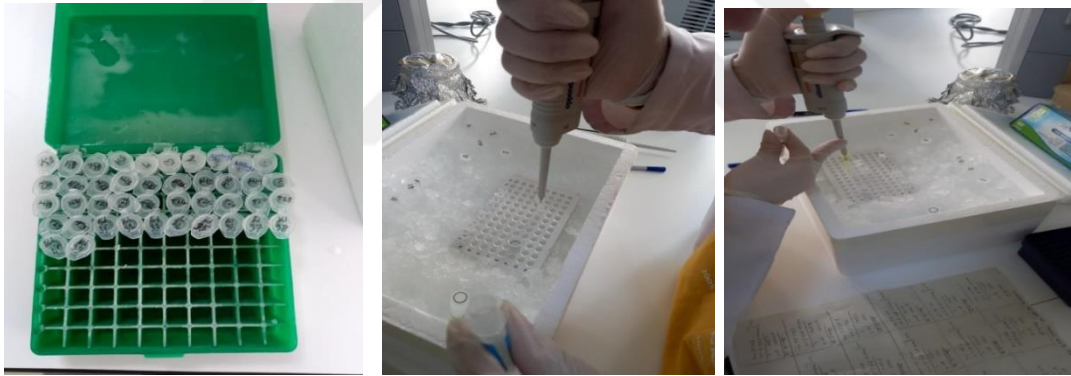
Şekil 3.10. RNA miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ve örneklerin % 1,5’lik agaroz jelde yürütülmesi



Şekil 3.11. Örneklerin % 1’lik agaroz jel’de RNA görüntüsü

3.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

-80 °C'de depolanmış RNA örnekleri 1µg/µl'ye seyreltilip ve RNA'dan cDNA sentezi, revers transkriptaz ve tasarlanan primerler yardımıyla cDNA sentez kiti ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada tamamlayıcı DNA(cDNA) sentezi için ticari cDNA kiti (BIORAD iScript cDNA, 1708890) ve Thermal Cyclers (BIORAD) cihazı kullanılmıştır. Analiz ticari kiti üreten firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır. Tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın oluşturulmasında her bir örnek için kalıp RNA miktarı alınıp PCR tüpüne koyulmuş ve üzerine her bir örneğe özel miktarda nükleaz içermeyen su, 4 µL 5x iScript reaksiyon karışımı ve 1 µL iScript Ters Transkriptaz koyularak son hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır. (Şekil 3.12). Her bir örnek için kalıp RNA ve Nükleaz içermeyen su miktarları Tablo 3.1. de verilmiştir. Örneklerin içerisinde bulunduğu PCR tüpleri Thermal Cyclers (BIORAD) cihazına yerleştirilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonuna (qRT-PCR) kadar 20 °C'de saklanmıştır.



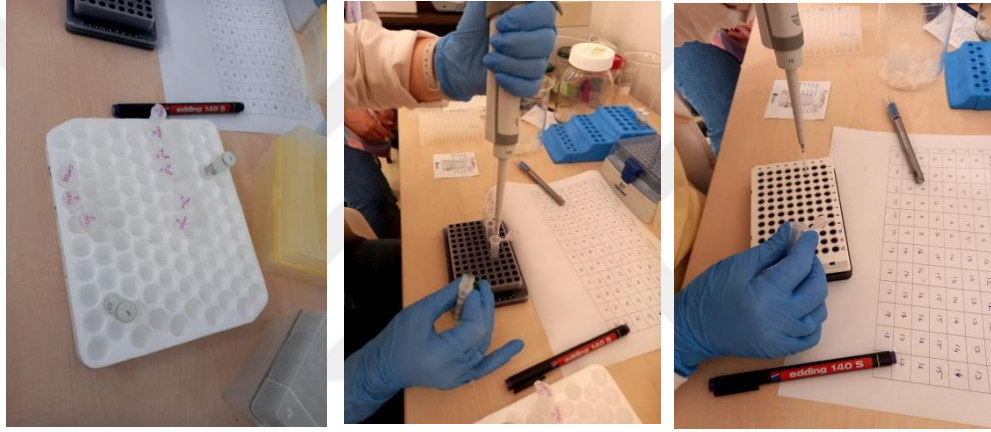
Şekil 3.12. Tamamlayıcı DNA çalışması

Tablo 3.1. Kas örnekleri için RNA ve Nükleaz içermeyen su miktarları

Hayvan adı	Hayvan no	Kalıp RNA miktarı	Nükleaz içermeyen su miktarı
Kilis 1	227270 (ST)	2.97 mg	12.03
Kilis 2	727259 (ST)	2.29 mg	12.71
Kilis 3	727284 (LD)	4.25 mg	10.75
Kilis 4	727269 (LD)	3.98 mg	11.02
Kilis 5	727259 (LD)	3.51 mg	11.48
Kilis 6	227270 (LD)	3.52 mg	11.41
Kilis 7	727297 (ST)	2.77 mg	12.23
Kilis 8	727297 (LD)	3.90 mg	11.10
Kilis 9	727284 (ST)	2.94 mg	12.06
Kilis 10	727279 (LD)	4.47 mg	10.53
Kilis 11	727284 (LD)	4.25 mg	10.75
Kilis 12	727297 (ST)	2.77 mg	12.23
Honamlı 1	4130927 (ST)	1.71 mg	13.29
Honamlı 2	4130927 (LD)	1.99 mg	13.01
Honamlı 3	4943 (LD)	1.44 mg	10.56
Honamlı 4	4128879 (ST)	2.30 mg	12.70
Honamlı 5	4130533 (LD)	1.46 mg	13.54
Honamlı 6	4128910 (LD)	1.64 mg	13.36
Honamlı 7	4128879 (LD)	1.25 mg	13.75
Honamlı 8	4943 (ST)	3.50 mg	11.50
Honamlı 9	4130533 (ST)	4.91 mg	10.09
Honamlı 10	4128910 (ST)	2.53 mg	12.47
Honamlı 11	4128879 (ST)	2.30 mg	12.70
Honamlı 12	4128879 (LD)	1.25 mg	13.75
Kıl 1	3339 (LD)	2.52 mg	12.48
Kıl 2	3302 (LD)	1.51 mg	13.49
Kıl 3	3302 (ST)	2.73 mg	12.27
Kıl 4	3347 (ST)	1.83 mg	13.17
Kıl 5	3339 (ST)	2.26 mg	12.74
Kıl 6	3347 (LD)	2.45 mg	12.55
Kıl 7	3312 (ST)	2.55 mg	12.45
Kıl 8	3485 (LD)	2.08 mg	12.92
Kıl 9	3312 (LD)	1.66 mg	13.34
Kıl 10	3485 (ST)	4.27 mg	10.73
Kıl 11	3302 (ST)	2.73 mg	12.27
Kıl 12	3347 (LD)	2.45 mg	12.55
Tiftik 1	160409 (ST)	2.30 mg	12.25
Tiftik 2	160409 (LD)	2.15mg	12.10
Tiftik 3	16005 (LD)	2.43 mg	12.35
Tiftik 4	16005 (ST)	1.80 mg	13.05
Tiftik 5	161502 (LD)	1.90 mg	13.15
Tiftik 6	163252 (LD)	2.10 mg	12.98
Tiftik 7	161789 (LD)	2.18 mg	13.02
Tiftik 8	161502 (ST)	1.93 mg	13.07
Tiftik 9	161789 (ST)	1.85 mg	13.30
Tiftik 10	163252 (LD)	1.44 mg	13.56
Tiftik 11	161502 (LD)	1.90 mg	13.15
Tiftik 12	16005 (ST)	1.80 mg	13.05

3.4. Real time PCR

Kas örneklerinde Mfy5 ve Mfy6 gen ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR analizi ile belirlenmiştir. Mfy5 ve Mfy6 genlerinin korunmuş dizileri dikkate alınarak tasarlanan sentetik oligonükleotid primerleri kullanılmıştır. Çalışmada referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Primerler üretici firmanın prosedürüne uygun olarak seyreltilmiştir. Her bir tüpe 70 µl su eklenmiş ve GAPDH-R primer için 17,5 µl, Myf5-f primer için 17,5 µl, Myf5-R primer için 17,5 µl, Myf6-F primer için 17,5 µl, Myf6-R primer için 17,5 µl tüpe ilave edilmiştir (Şekil 3.13). Sonra her bir tüpe 150 µl Universal SYBR Green Supermix konulmuştur. Daha sonra tüpler vorteklenip ve ardından dikkatli bir şekilde alt üst edilmiştir. (Şekil 3.14).



Şekil 3.13. Primer baz dizilerinin seyreltilmesi



Şekil 3.14. Universal SYBR Green Supermix ilavesi

Her bir örnek için 2 tekrarlı primer dizileri ve referans gen (GAPDH) Real-Time plate kuyucuklarına yüklenmiştir. Prosedüre uygun olarak Myf5-F primeri için 643 µl, Myf5-R primeri için 555 µl, Myf6- F primeri için 475 µl, Myf6-R primeri için 475 µl, GAPDH-F primeri için 475 µl, GAPDH-R primeri için 475 µl µl nükleaz free suda çözülerek 100 µM 'lık stoklar elde edilmiştir. Mfy5, Mfy6 ve referans genlerinin primer baz dizileri Tablo 3.2'de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Real-Time PCR'da kullanılan primer baz dizileri

Genler	Seri No	Primer Sekansları	Ürün Boyutu	Gen Bankası
Mfy5-F	202220420/1-7	CACGACCAACCCTAACCAGAG	101 bp	JF829004 (Zhong vd.,2013)
Mfy5-R	202220420/1-8	TCTCCACCTGTTCCCTTAGCA		
Mfy6-F	202220420/1-9	CGGAGCGCCATTAACACTACAT	101 bp	NM_001285602 (Huang vd., 2016)
Mfy6-R	202220420/1-10	AAATCCGCACCCTCAAGATT		
GAPDH-F	202220420/1-11	GCA AGT TCC ACG GCA CAG	118 bp	AF035421 (Cheng vd., 2012)
GAPDH-R	202220420/1-12	TCA GCA CCA GCA TCA CCC		

F= forward, R= reverse

Real-Time PCR için bütün örneklerle ait cDNA'lerden 1µl alınıp 2 tekrarlı Real-Time plate kuyucuklarına yüklenmiştir. Daha sonra örneklerle 5,8 µl nükleaz içermeyen su, 1,6 µl Forward Primer ve 1,6 µl Reverse Primer eklenmiştir. Son olarak kuyucuklara Universal SYBR Green Supermix 10µl koyularak mühürleme bandı ile Real-Time PCR plate'nin üzeri kapatılmıştır ve 15 dakika içerisinde ışıktan korunmuş bir şekilde buz içerisinde Real-Time PCR cihazı (BIORAD) ile Real-Time PCR protokolü uygulanmıştır (Şekil 3.15). Real-Time PCR protokolünün aşamaları Tablo 3.3.'de sunulmuştur.



Şekil 3.15. Real- Time PCR analizi

Tablo 3.3. Real-Time PCR protokolü

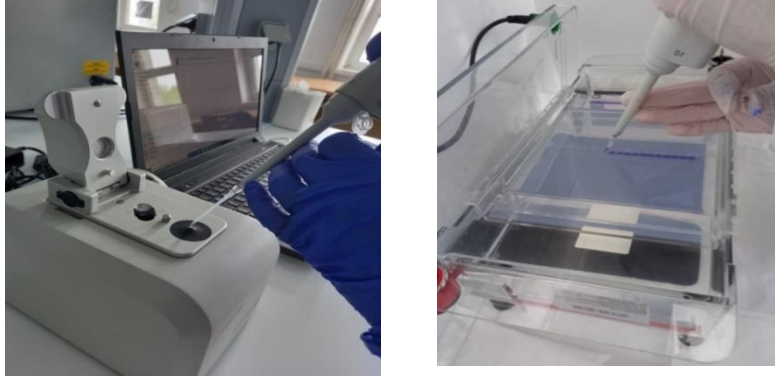
Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Polimeraz Aktivasyonu ve DNA Denatürasyonu	96	2'	1
Denatürasyon	96	20"	} 40
Bağlanma/Uzama ve Plate Okuma	60	1,5'	
Erime Eğrisi Analizi	65-95 (0.5°C artış/döngü)	5"	Plate Okuma

RT-qPCR uygulamasında kullanılan PCR protokolü; ilk DNA denatürasyonu 2 dk. (96 °C), ikinci denatürasyon 20 saniye 35 döngü (96 °C), bağlanma/uzama ve plate okuma 1,5 dakika, uzatma 45 saniye. (72°C), floresan analizi (72°C). RT-qPCR uygulamalarında sonuçların güvenilirliği açısından tüm işlemler en az 3 kez tekrarlandı. RT-qPCR verimliliğini hesaplamak için farklı konsantrasyonlarda (1, 1/10, 1/100 ve 1/1000) standartlar kullanılmıştır. Çalışmada RT-qPCR etkinliği için E=1.60 ile 2.10 arasındaki değerler kullanılmıştır. Mfy5 ve Mfy6 genlerinin ekspresyon seviyeleri referans genin ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırılıp normal dağılıma uygun hale getirilerek ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi, RNA ekspresyon seviyelerini analiz etmek için kullanılmıştır (Huang et al., 2016).

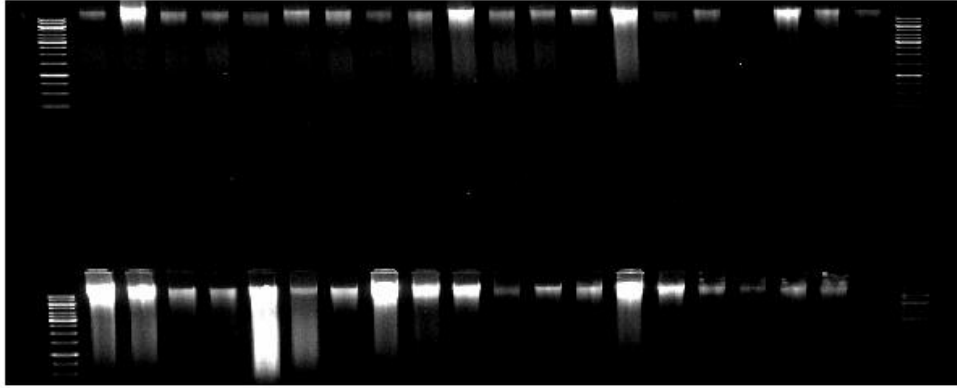
3.5. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

LD ve ST kas örneklerindeki genomik DNA izolasyonu PureLink™ DNA Mini Kit (Invitrogen™) protokolü takip edilerek yapılmıştır. Başlangıç materyali olarak her bir kastan 100 mg örnek kullanılmıştır. Örnekler steril havan içerisinde sıvı azot ile ezilip parçalanarak 1.5 ml'lik ependorf tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. Sonra örneklerin üzerine 200 µl TE (Tris- EDTA) tampon çözeltisi eklenmiş ve tüpler yaklaşık 30-35 saniye vortekslenerek homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra örneklerin üzerine 400 µl lysis solüsyon eklenmiş ve 6-7 kez dikkatli bir şekilde alt üst edilip karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler 65 °C sıcaklıkta 15 dk su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon esnasında tüpler her 5 dk da bir DNA'ya zarar vermeyecek şekilde tüplerin dibine yavaşça parmak ucuyla dokunularak karıştırılmıştır. Inkübasyondan hemen sonra tüplere 600 µl kloroform eklenerek 10-15 kez dikkatli bir şekilde aşağı yukarı çevrilmiştir. İşlem sonunda örnekler 14.000 g'de, 4 °C sıcaklıkta 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra çökeltinin üstündeki sıvı (supernatant) otomatik pipet kullanılarak dikkatli bir şekilde başka steril tüplere alınmıştır. Toplam DNA preparatlarının miktarı ve kalitesi 260 nm dalga boyunda NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers – (ThermoFisherScientific) cihazı

kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 3.16). Toplam DNA'nın saflığı, A260/280 ve A260/230 oranı ile belirlenmiştir. Ölçüm işleminden sonra DNA bütünlüğü ve varlığı % 1,5'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.16. DNA miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ve örneklerin agaroz 1,5'lik agaroz jelde yürütülmesi



Şekil 3.17. %1 lik Agaroz jelde DNA görüntüsü

3.6. İstatiksel Analiz

Çalışma boyunca elde edilen veriler SPSS 20.0 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Verilerin varyans analizine uygunluğu Levene varyans homojenlik testi değerlendirilmiş olup varyansların homojen olduğu ($P < 0,05$) tespit edilmiştir. Irklar arasında DNA ve RNA miktarı bakımından elde edilen ortalamaların önem seviyesinin karşılaştırılması Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak yapılmıştır. Mfy5 ve Mfy6 genlerinin ekspresyon düzeyleri, referans olarak seçilen ve her dokuda eksprese edildiği bilinen bir gen (housekeeping gen) düzeyi ile karşılaştırılmıştır. Mfy5 ve Mfy6 genlerinin ekspresyon düzeyinin ırklar arasında farklılığın belirlenmesi amacıyla bağımsız örneklerde t-testi yapılmıştır ($P < 0,05$).

4. BULGULAR

Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarına ait Longissimus-dorsi (LD) ve Semitendinosus (ST) kaslarındaki toplam DNA ve RNA miktarları ve RNA-DNA oranı Tablo 4.1’de sunulmuştur. Çalışmada, LD kasına ait toplam DNA miktarı bakımından ırklar karşılaştırıldığında, Honamlı ırkı oğlakların en yüksek ($P < 0.05$) DNA miktarına, Tiftik ırkı oğlakların ise en düşük ($P < 0.05$) DNA miktarına sahip oldukları tespit edilmiştir. Benzer olarak, ST kasına ait toplam DNA miktarının Honamlı ırkı oğlaklarda en yüksek ($P < 0.05$), Tiftik ve Kilis ırkı oğlaklarda en düşük ($P < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, LD kasına ait toplam RNA miktarı bakımından ırklar karşılaştırıldığında, Kıl ve Honamlı keçi ırklarına ait oğlakların en yüksek ($P < 0.05$) RNA miktarına, Tiftik ve Kilis ırklarına ait oğlakların ise en düşük ($P < 0.05$) RNA miktarına sahip oldukları tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, ST kasındaki toplam RNA miktarı ırklar karşılaştırıldığında en yüksek ($P < 0.05$) Honamlı ırkı oğlaklarda tespit edilmiştir. Çalışmada, ırklar arasında LD kasındaki en yüksek ($P < 0.05$) RNA/DNA oranına Tiftik ırkına ait oğlaklar sahipken en düşük ($P < 0.05$) RNA/DNA oranına Honamlı ve Kilis ırkı oğlakların sahip olduğu tespit edilmiştir. Benzer bir şekilde Tiftik ırkına ait oğlakların, Kilis oğlakları hariç, Kıl ve Honamlı ırkına ait oğlaklara göre ST kasında daha yüksek ($P < 0.05$) RNA/DNA oranına sahip oldukları tespit edilmiştir.

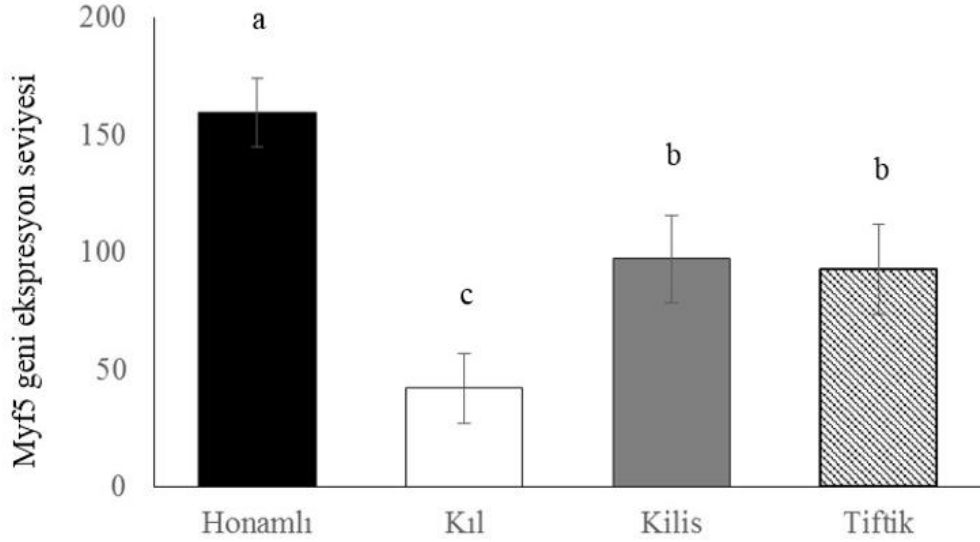
Tablo 4.1. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarına ait Longissimus-dorsi (LD) ve Semitendinosus (ST) kaslarındaki toplam DNA ve RNA miktarları ve RNA-DNA oranı

		Irk			
		Tiftik	Kıl	Honamlı	Kilis
DNA (mg/g)	LD	0,44±0,08 ^c	0,94±0,22 ^b	2,26±0,955 ^a	1,25±0,26 ^b
	ST	0,41±0,09 ^c	1,08±0,35 ^b	1,80±0,30 ^a	0,59±0,13 ^c
RNA (mg/g)	LD	0,76±0,08 ^b	0,96±0,16 ^a	0,99±0,07 ^a	0,39±0,02 ^b
	ST	0,57±0,09 ^b	0,59±0,08 ^b	0,94±0,12 ^a	0,51±0,04 ^b
RNA/DNA	LD	1,73±0,28 ^a	1,02±0,21 ^b	0,44±0,10 ^c	0,31±0,09 ^c
	ST	1,39±0,29 ^a	0,55±0,13 ^b	0,52±0,15 ^b	0,86±0,20 ^{ab}

^{a,b,c} Aynı satırda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P < 0.05$)

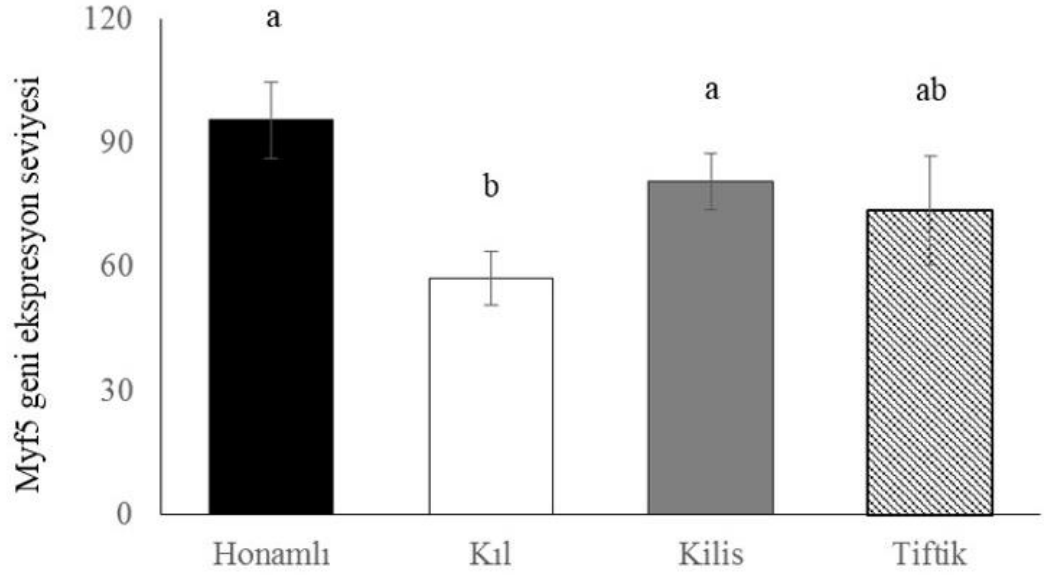
Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik keçisi oğlaklarının Longissimus-dorsi (LD) iskelet kasında miyojenik faktör 5 (Myf 5) geninin ekspresyon seviyeleri Şekil 4.1.’de sunulmuştur. Çalışmada LD kasında Myf 5 geninin ekspresyon seviyesi bakımından ırklar arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar olup, en yüksek ($P < 0.05$) Myf 5 gen ekspresyon seviyesi Honamlı keçisine ait oğlaklarda, en düşük ($P < 0.05$) gen ekspresyon seviyesi ise Kıl keçisine ait oğlaklarda tespit edilmiştir. Honamlı ırkına ait

oğlaklar LD kasında Myf 5 genini, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarına göre sırasıyla yaklaşık 62,6, 67,0 ve 117,8 kat daha fazla ($P < 0.05$) eksprese etmişlerdir. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-qPCR) sonucunda Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının LD kasındaki Myf 5 geninin ekspresyon seviyeleri sırasıyla, $159,8 \pm 14,6$, $97,2 \pm 18,6$, $92,8 \pm 18,9$ ve $42,0 \pm 14,9$ kat değişimi olarak hesaplanmıştır.



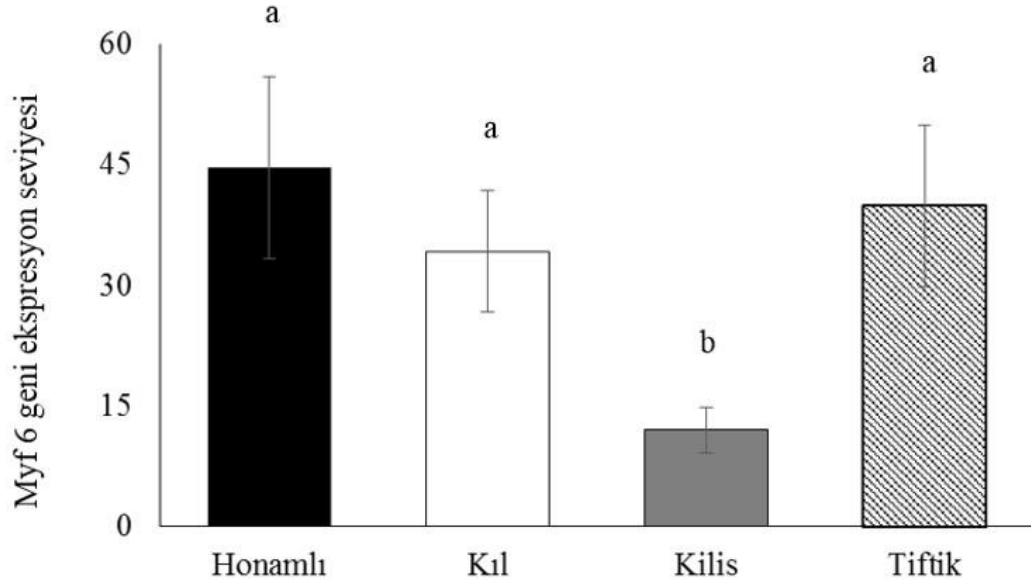
Şekil 4. 1. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Longissimus-dorsi iskelet kasında miyojenik faktör 5 (Myf 5) geninin ekspresyon seviyeleri. Barların üstündeki çubuklar, ortalamaların standart hatasını temsil etmekte ve farklı harflere sahip barlar arasındaki farklılık önemlidir ($P < 0.05$)

Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Semitendinosus (ST) iskelet kasında miyojenik faktör 5 (Myf 5) geninin ekspresyon seviyeleri Şekil 4.2.'de sunulmuştur. Çalışmada ST kasında Myf 5 geninin ekspresyon seviyesi bakımından ırklar arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar olup, Kıl keçisine ait oğlakların, Tiftik keçisi oğlakları hariç, Honamlı ve Kilis keçisi ait oğlaklara göre daha düşük ($P < 0.05$) gen ekspresyon seviyesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-qPCR) sonucunda Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik keçisi oğlaklarının ST kasındaki Myf 5 geninin ekspresyon seviyeleri sırasıyla, $95,4 \pm 9,2$, $57,2 \pm 6,6$, $80,7 \pm 6,8$ ve $73,7 \pm 13,1$ kat değişimi olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre Kıl keçisi ırkına ait oğlaklar ST kasında Myf 5 genini, Honamlı, Kilis ve Tiftik keçisi oğlaklarına göre sırasıyla yaklaşık 38,2, 23,5 ve 16,6 kat daha az ($P < 0.05$) eksprese etmişlerdir.



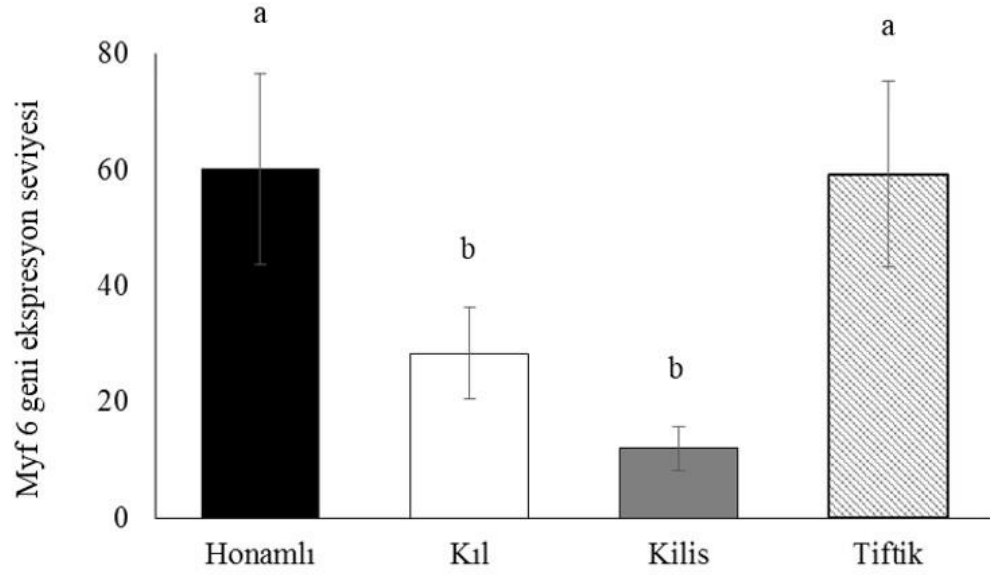
Şekil 4. 2. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Semitendinosus iskelet kasında miyojenik faktör 5 (Myf 5) geninin ekspresyon seviyeleri. Barların üstündeki çubuklar, ortalamaların standart hatasını temsil etmekte ve farklı harflere sahip barlar arasındaki farklılık önemlidir ($P < 0.05$)

Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Longissimus-dorsi (LD) iskelet kasında miyojenik faktör 6 (Myf 6) geninin ekspresyon seviyeleri Şekil 4.3.'de sunulmuştur. Çalışmada LD kasında Myf 6 geninin ekspresyon seviyesi bakımında ırklar arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar olup, Kilis keçisi ırkına ait oğlakların, Honamlı, Kıl ve Tiftik keçi ırkına ait oğlaklara göre daha düşük ($P < 0.05$) gen ekspresyon seviyesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-qPCR) sonucunda Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının LD kasındaki Myf 6 geninin ekspresyon seviyeleri sırasıyla, $44,5 \pm 11,3$, $34,2 \pm 7,5$, $12,0 \pm 2,9$ ve $39,8 \pm 10,1$ kat değişimi olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre Kilis ırkına ait oğlaklar LD kasında Myf 6 genini, Honamlı, Kıl ve Tiftik oğlaklarına göre sırasıyla yaklaşık 32,5, 22,2 ve 27,8 kat daha az ($P < 0.05$) eksprese etmişlerdir.



Şekil 4. 3. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Longissimus-dorsi iskelet kasında miyojenik faktör 6 (Myf6) geninin ekspresyon seviyeleri. Barların üstündeki çubuklar, ortalamaların standart hatasını temsil etmekte ve farklı harflere sahip barlar arasındaki farklılık önemlidir ($P < 0.05$)

Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Semitendinosus (ST) iskelet kasında miyojenik faktör 6 (Myf 6) geninin ekspresyon seviyeleri Şekil 4.4.'de sunulmuştur. Çalışmada ST kasında Myf 6 geninin ekspresyon seviyesi bakımında ırklar arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar olup, en yüksek ($P < 0.05$) Myf 6 gen ekspresyon seviyesi Honamlı ve Tiftik ırklarına ait oğlaklarda, en düşük ($P < 0.05$) gen ekspresyon seviyesi ise Kıl ve Kilis ırklarına ait oğlaklarda tespit edilmiştir. Honamlı ırkına ait oğlaklar ST kasında Myf 6 genini, Kıl ve Kilis oğlaklarına göre sırasıyla yaklaşık 31,8 ve 48,1 kat daha fazla ($P < 0.05$) eksprese etmişlerdir. Bunun yanında Tiftik ırkına ait oğlaklar ST kasında Myf 6 genini, Kıl ve Kilis oğlaklarına göre sırasıyla yaklaşık 30,9 ve 47,2 kat daha fazla ($P < 0.05$) eksprese etmişlerdir. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-qPCR) sonucunda Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının LD kasındaki Myf 5 geninin ekspresyon seviyeleri sırasıyla, $60,1 \pm 16,4$, $28,3 \pm 7,9$, $12,0 \pm 3,8$ ve $59,2 \pm 16,0$ kat değişimi olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 4. Honamlı, Kıl, Kilis ve Tiftik oğlaklarının Semitendinosus iskelet kasında miyojenik faktör 6 (Myf 6) geninin ekspresyon seviyeleri. Barların üstündeki çubuklar, ortalamaların standart hatasını temsil etmekte ve farklı harflere sahip barlar arasındaki farklılık önemlidir ($P < 0.05$).

5. TARTIŞMA

Çiftlik hayvanlarında birçok genetik ve çevre faktörü et kalitesini ve verimini etkilemektedir. Canlılarda kas liflerinin gelişim ve büyümesi MDF gen ailesi dört korunmuş temel helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon faktörü olan Myf5, Myf6, MyoD ve MyoG) tarafından düzenlenir (Zhong et al., 2013). Bu ailedeki genler embriyonel hayattaki ilkel kas hücrelerinde artışa ve kas liflerinin şekillenerek doğum sonrası kas hücrelerinin olgunlaşması ve fonksiyonlarının yerine getirmelerini kontrol ederler (Hughes and Schiaffino, 1999). MDF gen ailesinin üyeleri arasında yer alan Myf5 ve Myf6 genleri çiftlik hayvanlarında büyüme, karkas ve et kalitesi ile yakından ilişkili olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Carvajal et al., 2008; Liu et al., 2008). Örneğin Myf5 sığırlarda doğum ağırlığı, sütten kesime kadar günlük ortalama canlı ağırlık artışı ve günlük canlı ağırlık artışı ile karkas ve et kalitesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Büyüme ile ilişki olan canlı ağırlık artışı veya karkas ağırlığı gibi et verim özellikleri canlının kas hücrelerinde artış ve kas dokusu gelişimi ile ilişkili özelliklerdir. Sığır ve domuz gibi tüm dünyada en önemli kırmızı et kaynağı olan çiftlik hayvanlarının yetiştiriciliğinde yağlı et elde etmek istenir. Bu özelliklerden elde edilecek et miktarı bireyin doğduğunda sahip olduğu kas lifi sayısı tarafından belirlenir (Handel and Stickland, 1988). Çiftlik hayvanlarında canlı ağırlık kazancı ve karkas ağırlığı büyüme özellikleri ile ilişkili olup, bu özellikler hayvanın kas lifi sayısındaki yada çapındaki artış ve kas kütlesinin gelişimi ile yakından ilişkilidir.

Et veriminin en büyük göstergesi olan karkas ağırlığı ile ilişkili olan büyüme, doğum öncesi (prenatal) ve doğum sonrası (postnatal) büyüme olmak üzere iki bölüme ayrılır. Kas gelişimi büyüme, olgunlaşma ve fonksiyonların gelişmesi sırasında embriyonun uterusu bağlanması hücresel artış ve özelleşmeleri kapsayan çok boyutlu olaylar zinciridir (Ujan et al., 2011). Bu olay başlıca MDF gen ailesi tarafından kontrol edilir. MDF'lerin kas liflerinin oluşması, gelişimi ve çoğalması sürecindeki aşamalardan doğum sonrası (postnatal) kas olgunlaşması, farklılaşması ve fonksiyonlarına kadar miyojenez düzenledikleri bilinmektedir (Patel et al., 2014; Siqin et al., 2017; Zhong et al., 2013). Çiftlik hayvanlarında kas kütlesinin sahip olduğu hücrelerin büyüme ve gelişimi MDF gen ailesi üyeleri olan MyoG, MyoD, Myf5 ve Myf6 tarafından düzenlenmektedir. Bu genler embriyonik dönemde kas hücrelerinin oluşmasını, doğum sonrası kas liflerinin olgunlaşması ve fonksiyonlarını kontrol etmektedir (Hughes and Schiaffino, 1999). Çiftlik hayvanlarında MDF gen

ailesinin ekspresyon seviyesi et verimi ve kalitesi için yapılan çalışmalarda genetik belirteç olarak kullanılmasına ışık tutabilecektir (Bhuiyan et al., 2009; McIlveen and Buchanan, 2001; Ujan et al., 2011; Zhang et al., 2007). Myf 5 ve Myf 6 genlerinin et verimi ve et kalite parametreleri arasındaki ilişkilerin daha kesin olarak belirlenebilmesi için geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Miyojenik transkripsiyon faktörleri gibi belirli genlerin kas ifadesi, et kalitesinin yanı sıra karkastaki et içeriğini de önemli ölçüde etkileyebilir.

Mevcut çalışmada LD ve ST kasında her iki genin Myf 5 ve Myf 6 genlerinin ekspresyon seviyesi bakımından ırklar arasında Myf 5 gen ekspresyon seviyesi en yüksek Honamlı keçi ırkına ait oğlaklarda en yüksek olduğu belirlenmiştir. Yani kısacası bu çalışmada Myf 5 ve Myf 6 genlerinin ekspresyon seviyesinin Honamlı ırkında belirlenmesi bu yerli ırkın diğer ırklara göre daha yüksek besi potansiyeli olduğunu gösterebilir ve et verim özellikleri üzerine yapılacak ıslah çalışmalarında moleküler markör olarak kullanım olanağını da ortaya koyabilmektedir. Bu araştırmadan elde edilen genetik bilgiler kullanılarak besi hayvancılığında genetik ilerlemenin hızlandırılmasının yolları ve gelecekteki olası araştırma yönelimleri geliştirilebilecektir. Bir başka ifade ile MDF gen ailesinin özellikle Myf5 ve Myf6 ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi yerli keçi ırklarımızın et üretim potansiyellerinin daha açıklayıcı ve net olarak belirlenmesi ve et veriminin artırılması hakkında önemli bilgiler verebilir. Ayrıca yerli keçi ırklarımızda kas lifi gelişiminden sorumlu gen ailelerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinin ilk defa yapılması bu alanda olan bir eksikliğin giderilmesinin önünü açmakla birlikte yerli ırkların et üretim potansiyellerinin belirlenmesi bakımından hayvancılığın gelişmiş olduğu ülkelerle rekabetin sağlanmasına da katkı sağlayabilecektir. Ayrıca doğum öncesi gelişim sırasında tanımlanan iskelet kası lifi iki ayrı aşamada meydana gelirken, doğum sonrası büyüme hipertrofik kas lifi büyümesi ile sınırlıdır. İskelet kası lifleri, kesimden sonra elde edilen et kütesinin ana hücre tipidir. Bu nedenle, MDF gen ailesinin aktivitesindeki farklılıklar, bu hayvanlarda depolanan ve ekonomik açıdan büyük önem taşıyan et miktarı için çok önemli olabilir. Bu yüzden de MDF genleri özellikle Myf5 ve Myf6 genleri genomik varyasyon ile iskelet kası kütlesi ve dolayısıyla et kütlesi arasındaki ilişkiyi araştırmak için potansiyel aday genler olarak kabul edilebilirler. Bu proje de, et üretimi ile ilgili olarak MDF gen ailesine ait fonksiyonel genlerdeki genomik varyasyon bilgisinin ve gen anlatımlarındaki

varyasyonun ıslahta kullanılabilecek bilgiler sağlama potansiyeli araştırılmıştır. Kas kütlesindeki artış sahip olduğu hücre sayısı ve hücrelerin gelişim potansiyeline bağlıdır. Dolayısıyla, besiye alınacak hayvanın et üretim potansiyeli iskelet kas kütlesinin sahip olduğu kas lifi veya kas hücresi özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Kas lifi sayısı ergin dönemde besideki canlı ağırlık kazancını ve bu kazancın yağ veya kas şeklinde olacağını belirlemektedir (Fahey et al., 2005).

İskelet kas kütlesini oluşturan en küçük hücresel birim kas lifi olarak tanımlanmakta ve kas liflerinde gerçekleşen moleküler süreçler canlının büyüme ve gelişim eğilimini ortaya koymaktadır (Handel and Stickland, 1987). İskelet kas dokusunun sahip olduğu kas lifi sayısı, çeşidi hatta kas liflerinin çapı bu dokunun hücresel moleküler sürecini ya da sahip olduğu DNA ve RNA içeriğini ve RNA/DNA oranlarını etkileyerek kas dokusunun transkripsiyonel ve translasyonel kapasitesini etkileyebilmektedir (Sen et al., 2015).

Kas liflerinin DNA ve RNA içeriği gibi hücresel özelliklerindeki farklılaşma canlının büyüme ve gelişimi doğrudan etkileyebilmektedir (Handel and Stickland, 1987). Yapılan çalışmalar iskelet kası gibi çok çekirdekli hücrelerden oluşan dokularda hücrenin sahip olduğu protein, DNA ve RNA içeriği ve bunların oranlarının hücre büyüklüğünün belirlenmesinde bir indeks olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Greenwood et al., 2006).

Mevcut çalışmada ırklar arasında toplam genomik DNA miktarına bakıldığında, Honamlı oğlaklarının LD ve ST kaslarındaki toplam genomik DNA miktarının diğer oğlaklarından daha yüksek olduğu bulunmuş ve en düşük toplam genomik DNA miktarının da Tiftik ve Kilis oğlaklarında olduğu belirlenmiştir. (Tablo 4.2). Yani kısacası LD kasında honamlı ırkı Tiftik ırkına göre % 513, Kıl ırkına göre %240, Kilis ırkına göre %180 genomik DNA miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmada ST kasında honamlı ırkı Tiftik ırkına göre % 439, Kıl ırkına göre % 166, Kilis ırkına göre % 305 genomik DNA miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. (Tablo 4.2). Her ne kadar iskelet kas kütlesi hücreleri veya kas lifleri çok çekirdekli yapıya sahip olsalar da kas kütlesinin sahip olduğu DNA miktarı kas lifi sayısı ile doğrudan ilişkilendirilebilmektedir (Greenwood et al., 2006). Dahası, kas kütlesi içerisindeki kas lifi sayısının fazla olması besiye alınan hayvanların daha yüksek besi performansı sergilemesine imkan vermektedir (Sen et al., 2015). Mevcut çalışmada ırkların kas lifi sayıları belirlenmemiş olsa da Honamlı oğlaklarının sahip olduğu

genomik DNA miktarı bu ırkın diğer ırklardan daha fazla iskelet kas lifine sahip olduğunun bir göstergesi olabilir ve bu ırkın diğer ırklara göre daha yüksek besi potansiyeli olduğunu gösterebilir. Honamlı oğlaklarının besi performansı ile kesim ve karkas özellikleri (Elmaz et al., 2017) ile Tiftik keçisi oğlaklarının besi perfonsı ve karkas özellikleri (Daşkiran ve Ertuğrul, 1994) karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak honamlı oğlakların diğer ırklara göre daha yüksek performans özelliği gösterdiği bilinmektedir ve bu durum mevcut ırklarla yapılan besi çalışmalarıda bu durumu desteklemektedir.

Mevcut çalışmada ırklar arasında LD ve ST kaslarındaki toplam RNA miktarlarına bakıldığında toplam RNA miktarının Honamlı oğlaklarında diğer ırklardan doğan oğlaklardan daha fazla olduğu ve toplam RNA miktarının nispeten en düşük Tiftik ve Kilis oğlaklarında tespit edilmiştir. LD kasındaki honamlı ırkının Tiftik ırkına göre %130, Kıl ırkına göre % 103, Kilis ırkına göre %253 daha fazla RNA miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. ST kasındaki honamlı ırkının ise Tiftik ırkına göre % 164, Kıl ırkına göre % 159, Kilis ırkına göre ise % 184 daha fazla RNA miktarı içermektedir. DNA, RNA, RNA/DNA oranındaki farklılıklar, ırkların genetik kökenine bağlanabilir. Sonuç olarak, bu çalışma kas kütlelerinin hücresel özelliklerinin (DNA, RNA ve RNA/DNA) keçilerde genetik kökeni ile farklı olabileceğini göstermektedir. Tiftik ve Honamlı ırklarından doğan oğlakların sahip oldukları hücresel özellikler bu oğlakların metabolik olarak daha aktif olduğunu ve kas liflerinde büyüme için daha büyük bir kapasiteye sahip olduklarını göstermektedir. Bütün bu sonuçlar Honamlı ırklarından doğan oğlakların diğer ırklara göre daha yüksek büyüme veya besi potansiyeline sahip olabileceğini gösterebilmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışma Myf 5 ve Myf 6'nın keçi iskelet kaslarında önemli ölçüde farklı ekspresyonu sunulmuştur. Bu çalışma Honamlı oğlak ırklarının Myf5 ve Myf6 gen ekspresyon seviyesinin daha yüksek olması nedeniyle daha yüksek kas büyümesine sahip olabileceğini ve bu ırkın daha verimli bir besi uygulaması için önerilebileceğini göstermiştir. Mevcut ırklarla yapılan besi çalışmaları da bu durumu desteklemektedir. Sonuç olarak, Türk yerli keçi ırklarının Myf5 ve Myf6 gen ekspresyon seviyelerine sahip olduğu ve bu farklılıkların besi uygulamaları için daha verimli ırklar seçmek için kullanılabileceği sonucuna varılabilir. Kısacası Myf5 ve Myf6 genlerinin ekspresyon seviyesinin belirlenmesi Honamlı keçisinin gelecekte yerli ırkların et verim özellikleri üzerine yapılacak ıslah çalışmalarında moleküler markör olarak kullanım olanağını da ortaya koyabilir.

KAYNAKLAR

- Alizadehasl, M. (2011). Kilis, Norduz Ve Honamli Keçilerinde Bazi Morfolojik Özellikler. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 51(2), 81-92.
- Aydogdu, M. H., and Kucuk, N. (2018). General Analysis Of Recent Changes In Red Meat Consumption In Turkey. *Iosr Journal Of Economics And Finance (Iosrjef)*, 9(6), 1-8.
- Barth, J. L., Worrell, R. A., Crawford, J. M., Morris, J., and Ivarie, R. (1993). Isolation, Sequence, And Characterization Of The Bovine Myogenic Factor-Encoding Gene Myf-5. *Gene*, 127(2), 185-191.
- Bhuiyan, M., Kim, N., Cho, Y., Yoon, D., Kim, K. S., Jeon, J., and Lee, J. (2009). Identification Of Snps In Myod Gene Family And Their Associations With Carcass Traits In Cattle. *Livestock Science*, 126(1-3), 292-297.
- Braun, T., and Arnold, H. H. (1995). Inactivation Of Myf 6 And Myf 5 Genes In Mice Leads To Alterations In Skeletal Muscle Development. *The Embo Journal*, 14(6), 1176-1186.
- Braun, T., Buschhausen- Denker, G., Bober, E., Tannich, E., and Arnold, H. (1989). A Novel Human Muscle Factor Related To But Distinct From Myod1 Induces Myogenic Conversion In 10t1/2 Fibroblasts. *The Embo Journal*, 8(3), 701-709.
- Carvajal, J. J., Keith, A., and Rigby, P. W. (2008). Global Transcriptional Regulation Of The Locus Encoding The Skeletal Muscle Determination Genes Mrf4 And Myf5. *Genes & Development*, 22(2), 265-276.
- Daskiran, I., and Koluman, N. (2014). Goat Breeds Of Turkey And Their Specific Characteristics. *The Proceedings Of The European Regional Conference On Goats (Ercg 2014)*, Debrecen, Hungary.
- Daşkiran, İ., ve Ertuğrul, M. (1994). Sütten Kesim Çağında Besiye Alinan Ankara Keçisi Erkek Oğlaklarının Besi Performansı Ve Karkas Özellikleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 34(1-2), 59-78.
- Daşkiran, İ., Koluman, N., ve Konyali, A. (2012). Keçi Yetiştirme. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü.
- Elmaz, O., Akbas, A. A., and Saatci, M. (2017). Effects Of Birth Type On Growth, Fattening Performance And Carcass Characteristics In Honamli Male Kids.
- Everest, Ö. Ü. B., and Tan, A. S. P. D. S. (2019). Türkiye’de Tarım Sektöründe Son 10 Yılda Meydana Gelen Değişimlerin İncelenmesi. *Cataloging-In-Publication Data*, 149.
- Fahey, A., Brameld, J., Parr, T., and Buttery, P. (2005). The Effect Of Maternal Undernutrition Before Muscle Differentiation On The Muscle Fiber Development Of The Newborn Lamb. *Journal Of Animal Science*, 83(11), 2564-2571.
- Gönenç, S. (2020). Ankara (Tiftik) Keçilerinin Yitiriliş Öyküsünden Bir Kesit. *Ankara Araştırmaları Dergisi*, 8(2), 253-267.
- Greenwood, P., Gardner, G. E., and Hegarty, R. (2006). Indices Of Cellular Development In Muscles Of Lambs Are Influenced By Sire Estimated Breeding Values And Pastoral Nutritional System. *Australian Journal Of Agricultural Research*, 57(6), 651-659.
- Handel, S., and Stickland, N. (1988). Catch-Up Growth In Pigs: A Relationship With Muscle Cellularity. *Animal Science*, 47(2), 291-295.
- Huang, J., Jiao, J., Tan, Z.-L., He, Z., Beauchemin, K. A., Forster, R., Zhou, C. (2016). Inferring The Skeletal Muscle Developmental Changes Of Grazing And Barn-Fed Goats From Gene Expression Data. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 64(36), 6791-6800.

- Hughes, S., and Schiaffino, S. (1999). Control Of Muscle Fibre Size: A Crucial Factor In Ageing. *Acta Physiologica Scandinavica*, 167(4), 307-312.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., & Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 Determines Skeletal Muscle Identity In Myf5: Myod Double-Mutant Mice. *Nature*, 431(7007), 466-471.
- Kuran, M., Şen, U., Şirin, E., and Ulutaş, Z. (2012). Maternal Undernutrition During Mid-Pregnancy Affects Muscle Cellular Characteristics Of Lambs. The Book Of Abstracts Of 63th Annual Meeting Of Eaap.
- Liu, M., Peng, J., Xu, D.-Q., Zheng, R., Li, F.-E., Li, J.-L., Deng, C.-Y. (2008). Association Of Myf 5 And Myod 1 Gene Polymorphisms And Meat Quality Traits In Large White× Meishan F2 Pig Populations. *Biochemical Genetics*, 46, 720-732.
- McIlveen, H., and Buchanan, J. (2001). The Impact Of Sensory Factors On Beef Purchase And Consumption. *Nutrition & Food Science*, 31(6), 286-292.
- Natrass, G., Quigley, S., Gardner, G. E., Bawden, C., McLaughlan, C., Hegarty, R., & Greenwood, P. (2006). Genotypic And Nutritional Regulation Of Gene Expression In Two Sheep Hindlimb Muscles With Distinct Myofibre And Metabolic Characteristics. *Australian Journal Of Agricultural Research*, 57(6), 691-698.
- Patel, A. K., Tripathi, A. K., Patel, U. A., Shah, R. K., & Joshi, C. G. (2014). Myostatin Knockdown And Its Effect On Myogenic Gene Expression Program In Stably Transfected Goat Myoblasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 50, 587-596.
- Polin, R. A., & Abman, S. H. (2011). Fetal And Neonatal Physiology. *E-Book: Elsevier Health Sciences*.
- Robakowska-Hyżorek, D., Oprządek, J., Żelazowska, B., Olbromski, R., & Zwierzchowski, L. (2010). Effect Of The G. 723g T Polymorphism In The Bovine Myogenic Factor 5 (Myf5) Gene Promoter Region On Gene Transcript Level In The Longissimus Dorsi Muscle And On Meat Traits Of Polish Holstein-Friesian Cattle. *Biochemical Genetics*, 48, 450-464.
- Sen, U., Şirin, E., Ensoy, U., Aksoy, Y., Ulutaş, Z., & Kuran, M. (2015). The Effect Of Maternal Nutrition Level During Mid-Gestation On Postnatal Muscle Fibre Composition And Meat Quality In Lambs. *Animal Production Science*, 56(5), 834-843.
- Siqin, Q., Nishiumi, T., Yamada, T., Wang, S., Liu, W., Wu, R., & Borjigin, G. (2017). Relationships Among Muscle Fiber Type Composition, Fiber Diameter And Mrf Gene Expression In Different Skeletal Muscles Of Naturally Grazing Wuzhumuqin Sheep During Postnatal Development. *Animal Science Journal*, 88(12), 2033-2043.
- Soumilion, A., Rettenberger, G., Vergouwe, M., Erkens, J., Lenstra, J., and Te Pas, M. (1997). Assignment Of The Porcine Loci For Myod1 To Chromosome 2 And Myf5 To Chromosome 5. *Animal Genetics*, 28(1), 37-38.
- Şirin, E. (2019). Fertility Characteristics Of Hair Goats In Tokat Province. *Turkish Journal Of Agriculture-Food Science And Technology*, 7(7), 955-957.
- Tamur, E. (2003). Ankara Keçisi Ve Ankara Tiftik Dokumacılığı: Tükenen Bir Zenginliğin Ve Çöken Bir Sanayinin Tarihsel Öyküsünden Kesitler. Ankara Ticaret Odası Yayınları.
- Ujan, J., Zan, L., Ujan, S., & Wang, H. (2011). Association Between Polymorphism Of Myf5 Gene With Meat Quality Traits In Indigenous Chinese Cattle Breeds. *Paper Presented At The International Conference On Asia Agriculture And Animal, Ipcbee*.

- Verner, J., Humpolíček, P., and Knoll, A. (2007). Impact Of Myod Family Genes On Pork Traits In Large White And Landrace Pigs. *Journal Of Animal Breeding And Genetics*, 124(2), 81-85.
- Yanar, A., ve Akpınarlı, F. (2016). Geleneksel Ankara Sof Dokumaları. *Ankara Araştırmaları Dergisi*, 4(2), 170-179.
- Yilmaz, O., Kor, A., Ertugrul, M., & Wilson, R. T. (2012). The Domestic Livestock Resources Of Turkey: Goat Breeds And Types And Their Conservation Status. *Animal Genetic Resources/Resources Génétiques Animales/Recursos Genéticos Animales*, 51, 105-116.
- Zhang, R., Chen, H., Lei, C., Zhang, C., Lan, X., Zhang, Y., Wang, X. (2007). Association Between Polymorphisms Of Mstn And Myf5 Genes And Growth Traits In Three Chinese Cattle Breeds. *Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences*, 20(12), 1798-1804.
- Zhong, T., Jin, P. F., Dong, E. N., Li, L., Wang, L. J., and Zhang, H. P. (2013). Caprine Sex Affects Skeletal Muscle Profile And Mrfs Expression During Postnatal Development. *Animal Science Journal*, 84(5), 442-448.

ÖZ GEÇMİŞ

Büşra BAYRAK, Samsun Şehit Ahmet Altunoğlu 100. YIL Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümünden 28.06.2019 tarihinde mezun oldu. Aynı yıl OMÜ LEE Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Mezuniyetinden bu yana Yüksek Lisan öğrencisi olarak görev yapan orta derecede İngilizce bilmektedir. Bilgisayar işletmenliği, bilgisayar destekli muhasebe, biyosidal ürün uygulayıcı ve iş sağlığı ve güvenliği sertifikaları bulunmaktadır.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0001-8208-214X

Yayınlar:

1. Gökçek D, Bayrak B, Şen U. 2022. The Effect of Progestin Source on Some Reproductive Performance in Akkaraman ewes. BSJ Agri, 5(3): 281-287.
2. Bayrak B, Sen U. 2022. Determination of gene expression levels of myogenic factor 5 in Hair, Angora, Honamli and Kilis goat breeds. Proceedings Book of the VI. International Congress on Domestic Animal Breeding Genetics and Husbandry-2023, October 03-05, 2023, Samsun, Türkiye, 6: 10-15.
3. Bayrak B, Sen U. 2022. Seasonal effect on cellular muscle characteristics of Karayaka lambs. Proceedings Book of the II International Biology Congress, May 18-20, 2023, Bishkek, Kyrgyz Republic, 2: 119-129.