T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE BULUNAN BAZI SIĞIR IRKLARININ OLR1 GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Gözde YAZICITUNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU

KONYA -2011

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE BULUNAN BAZI SIĞIR IRKLARININ OLR1 GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Gözde YAZICITUNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10202006 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA -2011

ÖNSÖZ

Dünya'da ve Türkiye'de sığır yetiştiriciliği, hayvancılığın önemli bir kolunu oluşturur. Çünkü insan beslenmesinde değerli gıda maddeleri olan süt, et ve ürünleri büyük ölçüde sığırlardan elde edilir. Hayvan türleri içerisinde sığır, süt ve et verimi en yüksek olan hayvandır. Hayvancılıkta temel hedeflerden biri, başarılı ıslah çalışmalarıyla birim hayvandan alınan verim miktarının artırılmasıdır. Sığır, ıslah çalışmalarına kısa sürede ve etkili şekilde cevap veren bir hayvan türüdür.

Hayvanlarda başarılı bir ıslah çalışmasının yapılabilmesinde öncelikle ırkların genetik yapılarının iyi bir şekilde belirlenmesi önemlidir. Genetik polimorfizmler canlılarda istenmeyen mutasyonlara neden olabildiği gibi, bazen de canlıların yaşam gücü ve verimlerini olumlu yönde etkileyebilmektedir. Ekonomik önemi olan karakterleri kontrol eden gen(ler)in polimorfizmlerinin belirlenmesi hayvan yetiştiriciliğinde moleküler ıslah programlarının geliştirilmesi için kullanılabilir.

Bu tezde Türkiye'de bulunan bazı sığır ırklarının OLR1 (oxidized low density lipoprotein receptor 1; düşük dansiteli lipoproteini oksitleyici reseptör 1) geni üzerinde bulunan 3'UTR bölgesindeki polimorfik yapının PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve RFLP (Belirlenen Parçacık Polimorfizmi, Restriksiyon Enzimleri Uzunluk Polimorfizmi) yöntemleri kullanılarak ortaya konulması amaçlanmıştır. Sonuçların, süt özellikleriyle ilgili yapılabilecek çalışmalara katkı sağlaması ve genetik karakterizasyon araştırmalarına destek olması hedeflenmiştir.

Çalışmanın projelendirilmesi ve yürütülmesi aşamalarında yardımlarını benden esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ercan KURAR'a, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Arş. Gör. Müge DOĞAN'a ve manevi desteğini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan babam Cevat YAZICITUNÇ'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR v

1.GİRİŞ……1

1.1.Moleküler Biyolojide Genetik Yaklaşımlar……..2

1.2. Quantitative Trait Loci – Kantitatif Karakter Lokusları (QTL)…….. 4

1.3. Sığır OLR1 Geni ve Polimorfizmleri……...5

1.3.1.Sığır OLR1 Geni 3' UTR Bölgesi Polimorfizmi ……...……...6

1.4. İnsanda OLR1 Geni ve Polimorfizmleri……..……..……..7

1.5. İnsanda Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL)…….……..……8

1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)…….…..9

1.7. Restriksiyon Endonükleazlar (RE)……..……..11

1.8. DNA Temelli Markörler……....12

1.8.1. Restriksiyon Enzimleri Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)…….12

1.8.2. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)……13

1.8.3. Diğer DNA Markörleri……...……13

1.9. Çalışmada Kullanılan Yerli Sığır Irklarının Genel Özellikleri……..…15

1.9.1. Güney Anadolu Kırmızısı (GAK)…….……..……15

1.9.2. Yerli Kara (YK)……..……...…….……16

1.9.3. Boz Irk (BI)…….……..…….17

1.10. Populasyon Genetiği ve İstatistiki Yöntemler……... 18

1.10.1. Hardy-Weinberg Denge Kanunu……..18

1.10.2. Ki-Kare (χ^2) Testi……. 18

2. GEREÇ VE YÖNTEM……..…….……..20

2.1. Hayvan Materyal..…….20

2.2. DNA İzolasyonu……...20

2.3. İzole Edilmiş DNA'ların Miktar ve Kalitesinin Ölçülmesi……..21

2.4. PZR……...21

2.5. Agaroz Jel Elektroforezi Analizi…….22

2.6. OLR1 Geninin Restriksiyon Enzimi ile Kesimi…….……..22

2.7. İstatistiksel Analizler……22

3. BULGULAR……...……...…..……..23

3.1. OLR1 Geni 3' UTR Bölgesi Polimorfizmi Bulguları……...23

3.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi…….……...23

3.3. OLR1 Geni Genotipleme Sonuçları……..24
3.4. İstatistiksel Analizlerin Sonuçları…….25
3.5. Kullanılan Sığır Irklarının Karşılaştırılması…….26
4. TARTIŞMA……..……..28
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.……..……32
6.ÖZET……...…….……33
7.SUMMARY……...……...……..34
8.KAYNAKLAR…...……...……..35
9.EKLER…...……39
10.ÖZGEÇMİŞ……..……40

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	mikrolitre
3' UTR	3' kodlanmayan bölge
A	Adenin
AFLP	Yükseltgenmiş parça uzunluk polimorfizmi
bç	Baz çifti
BI	Boz Irk
BTA5	Sığır 5. kromozom çifti
C	Sitozin
cM	Santimorgan
DAK	Doğu Anadolu Kırmızısı
ddMQ	Bi distile su
DGAT1	Diasilgliserol asiltransferaz-1
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
HW	Hardy-Weinberg
G	Guanin
g	Gram
GAK	Güney Anadolu Kırmızısı
KAH	Koroner arter hastalığı
kg	Kilogram
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOX-1	Lektin Benzeri Okside LDL Reseptörü-1
Mg	Magnezyum
MgCl	Magnezyum klorür

ml	Mililitre
mM	Milimolar
mtDNA	Mitokondrial DNA
ng	Nanogram
nMol	Nanomol
OLR1	Okside Düşük-dansiteli Lipoprotein Reseptör 1
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Asitlik/Bazlık Ölçütü
pmol	Pikomol
PstI	*Providencia stuartii I*
RAPD	Rastgele yükseltilmiş polimorfik DNA
QTL	Quantitative Trait Loci (Kantitatif Karakter Lokusu)
RFLP	Belirlenen Parçacık Polimorfizmi, Restriksiyon Enzimleri Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Rotation per minute - Dakikadaki dönüş sayısı
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSCP	Tek zincir konformasyon polimorfizm
STS	İşaretlenmiş dizi bölgesi
T	Timin
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
UV	Ultraviyole
VNTR	Değişen nükleotid ardı ardına tekrarlar
YK	Yerli Kara

1.GİRİŞ

Beslenme insanlık için vazgeçilmez yaşamsal ihtiyaçlardan biridir. Beslenmenin önemli bir payını oluşturan süt, et ve ürünleri sağlıklı, kaliteli ve nitelikli olmak zorundadır. Sağlıklı nesillerin oluşabilmesi için bu gereklidir. Hayvancılık sektörünün iyileştirilmesi, sofralarımıza kadar ulaşan ürünlerin sağlıklı ve kaliteli olabilmesinde etkilidir. Hayvancılık, ülkemizde olduğu kadar dünyada da hızla gelişen ve önem kazanan bir sektördür.

Önceleri süte, başka besin maddelerinde olduğu gibi, yalnızca kalori ve protein kaynağı olarak değer verilmekteydi. Oysa artık, yapılan araştırmalar sonucunda, kalori ve protein sağlamanın yanı sıra başka önemli besin değerlerini de bulundurduğu bilinmektedir. Bütün hayvansal proteinler içinde en uygunu sütteki proteindir. İnsan beslenmesinde olduğu kadar hayvan beslenmesinde de bu nokta önem taşımaktadır. Sütün bileşiminde bulunan başta vitaminler olmak üzere tüm besin ögeleri, hayati fonksiyonlarda önemli görevlere sahiptir. Süt büyüme ve gelişme için elzemdir, bunun yanı sıra yapısında bulunan ve fizyolojik öneme sahip enzim, hormon, vitamin, protein ve peptit yapılı ögeler ve yağ asitleri yaşam döngüsü içinde önemli yere sahiptir. Özellikle yetişkin kadınlar, çocuklar ve gençler olmak üzere tüm yaş gruplarının süt ve süt ürünlerini hergün tüketmeleri gerekmektedir (Yarkın 1961, Ünal ve Besler 2004).

Sütte bulunan süt yağı; yağda eriyen vitaminler ve vücudun enerji ihtiyacı için kaynak oluşturmaktadır. Süt yağı %5 oranında doymuş yağ içermesine rağmen kronik hastalıklar için olumlu etkinlikleri olan linoleik asit, sfingomyelin, bütirik asit, miristik asit gibi özel bileşenler içerdiğinden önem taşımaktadır. İnsan beslenmesinde önemli yere sahip olan süt ürünleri büyük ölçüde sığırlardan elde edilmektedir. Bu bakımdan hem Dünya'da hem de Türkiye'de sığır yetiştiriciliği hayvancılığın önemli bir kolunu oluşturmaktadır (Ünal ve Besler 2004).

Türkiye'de Cumhuriyetin ilk yıllarından itibaren sığırcılık önemli bir üretim kolu haline gelmeye başlamış ve diğer hayvansal üretim kollarına göre daha fazla ilgi görmüştür. Bunda, sığırın biyolojik üstünlüklerinin olmasının avantajı büyük olmuştur. Sığır yetiştiriciliğine yönelik özellikle genotipi iyileştirme çalışmaları

ağırlık kazanmıştır. Bu amaçla, yerli ırkların seleksiyonla ıslahı üzerinde durulmuş bir yandan da kültür ırkları ithalatına yönelinmiştir. Suni tohumlama çalışmalarına başlanmış ve bu çalışmalar kamunun görevi haline getirilmiştir ardından özel sektöre de açılmıştır. Farklı ülkelerden sağlanan desteklerle geliştirme, eğitim amaçlı projeler yürütülmüştür. Damızlık yetiştiriciliği söz konusu olduğunda düşük faizli krediler kullanılmıştır. Bunca çabaya rağmen yine de genotipi iyileştirme adına istenen noktaya henüz gelinememiştir (Akman ve ark 2011).

Sığır, Dünya'nın hemen her yerinde yetiştirilebilen ve insanlarla birlikteliği çok eskilere dayanan bir hayvandır. Bu birliktelikte sığırın insanlar için et, süt gibi besin maddeleri sağlamasının dışında derisi, tırnağı, boynuzu, gübresi ve çeki gücüyle de insanlara hizmeti fazlaca olmuştur. Sığır, dünya süt üretiminin neredeyse tamamını, et üretiminin de yaklaşık %25'ini tek başına sağlamaktadır. Besin maddesi yönünden büyük bir paya sahip olan sığır, sığır yetiştiriciliğini önemli hale getirir. Türkiye söz konusu olduğunda; sığırın, özellikle kırmızı et üretimine toplam üretimin manda, koyun ve keçi dışında katkı yapması beklenen başka bir alternatifi yoktur. Bir diğer ifadeyle, Türkiye için sığır sadece süt üretimi değil, et üretimi için de oldukça önemli, hatta vazgeçilmez kabul edilmelidir. O halde Türkiye'nin sığır yetiştiriciliği hem kırmızı et hem süt dikkate alınarak tartışılmalıdır. Şimdiye kadar meydana gelen değişmelerin yönü ve gelecek yıllar göz önüne alındığında böyle bir değerlendirmenin hatalı olmayacağı aşikardır (Akman ve ark 2011).

Devlet İstatistik Enstitüsü (DİE)'nün 2009 yılı verilerine göre Türkiye 10 723 958 baş sığır, 20 721 925 baş koyun ve 5 128 285 baş keçi mevcudu ile dünya ülkeleri arasında önemli bir yere sahiptir (DİE 2011). İstatistiklerden de görüldüğü gibi sığır yetiştiriciliği, hayvancılığın önemli bir kolunu oluşturur. Değerli gıda maddeleri olan süt ve et büyük ölçüde sığırlardan elde edilir. Türkiye'de önemli yerli sığır ırkları mevcuttur. Bunlardan bazıları Boz Irk, Yerli Kara ve Güney Anadolu Kırmızısı ırklarıdır.

1.1. Moleküler Biyolojide Genetik Yaklaşımlar

1984 yılında İnsan Genom Projesi (Brown 2002) ve 1990'lı yıllarda Sığır Genom Haritalama çalışmaları başlatılmıştır. Son yıllarda da çiftlik hayvanlarında

ekonomik olarak önemli özellikleri belirleyen genlerin tanınmasına yönelik olarak pek çok çalışma yapıldığı görülmüştür. İnsanları ve fareleri konu alan moleküler genetik çalışmaları özellikle çeşitli hastalıkların daha iyi anlaşılmasına ve tanımlanmasına yönelik olurken, evcil hayvanlarda yapılan çalışmalar ise daha çok ekonomik olarak önemli çeşitli nitelikler ya da bunlarla ilgili olduğu düşünülen diğer genler üzerinde sürdürülmüştür. Bu nedenle gerek sığırlarda gerekse koyun, keçi gibi diğer çiftlik hayvanlarında, ekonomik olarak önemli olduğu tespit edilmiş lokusların belirlenmesine ve hayvanların bu özellikleri bakımından genotiplerinin analizine olanak sağlayacak özgün moleküler yöntemlerin geliştirilmesine araştırıcılar tarafından fazlaca yer verilmiştir (Elmacı ve ark 2007).

Populasyonlar arasında ve içinde meydana gelen genetik varyasyonların kalıtımının incelenmesi, mutasyon, seleksiyon etkilerinin, delesyon, genetik kayma ve rekombinasyonun araştırılması gibi konular populasyon genetiğinin konuları arasında yer almaktadır (Erensayın 2000).

Polimorfizmler canlılarda bazen istenmeyen mutasyonlara neden olurken bazen de canlıların yaşam gücünü ve verimlerini olumlu yönde etkileyerek yararlı bir duruma dönüşebilirler. Sığırlarda ekonomik önemi olan karakterleri kontrol eden gen veya genlerin polimorfizmlerinin belirlenmesi hayvan yetiştiriciliğindeki moleküler ıslah programlarının geliştirilmesinde kullanılabilir (Kiraz ve ark 2007).

Son yıllarda çeşitli moleküler teknikler geliştirilmiştir. Moleküler teknikler; biyoloji, ziraat, tıp, veteriner, ormancılık gibi çalışma alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler tekniklerle; populasyonlar genetik yapısının tespiti, markör destekli ıslah çalışmaları, genetik haritalar, filogenetik analizler, ebeveyn ve cinsiyet tayinleri, bazı hastalıkların tanısı ve ekonomik önemi olan karakterlerin belirlenmesi gibi uygulamalar yapılmaktadır. Farklı markör sistemlerinin kullanılması ile sığır, koyun, keçi gibi evcil çiftlik hayvanlarında yapılan genetik haritalama ve kodlayan kromozom bölgelerinin tespiti (QTL) haritalama çalışmaları kolaylık kazanmıştır (Kiraz ve ark erişim 2007).

1.2. Quantitative Trait Loci - Kantitatif Karakter Lokusları (QTL)

Canlılarda türler arasında değişiklik gösteren yapılar, örneğin vücut yapısı, saç rengi, göz rengi; hayvanlarda kıl yapısı, süt verimi, canlı ağırlık gibi özellikler DNA'nın bazı bölgelerindeki polimorfizmlerden kaynaklanır. DNA üzerinde bulunan ve türler içi veya türler arası doğurganlık, et ve süt verimi, sütün bileşimi gibi verim ile ilgili farklılıkların kontrolünden sorumlu olan bölgelere QTL (Quantitative Trait Loci) adı verilir. QTL belirleme çalışmalarının temeli, özel genetik markörler ile fenotipler arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. Çiftlik hayvanlarında, markör-QTL bağlantı çalışmaları genellikle populasyonlar içinde yürütülür ve polimorfik olan markör bölgelerinin varlığını gerektirir (Primrose 2006, Weller 2009).

Genom analizi için kullanılan genetik markörlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar, bazı özel gen allellerinin varlığını belirlemek açısından gerekli bilgileri edinmek amacıyla kullanılmaktadır. Ekonomik açıdan verim özellikleri üzerinde büyük etkisi olan kantitatif karakter lokuslarının (QTL) belirlenmesi, genomik bölgelerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Ashwell ve ark 2001).

QTL belirleme çalışmaları Georges ve ark (1995) tarafından sütçü sığırlarda yapılan çalışmalar ile başlamış ve yaygınlaşmıştır. Khatkar ve ark (2004), yaptıkları çalışmada 29 sığır kromozomundan 20'sinde süt üretimine etkisi olan QTL belirlediklerini bildirirken, belirlenen QTL'lerin pleotropik etkilerinin olduğunu ve fenotipler arasındaki genetik ilişkilerin değerlendirilmesine katkı sağlayacağını ileri sürmüşlerdir.

Heyen ve ark (1999) yaptıkları bir çalışmada, iki farklı populasyonda sığır 5. kromozomu üzerinde 6 farklı QTL rapor etmişlerdir. Yine Koning ve ark (2001), Finnish-Ayrshire ırkı populasyonunda 5. kromozom üzerinde 107 cM (sentimorgan) pozisyonunda süt verimine etkisi olan bir QTL belirlemişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda da (Ashwell ve ark 2004, Khatkar ve ark 2004), sığır 5. kromozomundaki OLR1 (oxidized low density lipoprotein receptor 1; düşük dansiteli lipoproteini oksitleyici reseptör 1) geni üzerinde de QTL bölgelerine rastlanmıştır.

1.3. Sığır OLR1 Geni ve Polimorfizmleri

Sığır aort endotel hücrelerinde tanımlanan OLR1, düşük dansiteli lipoproteini bağlayan ve indirgeyen bir majör protein olarak bilinmektedir. OLR1'in genomik DNA dizisine bakıldığında, 4. ekzonda (kodlayıcı bölge) 2 SNP (single nucleotide polymorphism), 4. intronda (kodlayıcı olmayan bölge) 5 SNP ve 3'UTR (untranslated region) bölgesinde de 1 SNP belirlenmiştir. Haplotip analizlerinde 3'UTR bölgesindeki C (sitozin) allelinin; süt yağı verimi ve yüzdesini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir. Ancak 4. ekzondaki SNP'lerin bu değerlere etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Khatib ve ark 2006).

Sığırlardaki OLR1 geni, süt bileşim özellikleriyle ilişkisinin olduğu düşünülerek aday gen olarak seçilmiştir. Sığırlarda yapılan bir genotiplemede OLR1 (NW_215807) geni 8232. pozisyonda bir SNP gösterilmiştir (Khatib ve ark 2007).

Khatib ve ark (2007) Kuzey Amerika Holştayn populasyonunda yaptıkları çalışmada ''NW_215807'' referans numarasında belirtilmiş ''C7160T; A7161G; T7278G; A7381G; C7409T; C7438G; C7512G ve C8232A'' pozisyonlarında 8 farklı SNP belirlemiştir. Bu polimorfizmlerden 4'ünde intrajenik haplotip tespit edilmiştir. C8232A haplotipinin süt yağı verimi ve yüzdesini yüksek oranda etkilediği bulunmuştur.

Komisarek ve ark (2008) süt üretimi, uzun ömür ve üreme üzerine etkili olduğu tahmin edilen ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2), PPARGC1A (peroxysome proliferator-activated receptor-c coactivator-1a), OLR1 ve SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase 1) genlerinde 6 polimorfizm bölgesini araştırmışlardır. Bu çalışma 453 Polonya Holştayn boğası üzerinde yürütülmüştür. Çalışma sonunda OLR1 geninde (NM_174132 referans numarasına göre) C223A polimorfizminin süt verimi üzerine etkisi tespit edilmiştir.

Schennink ve ark (2009), hayvancılık ekonomisinde önemli yeri olan OLR1 geni üzerinde araştırma yapmışlar ve genin C8232A polimorfizmi bulunan hayvanların, sütlerindeki yağ yüzdesinin düşük olduğunu saptamışlardır. FASN (Fatty acid synthase), OLR1, PPARGC1A (peroxysome proliferator-activated

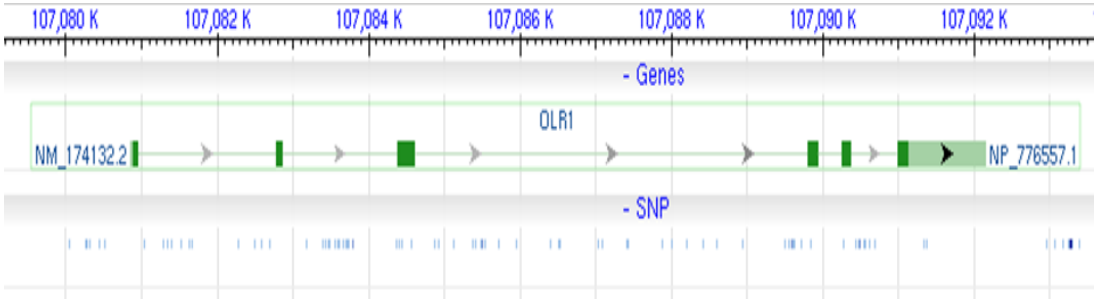
receptor-c coactivator-1a), PRL (Prolactin) ve STAT5A (Signal transducer and activator of transcription 5A) genleri üzerindeki polimorfizmlerin etkilerini belirlemek üzere Hollanda Holştayn ırkı populasyonu üzerine yaptıkları bu çalışmayla FASN ve OLR1 genlerindeki polimorfizmlerin süt yağı yüzdesinde önemli bir etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Çalışmada süt yağı ve proteini dışında trans yağ asitleri, doymamışlık, süt verimi gibi 28 özellik incelenmiştir. Ancak tüm belirlenmiş polimorfizmlerin, süt yağı yüzdesine etkisini gösteren ve aynı genlere ait önceki çalışmalarda raporlanan sonuçlarla yakınlık saptayamamışlardır (Schennink ve ark 2009).

1.3.1. Sığır OLR1 Geni 3' UTR Bölgesi Polimorfizmi

Mutasyon analizleri ile OLR1 geninde 8 polimorfik bölge bulunmuştur. OLR1 geninin 3'UTR bölgesinde 10497. pozisyonda (Erişim: NC_007303) bulunan sitozin (C) nükleotidinin, adenin (A) nükleotidine değiştiği bir polimorfizm belirlenmiştir (Khatib ve ark 2006).

```
10141 agggagctgtttcccgtatgtatccttcagggacctgtgcatatattcaaaggggaactg
10201 tttttgctgaaaactgcattttaactgcattcagtatatgtcaaaagaaggcgaatctat
10261 tgagagcacagtgaatttgaaggatctggaggaaaagaaggaaacctttgaattctcttc
10321 tggaatttaagctatacttcatcacttagatgtaaaccattagagcccagggaaatgcct
10381 gctactggttgagtgcagaactccttagcagagactggcccagctgcctggcaccttgat
10441 agcaaaagttgcaattccctctgtatatttttccctaacttgttccaagtcctcccctgc
10501 aggacttcagagaagtcaatttttctgtttccattgtttctaagaacttgttgcctaact
10561 caaggtcacagcatttttctcacttttgtcctatgctttcttctaggcattgtagagttt
10621 tagattttacatggaaatctagaacttattttagattaatttctaagtgatatatggatg
```

Şekil 1.1. OLR1 geninin 10141 – 10680 nükleotidleri arasındaki dizi (NC_007303).



Şekil 1.2. OLR1 geninin anatomik yapısı. Yeşil bölgeler sırasıyla 1., 2., 3., 4. ve 5. ekzonları; açık yeşil bölge iste 3'UTR bölgesini göstermektedir (ncbi.nlm.nih.gov).

1.4. İnsanda OLR1 Geni ve Polimorfizmleri

İnsandaki OLR1 geninin, damar sertliğinin patogenezinde etkili olan LDL'yi (düşük dansiteli lipoprotein) oksitleyici reseptör görevi bulunmaktadır. İnsan OLR1 geni üzerine yapılan çalışmada, bu genin G501C polimorfizminin iskemik serebrovasküler hastalığıyla düşük de olsa bir ilgisinin olabileceği saptanmıştır (Hattori ve ark 2006).

Mango ve ark (2003), Chen ve ark (2003), Sentinelli ve ark (2006) LOX-1 geninde, 3' UTR C188T bölgesi de dahil olmak üzere çeşitli polimorfizmler tespit etmişlerdir. T alleline sahip olan bireylerde koroner arter hastalığı ve miyokard infarktüs hastalığı için bir risk artışı olabileceğini belirlemişlerdir.

Kurnaz (2008) yaptığı bir çalışmada, koroner arter hastası olan insanlardaki LOX-1 (Lektin benzeri okside LDL reseptörü-1) yani OLR1 geninde bulunan 4 ayrı polimorfik bölge incelenmiştir. LOX-1 polimorfizmlerinin serum lipoprotein parametreleri üzerinde çok belirgin bir etkisi gözlenmediğini ve hipertansiyon ile ilişkisinin de daha kapsamlı olarak araştırılması gerektiğini belirtilmiştir. Erkek cinsiyeti ve sigara kullanımının 3'UTR 188T alleli ile birlikteliğinde KAH (Koroner Arter Hastalığı) gelişim riskini arttırdığı yönünde izlenim elde edilmiştir. K167N polimorfizminin ise, diğer kardiyovasküler risk faktörleri ile etkileşimi gözlenmediğinden bu polimorfizmin bağımsız bir risk faktörü olabileceği kanısına varılmıştır. LOX-1 varyantlarının KAH üzerinde gen-gen etkileşiminden çok gen-çevre etkileşimleri yoluyla etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Yine, insandaki OLR1 geninde yapılan diğer çalışmalarda (Mehta ve Li 2002, Ringseis ve ark 2007, Dunn ve ark 2008), bu genin vasküler endotel hücre yüzeyi reseptörünü kodladığı ve bu durumun düşük dansiteli lipoproteinin niteliğini bozduğu belirlenmiştir. Düşük dansiteli lipoproteinin içselleştirilmesi ise; endotelin fonksiyonunu kaybetmesi ve damar sertliğiyle sonuçlanmaktadır. Okside olmuş lipidler insan vücudunda; karaciğer metabolizmasını ve glikoz metabolizmasını etkilemektedir.

OLR1 geni tarafından kodlanan, insan lektin benzeri okside düşük-dansiteli lipoprotein reseptör 1, vasküler endotel hücrelerde ox-LDL (oxide-low-density lipoprotein) için bir hücre yüzeyi endositoz reseptörü olarak belirlenmiştir. Fizyolojik durumlarda, LOX-1 ekspresyonu *in vitro* olarak normal aort endotel hücrelerde, *in vivo* olarak plasenta, akciğer, beyin, karaciğer gibi vasküler bakımdan zengin hücrelerde görülmektedir. Diğer yandan ox-LDL ve inflamatuvar sitokinler; yumuşak kas büyüme faktörleri ve lökosit adezyon moleküllerinin endotel ekspresyonuna yol açabilmektedir ve LOX-1 in ekspresyonunu artırabilmektedir. Endoteldeki LOX-1, trombositlerin oto-aktivasyonuna ve endotel disfonksiyonunu ortaya koyan endotel hücrelerden endotelin-1 salınımına aracılık etmektedir (Kakutani ve ark 2000).

Yapılan bir çalışmada, iskemik felci önleyen asetilsalisilik asit Aspirin'in, LOX-1 ekspresyonunu inhibe ettiği ortaya konmuştur. Okside düşük-dansiteli lipoprotein (ox-LDL) birikimi, akut miyokard iskemisinde aterosklerotik plak oluşumuyla karakterize olmaktadır. Ox-LDL, matrix metalloproteinaz (MMP)'ın ekspresyonuna yol açmakta ve lektin benzeri reseptör (LOX-1)'ün ekspresyonuna neden olmaktadır. Aspirinin, LOX-1 ekspresyonunu ve ardından oluşabilecek MMP aktivasyonunu engelleyebildiği düşünülmektedir. Çalışma sonucunda hem Aspirin hem de salisilat, insan koroner arter endotel hücrelerinde, ox-LDL'nin süperoksit anyon üretimini azaltmıştır. Aspirinin bu etkilerinin, akut miyokard iskemisinde trombositin inhibitör etkisine tamamlayıcı olabilecegi belirtilmiştir (Mehta ve ark 2004).

LOX-1'in ekspresyonunun hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diyabet ve miyokard iskemide arttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak LOX-1 erken aterosikleroz lezyonları içeren endotel hücreler, düz kas hücreleri ve ileri düzey aterosiklerotik plakların makrofajları tarafından belirgin olarak ifade edilmiştir (Kataoka ve ark 1999).

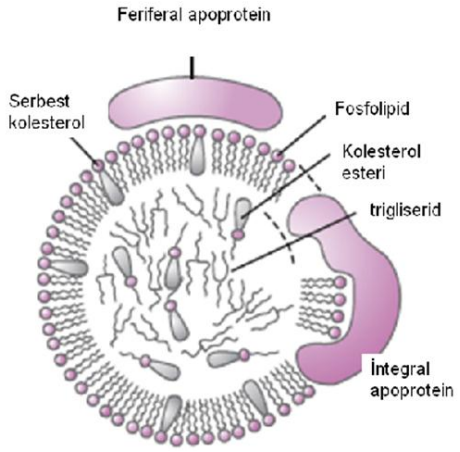
1.5. İnsanda Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL)

Ailesel hiperkolesterolemi, yaklaşık 500 kişiden 1'inde görülen, otozomal dominant kalıtımlı bir hastalıktır. Bu hastalık, kolesterol-ester bağlayan düşük

yoğunluklu lipoprotein (LDL)'in hücre yüzeyinin yapı ve işlevini etkileyen mutasyonları sonucunda oluşmaktadır. Hastalık, LDL'ye bağlı kolesterolün plazma konsantrasyonunda artması ve bunun sonucunda kan damarları, cilt ve tendonlarda fazla miktarda birikmesine neden olmaktadır (Passarge 2000).

LDL reseptörü, 839 amino asitten oluşan, zara bağlı bir proteindir. İnsanlarda reseptör geni 19. kromozom üzerinde yaklaşık 45 kb'lık bir bölgede bulunmakta ve 18 ekzon bölgesi içermektedir. Ekzon-1 tarafından kodlanan bir sinyal dizisi, endositoz sırasında reseptör proteinin hedefe yönlendirilmesini sağlamaktadır (Francke 1984, Yamamoto 1984).

İnsan LDL reseptör geninde delesyonlar ve nokta mutasyonları tanımlanmıştır. Toplam olarak 127 LDL mutasyonu bilinmektedir. Bu mutasyonlar sinyal dizisi, ligand bağlanma bölgesi, sitoplazmik kuyruk ve promotor gibi bölgeleri etkilemektedir (Passarge 2000).



Resim 1.1. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'in yapısı (Engelking 2011).

1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İlk olarak Karry Mullis tarafından 1985'de tanımlanan ve 1993 yılında Nobel ödülünü almasını sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle, bir DNA segmenti tek bir orijinal kopyadan milyonlarca hatta milyarlarca çoğaltılabilmektedir. Böylece, moleküler genetik alanındaki pek çok araştırma için gerekli kaynak sağlanabilmektedir. DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki

segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak prensibine dayanmaktadır.

PZR'da 3 temel basamak mevcuttur. Öncelikle amplifiye edilecek DNA segmenti 95°C de tek iplikli yapıya dönüştürülmektedir (denatürasyon). Bu yapılar, yeni sentezlenecek DNA için kalıp görevi görmektedirler. Bu reaksiyon primer adı verilen ve hedef DNA'yı tamamlayıcı olan sentetik oligonükleotidler tarafından başlatılmaktadır. Primerler spesifik bir dizi içerisindeki kısa nükleotid sekanslarından meydana gelmektedirler. Bu primerler hedef bölgenin uçlarına 50-65°C de bağlanarak (annealing ya da hibridizasyon işlemi) amplifiye olacak şekilde DNA bölgesinin sınırlarını belirlemektedirler. Bağlanma sıcaklıkları, kullanılan primerlerdeki nükleotidlerin sayısına ve cinsine göre hesaplanmakta ve bu yüzden primerlere göre değişiklik göstermektedir. Sekanslar 5' ve 3' olmak üzere iki uca sahip olup amplifikasyon sürekli olarak 5' ucundan 3' yönüne doğrudur ve primerlerin yerleştiği bölgenin tersi yönde oluşmaktadır. Son olarak 72 °C de DNA polimeraz enziminin etkisiyle polimerize olmaktadır. Bu 3 adım bir PZR döngüsünü oluşturmaktadır. Yeni şekillenmiş olan sarmal, orjinal hedef DNA'dan denatürasyon yoluyla ayrılmakta ve primer hibridizasyonu, DNA sentezi ve denatürasyon siklusu tekrar etmektedir. Bu işlem ilgilenilen sekansın milyonlarca sayıda çoğalması ile neticelenmektedir. 30 döngü sonunda yaklaşık 250 milyon kısa DNA ürünü elde edilmektedir (Passarge 2000, Brown 2002, Weissensteiner 2003, Turner 2004, Mulhardt 2010).

Termokararlı DNA polimerazlar, PZR'da kullanılmak üzere bazı termofilik bakterilerden izole edilmiş ve klonlanmıştır. En yaygın kullanılanı *Thermus aquaticus* isimli bakteriden elde edilen ve 95°C 'nin üstündeki sıcaklıklara dayanıklı olan Taq polimerazdır (Chien ve ark 1976) ve modifikasyonları neredeyse tüm DNA amplifikasyonlarında kullanılmaktadır. Diğer DNA polimerazlar da birbirlerinden nükleotid ekleme hızları, yarılanma ömürleri, ısı tolerans farklılıkları, ekzonükleaz özelliklerinin olup olmaması gibi yönleriyle ayrılmaktadırlar. Enzim tipinin seçimini, yapılacak amplifikasyonun koşulları belirlemektedir (Brown 2002, Turner 2004).

1.7. Restriksiyon Endonükleazlar (RE)

RFLP (Belirlenen Parçacık Polimorfizm Yöntemi / Restriksiyon Enzimleri Uzunluk Polimorfizmi) analizleri ve genom haritalamaları da dahil olmak üzere çeşitli uygulama için kullanılan önemli bir reaktif olan restriksiyon enzimleri genelde restriksiyon endonükleazlar olarak adlandırılan ve DNA'yı tanımlanmış ve üretilebilir fragmentlere kesen bakteri kökenli enzimlerdir. Bu enzimler bakterilerde, yabancı DNA'lara karşı savunma mekanizması olarak görev yapmaktadırlar. Dışarıdan hücrelere giren genetik materyalleri 4-8 bazlık tanıma bölgelerine göre tanıyıp keserek bakteri DNAsını korumaya çalışmaktadırlar (Gerstein 2001, Mulhardt 2010, Arda, Erişim tarihi: 25.08.2011).

Günümüzde 400 den fazla farklı restriksiyon enzimi izole edilmiştir (Passarge 2000, Turner 2004). RE'ler izole edildikleri bakterilere göre adlandırılıp, üç harften oluşan kısaltma ile gösterilmektedirler. İlk harfler enzimin izole edildiği bakterinin cinsini, sonraki iki harf bakterinin türünü göstermektedir. Adlandırmanın sonunda yer alan Romen rakamları da, ilgili bakteriden elde edilmiş olan restriksiyon enzimlerinin sayısını ifade etmektedir (Mulhardt 2010).

Bir restriksiyon enziminin tanıma dizini, belli bir DNA bölgesinde, düzensiz şekilde yer almaktadır. Bu nedenle, restriksiyon noktaları arasındaki mesafeler farklıdır. Bir restriksiyon enzimi ile kesim sonrasında, çeşitli büyüklüklerde DNA parçaları ortaya çıkmaktadır. Belirli bir restriksiyon enzimi, belli bir DNA bölgesini karakteristik ölçülerde bir dizi DNA fragmanına ayırmakta ve tanı amacıyla kullanılabilecek bir kalıp oluşturmaktadır (Passarge 2000).

Restriksiyon endonükleazlar çift iplikçikli DNA'da yaptıkları kesimlerin özelliklerine göre 3 gruba ayrılmaktadırlar. Tip I RE'ler DNA'yı tanıdığı bölgeden 1000 bç.lik uzaklıktaki özgül olmayan yerlerden asimetrik kesmektedir. Tip II RE'ler kesim esnasında enerjiye ihtiyaç duymadan ve DNA'yı tam tanıma bölgesinden keserek, palindromik fragmentler oluşturmaktadır. Tip III RE'ler ise kesim esnasında enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Bu 3 tip göz önüne alındığında, sahip oldukları özelliklerinden dolayı en yaygın olarak Tip II RE'ler kullanılmaktadırlar. Farklı bakterilerden elde edildiği için farklı isimlerde bulunan ancak aynı DNA dizinini

tanıyıp kesen izoşizomer restriksiyon endonükleazlar da bulunmaktadır (Solak ve ark 2000, Mulhardt 2010, Arda 2011).

1.8. DNA Temelli Markörler

DNA markörleri, farklı genotiplere ait asit dizilişlerindeki farklılığı ortaya koymaktadırlar. Bu markörler DNA'nın enzimle kesimi sonrasında elde edilen RFLP'ler ve PZR kullanımına dayalı olan tek iplik konformasyon polimorfizmi (SSCP), rastgele çoğaltılmış DNA farklılığı (RAPD), çoğaltılan parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP), sekans etiketli bölge (STS), tek nükleotid polimorfizmi (SNP), değişken sayılı ardarda tekrarlar (VTNR), mitokondrial DNA (mtDNA), basit dizi tekrarları (SSR) veya mikrosatellitlerdir (STR) (Bulut 2004).

1.8.1. Restriksiyon Enzimleri Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)

İlk olarak 1980'de Botstein ve arkadaşlarının ifade ettiği RFLP (Primrose 2006), populasyon çalışmaları ve genomik haritalamalar için sıklıkla kullanılan genetik markör sistemidir ve ilk olarak virüslerdeki genetik farklılığı belirlemek için kullanılmıştır (Wu 2007, Weller 2009). Normal ve polimorfik gen segmentlerinin baz dizilerinde bireysel farklılık yani polimorfizmler varsa, bu restriksiyon enzimleri uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemiyle saptanabilmektedir. Yani, bir kromozom üzerinde bulunan bir restriksiyon enzimi tanıma bölgesi, bir diğerinde bulunmamakta ve restriksiyon fragment büyüklükleri bu bölgelerde farklı farklı olmaktadır. Oluşan DNA fragmentleri RFLP olarak adlandırılmaktadır ve bu fragmentler jel elektroforezle birbirinden ayrıştırılmaktadır (Passarge 2000, Wu 2007).

Bu yöntem, araştırılmakta olan belirli bir DNA parçasının benzer yada aynı dizilişteki DNA'ya melezlenebilmesini temel almaktadır. RFLP tekniği, kesim enziminin tanıdığı bölgedeki tek nükleik asit baz değişikliğini bile tanıyabilmektedir. Tanıma bölgesindeki baz değişikliği farklı genotipler arasındaki polimorfizmin sebebidir. RFLP için büyük miktarlarda DNAya ihtiyaç olduğu için, öncelikle PZR tekniğiyle DNA bölgesinin çoğaltılması gerekmektedir (Passarge 2000, Bulut 2004, Wu 2007).

1.8.2. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)

Tek nokta polimorfizmleri (SNPs), DNA'daki tek nükleotid değişiklikleridir. SNP'ler transisyonlar (bir pürin bazın [A,G] diğer bir pürin bazına veya bir pirimidin bazın [C,T] diğer pirimidin bazına değişmesi) ve transversiyonlar (bir pürin bazının bir pirimidin bazına değişimi veya tersi) gibi baz değişimlerini içermektedir (Holliday 1993). SNP'ler populasyonda en az %1 sıklıkla görülmektedirler ve genom haritalamaları için önemli sekans markörleridir (Primrose 2006).

Genetik ilişkilendirme çalışmalarında kullanılan SNP markörleri sayesinde bir takım genetik hastalıkların keşfine ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen diyabet, kemik yoğunluğu, glokom, koroner arter hastalığı, kan lipit konsantrasyonları, vücut ağırlığı, göz rengi gibi konuların araştırılmasına olanak sağlanmıştır (Pierce 2010).

DNA sekans varyasyonlarının büyük çoğunluğunu SNP'ler oluşturmaktadır. Bazı SNP'ler protein ürünündeki amino asidi değiştirmekte veya proteinin regülasyonunu yada ekspresyonunu etkilemektedir, bazıları ekzon içerikli farklı protein varyantlarıyla sonuçlanır. Ekzon, intron ya da kodlanamayan bölgelerdeki pek çok SNP'nin, yalnızca bir yada birkaçı direk olarak fenotipi etkilese de, hastalık ve fenotiple ilişkili olabilmektedir (Kwok 2003). Bazı SNP allelleri, direk olarak genin fonksiyonunda yada regülasyonunda farklılığa yol açıp hastalığa neden olurken, bazıları etkisiz yani çekinik kalmakta veya canlı için olumlu olabilecek etki göstermektedirler. Ancak çoğu SNP allelik varyant olarak kalır ve fenotipik farklılık olarak ortaya çıkmaz (Brookes 1999, Pierce 2010)

1.8.3. Diğer DNA Markörleri

Diğer DNA markörlerine kısaca değinecek olursak; VNTR (Değişken sayıda ardı ardına tekrarlar), genelde DNA üzerindeki ardışık tekrarlayan diziler içinde yer alan kısa tekrar birimleridir. Tekrarların sayısındaki değişiklikler polimorfizmleri oluşturmaktadır. SSCP (tek-iplik konformasyon polimorfizmi), nükleotid baz dizisindeki polimorfizm nedeni ile oluşmuş farklılığın ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır. Başka deyişle ortak kökenli DNA parçalarının (tek iplikli) birbirinden

farklı olup olmadıklarını saptamaktadır. STS (Sekans etiketli bölge), dizisi bilinen kısa bir DNA bölgesidir. PZR ile çoğaltıldıktan sonra genom haritaları için başlangıç nesnesi olarak kullanılabilmektedir. RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), ters yönelimdeki primer dizisiyle çevrili gizli DNA bölgeleridir. AFLP (çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı) restriksiyon enzimlerince kesime dayalı bir tekniktir ve yüksek ayrım gücünden dolayı tercih sebebi olmaktadır. Dairesel yapıda olan ve sadece anne tarafından kalıtılan mtDNA'lar ise hücrede mitokondri içerisinde bulunurlar. Her mitokondri içinde ortalama 4-5 kopyaları vardır ve genetik araştırmalar için büyük önem taşırlar. Eksprese dizi etiketleri yani EST'ler, eksprese edilen genleri ve genomik dizilerin kodlayıcı bölgelerini belirlemekte kullanılırlar. Mikrosatellitler (SSR) ise ökaryotik hücre genomunda ardışık tekrar eden kısa DNA dizileridir (Passarge 2000, Bulut 2004, Butler 2005, Wu 2007, Pierce 2010).

1.9. Çalışmada Kullanılan Yerli Sığır Irklarının Genel Özellikleri

1.9.1. Güney Anadolu Kırmızısı (GAK)



Resim 1.2. Güney Anadolu Kırmızısı sığırı (turkhaygen.gov.tr)

Yayılma alanı Torosların güneyinde kalan Akdeniz bölgesi ile Güneydoğu Anadolu Bölgesidir. Türkiye'nin en iri yapılı ve süt verimi en yüksek yerli ırkıdır. Uzun yıllardan beri bu bölgelerde yetiştirildiklerinden dolayı Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin mevcut koşullarına, özellikle sıcak iklimine iyi adapte olmuşlardır. Bakım ve beslemenin düzenli olmadığı ilkel şartlarda yetiştirilebilirler. Uzun mesafeleri rahatlıkla yürürler.

Güney Anadolu Kırmızısı kirli sarıdan kırmızı tarçıniye kadar değişen renkler gösterirler. En çok görülen tarçın rengidir. Vücudun ön kısmı arka kısmından daha koyu renklidir. Genel olarak burun etrafında vücut renginden daha açık bir halka vardır. Bacakların iç yüzeyleri, memeler ve karın altı vücuda nazaran daha açık renktedir.

Laktasyon süreleri kısa olup yedi ay kadardır. Makineli sağım için uygun değildirler. Süt verimleri, içinde bulundukları bakım ve beslenme şartlarına göre ortalama 1500 - 2500 kg arasında değişir. Süt verimi yönünden varyasyon büyük olup 5000 kg'a kadar süt veren ineklere rastlanmaktadır. Laktasyon süresi 240 gün

olup sütteki yağ oranı %3-3.5'tur. Ergin canlı ağırlıkları dişilerde 400 kg, erkeklerde 600 kg civarındadır. Beside günlük canlı ağırlık artışı 800 - 900 g arasındadır (tarimkutuphanesi.com).

1.9.2.Yerli Kara (YK)



Resim 1.3. Yerli Kara sığırı (tarimkutuphanesi.com).

Yerli Kara ırkı sığırlar, genelde Orta Anadolu bölgesinde yetiştirilirler ve bu bölgenin iklim ve çevre şartlarına adaptedirler. Başları vücutlarına oranla biraz iridir. Boynuzlar hilal şeklinde olup ince ve kısadır. Anadolu'ya adapte olmuş ırklar arasında en ufak yapılı olanlarıdır. Deri rengi genelde siyah olup meme bölgesinde beyaz veya açık tonlu kısımlar bulunabilmektedir.

Yerli Kara sığır ırkının en önemli görülen özelliklerinden birisi çok uysal olmasıdır. Az ot ve az samanla beslenerek kanaatkar olduğunu da ispatlamıştır.

Laktasyon süreleri 200 gün, süt verimi 700 - 900 kg, süt yağı oranı %4 civarındadır. Bakım ve besleme şartları iyileştirilirse süt verimi 1200 kg'a kadar çıkartılabilir. Ergin canlı ağırlıkları dişilerde 200 kg, erkeklerde 300 kg civarındadır. Beside günlük canlı ağırlık artışı yaklaşık 900 g kadardır (tarimkutuphanesi.com).

1.9.3. Boz Irk (BI)



Resim 1.4. Boz Irk sığırı (tarimkutuphanesi.com).

Yayılma alanı Türkiye'nin Trakya, Güney Marmara, Kuzey Ege ve Orta Anadolu'nun batı bölgeleridir. Bu bölgelerin iklim ve çevre şartlarına adapte olmuş ve fakir gıda ile yetinen bir ırktır. Sayıları oldukça azalmış olan bu ırkın doğal yaşam alanları genelde dağlık bölgelerdeki orman içleri ve engebeli arazilerdir. Bu tür alanlarda hiçbir insan müdahalesi olmadan beslenip üreyebilirler. Oldukça gelişmiş bir sindirim sistemine sahiptirler. Düşük kalitedeki yemleri iyi değerlendirebilirler. İklime uyma kabiliyetleri çok yüksektir.

Vücut rengi açık gümüşiden koyu kül rengine kadar değişir. Boğaların göz etrafında koyu bir halka, burun ucunun üst sınırında siyah bir halka vardır. İnekler boğalara göre daha açık renkli olurlar. Beden sağlam yapılıdır. Ergin canlı ağırlıkları dişilerde 300 - 350 kg, erkeklerde 400 - 450 kg civarındadır.

Meme yapıları küçük olup süt verimleri düşüktür. Asabi karakterli olan bu ırkın sağımı güçtür. Laktasyon süresi 180-240 gündür. Laktasyon süt verimi ortalama 800 - 1000 kg ve süt yağı %4 civarındadır. Beside günde yaklaşık 700 - 900 g canlı ağırlık artışı sağlayabilmektedir (tarimkutuphanesi.com).

1.10. Populasyon Genetiği ve İstatistiki Yöntemler

Populasyon genetiği, bir populasyondaki farklı genotiplerin frekansları ile ilgilenmektedir. Bir populasyondaki belirli bir gen lokusunda bir allelin bulunma sıklığı ise allel frekansını vermektedir. Populasyonun zaman içinde nasıl bir değişim gösterdiği allel frekanslarıyla saptanabilmektedir. Populasyon genetiği çalışmalarında allel frekansları, genotip frekanslarına göre daha kullanışlıdır (Passarge 2000). Allelik ve genotipik frekansların Mendel yasasıyla uyumunun kontrol edilmesi için populasyon genetiğinin önemli prensiplerinden biri olan Hardy-Weinberg denge kanunuyla uyumunun incelenmesi gerekmektedir (Pierce 2010).

1.10.1. Hardy-Weinberg Denge Kanunu

Bir allelin sıklığı bilindiği takdirde, genotipin populasyondaki sıklığı saptanabilmektedir. 1908 yılında, İngiliz matematikçi Geoffrey H. Hardy ve bir Alman doktoru Wilhelm Weinberg'in birbirinden habersiz olarak geliştirdikleri ve 'Hardy-Weinberg (HW) Denge Kanunu' denilen kurala göre; populasyonun yeterince büyük olması, populasyonda rastgele çiftleşmelerin olması, seleksiyon, mutasyon ve göç olmaması durumunda allel frekansları jenerasyonlar arasında sabit kalmakta ve populasyon genetik olarak dengede olduğu kabul edilmektedir. HW dengesine göre iki allelli bir lokusun dağılımı $(p+q)^2=1$ yani $p^2+2pq+q^2=1$ şeklinde olmaktadır. Burada p, A allelinin; q, a allelinin sıklığını temsil etmektedir. A allelinin sıklığı (p) biliniyorsa, a allelinin sıklığı (q); a allelinin sıklığı biliniyorsa, A alleinin sıklığı hesaplanabilmektedir. Bunun tersine eğer genotip sıklığı gözlenmişse, allel sıklığı hesaplanabilmektedir. Yani sadece aa homozigot bireyler biliniyorsa, q^2 sıklığına eşittir ve $p=1-q$ dan heterozigot (pq) ve AA homozigotların (p^2) oranı belirlenebilmektedir. Populasyon bazen HW dengesinden sapabilmektedir. Bunun tespiti için, istatistiki olarak χ^2 (ki-kare) testi kullanılmaktadır (Haldene 1954, Erensayın 2000, Passarge 2000, Hamilton 2009).

1.10.2. Ki-Kare (χ^2) Testi

Araştırmalarda çoğunlukla hem zaman hem de ekonomik nedenlerden dolayı çok büyük sayıda örnek üzerinde çalışılamamaktadır. Ya da bazen populasyon

içerisinde mutasyon, seleksiyon, göç gibi durumların olduğundan şüphelenilebilmektedir. Böyle durumlarda, araştırmalar sonucu elde edilen bulguların istatistiki olarak ki-kare testi ile uygunluğu test edilebilmektedir.

Sonuçların beklenen değerlere eşit olması yada tesadüfi sapmaların tespit edilmesi için kullanılan ki-kare testi, $\chi^2 = \Sigma(G-B)^2/B$ formülü ile hesaplanabilmektedir. Burada G, gözlenen değeri, B, beklenen değeri temsil etmektedir. Hesaplamaya geçilmeden önce değerler arasında önemli farkın olup olmadığını test etmek için bir hipotez öne sürülmektedir. Bu hipoteze sıfır hipotezi (H_0) denmektedir. Hipotezin kabul edilmediği durumda ise alternatif hipotez (H_A veya H_1) öne sürülmektedir. Hesaplamalar sonucu elde edilen χ^2 değeri, istatistikte kullanılan ve güven sınırlarına göre oluşturulmuş tabloda verilen χ^2 değeriyle kontrol edilmektedir. χ^2 değeri, tablo değerinden - belirtilen güven sınırları içinde - küçük bulunmuşsa sıfır hipotezi öne sürülmekte yani beklenen ve gözlenen değerler arasında önemli bir farkın olmadığı sonucuna varılmaktadır (Erensayın 2000, Hamilton 2009).

Bu çalışmada; Türkiye'de bulunan ve yerli genetik kaynaklarımızdan olan Güney Anadolu Kırmızısı, Yerli Kara, Boz Irk sığır ırklarında, süt yağı miktarı ve süt yağı verimi üzerinde etkili olan OLR1 (oxidized low-density lipoprotein receptor 1) geni 3'UTR bölgesinde 10141 - 10680 nükleotidleri arasındaki polimorfik yapının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Belirlenen Parçacık Polimorfizm Yöntemi / Restriksiyon Enzimleri Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemleri kullanılarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyal

Türkiye'nin değişik bölgelerinden, akraba olmayan ve rastgele seçilmiş Boz Irk (BI), Yerli Kara (YK), Güney Anadolu Kırmızısı (GAK) ırklarından, EDTA'lı tüplere alınan 147 kan örneği kullanıldı. Kan örnekleri TÜRKHAYGEN-1 106G104 numaralı projesi kapsamındaki bir araştırma için alınan örnekler olup laboratuvarımızda mevcuttur.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan hayvan materyal

Irk	Dişi (n)	Erkek (n)	Toplam (n)
GAK	24	27	51
YK	27	22	49
BI	23	24	47
Toplam	**74**	**73**	**147**

2.2. DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden standart fenol/kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı (Sambrook ve ark 1989). Dört yüz µl tam kan örneği 2 ml lik eppendorf tüplere konuldu. Üzerlerine 20 µl 0,5 M EDTA (pH 8.0) konuldu. Bununda üzerine 2X lysis buffer ile 2 ml'ye tamamlandı. On dakika boyunca tüpler iyice karıştırıldı. Daha sonra 30 dakika buzun içinde bekletildi. Buzdan alınan tüpler 3000 rpm de +4 ^{0}C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün süpernatant fazı atıldı. Tüpteki pellet üzerine 240 µl SALT/EDTA eklenerek iyice vortexlendi. Daha sonra üzerine 24 µl %10 luk SDS solüsyonu ve 12 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek örnekler 55 ^{0}C de 3 saat etüvde bekletildi. Bekleme sonunda tüp üzerine 240 µl FENOL (pH 8.0) eklendi. Tüpler 20 saniye oldukça sert bir şekilde çalkalanıp sonra 5 dakika da yumuşak şekilde alt üst edildi. Daha sonra tüpler 3000 rpm de +4^{0}C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatant kısmı yeni tüplere alındı. Bu tüpün üzerine 240 ml fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1 oranında) eklendi. Tüpler yine 20 saniye oldukça sert bir şekilde çalkalandı ve sonra 5 dakika da yumuşak şekilde ters yüz edildi. Daha sonra tüpler 3000 rpm de +4^{0}C de

10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatant kısmı yeni tüplere alındı. Süpernatantın 1/10'u kadar 3 M NaAc pH 5.2 eklendi. Üzerine, alınan süpernatant kısmının 2,5 katı kadar -20^{0}C de soğutulmuş %95'lik ETANOL eklendi. Tüpler sert bir şekilde sallandı ve yoğunlaşarak çöken DNA cam çubuk ile alınarak yeni tüpe alındı. Pellet kurutulup alkol uzaklaştırıldı. Pellet, 0,2 ml 10 mM Tris, pH 8.0 ile sulandırıldı.

2.3. İzole Edilmiş DNA'ların Miktar ve Kalitesinin Ölçülmesi

İzole edilen DNA'lar Thermo Scientific Nanodrop ND-1000 ile ölçüldü. Ölçüm sonucunda DNA örneklerinin kalitesi ve yoğunlukları ng/µl ve 260/280 A UV ile tespit edildi.

2.4. PZR

Elde edilen DNA'ların OLR1 gen bölgesinin 270 baz çift (bç) lik fragmenti PZR yöntemi ile yükseltendi. PZR protokolü olarak 30 µl'lik PZR ürünü elde etmek amacıyla her bir örnek için; 20 µl TP mix (20 µl TP mix içinde: 3 µl Taq Buffer, 1,8 µl MgCl++, her birinden 0,06 µl olacak şekilde toplamda 0,24 µl dNTP, 14,96 µl distile su), her bir primer çiftinden 0,2 µl ve 4 µl DNA template ve 5,6 µl de distile su kullanıldı. Kullanılan primerler; AAGGCGAATCTATTGAGAGC (forward) ve ACTTCTCTGAAGTCCTGCA (reverse) şeklindedir (Khatib ve ark 2006). PZR, MJ Research PTC-200 thermal cycler cihazı ve touchdown PZR profili (Don 1991) kullanılarak iki aşamada yapıldı. 95°C'de 4 dakika denatürasyonun ardından ilk aşamada 16 döngü için 94°C'de 30 saniye denatürasyon, primerlerin ideal bağlanma noktasının sağlanması için 60°C'den başlayarak her bir döngüde 0.5°C düşürülen ve 30 saniye süren bağlanma ve 72°C'de 30 saniye uzama sağlandı. İkinci aşamada 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 30 saniye uzama olacak şekilde toplam 25 döngü gerçekleştirildi. Son olarak örnekler 72°C'de 10 dakika tutularak tam bir bağlanma sağlandı.

2.5. Agaroz Jel Elektroforez Analizi

PZR işleminden sonra elde edilen PZR ürünlerini değerlendirmek amacıyla % 2'lik agaroz jel kullanılmıştır. PZR ürününden 10 µl alınıp 5 µl 6x loading dye ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Yürütme sonunda jelin UV ışık altında fotoğrafı çekilerek değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda 270 bç büyüklüğünde bantlar görülmüştür.

2.6. OLR1 Geninin Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Değerlendirme sonucunda geriye kalan 20 µl PZR ürünlerinde restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizm analizi için restriksiyon kesimi yapıldı. Enzim-buffer-su karışımları hazırlanıp (her bir örnek için 0,5 µl PstI enzimi, 0,5 µl buffer, 9 µl bidistile su) 10 µl PZR örneklerinin üzerine eklendi ve 37 °C'de bir gece (yaklaşık 17-18 saat) bekletildi. Bu sürenin bitiminden sonra % 2'lik agaroz jele elde edilen enzim kesim ürünleri yüklendi. Her bir örneğin yanına enzimle kesilmemiş PZR ürününden 10'ar µl'si, 5 µl 6x loading dye ile boyanarak aynı jelde, aynı örneğin yanına farkı daha iyi gözlemleyebilmek için yüklendi. Yürütme sonunda UV ışığı altında fotoğrafı çekilip değerlendirildi.

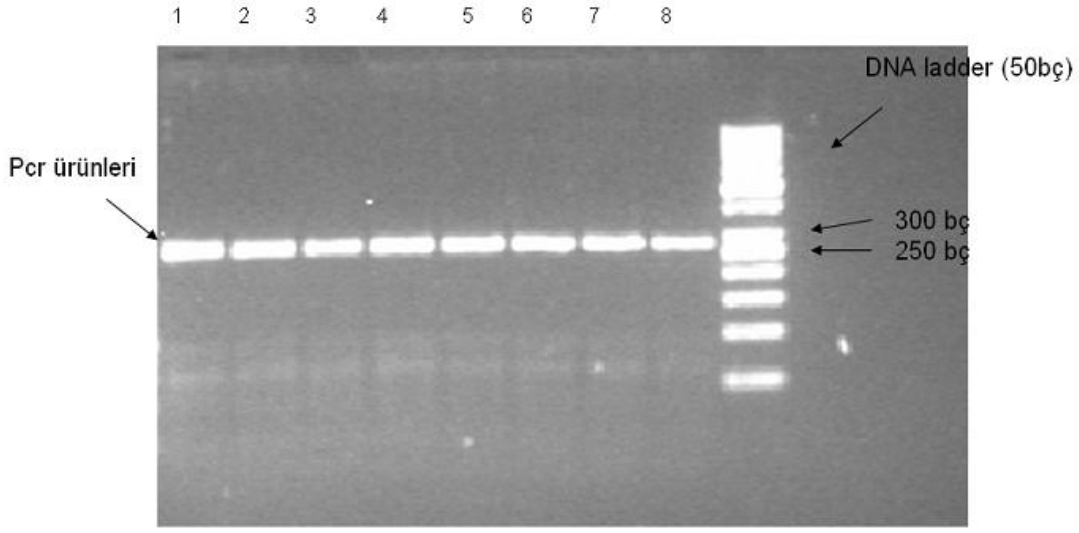
2.7. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi TFPGA, version 1.3.8 programı ile (Miller 1997) yapıldı. Hardy-Weinberg dengesi tam olasılık testi ile değerlendirildi. Mega 5 programıyla (Tamura 2011) dairesel ağacı çizildi.

3. BULGULAR

3.1. OLR1 Geni 3’ UTR bölgesi Polimorfizmi Bulguları

Fenol/kloroform yöntemiyle izole edilen DNA’ların OLR1 gen bölgesinin 10141 – 10680. nükleotidleri arasında bulunan kısmı, PZR yöntemi ile yükseltgenmiş ve enzimle kesilmeden önce agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. UV ışık altında çekilen jel fotoğraflarında 270 bç uzunluğunda gözlenen bantlar Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



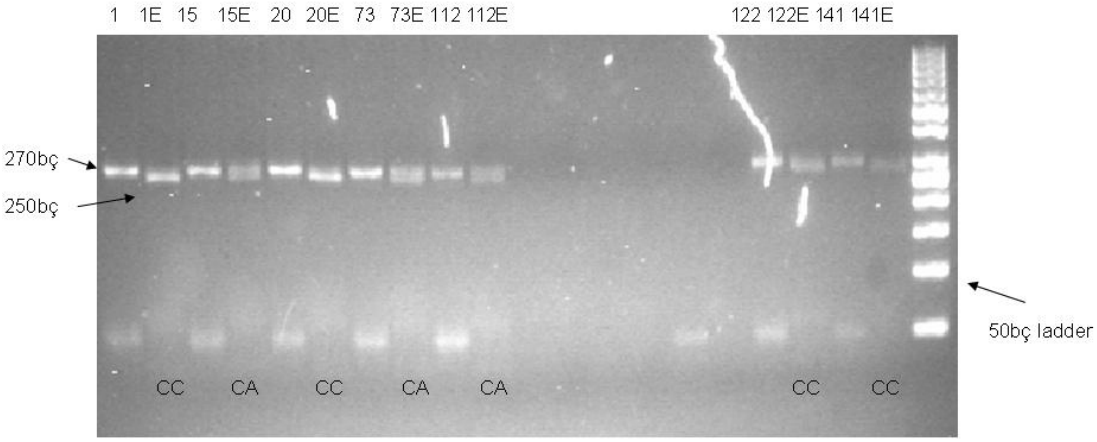
Şekil 3.1. OLR-1 geni (NC_007303) 10141 – 10680. nükleotidleri arasındaki bölgenin PZR ile yükseltgenen (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 nolu) örnekler. 9. kuyucuk DNA markörünü (50 bç) göstermektedir.

3.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

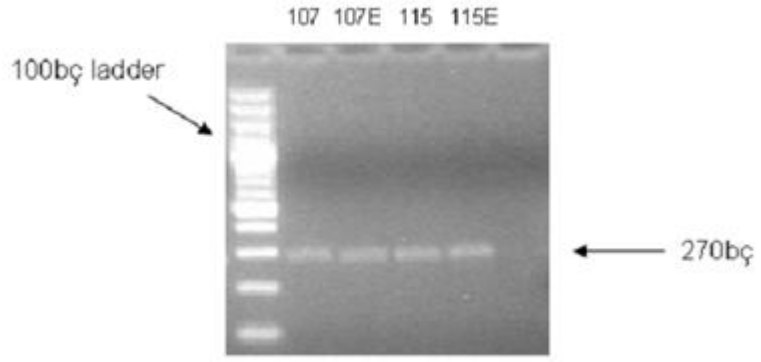
OLR1 geni 3’ UTR C8232A polimorfizminin belirlenmesi amacıyla yükseltgenmiş PZR ürünü, PstI (*Providencia stuartii-I*) restriksiyon enzimiyle kesilmiş ve agaroz jel elektroforezinde parça büyüklüklerine göre ayrıştırılmıştır.

Agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılan ve UV ışık altında çekilen jel fotoğraflarında üç farklı bant profili gözlenmiştir. Bunlardan ilki, kesme işleminin gerçekleşmediği 270 bç uzunluğundaki bant, ikincisi kesme işleminin gerçekleştiği

250 bç uzunluğundaki bant, üçüncüsü ise 250 bç ve 270 bç uzunluğunda iki ayrı bantın gözlenmesidir.



Şekil 3.2. OLR1 geninde 10141 - 10680 nükleotidleri arasındaki gen bölgesinin PZR ürününün, PstI restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası, agaroz jel fotoğrafı. (son kuyucuk DNA markerını (50 bç) göstermektedir). 1, 20, 122, 141 nolu örnekler CC; 15, 73, 112 nolu örnekler CA genotipini göstermektedir (her örneğin yanına negatif kontrolü konularak, bantların daha kolay ayırt edilebilmesi sağlanmıştır.)



Şekil 3.3. BI sığır ırkına ait PZR ürünlerinin (107 ve 115) PstI enzimiyle kesimi sonrası agaroz jel elektroforezi.

3.3. OLR1 Geni Genotipleme Sonuçları

Değerlendirme sonucunda, OLR1 geni için 270 bç ve 250 bç büyüklüğünde bantlar gözlenmiştir. Genotipleme yapılırken sadece 270 bç büyüklüğünde bant görüldüğünde AA homozigot; 250 bç büyüklüğündeki bantla, 270 bç

büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde CA heterozigot ve sadece 250 bç büyüklüğündeki bant görüldüğünde ise CC homozigot şeklinde genotiplendirilmesi değerlendirilmiştir.

On sekiz örneğin (2 GAK, 1 YK, 15 BI), farklı PZR kondisyon ve profillerinde bantlar gözlemlenememiştir. Bu yüzden bu 18 örnek istatistiki değerlendirmeye alınmamış ve geriye kalan 129 örnekle istatistiksel analizler yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Güney Anadolu Kırmızı, Yerli Kara ve Boz Irk sığır ırklarında gözlenen genotipler.

	Gözlenen genotipler		
	CC	**CA**	**AA**
GAK	46	3	0
YK	42	6	0
BI	27	3	2
Toplam	**115**	**12**	**2**

3.4. İstatistiksel Analizlerin Sonuçları

Genotiplemesi yapılan verilerin allel ve genotip frekansları hesaplanmış, ki-kare (χ^2) testi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık seviyesi 0,05 alınmıştır.

Çizelge 3.2. OLR1 3'UTR C8232A genotipik, allelik frekans, gözlenen, beklenen heterozigot değerleri.

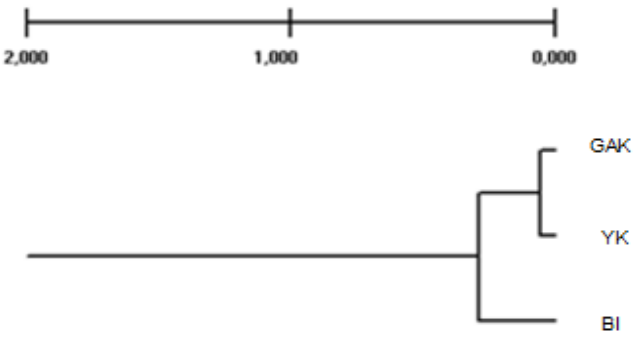
	genotipik frekans				**allelik frekans**		**heterozigot %**	
	CC	**CA**	**AA**	**EP1**	**C**	**A**	**Gözlenen H_0**	**Beklenen H_E**
GAK	0,95	0,06	0,0009	0,83	0,97	0,03	6,12	5,94
YK	0,92	0,12	0,004	0,65	0,94	0,06	12,5	11,73
BI	0,77	0,19	0,012	0,003*	0,89	0,11	9,38	19,48

EP1: exact probability (Haldene 1954)
* P<0,05 ise EP önemlidir.

OLR1 geni 3' UTR C8232A polimorfizmi için yapılan genotiplemede; 115 hayvanda (%89,15) CC genotipi, 12 hayvanda (%9,3) CA genotipi ve 2 (%1,55) hayvanda ise AA genotipi bulundu. GAK, YK ve BI sığır ırklarında CC genotipi

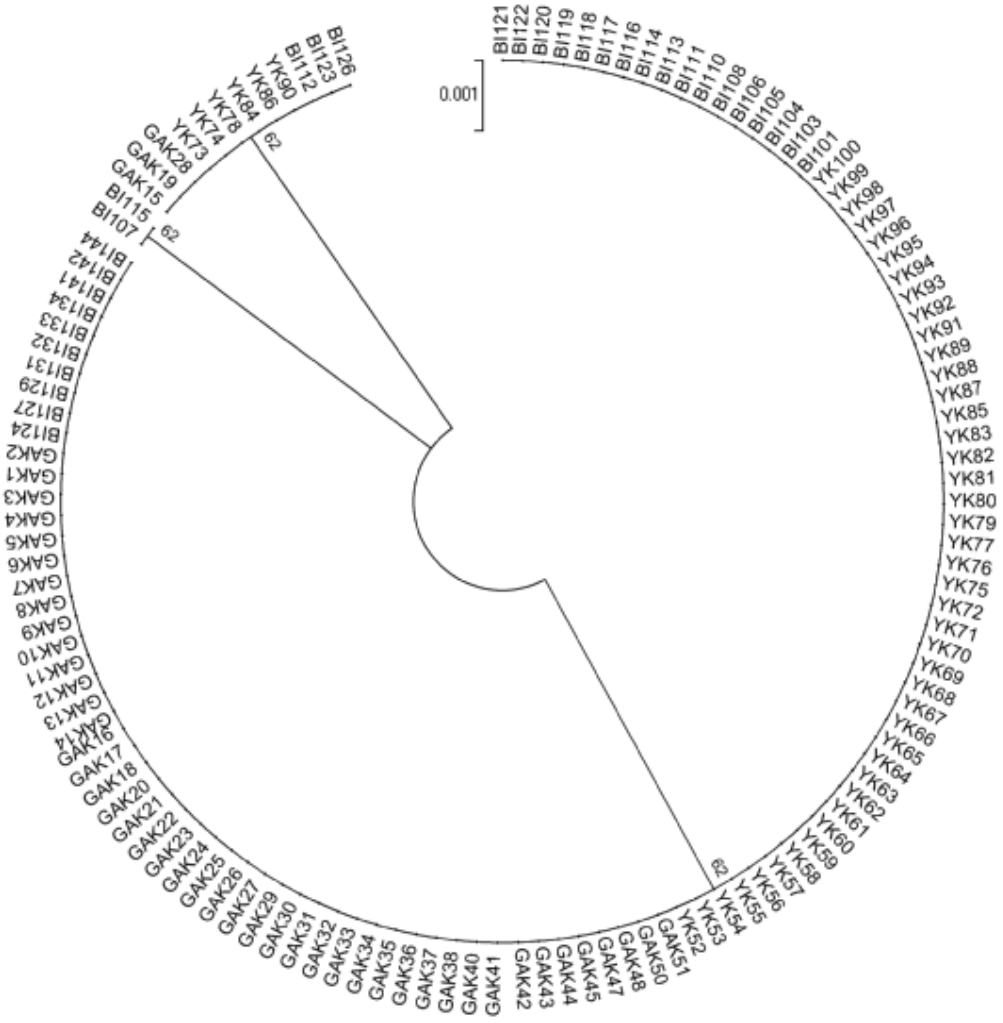
sırasıyla %93,88, %87,5 ve %84,38, CA genotipi sırası ile %6,12, %12,5 ve %9,38, AA genotipi ise sırası ile %0, %0 ve %6,25 olarak bulundu. AA genotipi referans alınarak yapılan istatistiksel hesaplamada heterozigot CA genotipinin GAK, YK ve BI sığır ırkları arasındaki dağılımlarında istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edildi (χ^2= 8,61). Bu farklılığın sebebinin ortaya konması için Çizelge 3.1.'deki veriler kullanıldığında; AA genotipinin BI'da 2 (%6,55) hayvanda, GAK ve YK'da ise mevcut olmadıgı görülmektedir.

3.5. Kullanılan Sığır Irklarının Karşılaştırılması



Şekil 3.4. Irkların filogenetik karşılaştırılmasını gösteren agaç (TFPGA, version 1.3.8 programı ile (Miller 1997)).

Sığır ırkları arasındaki genetik ilişki ağacını gösteren Şelik 3.4.'e göre ırklar 2 ana gruba ayrılmaktadır. Buna göre BI diğer 2 gruptan farklılık göstermiş ve ayrılmıştır. GAK ve YK ırkları ise birbirine benzerlik göstermektedir.



Şekil 3.5. Çalışmada kullanılan tüm bireylerin karşılaştırılmasını gösteren dairesel ağaç (Mega 5; Kimura 2 parametresi ile (Tamura 2011)).

4. TARTIŞMA

Sunulan çalışmada, Türkiye'de bulunan Güney Anadolu Kırmızısı, Yerli Kara, Boz Irk sığır ırklarının süt yağı ve süt verimi üzerinde etkili olan OLR1 (oxidized low - density lipoprotein receptor 1) geni 3'UTR bölgesinde 10141 - 10680 nükleotidleri arasındaki polimorfik yapının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Belirlenen Parçacık Polimorfizm Yöntemi / Retriksiyon Enzimleri Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemleri kullanılarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

Sığır aort endotel hücrelerinde tanımlanan OLR1, düşük dansiteli lipoproteini bağlayan ve indirgeyen bir majör protein olarak bilinmektedir. Haplotip analizlerinde 3'UTR 8232 pozisyonundaki C allelinin; süt yağı verimi ve yüzdesini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (Khatib ve ark 2006). Sığırlardaki OLR1 geni, süt bileşim özellikleriyle ilişkisinin olduğu düşünülerek aday gen olarak seçilmiştir (Khatib ve ark 2007).

Mutasyon analizleri ile OLR1 geninin 3'UTR bölgesinde 8232. pozisyonda bulunan sitozin (C) nükleotidinin, adenin (A) nükleotidine değiştiği bir polimorfizm belirlenmiştir (Khatib ve ark 2006). Sunulan çalışmada GAK, YK ve BI sığır ırklarının 8232. pozisyonundaki polimorfizmi belirlemek amacıyla PZR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. OLR1 geninin 8232. pozisyonunda bir polimorfizm varsa restriksiyon enzimi bu bölgeyi tanımamakta ve kesme işlemi gerçekleşmemektedir. Başka bir deyişle OLR1 geninin 8232. pozisyonunda, adenin (A) nükleotidi varsa enzim buraya yerleşememekte ve hedeflenen bölgeyi kesememektedir.

Khatib ve ark (2006) OLR1 geni 3'UTR polimorfizmini incelemeleri sonucunda AA genotipli bireyler; CC ve CA genotipli bireylerle karşılaştırıldığında AA genotipli bireylerde OLR1 ekspresyonunun azaldığını görmüşlerdir. Bu durumun A allelinin varlığıyla alakalı olabileceği gibi, yakınlardaki fonksiyonel bir SNP'nin varlığıyla da bağlantılı olabileceğini belirtmişlerdir. Holştayn ırkında C allelinin frekansını %54, Guernsey ırkında %87 ve Bison Bison, İsviçre Holştayn ile Jersey ırklarında %100 olarak bulmuşlardır. Sunulan çalışmada ise C allelinin frekansı; Güney Anadolu Kırmızısı ırkında %97, Yerli Kara ırkında %94 ve Boz Irk'ta ise %89 olarak hesaplanmıştır. Yerli sığır ırklarımız için bulunan C alleli frekansı,

Khatib ve ark (2006)'nın çalışmasında kullanılan C alleli frekansı ile yakınlık göstermektedir.

Yine, Khatib ve ark (2007) OLR1 C8232A polimorfizminde C allelinin sıklığını İsviçre Holştayn ırkında %95 olarak saptamışlardır. UW (The University of Wisconsin)'in kaynak populasyonunda ise C alleli Holştayn ırkı için %64 olarak verilmiştir. Bu iki ırktan İsviçre Holştayn ırkı daha yüksek süt yağı yüzdesine sahip olduğu için iki ırk arasındaki farklılığın sebebinin C allel frekansı olduğunu ifade etmişlerdir.

Komisarek ve ark (2009) OLR1 geni 3'UTR bölgesiyle ilgili benzer çalışmada, C allelinin frekansını %57 ve A allelinin frekansını %43 bulmuşlardır. Süt ve yağ yüzdesi için tahmini damızlık değerlerinin (EBV), CC ve CA genotipli boğalara göre AA boğalarında daha düşük görülmüştür ve bunun sonucu olarak C allelinin süt yağı yüzdesine pozitif etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. AA genotipindeki bireylerde süt yağı yüzdesinin az olması, düşük OLR1 gen ekspresyonu ve plazma ox-LDL konsantrasyonunun yeterince az olmasından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Sunulan çalışmada ise Çizelde 3.2'deki verilere bakıldığında CC genotipinin, AA genotipinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle GAK, YK ve BI sığır ırklarında süt yağı veriminin oldukça yüksek olabileceği sonucuna varılmıştır. En yüksek süt yağı miktarının GAK ırkında, daha sonra YK ırkında ve son olarak BI'da olabileceği düşünülmüştür.

Yine Schennink ve ark (2009) OLR1 geni C8232A polimorfizminde C alleli frekansını %71 bulmuşlar ve Khatib ve ark (2006)'nın çalışma raporları ile uyum içinde olduğunu belirtmişlerdir. Ancak kendi çalışmalarında düşük süt yağı verimiyle ilgili bir ilişki görememişlerdir.

Çalışılan yerli sığır ırklarında; OLR1 geni 3'UTR bölgesindeki AA genotipi yalnızca Boz Irk (BI) sığır ırkında 2 erkek sığırda gözlenmiştir. Diğer iki ırkta ise AA genotipli bireylere rastlanmamıştır. AA genotipindeki bireylerin dişi olması durumunda, düşük OLR1 gen ekspresyonu ve plazma ox-LDL konsantrasyonunun az olması sonucunda süt yağı yüzdelerinin düşük olabileceği düşünülebilir.

Yapılan çalışma heterozigotluk açısından değerlendirildiğinde, en yüksek heterozigotluk düzeyine YK sığır ırkında ulaşılmıştır. Ayrıca BI ırkında, H_0 ve H_E değerleri arasında önemli bir farklılık gözlenmiştir. Bir lokusta yüksek allel yada allelik frekans dağılımı mevcut olduğunda daha geniş bir heterozigotluk elde edileceği düşünülürse, YK ırkında yüksek allel frekansı olduğu anlaşılmaktadır. Buna ek olarak, H_E değerinin BI ırkında yüksek olmasında, bu ırktaki örnek sayısının daha az olmasının önemli etkisi bulunmaktadır. Çünkü beklenen heterozigotluk hesaplamasında, örnek büyüklüğünün etkisi fazladır.

Hardy-Weinberg dengesine göre değerlendirildiğinde, BI sığır populasyonunun dengede olmadığı görülmektedir. Bunun nedeninin ise, Boz Irk'ın genel özelliklerine bakıldığında, Güney Anadolu Kırmızısı ve Yerli Kara sığır ırklarından farklı olarak, dağlık bölgelerdeki orman içlerinde ve engebeli arazilerde yaşamaları olduğu düşünülmektedir. Arazi yapısından dolayı bu bölgelerde küçük gruplar halinde yaşadıkları için, rastgele çiftleşmelerin olmamasından dolayı, HW dengesi için gerekli şartlardan biri sağlanamamaktadır. Bu durum da BI sığır populasyonunun HW dengesinden sapmasına sebep olmaktadır.

Süt yağı ve süt verimi üzerine etkili olan DGAT1 (diasilgliserol-asiltransferaz-1) geninin 10 433 - 10 434 pozisyonundaki K232A polimorfizmini belirlemek amacıyla PZR-RFLP metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada (Şahin 2010), Boz Irk, Yerli Kara, Güney Anadolu Kırmızısı, Doğu Anadolu Kırmızısı ve Zavot sığır ırkları araştırılmıştır. K (lizin) aminoasidi, A (alanin) aminoasidine dönüştüğü zaman, bu polimorfizmin etkisiyle sütteki yağ miktarı azalmaktadır (Strzalkowska 2005). Çalışma sonucunda, A allelinin en yüksek frekansı YK ırkında %58 olarak gözlenmiştir. Diğer ırklarda ise allel frekansları sırasıyla Zavot (%50), GAK (%50), BI (%38) ve DAK (%38) şeklinde bulunmuştur. Bu sıralamaya göre A allelinin sütteki yağ miktarını düşürdüğü göz önüne alınırsa, DAK ve BI sığır ırklarında süt yağı oranlarının yüksek olması beklenmektedir. Sunulan çalışmada ise BI en düşük, GAK ise en yüksek süt yağı oranına sahip olarak bulunmuştur. Şahin (2010)'in çalışmasındaki ırklarla, sunulan çalışmadaki ırklar aynı populasyona ait olmasına rağmen (her iki çalışmada da aynı kan örnekleri kullanılmıştır), süt yağı ve verimini etkileyen genlerin allel frekansları ırkların süt yağı ve süt verimi sıralamasını değiştirmektedir. Süt özelliklerini etkileyen birçok QTL olduğu ve başka

bölgelerdeki polimorfizm(ler)in etkisi düşünülürse, bu durum makul karşılanmaktadır.

Kepenek (2007)'in yaptığı çalışmada, dört yerli Türk sığır ırkı; Güney Anadolu Kırmızısı (n= 48), Doğu Anadolu Kırmızısı (n= 34), Yerli Kara (42), Bozırk (n= 46) ve damızlık olarak kullanılan Holştayn (n= 21) örneklerinde, süt üretimini arttıran Prolaktin (PRL) ve Diasilgliserol asiltransferaz-1 (DGAT1) genlerinin polimorfizmi araştırılmıştır. Yüksek süt verimiyle ilgili olduğu düşünülen PRL geninin A allelinin frekansının değerleri YK'da %56,5; BI'da %70; GAK'da %75,6 olarak bulunmuştur. Sütteki yağ miktarıyla ilgili olduğu düşünülen DGAT1 geninin K allelinin frekansının değerleri GAK'da %82,9; BI'da %85; YK'da %92,5 şeklinde bulunmuştur. PRL geninin A allelinin sütün verimini artırıcı yöndeki etkisi, yüksek A allel frekansı sebebiyle GAK sığır ırkında yüksek süt veriminin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca sunulan çalışmada da GAK, YK ve BI ırkları arasından; GAK en yüksek süt yağı verimine sahip olması beklenen ırk olarak belirtilmiştir. Kepenek (2007)'in çalışmasındaki DGAT1 geninde ise, K allelinin süt yağı miktarını arttırtığı göz önüne alınırsa, en yüksek süt yağı miktarının YK ırkında olması beklenebilir. Ancak Kepenek (2007)'in çalışmasında kullanılan örneklerin bu farklılığa neden olduğu düşünülmektedir.

Sunulan çalışma, önceden yapılan (Khatib ve ark 2006, Khatib ve ark 2007, Schennink ve ark 2009) OLR1 geni C223A polimorfizmi araştırmalarını destekler niteliktedir. Süt yağı verimi ve süt yağı oranı üzerine etkisi olan OLR1 genindeki polimorfik bölgenin; diğer sığır ırkları da kullanılarak ve sütün benzer özelliklerine etki ettiği düşünülen farklı polimorfik bölgelerle birlikte çalışılarak daha yarar sağlayabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; Türkiye'de bulunan Güney Anadolu Kırmızısı, Yerli Kara ve Boz Irk sığırlarının, süt yağı verimi ve süt yağı oranına etkisi olan OLR1 geni 3'UTR bölgesinin polimorfizmi PZR tekniği kullanılarak araştırılmış ve sığır ırklarının kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda, gruplardan BI'ın diğer iki ırktan farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

OLR1 geninde C allelinin en yüksek frekansı GAK (%97), daha sonra YK (%94), en düşük frekansı BI'da (%89) gözlenmiştir. Populasyon sayısı artırılarak ve diğer yerli ırklar da çalışmaya alınarak araştırma sonuçları daha detaylı değerlendirilebilir.

GAK, YK ve BI ırklarında yürütülen bu çalışma ile elde edilen verilerin, bu sığır ırklarında süt yağı oranı ile OLR1 gen polimorfizmi arasındaki ilişki ile ilgili çalışmalarda yararlı olması, hayvan yetiştiriciliği ve ıslah çalışmalarında süt verimi yönünden yapılacak çalışmalara katkı sağlaması ve genetik karakterizasyon araştırmalarına destek olması hedeflenmiştir.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Türkiye'de Bulunan Bazı Sığır Irklarının OLR1 Gen Polimorfizminin Araştırılması

Gözde YAZICITUNÇ

Biyokimya (VET) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2011

Sunulan çalışmada süt yağı verimi ve süt yağı yüzdesi üzerine etkili olan OLR1 geni 3'UTR C8232A polimorfizmi incelenmiştir.

Düşük dansiteli lipoproteini bağlayan ve indirgeyen bir majör protein olan OLR1'i kodlayan OLR1 geni süt bileşimi özellikleri bakımından aday gen olarak belirlenmiştir.

Çalışmada materyal olarak Güney Doğu Anadolu Kırmızısı (GAK), Yerli Kara (YK) ve Boz Irk (BI) ırklarından olmak üzere toplam 149 baş sığır kullanılmıştır. Fenol/Kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır.

Örnekler üzerinde OLR1 geninin 3'UTR bölgesindeki C/A polimorfizmi PZR-RFLP tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

OLR1 geninde C allelin en yüksek frekansı GAK (%97) daha sonra YK (% 94)'da, en düşük frekansı da BI'da (% 89) gözlenmiştir.

GAK, YK ve BI ırklarında yürütülen bu çalışma ile elde edilen verilerin, bu sığır ırklarında süt yağı yüzdesi ve verimi ile OLR1 gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin, süt özellikleri ile ilgili çalışmalarda yararlı olacağı, hayvan yetiştiriciliği ve ıslah çalışmalarında süt verimi yönünden seleksiyona katkı sağlayacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Sığır; OLR1 geni; Polimorfizm.

7. SUMMARY

Investigation of OLR1 Gene Polymorphism in gene Cattle in Turkey

In the present study, C8232A polymorphism in 3'UTR region of OLR1 gene, which is effective on the production and percentage of milk fat, was investigated.

Coding OLR1, a major protein decreasing and binding low density lipoprotein, OLR1 gene was defined as candidate gene in terms of the features of milk formation.

As the study material, total 149 cattles of South Anatolian Red (SAR), Anatolian Black (AB) and Anatolian Grey (AG) were used. DNA extraction was done with Phenol/Chloroform method.

C/A polymorphism in 3'UTR region of OLR1 gene was determined using PCR-RFLP technique in all samples.

The highest frequency of C allelle in OLR1 gene was found to be first in SAR (97%) and second in AB (94%), and the lowest in AG (89%).

The data obtained via the study performed on GAK, AB and AG kinds were concluded to be beneficial in studies associated between milk features in these kinds and polymorphism of OLR1 gene, and to contribute to the selection, improvement and raising of appropriate races as to milk production.

Key Words: Cattle; OLR1 gene; Polymorphism.

8. KAYNAKLAR

1. Akman N, Özkütük K, Kumlu S, Yener SM. Türkiye'de sığır yetiştiriciliği ve sığır yetiştiriciliğinin geleceği. Erişim: http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/71c50ad1a156d72_ek.pdf?tipi=14&sube=. Erişim tarihi: 12.05.2011.

2. Arda M. Biyoteknolojinin önemi, kısa tarihçesi, restriksiyon endonükleazlar ve RNA'dan cDNA elde edilmesi. Ankara Üni Vet Fak Temel mikrobiyoloji. Erişim: http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/368.pdf. Erişim tarihi: 25.08.2011.

3. Ashwell MS, VanTassell CP, Sonstegard TS. A Genome Scan To Identify Quantitative Trait Loci Affecting Economically Important Traits in a US Holstein Population. J Dairy Sci. 2001;84:2535-2542.

4. Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, Ron M, Weller JI, Lewin HA. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. J Dairy Sci. 2004;87:468-475.

5. Boz Irk sığır ırkı. Erişim: http://www.tarimkutuphanesi.com/SIGIR_IRKLARIMIZ_00134.html Erişim tarihi: 23.06.2011.

6. Brookes AJ. The esence of SNPs. Gene. 1999;234:177-186.

7. Brown TA. Genomes 2. Garland Sci; 2002.

8. Bulut Z. Türkiye'deki bazı koyun ırklarının genetik yapılarının mikrosatellitlerle incelenmesi. Selçuk Üni Sağ Bil Ens Biyokim A D. Doktora Tezi. Konya; 2004.

9. Butler JM. Forensic DNA typing. 2nd edition. London. 2005; 241-246.

10. Chen Q, Reis SE, Kammerer C, Craig WY, LaPierre SE, Zimmer EL, McNamara DM, Pauly DF, Sharaf B, Holubkov R, Merz NB, Sopko G, Bontempo F, Kamboh MI. Genetic variation in lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX1) gene and the risk of coronary artery disease. Circ. 2003;107:3146-3151.

11. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile thermus aquaticus. J Bacteriol. 1976;127(3):1550-57.

12. Devlet İstatistik Enstitüsü (DİE). Erişim: http://www.tuik.gov.tr. Erişim tarihi: 10.03.2011.

13. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 1991;19(14):4008.

14. Dunn S, Vohra RE, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S. The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease. Biochem J. 2008;409:349-355.

15. Elmacı C, Öner Y. Et sığırcılığında moleküler genetik yaklaşımlar. Hayvansal Üretim. 2007;48(2):45-48.

16. Engelking LR. Textbook of veterinary physiological chemistry. Burlington. Elsevier; 2011.

17. Erensayın C. Genetik. Ankara. Nobel; 2000.

18. Francke U, Brown MS, Goldstein JL. Assignment of the human gene fort he low density lipoprotein receptor to chromosome 19: synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. Proc Natl Acad Sci. USA. 1984;81(9):2826-30.

19. Gerstein AS. Molecular biology problem solver. New York. Wiley-Liss Inc; 2001.

20. Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Womack JE, Hoeschele I. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. Genetics. 1995;139:907-920.

21. Güney Anadolu Kırmızısı sığır ırkı. Erişim: http://www.tarimkutuphanesi.com/SIGIR_IRKLARIMIZ_00079.html. Erişim tarihi: 23.06.2011.

22. Haldene JBS. An exact test for randomness of mating. Department of Biometry. University College. London, 1954.

23. Hamilton MB. Population genetics. Hoboken. Blackwell; 2009.

24. Hattori H, Sonoda A, Sato H, Daisuke I, Tanahashi N, Murata M, Saito I, Watanabe K, Suzuki N. G501C polymorphism of oxidized LDL receptor gene (OLR1) and ischemic stroke. Sci Direct, 2006;246-249.

25. Heyen D.W, Weller JI, Ron M, Band M, Beever JE, Feldmesser E, Da Y, Wiggans GR, Vanraden PM, Lewin HA. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. Physiol Genomics. 1999;1:165–175.

26. Holliday R, Grigg GW. DNA methylation and mutation. Mutat Res. 1993;285:61-67.

27. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=109019599. Erişim tarihi: 15.05.2011.

28. Kakutani M, Masaki T, Sawamura T. A platelet–endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. Proc Natl Acad Sci. 2000;97:360-364.

29. Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriwaki H, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Hashimoto N, Kita T. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. Circulation. 1999;99:3110-3117.

30. Kepenek EŞ. Polymorphism of prolactin (PRL), diacylglycerol acyltransferase (DGAT-1) and bovine solute carrier family 35 member 3 (SLC35A3) genes in native cattle breeds and its implication for turkish cattle breeding. ODTU. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. 2007.

31. Khatib H, Leonard D, Schutzkus V, Luo W, Chang YM. Association of the OLR1 gene with milk composition in Holstein Dairy Cattle. J Dairy Sci. 2006;89:1753-1760.

32. Khatib H, Rosa GJM, Weigel K, Schiavini F, Santus E, Bagnato A. Additional support for an association between OLR1 and milk fat traits in cattle. Anim Genet. 2007;38:308-310.

33. Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I, Raadsma HW. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. Genet Sel Evol. 2004;36:163-190.

34. Kiraz S, Ekinci MS, Özköse E, Akyol İ. Genetik polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan moleküler teknikler. 5. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi. Yüzüncü Yıl Üni. 5-8 Eylül 2007.

35. Komisarek J, Dorynek Z. Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. J Appl Genet. 2009;50(2):125-132.

36. Koning D.J, Schulmant N.F, Elo K, Moisio S, Kinos R, Vilkki J, Maki-Tanila A. Mapping of multiple quantitative trait loci by simple regression in half-sib designs. J Anim Sci. 2001;79:616-622.

37. Kurnaz Ö. Koroner arter hastalarında okside düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör polimorfizmleri ve ACE I/D gen polimorfizmlerinin incelenmesi. İstanbul Üni. Moleküler Tıp Anabilim Dalı / Moleküler Tıp Programı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2008.
38. Kwok PY. Single nucleotide polymorphisms methods and protocols. New Jersey. Humana Pres Inc; 2003.

39. Mango R, Clementi F, Borgiani P, Forleo G.B, Federici M, Contino G, Giardina E, Garza L, Fahdi IE, Lauro R, Mehta JL, Novelli G, Romeo F. Association of single nucleotide polymorphisms in the oxidised LDL receptor 1 (OLR1) gene in patients with acute myocardial infarction. J Med Genet. 2003;40:933-936.

40. Mehta JL, Li D. Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low- density lipoprotein receptor. J Am Coll Cardiol. 2002: 39:1429-1435.

41. Mehta JL, Chen J, Yu F, Li DY. Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells. Cardiovasc Res. 2004;64:243-249.

42. Miller MP. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3. 1997.

43. Mulhardt C. Molecular biology and genomics. Çevirenler: Beese EW, Munich MD. Germany. Experimenter Series; 2011.

44. Passarge E. Renkli Genetik atlası. Çevirenler: Lülesi G, Sakızlı M, Alper Ö. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri; 2000.

45. Pierce BA. Genetics: a conceptual approach 4nd edition. England. HW Freeman; 2010.

46. Primrose SB, Twyman RM. Principles of gene manipulation and genomics. 7th edition. Malden. Blackwell; 2006.

47. Ringseis R, Dathe C, Muschick A, Brandsch C, Eder K. Oxidized fat reduces milk triacylglycerol concentrations by inhibiting gene expression of lipoprotein lipase and fatty acid transporters in the mammary gland of rats. J Nutr. 2007; 2056-2061.

48. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Pres. Cold Spring Harbor. 1989. Erişim: http://www.cshlpress.com/default.tpl?cart=127102115634698933&fromlink=T&linkaction=full&linksortby=oop_title&--eqSKUdatarq=21. Erişim tarihi: 25.08.2011.

49. Schennink A, Bovenhuis H, Leon-Kloosterziel K.M, Arendonk M, Visker W. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. Anim Genet. 2009;40:909-916.

50. Sentinelli F, Filippi E, Fallarino M, Romeo S, Fanelli M, Buzzetti R, Berni A, Baroni MG. The 3'UTR C>T polymorphism of the oxidized LDL-receptor 1 (OLR1) gene does not associate with coronary artery disease in Italian CAD patients or with the severity of coronary disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006;16:345-352.

51. Solak M, Bağcı H, Şengil AZ, Öztaş S. Moleküler genetik ve rekombinant DNA teknolojisi. Afyon Kocatepe Üni. Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı Yayın No:5 Afyon. 2000.
52. Strzałkowska N, Siadkowska E, Słoniewski K,Krzyżewski J, Zwierzchowski L. Effect of the DGAT1 gene polymorphism on milk production traits in Black-and-White (Friesian) cows. Anim Sci Pap Rep. 2005;23(3):189-197.

53. Şahin İ. Türkiye'de bulunan bazı sığır ırklarının DGAT1 ve PRNP gen polimorfizmlerinin araştırılması. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi. Konya. 2010.

54. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 2011; 28(10):2731-2739.

55. Tek nokta polimorfizmi (SNP) Erişim: http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_snp.pdf. Erişim tarihi: 07.07.2011.

56. Turner PC, McLennan AG, Bates AD, White MRD. Moleküler biyoloji. Çeviren: Konuk M. Ankara. Nobel; 2004.

57. Ünal RN, Besler H. Beslenmede sütün önemi. Ankara. Sinem Matb; 2006;1-46.

58. Weissensteiner T, Nolan T, Bustin SA, Griffin HG, Griffin A. PCR technology: current innovations. 2nd Edition. US. CRC Pres; 2003.

59. Weller JI. Quantitative trait loci analysis in animals. Cambridge. CABI; 2009.

60. Wu R, Ma C, Casella G. Statistical genetics of quantitative traits. New York. Springer; 2007.

61. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW. The human LDl receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its m RNA. Cell 1984;39(1); 27-38.

62. Yarkın İ. Sığır yetiştirilmesi. Atatürk Üniversitesi Yayınları Ziraat Fakültesi - Ders Kitapları Serisi. Erzurum. 1961.

63.Yerli Kara sığır ırkı. Erişim: http://www.turkhaygen.gov.tr/data/yerlikara.asp. Erişim tarihi: 12.05.2011.

9. EKLER

10. ÖZGEÇMİŞ

20.09.1985 yılında Konya'da doğdu. İlköğrenimini Konya İbrahim Yapıcı İlköğretim Okulu'nda, orta ve lise öğrenimini Konya Selçuklu Dolapoğlu Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra, 2003 yılında girdiği Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünden 2008 yılında mezun oldu. Eylül 2008'de Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.