T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOZIRK SIĞIRLARIN GHRELİN GENİNDE rs110968631 TNP'ni BELİRLEMEDE ARMS-PCR VE PCR-RFLP METOTLARININ KULLANIMI

SERTAÇ ATALAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: YRD. DOÇ. DR. SÜLEYMAN KÖK

EDİRNE-2015

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof.Dr. Mustafa Özcan
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof.Dr. Ece Şen
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Süleyman Kök
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Prof.Dr. Ece Şen	
Doç.Dr. Eser Kemal Gürcan	
Yrd. Doç. Süleyman Kök	

Tarih: 11/06/2015

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

11/06/2015

Sertaç Atalay

Yüksek Lisans Tezi
SERTAÇ ATALAY
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Ghrelin, hayvanlarda yem tüketimi ve büyüme hormonu salgılanmasını uyaran önemli bir hormondur. Sığırlarda, karkas kompozisyonu, süt verimi ve yemden yararlanma ile olumlu ilişkisi vardır. Plazmadaki aktif ghrelin (açil ghrelin) konsantrasyonun, sığır ırkları arasında farklı olması, GHRL (ghrelin) genindeki varyasyonların aktif ghrelin konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Ghrelin genindeki polimorfizmlerin tespit edilerek, kantitatif özellikler ile ilişkisinin kurulması seleksiyon çalışmaları yönünden önemlidir.

Çalışmada, GHRL geninin 4. intronunda bulunan, rs110968631 C>T tek nükleotid polimorfizmini (TNP) tespit etmek amacıyla, Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistem-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ARMS-PCR) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restiriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) metotları tasarlanmıştır.

Çalışmada, 75 Bozırk sığır örneğini, ARMS-PCR metodu ile çalıştıktan sonra, her genotipi içeren rastgele seçilmiş 20 örnekte PCR-RFLP metodu ile sonuçların doğrulamasını yaptık. Tasarlamış olduğumuz metotların güvenirliğini test ettiğimiz bu çalışma sonucunda, her iki metot ile de aynı sonuçlara ulaşılmıştır.

Çalışma sonucunda, Bozırk sığırlarda rs110968631 C>T polimorfizmi yönünden 3 genotipide (CC, CT, TT) tespit edildi. CC, CT, TT genotipindeki birey sayısı sırasıyla; 1, 9 ve 65 olarak tespit edildi. Allel frekansları ise, C ve T allelleri için sırasıyla; 0,073, 0,927 olarak tahmin edilmiştir.

Yıl : 2015
Sayfa Sayısı : 51
Anahtar Kelimeler : GHRL, Ghrelin, ARMS-PCR, PCR-RFLP, Bozırk Sığır, TNP

Master's Thesis
SERTAÇ ATALAY
Trakya University Institute of Natural Sciences
Department of Biotechnology and Genetic

ABSTRACT

Ghrelin is an important hormone that stimulates feed consumption and growth hormone secretion of animals. Ghrelin is associated with feed efficiency traits, milk yield and carcass composition of cattle. Active ghrelin concentrations and the ratio of active/total ghrelin differs between breeds, indicating that genetics have an effect on the amount and form of circulating ghrelin. Detection of polymorphisms in the GHRL gene and establishment of relations with the quantitative characteristic is important in the breeding studies.

In this study, we have designed two methods for the detection of rs110968631 C> T single nucleotide polymorphism (SNP) in intron 4 of GHRL gene; Amplification-refractory mutation system-Polymerase chain reaction (ARMS-PCR) and Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

We have used the ARMS-PCR method in example 75 Bozırk cattle and we confirmed the results by the PCR-RFLP method. We obtained similar results when we tested the reliability of designed method by using both ARMS-PCR and PCR-RFLP methods. In our study, CC, CT, TT genotypes were detected in 1, 9 and 65 individuals respectively. Allele frequency were estimated as 0,073 and 0,927 for C and T alleles respectively.

Year : 2015
Number of Pages : 51
Keywords : GHRL, Ghrelin, ARMS-PCR. PCR-RFLP, Turkish Grey cattle, SNP

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Süleyman Kök başta olmak üzere, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında eğitim veren tüm bilim insanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bilimsel desteklerini esirgemeyen Uzm. Vet. Hekim Hasan Semih Eken'e, çalışmalarıma ayrıdığım zamana anlayış gösteren sevgili eşime ve kızıma teşekkür ederim.

Sertaç Atalay
Edirne, Haziran 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER vii
KISALTMALAR vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
TABLOLAR DİZİNİ x
BÖLÜM 1: GİRİŞ 1
BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER 3
2.1. Ghrelin Hormonu 3
2.1.1. Ghrelin Hormonunun Kimyasal Yapısı 4
2.1.2. Ghrelin Hormonu Reseptörü (GHS-R) 6
2.1.3. Ghrelin Hormonunun Davranışlar Üzerine Etkisi 7
2.1.4. Ghrelin Hormonunun Üreme Sistemi Üzerine Etkileri 7
2.1.5. Ghrelin Hormonunun İnsülin ve Karbonhidrat Metabolizmasına Etkileri 9
2.1.6. Ghrelin Hormonunun Beslenme Davranışı ve Büyüme Üzerine Etkisi 9
2.2. Sığır Ghrelin Hormonu 10
2.2.1. Sığır Ghrelin Hormonu ve Büyüme Hormonu İlişkisi 11
2.2.2. Sığır Ghrelin Hormonunun Vücut Yağ Dağılımı ile İlişkisi 12
2.2.3. Sığır Ghrelin Hormonu ve Kuru Madde Tüketimi İlişkisi 13
2.2.4. Sığır Ghrelin Hormonu Üreme Özellikleri İlişkisi 14

2.2.5 Sığır Ghrelin Geni ve Tek Nükleotid Polimorfizmleri 15
2.3. Yerli Bozırk Sığırı ve Önemi 18
2.4. Ghrelin Hormonunun Sığır Verim Özellikleri ile İlişkisi 20
BÖLÜM 3: MATERYAL VE METOT 21
3.1. Örnekler 21
3.2. DNA Ekstraksiyon 21
3.3. ARMS-PCR Metodu 23
3.3.1. Primer Tasarımı 23
3.3.1.1. Seçilen Primer Setinin Uygunluğunun Kontrolü 26
3.3.1.2. Seçilen Primer Setinin Özgünlüğünün Kontrolü 26
3.3.2. PCR Optimizasyonu 26
3.3.2.1. PCR Karışımı 27
3.3.2.2. Gradient PCR ile Optimum Bağlanma Sıcaklığının Bulunması 29
3.3.2.3 Gradient PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi 29
3.3.3. Örneklerin ARMS-PCR Metodu ile Çalışılması 30
3.4. PCR-RFLP Metodu 31
3.4.1. Primer Tasarımı 31
3.4.2. Allellerin Ayrımını Sağlayacak Restriksiyon Endonükleaz Enziminin Tespiti 31
3.4.3. PCR-RFLP Metodu İçin PCR Optimizasyonu 35
3.4.4. PCR Ürünlerinin *Bse*YI Enzimi ile Kesilmesi 35
3.4.5. Restriksiyon Enzimlerinin Sindirimi Sonucu Oluşan Ürünlerin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi 37
3.5. Örneklerin İstatistiksel Değerlendirilmesi 38
BÖLÜM 4: SONUÇLAR VE TARTIŞMA 39
4.1. Bozırk Sığırlarda rs110968631 C>T Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları. 39

4.2. ARMS-PCR ve PCR-RFLP Metotlarının Karşılaştırılmasına İlişkin Değerlendirme 40
KAYNAKLAR 42
ÖZGEÇMİŞ 50
BİLİMSEL FAALİYETLER 51

SİMGELER

mM : Minimolar

µl : Mikrolitre

ng : Nanogram

nm : Nanometre

pmol : Pikomol

U : Ünite

V : Volt

KISALTMALAR

AJE : Agaroz Jel Elektroforezi

ARMS-PCR : Amplifikasyon Refraktör Mutasyon Sistem- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

bç : Baz Çifti

Fİ : Forward Inner

FO : Forward Outer

GC : Guanin-Sitozin

GCAA : Günlük Canlı Ağırlık Artışı

GH : Büyüme Hormonu

GHRH : Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon

GHRH-R : Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon Reseptörü

GHRL : Ghrelin Geni

GHS-R : Büyüme Hormonu Salgılatıcı Reseptör

GOAT : Ghrelin-O-Açil Transferaz

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi

ICV : İntraserobroventriküler

KMT : Kuru Madde Tüketimi

PCR-RFLP : Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

QTL : Kantitatif Özellik Lokusu

RE : Restsiksiyon Endonükleaz

TBE : Tris, Borik asit, EDTA

Tm : Erime Sıcaklığı

TNP : Tek Nükleotid Polimorfizmi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ghrelin hormonun kimyasal yapısı..... 5
Şekil 2.2. İnsan, domuz ve rat, Ghrelin hormonu sekanslarının karşılaştırması 5
Şekil 2.3. Sığır, preproghrelin ve olgun ghrelin hormonlarının aminoasit sekansları.... 11
Şekil 2.4. Olgun sığır ghrelin hormonunun diğer birkaç tür ile sekanslarının karşılaştırması..... 11
Şekil 2.5. Sığır GHRL geni 16
Şekil 2.6. rs110968631 Polimorfizmin GHRL geni üzerinde gösterilmesi 16
Şekil 2.7. Çin ırkı sığırlarda tespit edilen 11 TNP' nin GHRL geni üzerindeki konumları 18
Şekil 3.1. ARMS-PCR metodunun şematize edimiş anlatımı 23
Şekil 3.2. Primer1 programına girilen 664 bç'lik bölgenin sekansı. Polimorfik nükleotid kırmızı ile renklendirilmiştir. 25
Şekil 3.3. ARMS-PCR çalışması için primer tasarımında Primer1 programına veri girişi. 25
Şekil 3.4. Gradien (55-66 ºC) ARMS-PCR çalışması, agaroz jel elektroforez görüntüsü. 30
Şekil 3.5. ARMS-PCR metodu ile tespit edilen 3 genotipin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. 31
Şekil 3.6. rs110968631 polimorfizmi C ve T allellerinin NEBCutter V2.0 programından alınan restriksiyon endonükleaz enzimi kesim haritası..... 33
Şekil 3.7. FO ve RO primerleri ile çoğaltılan gen bölgesinin *Bse*YI enzimi ile kesim noktalarının RestrictionsMapper programı ile doğrulanması..... 34
Şekil 3.8. RFPL analizi için çoğaltılan 420 bp'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü..... 36
Şekil 3.9. *Bse*YI enzimi kesim bölgesi ve kesim sonrası oluşan ürün boyutları..... 37
Şekil 3.10. *Bse*YI enzimi kesim ürünlerinin agaraoz jel elektroforezi görüntüsü.…....38

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Çin Sığırlarında tespit edilen polimorfizmler ve frekansları 17
Tablo 3.1. DNA ekstraksiyonu yapılan 75 örneğin 260 nm' de ölçülen absorbansları ve 1 µl' deki DNA miktarları. 22
Tablo 3.2. ARMS-PCR metodu için tasarlanan primer seti ve ürün boyutları..... 244
Tablo 3.3. ARMS PCR metodu ile agaroz jel elektroforezinde görülen ürünler ile genotip teşhisi 244
Tablo 3.4. Tasarlanan primerlerin erime sıcaklıkları, uzunlukları ve GC içerikleri..... 26
Tablo 3.5. ARMS-PCR için kullanılan PCR karışımının içeriği. 27
Tablo 3.6. Ekstrakte edilen DNA konsantrasyonunun 10 pmol/µl' ye ayarlanması 28
Tablo 3.7. Gradient ARMS-PCR çalışmasında uygulanan PCR protokolü. 29
Tablo 3.8. Çoğaltılan fragmentin *Bse*YI enzimi ile kesimi sonrası, allel ve genotiplere göre fragment boyutları. 32
Tablo 3.9. PCR-RFLP metodu için kullanılan PCR karışımının içeriği 35
Tablo 3.10. RCR-RFLP metodu için PCR protokolü 35
Tablo 3.11. PCR ürünlerinin *Bse*YI enzimi ile kesildiği reaksiyon karışımı……..36
Tablo 4.1. Bozırk Sığırlarda rs110968631 C>T Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları 39

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Ghrelin, hayvanlarda yem tüketimi ve büyüme hormunu salgılanmasını uyaran önemli bir hormondur. Ghrelin ve leptin hormonlarının yem tüketimi, enerji metabolizması, yağlanma ile beraber yemden yararlanma ve karkas kompozisyonu üzerine önemli etkilerinin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [1,2,3,4]. Ruminantlarda plazmadaki açil ghrelin (aktif ghrelin) konsantrasyonu, açlık durumunda arttığı ve tokluğa bağlı olarak ise hızlı bir şekilde düştüğü bilinmektedir [5].

Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör (GHS-R) için endojen ligand olan ghrelin, büyüme hormonu (GH) salgılanmasını da uyarmaktadır. GH doğum sonrası somatik gelişimde ve protein sentezinin regülasyonunda görev almasının yanında süt ineklerinde laktasyon döneminde, süt üretimi için gerekli enerjinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır [5].

Ghrelinin, beslenme ve GH üzerindeki etkileri, et ve süt sığırı yetiştiricileri için önemli ekonomik özellikler olan, süt verimi ve karkas kompozisyonu üzerinde çeşitliliğe neden olmaktadır. Irklar arasında plazmadaki aktif ghrelin konsantrasyonlarının farklı olduğunun tespit edilmesi, genetik etkinin dolaşımdaki aktif ghrelin miktarı üzerinde etkili olduğunu göstermektedir [6]. Bu bilgiler ışığında, marker destekli seleksiyon çalışmalarında değerlendirilmek üzere, GHRL geni varyasyonlarının tespit edilmesi, aktif ghrelin konsantrasyonları ve kantitatif özellikler ile ilişkilendirilmesi önem kazanmıştır.

Kantitatif özellikli lokus (QTL) üzerine yapılan araştırmaların temel amacı marker destekli seleksiyon (MAS) programlarında kullanılabilecek genler veya markerler bulmaktır [7]. DNA markerleri, bir tür içerisindeki farklı bireylerde dizi polimorfizmi gösteren DNA bölgeleridir ve varyasyonun belirlenmesinde günümüzde en sık kullanılan yöntemdir [8]. Son otuz yılda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler, hayvancılık ile ilgili verim özelliklerini etkileyen birçok QTL' nin tanımlanmasını

sağlamıştır. Bu QTL' lerin keşfi, klasik seleksiyonla elde edilmesi çok zor olan, belirli özelliklerin seçilimini mümkün kılmıştır [9].

GHRL geni üzerindeki polimorfizmlerin belirlenmesi ileride yapılacak marker destekli seleksiyon çalışmaları için ve yerli gen kaynaklarımızın spesifik özelliklerinin tespit edilmesi yönünden önemlidir. Bu amaçla çalışmamızda, GHRL geninin 4. intronu üzerinde bulunan, rs110968631 C>T tek nükleotid polimorfizminin (TNP) belirlenmesine yönelik ARMS-PCR ve PCR-RFLP metotları kullanılmıştır. Tasarlanan metotlar ile 75 baş Bozırk sığır örneğinde, rs110968631 polimorfizmine ait genotipler tespit edilmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Ghrelin Hormonu

Oreksijenik hormon olarak da bilinen ghrelin; insanda açlığı (obeziteyi), hayvanlarda yem tüketimini tetikler ve yemden yararlanmayı arttırır, in vivo ve in vitro olarak GH salınımını uyaran GHS-R için spesifik endojen bir ligandtır. Ghrelinin insan ve hayvanlarda GH hormonu salgılatıcı özelliği nedeni ile, Hint-Avupa dilleri ailesindeki grow (büyüme) sözcüğünün kökü olan "ghre" ile "relin" (salgılama) sözcüklerinden "ghrelin" türetilmiştir [10].

Ghrelin ilk kez 1999 yılında Kojima ve arkadaşları (1999) tarafından farelerin midesinde tanımlanmış peptid yapıda bir hormondur. Midenin oksintik mukozasında yer alan endokrin fonksiyonlara sahip X/A hücreleri tarafından üretilmektedir [10]. Keşfinin ilk yıllarında vücutta, büyüme hormonu salınımını arttırıcı bir hormon olarak görülse de, son yıllarda beslenme ve vücut ağırlığının düzenlenmesi üzerine etkileri daha çok dikkat çekmektedir [11].

Ghrelin peptidi, midede üretilen hazmettirici peptidlerden farklı olarak, sadece gastrointestinal bölgede kalmayarak gastrik kan damarları içine salınmaktadır ve bütün vücut boyunca dolaşıma katılmaktadır. Ghrelin pozitif hücreler, kapillerlere yakın yerleşimlidir ve oksintik bez lümeni ile irtibatı yoktur. Bu da salınımın gastrointestinal kanala değil, gastrik damarlara olduğunu göstermektedir. Böylelikle de tüm vücudu dolaşır. Yapılan çalışmalarda ghrelin hormonunun kan beyin bariyerini geçtiği görülmüştür [12,13,14].

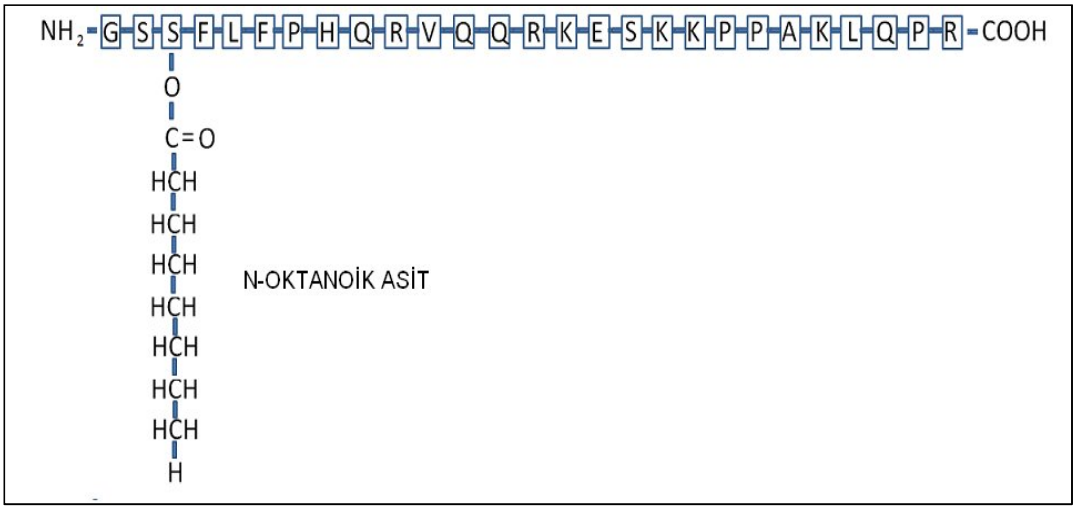
Bu hormon mideden başka hipotalamus, hipofiz, tükrük bezi, tiroid bezi, ince barsak, böbrekler, kalp, pankreasın alfa, beta ve epsilon hücreleri, santral sinir sistemi, akciğer, plasenta, gonadlar, immün sistem, meme ve dişlerde de sentezlenmektedir. Ghrelin mRNA'sı hemen hemen bütün dokularda tespit edilmiştir. Çalışılan dokularda ghrelin mRNA miktarının mide fundusunda en fazla olduğu, bunu da sırasıyla jejunum,

duodenum, midenin antrumu, akciğer, pankreas dokusu, venöz sistem, safra kesesi, lenf nodu, yemek borusu, sol kolon, yanak, hipofiz, meme, böbrek, ovaryum, prostat, sağ kolon, ileum, karaciğer, dalak, fallopian tüp, lenfositler, testis, yağ dokusu, plasenta, adrenal bez, kas, mesane, kalbin atriyumu, tiroid, miyokardiyum ve derinin takip ettiği belirlenmiştir [15].

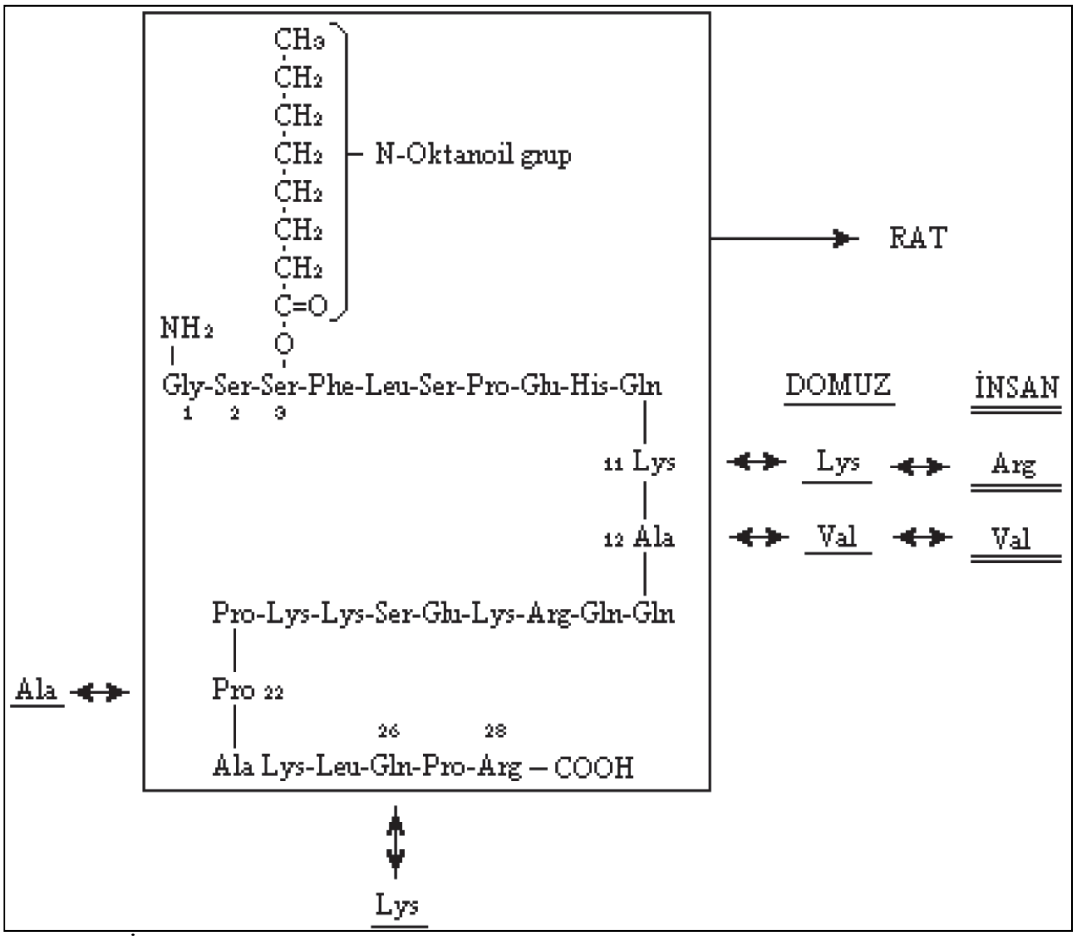
2.1.1. Ghrelin Hormonunun Kimyasal Yapısı

Ruminantlarda 27, tek mideli memelilerde 28 aminoasit içeren ghrelin hormonu, N-terminal ucundaki 3. aminoasit olan serine bağlı, oktanil grubu adı verilen sekiz karbonlu bir yağ asidi içermektedir [16,17] (Şekil 2.1). Ghrelin hormonu salınmadan önce sitoplazmada enzimatik bir işlemden geçer, üçüncü pozisyonundaki serin aminoasidine n-oktanil grubu, ghrelin-O-açil transfreaz (GOAT) enziminin aktivitesi ile eklenir ki bu da ghrelin'in GH salgılatıcı etkinliği için gereklidir [18,19]. Yani oktanil grubu ghrelinin aktif olması için gereklidir. Bu post translasyonel değişimin, ghrelin peptidine kazandırdığı hidrofobik özellik ile beyin dokusuna, özel olarak da hipotalamus ve hipofiz'e geçişine imkan sağlamaktadır. Hücre biyolojisinde ilk defa, salınan bir proteinde açil bağlanması işlemi gözlenmiş olmaktadır. Açil grubu taşımayan ghrelin formu olan desaçil-ghrelin'in hipotalamik ve hipofizer reseptörlere bağlanamadığının görülmesi, n-oktanil hidrofobik özelliğin, ghrelin'in GHS-R ile bağlanmasında da çok önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir [10,20]. Ghrelin'in yarı ömrü 60 dakikadan kısadır, çünkü plazma esterazı tarafından kolayca yıkılır ve des-açil-ghrelin'e dönüşür ki bu molekül inaktiftir. Des-açil-ghrelin sirkülasyondaki toplam grelinin % 80-90'ını oluşturmaktadır [21].

Memeli ghrelinlerinde NH_2 terminal ucundaki ilk 10 amino asit evrimsel süreç içerisinde iyi korunmuştur. Bu yapısal korunma, üçüncü sırada yer alan serin amino asidinin, açil modifikasyonuna olanak sağlamaktadır. Buradan anlaşıldığı üzere NH_2 terminal bölgenin ilk 10 amino asidi peptidin aktivite gösterebilmesi için ana rol üstlenmektedir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 3315 dalton olan memeli ghrelinleri birbirine tamamen benzer değildir. Rat, insan ve domuz ghrelin yapılarının karşılaştırılması Şekil 2.2' de gösterilmiştir. Şekilden anlaşıldığı gibi sıçan ve domuz ghrelinindeki 11. amino asit olan lizin, insanda arjinin ile yer değiştirmiştir. Diğer



Şekil 2.1. Ghrelin hormonun kimyasal yapısı ([16] ve [17] numaralı kaynaklardan yararlanılarak çizilmiştir.)



Şekil 2.2. İnsan, domuz ve rat Ghrelin hormonu aminoasit sekanslarının karşılaştırması [22].

taraftan sıçan ghrelininde 12. amino asit olan alanin, hem domuzda hem de insanda valin olarak değişmiştir. Bundan başka sıçanlarda 22 nolu amino asit olan prolinin yerine domuzda alanin, sıçanlarda ise 26 nolu amino asit olan glisinin yerine domuzda lizin bulunmaktadır [22].

Balıklarda, Gökkuşağı alabalığı, tilipia, yılan balığı ve japon balıklarının midelerinden ghrelin izole edilmiştir. Balıklardaki ghrelinin amino asit sayısı memelilerdekinden az olup genellikle 19 ve 21 aminoasit arasında değişmektedir. Kurbağalarda, diğer omurgalıların aksine açil modifikasyonunun serin yerine tironin amino asidiyle oluşturulduğu bulunmuştur [22].

Tavuk ghrelin hormonu, 26 aminoasit uzunluğunda olup insan ile % 54 benzerlik göstermektedir [23]. Civciv ve sıçanlara tavuk ghrelin hormonu verildiğinde hem plazma GH seviyesi hem de kortisol seviyesi her iki canlıda da artmıştır. Ancak kortizol seviyesindeki artış memelilerdekine oranla nispeten daha düşük bulunmuştur. Gözlenen bu etki, sıçan ve insan ghrelini uygulamalarına benzerdir [24]. Çalışılmış diğer kanatlı ghrelin hormonları devekuşu, ördek, kaz ve hindidir. Tavuk, kaz, ördek ve devekuşu ghrelinleri 26 amino asitten oluşmaktadır. Hindi hariç bütün kanatlılar -COOH ucunda arjinin-arjinin ihtiva ederler. Hindi ghrelini ise 28 aminoasitli olup tıpkı memelilerde olduğu gibi -COOH ucunda prolin-arjinin vardır [18,20].

İmmunohistokimyasal yöntemle erik ve dut bitkilerinin parankima dokularında ghrelin tespit edilmiştir. Bulgular HPLC yöntemi ile de doğrulanmıştır. Bitkilerde ghrelinin moleküler ağırlığı ve amino asit dizilimi henüz bilinmemektedir. Ancak bitkilerde ghrelin hormonunun fonksiyonunun büyüme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [25].

2.1.2. Ghrelin Hormonu Reseptörü (GHS-R)

1996 yılında, GHRH (Büyüme hormonu salgılatıcı hormon) reseptöründen farklı olarak, GHS-R tanımlanmıştır. Yani Ghrelin hormonunun bulunmasından 3 yıl önce reseptörü bulunmuştur. Ghrelinin biyolojik etkileri çoğunlukla hücre yüzey reseptörü olarak adlandırılan GHS-R ile etkileşim yoluyla gerçekleşir [26].

GHS-R geni olmayan farelerde, ghrelin enjeksiyonu sonucunda GH salınımı veya iştah indüklenmesi cevabı görülmez. Bu da ghrelinin neden GHS-R yoluyla etki

ettiğinin düşünüldüğünü ve GHS-R' ye ghrelin reseptörü adının verildiğini açıklamaktadır [27].

GHS-R'nin bilinen iki tane formu vardır. Bunlar; GHS reseptör tip 1a (GHS-R 1a) ve GHS reseptör tip 1b (GHS-R 1b) dir. GHS-R 1a fonksiyonel reseptör olup, 7 transmembran bölgelidir. GHS-R 1b ise 5 transmembran bölgeli olup, biyolojik olarak inaktiftir [26]. GHS-R 1a 366 aminoasitten, GHS-R 1b ise 289 aminoasitten meydana gelmiştir [28].

GHS-R mRNA varlığı beynin bazı bölümlerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Bu bölgeler; anteroventral preoptik nükleus, anterior hipotalamik bölge, suprakiyazmatik nükleus, lateroanterior hipotalamik nükleus, paraventriküler nükleus, arkuat nükleus ve tuberomamilar nükleusunu kapsayan birkaç hipotalamik nükleusları kapsayan bölgelerdir [26].

GHS-R'ün mRNA dağılımı sadece beyin bölgelerinde bulunmamaktadır. Bu reseptörler aynı zamanda mide, bağırsak, karaciğer, kalp, fetal beyin, testis, timus, adrenal salgı bezi, uterus, spinal kord, kemik iliği, tiroid, ümmin sistem, yağ doku, pankreatik hücreler ve akciğeri kapsayan periferal bölgelerde de yoğun şekilde bulunur. GHS-R, hücre membranında G-proteini ile birlikte fonksiyon yaparak hücre içi Ca^{2+} mobilizasyonu ile ilgili olduğu belirtilmektedir [13, 29].

2.1.3. Ghrelin Hormonunun Davranışlar Üzerine Etkisi

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda ghrelinin intraserebroventriküler (ICV) uygulanmasının, anksiyeteyi indüklediği ve hafızayı olumlu etkilediği bulunmuştur [30]. Periferik ghrelin enjeksiyonu, hipotalamusu etkileyerek artmış anksiyeteye neden olmaktadır [31]. Bu bulgular ghrelinin, stres yapıcılara karşı nöroendokrin ve davranışsal cevaplarda rolü olabileceğini ve anksiyetenin düzenlenmesinde midenin önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir [20].

2.1.4. Ghrelin Hormonunun Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Östrojen ve progesteron hormonları gebelik sürecinde en önemli hormonlardandır. Yumurtalıklardan salgılanan östrojen ve progesteron hormonlarının kandaki miktarları, beyinde yer alan hipofiz bezinden salgılanan folikül stimüle edici ve luteinize edici hormonlar tarafından kontrol edilmektedir. Ghrelin hormonu üremenin

kontrolüne, üreme ile ilgili hormonların salınımını etkileyerek iştirak edebilmektedir [32]. Farklı çalışmalarda, ghrelin hormonu, farklı deney modellerinde luteinize edici hormonun (LH) salgılanmasını, LH salgılatıcı hormonu (LHSH) inhibe ederek engellediği belirtilmektedir. Aynı zamanda ghrelin, folikül stimüle edici hormonuda artırmaktadır [33].

Üreme ile ilgili olarak, ghrelin hormonu ve bu hormonun reseptörünün de ovaryumda bulunması önemlidir. Sıçanların diöstrus siklusunda ovaryumlarında ghrelin gen ekspresyonu en fazla miktarda bulunurken, proöstrus siklusunda en az seviyede bulunmaktadır. Ghrelin immün reaktifi ovaryumda, öncelikle lötal kompartmanda lokalize olduğu belirtilir [34]. Benzer şekilde, güçlü ghrelin immün boyaması insan ovaryumunun olgun ve genç korpora lutea'da gözlendiği belirtilirken, gelişme safhasında ovaryum foliküllerinde ortaya çıkmadığı gözlenir. Ghrelin için fonksiyonel reseptör olan GHS-R ile proteini somatik foliküler hücreler, luteal hücreler ve daha düşük derecede interstisyel hücreler gibi insan ovaryumunda oosite de dağılım göstermektedir. Bu durumda, folikül gelişimi ve GHS-R arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Bir kaç ovaryum kompartmanında ghrelin ve reseptörünün simultane dağılımı, ovaryum fonksiyonunun otokrin ve parakrin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olabileceği tahmin edilmektedir [35]

Gebelik esnasında plazma ghrelin konsantrasyonunun, plasentanın salgıladığı ghrelin tarafından etkilendiği gösterilmiştir. Plasentada ghrelin mRNA yoğunluğu gebeliğin daha sonraki aşamalarında gebeliğin diğer erken dönemlerine göre artış olduğu belirtilmiştir [36]. Ghrelin verilen sıçanların yavrularının daha büyük olmasından dolayı fötal büyümede ghrelinin rolü olabileceği düşünülmektedir [37].

Ghrelin aynı zamanda erkek üreme sisteminde de etkili olduğu ifade edilmektedir. Hormon, sıçan ve insan testisindeki olgun leydig hücrelerinde de bulunduğu belirtilmektedir. Ghrelinin fonksiyonel reseptörü olan GHS-R tip 1a da testislerdeki sertoli ve leydig hücrelerinde tespit edilmiştir. Ayrıca, ghrelin doz bağımlı olarak testikülar testosteron salınımını *in vitro,* leydig hücre proliferasyonunu da *in vivo* olarak inhibe ettiği belirtilmektedir [38].

2.1.5. Ghrelin Hormonunun İnsülin ve Karbonhidrat Metabolizmasına Etkileri

Ghrelinin iştahın ve vücut ağırlığının fizyolojik olarak düzenlenmesinin yanı sıra, insülin ve glukoz metabolizmasında da önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür [15]. Ghrelin dolaşımdaki glukoz seviyelerini, GH salınımıyla, insülin direncini arttırarak ve glukoneogenezisi stimüle ederek ayarlar [39]. Ghrelinin insülin sekresyonundaki etkisi ile ilgili bazı çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, ghrelinin, normal ve diyabetik sıçanların pankreasından insülin sekresyonunu uyardığı tespit edilmiştir. Diyabetik sıçanların langerhans adacıklarındaki ghrelin immünreaktif hücre sayısının da arttığı gözlenmiştir [40]. Ghrelinin intravenöz uygulanmasının, hem normal, hem de obez insanlarda glukoz seviyesini arttırdığı bildirilmiştir [41]. İnsanda GH reseptör antagonistiyle birlikte uygulanması ise insülin direncini bariz şekilde arttırdığı görülmüştür [42].

2.1.6. Ghrelin Hormonunun Beslenme Davranışı ve Büyüme Üzerine Etkisi

Ghrelin sekresyonunun düzenlenmesindeki en önemli faktör beslenmedir. Plazma ghrelin seviyeleri açlıkta artar ve gıda alımından sonra düşer [43]. Ghrelinin besinlerin kullanımı ve metabolizmaya ait hormon salgılanmasında da etkili olduğu bilinmektedir [44].

Ghrelin kilo alımı ve yağlanmayı indükler [45]. Periferal kandaki ghrelinin konsantrasyonu arttığında mide ghrelin seviyesinde azalma meydana gemektedir. Bazı çalışmalarda ghrelinin beslenme davranışı üzerine olan etkileri hakkında bilgi sağlamak için, kemirgen hayvanlara merkezi yada periferik olarak uygulanması ile besin alımına ve vücut ağırlığının artışına sebep olduğu belirtilmektedir. Sıçanlara ICV olarak uygulanması, gıda alımını doza bağlı şekilde arttırmıştır. Ghrelinin, genetik olarak GH eksikliği olan sıçanlara ICV olarak uygulanması gıda alımını stimüle eder: Bu bilgiler ghrelinin oreksijenik aktivitesinin GH sinyal yolundan bağımsız olduğunu göstermektedir. Ghrelinin devamlı ICV olarak uygulanması, gıda alımı ve yağ kitlesindeki artışı stimüle ederek kilo alımına neden olur [46, 47]. Ghrelinin beslenme üzerine olan etkisinin üç şekilde olabileceği görüşü kabul edilmektedir. Bunlardan birincisi midede üretilen ghrelinin dolaşıma geçmesi ve kan beyin bariyerinide aktif transportla geçip iştahı uyarmasıdır. İkincisi, periferal sentezlenen ghrelinin, vagal affrent sinir uçlarını uyarması sonucu GHS-R ekspresyonunu arttırarak nükleus

solitaryus aracılığıyla hipotalamusun uyarılmasıdır. Üçüncü ve sonuncusu ise ghrelinin lokal olarak hipotalamustan salgılanarak, direkt nöropeptid Y ve agouti ilişkili protein ve diğer hücreleri uyarmasıdır [48]. Ghrelin, mideden beyine kanla taşınarak oreksijenik (iştah artırıcı) etki gösterdiği için mide-beyin (brain-gut) peptidi olarak da adlandırılmaktadır.

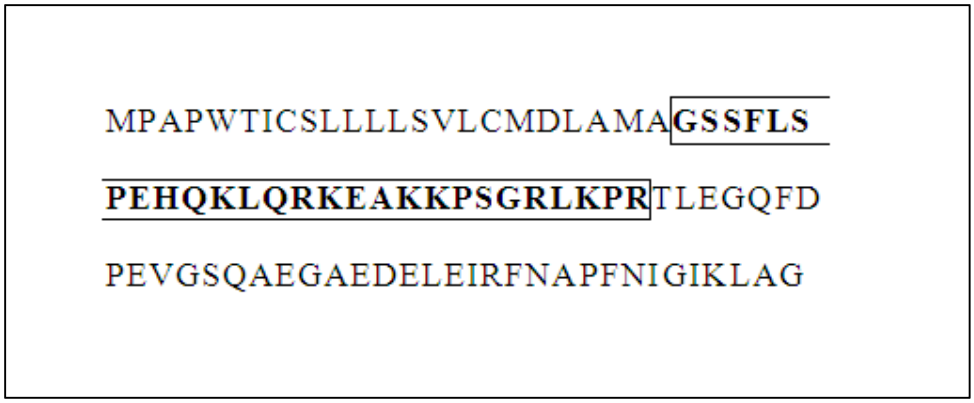
Ghrelinin, GH ile ilişkisi ilk keşfedilen etkilerindendir. Ghrelin GH salınımını hem *in vitro* hem de *in vivo* şartlarda doz bağımlı olarak arttırmaktadır. GH salınımı iki farklı yolla gerçekleşmektedir: Birincisinde, GHRH hipofiz içine büyüme hormonu salgılatıcı hormon reseptörü (GHRH-R) vasıtasıyla girer ve intraselüler siklik adenozin monofosfat seviyesini yükselterek GH salınımını uyarır. İkincisinde ise büyüme hormonu salgılatıcı (GHS) ya da ghrelinin hipofiz membranında bulunan GHS-R vasıtasıyla hipofiz içine girmesi ve fosfolipaz C aktivasyonu sonucu intraselüler Ca^{2+} iyonu derişiminin yükseltmesiyle GH salınımı uyarılır.

2.2. Sığır Ghrelin Hormonu

Ghrelin tek mideli türlerde 28 aminoasitli, ruminantlarda ise 27 aminoasitli bir peptittir [16]. Dolaşımda olan ghrelinin küçük bir kısmında, üçüncü aminoasit olan serin, ghrelin o-açil transferaz (GOAT) enzimi tarafından açillenmiştir. Açillenmiş ve açillenmemiş (desaçil) ghrelin dolaşımda beraber bulunurlar [49]. Her iki ghrelin formuda enerji homeostazında beraber görev alırlar ancak sadece açillenmiş formu GH salınımını uyararan GHS-R reseptörü ile ilişkiye girerek endokrinolojik faaliyet gösterir [5]. Sığır ghrelin hormonu obamasum oksintik bezlerinde izole edilmiştir [50].

Sığır preproghrelin 116 aminoasitten oluşmuştur, olgun sığır ghrelin hormonu ise 27 aminoasitten oluşmaktadır (Şekil 2.3). Olgun sığır ghrelin hormonunun, fare, rat, domuz ve insan ile aminoasit sekanslarının karşılaştırılması Şekil 2.4' te verilmiştir. Sığır aminoasit sekansı ile en yüksek benzerlik %78,6 ile domuzda bulunmuştur. İnsan, rat, fare ile sığır preproghrelin aminoasit sekans benzerlikleri sırasıyla, %71,4, %75, %75'tir [51].

Ruminantlarda plazmadaki açil ghrelin konsantrasyonu beslenmeden önce artar, beslenmeye bağlı olarak hızlı bir şekilde düşer. Yani dolaşımdaki açil ghrelin konsantrasyonu pozitif enerji dengesi tarafından kontrol edilir [52].



Şekil 2.3. Sığır, preproghrelin ve olgun ghrelin hormonlarının aminoasit sekansları. Olgun ghrelin hormonunun sekansı çerçeve içine alınmıştır. ([51] ve [60] numaralı kaynaklardan yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Sığır(27)	**GSSFLSPEHQ**	**K—LQRKEAKK**	**PSGRLKPR**
İnsan(28)	**GSSFLSPEHQ**	**RVQQRKESKK**	**PPAKLQPR**
Domuz(28)	**GSSFLSPEHQ**	**KVQQRKESKK**	**PAAKLKPR**
Rat(28)	**GSSFLSPEHQ**	**KAQQRKESKK**	**PPAKLQPR**
Fare(28)	**GSSFLSPEHQ**	**KAQQRKESKK**	**PPAKLQPR**

Şekil 2.4. Olgun sığır ghrelin hormonunun diğer birkaç tür ile aminoasit sekanslarının karşılaştırması. ([51] ve [60] numaralı kaynaklardan yararlanılarak hazırlanmıştır.)

2.2.1. Sığır Ghrelin Hormonu ve Büyüme Hormonu İlişkisi

Memelilerde, kandaki GH konsantrasyonu, öncelikle yaş, beslenme ve emzirme ile değişir. Süt sığırlarında, doğum sonrası dönemde GH salgısı ve GH salgısına cevap yüksek, ergenlikten sonra artan yaş ile beraber ise düşüktür [53]. Ancak olgun ineklerde doğum sonrası dönemde ve laktasyon döneminde dolaşımdaki GH hormonu konsantrasyonu tekrar artar [54]. GH hormonu doğum sonrası somatik gelişimde ve protein sentezinin regulasyonunda görev almasının yanında, süt ineklerinde laktasyon döneminde süt üretimi için gerekli enerjinin sağlanmasında da önemli rol almaktadır [55]. Ancak GHRH uyarısıyla GH salgılanmasının yaşlanmayla ineklerde baskılandığı kanıtlanmıştır [56]. Bu nedenle olgun ineklerin laktasyon dönemlerinde artan GH

miktarının GHRH tarafından değil de GHS-R vasıtası ile ghrelin hormonu tarafından sağlandığı düşünülmektedir [5].

Büyümekte olan ve laktasyon dönemindeki sığırlarda üzerinde yapılan çalışmalarda, büyüme dönemindeki sığırların GH konsantrasyonlarının artmasında GHRH' nin önemli rol üstlendiği görülürken, laktasyon dönemindeki sığırlarda GHRH'ye göre ghrelin hormonun göreceli öneminin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar büyüme dönemindeki GH salgısının merkezi yolağı ile kontrol edildiği, laktasyon döneminde ise beslenmeye bağlı olarak periferal kontrol edildiğini göstermektedir [5]. Bununla beraber, Holstein düvelere, damar içi ghrelin enjeksiyonu yaparak dolaşımdaki GH konsantrasyonlarının anlamlı şeklide arttığı gösterilmiştir [57].

Myint ve arkadaşları (2008) sütten kesim öncesi ve sonrası boğalar üzerinde, ghrelin ve GHRH' ın plazmadaki GH ve diğer metabolik parametreler üzerine sinerjik etkisini incelemişler. 5 haftalık (sütten kesim öncesi) ve 10 haftalık (sütten kesim sonrası) buzağılara I.V. olarak ghrelin ve GHRH kombinasyonu, sadece ghrelin ve sadece GHRH enjekte ederek GH üzerindeki tekil ve sinerjik etkilerini incelemişler. Sütten kesim öncesi buzağılarda hem tekil hem de sinerjik etkilerinin bulunduğu gözlenirken, sütten kesim sonrasında tekil etkilerinin bulunduğu ancak sinerjik etkilerinin bulunmadığını görmüşler [58].

2.2.2. Sığır Ghrelin Hormonunun Vücut Yağ Dağılımı ile İlişkisi

Ghrelin kalori kısıtlaması ve yağ tüketimi sırasında artan bir hormondur. Ghrelin ve leptin hormonlarının, gıda alımı, enerji metabolizması, yağlanma ve bunlarla beraber yemden yararlanma ve vücut ağırlığının kompozisyonu üzerine etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [1, 2, 3, 4].

Sığır dışındaki hayvanlardan elde edilen sonuçlara göre, ghrelin ve GHS-R yağ depolanmasında, glukoz metabolizmasında veya enerji homeostazında direkt olarak karaciğer ve yağ dokuyu etkileyerek anahtar rol oynamaktadır. Jennings ve arkadaşları (2011) tarafından 72 sığır üzerinde yaptıkları araştırmada; 8 sığırı vücut kompozisyonları ile ilgili bilgiler edinmek amacıyla kesmişler, geriye kalan sığırları iki gruba ayırmış, ilk grup 111 gün boyunca düşük enerjili diyet ile 112 ila 209. günler arasında ise yüksek enerjili diyet (DE-YE) ile beslenmişlerdir. İkinci grup ise 1-209.

günler boyunca yüksek enerjili (YE-YE) diyet ile beslemişlerdir. Her iki gruptanda 88, 111, 160 ve 209. günlerde kesilen hayvanların karkas kompozisyonu ve yine her kesimden önce toplanan kan örneklerinden ghrelin ve leptin konsantrasyonlarını tespit edilmişler. YE-YE grubundaki hayvanların karkas toplam yağ miktarlarının, YE-DE grubundakilere göre daha yüksek olduğu tespit etmişler. Ancak karkastaki protein oranına bakıldığında YE-DE grubundaki hayvanların daha fazla protein kazandıkları görülmüşler. Plazmadaki ghrelin, insülin ve leptin oranları karşılaştırıldığında YE-YE grubu hayvanların, YE-DE grubuna göre daha yüksek değere sahip olduğu görmüşler. Sürekli YE diyet ile beslenen sığırlarda ghrelin konsantrasyonu yükselirken, kilo artışı (yağlanma) gözlenmiş, ancak karaciğeri yağ doku ve kas dokuda GHS-R miktarında diğer kontrol grubuna göre bir artış gözlenmemiş. Sığır metabolizmasında ghrelin hormonunun rolü olarak, vücut ağırlığı kazancının kompozisyonu, yemden yararlanma ve karaciğer yağlanması gibi özellikleri etkilediği sonucuna varmışlar [4].

Börner ve arkadaşları (2013) ghrelin hormonunun, vücut ve karaciğer yağı, süt yağı içeriği ve yem alımı ile ilişkisini inceledikleri çalışmalarında, postpartum dönemindeki 16 süt ineğine karaciğer biyopsisi yaparak inekleri karaciğer yağ içeriğine göre; yüksek (Y) ve düşük (D) olmak üzere 2 gruba ayırmışlar. İki grubun yem alımlarını (doğumdan 6 hafta önce ve 2 hafta sonra) karşılaştırmışlar. Doğum öncesi ineklerde, beslenme öncesi toplam ghrelin konsantrasyonunu D grubu ineklerde Y grubu ineklere göre daha yüksek bulmuşlar. Hem doğumdan önce hem de doğum sonrası ineklerin beslenme öncesi aktif ghrelin konsantrasyonlarına baktıklarında ise, aktif ghrelin ve aktif ghrelin/toplam ghrelin oranlarının Y grubu ineklerde D grubu ineklere göre yüksek olduğunu tespit etmişler. Elde edilen sonuçlar ile hem yem alımı hem de yağ metabolizmasının düzenlenmesinde ghrelin hormonunun etkisi olduğu sonucuna varmışlardır. Aktif ghrelin/toplam ghrelin oranının, sırt yağ kalınlığı, karaciğer ve süt yağ içeriği ve aynı zamanda tüm vücut yağ oksidasyonu ile ilişki olduğunu, laktasyona geçiş döneminde gerekli adaptasyonun sağlanmasında rol oynadığını görmüşlerdir [59].

2.2.3. Sığır Ghrelin Hormonu ve Kuru Madde Tüketimi İlişkisi

Sığırlarda dolaşımdaki ghrelin konsantrasyonu kuru madde tüketimi (KMT) için gösterge olarak kullanılabilir. Foote ve arkadaşları (2014) dolaşımdaki ghrelin

konsantrasyonu ile KMT, karkas ve büyüme özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemişler. Plazma metabolitleri, cinsiyet ve aktif ghrelin miktarı ile yapılan çok değişkenli regresyon analizleriyle, KMT ile aktif ghrelin miktarı arasında pozitif ilişki olduğu tespit etmişler. Aktif ghrelin/toplam ghrelin oranı ile KMT arasında pozitif ilişki olduğunu görmüşler. Günlük canlı ağırlık artışı (GCAA) ile ilgili yaptıkları incelemede aktif ghrelin ve aktif ghrelinin/toplam ghrelin oranının GCAA ile pozitif ilişkiliyken, toplam ghrelinin negatif ilişkili olduğunu tespit etmişler. Irklar arasındaki toplam ghrelin konsantrasonlarının farklı olmadığı, ancak aktif ghrelin konsantrasyonu ve aktif ghrelin / toplam ghreline oranlarının ırklar arasında farklı olduğunu tespit etmişler. Bu sonuç genetik etkinin dolaşımdaki aktif ghrelin miktarı üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Toplam ghrelin konsantrasyonun sıcak karkas ağırlığı ile ilişkili olduğu ancak diğer karkas özellikleri ile ilişkisinin olmadığı görülmüş. Sonuç olarak ghrelin konsantasyonlarının KMT ile ilişkili olduğu, genetik varyasyonların dolaşımdaki ghrelin konsantrasyonları üzerine etkili olduğu, günlük kilo alımı ve sıcak karkas ağırlığı ile ilişkisi olduğu görülmüş [6].

2.2.4. Sığır Ghrelin Hormonu Üreme Özellikleri İlişkisi

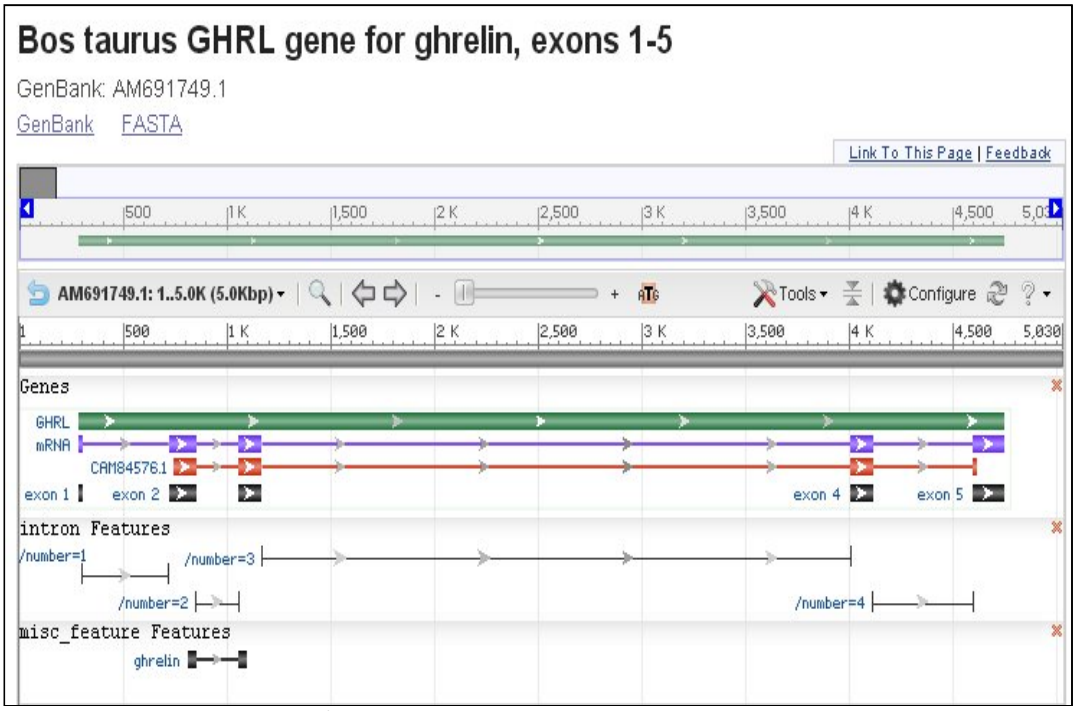
Dovolou ve arkadaşları (2014), ghrelin hormonunun, *in vitro* olarak üretilen sığır zigotlarının gelişiminde etkisini tespit etmek için yaptıkları çalışmada, blastosit oluşum yüzdesini, metabolizma ile ilgili genlerin (apoptozis, implantasyon, oksidasyon genleri) ekspresyon seviyelerini incelemişler. Birinci deneyde 3 farklı konsantrasyonda (GHR200 - 200 pg/ml, GHR800 – 800 pg/ml, GHR2000 - 2000 pg/ml) ghrelin hormonu varlığında ve kontrol olarak (C) yokluğunda zigotların gelişimi incelenmiş. 7, 8 ve 9. günlerde blastosit oluşum oranı incelenmiş. İkinci deneyde ise sadece GHR800 kullanılmış. Zigot oluşumundan sonra 4 gruba ayırmışlar. Birinci grupta ve ikinci grup (kontrol ve GHR800) değiştirilmeyen kültür ortamına alınırken, üçüncü ve dördüncü grup (kontrol N, GHR800N) her gün tazelenen kültür ortamına alınmış. 7 gün sonra blastositler, metabolizma genlerinin mRNA miktarlarının ölçümü için dondurulmuş. 3. deneyde ise embriyolar ikinci deneydeki gibi yetiştirilmiş ancak kültür ortamına alınmamış. Birinci deneyin sonuçlarında GHR200, GHR800 ve GHR2000 arasında blastosit oluşum yüzdesi arasında bir fark görülmezken, GHR800' ün kontrol grubuna göre blastosit oluşumunu çok az baskıladığı görülmüş. İkinci deneyde GHR800N

grubunda, GHR800'e göre çok daha fazla blastosit oluşum yüzdesi görülmüş. 7 günlük gruplar arasında en yüksek oluşum yüzdesi GHR800N (Ghrelin hormonunun her gün tazelendiği kültür ortamı, 800 pg/ml konsantrasyonda) grubunda görülmüş. Üçüncü deneyde ise ghrelin büyük ölçüde blastosit oluşumunu baskılamış. Gruplar arasında, metabolizma genlerinin mRNA miktarlarında önemli farklılıklar bulmuşlar. Sonuçta ghrelin varlığında üretilen embriyoların kontrol gruplarına göre daha kaliteli olduğu sonucuna varmışlar. Erken embriyonik gelişimde, ghrelinin etkisini gösteren bu çalışmanın, daha detaylı çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varmışlar [60].

2.2.5 Sığır Ghrelin Geni ve Tek Nükleotid Polimorfizmleri

Çiftlik hayvanlarında ekonomik özellikler ile ilgili aday genler uzun süredir değerlendirilmektedir. Marker destekli seleksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere bu aday genlerdeki polimorfizmler kullanılmaktadır [62]. GHRL genindeki polimorfizmlerin tespit edilerek kantitatif özellikler ile ilişkilendirilmesi marker destekli seleksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere yararlı olacaktır.

Sığır ghrelin geni (GHRL), 22. kromozom üzerinde bulunmaktadır. 5 ekzon 4 intron içeren GHRL geni 5030 baz çiftinden (GenBank: AM691749.1) oluşmaktadır (Şekil 2.5). Sığır GHRL gen bölgesinde şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 608 TNP tespit edilmiştir. Bunlarda 57 tanesi kodlanan gen bölgesinde bulunan TNP' lerdir [61]. Sherman ve arkadaşları (2008), 464 Şerole, Angus ırkı ve Şerole X Angus melezi sığır üzerinde yaptıkları çalışmada GHRL geni C>T polimorfizminin (rs110968631), yemden yararlanma, büyüme ve karkas özellikleri üzerine ilişkisini incelemişlerdir. rs110968631 polimorfizmi, 22. kromozomda bulunan GHRL geninin, 4. intronu üzerindedir (Şekil 2.6) [61]. rs110968631 polimorfizminin yemden yararlanma ile çok az ilişkili olduğu, ancak karkas özellikleri ile bir ilişkisinin olmadığını bulmuşlardır. CC genotipinin frekansı 0,12 (8 hayvan) olarak çok düşük tespit edilmiş, bu sebeple allellerin baskınlığını incelemek mümkün olamamış. TT homozigot genotipin karkas ölçüleri üzerine pozitif etkisi görülmüş. GHRL geninin 4. intronunda bulunan bu C>T polimorfizminin (Şekil 2.6) aminoasit değişikliğine sebep olmayacağını, ancak ghrelin hormonunun aktivitesine etki eden başka bir TNP ile olan bağlantı dengesizliği neticesinde yemden yararlanma üzerine etkisini gösteriyor olabileceği sonucuna varmışlardır [62].



Şekil 2.5. Sığır GHRL geni [61]

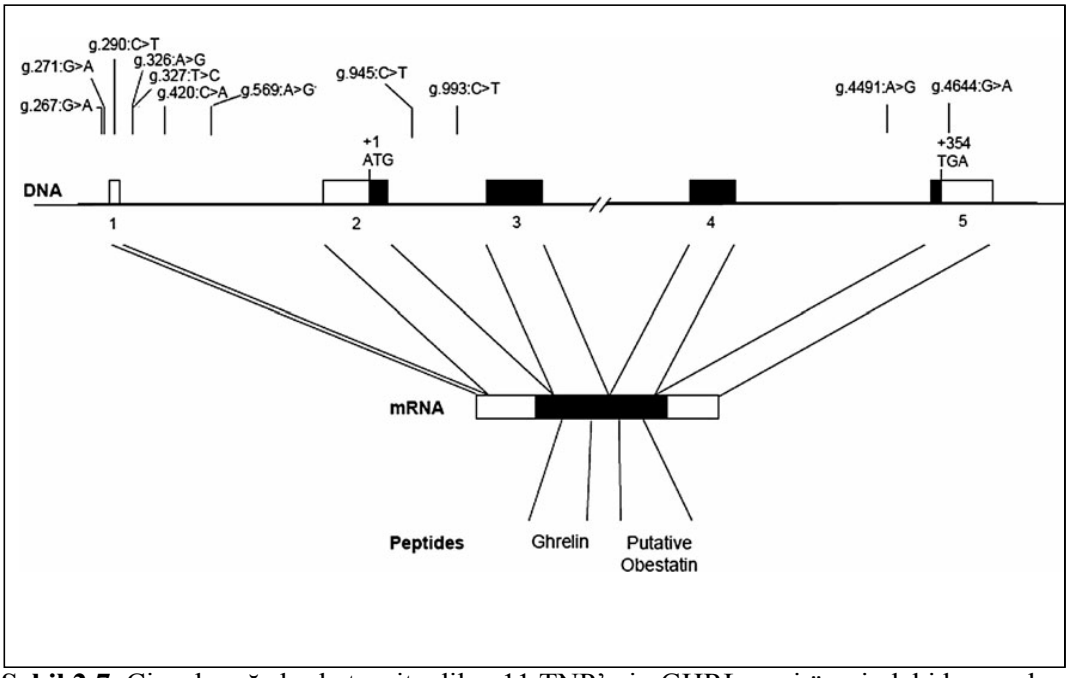


Şekil 2.6. rs110968631 Polimorfizmin GHRL geni üzerinde gösterilmesi [61]

Sun ve arkadaşları (2011) 1173 Çin sığırın doğum ağırlıklarını, vücut ağırlık, vücut uzunluk, sağrı yüksekliklerini, göğüs çevrelerini ve ortalama günlük kilo alımlarını farklı periyotlarda (6, 12, 18, 24 ay) kayıt altına almışlardır. GHRL geni üzerinde tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) analizi ile TNP' lerin yerlerini tespit etmişler ve sekans analizi ile hangi nükleotid değişikliklerinin olduğunu bulmuşlardır. Tablo 2.1'de bulunan TNP' ler ve frekansları belirtilmiştir. TNP' lerin gen üzerindeki yerleri Şekil 2.7' da şematize edilmiştir. Kayıt altına alınan kantitafif özellikler ile tespit edilen TNP' ler arasında yapılan ilişki analizleri neticesinde herhangi bir ilişki tespit edilememiştir [63].

Tablo 2.1. Çin Sığırlarında tespit edilen polimorfizmler ve frekansları [63]

TNP		Allele		Chinese Holstein		"	
		Max.	Min	Max.	Min	Max.	Min
50 UTR_12G>A	g.267	G	A	0.567	0.433	0.710	0.290
50 UTR_-8G>A	g.271	G	A	0.551	0.450	0.380	0.620
EX1_11C>T	g.290	C	T	0.370	0.630	0.570	0.430
IVS1+26A>G	g.326	A	G	0.697	0.303	0.640	0.360
IVS1+27T>C	g.327	T	C	0.697	0.303	0.640	0.360
IVS1+120C>A	g.420	C	A	0.079	0.921	0.050	0.950
IVS1+269A>G	g.569	A	G	0.551	0.449	0.380	0.620
IVS2+94C>T	g.945	C	T	0.829	0.171	0.950	0.050
IVS2+142C>T	g.993	C	T	0.829	0.171	0.950	0.050
IVS4+375A>G	g.4491	A	G	0.800	0.200	0.853	0.147
EX5_47G>A	g.4644	G	A	0.900	0.100	0.927	0.073



Şekil 2.7. Çin ırkı sığırlarda tespit edilen 11 TNP' nin GHRL geni üzerindeki konumları [63]

2.3. Yerli Bozırk Sığırı ve Önemi

Yerli ırk sığır yetiştiriciliği kırsal kesimdeki gelir düzeyi düşük olan halkın geçim kaynağı olma özelliğini devam ettirmektedir. Yerli ırk sığır yetiştiriciliği diğer kültür hayvan ırklarına kıyasla, sahiplerine fazla ekonomik külfet yüklemeden yetiştirilmekte ve yöredeki bitkisel doğal kaynakları verimli bir biçimde değerlendirebilme kabiliyetindedirler. Tükettikleri bitkisel kaynakları insan beslenmesinde önemi olan hayvansal kaynaklı proteinlere dönüştürürler. Kırsal kesimde yaşayan insanların hayvansal gıda ihtiyaçlarını da karşılamaktadırlar. Yerli sığır ırklarının süt verimleri çok düşük olduğundan et üretimi için yetiştiricilikleri öne çıkmıştır. İşletme içi damızlık dışı kalan yerli ırk sığırlar, genellikle kasaplık olarak değerlendirildikleri için sığır popülasyonu içindeki oranları gittikçe azalmaktadır. Boz sığır ırkının menşei zoolojik araştırmalara göre *Bos Taurus Primigenius*'un alt gurubuna girmektedir. İngilizce kaynaklarda Grey Steppe adı ile geçmektedir. Avrupa da yaşayan bazı yerel gri sığırların akrabası olduğuna inanılır. Bozırk sığır, Ukrayna'nın bozkır kökenli sığırıdır. Avrupa'da bu ırka benzer ve akraba olan ırklar EAAP-AGDB verilerine göre, Iskar Gri (Bulgaristan), İstrian (Hırvatistan), Dalmaçya Grisi (Hırvatistan), Slovenya podolian (Hırvatistan), Katerin (Yunanistan), Sykia

(Yunanistan), Macar Grey (Macaristan), Cinisara (İtalya), MareManna (İtalya), Podolicia (İtalya), Romen step (Romanya), Ukraynaca Grey (Ukrayna), İstrian (Yugoslavya) ırklarıdır. Trakya ve Marmara Bölgesi illerinde 1950'li yılların başlarında yaklaşık olarak 1-1.2 milyon baş Bozırk sığırın varlığı bilinmektedir. Bu gün ise bu sayı, saf Bozırklarda bin başın altında olduğu tahmin edilmektedir. Bozırklar önceleri Trakya, Güney Marmara, Kuzey Ege ve Orta Anadolu'nun Batısında yaygın olarak et, süt ve çeki hayvanı olarak yetiştirilmişlerdir. Giderek sayıları azalan Bozırk sığırların bağışıklık sistemi çok iyi gelişmiş olup, paraziter hastalıkların bulaşık olduğu meralarda tehlikesizce otlatılıp extansif yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bozırk Marmara bölgesinin tek yerli sığır ırkıdır. Trakya ve Batı Anadolu'da geçmiş yıllarda yaygın olarak yetiştirilmesine rağmen günümüzde saf Bozırk sayısı kesin bilinmemekte ve de yok olma tehdidi altındadır. Marmara Bölgesi ve Trakya'nın yüksek rakımlı, engebeli, ormanlık dar alanlarında ve az sayıda kalmıştır. Diğer ırklar ile melezleme çalışmaları ve veriminin düşüklüğü nedeniyle Bozırk yok olma tehtidi altındadır. Bilindiği gibi dağlık bölgelerdeki sığırlar ovalık bölgelerdeki hayvanlara nazaran cüsse itibarıyla genellikle daha küçüktürler. Kültür ırklarına göre küçük cüsseli yerli ırklar dik meyilli meralarda otlayabilmekte, dar ve tehlikeli patikalarda yürüyebilmektedirler. Dağlık arazinin kısıtlı yem durumu, hayvanın cüssesini küçültmektedir. Bozırkın yapısı, meralarda otlatma ve yetiştirme tarzına uygun gelişmiştir. Merayı kaplayan bitkilerin genel karakterleri de Bozırkın adaptasyonuna tesir etmiştir. Bozırk sığırlar; niteliksiz kaba yemlerden (sap ve saman vb.) kültür ırklarına göre daha iyi yararlanma kabiliyetinde olup oldukça gelişmiş bir sindirim sistemine sahiptirler. Her türlü olumsuz doğa ve iklim şartlarının yanında hastalık ve zararlılara karşı da oldukça dayanıklıdırlar. Doğada hiçbir insan müdahalesi olmadan yaşama, beslenme ve üreme yeteneğine sahiptirler. Kış dahil yılın tamamını doğada serbest sürüler halinde geçirirler. Yetiştiriciler bu yarı yabani hayvanlar için herhangi bir kesif yem vermezler, veteriner ve ilaç gibi sağlık giderleri de yok denecek kadar azdır. Tamamen ekstansif yetiştiricilik yöntemiyle buzağı ve et üretimine yönelik olarak yetiştirilirler. Erkekler genellikle iki yaşından sonra kurbanlık veya kasaplık olarak değerlendirilirler. Türkiye'de organik, bitkisel ve hayvansal ürünler üretimi, işlenmesi ve pazarlanması 22145 sayılı T.C. Resmi Gazetesinde "Bitkisel ve Hayvansal Ürünlerin Organik Metodlarla Üretilmesine İlişkin Yönetmelik" ile düzenlenmişti. Bu bağlamda, özellikle tarım, hayvancılık ve su

ürünlerinde, yerli türlerin ve geleneksel üretim biçimlerinin korunması ve geliştirilmesine ve özellikle de gen kaynaklarının kullanımına önem verilmelidir. Biyolojik kaynakların verimsiz ve yanlış kullanımı yoksulluğun hızla artmasına neden olmaktadır. Organik hayvancılık mevcut ekosistem içerisinde uygulanan alternatif bir modeldir. Tüketici talebine yönelik yüksek kaliteli, sağlıklı ve güvenilir organik hayvansal et ürünü üretiminde Gümüşhane-Kelkit'te ekolojik süt ve et sığırcılığı işletmeleri model alınabilir. Organik hayvansal üretim yapan yaklaşık 1.500 çiftçi ailesini kapsayan bu proje, Bozırk ve yetiştirildiği için Marmara Bölgesinin engebeli arazi ve meralarının değerlendirilmesinde model alınabilir [64].

2.4. Ghrelin Hormonunun Sığır Verim Özellikleri ile İlişkisi

Ghrelin hormonun, laktasyon dönemindeki sığırlarda GH salgılatarak beslenmeye bağlı süt verimini regüle ettiği [5], süt yağ içeriği ve sırt yağ kalınlığı ile ilişkili olduğu [59], vücut ağırlık kazancının kompozisyonu, karaciğer yağlaması ve yemden yararlanma [4], kuru madde alımı [6] ve erken embriyonik gelişimde [60] etkili olduğu bilinmektedir.

Irklar arasındaki aktif ghrelin ve aktif ghrelin/toplam ghrelin oranının farklı olması, genetik etkinin dolaşımdaki aktif ghrelin miktarı üzerine etkili olduğunu göstermektedir [6]. GHRL geni üzerindeki polimorfizmlerin tespit edilerek, aktif ghrelin hormonu konsantrasyonu ve sığır verim özellikleri ile ilişkilerinin tespiti önemlidir. rs110968631 C>T polimorfizminin yemden yararlanma ve karkas ölçüleri üzerine etkisi olduğu tespit edilmiştir [62]. Ancak şimdiye kadar GHRL geni ve hormonu üzerine yerli sığır ırklarımızda yapılmış bilinen bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bozırk sığırlarda GHRL geni üzerine yaptığımız çalışmayla ilgili genin rs110968631 polimorfik lokusundaki allel frekansları ve popülasyondaki genotipik frekansları belirlenerek, ileride yapılacak ıslah çalışmaları için araştırmamızın faydalı olacağı ve ırkın genotipik yapısını belirleme çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Örnekler

Tez çalışmasında, 2010-2011 yıllarında Keşan mezbahasında kesilen 75 Bozırk sığırdan alınan doku örnekleri üzerinde çalışılmıştır. Alınan doku örnekleri, çalışma başlayıncaya kadar, -20 ºC' de derin dondurucuda saklanmıştır. Örnekler üzerinde yapılan çalışmalar, Trakya Üniversitesi Keşan Meslek Yüksekokulu Biyoteknoloji ve Genetik Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.2. DNA Ekstraksiyon

Doku örneklerinden DNA ekstraksiyon işlemi, FujiFilm yarı otomatik DNA ekstraksiyon cihazı ve yine aynı markanın dokudan DNA ekstraksiyon kitleri kullanılarak, üretici talimatlarına uygun olarak yapılmıştır. DNA ekstraksiyonuna, 25 mg doku örneği ile başlanmış, kolonda toplanan DNA'lar 150 µl elüsyon sıvısı ile koleksiyon tüplerine toplanmıştır.

Ekstrakte edilen DNA miktarını hesaplamak için, ekstraktlardan 40 µl alınarak 960 µl ultraviyole saf su ile sulandırılmış, yani 1/25 oranında seyreltilmiştir. Seyreltinin optik dansitesi, "Thermo Spektonic Aquamate" spektrofotometre cihazı ile 260 nm' de iki defa ölçülerek ve ortalamaları alınmıştır. Ölçümlerde, 1 ml' lik küvet (Hellma Analytics) kullanılmıştır. 50 ng/µl konsantrasyondaki DNA' nın 260 nm' deki absorbansı 1 olması bilgisine dayanarak [65], 260 nm' de bulunan ortalama absorbans, seyreltmeden gelen 25 ve daha sonra 50 ile çarpılarak, 1 µl' de ki DNA miktarı ng olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar 75 örnek için yapılmıştır (Tablo 3.1).

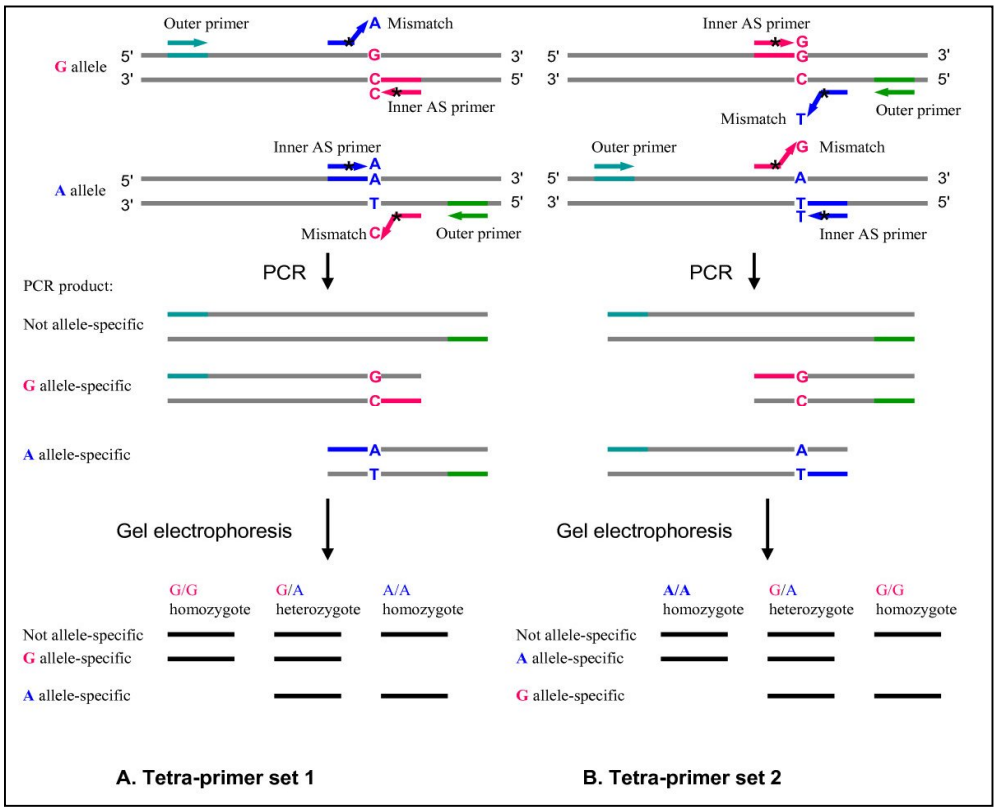
Ekstrakte edilen DNA' lar, spektrofotometrik ölçümleri yapıldıktan sonra çalışma yapılıncaya kadar -20 ºC' de derin dondurucuda saklanmıştır.

Tablo 3.1. DNA ekstraksiyonu yapılan 75 örneğin (ÖN) 260 nm' de ölçülen absorbans değerleri (OD) ve 1 µl' deki DNA miktarları.

ÖN	1.OD	2.OD	ng/ µl	ÖN	1.OD	2.OD	ng/ µl
1	0,031	0,024	34,375	39	0,028	0,028	35,000
2	0,018	0,021	24,375	40	0,017	0,026	26,875
3	0,013	0,014	16,875	41	0,019	0,029	30,000
4	0,019	0,015	21,250	42	0,028	0,039	41,875
5	0,011	0,012	14,375	43	0,019	0,017	22,500
6	0,017	0,01	16,875	44	0,011	0,016	16,875
7	0,015	0,011	16,250	45	0,015	0,013	17,500
8	0,022	0,015	23,125	46	0,023	0,023	28,750
9	0,030	0,028	36,250	47	0,026	0,028	33,750
10	0,019	0,022	25,625	48	0,032	0,027	36,875
11	0,028	0,035	39,375	49	0,035	0,038	45,625
12	0,037	0,033	43,750	50	0,013	0,014	16,875
13	0,026	0,034	37,500	51	0,015	0,019	21,250
14	0,020	0,027	29,375	52	0,022	0,011	20,625
15	0,023	0,033	35,000	53	0,023	0,027	31,250
16	0,014	0,017	19,375	54	0,039	0,033	45,000
17	0,033	0,016	30,625	55	0,018	0,012	18,750
18	0,038	0,027	40,625	56	0,014	0,014	17,500
19	0,021	0,016	23,125	57	0,016	0,011	16,875
20	0,023	0,017	25,000	58	0,017	0,009	16,250
21	0,033	0,029	38,750	59	0,008	0,011	11,875
22	0,036	0,030	41,250	60	0,019	0,017	22,500
23	0,020	0,014	21,250	61	0,038	0,041	49,375
24	0,018	0,014	20,000	62	0,024	0,028	32,500
25	0,018	0,008	16,250	63	0,028	0,033	38,125
26	0,014	0,015	18,125	64	0,036	0,024	37,500
27	0,040	0,033	45,625	65	0,033	0,034	41,875
28	0,025	0,020	28,125	66	0,011	0,017	17,500
29	0,018	0,013	19,375	67	0,027	0,021	30,000
30	0,015	0,015	18,750	68	0,029	0,019	30,000
31	0,044	0,041	53,125	69	0,036	0,028	40,000
32	0,021	0,021	26,250	70	0,011	0,016	16,875
33	0,030	0,028	36,250	71	0,021	0,017	23,750
34	0,019	0,019	23,750	72	0,016	0,023	24,375
35	0,041	0,042	51,875	73	0,025	0,030	34,375
36	0,029	0,031	37,500	74	0,024	0,028	32,500
37	0,023	0,028	31,875	75	0,015	0,019	21,250
38	0,033	0,040	45,625				

3.3. ARMS-PCR Metodu

ARMS-PCR metodu ilk defa Newton ve arkadaşları (1989) [66] tarafından, tek nokta mutasyonları ve küçük delesyonları tespit etmek için tasarlanmıştır. Temel olarak, iki farklı DNA kalıbı (mutant ve doğal) için tasarlanmış iki farklı primer ile yapılan amplifikasyon sonucu, ürün oluşumuna göre genotipin tespit edildiği bir metottur (Şekil 3.1). Mutasyonun bulunduğu bölgeyi sınırlayan dış primerler (outer) ve allel spesifik primerler (inner) ile yapılan PCR sonrası, herhangi bir işleme gerek kalmadan ürünlerin jel elektroforezinde koşturulması ile genotip tespiti yapılabilmektedir.



Şekil 3.1. ARMS-PCR metodunun şematize edimiş anlatımı [67].

3.3.1. Primer Tasarımı

rs110968631 TNP ilk olarak Sherman ve ark. [62] tarafından DNA dizi analizi ile tespit edilmiştir. rs110968631 TNP üzerine literatürde başka herhangi bir çalışmaya ulaşılmamıştır. Çalışmamız için rs110968631 TNP' ni belirlemeye özgü primerler tasarlanmış ve bunlar ile ARMS-PCR ve PCR-RFLP metotları karşılaştırılmıştır.

Primer tasarımı için "Primer1" [68] programı kullanılmıştır. 332. nükleotidi polimorfik olan, 664 bç' lik dizi (Şekil 3.2), programa girildi (Şekil 3.3). Programa polimorfik nokta ve primerler için istenilen özellikler girildikten sonra, 10 adet primer seti çıktı alındı. Primer1 programından çıktısı alınan primer setlerinden, Tablo 3.2' de belirtilen 4 primer, "OligoAnalizer 3.1" [69] ve "NCBI Blast" [70] programları ile değerlendirildikten sonra seçildi

Tablo 3.2. ARMS-PCR metodu için tasarlanan primer seti ve ürün boyutları.

Primer kodu	Primer dizisi	Ürün Boyutu (bç)
Fİ	Forward inner primer (T allele) GCACGGGTTTGATCCCTTGT	265
Rİ	Reverse inner primer (C allele) CGTGGGGATCTTAAGTTCCCAAG	198
FO	Forward outer primer AGAGCTTCTGAGGGTGGGAGAAC	420
RO	Reverse outer primer AAGAGTCGTCACTCAGTACCCGTG	

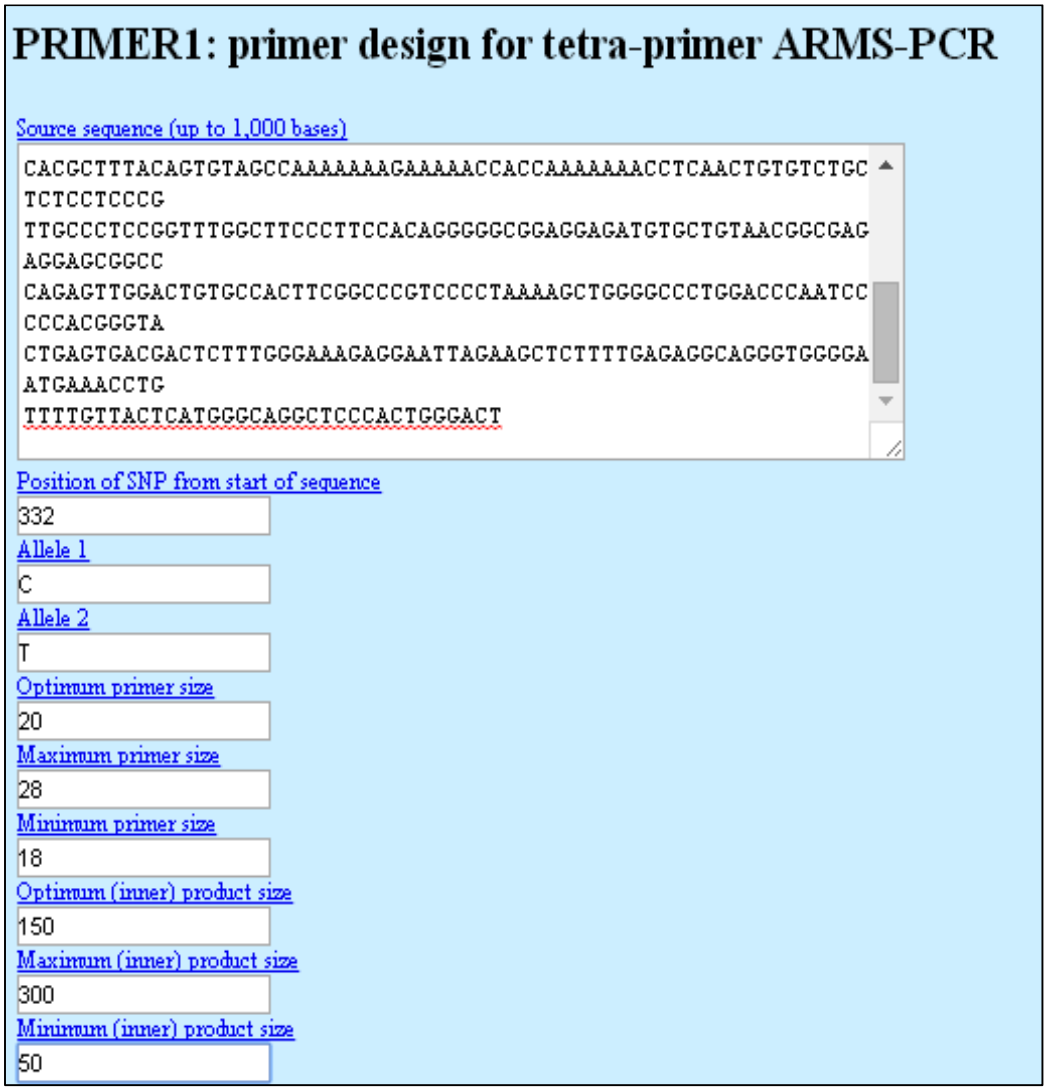
Tablo 3.2' de verilen primerler ile yapılan PCR sonrası, incelenen örnek, homozigot TT genotipine sahip olduğunda, agaroz jel elektroforezinde Fİ, RO primerlerinin oluşturacağı 265 bç' lik ürün ve FO, RO primerlerin oluşturacağı 420 bç' lik ürünün görülmesi beklenilmektedir. Örnek, homozigot CC genotipine sahip olduğunda ise, Rİ, FO primerlerinin oluşturacağı 198 bç' lik ürün yanından yine FO ve RO primerlerinin oluşturacağı 420 bç' lik ürün beklenilmektedir. Örneğin heterozigot olması durumunda ise 198, 265 ve 420 bç' lik ürünlerin oluşması beklenilmektedir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. ARMS-PCR metodu, agaroz jel elektroforezinde görüntülenen ürünler ile genotip teşhisi

Genotip	Primerler	Ürün
Homozigot TT	Fİ-RO FO-RO	265 420
Homozigot CC	Rİ-FO FO-RO	198 420
Heterozigot CT	Fİ-RO Rİ-FO FO-RO	265 198 420

TGCGGGGGCGCGTTGGTTTTCATTGAAATGTGAAATTTCTGTCTTTGGTGAAATAAACATTTTGAACCTT
TGCATCCATCTGAGCATTTATTCACTGCCTACTCTAGTACCCCTCAGAGCCCCACGTGGTCTCGGAAGTG
TCCCGGAAGCCAGGTGAGAGCTTCTGAGGGTGGGAGAACGGACAGGTGGTTGGTCCCAGGGCCACTCACT
CGTTAGCCAGGGTTTCTGAAACGCAAGAGGTCAAGTCAAAGAGCTGTGTCCGGGACTTCCCTGGCGGTCC
ACTGGTTAAGACTCCATGCTTCCACTACAGGGGCACGGGTTTGATCCCTGGCTGGGGAACTTAAGATCCC
CACGCTTTACAGTGTAGCCAAAAAAAGAAAAACCACCAAAAAAACCTCAACTGTGTCTGCTCTCCTCCCG
TTGCCCTCCGGTTTGGCTTCCCTTCCACAGGGGGCGGAGGAGATGTGCTGTAACGGCGAGAGGAGCGGCC
CAGAGTTGGACTGTGCCACTTCGGCCCGTCCCCTAAAAGCTGGGGCCCTGGACCCAATCCCCCACGGGTA
CTGAGTGACGACTCTTTGGGAAAGAGGAATTAGAAGCTCTTTTGAGAGGCAGGGTGGGGAATGAAACCTG
TTTTGTTACTCATGGGCAGGCTCCCACTGGGACT

Şekil 3.2. Primer1 programına girilen 664 bç'lik bölgenin sekansı. Polimorfik nükleotid kırmızı ile renklendirilmiştir.



Şekil 3.3. ARMS-PCR çalışması primer tasarımında Primer1 programına veri girişi.

3.3.1.1. Seçilen Primer Setinin Uygunluğunun Kontrolü

Dizayn edilen dış ve iç primerlerin mevcut tek nokta polimorfizmini tespit etmelerinin yanında; hetero dimer, self dimer ve saç tokası oluşturmamaları, guanin-sitozin (GC) içeriklerinin %40-60 arasında olması, tasarlanan 4 primer arasındaki erime sıcaklık (Tm) farklarının 4 ºC' den büyük olmaması, uzunluklarının 18-24 nükleotid olması gibi genel şartları sağlaması gerekmektedir [71]. Bu özellikler "OligoAnalizer 3.1" programı ile kontrol edilmiştir.

2 mM Mg^{++}, 0,2 mM her dNTP içeren PCR karışımında primerlerin özellikleri Tablo 3.4'te verilmiştir. Primerlerin, PCR sıcaklıklarında hetero ve self dimer, saç tokası yapısı oluşturmadıkları ve Tm, uzunluk, GC içeriği bakımından uygun oldukları görülmüştür.

Tablo 3.4. Tasarlanan primerlerin erime sıcaklıkları, uzunlukları ve GC içerikleri

Primer Kodu	Tm (ºC)	Uzunluk	% GC
Fİ	61,5	20	55,0
Rİ	61,4	23	52,2
FO	63,8	23	56,5
RO	63,9	24	54,2

3.3.1.2. Seçilen Primer Setinin Özgünlüğünün Kontrolü

Kullanılacak primerlerin, incelenecek bölge haricinde farklı gen bölgelerine bağlanmaması gerekmektedir. Alınan sonuçların doğruluğu ve PCR başarısı için özgünlük çok önemlidir. Seçilen primerlerin özgünlüğü, NCBI Blast programında incelenmiş ve *Bos taurus* türünde GHRL geninin ilgili bölgesi hariç genomda farklı bir bölgeyle uyuşmadıkları görülmüştür.

3.3.2. PCR Optimizasyonu

Kullanılan bileşenlerin, sıcaklık ve sürenin PCR için optimum miktarda olması, reaksiyonu inhibe edecek bileşenlerin uzaklaştırılması, kontaminasyon riskinin en aza indirilmesi elde edilen sonuçların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği için önemlidir. Verimli sonuç almak için dNTP, Mg^{++}, DNA polimeraz enzimi, primerler ve tampon çözeltisi konsantrasyonlarının iyi ayarlanmasının yanında, primerlerin bağlanma

sıcaklıkları ve döngü sayıları için optimumların, klasik PCR ile yapılan testler sonucunda bulunması ile örneklerin çalışılmasına geçilmiştir [72].

3.3.2.1. PCR Karışımı

Araştırmamızda, tüm PCR' lar için, Fermantas marka "PCR Mastermix (2x) – K0171" hazır PCR karışımı üreticinin talimatlarına uygun olarak kullanıldı. Böylece karışım hazırlanması esnasında meydana gelebilecek kontaminasyonları ve kullanıcı kaynaklı pipetleme hatalarını en aza indirgemiş olduk. Kullanılan ticari karışımın içeriği; 0,05 U/µl *Taq* DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, 4 mM $MgCl_2$, her bir dNTP'den 0,4 mM şeklindedir.

Tam PCR karışımına dahil olan mastermix, primer, örnek DNA, su miktarları Tablo 3.5' te belirtilmiştir. Outer primerlerin allel seçici özelliği olmaması nedeni ile miktarları 5 pmol olarak ayarlanmışken, inner primerler 10 pmol olarak reaksiyon karışımına dahil edilmiştir. 50 pmol örnek DNA ve 4,5 µl su karışıma katılmıştır.

Tablo 3.5. ARMS-PCR için kullanılan PCR karışımının içeriği.

Miktar	İçerik
12,5 µl	Mastermix (Fermantas)
0,5 µl	Outer Forward Primer (5 pmol)
0,5 µl	Outer Reverse Primer (5 pmol)
1 µl	Inner Forwar Primer (10 pmol)
1 µl	Inner Reverse Primer (10 pmol)
5 µl	Örnek DNA (50 pmol)
4,5 µl	Nükleaz İçermeyen Su (Fermentas)
Toplam hacim; 25 µl	

Deney, ekstrakte edilen DNA' lardan PCR karışımına 50 pmol eklenecek şekilde tasarlanmıştır. Bu sebeple, daha önce ekstraktlarda hesaplanan DNA miktarı (Tablo3.1.) 10 pmol/µl olacak şekilde, ultraviyole saf su ile seyreltilmiştir (Tablo 3.6). Ekstrakte edilen DNA'lardan 20 µl alınmış, son konsantrasyonda 10 pmol/µl DNA içermesi için üzerine eklenmesi gereken su miktarı "$M_1xV_1=M_2xV_2$" formülü ile hesaplanmıştır.

Tablo 3.6. Ekstrakte edilen DNA konsantrasyonunun 10 pmol/µl' ye ayarlanması

Örnek Numarası	10 pmol/µl İçin Eklenecek Su Miktarı (20 µl üzerine)	Örnek Numarası	10 pmol/µl İçin Eklenecek Su Miktarı (20 µl üzerine)
1	24,375	39	25,000
2	14,375	40	16,875
3	6,875	41	20,000
4	11,250	42	31,875
5	4,375	43	12,500
6	6,875	44	6,875
7	6,250	45	7,500
8	13,125	46	18,750
9	26,250	47	23,750
10	15,625	48	26,875
11	29,375	49	35,625
12	33,750	50	6,875
13	27,500	51	11,250
14	19,375	52	10,625
15	25,000	53	21,250
16	9,375	54	35,000
17	20,625	55	8,750
18	30,625	56	7,500
19	13,125	57	6,875
20	15,000	58	56,875
21	28,750	59	1,875
22	31,250	60	1,750
23	11,250	61	39,375
24	10,000	62	22,500
25	6,250	63	28,125
26	8,125	64	27,500
27	35,625	65	31,875
28	18,125	66	7,500
29	9,375	67	20,000
30	8,750	68	20,000
31	43,125	69	30,000
32	16,250	70	6,875
33	26,250	71	13,750
34	13,750	72	14,375
35	41,875	73	24,375
36	27,500	74	22,500
37	21,875	75	11,250
38	11,250		

3.3.2.2. Gradient PCR ile Optimum Bağlanma Sıcaklığının Bulunması

PCR çalışmaları için tasarlanmış bilgisayar programları, reaksiyona girecek bileşiklerin miktarlarını ve primerlerin bağlanma sıcaklıklarını hesaplama konusunda bize fikir verse de, çalışılan laboratuvar koşullarında optimum bağlanma sıcaklıklarının bulunması için gradient PCR çalışmasının yapılması gerekmektedir. 96 kuyucuklu bir PCR cihazında, aynı anda 12 farklı bağlanma sıcaklığını değerlendirmek mümkündür. Biz OligoAnalyzer 3.1 programı ile yaptığımız değerlendirmede Fİ, Rİ, FO, RO primerleri için bağlanma sıcaklıklarını sırasıyla; 61,5 ºC, 61,4 ºC, 63,8 ºC, 63,9 ºC olarak tespit ettik. Bu sıcaklıkları ortaya alarak, 55-66 ºC' ler arasında, Tablo 3.5'te verilen PCR karışımı içeriğini kullanarak ve Tablo 3.7'de verilen PCR protokolünü kullanarak gradient PCR çalışmasını gerçekleştirdik. Agaroz jel elektroforezinde koşturulan PCR ürünlerinin görüntülenmesi sonucunda 3 farklı boyuttaki bandın elde edilmesi için en uygun bağlanma sıcaklığının 61 ºC olduğunu tespit ettik (Şekil 3.4).

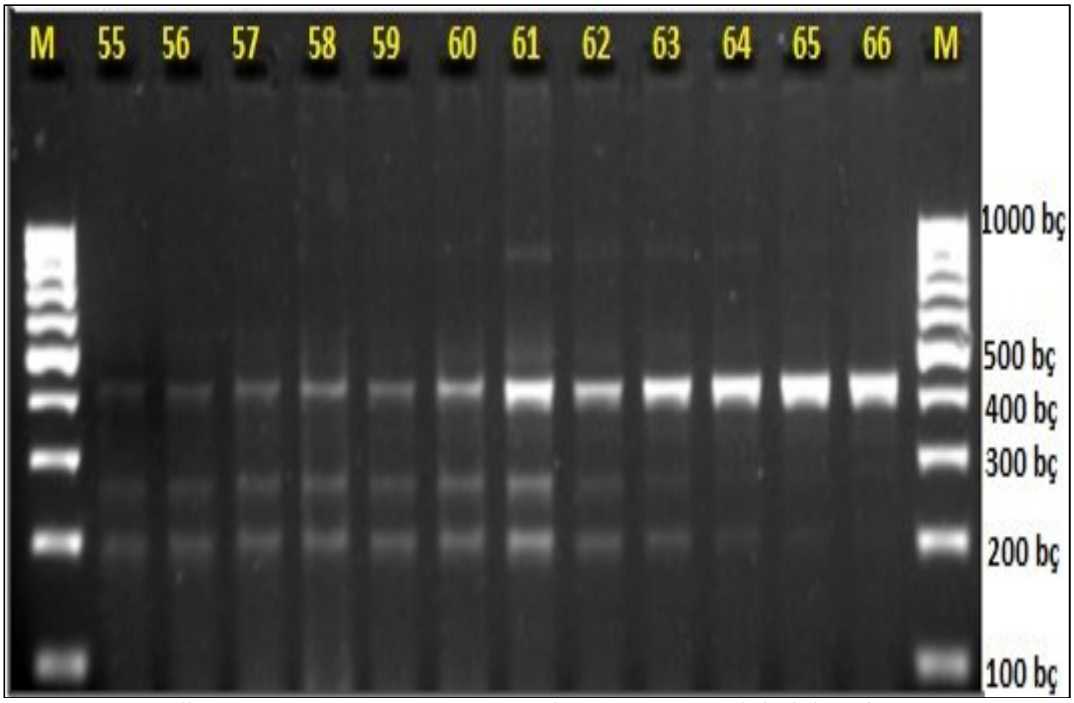
Tablo 3.7. Gradient ARMS-PCR çalışmasında uygulanan PCR protokolü.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 ºC	10 dakika	1
95 ºC	30 saniye	30
55-66 ºC	30 saniye	
72 ºC	30 saniye	
72 ºC	10 dakika	1

3.3.2.3 Gradient PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforezi (AJE) çoğaltılan DNA fragmentlerinin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlar. Elektrik akımı altında DNA fragmentleri eksiden artıya doğru hareket eder. Molekül ağırlığı büyük fragmentlerin küçük fragmentlere göre daha yavaş hareket ettiği esasına dayanır.

ARMS PCR ürünlerini %2'lik AJE' de yürüterek görüntüledik (Şekil 3.4). Jel hazırlanmasında "Sigma-Aldrich- A7431" marka agaroz, "Merck 1.11608.0030" marka etidyum bromid ve "Multicell" marka 10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) tamponu



Şekil 3.4. Gradien (55-66 ºC) ARMS-PCR çalışması, agaroz jel elektroforez görüntüsü.

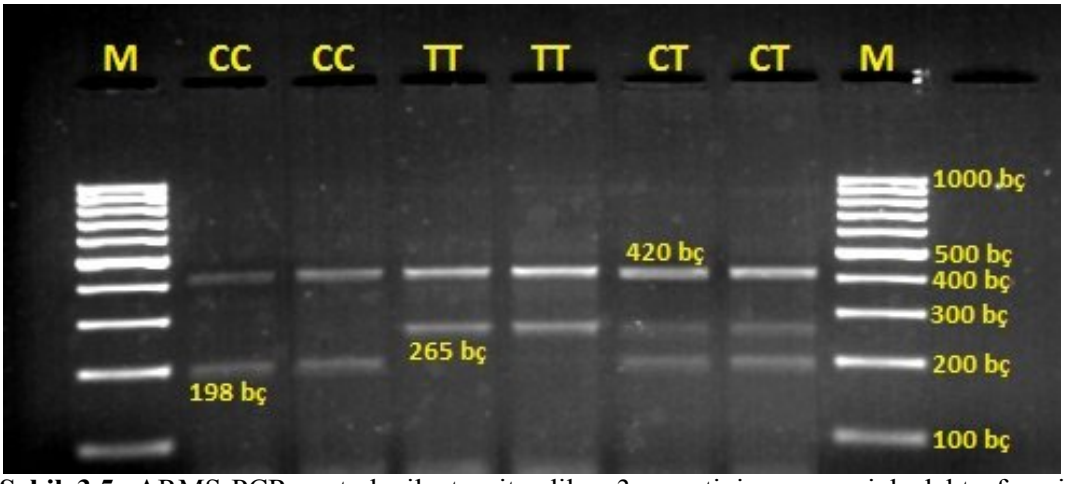
kullandık. Elektroforez tankı olarak "Thermo OWL A2", güç kaynağı olarak ise "Thermo EC 300 XL" kullandık.

150 ml, %2' lik agaroz jel hazırlandıktan sonra, 5 µl Etidyum Bromid (10 mg/ml) katılarak katılaşması için tanka dökülmüştür. 0,5 X, 1 litre TBE tamponun tanka eklenmesinin ardından, her bir PCR ürününden 20 µl kuyucuklara yüklenmiştir. İlk ve son kuyucuklara 100 bç' lik DNA marker (Fermentas SM0241) 10 µl yüklenmiştir. 180 volt altında 60 dakika koşturulan örneklerin fotoğrafları "DNR Minibis Pro" marka görüntüleme sistemi ile çekilmiştir.

Çalışma neticesinde allel spesifik bantların ve dış primer bandının en verimli (belirgin) şekilde oluştuğu sıcaklığın 61 ºC olduğu görülmüştür.

3.3.3. Örneklerin ARMS-PCR Metodu ile Çalışılması

75 sığır örneğinden izole edilen DNA' ların konsantrasyonu 10 pmol/µl olacak şekilde ayarlandı. Tablo 3.5'deki PCR karışımı ve Tablo 3.7'deki protokol (bağlanma sıcaklığı 61 ^{0}C) uygulanarak ARMS-PCR işlemi gerçekleştirildi. Bölüm 3.3.2.3.'te belirlenen agaroz jel elektroforezi şartlarına uygun olarak sonuçlar görüntülendi. Çalışmamız sonucunda, örneklerde 3 farklı genotipide görüntüledik (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. ARMS-PCR metodu ile tespit edilen 3 genotipin agaroz jel elektroforezi görüntüleri.

3.4. PCR-RFLP Metodu

TNP' ler restriksiyon enzimleri için farklı kesim bölgeleri oluşturur. PCR-RFLP metodu, restriksiyon enzimleri ile kesim işlemine tabi tutulan, mutant ve doğal tipteki DNA fragmentinden farklı büyüklüklerde bantlar elde edilmesi esasına dayanır [73]. Enzim ile kesilen amplifiye edilmiş DNA fragmentleri, agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezinde koşturularak molekül ağırlıklarına göre ayrılır.

3.4.1. Primer Tasarımı

PCR-RFLP metodu için primer tasarlanırken, kesim sonrası oluşan fragmentlerin, jel elektroforezinde koşturulduktan sonra birbirleriyle çakışmayacak bantlar oluşturacak büyüklükte olmalarına dikkat edilmelidir. Çalışmamızda ARMS-PCR için primer tasarlaken, outer primerlerin aynı zamanda PCR-RFLP metodu için de kullanılabilir olmasına dikkat ettik. Dolayısıyla ARMS-PCR için tasarımı yapılmış olan Tablo 3.2' deki outer forward (OF) ve outer reverse (OR) primerler, PCR-RFLP metodu içinde kullanılmıştır.

3.4.2. Allellerin Ayrımını Sağlayacak Restriksiyon Endonükleaz Enziminin Tespiti

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, DNA dizilimlerini özgün olarak tanıyan, bu dizilimlerden veya dizilimlere yakın bölgelerden DNA' yı kesen enzimlerdir. Ancak optimum şartlar sağlanmadığı zaman, RE enzimleri spesifik olmayan, benzer bölgelerden de kesim yapabilmektedir. Bu özelliğe star aktivitesi

denilmektedir [74]. Kullanılacak enzimin, star aktiviteye sahip olup olmadığı bilinmeli ve buna göre önlem alınmalıdır.

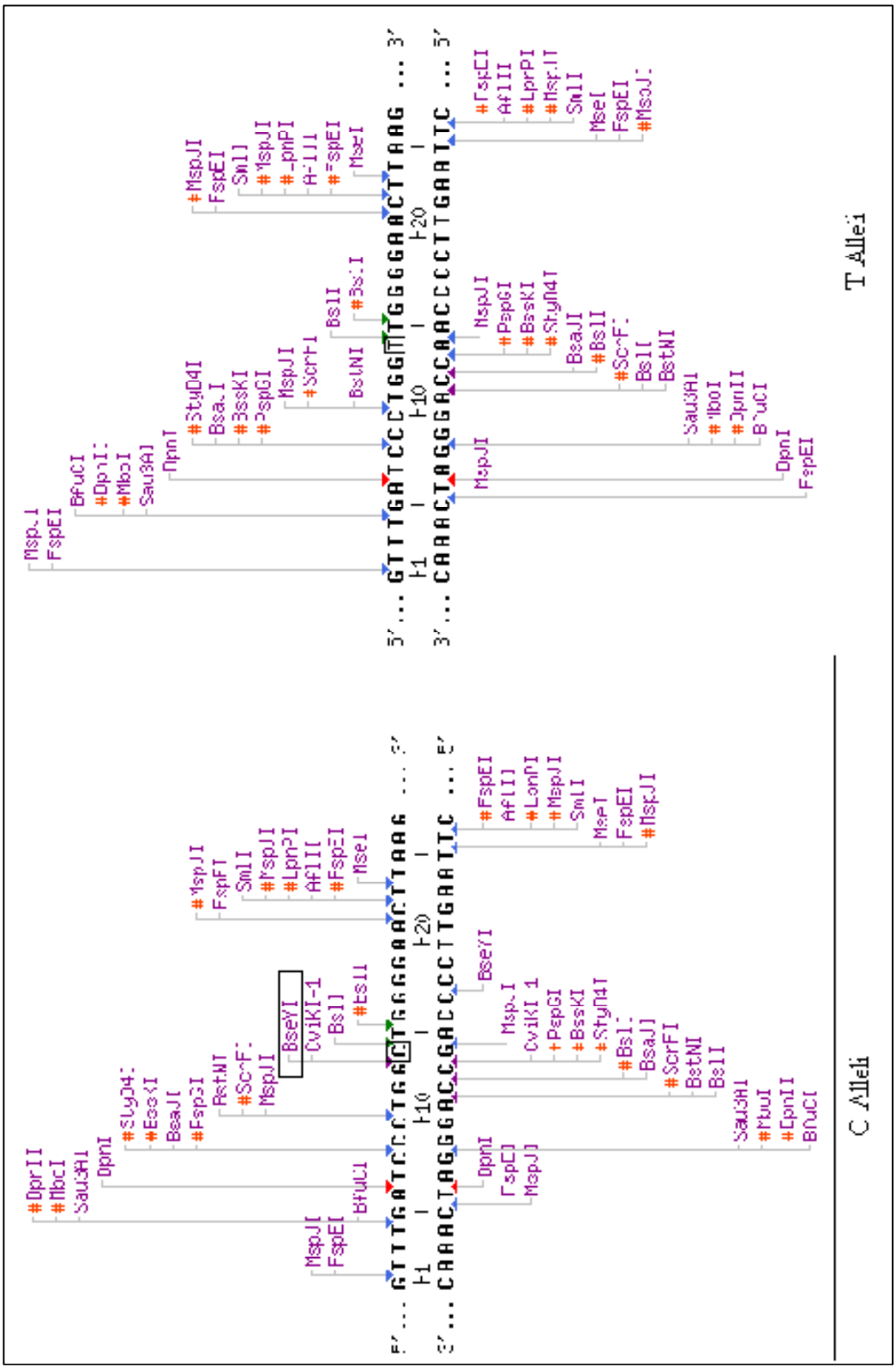
PCR-RFLP metodunda kullanılacak RE enziminde aradığımız özellik, bir allelin bulunduğu bölgeden kesim yaparken diğer alleli kesmemesidir. Bu özelliği taşıyan enzimin tespiti amacıyla, rs110968631 C>T polimorfizmini içeren 30 nükleotidlik gen bölgesi, ilk önce C alleli için, daha sonra T alleli için olmak üzere NEBcutter V2.0 [75] programına kopyalanıp, restriksiyon enzimi kesim haritaları elde edildi (Şekil 3.6). Kesim haritaları üzerindeki inceleme neticesinde, *Bse*YI restriksiyon endonükleaz enziminin C allelini keserken, T allelini kesmediği tespit edildi. Bulunan enzimin kontrol edilmesi amacıyla, iki alleli içeren sekanslar sırasıyla RestrictionsMapper [76] (Şekil 3.7) programına kopyalanarak sonuçlar kontrol edilmiştir.

FO ve RO primerleri ile çoğaltılan gen bölgesi, *Bse*YI enzimi ile kesildiğinde; C allelini içeren 420 bç' lik fragmentin, 175 ve 373. noktalardan kesildiği ve 175, 198, 47 bç' lik fragmentler oluşturduğu görüldü. T alleli için ise 373. noktada tek kesim bölgesi olduğu, 373 ve 47 bç'lik 2 fragment oluşturduğu görüldü. Genotip tayini için fragment büyüklükleri Tablo 3.8' da verilmiştir.

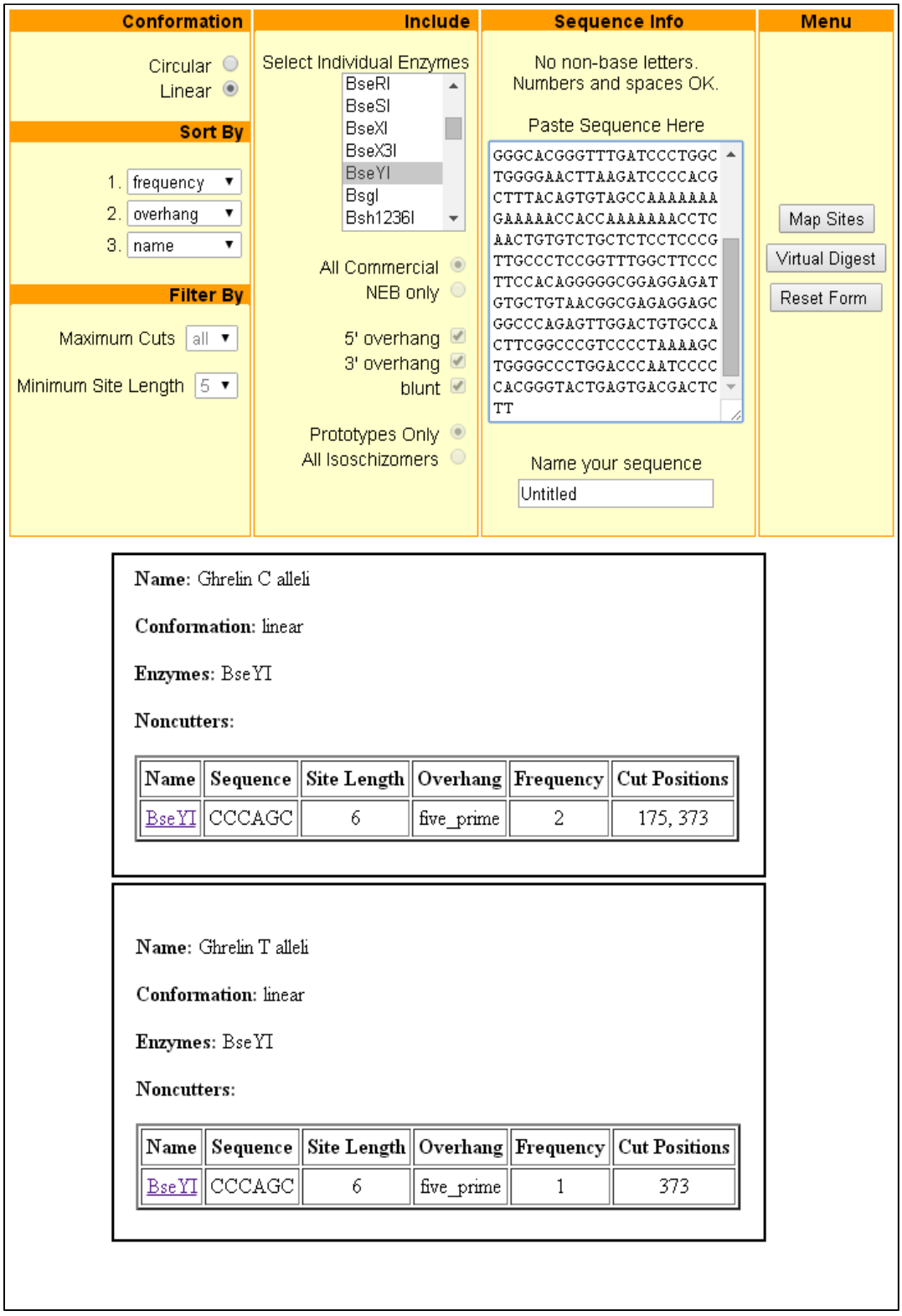
Çalışma için uygun olduğu tespit edilen *Bse*YI (R0635S-New England BioLabs) enzimi, kullanıma hazır ticari olarak temin edilmiştir. Enzim konsantrasyonu 5 U/µl'dir. Enzim ile beraber, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 1 mM dithiothreitol, 100 µg/ml BSA içeriğine sahip 10X reaksiyon tamponu alınmıştır.

Tablo 3.8. Çoğaltılan fragmentin *Bse*YI enzimi ile kesimi sonrası, allel ve genotiplere göre fragment boyutları.

ALLEL	**FRAGMENT (bç)**
C	**47, 175,198**
T	**47, 373**
GENOTİP	**FRAGMENT (bç)**
CC	**47, 175,198**
TT	**47, 373**
CT	**47, 175, 198, 373**



Şekil 3.6. rs110968631 polimorfizmi C ve T allellerinin NEBCutter V2.0 [75] programından alınan restriksiyon endonükleaz enzimi kesim haritası



Şekil 3.7. FO ve RO primerleri ile çoğaltılan gen bölgesinin *Bse*YI enzimi ile kesim noktalarının RestrictionsMapper [76] programı ile doğrulanması.

3.4.3. PCR-RFLP Metodu İçin PCR Optimizasyonu

Tablo 3.2' de verilen OF ve OR primerleri kullanılarak, Tablo 3.9' da verilen PCR karışımı hazırlanmış ve Tablo 3.10' de verilen PCR protokolüne göre amplifikasyon yapılmıştır. Ürünler, agaroz jel elektroforezinde koşturularak amplifikasyon sonucu kontrol edilmiş, 420 bç' lik ürünün elde edildiği görülmüştür (Şekil 3.8).

Tablo 3.9. PCR-RFLP metodu için kullanılan PCR karışımının içeriği

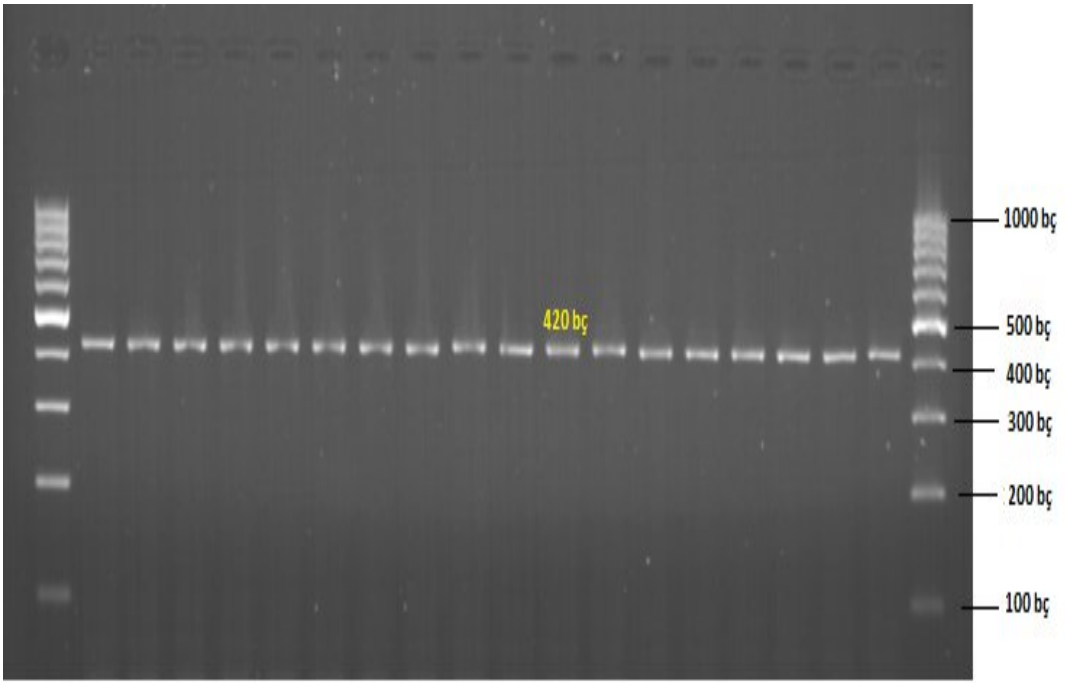
Miktar	İçerik
12,5 µl	Mastermix (Fermantas)
0,5 µl	Outer Forward Primer (5 pmol)
0,5 µl	Outer Reverse Primer (5 pmol)
5 µl	Örnek DNA (50 pmol)
6,5 µl	Nükleaz İçermeyen Su (Fermentas)
Toplam hacim; 25 µl	

Tablo 3.10. RCR-RFLP metodu için PCR protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 ºC	10 dakika	1
95 ºC	30 saniye	30
63 ºC	30 saniye	
72 ºC	30 saniye	
72 ºC	10 dakika	1

3.4.4. PCR Ürünlerinin *Bse*YI Enzimi ile Kesilmesi

*Bse*YI enzimi (New England Biolabs R0635S), üreticinin talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. Star aktivesinden korunmak için, RE enziminin hacminin, toplam

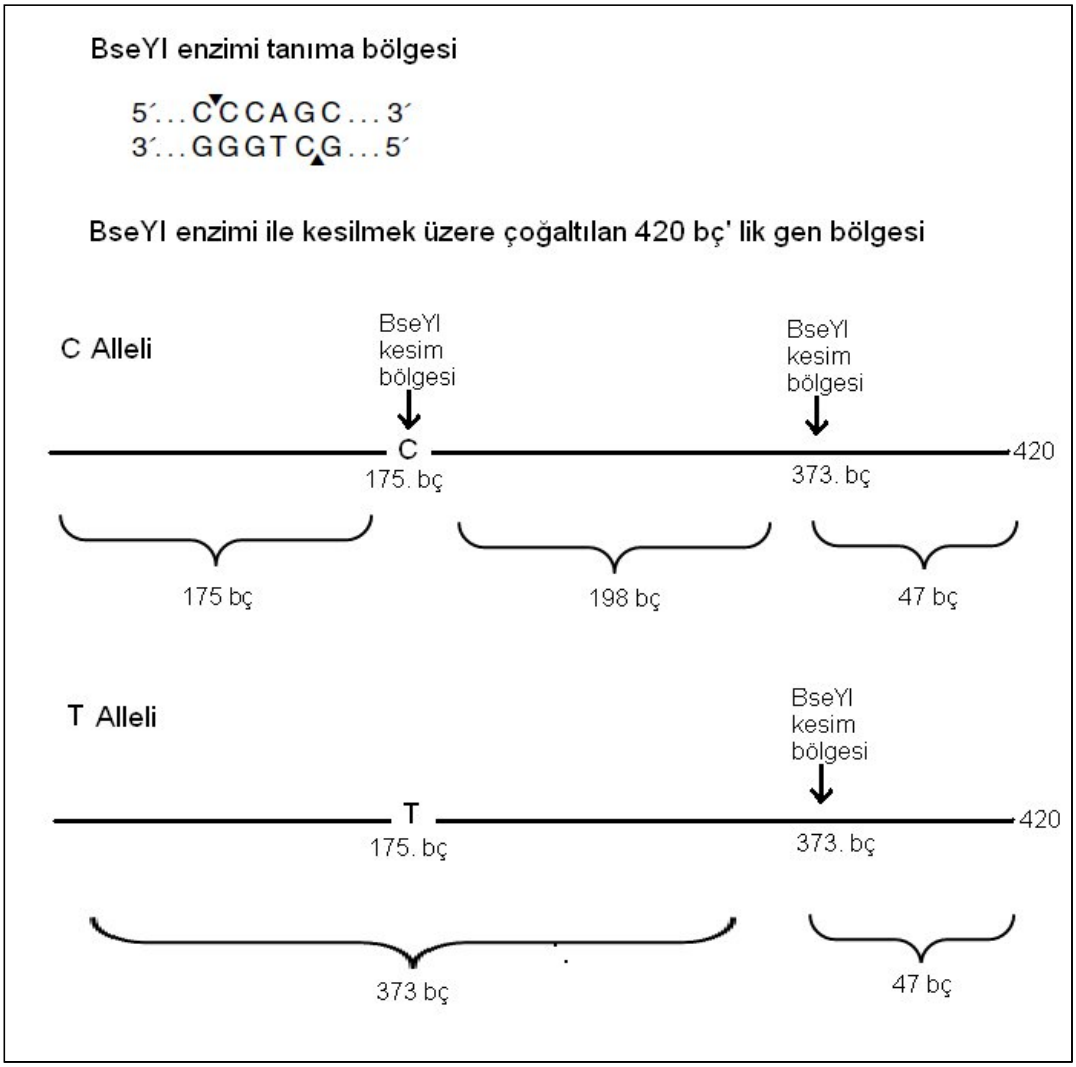


Şekil 3.8. RFPL analizi için çoğaltılan 420 bp'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

reaksiyon hacmine oranının %10'u geçmemesine dikkat edilmiştir. PCR ürünü, enzim ve reaksiyon tamponu Tablo 3.11'de verilen miktarlarda karıştırılarak, 37 ºC' de 16 saat inkübe edilmiştir. *Bse*YI enziminin tanıdığı bölge ve 420 bç'lik çoğaltılan bölgede kesim noktaları şekil 3.9' da gösterilmiştir.

Tablo 3.11. PCR ürünlerinin *Bse*YI enzimi ile kesildiği reaksiyon karışımı

İÇERİK	MİKTAR
*Bse*YI Enzimi (5 U/ µl)	2 µl
Reaksiyon Tamponu (1X)	5 µl
PCR Ürünü	20 µl
Su (Moleküler saflıkta)	23 µl
Toplam Hacim	50 µl

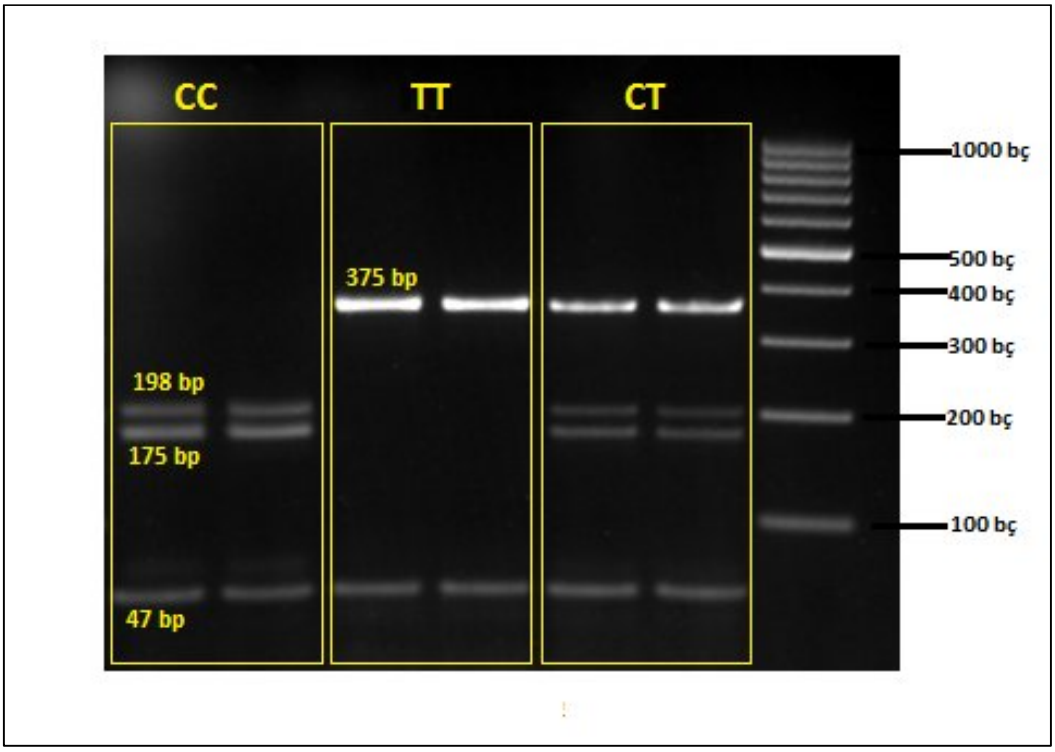


Şekil 3.9. *Bse*YI enzimi tanıma bölgesi ve kesim sonrası oluşan ürün boyutları

3.4.5. Restriksiyon Enzimlerinin Sindirimi Sonucu Oluşan Ürünlerin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi

*Bse*YI enzimi, kesim sonrasında elektroforez işlemi esnasında DNA'ya bağlı kalabilmektedir. Elektroforezde DNA'nın hareket hızını değiştirebileceğinden üreticinin talimatları doğrultusunda DNA'yı enzimden arındırmak için son konsantrasyonda % 0,5 olacak şekilde sodyum dodesil sülfat eklenmiştir.

% 2' lik hazırlanan 150 ml agaroz jele (3 g agaroz, 150 ml 0,5 X TBE) , RE enzimi ürünleri 20 µl yüklendikten sonra, 170 V elektrik akımı altında, 60 dakika yürütülmüştür. Daha sonra jel görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. *Bse*YI enzimi kesim ürünlerinin agaraoz jel elektroforezi görüntüsü

3.5. Örneklerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Belirlenen allel ve genotipler Popgene32 versiyon 1.3.1 [77] programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Populasyondaki allel gen ve genotip frekansları Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı $p<0,05$ önem seviyesine göre tartışılmıştır.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Bozırk Sığırlarda rs110968631 C>T Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

Örnek alınan 75 baş Bozırk sığırda, ARMS-PCR ve PCR-RFLP metotları ile yapılan rs110968631 C>T polimorfizm taraması sonucunda, örneklerden 65 tanesinin TT, 9 tanesinin CT ve 1 tanesinin CC genotipine sahip olduğu tespit edildi. Genotipleri belirlenen Bozırk sığırların verileri, PopGene32 version 1.31 [77] programına yüklenerek allel ve genotip frekansları hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Bozstep ırkı sığırlarda rs110968631 C>T polimorfizmi allel ve genotip frekansları

Örnek sayısı	Allel Frekansları		Genotip Frekansları		
	C	T	CC	CT	TT
75	0,0733	0,9267	0,0054	0,1358	0,8588

Bozırk sığırlarda C alleli frekansı 0,073 olarak tespit edildi. Sherman ve arkaşlarının (2008), yaptıkları çalışmada C allel frekansı, Angus ırkı sığırlarda 0,15, Şerole ırkı sığırlada 0,12, Şerole X Angus melerinde ise 0,06 olarak bildirilmiştir. Araştırma sonuçlarımız, Şerole X Angus melezleri ile yakınlık göstermektedir. Karkas ölçüleri üzerine olumlu etkisi olduğu bilinen T allelinin [62] frekansı Bozırk sığırlarda 0,9267 dir. Bu durum ırkın genotipik değeri açısından olumlu bir özellik olarak değerlendirilmelidir.

Bozırk örnek popülasyonda rs110968631 C>T polimorfizmi için CC, TT ve CT genotipleri frekansı, sırasıyla 0,0054, 0,1358 ve 0,8588 olarak belirlenmiştir. Sherman ve arkaşlarının (2008), yemden yararlanma ve karkas ölçülerine yönelik fenotiplerle ilişkilendirme yaptığı çalışmasında "yemden yararlanma ve karkas ölçülerini arttırmada olumlu etkisi olduğu"nu belirttiği TT genotipindeki sığırlar % 85,88 oran da

gözlenmiştir. Bozırk örnek sığırlarda CC genotipindeki sığır oranı % 0,54 gibi düşük gözlenmiştir. Sherman ve arkaşlarının [62] 464 baştan oluşan sığır sürüsünde yaptıkları çalışmasında CC genotipindeki (8 baş) sığır sayısının da çok düşük belirlenmesi bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Örnek Bozırk popülasyonunda Hardy-Weinberg dengesi bakımından rs110968631 C>T lokusu için genotiplerdeki dağılım oranı fark önemlidir (P<0,05).

Sonuç olarak rs110968631 C>T polimorfizmi yönünden, alınan Bozırk örnek popülasyonda tüm genotiplerin (CC, TT, CT) varlığının belirlenmesi, Bozırk sığırların yemden yararlanma ve karkas ölçülerini arttırmada olumlu etkisi olacağı tahmin edilmektedir. Islah çalışmalarıyla olumlu TT genotipindeki Bozırk sığırların, Bozırk popülasyonundaki oranının arttılmasıyla, ırkın ıslahına olumlu katkıda bulunulabileceği düşünülmektedir.

4.2. ARMS-PCR ve PCR-RFLP Metotlarının Karşılaştırılmasına İlişkin Değerlendirme

PCR-RFLP metodu çalışma basamakları; kesilecek ürünün PCR' da elde edilmesi, PCR veriminin AJE' de kontrol edilmesi, PCR ürünün RE enzimi ile kesilmesi, RE ürünlerinin AJE ile görüntülenmesi olmak üzere 4 aşamalıdır. ARMS-PCR metodunun çalışma basamakları ise, PCR'da ürünlerin elde edilmesi ve AJE ile görüntülenmesi olmak üzere 2 aşamada sonuçlandırılmaktadır.

ARMS-PCR yöntemi ile real-time PCR'ı birleştirilerek elektroforez basamağını da ortadan kaldıran çalışmaların [80] yanında, aynı anda tek bir PCR çalışması ile 6 TNP' yi de tespit eden ARMS-PCR metotları dizayn edilmiştir [81]. ARMS-PCR yöntemi ile küçük mutasyonları da tespit etmekte mümkündür [79]. Georgiana ve arkadaşları (2009), ARMS-PCR ve PCR-RFLP metotlarını karşılaştırdıkları çalışmada, ARMS-PCR metodunun TNP' lerini tespit etmek için PCR-RFLP metoduna göre üstün olduğunu bildirmektedirler [78].

Araştırmamızda, Bozırkın rs110968631 C>T polimorfizmi tespitinde kullandığımız her iki metodun sonuçları birbirleriyle örtüşmekte ve aynı sonucu vermektedir. Yaptığımız çalışmada ki araştırma sonuçları, Georgiana ve arkadaşlarının (2009) bildirdiği sonucu destekler niteliktedir. Uygulamamızda, ARMS-PCR metodunun çalışma süresi, pratiklik ve maliyet bakımından PCR-RFLP metoduna göre

üstün olduğunu ve en az PCR-RFLP metodu kadar da güvenilir olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca araştırmamıza özgü yapmış olduğumuz özgün primer tasarımlarının hem ARMS-PCR ve hem de PCR-RFLP metodlarına uygunluğu kanıtlanmış ve sığırlarda GHRL geni üzerindeki rs110968631 C>T polimorfizmi tespitinde kullanılabileceğini doğrulamıştır. Sonuç olarak, ARMS-PCR metodu diğer TNP' lerin tespitinde de PCR-RFLP metodu kadar güvenir olduğunu kanıtlanmaktadır.

KAYNAKLAR

[1] A. E. Wertz-Lutz, J. A. Daniel, J. A. Clapper, A. Trenkle, and D. C. Beitz. ***"Prolonged, moderate nutrient restriction in beef cattle results in persistently elevated circulating ghrelin concentrations."*** J. Anim. Sci. 86:564−575. (2008)

[2] A. E. Wertz-Lutz, T. J. Knight, R. H. Pritchard, J. A. Daniel, J. A. Clapper, A. J. Smart, A. Trenkle, D. C. Beitz.. ***"Circulating ghrelin concentrations fluctuate relative to nutritional status and influence feeding behavior in cattle"*** J. Anim. Sci. 84:3285−3300, (2006)

[3] D. H. Keisler, J. A. Daniel, C. D. Morrison. ***"The role of leptin in nutritional status and reproductive function."*** J. Reprod. Fertil. 54:425−435, (1999)

[4] J. S. Jennings, A. E. Wertz-Lutz, R. H. Pritchard, A. D. Weaver, D. H. Keisler, K. Bruns ***"Circulating ghrelin and leptin concentrations and growth hormone secretagogue receptor abundance in liver, muscle, and adipose tissue of beef cattle exhibiting differences in composition of gain1"*** J. Anim. Sci, 89:3954-3972, (2011)

[5] F. Itoh, T. Komatsu, M. Yonai, T. Sugino, M. Kojima, K. Kangawa, Y. Hasegawa, Y. Terashima, K. Hodate ***"GH secretory responses to ghrelin and GHRH in growing and lactating dairy cattle".*** Domestic Animal Endocrinology 28 34–35. (2005)

[6] A. P. Foote, K. E. Hales, C. A. Lents, and H. C. Freetly ***"Association of circulating active and total ghrelin concentrations with dry matter intake, growth, and carcass characteristics of finishing beef cattle*** J. Anim. Sci., 92:5651−5658, (2014)

[7] M. S. Kathar, P.C.Thomson, I. Tammen, H.W. Raadsma ***"Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis***" Genet. Sel. Evol. 36 163–190 163, (2004)

[8] Y. Özşensoy, E. Kurar ***"Markör Sistemleri ve Genetik Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanımları"*** Journal of Cell and Molecular Biology 10(2):11-19, (2012)

[9] J. C. Dekkers "***Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons***" J. Anim. Sci, 82:E313-E328, (2004)

[10] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date "***Ghrelin is a growth-hormne-releasing acylatedpeptide from stomach***". Nature,402:656- 660, (2012).

[11] U. Yiş, Y. Öztürk, B. Büyükgebiz "***Ghrelin: enerji metabolizmasının düzenlenmesinde yeni bir hormon***" Çocuk Sağlığı Hastalıkları Dergisi; 48: 196-201 (2005)

[12] WA. Banks, M. Tschop, SM. Robinson, ML. Heiman ***"Extend and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure",*** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 302, 822-827, (2002)

[13] NB. Dass, M. Munonyara, AK. Bassil, GJ. Hervieu, S. Osbourne, S. Corcoran, M. Morgan, GJ. Sanger ***"Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin"*** Neuroscience 120, 2, 443-453, (2003)

[14] Y. Masuda, T. Tanaka, N. Inomata, S. Tanaka, Z. Itoh, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa ***"Ghrelin stimulates gastric ascid secreti-on and motility in rats"*** Biochemical and Bio-physical Research Communications 270,905-908, (2000)

[15] AM. Wren, LJ. Seal, MA. Cohen, AE. Brynes, GS. Frost, KG. Murphy, WS. Dhillo, MA. Ghatei, SR. Bloom "***Ghrelin enhances appetite and increases food intake in human".*** J Clin Endocrinol Metab. 86 (12): 5992, (2001)

[16] JC. Dickin, TD. Thue, FC. Buchanan ***"An alternative splice site in ghrelin is missing in ruminants".*** Animal Genetics, 35 411–412, (2004)

[17] Y. Nishi, J. Yoh, H. Hiejima, M. Kojima ***"Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides."*** Peptides 32 2175–2182, (2011)

[18] M. Kojima, K. Kangawa ***"Ghrelin: structure and function."*** Physiol Rev. 85: 495-522, (2005)

[19] JA. Gutierrez, PJ. Solenberg, DR. Perkins, JA. Willency, MD. Knierman, Z. Jin, DR. Witcher, S. Luo, JE. Onyia, JE. Hale ***"Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase"*** PNAS 105 6320–6325, (2008)

[20] M. Korbonits, AP. Goldstone, M. Gueorguiev, AB. Grossman ***"Ghrelin-a hormone with multiple functions"***. Front in Neuroend.25: 27-68, (2004)

[21] H. Kaiya, VM. Darras, K. Kangawa ***"Grelin in Birds: Its structure, distribution and function."*** The Journal of Poultry Science. 44 (1): 18, (2007)

[22] S. Aydın ***"Ghrelin Hormonunun Keşfi: Araştırmaları ve Klinik Uygulamaları"*** Turkish Journal of Biochemistry, 32 (2) ; 76−89, (2007)

[23] H. Kaiya, S. Van Der Geyten, M. Kojima, H. Hosoda, Y. Kitajima, M. Matsumoto, S. Geelissen, VM. Darras, K. Kangawa ***"Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity."*** Endocrinology. 143 (9): 3454-3463, (2002)

[24] C. Gottero, F. Prodam, S. Destefanis, A. Benso, C. Gauna, E. Me, L. Filtri, F.Riganti, AJ. Van Der Lely, E. Ghigo, F. Broglio ***"Cortistatin-17 and -14 exert the same endocrine activities as somatostatin in humans."*** Growth Horm IGF Res. 14 (5): 382-387, (2004)

[25] S.Aydın, H. Geçkil, F. Zengin, IH. Ozercan, F. Karatas, S. Aydın, D. Turgut-Balik, Y. Ozkan, F. Dağlı, V. Çelik ***"Ghrelin in plants: What is the function of an appetite hormone in plants?"*** Peptides. 27: 1597-1602, (2006)

[26] A. Howard, S. Feighner, D. Cully ***"A receptor in pitutiary and hypothalamus that function in growth hormone release,"*** Science, 12 , 1, 137-145, (1996)

[27] Y. Sun, P. Wang, H. Zheng, RG. Smith ***"Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor."*** Proc Natl Acad Sci U S A., 101: 4679–4684, (2004)

[28] JM. Cao, H Ong, C Chen **"Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system."** Trends Endocrinol Metab, 17: 13–18, (2006)

[29] P. Cassoni, M. Papotti, C. Ghe, F Catapano, A Sapino, A Graziani ***"Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines"*** The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 86, 1738–1745, (2001)

[30] VP. Carlini, ME. Monzon, MM. Varas ***"Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats***". Biochem Biophys Res Commun, 299: 739–743, (2002)

[31] A.Asakawa, A. Inui, T. Kaga ***"A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral res-ponses to stress in mice"***. Neuroendocrinology, 74: 143–147, (2001)

[32] M.L. Barreiro, M. Tena-Sempere ***"Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility",*** Molecular and Cellular Endocrinology 226, 1-2, 1-9, (2004)

[33] M. Tena-Sempere, E. Aguilar, R. Fernandez-Fernandez, L. Pinilla ***"Ghrelin inhibits prolactin secretion in prepubertal rats",*** Neuroendocrinology 79, 133–141, (2004)

[34] JE.Caminos, M. Tena-Sempere, F. Gaytan, JE. Sanchez-Criado, ML. Barreiro, R. Noguei-ras, F.F. Casanueva, E. Aguilar, C. Dieguez, ***"Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary,"*** Endocrinology 144, 4, 1594-602, (2003)

[35] F. Gaytan, ML. Barreiro, JE. Caminos ***"Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors".*** J Clin Endocrinol Metab; 89: 400–409, (2004)

[36] K. Shibata, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, Y. Makino, I. Makino, T. Kawarabayashi, K. Futagami, Y. Gomita ***"Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus."*** Peptides 25, 2, 279-287, (2004)

[37] K. Tanaka, H. Minoura, T. Isobe ***"Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells".*** J Clin Endocrinol Metab; 88: 2335–2340, (2003)

[38] M.Tena-Sempere, ***"Exploring the role of ghrelin as novel regulator of gonodal function, Growth Hormone and IGF"*** Research 15, 2, 83-85, (2005)

[39] AF. Muller, JA. Janssen, LJ. Hofland ***"Blockade of the growth hormone (GH) receptor unmasks rapid GH-releasing peptide–6-mediated tissue-specific insulin resistance".*** J Clin Endocrinol Metab; 86: 590–593, (2001)

[40] E. Adeghate, AS. Ponery ***"Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats".*** J Neuroendocrinol ; 14: 555–560, (2002)

[41] F. Broglio, E. Arvat, A. Benso ***"Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans."*** J Clin Endocrinol Metab; 86: 5083–5086, (2001)

[42] AF. Muller, SW. Lamberts, JA. Janssen ***"Ghrelin drives GH secretion during fasting in man".*** Eur J Endocrinol; 146: 203–207, (2002)

[43] DE. Cummings, JQ. Purnell, RS. Frayo ***"A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans".*** Diabetes; 50: 1714–1719, (2001)

[44] FT. Itoh, T. Komatsu, S. Kushibiki, K. Hodate ***"Effects of ghrelin injection on plasma concentrations of glucose, pancreatic hormones and cortisol in Holstein dairy cattle."*** Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol; 143: 97–102, (2006)

[45] M. Shintani, Y. Ogawa, K. Ebihara ***"Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway."*** Diabetes, 50: 227–232, (2001)

[46] M. Nakazato, N. Murakami, Y. Date ***"A role for ghrelin in the central regulation of feding"***. Nature, 409: 194–198, (2001)

[47] M. Tschöp, DL. Smiley, ML. Heiman. "***Ghrelin induces adiposity in rodents".*** Nature, 407: 908–913, (2000)

[48] M. Korbonits , AP. Goldstone , M. Gueorguiev, AB. Grossman "***Ghrelin--a hormone with multiple functions.***" Front Neuroendocrinol. 25: 27–68, (2004)

[49] J. Yang, MS. Brown, G. Liang, NV. Grishin, JL. Golstein ***"Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetitestimulating peptide hormone"*** Cell 132 387–396. (2008)

[50] F. G. Colinet, P. Daniel, R. Renaville ***"Molecular characterization of the bovine* GHRL *gene"*** Archiv Tierzucht 52, 1, 79-84, (2009)

[51] K. Kita, K. Harada, K. Nagao and H. Yokota ***"Characteristics of Gene Structure of Bovine Ghrelin and Influence of Aging on Plasma Ghrelin"*** Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol 18, No. 5 : 723-727, (2005)

[52] P. Gregorini, KJ. Soder, RS Kensinger ***"Effects of rumen fill on shortterm ingestive behavior and circulating concentrations of ghrelin, insulin, and***

glucose of dairy cows foraging vegetative micro-swards". Journal of Dairy Science 93 2095–2105, (2009)

[53] H. Shingu, K. Hodate, S. Kushibiki, Y. Ueda, A. Watanabe, M. Shinoda ***"Profiles of growth hormone and insulin secretion, and glucose response to insulin in growing Japanese Black heifers (beef type): comparison with Holstein heifers (dairy type)".*** Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol, 130:259–70, (2001)

[54] H. Shingu, K. Hodate, S. Kushibiki, V. Ueda, A. Watanabe, M. Shinoda, ***"Breed differences in growth hormone and insulin secretion between lactating Japanese Black cows (beef type) and Holstein cows (dairy type)."*** Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol, 132:493–504, (2002)

[55] A. Sorensen, CH. Knight ***"Endocrine profiles of cows undergoing extended lactation in relation to the control of lactation persistency."*** Domest Anim Endocrinol ,23:111–23, (2002)

[56] K. Hodate, T. Johke, A. Kawabata, H. Fuse, S. Ohashi ***"Age associated changes in bovine growth hormone release via human growth hormone-releasing factor."*** Jpn J Zootech Sci, 59:285–91, (1988)

[57] H. T. Myint, H. Yoshida, T. Ito, H. Kuwayama ***"Dose-dependent response of plasma ghrelin and growth hormone concentrations to bovine ghrelin in Holstein heifers"*** Journal of Endocrinology 189, 655–664, (2006)

[58] H. Myint, H. Yoshida, T. Ito, M. He, H. Inoue, H. Kuwayama, ***"Combined administration of ghrelin and GHRH synergistically stimulates GH release in Holstein preweaning calves"*** Domestic Animal Endocrinology 34, 118–123, (2008)

[59] S.Borrner, M. Derno, S. Hacke, U. Kautzsch, C. Schaff, S. ThanThan, H. Kuwayama, H. M Hammon, M. Rontgen, R. Weikard, C. Kuhn, A. Tuchscherer, B. Kuhla ***"Plasma ghrelin is positively associated with body fat, liver fat and milk fat content but not with feed intake of dairy cows after parturition"*** Journal of Endocrinology 216, 217–229**,** (2013)

[60] E. Dovoloua, E. Periquestac, I. E. Messinisb, T. Tsiligiannid, K. Dafopoulosb, A. G. Adanc, G. S. Amiridisa, ***"Daily supplementation with ghrelin improves* in vitro *bovine blastocysts formation rate and alters gene expression***

related to embryo quality" Theriogenology Volume 81, Issue 4, , Pages 565–571, (2014)

[61] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=281192 (2015)

[62] E. L. Sherman, J. D. Nkrumah, B. M. Murdoch, C. Li, Z. Wang,A. Fu, S. S. Moore ***"Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle1"*** J. Anim. Sci, 86:1-16, (2008)

[63] J. Sun, Q Jin, C. Zhang, X. Fang, C. Gu, C. Lei, J. Wang, H. Chen, ***"Polymorphisms in the bovine ghrelin precursor (*GHRL*) and Syndecan-1 (SDC1) genes that are associated with growth traits in cattle"*** Mol Biol Rep, 38:3153–3160, (2011)

[64] S. Kök, S. Atalay, H.S. Eken, M. Savaşçı ***"Türk Boz Irkı sığırlarda UoG-CAST, CAPN1 316 ve CAPN1 4751 Marker Genotipleri Arastırılması"*** Trakya Üniversitesi BAP Proje No: TUBAP-2013-109, pp 35 (2015)

[65] Ufuk Çakatay, Seval Aydın, Ahmet Belce ***"Biyokimyada Temel Hesaplamalar"*** (e-kitap) www.istanbul.edu.tr

[66] CR Newton, A Graham, LE Heptinstall, SJ Powell, C Summers, N Kalsheker ***"Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)."*** Nucleic Acid Res; 17 : 2503-16, (1989)

[67] F. M. You, N. Huo, Y. Q. Gu, M. Luo, Y. Ma, D. Hane, G. R. Lazo, J. Dvorak, O. D. Anderson ***"BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design."*** 'BMC Bioinformatics, 9':253 doi:10.1186/1471-2105-9-253, (2008).

[68] ***"http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html"*** internet açık kaynak

[69] ***"https://eu.idtdna.com/calc/analyzer"*** internet açık kaynak

[70] ***"http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi"*** internet açık kaynak

[71] Y. Chuang, Y.H. Cheng, C.H. Yang ***"Specific primer design for the polymerase chain reaction***" Biotechnology Letters, Volume 35, Issue 10, pp 1541-1549 (2013)

[72] S. Kahya, E. Büyükcangaz, K. T. Carlı **"Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu"** Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med. 32 1: 31-38, (2013)

[73] ***"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/"*** internet açık kaynak

[74] D. S. Goodsell ***"The Molecular Perspective: Restriction Endonucleases"*** The Oncologist, vol. 7 no. 1 82-83 (2002)

[75] ***"http://nc2.neb.com/NEBcutter2/"*** internet açık kaynak

[76] ***"http://www.restrictionmapper.org/"*** internet açık kaynak

[77] "***https://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf"*** *internet açık kaynak*

[78] D. Georgiana1, S. Alexsandra. C. Nicoleta, F.S.Constantin "**A comparative study of ARMS – PCR and RFLP – PCR as methods for rapid SNP identification"** Romanian Biotechnological Letters Vol. 14, No. 6 pp. 4845-4850 (2009)

[79] P. Piccioli, M. Serra,V Gismondi, S. Pedemonte, F. Loiacono ***"Multiplex tetra-primer amplification refractory mutation system PCR to detect 6 common germline mutations of the MUTYH gene associated with polyposis and colorectal cancer."*** Clin Chem 52: 739–743, (2006)

[80] J. A. Bates, E. J. A. Taylor ***"Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of*** **Pyrenophora teres***"* Molecular Plant Pathology Volume 2, Issue 5, pages 275–280, (2001)

[81] C. Zhang ,Y. Liu ,B. Z. Ring, K. N., M. Yang, M. Wang, H. Shen, X. Wu , X. Ma ***"A Novel Multiplex Tetra-Primer ARMS-PCR for the Simultaneous Genotyping of Six Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Female Cancers"*** Plos One, Volume 8, Issue 4, e62126 (2013)

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Gelibolu'da doğdum, ilköğrenim, ortaöğrenim ve lise eğitimimi burada aldıktan sonra, 2001 yılında Ankara Üniversite Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimimi tamamladım. Halen, Keşan' da bulunan, K.K.K'lığına bağlı Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığında, mikrobiyoloji tahlil uzmanı ve genetik laboratuvarı sorumlusu olarak çalışmaktayım.

BİLİMSEL FAALİYETLER

SCI-SSCI veya SCI Expanded Kapsamındaki Yayınları;

S. Kök, S. Atalay, M. Savaşçı, H.S. Eken, ***"Characterization of Calpastatin Gene in Purebred and Crossbred Turkish Grey Steppe Cattle"*** Kafkas Univ Vet Fak Derg, 19 (2): 203-206, (2013)

Ö.Ö Arun, G. Çiftçioğlu, S. Sandıkçı Altunatmaz, S. Atalay, M. Savaşçı, H.S.Eken ***"Effect Of Processing On Pcr Detection Of Animal Species In Meat Products"*** Kafkas Univ Vet Fak Derg, 20(6): 945-950 (2014)

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler;

Ö.Ö Arun, G. Çiftçioğlu, S. Sandıkçı Altunatmaz, S. Atalay, M. Savaşçı, H.S.Eken, ***"Pcr Detection Of Meat Species In Heat Processed Meat Products"***, 8th Joint Scientific Symposium of Veterinary Faculties, Almanya, 9-12 Nisan 2013

S. Kök, S. Atalay, Ö. Çobanoğlu, E.K. Gürcan, F. Balcı, M.İ. Soysal ***"A Discussion about the Buffalo Genome; Example of Growth Hormone Gene"*** 8th Asian Buffalo Congress ISTANBUL, 21 - 25 Nisan 2015

Bilimsel Araştırma Projeleri;

S. Kök, S. Atalay, H.S. Eken, M. Savaşçı ***"Türk Boz Irkı sığırlarda UoG-CAST, CAPN1 316 ve CAPN1 4751 Marker Genotipleri Arastırılması"*** Trakya Üniversitesi BAP Proje No: TUBAP-2013-109, pp 35 (2015)
Proje başlama ve bitiş tarihi: 24.07.2013 - 27.01.2015
Proje bütçesi: 49 648, 00 TL