



**SIĞIRLARDA VERİM ÖZELLİKLERİNİ
ETKİLEYEN BAZI MOLEKÜLER MARKIR
POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİ VE
VERİMLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Zeynep SÖNMEZ

**Doktora Tezi
Zootečni Anabilim Dalı
Biyometri ve Genetik Bilim Dalı
Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR
2017
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SIĞIRLARDA VERİM ÖZELLİKLERİNİ ETKİLEYEN BAZI
MOLEKÜLER MARKIR POLİMORFİZMLERİNİN
BELİRLENMESİ VE VERİMLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Zeynep SÖNMEZ

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI
Biyometri ve Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**SIĞIRLARDA VERİM ÖZELLİKLERİNİ ETKİLEYEN BAZI MOLEKÜLER MARKIR
POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİ VE VERİMLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR danışmanlığında, Zeynep SÖNMEZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 06/10/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Zootekni Anabilim Dalı Biyometri ve Genetik Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mehmet TOPAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Yasemin ÖNER

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mehmet Ulaş ÇINAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 09.11./2017 tarih ve 44/13 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2015/399

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

SIĞIRLARDA VERİM ÖZELLİKLERİNİ ETKİLEYEN BAZI MOLEKÜLER MARKIR POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİ VE VERİMLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Zeynep SÖNMEZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı
Biyometri ve Genetik Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR

Siğirlarda verim özelliklerini etkileyen *ELF5* (E74-Like Faktör 5; Epitel-Spesifik ETS Faktör 5), *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein2; Kemik mineral yoğunluk proteini 2) ve *FGF21* (Fibroblast Growth Factor 21; Fibroblast Büyüme Faktör 21) genlerin moleküler markır polimorfizmlerini belirlemek amacıyla yapmış olduğumuz çalışmada Esmer siğirlara ait DNA örnekleri kullanılmıştır. Farklı bölgelere ayrılmış her bir gen için PCR analizleri uygulanmış, sonrasında Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM) yöntemi ile örnekler kümelerine ayrılmıştır. Her kümeden örnekler rastgele seçilerek sekans analizleri uygulanmış ve polimorfik bölgeler tespit edilmiştir.

ELF5, *FGF21* ve *BMP2* gen bölgeleri DNA dizi analizleri sonucu; *ELF5* geni 2. intron bölgesi için g.65825359 C/T, g.65825499 G/A transisyonları ve g.65825371 A delesyonu tespit edilmiş, *ELF5* geni 5. ekzon bölgesi için g.65825909 T/C, g.65826062 G/A, g.65826123 A/C, g.65826134 C/T ve g.65826138 T/C olmak üzere 5 farklı polimorfik bölge tanımlanmış, *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi için g.55834828 C/G polimorfik bölgesi ve *FGF21* 3. ekzon bölgesi için g.55836088 G/T ve g.55836007. C/A polimorfizmleri belirlenmiş, *BMP2* geni 2. ekzon bölgesinde g.49551963 T/C polimorfizmi ve *BMP2* geni 3. ekzon bölgesi için g.49551337 G/A, g.49551405 G/T, g.49551428 G/C, g.49551433 A/C ve g.49551449 T/G polimorfik bölgeleri tanımlanmıştır.

ELF5 geninin 2. intron bölgesi için tanımlanmış polimorfik bölgelerden g.65825371 -/A polimorfik bölgesi ile gerçek süt verimi (laktasyon süt verimi) ve pik süt verimi arasında, g.65825359 C/T polimorfizmi ile pik gün verim değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

ELF5 5. ekzon bölgesi, *BMP2* ve *FGF21* gen bölgeleri için belirlenmiş polimorfik bölgeler ile Esmer ırkı siğirına ait laktasyon süt verimleri, 305 günlük süt verimleri, günlük süt verimleri, laktasyon süreleri, pik süt verimleri, pik gün verimleri ve ortalama pik süt verimleri arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır ($P > 0.05$). Ancak, hayvan ıslahı alanında yapılacak farklı çalışmalarda, belirlenen polimorfik bölgelerin markır olabilme özelliklerinin araştırılması önerilmektedir.

2017, 155 sayfa

Anahtar Kelimeler: *ELF5*, *BMP2* ve *FGF21*, HRMA, polimorfizm, süt verimi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETERMINATION AND RELATIONSHIP OF SOME MOLECULAR MARKER POLYMORPHISMS AFFECTING PRODUCTION TRAITS IN CATTLE BREED

Zeynep SÖNMEZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science
Biometry and Genetics Department

Supervisor:: Assoc. Prof. Dr. Memiş ÖZDEMİR

In this study we aimed to determined molecular marker polymorphism in the *ELF5* (E74-Like Factor 5), *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein2) and *FGF21* (Fibroblast Growth Factor 21) which effected the performance traits of cattle. We are used as material the Brown Swiss breed DNA samples. PCR analysis were made for the three different genes and then DNA samples were clustered by High Resolution Melting Analysis (HRM) method and sequence analysis were applied to some of the samples in each different cluster and were defined its polymorphic regions.

In the result of DNA sequence analysis for *ELF5*, *FGF21* ve *BMP2* gene regions: for the 2. intron of *ELF5* gene; g.65825371A deletion, g.65825359 C/T and g.65825499 G/A transistions, for the 5. exon region of *ELF5* gene; G.65825909 T/C, g.65826062 G/A, g.65826123 A/C, g.65826134 C/T; and g. 65826138 T/C polymorphic region, for the 1. exon region of the *FGF21* gene; G.55834828 C/G polymorphic region, for the 3. exon region of *FGF21* gene; g.55836088 G/T and g.55836007 C/A polymorphisms, for the 2. exon region of *BMP2* gene; g.9551963. T/C polymorphism and for the 3. exon region of *BMP2* gene; g.49551337 G/A, g.49551405 G/T, g.49551428 G/C, g.49551433 A/C and g.49551449. T/G polymorphic regions were defined.

There was non-significant as statistically the relationship between the polymorphic regions determined for the *ELF5*, *BMP2* and *FGF21* gene and lactation milk yields, 305-days milk yields, daily milk yields, lactation times, peak milk yields, peak day yields and average peak milk yields of Brown Swiss breed ($P>0.05$). However, it is suggested to investigate the marker ability of polymorphic regions determined for future studies in the animal breeding.

2017, 155 pages

Keywords: *ELF5*, *BMP2* and *FGF21*, HRMA, polymorphism, milk yield

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı hazırlama sürecinde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, iyi bir çalışma ortamı sağlayan ve desteğini her an hissettiren çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi arz ederim.

Zootekni Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömer Cevdet BİLGİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın birçok aşamasında desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Sinan KOPUZLU hocama teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmanın gerçekleşmesi için laboratuvar destek ve imkanlarını sunan Sayın Doç. Dr. Bülent ÇETİN hocama teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım Esma YUCA'ya ve adlarını anamadığım çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eserin ortaya çıkmasında büyük katkısı olan Proje destekçisi BAP yönetim kurulu üyelerine teşekkür ederim.

Tüm hayatımız boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen öncelikle kardeşim Dr. Taha SÖNMEZ, Av. Serap SÖNMEZ'e ve ailemin diğer üyelerine, teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Zeynep SÖNMEZ

Eylül 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting Analysis).....	6
1.1.1. HRM analizi sınırlamaları	11
1.1.2. HRMA analizi ile yapılan çalışmalar	11
1.2. DNA Sekanslama	15
1.2.1. Shoutgun sekanslama	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
2.1. Fibroblast Büyüme Faktör 21; <i>FGF21</i> Geni	18
2.2. E74-Like Faktör 5; <i>ELF5</i>	20
2.3. <i>BMP2</i> ; Bone Morphogenetic Protein2 (Kemik Mineral Yoğunluk Proteini2) ...	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Sürü idaresi ve beslenmesi	26
3.1.1.a. Barındırma	26
3.1.1.b. Yemleme	26
3.1.1.c. Süt verim kontrolleri.....	27
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Hayvanlardan kan alımı.....	27
3.2.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	27
3.2.3. Kullanılan çözeltiler	28
3.2.4. Genomik DNA izolasyonu	28
3.2.5. DNA'nın kalitatif tayini	29
3.2.6. DNA'nın kantitatif tayini	30

3.2.7. PCR işlemi.....	30
3.2.8. Primer dizaynı	31
3.2.8.a. <i>FGF21</i> geni primerleri.....	31
3.2.8.b. <i>ELF5</i> Geni Primerleri	32
3.2.8.c. <i>BMP2</i> Geni primerleri	32
3.2.9. PCR amplifikasyonu.....	33
3.2.10. HRM analizi protokolü.....	33
3.2.11. HRM analiz verilerinin değerlendirilmesi.....	34
3.2.12. PCR ürünlerinin gözlenmesi	34
3.2.13. İstatistiksel analizler	35
3.2.14. DNA sekanslama	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1. DNA'nın Kantitatif Tayini	38
4.2. Gen Bölgelerinin PCR Optimizasyon Koşulları ve Jel Görüntüleri.....	38
4.3. HRM-PCR Analiz Sonuçları	40
4.3.1. Erime eğrisi grafikleri (Melt Curve)	41
4.3.2. HRMA ham veri ve Normalizasyon grafikleri.....	41
4.3.3. <i>FGF21</i> Geni HRM Analiz Sonuçları	42
4.3.3.a. <i>FGF21</i> geni Melt Eğrisi grafikleri.....	43
4.3.3.b. <i>FGF21</i> Geni HRMA Ham Veri ve Normalizasyon grafikleri	45
4.3.4. Kümeleme analizleri.....	49
4.3.4.a. <i>FGF21</i> geni kümeleme ve temel bileşenler analizi	49
4.3.5. <i>BMP2</i> geni HRM analiz sonuçları.....	55
4.3.5.a. <i>BMP2</i> geni 2. Ekzon Bölgesi Erime Eğrisi Grafiği.....	56
4.3.5.b. <i>BMP2</i> geni 3. Ekzon bölgeleri erime eğrisi grafiği.....	57
4.3.5.b. <i>BMP2</i> geni HRMA ham veri ve Normalizasyon grafikleri.....	58
4.3.6. <i>ELF5</i> geni HRM analiz sonuçları.....	67
4.3.6.a. <i>ELF5</i> geni erime eğrisi grafikleri (Melt curve)	68
4.3.6.b. <i>ELF5</i> Geni HRMA Ham Veri ve Normalizasyon Grafikleri	71
4.3.6.c. <i>ELF5</i> geni kümeleme verileri ve temel bileşenler analizi	75
4.4. Gen Bölgeleri Sekans Analizleri ve Verimle İlişkilendirme Sonuçları	82
4.4.1. <i>ELF5</i> geni sekans analizi sonuçları	82

4.4.1.a. <i>ELF5</i> 2. intron bölgesi	83
4.4.1.b. <i>ELF5</i> 5. ekzon bölgesi.....	87
4.4.1.c. <i>ELF5</i> 6. ekzon bölgesi	95
4.4.2. <i>FGF21</i> geni sekans analizi sonuçları	95
4.4.2.a. <i>FGF21</i> 1. ve 2. ekzon bölgesi.....	96
4.4.2.b. <i>FGF21</i> 3. ekzon bölgesi	98
4.4.3. <i>BMP2</i> geni sekans analizi sonuçları	100
4.4.3.a. <i>BMP2</i> geni 2.Ekzon Bölgesi.....	100
4.4.3.b. <i>BMP2</i> geni 3. Ekzon-1. Bölgesi	101
4.4.3.c. <i>BMP2</i> geni 3. Ekzon-2. Bölgesi	101
4.4.4. <i>ELF5</i> Geni Verimle İlişkilendirme Analizi Sonuçları	108
4.4.4.a. <i>ELF5</i> 2. intron bölgesi	108
4.4.4.b. <i>ELF5</i> 5. ekzon bölgesi.....	115
4.4.3. <i>FGF21</i> Geni verimle ilişkilendirme analizi sonuçları.....	126
4.4.3.a. Gerçek süt verimi (Laktasyon süt verimi)	128
4.4.3.b. 305 günlük süt verimi.....	128
4.4.3.c. Günlük süt verimi	129
4.4.3.d. Laktasyon süresi (Sağım süresi).....	129
4.4.3.e. Pik süt verimleri.....	129
4.4.4. <i>BMP2</i> geni verimle ilişkilendirme analizi sonuçları	132
4.4.4.a. Gerçek süt verimi (Laktasyon süt verimi)	135
4.4.4.b. 305 günlük süt verimi.....	136
4.4.4.c. Günlük süt verimi	136
4.4.4.d. Laktasyon süresi (Sağım süresi).....	137
4.4.4.e. Pik süt verimleri.....	137
5. SONUÇ	141
KAYNAKLAR	147
ÖZGEÇMİŞ	156

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
APS	Adenosine 5' fosfosulfat
ATP	Adenozin Trifosfat
<i>BMP2</i>	Bone Morphogenetic Protein2 (; Kemik mineral yoğunluk proteini2)
Bp	Baz çifti (Nükleotid)
C	Sitozin
°C	Santigrat Derece
cDNA	Complementary DNA(Komplementer DNA)
Chr	Chromosome (Kromozom)
cM	santimorgan
dak	Dakika
dbSNP	SNP database (SNP veri tabanı)
ddH ₂ O	Double-distilled water
ddNTP	Dideoksinukleosit trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonukleosit Trifosfat
dsDNA	çift zincirli DNA
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<i>ELF5</i>	E74-Like Faktör5 (Epitel-Spesifik ETS Faktör 5)
EtBr	Ethydium Bromide (Etidyum Bromid)
ETS	E26 transformasyon-spesifik proteini
<i>FGF21</i>	Fibroblast Growth Factor21 (Fibroblast Büyüme Faktör21)
G	Guanin
GWAS	Genome-wide association studies (Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları)
HRM	High Resolution Melting Analysis (Yüksek çözünürlüklü erime)
Kb	Kilo baz
KCl	Potasyum klorür
KDa	Kilodalton

Kg	Kilogram
LD	Bağlantı dengesizliği(linkage disequilibrium)
m	Metre
M	Molar
MAS	(Marker-Assisted Selection; Markır destekli seleksiyon)
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Messenger RNA (Mesajcı Ribo Nükleik asit)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
ORF	Açık okuma bölgesi
PCA	Principal Component Analysis (temel bileşenler analizi)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PPi	pirofosfat
QTL	(Quantatif trait locus; Kantitatif özellik lokusu)
Rf	Referans
rpm	Rotor Per Minute (Bir Dakikadaki Rotor Devir Sayısı)
SNP	Single Nucleotid Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism (Tek zincir konformasyon polimorfizmi yöntemi)
T	Timin
TBE	Tris Borik asit EDTA
T _m	Melting Temperature (Erime Sıcaklığı)
UV	Ultra violet (Ultra Viyole)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Esmer sığır ırkı	5
Şekil 1.2. Boya saturasyon modeli.....	8
Şekil 1.3. Tm sıcaklığı ve denatürasyon fazı	9
Şekil 1.4. DNA Melt Profini Gösteren Gerçek Zamanlı PCR Verileri.....	10
Şekil 4.1. <i>FGF21</i> gen bölgelerine ait PCR sonuçları.....	39
Şekil 4.2. <i>ELF5</i> gen bölgelerine ait PCR sonuçları	39
Şekil 4.3. <i>BMP2</i> gen bölgelerine ait PCR sonuçları	40
Şekil 4.4. <i>FGF21</i> geni 1. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği	43
Şekil 4.5. <i>FGF21</i> geni 2. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği	44
Şekil 4.6. <i>FGF21</i> geni 3. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği	45
Şekil 4.7. A. <i>FGF21</i> geni 1. ekzon bölgesi ham HRMA grafiği, B. Normalizasyon grafiği	46
Şekil 4.8. a. <i>FGF21</i> geni 2. ekzon bölgesi ham HRMA grafiği, b. Normalizasyon grafiği	47
Şekil 4.9. a. <i>FGF21</i> geni 3. ekzon Ham HRMA grafiği, b. Normalizasyon grafiği.....	48
Şekil 4.10. <i>FGF21</i> geni 1.ekzon veri kümeleri.....	50
Şekil 4.11. <i>FGF21</i> geni 1. ekzon 3 boyutlu PCA analizi	51
Şekil 4.12. <i>FGF21</i> geni 2. ekzon bölgesi küme verileri	52
Şekil 4.13. <i>FGF21</i> geni 2.ekzon bölgesi 3 boyutlu temel bileşenler analizine göre örnekler çoklu dağılım göstermiştir	53
Şekil 4.14. <i>FGF21</i> geni 3.ekzon küme verileri;	54
Şekil 4.15. <i>FGF21</i> geni 3.ekzon bölgesi temel bileşenler analizi	55
Şekil 4.16. <i>BMP2</i> geni 2.ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği	56
Şekil 4.17. <i>BMP2</i> geni 3.ekzon-1. bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği	57
Şekil 4.18. <i>BMP2</i> geni 3.ekzon-2. bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği	58
Şekil 4.19. A. <i>BMP2</i> geni 2.ekzon bölgesi Ham HRMA grafiği B. Normalizasyon grafiği	59
Şekil 4.20. A. <i>BMP2</i> geni 3.ekzon-1.bölge ham HRM analiz grafiği. B. Normalizasyon grafiği	60

Şekil 4.21. A. BMP2 geni 3.ekzon-2.bölge ham HRM analiz grafiği,	
B. Normalizasyon grafiği	61
Şekil 4.22. BMP2 geni 2.ekzon bölgesi küme verileri.....	62
Şekil 4.23. BMP2 geni 2.ekzon bölgesi üç boyutlu temel bileşenler analizi	63
Şekil 4.24. BMP2 geni 3.ekzon-1.bölge veri kümeleri	64
Şekil 4.25. BMP2 geni 3.ekzon-1.bölgesi üç boyutlu temel bileşenler analizi.....	65
Şekil 4.26. BMP2 geni 3.ekzon-2.bölgesine ait veri kümeleri.....	66
Şekil 4.27. BMP2 geni 3.ekzon-2.bölgesi üç boyutlu temel bileşenler analizi.....	67
Şekil 4.28. ELF5 geni 2. intron bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği.....	68
Şekil 4.29. ELF5 geni 5. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği.....	68
Şekil 4.30. ELF5 geni 6. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği.....	69
Şekil 4.31. ELF5 geni 7.ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği.....	70
Şekil 4.32. A. ELF5 geni 2. intron bölgesi Ham HRMA grafiği B. Normalizasyon	
grafiği	71
Şekil 4.33. A. ELF5 geni 5.ekzon bölgesi Ham HRMA grafiği B. Normalizasyon	
grafiği	72
Şekil 4.34. A. ELF5 geni 6.ekzon bölgesi Ham HRMA grafiği B. ELF5 3. Bölge	
bölgesi için 78-83 °C aralığındaki normalizasyon grafiği	73
Şekil 4.35. A. ELF5 geni 7.ekzon bölgesi Ham HRMA grafiği B. Normalizasyon	
grafiği	74
Şekil 4.36. ELF5 geni 2. İntron bölgesi veri kümeleri.....	75
Şekil 4.37. ELF5 geni 2. intron bölgesi 3 boyutlu temel bileşenler analizi.....	76
Şekil 4.38. ELF5 geni 5. ekzon bölgesi küme verileri.....	77
Şekil 4.39. ELF5 geni 5. ekzon bölgesi 3 boyutlu temel bileşenler analizlerine göre	
örnekler çoklu dağılım göstermiştir.	78
Şekil 4.40. ELF5 geni 6. ekzon bölgesi küme verileri.....	79
Şekil 4.41. ELF5 geni 6. ekzon bölgesi temel bileşen analizlerine göre örnekler	
çoklu dağılım göstermiştir.....	80
Şekil 4.42. ELF5 geni 7. ekzon bölgesi küme verileri.....	81
Şekil 4.43. ELF5 geni 7. ekzon bölgesi üç boyutlu temel bileşenler analizi	82
Şekil 4.44. ELF5 2. intron bölgesi polimorfik sekans bölgeleri a. C/T, b. -/A, c. G/A ..	84

Şekil 4.45. <i>ELF5</i> 2. intron bölgesi g.65825359 C/T; CC, CT, TT genotipleri ve g.65825499 G/A; GG, GA AA genotipleri	86
Şekil 4.46. <i>ELF5</i> 5.ekzon bölgesi amino asit değişimleri	88
Şekil 4.47. <i>ELF5</i> 5. ekzon bölgesi polimorfik sekans dizileri a. T/C, b. G/A, c. A/C, d. C/T, e.T/C polimorfizmi	89
Şekil 4.48. <i>ELF5</i> 5. ekzon bölgesi polimorfik sekans dizileri	94
Şekil 4.49. <i>FGF21</i> 1. ekzon bölgesi amino asit dizisi	97
Şekil 4.50. <i>FGF21</i> 1. ekzon bölgesi C/G polimorfizmi.....	97
Şekil 4.51. <i>FGF21</i> 3.ekzon bölgesi amino asit dizilimi	99
Şekil 4.52. <i>FGF21</i> 3.ekzon bölgesi a.G/T, b.C/A polimorfizmi	99
Şekil 4.53. <i>BMP2</i> 2.ekzon bölgesi A. Amino asit dizi değişimi, B. T/C dizi polimorfizmi.....	101
Şekil 4.54. <i>BMP2</i> geni 3.ekzon-2.bölgesi a. G/A, b. G/T c. G/C, d. A/C, e. T/G polimorfizmi.....	103
Şekil 4.55. <i>BMP2</i> geni 3.ekzon-2.bölgesi polimorfik bölge genotipleri	105
Şekil 4.56. <i>BMP2</i> geni 3.ekzon-2.bölgesi amino ast dizi değişimleri	106

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>FGF21</i> geni primerleri.....	31
Çizelge 3.2. <i>ELF5</i> geni primer dizileri	32
Çizelge 3.3. <i>BMP2</i> geni primer dizileri	33
Çizelge 3.4. PCR bileşenleri ve reaksiyonda kullanılan miktarları	33
Çizelge 3.5. HRM-PCR reaksiyon bileşimleri ve reaksiyonda kullanılan miktarları	34
Çizelge 4.1. <i>FGF21</i> Geni PCR optimizasyon koşulları.....	38
Çizelge 4.2. <i>ELF5</i> Geni PCR optimizasyon koşulları	39
Çizelge 4.3. <i>BMP2</i> Geni PCR optimizasyon koşulları	39
Çizelge 4.4. HRM-PCR koşullarının optimizasyonu.....	41
Çizelge 4.5. <i>ELF5</i> 2. intron bölgesi polimorfizm dizileri.....	84
Çizelge 4.6. <i>ELF5</i> 2. intron bölgesi tek nükleotid değişimleri	85
Çizelge 4.7. <i>ELF5</i> 2. intron bölgesi polimorfik bölgeler allel ve genotip frekansları	86
Çizelge 4.8. <i>ELF5</i> 5. ekzon bölgesi polimorfik diziler.....	87
Çizelge 4.9. <i>ELF5</i> 5. ekzon bölgesi polimorfik bölgeler allel ve genotip frekansları	90
Çizelge 4.10. <i>ELF5</i> 5.ekzon bölgesi tek nükleotid değişimleri	92
Çizelge 4.11. <i>FGF21</i> 1. ekzon bölgesi polimorfik diziler	96
Çizelge 4.12. <i>FGF21</i> 3. ekzon bölgesi polimorfik diziler	98
Çizelge 4.13. <i>BMP2</i> geni 2.ekzon bölgesi polimorfik diziler.....	100
Çizelge 4.14. <i>BMP2</i> geni 3.ekzon-2.bölgesi polimorfik dizileri	102
Çizelge 4.15. <i>BMP2</i> geni 3.ekzon 2.bölgesi tek nükleotid değişimleri	107
Çizelge 4.16. <i>ELF5</i> geni 2. intron bölgesi farklı performans özelliklerine ait varyans analizi sonuçları.....	109
Çizelge 4.17. <i>ELF5</i> 2. intron bölgesi farklı verim özellikleri bakımından en küçük kareler ortalaması ve standart hataları	114
Çizelge 4.18. <i>ELF5</i> geni 5.ekzon bölgesi farklı performans özelliklerine ait varyans analizi sonuçları.....	115
Çizelge 4.19. <i>ELF5</i> 5.ekzon bölgesi farklı verim özellikleri bakımından en küçük kareler ortalaması ve standart hataları.....	122

Çizelge 4.20. <i>FGF21</i> geni 1.ekzon bölgesi farklı performans özelliklerine ait varyans analizi sonuçları.....	127
Çizelge 4.21. <i>FGF21</i> 1.ekzon bölgesi farklı verim özellikleri bakımından en küçük kareler ortalaması ve standart hataları.....	131
Çizelge 4.22. <i>BMP2</i> geni 3.ekzon-2. bölgesi farklı performans özelliklerine ait varyans analizi sonuçları.....	133
Çizelge 4.23. <i>BMP2</i> 3.ekzon-2. bölgesi farklı verim özellikleri bakımından en küçük kareler ortalaması ve standart hataları.....	139



1. GİRİŞ

Çeşitli verim özellikleri ile yaşamın her anında gereksinim duyulan çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde değişen ekonomik koşullar ve giderek artan küreselleşme hızı ile tüm dünyada, verim özellikleri yönünden çok yönlü ve daha verimli ırklar elde etme yönüne doğru gidilmektedir. Çiftlik hayvanlarında üretimi artırma, verim kalitesini yükseltme ve artan dünya nüfusuna karşı hayvansal potansiyeli artırmak amacıyla bilim insanları yeni genetik markırlar, biyo belirteçler ve moleküler analiz yöntemlerini geliştirmek için çalışmalar yapmaktadırlar. Bu amaçla tek genle kalıtılan monojenik karakterleri belirlemek amacıyla Linkaj (Bağlantı) haritaları, çevre ve genlerin etkisiyle kalıtılan çoklu fenotipleri belirlemek amacıyla QTL (Quantatif trait locus; Kantitatif özellik lokusu) haritaları oluşturulmaktadır (Wang 2012).

Moleküler yöntem ve markırlara göre yapılan birey seçimine, Gen markır-QTL ilişkili seleksiyon denir. MAS (Marker-Assisted Selection; Markır destekli seleksiyon) yöntemi ekonomik açıdan büyük önem taşıyan hayvansal ve bitkisel verimlerin tespiti, hayvanların damızlık değerlerinin tahmini, tahmini progeny farklılıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. MAS tekniği ile ilgili hayvana ait verim kayıtları kullanılarak belli özelliklerin ıslahı yönünde özellikle cinsiyete bağlı ve düşük kalıtım dereceli verimlerin seçimini kolaylaştırdığı için, üstün özelliklere veya istenilen özelliğe sahip elit bireylerin seçimine yönelik hayvan ıslahı tekniğinde büyük kolaylık sağlamaktadır (Karsi *et al.* 2000; Drogemuller *et al.* 2001). Geleneksel ıslah metotlarıyla kullanılan MAS yöntemi jenerasyon aralığını kısaltarak, genetik ilerlemeyi hızlandırmakta ve doğru yönde ilerleme sağlayarak karmaşık özelliklerin tespitinde etkili olmaktadır.

Linkaj haritaları bir bireyde gözlenen genleri veya parçalara ayrılmış genetik lokusları incelemede yaygın olarak uygulanmaktadır. Temelde pedigrî bilgilerine dayanarak, belirlenen genetik markırlar ile aile üyeleri tarafından kalıtılan genetik bölgeleri daraltma uygulamalarının yanı sıra linkaj bağıntıları ile tanımlanan genler yardımıyla majör genetik hastalıkların tanımlanması (parametrik linkaj) ve kompleks hastalıkların (serbest

model yada non-parametrik linkaj) tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Khatkar *et al.* 2008; Wang 2012). Hem moleküler hem de istatistik analiz süreçlerini kapsayan bu teknikte öncelikle istenilen kantitatif özelliği taşıyan gen bölgeleri seçilerek markır lokuslarının kromozom boyunca birbirlerine göre mesafeleri ve yönleri cM olarak bulunup işaretlenerek genoma ait genetik linkaj (bağlantı) grupları belirlenmekte ve genom dizi haritaları veya Genetik Bağlantı Haritaları (Linkage Mapping) çıkartılmaktadır (Dawn and Barrett 2005).

İlişkilendirme çalışmaları popülasyon bazında (durum/kontrol veya kantitatif özellikler belirlenerek) veya pedigrî analizlerine bağlı olarak dengesiz geçiş testleri ile aday genlerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Linkaj haritalarıyla karşılaştırıldığında popülasyon genelinde mayotik rekombinasyon sonucu oluşan kromozomların küçük bölgelerinde lokalize olmuş genetik sinyallerden elde edilen bilgi pedigrî analizlerinde elde edilecek bilgiden daha fazla yarar sağlamaktadır.

Polimorfizm temel anlamıyla kişiler ve popülasyonlar arası DNA dizisindeki farklılıklar olarak tanımlanmaktadır. Bir lokusta birden fazla allelin bulunması şeklindeki DNA nükleotid değişimlerine polimorfizm denilmektedir. Allellerin genel popülasyondaki kromozomların %1'inden fazlasında bulunması "genetik polimorfizm", Allelik sıklığı %1'den küçük olması durumunda "genetik mutasyonlar" şeklinde tanımlanmaktadır. Polimorfizmi mutasyondan ayıran görülme sıklığındaki farklılıklardır. Mutasyonlar polimorfizmlere göre çok daha nadir görülürler ve farklı popülasyonlarda polimorfizm sıklığı değişken olabilmektedir. Polimorfizmler genlerin regülatuar (düzenleyici) bölgelerinde bulunmaları halinde genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotipik değişikliklere neden olabilmektedir (Özden ve Emir 2006; Bozkaya 2009).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (Genome-wide association studies; GWAS) ortak genetik varyantlara sahip çok sayıdaki bireylerle bu bireylerin kantitatif özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemektedir (Höglund *et al.* 2014). Organizmaların genomlarının sekanslanması, kapsamlı SNP (Single nucleotide polymorphism; Tek nükleotid polimorfizmi) verilerinin geliştirilmesi ve genotip tanımlama teknolojilerindeki

ilerlemeler sayesinde tüm genomda genetik ilişkilendirme haritaları çıkarılabilmektedir (Schlötterer *et al.* 2014). İlk GWAS çalışması 2005 yılında Klein ve arkadaşlarının insanlarda körlüğe neden olan yaşla bağlantılı olarak makular dejenerasyona neden olan AMD (Age-related macular degeneration) geni, yaklaşık 100.000 SNP ile ilişkilendirilerek tam olarak tespit edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Sığırlar üzerinde 574 farklı özelliği gösteren 799 farklı yayından alınmış toplam 29 kromozom ve X kromozomu üzerinde olmak üzere toplam 99,652 QTL tanımlanmıştır (Hu *et al.* 2016). Bunlardan süt protein oranı ile ilgili 16,390, sütteki yağ oranı ile ilişkili 13,391, sütteki yağ yüzdesi için 3,243 ve süt verimi ile ilişkili 3,764, sütün oluşmasında etkili 296 olmak üzere sütle ilişkili toplam 34,927 QTL tanımlanırken, kan parametreleri, hastalığa dirençlilik, genel sağlık parametreleri, mastisit, organ hastalıkları, parazit dirençliliği gibi sağlık verileri ile ilişkili 3,217, et ve karkas özellikleri ile ilgili; anatomi, karkas kalitesi, kimyası ve yağ oranı, yağ asidi içeriği, et/yag oranı, etin tadı, sululuk oranı gibi duyuşal karakterleri içeren, duyuşal özellikler dahil 4,171, sığırlarda üretimi etkileyen 12,679, üreme özellikleri için 35,565 ve deri rengi, davranış özellikler, gibi dış faktörlerin etkili olduğu özellikler bakımından 9,093 QTL belirlenmiştir (Hu *et al.* 2016). Model organizma olarak kullanılan fareler üzerinde yapılan gen knock-out, knock-down gen susturma ve transgen çalışmaları sonucu meme bezlerinde laktasyonu, meme bezi epitel hücrelerini ve mastitisi etkileyen 166 genotip tanımlanmıştır (Ron *et al.* 2007). Tanımlanan yeni genler ve yapılan yeni araştırmalar sonucu meme bezini etkileyen genler markır olarak seçilerek çiftlik hayvanlarında seleksiyon amaçlı kullanılmaları mümkün olmuş ve özellikle sığırlarda yeni gen haritalarının QTL bölgelerinin tanımlanmasında kolaylık sağlamıştır.

DNA üzerinde bulunan polimorfik bölgelerin tespiti amacıyla birçok moleküler yöntem geliştirilmiştir ve bu yöntemlerden bazıları; DAF DNA (Amplification Fingerprinting: Çoğaltılmış DNA Parmak izi), RAPD (Randomly Amplified Polymorphism: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), S-SAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism), SSR (Microsatellites or Simple Sequence Repeat: Basit Dizi Tekrarı),

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat: Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats: Değişken Sayılı Bitişik Tekrarlar), STS (Sequence Tagged Sites: Etiketlenmiş Dizi Bölgesi), SCAR (Sequence Characterized Amplification Region: Baz Dizilimi Belirlenerek Çoğaltılan DNA Bölgeleri), SAMPL (Sequence Amplification Of Microsatellite Polymorphic Loci), EST (Expressed Sequence Tag), SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), TRAP (Target Recognition Amplification Polymorphism), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), REMAP (RETransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism), MITES (Miniature Inverted Repeat Transposable Elements), Mikroarray, DarT (Diversity Array Technology), SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) yöntemleridir (Buckler and Thornsberry 2002). Geliştirilen bu moleküler tekniklerle, populasyonlarda genetik yapının tespiti, marker destekli seleksiyon çalışmaları, genetik haritalar, filogenetik analizler, ebeveyn ve cinsiyet tayini, hastalıkların tanıları, mutasyon taramaları yapılabilmektedir.

Anavatanı İsviçre'nin kuzey doğusundaki Schwyz bölgesi olan Esmer İsviçre sığır ırklarının kökeni *Bos Taurus* Brachicerostur (Briggs 1980). Esmer sığır ırk Avrupa'nın Kuzey ucuna, ekvatorial bölgelerin tropik ve subtropik kuşaklarından, İtalya'nın deniz kıyılarından Meksika ve Peru'nun 4500 m yüksekliğe varan farklı coğrafya ve iklim bölgelerinde yetiştirilmektedirler (Briggs 1980; Özhan 2012).

Son istatistiklere göre Türkiye'de yetiştirilen sığır sayısı 14 milyon 80 bin baş olup bunların içersinde kültür hayvanı sayısı yaklaşık 6.6 milyondur. İsviçre Esmeri sığır ırkına ait her yaşta olmak üzere melez ve saf ırkların sayısı 2.7 milyondur. (Anonim 2016b, Anonim 2016c).



Esmer sığır ırkı dişisi



Esmer sığır ırkı erkeği

Şekil 1.1. Esmer sığır ırkı (Anonim 2016a)

Esmer ırkı sığırların renk tonları gümüşü griden siyaha yakın koyu esmer tonuna kadar değişir. Sırtta açık renkte bir ester çizgisi bulunur. Kulak içindeki tüyler çoğunlukla beyaz ve uzun; dil ve burun ucu, kuyruk ucu, boynuz uçları siyahtır. Vücut bölgeleri arasındaki uyum çok düzgün ve vücut yapısı sağlam, kuvvetli, adaleli ve iridir (Anonim 2016b). Normal koşullarda ineklerde vücut ağırlığı 600-700 kg, boğalarda 1000-1200 kg'dır. Memenin karın duvarına bağlantısı ve meme yapısı uygun ve kuvvetlidir (Özhan vd. 2012; Anonim 2016a).

Esmer ırkı hayvanların süt verimleri Türkiye'de 3000 kg, sütteki yağ oranı ise %3.7 civarındadır. Esmerler yerli ırk ile melezleme yapıldığında süt verimi birinci melez kuşakta yerli ırklara göre %60 artmasından dolayı halk tarafından tercih edilmektedir (Anonim 2016c).

Esmer ırk sığırların değişik iklim bakım ve besleme şartlarına uyması nedeniyle dünyada geniş bir alana yayılmaları ve buralarda başarı ile yetiştirilmeleri esmer ırkların uyum kabiliyetlerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Yapılan araştırmalar neticesinde esmer ırklarının diğer kültür ırklarına göre güç şartlara daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

Nitekim Türkiye'de Kars yöresinden Ege bölgesine kadar farklı çevre koşullarında başarıyla yetiştirilmektedir (Anonim 2016b).

Bu çalışmada, sığırlarda verim özelliklerini etkileyen *ELF5* (E74-Like Faktör 5; Epitel-Spesifik ETS Faktör 5), *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein 2; Kemik mineral yoğunluk proteini 2) ve *FGF21* (Fibroblast Growth Factor 21; Fibroblast Büyüme Faktör 21) genleri üzerinde bazı moleküler markır polimorfizmlerini belirlemek amaçlanmıştır. Materyal olarak verim kayıtları mevcut ve birbirleriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan 96 adet Esmer ırkı sığır kan örneklerinden izole edilmiş DNA örnekleri kullanılmıştır. Herbir gen bölgesine ait tanımlanmış farklı bölgelerin PCR analizleri sonrasında Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM) yöntemi ile örnekler kümelere ayrılarak her kümeden örnekler seçilmiş, örneklerin bazılarında sekans analizleri uygulanmıştır. Sekans analizleri sonucunda belirlenen genler ve gen bölgelerinde yeni polimorfizmler tanımlanmış ve tanımlanan bu polimorfizmler ile mevcut verim kayıtları arasında ilişkilendirilme analizleri çalışması yapılmıştır.

1.1. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting Analysis)

Yüksek çözünürlüklü erime analizi, (HRMA; High Resolution Melting Analysis) real time PCR (Polymerase Chain Reaction; Polimeraz zincir reaksiyonu) teknolojilerinin gelişmesine bağlı olarak Ririe *et al.* (1997) tarafından mikro hacimlerde fluometre entegreli termal PCR cihazı kullanarak çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliğindeki SYBR Green I boyasının polimeraz zincir reaksiyonu boyunca floresans ışımaya özelliği ölçülmesi ile DNA erime eğrilerini tespit ettikleri çalışmayla ortaya konmuştur. Sıcaklık değişimine bağlı olarak değişen DNA erime eğrilerinin şekillerinin ve pozisyonlarının 2 C° derecenin altındaki sıcaklıklarda DNA içeriğindeki GC/AT oranındaki farklılığa, ürün baz uzunluğuna ve baz dizisine bağlı olarak değiştiğinin gözlenmesi ile Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRMA) tanımlanmıştır. Geliştirilmiş olan bu yeni yöntemle özellikle istenilen DNA ürünlerinin, jel elektroforezine olan ihtiyacı ortadan kaldırarak istenmeyen ürünlerden ayırt edilebilirliği sağlanmış, erime eğrilerinin analizi ile amplifikasyonun çift sarmallı DNA'ya özgü boyalarla izlendiği, ürünlerin komple

amplifikasyonu ve analizinin 15 dakikadan daha kısa bir sürede gerçekleştirilebildiği tespit edilmiştir (Ririe *et al.* 1997; Hecker *et al.* 1999).

HRM analizi, nükleik asit sekanslarındaki genetik varyasyonu belirlemek için kullanılan bir PCR sonrası analiz yöntemidir. Bu basit ve hızlı yöntem, PCR erime (T_m) eğrisi tekniklerini temel almaktadır ve ileri nesil gerçek zamanlı PCR cihazları ve yazılım programları ile birlikte geliştirilmiş çift zincirli DNA (dsDNA) bağlayıcı boyaların bulunması sayesinde etkinleştirilmiştir. HRM analizi ile numuneler sahip oldukları DNA dizilerinin bileşimine, uzunluğuna, GC içeriğine göre ayırt edebilmektedir (Herman *et al.* 2006; Kent *et al.* 2007).

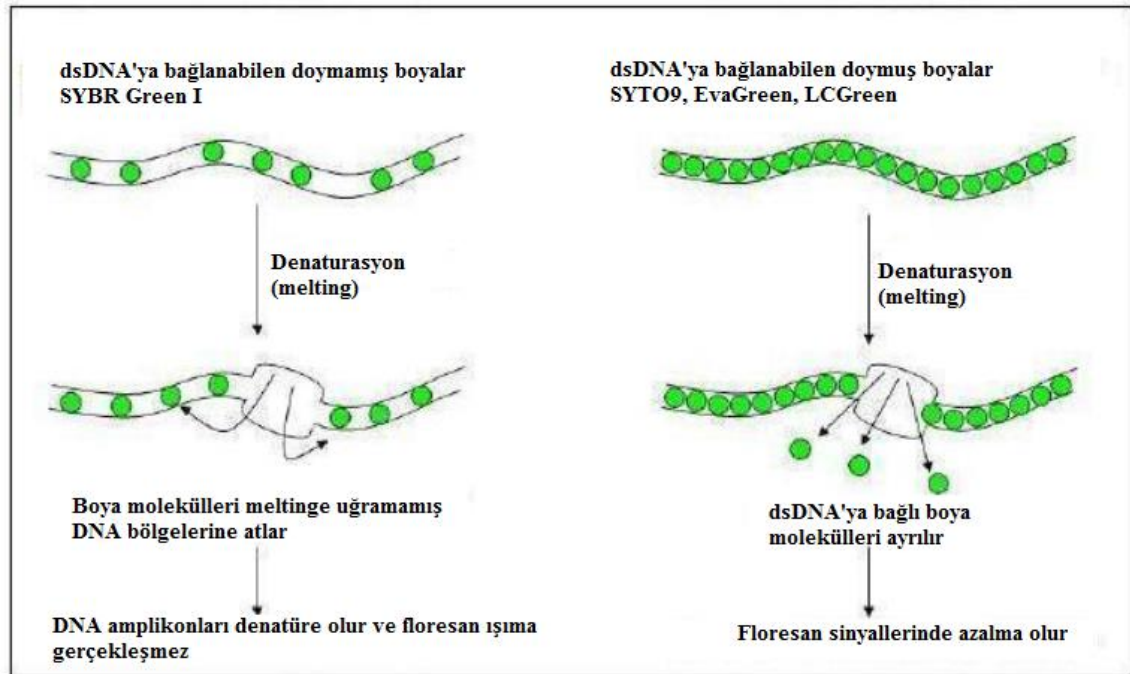
HRM analizi standart erime eğrisi analizinden farklıdır;

1. Kimyasal olarak HRM analizinde, yüksek konsantrasyonlarda PCR'yi engellemeyen daha parlak dsDNA bağlayıcı boyalar kullanılır.
2. HRM analizi için daha hassas, sıcaklık çözünürlüğünde daha fazla floresan veri noktası toplayan cihazlar gerektirir.
3. HRM analizinde standart erime eğrisinden farklı olarak belirli veri analizi algoritmalarını ve çizelgelerini kullanan daha özel yazılım programları kullanılır.

Çift zincirli DNA erime eğrileri genellikle floresanla işaretlenmiş primerler ve interkalasyon boya kullanılarak izlenir. Sadece çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliğinde olan interkalasyon boya PCR ile uyumlu bir konsantrasyonda dsDNA'nın sıcaklık artışına bağlı olarak denatürasyona uğradığı noktalarda salınır ve floresan yoğunluğu azalır. Geliştirilmiş gerçek zamanlı PCR cihazlarının salınan boya floresan yoğunluğunu ölçmesi ile nükleik asit zincirlerindeki varyasyonlar, mutasyonlar ve metilasyonlar belirlenmiş olur (Wojdacz and Dobrovic 2007; Malentacchi *et al.* 2009; Vossen *et al.* 2009).

HRM analizinin ilk uygulamalarında SYBR® Green boya kullanılırken, Herrmann *et al.* (2007) tarafından yapılan DNA ampikonlarının erime analizinde mutasyon taramaları

ve genotiplendirme amacıyla çapraz DNA saturasyon boyalarının ve HRM analiz cihazlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, SYBR® Green boyasının PCR amplikasyonu sırasında reaksiyon konsantrasyonu yeterli doygunluğa ulaşınca PCR amplikasyonlarını inhibe ettiği, 'boya sıçramasına' neden olup heterodubleks algılama hassasiyetini düşürdüğü öne sürülmüştür. Alternatif olarak kullanılmış LC Green Plus boyasının aynı koşullarda PCR reaksiyonunu inhibe etmediği ve tüm varyantların erime eğrilerinin ölçülebildiği gözlenmiştir.

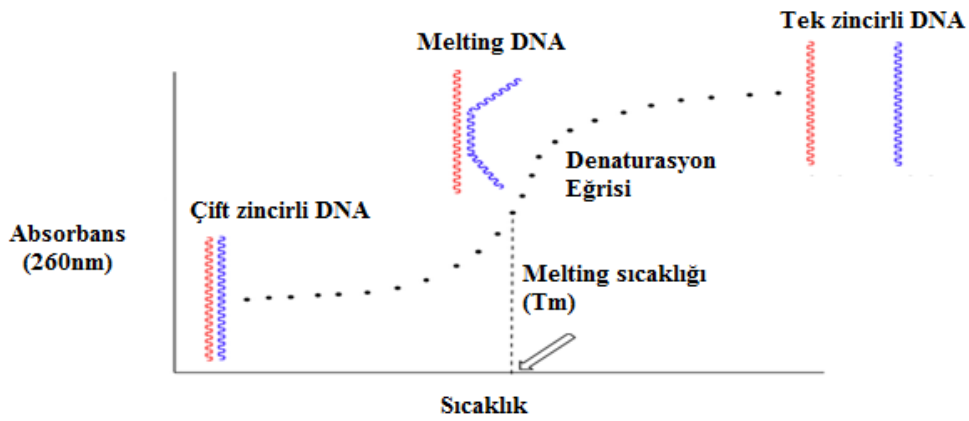


Şekil 1.2. Boya saturasyon modeli

Çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliğindeki doymamış boyalar, denatürasyona uğramış DNA zincirinden ayrılırken boya molekülleri denatüre olmamış DNA bölgelerine atlayarak yeniden çift zincirli DNA'ya bağlanır. Böylece floresan sinyalde değişiklik gözlenmez. LC-Green; LCGreen1, SYTO9, EvaGreen ve Light Cyclers 480 ResoLight gibi DNA bağlanma özelliğindeki satüre edici boyalar çift zincirli DNA moleküllerinin tümüne bağlanır ve erime aşamasında floresan şiddeti azalır.

Bu gelişmeler doğrultusunda ampikonların HRM analizleri için ilki LC-Green olmak üzere; LCGreen1(Idaho Technology Inc.), SYTO9 (Invitrogen, Carlsbad, CA), EvaGreens (Biotum) ve Light Cyclers 480 ResoLight (Roche, Indianapolis, IN) DNA bağlanma özelliğindeki satüre edici boyalar kullanılmaktadır (Wittwer *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2004; Herrmann *et al.* 2006).

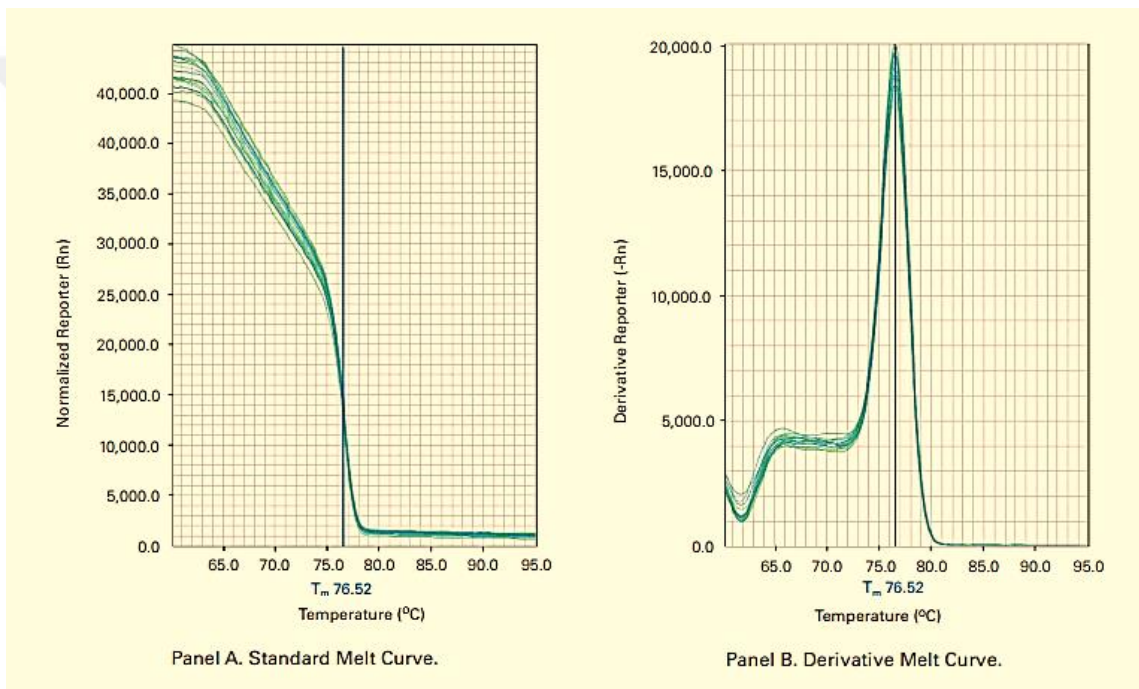
DNA zincirlerinin denatüre edilmeye başladığı noktada birbirine yakın etkileşimde bulunan bazlar UV ışıkları altında ışıma yapmayıp dalga boylarında değişim gözlenmez. Tek zincirli DNA'nın UV absorbans değeri çift zincirli DNA absorbans değerinden daha yüksektir. Tek zincirli DNA'nın UV absorbans etkisine DNA'nın hiperkromik etkisi (UV absorpsiyon $>260\text{nm}$) denilmekte iken çift zincirli DNA molekülünün baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları dsDNA'nın UV absorbansında azalma ile sonuçlanan bazların aromatik halkasının rezonans davranışını sınırlar. Birbirine yakın etkileşimdeki bazların UV absorbans değerleri $<260\text{nm}$ dalga boyundan küçük olur bu olaya DNA'nın hipokromik etkisi denilmektedir. Bu iki etki sayesinde DNA zincirinin UV absorbans değerleri belirlenmektedir (Hernandez *et al.* 2005; Buchvarov *et al.* 2007; Abramo *et al.* 2013).



Şekil 1.3. Tm sıcaklığı ve denatürasyon fazı

DNA'nın erime sıcaklığı, bir numunedeki DNA'nın %50'sinin çift sarmallı DNA'dan (dsDNA) tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) denatüre olduğu sıcaklık olarak tanımlanır ve genellikle sigmoid bir eğri şeklindedir ve x ekseninde "sıcaklık" dereceleri, y ekseninde

ise “floresan” değerleri çizilen eğrilerdir. Ergime sıcaklığı, erime eğrisinin ilk türevinin tepe noktası (dF / dT) belirlenerek hesaplanabilir. DNA çift zincirine bağlanan floresan ışıma yapabilen boyaların çift zincirli DNA’nın denaturasyona uğrayarak tek sarmallı yapıya dönüştüğü evrede, DNA interkalasyon boyalarının DNA dizisinden salındığı evre DNA erime eğrisi olarak tanımlanmaktadır. Floresanstaki değişim oranının en fazla olduğu eriyik fazının orta noktası, analiz altındaki belirli DNA parçasının erime sıcaklığını (T_m) tanımlar (Su *et al.* 2012).



Şekil 1.4. DNA Melt Profini Gösteren Gerçek Zamanlı PCR Verileri

A: Tüm ürünler standart erime eğrisi. B: Eğim üzerindeki giriş noktasını erime piki olarak gösteren erime eğrisi türevi grafiği (Reed *et al.* 2007).

Tüm ürünler çift sarmallı yapıya dönüşüp maksimum miktarda boya bağlandığında yüksek başlangıç floresansını gösteren standart bir erime eğrisi grafiğinde sıcaklık arttıkça PCR ürünleri denatüre olur, boya serbest bırakılır ve floresan sinyali düşer. Grafikte görülen dikey çizgiler, numunedeki PCR ürünlerinin %50'sinin denatüre edildiği erime eğrisi noktasını göstermektedir (Reed *et al.* 2004).

HRM Analizi; DNA metilasyon analizi, DNA haritalama, tür tanımlama, mutasyon tarama, aday yatkınlık genlerinin tanımlanması, ilişkilendirme çalışmaları (genotipi-fenotip karşılaştırması), bir popülasyonda veya alt grupta allel dağılımlarının saptanması, heterozigotluk kaybı taraması, DNA parmak izi, haplotip bloklarının karakterizasyonu, çevresel faktörlerle oluşmuş somatik mutasyon oranlarının belirlenmesi, HLA tiplendirilmesi gibi uygulamalarda kullanılmaktadır (White and Potts 2006).

1.1.1. HRM analizi sınırlamaları

HRM analizi, çok büyük ekzonlarda, büyük insersiyon delesyon bulunan genlerde ve ekzonların silinmesi durumunda, tüm bir ekzonu kapsayan mutasyonları algılayamamaktadır (Er and Chang 2012).

HRM analizi için genellikle 100-300 bp'lik ampikon uzunlukları önerilir. Duyarlılık ve özgüllük 400 bp'den düşük ampikonlar için %100 iken, 400-1000 bp büyüklüğündeki PCR ürünlerinde HRM analiz hassasiyeti %96'ya düşmektedir (Chou *et al.* 2005; Daniels *et al.* 2012).

HRM analizinin doğru bir şekilde gerçekleşmesi için güçlü ve hassas HRM yapabilen cihazlar kullanılmalıdır, seçilecek sature edici boyaların konsantrasyonu uygun doygunluğa ulaşmadığında erime eğrileri gözlenmemektedir.

HRM analizinin en büyük avantajı tekrarlanabilir olmasıdır. Bununla birlikte, PCR sonrasında başlangıçtaki nükleik asit kalıplarında veya ampimer konsantrasyonlarında farklılıklar varsa tekrarlanabilirlik oranı düşük olabilmektedir.

1.1.2. HRMA analizi ile yapılan çalışmalar

Yüksek çözünürlüklü Erime Analizi ile Tek-Nükleotid Polimorfizm taramasının duyarlılığı ve özgüllüğünün araştırılması amacıyla DNA havuzundan seçilmiş 800-1000

bp uzunluğunda ve %40, %50, %60 oranında GC içeren M13, λ ve pBR322 plazmidleri kullanılarak heterodupleks DNA analizi ve SSCP analizleri yapılmıştır. Yapılmış analizler sonucu heterodupleks analizinin duyarlılığının PCR ürünü uzunluğu veya SNP pozisyonunun belirgin bir etkisi olmadan %92 olduğu, SSCP analizinin sensitivitesi %94 iken, heterodupleks analizi daha güvenilir ve sağlam olarak kabul edilmiştir. Buna karşılık, yüksek çözünürlüklü erime analizinin hassasiyeti, 1000 bp'ye kadar PCR ürünleri içeren bir veri seti içinde SNP belirleme duyarlılığı %98 oranında belirlenmiştir (Reed and Wittwer 2007).

Son zamanlarda mutasyon taramalarında yaygın olarak kullanılan yüksek çözünürlüklü erime analizinin (HRMA) farklı rutin klinik ortamlarda DNA dizilemesine kıyasla insan mutasyonları taramalarında HRMA'nın tanısal doğruluğu araştırılmıştır. Bu amaçla HRM çalışmaları yapılmış 195 yayın arasından HRMA'nın doğruluğunu değerlendiren otuz dört çalışma meta-analize dahil edilmiş ve HRMA'nın insanlardaki hastalıkla ilişkili mutasyonları saptamada oldukça hassas bir test olduğu (%97.5) belirtilmiştir (Li *et al.* 2011).

Genomik çalışmalar sıklıkla epigenetik markırların analizi, özellikle CpG dinükleotitlerinde gen ekspresyonu, genetik baskılama ve kanser ile ilgili metilasyon işlemlerini içerir. Bu prosedürlerin çoğu genomik DNA daki bisülfid bağlarının metilasyona uğramamış sitozin bazını urasil bazına dönüştürmesi oluşturur. HRM analizi ile metilasyona uğramamış CpG bölgelerinin kontrol grubu olarak kullanılarak metilasyon bölgelerinin belirlenmesi (Worm *et al.* 2001), erime problemleri kullanılarak Urasil bazına dönüşmüş sitozin bazlarının miktarı belirlenerek metilasyon oranları tespit edilmiştir (Maat *et al.* 2007).

Kanser hastalarında, DNA metilasyonunun hızlı ve doğru bir şekilde ölçülmesi için diferansiyel-yüksek çözünürlüklü erime analizine (D-HRMA) dayanan optimize edilmiş metilazasyonsuz ve metilazasyonlu primerlerin kullanıldığı çalışmada HRM analizi sonrası erime eğrilerine göre differansiyel floresan miktarının ölçülmüştür. Analizler

sonucu 85 hastada *hTERT* ve *BCL2* genlerinin DNA metilasyonuna uğradığı belirlenmiştir (Wojdacz and Dobrovic 2007).

Prostat kanserli hastalarda HRM analizi ile DNA metilasyonunun ölçüldüğü farklı bir çalışmada *MGMT* geninin promotor bölgesinde %0.1 oranında DNA'nın metilasyona uğradığı böylece HRMA analizinin kanser teşhislerinde ucuz, pratik ve hızlı tanı konulmasında uygulanabilirliği ortaya konmuştur (Malentacchi *et al.* 2009).

Ribozomal genler ve diğer belirleyici genler kullanılarak mikroorganizmaların tanımlanmasında HRM analizi kullanılmıştır. HRM tekniği kullanılarak yapılmış mikroorganizmaların tür tanımlanması çalışması ile *Mycobacterium chelonae-M. Abscessus* türleri tanımlanmış (Odell *et al.* 2005), farklı bir çalışmada ribozomal RNA'nın 100 bp'lik alt birimi kullanılarak HRM analiz yöntemiyle *Cryptococcus neoformans var. grubii*, *Cryptococcus neoformans var. neoformans*, ve *Cryptococcus gattii* mantar türleri tanımlanmıştır (Gago *et al.* 2011).

HRM analizi, tek bir lokusta bulunan allellerin çözülmesinde kullanılabilir. Bu amaçla kanatlılarda taşıyıcı olan kanatlı adenovirus (FAdV) serotipleri HRM analizi ile 897 bp'lik geniş bir HRM eğrisi elde edilerek virüs genotiplendirilmiştir (Steer *et al.* 2009).

Multilokuslu-HRM temelli mikrobiyal genotiplendirme yöntemlerinin geliştirilmesi ile allellik durumlar arasındaki bağlantıyı tamamlayamamış rekombinojenik türlerin çözülmesini ve tanımlanmasında kullanılır. Bakteriyel tiplendirmede kullanılan multilokuslu dizi tiplendirmesi (MLST) fragmentlerin iç kısımlarının HRM analizine dayanır (Tong and Giffard 2012). Bu yöntemle belirlenmiş 6 çoklu bölge arasından 268 melting tipi arasından *S. aureus* STs suşu, farklı bir çalışmada 231 melting tipinden *Enterococcus faecium* bakterisi tanımlanmıştır (Lilliebridge *et al.* 2011; Tong *et al.* 2011).

HRM yöntemi ile büyük baz dizilimine sahip çoklu ekzonlar içeren genler içinde nadir bulunan SNP'lerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla 13 ekzon içeren X kromozomuna ile bağlantılı kronik granümatöz hastalığına neden olan *CYBB* (Cytochrome B-245 Beta Chain) geninin varyantları tanımlanmıştır (Erali and Wittwer 2010). Amplikon erime analizi ile etiketlenmemiş prob kullanılarak *APOE* (apolipoprotein E) geninde 10 farklı allel tanımlanmıştır (Vossen *et al.* 2009).

Tindall *et al.* (2009) incelemiş oldukları 8 gende; *SERPINA1*, *CXCR7*, *MBL*, *VDR*, *NKX3A*, *NPY*, *TP53*, ve *HRAS* genlerinde LC Green PLUS ve LightCycler 480 DNA saturasyon boyları kullanılarak HRM analizi ile 10 farklı varyant tanımlanmış 5/8 (%63) oranında tekli heterozigot ve 2/2 (%100) çift heterozigot varyantların yabancı tip genotiplerden ayrıldığı bildirilmiştir.

Van Der Stoep *et al.* (2009), *BRCA1* geninde tanımlı SNP'leri kolay ve hızlı bir yöntemle belirlemek amacıyla; erime eğrisi problemlerini geliştirme, bir dizi varyant ekranını tasarlama, HRMA'nın laboratuvarlar arası ayrıntılı bir değerlendirme ve yeni genler için bir tarama tekniği olarak uygulanması için bir çalışma yapmışlar ve 28 hasta üzerinde %98 özgüllükte %100 algılama hassasiyeti ile belirlenmiş *BRCA1* geninde yeni HRMA protokolü hazırlamışlardır.

HRMA analizi ile iki saat içerisinde, heteroplazmik yapıda olduğu için karmaşık olan ve varyant allel yüzdeleri farklı olan 16.6 kb'lık insan mitokondriyal DNA'sı taranmıştır (Dobrowolski *et al.* 2009).

Liew *et al.* (2004) tarafından, Faktör V (Leiden) 1691G>A, protrombin 20210G>A, metilenetetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) 1298A>C, hemokromatozis (HFE) için küçük amplikonlar kullanılarak SNP tanımlamada HRM analizinin kullanılabilirliği araştırılmış ve 38-50 baz uzunluğundaki amplikonların genotipleri ayırmada etkili olduğu belirlenmiştir. Kısa amplikonların yanı sıra uzun baz uzunluğuna sahip amplikonlar SNP genotiplendirme de kullanılmaktadır. Uzun PCR ürünleri kullanılarak 1-5 ve 15. insan

trombosit antijenleri (amplikon uzunlukları 160-280 bp) tanımlanmıştır (Liew *et al.* 2006).

Homozigot yabancı tip ve mutant insan trombosit antijeni örnekleri 0.3 ile 1°C arasında değişen tek pikler üretirken, heterozigot varyantlar HRM erime eğrilerinin şekliyle kolaylıkla tanımlanmış böylece yüksek çözünürlüklü erime analiziyle insan trombosit antijen genotiplendirmesinin, geleneksel hibridizasyon problemleri kullanılarak genotipleme yöntemi ile karşılaştırıldığında uygulamasının daha kolay olduğu sonucuna varılmıştır (Liew *et al.* 2007).

1.2. DNA Sekanslama

DNA sekanslama gen ve genomu oluşturan nükleotid-baz dizilerinin belirlenmesi işlemine gen veya DNA sekanslama, kullanılan kimyasal ve biyolojik süreçlerle sekans işleminin gerçekleştirilmesi için uygulanan tekniklere ise DNA sekanslama teknikleri denilmektedir.

DNA sekanslama işlemi Sanger ve Coulson tarafından “DNA sekanslamanın artı ve eksisi” olarak adlandırdıkları yöntemde *Escherichia coli* DNA polimeraz I ve T4 bakteriyofajında DNA polimeraz enzimlerinin farklı şekilde nukleosit trifosfatları sınırlandırabildiğinin keşfedilmesi ile başlamıştır (Sanger and Coulson, 1975). İki yıl sonra Sanger *et al.* (Sanger *et al.* 1977), enzimatik polimerizasyonla oligonükleotid sekanslamayı gerçekleştirerek günümüzde birçok DNA sekanslama yöntemine ışık tutan zincir sonlandırma metodu veya dideoksinükleotid yöntemi olarak adlandırılan tekniğin bulunması ile sekanslama yöntemlerinde yeni bir çığır açmışlardır.

Sanger zincir sonlama metodunda PCR ile çoğaltılmış kalıp zincir DNA fragmentinin enzimatik reaksiyonlarla polimerize olacak şekilde sekansı bilinmeyen tamamlayıcı kalıp DNA ya komplementer olacak bir DNA zincirinin M13 gibi bir vektöre klonlanması ile uygulanmaktadır. Rekombinant M13 vektörüne P³², S³⁵ veya P³³ radyoaktif izotoplarla etiketlenmiş kısa bir oligonükleotid primerinin ve 3’pozisyonunda OH grubu taşımayan

terminatör ya da dideoksinukleosit trifosfat olarak adlandırılmış (ddNTP) modifiye dideosinukleositlerin klenov, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden herhangi biri kullanılarak ddNTP nükleositlerin zincir uzamasına dahil olması ile sekans analizi gerçekleştirir. Dizi analizi kalıp DNA zinciri, deosinukleotid bazları, polimeraz enzimi, modifiye dideoksinukleositlerden biri ve radyoaktif floresan etiketleyici taşıyan bir deoksinukleotid bazı içeren dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanarak gerçekleştirilir. Hazırlanmış olan reaksiyon tüplerinde modifiye ddNTP'lerden biri ile rastgele sonlanmış yeni DNA fragmentleri oluşur (Klug *et al.* 2000). Reaksiyon işlemleri tamamlandıktan sonra farklı büyüklükteki fragmentler denatüre poliakrilamid jel elektroforezinde dört paralel bant halinde yürütülür. DNA dizisi önce en hızlı hareket eden bant saptanarak zincirin sonlandığı en küçük DNA parçası belirlenir, okuma işlemi otoradyografide tüm bantlar okunmayacak şekilde üst üste gelinceye kadar devam ettirilir (Sanger *et al.* 1977). Günümüzde yapılan DNA dizileme işlemleri çoğunlukla Sanger zincir sonlandırma metoduna dayanmaktadır.

DNA sekanslamada kullanılan diğer alternatif sekanslama yöntemi Maxam ve Gilbert tarafından 1977'de tanımlanan çift zincirli DNA'nın kimyasal yıkılım prosedürüne dayanır. Maxam ve Gilbert tekniğinde çift zincirli DNA molekülünün 5'ucu P^{32} , S^{35} radyoaktif izotoplarla, merkaptopropil veya aminopropil bağlayıcılar, radyoaktif olmayan biyotin molekülleri ile etiketlenir, daha sonra reaksiyon ortamına dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek DNA kalıbının $90^{\circ}C$ 'ye kadar ısıtılarak çift zincirli DNA fragmentinin birbirinden ayrılması sağlanır (Maxam and Gilbert 1977). Birbirinden ayrılmış zincirler içerdikleri pürin ve pirimidin içeriklerine göre molekül ağırlığı büyük olan fragmnetin jel elektroforezinde daha yavaş hareket etmesi prensibine dayanarak iplikler saflaştırılır. Poliakrilamid jelden geçirilen fragmentler X-ray film kasetlerde muhafaza edilmektedir (Church and Gilbert 1984).

Maxam ve Gilbert tekniğinde birbirinden ayrılmış DNA iplikleri, restrüksiyon enzimleri ile dört parçaya ayrıldıktan sonra her bir parça adenin, sitozin, guanin ve timin pozisyonuna göre kimyasal ajanlar kullanılarak; bazların modifikasyonu, modifiye bazların şeker köprülerinin kırılması ve DNA zincirinin kullanılan kimyasallarla glikozid

bağlarını kopararak deoksiribozların serbest kalması aşamalarından oluşur. Pürinler arasındaki glikozid bağları dimetil sülfat reaktantı, primidinler arasındaki riboz şekeri ve nükleotidler arasındaki bağ hidrazin reaktifleri tarafından yıkılır. Piperidin kimyasal bazlar arasında fosfodiester bağlarını katalizleyerek bazların fosfat köprüleri ile birbirine tekrar bağlanmasını sağlar. Böylece kimyasal modifikasyon ve kesim işlemleri her iplik başına sadece tek bir kimyasal kırılma ile sonuçlanan reaksiyonlar ve bu reaksiyonların otoradyografide okunması ile zincir baz sekansı gerçekleştirilmiş olur (Gaastra 1985; Franca *et al.* 2002).

1.2.1. Shoutgun sekanslama

Tüm genom sekanslama projelerinde kullanılan BAC, YAC, HAC klonlama vektörlerinin 600-700 bp uzunluğunda nükleotidleri okuması zordur. Bu zorlukları gidermek için Shoutgun Sekanslama adı verilen teknikle büyük zincirli DNA fragmentlerinin sekanslaması; her seferinde 600-700 baz uzunluğunda küçük fragmentlerin vektörlerde klonlanıp kesim enzimleri ile 1-2 kb uzunluğunda daha küçük parçalara ayrılarak plazmid vektörlerde gen bölgelerinin çoğalması sağlanır. Daha sonra tüm sekans bilgileri bilgisayar ortamında kaydedilip üst üste gelen parçalar dijital ortamda kaydedilmiş sekans bölgeleri taranarak orijinal parçaların birbirini tanıyıp uç uca yapışması sağlanır böylece tüm genom sekansı bir araya getirilerek genom dizisi oluşturulmuş olur (Green 2001; IHGSC 2001). İlk uygulamaları tütün mozaik virüsünde denenmiş yöntem (CMV, cauliflower mosaic virus) daha sonraları insan genom haritaları oluşturulması ve organizmaların fiziksel haritalarınının oluşturulmasında kullanılmıştır (Adams 2008) .

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Fibroblast Büyüme Faktör 21; *FGF21* Geni

Fibroblast büyüme faktörü (FGF) insanlarda 150-300 amino asit uzunluğunda ağırlıklı olarak gelişim ve metabolizma işlevlerini yürüten biyolojik reaksiyonlarda, embriyonun gelişmesinde, hücre büyümesi, morfojenesis olaylarında, mitoziste, anjiyogenezis oluşumunda, dokuların iyileşmesi, tümörlerin büyümesi ve yayılmasında önemli rol oynayan sinyal protein genidir (Cohn 1995; McKeehan 1998; Thissen 1999; Ornitz and Itoh 2001; Itoh and Ornitz 2008). Biyolojik fonksiyonlarına göre fibroblast büyüme faktör proteini (FGF 1-23) 22 alt birime ayrılır. *FGF19* (farede *FGF15*) *FGF21* ve *FGF23* dahil olmak üzere, FGF ailesinin üç üyesi, metabolik düzenlemelerde rol oynayan endokrin faktörü olarak ortaya çıkmıştır (Ornitz and Itoh 2008). *FGF23* proteini kemiklerde sentezlenir, böbreklerde fosfat geri emilimini inhibe etme ve D vitamini biyosentezinde görev alır. *FGF19* proteini bağırsak epitel hücrelerinde salgınır, hepatik safra asiti sentezini ve yağlanmayı regüle eder (Tomlinson 2002; Kharitonkov 2005; Muha and Müller 2013).

FGF21 geni *Bos taurus* türlerinde 18. kromozom üzerinde kodlanır ve üç ekzon içerir (Anonymous 2017a). *FGF21* protein geni insan genomunda 19. kromozomun uzun kolu (19q13.33) üzerinde 193 amino asit uzunluğunda ve 21.3 kDa ağırlığında sentezlenir (Anonymous 20117a). Farelerde 7-B2 kromozomu üzerinde sentezlenir ve beş ekzon bölgesinden oluşur. Fibroblast büyüme faktörü 21 (*FGF21*) endokrin hormonu *FGF21* geni tarafından kodlanan pleotropik ve periferik glikoz toleransını, enerji dengesini, lipid metabolizmasını düzenleyen hepatik hormondur. *FGF21* geni karaciğer, pankreas, beyaz yağ dokusu ve kas hücrelerinde daha çok aktive olmaktadır (Kharitonkov 2005; Ogawa 2007; Zhang 2008; Hondares 2011).

Glikoz ve lipid metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olan *FGF21* geninin, fareler ve insanlar üzerinde etkisinin araştırıldığı çalışmalarda obez ve diyabetik farelerde *FGF21*

ekspresyonunun beyaz yağ hücreleri ve karaciğer hücrelerinde durması sonucu glikoz alımının azalmasına, insüline duyarlılığı artırıp serbest yağ asitleri ve plazma trigliserit oranının düşmesine neden olduğu bildirilmiştir (Zhang 2008; Fisher 2010; Kliewer ve Mangelsdorf 2010).

Ratlarda *FGF21*'in uyarılmasının durdurulması sonucu glukagon sekresyonunu baskılandığı, farelerde plazma glukagon konsatrasyonunu durdurduğu (Kharitonov *et al.* 2008), *FGF21* plazma seviyesinin glikoz, insülin ve trigliserit salınımı ve emilimi üzerinde etkili olduğu ve *FGF21* hormonunun fruktoz metabolizması üzerinde önemli etkisi olduğu ortaya konmuştur (Dushay *et al.* 2014).

Düşük proteinli beslenen fare ve ratlarda azaltılmış protein alımının açlık ve ketojenik diyetle yanıt olarak *FGF21*'in dolaşımında miktarının arttığı ve *FGF21* geninin proteini sınırlama, davranışsal ve metabolik tepkileri için gerekli olduğu (Laeger 2014), obez farelerde *FGF21* ile tedavi sonucu enerji harcanmasının yağ kullanımının ve yağ salınmasını artırdığı, karaciğer yağlanmasını azalttığı ve glisemiayı iyileştirdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Coskun 2008; Holland *et al.* 2013).

Schoenberg *et al.* (2011) gebeliğin son döneminden erken laktasyon dönemine girmiş yüksek süt verimli Holştayn ırkında plazma *FGF21* seviyesinin ölçülmesi ve *FGF21* gen aktivasyonunun laktasyon döneminde lipid metabolizması üzerinde etkisinin araştırılmış olduğu çalışmada; karaciğer, meme bezi ve kuyruk kısmında beyaz adipoz dokudan biyopsi yolu ile numuneler toplanmıştır. doku örneklerinden alınmış numunelerin real time PCR ile ekspresyon analizleri yapılmış ve sonuç olarak beyaz yağ dokusu ve karaciğer hücrelerinde *FGF21* gen aktivitesinin yüksek olduğu, erken laktasyon döneminde az miktarda meme bezi hücrelerinde *FGF21* geninin aktivite gösterdiği, karaciğer hücrelerinden salınan *FGF21* geninin aktivasyonu ile laktasyon dönemi boyunca yağ birikiminin sağlandığı ortaya konmuştur.

Sun *et al.* (2013) 18 aylık 1255 baş Çin sığır ırklarında *FGF21* geni SNP polimorfizmi ile ekonomik verim özelliklerinin ilişkilendirdikleri çalışmalarında 4 polimorfik SNP

tespit etmişlerdir. Belirlemiş oldukları g.297C>G ve g.940C>T SNP'lerinin 18 aylık ineklerde büyüme ve vücut ağırlığı üzerinde önemli derecede etkili olduğu bildirilirken yapılan haplotip analizi sonucu 7 farklı haplotip gözlemlendiği bunlardan TCCC haplotipinin dominant olduğu görülmüştür. Sonuç olarak *FGF21* geninin yetiştirme alanında ıslah amaçlı markır destekli seleksiyon programlarında kullanılabileceği önerilmiştir.

2.2. E74-Like Faktör 5; *ELF5*

Epitel-Spesifik ETS Faktör 2; ESE-2a olarak bilinen *ELF5* protein faktör geni metazoalarda sınırlı E26 transformasyon-spesifik (ETS) gen ailesinin 30 alt üyesinden (*ETS*, *ERG*, *ELG*, *ELF*, *ESE*, *ERF*, *TEL*, *PEA3*, *SPI*, *TCF* ve *PDEF*) birisidir. ETS faktör proteini sahip oldukları trans-aktör fosfoproteinleri ile epitelyal, hematopoetik, nöronal, endotelyal ve endokrin sistemlerinde hücrelerin migrasyon, proliferasyon, differensiyon ve onkogenik transformasyonlarında, tumorjenesiste, embriyonik gelişmede, neoplazya, anjiyogenez ve inflamasyon olaylarında önemli rol oynamaktadır (Moreau-Gachelin *et al.* 1996; Sharrocks *et al.* 1997; Seth and Watson 2005; Tummala and Sinha 2006; Hartmann *et al.* 2014; Oliver *et al.* 2012).

ETS faktör ailesi proteinlerinin klonlama ve karakterizasyon çalışmaları sonucu ELF/E74 alt ünitesine benzerlik gösteren *ELF5* alt ünitesi yetişkin fare karaciğer hücrelerinden izole edilen murine cDNA sekanslama analizi sonucu maksimum 1437 bp uzunluğunda 759 bp açık okuma bölgesine (ORF) sahip, 253 amino asit kodlayan 31 kDa ağırlığında protein sentezlediği ve farelerde 11.kromozomun 13p-15p kolu üzerinde bulunduğu tespit edilmiş, insan ve fare *ELF5* cDNA'sının %95 oranında benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Zhou *et al.*1998; Silverman *et al.* 2002). *ELF5* geni sığırlarda 15. kromozom üzerinde bulunur, 9 ekzon ve 7 intron bölgesi içeren yaklaşık 33196 bp uzunluğundadır ve 255 amino asit kodlayan 30,09 kDa ağırlığında protein sentezler (Anonymous 2017d).

Oettgen *et al.* (1999), hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında, hücrelerde tanımladıkları ETS proteinlerinin cDNA analizleri, sekanslama ve northern blot analizleri sonucu iki farklı amino ucuna sahip 265 amino asit uzunluğunda 31.3 kDa ağırlığında

ESE-2b ve 255 amino asit uzunluğunda 30.1 kDa ağırlığında *ESE-2a* olmak üzere iki farklı ESE2 izoformunu tanımlamıştır. *ESE-2b* proteinleri *Drosophila* E74 ETS bağlanma bölgesine bir oligonukleotid bağlama özelliğine sahipken *ESE-2b* izoformunda oligonukleotid bağlanma bölgesi bulunmamıştır. *ESE-2b* izoformu epitelyal hücrelerce zengin dokularda, prostat, salya bezleri, deri keratinosit hücrelerinde, meme bezleri, fetal böbrek hücrelerinde, trakeal hücrelerde ve mide epitel hücrelerinde daha çok aktif olduğu elektroforetik mobilite kayma yöntemi ekspresyon analizi (EMSA) sonucu gösterilmiştir (Choi and Sinha 2006).

ELF5 proteinin meme bezlerinin gelişimi ve süt salınımı üzerinde etkisinin araştırıldığı ilk çalışma Zhou *et al.* (2005) tarafından yapılmış ve çalışma sonucu *ELF5* proteinin farelerde embriyonun erken evrelerinde embriyonun gelişimi için gerektiği, laktasyon ve hamilelik dönemi boyunca meme alveolar epitel hücrelerinin proliferasyon ve differansiyonel gelişimde etkili olduğu, *ELF5* ekspresyonunun Prolaktin reseptör (*PRLR*) geninin heterozigot olduğu meme bezinde *PRLR*'nin salınımının azaldığı ve *ELF5*+/- heterozigot meme bezinde *PRLR* ile aynı salınımının yapıldığı belirtilmiştir.

Farelerde ETS transkripsiyon faktörü *ELF5* proteinin özel alveolar meme yağ hücreleri üzerine etkilerinin ölçüldüğü çalışmada alveolar hücrelerden yağ salınımında genomik düzenleyicisi olarak aktive olduğu, alveolar hücrelerin differansiyonu ve özelleşmesinde, süt salgılama dahil salgılama işlevinin yerine getirmesinde rol aldığı bildirilmiştir (Oakes *et al.* 2007).

Lee *et al.*(2011) tarafından meme kök hücreleri ve progenitor hücrelerde süt üretimi için meme luminal progenitor hücrelerin alveol kanallarının açılmasında *ELF5* geni transkripsiyon faktör alt biriminin rolü olduğu, hamilelik boyunca *ELF5* geninin promotor metilasyonunun azalmasıyla genin ekspresyonu artarak meme bezlerinin gelişimini sağladığı ortaya konmuştur.

Hou *et al.*(2014) 657 baş Xinong Saanen (SN; 385) ve Guanzhong (GZ; 272) kaprin cinsi keçi ırklarında E74-like faktör5 gen polimorfizmi ve süt verimi ile ilişkilendirme amaçlı

yapmış oldukları çalışmalarında *ELF5* cDNA sekanslama analizi sonucu 768 bp uzunluğundaki cDNA'nın BLAST işleminden sonra *B. taurus* %99, *O. aries* %99, *S. scrofa* %94 ve *H. sapiens* türlerinde %94 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiş, 1. intron bölgesinde g.27147 C>G mutasyonu, 3. intron bölgesinde g.10342G>A mutasyon bölgeleri tanımlanmıştır. RFLP analizi sonucu 1.intron bölgesinde RFLP polimorfizmini belirlemek amacıyla *BstXI* enzimi ile kesim yapılmış CCCG ve GG olmak üzere üç farklı genotip bölgesi tespit edilmiştir. Allel frekansları 1. intron bölgesi için SN ve GZ ırklarında C alleli 0.80 ve 0.87G alleli 0.20 ve 0.13 olarak bulunurken, g.10342G>A lokusu için SsiI restriksiyon enzimi ile yapılan kesim sonucu aynı ırklar için AAAG ve GG genotipleri tanımlanarak, allel frekansları A; 0.89 ve 0.90G; 0.11 ve 0.10 olarak bulunmuştur. Süt verimi ile ilişkilendirme analizi sonunda SN ve GZ ırklarının her ikisinde de CG genotipli bireylerde süt veriminin yüksek olduğu, dördüncü laktasyonda ise CC genotipli bireylerin süt veriminin yüksek olduğu 3. intron bölgesinde g.10342G>A SNP gen polimorfizminin süt verimi üzerinde önemli etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

2.3. *BMP2*; Bone Morphogenetic Protein2 (Kemik Mineral Yoğunluk Proteini2)

Kemik mineral yoğunluk proteini BMP'ler transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) çeşitli biyolojik süreçlere aracılık eden sinyal molekülleri süper ailesinin üyeleridir. 30 kadar BMP ligandları tespit edilmiş ve bu ligandlar amino asit dizisi benzerliğine göre *BMP2*, *BMP4*, *BMP5*, *BMP6*, *BMP7*, *BMP8A*, *BMP8B*, *BMP10*, *BMP15* grupları, reseptörler (*BMPR1a*, *BMPR1b*, and *BMPR2*), alt sınıfları ve BMP gremlin, noggin, ve follistatin antagonistler halinde kategorize edilmişlerdir (Fitzgerald *et al.* 2012). BMP'ler başlangıçta yumuşak dokularda ektopik kemik indüklemeye ve dış BMP parmak amputasyonu görülen ölü farelerde kemik rejenerasyonunu teşvik ettiği (Reddi 1998; Yu *et al.* 2012), embriyonik gelişim ve kemiklerin gelişimi üzerinde etkili olduğu, kartilaj gelişimini ve tendonların differansiyonu sağladığı (Chen *et al.* 2006; Park *et al.* 2010; Papathanasiou *et al.* 2012), kemik kırık ve tendon yaralanmalarında onarıcı rol oynadığı, intraselüler Smad proteinlerin nüklear translokasyonu ve fosforilasyonunu uyardığı (Smad-1-5--8, Smad-4) belirtilmiştir.

BMP2 geni kemik iliği mezenşimal kök hücreleri üzerinde osteoendüktif etkilerinin gözlenmesi tendon gibi doku ve epitel hücrelerin rejenerasyonu, damar bütünlüğünü koruma, endotelial hücrelerin proliferasyon ve migrasyonu, nöron ve dentrit oluşumunu uyarma, nöropeptid seviyesini değiştirme, immuno sistemde bağışıklığı modüle etme, deride yaraların iyileşmesi sürecine katılma gibi (Kingsley 1994; Attisano *et al.* 2002; Cruise *et al.* 2004; Lavery *et al.* 2008; Moura *et al.* 2013) pek çok biyolojik süreçte etkili olmaktadır.

BMP2 (*Drosophila* homolog aaDPP) eklem kıkırdağının neonatal büyüme sırasında kondrositlerde, osteoartrit hastaların eklem kıkırdaklarının kemik iliği dokusu vasküler invazyonun yapıldığı fibroblastik mezenşimal hücrelerde, fibrokondrositler, kondrositler ve osteoblastlarda, böbrek ve epidermis hücrelerinde bulunur (Botchkarev and Sharov 2004; Owens *et al.* 2008; Bian Chin *et al.* 2017). İnsan genomunda *BMP2* geni 20p-12. kromozom kolu üzerinde, 396 amino asit uzunluğunda, 44.7 kDa ağırlığında protein şifreler. Sığırlarda *BMP2* geni 395 amino asit uzunluğunda 44,55 kDa ağırlığında protein şifreler. 13. kromozom üzerinde taşınır, 3 ekzon ve 3 intron bölgesinden oluşan yaklaşık 11255 bp uzunluğunda DNA zincirinden oluşmaktadır (Anonymous 2017d).

BMP2 hücrelerin proliferasyonu, bakımını, olgunlaşmamış hücre popülasyonlarının yeniden düzenlenmesi, adipojenik, kondrojenik differansiyonlarda, kemiklerin gelişmesi, kemik mineral yoğunluğu üzerinde etkisi olduğu, eritropoietin yokluğunda, *BMP2* eritropoieze doğru hematopoetik hücrelerin bağlanması ve farklılaşmasını uyarmakta rol alır (Zhang *et al.* 2003; Khurana *et al.* 2013).

Belçika-Hollanda ve Fransa kökenli otosclerosis (işitme kaybı hastalığı) hastaları üzerinde bu hastalığa neden olabilecek 13 aday gen üzerinde SNP polimorfizminin belirlenmesi çalışmasında, *BMP2* geninin 3'UTR bölgesinde tespit edilmiş rs3178250 SNP'nin C alleli otosklerozis hastalığına karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Schrauwen *et al.* 2008).

BMP2 proteinin kırık onarımında ve kondrojenezisi uyarılmasında bir araç olarak kullanıldığı (Whitcomb and Block 1994), adipoz kaynaklı kök hücrelerin ve kafatasının üst kısmında bakulovirüs-aracılı *BMP2* protein geni ve insan miRNA'sı (miR-148b) ile birlikte osteojenik farklılaşma defektinin onarımında rol aldığı (Liao *et al.* 2014) gösterilmiştir.

BMP2 proteinin invitro ortamda büyütülen insan göğüs kanseri MDA-MB-231 kök hücrelerinde tümör büyümesi yönünden hiç bir uyarıcı etkiye sahip olmadığı, kanserli karaciğer hücrelerinde hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve göçünü durdurduğu dolayısıyla rekombinant BMP-2 proteinin gelecekte omurga tümörü olan hastaların tedavisinde kullanımını desteklemek için markır olarak tedavi çalışmalarında yardımcı olabileceği (Yeet *et al.* 2013; Fotinos *et al.* 2014), parietal endoderm içerisinde embriyonal karsinoma F9 hücrelerinin differansiyonunu ve civcivlerde bacak tomurcuklarının oluşumunu sağlayan cAMP analogları ile kombine Retinoik asidin sentezlenmesini *BMP2* geninin regülasyonu ile sağlandığı ortaya konmuştur (Heller *et al.* 1999).

Osteoblastlarda *BMP2*'nin periost ve kemik iliğinde anjiyogenezisi kontrol ettiği *BMP2* geninde görülen delesyonun periosteum ve trabekular kemiklerin mikrovaskular yataklarındaki gelişiminin azalmasını etkileyerek osteoblastlarda mezenşimal kök hücrelerin kusurlu olmasına neden olduğu (Yang *et al.* 2013), *BMP2* geni mezenşimal hücrelerinde post transkripsiyonal evrede lusiferaz sentezini inhibe ettiği, *BMP2* geninde A-C tek nükleotid polimorfizmi (rs15705+A1123C) C/C genotipi daha düşük bazal deri altı yağ hacimleri ile ilişkili olduğu ($P < 0.003$) ve genç erkeklerde egzersizle birlikte iskeletal kas hacminde artışı indüklediği (Devaney *et al.* 2009) insan ve farelerde yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur.

Kemiklerin büyümesinde etkili *BMP2* protein geninin Çinde yetiştirilen Guizhou semi ince kıllı koyunlarda 2.ekzon bölgesinde PCR-SSCP ve DNA sekanslama tekniği ile belirlenen G>A (g. 273 G>A) mutasyonunda LL-LW ve WW genotipleri tanımlanmış *BMP2* geni ikinci ekzonda gen polimorfizminin incelenen koyun ırkında gövde

yüksekliği, vücut uzunluğu ve göğüs çevresi genişliği üzerinde önemli derecede etkili olduğu ortaya konmuştur (Li *et al.* 2012).

17 günlük sığır embriyo hücrelerinden ve sığır tirofoblast (embriyonun beslenmesini sağlayan blastosist hücrelerinin dış tabakası (CT1) *BMP2* ve 4, doğuştan gelen noggin inhibitör geni (NOG), *BMP2/4* reseptör (*BMPRII*, *ACVR1*, *BMPRI1A*, *BMPRI1B*), genlerinin trofoblast hücrelerinin proliferasyonu, differansiyonunu sağladığı (Pennington and Ealy, 2012), Illumina's Porcine SNP60 BeadChip kullanılarak ticari amaçlı üretilen dişi domuzlarda sırt yağlanması, bel kas alanı, kol ve bacakların konformasyonunun yanı sıra vücut konformasyon (FL), yapısal sağlamlık özellikleri ile ilişkili 51,385 SNP belirlendiği çalışmada, *BMP2* geninin bel kas alanı, vücut büyüklüğü, kol ve bacakların gelişimi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Fan *et al.* 2011).

Tavşanlarda implant yerleştirme ile birlikte tavşan maksiller sinüs büyütme operasyonu sonrasında *BMP2* geninin transdüksiyonu ile 2-4 hafta içinde kemik iliği kök hücrelerinin (BMSC) kemik implantı yapıldığı alanda yeni kemik hücrelerini oluşturduğu ve kemik iyileşmesini kolaylaştırdığı ortaya konmuştur (Jhin *et al.* 2013).

PCR-SSCP ve DNA sekanslama yöntemi ile 299 baş keçide (Boer, Çin Xuhuai beyaz keçileri ve Çin Haimen keçisi) kaprine *BMP2* genetik varyasyonunun araştırıldığı farklı bir çalışmada, *BMP2* geninin 3'UTR bölgesinde AA, AB, BB olmak üzere üç farklı genotipe ayrılan tek bir A-G mutasyonunun (AY714781.1:g.A172G) gözlemlendiği, incelenen üç ırkta da A allel gen frekansının dominant olduğu, A allel frekansları her üç ırkta sırasıyla 0.82;0.72 ve 0.90 olarak ölçüldüğü ve Boer ırkı keçilerde BB genotipli bireylerde boyun uzunluğunun AA genotipli bireylere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Fang *et al.* 2010).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Erzurum ili Ilıca bölgesinde Esmer ırkı süt yetiştiriciliği yapılan özel firmada doğan ve işletme tarafından kayıt altına alınmış, akrabalık dereceleri düşük 96 adet proje hayvanları kullanılmıştır. DNA izolasyonları bu kan örneklerinden yapılmıştır. Çalışma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Sürü idaresi ve beslenmesi

3.1.1.a. Barındırma

Erzurum ili Ilıca bölgesinde 2014 yılında kurulmuş süt sığır işletmeciliği yapılan ticari firmada Esmer sığır ırkı hayvanlar entansif olarak serbest ahır sisteminde yetiştirilmektedir.

3.1.1.b. Yemleme

Ticari firma işletmesinde hayvanların süt verimlerine göre yemleme programı uygulanmaktadır. Sağmal ineklere sağım sırasında 4-5 kg süt yemi verilmektedir. Yılın diğer dönemlerinde, sağmal ineklere 4-5 kg süt yemi ile 8-10 kg kuru çayır otu veya kuru yonca otu ile 10-12 kg yaş pancar posası verilmektedir. Düve ve tosunlara da kuru çayır otu ve 2 kg kesif yem yedirilmektedir. Yıllar itibarı ile muhtelif yıllarda verilen yaş pancar posası ve kesif yem miktarlarında değişiklik olabilmektedir.

3.1.1.c. Süt verim kontrolleri

Araştırma veri setini 2014-2017 yılları arasında Esmer sığırlardan elde edilen süt verim kayıtları oluşturmuştur. Süt kayıtları günlük entegre süt sağım ünitelerinden elde edilen ferdi kayıtlar alınarak yapılmış, verim kontrolleri sabah ve akşam yapılarak günlük süt verimleri tespit edilmiştir. Aylık kontroller her ayın ilk haftası içinde yapılarak kontrol sağımalarında günde iki sağım esasında eşit olmayan aralıklarla yapılan, aylık verim kontrolleri metoduna göre ve sağımda süt miktarı 0,1 kg hassasiyetle ölçülmektedir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hayvanlardan kan alımı

Araştırmada kullanılan kan örnekleri, 10 ml'lik K3 EDTA (Etilen DiaminTetra-Asetik Asit)'lı vakumlu tüplere konarak kan örneklerinin EDTA ile karışması için tüpler alt üst edilip ve çalışma ortamına getirilene kadar +4°C buz kalıplarında korunmuştur. Kan alma işleminde sterilizasyona dikkat edilmiş ve tüplerin birbiri ile karışmaması için hayvanın numarası, ırkı ve ait olduğu bölge tüp üzerindeki etiketlere kaydedilmiştir.

3.2.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform cihazı

Otomatik Termocycle Sistem (Bioner)

Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad)

NanoDrop (Thermo scientific),

Buzdolabı (Arçelik)

Elektroforez Sistemi (BiogenApelexFranceSN 280800)

Hassas Terazı (Shimadzu)

Mikrodalga Fırın (Blueline)

Saf Su Cihazı (Ateks)

Santrifüj (Kubota)

Vorteks (Yellow Line) ve muhtelif cam malzemeler kullanılmıştır.

3.2.3. Kullanılan çözeltiler

- 1.5xRetik Salın Çözeltisi
- 2.Liziz Çözeltisi
- 3.RBC Çözeltisi
- 4.Proteinaz K
- 5.Fenol
- 6.Fenol/Kloroform
- 7.TE Çözeltisi
8. Nuclease free water
9. Amonyum asetat
- 10.İzopropanol
11. Etanol
12. HRM Master mix : HotStarTaq Plus DNA Polymerase

HRM PCR Buffer

EvaGreen

Q-Solusyonu

dNTP mix

RNase-free water

3.2.4. Genomik DNA izolasyonu

Tam kandan DNA izolasyonu Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda Purgene DNA kiti (Gentra Systems Minnesota USA) kullanılarak prosedürüne uygun şekilde aşağıda belirtilen sıra takip edilerek yapılmıştır;

- 1- Her örnek için 2 set tüp hazırlanmış tüplerin üzerine etiketle numara verilmiştir,

- 2- Tüplerin üzerine 900 µl RBC solüsyonu eklenmiş ve üzerlerine 300 µl kan eklenerek tüpler alt- üst edilmiştir,
- 3- 13.000g de 2 dak. santrifüj edilerek süpernatant bir pipet vasıtasıyla tüp dibinde 5-10µl kalacak şekilde uzaklaştırılmış, tam homojenizasyonun sağlanması için süpernatant vortekslenmiştir,
- 4- Homojenat üzerine 300 µl Cell lysis ve 100 µl Protein Precipitation eklenip vortekslenildikten sonra 13.000 rpm de 2 dak. santrifüjlenmiştir,
- 5- 2.tüp hazırlanıp üzerlerine 300 µl izopropanol eklenmiş ve 1.tüpteki süpernatant 2.tüpe eklenerek tüpler alt üst edilmiştir,
- 6- DNA'lı tüp 13 000 rpm'de 2 dak. santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır,
- 7- Dipte kalan DNA'nın üzerine 300 µl 1.2 M NaCl çözeltisi eklenip çözelti karıştırılmıştır,
- 8- Vorteksin ardından 750 µl %96'lık Etanol eklenmiş, 13.000 rpm'de 2 dak. santrifüj yapılmıştır,
- 9- Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve üzerine 1000 µl %70'lik etanol eklenmiştir,
- 10- Örnekler 13 000 rpm'de 2 dak. santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır,
- 13- Alkolden arındırılan DNA'lı tüpün içine 300-500 µl ddH₂O veya TE eklenmiş ve DNA'nın çözünmesi sağlanmıştır,
- 14- Örnekler spektrofotometrik ölçüm anına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir,

3.2.5. DNA'nın kalitatif tayini

Elde edilen DNA'lar %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek DNA bantlarının görüntülenmesi sağlanmıştır. Bunun için sırasıyla 0,24 g agaroz 30 ml 1XTBE tamponu içerisine konularak mikrodalga fırın içerisinde 500 Watt'da 2 dakika tutularak agarozun eritilmesi sağlanmış daha sonra uygun sıcaklığa kadar soğutulan eriyik içerisine 6 µl EtBr ilave edilmiştir. Soğutulan karışım daha sonra hazırlanan taraklı jel kabine hava kabarcığı olmayacak şekilde dikkatlice dökülerek polimerizasyon için oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilmeye alınmıştır. Tarağı alınan jel 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirilip kuyucuklarına 2 µl jel yükleme buffer ile 5 µl DNA karışımı otomatik pipetler aracılığı ile dikkatlice yüklenerek 110 volt'ta 15 dakika süreyle

yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra dikkatlice çıkartılan jeldeki bantların varlığı ultraviyole (UV) ışığı ile gözlemlene aşamaları izlenerek tayin yapılmıştır.

3.2.6. DNA'nın kantitatif tayini

Ekstrakte edilecek DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları Nano Drop ND-1000 (NanoDrop TechnologiesInc.) spektrofotometre de okuma yapılarak belirlenmiştir. DNA konsantrasyonu düşük bulunan örneklerde istenilen değer yakalanana kadar kan örneklerinden DNA elde etme işlemleri tekrarlanmıştır.

3.2.7. PCR işlemi

PCR laboratuvar şartlarında hedef DNA ya da RNA dizilerinin otomatik termocycle sistemi ile çoğaltılması işlemidir.

PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için gerekli madde ve içerikler ve PCR şartları aşağıda belirtilen maddelere göre gerçekleştirilmiştir (Şahin vd 2000).

Gerekli maddeler

1. Kalıp DNA: Saflaştırılan DNA amplifiye edilecek DNA parçalarına kalıp görevi yapacaktır.
2. Primerler: Kullanılacak primerler yalnızca amplifiye edilecek bölgeye spesifik olmalıdır.
3. dNTP: Stok deoksiribonükleotitler (dNTP= dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) nötral değilse pH 7'de nötralize edilmelidir ve -20°C'de saklanmalıdır.
4. Taq DNA Polimeraz: *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir. Değişik türleri vardır. Enzim 5'→3'ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Yani sentezin yönü 5 ucundan 3 ucuna olup primerlerin serbest 3' OH ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla fosfodiester bağlarının katalizi ve böylece DNA

ipliğinin polimerizasyonu sağlanarak PCR sentezinin gerçekleşmesini sağlayacaktır (Şahin vd 2000).

5. Mg^{+2} Derişimi: Mg^{+2} derişimi primer yapışmasını hem kalıp hem de PCR ürününün ayrışma sıcaklıklarını, primer-dimer kalıntıların oluşumunu ve enzimin aktivitesini etkiler.

6. PCR tamponu: PCR için uygun tampon 10-50 mM arasında değışen Tris-HCl'dir.

3.2.8. Primer dizaynı

Primerler literatürler doğrultusunda ilgili genin polimorfik bulunan kısmını kapsayacak şekilde ve ilgili gen bölgelerinin NCBI-GenBank'da mevcut DNA dizilimlerine dayanarak dizayn edilmiştir. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz *FGF21* geni için üç çift primer, *BMP2* ve *ELF5* genleri için 4 çift primer dizayn edilmiştir.

3.2.8.a. *FGF21* geni primerleri

FGF21 geni *Bos taurus* türlerinde 18.kromozom üzerinde kodlanır ve 3 ekzon içeren (NCBI Reference Sequence: AC_000175) *FGF21* geninin 2611 bp'lik DNA dizisinin tümü seçilerek primer dizaynı yapılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *FGF21* geni primerleri

Primerler	(5'→3')		Başlama noktası	Bitiş noktası	Ürün baz pair
1. Ekzon	F	TCCCAAGAGATCTGGGTGTC	870	888	338
	R	GGCATCATCCGTGTAGAGGT	1207	1226	
2. Ekzon	F	GATGTTGGTCAGGCTTGGTT	1596	1616	416
	R	GAGGCAGGTCCTCCTTAAC	2011	2031	
3. Ekzon	F	TCTACCAGTCGGAGACCCTG	2265	2294	256
	R	GACCCAGTACTACACAGCGG	2501	2521	

3.2.8.b. *ELF5* Geni Primerleri

E74 benzeri ETS transkripsiyon faktör5 geni Sığırlarda 15. kromozom üzerinde 9 ekzon (NCBI Reference Sequence: AC_000172.1 Chr.15) içeren (33196 bp) *ELF5* geninin 5. 6. 7. ekzon bölgeleri ve 4. intron bölgesinin dahil olduğu gen dizisi baz alınarak primer dizileri belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *ELF5* geni primer dizileri

Primerler		(5'→3')	Başlama noktası	Bitiş noktası	Ürün baz pair
2. İtron	F	ACCCAGTGAGCCTTGTATGG	1707	1727	492
	R	AAGCATCACTGCACAGAACG	2198	2219	
5. Ekzon	F	CGTTCTGTGCAGTGATGCTT	1445	1465	500
	R	CCCAGTCTCCCCAAAGTGTA	1903	1925	
6. Ekzon	F	CTGGTTGCCGTAAATTTGGT	30744	30764	475
	R	GCCCAGTTTTTCTATGGCTGA	31200	31221	
7. Ekzon	F	GGGTTGACCGAAGATTAGTG	31824	31844	475
	R	CCACAGTTACCGATGTGAAA	32279	32299	

3.2.8.c. *BMP2* Geni primerleri

Kemik Morfogenetik Protein2 geni Sığırlarda 13. kromozom üzerinde bulunur. 3 ekzon (NCBI Reference Sequence: Chr.13AC_000170.1) içeren *BMP2* geninin 11255 bp'lik DNA dizisi baz alınarak primer dizileri belirlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. *BMP2* geni primer dizileri

Primerler	(5'→3')		Başlama noktası	Bitiş noktası	Ürün baz pair
1.Ekzon	F	TGCGTGCTAGGAGGGACT	94	112	459
	R	CCACCCTCTAGAAGGGACTT	533	553	
2. Ekzon	F	GTCTTCTAGCGTTGCTGCTT	1445	1465	480
	R	CCAGGTTTCGGAAGGTTCTTAC	1903	1925	
1. Bölge (3. Ekzon)	F	CAGTAGGTGG GAGAGCTTCG	9541	9561	498
	R	CTGAGCTCTGTTGGGACACA	10019	10039	
2. Bölge (3. Ekzon)	F	GGGTTGTGGGTGTCGTTAG	10120	10139	467
	R	GCCAGAGTAACCTTCCATGTAG	10556	10578	

3.2.9. PCR amplifikasyonu

PCR amplifikasyonları aynı şartlar altında farklı zamanlarda uygulanmıştır. Çizelge 3.4'te PCR bileşenleri ve kullanılan miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR bileşenleri ve reaksiyonda kullanılan miktarları

PCR Bileşeni	Konsantrasyon/Hacim
PCR Tamponu (pH:8.5)	5.0 µl (10X)
Primer F	10 pmol/µl
Primer R	10 pmol/µl
MgCl ₂	1.5 mM1.2 µl
Taq	0.5-1.0 U
dNTP	0.25 mM2.5 µl
Steril distile su	Toplam hacim 20 µl'ye tamamlanır
Genomik DNA	50-100 ng

3.2.10. HRM analizi protokolü

1. 2X HRM PCR Master Mixprimer çözeltileri RNase-free water kalıp DNA'lar ve kontrol DNA'ları (isteğe bağlı) çözünmüş halde tutulmuştur.

2. Reaksiyon mixleri Çizelge 3.5'teki ölçülere uygun olarak hazırlanmıştır.
3. Reaksiyon karışımını uygun hacimlerdeki PCR tüplerine konmuştur.
4. Tek tek PCR tüplerine veya platelere eşit miktarda kalıp DNA'lar (1-50 ng genomik DNA veya 1-50 pg mikrobik DNA her numune için aynı miktar) ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır.
5. HRM analizi için uygun Real time PCR programı ayarlanmıştır.
6. PCR cihazının son kontrolleri yapıldıktan sonra cihaz çalıştırılmış ve sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 3.5. HRM-PCR reaksiyon bileşimleri ve reaksiyonda kullanılan miktarları

Bileşenler	Reaksiyon hacmi 25 µl	Final concentration
Reaksiyon mix 2x HRM PCR	12.5 µl	1X
Master Mix 10 µM primer mix	1.75 µl	0.7 µM forward primer 0.7 µM reverse primer
RNase-free water	Her Reaksiyon için eşit hacimlerde alınmalıdır	
Template DNA	Her Reaksiyon için eşit hacimlerde alınmalıdır	Eukaryotik: 1–50 ng DNA/reaksiyon

3.2.11. HRM analiz verilerinin değerlendirilmesi

Rotor-Gene Q Real time PCR cihazı ile analiz edilen veriler Rotor-Gene ScreenClust HRM Software programı kullanılarak kontrol grubu bilinmeyen UNSUPERVISED modda kümelendirilmiştir.

3.2.12. PCR ürünlerinin gözlenmesi

PCR işleminden sonra amplifikasyon oluşumunu kontrol etmek için %2.5'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütülmüştür. %2.5'lik agaroz jel 50 ml'lik 1XTBE tamponu içerisinde 1

g agaroz mikrodalga fırında 500 Watt'da 2 dakika eritilip içerisine 6 µl EtBr ilave edilerek hazırlanmış, eriyik soğutulduktan sonra hazırlanan lel taraklı jel kabinine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice dökülerek oda sıcaklığında 8-10 dakika polimerize olmaya bırakılmıştır. PCR ürünü ve jel yükleme tamponu otomatik pipetler aracılığı ile yüklenerek jelde yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra dikkatlice çıkartılan jeldeki bantların varlığı UV ışığı ile gözlenmiş ve amplifikasyonu gerçekleştiren ürünlerin bir sonraki işleme kadar -20°C'de korunmuş amplifikasyonu gerçekleştirilmeyen örnekler için PCR işlemi gerçekleştirinceye kadar tekrar edilmiştir.

3.2.13. İstatistiksel analizler

Elde edilen polimorfik sistemlere ait verilerin kümelendirilmesinde Rotor-Gene ScreenClust HRM Software programı, verimle ilişkilendirme analizlerinde SPSS Windows istatistik paket programından yararlanılmıştır.

İstatistiksel olarak yapılan ilişkilendirme analizinde, Erzurum ili Ilıca bölgesinde özel bir işletmede yetiştirilen Esmer ırkı sığına ait verim kayıtları kullanılmıştır. Çalışmada performans özellikleri olarak, gerçek süt verimi, 305 gün süt verimi, laktasyon süresi ve günlük süt verimi gibi süt verim özellikleri incelenmiştir. Elde edilen verilerin analizinde Genel Linear Model (Harvey 1990) esas alınarak SPSS paket programı kullanılmıştır. Analizlerde ilgili verim özelliği üzerine etkili olduğu düşünülen; genotip, laktasyon sırası, ineğin yaşı ve buzağılama mevsimleri gibi çevre faktörleri üzerinde durulmuştur.

Araştırmadaki verim özelliklerine göre aşağıdaki istatistik model kullanılmıştır.

$$Y_{ijkl} : \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + f_m + e_{ijklm}$$

Y_{ijkl} : Her hangi bir Esmer ineğin ele alınan süt verimi (gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, laktasyon süresi ve günlük süt verimi) özelliklerinin her hangi biri bakımından değeri,

μ :populasyon ortalaması,

a_i : i. Genotip etkisi ,

b_j : j. Laktasyon sırasının etkisi (j:3; 1. Laktasyon:1, 2. Laktasyon:2, 3. Laktasyon: 3),

c_k : k. Cinsiyetin etkisi (1 dişi, 2 erkek),

d_l : l. Buzağılama mevsiminin etkisi (k:2; 1:kış-ilkbahar, 2:yaz-sonbahar),

f_m : Aşıma açık gün sayısının etkisi (1: 20-60gün, 2: 61-120 gün, 3: 121-145 gün, 4:146-200 gün, 5: 201 gün ve üzeri),

e_{ijklm} : Hata payı.

Kullanılan modelde hata haricinde kalan bütün faktörler sabit, hata ise şansa bağlı olarak kabul edilmiştir.

Laktasyon süt verimi, Süt verim kontrollerinde “Süt Hayvanlarında Ekonomikliği Belirleme Uluslararası Komitesi (Internationeles Komitee zur Ermittlung der Wirtschaftlichkeit von Milchtieren = IKEWM)’ tarafından bildirilen esaslara göre kontrol aralıklarında hesaplanan süt verimlerinin toplamı olarak tanımlanmıştır. Laktasyon süt verimi laktasyon başladığı günden ilk kontrol yapılacak güne kadar geçen süre birinci laktasyon aralığı olarak hesaplanmış ve ilk kontrol aralığı ile hesaplanan değer çarpılarak bu aralığa ait süt verimi bulunmuştur.

Devam edecek laktasyon verileri aralıklarda birbirini izleyen iki kontroldeki günlük süt verimlerinin ortalaması, ilgili kontrol aralığı ile çarpılarak belirlenmiştir. Son kontrolden sonra laktasyonun devam ettiği kabul edilen süre son kontrol günlük süt verimi ile çarpılarak son aralığa ait süt verimi bulunmuştur.

Bu anlatılan metoda göre, laktasyon süresi ve laktasyon süt verimi aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır (Özhan vd 2011).

$$LS = \sum (n_i) + n_k$$

$$SV = S_1 \cdot n_1 + \sum [n_i \cdot (S_i + S_{i-1}) / 2] + S_k \cdot n_k$$

Formüle göre;

LS = Laktasyon süresi (gün)

SV= Laktasyon süt verimi (kg)

n_i = i. kontrol aralığı

n_1 = Doğum- ilk kontrol arası süre (gün)

n_k = Son kontrolden sonra laktasyonun devam ettiği farzedilen süre

S_i = i. kontroldeki günlük süt verimi (kg)

S_1 = İlk kontroldeki günlük süt verimi (kg)

SK= Son kontroldeki günlük süt verimi

3.2.14. DNA sekanslama

Toplam 96 adet PCR örneği, HRM metoduyla kümelerine ayrılmış ve sekans analizleri için her kümeden 4 numune belirlenmiştir. Gen bölgelerinin küme sayılarına göre sayıları 30-35 arasında değişen numunelere ait DNA örnekleri, ticari DNA sekanslama yapan firmaya gönderilerek herbir örneğin DNA baz dizisi elde edilmiştir. Daha sonra Mega 7.0 (Kumar *et al.* 2016) ve BioEdit 7.2.6 (Hall 2005) yazılım programları yardımıyla, DNA sekans sonuçlarına göre numunelere ait genotip farklılıkları ortaya konmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA'nın Kantitatif Tayini

Ekstrakte edilmiş DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları NanoDrop ND-1000 (NanoDrop TechnologiesInc.) spektrofotometrede okuma yapılarak belirlenmiştir.

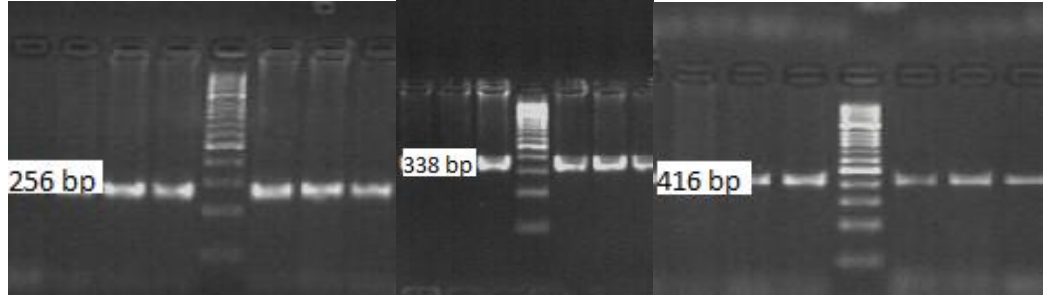
4.2. Gen Bölgelerinin PCR Optimizasyon Koşulları ve Jel Görüntüleri

İlgili genlere ait primer çiftlerinin PCR optimizasyonları her bir bölge için sırasıyla uygulanmak üzere gradient PCR işleminden geçirilerek bağlanma sıcaklıkları belirlenmiş ve PCR optimizasyonları sağlanmıştır.

PCR işleminden sonra amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için PCR ürünlerinin bant büyüklüklerine göre %2,5 ve %1'lik agaroz jeller hazırlanarak PCR ürünleri yürütülmüştür. İlgili genlere ait PCR ürünleri UV ışığı altında gözlemlenerek görüntüleme işlemi yapılmıştır.

Çizelge 4.1. *FGF21* Geni PCR optimizasyon koşulları

Aşamalar	<i>FGF21</i> 1.ekzon (338 bp)	<i>FGF21</i> 2.ekzon (416 bp)	<i>FGF21</i> 3. ekzon (256 bp)	Döngü sayısı
1	95°C'de 5 dak.	95°C'de 5 dak.	95°C'de 5 dak.	1 döngü
2	95°C'de 45 sn. 56°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	95°C'de 50 sn. 61°C'de 50 sn. 72°C'de 50 sn.	95°C'de 45 sn. 58°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	32 döngü
3	72°C'de 5 dak.	72°C'de 5 dak.	72 °C'de 5 dak.	1 döngü

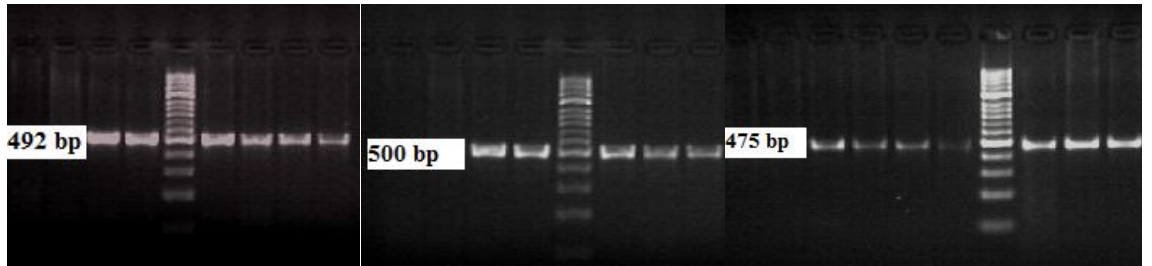


Şekil 4.1. *FGF21* gen bölgelerine ait PCR sonuçları

(Standart Genesta 100 bp DNA markır görüntüleri ile sırasıyla 1.primer çifti 256, 2.primer çifti 338, 3. Primer çifti 416 bp)

Çizelge 4.2. *ELF5* Geni PCR optimizasyon koşulları

Aşama	<i>ELF5</i> 2.intron (492bp)	<i>ELF5</i> 5.ekzon (500bp)	<i>ELF5</i> 6.ekzon (475 bp)	<i>ELF5</i> 7.ekzon (475 bp)	Döngü sayısı
1	96°C'de 5 dak.	96°C'de 5 dak.	96°C'de 5 dak.	96°C'de 5 dak.	1 döngü
2	96°C'de 45 sn. 60°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	96°C'de 45 sn. 60°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	96°C'de 45 sn. 58°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	96°C'de 45 sn. 58°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	32 döngü
3	72 °C'de 5 dak.	72°C'de 5 dak.	72°C'de 5 dak.	72°C'de 5 dak.	1 döngü



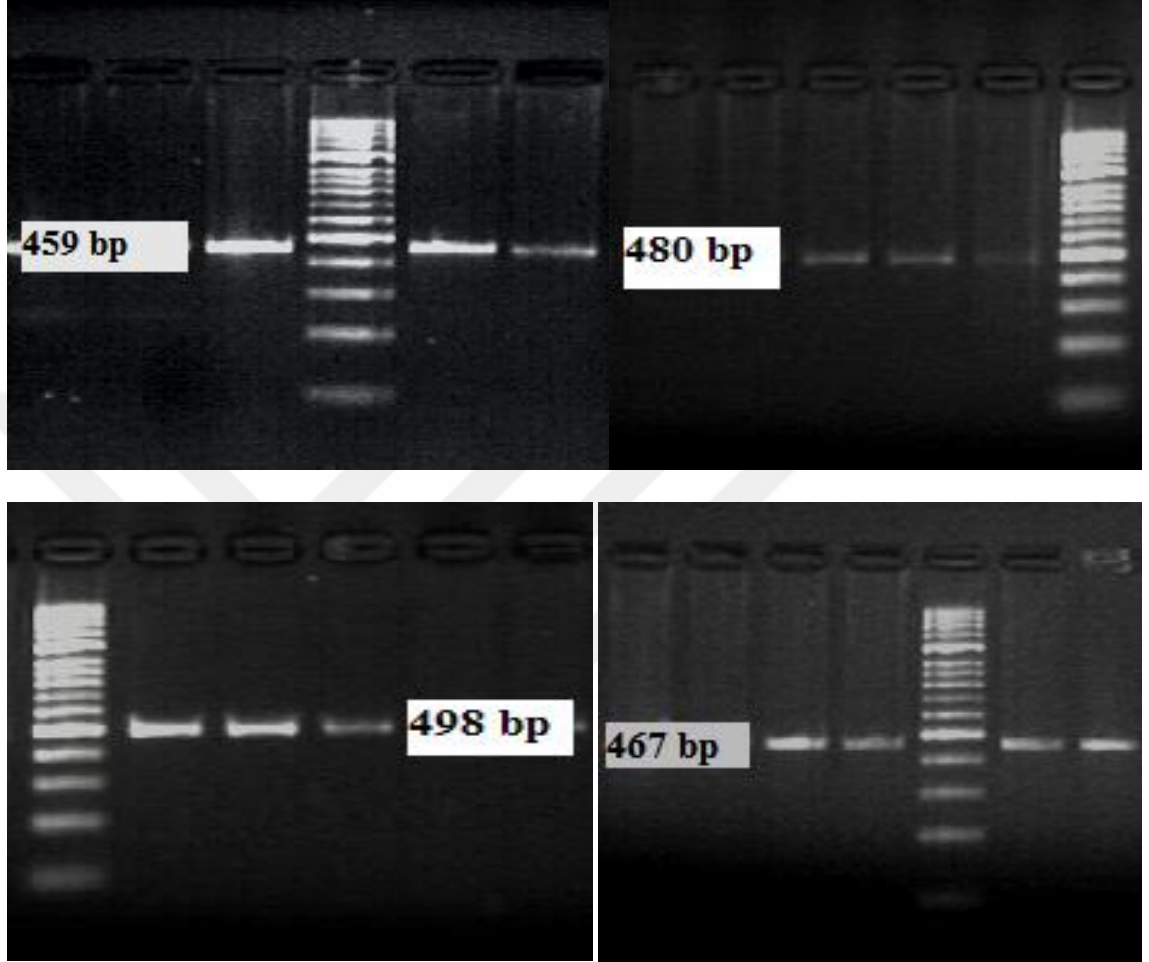
Şekil 4.2. *ELF5* gen bölgelerine ait PCR sonuçları

(Standart Genesta 100 bp DNA markır görüntüleri ile sırasıyla 1. primer çifti 492, 2. primer çifti 500, 3. ve 4. primer çifti 475 bp)

Çizelge 4.3. *BMP2* Geni PCR optimizasyon koşulları

Aşama	<i>BMP2</i> 1.ekzon (459bp)	<i>BMP2</i> 2.ekzon (480bp)	<i>BMP2</i> 3.ekzon (498 bp)	<i>BMP2</i> 3.ekzon (467 bp)	Döngü sayısı
1	96°C'de 5 dak.	96°C'de 5 dak.	96°C'de 5 dak.	96°C'de 5 dak.	1 döngü
2	96°C'de 45 sn. 60°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	96°C'de 45 sn. 57°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	96°C'de 45 sn. 60°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	96°C'de 45 sn. 60°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	32 döngü

3	72 °C'de 5 dak.	72°C'de 5 dak.	72°C'de 5 dak	72°C'de 5 dak.	1 döngü
---	-----------------	----------------	---------------	----------------	---------



Şekil 4.3. BMP2 gen bölgelerine ait PCR sonuçları
(standart Genesta 100 bp DNA markır görüntüleri ile sırasıyla 1. primer çifti 459, 2. primer çifti 480, 3. primer çifti 498 ve 4. primer çifti 467 bp)

4.3. HRM-PCR Analiz Sonuçları

Rotor Gene Q real time PCR cihazı kullanılarak, Esmer ırkı sığırlara ait 96 adet DNA örneğinin farklı gen bölgeleri için EvaGreen interkalasyon boyası kullanılarak kapalı tüp ortamında HRM-PCR'ları gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.4. HRM-PCR koşullarının optimizasyonu

HRM-PCR	<i>FGF21</i> tüm bölge	<i>ELF5</i> tüm bölge	<i>BMP2</i> 2. 3. ve 4. bölge
Denaturasyon	95°C 5 dak.	95°C 5 dak.	95°C 5 dak.
40 Döngü	Denaturasyon 95°C 10 s	Denaturasyon 95°C 10 s	Denaturasyon 95°C 10 s
	Anneling 58°C 30 s	Anneling 58°C 45 s	Anneling 56°C 30 s
	Uzama 72°C 24 s	Uzama 72°C 24 s	Uzama 72°C 24 s
HRM	61°C - 95°C	61°C - 95°C	61°C - 99°C
	1.döngü için 90 s	1.döngü için 90 s	1.döngü için 90 s
	HRM her bir adım için 2 s	HRM her bir adım için 2 s	HRM her bir adım için 2 s

4.3.1. Erime eğrisi grafikleri (Melt Curve)

Çift zincirli DNA'nın erime eğrisinin ilk türevinin tepe noktası (dF/dT) belirlenerek hesaplanan erime sıcaklığı (T_m), DNA çift zincirine bağlanan floresan ışığa yapabilen interkalasyon boyalarının çift zincirli DNA'nın denaturasyona uğrayarak tek sarmallı yapıya dönüştüğü evrede doymuş haldeki interkalasyon boyları DNA dizisinden ayrılırken düşük konsantrasyonlarda floresan ışığa yapmaktadır. Floresans miktarlarını ölçen hassas gerçek zamanlı PCR cihazları kullanılarak DNA zincirinin salmış olduğu boya miktarına göre DNA erime eğrisi grafiği çizilmiştir.

4.3.2. HRMA ham veri ve Normalizasyon grafikleri

Rotor Gene Q real time PCR cihazı kullanılarak farklı gen bölgeleri için HRM analizi yapılan örneklerin EvaGreen interkalasyon boyası kullanılarak PCR'ları gerçekleştirilmiş ve ampliconlar sıcaklık dereceleri kademeli olarak artacak şekilde denaturasyona uğrayarak tek zincirli forma dönüşürken her bir örneğin vermiş olduğu floresan ışığa miktarına göre HRMA grafikleri belirlenmiştir. HRMA grafiği sonucu PCR

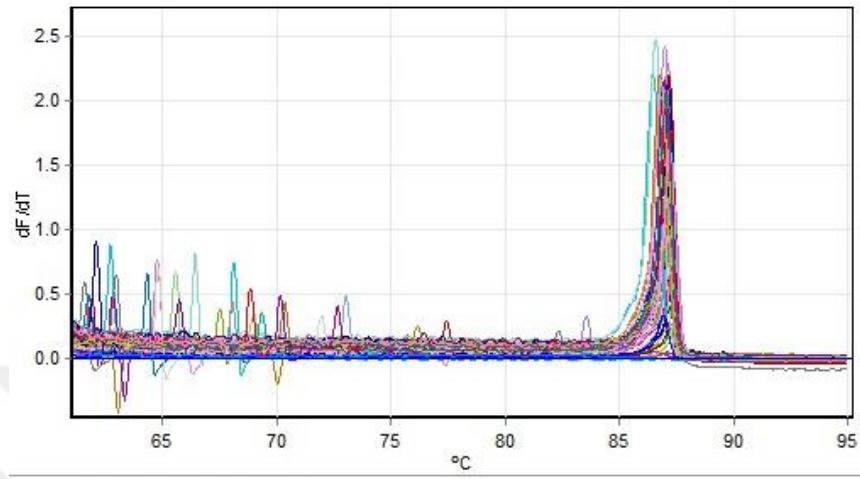
amplikasyonlarının erime sıcaklıkları belirlenmiş ve floresan ışıma yapmayan PCR'ı gerçekleştirilmemiş örnekler elemine edilmiştir.

Ham HRM analizinde flüoresandaki farklılıklar PCR ve HRM sürecindeki çeşitli faktörler örneğin amplikonlar ve kalıp DNA'nın farklı miktarları tarafından indüklenebileceğinden herhangi bir HRM analizi başlangıç ve bitiş flüoresanının normalleştirilmesi gerekmektedir. Normalizasyon aralığı en yüksek floresans değerinin 100'e eşit ve en düşük değer sıfıra gelecek şekilde Erime eğrisi geçişinden önceki ve sonraki bölgeler eğrinin ortalama flüoresan değerini ve eğimini hesaplamak için kullanılmıştır. Erime piklerinin görüldüğü sıcaklık aralıkları esas alınarak PCR'ı gerçekleştirilmeyen örnekler elemine edilmiş ve normalizasyon grafikleri belirlenmiştir.

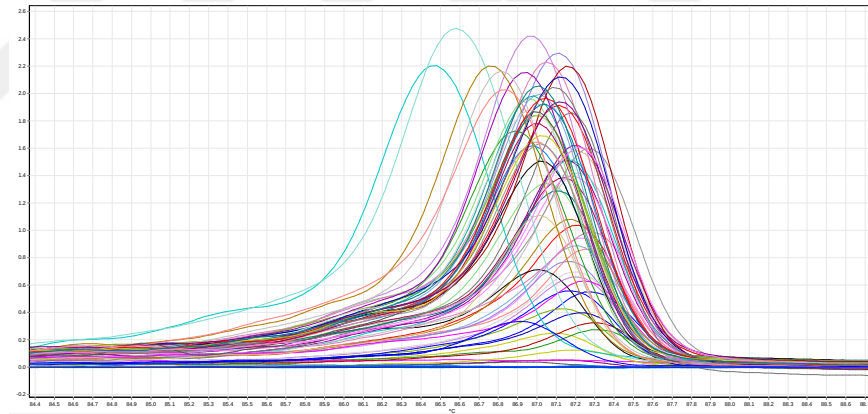
4.3.3. *FGF21* Geni HRM Analiz Sonuçları

FGF21 geni sığır genomlarında 18. kromozom üzerinde kodlanır ve 3 ekzon içerir (NCBI Reference Sequence: AC_000175). *FGF21* geninin 1. ekzon bölgesini içeren 338 bp'lik 2. ekzon bölgesinin 416 bp ve 3. ekzon bölgesinin dahil olduğu 256 bp'lik DNA dizilerinin HRM-PCR analizleri sonucunda her bir gen bölgesi için farklı erime eğrisi grafikleri elde edilmiştir.

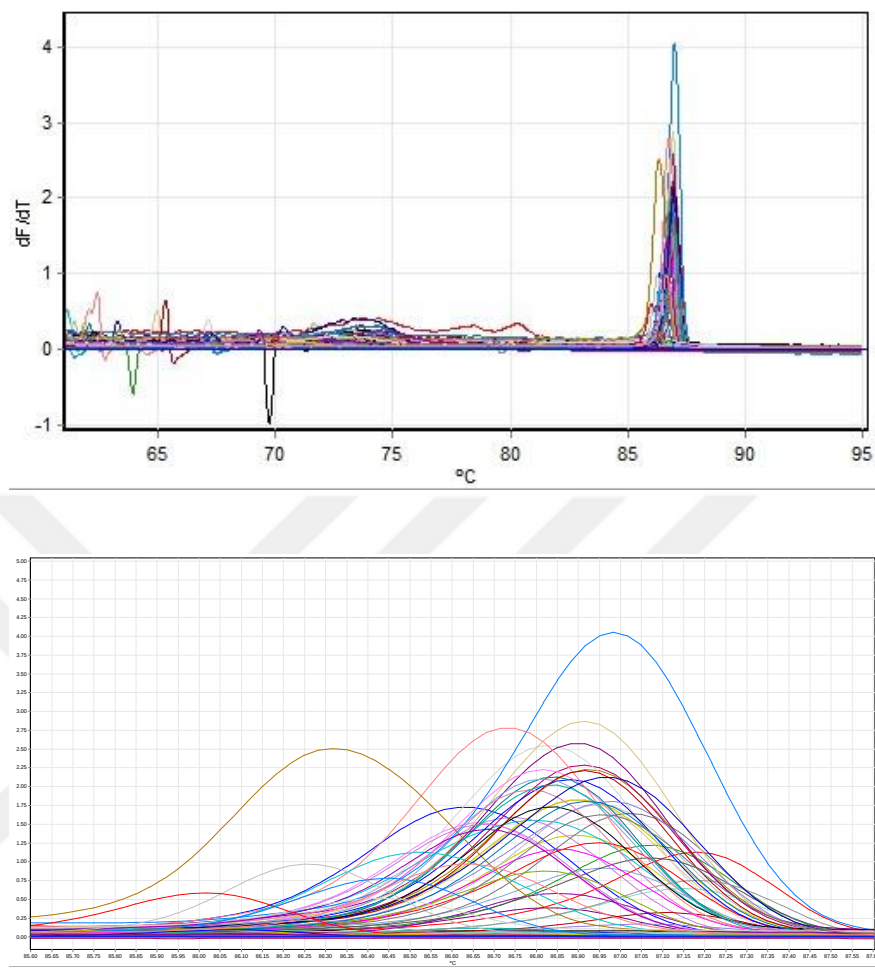
4.3.3.a. *FGF21* geni Melt Eğrisi grafikleri



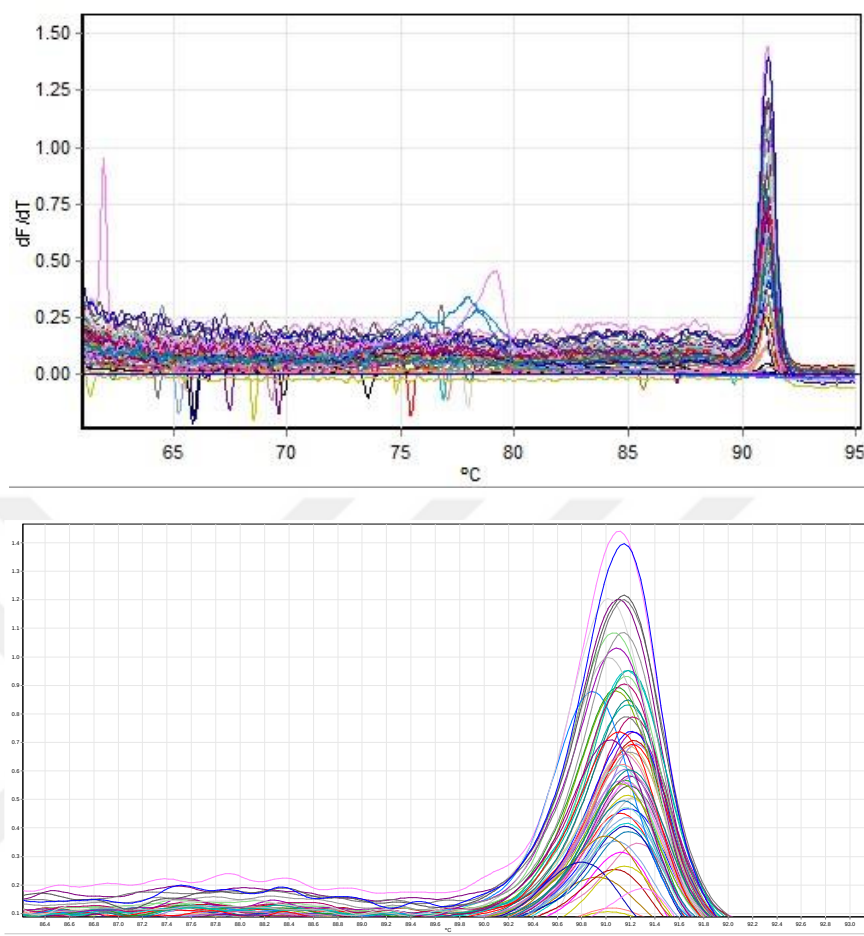
A. FGF21 1.Ekzon Melt Eğrisi



Şekil 4.4. *FGF21* geni 1. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği



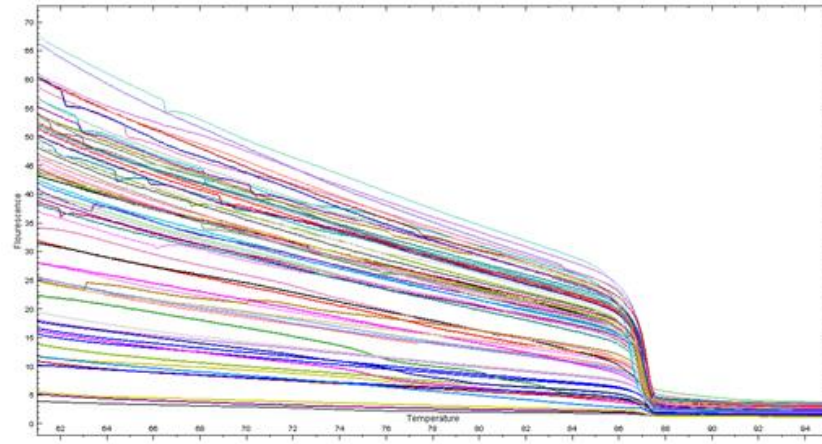
Şekil 4.5. *FGF21* geni 2. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği



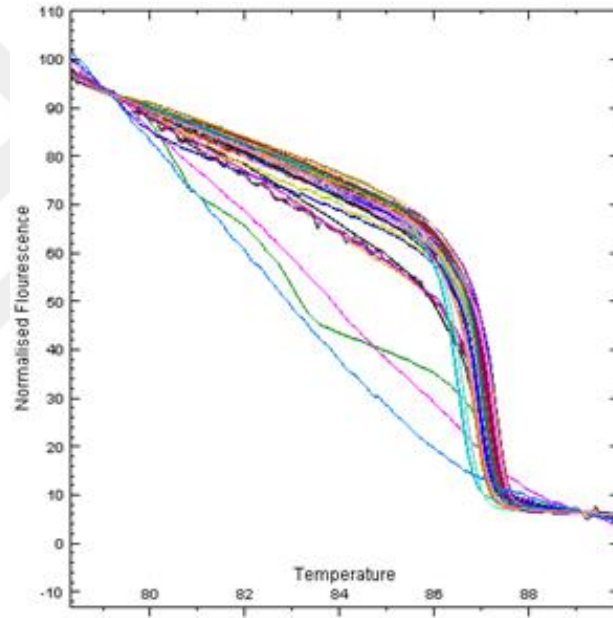
Şekil 4.6. *FGF21* geni 3. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği

4.3.3.b. *FGF21* Geni HRMA Ham Veri ve Normalizasyon grafikleri

Esmer ırkına ait 96 adet DNA örneğinin Eva Green DNA saturasyon boyası kullanılarak PCR'ı gerçekleştirilmiş ve ham HRM analiz grafiğine göre belirlenmiş erime eğrisi sıcaklıklarına göre normalizasyon aralıkları belirlenmiştir. Ayrıca bölgelere ait belirli sıcaklık aralığındaki normalizasyon grafikleri elde edilmiştir.

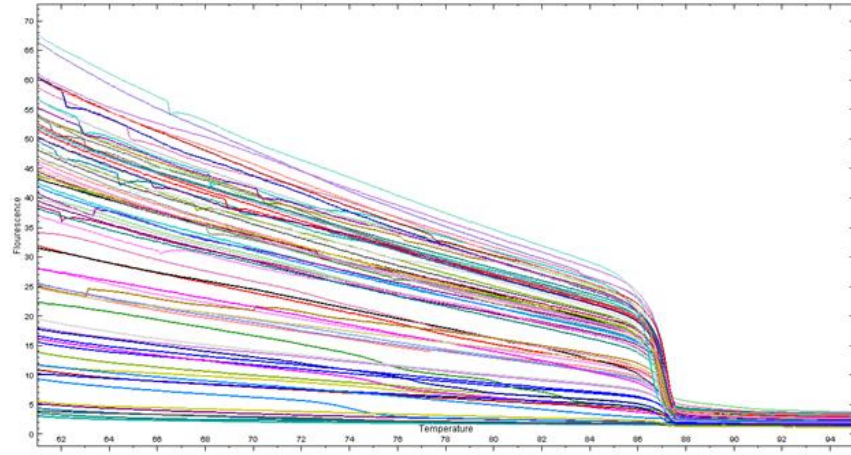


A. HRMA Grafiği

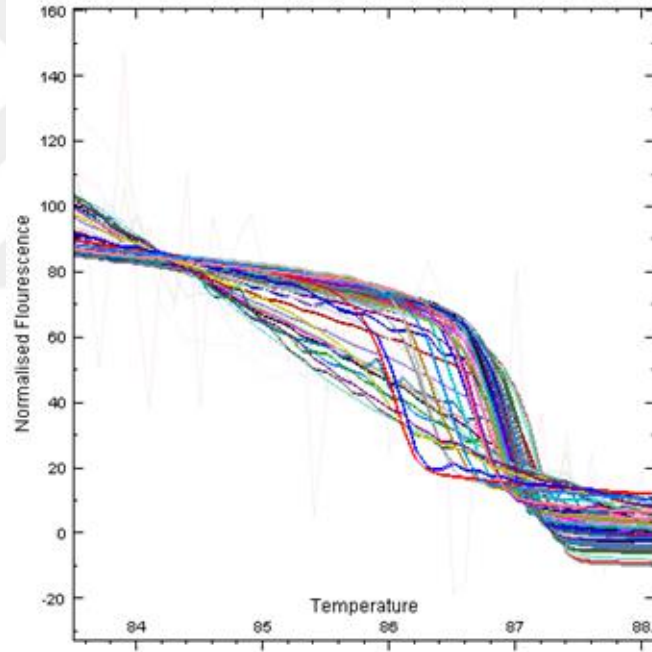


B. Normalizasyon grafiği

Şekil 4.7. A. *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi ham HRMA grafiği, B. Normalizasyon grafiği

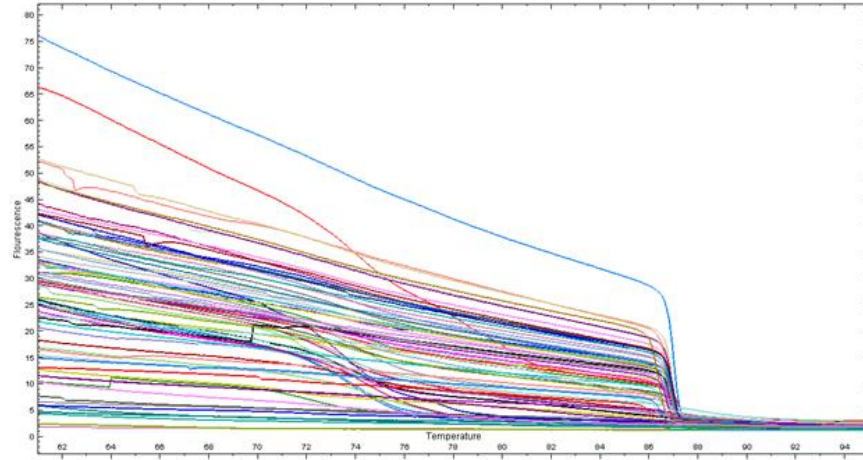


A. FGF21 2. EKZON HRMA

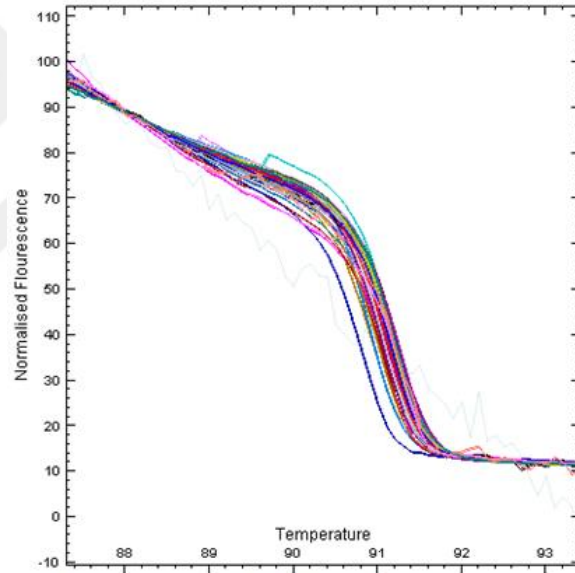


B. FGF21 2. Ekzon Normalizasyon Grafiği

Şekil 4.8. a. *FGF21* geni 2. ekzon bölgesi ham HRMA grafiği, b. Normalizasyon grafiği



A. FGF21 3.Ekzon HRMA



B. FGF21 3. Ekzon Normalizasyon Grafiği

Şekil 4.9. a. *FGF21* geni 3. ekzon Ham HRMA grafiği, b. Normalizasyon grafiği.

Baz büyüklükleri birbirinden farklı olan ve farklı ekzon bölgeleri içeren *FGF21* geni için uygulanmış HRM-PCR analizi sonucu erime eğrisi grafiklerine göre farklı sıcaklıklarda normalizasyon aralıkları tespit edilmiş ve *FGF21* 1. ekzon bölgesi 78-89°C aralığında, 2. ekzon bölgesi için 84-88 °C ve *FGF21* 3. ekzon bölgesi için 88-93°C aralığında belirlenmiştir.

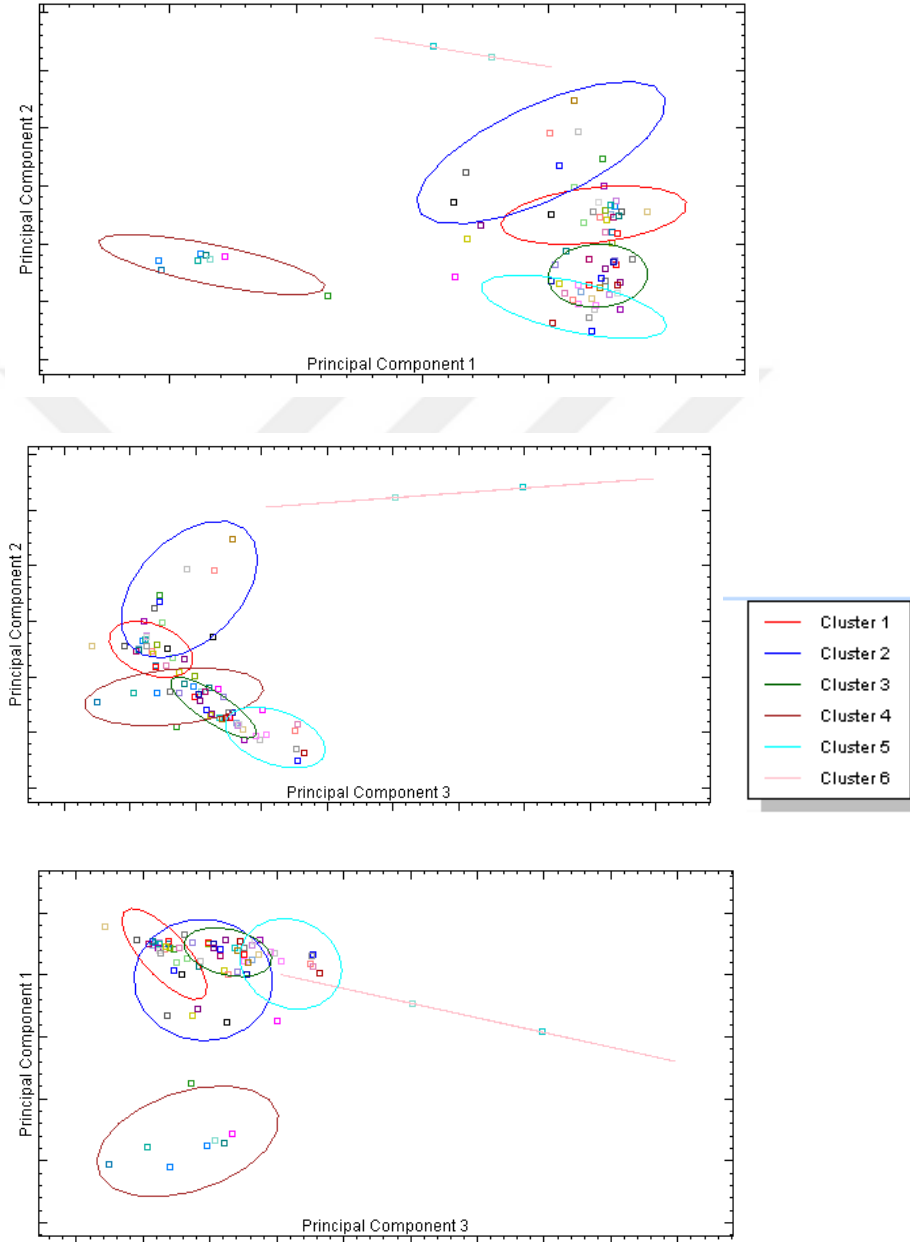
4.3.4. Kümeleme analizleri

Örnekler arasındaki farklılıkları belirlemek için normalleştirilmiş Tm eğrileri baz alınarak ScreenClust HRM yazılım programı üzerinden unsupervised modda kümeleme analizi yapılmıştır. Kümeleme analizi veri setindeki mevcut aralarında korelasyon olan değişkenlerin bazı linear transformasyonlarla aynı sayıda ama aralarında korelasyon olmayan (ortogonal) değişkenlere dönüştürme temeline dayanan ve veri analizi esnasında veri setinin boyutlarını küçülterek gruplara ayırabilen üç boyutlu temel bileşenler analizine (PCA; Principal Component Analysis) göre yapılmıştır (Reja *et al.* 2010).

4.3.4.a. *FGF21* geni kümeleme ve temel bileşenler analizi

HRM-PCR analizi yapılmış 96 adet Esmer ırkına ait DNA örneğinin kümeleme analizi sonucu örnekler erime eğrileri farklılığına göre kümelere ayrılmıştır. ScreenClust HRM yazılım programı üzerinden değerlendirilen veriler üç boyutlu temel bileşenler analizine (Principal Component Analysis) göre her bir bölge için farklı kümelerde toplanmıştır.

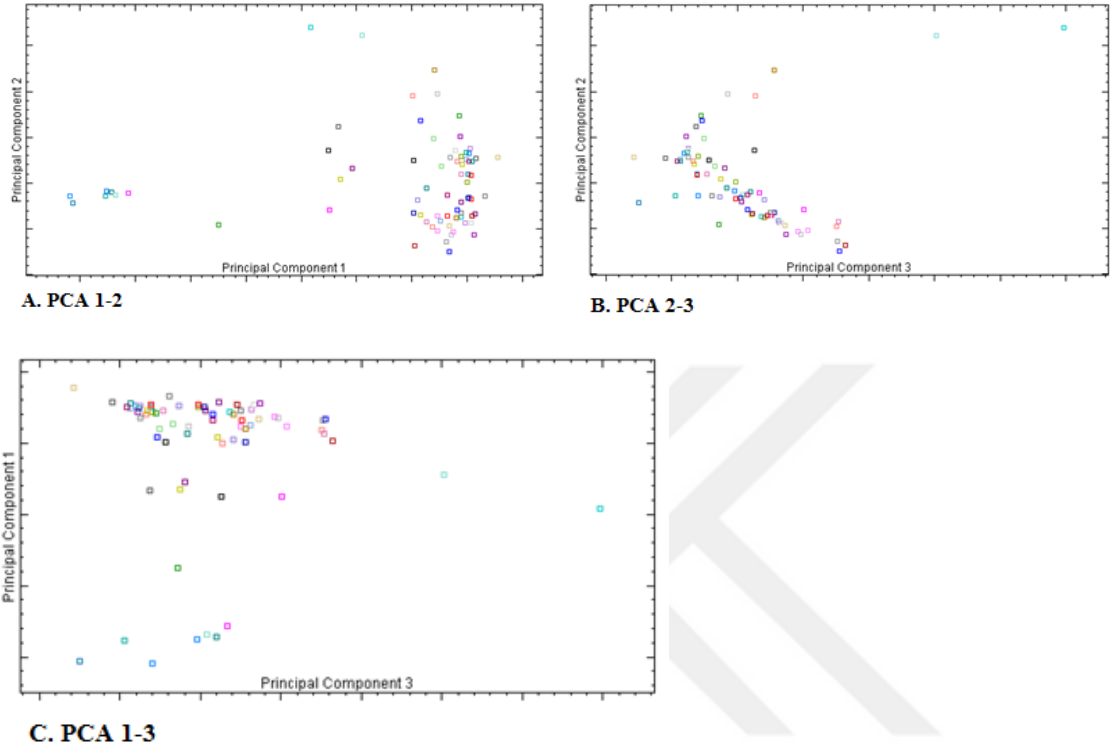
a. *FGF21* geni 1.Ekzon Bölgesi Kümeleme Analizi



Şekil 4.10. *FGF21* geni 1.ekzon veri kümeleri

1. Küme: 11, 32, 41, 59, 67, 73, 79, 85, 92, 94, 95, 98 (12 örnek),
2. Küme: 3, 5, 8, 9, 19, 20, 25, 29, 30, 42, 76, 96, 100, 112 (14 örnek),
3. Küme: 2, 4, 14, 38, 40, 43, 47, 48, 50, 54, 56, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 68, 70, 71, 72, 78, 86, 90 (24 örnek),
4. Küme: 10, 15, 24, 97, 99 (5 örnek),
5. Küme: 1, 12, 13, 16, 17, 18, 21, 22, 26, 27, 28, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 52, 58, 63, 69, 74, 83, 84, 78, 88, 91 (28 örnek),
6. Küme: 45, 49, 81, 82, 93 (5 örnek).

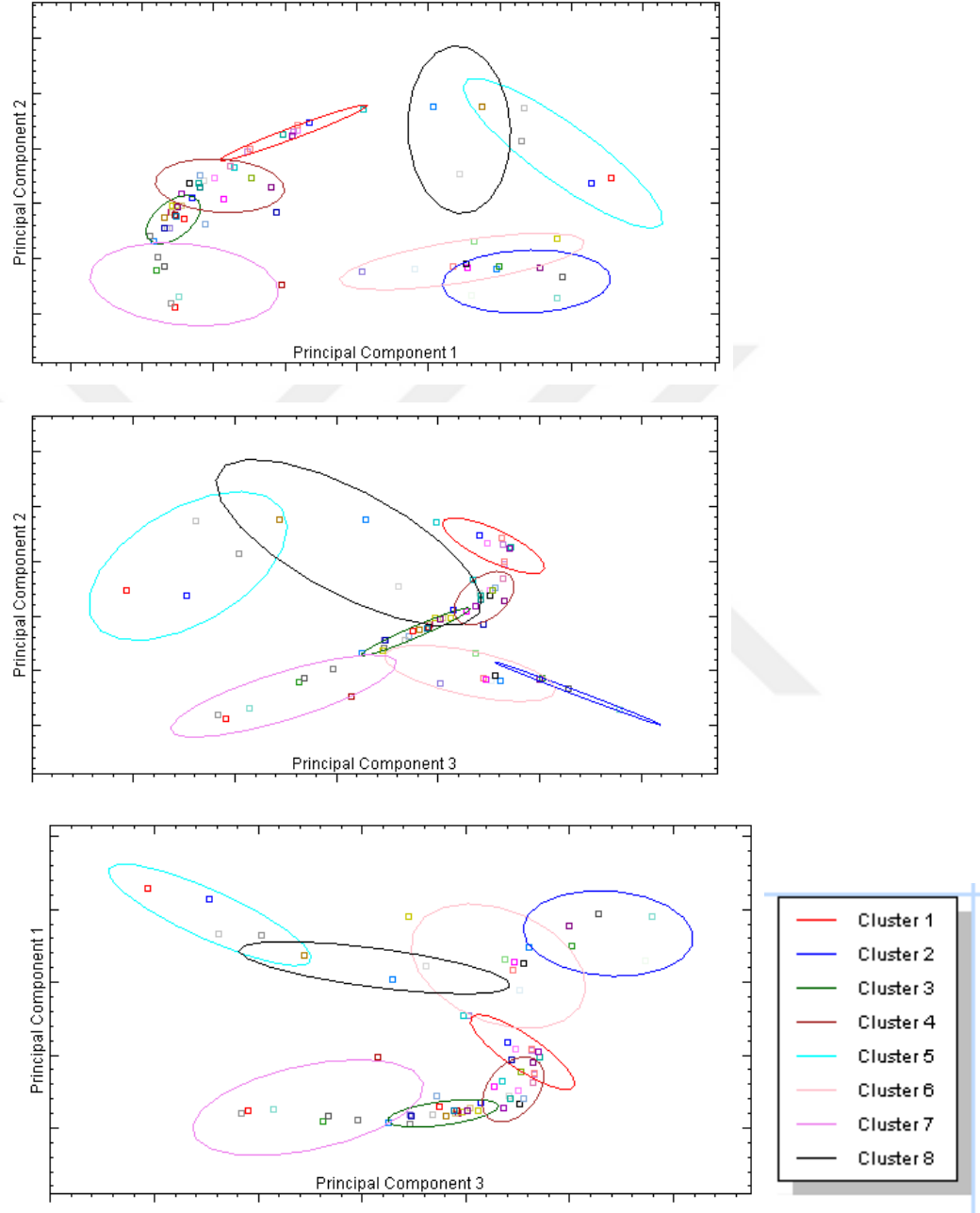
a1. *FGF21* geni 1. Ekzon Bölgesi Temel Bileşenler Analizi



Şekil 4.11. *FGF21* geni 1. ekzon 3 boyutlu PCA analizi

A: 1-2 temel bileşenler analizine göre örnekler sağa doğru yığılım göstermiştir,
 B: 2-3 üç boyutlu PCA ya göre örnekler sola doğru yığılım gösterirmiştir,
 C: 1-3 temel bileşenlerine göre örnekler üst fazlarda birikmiştir.

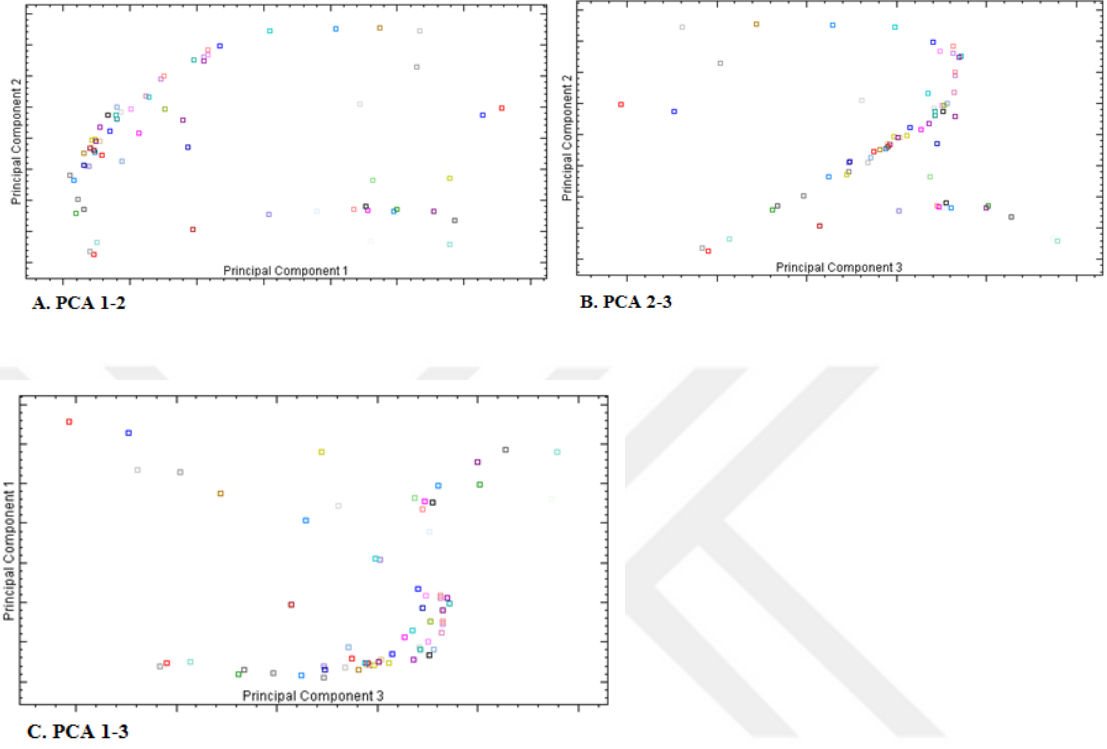
b. *FGF21* geni 2. Ekzon Bölgesi Kümeleme Analizi



Şekil 4.12. *FGF21* geni 2. ekzon bölgesi küme verileri

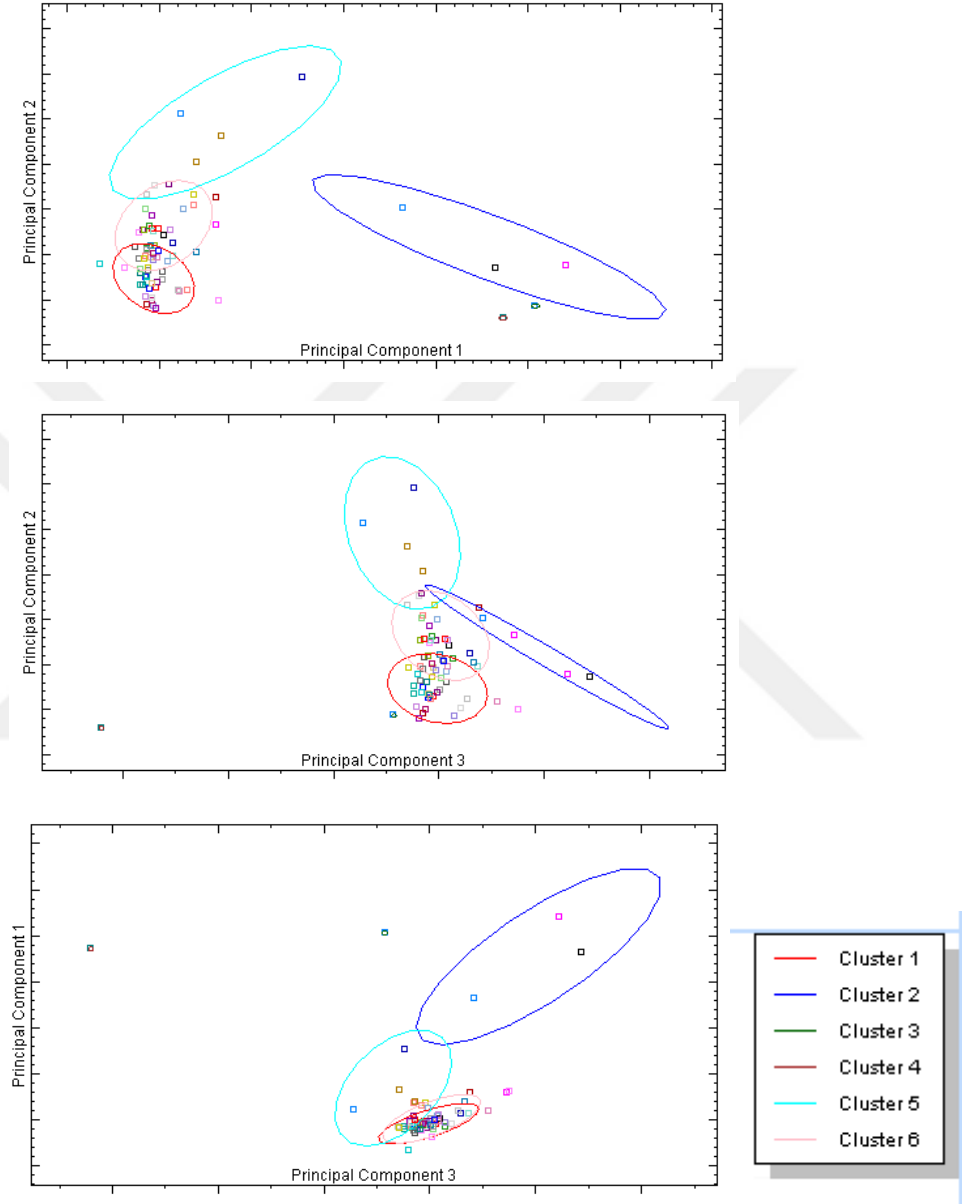
1. Küme: 3, 5, 18, 23, 40, 45, 54, 64, 80, 87, 88
2. Küme: 41, 48, 49, 70, 74, 94, 95, 96, 98, 100 (10 örnek)
3. Küme: 2, 13, 16, 21, 27, 29, 33, 34, 36, 38, 47, 52, 58, 62, 63, 69, 81, 82, 83, 84, 85, 91, 93 (23 örnek)
4. Küme: 12, 4, 25, 26, 28, 35, 37, 39, 42, 43, 50, 56, 60, 61, 80 (15 örnek)
5. Küme : 67, 68, 71, 73, 116 (5 örnek)
6. Küme: 6, 8, 10, 11, 14, 17, 24, 72, 97, 99, 112, 113 (12 örnek)
7. Küme: 1, 9, 15, 20, 30, 31, 32, 86 (8 örnek)
8. Küme: 59, 66, 78, 89, 90, 92 (6 örnek)

b1. *FGF21* geni 2. Ekzon Bölgesi Temel Bileşenler Analizi



Şekil 4.13. *FGF21* geni 2.ekzon bölgesi 3 boyutlu temel bileşenler analizine göre örnekler çoklu dağılım göstermiştir

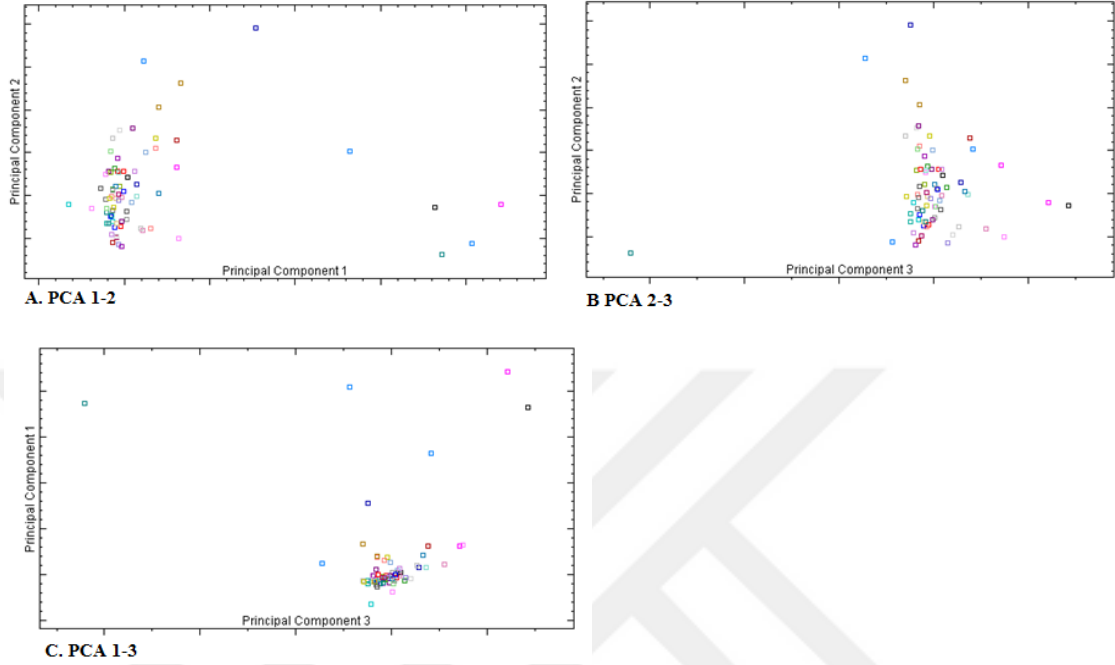
c. FGF21 geni 3.Ekzon Bölgesi Kümeleme Analizi



Şekil 4.14. FGF21 geni 3.ekzon küme verileri;

- 1.Küme: 3, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 31,32, 33, 34, 35,36, 37, 39,40, 45, 47, 84, 52, 56, 61, 56, 69, 72, 76,78, 79,113, 116 (38 örnek).
- 2.Küme: 10, 11, 77, 83, 84, 85, 87, 88, 91, 92 (10 örnek)
- 3.Küme: 6,86 (2 örnek)
- 4.Küme: 4: 7, 80, 81, 82,89, 90, 93 (7 örnek)
- 5.Küme: 21, 38,59, 63, 96, 98, 99, 100 (8 örnek)
- 6.Küme: 1, 2, 4, 5, 8, 9, 14, 22, 24, 25, , 41, 42, , 43, 49, 50, 54, 58, 60, 62, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 94, 95, 97, 112 (31 örnek)

c.1. *FGF21* geni 3.Ekzon Bölgesi Temel Bileşenler Analizi



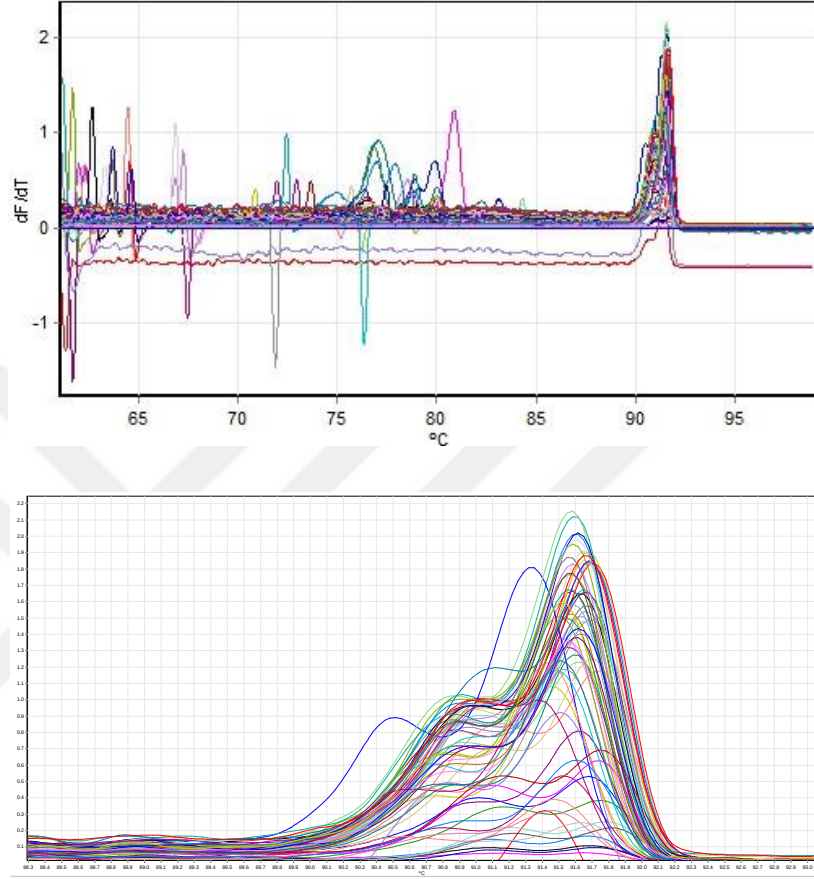
Şekil 4.15. *FGF21* geni 3.ekzon bölgesi temel bileşenler analizi

A: 1-2 örnekler sola doğru birikmiştir, B: 2-3 üç boyutlu temel bileşenler analizine göre örnekler sağa doğru yığılmı göstermiştir, C: temel 1-3 bileşenlerine göre örnekler alt fazlarda birikmiştir.

4.3.5. *BMP2* geni HRM analiz sonuçları

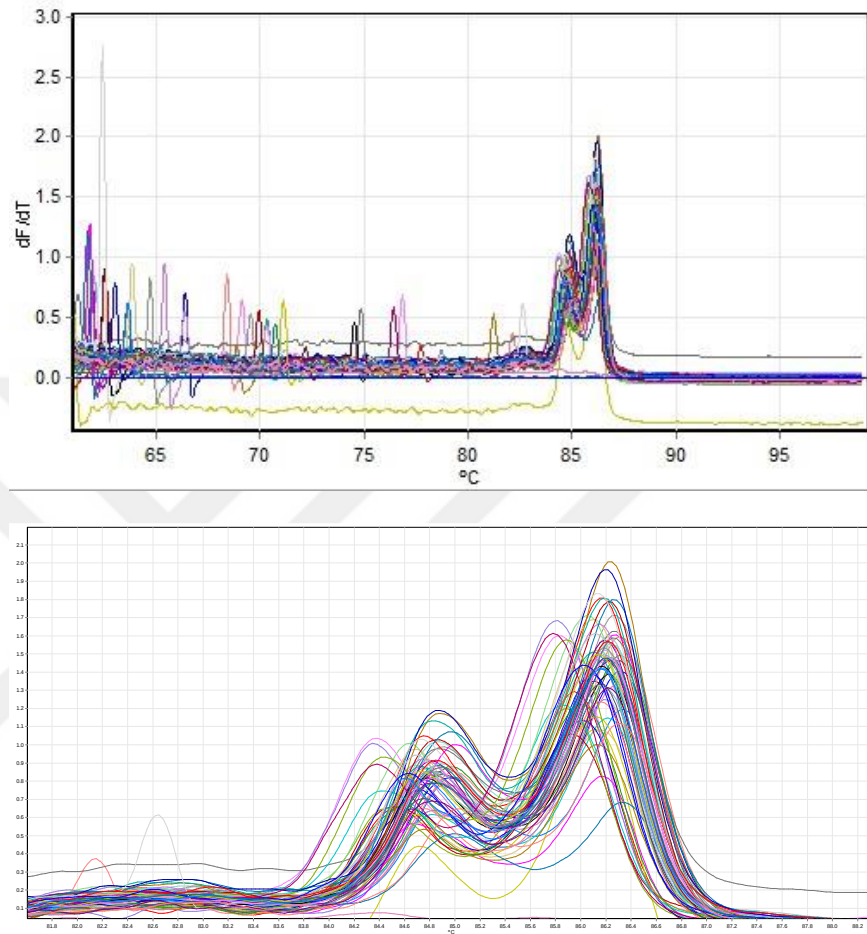
Sığır genomlarında 13. kromozom üzerinde bulunan Kemik Morfogenetik Protein2 geni 3 ekzon (NCBI Reference Sequence: Chr.13AC_000170.1) içerir. 11255 bp'lık DNA dizisinin 2. ve 3. ekzonları kapsayacak şekilde dizayn edilmiş primerler kullanılarak HRM-PCR analizi yapılmıştır.

4.3.5.a. BMP2 geni 2. Ekzon Bölgesi Erime Eğrisi Grafiği

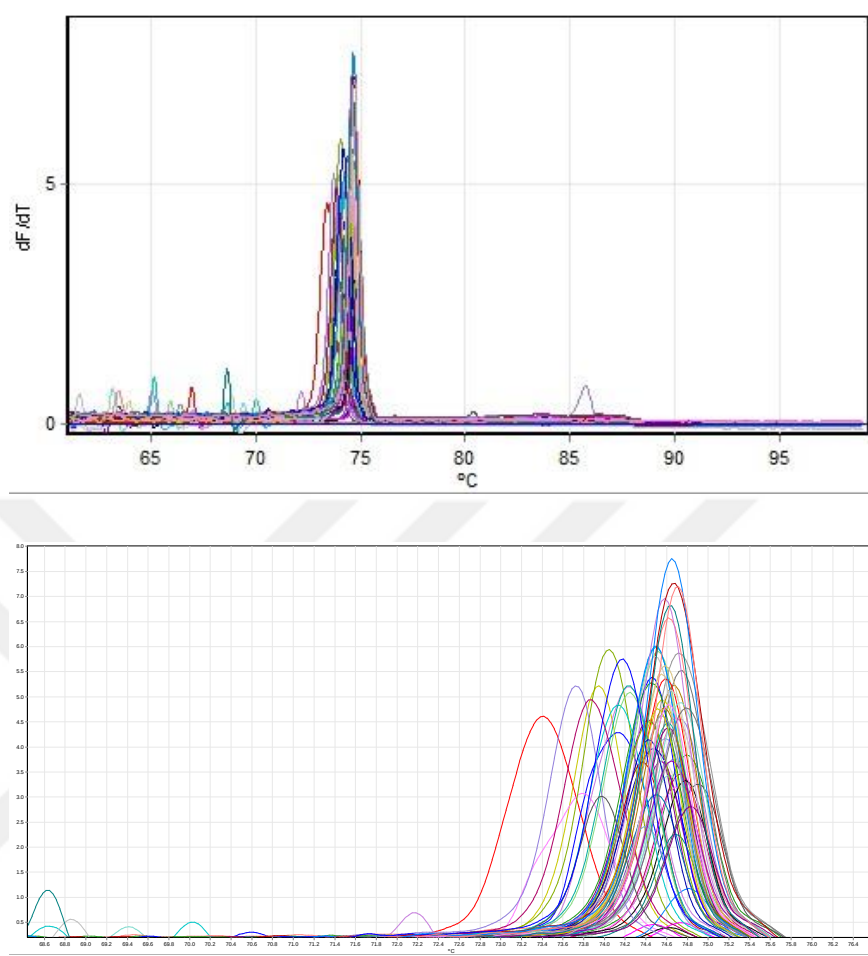


Şekil 4.16. BMP2 geni 2.ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği

4.3.5.b. *BMP2* geni 3. Ekzon bölgeleri erime eğrisi grafiği



Şekil 4.17. *BMP2* geni 3.ekzon-1. bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği

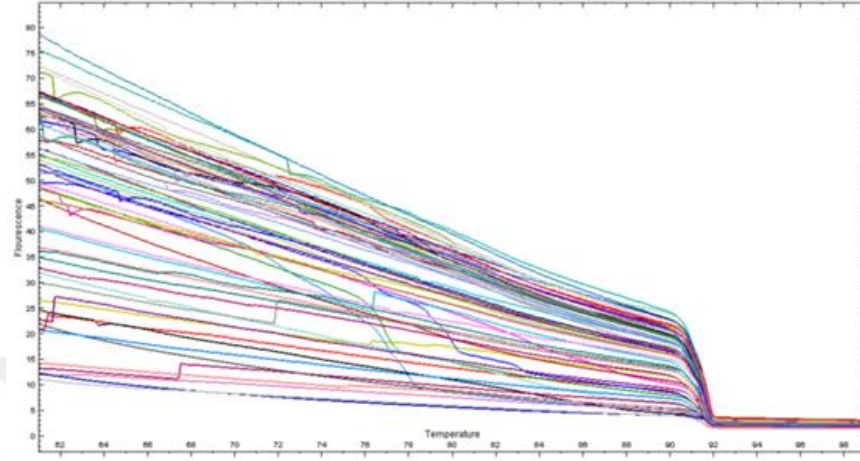


Şekil 4.18. *BMP2* geni 3.ekzon-2. bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği

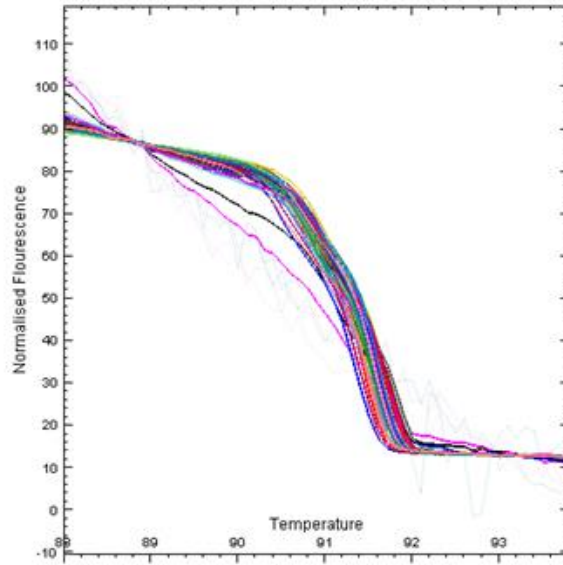
4.3.5.b. *BMP2* geni HRMA ham veri ve Normalizasyon grafikleri

Kemiklerin büyümesinde ve farklılaşmasında rol oynayan *BMP2* geninin farklı ekzon bölgeleri için normalizasyon aralığı en yüksek floresans değerinin 100'e eşit ve en düşük değer sıfıra gelecek şekilde erime eğrisi geçişinden önceki ve sonraki bölgeler belirlenerek normalizasyon grafikleri çizilmiştir.

a. BMP2 geni 2.Ekzon Bölgesi HRMA ham veri ve Normalizasyon grafikleri



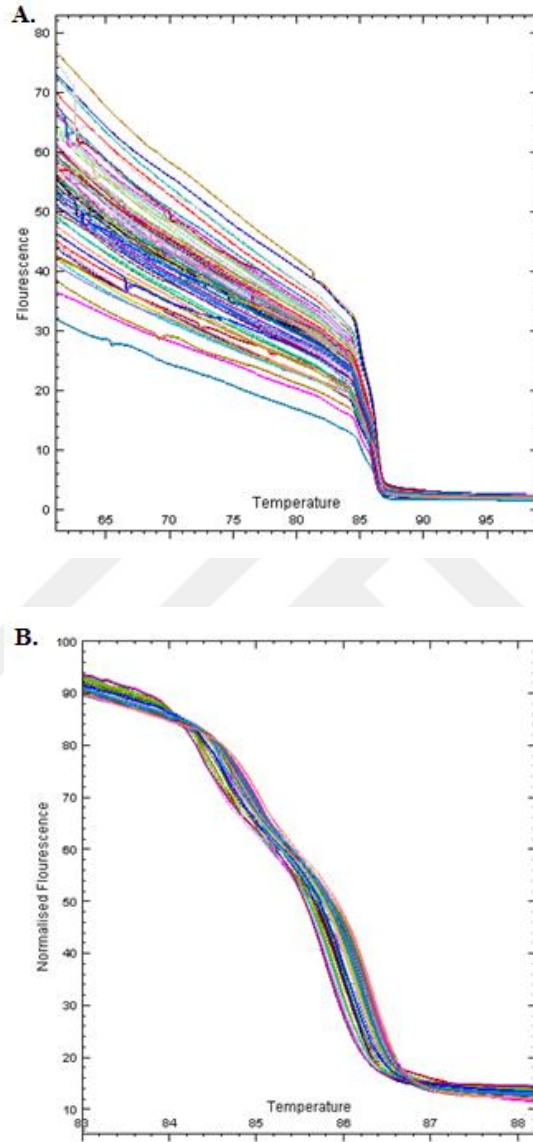
A. BMP2 2. Bölge HRMA grafiği



B. BMP2 2.Bölge Normalizasyon Grafiği

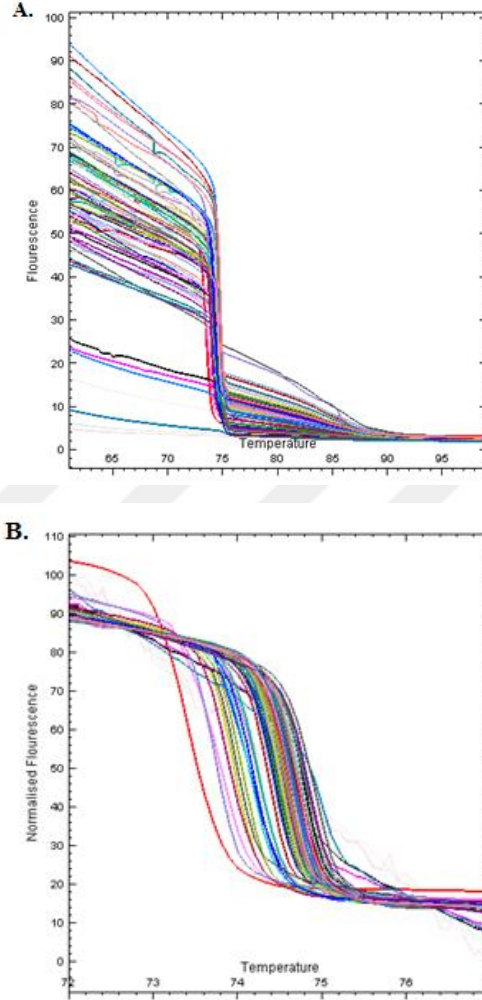
Şekil 4.19. A. BMP2 geni 2.ekzon bölgesi Ham HRMA grafiği B. Normalizasyon grafiği

b. BMP2 geni 3.Ekzon-1.Bölge, HRMA Ham Veri ve Normalizasyon grafikleri



Şekil 4.20. A. BMP2 geni 3.ekzon-1.bölge ham HRM analiz grafiği. B. Normalizasyon grafiği

c. BMP2 Geni 3.Ekzon-2.Bölge HRMA ham veri ve Normalizasyon grafikleri



Şekil 4.21. A. BMP2 geni 3.ekzon-2.bölge ham HRM analiz grafiği, B. Normalizasyon grafiği

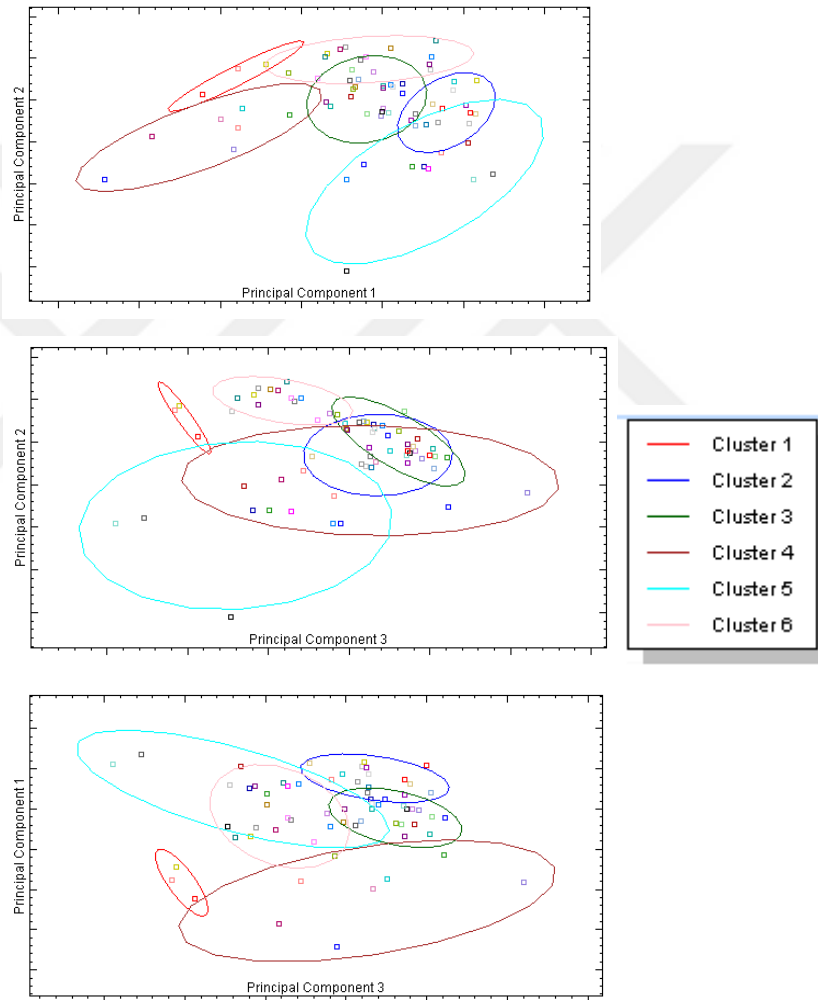
Farklı ekzon bölgeleri içeren *BMP2* gen bölgelerinin HRM-PCR analizleri sonucu erime eğrisi grafiklerine göre farklı sıcaklıklarda normalizasyon aralıkları tespit edilmiştir. *BMP2* geni 2. ekzon bölgesi 89-93°C, 3.ekzon-1. bölgesi 83-88°C, 3. ekzon-2. bölgesi için 72-77°C aralıklarında normalizasyon grafikleri belirlenmiştir.

4.3.5.c. BMP2 geni kümeleme ve temel bileşenler analizi

HRM-PCR analizi yapılmış 96 adet Esmer ırkına ait DNA örneğinin kümelendirme

analizleri her bir örneğin erime eğrileri farklılığına göre belirlenmiş HRMA analizleri kullanılarak ScreenClust HRM yazılım programı üzerinden değerlendirilmiştir. Örnekler üç boyutlu temel bileşenler analizine göre her bir bölge için farklı kümelerde toplanmıştır.

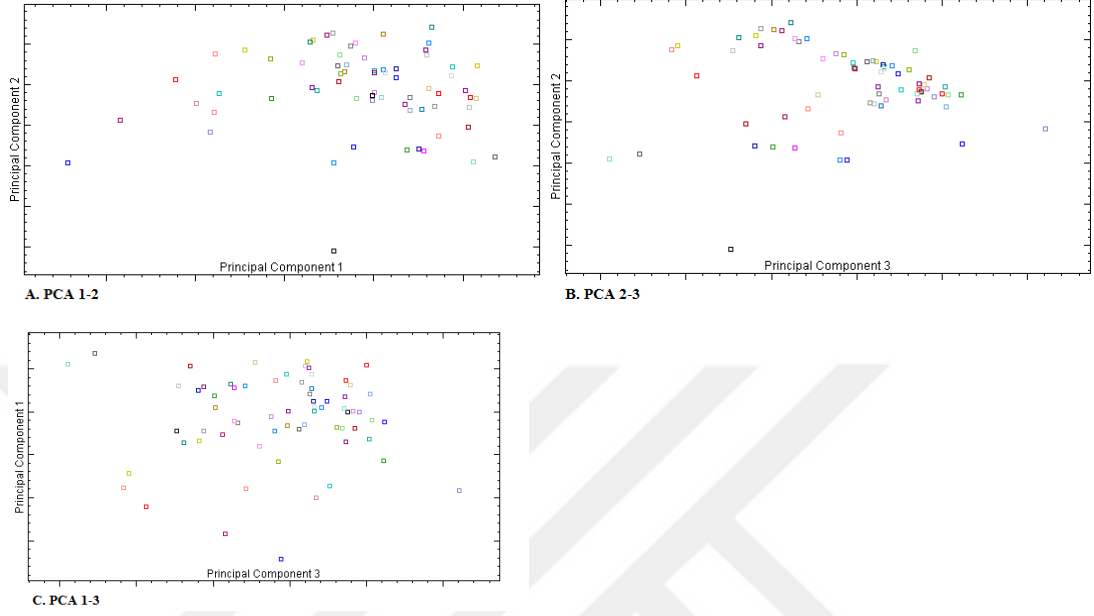
a. BMP2 geni 2.Ekzon Bölgesi Kümeleme ve Temel bileşenler analizi



Şekil 4.22. BMP2 geni 2.ekzon bölgesi küme verileri

1. Küme: 24, 77, 81, 86 (4 örnek)
2. Küme: 3, 4, 5, 6, 11, 14, 17, 18, 20, 21, 23, 27, 38, 43, 74, 47, 48, 50, 78, 54, 79, 81, 60, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 71, 90, 91, 92, 94, 95, 116 (37 örnek)
3. Küme: 8, 9, 12, 13, 15, 16, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 42, 45, 52, 56, 58, 61, 65, 70, 97, 99 (27 örnek)
4. Küme: 1, 2, 73, 22, 35, 40, 41, 44, 49, 59, 72, 96, 98, 100, 112 (15 örnek); 5. Küme: 7, 80, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 93 (9 örnek)
6. Küme: 10, 37, 82 (3 örnek)

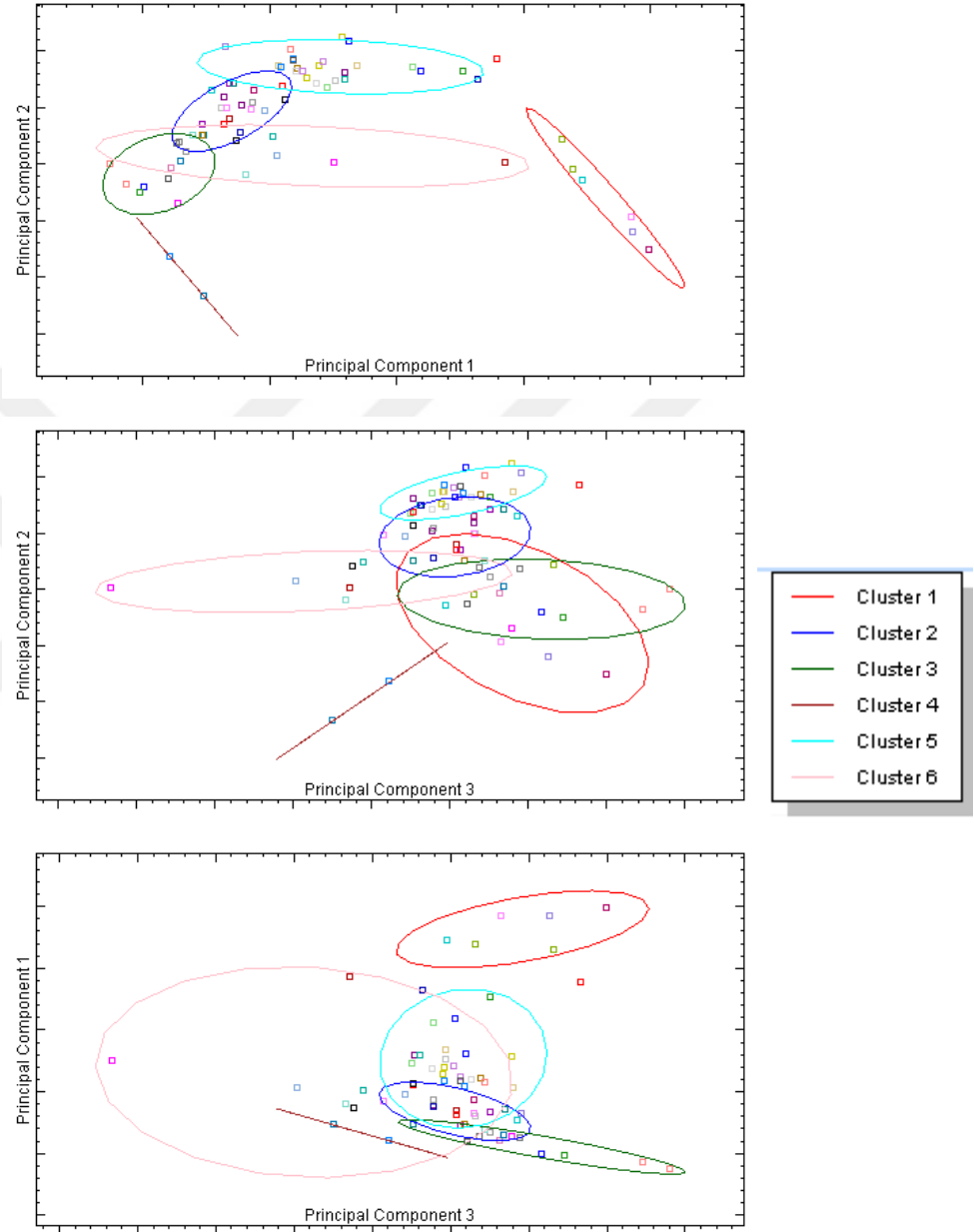
BMP2 geni 2.Ekzon Bölgesi Temel Bileşenler Analizi



Şekil 4.23. BMP2 geni 2.ekzon bölgesi üç boyutlu temel bileşenler analizi

A: 1-2 temel bileşenler analizine göre örnekler sağa doğru yığılım göstermiştir, B: 2-3 ve C: temel 1-3 bileşenlerine göre örnekler üst fazlarda birikmiştir.

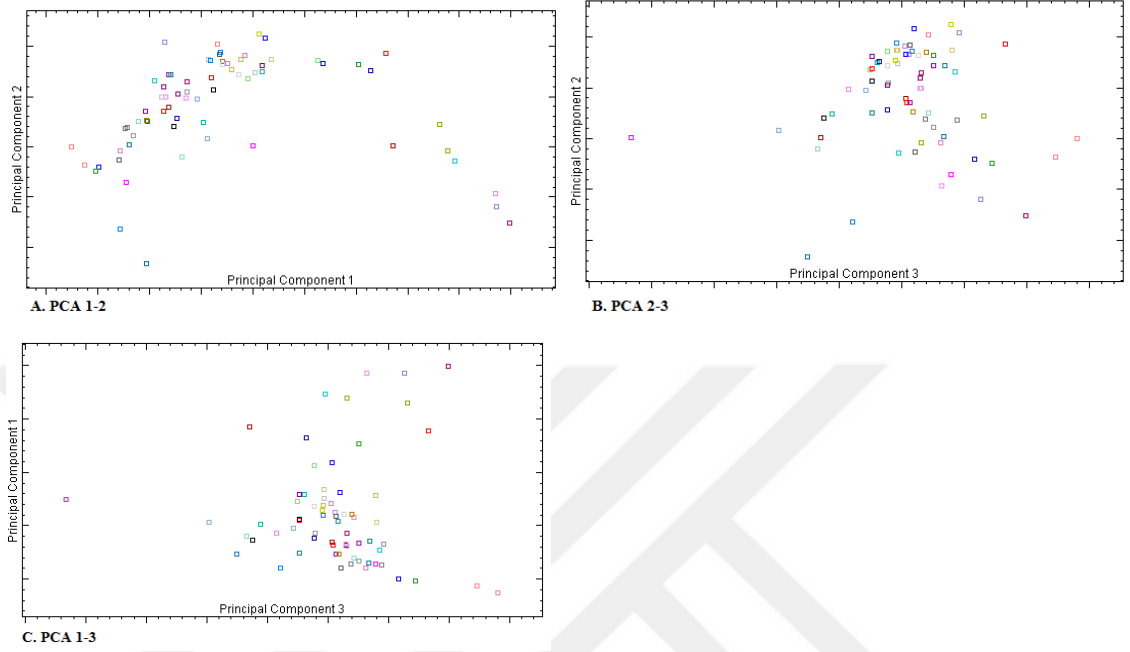
b. BMP2 Geni 3.Ekzon-1.Bölge Kümeleme ve Temel Bileşenler Analizi



Şekil 4.24. BMP2 geni 3.ekzon-1.bölge veri kümeleri

1. Küme: 5, 22, 44, 49, 54, 59 (6 örnek)
2. Küme: 12, 61, 26, 27, 29, 31, 33, 36, 37, 39, 43, 47, 52, 78, 80, 58, 62, 65, 68, 69, 71 (21 örnek)
3. Küme: 3, 8, 9, 73, 30, 32, 42, 56, 63, 72 (10 örnek)
4. Küme: 6, 24 (2 örnek);
5. Küme: 1, 2, 4, 13, 14, 17, 18, 21, 32, 25, 28, 34, 35, 38, 40, 41, 54, 74, 50, 60, 61, 64, 66, 67, 70 (25 örnek)
6. Küme: 10, 11, 15, 20, 48, 79 (6 örnek)

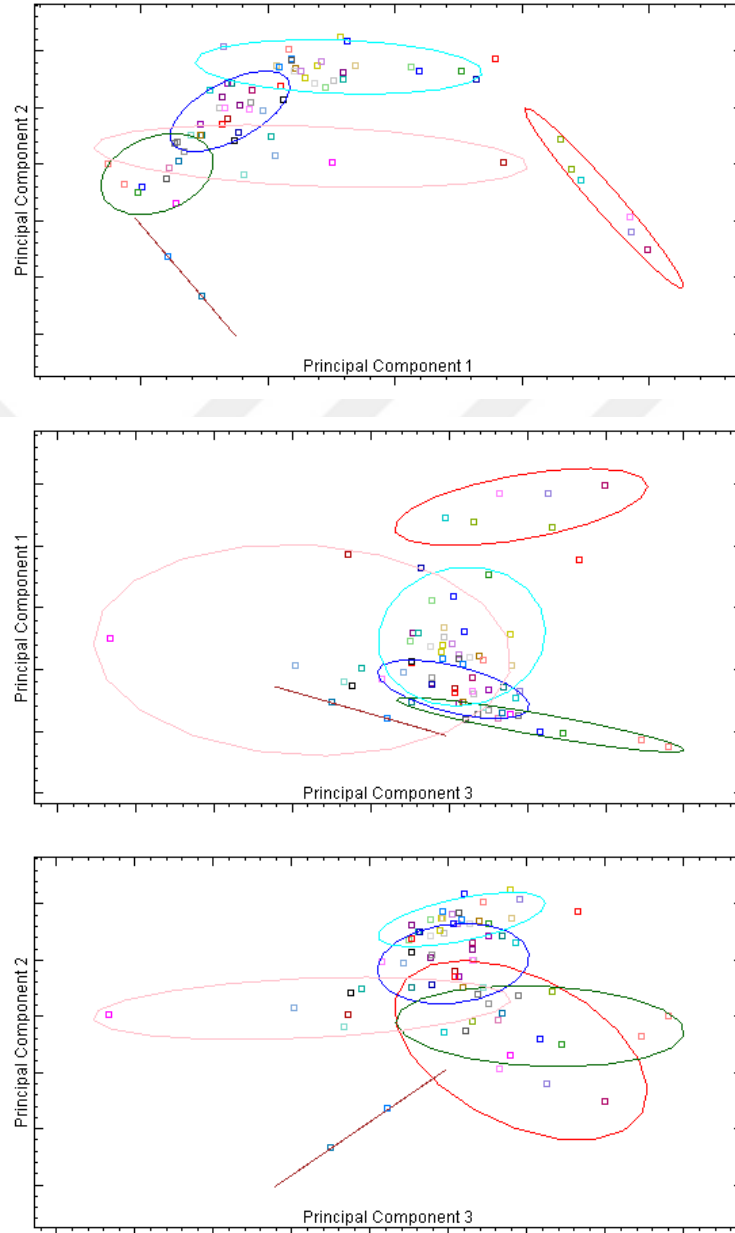
BMP2 Geni 3. Ekzon-1.Bölge Temel Bileşenler Analizi



Şekil 4.25. BMP2 geni 3.ekzon-1.bölgesi üç boyutlu temel bileşenler analizi

A: 1-2 temel bileşenler analizine göre örnekler sola doğru yığılmıştır, B: 2-3 üç boyutlu PCA ya göre örnekler sağa doğru yığılmıştır, C: 1-3 örnekler alt fazlarda birikmiştir.

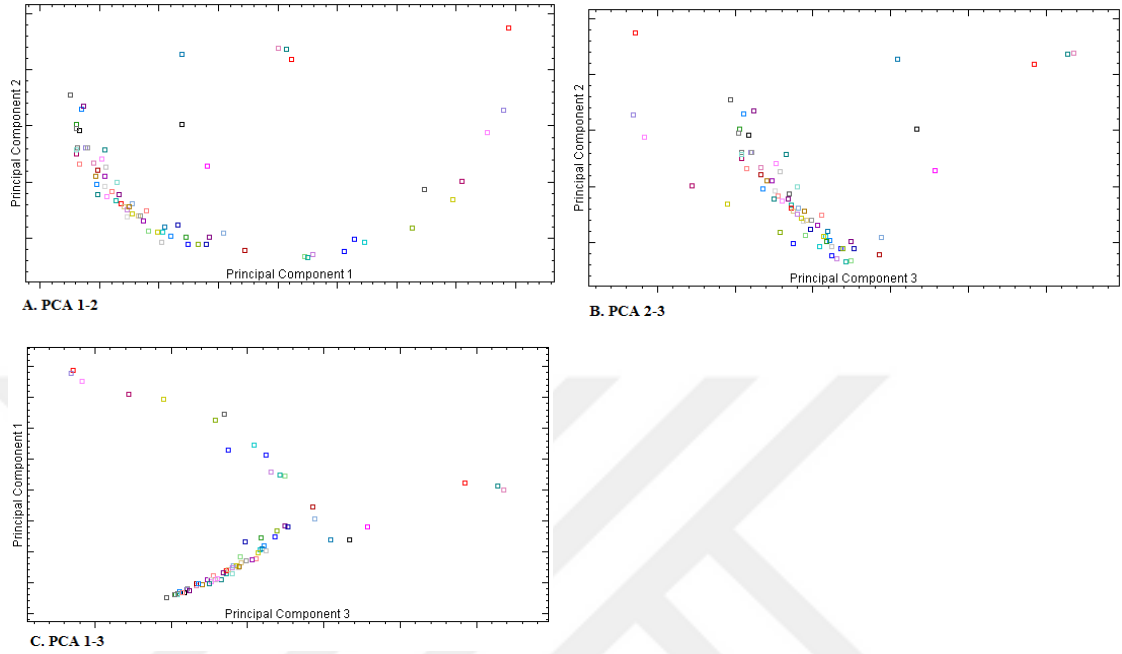
c. BMP2 Geni 3.Ekzon-2.Bölge Kümeleme ve Temel Bileşenler Analizi



Şekil 4.26. BMP2 geni 3.ekzon-2.bölgesine ait veri kümeleri

- 1.Küme: 7, 77, 65, 84, 94, 96 (6 örnek)
- 2.Küme: 4, 8, 12, 13, 14, 16, 20, 23, 25, 26, 28, 33, 34, 35, 36, 38, 41, 45, 48, 50, 78, 54, 56, 80, 61, 62, 66, 80, 92 (29 örnek)
- 3.Küme: 6, 9, 15, 17, 73, 21, 27, 29, 30, 31, 32, 37, 39, 40, 43, 47, 52, 58, 60, 63, 68, 69, 70, 71, 72, 86 (26 örnek)
4. Küme: 10, 11, 24, 85, 89, 90, 93, 112, 113, 116 (10 örnek)
5. Küme: 1, 5, 49, 59, 87, 95, 97, 99 (8 örnek)
6. Küme: 2, 3, 18, 22, 44, 74, 79, 64, 67, 81, 82, 83, 88, 91, 98, 100 (16 örnek)

BMP2 Geni 3.Ekzon-2.Bölge Temel Bileşenler Analizi



Şekil 4.27. BMP2 geni 3.ekzon-2.bölgesi üç boyutlu temel bileşenler analizi

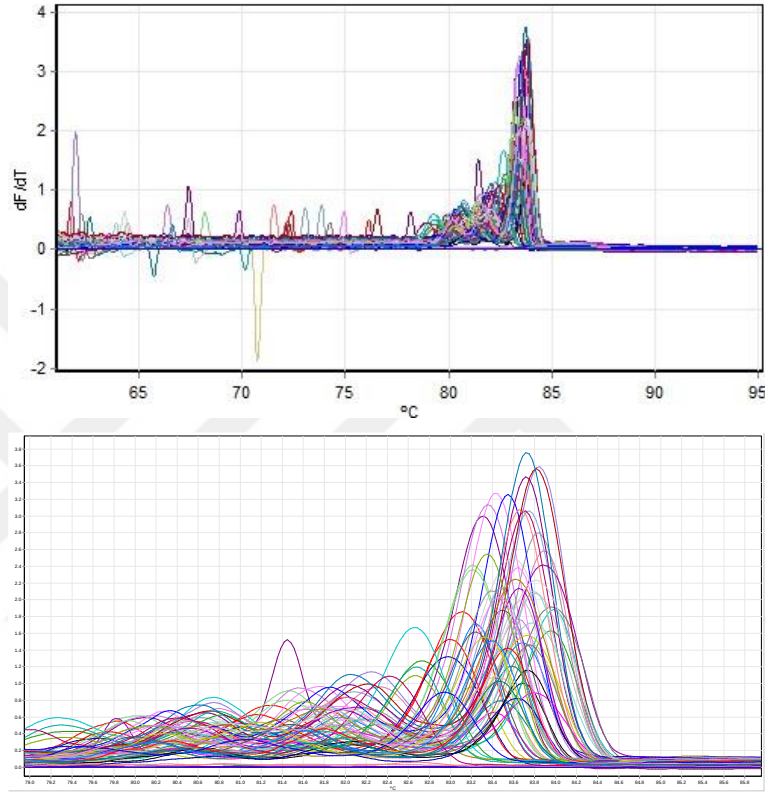
A: 1-2 temel bileşenler analizine göre örnekler sağa ve sola doğru yığılım göstermiştir, B: 2-3 ve C: 1-3 üç boyutlu PCA ya göre örnekler orta alanlarda dağılımıştır.

4.3.6. ELF5 geni HRM analiz sonuçları

Sığır genomlarında 15.kromozom üzerinde bulunan ve 9 ekzon (NCBI Reference Sequence: AC_000172.1 Chr.15) içeren E74 benzeri ETS transkripsiyon faktör 5 geninin (33196 bp) 5. 6. 7. ekzon bölgeleri ve 2.intron bölgeleri için Esmer sığır ırkı DNA örneklerinin HRM-PCR analizleri yapılmıştır.

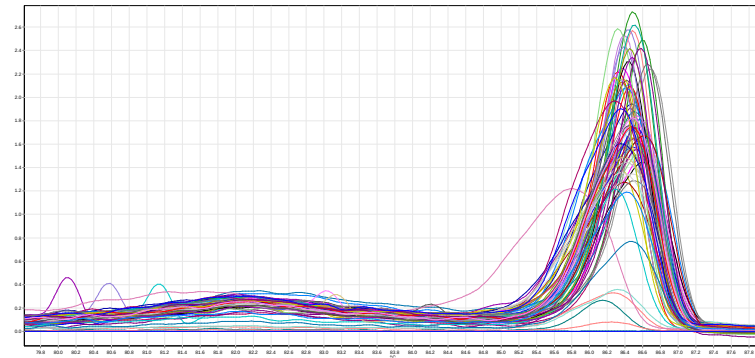
4.3.6.a. *ELF5* geni erime eğrisi grafikleri (Melt curve)

a. *ELF5* Geni 2. İntron Bölgesi Erime Eğrisi Grafikleri



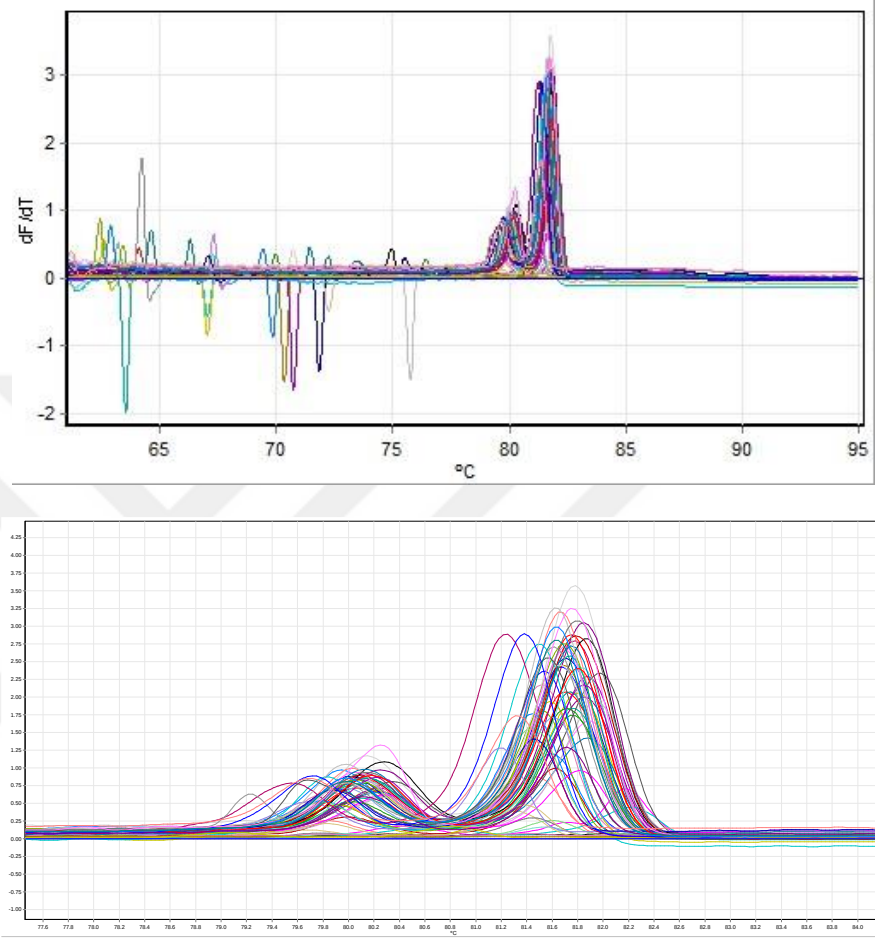
Şekil 4.28. *ELF5* geni 2. intron bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği

b. *ELF5* Geni 5. Ekzon Bölgesi Erime Eğrisi Grafikleri



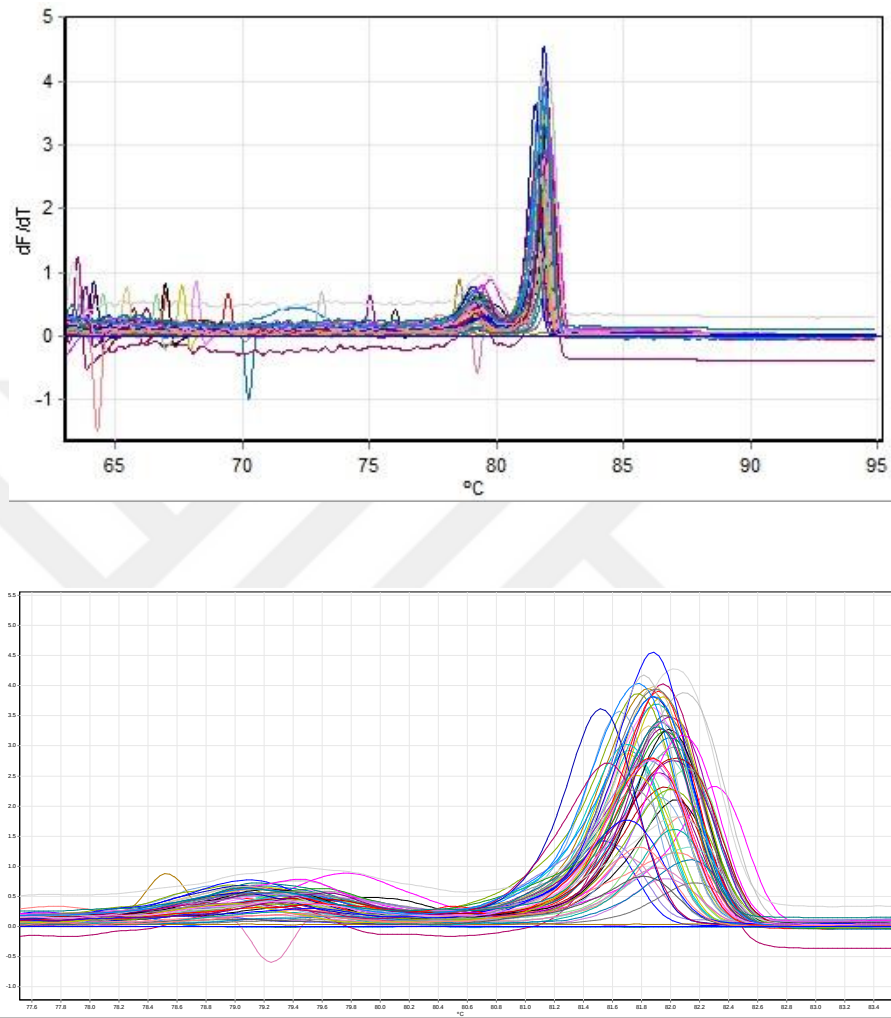
Şekil 4.29. *ELF5* geni 5. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği

c. *ELF5* Geni 6. Ekzon Bölgesi Erime Eğrisi Grafikleri



Şekil 4.30. *ELF5* geni 6. ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği

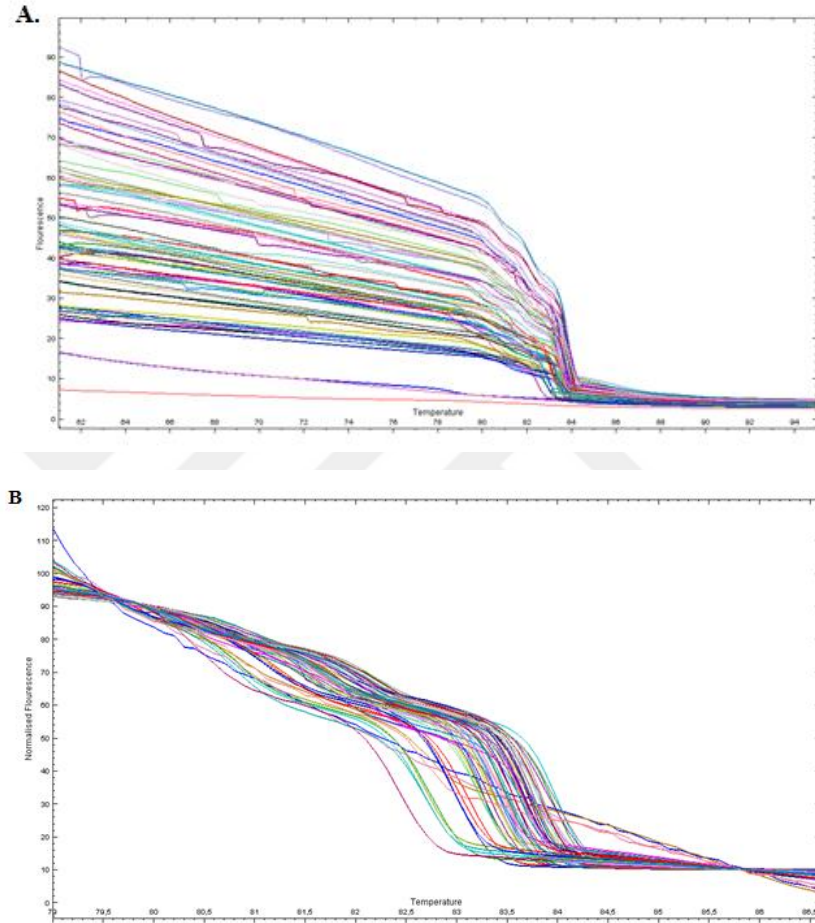
d. *ELF5* geni 7. Ekzon Bölgesi Erime Eğrisi Grafikleri



Şekil 4.31. *ELF5* geni 7.ekzon bölgesine ait differansiyel erime eğrisi grafiği

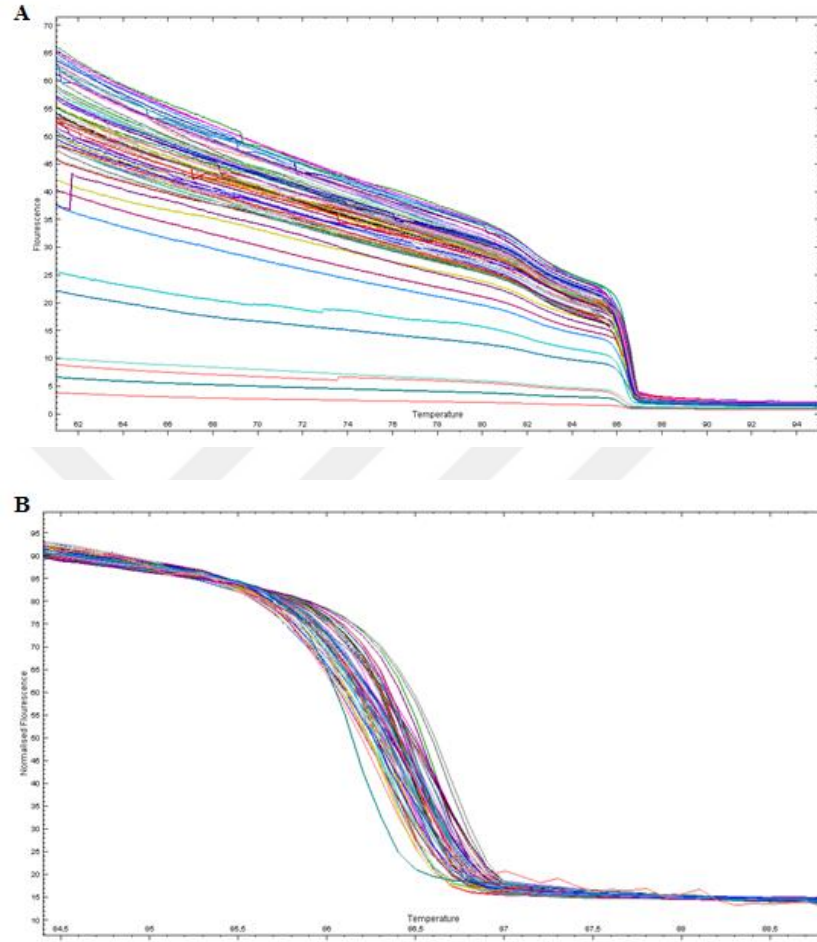
4.3.6.b. *ELF5* Geni HRMA Ham Veri ve Normalizasyon Grafikleri

a. *ELF5* Geni 2. İntron Bölgesi HRMA ham veri ve Normalizasyon Grafiği



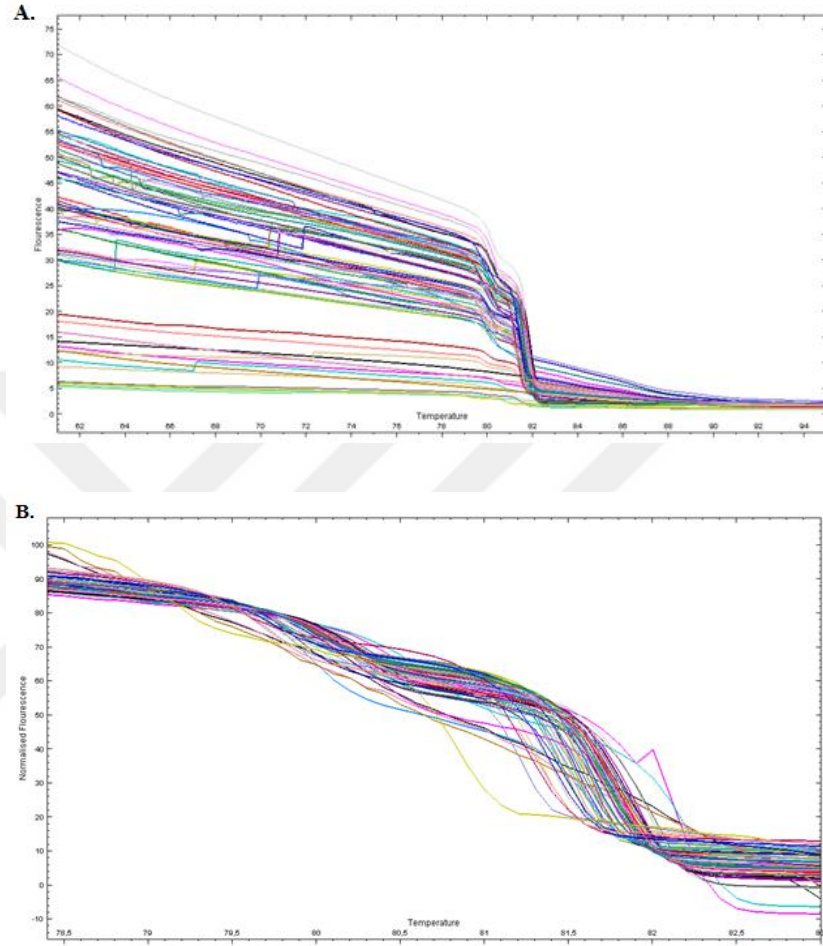
Şekil 4.32. A. *ELF5* geni 2. intron bölgesi Ham HRMA grafiği B. Normalizasyon grafiği

b. *ELF5* Geni 5.Ekzon Bölgesi HRMA Ham Veri ve Normalizasyon Grafiği



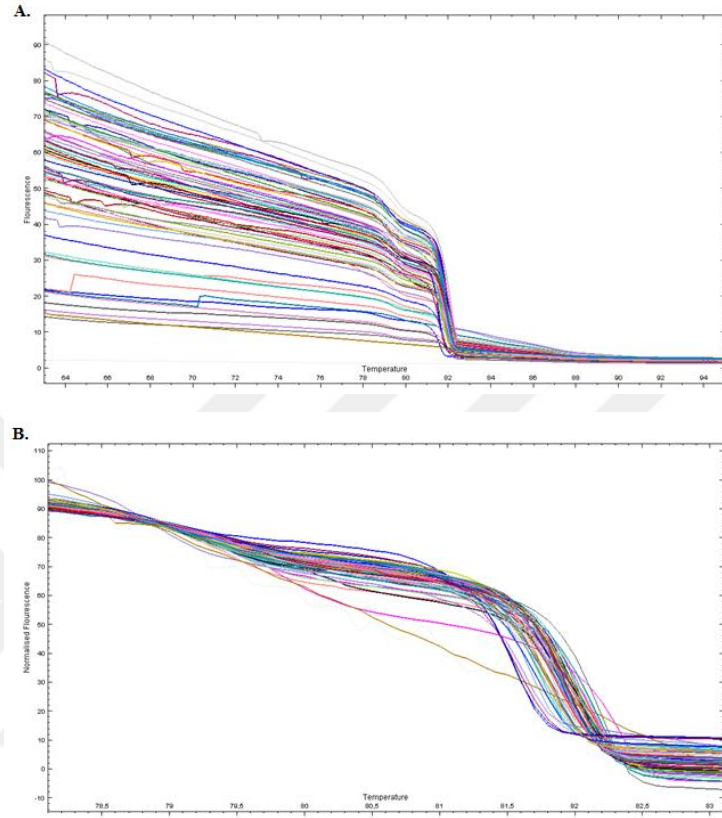
Şekil 4.33. A. *ELF5* geni 5.ekzon bölgesi Ham HRMA grafiği B. Normalizasyon grafiği

c. *ELF5* geni 6.Ekzon Bölgesi HRMA Ham Veri ve Normalizasyon Grafiği



Şekil 4.34. A. *ELF5* geni 6.ekzon bölgesi Ham HRMA grafiği B. *ELF5* 3. Bölge bölgesi için 78-83 °C aralığındaki normalizasyon grafiği

d. *ELF5* geni 7. Ekzon Bölgesi HRMA Ham Veri ve Normalizasyon Grafiği

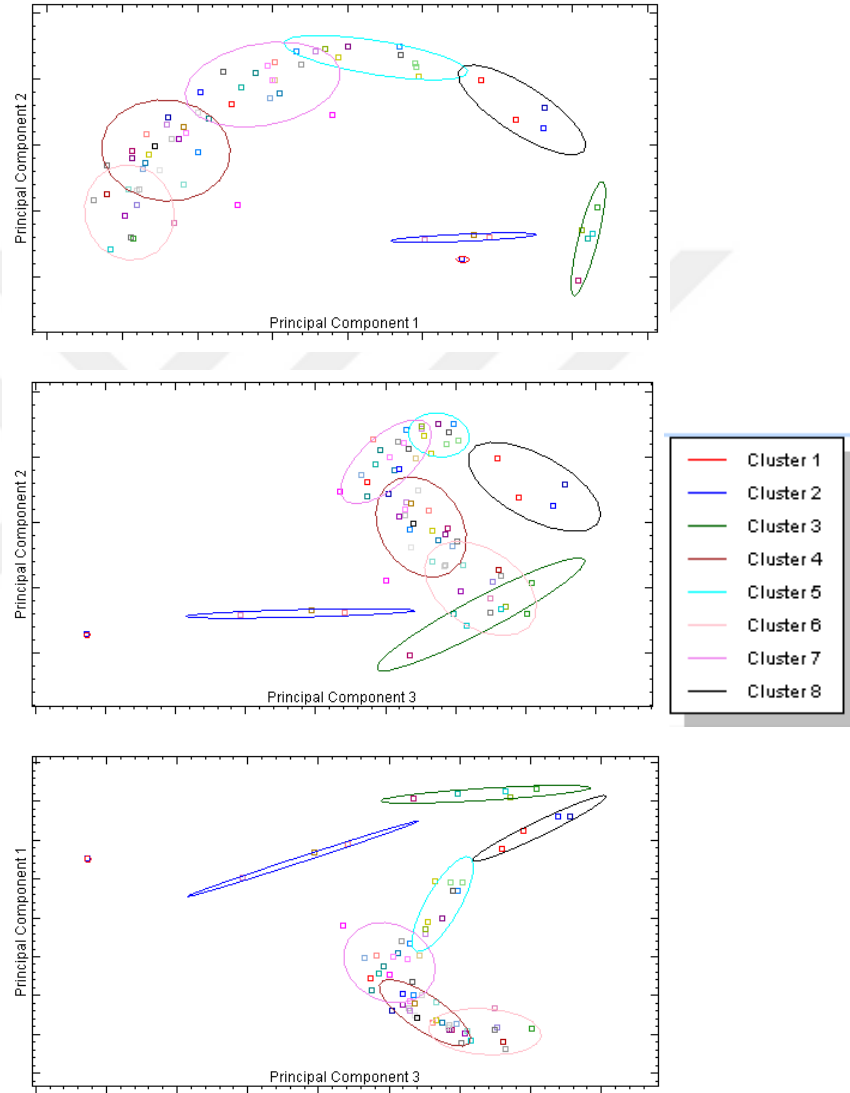


Şekil 4.35. A. *ELF5* geni 7.ekzon bölgesi Ham HRMA grafiği B. Normalizasyon grafiği

Baz büyüklükleri birbirinden farklı ve farklı ekzon bölgeleri içerecek şekilde çoğaltılmış *ELF5* gen ürünlerinin PCR-HRM analizleri sonucu erime sıcaklıkları farklılığına göre polimorfik bölgelerinin doğru tespiti için farklı sıcaklıklarda normalizasyon aralıkları belirlenmiştir. *ELF5* geni 2. intron bölgesi 79-86°C, 5.ekzon için 84-89°C, 6.ekzon 78-83°C ve 7. ekzon bölgesi 78-83°C normalizasyon aralıkları tespit edilmiştir.

4.3.6.c. *ELF5* geni kümeleme verileri ve temel bileşenler analizi

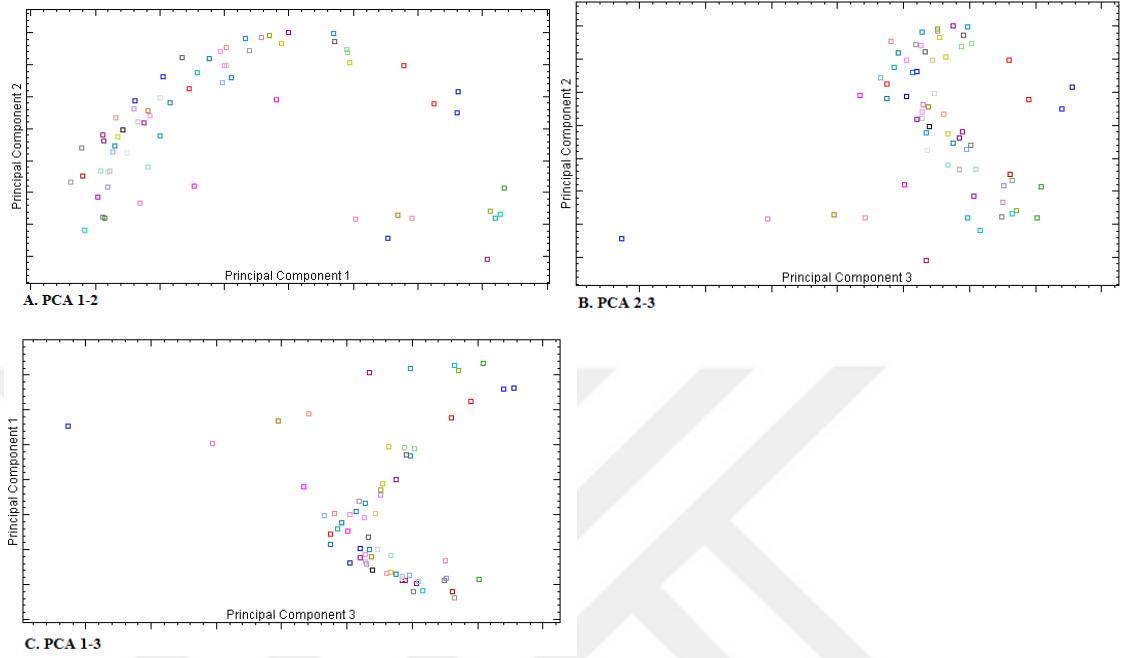
a. *ELF5* Geni 2. İntron Bölgesi Kümeleme Analizi



Şekil 4.36. *ELF5* geni 2. İntron bölgesi veri kümeleri

1. Küme; 3,90 (2 örnek)
2. Küme: 21, 77, 72, 86, 89, 100 (6 örnek)
3. Küme: 22, 41, 44, 79, 59, 80, 82, 84, 91, 93, 95, 98, 113, 116 (14 örnek)
4. Küme: 6, 11, 15, 16, 27, 28, 29, 34, 36, 37, 40, 42, 43, 50, 78, 56, 81, 58, 63, 87, 88, 94, 96, 97, 99 (25 örnek)
5. Küme: 2, 4, 14, 18, 38, 74, 54, 64, 66, 81, 92, 112 (12 örnek)
6. Küme: 9, 12, 17, 73, 26, 30, 31, 47, 52, 60, 61(11 örnek)
- 7.Küme: 5, 8, 10, 23, 24, 32, 35, 39, 54, 84, 62, 65, 69, 70, 71(15 örnek)
8. Küme: 25, 33, 67 (3 örnek)

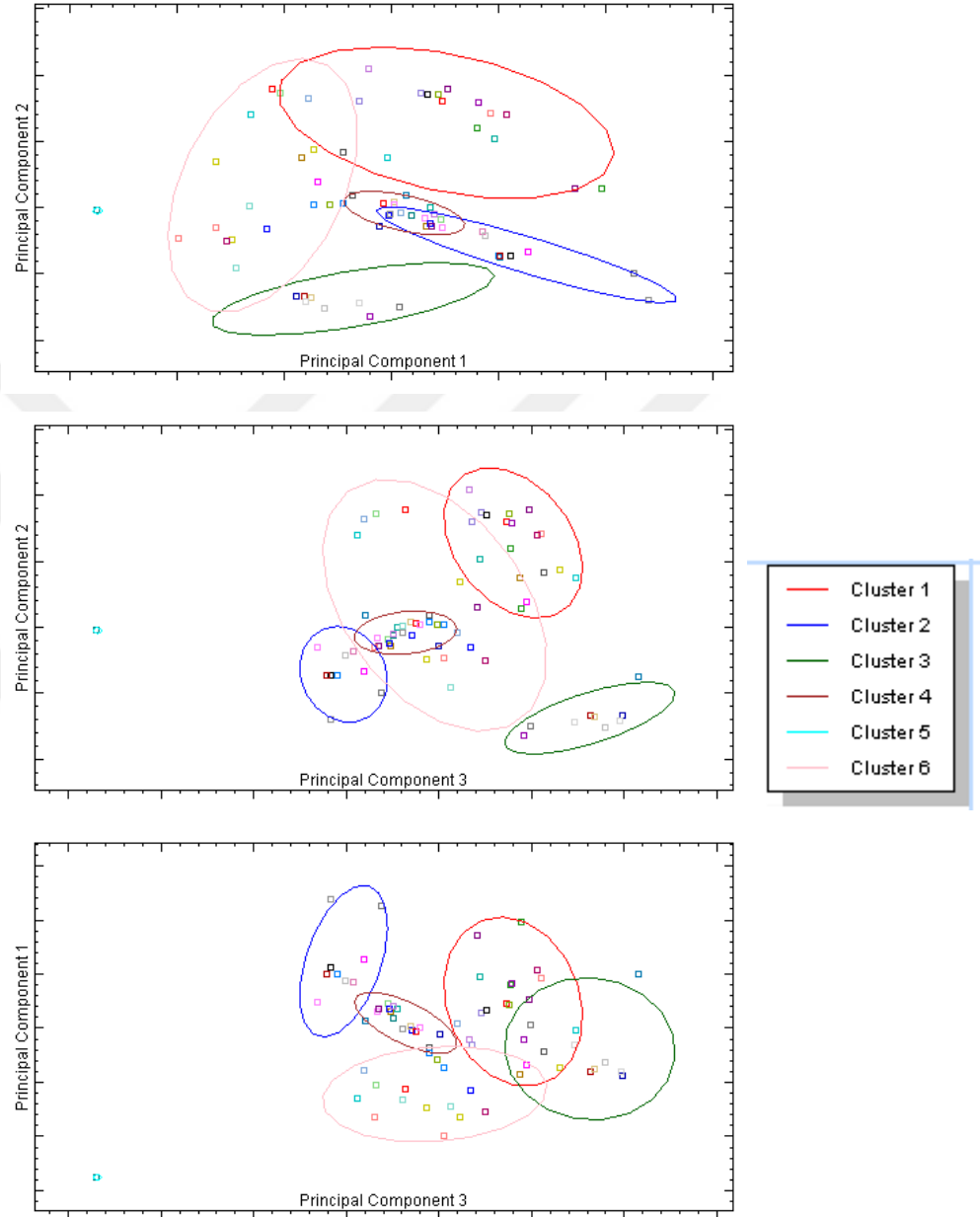
***ELF5* Geni 2. İntron Bölgesi Temel Bileşenler Analizi**



Şekil 4.37. *ELF5* geni 2. intron bölgesi 3 boyutlu temel bileşenler analizi

A: 1-2 temel bileşenler analizine göre örnekler sola doğru yığılım göstermiştir. B: 2-3 ve C:1-3 bileşenlerine göre örnekler sağa doğru birikmiştir.

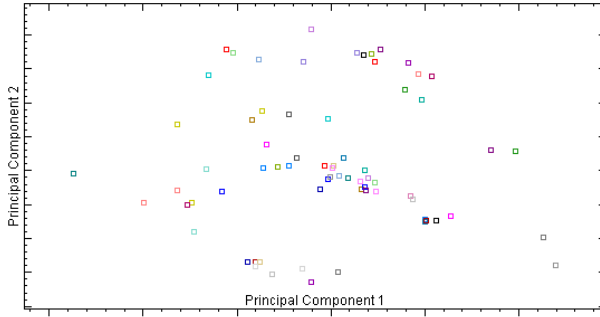
b. *ELF5* Geni 5. Ekzon Bölgesi Kümeleme Analizi



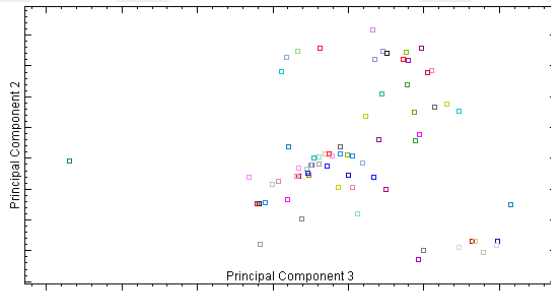
Şekil 4.38. *ELF5* geni 5. ekzon bölgesi küme verileri

1. Küme: 4, 8, 9, 12, 17, 18, 27, 32, 33, 34, 41, 43, 49, 54, 79, 58, 68, 80, 82, 83, 88, 91, 29 (23 örnek)
2. Küme: 6, 10, 11, 73, 29, 30, 37, 52, 63, 84 (10 örnek)
3. Küme: 20, 24, 26, 28, 31, 45, 81, 60, 61, 89 (10 örnek)
4. Küme: 3, 5, 13, 14, 16, 21, 23, 25, 35, 36, 39, 50, 56, 62, 64, 65, 69, 70, 86 (19 örnek)
5. Küme: 71, 90, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100 (9 örnek)
6. Küme: 1, 2, 15, 22, 38, 40, 42, 44, 74, 47, 48, 78, 59, 66, 67, 72, 81, 85, 87, 99 (20 örnek)

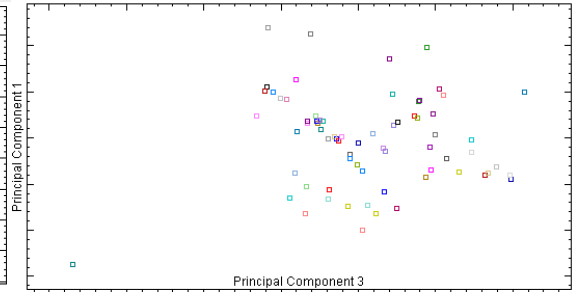
***ELF5* Geni 5. Ekzon Bölgesi Temel Bileşenler Analizi**



A. PCA 1-2



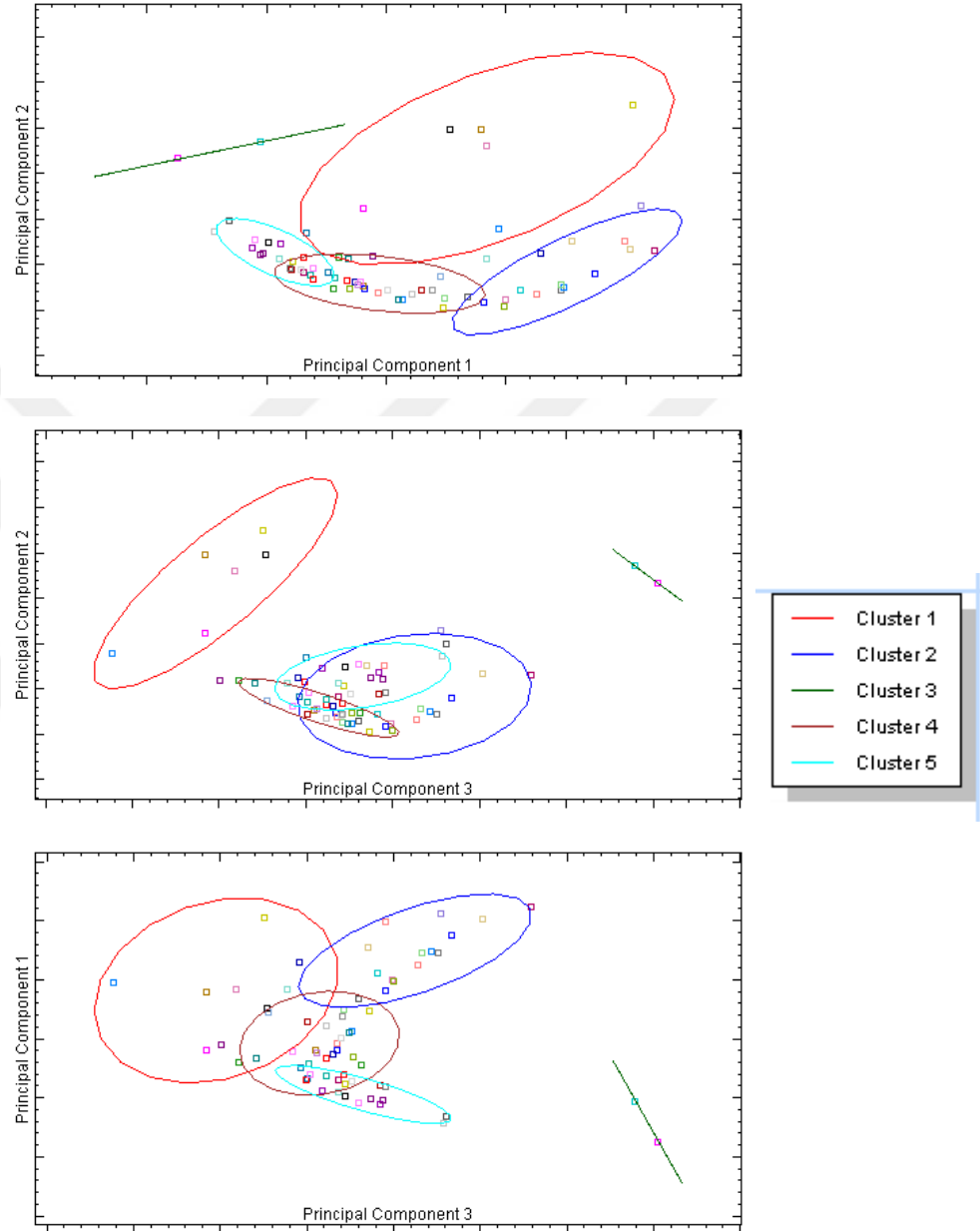
B. PCA 2-3



C. PCA 1-3

Şekil 4.39. *ELF5* geni 5. ekzon bölgesi 3 boyutlu temel bileşenler analizlerine göre örnekler çoklu dağılım göstermiştir.

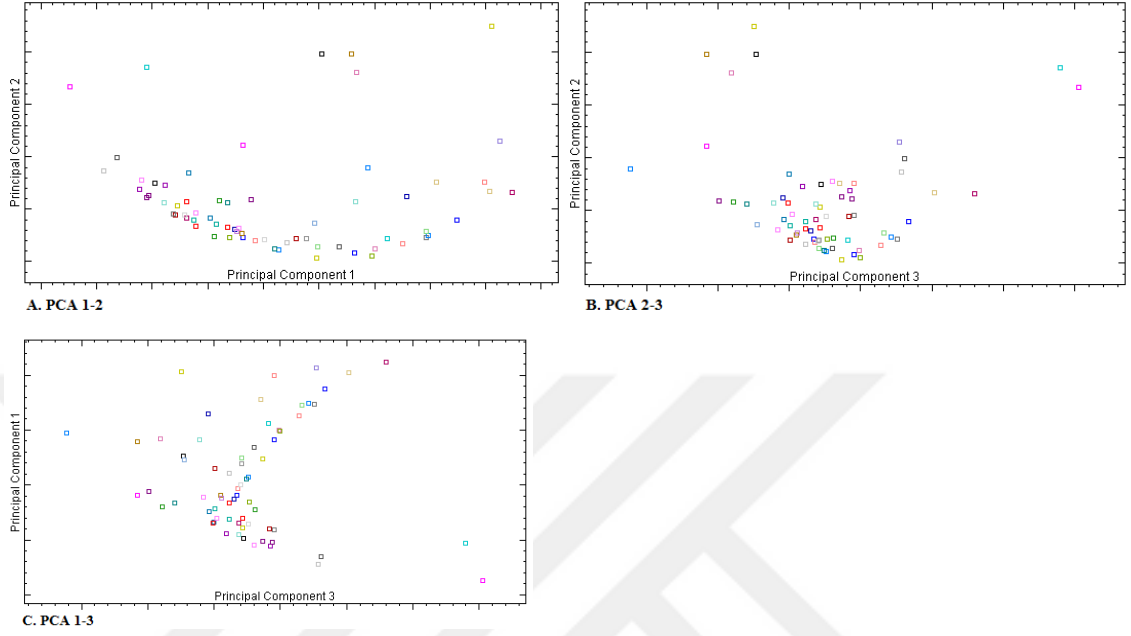
c. *ELF5* Geni 6. Ekzon Bölgesi Küme analizi



Şekil 4.40. *ELF5* geni 6. ekzon bölgesi küme verileri

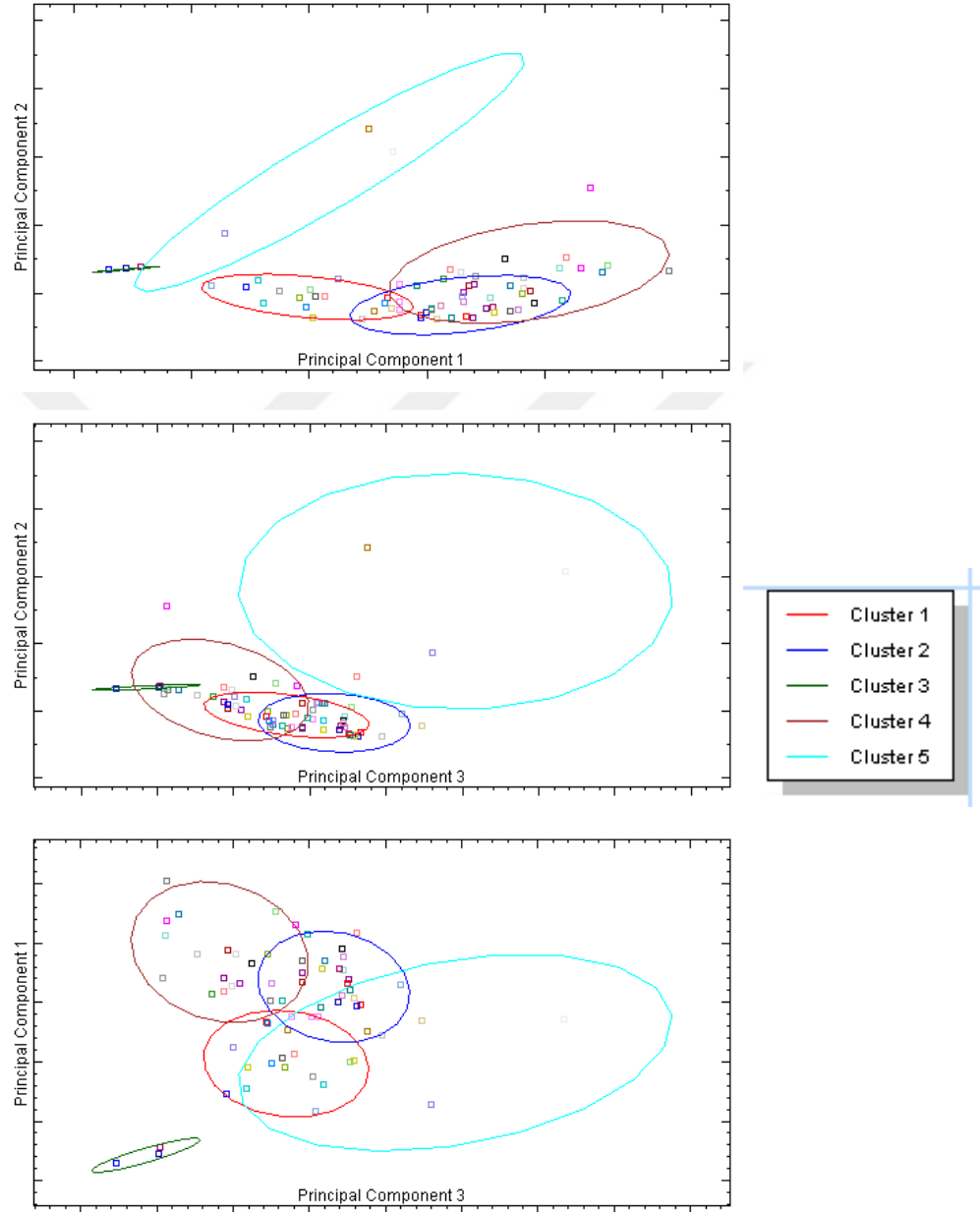
1. Küme: 6, 11, 42, 75, 77, 66, 96 (7 örnek)
2. Küme: 8, 13, 73, 22, 31, 35, 38, 44, 45, 74, 49, 79, 59, 67, 72, 94, 97, 99, 112 (19 örnek)
3. Küme : 10, 12, 80, 82, 86, 89, 90, 93, 100 (10 örnek)
4. Küme: 41, 3, 9, 14, 15, 20, 21, 23, 25, 33, 34, 37, 39, 40, 41, 48, 50, 54, 78, 56, 60, 61, 62, 64, 68, 69, 70, 71, 81, 83, 84, 85, 87, 88, 91, 92, 95, 98, 113 (39 örnek)
5. Küme: 2, 4, 5, 24, 26, 27, 28, 29, 32, 36, 43, 47, 52, 58, 63, 65, 116 (17 örnek)

***ELF5* Geni 6. Ekzon Bölgesi Temel Bileşenler Analizi**



Şekil 4.41. *ELF5* geni 6. ekzon bölgesi temel bileşen analizlerine göre örnekler çoklu dağılım göstermiştir.

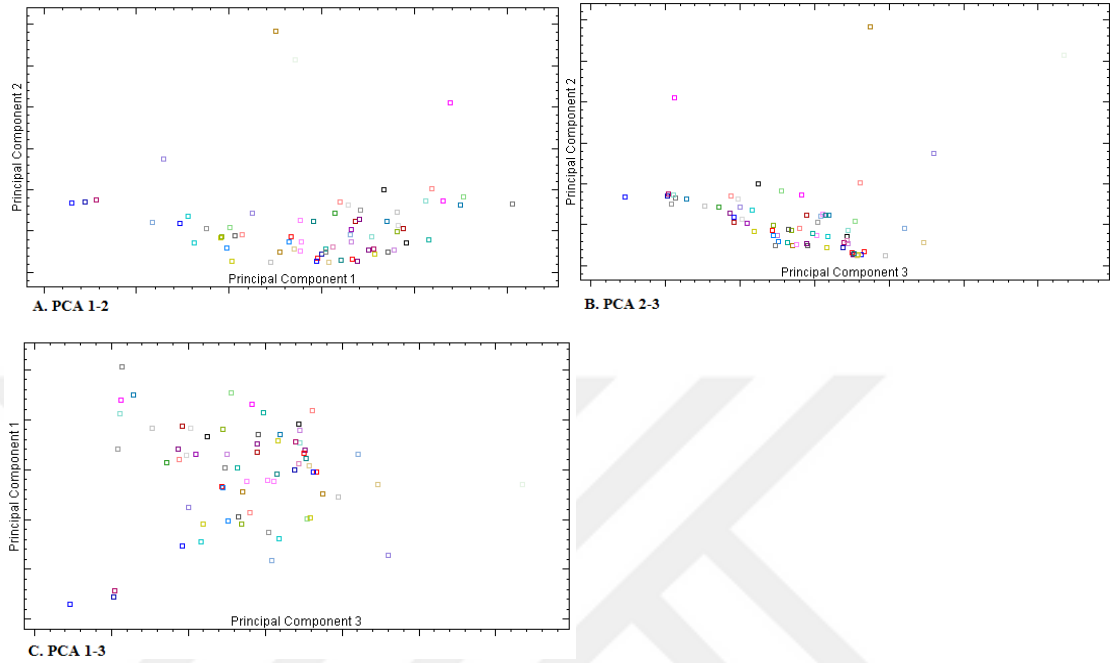
3. *ELF5* Geni 7. Ekzon Bölgesi Kümeleme Analizi



Şekil 4.42. *ELF5* geni 7. ekzon bölgesi küme verileri

1. Küme: 2, 12, 14, 16, 21, 22, 38, 44, 49, 62, 64, 65, 66, 67, 70, 72, 80, 81, 82, 90, 91, 93, 98, 100, 112 (25 örnek)
2. Küme: 1, 4, 5, 8, 13, 15, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 32, 33, 34, 35, 37, 39, 43, 45, 48, 50, 74, 78, 61, 63, 68, 69, 71, 86, 89 (31 örnek)
3. Küme: 3, 79, 59, 92, 113 (5 örnek)
4. Küme: 10, 11, 26, 28, 29, 30, 31, 36, 40, 41, 42, 73, 47, 52, 54, 56, 60, 83, 84, 85, 87, 88, 94, 95, 96, 97, 99, 116 (28 örnek)
5. Küme: 9, 17, 77 (3 örnek)

***ELF5* Geni 7. Ekzon Bölgesi Temel Bileşenler Analizi**



Şekil 4.43. *ELF5* geni 7. ekzon bölgesi üç boyutlu temel bileşenler analizi

A: 1-2, B: 2-3 üç boyutlu PCA ya göre örnekler alt fazlarda toplanmıştır, C: 1-3 bileşenlerine göre örnekler orta fazlarda birikmiştir.

4.4. Gen Bölgeleri Sekans Analizleri ve Verimle İlişkilendirme Sonuçları

Esmer sığır ırkında *ELF5*, *FGF21* ve *BMP2* gen bölgelerinde polimorfizm gösteren bölgeleri tespit etmek ve belirlenen polimorfik bölgelerin süt verim kaydıyla ilişkilendirmek için yaptığımız çalışmada veriler değerlendirilmiş ve sonuçlar resimler ve çizelgeler halinde gösterilmiştir.

4.4.1. *ELF5* geni sekans analizi sonuçları

ELF5 proteinin meme bezlerinin gelişimi ve süt salınımı üzerinde etkisinin olduğu, embriyonun erken evrelerinde embriyonun gelişimi için gerektiği, laktasyon ve hamilelik dönemi boyunca meme alveoler epitel hücrelerinin proliferasyon ve differansiyonel gelişiminde etkili olduğu, süt salgılama dahil salgılama işlevinin yerine getirmesinde rol

aldığı belirtilmiştir (Zhou *et al.* 2005; Oakes *et al.* 2007). *ELF5* protein geni Sığırlarda 15. kromozom üzerinde bulunur ve 9 ekzon (33196 bp) (NCBI Reference Sequence: AC_000172.1 Chr.15) içermektedir (Anonymous 20117a).

ELF5 geninin 5.6.7. ekzon bölgeleri ve 2. intron bölgesinin dahil olduğu gen dizisi esas alınarak dizayn edilmiş primerler ile gen bölgeleri çoğaltılmış ve PCR ürünlerinin DNA dizileri Sanger Sekanslama yöntemi ile belirlenmiştir.

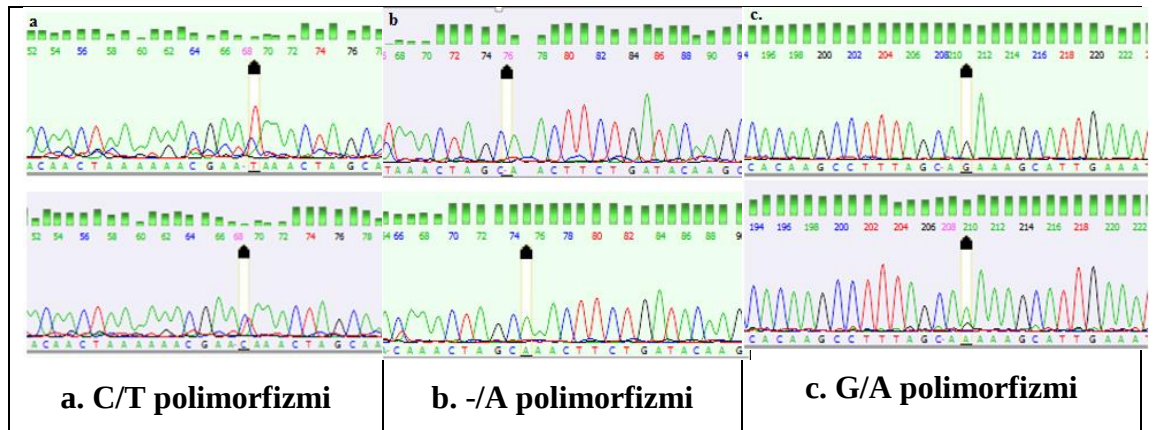
4.4.1.a. *ELF5* 2. intron bölgesi

ELF5 geninin 2 intron bölgesinin dahil olduğu 492 bp uzunluğundaki gen bölgesi HRM-PCR analizi sonucu kümeler ayrılmıştır. Belirlenmiş kümelerden her kümede 4 örnek içerecek şekilde sekans analizi uygulanmış ve 2. intron bölgesi için NCBI AC_000172.1 (c65856751-65823556 *Bos taurus* breed *Hereford* chromosome 15 *Bos taurus* UMD 3.1.1 Whole genome shotgun sequence) ve çoğaltmak istediğimiz gen bölgeleri referans alınmıştır. Referans dizilerine göre MEGA 7.0, ve BioEdit yazılım programları kullanılarak polimorfizm gösteren diziler tespit edilmiştir.

Esmer ırkı sığırdaki AC region: 65825262-65825757 dizi aralığında 492 bp uzunluğunda PCR analizi yapılmış *ELF5* geni 2.intron bölgesi üzerinde DNA dizi analizi sonucu g.65825359 C/T polimorfizmi, g.65825499 G/A polimorfizmi ve g.65825371 Adelesyonu (-/A) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *ELF5* 2. intron bölgesi polimorfizm dizileri

NCBI Dizi No.	g.65825359	g.65825371	g.65825499
<i>ELF5</i> 1. Bölge 492 bp	C	A	G
EL1-C2-_12	.	A	A
EL1-C2-_72	T	A	.
EL1-C2-_77	T	-	A
EL1-C2-_89	T	A	A
EL1-C3-_113	-	A	.
EL1-C3-_82	.	-	.
EL1-C3-_91	.	A	.
EL1-C3-_95	.	-	.
EL1-C4-_28	.	A	A
EL1-C4-_37	.	A	.
EL1-C4-_50	.	-	.
EL1-C4-_94	.	A	.
EL1-C5-_112	.	A	.
EL1-C5-_14	.	A	.
EL1-C5-_64	.	A	.
EL1-C5-_74	.	A	.
EL1-C6-_73	.	A	.
EL1-C6-_52	.	A	.
EL1-C6-_61	.	A	A
EL1-C6-_9	.	A	.
EL1-C7-_24	.	A	.
EL1-C7-_70	.	A	.
EL1-C7-_8	.	-	.
Polimorfizm	C/T	-/A	G/A

Şekil 4.44. *ELF5* 2. intron bölgesi polimorfik sekans bölgeleri a. C/T, b. -/A, c. G/A

ELF5 geni 2. intron bölgesi için dizi analizleri sonucu örneklerde mutasyon taraması yapılmış ve 23 örneğin baz dizilerinin analizi sonucu 293 tek nükleotid baz değişiklikleri olduğu belirlenmiştir. Çoklu baz değişimleri çizelge halinde gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. *ELF5* 2. intron bölgesi tek nükleotid değişimleri

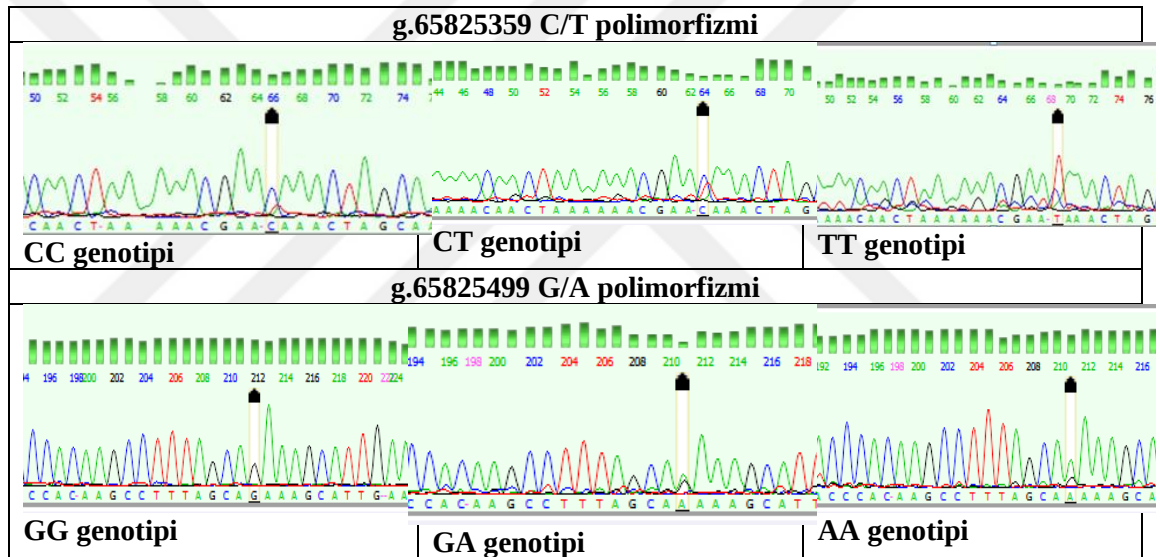
NCBI dizi no.	65825373	65825377	65825401	65825407	65825528	65825547	65825585
<i>ELF5</i> 2. intron	A	A	A	C	A	G	A
EL1-C6-_52	A	W	A	C	A	G	A
EL1-C2-_12	G	W	R	Y	A	A	A
EL1-C2-_89	T	T	A	T	A	R	A
EL1-C2-_72	A	A	A	T	W	G	A
EL1-C4-_94	A	A	R	C	A	G	A
EL1-C6-_73	W	A	A	C	A	G	A
EL1-C6-_61	W	A	A	Y	A	R	A
EL1-C6-_9	A	W	A	C	A	G	A
EL1-C2-_77	A	W	A	Y	M	R	M
EL1C3_113	A	A	A	C	M	G	M
EL1-C5-_14	A	A	A	C	A	G	A
EL1-C7-_24	W	W	A	Y	M	G	M
EL1-C7-_70	A	A	A	Y	A	G	A
EL1-C4-_37	A	A	A	Y	A	G	A
EL1C5_112	W	A	A	C	A	G	A
EL1-C5-_74	A	A	A	C	A	G	A
EL1-C4-_28	W	A	A	Y	A	R	A
EL1-C4-_50	A	A	A	C	A	G	A
EL1-C3-_91	A	W	A	Y	A	G	A
EL1-C5-_64	A	A	A	Y	A	G	A
EL1-C3-_95	A	A	A	Y	A	G	A
EL1-C3-_82	W	A	A	T	A	C	A

W: Zayıf A veya T, Y; Primidin (C/T), R; pürin (A/G), M; Amino C/T değişimleri

Esmer ırkı sığırdada 492 bp uzunluğunda PCR analizi yapılmış *ELF5* geni 2.intron bölgesi için 23 esmer ırkı DNAörneklerinin dizi analizi sonucu g.65825359 C/T polimorfizmi, g.65825499 G/A polimorfizmi ve g.65825371 A delesyonu (-/A) olduğu tanımlandıktan sonra FinchTV v1.5 (Geospiza, Seattle, WA) programı kullanılarak doğrudan sayım yöntemi ile gen ve genotip sayıları belirlenmiştir. *ELF5* geni 2.intron bölgesi g.65825359 C/T polimorfizmi için CC, CT ve TT genotip frekansları; % 6.79, % 11.41 ve % 4.79 C ve T allel frekansları 0.54 ve 0.46 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). g.65825499 G/A polimorfik bölgesi için GG, GA ve AA genotip frekansları % 7.92, % 11.15 ve % 3.92 olarak bulunmuş G ve A allel frekansları 0.59 ve 0.41 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. *ELF5* 2. intron bölgesi polimorfik bölgeler allel ve genotip frekansları

g.65825359 C/T	Genotip	CC	TC	TT	Toplam
	N	4	17	2	23
	p	0,81	0,59	0,32	0,54
	q	0,19	0,41	0,68	0,46
	Genotip frek.	6,79	11,41	4,79	100
g.65825499 G/A	Genotip	GG	GA	AA	
	n	5	17	1	23
	p	0,89	0,69	0,37	0,59
	q	0,11	0,31	0,63	0,41
	Genotip frek.	7,92	11,15	3,92	100

**Şekil 4.45.** *ELF5* 2. intron bölgesi g.65825359 C/T; CC, CT, TT genotipleri ve g.65825499 G/A; GG, GA AA genotipleri

ELF5 geni 2. intron bölgesi üzerinde tanımlanmış olduğumuz g.65825359 C/T, g.65825499 G/A ve g.65825371 A delesyonu (-/A) polimorfizmlerinin *Bos taurus* türlerinde *ELF5* geni için tanımlanmış SNP benzerliklerini karşılaştırmak amacıyla NCBI dbSNP veri tabanında sunulmuş SNP'ler kontrol edilmiştir. NCBI verileri doğrultusunda g.65825359 C/T polimorfizmine en yakın 5 bp uzaklıkta Cofactor-Genomics şirketi (2013) tarafından bildirilmiş ID-Chr15:g.65825354 A>T (RefSNP-rs469246690) SNP bildirilmiştir. g.65825499 G/A SNP bölgesi için aynı şirket (2013) tarafından ID-Chr15:g.65825495T>A (RefSNP-rs475815172) ve ID-Chr15:g.65825496 C>G (RefSNP-rs438011969) SNP'leri bildirilmiştir. g.65825371 A delesyonu (-/A)

polimorfizmi ile 1 bp farkla 1000-Bull-Genomes projesi kapsamında ID-15:g65825370 C>A (RefSNP-rs433295185) SNP tanımlanmıştır (Anonymous 2017c).

4.4.1.b. *ELF5* 5. ekzon bölgesi

AC_000172.1:c65856751-65823556 ncbi referans dizisi ve PCR ile çoğaltılmış 500 bp uzunluğundaki *ELF5* 5. ekzon gen dizisi referans alınarak sekans analizleri yapılmış ve polimorfik diziler Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Esmer ırkında AC region: 65825735-65826235 aralığında çoğaltılmış 500 bp’lık *ELF5* geni 5.ekzon bölgesi DNA dizilerinin sekans analizi sonucu g.65825909 T/C, g.65826062 G/A, g.65826123 A/C, g.65826134 C/T ve g. 65826138 T/C olmak üzere 5 farklı polimorfik bölge tanımlanmıştır.

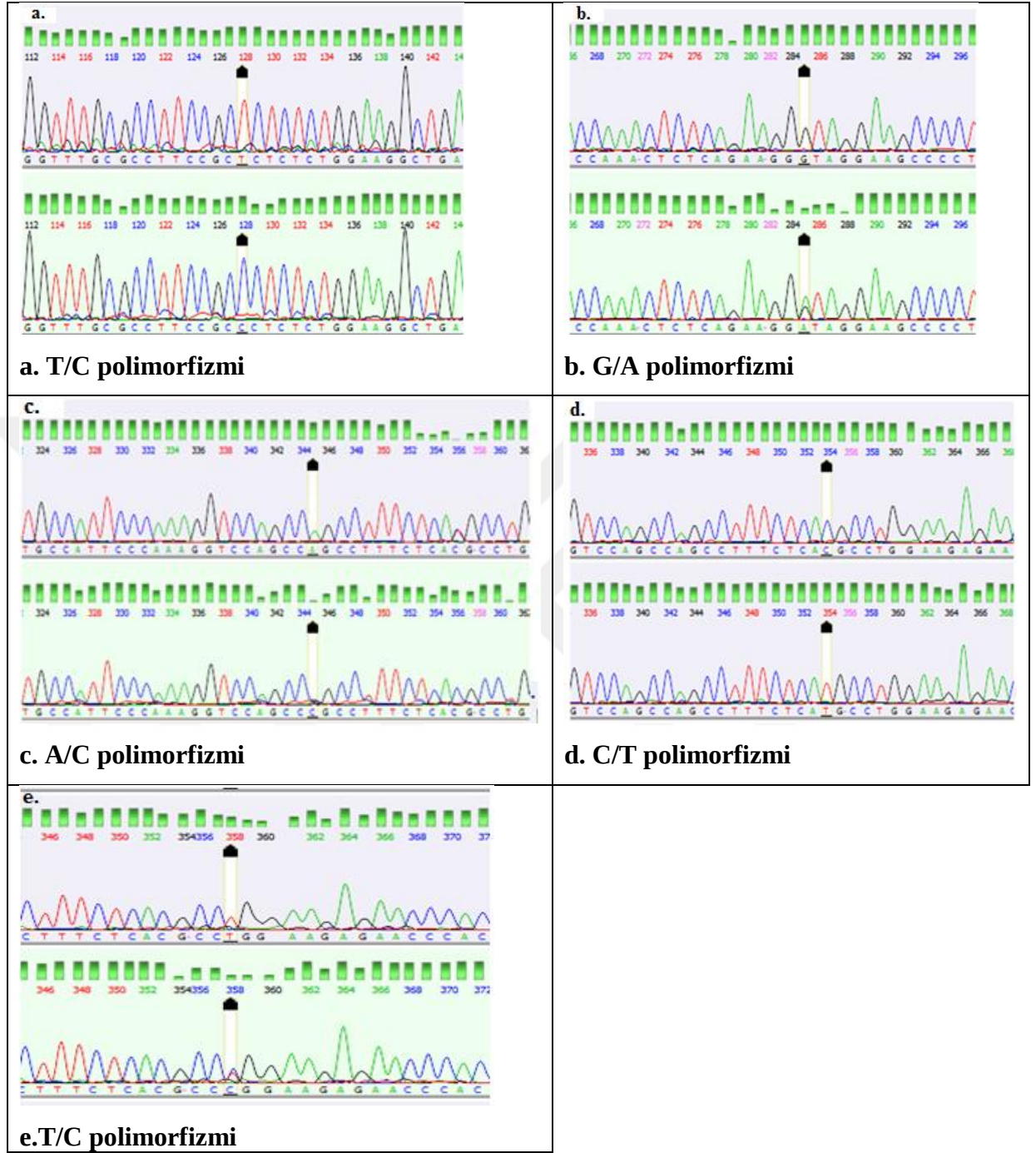
Çizelge 4.8. *ELF5* 5. ekzon bölgesi polimorfik diziler

NCBI dizi no.	65825909	65826062	65826123	65826134	65826138
<i>ELF5</i> 2bölge 500 bp	T	G	A	C	T
EL2-C2-_29	C	.	C	.	.
EL2-C5-_96	C	.	.	.	.
EL2-C5-_71	.	.	.	.	.
EL2-C5-_100	C	.	.	.	.
EL2-C1-_49	C	.	C	.	C
EL2-C2-_84	C	.	.	.	.
EL2-C3-_31	C	A	.	.	.
EL2-C4-_86	.	.	.	.	.
EL2-C6-_66	.	A	.	T	.
EL2-C1-_34	.	A	.	.	.
EL2-C1-_82	C	.	C	.	C
EL2-C6-_39	C	.	.	.	.
EL2-C6-_74	.	.	.	.	.
EL2-C2-_63	C	.	.	.	.
EL2-C3-_89	.	A	.	.	.
EL2-C4-_25	C	.	.	.	C
EL2-C3-_60	C	A	.	T	.
EL2-C1-_79	C	.	.	.	C
EL2-C3-_45	C	A	.	T	.
EL2-C4-_13	C	.	.	.	.
EL2-C5-_98	C	.	.	.	.
Polimorfizm	T/C	G/A	A/C	C/T	T/C
Amino asit değişimleri	2346 T>C Ala782Ala	2499G>A Gly833Gly	2560A>C Ser854Arg	2571C>T His857His	2575T>C Trp859Arg

MEGA 7.0 ve BioEdit sekans analiz programları kullanılarak çoklu protein dizi analizi yapılmış ve bazların DNA dizi değişimleri sonucu g.65825861 T>C transisyonu GCT-GCC kodon farklılaşması ile Alanin782-Alanin (Ala782Ala), g.65826062 G>A transisyonu GGG-GGA Glisin833-Glisin (Gly833Gly) ve g.65826134 C>T transisyonu sonucu CAC-CAT Histidin857-Histidin (His857His), g.65826123 A>C transversiyonu sonucu AGC-CGC Serin854-Arjinin (Ser854Arg) ve g. 65826138 T>C transisyonu ile TGG-CGG Triptofan859-Arjinin (Trp859Arg) amino asit değişimleri gerçekleşmiştir.

AC_000172.1:c65856751-6582	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C1- 34-Forward 2_D6	CCGCTC	Ala	AGGAT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C2- 73-Forward 2_B7	CCGCTC	Ala	AGGAT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C6- 39-Forward 2_H8	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C4- 50-Forward 2_B8	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C5- 98-Forward 2_F8	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C6- 66-Forward 2_A9	CCGCTC	Ala	AGGAT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C6- 74-Forward 2_B9	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C3- 45-Forward 2_E7	CCGCTC	Ala	AGGAT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C4- 13-Forward 2_H7	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C4- 25-Forward 2_A8	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C2- 63-Forward 2_A7	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C1- 49-Forward 2_E6	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C3- 31-Forward 2_D7	CCGCTC	Ala	AGGAT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C3- 60-Forward 2_F7	CCGCTC	Ala	AGGAT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C5- 100-Forward 2_G8	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C2- 84-Forward 2_C7	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C3- 89-Forward 2_G7	CCGCTC	Ala	AGGAT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C4- 86-Forward 2_C8	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C5- 71-Forward 2_D8	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C1- 79-Forward 2_F6	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C1- 82-Forward 2_G6	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C5- 96-Forward 2_E8	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp
EL2-C2- 29-Forward 2_H6	CCGCTC	Ala	AGGGT	Gly	CAGCCAGCC	Ser	CTCAGGCCTGG	His	Ala	Trp

Şekil 4.46. *ELF5* 5.ekzon bölgesi amino asit değişimleri



Şekil 4.47. *ELF5* 5. ekzon bölgesi polimorfik sekans dizileri a. T/C, b. G/A, c. A/C, d. C/T, e. T/C polimorfizmi

500 bp'lık *ELF5* geni 5. ekzon bölgesi için belirlenmiş g.65825909 T/C, g.65826062 G/A, g.65826123 A/C, g.65826134 C/T ve g. 65826138 T/C bölgesi için 22 adet Esmer ırkı

DNA örneklerinin dizi analizleri sonucu polimorfik bölgelerin allel ve genotip frekansları belirlenmiştir.

g.65825909 T/C polimorfik bölgesi için TT, TC, CC genotip frekansları % 6,05 ,%10,95 ve %5,04 olarak ölçülmüş TT ve CC allel frekansları 0.52 ve 0.48 olarak belirlenmiş, g.65826062 G/A için GG, GA, AA genotip frekansları %7,68, %10,64, %3,68; allel frekansları GG ve AA olmak üzere 0.59 ve 0.41 olarak hesaplanmıştır. g. 65826138 T/C bölgesi için TC ve TT genotipleri belirlenmiş CC genotipi görülmemiştir. Diğer polimorfik bölgelerin allel ve genotip frekansları Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. *ELF5* 5. ekzon bölgesi polimorfik bölgeler allel ve genotip frekansları

g.65825909 T/C	Genotip	TT	TC	CC	Toplam
	N	6	11	5	22
	p	0,52	0,52	0,52	0,52
	q	0,48	0,48	0,48	0,48
	Genotip frek.	6,05	10,95	5,04	100
g.65826062 G/A	Genotip	GG	GA	AA	-
	N	5	16	1	22
	p	0,89	0,69	0,38	0,59
	q	0,11	0,31	0,62	0,41
	Genotip frek.	7,68	10,64	3,68	100
g.65826123 A/C	Genotip	AA	AC	CC	-
	N	16	3	3	22
	p	0,33	0,7	0,91	0,8
	q	0,67	0,3	0,09	0,2
	Genotip frek.	13,92	7,16	0,92	100
g.65826134 C/T	Genotip	CC	CT	TT	-
	N	16	5	1	22
	p	0,71	0,8	0,86	0,84
	q	0,29	0,2	0,14	0,16
	Genotip frek.	15,56	5,89	0,56	100
g.65826134 C/T	Genotip	TT	TC	CC	-
	N	17	5	0	
	p	1	0,87	-	0,89
	q	0	0,13	-	0,11
	Genotip frek.	17,28	4,43	0,28	100

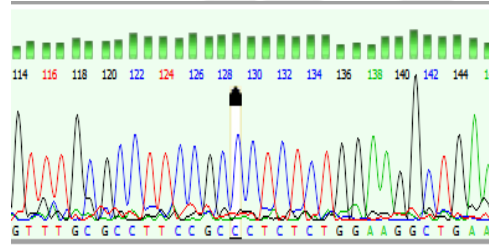
ELF5 geni 5.ekzon bölgesi için dizi analizleri sonucu 23 örnekte mutasyon taraması yapılmış ve 101 mutant baz belirlenmiştir. Çoklu mutant bazlar çizelge halinde verilmiştir.



Çizelge 4.10. *ELF5* 5.ekzon bölgesi tek nükleotid değişimleri

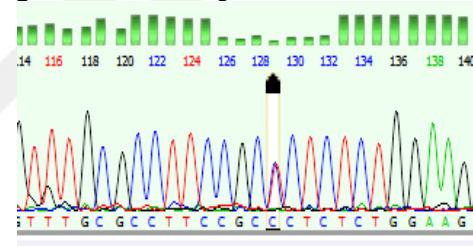
NCBI dizi	65825827	65825830	65825831	65825835	65825839	65825840	65825845	65825846	65825850	65825854	65825855	65825856	65825858	65825862	65825866	65825872	65825880	65825884	65825906	65825923	65825940	65825948	65825961	65825979	65826022	65826027	65826061	65826122	65826133	65826137
<i>ELF5</i> 5.ekz.	T	T	C	T	A	G	A	G	G	T	T	-	T	T	C	G	A	C	T	A	A	T	T	A	G	A	G	A	C	T
EL2-C2- 29	T	T	M	Y	W	G	A	S	G	T	T	-	T	T	C	G	A	C	Y	A	A	T	T	A	G	A	G	C	C	Y
EL2-C5- 96	T	T	C	T	A	G	A	G	G	T	T	M	T	T	C	G	A	C	Y	A	A	T	T	A	G	A	G	A	C	T
EL2-C2- 73	T	T	C	T	A	G	A	G	G	T	T	-	T	T	C	G	A	C	Y	A	A	Y	Y	A	G	A	A	A	C	C
EL2-C5- 71	M	K	C	T	A	G	A	G	G	R	M	M	-	T	C	G	A	C	T	R	R	T	T	R	R	W	G	M	C	T
EL2-C5-100	T	T	C	T	A	G	A	G	G	T	T	M	W	T	C	G	A	C	Y	A	A	T	T	A	G	A	G	A	C	T
EL2-C1- 49	T	K	C	T	R	G	W	G	G	T	M	T	-	W	C	G	A	C	C	A	A	T	K	R	R	A	G	C	C	T
EL2-C2- 84	T	K	C	T	A	G	A	G	G	T	T	M	T	G	S	G	A	C	C	A	A	T	K	A	G	A	G	A	C	T
EL2-C3- 31	T	T	M	T	A	G	A	G	G	T	T	M	K	T	C	G	A	C	Y	A	A	T	T	A	G	A	R	A	Y	T
EL2-C4- 86	T	T	C	T	A	G	A	K	K	T	M	T	T	T	C	K	A	C	T	A	A	T	T	A	G	A	G	A	C	T
EL2-C6- 66	T	T	C	T	A	G	A	G	G	T	T	T	-	T	C	G	A	C	T	A	A	T	K	A	G	A	A	A	T	T
EL2-C1- 34	T	T	M	T	A	R	A	G	G	T	T	T	T	K	C	G	A	C	T	A	A	T	T	A	G	A	R	A	Y	T
EL2-C1- 82	T	T	C	T	W	G	A	G	G	T	T	M	T	T	C	G	A	C	C	A	A	T	T	A	S	A	G	M	C	T
EL2-C2- 63	T	K	C	T	A	G	A	G	G	T	T	-	T	T	C	G	R	C	C	A	A	T	T	A	G	A	G	A	C	T
EL2-C6- 39	T	T	C	T	A	G	A	G	G	T	T	T	T	T	C	K	A	C	Y	A	A	T	K	A	R	A	G	A	C	T
EL2-C6- 74	T	T	C	T	A	G	A	G	G	T	T	T	T	T	C	G	A	C	T	A	A	T	K	A	R	A	G	A	C	Y
EL2-C3- 89	W	K	C	T	A	R	A	G	G	T	T	T	-	T	C	G	A	S	T	A	A	T	T	A	G	A	R	A	Y	T
EL2-C4- 25	T	T	C	T	A	G	W	G	K	T	T	T	T	T	S	K	R	C	Y	R	A	T	K	A	R	A	G	M	C	Y
EL2-C3- 60	T	T	M	Y	A	G	A	G	G	T	T	T	T	K	C	G	A	C	Y	A	A	T	T	A	G	A	R	A	Y	T
EL2-C1- 79	T	T	M	T	W	G	A	G	G	K	T	A	A	K	C	G	A	C	C	A	A	T	T	A	G	A	G	A	C	T
EL2-C3- 45	T	T	C	T	A	G	A	G	G	T	T	T	-	T	C	G	A	C	Y	A	A	T	K	A	G	A	R	A	Y	T
EL2-C4- 13	T	T	M	T	A	G	A	G	G	T	T	T	T	T	C	G	A	C	Y	A	A	T	T	A	G	A	G	A	C	T
EL2-C5- 98	T	T	C	T	A	G	A	G	G	T	T	T	T	T	C	G	A	C	Y	A	A	T	T	A	G	A	G	A	C	T

W: Zayıf A veya T, Y; Primidin (C/T), R; pürin (A/G), M; Amino C/T K; keto T/G, S; güçlü G/C değişimleri

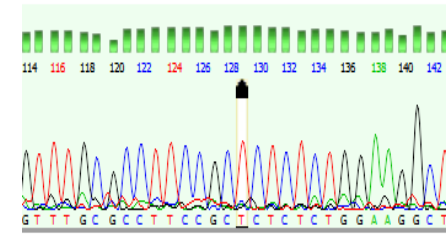


CC

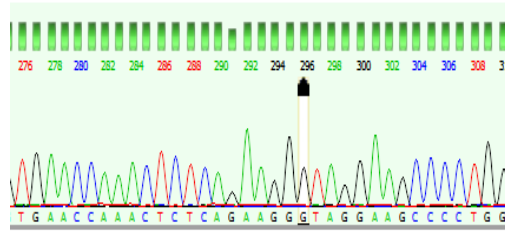
g.65825909 T/C polimorfizmi



TC

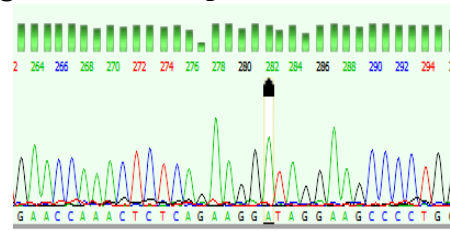


TT

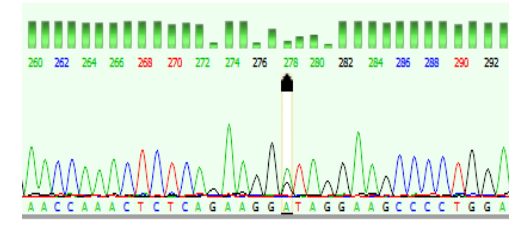


GG

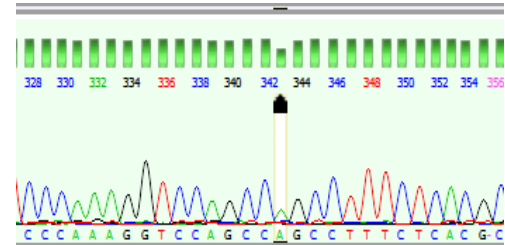
g.65826062 G/A polimorfizmi



AA

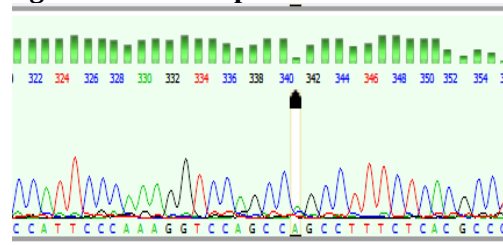


GA

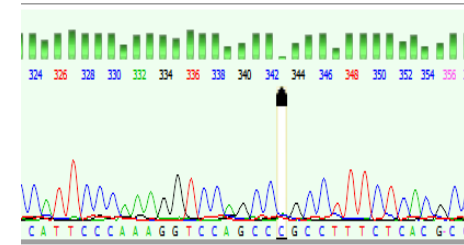


AA

g.65826123 A/C polimorfizmi

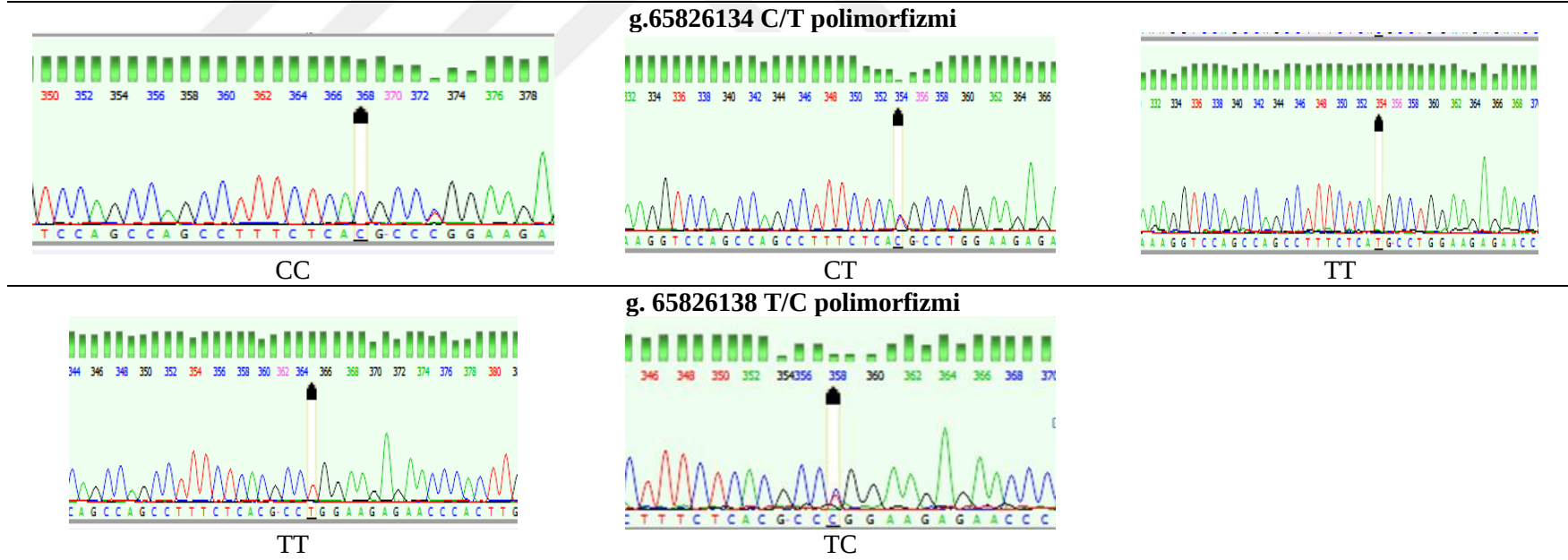


AC



CC

Şekil 4.48. (devam)



Şekil 4.48. *ELF5* 5. ekzon bölgesi polimorfik sekans dizileri

Esmer ırkı sığırdada belirlemiş olduğumuz *ELF5* 5. Ekzon bölgesi g.65826134 C>T polimorfizmi, Daetwyler *et al.* (2014) tarafından Sığırlarda monojenik ve karmaşık özelliklerin haritalanmasını kolaylaştıran 234 boğanın tam genom dizilimi çalışması doğrultusunda özellikle Holstein-Friesian popülasyonu ve Fleckvieh ırklarında SNP ID-15:g65826134 C>T (RefSNP-rs444548435) daha önce belirlenmiştir. Esmer ırkı sığırdada belirlemiş olduğumuz *ELF5* 5. Ekzon bölgesi g.65825909 T/C polimorfizmine en yakın bölge Cofactor-Genomics projesi kapsamında (2013) ID Chr15:g.65825915 A>C (RefSNP-rs451761759) ve g.65826062 G/A polimorfizmine en yakın bölge Daetwyler *et al.* (2014) tarafından ID-15:g65826049 G>T (RefSNP-rs476162956) SNP'si tanımlanmıştır. NCBI dbSNP verilerine göre *ELF5* 5. ekzon bölgesi için belirlemiş olduğumuz g.65825909 T/C SNP'ine yakın 6 bp uzaklıkta Cofactor-Genomics tanımlanmış ID-Chr15:g.65825915 A>C (RefSNP-rs451761759) ve 13 bp farklılıkla ID-Chr15:g.65825922 T>C (RefSNP-rs472070278) SNP'leri tespit edilmiş (Anonymous 2017c), ancak g.65825909 T/C polimorfik bölgesi tanımlanmamıştır.

4.4.1.c. *ELF5* 6. ekzon bölgesi

Esmer ırkında 6. ekzon da bulunan 475 baz çifti uzunluğundaki *ELF5* gen polimorfizmini belirlemek amacıyla yapılmış sekans analizleri sonucu AC_000172.1:c65856751-65823556 NCBI baz dizileri referans alınarak baz dizi sıralaması yapılmış 24 örnekte toplam 148 tek baz değişimi tespit edilmiştir. Baz değişimi görülmüş diziler arasında polimorfik bölgeler saptanamamıştır.

4.4.2. *FGF21* geni sekans analizi sonuçları

FGF21 geni *Bos taurus* türlerinde 18. kromozom üzerinde kodlanır. 3 ekzon içeren (NCBI Reference Sequence: AC_000175) *FGF21* geninin 2611 bp'lik DNA dizisinin tüm ekzon bölgelerini kapsayacak şekilde PCR uygulanmış ve gen bölgeleri istenilen baz uzunluğunda çoğalttıktan sonra PCR-HRM analizi uygulanmıştır. HRM analizleri sonucu gen bölgeleri Tm farklılıklarına göre kümelere ayrılmış ve her kümeden örnekler seçilerek sekans analizi yapılmıştır.

4.4.2.a. *FGF21* 1. ve 2. ekzon bölgesi

338 baz çifti uzunluğundaki *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi için g.55834828 C/G polimorfik bölgesi tanımlanmış ve 20 mutant baz belirlenmiştir. g.55834828 C/G transversiyonel baz değişimi sonucu CAC-CTG kodon farklılaşmasına neden olarak Histidin400-Lösin (His400Leu) amino asit değişimlerine neden olmuştur.

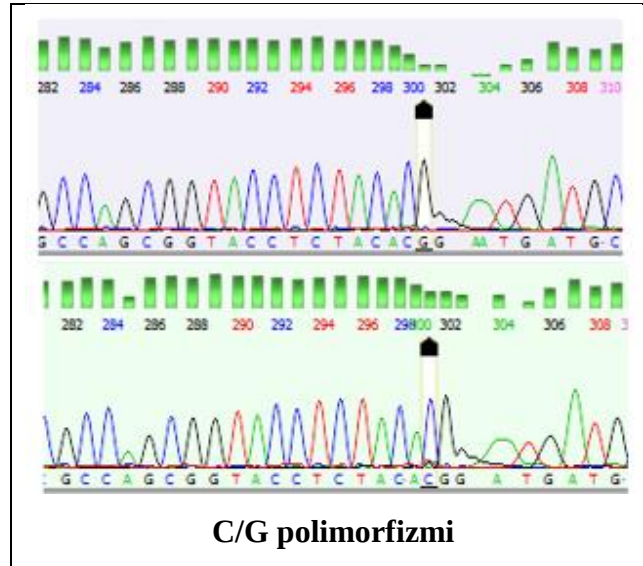
Çizelge 4.11. *FGF21* 1. ekzon bölgesi polimorfik diziler

NCBI Dizi No	55834828
<i>FGF21</i> 1. bölge 338-bp	C
FG1-C1-_99	G
FG1-C2-_3	.
FG1-C3-_4	.
FG1-C3-_90	.
FG1-C4-_15	.
FG1-C6-_45	.
FG1-C1-_73	.
FG1-C1-_85	G
FG1-C3-_86	.
FG1-C4-_10	G
FG1-C4-_97	G
FG1-C5-_91	.
FG1-C6-_82	G
FG1-C2-_100	.
FG1-C3-_38	G
FG1-C5-_1	.
FG1-C5-_31	G
FG1-C6-_81	G
FG1-C1-_79	.
FG1-C2-_76	G
FG1-C5-_12	G
FG1-C6-_49	.
Polimorfizm	C/G
Amino asit değişimleri	C>G His400Leu

Dizi analizi yapılmış 22 adet esmer sığır ırkı DNA örneğinde *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi için belirlenmiş g.55834828 C/G polimorfik bölgesi için 10 örnekte GG ve 12 örnekte CC genotipleri belirlenmiş heterozigot GC genotipine rastlanılmamıştır.

AC_000175.1:55833627-55836	CTACAC	LeuHis
FGF21 1. BÖLGE.txt	CTACAC	LeuHis
FG1-C2-	CTACAC	LeuHis
FG1-C3-	CTACAC	LeuHis
FG1-C3-_1	CTACAC	LeuHis
FG1-C3-_2	CTACAC	LeuHis
FG1-C3-_3	CTACAC	LeuHis
FG1-C4-	CTACAC	LeuHis
FG1-C4-_1	CTACAC	LeuHis
FG1-C4-_2	CTACAG	LeuGln
FG1-C5-	CTACAC	LeuHis
FG1-C5-_1	CTACA-	Leu ?
FG1-C5-_2	CTACAC	LeuHis
FG1-C5-_3	CTACAC	LeuHis
FG1-C6-	CTACAC	LeuHis
FG1-C6-_1	CTACAC	LeuHis
FG1-C6-_2	CTACTG	LeuLeu
FG1-C6-_3	CTACAC	LeuHis
FG1-C1-	CTACAC	LeuHis
FG1-C1-_1	CTACAC	LeuHis
FG1-C1-_3	CTACAC	LeuHis
FG1-C2-_2	CTACA-	Leu ?
FG1-C1-_2	CTACAC	LeuHis
FG1-C2-_1	CTACAC	LeuHis

Şekil 4.49. *FGF21* 1. ekzon bölgesi amino asit dizisi



Şekil 4.50. *FGF21* 1. ekzon bölgesi C/G polimorfizmi

FGF21 geni 1.ekzon bölgesi g.55834828 C/G polimorfik bölgesi için NCBI dbSNP veri tabanında sunulmuş SNP'ler kontrol edilmiştir. NCBI verileri doğrultusunda g.55834828.

C/G tek nükleotid polimorfizmi ile örtüşen bölge bulunamamıştır. Belirlemiş olduğumuz C/G SNP bölgesine en yakın Cofactor-Genomics tarafından (2013) ID-Chr18:g.55834805 T>A (RefSNP-rs450520825) SNP tespit edilmiştir (Anonymous 2017c).

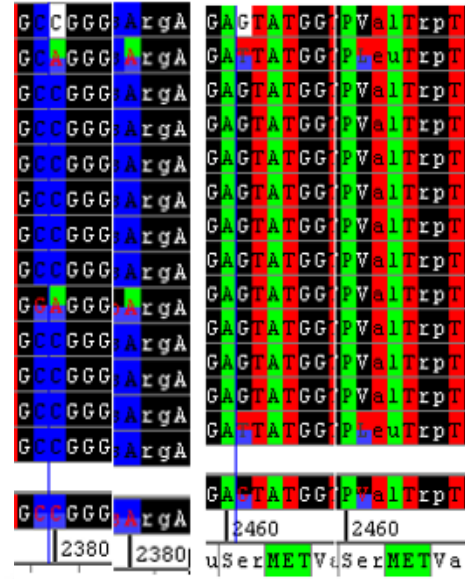
AC region: 55835226-55835642 aralığında PCR uzunluğu belirlenmiş 416 bp uzunluğundaki *FGF21* 2. ekzon bölgesi için polimorfizm gösteren baz dizisi tanımlanamamıştır.

4.4.2.b. *FGF21* 3. ekzon bölgesi

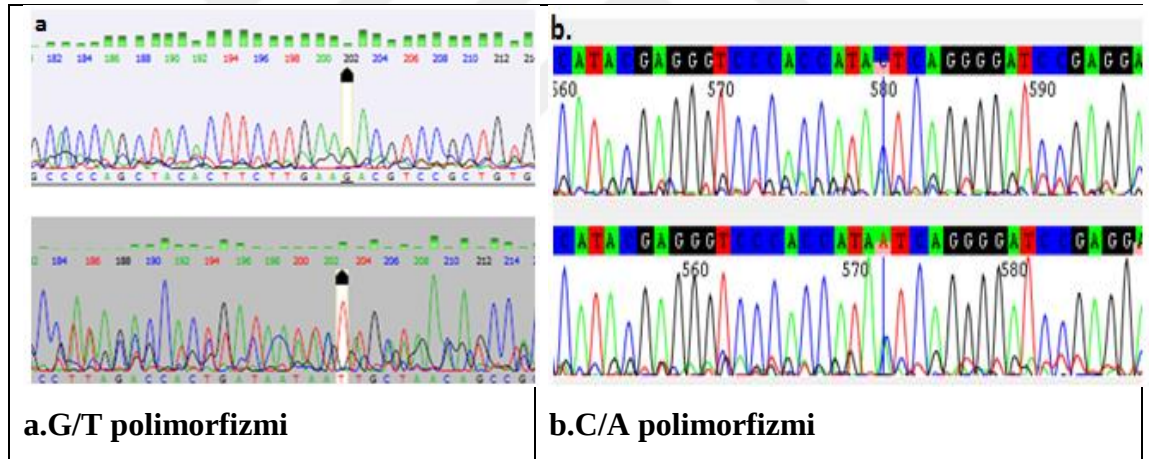
256 baz uzunluğundaki (AC region: 55835905-55836161) *FGF21* 3. ekzon bölgesinde g.55836088 G/T ve g.55836007 C/A polimorfizmleri belirlenmiştir. Bu baz değişimlerinin kodon dizi analizi sonuçlarına göre g.55836007 C>A transversiyonu CGG-AGG kodon değişimine neden olmuş ve Arjinin793-Arjinin (Arg793Arg) değişimi; g.55836088 G>T transversiyonu sonucu GTA-TTA Valin-Lösin (Val820Leu) amino asit değişimlerine neden olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. *FGF21* 3. ekzon bölgesi polimorfik diziler

NCBI Dizi No.	55836007	55836088
<i>FGF21</i>-3. bölge 256 bp	C	G
FG3-C1-113	.	.
FG3-C1-3	A	T
FG3-C2-11	.	.
FG3-C2-91	.	T
FG3-C4-80	.	.
FG3-C4-90	.	.
FG3-C5-100	.	.
FG3-C5-21	.	.
FG3-C5-38	.	.
FG3-C6-41	.	.
FG3-C6-70	.	.
FG3-C6-94	A	.
Polimorfizm	C/A	G/T
Amino asit değişimleri	C>A Arg793Arg	G>T Val820Leu



Şekil 4.51. *FGF21* 3.ekzon bölgesi amino asit dizilimi



Şekil 4.52. *FGF21* 3.ekzon bölgesi a.G/T, b.C/A polimorfizmi

Esmer ırkı sığırlarda DNA dizi analizi sonucu *FGF21* 3. ekzon bölgesinde g.55836088 G/T ve g.55836007 C/A polimorfizmleri belirlenmiştir. NCBI dbSNP veri tabanında sunulmuş SNP'ler kontrol edilerek NCBI verileri doğrultusunda g.55836088 G/T ve g.55836007 C/A tek nükleotid polimorfizmi ile örtüşen bölge bulunamamıştır. Belirlemiş olduğumuz g.55836007 C/A SNP bölgesine en yakın Cofactor-Genomics tarafından (2013) ID-Chr18:g.55836012 T>G (RefSNP-rs435381165) SNP ve ID-Chr18:g.55836030 A>C (RefSNP-rs447540820) SNP'leri tanımlanmıştır (Anonymous 2017c).

4.4.3. BMP2 geni sekans analizi sonuçları

Sığırlarda 13. kromozom üzerinde bulunan Kemik Morfogenetik Protein2 geni 3 ekzon (NCBI Reference Sequence: Chr.13AC_000170.1) içerir. 11255 bp'lik DNA dizisinin 2. ve 3. ekzonları kapsayacak şekilde dizayn edilmiş primerler kullanılarak PCR analizi yapılmış ve bölgelere ait PCR ürünleri elde edilmiştir.

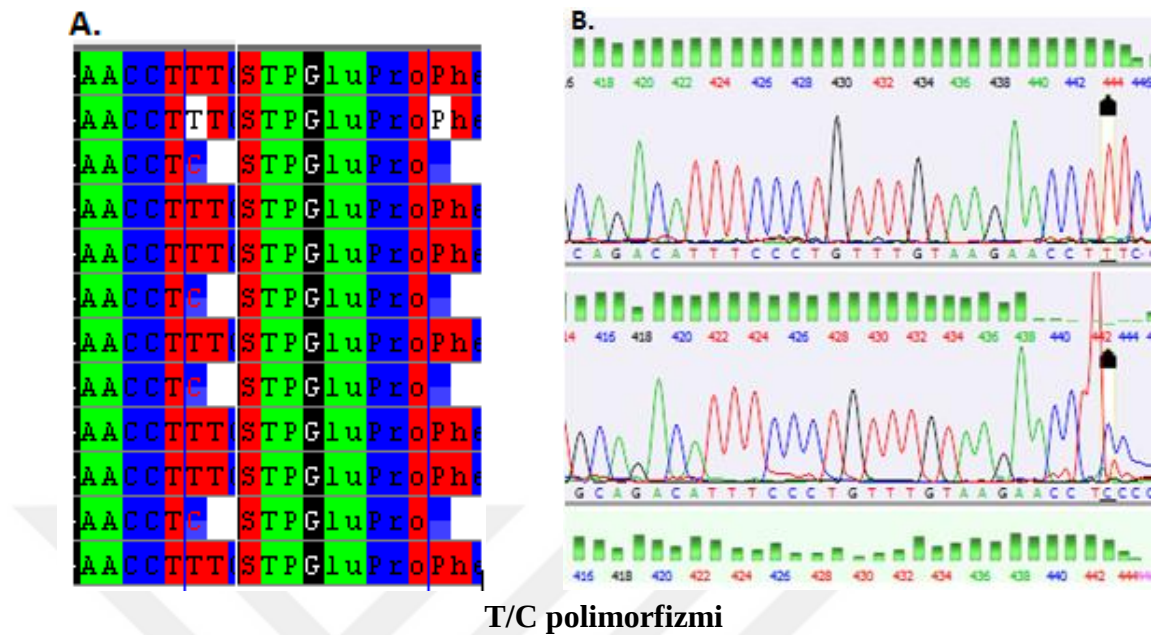
4.4.3.a. BMP2 geni 2.Ekzon Bölgesi

BMP2 geni 2.ekzon bölgesi için AC_000170.1: 49550050-49561304 *Bos taurus* breed Hereford chromosome 13 sekans dizisi ve PCR ile çoğaltılan 480 bp'lik DNA dizisi referans alınarak sekans analizi yapılmıştır.

AC_000170 Region: 49551496-49551975 aralığında 480 bp uzunluğunda çoğaltılmış BMP2 geni 2.ekzon bölgesinde g.49551963 T/C polimorfizmi görülmüştür. g.49551963 T>C transisyonu TTT-TC? sonucu fenilalanin638–bilinmeyen Xaa amino asidine (Phe638Xaa) dönüştüğü belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. BMP2 geni 2.ekzon bölgesi polimorfik diziler

NCBI Dizi No.	g.49551963
BMP2 2.ekzon 480bp	T
BM2-C2-_38	.
BM2-C2-_90	.
BM2-C3-_12	C
BM2-C3-_30	C
BM2-C3-_36	C
BM2-C3-_8	C
BM2-C4-_1	.
BM2-C6-_10	.
BM2-C6-_37	T
Polimorfizm	T/C
Amino asit değişimleri	1913T>C Phe638Xaa



Şekil 4.53. BMP2 2.ekzon bölgesi A. Amino asit dizi değişimi, B. T/C dizi polimorfizmi

BMP2 geni 2.ekzon bölgesi için tanımlanmış g.49551963 T/C SNP'ine 6 bp uzaklıkta Kawahara *et al.* (2011) Japon yerli sığır ırkı Kuchinoshima-Ushi tam genom sekans analizi sonucu *BMP2* geni için ID-CHR13-49551957 (RefSNP-rs133671814) -/A delesyonu bildirilmiştir.

4.4.3.b. *BMP2* geni 3. Ekzon-1. Bölgesi

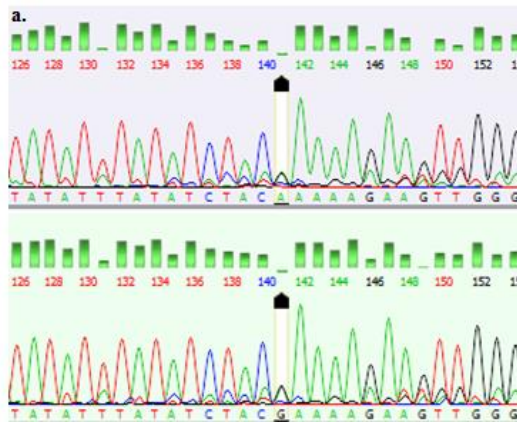
AC_000170 Region: 49559591-49560089 aralığında 498 baz çifti uzunluğundaki *BMP2* geni 3.ekzon-1. bölgesi için Esmer ırkı süt sığırına ait 23 DNA örneğinin sekans analizi yapılmış ve mutasyona uğramış toplam 36 baz belirlenmiştir. Bu mutant baz dizileri arasında polimorfizm gösteren diziler tanımlanamamıştır.

4.4.3.c. *BMP2* geni 3. Ekzon-2. Bölgesi

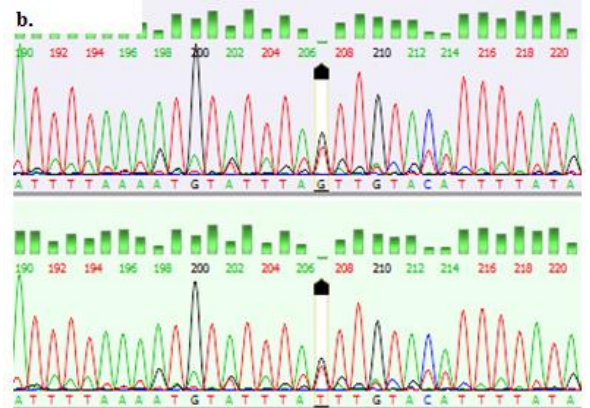
AC_000170 Region: 49551161-49551628 aralığında 3. ekzon bölgesini içeren 467 baz uzunluğundaki *BMP2* geni 2.bölgesi için g.49551337 G/A, g.49551405 G/T, g.49551428 G/C, g.49551433 A/C ve g.49551449 T/G polimorfik bölgeleri bulunmuştur.

Çizelge 4.14. BMP2 geni 3.ekzon-2.bölgesi polimorfik dizileri

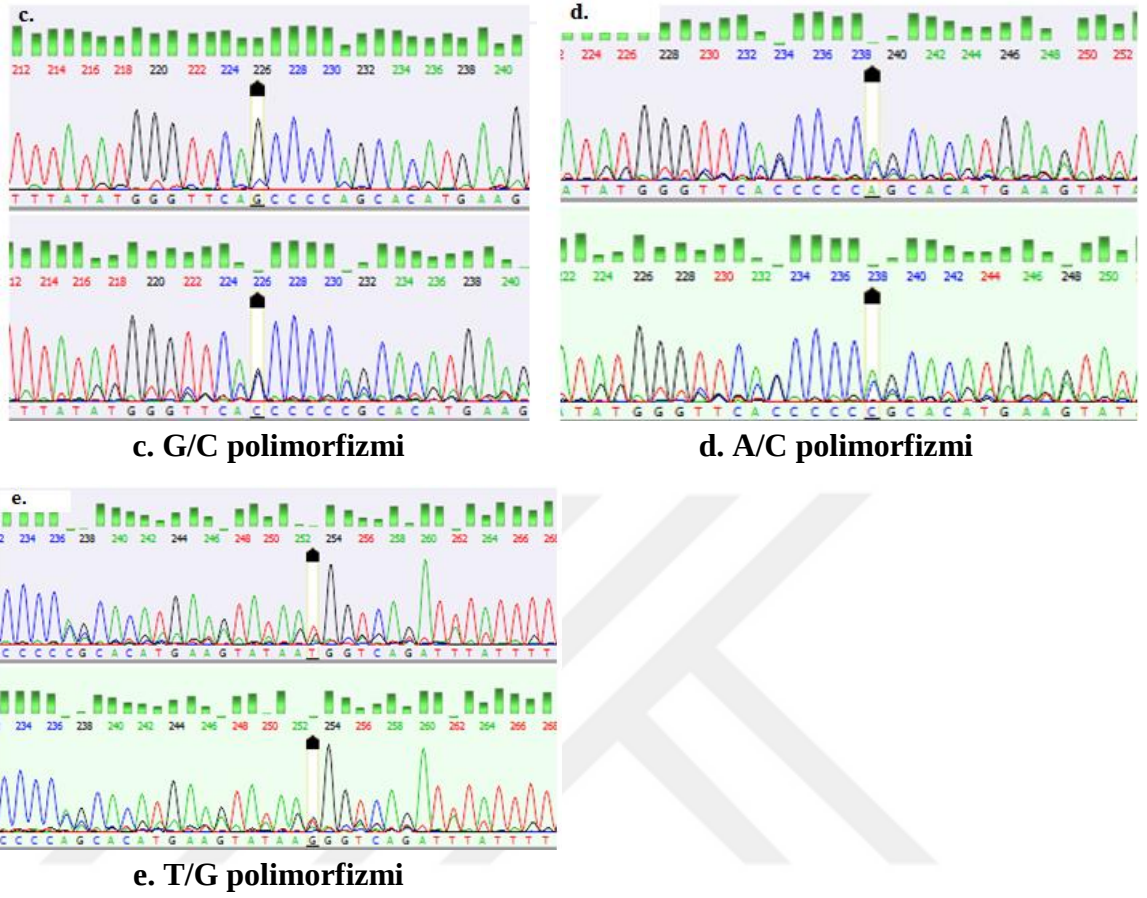
NCBI Dizi No.	49551337	49551405	49551428	49551433	49551449
BMP2 3.ekzon 476bp	G	G	G	A	T
BM4-C1-_65	A	T	C	C	G
BM4-C1-_77	.	T	C	.	.
BM4-C1-_84	.	T	C	C	.
BM4-C1-_96	.	.	.	.	.
BM4-C2-_12	A	.	C	.	G
BM4-C2-_16	.	.	C	.	.
BM4-C2-_34	.	.	.	.	.
BM4-C2-_45	.	.	C	.	.
BM4-C3-_32	.	T	C	C	.
BM4-C3-_40	.	.	C	.	.
BM4-C3-_58	.	.	.	.	.
BM4-C3-_68	.	.	.	.	.
BM4-C4-_113	.	.	.	.	.
BM4-C4-_11	.	.	C	.	.
BM4-C4-_90	.	T	C	.	.
BM4-C4-_93	.	T	C	.	.
BM4-C5-_49	.	.	C	C	.
BM4-C5-_59	A	.	.	C	G
BM4-C5-_87	.	T	C	C	.
BM4-C5-_95	.	T	C	C	.
Polimorfizm	G/A	G/T	G/C	A/C	T/G
Amino asit değişimleri	G>A Thr3429Thr	G>T Ser3452Ile	G>C Pro3460Ala	A>C Pro3461Pro	T>G Trp3467Gly



a. G/A polimorfizmi



b. G/T polimorfizmi

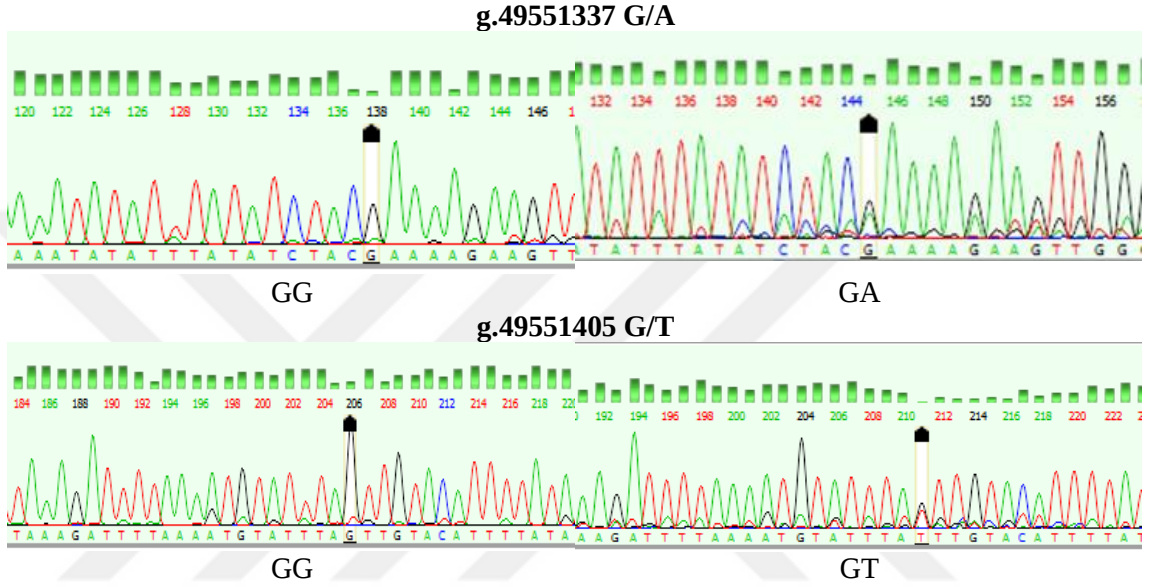


Şekil 4.54. *BMP2* geni 3.ekzon-2.bölgesi a. G/A, b. G/T c. G/C, d. A/C, e. T/G polimorfizmi

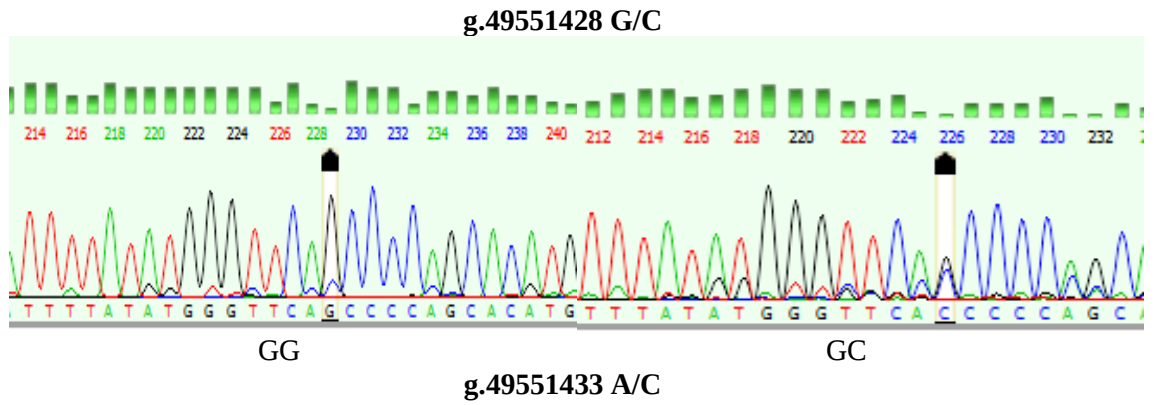
BMP2 geni 3.ekzon-2.bölgesi için tanımlanmış polimorfik bazlar kodon değişimlerine neden olarak farklı amino asitlerin kodlanmasına neden olmuştur. Tanımlanmış polimorfik bazlar, kodon değişimleri ve amino asit farklılıkları sırasıyla g.49551337 G/A transisyonu **ACG-ACA** sonucu threonin3429-threonin (Thr3429Thr) ve g.49551433 amino asit değişimi, A>C **CCA-CCC** prolin3461-prolin (Pro3461Pro), g.49551405 G/T **AGT-ATT** serin-izolösin (Ser3452Ile), g.49551428 G/C **GCC-CCC** prolin-alanin (Pro3460Ala), ve g.49551449 T>G transversiyonları sonucu **TGG-GGG** triptofan3467-glisin (Trp3467Gly) amino asit değişimleri belirlenmiştir.

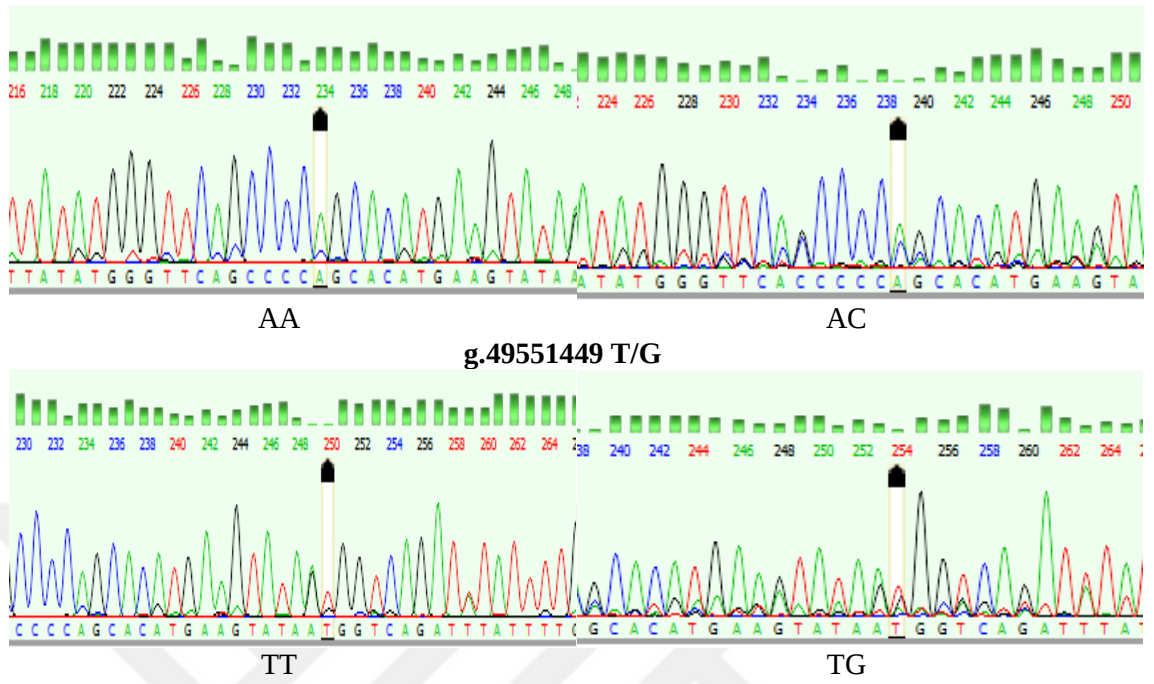
Esmer sığır ırkında DNA dizi analizi yapılmış 20 adet örnekte doğrudan sayım yöntemi ile 3. ekzon bölgesini içeren *BMP2* geni 2.bölgesi için tanımlanmış polimorfik bölgeler g.49551337 G/A, g.49551405 G/T, g.49551428 G/C, g.49551433 A/C ve g.49551449

T/G için genotip sayıları belirlenmiştir. Doğrudan sayım sonucu g.49551337 G/A; GG-GA, g.49551405 G/T; GG-GT, g.49551428 G/C; GG-GC homozigot ve heterozigot genotipleri olmak üzere 20 adet DNA dizisinin 3 örneğin homozigot genotipinde olduğu, 17 örneğin ise heterozigot genotip taşıdığı görülmüştür.



Şekil 4.55. (devam)





Şekil 4.55. *BMP2* geni 3.ekzon-2.bölgesi polimorfik bölge genotipleri

3. ekzon bölgesini içeren 467 baz uzunluğundaki *BMP2* geni 2.bölgesi için tanımlanmış polimorfik bölgeler NCBI dbSNP veri tabanında sunulmuş SNP'ler kontrol edilmiştir. NCBI verileri doğrultusunda *BMP2* geni için g.49551337 G/A tek nükleotid polimorfizmi ile aynı bölgede SNP tanımlanmamış, en yakın 32 bp uzaklıkta Cofactor-Genomics şirketi (2013) tarafından ID-Chr13:g.49551369 C>A (RefSNP-rs478378586) SNP tanımlanmıştır. Esmer sığır ırkında *BMP2* geni 3.ekzon-4.bölgesi için tanımlanmış olduğumuz g.49551405 G/T SNP bölgesi dbSNP veri tabanında SNP ID-Chr13:g.49551407 (RefSNP-rs470388497) bölgesinde G>T SNP daha önce tanımlanmıştır. g.49551428 G/C SNP bölgesi ile aynı bölge sınırlarında 7 bp uzaklıkta ID-Chr13:g.49551421 G>A (RefSNP-rs466516722) SNP'si ve 14 bp uzaklıkta Chr13:g.49551435 A>G (RefSNP-rs434357845) SNP'leri tespit edilmiştir. NCBI veri tabanında g.49551433 A/C SNP'si ile aynı bölgede ID-Chr13:g.49551435 A>G (RefSNP-rs434357845) ve ID-Chr13:g.49551437 A>C (RefSNP-rs451359294) SNP'leri tanımlanmış, g.49551449 T/G SNP'i için 7 bp uzaklıkta ID-Chr13:g.49551442 G>T (RefSNP-rs471472555) tek nükleotid polimorfizmi belirlenmiştir (Anonymous 2017c).

AC 000170.1:49550050-49561	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Ala:Pro	TGGTrp
BMP 4. BÖLGE 467 BP.txt	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Ala:Pro	TGGTrp
BM4-C1- 96-Forward4_D1	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Ala:Pro	TGGTrp
BM4-C3- 58-Forward4_C2	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Ala:Pro	TGGTrp
BM4-C4- 93-Forward4_G2	TCTACGAAAACThr	ATTIle	CCCCA	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C1- 65-Forward4_A1	TCTACAAAAACThr	ATTIle	CCCCC	Pro:Pro	GGGGly
BM4-C3- 32-Forward4_A2	TCTACGAAAACThr	ATTIle	CCCCC	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C4- 90-Forward4_F2	TCTACGAAAACThr	ATTIle	CCCCA	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C4- 11-Forward4_E2	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C2- 12-Forward4_E1	TCTACAAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Pro:Pro	GGGGly
BM4-C3- 68-Forward4_D2	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Ala:Pro	TGGTrp
BM4-C1- 84-Forward4_C1	TCTACGAAAACThr	ATTIle	CCCCC	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C5- 49-Forward4_A3	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCC	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C5- 59-Forward4_B3	TCTACAAAAACThr	AGT'Ser	CCCCC	Ala:Pro	GGGGly
BM4-C5- 95-Forward4_D3	TCTACGAAAACThr	ATTIle	CCCCC	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C1- 77-Forward4_B1	TCTACGAAAACThr	ATTIle	CCCCA	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C2- 34-Forward4_G1	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Ala:Pro	TGGTrp
BM4-C2- 16-Forward4_F1	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C2- 45-Forward4_H1	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C3- 40-Forward4_B2	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Pro:Pro	TGGTrp
BM4-C4- 113-Forward4_H2	TCTACGAAAACThr	AGT'Ser	CCCCA	Ala:Pro	TGGTrp
BM4-C5- 87-Forward4_C3	TCTACGAAAACThr	ATTIle	CCCCC	Pro:Pro	TGGTrp

Şekil 4.56. BMP2 geni 3.ekzon-2.bölgesi amino ast dizi değişimleri

BMP2 geni 3.ekzon-2.bölgesi için toplamda 194 adet tek baz değişimi gözlenmiş ve bu baz değişimleri Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15. BMP2 geni 3.ekzon 2.bölgesi tek nükleotid değişimleri

NCBI Dizi	49552336	49552351	49552696	49552996	49553071	49553086	49553236	49553431	49553806	49554376	49554691	49554826	49555156	49555171	49555246	49555261	49555396	49555471	49555486	49555621	49555996	49556176	49556311	49556356	49556371	49556776	49556821	49556911	49557046	49557301	49557451	49557466	49557736	49557901
BMP2 4. bölge467bp	A	A	A	A	A	T	G	A	G	T	A	G	A	G	A	G	G	A	T	T	A	G	G	A	A	G	T	T	A	G	A	G	G	A
BM4-C3-58	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	A	G	A	G	A	G	G	A	T	T	A	G	G	A	A	G	T	T	A	G	A	G	G	A
BM4-C4-93	.	A	R	R	R	.	.	.	R	T	A	K	A	S	A	G	R	R	T	T	A	R	K	A	W	R	T	T	W	G	A	G	G	A
BM4-C4-90	.	W	.	R	R	.	.	.	R	T	A	T	A	S	M	G	R	A	T	W	A	R	G	A	A	G	T	T	A	K	A	G	G	A
BM4-C3-32	R	W	R	R	R	.	.	.	R	T	A	T	A	S	C	G	R	R	K	W	A	R	K	A	A	G	K	K	W	K	A	G	R	R
BM4-C4-11	.	A	R	R	R	.	.	.	R	T	A	K	A	C	M	G	G	R	T	W	A	R	G	A	A	G	T	T	A	K	A	G	G	R
BM4-C1-84	.	A	.	R	R	.	R	M	R	W	A	K	A	S	M	S	R	A	T	W	A	R	K	M	A	R	T	K	A	K	W	K	R	A
BM4-C2-12	.	W	R	R	R	.	R	M	R	T	A	K	A	S	M	G	R	R	K	W	M	R	K	A	A	G	K	T	A	K	A	G	R	R
BM4-C3-68	.	W	R	R	R	.	.	.	R	T	A	K	A	S	M	G	R	A	T	W	A	R	K	W	A	G	T	T	A	K	A	G	G	A
BM4-C5-59	.	W	.	R	R	.	.	M	R	T	A	K	A	S	M	G	G	A	G	W	M	R	G	A	A	G	K	T	A	K	A	G	R	R
BM4-C5-49	.	W	R	R	R	.	.	M	R	T	A	K	A	S	C	G	G	R	K	W	M	R	K	M	A	G	K	T	W	K	A	G	R	R
BM4-C5-95	.	W	R	R	R	.	.	M	R	T	A	T	A	S	C	G	R	R	K	W	A	R	K	A	A	G	T	T	W	K	A	G	R	R
BM4-C2-34	.	A	R	R	R	.	.	.	.	T	A	G	A	G	A	G	G	R	T	W	A	G	G	A	A	G	T	T	A	G	A	G	G	A
BM4-C2-16	R	W	R	R	R	.	.	.	R	T	A	K	A	S	M	G	R	R	T	W	A	R	K	A	A	G	T	T	W	K	A	G	R	R
BM4-C2-	.	W	R	R	R	.	.	.	R	T	A	G	A	C	M	G	G	R	K	W	A	R	G	A	A	G	K	T	A	K	A	G	G	R
BM4-C3-40	.	W	.	R	R	.	.	.	R	T	A	K	A	C	M	G	G	R	K	W	A	R	G	A	A	G	T	T	A	K	A	G	G	R
BM4-C4-113	.	.	.	R	R	.	.	.	.	T	A	G	A	G	A	G	G	R	T	W	A	G	G	A	A	G	T	T	A	G	A	G	G	A
BM4-C5-87	.	W	R	R	R	.	.	M	R	T	A	T	A	S	C	G	G	R	K	W	A	R	K	W	A	G	T	T	W	K	A	G	G	R

W: Zayıf A veya T, Y; Primidin (C/T), R; pürin (A/G), M; Amino C/T K; keto T/G, S; güçlü G/C değişimleri

HRMA-PCR analizleri sonucu bağlanma sıcaklığı farklılıklarına göre *ELF5* 6. ekzon bölgesi 5 farklı kümeye, *BMP2* geni 3.ekzon-1.bölgesi ve *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi PCR ürünleri 6 farklı kümede toplanmış olmasına rağmen sekans analizleri sonucu polimorfik bölgelere rastlanılmamıştır.

4.4.4. *ELF5* Geni Verimle İlişkilendirme Analizi Sonuçları

Gen dizi analizleri sonucu *ELF5* geni için farklı bölgelerde farklı sayıda polimorfik bölgeler tanımlanmıştır. Polimorfik bölgeler baz alınarak genom dizi analizi yapılan Esmer ırkı süt sığırlarında verim özelliklerinden polimorfik bölge genotipleri, laktasyon sırası, cinsiyet, aşım açık gün sayısı, periyodik servis ve buzağılama mevsimleri gibi çevre faktörleri üzerinde durulmuştur.

4.4.4.a. *ELF5* 2. intron bölgesi

ELF5 geninin 2. intron bölgesinde g.65825359 C/T, g.65825499 G/A ve g.65825371 -/A polimorfik bölgeleri ile buzağılama mevsimi, laktasyon sırası ve aşım açık gün sayısı varyasyon kaynakları ile gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, günlük süt verimi, sağım süresi, pik süt verimi, ortalama pik süt verimi ve pik gün verimleri arasındaki ilişkiler varyans analizi ile incelenmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre g.65825371 -/A polimorfik bölgesi ile gerçek süt verimi (laktasyon süt verimi) ve pik süt verimi arasında ($P<0.05$), g.65825359 C/T polimorfizmi ile pik gün verim değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler tespit edilmiştir ($P<0.05$). *ELF5* geninin 2. intron bölgesinde tanımlanmış g.65825359 C/T, g.65825499 G/A ve g.65825371 -/A polimorfik bölgeleri ile diğer varyasyon kaynakları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($P>0.05$). Varyans analizi sonuçları Çizelge 4.16'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. *ELF5* geni 2. intron bölgesi farklı performans özelliklerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
Laktasyon Süt Verimi (Gerçek Süt Verimi)					
g.65825359 C/T	2	2717323,163	1,202	,322	Ö.S.
g.65825371 -/A	1	10953108,311	4,845	,040	*
g.65825499 G/A	1	953836,312	,422	,524	Ö.S.
Buzağılama mevsimi	3	6745158,134	2,984	,057	Ö.S.
Cinsiyet	1	2650373,953	1,172	,292	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	24344257,540	10,768	,004	**
Aşıma açık gün	4	10040773,742	4,441	,011	*
Hata	19	2260818,638			
305 Günlük Süt Verimi					
g.65825359 C/T	2	724820,443	,768	,478	Ö.S.
g.65825371 -/A	1	599200,865	,635	,435	Ö.S.
g.65825499 G/A	1	75014,046	,079	,781	Ö.S.
Buzağılama mevsimi	3	1462924,819	1,550	,234	Ö.S.
Cinsiyet	1	2064417,320	2,188	,156	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	6480255,192	6,867	,017	*
Aşıma açık gün	4	773030,584	,819	,529	Ö.S.
Hata	19	943628,096			
Günlük Süt Verimi					
g.65825359 C/T	2	6,788	,622	,548	Ö.S.
g.65825371 -/A	1	4,567	,418	,526	Ö.S.
g.65825499 G/A	1	,084	,008	,931	Ö.S.
Buzağılama mevsimi	3	20,215	1,852	,172	Ö.S.
Cinsiyet	1	49,010	4,489	,048	*
Laktasyon sırası	1	50,396	4,616	,045	*
Aşıma açık gün	4	11,772	1,078	,395	Ö.S.
Hata	19	10,918			
Laktasyon Süresi (Sağım Süresi)					
g.65825359 C/T	2	2675,382	,392	,681	Ö.S.
g.65825371 -/A	1	27861,677	4,084	,058	Ö.S.
g.65825499 G/A	1	663,075	,097	,759	Ö.S.
Buzağılama mevsimi	3	19028,846	2,789	,069	Ö.S.
Cinsiyet	1	23784,403	3,487	,077	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	24496,008	3,591	,073	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	41804,016	6,128	,002	**
Hata	19	6821,744			
Toplam	33				

Ö.S.; önemsiz, ** P<0.001, * P<0.05

Çizelge 4.16. (devam)

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
Pik Gün Verimi					
g.65825359 C/T	2	7690,484	4,703	,022	*
g.65825371 -/A	1	6427,536	3,931	,062	Ö.S.
g.65825499 G/A	1	1269,103	,776	,389	Ö.S.
Buzağılama mevsimi	3	205,699	,126	,944	Ö.S.
Cinsiyet	1	6274,832	3,837	,065	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	6368,553	3,895	,063	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	2438,341	1,491	,244	Ö.S.
Hata	19	1635,175			
Pik Süt Verimi					
g.65825359 C/T	2	397169,422	1,297	,297	Ö.S.
g.65825371 -/A	1	1583369,542	5,170	,035	*
g.65825499 G/A	1	80240,773	,262	,615	Ö.S.
Buzağılama mevsimi	3	320005,559	1,045	,395	Ö.S.
Cinsiyet	1	187225,997	,611	,444	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	202631,781	,662	,426	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	143488,752	,468	,758	Ö.S.
Hata	19	306275,384			
Ortalama Pik Süt Verimi					
g.65825359 C/T	2	6,582	,200	,821	Ö.S.
g.65825371 -/A	1	6,294	,191	,667	Ö.S.
g.65825499 G/A	1	6,286	,191	,667	Ö.S.
Buzağılama mevsimi	3	32,379	,982	,422	Ö.S.
Cinsiyet	1	28,848	,875	,361	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	91,891	2,787	,111	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	100,153	3,037	,043	*
Hata	19	32,974			
Toplam	33				

Ö.S.; önemsiz, ** P<0.001, * P<0.05

a. Gerçek Süt Verimi (Laktasyon Süt Verimi)

Varyans analizi sonuçlarına göre ELF5 geni 2. intron bölgesi için belirlenen g.65825371 -/A polimorfik bölgesi ile gerçek süt verimi ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (P<0.05). Tespit edilen -/A ve +/A genotipleri arasında 1769,052±803,720 kg fark gözlenmiştir. Diğer varyasyon kaynakları ile g.65825359 C/T ve g.65825499 G/A polimorfik bölgelerinin gerçek süt verimi ortalamaları üzerine

etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

Esmer ırkı için gerçek süt verimi genel ortalaması $4277,10 \pm 560,20$ kg olarak belirlenmiştir. Analizler sonucunda ELF5 geni 2. intron bölgesi g.65825359 C/T polimorfizmi gerçek süt ortalaması CC genotipi için $4486,84 \pm 814,70$ kg, CT genotipi $3422,30 \pm 455,68$ kg ve TT genotipi $4922,17 \pm 1468,75$ kg; g.65825371 -/A bölgesinde, -/A için $3392,58 \pm 798,82$ kg, +/A alleli için $5161,63 \pm 559,03$ kg ve g.65825499 G/A polimorfizmi GA genotipi $4031,21 \pm 656,00$ kg; GG genotipi $4523,00 \pm 695,65$ kg olarak bulunmuştur. 33 baş esmer sığına ait diğer varyasyon kaynaklarının gerçek süt verimi ortalamaları ve ortalamaların standart hataları Çizelge 4.17’de gösterilmiştir.

b. 305 günlük süt verimi

Varyans analizi sonuçlarına göre ELF5 belirlenen polimorfik bölgelerin 305 günlük süt verimi ortalamaları üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

Çalışma materyalini oluşturan Esmer sığına ait 305 günlük süt verimi genel ortalaması $4962,94 \pm 361,92$ kg olarak tespit edilmiştir. ELF5 geni 2. intron bölgesi g.65825359 C/T polimorfizmi 305 günlük süt verimi ortalaması CC genotipi için $4849,15 \pm 526,34$ kg, CT genotipi $4497,63 \pm 294,39$ kg ve TT genotipi $5542,03 \pm 948,89$ kg, A delesyonu görülen (-/A) $4756,05 \pm 516,08$ kg, görülmeyen (+/A) $5169,82 \pm 361,16$ kg ve g.65825499 G/A polimorfizm bölgesinde GA genotipi $4893,98 \pm 423,81$ kg, GG genotipi için $5031,89 \pm 449,43$ kg olarak belirlenmiştir.

c. Günlük süt verimi

ELF5 2. intron bölgesi için tespit edilmiş polimorfik bölgeler, laktasyon sırası, cinsiyet ve buzağılama mevsimi faktörlerinin günlük süt verimi üzerine etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

Günlük süt verimi genel ortalaması $16,81 \pm 1,23$ kg olarak tespit edilmiştir. g.65825359 C/T polimorfizmi günlük süt verimi ortalaması CC genotipi için $16,89 \pm 1,79$ kg, CT genotipi $15,41 \pm 1,00$ kg ve TT genotipi $18,13 \pm 3,23$ kg, g.65825371 -/A bölgesinde, -/A için $16,24 \pm 1,76$ kg, +/A alleli için $17,38 \pm 1,23$ kg ve ve g.65825499 G/A polimorfizm bölgesinde GA genotipi $16,74 \pm 1,44$ kg, GG genotipi için $16,88 \pm 1,53$ kg olarak belirlenmiştir.

d. Laktasyon süresi

ELF5 2. intron bölgesi için belirlenen polimorfik bölgelerin laktasyon süresi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$).

Esmer sığır ırkı için genel laktasyon süresi ortalaması $249,64 \pm 30,77$ gün olarak belirlenmiştir. *ELF5* geni 2. intron bölgesi g.65825359 C/T polimorfizmi CC genotipi laktasyon süresi ortalaması $269,65 \pm 44,75$ gün, CT genotipi $227,90 \pm 25,03$ gün TT genotipi $251,38 \pm 80,68$ gün, A delesyonu görülen (-/A) $205,03 \pm 43,88$ gün, A delesyonu görülmeyen (+/A) $294,25 \pm 30,71$ gün ve g.65825499 G/A polimorfizm bölgesinde GA genotipi $243,16 \pm 36,03$ gün, GG genotipi için $256,13 \pm 38,21$ gün olarak belirlenmiştir. Polimorfik bölgeler içerisinde en yüksek laktasyon süresi +/A bireylerde görülürken en düşük laktasyon süresi -/A bireylerde görülmüştür.

e. Pik Süt Verimleri

Genel linear testi uygulanmış 33 baş esmer sığır ırkına ait süt verim kayıtları arasında g.65825359 C/T polimorfizminin pik gün verim değerleri üzerindeki etkisinin ve g.65825371 -/A polimorfik bölgesinin pik süt verimi üzerindeki etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

Esmer sığır ırkının pik gün verimi; pik süt verimi ve ortalama pik süt verimleri genel ortalamaları sırasıyla $27,06 \pm 15,07$ gün, $465,78 \pm 206,19$ kg ve $16,39 \pm 2,14$ kg olarak belirlenmiştir.

ELF5 geni 2. intron bölgesi g.65825359 C/T polimorfizmi CC genotipi pik gün verimi ortalaması $64,46 \pm 21,91$ gün, CT genotipi $70,17 \pm 12,25$ gün, TT genotipi için $53,45 \pm 39,50$ gün olarak belirlenmiş ve CT genotipli bireyler ile TT genotipli bireyler arasındaki $123,620 \pm 40,499$ günlük pik gün verimi farkı istatistiksel olarak anlamlı olup ($P < 0,022$) CT genotipli bireylerde pik gün verimi daha yüksektir. g.65825371 -/A polimorfik bölgesi A delesyonu görülen (-/A) $5,63 \pm 21,48$ gün, görülmeyen (+/A) $48,49 \pm 15,03$ gün ve g.65825499 G/A polimorfizm bölgesinde GA genotipi $36,03 \pm 17,64$ gün, GG genotipi için $18,09 \pm 18,71$ gün olarak belirlenmiştir.

Pik süt verimi ortalamaları g.65825371 -/A polimorfik bölgesi için -/A $129,47 \pm 294,02$ kg, +/A $802,08 \pm 205,76$ kg olarak belirlenmiş ve A delesyonu görülen (-/A) bireyler ile A delesyonu taşımayan (+/A) bireyler arasındaki $672,609 \pm 295,820$ kg fark istatistiksel olarak anlamlı olup ($\text{sig}\alpha = 0.035$) A delesyonu görülen (-/A) bireylerde pik süt verimi ortalamalarının düşük olduğu belirlenmiştir. g.65825499 G/A polimorfik bölgesi GA genotipi $394,46 \pm 241,45$ kg; GG genotipi için $537,10 \pm 256,04$ kg olarak tespit edilmiştir.

Polimorfik bölgeler içerisinde en yüksek ortalama pik süt verimi değerleri 65825359 C/T polimorfik bölgesi TT genotipli bireylerde $17,71 \pm 5,61$ kg, en düşük CT genotipi taşıyan hayvanlarda $15,01 \pm 1,74$ kg olup en yüksek ve en düşük ortalama pik süt verimi değerleri arasındaki fark önemli bulunamamıştır.

Çizelge 4.17. *ELF5* 2. intron bölgesi farklı verim özellikleri bakımından en küçük kareler ortalaması ve standart hataları

Varyasyon Kaynakları		N	Laktasyon süt verimi	Günlük süt verimi	305 günlük sütverimi	Sağım süresi	Pik Gün Verimi	Pik Süt Verimi	Ort. Pik Süt Verimi
			$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
g.65825359 C/T	CC	5	4486,84±814,70	16,89±1,79	4849,15±526,34	269,65±44,75	64,46±21,91	706,50±299,86	16,46±3,11
	CT	26	3422,30±455,68	15,41±1,00	4497,63±294,39	227,90±25,03	70,17±12,25	785,44±167,72	15,01±1,74
	TT	2	4922,17±1468,75	18,13±3,23	5542,03±948,89	251,38±80,68	53,45±39,50	-94,60±540,59	17,71±5,61
g.65825371-/A	-/A	9	3392,58±798,82	16,24±1,76	4756,05±516,08	205,03±43,88	5,63±21,48	129,47±294,02	15,72±3,05
	+/A	24	5161,63±559,03	17,38±1,23	5169,82±361,16	294,25±30,71	48,49±15,03	802,08±205,76	17,06±2,13
g.65825499 G/A	GA	10	4031,21±656,00	16,74±1,44	4893,98±423,81	243,16±36,03	36,03±17,64	394,46±241,45	15,76±2,51
	GG	23	4523,00±695,65	16,88±1,53	5031,89±449,43	256,13±38,21	18,09±18,71	537,10±256,04	17,02±2,66
Buzağılama Mevsimi	ilkbahar	4	5742,26±973,38	19,65±2,14	5919,07±628,86	280,39±53,47	28,17±26,18	776,57±358,27	20,30±3,72
	kış	17	3109,57±610,62	17,80±1,34	4830,99±394,49	175,66±33,54	24,89±16,42	381,13±224,75	17,32±2,33
	sonbahar	8	3892,08±635,60	15,64±1,40	4620,90±410,63	245,05±34,91	35,16±17,09	613,37±233,94	15,25±2,43
	yaz	4	4364,50±110,97	14,15±2,42	4480,78±711,28	297,48±60,48	20,02±29,61	92,04±405,23	12,70±4,20
Cinsiyet	D	16	3867,72±716,01	18,57±1,57	5324,24±462,58	210,86±39,33	7,14±19,26	356,97±263,54	17,74±2,73
	E	17	4686,49±633,17	15,05±1,39	4601,63±409,06	288,42±34,78	46,98±17,03	574,59±233,05	15,04±2,42
Laktasyon sırası	1	14	2677,51±658,72	14,51±1,45	4137,64±425,57	198,90±36,18	52,93±17,72	611,71±242,45	13,28±2,52
	2	19	5876,70±817,91	19,11±1,80	5788,23±528,41	300,38±44,93	1,19±22,00	319,84±301,04	19,50±3,12
Aşıma açık gün	30-90	7	1762,90±850,46	17,13±1,87	4518,70±549,44	112,96±46,72	24,62±22,87	544,15±313,02	17,99±3,25
	91-150	7	3624,31±940,95	14,53±2,07	4364,08±607,90	236,39±51,69	67,00±25,31	250,24±346,33	7,23±3,59
	151-175	7	4734,07±995,74	18,82±2,19	5563,82±643,30	247,18±54,70	-2,62±26,78	394,60±366,50	18,61±3,80
	176-250	7	5753,59±761,85	15,23±1,67	4776,79±492,20	372,94±41,85	43,55±20,49	729,23±280,41	14,32±2,91
	250 üstü	5	5510,63±1076,25	18,33±2,37	5591,28±695,32	278,75±59,12	2,74±28,94	410,67±396,13	23,80±4,11
Toplam		33	4277,10±560,20	16,81±1,23	4962,94±361,92	249,64±30,77	27,06±15,07	465,78±206,19	16,39±2,14

4.4.4.b. *ELF5* 5. ekzon bölgesi

Esmer ırkında *ELF5* geni 5. ekzon bölgesi g.65825909 T/C; g.65826062 G/A; g.65826123 A/C; g.65826134 C/T ve g.65826138 T/C polimorfik bölgeleri, buzağılama mevsimi, laktasyon sırası ve aşımaya açık gün sayısına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.18’de gösterilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre belirlenmiş polimorfik gen bölgeleri ile gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, günlük süt verimi, sağım süresi, pik süt verimi, ortalama pik süt verimi ve pik gün verimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 4.18. *ELF5* geni 5.ekzon bölgesi farklı performans özelliklerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
Laktasyon Süt Verimi (Gerçek Süt Verimi)					
65825909 T/C	2	5664439,109	1,671	0,210	Ö.S.
65826123 A/C	2	997182,478	0,263	0,771	Ö.S.
65826134 C/T-65826062 G/A	2	3867144,810	1,090	0,353	Ö.S.
65826138 T/C	1	2042673,206	0,562	0,461	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	949233,662	0,261	0,614	Ö.S.
Aşımaya açık gün	4	1753333,640	0,482	0,749	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	771948,956	0,212	0,887	Ö.S.
Hata	24	3636469,578			
Toplam	34				
Günlük Süt Verimi					
65825909 T/C	2	7,806	0,537	0,591	Ö.S.
65826123 A/C	2	21,034	1,573	0,229	Ö.S.
65826134 C/T-65826062 G/A	2	1,289	0,085	0,918	Ö.S.
65826138 T/C	1	7,384	0,518	0,479	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	5,648	0,422	0,522	Ö.S.
Aşımaya açık gün	4	1,410	0,105	0,979	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	37,606	2,812	0,062	Ö.S.
Hata	24	14,261			
Toplam	34				

Ö.S.; önemsiz, ** $P<0.001$, * $P<0.05$

Çizelge 4.18. (devam)

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
305 Günlük Süt Verimi					
65825909 T/C	2	1454309,285	1,557	,232	Ö.S.
65826123 A/C	2	1845374,187	2,050	,152	Ö.S.
65826134 C/T-65826062 G/A	2	326973,572	,317	,732	Ö.S.
65826138 T/C	1	233706,060	,232	,634	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	546598,941	,607	,444	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	587161,020	,629	,647	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	2446964,537	2,719	,068	Ö.S.
Hata	23	934062,261			
Toplam	34				
Sağım Süresi					
65825909 T/C	2	17845,144	1,281	,297	Ö.S.
65826123 A/C	2	339,997	,022	,978	Ö.S.
65826134 C/T-65826062 G/A	2	6249,286	,418	,663	Ö.S.
65826138 T/C	1	18765,407	1,335	,259	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	3948,211	,256	,618	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	8631,539	,578	,682	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	8364,079	,560	,647	Ö.S.
Hata	23	14937,979			
Toplam	34				
Pik Gün Verimi					
65825909 T/C	2	3333,084	1,383	,271	Ö.S.
65826123 A/C	2	1159,792	,446	,646	Ö.S.
65826134 C/T-65826062 G/A	2	2639,066	1,068	,360	Ö.S.
65826138 T/C	1	171,642	,067	,799	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	1390,041	,577	,455	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	2324,378	,941	,458	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	5604,168	2,268	,108	Ö.S.
Hata	23	2470,951			
Toplam	34				

Çizelge 4.18. (devam)

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
Pik Süt Verimi					
65825909 T/C	2	581399,633	2,078	,148	Ö.S.
65826123 A/C	2	170405,929	,540	,590	Ö.S.
65826134 C/T-65826062 G/A	2	97104,998	,302	,742	Ö.S.
65826138 T/C	1	51081,705	,162	,690	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	860751,073	3,076	,093	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	236238,977	,734	,578	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	52722,434	,164	,920	Ö.S.
Hata	23	321918,683			
Toplam	34				
Ortalama Pik Süt Verimi					
65825909 T/C	2	3,811	,055	,947	Ö.S.
65826123 A/C	2	15,116	,221	,804	Ö.S.
65826134 C/T-65826062 G/A	2	111,446	1,853	,179	Ö.S.
65826138 T/C	1	4,821	,072	,790	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	5,334	,077	,784	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	21,597	,359	,835	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	89,127	1,482	,246	Ö.S.
Hata	23	60,146			
Toplam	34				

Ö.S.; önemsiz, ** P<0.001, * P<0.05

a. Gerçek Süt Verimi (Laktasyon Süt Verimi)

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi polimorfik bölgelerinin gerçek süt verimi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (P>0.05).

Esmer ırkı için gerçek süt verimi genel ortalaması 3702,84±605,75 kg olarak belirlenmiştir. Analizler sonucu *ELF5* geni 5. ekzon bölgesi g.65825909 T/C polimorfizmi gerçek süt ortalamaları CC genotipi 3533,16±822,61 kg, TC genotipi

4199,78±671,83 kg ve TT genotipi için 2511,08±835,20 kg olarak belirlenmiştir. g.65826062 G/A polimorfizmi AA genotipi 3154,48±1614,91 kg, GA genotipi 2373,31±1020,83 kg ve GG genotipi 3827,11±589,13 kg; g.65826123 A/C AA, AC ve CC genotipleri için sırasıyla 3258,50±778,38 kg, 3734,28±1043,16 kg ve 4115,74±1068,06 kg; g.65826134 C/T polimorfizmi CC genotipi 3827,11±589,13 kg, CT genotipi 2373,31±1020,83 kg ve TT genotipi için 3154,48±1614,91 kg olarak bulunmuş ve 65826138 T/C polimorfizmi TT ve TC genotipleri için gerçek süt verimi genel ortalamaları sırasıyla 3811,79±646,82 kg ve 3043,07±917,12 kg olarak tespit edilmiştir. En yüksek gerçek süt verimi ortalaması g.65825909 T/C polimorfik bölgesi TC genotip ve en düşük gerçek süt verim ortalamasının g.65826134 C/T polimorfik bölgesi CT genotipli bireylerde görüldüğü belirlenmiştir. 34 baş esmer sığır ırkına ait diğer verilerin gerçek süt verimi ortalamaları ve ortalamaların standart hataları Çizelge 4.19'da gösterilmiştir.

b. 305 günlük süt verimi

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi için belirlenmiş polimorfik bölgelerin 305 günlük süt verimi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

Çalışma materyalini oluşturan Esmer sığır ırkına ait verim kayıtlarına göre 305 günlük süt verimi genel ortalaması 4781,25±294,94 kg olarak tespit edilmiştir. *ELF5* geni 5. ekzon bölgesi için belirlenmiş polimorfik bölgeler arasında en yüksek 305 günlük süt verimi genel ortalamaları g.65825909 T/C polimorfik bölgelerinde tanımlanmış ve CC, CT ve TT genotipli bu bireylerde 305 günlük süt verimi genel ortalama değerlerinin sırasıyla 4835,21±431,75 kg, 4827,59±352,61 kg ve 4036,39±438,36 kg olduğu belirlenmiştir. En düşük 305 günlük süt verimi genel ortalaması g.65826062 G/A polimorfik bölgesi GG, GA, AA genotipli bireylerinde ve g.65826134 C/T polimorfik bölgesi için tanımlanmış CC, TC ve TT genotipli bireylerde görülmüştür. En düşük 305 günlük süt verimi genel ortalamaları iki polimorfik bölge için aynı değerde olup belirlenmiş genotipler için sırasıyla 4680,69±317,79 kg, 4300,69±550,65 kg ve 4343,09±871,10 kg olarak tespit edilmiştir.

c. Günlük süt verimi

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi için tanımlanmış polimorfik bölgelerin günlük süt verimi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

Günlük süt verimi genel ortalaması $15,96\pm1,14$ kg olarak tespit edilmiştir. g.65826062 G/A polimorfik bölgesi GG, GA, AA genotipli bireylerinde ve g.65826134 C/T polimorfik bölgesi için tanımlanmış CC, CT ve TT genotipli bireylerde homozigot ve heterozigot genotip değerleri benzer olması nedeniyle günlük süt verimi ortalamaları aynı değerde olup homozigot ve heterozigot genotipler için sırasıyla $15,24\pm3,33$ kg, $14,69\pm2,11$ kg ve $15,54\pm1,22$ kg olduğu görülmüştür. g.65825909 T/C, g.65826123 A/C ve g.65826138 T/C polimorfik bölgeleri arasında günlük süt verimi ortalaması en yüksek ve en düşük g.65826123 A/C polimorfik bölgesinde görülmüş, CC genotipi için $17,45\pm2,00$ kg ve AA genotipi için $13,77\pm1,46$ kg olarak belirlenmiştir.

d. Laktasyon süresi (Sağım süresi)

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi bölgesi için tespit edilmiş polimorfik bölgeler, laktasyon sırası, buzağılama mevsimi ve aşımaya açık gün sayısı faktörlerinin laktasyon süresi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi genel laktasyon süresi ortalaması $240,89\pm38,64$ gün olarak belirlenmiştir. *ELF5* geni 5. ekzon bölgesi g.65825909 T/C polimorfik bölgesi CC genotipi $224,94\pm52,72$ gün, TC genotipi $276,45\pm43,06$ gün ve TT genotipi laktasyon süresi ortalaması $183,98\pm53,53$ gün; g.65826062 G/A polimorfizmi AA genotipi $200,08\pm104,80$ gün, GA genotipi $195,41\pm66,25$ gün ve GG genotipi $247,59\pm38,23$ gün olarak belirlenmiştir. g.65826123 A/C polimorfik bölgesi AA genotipi $232,01\pm49,66$ gün, AC $247,77\pm66,55$ gün ve CC genotipi için $242,87\pm68,14$ gün; g.65826138 T/C polimorfizmi TC ve TT genotipleri için sırasıyla $187,25\pm57,02$ gün ve $260,93\pm40,21$ gün olarak tespit edilmiştir. Polimorfik bölgeler içerisinde en yüksek laktasyon süresi

g.65826123 A/C polimorfizmi taşıyan bireylerde görülmüş ve birinci laktasyon değeri $219,62 \pm 67,40$ gün, ikinci laktasyon değerleri ise $262,16 \pm 44,56$ gün olduğu görülmüştür.

e. Pik süt verimleri

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi için tespit edilmiş polimorfik bölgelerin, pik gün verimi; pik süt verimi ve ortalama pik süt verimleri genel ortalamaları üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$).

Esmer sığır ırkının pik gün verimi; pik süt verimi ve ortalama pik süt verimleri genel ortalamaları sırasıyla $69,22 \pm 20,52$ gün, $699,44 \pm 234,20$ kg ve $14,65 \pm 3,20$ kg olarak belirlenmiştir.

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi g.65825909 T/C, g.65826062 G/A, g.65826123 A/C, g.65826134 C/T, g.65826138 T/C polimorfik bölgeleri içerisinde en yüksek pik gün verimi ortalaması genel olarak g.65826123 A/C polimorfik bölgesinde görülmüş ve pik gün verimi ortalamaları AA, AC ve CC genotipleri için sırasıyla $64,09 \pm 20,37$ gün, $63,79 \pm 27,30$ gün ve $92,25 \pm 27,95$ gün; en düşük pik gün verimi genel olarak g.65826138 T/C polimorfik bölgesi için bulunmuş ve TC ve TT genotipi için sırasıyla $65,21 \pm 24,43$ gün ve $72,26 \pm 17,23$ gün olarak görülmüştür.

Pik süt verimi ortalamaları g.65825909 T/C; CC genotipi için $741,59 \pm 236,30$ kg, CT genotipi $877,56 \pm 192,99$ kg ve TT genotipi için $339,62 \pm 239,92$ kg; g.65826138 T/C polimorfizmi TC genotipi $614,44 \pm 269,69$ kg, TT genotipi için $736,00 \pm 190,21$ kg olarak tespit edilmiş ve diğer polimorfik bölgeler ile laktasyon sayısı, aşım çık gün sayısı ve mevsimsel faktörlere ait pik süt verim ortalama değerleri Çizelge 4.19’da verilmiştir.

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi pik süt verimi ortalamalarının polimorfik bölgeler arasında en yüksek değeri sırasıyla g.65826062 G/A ve g.65826134 C/T polimorfik bölgeleri homozigot AA ve CC genotipli bireyler için ($20,53 \pm 6,65$ gün) görülürken, en düşük

değerleri aynı polimorfik bölgelerin heterozigot GA ve CT genotipleri ($8,08 \pm 4,20$) içerisinde görülmüştür.



Çizelge 4.19. ELF5 5.ekzon bölgesi farklı verim özellikleri bakımından en küçük kareler ortalaması ve standart hataları

Varyasyon Kaynakları		N	Laktasyon süt verimi	Günlük süt verimi	305 günlük süt verimi	Sağım süresi	Pik gün verimi	Pik süt verimi	Ort. pik süt verimi
			$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
65825909 T/C	CC	9	3533,16±822,61	16,16±1,70	4835,21±431,75	224,94±52,72	76,10±21,93	741,59±236,30	14,08±3,72
	TC	17	4199,78±671,83	15,73±1,39	4827,59±352,61	276,45±43,06	82,45±17,91	877,56±192,99	13,57±3,04
	TT	8	2511,08±835,20	14,11±1,73	4036,39±438,36	183,98±53,53	42,43±22,27	339,62±239,92	14,96±3,78
Laktasyon sırası	1	10	3609,23±1009,83	15,32±2,09	4636,11±530,01	231,61±64,72	80,29±26,93	983,83±290,08	13,38±4,57
	2	24	3220,12±687,78	15,34±1,42	4496,69±360,98	225,30±44,08	53,70±18,34	322,02±197,57	15,03±3,11
Aşıma açık gün	20-60	7	2928,88±1016,68	14,93±2,10	4279,05±533,60	192,86±65,16	94,25±27,11	919,74±292,05	13,36±4,60
	61-120	7	2965,69±940,86	14,83±1,95	4390,79±493,81	208,64±60,30	68,77±25,09	651,20±270,27	12,74±4,26
	121-145	7	3104,93±915,65	15,67±1,89	4528,40±480,58	203,74±58,69	50,30±24,41	380,64±263,03	12,51±4,15
	146-200	6	4418,19±1086,50	16,35±2,25	5208,46±570,25	288,90±69,64	60,51±28,97	759,76±312,11	14,95±4,92
	200 üstü	7	3655,66±1141,85	14,88±2,36	4425,29±599,30	248,14±73,19	61,14±30,45	553,28±328,01	17,47±5,17
Buzağılama Mevsimi	ilkbahar	2	3221,07±1413,54	16,54±2,93	5009,57±741,89	192,32±90,60	35,76±37,69	513,23±406,05	16,19±6,40
	kış	17	3451,22±549,63	15,19±1,14	4345,16±288,47	230,74±35,23	71,69±14,65	830,83±157,89	13,53±2,49
	sonbahar	12	3583,72±637,36	17,69±1,32	5089,64±334,52	207,52±40,85	47,63±16,99	795,49±183,09	17,27±2,89
	yaz	3	3402,68±1276,64	11,91±2,64	3821,22±670,04	283,24±81,82	112,90±34,04	472,15±366,73	9,84±5,78

Çizelge 4.19. (devam)

Varyasyon Kaynakları		N	Laktasyon süt verimi	Günlük süt verimi	305 günlük süt verimi	Sağım süresi	Pik gün verimi	Pik süt verimi	Ort. pik süt verimi
			$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
65826123 A/C	AA	24	3258,50±778,38	13,77±1,46	4121,01±378,99	232,01±49,66	64,09±20,37	549,99±224,40	12,74±3,31
	AC	5	3734,28±1043,16	16,66±1,96	5059,69±507,91	247,77±66,55	63,79±27,30	922,86±300,73	14,91±4,43
	CC	5	4115,74±1068,06	17,45±2,00	5163,07±520,03	242,87±68,14	92,25±27,95	746,29±307,91	15,98±4,54
Laktasyon sırası	1	10	3405,47±1056,44	15,15±1,98	4530,99±514,37	219,62±67,40	75,36±27,64	895,79±304,56	13,79±4,49
	2	24	4000,21±698,49	16,76±1,31	5031,52±340,09	262,16±44,56	71,39±18,28	583,64±201,37	15,30±2,97
Aşıma açık gün	20-60	7	3051,97±1108,61	15,48±2,08	4471,27±539,77	198,55±70,72	94,38±29,01	1009,52±319,60	13,69±4,71
	61-120	7	3159,03±1060,85	15,85±1,99	4664,84±516,52	208,67±67,68	75,50±27,76	685,82±305,83	13,78±4,51
	121-145	7	3224,70±981,85	15,30±1,84	4483,17±478,05	216,44±62,64	52,13±25,69	441,23±283,06	11,63±4,17
	146-200	6	4152,18±1179,45	15,99±2,21	5008,13±574,26	270,69±75,24	57,73±30,86	593,21±340,02	15,40±5,01
	200 üstü	7	4926,31±1189,34	17,17±2,23	5278,87±579,08	310,08±75,87	87,13±31,12	968,80±342,88	18,22±5,05
Buzağılama Mevsimi	ilkbahar	2	3673,39±1531,01	18,32±2,87	5585,87±745,44	204,89±97,67	47,35±40,06	721,33±441,37	17,06±6,50
	kış	17	3681,74±739,56	16,60±1,39	4762,51±360,08	233,31±47,18	76,02±19,35	943,38±213,21	14,77±3,14
	sonbahar	12	3800,70±740,49	18,62±1,39	5359,01±360,54	213,29±47,24	51,13±19,38	862,71±213,48	18,26±3,15
	yaz	3	3655,52±1404,88	10,30±2,64	3417,63±684,03	312,06±89,62	119,00±36,76	431,45±405,01	8,09±5,97
Toplam		34	3702,84±605,75	15,96±1,14	4781,25±294,94	240,89±38,64	73,37±15,85	739,71±174,63	14,55±2,57

Çizelge 4.19. (devam)

Varyasyon Kaynakları		N	Laktasyon süt verimi	Günlük süt verimi	305 günlük süt verimi	Sağım süresi	Pik gün verimi	Pik süt verimi	Ort. pik süt verimi
			$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
65826134 C/T	CC	26	3827,11±589,13	15,54±1,22	4680,69±317,79	247,59±38,23	63,77±15,55	660,40±177,48	15,33±2,43
	CT	6	2373,31±1020,83	14,69±2,11	4300,69±550,65	195,41±66,25	100,56±26,94	887,23±307,53	8,08±4,20
	TT	2	3154,48±1614,91	15,24±3,33	4343,09±871,10	200,08±104,80	43,32±42,62	550,68±486,50	20,53±6,65
65826062 G/A	AA	2	3154,48±1614,91	15,24±3,33	4343,09±871,10	200,08±104,80	43,32±42,62	550,68±486,50	20,53±6,65
	GA	6	2373,31±1020,83	14,69±2,11	4300,69±550,65	195,41±66,25	100,56±26,94	887,23±307,53	8,08±4,20
	GG	26	3827,11±589,13	15,54±1,22	4680,69±317,79	247,59±38,23	63,77±15,55	660,40±177,48	15,33±2,43
Laktasyon sırası	1	10	2934,45±1166,83	14,73±2,41	4307,03±629,40	195,63±75,72	69,59±30,80	877,04±351,51	14,70±4,80
	2	24	3302,16±801,64	15,58±1,65	4575,95±432,41	233,09±52,02	68,85±21,16	521,84±241,50	14,59±3,30
Aşıma açık gün	20-60	7	2141,27±1266,76	14,52±2,61	4018,26±683,31	156,24±82,21	101,63±33,43	979,83±381,62	12,55±5,22
	61-120	7	2289,87±1072,39	14,39±2,21	4152,23±578,46	178,19±69,59	73,57±28,30	672,26±323,06	11,74±4,42
	121-145	7	3008,08±1116,17	15,83±2,30	4517,79±602,07	194,91±72,43	51,93±29,46	448,63±336,25	13,91±4,60
	146-200	6	3801,41±1179,70	15,76±2,43	4891,07±636,35	255,23±76,56	47,31±31,14	622,99±355,39	16,38±4,86
	200 üstü	7	4350,87±1143,92	15,29±2,36	4628,08±617,05	287,23±74,23	71,64±30,19	773,50±344,61	18,66±4,71
Buzağılam a Mevsimi	ilkbahar	2	2658,00±1577,93	16,61±3,25	4928,36±851,16	162,92±102,40	48,05±41,65	634,80±475,36	15,47±6,50
	kış	17	2883,50±705,80	14,86±1,46	4150,05±380,72	203,70±45,80	74,55±18,63	841,77±212,63	13,01±2,91
	sonbahar	12	3414,41±795,61	17,41±1,64	4927,45±429,16	196,30±51,63	36,82±21,00	726,23±239,68	19,32±3,28
	yaz	3	3517,29±1378,15	11,75±2,84	3760,10±743,39	294,53±89,43	117,44±36,37	594,96±415,18	10,78±5,67

Çizelge 4.19. (devam)

Varyasyon Kaynakları		N	Laktasyon süt verimi	Günlük süt verimi	305 günlük süt verimi	Sağım süresi	Pik gün verimi	Pik süt verimi	Ort. pik süt verimi
			$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
65826138	TC	8	3043,07±917,12	16,42±1,82	4799,58±482,52	187,25±57,02	65,21±24,43	614,44±269,69	14,90±3,93
T/C	TT	26	3811,79±646,82	14,96±1,28	4539,56±340,30	260,93±40,21	72,26±17,23	736,00±190,21	13,72±2,77
Laktasyon	1	10	3096,25±1083,92	15,43±2,15	4561,69±570,28	194,91±67,39	70,68±28,88	851,86±318,75	13,99±4,64
sırası	2	24	3758,60±631,59	15,96±1,25	4777,44±332,29	253,27±39,26	66,79±16,83	498,58±185,73	14,63±2,71
Aşıma açık gün	20-60	7	2742,98±1097,54	15,42±2,17	4379,51±577,44	173,12±68,23	93,22±29,24	897,79±322,75	13,68±4,70
	61-120	7	2593,31±1054,39	15,31±2,09	4451,30±554,74	176,24±65,55	64,05±28,09	578,88±310,06	13,26±4,52
	121-145	7	3334,12±935,04	16,13±1,85	4706,34±491,95	212,79±58,13	57,26±24,91	468,58±274,97	12,36±4,01
	146-200	6	3809,26±1161,59	16,42±2,30	5104,41±611,14	246,17±72,21	48,90±30,94	600,30±341,59	15,65±4,98
	200 üstü	7	4657,47±1039,52	15,19±2,06	4706,29±546,91	312,15±64,62	80,22±27,69	830,56±305,69	16,59±4,45
Buzağılam a Mevsimi	ilkbahar	2	2986,55±1553,36	17,85±3,08	5337,01±817,26	157,56±96,57	39,07±41,38	528,92±456,80	16,68±6,65
	kış	17	3056,61±721,31	15,77±1,43	4432,13±379,50	195,30±44,84	67,27±19,22	759,30±212,11	14,09±3,09
	sonbahar	12	3297,16±728,41	17,96±1,44	5104,98±383,24	183,96±45,28	42,83±19,40	731,53±214,20	17,69±3,12
	yaz	3	4369,40±1351,61	11,20±2,68	3804,15±711,11	359,55±84,03	125,76±36,01	681,13±397,47	8,76±5,79
	Toplam	34	3702,84±605,75	15,96±1,14	4781,25±294,94	240,89±38,64	73,37±15,85	739,71±174,63	14,55±2,57

ELF5 geninin 2. intron bölgesinde tanımlanmış g.65825359 C/T, g.65825499 G/A ve g.65825371 -/A polimorfik bölgeleri, buzağılama mevsimi, laktasyon sırası ve aşım açık gün sayısı varyasyon kaynakları ile gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, günlük süt verimi, sağım süresi, pik süt verimi, ortalama pik süt verimi ve pik gün verimleri arasında yapılmış varyans analizi sonuçlarına göre g.65825371 -/A polimorfik bölgesi ile gerçek süt verimi (laktasyon süt verimi) ve pik süt verimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($P<0.05$), g.65825359 C/T polimorfizmi ile pik gün verim değerleri arasında anlamlı ilişki olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Çalışmada belirlenmiş *ELF5* geninin 2. intron bölgesi g.65825371 -/A polimorfik bölgesi için -/A delesyonlu bireylerde süt verimlerinin genel olarak daha düşük olduğu ve *ELF5* geninin 2. intron bölgesinde görülen bu delesyonun esmer ırkı süt sığırında süt verimini etkilediği belirlenmiştir.

Farklı ekzon bölgelerini içeren *ELF5* geni için yapılan çalışmada örnek sayımızın az olması ve sadece süt verimlerine ilişkin kayıtlar bulunması nedeniyle polimorfik bölgeler ile süt verimleri arasında genel olarak ilişki bulunamamıştır.

Sığırlarda daha önce yapılmış çalışmalarda *ELF5* geni verimle ilişkilendirme çalışmalarının yapılmamış olması nedeniyle literatür karşılaştırılması yapılamamıştır.

4.4.3. *FGF21* Geni verimle ilişkilendirme analizi sonuçları

Esmer sığır ırklarında *FGF21* geni üzerine yapılan süt verim kayıtları ile ilişkilendirme analizlerinde *FGF21* geni 3. ekzon bölgesi için belirlemiş olduğumuz g.55836088. G/T ve g.55836007. C/A polimorfizmleri için yeterli sayıda verim kaydı bulunmadığı için istatistiksel analizler yapılamamıştır.

Esmer sığıra ait gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, günlük süt verimi, sağım süresi, pik süt verimi, pik gün verimi ve ortalama pik süt verim kayıtları ile *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi için tespit edilmiş g.55834828. C/G polimorfik bölgesi, buzağılama mevsimi, laktasyon süresi ve aşım açık gün sayısı verileri ile ilişkilendirme analizleri

sonucunda, incelenen faktörlerin süt verim kayıtları üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P>0.05$). Varyasyon kaynakları ile ilişkilendirme analizi sonuçları Çizelge 4.20’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. *FGF21* geni 1.ekzon bölgesi farklı performans özelliklerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
Laktasyon Süt Verimi (Gerçek Süt Verimi)					
g.55834828 C/G	1	965745,255	0,240	0,629	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	2160483,980	0,538	0,661	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	21592,620	0,005	0,942	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	3734030,907	0,930	0,464	Ö.S.
Hata	23	4016358,263			
Günlük Süt Verimi					
g.55834828 C/G	1	6,419	0,588	0,451	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	26,640	2,442	0,090	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	,012	0,001	0,974	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	21,514	1,972	0,133	Ö.S.
Hata	23	10,908			
305 Günlük Süt Verimi					
g.55834828 C/G	1	81783,461	0,074	0,789	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	2516029,019	2,263	0,108	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	36214,810	0,033	0,858	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	154394,462	0,139	0,966	Ö.S.
Hata	23	1111797,048			
Sağım Süresi					
g.55834828 C/G	1	,172	0,000	0,997	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	1154,736	0,095	0,962	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	198,629	0,016	0,899	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	25014,435	2,058	0,119	Ö.S.
Hata	23	12153,843			
Pik Gün Verimi					
g.55834828 C/G	1	811,545	0,582	0,453	Ö.S.
BuzağılamaMevsimi	3	1944,422	1,394	0,270	Ö.S.
Laktasyonsayısı	1	244,239	0,175	0,679	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	5091,170	3,651	0,019	*
Hata	23	1394,449			

Çizelge 4.20. (devam)

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
Pik Süt Verimi					
g.55834828 C/G	1	4926,073	0,015	0,904	Ö.S.
BuzağılamaMevsimi	3	417385,106	1,252	0,314	Ö.S.
Laktasyonsayısı	1	493,257	0,001	0,970	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	586866,800	1,760	0,171	Ö.S.
Hata	23	333386,443			
Ortalama Pik Süt Verimi					
g.55834828 C/G	1	8,366	0,538	0,471	Ö.S.
BuzağılamaMevsimi	3	45,409	2,920	0,056	Ö.S.
Laktasyonsayısı	1	,075	0,005	0,945	Ö.S.
Aşıma açık gün	4	170,995	10,994	0,000	**
Hata	23	15,553			
Total	33				

Ö.S.; önemsiz, ** P<0.001, * P<0.05

4.4.3.a. Gerçek süt verimi (Laktasyon süt verimi)

FGF21 geni 1. ekzon bölgesi için belirlenmiş polimorfik bölgeler ile diğer farklı varyasyon kaynaklarının 305 günlük süt verimi ile ilişki analizleri sonucu ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($P>0.05$).

Esmer sığırların gerçek süt verimi ortalamaları ve ortalamaların standart hataları Çizelge 4.19'da gösterilmiştir. Esmer ırkı için gerçek süt verimi genel ortalaması $3983,2 \pm 2081,2$ kg olarak belirlenmiştir. Analizler sonucu laktasyon süt verimi ortalaması *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi g.55834828. C/G polimorfik bölgesinde CC ve GG genotipleri için sırasıyla $4286,7 \pm 646,1$ kg; $3918,2 \pm 719,8$ olarak tespit edilmiştir.

4.4.3.b. 305 günlük süt verimi

Araştırmada kullanılan farklı varyasyon kaynaklarının 305 günlük süt verimi ile ilişki analizleri sonucu ortalamalar arasında farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($P>0.05$).

FGF21 geni 1. ekzon bölgesi 305 günlük süt verimi genel ortalaması $4725,3 \pm 1064,8$ kg olarak tespit edilmiştir. *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi g.55834828. C/G polimorfik bölgesinde CC ve GG genotipleri için sırasıyla $5113,5 \pm 340,0$ kg; $5006,3 \pm 378,7$ kg olarak tespit edilmiştir.

4.4.3.c. Günlük süt verimi

FGF21 geni 1. ekzon bölgesi için belirlenmiş polimorfik bölgeler, laktasyon sırası, buzağılama mevsimi ve aşımaya açık gün sayısı faktörlerinin günlük süt verimi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$).

Günlük süt verimi genel ortalaması $16,8 \pm 3,7$ kg olarak tespit edilmiştir. g.55834828. C/G polimorfik bölgesi CC genotipi $17,9 \pm 1,1$ kg ve GG genotipi için $16,9 \pm 1,2$ kg olarak belirlenmiştir.

4.4.3.d. Laktasyon süresi (Sağım süresi)

FGF21 geni 1. ekzon bölgesi bölgesi için belirlenen polimorfik bölgelerinin laktasyon süresi üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$).

Esmer sığır ırkının laktasyon süresi ortalaması $244,2 \pm 119,6$ gün olarak belirlenmiştir. Laktasyon süresi g.55834828. C/G polimorfik bölgesi için CC ve GG genotip ortalamaları ($238,8 \pm 35,5$; $239,0 \pm 39,6$ gün) birbirine yakındır.

4.4.3.e. Pik süt verimleri

FGF21 geni 1. ekzon bölgesi bölgesi için belirlenen polimorfik bölgelerinin pik gün verimi; pik süt verimi ve ortalama pik süt verimleri üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($P > 0.05$).

Esmer sığır ırkının *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi için pik gün verimi; pik süt verimi ve ortalama pik süt verimleri genel ortalamaları sırasıyla $61,7 \pm 44,7$ gün; $816,8 \pm 671,6$ kg ve $16,3 \pm 6,2$ kg olarak belirlenmiştir.

Pik süt verimi ortalamaları g.55834828. C/G polimorfik bölgesi CC genotipi $730,2 \pm 186,2$ kg ve GG genotipi için $756,5 \pm 207,4$ kg olarak belirlenmiştir.



Çizelge 4.21. FGF21 1.ekzon bölgesi farklı verim özellikleri bakımından en küçük kareler ortalaması ve standart hataları

Varyasyon Kaynakları		N	Laktasyon süt verimi	Günlük süt verimi	305 günlük sütverimi	Sağım süresi	Pik Gün Verimi	Pik Süt Verimi	Ort. Pik Süt Verimi
			$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
g.55834828 C/G	CC	18	4286,7±646,1	17,9±1,1	5113,5±339,9	238,8±35,5	48,2±12,0	730,2±186,2	18,7±1,3
	GG	15	3918,2±7	16,9±1,2	5006,3±378,7	239,0±39,6	58,8±13,4	756,5±207,4	17,6±1,4
Buzağılama Mevsimi	ilkbahar	2	3415,6±1553,0	17,7±2,6	5324,1±817,1	201,7±85,4	80,1±28,9	1181,7±447,4	22,2±3,1
	Kış	18	4262,1±613,4	17,7±1,0	4985,9±322,8	246,2±33,8	61,0±11,4	934,4±176,7	17,0±1,2
	sonbahar	11	3450,1±724,1	14,3±1,2	4069,6±381,0	250,9±39,8	65,9±13,5	776,9±208,6	13,9±1,4
	Yaz	2	5282,1±1519,0	20,0±2,5	5859,9±799,2	256,9±83,6	7,0±28,3	80,3±437,6	19,3±3,0
Aşıma açık gün	30-100	7	3135,3±1129,8	20,4±1,9	5186,5±594,4	142,5±62,2	19,1±21,1	626,7±325,5	24,6±2,2
	101-130	8	3665,1±1065,0	15,9±1,8	4877,8±560,3	229,1±58,6	62,2±19,8	404,0±306,8	10,65±2,1
	131-160	6	3070,9±1117,9	18,6±1,8	5260,3±588,2	163,9±61,5	29,1±20,8	365,5±322,1	19,3±2,2
	161-200	6	5268,55±958,2	16,0±1,6	4997,7±504,1	322,5±52,7	43,3±17,9	712,3±276,1	17,7±1,9
	200 üzeri	6	5372,4±1307,2	16,1±2,2	4976,9±687,8	336,6±71,9	113,8±24,4	1608,3±376,7	18,3±2,6
Laktasyon sırası	1	10	4050,9±993,1	17,4±1,6	5126,6±522,5	234,0±54,6	48,0±18,5	751,1±286,1	18,0±2,0
	2	23	4154,0±810,0	17,5±1,3	4993,1±426,2	243,9±44,6	59,0±15,1	735,5±233,4	18,2±1,6
Toplam		33	398,17±2081,2	16,8±3,7	4725,3±1064,8	244,2±119,6	61,7±44,7	816,8±671,6	16,3±6,2

Çalışma materyalini oluşturan Esmer ırkı sığırlara ait sadece süt verim kaynakları bulunduğundan *FGF21* geni ile ilişkilendirme analizleri sadece süt verim kayıtlarına uygulanmıştır. Süt verim kayıtları ve polimorfik bölgeler arasında istatistiksel olarak ilişki bulunamamıştır. Sığırlarda daha önce yapılmış çalışmalarda *FGF21* geni için verimle ilişkilendirme analizleri yapılmadığından dolayı literatür karşılaştırılması yapılamamıştır.

4.4.4. *BMP2* geni verimle ilişkilendirme analizi sonuçları

Esmer sığır ırklarında *BMP2* geni için süt verim kayıtları ile ilişkilendirme analizlerinde *BMP2* geni 2. ekzon bölgesinde tanımlanmış g.49551963. T/C polimorfizmi için yeterli sayıda verim kaydı bulunmaması nedeniyle istatistiksel analizler yapılamamıştır.

Esmer sığına ait gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, günlük süt verimi, sağım süresi, pik süt verimi, pik gün verimi ve ortalama pik süt verim kayıtları ile *BMP2* geni 3. ekzon-2.bölgesi için tanımlanmış polimorfik bölgeleri arasında ilişkilendirme analizleri sonucu polimorfik bölgelerin varyasyon kaynakları üzerine etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P>0.05$) belirlenmiştir.

Varyasyon kaynakları ile ilişkilendirme analizi sonuçları Çizelge 4.22’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. BMP2 geni 3.ekzon-2. bölgesi farklı performans özelliklerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
Laktasyon Süt Verimi (Gerçek Süt Verimi)					
49551337 G/A	1	894904,571	1,204	,288	Ö.S.
49551405 G/T	1	894904,571	1,204	,288	Ö.S.
49551428 G/C	1	137229,588	,185	,673	Ö.S.
49551433 A/C	1	364455,551	,490	,493	Ö.S.
49551449 T/G	1	586078,899	,789	,387	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	10496439,021	14,125	,000	**
Laktasyon sırası	1	3650,334	,005	,945	Ö.S.
Aşıma açık gün sayısı	4	1566742,546	2,108	,124	Ö.S.
Hata	17	743095,549			
Günlük Süt Verimi					
49551337 G/A	1	5,597	,403	,534	Ö.S.
49551405 G/T	1	5,597	,403	,534	Ö.S.
49551428 G/C	1	,051	,004	,953	Ö.S.
49551433 A/C	1	5,392	,388	,542	Ö.S.
49551449 T/G	1	2,848	,205	,657	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	11,546	,831	,495	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	33,276	2,394	,140	Ö.S.
Aşıma açık gün sayısı	4	40,269	2,898	,054	Ö.S.
Hata	17	13,898			
305 Günlük Süt Verimi					
49551337 G/A	1	1765,468	,001	,974	Ö.S.
49551405 G/T	1	1765,468	,001	,974	Ö.S.
49551428 G/C	1	283244,901	,181	,676	Ö.S.
49551433 A/C	1	5967,547	,004	,951	Ö.S.
49551449 T/G	1	603189,751	,386	,543	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	1991893,223	1,273	,315	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	3188260,488	2,038	,172	Ö.S.
Aşıma açık gün sayısı	4	1521234,544	,972	,448	Ö.S.
Hata	17	1564286,060			

Ö.S.; önemsiz, ** P<0.001, * P<0.05

Çizelge 4.22. (devam)

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
Sağım Süresi					
49551337 G/A	1	7739,174	2,649	,122	Ö.S.
49551405 G/T	1	7739,174	2,649	,122	Ö.S.
49551428 G/C	1	1165,345	,399	,536	Ö.S.
49551433 A/C	1	2685,700	,919	,351	Ö.S.
49551449 T/G	1	237,210	,081	,779	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	29111,994	9,964	,001	**
Laktasyon sırası	1	7894,550	2,702	,119	Ö.S.
Aşıma açık gün sayısı	4	19546,480	6,690	,002	**
Hata	17	2921,813			
Toplam	30				
Pik Gün Verimi					
49551337 G/A	1	3108,799	2,140	,162	Ö.S.
49551405 G/T	1	3108,799	2,140	,162	Ö.S.
49551428 G/C	1	137,614	,095	,762	Ö.S.
49551433 A/C	1	408,997	,281	,603	Ö.S.
49551449 T/G	1	146,965	,101	,754	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	489,066	,337	,799	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	3674,857	2,529	,130	Ö.S.
Aşıma açık gün sayısı	4	1856,105	1,277	,318	Ö.S.
Hata	17	1452,931			
Pik Süt Verimi					
49551337 G/A	1	829354,276	5,538	,031	*
49551405 G/T	1	829354,276	5,538	,031	*
49551428 G/C	1	23042,010	,154	,700	Ö.S.
49551433 A/C	1	38365,395	,256	,619	Ö.S.
49551449 T/G	1	54,744	,000	,985	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	78345,463	,523	,672	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	4672217,964	31,200	,000	**
Aşıma açık gün sayısı	4	198018,397	1,322	,302	Ö.S.
Hata	17	149748,316			

Ö.S.; önemsiz, ** P<0.001, * P<0.05

Çizelge 4.22. (devam)

Varyasyon Kaynakları	SD	Kareler Ort.	F	P	Ö.D
Ortalama Pik Süt Verimi					
49551337 G/A	1	,126	,003	,958	Ö.S.
49551405 G/T	1	,126	,003	,958	Ö.S.
49551428 G/C	1	57,558	1,296	,271	Ö.S.
49551433 A/C	1	25,696	,579	,457	Ö.S.
49551449 T/G	1	1,453	,033	,859	Ö.S.
Buzağılama Mevsimi	3	61,082	1,375	,284	Ö.S.
Laktasyon sırası	1	96,133	2,165	,159	Ö.S.
Aşıma açık gün sayısı	4	72,330	1,629	,213	Ö.S.
Hata	17	44,413			
Toplam	30				

Ö.S.; önemsiz, ** P<0.001, * P<0.05

4.4.4.a. Gerçek süt verimi (Laktasyon süt verimi)

BMP2 geni 3.ekzon bölgesi için belirlenmiş polimorfik bölgeler, laktasyon sırası, buzağılama mevsimi ve aşıma açık gün sayısı faktörlerinin günlük süt verimi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$).

BMP2 geni 3.ekzon bölgesi için hesaplanmış 30 baş esmer sığına ait gerçek süt verimi ortalamaları ve ortalamaların standart hataları Çizelge 4.22’de gösterilmiştir. Esmer ırkı için gerçek süt verimi genel ortalaması $4073,24 \pm 402,56$ kg olarak belirlenmiştir. Analizler sonucu *BMP2* geni 3.ekzon 2. bölgesinde tanımlanmış polimorfik bölgeler arasında g.49551337 G/A ve g.49551405 G/T polimorfik bölgelerinin aynı örneklerde homozigot ve heterozigot birey sayıları benzer olması nedeniyle varyans analiz sonuçları, en küçük kareler ortalamaları ve standart hata değerlerinin aynı olduğu belirlenmiştir.

BMP2 geni 3.ekzon 2. bölgesinde tanımlanmış polimorfik bölgeler içerisinde en yüksek ve en düşük laktasyon süt verimi ortalaması g.49551337 G/A ve g.49551405 G/T polimorfik bölgeleri içerisinde sırasıyla GG-TT ve GA-GT genotiplerinde $3611,81 \pm 715,86$ kg ve $4534,66 \pm 406,50$ kg olarak bulunmuştur. En yüksek gerçek süt verimi ortalamasının görüldüğü ilkbahar mevsimi ortalaması ile kış ($3676,76 \pm 488,79$ kg),

yaz (2756,11±639,98 kg) ve sonbahar ortalaması (2964,967±461,157 kg) arasındaki farklar istatistiksel olarak çok önemli olup ($P<0.001$) ilkbahar mevsiminde laktasyon süt veriminin daha yüksek olduğu görülmüştür.

4.4.4.b. 305 günlük süt verimi

BMP2 geni 3.ekzon bölgesi için belirlenmiş polimorfik bölgelerin 305 günlük süt verimi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$).

BMP2 geni 3.ekzon bölgesi 305 günlük süt verimi genel ortalaması 4783,72±584,08 kg olarak tespit edilmiştir. *BMP2* geni 3.ekzon bölgesi için g.49551337 G/A ve g.49551405 G/T polimorfizmleri; GA ve GT genotipleri 4763,23±589,78 kg, GG ve TT genotipleri için 4804,21±1038,64 kg, g.49551428 G/C; GC genotipi 5046,80±677,28 kg, GG genotipi 4520,65±993,99 kg, g.49551433 A/C; AA genotipi 4743,46±833,41 kg, AC genotipi 4823,98±915,13 kg ve g.49551449. T/G; TG genotipi 4483,51±842,79 kg, TT genotipi 5083,93±662,90 kg olarak tespit edilmiştir. Farklı varyasyon kaynaklarının 305 günlük süt verimi en küçük ortalamaları standart hataları çizelgede verilmiştir.

4.4.4.c. Günlük süt verimi

BMP2 geni 3.ekzon için belirlemiş olduğumuz polimorfik bölgeler, laktasyon sırası, buzağılama mevsimi ve aşımaya açık gün sayısı faktörlerinin günlük süt verimi üzerine etkisinin analizi sonucu varyasyon kaynaklarının etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P>0.05$) görülmüştür (Çizelge 4.21).

Günlük süt verimi genel ortalaması 17,12±1,74 kg olarak tespit edilmiştir. Günlük süt verimi ortalamaları polimorfik bölgeler için g.49551337 G/A ve g.49551405 G/T polimorfizmleri; GA ve GT genotipleri 15,97±1,76 kg, GG ve TT genotipleri için 18,28±3,10 kg, g.49551428 G/C; GC genotipi 17,23±2,02 kg, GG genotipi 17,01±2,96 kg, g.49551433 A/C; AA genotipi 15,91±2,48 kg, AC genotipi 18,33±2,73 kg ve

g.49551449. T/G; TG genotipi $16,47 \pm 2,51$ kg, TT genotipi $17,77 \pm 1,98$ kg olarak belirlenmiştir.

4.4.4.d. Laktasyon süresi (Sağım süresi)

BMP2 geni 3.ekzon bölgesi için belirlemiş olduğumuz polimorfik bölgelerin laktasyon süresi üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$). 30 baş Esmer ineğin genel laktasyon süresi ortalaması $243,89 \pm 25,24$ gün olarak belirlenmiştir.

BMP2 geni 3.ekzon bölgesi g.49551337 G/A, g.49551405 G/T, g.49551428 G/C, g.49551433 A/C ve g.49551449 T/G polimorfik bölgeleri içerisinde en yüksek ve en düşük laktasyon süresi ortalaması g.49551337 G/A ve g.49551405 G/T polimorfik bölgelerinde görülmüş en yüksek laktasyon süresi GA ve GT genotipleri için $286,80 \pm 25,49$ gün ve en düşük laktasyon süresi ortalaması GG ve TT genotipleri için $200,98 \pm 44,89$ olarak belirlenmiştir.

4.4.4.e. Pik süt verimleri

BMP2 3.ekzon bölgesi için tespit edilmiş g.49551337 G/A, g.49551405 G/T, g.49551428 G/C, g.49551433 A/C ve g.49551449 T/G polimorfik bölgelerin, pik gün verimi ve ortalama pik süt verimleri genel ortalamaları üzerine etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0.05$).

Esmer sığır ırkının pik gün verimi; pik süt verimi ve ortalama pik süt verimleri genel ortalamaları sırasıyla $45,47 \pm 17,80$ gün, $513,90 \pm 180,71$ kg ve $15,55 \pm 3,11$ kg olarak belirlenmiştir.

BMP2 3.ekzon bölgesi polimorfik bölgeler içerisinde en yüksek pik gün verimi g.49551337 G/A ve g.49551405 G/T polimorfik bölgeleri GA ve GT genotipleri için $72,67 \pm 17,97$ gün görülürken en düşük pik gün verimi GG ve TT genotipli bireylerde

18,28±31,65 gün görülmüş ortalamalar arasındaki yaklaşık 53 gün farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($P>0,05$).

Pik süt verimi ortalaması en yüksek değeri g.49551337 G/A ve g.49551405 G/T polimorfik bölgeleri GA ve GT genotiplerinde 958,11±182,48 kg görülürken en düşük pik gün verimi aynı polimorfik bölgelerin GG ve TT genotipli bireylerinde 69,70±321,36 kg olarak görülmüş ve g.49551337 G/A ve g.49551405 G/T polimorfik bölgelerin 30 baş esmer sığır ırkında hesaplanmış pik süt verim değerleri üzerine etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Birinci laktasyondaki hayvanlarda pik süt verimi ortalamaları (1081,88±207,44 kg) ikinci laktasyondaki hayvanlara göre (-54,08±207,28 kg) daha yüksektir. Laktasyon süreleri arasındaki yaklaşık 1135,96±30,2 kg fark istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuş ve laktasyon sürelerinin pik süt verimi ortalaması üzerindeki etkisinin çok önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$).

BMP2 geni 3. ekzon bölgesi ortalama pik süt verimi değerleri g.49551428 G/C polimorfik bölgesi GC genotip (11,80±3,61 kg) GG alleleline (19,30±5,30 kg) oranla daha düşük ortalamaya sahip olduğu, ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak ortalama pik süt verimi değerleri üzerinde etkili olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

30 baş esmer sığına ait diğer varyasyon kaynaklarının süt verimi ortalamaları ve ortalamaların standart hataları Çizelge 4.23’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.23. BMP2 3.ekzon-2. bölgesi farklı verim özellikleri bakımından en küçük kareler ortalaması ve standart hataları

Varyasyon Kaynakları		N	Laktasyon süt verimi	Günlük süt verimi	305 günlük sütverimi	Sağım süresi	Pik Gün Verimi	Pik Süt Verimi	Ort. Pik Süt Verimi
			$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
49551337 G/A	GA	27	4534,66±406,50	15,97±1,76	4763,23±589,78	286,80±25,49	72,67±17,97	958,11±182,48	15,72±3,14
	GG	3	3611,81±715,86	18,28±3,10	4804,21±1038,64	200,98±44,89	18,28±31,65	69,70±321,36	15,37±5,53
49551405 G/T	GG	3	3611,81±715,86	18,28±3,10	4804,21±1038,64	200,98±44,89	18,28±31,65	69,70±321,36	15,37±5,53
	GT	27	4534,66±406,50	15,97±1,76	4763,23±589,78	286,80±25,49	72,67±17,97	958,11±182,48	15,72±3,14
49551428 G/C	GC	26	3890,12±466,80	17,23±2,02	5046,80±677,28	260,76±29,27	51,27±20,64	438,87±209,55	11,80±3,61
	GG	4	4256,35±685,09	17,01±2,96	4520,65±993,99	227,01±42,96	39,67±30,29	588,94±307,54	19,30±5,30
49551433 A/C	AA	6	3758,61±574,41	15,91±2,48	4743,46±833,41	270,90±36,02	56,01±25,40	411,82±257,86	12,90±4,44
	AC	24	4387,86±630,73	18,33±2,73	4823,98±915,13	216,88±39,55	34,93±27,89	615,98±283,14	18,19±4,88
49551449 T/G	TG	23	3777,32±580,88	16,47±2,51	4483,51±842,79	237,94±36,42	50,16±25,69	516,76±260,76	16,01±4,49
	TT	7	4369,16±456,89	17,77±1,98	5083,93±662,90	249,84±28,65	40,79±20,20	511,04±205,10	15,08±3,53
Buzağılama Mevsimi	ilkbahar	5	6492,16±741,27	20,72±3,21	6338,66±1075,50	321,45±46,48	21,85±32,78	632,38±332,76	23,17±5,73
	kış	9	2379,98±448,28	17,85±1,94	4680,57±650,41	130,32±28,11	39,61±19,82	704,82±201,24	17,44±3,47
	sonbahar	15	3250,07±361,69	17,23±1,56	4520,45±524,77	197,19±22,68	51,77±15,99	594,28±162,36	16,86±2,80
	yaz	1	4170,74±966,35	12,69±4,18	3595,21±1402,07	326,60±60,60	68,66±42,73	124,14±433,80	4,72±7,47
Laktasyon sırası	1	11	4089,11±462,09	18,64±2,00	5252,91±670,44	220,54±28,98	61,40±20,43	1081,88±207,44	18,12±3,57
	2	19	4057,36±461,74	15,61±2,00	4314,53±669,94	267,24±28,95	29,54±20,42	-54,08±207,28	12,97±3,57
Aşıma açık gün	40-75	6	3790,46±643,81	19,18±2,78	5501,07±934,10	194,12±40,37	63,60±28,47	931,63±289,01	18,44±4,98
	75-115	6	3728,51±583,62	21,78±2,52	5474,43±846,77	161,53±36,60	14,16±25,81	452,59±261,99	21,10±4,51
	116-145	6	5011,31±623,23	17,00±2,70	5130,86±904,24	306,59±39,08	51,45±27,56	508,90±279,77	12,40±4,82
	146-200	6	4171,21±558,62	12,67±2,42	3645,77±810,50	306,80±35,03	51,71±24,70	220,43±250,77	11,39±4,32
	200 üstü	6	3664,69±524,94	14,97±2,27	4166,47±761,64	250,40±32,92	46,44±23,21	455,97±235,65	14,40±4,06
Toplam		30	4073,24±402,56	17,12±1,74	4783,72±584,08	243,89±25,24	45,47±17,80	513,90±180,71	15,55±3,11

Özellikle kemiklerin gelişmesi üzerinde etkili olduğu bilinen *BMP2* geninin büyüme verileri ile ilişkilendirilmesi gerekmektedir. Sığırlarda daha önce yapılmış çalışmalarda *BMP2* geni için verimle ilişkilendirme çalışmaları yapılmadığı için literatür karşılaştırılması yapılamamıştır.

Varyans analiz testleri *ELF5*, *FGF21* ve *BMP2* genleri için tanımlanmış polimorfik bölgelerin varyasyon kaynakları üzerindeki etkileri tek tek analiz edilmiş ve yine aynı sonuçlar elde edilmiştir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda farklı ırklar üzerinde, verim kayıtları yüksek ve daha fazla hayvan sayısı ile yapılacak verimle ilişkilendirme çalışmaları ile polimorfik bölgelerin süt verimi üzerine etkilerinin ölçülmesi önerilmektedir.

5. SONUÇ

Çeşitli verim özellikleri ile yaşamın her anında gereksinim duyulan çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde değişen ekonomik koşullar ve giderek artan küreselleşme hızı ile tüm dünyada, verim özellikleri yönünden çok yönlü ve daha verimli ırklar elde etme yönüne doğru gidilmektedir. Çiftlik hayvanlarında üretim potansiyelini artırma, verim kalitesini yükseltme ve artan dünya nüfusuna karşı hayvansal potansiyeli artırma amacıyla bilim insanları yeni genetik markırlar, biyobelirteçler ve moleküler analiz yöntemlerini geliştirmek için çalışmalar yapmaktadırlar.

Bu çalışmada, sığırlarda verim özelliklerini etkileyen *ELF5* (E74-Like Faktör 5; Epitel-Spesifik ETS Faktör 5), *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein2; Kemik mineral yoğunluk proteini 2) ve *FGF21* (Fibroblast Growth Factor 21; Fibroblast Büyüme Faktör 21) genleri üzerinde yeni moleküler markır polimorfizmlerini belirlemek amaçlanmıştır. Materyal olarak verim kayıtları mevcut ve birbirleriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan 96 adet Esmer ırkı sığırdan kan numuneleri alınarak herbir bireye ait DNA örneği kullanılmıştır. Herbir gen bölgesine ait tanımlanan bölgelerin PCR analizleri sonrasında yüksek çözünürlüklü erime analizi (HRM) yöntemi ile örnekler kümelere ayrılmış, her kümedeki örneklerin bazılarına sekans analizleri uygulanmıştır. Sekans analizleri sonucunda belirlenen genler ve gen bölgelerinde yeni polimorfizmler tanımlanmış ve tanımlanan bu polimorfizmler ile mevcut verim kayıtları arasında ilişkilendirme analizleri yapılmıştır.

Mutasyon ve SNP taramalarında yaygın olarak kullanılan yüksek çözünürlüklü erime analizinin (HRMA) yöntemi ile sığır ırklarında farklı verim özellikleri ile ilişkili olduğu belirlenmiş *ELF5*, *FGF21* ve *BMP2* genlerinin HRM profillerini belirlemek amacıyla Esmer ırkı 96 adet DNA örnekleri EvaGreen interkalasyon boyası kullanılarak kapalı tüp ortamında HRM-PCR'ları gerçekleştirilmiştir. HRM-PCR analizi yapılmış 96 adet Esmer ırkına ait DNA örneğinin kümelendirme analizi sonucu örnekler erime eğrileri farklılığına göre kümelere ayrılmıştır. ScreenClust HRM yazılım programı üzerinden değerlendirilen

veriler üç boyutlu temel bileşenler analizine (principal component; PCA) göre her bir bölge için farklı kümelerde toplanmıştır.

Esmer ırkı 96 adet DNA örneği ile HRM-PCR analizleri yapılmış *FGF21* geninin 1.ekzon bölgesini içeren 338 bp'lik 2.ekzon bölgesinin 416 bp ve 3.ekzonu kapsayan 256 bp'lik DNA gen bölgeleri için farklı erime eğrisi grafikleri elde edilmiştir. Kullanılan 96 Esmer ırkı PCR numuneleri *FGF21* 1. ekzon bölgesi için 6 küme, 2. ekzon bölgesi 8 küme ve *FGF21* 3. ekzon bölgesi 6 kümede toplanmıştır.

Kemiklerin büyümesinde ve farklılaşmasında rol oynayan BMP 2 geni için Esmer ırkı 96 adet DNA örneklerine HRM-PCR analizi yapılmış ve örnekler üç boyutlu temel bileşenler analizine göre her bir bölgede farklı sayıda olmak üzere *BMP2* 2. ekzon bölgesi için 5 küme, *BMP2* 3. ekzon bölgesini kapsayan 1.bölgesi; 6 küme ve 2.bölgesi için örnekler 5 farklı kümede gruplandırılmıştır.

Farklı ekzon bölgeleri içeren *ELF5* geni için 96 baş Esmer sığına ait HRM-PCR örneklerinin üç boyutlu temel bileşenler analizine göre *ELF5* 2. intron bölgesinde örnekler 8 küme, *ELF5* 5. ekzon için 6 kümede ve *ELF5* 6. ekzon bölgesi için 5 farklı kümede örnekler toplanmıştır.

Daha önce yapılmış çalışmalarda yüksek hassasiyette sonuçlar vermiş HRM-PCR analizininin çalışmamızda 500 bp'den büyük PCR ürünleri için HRM-PCR hassasiyetinin düştüğü görülmüştür.

Esmer ırkında *ELF5*, *FGF21* ve *BMP2* gen bölgelerinde polimorfizm gösteren bölgeleri tespit etmek amacıyla HRM-PCR analizi sonucu kümelere ayrılmış DNA örneklerden bazılarına DNA dizi analizi yapılmış ve MEGA7.0, BioEdit yazılım programları kullanılarak polimorfik bölgeler tespit edilmiştir.

Analizler sonucu Esmer ırkı sığıda *ELF5* geni 2. intron bölgesi için g.65825359 C/T, g.65825499 G/A ve g.65825371 A delesyonları tespit edilmiştir.

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi için yapılmış sekans analizleri sonucu g.65825909 T/C, g.65826062 G/A, g.65826123 A/C, g.65826134 C/T ve g. 65826138 T/C olmak üzere 5 farklı polimorfik bölge tanımlanmıştır.

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi için belirlenmiş bazların DNA dizi değişimleri sonucu g.65825861 T>C transisyonu GCT-GCC kodon farklılaşması ile Alanin782-Alanin (Ala782Ala), g.65826062 G>A transisyonu GGG-GGA Glisin833-Glisin (Gly833Gly) ve g.65826134 C>T transisyonu sonucu CAC-CAT Histidin857-Histidin (His857His), g.65826123 A>C transversiyonu sonucu AGC-CGC Serin854-Arjinin (Ser854Arg) ve g. 65826138 T>C transisyonu ile TGG-CGG Triptofan859-Arjinin (Trp859Arg) amino asit değişimleri gerçekleşmiştir.

338 baz çifti uzunluğundaki *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi için g.55834828 C/G polimorfik bölgesi tanımlanmış ve 20 mutant baz belirlenmiştir. g.55834828 C/G transversiyonel baz değişimi sonucu CAC-CTG kodon farklılaşmasına neden olarak Histidin400-Lösin (His400Leu) amino asit değişimlerine neden olmuştur.

256 baz uzunluğundaki *FGF21* 3. ekzon bölgesinde g.55836088 G/T ve g.55836007 C/A polimorfizmleri belirlenmiştir. Bu baz değişimlerinin kodon dizi analizi sonuçlarına göre g.55836007 C>A transversiyonu CGG-AGG kodon değişimine neden olmuş ve Arjinin793-Arjinin (Arg793Arg) değişimi; g.55836088 G>T transversiyonu sonucu GTA-TTA Valin-Lösin (Val820Leu) amino asit değişimlerine neden olduğu tespit edilmiştir.

BMP2 geni 2. ekzon g.49551963 T/C polimorfizmi görülmüştür. g.49551963 T>C transisyonu TTT-TC? sonucu fenilalanin638-bilinmeyen Xaa amino asidine (Phe638Xaa) dönüştüğü belirlenmiştir.

BMP2 geni 3. ekzon-1. bölgesini içeren 467 baz uzunluğundaki *BMP2* geni için g.49551337 G/A, g.49551405 G/T, g.49551428 G/C, g.49551433 A/C ve g.49551449 T/G polimorfik bölge olarak tanımlanmıştır.

BMP2 geni 3. ekzon-1. bölgesi bölgesi için tanımlanmış polimorfik bazlar kodon değişimlerine neden olarak farklı amino asitlerin kodlanmasına neden olmuştur. Tanımlanmış polimorfik bazlar, kodon değişimleri ve amino asit farklılıkları sırasıyla g.49551337 G/A transisyonu ACG-ACA sonucu threonin3429-threonin (Thr3429Thr) ve g.49551433 amino asit değişimi, A>C CCA-CCC prolin3461-prolin (Pro3461Pro), g.49551405 G/T AGT-ATT serin- izolösin (Ser3452Ile), g.49551428 G/C GCC-CCC prolin-alanin (Pro3460Ala), ve g.49551449 T>G transversiyonları sonucu TGG-GGG triptofan3467-glisin (Trp3467Gly) amino asit değişimleri belirlenmiştir.

Esmer ırkı sığırdada farklı genlerde belirlemiş olduğumuz polimorfik bölgeler ile *Bos taurus* türlerinde çalışmamızda kullandığımız genler ve bölgeleri için tanımlanmış SNP benzerliklerini karşılaştırmak amacıyla NCBI dbSNP veri tabanında sunulmuş SNP'ler kontrol edilmiştir. Analizler sonucu Esmer ırkı sığırdada belirlenen *ELF5* 5. ekzon bölgesi g.65826134 C>T polimorfizmi ID-15:g65826134 C>T (RefSNP-rs444548435) ve *BMP2* geni 3. ekzon bölgesi için tanımlanmış olduğumuz g.49551405 G/T SNP bölgesi dbSNP veri tabanında ID-Chr13:g.49551407 (RefSNP-rs470388497) bölgesinde G>T SNP'leri daha önce tanımlanmıştır. *ELF5* 5.ekzon bölgesi g.65826134 C>T polimorfizmi ve *BMP2* geni 3. ekzon bölgesinde belirlemiş olduğumuz g.49551405 G/T polimorfik bölgelerin doğruluğu kesinleşmiştir. Diğer genler ve gen bölgeleri için benzer SNP'ler tanımlanmadığı görülmüş ve belirlemiş olduğumuz diğer polimorfik bölgeler ilk defa çalışmamızda ortaya konmuştur.

Polimorfik bölgeler baz alınarak genom dizi analizi yaptığımız Esmer ırkı süt sığırlarında süt verim kayıtları ve döl verim kayıtları tutulmuş 35 baş sığıra ait gerçek süt verimi, günlük süt verimi, 305 günlük süt verimi, laktasyon süreleri, pik süt verimi, ortalama pik süt verimi, günlük pik verim kayıtları hesaplanmıştır. Elde edilen verilerin analizinde Genel Linear Model (Harvey 1990) esas alınarak istatistiksel analizleri yapılmıştır.

ELF5 geninin 2. intron bölgesi için tanımlanmış polimorfik bölgelerin süt verimi ile ilişkilendirildiği varyans analizi sonuçlarına göre g.65825371 -/A polimorfik bölgesi ile gerçek süt verimi (laktasyon süt verimi) ve pik süt verimi arasında istatistiksel olarak

anlamli ilişki bulunmuştur ($P<0.05$), g.65825359 C/T polimorfizmi ile pik gün verim değerleri arasında anlamli ilişki olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$).

ELF5 geni 5. ekzon bölgesi DNA sekans analizleri sonucu tanımlanmış g.65825909 T/C, g.65826062 G/A, g.65826123 A/C, g.65826134 C/T ve g.65826138 T/C polimorfik bölgeler ile gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, günlük süt verimi, sağım süresi, pik süt verimi, ortalama pik süt verimi ve pik gün verimleri arasında istatistiksel olarak anlamli ilişki bulunamamıştır ($P>0.05$).

Esmer sığır ırklarında *FGF21* geni üzerine yapılan süt verim kayıtları ile ilişkilendirme analizlerinde 256 baz uzunluğundaki *FGF21* 3. ekzon bölgesi için belirlemiş olduğumuz g.55836088 G/T ve g.55836007 C/A polimorfizmleri için yeterli sayıda verim kaydı bulunmadığı için istatistiksel analizleri yapılamamıştır.

Esmer sığırllara ait gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, günlük süt verimi, sağım süresi, pik süt verimi, pik gün verimi ve ortalama pik süt verim kayıtları zerine, *FGF21* geni 1. ekzon bölgesi için tespit edilmiş g.55834828 C/G polimorfik bölgesinin istatistiksel olarak anlamli etkisinin olmadığı grlmştır ($P>0.05$).

Esmer sığır ırklarında *BMP2* geni için süt verim kayıtları ile ilişkilendirme analizlerinde *BMP2* geni 2. ekzon bölgesinde g.49551963 T/C polimorfizmi için yeterli sayıda verim kaydı bulunmadığından dolayı istatistiksel analizleri yapılamamıştır.

Esmer sığırllara ait gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, günlük süt verimi, sağım süresi, pik süt verimi, pik gün verimi ve ortalama pik süt verim kayıtları zerine *BMP2* geni 3. ekzon bölgesi üzerindeki g.49551337 G/A, g.49551405 G/T, g.49551428 G/C, g.49551433, A/C ve g.49551449 T/G polimorfik bölgelerinin etkileri istatistiksel olarak anlamli bulunamamıştır.

Özellikle kemiklerin gelişmesi üzerinde etkili olduğu bilinen *BMP2* geninin büyüme verileri ile ilişkilendirilmesi gerekmektedir. Sığırllarda daha önce yapılmış çalışmalarda

BMP2 geni için verimle ilişkilendirilme çalışmaları yapılmadığı için süt verimi ile literatür karşılaştırması yapılamamıştır.

Esmer ırkı sığırlarda verim özelliklerini etkileyen *ELF5* (E74-Like Faktör 5; Epitel-Spesifik ETS Faktör 5), *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein 2; Kemik mineral yoğunluk proteini 2) ve *FGF21* (Fibroblast Growth Factor 21; Fibroblast Büyüme Faktör 21) genleri için yeni polimorfizmler tanımlanmıştır. Materyal olarak kullanmış olduğumuz Esmer ırkı sığırına ait DNA örnekleri için PCR analizleri yapılmış ve yüksek çözünürlüklü erime analizi (HRMA) yöntemi ile ilk defa HRM profilleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak *ELF5* geni 2. intron bölgesinde 3, 5. ekzon bölgesi için 5 farklı polimorfik bölge, *FGF21* geni 1. ekzon bölgesinde 1, 3. ekzon bölgesinde 2 farklı polimorfizm bölgesi, *BMP2* geni 2.ekzon bölgesi için 1, 3.ekzon-1.bölgesinde 5 farklı polimorfik bölge olmak üzere toplam 17 polimorfik bölge mevcut çalışmada ortaya konmuştur. Tespit edilen polimorfik bölgelerden sadece iki tanesi daha önce yapılmış çalışmalarda bildirilirken, diğer polimorfik bölgeler ilk defa çalışmamızda tanımlanmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada süt verim kayıtlarına ait örnek sayısının az olması, araştırma materyalini oluşturan Esmer sığır sürüsünün yeni olması, farklı verim kayıtlarının tutulmamış olması ve sadece süt verimlerine ilişkin kayıtlar bulunması nedeniyle ilgili polimorfik bölgeler ile süt verimleri arasında ilişki elde edilememiştir.

İlişkilendirme analizleri sonucu belirlemiş olduğumuz polimorfik bölgeler ile sadece süt verim kayıtları arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Hayvan ıslahı alanında yapılacak çalışmalarda, belirlenen polimorfik bölgelerin farklı ırklar üzerinde ve farklı performans özellikleriyle etkilerinin incelenmesi ve ıslah programlarında markır olabilme özelliklerinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abramo, M., Castellazzi, C.L., Orozco, M. and Amadei, A., 2013. On the Nature of DNA Hyperchromic Effect. *J. Phys. Chem. B*, 117, 8697–8704dx.doi.org/10.1021/jp403369.
- Adams, J.U., 2008. Complex Genomes: Shotgun Sequencing. *Nature Education*, 1(1):186
- Anonim, 2014a. <http://www.turkbesi.com/montofon-esmer-irk-brown-swiss-sigiri.html>
- Anonim, 2016b. <http://veteriner48.tr.gg/MONTOFON.htm>
- Anonim, 2016c. <http://www.tuik.gov.tr>
- Anonymous, 2017a. “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>”
- Anonymous, 2017b. “<http://www.omim.org/entry>”
- Anonymous, 2017c. “<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>”
- Anonymous, 2017d. “http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary”
- Attisano, L., Wrana, J.L., 2002. Signal transduction by the TGF beta superfamily. *Science* 296(5573):1646–1647
- Briggs, H.M. and Briggs, D.M., 1980. *Modern Breeds of Livestock*. Fourth Edition. Macmillan Publishing Co. 1980
- Botchkarev, V.A. and Sharov, A.A., 2004. BMP signaling in the control of skin development and hair follicle growth. *Differ Res Biol Divers*, 72(9–10):512–526
- Bozkaya, G. Ö., 2009. Mutation and Polymorphism for Clinicians: Medical Education, *Turkiye Klinikleri J Pediatr*;18(2):47-53
- Buchvarov, I., Wang, Q., Raytchev, M., Trifonov, A., Fiebig, T., 2007. Electronic Energy Delocalization and Dissipation in Single- And Double-Stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 4794– 4797.
- Chen, Y., Whetstone, H.C., Youn, A., Nadesan, P., Chow, C.Y., Lin, A.C. and Alman, B.A., 2006. β -Catenin Signaling Pathway Is Crucial for Bone Morphogenetic Protein 2 to Induce New Bone Formation. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 282, No. 1, pp. 526 –533
- Chin, K.Y., Majeed, S.A., Mohamed, N., and Nirwana, S. I., 2017. The Effects of Tocotrienol and Lovastatin Co-Supplementation on Bone Dynamic Histomorphometry and Bone Morphogenetic Protein-2 Expression in Rats with Estrogen Deficiency. *Nutrients*, 9, 143; doi:10.3390/nu9020143.
- Choi, Y.S. and Sinha, S., 2006. Determination of the consensus DNA-binding sequence and a transcriptional activation domain for ESE-2. *Biochem. J.* (398), 497–507 doi:10.1042/BJ20060375
- Chou, L.S., Lyon, E., Wittwer, C.T., 2005. A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model. *Am J Clin Pathol*; 124:330-8
- Church, G.M. and Gilbert W., 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 81, pp. 1991-1995
- Cohn, M.J., Carlos, J., Belmonte, I., Abud, H., Heath, S.J. K. and Tickle, C., 1995. Fibroblast Growth Factors Induce Additional Limb Development from the Flank of Chick Embryos. *Cell*, Vol. 80, 739-746

- Coskun, T., Bina, H.A., Schneider, M.A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., Moller, D. E. and Kharitononkov, A., et al, 2008. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149(12):6018–6027
- Cruise, B.A., Xu, P. and Hall, A.K., 2004. Wounds increase activin in skin and a vasoactive neuropeptide in sensory ganglia. *Dev Biol* 271(1):1–10
- Daetwyler, H.D., Capitan, A., Pausch, H., Stothard, P., van Binsbergen, R., Brondum, R.F., Liao, X., Djari, A., 2014. Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nat Genet.* 46(8):858-65. doi: 10.1038/ng.3034. Epub 2014 Jul 13.
- Daniels, R., Ndiaye, D., Wall, M., McKinney, J., Séne, P.D., Sabeti, P.C., *et al.*, 2012. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*; 56(6):2976-86. doi: 10.1128/AAC.05737
- Dawn, T.M. and Barrett, J.H., 2005. Genetic linkage studies. *The Lancet*, 366(9490), pp.1036-1044. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67424-7)
- Devaney, J.M., Tosi, L.L., Fritz, D.T., Gordish-Dressman, H.A., Jiang, S., Orkunoglu-Suer, F.E. *et al.*, 2009. Differences in Fat and Muscle Mass Associated With a Functional Human Polymorphism in a Post-Transcriptional *BMP2* Gene Regulatory Element. *J Cell Biochem.*; 107(6): 1073–1082. doi:10.1002/jcb.22209.
- Dobrowolski, S.F., Gray, J., Miller, T., Sears, M., 2009. Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high resolution melt profiling. *Hum Mutat* 30:891–898.
- Drogemuller, C, Distl O and Leeb T. 2001. Partial deletion of the bovine ED1 gene causes anhidrotic ectodermal dysplasia in cattle. *Genome-Res.* Oct; 11(10): 1699-705.
- Dushay, J.R., Toschi, E., Mitten, E.K., Fisher, F. M., Herman, M. A., Flier, E.M., 2014. Fructose ingestion acutely stimulates circulating *FGF21* levels in humans. *Molecular Metabolism* 51-57: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.008>
- Er, T.K. and Chang, J.G., 2012. High-resolution melting: Applications in genetic disorders *Clinica Chimica Acta* 414 (2012) 197–201
- Erali, M. and Wittwer, C. T., 2010. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* (50) 250–261
- Fan, B., Onteru, S.K., Du, Z.Q., Garrick, D. J., Stalder, K. J., Rothschild, M.F., 2011. Genome-Wide Association Study Identifies Loci for Body Composition and Structural Soundness Traits in Pigs. *PLoS ONE* 6(2): e14726. doi:10.1371/journal.pone.0014726
- Fang, X., Xu, H., Zhang, C., Zhan, J., Lan, X., Gu, C. and Chen, H., 2010. Polymorphisms in BMP-2 gene and their associations with growth traits in goats. *Genes & Genomics*, 32: 29-35 DOI 10.1007/s1 3258-010-0762-6 and Liangyou Rui
- Fisher, F.M., Chui, P.C., Antonellis, P.J., Bina, H.A., Kharitononkov, A., Flier, J.S., Flier, E. M., 2010. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (*FGF21*)- resistant state. *Diabetes*;59:2781–9
- Fitzgerald, A.M., Benz, C., Clark, A.F. and Wordinger, R.J., 2012. The Effects of Transforming Growth Factor- β 2 on the Expression of Follistatin and Activin A in Normal and Glaucomatous Human Trabecular Meshwork Cells and Tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;53:7358–7369) DOI:10.1167/ iovs.12-10292

- Fotinos, A., Nagarajan, N., Martins, A.S., Fritz, D. T., Garsetti, D., Lee, A.T., Hong, C. C. and Rogers, M. B., 2014. Bone Morphogenetic Protein-focused Strategies to Induce Cytotoxicity in Lung Cancer Cells. *Anticancer Research* 34: 2095-2104
- Franca, T.C., Carrilho, E. and Kist, B.L., 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35, pp. 169–200. DOI: 10.1017/S0033583502003797
- Gaastera, W., 1985. Chemical cleavage (maxam and gilbert) method for DNA sequence determination. *Methods Mol Biol.*, 2:333-41. doi: 10.1385/0-89603-064-4:333.
- Gago, S., Zaragoza, O., Cuesta, I., Rodríguez-Tudela, J. L., Estrella, M.C. and Buitrago, M.J., 2011. High-resolution melting analysis for identification of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 3663–3666 Vol. 49;(10) doi:10.1128/JCM.01091-11
- Green, E.D., 2001. Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Nature Reviews Genetics* 2, 573–583.
- Hall, T.A. 2005. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hartmann, A.G., Duval, D. L. and Bradford, A.P., 2014. ETS transcription factors in endocrine systems, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, (18), 4 doi:10.1016/j.tem.2007.03.002
- Hecker, K.H., Taylor, P.D., Gjerde, D.T., 1999. Mutation detection by denaturing DNA chromatography using fluorescently labeled polymerase chain reaction products. *Analytical Biochemistry* 1;272(2):156-64
- Heller, L.C., Li, Y., Abrams, K. L. and Rogers, M. B., 1999. Transcriptional Regulation of the *BMP2* Gene Retinoic Acid Induction In F9 Embryonal Carcinoma Cells and *Saccharomyces Cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 274;3, pp. 1394–1400,
- Hernandez, C.E., Cohen, B., Kohler, B., 2005. Base Stacking Controls Excited-State Dynamics in A.T DNA. *Nature*, 436, 1141–1144.
- Herrmann, M.G., Durtschi, J.D., Bromley, L.K., Wittwer, C.T. and Voelkerding, K.V., 2006. Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping: Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes. *Clinical Chemistry* 52:3-494–503.
- Herrmann, M.G., Durtschi, J.D., Wittwer, C.T. and Voelkerding, K.V., 2007. Expanded Instrument Comparison of Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping, *Clinical Chemistry* 53, No. 8
- Holland, W.L., Adams, A.C., Brozinick, J.T., Bui, H.H., Miyauchi, Y., Kusminski, C.M., *et al.*, 2013. An *FGF21*-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice. *Cell Metab* 17:790–7. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.019
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., Villarroya, F., 2011. Thermogenic activation induces *FGF21* expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem.* 15; 286(15): 12983–12990. doi:10.1074/jbc.M110.215889
- Hou, J. X., An, X.P., Wang, J.G., Song, Y.X., Cao, B.Y., 2014, Expression of caprine E74-like factor 5 gene and associations of polymorphisms with milk production traits, *Small Ruminant Research* 121 193–199
- Höglund, J. K., Sahana, G., Brøndum, R.F., Guldbrandtsen, B., Buitenhuis, B. and Lund, M. S., 2014. Fine mapping QTL for female fertility on BTA04 and BTA13 in

- dairy cattle using HD SNP and sequence data. *BMC Genomics*, 15:790
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/790>
- Hu, Z.L., Carissa, A., Park and James M. Reecy, 2016. Developmental progress and current status of the Animal QTLdb. *Nucleic Acids Research*, 44 (D1): D827-D833.
- IHGSC; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860–921
- Itoh, N. and Ornitz, D.M., 2008. Functional Evolutionary History of the Mouse FGF Gene Family. *Developmental Dynamics*, 237:18–27
- Jhin, M.J., Kim, K.H., Kim, S.H., Kim, Y.S., Kim, S.T., Koo, K.T., et al., 2013. Ex vivo bone morphogenetic protein-2 gene delivery using bone marrow stem cells in rabbit maxillary sinus augmentation in conjunction with implant placement. *J Periodontol*. 84(7):985-94. doi: 10.1902/jop.2012.120221
- Karsi, A., Li, P., Kim, S., Rex, A., 2000, Dunham Performance Traits-Linked DNA Markers and Marker-Assisted Selection” Pag VIII Conference San Diego, 9-12.
- Kawahara-Miki, R., Tsuda, K., Shiwa, Y., Arai-Kichise, Y., Matsumoto, T., Kanesaki, Y., et al., 2011. Whole-genome resequencing shows numerous genes with nonsynonymous SNPs in the Japanese native cattle Kuchinoshima-Ushi. *BMC Genomics*. 2011 Feb 10;12:103. doi: 10.1186/1471-2164-12-103.
- Kent, J.O., Reed, G.H., Wittwer, C.T., 2007. Review: High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics, *Pharmacogenomics* 8(6):597–608.
- Kharitonov, A., Dunbar, J.D., Bina, H.A., Bright, S., Moyers, J. S., et al., 2008. FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by beta Klotho. *Journal of Cellular Physiology*;215:1-7
- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., et al. 2005. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest*;115:1627–35.
- Khatkar, M.S., Nicholas, F.W., Collins, A.R., Zenger, K.R., Cavanagh, J.A., Barris, W., et al. 2008. Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC Genomics*, 9:187
- Khurana, S., Buckley, S., Schouteden, S., Ekker, S., Petryk, A., Delforge, M., Zwijsen, A. and Verfaillie, C. M., 2013. A novel role of BMP4 in adult hematopoietic stem and progenitor cell homing via Smad independent regulation of integrin- α 4 expression. *Blood*;121(5):781-790
- Kingsley, D.M., 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8(2):133–146
- Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.Y., Sackler, R.S., Haynes, C., Henning, A.K., et al. 2005. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 308(5720):385-9. Epub 2005 Mar 10.
- Kliwer, S.A. and Mange Isdorf, D.J., 2010. Fibroblast growth factor 21: from pharmacology to physiology. *Am J Clin Nutr*;91(suppl):254S–7S
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. Jul;33(7):1870-4. doi: 10.1093/molbev/msw054. Epub 2016 Mar 22.

- Laeger, T., Henagan, T. M., Albarado, D. C., Redman, L. M., Bray, G. A., Noland, R.C., 2014. *FGF21* is an endocrine signal of protein restriction. The Journal of Clinical Investigation ;124(9):3913–3922. doi:10.1172/JCI74915.
- Lavery, K., Swain, P., Falb, D. and Ismaili, M.H., 2008;. BMP- 2/4 and BMP- 6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow- derived mesenchymal stem cells. J Biol Chem. 283:20948–58
- Lee, H. J., Hinshelwood, R. A., Bouras, T., Ortega, D. G., Smora, F V.,Blazek, K., Visvader, J. E., Clark, S. J., Ormandy, C. J.2011, Lineage Specific Methylation of the *ELF5* Promoter in Mammary Epithelial Cells, STEM CELLS;29:1611–1619
- Li B-S, Wang X-Y, Ma F-L, Jiang B, Song X-X, *et al.*, 2011 Is High Resolution Melting Analysis (HRMA) Accurate for Detection of Human DiseaseAssociated Mutations? A Meta Analysis. PLoS ONE 6(12): e28078. doi:10.1371/journal.pone.0028078
- Li, B.S., Wang, X.Y., Ma, F.L., Jiang, B., Song, X.X., *et al.*, 2011. Is High Resolution Melting Analysis (HRMA) Accurate for Detection of Human DiseaseAssociated Mutations? A Meta Analysis. PLoS ONE 6(12): e28078. doi:10.1371/journal.pone.0028078
- Li, L.J., Li, Y.J., Li, W.T., Wang, X. and Shen , X. Y.,2012. Polymorphism of *BMP2* Gene Associated with Growth Traits in Guizhou Semi-Fine Wool Sheep. Journal of Animal and Veterinary Advances Vol: 1-8 Page No.: 1110-1115 DOI: 10.3923/javaa.2012.1110.1115
- Liao, Y.H., Chang, Y.H., Sung, L.Y., Li, K.C., Yeh, C.L., Yen, T.C., at al., 2014. Osteogenic differentiation of adipose-d erived stem cells and calvarial defect repair using baculovirus mediated co-expression of BMP-2 and miR-14 8b. Biomaterials 35 -4901e4910
- Liew, M., Nelson, L., Margraf, R., *et al.* Genotyping of human platelet antigens 1 to 6 and 15 by high-resolution amplicon melting and conventional hybridization probes. J Mol Diagn. 2006;8:97-104
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., Wittwer, C., 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. Clin Chem;50:1156–1164. [PubMed: 15229148]
- Liew, M., Seipp, M., Durtschi, J., Margraf, R.L., Dames, S., Erali, M., Voelkerding, K., Wittwer, C., 2007. Closed-tube SNP genotyping without labeled probes/a comparison between unlabeled probe and amplicon melting. Am J Clin Pathol;127:341–348. [PubMed: 17276934]
- Lilliebridge, R.A., Tong, S.Y.C., Giffard, P.M., Holt, D.C., 2011. The utility of high-resolution melting analysis of SNP nucleated PCR amplicons—a MLST based *Staphylococcus aureus* typing scheme. PLoS One 6:e19749. doi:10.1371/journal.pone.0019749.g004.
- Maat, W., Velden, P.A., Out-Luiting, C., Plug, M., Dirks-Mulder, A., Jager, M.J., Gruis, N.A., 2007. Epigenetic inactivation of *RASSF1a* in uveal melanoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 48:486–490.
- Malentacchi, F., Forni, G., Vinci, S. and Orlando C., 2009. Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol. Nucleic Acids Research, Vol. 37, No. 12 e86 doi:10.1093/nar/gkp383

- Maxam, A. M. and Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 74, No. 2, pp. 560-564
- McKeehan, W.L., Wang, F., and Kan, M. 1998. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 59:135–176.
- Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grimber G, Briand P, Vainchenker W and Tavitian A., 1996. Spi-1/PU.1 Transgenic Mice Develop Multistep Erythroleukemias, *Molecular and Cellular Biology*, p. 2453–2463 Vol. 16, No. 5
- Moura, J., Silva, L., Cruz, M. T. and Carvalho, E., 2013. Molecular and cellular mechanisms of bone morphogenetic proteins and activins in the skin: potential benefits for wound healing. *Arch Dermatol Res.* 305:557–569 DOI 10.1007/s00403-013-1381-2
- Muha, V. and Müller, J., 2013. Functions and Mechanisms of Fibroblast Growth Factor (FGF) Signalling in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 5920-5937; doi:10.3390/ijms14035920
- Oakes, S. R., Naylor, M. J, Labat, M.L., Blazek, K. D., Garden, M., Hilton, H.N. Kazlauskas, M., Pritchard, M. A *et al.* 2007. The Ets transcription factor *ELF5* specifies mammary alveolar cell fate, *Genes & Development*, 22:581–586
- Odell, I.D., Cloud, J.L., Seipp, M., Wittwer, C.T., 2005. Rapid species identification within the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group by high-resolution melting analysis of hsp65 PCR products. *Am. J. Clin. Pathol.* 123:96–101.
- Oettgen, P., Kas, K., Dube, A., Gu, X., Grall, F., Thamrongsak, U., *et al.* 1999. Characterization of ESE-2, a novel ESE-1-related ETS transcription factor that is restricted to glandular epithelium and differentiated keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 29439-29452.
- Ogawa, Y., Kurosu, H., Yamamoto, M., *et al.*, 2007. Beta Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci USA*;104:7432–7
- Oliver, J. R Kushwah, R. and Hu, J. 2012, Multiple roles of the epithelium-specific ETS transcription factor, ESE-1, in development and disease, *Laboratory Investigation* 92, 320–330
- Ornitz, D.M. and Itoh, N., 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.*, 2, 3005.1–3005.12 doi:10.1186/ gb-2001-2-3-reviews3005.
- Owens, P., Han, G., Li, A.G., Wang, X.J., 2008. The role of Smads in skin development. *J Invest Dermatol* 128(4):783–790
- Özden, A. ve Emir, F., 2006. Genetik Polimorfizm ve Polimorfizm Çalışmalar. *Güncel Gastroenteroloji*. 2006:24-28
- Özhan, M., Tüzemen, N. Ve Yanar, M. 2012, Büyük Baş Hayvan Yetiştirme, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, yayın no:134, 6. Baskı, Erzurum
- Papathanasiou, I., Malizos, K. N. and Tsezou, A., 2012. Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/bcatenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 14:R82 <http://arthritis-research.com/content/14/2/R82>
- Park, A., Hogan, M.V., Kesturu, G.S., James, R., Balian, G., Chhabra, A.B., 2010 Adipose-derived mesenchymal stem cells treated with growth differentiation

- factor- 5 express tendon- specific markers. *Tissue Eng*;16(9):2941-51. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0710.
- Pennington, K. A. and Ealy, A.D.,2012. The expression and potential function of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in bovine trophectoderm. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10:12
- Reddi, A.H.,1998 Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol*;16 (3):247–52.
- Reed, G.H. and Carl, T.,2004. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis *Clinical Chemistry* 50:10 1748–1754
- Reed, G.H., Kent, J.O. and Wittwer, C.T. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics, *Pharmacogenomics* 8(6):597–608.
- Reja, V., Kwok, A., Stone, G., Yang, L., Missel, A., Menzel, C., Bassam, B., 2010. ScreenClust: Advanced statistical software for supervised and unsupervised high resolution melting (HRM) analysis. *Methods* (50) S10–S14. doi:10.1016/j.ymeth.2010.02.006
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T.,1997. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves During The Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem*;245:154-160.
- Ron M., Israeli G., Seroussi E., Weller J.I., Gregg J.P., Shani M. & Medrano J.F. 2007. Combining mouse mammary gland gene expression and comparative mapping for the identification of candidate genes for QTL of milk production traits in cattle. *BMC Genomics* 8, 183.
- Sanger, F. and Coulson, A.R.,1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.*, 94(3):441-8.
- Schlötterer, C., Tobler, R., Kofler, R. and Nolte, V., 2014 Sequencing pools of individuals-mining genome-wide polymorphism data without big funding..*Nature Reviews Genetics*, (15), 749–763 doi:10.1038/nrg3803
- Schoenberg, K.M., Giesy, S.L., Harvatine, K. J., Waldron, M. R., Cheng, C., Kharitonov, A. and Boisclair, Y.R.,2011. Plasma *FGF21* Is Elevated by the Intense Lipid Mobilization of Lactation. *Endocrinology* 152: 4652– 4661
- Schrauwen, I., Thys, M., Vanderstraeten, K., Fransen, E., Dieltjens, N., Huyghe, J. R. et al.,2008. Association of Bone Morphogenetic Proteins With Otosclerosis. *J Bone Miner Res.*;23:507–516. doi: 10.1359/JBMR.071112
- Seth, A. and Watson, D.K., 2005. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur. J. Cancer* 41, 2462–2478]
- Sharrocks, A.D., Brown, A. L., Ling, Y., Yates, P. R., 1997. The ETS-domain transcription factor family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 1371-1387
- Silverman, E.S., Baron, R. M., Palmer, L. J., Le, L., Hallock, A., Subramaniam, V., et al.,2002 Constitutive and Cytokine-Induced Expression of the ETS Transcription Factor ESE-3 in the Lung, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* Vol. 27
- Steer, P.A., Kirkpatrick, N.C., O'Rourke, D., Noormohammadi, A.H., 2009. Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region. *J. Clin. Microbiol.* 47:311–321.

- Su, C., Middleton, C.T., Kohler, B., 2012. Base-Stacking Disorder and Excited-State Dynamics in Single-Stranded Adenine Homo-oligonucleotides. *J. Phys. Chem.*, 116, 10266–10274.
- Sun, X.M., Li, M.X., Li, A.M., Lan, X.Y., Lei, C.Z., Ma, W., *et al.*, 2013. Two novel intronic polymorphisms of bovine *FGF21* gene are associated with body weight at 18 months in Chinese cattle. *Livestock Science* Vol.155;1, Pag.23–29.
- Thissen, J.P., Underwood, L.E., Ketelslegers, J.M., 1999. Regulation of insulin-like growth factor-I in starvation and injury. *Nutr Rev*, 57:167–76
- Tindall, E.A., Petersen, D.C., Woodbridge, P., Schipany, K., Hayes, V.M., 2009. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Hum Mutat* 30:876–883.
- Tomlinson, E., Fu, L., John, L., Hultgren, B., Huang, X., Renz, M., Stephan, J.P., *et al.*, 2002. Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology* 143:1741–1747
- Tong, S.Y. and Giffard, P.M., 2012. Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* p. 3418–3421 Vol.50 (11)
- Tong, S.Y., Xie, S., Richardson, L.J., Ballard, S.A., Dakh, F., *et al.* 2011. High-resolution melting genotyping of *Enterococcus faecium* based on multilocus sequence typing derived single nucleotide polymorphisms. *PLoS ONE* 6(12): e29189. doi:10.1371/journal.pone.0029189
- Tummala, R. and Sinha, S., 2006, Differentiation-Specific Transcriptional Regulation of the ESE-2 Gene by a Novel Keratinocyte-Restricted Factor, *Journal of Cellular Biochemistry* 97:766–781
- Van der Stoep, N., Paridon, D.M., Janssens, T., Krenkova, P., Stambergova, A., Macek, M., Matthijs, G., Bakker, E., 2009. Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner™. *Hum Mutat* 30:889–909.
- Vossen, R.H., Aten, E., Roos, A., Dunnen, J.T., 2009. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum Mutat.*; 30(6):860-6. doi: 10.1002/humu.21019.
- Wang, X. 2012, Identification and Characterization of Candidate Genes for Complex Traits in Cattle. PhD thesis, Chair of Animal Breeding, Technische Universität München
- Whitcomb, D.C. and Block, G.D., 1994. Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *JAMA*. 1994 Dec 21;272(23):1845-50.
- White H and Potts G., 2006. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of (Corbett Life Science), HR-1 and 384 well LightScanner Rotor-Gene 6000 (Idaho Technology). National Genetics Reference Laboratory (Wessex, 2006). (<http://www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads.htm>).
- Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Pryor, R.J., 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem. Jun*; 49 (6 Pt 1):853-60.
- Wojdacz, T.K. and Dobrovic, A., 2007. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, No. 6 e41 doi:10.1093/nar/gkm013

- Worm, J., Aggerholm, A., Guldberg, P., 2001. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. *Clin Chem* 47:1183–1189.
- Yang, M., Fu, J., Lan, X., Sun, Y., Lei, C., Zhang, C., Chen, H., 2013. Effect of genetic variations within the SH2B2 gene on the growth of Chinese cattle. *Gene*, 528 314–319 <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.086>
- Ye, S., Park, B.H., Song, K.J., Kim, J.R., Jang, K.Y., Park, H.S., et al., 2013. In Vivo Inhibition of Bone Morphogenetic Protein-2 on Breast Cancer Cell Growth. *SPINE* Vol 38, 3, pp E143–E150
- Yu, L., Han, M., Yan, M., Lee, J., Muneoka, K., 2012. *BMP2* induces segment-specific skeletal regeneration from digit and limb amputations by establishing a new endochondral ossification center. *Dev Biol.* Dec 15;372(2):263-73. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.09.021.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., et al., 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841
- Zhang, X., Yeung, D.C., Karpisek, M, *et al.*, 2008. Serum *FGF21* levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 2008;57:1246–53.
- Zhou, J., Chehab, R. Tkalcevic, J., Naylor, M.J, Harris, Wilson, J.T, Tsao, S., Tellis, I., Zavarsek, S., *et al.*, 2005. *ELF5* is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation, *The EMBO Journal* 24, 635–644
- Zhou, J., Ng, A. Y. N., Tymms, M. J., Jermini, L. S., Seth, A. K., Thomas, R. S., Kola, I. 1998. A novel transcription factor, *ELF5*, belongs to the ELF subfamily of ETS genes and maps to human chromosome 11p13-15, a region subject to LOH and rearrangement in human carcinoma cell lines. *Oncogene* 17, 2719 ± 2732
- Zhou, L., Myers, A.N., Vandersteen, J.G., Wang, L., Wittwer, C.T., 2004. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin. Chem.* 50(8):1328- 35.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1986'da Erzurum'da doğdu. İlk ve ortaöğretimini Erzurum'da tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Mezun olduğu 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2012 yılında bu bölümden mezun olup aynı bölümde doktora eğitimine başladı. Devam eden doktora çalışması ile birlikte Nanobiyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine tamamladı.

