T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE'DE BULUNAN KİLİS,TİFTİK VE KIL IRKI KEÇİLERİN KALPAİN VE KALPASTATİN GENLERİNDEKİ MUTASYONLARIN İNCELENMESİ

BURHANETTİN BAHADIR KÜÇÜK

DANIŞMAN
DOÇ. DR. FERAYE ESEN GÜRSEL

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Burhanettin Bahadır KÜÇÜK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi ve Tez çalışmam süresince destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmanın her aşamasında kıymetli bilgi ve tecrübelerini benle paylaşan, bu zorlu sürecin tamamlanmasında sabır gösteren değerli danışmanım Doç. Dr. Feraye ESEN GÜRSEL'e,

Tez çalışmamın tüm aşamalarındaki bilimsel katkı ve yönlendirmelerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Kemal Özdem ÖZTABAK'a,

Doktora eğitimim süresince sağladıkları desteklerden ve gösterdikleri dostluktan dolayı Doç. Dr. Atila ATEŞ, Doç. Dr. Iraz AKIŞ ve Araş.Gör. Gizem ATMACA'ya,

Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'nden Sayın Prof. Dr. Ayşen ALTINER, Prof. Dr. Nezir Yaşar TOKER, Prof. Dr. Hasret DEMİRCAN YARDİBİ'ye teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-20862

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER V
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Kantitatif Karakter Lokusları 3
2.2. PZR-RFLP 4
2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 4
2.2.2. PZR'nin bileşenleri 4
2.2.3. PZR'nin İşleyişi 5
2.2.4. Restriksiyon Endonükleazlar 7
2.2.5. Tek Nükleotid Polimorfizmi 7
2.2.6. Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi 8
2.3. Kalpain / Kalpastatin Sistemi 9
2.3.1. Kalpainler 9
2.3.2. Kalpain Geni 13
2.3.3. Kalpastatin 15
2.3.4. Kalpastatin Geni 17
2.4. Keçi Etinin Önemi ve Özellikleri 17
2.5. Keçi Irkları 19
2.5.1. Kıl Keçisi 20
2.5.2. Tiftik Keçisi 22
2.5.3. Kilis Keçisi 23
3. GEREÇ VE YÖNTEM 25
3.1. GEREÇ 25

3.1.1. Hayvan Gereci....25
3.1.2. Kullanılan Cihazlar....25
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler....26
3.1.4. DNA İzolasyonu için Kullanılan Çözelti ve Tamponlar....27
3.1.4.1. Lizis Tamponu....27
3.1.4.2. Nükleaz Tamponu....27
3.1.4.3. Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) Çözeltisi (%10)....27
3.1.4.4. Amonyum Asetat Çözeltisi (4,5 M)....27
3.1.4.5. DNA İzolasyonu....27
3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler....28
3.1.5.1. 0,5XTEB Çözeltisi....28
3.1.5.2. dNTP Çözeltisi....29
3.1.5.3. Primer Çözeltisinin Hazırlanması....29
3.2. YÖNTEM....29
3.2.1. Kan Alma İşlemi ve DNA İzolasyonu....29
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu....29
3.2.3. Restriksiyon parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)....30
3.2.4. Agaroz Jelin Hazırlanması ve PZR Ürünlerinin Yürütülmesi....30
3.2.5. Dizin Analizi....31
3.2.6. İstatistiksel Analiz....31
3.2.7. Etik Kurul Onay Bilgileri....31
4. BULGULAR....33
4.1. CAST Geni PZR-RFLP Metodu ile belirlenen polimorfizmler....33
4.2. CAST Geni Polimorfizminin Değerlendirilmesi....34
4.3. CAPN Geni Polimorfizminin Değerlendirilmesi....36
4.3.1. CAPN geni 5707 polimorfizmi....36
4.3.2. CAPN geni 5709 polimorfizmi....37
4.3.3. CAPN geni 5723 polimorfizmi....37
4.3.4. CAPN geni 5741 polimorfizmi....38
5. TARTIŞMA....43
5.1. KALPASTATİN (CAST)....44
5.2. KALPAİN (CAPN)....48
5.3. KORUNMUŞ GEN OLMASI....51

KAYNAKLAR 53
ETİK KURUL KARARI 72
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....73
ÖZGEÇMİŞ 74

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kıl Keçisi Vücut Ölçüleri ve Verim Özellikleri 21
Tablo 2-2: Tiftik Keçisi Vücut Ölçüleri ve Verim Özellikleri 22
Tablo 2-3: Kilis Keçisi Vücut Ölçüleri ve Verim Özellikleri 24
Tablo 3-1: Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan 25 µl PZR Karışımındaki Solüsyonlar ve Miktarları 30
Tablo 4-1: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAST geni polimorfizmi genotip ve allel frekansları 35
Tablo 4-2: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAPN geni 5707 polimorfizmi genotip ve allel frekansları 39
Tablo 4-3: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAPN geni 5709 polimorfizmi genotip ve allel frekansları 40
Tablo 4-4: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAPN geni 5723 polimorfizmi genotip ve allel frekansları 41
Tablo 4-5: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAPN geni 5741 polimorfizmi genotip ve allel frekansları 42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Döngüsü 6
Şekil 2-2: Kalpainin Şematik Yapısı 10
Şekil 2-3: Kalpain Aktivasyon Mekanizması 12
Şekil 2-4: Tipik ve Atipik Kalpainler 14
Şekil 2-5: Kalpastatinin Şematik Yapısı 16
Şekil 2-6: Kıl Keçisi 21
Şekil 2-7: Tiftik Keçisi 22
Şekil 2-8: Kilis Keçisi 23
Şekil 4-1: CAST geni 622 bç'lik Hedef Bölgesinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü 33
Şekil 4-2: CAPN geni 609 bç'lik Hedef Bölgesinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü 36

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A	:	Adenin
A_{260}	:	260 nanometre dalga boyundaki absorbans
bç	:	Baz çifti
BMP-15	:	Kemik morfogenetik proteini-15
BMPR-IB	:	Kemik morfogenetik proteini reseptör-IB
C	:	Sitozin
C^o	:	Celsius
Ca	:	Kalsiyum
cAMP	:	Siklik adenozin monofosfat
CAPN	:	Kalpain
CAST	:	Kalpastatin
cm	:	Santimetre
d	:	Domain
dATP	:	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	:	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	:	Deoksiguanozin trifosfat
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dNTP	:	Deoksiribonükleozid trifosfat
dTTP	:	Deoksitimidin trifosfat
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
g	:	Gram
G	:	Guanin
GDF-9	:	Büyüme farklılaşma faktörü-9
GH	:	Büyüme hormonu
GR	:	Glisince zengin bölge
HVR1	:	Hiperdeğişken bölge
I	:	İyot
IGF	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü

kDa	:	Kilodalton
kg	:	Kilogram
KoA	:	Koenzim
L	:	Leader
MAS	:	Markör Destekli Seleksiyon
Mg	:	Magnezyum
$MgCl_2$	:	Magnezyum klorür
mRNA	:	Mesajcı ribonükleik asit
mtDNA	:	Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
N	:	Azot
NaCl	:	Sodyum klorür
ng	:	Nanogram
NH_4Cl	:	Amonyum klorür
nm	:	Nanometre
nmol	:	Nanomol
pmol	:	Pikomol
PC1	:	Sistein protez bölgesi-1
PC2	:	Sistein protez bölgesi-2
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
QTL	:	Kantitatif karakter lokusları
Rpm	:	Devir/dakika
RE	:	Restriksiyon enzimi
RFLP	:	Restriksiyon parçacık uzunluğu polimorfizmi
RNA	:	Ribonükleik asit
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SNP	:	Tek nükleotid polimorfizmi
SSCP	:	Tek zincirli konformasyon polimorfizmi
T	:	Timin
TEB	:	Tris Borik asit Etidyum Bromür
Tm	:	Çözülme sıcaklığı

U	:	Ünite
UV	:	Ultraviyole
V	:	Volt
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
χ^2	:	Ki-kare

ÖZET

Kucuk B. (2020). Türkiye'de bulunan Kilis, Tiftik ve Kıl Irkı Keçilerin Kalpain ve Kalpastatin Genlerindeki Mutasyonların İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada Türkiye'de bulunan yerli keçi ırklarından Kilis, Tiftik ve Kıl ırkı keçilerde et verim ve kalitesini ile ilişkili olduğu düşünülen Kalpain (CAPN) ve Kalpastatin (CAST) genlerindeki polimorfizmlerin genotip ve allel frekanslarının belirlenmesi ve seleksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere bilimsel verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada her üç keçi ırkından ellişer adet kullanılmıştır. Genomik DNA örneklerinde CAST ve CAPN genleri PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. CAPN genine ait pozitif çıkan bölgelerin dizin analizi yaptırılmıştır. CAST genine ait Kıl, Kilis ve Tiftik ırkı keçilerde MM genotipleri yüksek, MN genotipleri düşük, M allel frekansı yüksek ve N allel frekansı çok düşük olarak tespit edilmiştir. Hayvanlarda daha az yağlı karkasa sahip olunma özelliği ile ilişkili olduğu bilinen NN genotipine ise her üç keçi ırkında da rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışmada yerli genotiplerimizde CAST geni bakımından gen polimorfizminin olduğu görülmüştür. CAPN genine ait her üç keçi ırkında da 5707 polimorfizminde CC genotipi ve C allel frekansı yüksek, et kalitesi ile ilişkili olan 5709 polimorfizminde GG genotipi ve G allel frekansı yüksek, 5741 polimorfizminde AA genotipi ile A allel frekansı yükek, 5723 polimorfizminde GG genotipi AA genotipine oranla daha yüksek bulunmuştur. CAPN geni 5709 polimorfizminde CC genotipinin çok düşük düzeyde bulunmasına ve CAST geninde NN genotipinin hiç bulunmamasına yönelik bu genlerin küçük ruminantlarda korunmuş bir gen olabileceğini ileri sürebiliriz.

Anahtar Kelimeler : Kalpain, kalpastatin, keçi, PZR-RFLP, yerli ırk

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-20862

ABSTRACT

Kucuk, B. (2020). Determination of Calpain and Calpastatin Gene Mutations in Kilis, Tiftik and Kıl goat breeds in Turkey. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Biochemistry. PhD Thesis. İstanbul.

The aim of this study is to obtain a scientific data for selection by determining genotype and allele frequencies of calpain and calpastatin gene polymorphsims. These polymorphisms thought to be related to meat quality and yield traits of native Turkish breeds Kilis, Tiftik and Kıl goat. For this purpose, 50 individuals of each breed were used in this study. The CAST and CAPN gene in the DNA samples were multiplied using polymerase chain reaction. Samples testing positive were then subjected to sequencing analysis. Belongs to CAST gene, MM genotype was found to be high, MN genotype was found to be low, M allele frequency was found to be high and N allele frequency was found to be low in breeds Kilis, Kıl and Tiftik goats. NN genotype, which is believed to be associated with the ability to have less fatty carcass in animals, was not observed in any of the individuals. In this study, it was observed that there is gene polymorphism in terms of CAST gene in our native genotypes. Belongs to CAPN gene, CC genotype and C allele frequency of 5707 polymorphism related with meat quality was found to be high, GG genotype and G allele frequency of 5709 polymorphism was found to be high, AA genotype and A allele frequency of 5741 polymorphism was found to be high and GG genotype of 5723 polymorphism was found to be high according to AA allele in all of the three breeds. It can be claimed that the high presence of CC genotype of 5709 polymorphism in CAPN gene and absence of NN genotype in CAST gene provides may be a conserved gene that in small ruminants. As a conclusion it has been determined that CAST and CAPN gene affect meat yield in previous studies.

Key Words: Calpain, Calpastatin, goat, PCR-RFLP, native breeds

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpaşa. Project No. TDK-2016-20862

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda genetik alanda yaşanan gelişmeler, çiftlik hayvanları üzerine yoğun araştırmaların yapılmasına imkan sağlamıştır. Bu araştırmalar özellikle, ekonomik olarak verim özelliklerini etkileyen genlerin tanımlanması ve haritalanması üzerine odaklanmıştır. Genom taramaları sonucunda günümüzde birçok verim özelliklerine etkili olan gen bölgesi (Quantitative Trait Loci, QTL) belirlenmiştir ve aday gen çalışmalarıyla beslenme, büyüme ve enerji metabolizmasının fizyolojik olarak düzenlenmesinde görev alan genler tespit edilmeye çalışılmaktadır (Schrooten ve ark. 2000, Ashwell ve ark. 2004, Weikard ve ark. 2005).

QTL haritalama çalışmalarının esası fenotipler ile özel moleküler markörler arasındaki ilişkinin tespit edilmesidir. Çiftlik hayvanlarında, markör-QTL bağlantı analizleri çoğunlukla populasyonlar içinde gerçekleştirilmekte ve polimorfik olan markör bölgelerinin varlığına dayanmaktadır. (Primrose ve Tywan 2006; Weller 2009). Çiftlik hayvanlarında da moleküler markörler çoğunlukla gen bölgeleriyle ekonomik açıdan öneme sahip karakterlerin ilişkilendirilmesinde, genetik varyasyonların gösterilmesinde ya da herhangi bir özelliği etkileyen tek bir genin tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Balcıoğlu ve ark. 2014). Burada elde edilen bilgiler ise hayvancılıkta verimin arttırılmasına yönelik seleksiyon çalışmalarına öncülük etmektedir. Günümüzde çiftlik hayvanlarında üreme faaliyetleriyle birlikte et verimi, et ve süt kalitesi, yapağı verimi ve yapağı kalitesi gibi ekonomik karakterlerle ilişkilendirilebilecek ve seleksiyonda kullanılabilecek çok sayıda aday gen bulunmaktadır (Şahin ve ark. 2013). Et verimi ve kalitesi ile ilgili potansiyel ilişkisi olduğu bilinen genlerden iki tanesi de Kalpastatin (CAST) ve Kalpain (CAPN)'dir.

Kalpastatin/Kalpain sistemi, kalsiyuma (Ca^{+2}) bağlı intraselüler sistein proteinaz ailesidir ve miyoblast göçü, protein yıkımının düzenlenmesi, normal iskelet kas gelişimi ve büyüme gibi çeşitli fizyolojik görevlerde rol aldığı bilinmektedir (Zhou ve ark. 2007, Djadid ve ark. 2011). Palmer ve ark. (1997, 1999) kalpain sisteminin normal iskelet kası büyümesinde büyük bir öneme sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çiftlik hayvanlarında et kalite ve verim özellikleri üzerinde gerçekleştirilen çoğu araştırmada CAST'ın et sertliğine olan etkisi ve fizyolojik rolü CAST geni ile birlikte araştırılmıştır (Killefer ve Koohmaraie 1994; Lonergan ve ark. 1995; Huff-Lonergan ve ark. 1995; Boehm ve ark.

1998). Ayrıca Page ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada kalpainin kesim sonrasında miyofibriler proteinleri yıkıma uğrattığını ve böylelikle etin sertlik derecesine etki ettiğini göstermişlerdir.

Köpeklerden sonra ikinci evcilleştirilmiş hayvan olan keçi (Capra Hircus) evcilleştirilmesinden itibaren et, süt ve yapağı gibi ürünleriyle birlikte insanların tarım toplulukları oluşturarak yerleşik hayata geçmesinde büyük yararlar sağlamıştır. Arkeolojik çalışmalar keçilerin ilk evcilleştirilmesinin yakın doğuda verimli hilal bölgesinde (Fertile Crescent) 10.000 yıl önce yapıldığını göstermektedir (Porter 1996; Pringle 1998; Zeder ve Hesse 2000). Buna karşılık bazı çalışmalar keçinin evcilleştirilmesinin bu bölge ile aynı zamanda Pakistan'da Kaşmir keçi ırkına benzer bir ırktan yapıldığı da ileri sürmektedir. (Porter 1996; Legge 1996; Pringle 1998). Pakistan'daki bu evcilleştirilen keçinin Balochistan bölgesinde Zagoros dağlarında endemik olarak bulunan Capra aegagrus olduğu ve Türkiye'nin batısından Pakistan'a ve Kafkaslar'dan Sina'ya kadar geniş bir alana yayıldığı belirtilmektedir (Uerpmann 1987).

Bu çalışmada, ülkemizde yetiştirilen Kıl, Tiftik ve Kilis keçi ırklarında, et kalitesi ve verimini etkilediği öne sürülen CAST ve CAPN genlerindeki polimorfizmlerin genotip ve allel frekanslarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bugüne kadar keçilerin verim özelliklerini etkileyen yaklaşık 271 adet aday gen belirlenmesi (Cribiu ve Weiss 2013) ve ülkemizde yetişen yerli ırk keçilerin genetik alt yapısını açığa çıkarmaya yönelik çok az sayıda çalışmanın yapılmış olması (Akış ve ark. 2012) yerli keçi ırklarımızın moleküler genetik yapılarının aydınlatılmasına yönelik çalışmaların mevcut olandan daha fazla olması gerektiğini açıkça ortaya koymaktadır. Bu nedenle et verimini etkileyen CAPN ve CAST genleri üzerinde yapılacak bilimsel çalışmalardan elde edilecek bilgiler hem bu genlerin hayvancılıkta verimin arttırılmasına yönelik seleksiyon çalışmalarında kullanılabilmesini hem de et kalitesinin ve veriminin arttırılmasında aday gen olmalarını mümkün kılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kantitatif Karakter Lokusları

Kantitatif karakterler, döl verimi gibi süreklilik göstermeyen karakterler ile et, süt, yapağı verimi gibi ölçüme dayalı ve süreklilik gösteren karakterler olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Kantitatif karakterler, etkileri küçük olan çok sayıda genin ve çevresel faktörlerin etkisi altındadır. Bu karakterleri etkileyen genler Kantitatif Karakter Lokusları olarak adlandırılmaktadır (Cemal ve Karaca 2006).

Son yıllarda genetik alanda yaşanan teknolojik gelişmelere istinaden, moleküler düzeyde detaylı inceleme fırsatı veren spesifik metotlar geliştirilmiş ve bu metotlar uygulamada daha işlevsel hale gelmiştir (Elmacı ve Öner 2007). Ekonomik olarak verim özelliklerini etkileyen genlerin tanımlanması ve haritalanmasıyla kantitatif karakter lokuslarının ıslah programlarında kullanılması yeni hedefler üzerine odaklanılmasına yol açmıştır. Yaşanan bu gelişmeler fenotipik verilere dayanarak yapılan seleksiyonun yerini genotipik verilere ve genomik profillere dayanan daha etkili seleksiyon modellerine yönlendirmektedir (Cemal ve Karaca 2006).

Genom taramaları sonucunda birçok verim özelliklerine etkili olan gen bölgeleri tespit edilmiş, aday gen çalışmalarıyla büyüme, beslenme ve enerji metabolizmasının fizyolojik olarak düzenlenmesinde görev alan genler belirlenmiş ve halen belirlenmeye devam etmektedir. (Schrooten ve ark. 2000; Ashwell ve ark. 2004; Weikard ve ark. 2005). Bu aday gen çalışmaları kantitatif genlerin tanımlanmasına ve haritalanmasına olanak sağlamaktadır. Seçilen aday genlerde bulunan polimorfizmlerin etkilerinin net bir şekilde anlaşılması için ise kantitatif özelliklerle olan ilişkileri test edilmeli ve Markör Destekli Seleksiyon (MAS) programlarında kullanılabilmelidir (Wu ve ark. 2005).

Klasik ıslah yöntemlerinde karşılaşılan bazı problemlerin çözülmesinde MAS hızlı, etkili, doğru, ekonomik, alternatif ve yardımcı bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. MAS, birden fazla gen veya lokus tarafından kontrol edilen ve agronomik açıdan önem içeren karakterlerin hızlı ve etkin biçimde aktarılmasında kullanılmaktadır (Sönmezoğlu ve ark. 2010). Bu amaçla son yıllarda markör destekli ıslah çalışmaları genellikle geriye melezleme yönteminde uygulanmaktadır (Yıldırım 2005). Geleneksel seleksiyon yönteminde genetik ilerleme hızı sığır, koyun, keçi gibi uzun jenerasyon aralığına sahip hayvanlar için oldukça yavaş olmaktadır (Özdemir ve Doğru 2008). Bu açıdan geleneksel seleksiyon yöntemiyle mukayese edildiğinde, moleküler markörlerin

geriye melezleme ıslahının güvenilirliğini ve işlevselliğini arttırdığı belirtilmektedir (Francia ve ark. 2005). Geleneksel seleksiyon yöntemleriyle kullanılan MAS yönteminde ise ıslah edilmesi düşünülen özellik için seçilen belirteç genlerin kullanılmasıyla jenerasyon aralığını kısaltarak hızlı bir genetik ilerleme sağlamaktadır. Böylelikle hayvan başına beklenen verim düzeyine daha kısa sürede ulaşılması suretiyle MAS yönteminin çiftlik hayanlarında genetik ilerleme hızının %15-30 arasında arttırılabileceği bildirilmektedir (Kashi 1990, Tambasco ve ark. 2003).

Moleküler markör tekniklerinin ideal olması için genomun tamamında kullanılması, polimorfik olması, genetik farklılıkların tespit edilmesinde etkili olması, yüksek oranda markörler üretmesi, farklı fenotiplerle bağlantı oluşturması, düşük sayıda doku veya DNA materyali ihtiyacı gerektirmesi, güvenilir, bağımsız, basit, hızlı ve ucuz olması gibi avantajlı sayılabilecek özelliklere sahip olması gerekir. Ancak bu avantajların tamamına sahip markör tekniği bulunmamaktadır. Kullanım amacına göre ise moleküler markör teknikleri; geçiş türüne göre (biparental çekirdek kalıtımı, maternal çekirdek kalıtımı, maternal organel kalıtımı, paternal organel kalıtımı), gen aksiyonuna göre (dominant ve kodominant markörler), analiz metotlarına göre (PZR temelli olmayan = Hibridizasyon ve PZR temelli markörler) gruplandırılmaktadır (Kesawat ve Das 2009).

2.2. PZR-RFLP

2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction - PZR*), DNA içinde yer alan ve sekansı bilinen iki segment arasındaki spesifik bir bölgeyi enzimatik yollarla çoğaltmak için uygulanan reaksiyonlara verilen ortak bir isimdir. PZR, DNA'nın sıcaklık değişimleriyle döngüler boyunca in vitro koşullarda çoğaltılması işlemidir. PZR'nin dayanıklılığı ve duyarlılığı, düşük kalitedeki materyalden ve mikro düzeydeki başlangıç materyalinden hızlı bir şekilde DNA'nın çoğaltılmasını sağlamaktadır (Primrose ve Tywman 2006; Mercan 2010).

2.2.2. PZR'nin bileşenleri

Polimeraz zincir reaksiyonu için kalıp DNA (tDNA), primerler, DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz), eşit konsantrasyonda A, T, G, ve C nükleotidler (dNTP'ler-Deoksiribonükleosid trifosfatlar), kofaktör olan (iki değerli) katyonlar (Mg) ve polimerazın çalışması için tamponlar (Tris-HCL) gerekmektedir. Tüm materyallerin

varlığında ve uygun ortam koşulları sağlandığında PZR hedeflenmiş DNA veya RNA dizisinin kopyalanmasıyla tamamlanmaktadır (Sambrook ve Russel 2001; Passarge 2001; Reece 2004).

PZR ile çoğaltılacak hedef nükleik asit DNA, RNA veya mitokondriyal kökenli olabilir ve bu hedef gen parçası kalıp DNA veya kalıp RNA olarak isimlendirilmektedir (Cheng ve ark. 1994).

Primerler, DNA replikasyonunu başlatan nükleik asit dizileridir. Genellikle 20-30 baz uzunluğunda olan primerler, çoğaltılacak olan DNA parçasının başına ve sonuna bağlanır. DNA replikasyonunu sağlayan DNA polimerazlar, primerler olmadan yeni bir DNA dizisini sentezlemeye rastgele başlayamadıklarından dolayı PZR reaksiyonunda primerlerin mutlaka bulunması gerekmektedir (Singh ve ark. 2006).

Bir DNA parçasını çoğaltarak bir genin varlığını ya da yokluğunu belirlemek amacıyla PZR'de yaygın olarak sıcak sularda yaşayan *Thermus aquaticus* isimli bakteriden elde edilen ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır (Saiki ve ark. 1985).

Yeni sentezlenen DNA zinciri için gerekli olan bazlar PZR karışımına eklenen dNTP'lerden (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) sağlanmaktadır. Bu dNTP'ler tek tek ya da dörtlü karışım halinde satın alınmaktadır (Temizkan ve Arda 2004). Normal koşullarda PZR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gercekleşmektedir fakat en uygun konsantrasyonun deneysel olarak belirlenmesi önerilmektedir (Innis ve ark. 1990).

Tamponlar ve $MgCl_2$, diğerleri gibi PZR'nin temel bileşenleridir. En yaygın kullanılan tamponlar Taq DNA polimeraz enzimine özgü tamponlardır ve tampon içeriğinde $MgCl_2$ yer almıyorsa reaksiyon karışımına eklemek gerekmektedir. Reaksiyonda kullanılan tamponun konsantrasyonu 0.5-5.0 mM arasında değişmektedir. Kullanılacak uygun konsantrasyon miktarının ise her çalışma için deneysel olarak belirlenmesi önerilmektedir (White 1993).

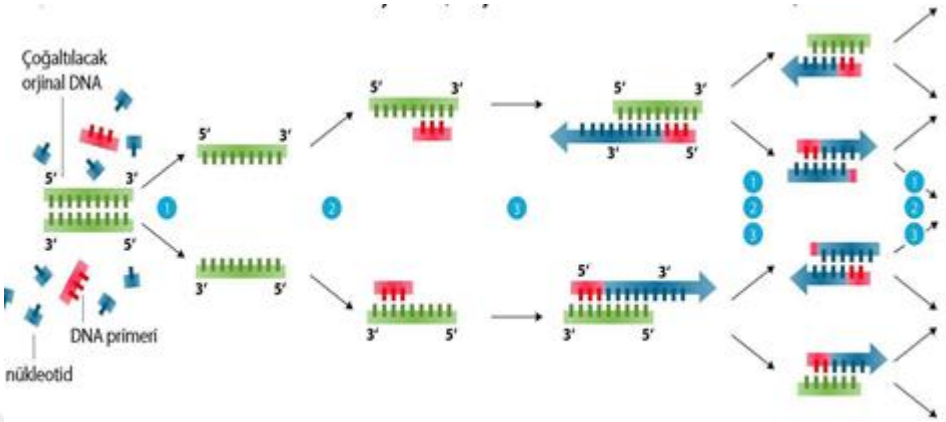
2.2.3. PZR'nin İşleyişi

Polimeraz zincir reaksiyonu üç aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar;

1) DNA çift zincirinin sıcaklıkla birbirinden ayrılması (denatürasyon),

2) Oligonükleotidlerin ve primerlerin bağlanması (bağlanma),

3) Zincirin uzama işleminin gerçekleşmesi (uzama). (Klug ve Cummings 2003; Temizkan ve Arda 2004).



Şekil 2-1: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Döngüsü

(https://www.tahlil.com/blog/pcr-testi-pcr-analizi-polimeraz-zincir-reaksiyonu-nedir-5590)

Denatürasyon: Çift zincirli kalıp DNA, yaklaşık olarak 94-95°C sıcaklığa maruz kalarak birbirinden ayrılmaktadır. Çoğaltılacak DNA zinciri, denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Zincirlerin birbirinden ayrılması için 15 saniye ile birkaç dakika arasında bir zaman geçmesi gerekmektedir.

Bağlanma: Oligonükleotid primerlerin (6-30 bazlık) kalıp DNA üzerindeki tamamlayıcı (*complementary*) dizilere bağlanmaları ile meydana gelen hibridizasyon olayıdır. Bu aşamada reaksiyon, primerlerin bağlanması için denatürasyon sıcaklığa göre daha düşük sıcaklığına düşürülmelidir. Primerlerin doğru şekilde hibridizasyonu için 40-72°C'de (optimum 55°C) 1-2 dakika tutmak yeterlidir.

Uzama (Polimerizasyon): DNA polimeraz enzimi tarafından zincir uzaması gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, primerleri kalıp DNA dizisine komplementer olacak şekilde 5′ ucundan 3' ucu yönünde ekleyerek yeni ekseni sentezlemektedir. Böylece primerlerin uzaması sağlanmış olup hedef DNA'nın iki zincirli kopyası oluşur. Optimum uzama aşaması için 72°C sıcaklığın ve 1-3 dk kadar zamanın olması önerilmektedir (McPherson and Møller 2001).

2.2.4. Restriksiyon Endonükleazlar

1970'lerde bakterilerin nükleaz içermesinin keşfedilmesinin ardından yapılan çalışmalarda nükleazların DNA çift zincirinde yer alan kısa nükleotid parçacıklarını tanıdıkları ve DNA çift sarmalının üzerindeki spesifik bölgelerden DNA zincirini kestikleri belirlenmiştir (Karp 2008). Restriksiyon endonükleazlar, bir savunma mekanizması olarak virüs istilasına karşı bakteriler tarafından üretilmektedir (Lüleyap 2008). Bir bakteri bakteriyofajlar tarafından enfekte edildiği zaman konakçı bakterilerin endonükleaz enzimleri fajların DNA'sını çeşitli noktalardan keserek o fajın konakçı bakteride çoğalmasını önlemiş olmaktadır. Diğer bir ifade ile restriksiyon endonükleazlar DNA'yı spesifik tanıma dizelerinden kesebilen enzimlerdir (Griffiths ve ark. 1996).

Restriksiyon endonükleazlar'ın 3 tipi bilinmektedir. Tip I ve tip III enzimleri, endonükleaz ve tek protein molekülü üzerine metilaz aktivitesine sahip olup DNA üzerinde özgün baz dizelerini tanımaktadır. Ancak kesme işlemi farklı baz dizeleri arasından gerçekleştirilmektedir (Benjamin 1975).

Tip II restriksiyon endonükleaz enzimler ise diziye spesifik kesim yaparak kesim spesifikliği açısından en kullanışlı restriksiyon endonükleazlardır. Bu kesim işleminde diziye özgü kesim yapan restriksiyon enzimleri tanıma dizisi denilen özgün nükleotit dizisini tanıdıktan sonra DNA'ya bağlanmaktadır. Enzim, bu tanıma dizisinden DNA'nın çift zincirini özgün bir kesim kalıbı oluşturacak şekilde kesmektedir (Öner 2011).

2.2.5. Tek Nükleotid Polimorfizmi

Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP-Single Nucleotide Polymorphism), iki birey arasındaki genom dizisinde meydana gelen tek baz farklılığıdır ve en sık görülen polimorfizm türüdür. SNP, popülasyonu oluşturan bireyler arasında DNA sekanslarında yüksek oranda yer değiştirme (substitüsyon) gösteren, bir nükleotid olarak da ifade edilmektedir (Wang ve ark. 1998). Bir diğer ifadeye göre ise SNP, (allel sıklığı minimum % 1 yada daha yüksek olan) normal bireylerde bulunan farklı sekans allelli genomik DNA'lardaki tek baz değişimidir. SNP'lerdeki tek baz değişimi SNP'yi farklılaştırarak nadir nokta mutasyonlarından ayırır ve uygun bir genetik markör olmasını sağlar (Brookes 1999).

SNP'ler transversiyon ve transisyon gibi baz değişimlerini kapsamaktadır. Transversiyonun varyantlarının sayısının transisyona göre iki katından fazla olmasına rağmen, transversiyon sıklığı transisyon sıklığından (1.5-2.5 faktörü) daha düşüktür.

İnsan genomundaki SNP'lerin % 25'i, G>A ve C>T transisyonlarından oluşmaktadır. Tek nükleotid pozisyonundaki varyasyon terminolojisi allel frekansı ile açıklanmaktadır. Bir popülasyondaki tek nükleotid değişiminin frekansı % 1'den küçük ise bu değişim mutasyon, % 1'den büyük ise SNP olarak açıklanmaktadır (Sönmezoğlu ve ark. 2010).

SNP'ler, genomik DNA'nın fonksiyonel etkinlikleri ve yapısal elementleri göz önünde bulundurularak ve tek nükleotid substitüsyonunun işlevselliği ile ilgili verileri esas alarak anonim SNP (fonksiyonel etkisi bilinmiyor), aday SNP (muhtemelen bir fonksiyonel etkiye sahip) ve protein SNP'leri (pSNP2, protein fonksiyonunda ve ekspresyonunda bir değişime neden olan tek nükleotid substitüsyonları) olarak sınıflandırılır. SNP'ler kodlanan ve genellikle kodlanmayan bölgelerde bulunur. Kodlanan bölgelerdeki SNP'ler proteinin yapısını değiştirebilirler (Ching ve ark. 2002).

2.2.6. Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism), dizisi bilinen genlerin allelik varyantlarının varlığını tespit etmek için nükleik asitleri analiz eden bir yöntemdir (Primrose ve Tywman 2006; Mercan 2010). DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi ve sonrasında kesim sonucu oluşan DNA parçacıklarının sayısı ve boyutlarının kıyaslanması RFLP'nin temel prensibini oluşturur. RFLP analizleri ya tüm bir genom ya da DNA'nın belirli bir parçası üzerine uygulanabilmektedir (Freeland 2005).

RFLP iki şekilde uygulanabilir. 1)RFLP-Southern Blot Yöntemi: DNA, uygun restriksiyon enzimi (RE) ile kesilir ve Southern blot ile membrana transfer edilir. Böylece DNA çift sarmalı denatürasyonla tek zincirli hale getirilir. İncelenen bölgenin yanındaki tek kopya, diziye komplementer olan işaretli probla hibridize edilir. 2) PZR-RFLP yöntemi : RFLP metodunun PZR ile kombine edilmiş olduğu bu yöntemde, PZR ile istenilen gen bölgesi birçok kez çoğaltıldıktan sonra restriksiyon enzimleriyle kesilmektedir. Bu metotta en büyük fark yaratan özelliğin fazla miktarda ve kaliteli DNA bulundurma zorunluluğunun ortadan kalkması olmuştur (Eijk ve ark. 1992). Kesim ürünleri, agaroz veya poliakrilamid jelde elektroforezde gözlemlenmektedir (Lüleyap 2008).

RFLP metodunun avantajları arasında donanımlı personel ve alete gerek olmadan uygulanabilmesi, pahalı olmaması, kolay dizayn edilebilmesi gösterilmektedir. Dezavantajları arasında ise restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgesine ihtiyaç duyması,

bir enzim bölgesinde birden çok varyasyonun olduğu durumlarda tam bir genotiplendirmenin yapılamaması, büyük miktarlarda uygulamanın zor olması gibi parametreler sayılabilir (Rasmussen 2012).

2.3. Kalpain / Kalpastatin Sistemi

2.3.1. Kalpainler

Kalpainler (EC 3.4.22.17), aktif merkezinde nükleofilik thiol grubu taşıyan ve aktivite gösterebilmek için Ca^{+2} iyonlarına ihtiyaç duyan sistein proteazlardır (Goll De ve ark. 2003).

Kalpain, adını "cal" ve "pain" kelimelerinin birleşmesinden almaktadır. "Cal" eki Ca^{+2} bağlama özelliğine sahip bölge olan Kalmodulin'den, "pain" eki ise papain benzeri sistein proteaz özelliği gösteren bölgeden gelmektedir (Croall ve Demartino 1991).

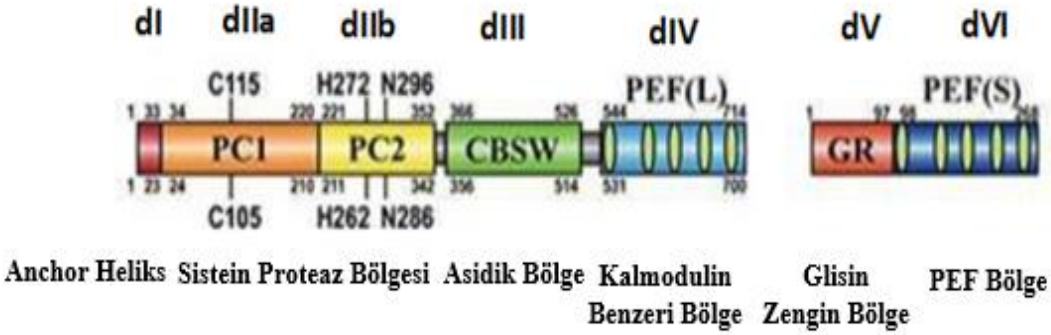
Kalpainin fizyolojik işlevleri tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın sinyal iletimi, hücre farklılaşması, membran füzyonu, trombosit aktivasyonu, apoptoz ve hücre döngüsünün devamlılığı gibi hücresel Ca^{+2} düzenleyici faaliyetlerde bulunduğu belirlenmiştir. Kalpain aktivitesinde meydana gelen bozukluklar metastaz, katarakt, felç, iskemi, kas distrofisi, beyin travması, kanser, diyabet, sinirsel bozukluklar, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda rol almaktadır (Wang ve Yuen 1997; Suzuki ve ark. 2004; Zhou ve ark. 2007).

Memeli dokularında temelde μ-kalpain (kalpain-1) ve m-kalpain (kalpain-2) olmak üzere iki kalpain türünün varlığı belirtilmiştir. Mikromolar ve milimolar düzeyde Ca^{+2} iyonu gerektiren proteazları tanımlamak amacıyla mikro ve mili kalpain adlandırması ilk olarak 1989'da kullanılmıştır (Cong ve ark. 1989). μ-kalpain (kalpain-1) ve m-kalpain (kalpain-2) ayrıca konvansiyonel, klasik veya her yerde sentezlenen (dokuya spesifik olmayan) kalpainler olarak da isimlendirilmektedir (Suzuki 1991; Goll De ve ark. 2003).

Her iki kalpain de 80 kDa'luk büyük alt birim ve 29 kDa'luk küçük alt birimden oluşan heterodimer yapılardır. 80 kDa'luk ünite katalitik alt birimi ihtiva ederken, 29 kDa'lık ünite ise düzenleyici (regülatör) bir alt birimdir (Khorchid ve Ikura 2002). Her iki kalpainin büyük alt birimleri kromozom 1 ve 11'deki farklı genlerden kodlanmakta olup amino asit sekanslarında %55-60 civarında benzerlik göstermektedir. μ-kalpain'in büyük alt birimi m-kalpaine oranla daha büyük moleküler ağırlığa sahiptir. Küçük alt

birimler ise her iki kalpain türünde de aynı olup kromozom 19 üzerindeki bir gen tarafından kodlanmaktadır (Goll De ve ark. 2003; Suzuki 1990; 1991)

Kalpain-1 ve kalpain-2'nin, büyük alt birimi dört domainden (dI-dIV), küçük altbirimi ise iki domainden (dV-dVI) oluşmaktadır. Büyük alt birimler 4 farklı aminoasit içermektedir (Carragher 2006) ve N-terminal anchor heliks, sistein proteaz bölgesi (PC1 ve PC2 olmak üzere iki proteaz bölgesinden oluşur), kalmodulin benzeri bölge, Penta-EF el bölgesinden oluşmaktadır. Küçük alt birim ise N-terminal ucunda glisince zengin bölge (GR Bögesi) ve PEF(S) bölgelerinden oluşmaktadır (Sorimachi ve Ono 2012).



Şekil 2-2: Kalpainin Şematik Yapısı

(Sorimachi ve Ono 2012)

Domain I (dI), N terminal bölgesinde yer almaktadır ve α-heliksten oluşan otoliz bölgesi içermektedir. Ca^{+2}'ye duyarlılığın artması durumunda kalpain aktivasyonu sırasında yarılmayı yapan otolitik domaindir (Carragher 2006). Domain I'in sekans homolojisi insan, tavuk, sıçan, domuz, tavşan gibi türler arasında %72-86 arasında farklılık göstermektedir (Goll De ve ark. 2003).

Domain II (dII), substratları hidroliz etmek için kritik önemi olan üçlü histidin, sistein ve asparajin aminoasitlerinden oluşan katalitik proteaz bölgesidir (Strobl ve ark. 2000). Aktif sistein bölgesine sahip olan domain II, dIIa ve dIIb olmak üzere iki subdomaine ayrılmaktadır (Khorchid ve Ikura 2002). Sistein aktif bölgesi domain IIa'da yer alırken, üçlü katalitik bölgenin geri kalanını oluşturan histidin ve asparajin, m-domaine ait domain IIb bölgesinde bulunmaktadır. X-ray kristalografik sonuçlar göstermektedir ki domain IIa ve domain IIb'in her biri 9 (domain IIb) veya 8 (domain IIa)

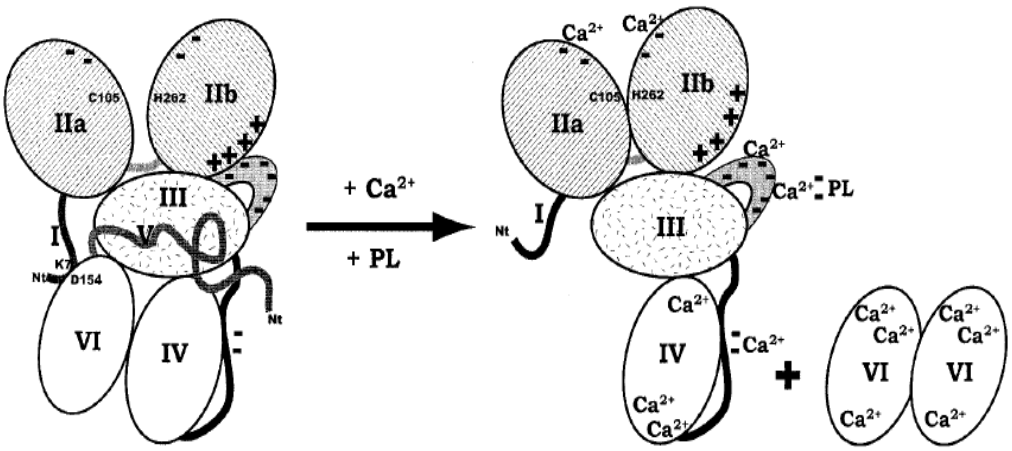
aminoasitten oluşan peptit kısmında bir Ca^{+2} atomu bağlamaktadır (Moldoveanu ve ark. 2002).

Domain III, asidik bölgeyi içermektedir ve Ca^{+2} ile birlikte kalpain aktivasyonunda rol oynamaktadır (Khorchid ve Ikura 2002). Domain III, kalpainin Ca^{2+} bağlayıcı domaini olan dIV ile katalitik domain olan domain II'yi bağlamasının yanısıra, fosfolipidlerin bağlanmasında (Tompa ve ark. 2002) ve elektrostatik etkileşimlerin katılımıyla kalpain aktivitesinin düzenlenmesinde de görev almaktadır. (Strobl ve ark. 2000; Horikawa ve ark. 2000).

Domain IV, 5 EF-el motifine sahip kalmodulin benzeri bölgedir. İlk 4 EF-el motifi bölgesi Ca^{+2}'bağlayıcı bölgedir. 5 EF-el motifi bölgesinin karboksil ucu küçük alt birimiyle dimerizasyon yapmaktadır (Khorchid ve Ikura 2002). EF-el yapısının yer aldığı bir proteine $Ca^{+2'}$un bağlanmasıyla hidrofobik grupların yüzeye çıkarılmasını sağlayan büyük konformasyonel değişimlere yol açmaktadır (Arrington ve ark. 2006).

Domain V, küçük alt birimin N-terminal bölgesini içermektedir ve glisin bakımından zengindir. Bu bölge yaklaşık % 30 glisinden oluşur ve hidrofobik bölge olarak isimlendirilmektedir. Domain V'in fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte membranla bağlantı sağladığı düşünülmektedir. (Inomata ve ark. 1989; Molinari ve ark. 1994; Khorchid ve Ikura 2002).

Domain VI, domain V'e poliprolin sayesinde bağlanmaktadır ve domain IV ile % 50 oranında benzerlik göstermektedir. İlk 4 bölgesi Ca^{+2} iyonlarını bağlarken, 5. bölgesi kalpain-1 ve kalpain-2 ile aynı olan katalitik EF-el motifine sahiptir (Lin ve ark. 1997; Blanchard ve ark. 1997; Carragher 2006).



Şekil 2-3: Kalpain Aktivasyon Mekanizması

(Suzuki ve ark. 2004)

Kalpainler, hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu normal sınırlar içerisinde bulunduğunda sitozolde inaktif proenzim olarak bulunurlar (Qıan 2008). Kalpain aktivitesi, otopreolitik salınım, fosforilasyon, Ca^{+2} konsantrasyonu ve endojen inhibitör protein olan CAST ile düzenlenirler (Cafe ve ark. 2010). Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış kalpainlerin aktive olmasına neden olur. Aktif forma dönüşümleri için m-kalpainler milimol seviyelerinde Ca^{+2} konsantrasyonlarına, μ-kalpainler ise mikromol düzeylerinde Ca^{+2} konsantrasyonlarına ihtiyaç duyarlar (De Croall ve Demartino 1991). Aktif kalpainler hücre zarında yer alır ve hücre zarındaki lokalizasyonları kalpain aktivasyonunda etki gösterir. Kalpainlerin aktivasyonlarında veya inaktivasyonlarında fosforilasyon uçları önemli role sahiptir (Juszczuk-Kubiak ve ark. 2009).

Hücrelerarası serbest Ca^{+2} seviyelerindeki artış ile hücre içi kalpain aktivasyonu tetiklenmektedir (Qıan 2008). Ca^{+2} yokluğunda, subdomain IIa ve IIb yapısal olarak ayrılmakta olup Ca^{+2}'nın bağlanması konformasyonel değişikliği indüklemektedir. Domain IIa ve IIb birbirine yakınlaşıp bağlanmaları sayesinde fonksiyonel katalitik bir bölge oluşturmaktadır. m-kalpain'de en az üç farklı Ca^{+2} bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bunlar, ikisi kalmodulin benzeri domain IV ve VI, bir asidik loop içeren domain III ve proteaz domain II'dir. m-kalpainin Ca^{+2} tarafından aktivasyonuyla, Ca^{+2}'un domain IV, VI ve III'e bağlanması ile domain I'in domain VI'den ve domain II'nin domain III'den ayrılması gerçekleşir. Böylelikle 30 k alt birim, 80k alt birimden ayrılır (Suzuki ve ark. 2004).

m ve μ-kalpainlerin substratları aynıdır (Banik ve ark. 1982; Ray ve ark. 2000). Kalmodulin bağlayıcı proteinler (kalsiyum pompası, inositol 1.4.5-trifosfat kinaz), miyofibril proteinleri (troponin I, troponin T, miyozin), membrana bağlı proteinler ve reseptörler (EGF reseptörü), hücre iskeleti ve yapısal proteinler (spektrin, α-aktinin, distrofin, tubulin) , transkripsiyon faktörleri (c-fos, c-jun) ve birkaç önemli enzimin (protein kinaz C, 3-hidroksil-3-metilglutaril-KoA redüktaz, cAMP-bağımlı kinaz) kalpain substratları içerdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Wang ve Yuen 1997; Rami 2003).

Son yıllarda kalpainlerin et verimliliği ile ilişkisini inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Page ve ark.'nın yaptıkları çalışmada kalpainin, kesim sonrası ölüm sertliğinde ve et yumuşaklığında başlıca rol oynadığı gösterilmiştir (Page ve ark. 2002). Huff-Lonergan ve ark. ise kalpainlerin, spesifik yapısal kas proteinlerinin degradasyonu aracılığıyla sığır, kuzu ve domuzlarda postmortem tenderizasyonda büyük bir rol oynadığını belirtmişlerdir (Huff-Lonergan ve ark. 1995). Koohmaraie de yaptığı çalışmalarda kalpainlerin, soğukta depolanma süresince oluşan postmortem et yumuşamasından sorumlu olan miyofibriler protein degradasyonuna aracılık ettiğini ortaya koymuştur (Koohmaraie 1988).

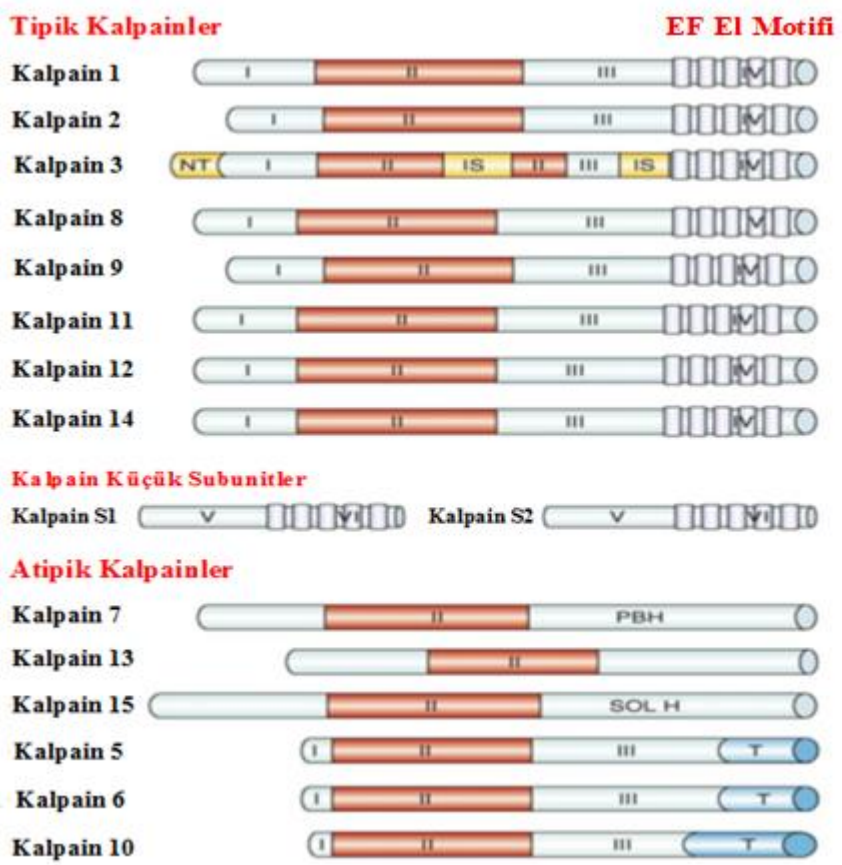
2.3.2. Kalpain Geni

Bir çok araştırmacının yaptıkları farklı çalışmalarda çiftlik hayvanlarında et ve süt verimi ile ilişkili olduğu bilinen ve seleksiyonda kullanılabilecek çok sayıda aday gen belirlenmiştir. Et verimi ve et kalitesi ile ilgili miyostatin, insulin beneri büyüme faktörü (IGF) ve leptin genleri (Grobet ve ark. 1998; Ge ve ark. 2001; Oprzadek ve ark. 2003), süt verimiyle ilgili prolaktin, β-laktoglobulin, diaçilgliserol açiltransferaz-1 genleri (Chung ve ark. 1996; Spelman ve ark. 2002; Heidari ve ark. 2012) ve üreme faaliyetleriyle ilgili progesteron reseptör gen ve osteopontin geni (Moura ve ark. 2007; Driver ve ark. 2009) seleksiyonda kullanılabilecek aday genlere örnek olarak verilebilir. Etin kalite karakteristiğinin belirlenmesinde başlıca aday genlerden biri de CAPN genidir.

CAPN geni, ilk olarak 1964 senesinde Guroff'un sıçan beyin ekstratlarıyla yaptığı çalışmalarda incelenmiştir (Guroff ve ark. 1964) ve Drosophila melanogaster'den memelilere kadar çok sayıda organizmada yer almaktadır (Page ve ark. 2002).

CAPN geni keçilerde 29.kromozomda lokalizedir ve 23 ekzon içermektedir. CAPN ailesinin memelilerde 15 adet geni belirlenmiş olup, bunlar birçok hücresel işlem

ve hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Tümünün fizyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen, şimdiye kadar ki yapılan çalışmalarda sinyal iletimi, hücresel döngü progresyonu, başkalaşım, apoptoz, membran füzyonu ve trombosit aktivasyonu gibi Ca^{+2} bağımlı hücresel işlemlerde yer aldıkları ortaya konmuştur (Huang ve Wang 2001; Suzuki ve ark. 2004).



Şekil 2-4: Tipik ve Atipik Kalpainler

(Saez ve ark. 2006)

Kalpain ailesine üye olan genlerden 9 tanesi tipik, 6 tanesi atipik kalpain olarak sınıflandırılmıştır (Branca 2004). Bu tanımlanan kalpainlerin tipik ve atipik kalpainler olmak üzere 2 sınıfa ayrılması, karboksil uçta EF-el motifine sahip olup olmamasına dayandırılmıştır (Saez ve ark. 2006; Carragher 2006). Tipik kalpainler EF-el motifinin yer aldığı C terminal Ca^{+2} bağlama domaini ile karakterize iken atipik kalpainlerde bu

bölge bulunmamaktadır (Branca 2004). Bu ailenin üyeleri kalpain 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13 ve küçük alt ünite II olmak üzere 10 farklı kalpainden oluşmaktadır (Carragher 2006).

Singh ve ark., Hindistan'da yetiştirilen Sirohi keçilerinde yaptıkları çalışmada CAPN geninin (ekzon 3, ekzon 4 ve ekzon 11) farklı bölgelerinindeki 59 nükleotid varyasyonları bos taurus sığırlarıyla karşılaştırmışlardır. Çalışmada yapılan analizler sonucunda CAPN geninin kesim sonrası et sertliğinde önemli bir role sahip olduğunu ve etin kalite karakteristiğinin değerlendirilmesinde başlıca aday gen olduğunu belirlemişlerdir. Sirohi keçilerinde yaptıkları bir başka çalışmada ise CAPN1 genindeki intron 6, ekson 7, intron 7, ekzon 8, intron 8 ve ekzon 9 bölgelerinde yar alan varyasyonları inlemişlerdir. 12 adet keçiden çoğalttıkları CAPN1 gen analizlerinde intron 6, exon 7, intron 7, exon 8, intron 8, exon 9 ve intron 9'da nükleotid substitüsyonlarını ortaya çıkarmışlardır (Singh ve ark. 2012).

Chung ve ark. 286 adet Hanwoo cinsi Kore sığırıyla et verimliliği üzerine yaptıkları çalışmada CAPN1 geni varyasyonlarının et yumuşaklığı üzerine etkisinin olup olmadığını RFLP ve SSCP metotlarını kullanarak araştırmışlardır (Chung ve ark. 2014).

Juszczuk-Kubiak ve ark, 7 farklı türe ait 141 sığırda yaptıkları çalışmada CAPN1 geninin intron 14 bölgesindeki SNP'yi PZR-SSCP metoduyla çalışmışlardır. 670 bç'lik fragman bölgesini içeren (4542- 5215) CAPN1 geni 14.intron bölgesinde bir adet SNP (C4685T tranzisyon) saptayarak buldukları yeni mutasyonun sığır CAPN1 geninde yağsız et oranı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Juszczuk-Kubiak 2004).

Barendse ve ark. ise sığırlarda yaptıkları et yumuşaklığı ile CAPN3 geni varyasyonu arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 2189 hayvanda CAPN3 geninde 3 SNP saptandıklarını belirtmişlerdir. Bunlar *CAPN3:c.53T>G* (Met18Arg), intronik bölgede *CAPN3:c.1538+225G>T*, intronik *CAPN3:c.2443-103G>C* amino asit sübstitüsyonlarıdır. Yaptıkları çalışmada sığır kromozom-10'da bulunan QTL'in et yumuşaklığı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Barendse ve ark. 2007).

2.3.3. Kalpastatin

CAST, ilk kez CAPN aktivitesine sahip kas ekstraktlarında m-kalpainin saflaştırılması çalışmalarında keşfedilmiştir (Dayton ve ark. 1976). İsmi ilk kez 1979 yılında Takashi Murachi tarafından önerilen CAST (Murachi 1989), sitozolde ve membranlarda bulunmaktadır ve kalpainin endojen inhibitör bir proteinidir. Kalpain

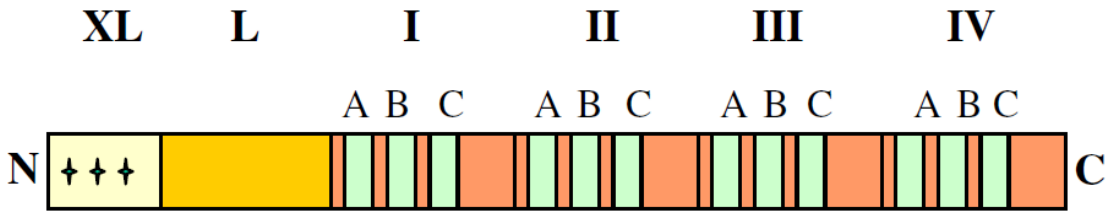
dışındaki proteazları inhibe etmeyen CAST, kalpain protezlar için spesifik bir inhibitör gibi davranmaktadır. Yapılan çalışmalarda 1 molekül CAST'ın 4 molekül kalpaini inhibe ettiği belirtilmiştir (Kaya 2005; Shi ve ark. 2000).

Kalpain aktivitesini inhibe ettiğinin anlaşılmasından sonra yapılan ilk çalışmalarda bir ısı-stabil proteini olduğu saptanmıştır (Okitani ve ark. 1976) ve sonrasında trikolorasetikasit, SDS veya üre gibi çeşitli denatüre edici ajanlara karşı direnç gösterdiği gösterilmiştir (Otsuka and Goll De 1987; Geesink ve ark 1998).

Neonatal serebral hipoksi ve iskemide gerçekleştirilen çalışmada CAST'ın hipoksiye yanıt olarak up-regüle olduğu ve kalpaine karşı bir intihar substratı olduğu da ifade edilmiştir (Shi ve ark. 2000; Kaya 2005).

Moleküler düzeyde CAST proteini 76 kDa ağırlığında olup 5 ana domainden meydana gelmektedir. Bu domainlerden N-terminal domaini, Leader (L) olarak adlandırılmaktadır. Leader domainin, kendi başına kalpainleri inhibe etme özelliğinin bulunmadığı tespit edilmiştir ve CAST'ın hücre içinde yerleşeceği bölgeyi belirlemede görev aldığı açıklanmıştır. Geri kalan 4 domain ise birbirlerine homologdur ve inhibisyon özelliği göstermektedir (Emori ve ark. 1987; Averna ve ark. 2001).

Her bir domainde A, B, C bölgeleri vardır. A ve C bölgeleri sırasıyla kalmodulin benzeri olan dIV ve dIV'ya, B bölgesi ise dII'ye bağlanır (Todd ve ark. 2003). A ve C domainleri Ca^{+2} iyonlarıyla birlikte kalpaine güçlü bir şekilde bağlanır ancak kalpaini baskılama aktivitesi yoktur. Bunun aksine B domaini, kalpain enzimlerini baskılamaktadır (Tompa ve ark. 2002).



Şekil 2-5: Kalpastatinin Şematik Yapısı

(XL domainde görülen +++ Protein kinaz A bağımlı fosforilasyon bölgeleridir.) (Dargelos ve ark. 2008**)**

2.3.4. Kalpastatin Geni

7. kromozomda lokalize olan ve 34 ekzon bölgesi içeren CAST geninin et yumuşaklığındaki fizyolojik ve genetik rolü çeşitli hayvanlarla yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (HuffLonergan ve ark. 1995; Boehm ve ark. 1998). CAST genindeki genetik varyasyon ve et kalitesi üzerine etkisi hem sığırlarda hem de kuzularda bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Casas ve ark. 2006; Schenkel ve ark. 2006; Palmer ve ark. 1999; Zhou ve ark. 2007). Ayrıca keçilerde CAST geni polimorfizmi ile yapılan bir çalışmada CAST'ın et yumuşaklığı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Byun ve ark. 2009).

Sevane ve ark., Avrupa sığır ırklarında büyüme, kas-yağ profili ve et kalitesi özelliklerinin aday genlerle ilişkisinin araştırıldığı çalışmada CAST geni etkisinin karkas yağ skorunda önemli olduğunu saptamışlardır (Sevane ve ark. 2014).

Hanwoo sığır ırkında yapılan çalışmada CAST geni 182 A>G polimorfizminin etteki sululuğa etkisinin istatistiksel anlamda önemli olduğunu ancak diğer polimorfizmler ile et kalitesi özellikleri arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır (Lee ve ark. 2014).

Li ve ark., Hanwoo ırkına büyük oranda benzerlik taşıyan Çin'in Yanbian sığır ırkında CAST geninin gevreklik, pişirme kaybı ve renk parametrelerine etkisinin anlamlı olduğunu bildirmişlerdir (Li ve ark. 2013).

Tait ve ark., ise Angus ırkında CAST gen etkisini gevreklik, ette kırmızı renk oluşumu ve düşük yağ oranı ile ilişkilendirmişlerdir (Tait ve ark. 2014).

Yapılan çalışmalar sonucunda CAST geninin et gevrekliği, su tutma kapasitesi, renk, sululuk ve yağ asidi profillerinde etkili olduğu saptanmıştır (Casas ve ark. 2006; Reardon ve ark. 2010; Sevane ve ark. 2014; Dunner ve ark. 2013). CAST geni, et kalitesi üzerine etkileri nedeniyle seleksiyon programlarında potansiyeli yüksek bir gen olarak bildirilmektedir (Barendse 2007).

2.4. Keçi Etinin Önemi ve Özellikleri

Genel olarak et verimi ve kalitesi özelliklerinin belirlenmesinde ırk, yaş, cinsiyet, bakım ve beslenme koşulları, hayvanların kesime sevk edilme koşulları, mezbaha organizasyonu, kesim ve depolama koşulları, etlerin olgunlaştırılma süreleri, paketleme işlemi ve hijyen koşulları gibi pekçok çevresel faktör önemli rol oynamaktadır. Bu çevresel etmenlerin yanı sıra hayvanlarda meydana gelen bireysel farklılıkların ortaya

konmasında genetik faktörlerin de oldukça etkili olduğu bildirilmektedir (Warner ve ark. 2010).

Etin yağ düzeyi, parlaklığı ve rengi fiziksel açıdan değerlendirmede;tadı, kokusu, lezzeti, içerdiği bağdoku miktarı ve çiğneme sırasındaki ağızdaki yağ salınım düzeyi ise damak tadı uygunluğu açısından değerlendirmede kullanılan parametrelerdir. Et kalitesinin değerlendirilmesinde bakılan parametreler ise pH, renk, gevreklik, su tutma kapasitesi, pişirme kaybı, yağ asit kompozisyonu, kolesterol düzeyi, nem, kuru madde, kül, protein ve kas içi yağ miktarıdır (Babiker 1990; Webb ve ark. 2005; Sebsibe 2008).

Dünyada en çok tüketilen kırmızı etler arasında bulunan keçi eti Afrika, Asya ve Pasifik ülkelerinde daha yaygın tüketilmektedir (Webb ve ark. 2005). Toplulukların sosyo-ekonomik durumu, kültürel ve geleneksel alışkanlıkları, kişisel tercihler ve inanç faktörleri keçi etinin tüketimi ve tercih edilmesinde rol oynamaktadır (Yaralı ve ark. 2010). Keçi eti, müslümanların domuz eti yememesi, Hintlilerin sığır eti yememeleri gibi dini ve kültürel nedenlerden dolayı tercih edilen etler arasında gösterilmektedir. Hindistan gibi bazı ülkelerde tüketimde tercih edilen et türlerinde ise birinci sırada yer almaktadır (Norman 1991).

Keçi etini, koyun eti ve sığır etinden ayıran özelliklerin başında kaba tekstürü, kolaylıkla fark edilebilir aroması, koyu kırmızı rengi ve lezzeti gelmektedir (Casey ve ark. 2003; Sheradin ve ark. 2003).

Keçi eti, %27.8 protein, % 9.22 yağ içermektedir. Protein oranı, koyun ve sığır etine yakın değerlere sahipken yağ oranı %50-65 düzeyinde daha düşüktür (Boyazoglu ve Morand-Fehr 2001). Keçi etinin diğer kasaplık hayvan etlerine kıyasla iyi bir protein kaynağı olmasının yanı sıra daha düşük oranda yağ oranı içermesi, bilinçli tüketicinin domuz, koyun ve sığır etine göre tercih etmesini sağlamaktadır. (Lee ve ark. 2008).

Keçi karkaslarında adipoz doku büyük oranda gelişmiştir. İç organları çevreleyen yağların gelişimi deri altı, kas içi ve kaslar arasındaki yağ dokunun gelişiminden daha önce gerçekleşmektedir (Casey ve ark. 2003). Keçilerde yağlanma ileri yaşlarda oluşurken karkas üzerinde fark edilebilir yağ birikimi düzeyine ancak ergin yaşlarda ulaşmaktadır (Owen ve ark. 1983). Yağ oranı keçi etinde sıklıkla değişmekle yaş, beslenme, canlı ağırlık, büyüme hızı, cinsiyet, fiziksel durum ve fiziksel aktivite gibi etmenlerden kolaylıkla etkilenebilmektedir (Owen ve ark. 1978; Kirton 1988).

Keçi etinde bir başka önemli parametre olan vitamin içeriği sinir sistemini koruması, cilt ve deri hastalıklarını engellemesi açısından ayrıca öneme sahiptir. Keçi eti B1, B2 ve B3 vitamin miktarı bakımından diğer hayvan türlerinin etlerine oranla daha yüksektir. Ayrıca ideal miktarda içerdiği vitamin çeşitliliği ile karbonhidrat ve yağ yakımını sağlarken, sağlıklı saç, deri ve tırnak oluşumunu desteklemektedir. Keçi etinin doymamış yağ ait oranının yüksek olması ve doymuş yağ oranının düşük olması açısından en az yağa sahip tür olması ile bilinmektedir. Demir oranı diğer tüm etlerden yüksek olan keçi etinin, en düşük kaloriye sahip olduğu düşünülen tavuk etinden bile daha düşük kaloriye sahip olmasıyla da ayrıcalık göstermektedir. Belirtilen tüm özellikler değerlendirildiğinde insanlar için özellikle kalp-damar sağlığı bakımından çok rahatlıkla tüketebilecek et olarak öne çıkmaktadır ve insanların tercih etme nedenleri arasında gösterilmektedir (Darcan 1996).

2.5. Keçi Irkları

Köpeklerden sonra ikinci evcilleştirilmiş hayvan olan keçi (Capra Hircus) evcilleştirilmesinden itibaren et, süt ve yapağı gibi ürünleriyle insanların tarım toplulukları oluşturarak yerleşik hayata geçmesinde büyük yararlar sağlamıştır (Porter 1996; Pringle 1998; Zeder ve Hesse 2000).

M.Ö. 9000-7000 yılları arasında Orta Doğu bölgesinde evcilleştirildiği tahmin edilen keçinin Capra prisca adamets (kılıç boynuzlu), Capra falcomeri (burgu boynuzlu) ve capra aegagrus (hilal boynuzlu) olmak üzere üç yabani keçi türünden köken aldığı kabul edilmektedir (Özcan 1989; Anonim 2002).

Keçi, tarihte evcilleştirilmesi gerçekleştirilen ilk hayvan türlerinden biridir ve farklı çevre koşullarına kısa sürede uyum göstermektedir. Bu özellikleri nedeniyle keçi ırkı evcil hayvan türleri arasında önemli bir yere sahiptir ve ekonomik olarak diğer türlere oranla fazlaca öneme sahiptir (Kaymakçı ve Aşkın 1997). Keçilerin diğer çiftlik hayvanlarına oranla tercih edilme nedenleri arasında elverişsiz bakım ve besleme koşullarına karşı daha dayanıklı olmaları ve az masrafla yetiştirilebilme özellikleri gelmektedir (Şengonca 1989, Şimşek ve Bayraktar 2006).

Keçiler, tropikal ve sub-tropikal şartlar altındaki evcil ruminantlar arasında en üretken ruminantlardır ve çoğu keçi ortalama 1,5 ve üstü boyutta yavru doğurmaktadır (Naude ve Hofmeyr 1981). Dünyanın en soğuk bölgelerinde keçilerin hayatta kalmalarını sağlayan iki sebep bulunmaktadır. Bunlar, ısı stresine olağanüstü dayanıklılık

göstermeleri ve zayıf beslenmeyle büyüme kabiliyetine sahip olmalarıdır. Böylece, marjinal tarım alanlarında, küçük çiftliklerde veya tropikal ve sub-tropikal alanlarda keçi üretimi eşit şekilde uygun hale gelmektedir. Keçiler, uygun bir şekilde yöneltilmediğinde ormanlara ve bitki örtüsüne büyük zararlar verebilmektedir (Norman 1991).

Keçiler, yem kaynaklarının ve özellikle sulama olanaklarının sınırlı olduğu bölgelerde mevcut yem kaynaklarını optimum şekilde değerlendirmelerinden dolayı, yetiştiricilerin gereksinim duyduğu et ve süt gibi ürünleri en verimli ve ideal şekilde sağlayan hayvanlardır. Genel olarak keçi üretiminde sağlanan gelirin % 60'ı süt, 35'i et ve 5'i de deri ve kıldan oluşmaktadır (Sandfort 1982). Eti, sütü, kılı ve derisinin kullanılabilmesi sebepleriyle özellikle aile tipi küçük işletmelerde Türkiye için hala çok önemli bir çiftlik hayvanı olma özelliğini sürdürmektedir (MacHugh ve Bradley 2001).

Keçilerin et üretim özellikleri sığır, kuzu ve domuz gibi et üretiminde kullanılan diğer evcil türlerine kıyasla, nispeten az bilimsel ilgiye sahip olduğu kabul edilmektedir. Bunun nedeni, keçilerin gelişmiş dünyada geleneksel düşük ekonomik öneme sahip olmaları ve sığır eti, domuz eti, koyun eti gibi diğer kırmızı et çeşitlerinin tercih edilmesidir. Gelişmiş ülkelerde keçiler özel ürün veya egzotik çiftlik hayvanı gibi düşünülürken Güney Doğu Asya ve Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde keçiler et üretiminin major kaynağıdır (Dhanda ve ark. 2003).

Keçi yetiştiriciliği, elverişli bir şekilde dünya çapında uygulanmaktadır. Gelişmiş ülkelerdeki küreselleşme, endüstriyel birleşmeler ve teknolojik ilerlemelerden dolayı tarımda meydana gelen büyük değişimlere rağmen dünya çapındaki keçi sayısı yüksek ve orta düzey gelire sahip ülkelerle birlikte oldukça artmıştır (Boehlje ve Sonka 1998; Morand-Fehr ve ark. 2004; Cheeke 2004).

Türkiye'de yetiştirilen keçilerin yaklaşık % 96'sı Kıl keçisidir. Kıl keçisinden sonra en yaygın keçi ırkları ise Tiftik ve Kilis keçi ırklarıdır.

2.5.1. Kıl Keçisi

Kıl keçisi, Türkiye'de en yaygın olarak beslenen ve yetiştirilen keçi ırkıdır. "Karakeçi" veya "Adi keçi" olarak da bilinmektedir. En yoğun olarak; Akdeniz, Ege, Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nin dağlık kesimlerinde beslenmektedir (Yalçın 1990).

Kıl keçileri genel olarak orta iri bir yapıda olmakla birlikte Cidago yüksekliği 65-73 cm, vücut uzunluğu 67-73 cm arasındadır. Canlı ağırlık ergin tekelerde 60-90 kg, ergin

dişilerde 45-65 kg'dır. Renk ve kıl örtüsü genellikle siyahtır. Beyaz, beyaz-alaca kahve renkli, ger ve kır renklerine de çokça rastlanmaktadır. Kıl keçileri çoğunlukla boynuzludur ancak nadir de olsa boynuzsuz keçiler mevcuttur. Başları vücutlarına göre orta irilikte olup çene altlarında genellikle sakal vardır (Özcan 1989; Kaymakçı ve Aşkın 1997).

Kıl keçilerinin süt veriminin oldukça düşük seviyelerde (60-100 kg) bulunduğu, ikiz doğum oranının %15 civarında olduğu ve bu keçilerin daha çok et üretimi için yetiştirildiği bilinmektedir. (Sönmez 1974; Tuncel ve Bayındır 1983; Yıldız ve Esen 1998).



Şekil 2-6: Kıl Keçisi

(TAGEM 2009)

Tablo 2-1: Kıl Keçisi Vücut Ölçüleri ve Verim Özellikleri

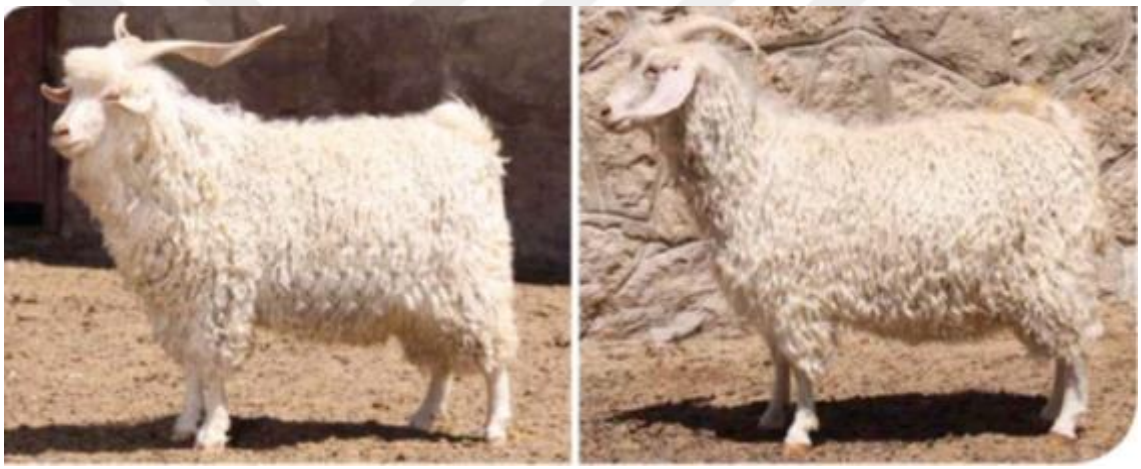
	Erkek	**Dişi**		**Dişi**
Cidago Yüksekliği (cm)		69	**Laktasyon Süt Verimi (kg)**	98
Vücut Uzunluğu (cm)		68	**Laktasyon Süresi (gün)**	183
Doğum Ağırlığı (kg)	3.4	2.5	**Üst Kaba Kıl / Kaşmir (g)**	410/46
Ergin Canlı Ağırlık (kg)	45-90	40-65	**Damızlık Yaşı**	18-20
Günlük Canlı Ağırlık Artışı (g)	160		**Oğlak Verimi**	1.1

(TAGEM 2009)

2.5.2. Tiftik Keçisi

Anavatanı Orta Asya ve Angora keçisi olarak tanınan Ankara keçisi Türkiye'de başta Ankara olmak üzere, İç Anadolu Bölgesi'nde Orta Anadolu Platosu'na ve Doğu Anadolu ile Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'ne yayılmıştır. Etinden, derisinden ve nadir olarak da sütünden yararlanılan bu ırkın en önemli verimi tiftiktir.

Tiftik, tüyü uzun, beyaz, çok ince ve ipeğimsi parlaklıkta olup elyaf şeklindeki yapısı ile "elmas lif" tanımı almaktadır. Bu tanım batı dillerine Arapça "muhayyer" kelimesinden geçmiştir ve dünyada mohair olarak bilinmektedir (Atay 2013). Tiftiğin rengi beyazdır. Kahverengi, siyah, gümüşi gri, sarı ve krem renkli olanları da bulunmaktadır (TAGEM 2009; Porter 1996; Kaymakçı 2006).



Şekil 2-7: Tiftik Keçisi

(TAGEM 2009)

Tablo 2-2: Tiftik Keçisi Vücut Ölçüleri ve Verim Özellikleri

	Erkek	**Dişi**		**Dişi**
Cidago Yüksekliği (cm)	66	51	**Laktasyon Süt Verimi (kg)**	25 – 50
Vücut Uzunluğu (cm)	67	58	**Tiftik Verimi (kg)**	2.8
Doğum Ağırlığı (kg)	2.7	2.5	**Lüle Uzunluğu (cm)**	15
Ergin Canlı Ağırlık (kg)	45	35	**Damızlık Yaşı (ay)**	18
Günlük Canlı Ağırlık Artışı (g)	110		**Oğlak Verimi**	1.1

(TAGEM 2009)

2.5.3. Kilis Keçisi

Kilis keçisi, Kıl keçileri ile Suriye kökenli Halep keçisinin melezlenmesi ile meydana gelmiştir ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ve özellikle Suriye'ye sınırı bulunan Şanlıurfa, Gaziantep, Kilis ve Hatay illerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir (İriadam 2004).

Kilis keçileri genellikle siyah renkli ve sarkık kulaklıdır. Kulakları ortalama 28 cm. civarındadır ancak kulak uzunluğu 38-39 cm'ye varan keçiler de mevcuttur. Dişi ve erkekleri çoğunlukla boynuzludur (Özcan 1989; Kaymakçı ve Aşkın 1997).

Kilis keçileri, orta iri ve uzun vücut yapılıdır ve siyah renklidir. Fakat gri-kahverengi, koyu kestane kır ve ger renkte olanlar da vardır. Baş ve kulaklar tamamen siyah kıllarla örtülüdür. Baş profili düz olup koçbaşlılara da rastlanır. Çene altında bir çift küpeye rastlanır. Kilis keçileri çoğunlukla boynuzludur. Cidago yüksekliği 65-75 cm, canlı ağırlık ergin tekelerde 60-80 kg, ergin dişilerde 35-50 kg'dır. Sütçü bir ırk olarak bilinen Kilis keçileri tamamen ekstansif şartlarda yetiştirilmektedir. Laktasyon süreleri 210-260 gün, süt verimleri 200-300 kg arasındadır. (Özcan 1989; Kaymakçı ve Aşkın 1997).



Şekil 2-8: Kilis Keçisi

(TAGEM 2009)

Tablo 2-3: Kilis Keçisi Vücut Ölçüleri ve Verim Özellikleri

	Erkek	**Dişi**		**Dişi**
Cidago Yüksekliği (cm)	70	67	**Laktasyon Süt Verimi (kg)**	217
Vücut Uzunluğu (cm)		66	**Laktasyon Süresi (gün)**	227
Doğum Ağırlığı (kg)	3	2.8	**Kıl Verimi (g)**	550
Ergin Canlı Ağırlık (kg)	60	40	**Damızlık Yaşı (ay)**	16
			Oğlak Verimi	1.4

(TAGEM 2009)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hayvan Gereci

Çalışmada hayvan materyali olarak Türkiye'deki yerli keçi ırklarından 50'şer adet Kilis keçisi, Tiftik keçisi ve Kıl keçi ırklarına ait DNA örnekleri kullanılmıştır. DNA örnekleri danışmanın da araştırmacı olarak dahil olduğu daha önceden İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapılmış İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiş 1433 no'lu Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) "Türkiye'deki bazı yerli keçi ırklarının mitokondrial DNA 'larının D-loop HVR1 bölgelerinin dizin analizi ve kökenlerinin belirlenmesi" isimli proje kapsamında oluşturulmuş DNA koleksiyondan seçilerek kullanılmıştır. Kan örnekleri alınan keçilerin seçiminde fenotip açısından ait oldukları ırkın tüm özelliklerini taşımalarına ve akraba olmalarına dikkat edilmiştir.

Çalışmada yer alan analizler, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'na ait DNA laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi aşağıda verilmiştir.

Soğutmalı santrifüj (Sigma 3-16 K)

Vorteks (Elektromag M16)

Etüv (Dedeoğlu)

Hassas terazi (Chyo MK-500C)

Güç kaynağı (Consort E833)

Yatay sualtı elektroforez cihazı (Thermo EC320)

Thermal cycler (Techne TC-312)

Minisantrifüj cihazı (Eppendorf minispin plus)

Kuru blok ısıtıcı (Techne Dri-Block DB-2D)

UV görüntüleme cihazı (Kodak El Logic 200 Imaging System)

Otoklav (Nüve OT 012)

Kılcal elektroforez ABI 3130 XL Genetic Analyzer (USA)

Otomatik pipet 100-1000 µl (Biohit)

Otomatik pipet 10-100 µl (Biohit)

Otomatik pipet 0,1-2,5 µl (Biohit)

Otomatik pipet 0,5-10 µl (Biohit)

Dijital otomatik pipet 10-100 µl (Thermo Finnipipette)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin listesi aşağıda verilmiştir.

EDTA (Sigma 066K0018)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma 015K0179)

Amonyum asetat (Biomatik 5A2563)

%99'luk absolut Etanol (Riedel-de Haën 32221)

Agaroz (Sigma 025K01041)

TEB tampon çözeltisi (Amresco 2758L42)

Etidyum Bromür (Sigma 083K8937)

Yükleme tamponu (6X) (Takara A129)

dNTP seti 4x25 µl (Fermantas 00016618)

Taq DNA polimeraz (Fermentas 00016337)

PZR reaksiyon tamponu (Fermentas 00016394)

MgCl2 (Fermentas 00016395)

Primerler (Integrated DNA Technologies)

Gene Ruler™ 100 bç DNA Ladder (Fermentas 00020166)

Gene RulerTM 50 bç DNA Ladder (Fermentas 00151359)

3.1.4. DNA İzolasyonu için Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

Çalışmada kullanılmış olan kan örneklerinin DNA izolasyonu işlemi için kullanılan çözelti ve tamponlar ile bunların hazırlanması aşağıda gösterilmiştir.

3.1.4.1. Lizis Tamponu

Balon jojeye 16,58 g NH4Cl, 2,0024 g KHCO3 ve 0,074 g EDTA konulup, steril distile su ile çözündürülerek 2 litreye tamamlanmıştır. 121°C'de 60 dakika otoklavda sterilize edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

3.1.4.2. Nükleaz Tamponu

4.65 g EDTA ve 2.92 g NaCl tartılarak, çözündürülmüş ve steril distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 60 dakika sterilizasyon yapıldıktan sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.1.4.3. Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) Çözeltisi (%10)

10 g sodyum dodesil sülfat steril distile suda çözündürülerek 100 ml'ye tamamlanmış ve oda ısısında saklanmıştır.

3.1.4.4. Amonyum Asetat Çözeltisi (4,5 M)

34,6 g amonyum asetat steril distile suda çözündürülerek 100 ml'ye tamamlanmış ve + 4 °C'de saklanmıştır

3.1.4.5. DNA İzolasyonu

Standart amonyum asetat ile çöktürme yöntemi kullanılarak genomik DNA elde edilmiştir (Miller ve ark. 1988). Yöntemin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

1-EDTA'lı tüpte bulunan 2cc kan, 50 ml'lik plastik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

2- 15 ml'e kadar Lysis Buffer eklenmiş ve vorteks ile karıştırılır.

3-15 dakika buzdolabında bekletilmiştir (+4°C)

4-Soğutmalı santrifüjde +4°C'de 6600d/d'da 11 dakika çevrilmiştir.

5-Oluşan pellete zarar vermeden üstteki sıvı dökülmüştür.

6-Pelletin üzerine 10 ml'e kadar Lysis Buffer ilave edilmiş ve vortekslenmiştir.

7- Soğutmalı santrifüjde 11 dakika süresince +4°C'de 6600 d/d'da çevrilmiştir.

8- Pellete zarar vermeden üst kısımdaki sıvı dökülmüştür.

9- Tüpte kalan pellet üzerine 3 ml nükleaz buffer, 400µl steril su, 50 µl sodyum dodesil sülfat, 30 µl Proteinaz K ilave edilmiştir.

10-37°C ‘de 1 gece inkübe edilmiştir.

11- İnkübasyon sonrasında tüpe 1.8 ml amonyum asetat ilav edilmiş ve vortekslenmiştir.

12- Soğutmalı santrifüjde +4°C’de 10600 d/d’da 25 dakika çevrilmiştir.

13.Üst kısımdaki sıvı, pellet ile karıştırılmadan başka bir 50 ml’lik plastik santrifüj tüpüne alınmıştır.

14-Yeni tüpe aktarılan sıvı %99’luk soğuk etanol ile 10-15 ml’e kadar tamamlanmıştır.

15- Tüp hafifçe alt üst edilerek çalkalanmış ve DNA ipliğinin oluştuğu görülmüştür.

16- DNA iplikçiği Steril bir pipet ucu aracılığı ile 400 µl steril su konmuş mikro santrifüj tüpüne alınarak, çözünmesi için oda ısısında birkaç gün bekletilmiştir.

Elde edilen genomik DNA örnekleri çalışmada kullanılıncaya kadar -86°C’de muhafaza edilmiştir. PZR işleminden önce, izole edilen DNA örneklerinin yoğunlukları, spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda absorbsiyon değerleri (A260) ölçülerek, aşağıdaki formülün kullanılması ile hesaplanmıştır (Temizkan ve Arda 2004).

DNA (µg/ml) = A260 x sulandırma oranı x 50

DNA izolasyon işleminin sonunda, 50 adet GAK ve DAK ırkı sığıra ait kan örneklerinin tamamından genomik DNA izole edilebilmiştir.

3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

Polimeraz zincir reaksiyonunda polimorfizmleri tespit edilecek bölgelerin çalışılması için kullanılan çözelti ve maddeler ile bunların hazırlanması aşağıda gösterilmiştir.

3.1.5.1. 0,5XTEB Çözeltisi

50 ml 10 x TEB steril distile suda çözündürülerek 1000 ml’ye tamamlanmış ve oda ısısında saklanmıştır.

3.1.5.2. dNTP Çözeltisi

dATP, dTTP, dGTP ve dCTP dinükleotitlerinin herbirinden 10 µl alınmış, 40 µl steril distile suda çözündürülmüştür. 100 µM yoğunlukta hazırlanan dNTP karışımı mikrosantrifüj ile karıştırılmış ve -20°C'de saklanmıştır.

3.1.5.3. Primer Çözeltisinin Hazırlanması

Liyofilize halde bulunan primerler öncelikle 100 µl distile suda çözündürülmüştür. Hazırlanan stok solüsyondan 1µl alınarak, distile su ile primerin sahip olduğu nmol değerine tamamlanmış ve 10 pmol/µl konsantrasyon sağlanmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kan Alma İşlemi ve DNA İzolasyonu

DNA örnekleri danışman tarafından daha önce araştırmacı olarak çalıştığı İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 1433 no'lu Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) kapsamında oluşturulmuş DNA koleksiyonundan seçilerek kullanılmıştır. Genomik DNA örnekleri standart amonyum asetat ile çöktürme yöntemi kullanılarak elde edilmiştir (Miller ve ark. 1988).

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

CAPN geni polimorfizmleri belirlemek üzere dizin analizine gönderilecek bölgeler PZR işlemi ile çoğaltılmıştır. Bu bölgelerin çoğaltılması için gerekli olan oligonükleotid primer dizileri aşağıda belirtilmiştir. (Singh ve ark. 2012). (GU908133).

CAPN-F : 5'-CCAGGGCCAGATGGTGAA-3'

CAPN-R : 5'-CGTCGGGTGTCAGGTTGC-3'

CAPN geni 609 bç'lik hedef bölgenin çoğaltılmasında kullanılacak PZR şartları: 95°C'de 2 dakika, 94°C'de 1 dakika, 59°C'de 1 dakika, 72°C'de 1dakika, 30 siklus ve 72°C'de 10 dakikadır. Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılan 25 µl PZR karşımındaki solüsyonlar ve miktarları Tablo 3-1'da verilmiştir.

CAST-F : 5'TGGGGCCCAATGA CGCCATCGATG3'

CAST-R : 5'GGTGGAGCA GCACTTCTGATCACC3'

CAST geni 622 bç'lik hedef bölgenin çoğaltılmasında kullanılacak PZR şartları: 95°C'de 3 dakika, 94°C'de 1 dakika, 59°C'de 1 dakika, 72°C'de 1dakika, 35 siklus ve

72°C'de 10 dakikadır. Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılan 25 µl PZR karşımındaki solüsyonlar ve miktarları Tablo 3-1'da verilmiştir.

Tablo 3-1: Hedef Bölgenin Çoğaltılması İçin Kullanılan 25 µl PZR Karışımındaki Solüsyonlar ve Miktarları

Solüsyonlar	Konsantrasyon	Miktar
Steril distile su		14,9 µl
$MgCl_2$	2 mM	2 µl
dNTP	100 µM	0,4 µl
Primer-1	10 pmol / µl	1 µl
Primer -2	10 pmol / µl	1 µl
Taq DNA polimeraz	1 U	0,2 µl
DNA	50-100 ng	3 µl
PZR tamponu	100mM KCI, 20 mM Tris-HCI, pH 8.0, mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1mM DDT, %50 gliserol	2,5 µl

3.2.3. Restriksiyon parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

CAST geni Polimorfizmleri belirlemek amacıyla çoğaltılan bölgeler Mspl restriksiyon enzimi ile sindirime tabi tutulmuştur. Sindirim işlemi için hazırlanan karışımın içeriği aşağıdaki gibidir:

- 10 µl PZR ürünü
- 1 µl restriksiyon enzimi
- 2 µl tampon solüsyonu
- 17 µl distile su

Buzlu çalışma rakı üzerinde, 0,2 ml'lik PZR tüplerinde hazırlanan karışım minisantrifüj aracılığıyla karıştırıldıktan sonra kuru blok ısıtıcıya yerleştirilmiştir. 5 dakika boyunca 37ºC'de sindirim işlemi gerçekleşmiştir.

3.2.4. Agaroz Jelin Hazırlanması ve PZR Ürünlerinin Yürütülmesi

PZR ürünlerinin ayrılması ve tanımlanması agaroz jel elektroforezinde yapılmıştır. % 2 agaroz jel hazırlanması için bir beher içine 30 ml 0,5 X TEB tampon

çözeltisi ve 0,6 g agaroz konularak mikrodalgada çözelti berraklaşıncaya ısıtılarak çözündürülmüştür. Isıtma aşamasında yürütülen DNA parçacıklarının görünür hale gelebilmesi için 1,5 µl etidyum bromür berraklaşan jele ilave edilerek karıştırılmıştır. Elde edilen jel, 55-60°C'ye kadar soğutulduktan sonra tarakların önceden yerleştirildiği jel tankına dökülmüştür. Jel içerisinden hava kabarcığının bulunmamasına dikkat edilmiştir. Jelin polimerleşmesi için 15 dakika beklendikten sonra jel içinden taraklar çıkartılarak örneklerin yüklenmesi için kuyucuklar hazırlanmıştır. Jel tankı, 0,5 X TEB tampon çözeltisi ile dolu elektroforezin içerisine konulmuştur. PZR uygulaması sonrası, elde edilen her bir sindirim ürününden 5 µl alınarak 2 µl yükleme tamponuyla parafilm üzerinde karıştırıldıktan sonra jeldeki kuyucuklara yüklenerek 110 voltta 20 dakika yürütülmüştür. Elektroforez işlemi tamamladıktan sonra jelde birbirinden ayrılan DNA örnekleri UV ışık altında görüntülenmiştir. RFLP uygulanmayan bölgeler için, çoğalan DNA örnekleri dizin analizi işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.5. Dizin Analizi

Çalışmamızda dizin analizi işlemi Refgen Biyoteknoloji Ltd. Şti (Ankara Üniversitesi Teknokent- Ankara) laboratuarı tarafından gerçekleştirilmiştir. PZR ürünlerinin saflaştırılıp forward primer vasıtasıyla dizinleme işlemi kılcal elektroforez (ABI 3130 XL Genetic Analyzer, USA) cihazında yapılmıştır.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Kıl, Kilis ve Ankara keçileri ırklarına ait her bir birey için dizin analizi sonuçları öncelikle Clustal W karşılaştırma programı bazlı çalışan MEGA 4 (Tamura ve ark. 2007) (http://www.megasoftware.net/m_con_select.html) bilgisayar programı kullanılarak her bir bireyin genotipi belirlenmiştir.

Irklara ait beklenen ve gözlenen genotip frekansları ile Hardy-Weinberg eşitliğine uyum analizleri için PopGen32 bilgisayar programı kullanılmıştır (Yeh ve ark. 2000).

Analiz edilen tüm lokuslara göre ırklar arası genetik uzaklık PopGen32 programı ile Nei (1978)'nin UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) yöntemine göre hesaplanmıştır. Haplotip frekansları, haplotiplerin sayılması ve bir ırka ait birey sayısıyla oranlanması sonucunda hesaplanmıştır.

3.2.7. Etik Kurul Onay Bilgileri

Etik kurul adı: İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Etik kurul kararının tarihi: 01.12.2015

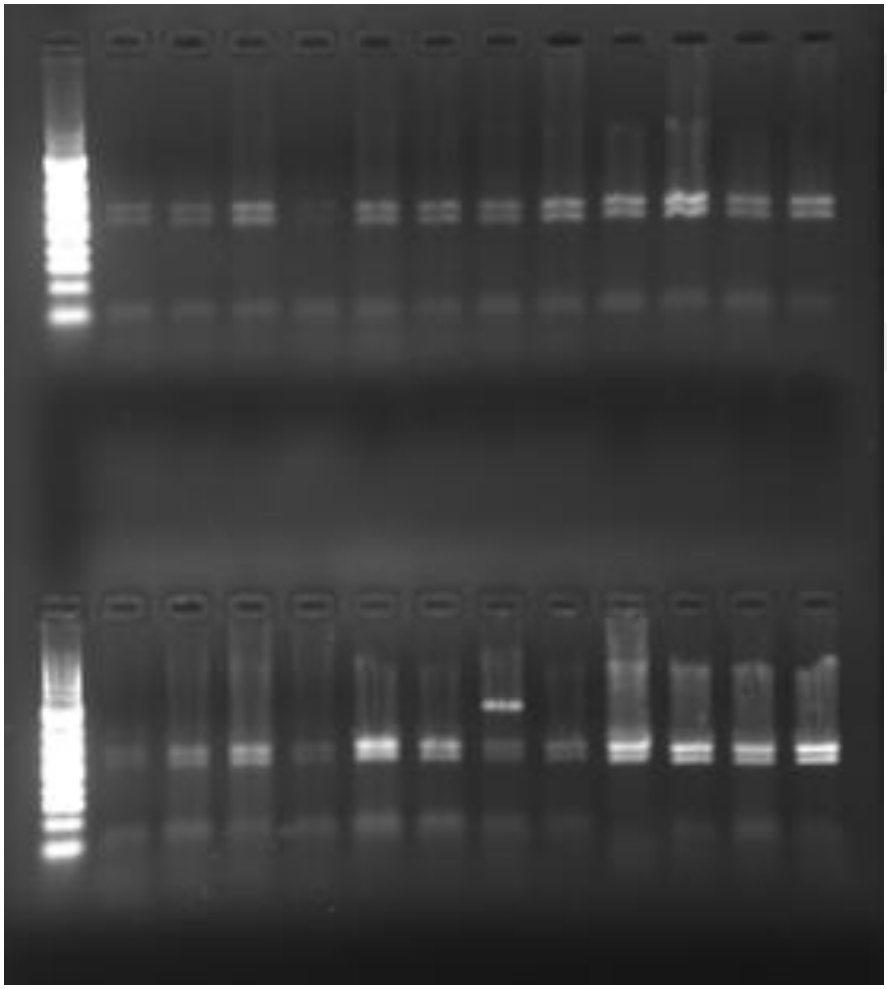
Etik kurul kararının sayısı: 54

4. BULGULAR

4.1. CAST Geni PZR-RFLP Metodu ile belirlenen polimorfizmler

Yapılan çalışmada CAST geni 622 bç'lik hedef bölge çoğaltılmıştır. Hedef bölgeye ait genotipler UV görüntüleme ile tespit edilerek fotoğraflanmıştır.

CAST geni 622 bç büyüklüğündeki bölgenin PZR ile çoğaltılması ve MSPI enzimi ile kesimi sonucunda MM genotipli bireylerde 336 ve 286 bç'lik iki bant, MN genotipli bireylerde 622, 336 ve 286 bç'lik üç bant elde edilmiştir. Hedef bölgeye ait fotoğraf aşağıda yer almaktadır.



Şekil 4-1: CAST geni 622 bç'lik Hedef Bölgesinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü

1.kuyu: Markör (Gene Ruler^{TM} 50bç DNA Ladder), diğer kuyular 286, 336 ve 622bç'lik hedef bölgeler

4.2. CAST Geni Polimorfizminin Değerlendirilmesi

Kıl, Kilis ve Tiftik ırkı keçilere ait CAST genine ait genotip ve allel frekans sonuçları Tablo 4-1'de verilmiştir. Kıl, Kilis ve Tiftik ırkı keçilerde homozigot genotip frekanslarına bakıldığında MM genotip frekansları her üç ırkta da oldukça yüksek tespit edilirken NN genotip frekansları gözlenmemiştir. Heterozigot genotip frekanslarında ise her üç keçi ırkında da MN genotip frekansları tespit edilmiş olup Tiftik ırkı keçilerde Kıl ve Kilis ırkı keçilere göre daha düşük bulunmuştur.

Beklenen ve gözlenen genotipler kıyaslandığı zaman her üç genotip frekansında MM homozigot birey sayısında yükselme, MN heterozigot birey sayısında ise azalma beklendiği görülmektedir. Bu yükselme ve azalmalar $p<0.01$ düzeyinde istatistiki önem arz etmesinden dolayı CAST geni genotip dağılımı Hardy-Weinberg eşitliğine uyumsuz bulunmuştur.

Her üç ırktaki allel frekans dağılımlarına bakıldığında ise M allel frekansının N allel frekansına göre dikkat çekici düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

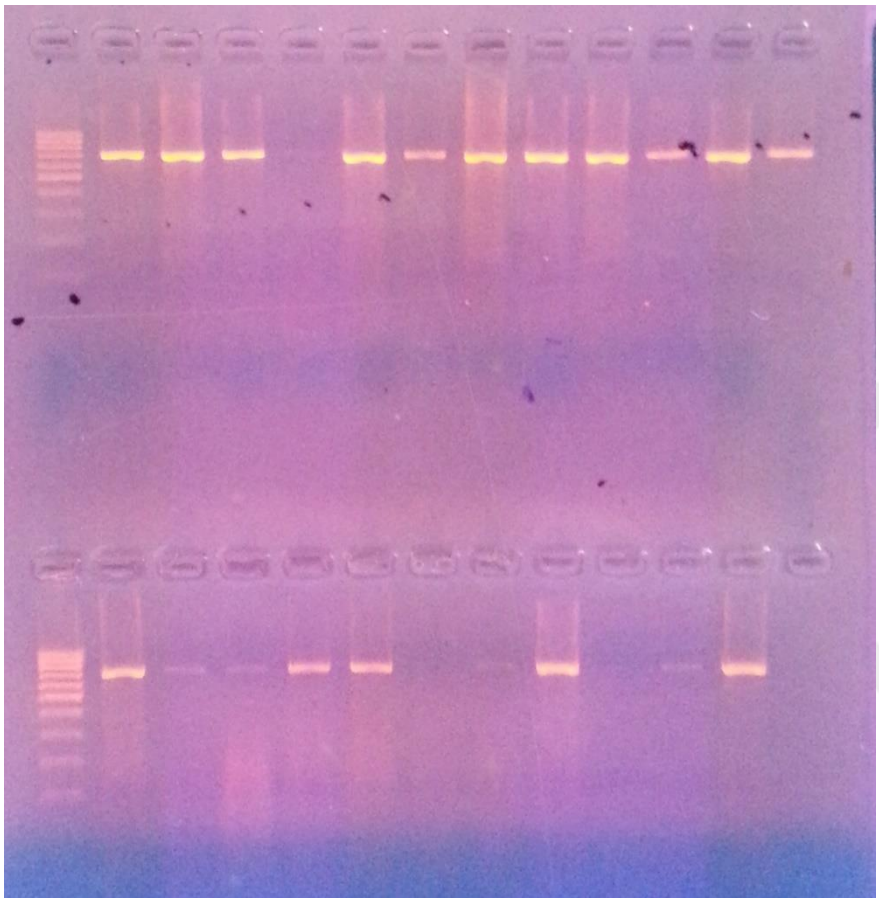
Tablo 4-1: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAST geni polimorfizmi genotip ve allel frekansları

		Genotip						Allel Frekansı (%)		
		MM		MN		NN		M	N	
Irk	*n*[1]	Göz[2]	Bek[3]	Göz	Bek	Göz	Bek			$(\chi^2)^4$
Kıl	50	0.94	0.94	0.6	0.06	0	0	0,97	0,03	0.0328 ***
Kilis	50	0.94	0.94	0.6	0.06	0	0	0,97	0,03	0,0315
Tiftik	50	0.82	0.87	0.18	0.17	0	0.01	0,91	0,09	0.0433 ***

[1]hayvan sayısı, [2]gözlenen değerler, [3]beklenen değerler, [4]Hardy-Weinberg eşitliğine uyum, *** P< 0,001

4.3. CAPN Geni Polimorfizminin Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada CAPN geni 609 bç'lik hedef bölge çoğaltılmıştır. Hedef bölgeye ait fotoğraf Şekil 4-2'de yer almaktadır.



Şekil 4-2: CAPN geni 609 bç'lik Hedef Bölgesinin %2'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü

1.kuyu: Markör (Gene Ruler^{TM} 100bç DNA Ladder), diğer kuyular 609bç'lik hedef bölge

Her üç keçi ırkına ait dizin analizi sonuçları Clustal W karşılaştırma programı bazlı çalışan MEGA 4 (Tamura ve ark., 2007) (http://www.megasoftware.net/m_con_select.html) bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi amacıyla yapılan istatistik analizleri icin PopGen32 bilgisayar programı kullanılmıştır (Yeh ve ark. 2000).

4.3.1. CAPN geni 5707 polimorfizmi

Kıl, Kilis ve Tiftik ırkı keçilerde CAPN geni 5707 bölgesine ait genotip ve allel frekans dağılımları Tablo 4-2'de verilmiştir. Kilis ırkında TT genotip haricinde homozigot genotip frekanslarına bakıldığında gözlenen genotip frekanslarının

beklenenden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca CC genotip frekansı TT genotip frekansına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Kilis ırkı keçilerde TT genotip frekansı gözlenmezken, Tiftik ve Kıl ırkı keçilerde çok düşük düzeyde bulunmuştur. CT heterozigot genotip frekansı her üç keçi ırkında da gözlenmemiştir. Allel frekans dağılımlarına bakıldığında ise her üç keçi ırkının C allel frekansı T allel frekansına göre dikkat çekici düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kilis ırkı keçilerde ise T allel frekansı hiç gözlenmemiştir. Her üç keçi ırkında 5707 polimorfizmine ait genotip frekansları Hardy-Weinberg eşitliğine uyum göstermektedir.

4.3.2. CAPN geni 5709 polimorfizmi

Kıl, Kilis ve Tiftik ırkı keçilerde CAPN geni 5709 bölgesine ait genotip ve allel frekans dağılımları Tablo 4-3'de verilmiştir. Her üç keçi ırkında da gözlenen GG genotip frekansları beklenenden yüksek bulunmuştur. Tiftik ve Kilis ırkı keçilerde ise gözlenen CC genotip frekansları beklenenden yüksek bulunmuştur. Ayrıca her üç ırkta da GG genotip frekansları, CC genotip frekanslarına göre oldukça yüksek çıkmıştır. CC genotip frekansı ise Tiftik ve Kilis ırkı keçilerde oldukça düşük gözlenirken, Kıl ırkı keçilerde hiç gözlenmemiştir. Her üç keçi ırkında da CG heterozigot genotip frekansı hiç gözlenmemiştir. Allel frekans dağılımlarına bakıldığında ise her üç ırkın G allel frekansının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir ve Kıl ırkı keçilerin G allel frekansı açısından monoformik olduğu tespit edilmiştir. Her üç keçi ırkında 5709 polimorfizmine ait genotip frekansları Hardy-Weinberg eşitliğine uyum göstermektedir.

4.3.3. CAPN geni 5723 polimorfizmi

Kıl, Kilis ve Tiftik ırkı keçilerde CAPN geni 5723 bölgesine ait genotip ve allel frekans dağılımları Tablo 4-4'de verilmiştir. Her üç keçi ırkında da homozigot genotip frekanslarına bakıldığında gözlenen genotip frekanslarının beklenenden daha yüksek olduğu gözlenirken GG genotip frekanslarının AA genotip frekanslarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. AA genotip frekansında Tiftik ırkı keçilerde Kilis ve Kıl ırkı keçilere göre daha yüksek olduğu gözlenirken GG frekansında ise diğer iki keçi ırkına göre en düşük genotip frekasnına sahip olduğu gözlenmiştir. GA heterozigot genotip frekansı ise her üç keçi ırkında da gözlenmemiştir. Allel frekans dağılımlarına bakıldığında ise Tiftik ve Kilis ırkı keçilerde G allel frekansı A allel frekansına göre daha yüksek, Kıl ırkı keçilerde ise A allel frekansı G allel frekansına göre daha yüksek gözlenmiştir. En yüksek G allel frekans değeri Kilis ırkı keçilerde, en yüksek A allel

frekans değeri ise Tiftik ırkı keçilerde bulunmuştur. Her üç keçi ırkında 5723 polimorfizmine ait genotip frekansları Hardy-Weinberg eşitliğine uyum göstermektedir.

4.3.4. CAPN geni 5741 polimorfizmi

Kıl, Kilis ve Tiftik ırkı keçilerde CAPN geni 5741 bölgesine ait genotip ve allel frekans dağılımları Tablo 4-5'de verilmiştir. Homozigot genotip frekanslarına bakıldığında her üç keçi ırkında da AA genotip frekansları GG genotip frekanslarına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca her üç keçi ırkında da gözlenen AA genotip frekansları beklenenden yüksek bulunmuştur. Tiftik ve Kıl ırkı keçilerde ise gözlenen GG genotip frekansları beklenenden yüksek bulunurken Kilis ırkı keçilerde ise GG genotip frekansı hiç gözlenmemiştir. Ayrıca her üç keçi ırkında da GA heterozigot genotipi tespit edilmemiştir. Allel frekanslarına bakıldığında ise her üç ırktada A allellinin G alleline göre çok yüksek oldukları gözlenmiştir. Kilis ırkı AA frekansı açısından monoformik bulunmuştur. Her üç keçi ırkında 5741 polimorfizmine ait genotip frekansları Hardy-Weinberg eşitliğine uyum göstermektedir.

Tablo 4-2: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAPN geni 5707 polimorfizmi genotip ve allel frekansları

		Genotip						Allel Frekansı (%)		
		CC		CT		TT		C	T	
Irk	*n*[1]	Göz[2]	Bek[3]	Göz	Bek	Göz	Bek			$(\chi^2)^4$
Tiftik	39	0,95	0,90	0,0	0,1	0,005	0,002	0,95	0,05	51,3624***
Kilis	44	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1	0,0	0,0000***
Kıl	46	0,94	0,87	0,0	0,12	0,06	0,0003	0,94	0,06	54,6348***

[1]hayvan sayısı, [2]gözlenen değerler, [3]beklenen değerler, [4] Hardy-Weinberg eşitliğine uyum, *** P< 0,001

Tablo 4-3: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAPN geni 5709 polimorfizmi genotip ve allel frekansları

		Genotip						Allel Frekansı (%)		
		CC		CG		GG		C	G	
Irk	*n*[1]	Göz[2]	Bek[3]	Göz	Bek	Göz	Bek			(χ^2)[4]
Tiftik	40	0,075	0,0085	0,0	0,0	0,925	0,83	0,10	0,90	46,3402***
Kilis	46	0,02	0,0003	0,0	0,0	0,98	0,96	0,02	0,98	91,0130***
Kıl	39	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1	0,0000***

[1]hayvan sayısı, [2]gözlenen değerler, [3]beklenen değerler, [4] Hardy-Weinberg eşitliğine uyum, *** P< 0,001

Tablo 4-4: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAPN geni 5723 polimorfizmi genotip ve allel frekansları

		Genotip						Allel Frekansı (%)		
		AA		GA		GG		A	G	
Irk	*n*[1]	Göz[2]	Bek[3]	Göz	Bek	Göz	Bek			$(\chi^2)^4$
Tiftik	40	0,42	0,17	0,0	0,0	0,55	0,35	0,44	0,56	123,1318***
Kilis	46	0,15	0,02	0,0	0,0	0,85	0,72	0,15	0,85	49,0971***
Kıl	39	0,10	0,01	0,0	0,0	0,90	0,80	0,10	0,09	44,0649***

[1]hayvan sayısı, [2]gözlenen değerler, [3]beklenen değerler, [4] Hardy-Weinberg eşitliğine uyum, *** P< 0,001

Tablo 4-5: Kıl, Kilis ve Tiftik ırk keçilerde CAPN geni 5741 polimorfizmi genotip ve allel frekansları

		Genotip						Allel Frekansı (%)		
		AA		GA		GG		A	G	
Irk	*n*[1]	Göz[2]	Bek[3]	Göz	Bek	Göz	Bek			$(\chi^2)^4$
Tiftik	41	0,85	0,73	0,0	0,25	0,15	0,02	0,85	0,15	44,2755***
Kilis	46	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1	0,0	0,000***
Kıl	39	0,97	0,95	0,0	0,05	0,02	0,0003	0,97	0,03	77,0143***

[1]hayvan sayısı, [2]gözlenen değerler, [3]beklenen değerler, [4] Hardy-Weinberg eşitliğine uyum, *** P< 0,001

5. TARTIŞMA

Son yıllarda moleküler genetik ve bilgisayar uygulamalarında yaşanan ilerlemeler, çiftlik hayvanlarının yetiştirilmesi ve ıslah programlarını pozitif yönde etkilemektedir. Moleküler genetik yöntemlerde sağlanan gelişmeler, çiftlik hayvanlarının sağlık durumlarını ve ekonomik olarak önemli verim özelliklerini etkileyen genlerin haritalanması ve tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Genetik araştırmalar sonucunda verim özelliklerine etkili olan çok sayıda gen bölgesi belirlenmiş olup gerçekleştirilen aday gen çalışmalarıyla beslenme, büyüme ve enerji metabolizmasının fizyolojisi üzerine biyolojik etkiye sahip genler tespit edilmeye çalışılmaktadır. Araştırmalardaki esas amaç, verim özelliklerini etkileyen genlerin ve genetik çeşitliliğe yol açan mutasyonların ortaya çıkarılması, genomun görev ve yapısının belirlenmesi ve genlerin birbiriyle ve çevreyle olan etkileşimlerinin aydınlatılmasıdır. Bu çalışmalar ile metabolizmadaki ara yolları etkileyen genlerin yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesi sonucunda daha başarılı seleksiyon programlarının uygulanmasına katkı sağlanmaktadır (Schrooten ve ark. 2000; Ashwell ve ark. 2004; Weikard ve ark. 2005).

Ülkemizde rakamsal olarak çok sayıda hayvan bulunmasına rağmen bu hayvanlardan elde edilen verim düşük seviyede kalmaktadır. Verim özelliklerinin yüksek olmamasının nedenleri arasında çevresel faktörler, bakım ve beslenme şartlarındaki yetersizliklerin yanı sıra yerli ırkların genotipik açıdan da yetersiz olması göz önünde bulundurulmalıdır (Gökçen 2000; Bakır ve Kaygısız 2003; Yıldız ve ark. 2008). Yerli keçi ırklarının fenotipik özelliklerinin geliştirilmesi için öncelikle bu özellikleri etkileyen genetik yapıların ortaya çıkarılması önem arz etmektedir. Genotiplere ait elde edilen bilgiler, klasik fenotipik seleksiyon çalışmalarına ciddi faydalar sağlamaktadır. Ekonomik yönden verim özelliklerine pozitif katkı sağlayan QTL'lerin detaylıca incelenmesi ve içerdiği genetik çeşitliliğin tanımlanması, metabolik yolların ve ilgili genlerin daha net bir şekilde anlaşılmasına ve böylece hayvan ıslahı çalışmalarının başarıya ulaşmasına katkı sağlayacaktır. (Wang ve ark. 2008; Komisarek ve Dorynek 2009; Sherman ve ark. 2009).

Et kalitesi gibi farklı ırklarda ve aynı ırkın farklı bireyleri arasında çok değişiklik gösteren kantitatif özelliklerin belirlenmesinde doğru seleksiyon modellerinin moleküler düzeyde gerçekleştirilmesi daha da büyük önem arz etmektedir.

Günümüzde çiftlik hayvanlarında verim özellikleri ve ekonomik özellikler ile ilişkili olabileceği düşünülen MAS çalışmalarında kullanılabilecek 271 adet aday gen tespit edilmiştir. Özellikle metabolizma ve biyokimyasal ara yollara etki eden bu aday genlerin önem sıralamaları kendi aralarında değişiklik göstermektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda BMPR-IB, BMP-15, GDF-9 (Gürsel ve ark. 2011; Karslı ve Balcıoğlu 2010; Karslı ve ark. 2012; Chu ve ark. 2011), prolaktin (Chu ve ark. 2007), melatonin (Hernandez ve ark. 2005) genlerinin döl verimi ile ilişkili olduğu, myostatin (Tellam ve ark. 2012), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I) (He ve ark. 2012), IGF bağlayıcı protein (IGF-BP) (Kumar ve ark. 2006), büyüme hormonu (GH) genlerinin (Adams ve Briegel 2005) et verimi ile ilişkili olduğu ve β-Lactoglobulin geninin (Şahin ve ark. 2011) süt kalitesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Son yıllarda çiftlik hayvanlarında, bu genlere et verim ve kalitesi ile ilişkili olduğu bildirilen CAPN ve CAST genleri de ilave edilmiştir (Gao ve ark. 2007; Dagong ve ark. 2012; Kania 2012; Şahin ve ark. 2013). Fare, domuz, koyun ve sığır gibi farklı hayvan türlerinde CAPN ve CAST gen polimorfizmini belirleme üzerine çalışmalar yürütülmüş fakat keçilerde bu gen polimorfizmi üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıda kalmıştır (Hitomi ve ark. 2000; Javanmard ve ark. 2010; Choi ve ark. 2006; Palmer ve ark. 1998; Juszczuk-Kubiak ve ark. 2004)

Bu araştırmada Türkiye'de yetiştirilen yerli ırk keçilerden Kıl, Tiftik ve Kilis keçi ırklarında et kalitesi ve verimini etkilediği öne sürülen CAST ve CAPN genlerindeki polimorfizmlerin genotip ve allel frekanslarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

5.1. KALPASTATİN (CAST)

Sığırlarla yapılan çalışmalar sonucunda, CAST genindeki varyasyonlar ile karkas ve et kalite özellikleri arasında ilişki olduğu ve bu varyasyonların et hassasiyetindeki varyasyonlara katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Barendse ve ark. 2007; Casas ve ark. 2006; Schenkel ve ark. 2006; Tait ve ark. 2014). Angus sığır ırkında yapılan bir çalışmada CAST gen etkisinin gevreklik, ette kırmızı renk oluşumu ve düşük yağ oranı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu verilere paralel olarak koyunlarda yapılan çalışmalar sonucunda da CAST geninin et kalitesi ile ilişkili olduğu yönünde bulgular mevcuttur (Palmer ve ark. 1998; Sutikno ve Sumantric 2011)

Juszczuk-Kubiak ve ark. (2008) sığırlarda gerçekleştirdikleri araştırma sonucunda CAST geni intron 12'de 4 yeni SNP saptayarak, tespit edilen 4 mutasyonun karkas ve et kalitesi özellikleriyle doğrudan ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Boz ırk ve Boz ırk/İsviçre Esmer melezi 132 boğa ve düvenin kullandığı bir çalışmada CAST/RsaI polimorfizminin C ve G alleleri karakterize edilmiştir. C allel frekansı, saf Türk Boz ırklara kıyasla melez grup içinde önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Çalışmada kullanılan örneklerin tamamında, C allel frekansı ortalaması %56, genotipik frekanslar ise CC, CG ve GG genotipleri için sırasıyla, safkan Türk Boz ırkta; 0.257, 0.499 ve 0.243 ve Türk Boz ırk/İsviçre Esmer melezi popülasyonda; 0.388, 0.470 ve 0.142 olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda genotipik dağılımların Türk Boz ırk sığırı saf ve melez örneklerinin her ikisinde de dengede olduğu ve GG genotipinin Boz ırk sığırlarda et yumuşaklığı ile ilişkili olabileceği saptanmıştır (Kök ve ark. 2019).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara paralel olarak İran ve Arap koyunlarında yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda MM genotip frekansı en yüksek bulunmuş ve NN genotip frekansı hiç saptanmamış veya çok düşük düzeyde bulunmuştur. (Nassiry ve ark. 2007; Gabor ve ark. 2009; Shahroudi ve ark. 2006; Mohammadi ve ark. 2008). Elyasi-Zaringhabaee ve ark. (2005), Arkharomerino koyunlarında yaptıkları bir çalışmada ise az önce ifade edilen çalışmalar ve bizim çalışmamıza benzer olarak NN genotipi hiç saptanmamış fakat bu çalışmalardan farklı olarak MN genotip frekansları yüksek bulunmuştur.

Saeed-ul-Hassan Khan ve ark. (2012)'nın Balkhi ile Kajli koyunları ve Beetal keçilerinde yaptıkları CAST gen polimorfizm çalışmasında Beetal ırkı keçilerde, bu çalışmada Kıl, Kilis ve Tiftik ırkı keçilerde tespit edilen sonuçlara paralel olarak NN genotipi tespit edilmemiş ve tüm keçiler MM genotipinde tespit edilmiştir. Çalışmada MM genotipi ile kilo artışı arasında pozitif etki saptanmıştır. Aynı çalışmada MM genotip frekansları Balkhi ve Kajli koyunlarında sırasıyla 0.76 ve 0.74; MN genotip frekansı ise iki ırkta da 0.24; NN genotip frekansını ise 0.00 ve 0.20 bulunmuştur. MN genotipine sahip olan Balkhi ırkı yavruların doğumdan sekiz aya ve Kalji ırkındaki yavruların doğumdan dört aya kadar diğer iki genotipe sahip olan yavrulara kıyasla önemli ölçüde daha hızlı kilo artışı gösterdikleri tespit edilmiştir. Çok az miktarda tespit edilen NN genotipine sahip Kajli koyunlarının ise diğerlerinden daha düşük canlı ağırlık ortalamalarına ulaşması, bu popülasyonlar için elde edilen verilerin literatür ışığında

değerlendirilmesiyle canlı ağırlık üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olan NN genotipine karşı gelişen bir seçim olduğu şüphesini doğurduğunu saptamışlardır. Çalışma sonucunda CAST gen lokusunun Balkhi ve Kajli koyun ırklarında büyüme ile ilişkili MAS için potansiyel bir moleküler markör olduğu bildirilmiştir.

Avanus ve ark., (2015) Türkiye'de bulunan 6 farklı yerli koyun ırkını (Kıvırcık, İmroz, Karayaka, Hemsin, Morkaraman ve Karagül) kullanarak yaptıkları çalışmada, İmroz ırkı koyunlarda en yüksek M allel frekansını (0.96) olarak bildirmiştir. Ayrıca çalışılan altı yerli ırk koyundan dört ırkta (İmroz, Morkaraman, Karakaya, Hemşin) MM genotip frekansları yüksek bulunmuş ve NN genotipine ise tüm ırklarda rastlanamamıştır. Araştırmacıların bulduğu bu sonuçlar yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir. Çalışmada, İmroz, Karayaka ve Hemşin koyun ırklarında MM genotipinin ve Kıvırcık ırkının MN genotipi için en yüksek genotip frekansına sahip olması yerli koyun ırklarının yetiştirildikleri bölgelerdeki seleksiyon sürecinden kaynaklanabileceği fikrini ortaya koymaktadır. Aynı çalışmada heterozigotluk değerleri sırasıyla en yüksek Kıvırcık ırkında (%60) ve en düşük İmroz ırkında (%7.4) ırkında saptanmıştır. İmroz ırkının İmroz adasından köken almasından dolayı, düşük heterozigotluk değerine sahip olmasını bu ırk için beklenen bir sonuç olarak belirtmişlerdir.

CAST geni ile Kıvırcık ırkı koyunların karkas özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada NN genotipli hayvanlarda canlı ağırlık, ortalama günlük kazanç, sırt yağ kalınlığı ve deri + sırt yağ ortalama değerlerinin MM ve MN genotiplerine göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Kıvırcık koyunlarında, CAST geninin yağ kalınlığı ve deri + sırt yağ kalınlığını etkilediğini ve NN genotipi taşıyan hayvanların MM ve MN genotipi olan hayvanlara göre daha az yağlı karkasa sahip olduklarını göstermiştir (Yılmaz ve ark. 2014a).

Yılmaz ve ark.'nın (2014b) yaptıkları başka bir çalışmada Kıvırcık, Sakız, Karacabey Merino ve Gökçeada koyun ırklarından oluşan 720 hayvanda yapılan CAST geni polimorfizmi çalışmalarında, Sakız popülasyonunda N allel (%65.5) ve NN genotipinin (%40,2) diğer ırklara göre oldukça yüksek olduğunu bulmuşlardır. Sakız ırkı koyunlarının, diğer popülasyonlara nispeten daha izole bir koruma sürüsünde yer aldığından dolayı bu popülasyonda akrabalı yetiştirmenin zamanla arttığı ve bazı genotip frekanslarını arttırdığı sonucuna varmışlardır. Gökçeada popülasyonunda N alleli (%1) düşük frekansta görülmüş, NN genotipi gözlenememiş ve MN genotipinin frekansı (%2)

da bu popülasyonda oldukça düşük bulunmuştur. Tüm bu veriler ışığında popülasyonda M alleli yönünde homozigotluğun meydana geldiğini öne sürmüşlerdir.

Bozhilova-Sakova M. ve Dimitrova I. (2016), Bulgar Karakachan koyununda yaptıkları çalışmada sadece MM (1.0) genotipini tespit etmiş ve popülasyonda CAST lokusunun monomorfik bulunduğunu açıklamışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarının, CAST koyun geni ile ilgili diğer araştırmacıların yaptığı çeşitli koyun ırklarında sadece M allelinin tespit ettikleri ve CAST lokusunun monomorfik olduğunu buldukları çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Gabor ve ark. 2009; Hristova ve ark. 2015). Araştırmacılar çalışmanın sonucunda Karakachan koyun ırkının genotiplendirilmesinin, koyunlardaki seçim programlarını ve et verimliliğini artırmak için kesimden önce sınıflandırmaya yardımcı olabileceği ve Karakachan koyun ırkının yerli Bulgar ırkı olmasından dolayı genetik çeşitliliğin kaynağı olduğu tespitinde bulunmuşlardır.

Balcıoğlu ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada 7 farklı koyun ırkında CAST geni genotip frekansını belirlemişlerdir. Adı geçen araştırmacıların 0.92 olarak tespit ettikleri M allel frekansı ile bu çalışmada Kıl, Kilis ve Tiftik ırkı keçilerde sırasıyla 0.97, 0.97 ve 0.91 olarak tespit edilen sonuçlar birbiri ile paralellik arz etmektedir.

Bu çalışma sonucunda CAST genine ait Kıl ve Kilis keçilerinde MM ve MN genotipleri sırası ile %94 ve %6; Tiftik keçilerinde ise %82 ve %18 olarak bulunmuştur. NN genotipine ise her üç keçi ırkında da rastlanılmamıştır. Kıl ve Kilis keçi ırklarında gözlenen M ve N allel frekansları ise %97 ve %0.03 iken Tiftik ırkında %91 ile %0.09 olarak belirlenmiştir. Her üç ırkta da M alleli yüksek frekansa sahipken N alleli çok düşüktür. Kıl, Kilis ve Tiftik keçi ırkları için Hardy-Weinberg dengesine uyumlu bulunmamıştır.

Koyun ve sığırlarla yapılan bazı çalışmalardan elde edilen sonuçların keçi çalışmalarından elde edilen sonuçlardan farklı olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın kullanılan örneklerden ve ırk içi varyasyondan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Türkiye'de yetiştirilen yerli keçi popülasyonlarında DNA düzeyinde CAST gen polimorfizmine yönelik yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bu araştırmada yerli genotiplerimizde CAST bakımından gen polimorfizminin olduğu görülmüştür. CAST lokusunda M ve N alleli olmak üzere 2 allel saptanmış olup en yaygın M allelidir. Bu çalışma referans bir çalışma olarak kabul edilip kimi yerli ırklar üzerinde başka çalışmalar da yapılabilecektir.

Bu çalışma sadece yerli gen kaynağı olan Kilis, Kıl ve Tiftik keçilerinde CAST gen polimorfimizminin olup olmadığını ortaya koyabilmek için yapılmıştır. Gelecek dönemde gerçekleştirilecek araştırmalarda elde edilecek genotip verileri ile bireylerin performans özellikleri arasında bağlantı kurularak genotiplerin fenotipe yansımaları daha net bir şekilde ortaya çıkarılabilecektir. Bu amaçla, Kilis, Kıl ve Tiftik keçi ırklarında her üç genotipe ait bireylerin aynı koşullarda gelişme özellikleri ile et verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi anlamlı olacaktır. Fenotipik anlamda üstünlük sağlayan genotiplerin saptanması durumunda bu genotiplere ait bilgiler mevcut ıslah programlarına entegre edilebilecektir. CAST geni et kalitesinin iyileştirilmesinde MAS için aday gen olması bakımından önemlidir.

5.2. KALPAİN (CAPN)

CAPN miyofibriler proteinlerin yıkımını gerçekleştiren, etin gevrekliğine ve yumuşaklığına etki eden en önemli proteinlerden biridir. (Page ve ark. 2004; Koohmarie ve ark. 1996). Bu nedenle CAPN geninin et verimi, etin gevrekliği ile etin sululuk, aroma ve intramuskular yağ oranları ile ilişkisinin değerlendirilmesine yönelik yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Et kalitesi üzerine yapılan bu çalışmalar sonucunda ise CAPN1 geninde oldukça fazla sayıda SNP tespit edilmiştir (Lee ve ark. 2014; Page ve ark. 2002, 2004; Juszczuk Kubiak ve ark. 2004; White ve ark. 2005).

Page ve ark. (2004) da CAPN'in et kalitesiyle ilişkisini değerlendirdikleri 362 Simmental ve Angus sığırı üzerinde yaptıkları çalışmada ekzon 9'da yer alan CAPN316'nın, AA allel frekasında A-G transversiyonuna neden olduğunu tespit etmiş ve C allel frekansını %17 bulmuşlardır. Ayrıca aynı çalışmada pozisyon 947'de C/G've amino asit pozisyonu CAPN316'da glisin/alanin değişikliğine neden olan CAPN1-G316A polimorfizminin protein sentezinde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan çalışma, CAPN316'nın et kalitesini pozitif yönde etkisini öne süren hipotezi desteklemektedir.

Pintos ve Corva (2011), CAPN geni ile Angus ırkı sığırların büyüme ve gelişme özellikleri arasındaki ilişkileri belirlemeyi amaçladıkları araştırmada, CAPN316'nın da aralarında bulunduğu dört adet markörün, doğum ağırlığı, ağırlık kazancı, 18 aylık yaştaki ağırlık ve bel gözü kası alanına pozitif etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda CAPN316'nın C alleli ile et gevrekliği arasında pozitif bir ilişki olduğu sonucuna varmışlardır.

Corva ve ark. (2007), 15-18 aylık 313 adet Arjantin Angus ve Hereford ırklarında yaptıkları çalışmada G316A polimorfizminin de dahil olduğu CAPN1 gen varyantlarının et kalitesinin önemli belirleyicilerinden biri olan etin gevrekliğine etkisinin istatistiksel düzeyde anlamlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Casas ve ark. (2005), Brahman ırkı sığırda karkas kompozisyonu ve et kalitesini araştırdıkları çalışmada yer alan kıl keçileri genotip dağılımına paralel olarak CC genotipini tespit edememişlerdir. Bunun nedeninin CAPN geninin ruminatlarda korunmuş bir gen olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aynı çalışmada CAPN316'nın et yumuşaklığı skoru ($P < 0.05$) ile ilişkili olduğunu ve bunun da et yumuşaklığını etkileyen varyasyon olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca etlerin gevreklik özelliklerinin tespiti için yapılan duyusal et muayenesi sonucunda GG genotipe sahip hayvanların etinin CG genotipine sahip hayvanlara göre daha gevrek et yapısına yatkın olduklarını tespit etmişlerdir.

Brangus, Angus ve Brahman ırklarından oluşan toplam 64 sığırda yapılan bir çalışmada CAPN1-G316A için CC, CG ve GG genotipleri sırasıyla Angus ırkında 0.0, 0.18 ve 0.82; Brangus ırkında 0.05, 028 ve 0.67; Brahman ırkında 0.0, 0.0 ve 1 olarak bulunmuştur. G allel frekansı ise her üç ırkta sırası ile 0.91, 0.81 ve 1 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen veriler ile paralellik gösteren Soria ve ark'nın yaptıkları çalışmanın verileri ışığında CAPN1 gen polimorfizmlerinin populasyon genetiği çalışmalarında ve fenotipik verilerle ilişkilendirme analizlerinde önemli bir yer tuttuğuna dikkat çekmişlerdir (Soria ve ark. 2010).

Li ve ark. (2013), 5 çeşit sığır ırkı kullanarak yaptıkları çalışmada bir ırk hariç dört ırkta CC genotipine rastlamamış ve tüm ırklarda G allel frekansını yüksek tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın verileri ile parallelik gösteren Li ve ark.'nın çalışmaları sonucunda, etin gevrekliği üzerine pozitif etkisi ile birlikte diğer çalışmalar sonucu bilinen CAPN1'nin 6.gündeki et rengi değerlerinin analizinde istatistiksel düzeyde anlamlı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir.

Fransa'da 3 farklı sığır ırkı kullanılarak yapılan çalışmada CAPN316'nın gen markörlerinin et gevrekliğine etkisini incelemişler ve GG genotipini ve G allel frekansını tüm ırklarda yüksek tespit etmişlerdir. Elde edilen veriler bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Yüksek G allel frekansının Blonde ırkı sığırlarda

kesim gücüne etki ettiğini ancak Limousin ırkı sığırlarda bu etkiyi gözlemlemediklerini belirtmişlerdir (Allais ve ark. 2011).

Chung ve ark. (2014), CAPN geninin et kalitesi üzerine yaptıkları çalışmada Hanwoo ırkı sığırlarda çalışmışlar ve 4558 ve 5709 markörlerinin et kalitesi ile yüksek oranda ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmanın sonucunda sığırlarla yapılan diğer araştırmalarda çok düşük frekansta (0-0.22) tespit edilen C allelini 0.392 olarak bulmuşlardır. Bu nedenle bu analizdeki 5709 C/G markörünün, sığır ırklarında kantitatif özellikler için anlamlılıklar göstermesi sebebi ile ırk özelliklerini ve genetik etkileri ayırt edebilecek belirgin bir nokta olduğu düşünülmektedir.

Bos-indicus ve Bos taurus/bos indicus melez ırklarının kullanıldığı CAPN316 genotiplemesinin yapıldığı çalışmada, CC genotipi tespit edilmemiş ve GG genotipi ise 0.790 ile 1.0 arasında değişim göstermiştir. Tespit edilen veriler mevcut çalışma ile parallelik göstermektedir. CAPN1- G316A polimorfizminin karkas ve et kalitesi özelliklerine etkisinin Bos indicus ve Bos Taurus-Bos Indicus melezlerinde pozitif sonuçlar vermesine rağmen genotipik frekansların yetersiz dağılım göstermesinden dolayı yetiştirme programlarında kullanımının sınırlı olabileceğini bildirmektedir (Curi ve ark. 2010).

Singh ve ark. (2011), keçi CAPN geni genetik varyasyonları incelemek amacıyla Hindistan'da bulunan 7 farklı keçi ırkından (Beetal, Barbari, Ganjam, Black Bengal, Sirohi, Osmanabadi ve Malabari) oluşan 42 adet keçiyle yaptıkları çalışmada ekzon 9 ve ekzon 14'te 4 adet SNP saptamışlardır. Ayrıca keçi CAPN1 geninde Bos taurus sığır ırkıyla karşılaştırdıklarında 34 nükleotid değişikliği saptanmıştır. Bu varyasyonlardan 20 tanesi ekzon 9 ve yakın bölgelerinde bulunmaktadır. 20 varyasyonun 13 tanesi tranzisyon (4 C/T, 3 T/C, 2 G/A, 4 A/G); 7 tanesi ise transversiyondur (3 C/G, 2 G/C, 1 T/A, C/A). Ekzon 14'te ise intron-ekzon sınırında 1 delesyon (C), 1 transversiyon (A/C) ve 12 tranzisyon (7 C/T, 3 T/C, 2 A/G) kaydedilmiştir. Sığır CAPN1 sekansıyla karşılaştırıldığında ekzon 9'da 4 varyasyon tespit edilmiştir. 5709 C/G dışındakiler anlamsız değişkiliklerdir. Pozisyon 5723 (A/G) and 5741 (G/A)'daki nükleotid varyasyonları sırasıyla Histidin'den Arjinin'e (ATG > GTG); Glisin'den Aspartat'a (GGG > GTA) değişim ile sonuçlanmıştır. Tespit edilen 1 adet SNP, SNP 5707, ekzon 9'da C/T tranzisyonuna karşılık gelmektedir. Bu SNP, CANP1 proteininin 6. Pozisyonunda Arjinin-Triptofan değişikliğine neden olmaktadır.

Araştırmacılar çeşitli ülkelere ait yerli keçi ırklarında CAPN1 gen analizleri ile daha önce yapılmış araştırmalardan elde edinilmiş olan sığırların verileri ile kıyaslama yapmışlardır. Sözü geçen çalışmalar, keçi ve sığır arasında CAPN1 geninde, keçi popülasyonunda et kalitesi ve hassasiyetindeki değişimin bir kısmını açıklayabilecek genetik varyasyonun tanımlanması ile sonuçlanmıştır (Singh ve ark. 2012; Costello ve ark. 2007).

Sonuç olarak CAPN ve CAST genlerinin et verimini etkilediği daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Türkiye'ye özgü üç keçi ırkından Kilis, Tiftik ve Kıl ırkındaki dağılımın verim özellikleri açısından fikir verebilmesi için daha fazla sayıda örnek üzerinde araştırma yapılması daha detaylı verilerin ve sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır.

5.3. KORUNMUŞ GEN OLMASI

Kalpain-kalpastatin sistemi, iskelet kasının gelişimi, hayvanların büyüme hızı, protein yıkımının düzenlenmesi gibi fizyolojik olaylarda önemli role sahiptir. Bu sistem, kas hücrelerinde mevcut olan Ca^{+2} bağımlı proteolitik özelliği bulunan μ ve m-kalpain ile kalpain inhibitörü olan CAST proteinini içermektedir. Kaslarda inaktif olarak bulunan kalpainler kesim sonrası kaslarda meydana gelen pH-değeri düşmesi ile aktif hale geçmekte ve miyofibriler proteinlerin yapısında değişikliklere neden olup, etin olgunlaşmasını sağlamaktadır. CAST ise spesifik bir endojen kalpain inhibitörü olup post-mortem koşullarda kas proteinlerinin proteolizinde rol oynayarak et yumuşaklığı düzeyininin oran ve kapsamını regüle etmektedir.

Gabor ve ark. (2009) koyunlarda CAST geni üzerine yaptıkları çalışmada M allel frekansını N allel frekansına oranla önemli ölçüde yüksek bulmuşlar ve bu çalışmadan elde edilen veriler ile paralel bir şekilde çalışmalarında NN genotipini saptamamışlardır. Nasirry ve ark. (2007)'da MM genotipini 0.76 düzeyinde bulmuş ve NN genotipine hiç rastlamamışlardır. Saeed-ul-Hassan Khan ve ark. (2012)'nın çalışmasında belirttiği gibi NN genotipine sahip olmanın canlı ağırlık üzerinde negatif bir etkiye sebep olması ve yapılan birçok çalışma sonucunda hayvanların önemli oranda MM genotipine sahip olmasının NN genotipine karşı gelişen bir seçim olduğu şüphesini doğurmaktadır. Bu araştırmada kullanılan yerli ırk keçilerde CAST geninde MM genotipi oldukça yüksek tespit edilmişken, buna karşın NN genotipine hiç rastlanmamıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar yukarıda bahsedilen üç araştırmanın sonuçları ile paralellik arz etmektedir. Tüm

bu veriler ışığında Türkiye'de bulunan Kıl, Kilis ve Tiftik keçi ırklarında da NN genotipinin tespit edilmemesinin CAST geninin küçük ruminantlarda korunmuş bir gen olabileceği hipotezini desteklemektedir.

CAPN1 geninde bulunan CAPN316 polimorfizmi Guanin (G alleli) nükleotidinin Sitozin (C alleli) nükleotitine değişimi ile oluşmaktadır. Bu durum Kalpain domain II de Alanin aminoasidinin Glisin aminoasidine dönüşümüne neden olmaktadır. Bu durum μ-Kalpainin postmortem miyofibriler degradasyonda değişiklikler ile beraber proteolitik aktivitesinde fonksiyonel değişikliklere neden olabilir. Curi ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada CC genotipinin et yumuşaklığı ile pozitif bir ilişkisinin olabileceğini ileri sürmüştür. Bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak Curi ve ark. (2010) da G allel frekansının C allel frekansına göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ve genotip frekansları açısından incelendiği zaman ise CC genotipine hiç rastlanmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada GG genotipi dikkat çekiçi düzeyde yüksek tespit edilmişken CC genotipi ise çok düşük düzeylerde veya hiç saptanmamıştır. Bu çalışmanın sonuçları Curi ve ark. (2010) bulguları ile paralellik göstermektedir. Her iki çalışmada da CC genotipinin hiç veya çok düşük düzeyde bulunmasının nedeninin CAST geninde de belirtiğimiz gibi bu genin korunmuş olmasından kaynaklanıyor olabileceğini ileri sürebiliriz.

KAYNAKLAR

Adams, N.R. ve Briegel, J.R. (2005). Multiple effects of an additional growth hormone gene in adult sheep. *Journal of Animal Science,* 83, 1868-1874.

Akış, I., Oztabak, K., Esen Gursel, F. ve Ün, C. (2012). Goat agouti polymorphism and its association with goat color in indigenous Turkish goat breeds. *Veterinary Medicine and Zootechnics*, 60, 3-6.

Allais, S., Journaux, L., Leveziel, H., Payet-duprat, N., Raynaud, P., Hocquette, I.F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-capel, C. ve Renand, G. (2011). Effects of polymorphisms in the calpastatin and m-calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of Animal Science*, 89(1), 1-11.

Anonymous. (2002). http//home.earhlink.net/-lureynolds/breeds.html

Arrington, D.D., Terry, R., Vleet, V. ve Schnellmann, R.G. (2006). Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction. *American Journal Physiology Cell Physiology*, 291, C1159-C1171.

Ashwell, M.S., Hayen, D.W., Sonstegard, T.S., Tanssell Van, C.P., Da, Y., Van Raden, P.M. ve ark. (2004). Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health and reproductive traits in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 87, 468-475.

Atay, O., Gökdal, Ö. ve Özuğur, A. K. (2013). Yetiştirici koşullarında Alpin x Kıl keçi melezi (F1), Saanen x Kıl keçi melezi (F1) ve Kıl keçilerin kimi özellikleri. *8. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi*, Çanakkale, 366-372.

Ateş Sönmezoğlu, Ö., Yıldırım, A., Eserkaya Güleç, T. ve Kandemir, N., (2010). Markör Destekli Seleksiyonun Buğday Islahında Kullanımı. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(1), 105-112.

Avanus, K. (2015). Genetic Variability of CAST Gene in Native Sheep Breeds of Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21 (6), 789-794.

Averna, M., Tullio, R.D., Passalacqua, M., Salamini, F., Ponteremoli, S. ve Mellon, E. (2001). Changes in intracellular calpstatin localisation are mediated by reversible phosphorylation. *Biochemical Journal*, 354, 25-30.

Babiker, S.A., El khider, I.A. ve Shafie, S.A. (1990). Chemical composition and quality attributes of goat meat and lamb. *Meat science*, 28, 273-277.

Bakır, G. ve Kaygısız, A. (2003). Guney Anadolu Kırmızısı sığırlarında dünden bugüne yapılan ıslah calışmaları. *Gap 3. Tarım Kongresi,* 02-03 Ekim 2003 Şanlıurfa.

Balcıoğlu, M.S., Karsli, T., Şahin, E., Ulutaş, Z. ve Aksoy, Y. (2014). Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Yerli Koyun Irklarında Kalpastatin (CAST) Geni Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemiyle Belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi.* Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi.

Banik, N.L., Hogan, E.L. ve Powers, L.J. (1982). Degradation of cytoskeletal proteins in spinal cord injury. *Neurochemical Research,* 7, 1465-1475.

Barendse, W., Harrison, B.E., Hawken, R.J., Ferguson, D.M., Thompson, J.M., Thomas, M.B., ve ark. (2007). Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. *Genetics*, 176, 2601–2610.

Benjamin L. (1975): Gene expression.

Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J.S.C., Davis, P.L., Elce, J.S. ve Cygler, M. (1997). Structure of a calpain Ca2+-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca2+-induced conformational changes. *Nature Structural Biology,* 4, 532-538.

Boehlje, M. ve Sonka, S. (1998). Structural realignment in agriculture: How do we analyze and understand it? Food and Agric. *Marketing Consort.*, Park City, UT.

Boehm, M.L., Kendall, T.L., Thompson, V.F. ve Goll, D.E. (1998). Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *Journal of Science*, 76, 2415-2434.

Boyazoglu, J. ve Morand-Fehr P. (2001). Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality. A critical review. *Small ruminant research : the journal of the International Goat Association,* 40(1), 1-11.

Bozhilova-Sakova, M. and Dimitrova, I. (2016). PCR-RFLP Analysis of CAST Gene in one Bulgarian Sheep Breed. *Athens: ATINER'S Conference*. Paper Series, No: AGR2015-1824.

Branca, D. (2004). Calpain-related diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 1098-1104.

Brookes, A. (1999). The Essence of SNPs. *Gene*, 234, 77-186.

Byun, S.O., Zhou, H. ve Hickford, J.G.H. (2009). Haplotypic diversity within the ovine calpastatin (CAST) gene. *Molecular Biotechnology*, 41, 133-137.

Cafe, L.M., Mcintyre, B.L., Robinson, D.L., Geesink, G.H., Barendse, W. ve Greenwood, P.L. (2010). Production and processing studies on calpain system gene markers

for tenderness in Brahman cattle: 1.Growth, efficiency, temperament, and carcass characteristics. *Journal of Animal Science*, 88, 3047-3058.

Carragher, N.O. (2006). Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Current Pharmautical Design*, 12, 615-638.

Casas, E., White, S.N., Riley, D.G., Smith, T.P., Brenneman, R.A., Olson, T.A, Johnson, D.D., Coleman, S.W., Bennett, G.L. ve Chase, C.C. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in Bos indicus cattle. *Journal of Animal Science*, 83 (1),13-19.

Casas, E., White, S.N., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., ve ark. (2006). Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84, 520-525.

Casey, N.H., Van Niekerk, W.A. ve Webb, E.C. (2003). Goat meat. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglass, P. (Eds.), Encyclopaedia of Food Sciences and Nutrition. *Academic Press*, London, pp.2937-2944.

Cemal, İ. ve Karaca, O. (2006). Çiftlik hayvanlarında major genlerin belirlenmesi ve genotip ayrımı. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 (1): 105-115.

Cheeke, P.R. (2004). Contemporary Issues in Animal Agriculture. *3rd ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River*, NJ. Colomer-Rocher, 253-292.

Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M. ve Higuchi, R. (1994). Effective amplification of long tragets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91(12), 5695-5699.

Ching, A.D.A., Caldwell K.S., Jung M. ve ark. (2002). SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetic*, 3, 19.

Choi, B.H., Lee, J.S., Jang, G.W., Lee, H.Y., Lee, J.W., Lee, K.T., Chung, H.Y., Park, H.S., Oh, S.J., Sun, S.S., Myung, K.H., Cheong, I.C. ve Kim, T.H. (2006). Mapping of the porcine calpastatin gene and association study of its variance with economic traits in pigs. *AsianAustralian Jorunal of Animal Sciences*, 19, 1085-1089.

Chu, M.X., Mu, Y.L., Fang, L., Ye, S.C. ve Sun, S.H. (2007). Prolactin Receptor as a Candidate Gene for Prolificacy of Small Tail Han Sheep. *Animal Biotechnology*, 18, 65-73.

Chu, M.X., Yang, J., Feng, T., Cao, G.L., Fang, L., Di, R., Huang, D.W., Tang, Q.Q., Ma, Y.H., Li, K. ve Li, N. (2011). GDF9 as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. *Molecular Biology Reports,* 38(8), 5199-5204.

Chung, E.R., Rhim, T.J. ve Han, S.K. (1996). Associations between PCR-RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in dairy cattle. *Korean Journal of Animal Science,* 38, 321-336.

Chung, H., Shin, S., ve Chung, E. (2014). Effects of genetic variants for the bovine calpain gene on meat tenderness. *Molecular Biology Reports*, 41, 2963–2970.

Cong, J., Goll, D.E., Peterson, A. ve Kapprell, H., (1989). The role of autolysis in activity of the Ca2+-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *Journal of Biological Chemistry*, 264, 10096-103.

Corva, P.M., Soria, L., Villarreal, E.L., Schor, A., Perez C.M., Motter, M., Mezzadra, C., Melucci, L.M., Paván, E., Depetris, G., Miquel, M.C., Santini, F.J. ve Grigera Naón, J.J. (2007). Association of polymorphisms on the *CAPN1* and *CAST* genes with meat tenderness in beef cattle of Argentina. *Genetics and Molecular Biology*, 30 (4), 1064-1069.

Costello, S., O'Doherty, E., Troy, D.J., Ernst, C.W., Kim, K.S., Stapleton, P., Sweeney, T. ve Mullen, A.M. (2007). Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine M. Longissimus Dorsi. Meat *Science,* 75, 551–557.

Cribiu, E. ve Weiss, B. (2013). Goat map Database at: http://dga.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/main.pl?BASE=goat.

Croall, D.E. ve Demartino, G.N. (1991). Calcium activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews,* 71, 813-847.

Curi, R.A., Chardulo, L.A.L., Giusti, J., Silveira, A.C., Martins, C.L. ve De Oliveira, H.N. (2010). Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in Bos indicus and Bos taurus–Bos indicus cross beef cattle. *Meat Science*, 86 (4), 915-920.

Dagong, M.I.A., Herman, R., Sumantri, C., Noor, R.R. ve Yamin, M. (2012). Carcass and physical meat characteristics of thin tail sheep (TTS) based on calpastatin

gene (CAST) (Locus intron 5 – exon 6) genotypes variation. *Journal Ilmu Ternak dan Veteriner,* 17(1), 13-24.

Darcan, N. ve O. Güney. (1996). Farkli Sagim ve Büyütme Uygulamalarinin Koyunlarin Laktasyon Süt Verimi ve Kuzularin Büyüme ve Besideki Performanslari Üzerine Etkileri. *Hayvancilik'96 Ulusal Kongresi,* 18-20 Eylül 1996, 275-279, Izmir.

Dargelos, E., Poussard, S., Brule, C., Daury, L. ve Cottin, P. (2008). Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: A possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie*, 90, 359-368.

Dayton, W.R., Goll, D.E., Zeece, M.G., Robson, R.M. ve Reville, W.J. (1976). A Ca2_-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*, 15, 2150–2158, 1976.

Dhanda, J. S., Taylor, D. G., Murray, P.J., Pegg, R.B. ve Shand, P.J. (2003). Goat Meat Production: Present Status and Future Possibilities, *(Asian-Australasian Jorunal of Animal Sciences*, Vol 16, No. 12, 1842-1852).

Djadid, N.D., Nikmard, M., Zakeri, S. ve Gholizadeh, S. (2011). Characterization of calpastatin gene in Iranian Afshari sheep. *Iran Journal of Biotechnology*, 9(2), 145-149.

Driver, A.M., Huang, W., Gajic, S., Monson, R.L., Rosa, G.J.M ve Khatib, H. (2009). Short communication: effects of the progesterone receptor variants on fertility traits in cattle. *Journal of Dairy Science*, 92, 4082-4085.

Dunner, S., Sevane, N., García, D., Cortés, O., Valentini, A., Williams, J.L., Mangin, B., Canon, J. ve Leveziel, H. (2013). Association of genes involved in carcass and meat quality traits in 15 European bovine breeds. *Livestock Science*, 154 (1), 34-44.

Eijk, M.V., Stewart-Haynes, J.A. ve Lewin, H.A. (1992). Extensive polymorphism of the BOLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*, *23*(6), 483-496.

Elmacı C., ve Öner, Y. (2007). Et sığırcılığımda moleküler genetik yaklaşımlar. *Hayvansal Üretim*, 48 (2), 45-48.

Elyasi-Zaringhabaee G., Shodja, J. ve Nassiry, M.R. (2005). Determination of ovine calpastatin gene polymorphism using PCR-RFLP. *In: Proceedings of the 4th National Biotechnology Conference of Iran*. Iran, 110.

Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Imahori, K. ve Suzuki, K. (1987). Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *PNAS of the United States of America*, 84, 3590-3594.

Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E. ve Valè, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 317-342.

Freeland, J.R. (2005). Molecular Ecology. *John Wiley & Sons Ltd*. ISBN-13 978-0-470-09061-8 (HB).

Gabor, M., Trakovicka, A. ve Miluchova, M. (2009). Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method. *Lucrari Stiintifice Zootehnie si Biotehnologi*, 42(2), 470-476.

Gao, Y., Zhang, R., Hu, X. ve Li, N. (2007). Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. *Meat Science*, 77, 36-45.

Ge, W., Davis, M.E., Hines, H.C., Irvin, K.M. ve Simmen, R.C.M. (2001). Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*, 79, 1757-1762.

Geesink, G.H., Nonneman, D. ve Koohmaraie, M. (1998). An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 356, 19–24.

Gokcen, H. (2000). Turkiye'deki hayvan ıslahı calışmalarının dünü, bugünü ve geleceği. *Performans Dergisi*, 21.

Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W ve Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews*, 83, 731-801.

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. (1996). An introduction to genetic analysis. 6th Ed., *W.H. Freeman and Company*, p. 916, New York.

Grobet L., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Menissier, F., Zanotti, M., Dunner, S. ve Georges, M. (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double muscling in cattle. *Mammalian Genome, 9*, 210-213.

Guroff, G. (1964). A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 149-155.

Gursel, F.E, Akış, I., Durak, A., Mengi, A. Öztabak, K. (2011). Determination of BMP-15, B-1B and GDF-9 gene mutations of the indigeneous sheep breeds in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi dergisi*, 17(5), 725-729.

He, J.N., Zhang, B.Y., Chu, M.X., Wang, P.Q., Feng, T., Cao, G.L., Di, R., Fang, L., Huang, D.W., Tang, Q.Q. ve Li, N. (2012). Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene and its association with litter size in Small Tail Han sheep. *Molecular Biology Reports*, 39, 9801–9807.

Heidari, M., Azari, M.A., Hasani, S., Khanahmadi, A. ve Zerehdaran, S. (2012). Effect of polymorphic variants of GH, Pit-1, and beta-LG genes on milk production of Holstein cows. *Genetika*, 48(4), 503-507.

Hernandez, X., Bodin, L., Chesneau, D., Guillaume, D., Chemineau, P., Malpaux, P. ve Migaud, M. (2005). Relationship between MT1 melatonin receptor gene polymorphism and seasonal hysiological responses in Île-de-France ewes. *Reproduction Nutrition Development*, 45, 151-162.

Hitomi, K., Murase, M., Kawamura, T. ve Maki, M. (2000). Constant expression of mouse calpastatin isoforms during differentiation in myoblast cell line, C2C12. *Cytotechnology*, 33, 63-70.

Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N.J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinori, Y., Linder, T.H., Mashima, H., Schwarz, P., del Bosque-Plata, L., Horikawa, Y., Oda, Y., Yoshiuchi, I., Colilla, S., Polonsky, K.S., Wei, S., Concannon, P., Iwasaki, N., Schulze, J., Baier, L.J., Bogardus, C., Groop, L., Boerwinkle, E., Hanis, C.L. ve Bell, G.I. (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*, 26, 163-175.

Hristova, D., Georgieva, S. Ve Tanchev, S. (2015). Analysis of DNA polymorphism of CAST gene in Local Karnoibat and Stara Zagora sheep breeds. *Agricultural science and technology*, 7(1), 36-39.

Huang, Y. ve Wang, K.K. (2001). The calpain family and human disease. *Trends in Molecular Medicine*, 7, 355-62.

Huff-lonergan, E., Parrish, F.C. ve Robson, R.M. (1995). Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. *Jorunal of Animal Science*, 73, 1064-1073.

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. ve ark. (1990). PCR Protocols: A guide to methods and applications, California, San Diego, *Academic Press Inc*.

Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Saito, Y. ve Kawashima, S. (1989). Properties of erythrocyte membrane binding and autolytic activation of calcium-activated neutral protease. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 18838-18843.

İriadam, M. (2004). Kilis keçilerine ait bazı hematolojik ve biyokimyasal parametreler. *Ankara Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 51, 83-85.

Javanmard, A., Panandam, J.M., Sugnaseelan, S. ve Yusoff, K. (2010). Allele frequencies at six candidate genes associated with growth and carcass quality traits in the Boer goats. *African Journal of Biotechnology*, 9, 7236-7238.

Juszczuk-Kubiak, E., Sakowski, T., Flisikowski, K., Wicinska, K., Oprzadek, J. ve Rosochacki, S.J. (2004). Bovine mucalpain (*CAPN1*) gene: new SNP within intron 14. *Journal of Applied Genetics*, 45(4), 457-460

Juszczuk-Kubiak, E., Wyszyńska-Koko, J., Wicińska, K. ve Rosochacki, S. (2008). A novel polymorphisms in intron 12 of the bovine calpastatin gene. *Molecular biology reports*, 35(1), 29-35.

Juszczuk-Kubiak, E.J., Flisikowski, K., Wicinska, K., Poloszynowicz, J. ve Rosochacki, S. (2009). Identification of the new polymorphisms in the promoter region of the CAST gene in cattle. *Meat Science*, 82, 278-283.

Kania, M.G. (2012). Effect of calpastatin gene polymorphism on lamb growth and muscling. *Annals of Animal Science*, 12(1), 63-72.

Karp, G. (2008). Restriction Endonucleas Technology, Arber, W., Nathans, D., Smith, O. H., Mitchell, P., 7th Ed, *Cell and Moleküler Biology*, Van Hoffmann Press, USA.

Karslı, T ve Balcıoğlu, M.S. (2010). Türkiye'de yetiştirilen altı yerli koyun ırkında BMPR-IB (Booroola) geninde FecB allel varlığının PCR-RFLP yöntemiyle araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 16(6), 1033-1036.

Karslı, T., Şahin, E., Karslı, B.A., Alkan, S. ve Balcıoğlu, M.S. (2012). An investigation of mutations (FecXG, FecXI, FecXH, FecXB) on BMP-15 gene in some local sheep breeds raised in Turkey. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* 25(1), 29-33.

Kashi, Y., Hallerman, E. and Soller, M., (1990). Marker asisted selection of candidate bulls for progeny testing programs. *Animal Science*, 52, 21-31.

Kaya, M. (2005). Bir Kalpain İnhibitörü Olan Ak295'in Nöroprotektif etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Sağlık

Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi, İstanbul.

Kaymakçı, M., ve Aşkın, Y. (1997). Keçi Yetiştiriciliği. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları,* ss. 294, İzmir.

Kaymakçı, M. (2006). Keçi yetiştiriciliği. *İzmir ili damızlık koyun-keçi yetiştiricileri birliği yayınları,* No:2. Bornova-İzmir,Türkiye.

Kesawat, M.S. ve Das, B.K. (2009). Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. *Journal of Crop Science and Biotechnology,* 12 (4),169-181.

Khan, S.H., Riaz, M., Ghaffar, A. ve Khan, M.F.U. (2012). Calpastatin (CAST) Gene Polymorphism and its Association with Average Daily Weight Gain in Balkhi and Kajli Sheep and Beetal Goat Breeds. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(2), 377-382.

Khorchid, A. ve Ikura, M. (2002). How calpain is activated by calcium. *Nature Structural Biology*, 9, 4.

Killefer, J. ve Koohmaraie, M. (1994). Bovine skeletal-muscle calpastatine-cloning, sequence-analysis, and steady-state messenger-RNA expression. *Journal of Science*, 72, 606-614.

Kirton, H. (1988). Characteristics of goat meat, including carcass quality and methods of slaughter. In: Goat Meat Production in Asia. *Proceedings of aWorkshop*, Tando Jam, Pakistan. IDRC, Ottawa, Canada, pp. 87-99.

Klug, W.S. ve Cummings, M.R. (2003). (Çeviri editor: Öner, C.) Genetik Kavramlar.(Altıncı baskı). *Palme Yayıncılık.* ISBN: 0-13-081626-4, 515-517.

Kök, S., Atalay, S., Vapur, G., Soysal, M.İ. (2019). Sığırlarda Kalpain ve Kalpastatin Gen Polimorfizmlerinin Et Tekstürünün İyileştirilmesi Çalışmalarında Kullanımı. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi,* 59 (2), 87-96.

Komisarek, J. ve Dorynek, Z. (2009). Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics*, 50 (2), 125-132.

Koohmaraie, M., (1988). The role of endogenous proteases inmeat tenderness. *Reciprocal Meats Conference*, 41, 89-100.

Koohmaraie, M., Shackelford, S.D. ve Wheeler, T.L. (1996). Effects of a β-adrenergic agonist (L-644,969) and male sex condition on muscle growth and meat quality of callipyge lambs. *Journal Animal Science*, 74, 70-79.

Kumar, P., Choudhary, V., Kumar, K.G., Bhattacharya, T.K., Bhushan, B., Sharma, A. ve Mishra, A. (2006). Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies on IGFBP-3 gene in sheep and its comparison with cattle and buffalo. *Small Ruminant Research*, 64, 285–292.

Lee, J.H., Kannan, G., Eega, K.R., Kouakou, B. ve Getz, W.R. (2008). Nutritional and quality characteristics of meat from goats and lambs finished under identical dietary regime. *Small Ruminant Research*, 74, 255–259.

Lee, S.H., Kim, S.C., Chai, H.H., Cho, S.H., Kim, H.C., Lim, D., Choi, B.H., Dang, C.G., Sharma, A., Gondro, C., Yang, B.S. ve Hong S.K. (2014). Mutations in calpastatin and mucalpain are associated with meat tenderness, flavor and juiciness in Hanwoo (Korean cattle): molecular modeling of the effects of substitutions in the calpastatin/mu-calpain complex. *Meat Science*, 96 (4), 1501-1508.

Legge, A.J. (1996). The beginning of caprine domestication in Southwest Asia D.R.Harris (ed), The Origins and Spread of Agriculture and Pastoralism in Eurasia, *University College London Press*, London, pp. 238-262.

Li, X., Ekerljung, M., Lundstrom, K. ve Lunden, A. (2013). Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. *Meat Science*, 94 (2),153-158.

Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K.W., Carson, M., Jin, L., Yuen, P., Takano, E., Hatanaka, M., Delucas, L.J. ve Narayana, S.V.L. (1997). Crystal structure of a calcium bound domain VI of calpain at 1.9 angstrom resolution and its role in enzyme assembly. *Nature Structural Biology*, 4, 539-547.

Lonergan, S.M., Ernst, C.W. Bishop, M.D., Calkins, C.R. ve Koohmaraie, M. (1995). Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatine locus to calpastatin activity and meat tenderness. *Journal of Science*, 73, 3608-12.

Lüleyap, H.Ü. (2008). Moleküler Genetik Esasları, 1. Baskı, *Nobel Kitabevi*, Adana.

Machugh, D.E. ve Bradley, D.G. (2001). Livestock genetic origins: Goats buck the trend. *PNAS*, 98, 5382-5384

McPherson, M.J. and Møller, S.G. (2001). PCR: The basics from background to bench. *BIOS Scientific Publishers Limited*, 276 p., Oxford.

Mercan, L., (2010). Yerli Tavuk Genotiplerinin Ticari Genotipler İle Olan Genetik Farklılığının SSR Yöntemi ile Analizi. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

Miller, M., Dykes, D.D. ve Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research,* 16, 1215.

Mohammadi, M., Nasiri, M.T.B., Alami-Saeid, K.H., Fayazi, J., Mamoee, M., Sadr, A.S. (2008). Polymorphism of calpastatin gene in Arabic sheep using PCR- RFLP. *African Journal Biotechnology*, 7(15), 2682-2684.

Moldoveanu, T., Hosfield, C.M., Lim, D., Elce, J.S., Jia, Z. ve Davies, P.L. (2002). A Ca2+ switch aligns the active site of calpain. *Cell*, 108: 649–660.

Molinari, M., Anagli, J., ve Carafoli, E. (1994). Ca-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 27992-27995.

Morand-Fehr, P., Boutonnet, J.P., Devendra, C., Dubeuf, J.P., Haenlein, G.F.W., Holst, P., Mowlem, L. ve Capote, J. (2004). Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research*, 51, 175–183.

Moura, A.A., Chapman, D.A. ve Killian, G.J. (2007). Proteins of the accessory sex glands associated with the ocytepenetrating capacity of cauda epididymal sperm from holstein bulls of documented fertility. *Molecular Reproduction and Development,* 74, 214-222.

Murachi, T. (1989). Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem International,* 18, 263–294.

Nassiry, R.M., Shahroudi, F.E., Tahmoorespur, M. ve Javadmanesh, A. (2007). Genetic variability and population structure in Beta- lactoglubuline, Calpastatin and Calpain loci in Iranian Kurdi Sheep. *Pakistan Jorunal of Biological Sciences*, 10(7), 1062-1967.

Naude, R.T. ve Hofmeyr, H.S. (1981). Meat production. In: Goat Production (Ed. C. Gall). *Academic Press,* London. pp. 285- 307.

Norman, G.A. (1991). The potential of meat from goat. In: Developments in Meat Science (Ed. R. A. Lawrie). *Elsevier Applied Science,* London. pp. 57-87.

Öner, C. (2011). Genetik Kavramlar, *Palme Yayınevi*, Ankara.

Oprzadek, J., Flisikowski, K., Zwierzchowski, L. ve Dymnicki, E. (2003). Polymorphisms at *loci* of Leptin (*LEP*), *Pit1* and *STAT5A* and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and White bulls. *Animal Science Paper and Reports,* 21(3): 135-145.

Otsuka, Y. ve Goll, D.E. (1987). Purification of the Ca2+-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca2+-dependent proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5839–5851.

Owen, J.E., Norman, G.A., Philbrooks, C.A. ve Jones, N.S.D. (1978). Studies on the meat production characteristics of Botswana goats and sheep. Part III. Carcass tissue composition and distribution. *Meat Science*, 2, 59-74.

Owen, J.E. Arias Cereceres, M.T., Garcia Macias, J.A., Nunes Gonzalez, F.A. (1983). Studios on the Crioli Goat of Northenr Mexico. Part I. The Effect of Body Weight on Body Components and Carcass Development. *Meat Science,* 9, 191-204.

Özcan, L. (1989). Küçükbaş hayvan yetiştirme I, Keçi üretimi. Çukuorva üniversitesi ziraat fakültesi, zootekni bölümü, ders kitabı, no:111 Adana.

Özdemir, M. ve Doğru, Ü. (2008). Sığırların Verim Özellikleri Üzerine Etkili Önemli Moleküler Markörler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 39 (1), 127-135.

Page, B.T., Casas, E., Heaton, M.P., Cullen, N.G., Hyndman, D.L., Morris, C.A., Crawford, A.M., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., Keele, J.W. ve Smith, T.P. (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphism in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science,* 80, 3077-3085.

Page, B.T., Casas, E., Quaas, R.T., Thallman, R.M., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D. ve ark. (2004). Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science*, 82, 3474–3481.

Palmer, B.R., Roberts N. ve Kent M.P. (1997). A candidate gene approach to animal quality traits. *New Zealand Society of Animal Production,* 57, 294-296.

Palmer, B.R., Roberts, N., Hickford, J.G.H. ve Bickerstaffe, R. (1998). Rapid communication: PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. *Journal of Animal Science*, 76, 1499-1500.

Palmer, B.R., Morton, J.D., Roberts, N., Ilian, M.A. ve Bickerstaffe, R. (1999). Marker-assisted selection for meat quality and the ovine calpastatin gene. *New Zealand.Society of.Animal Production*, 59, 266-268.

Passarge, E. (2001). Color Atlas of Genetics, Second Edition. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, Germany.

Pintos, D. ve Corva, P.M. (2011). Association between molecular markers for beef tenderness and growth traits in Argentinian angus cattle. *Animal Genetics*, 42(3), 329-332.

Porter V. (1996). Goats of the world. *Farming Pres*. Ipswich, UK.

Primrose, S.B. ve Twyman R.M., (2006). Principles of gene manipulation and genomics, 7th edition, Malden, Blackwell, USA.

Pringle, H. (1998). Neolithic agriculture:reading the signs of ancient animal domestication. *Science*, 282, 1448.

Qıan, J. (2008). The calpain protease active site: A target for inhibitor and activity-based probe design, Master, *Queen's University*, Canada.

Rami, A. (2003). Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain calpastatin caspase hypothesis. *Neurobiology of Disease*, 13, 75-88.

Rasmussen, H.B. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCRAmplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis-Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. Gel Electrophoresis - Principles and Basics. Ed. Dr. Sameh Magdeldin. InTech, (http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restrictionfragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te adresinden ulaşılmıştır).

Ray, S.K., Matzella, D.D. ve Wilford, E.L. (2000). Increased calpain expression is associated with apoptosis in rat spinal cord injury:calpain inhibitor provides neuroprotection. *Neurochemical Research*, 25, 1191-1198.

Reardon, W., Mullen, A.M., Sweeney, T. ve Hamill, R.M. (2010). Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine m. longissimus and m. semimembranosus. *Meat Science*, 86, 270-275.

Reece, R.J., (2004). Analysis of Genes and Genomes. *John Wiley & Sons Ltd*, West Sussex, England.

Saez, M.E., Ramirez-Lorca, R., Moron, F.J., ve Ruiz, A. (2006). The therapeutic potential of the calpain family: New aspects, *Drug Discovery*, 11, 19/20.

Şahin, E., Karslı, T., Elmacı, C. ve Balcıoğlu, M.S. (2011). Beta-Lactoglobulin gene types in Turkish fat-tailed sheep breeds. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(6), 1031-1033.

Şahin, Ş., Öner, Y. ve Elmacı, C. (2013). Esmer ve Siyah Alaca ırkı sığırlarda bazı ekonomik özellikler ile ilişkili gen bölgelerinin PCR-RFLP tekniği ile incelenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi,* 19, 235-244.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. ve Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230 (4732), 1350-1354.

Sambrook J. ve Russel D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual: Third Edition, New York, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2229 p.

Sandfort, S. (1982). Institutional and Economic Issues in the Development of Goat and Product Markets. *Proceedings of the Third International Conference Goat Production and Diseasee*. 10-15 January, Tucson, Arizona, USA.

Schenkel, F.S., Miller, S.P., Jiang, Z., Mandell, I.B., Ye, X., Li, H. ve ark. (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84, 291-299.

Schrooten, C., Bovenhuis, H., Coppieters, W. ve Van Arendank, J.A.M. (2000). Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83, 795-806.

Sebsibe, A. (2008). Sheep and goat meat characteristics and quality, in Editör: Yami A, Merkel RC. *Sheep and goat production handbook for Ethiopia*, Chapter:12, P:325- 340. Erişim adresi: www.esgpip.org/handbook/chapter12.html. Erişim tarihi: 20.12.2014

Şengonca, M. (1989). Küçük Baş Hayvan Yetiştirme. *Uludağ Üniversitesi Basımevi*. Uludağ Üni. Güçlendirme Vakfı Yayın No: 27. U.Ü. I.Ġ.B.F., İşletme iktisadi ve Muhasebe Araştırma ve Uygulama Merkezi. No:27, 170 S.

Sevane, N., Armstrong, E., Wiener, P., Pongwong, R., Dunner, S. ve Gemqual, C. (2014). Polymorphisms in twelve candidate genes are associated with growth, muscle

lipid profile and meat quality traits in eleven European cattle breeds. *Molecular Biology Reports*, 41 (7), 4721-4731.

Shahroudi, E.F., Nassiry, M.R., Valizadh, R., Moussavi, A.H., Pour, M.T. ve Ghiasi, H. (2006). Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. *Iranian Jorunal of Biotechnology*, 4(2).

Sheradin, R., Hoffman, L.C. ve Ferreira, A.V. (2003). Meat quality of Boer goat kids and Mutton Merino lambs 2 sensory meat evaluation. *Animal Science*, 76, 73-79.

Sherman, E.L., Nkrumah, J.D., Murdoch, B.M., Li, C., Wang, Z., Fu, A. ve ark. (2009). 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 cattle. *Journal of Animal Sciences*, 86, 1-16.

Shi, Y., Melnikov, V.Y., Schrier, R.W., ve Edelstein, C.L. (2000). Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 279, F509–F517.

Şimşek, Ü.G. ve Bayraktar, M. (2006). Kıl keçisi ve Saanen x kıl keçisi (f1) melezlerine ait büyüme ve ya Ģama gücü özelliklerinin araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20(3), 229-238.

Singh, A., Goering, R.V., Simjee, S., Foley, S.L. ve Zervos, M.J. (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection, *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 512-530.

Singh, L.V., Sharma, R., Pandey, A.K., Maitra, A., Dixit, S.P., Tripathi, V. ve Mishra, B.P. (2011). Identification of four novel single nucleotide polymorphisms of CAPN1 gene in Indian goat. *Indian Journal of Animal Sciences*, 81 (12), 1239–1243.

Singh, L.V., Sharma, R., Pandey, A.K., Tripathi, V., Maitra, A. ve Mishra, B.P. (2012). Genetic variation in CAPN1 gene in Sirohi breed goat. *Indian Journal of Veterinary Research*, Vol.21, No.2, 1-4.

Sönmez, R. (1974). Melezleme yolu ile yerli kıl keçilerinin süt keçisine çevrilme olanakları. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, No:226.

Soria, La., Corva, P., Huguet, M., Miño, S., Miquel, M. (2010). Bovine μ-calpain (CAPN1) gene polymorphisms in Brangus and Brahman bulls. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 21 (1), 61-69.

Sorimachi, H. ve Ono, Y. (2012). Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc Res.,* 96, 11-22.

Spelman, R.J., Ford, C.A., McElhinney, P., Gregory, G.C. ve Snell, R.G. (2002). Characterization of DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science*, 12, 3514-3517.

Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K. ve Bode, W. (2000). The crystal structure of calcium-free human mcalpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 588–592.

Sutikno, Y.M. ve Sumantric, C. (2011). Association of Polymorphisms Calpastatin Gene with Body Weight of Local Sheep in Jonggol, Indonesia. *Media Peternakan*, 34(1), 1-6.

Suzuki, K. (1990). The structure of the calpains and the calpain gene. In: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*, edited by Mellgren RL and Murachi T. Boca Raton, FL: CRC, p. 25-35.

Suzuki, K., (1991). Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomedica biochimica acta*, 50, 483.

Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y. ve Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*. 53, S12-S8.

Tagem, (2009). Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları Tanıtım Kataloğu. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara, 74-81.

Tait, R.G., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., King, D.A, Casas, E., Thallman, R.M., Smith, T.P. ve Benneett, G.L. (2014). mu-Calpain, calpastatin, and growth hormone receptor genetic effects on preweaning performance, carcass quality traits, and residual variance of tenderness in Angus cattle selected to increase minor haplotype and allele frequencies. *Journal of Animal Science*, 92 (2), 456-466.

Tambasco, D.D., Paz, C.C.P., Tambasco-Studart, M.D., Pereira, A.P., Alencar, M.M., Freita, A.R., Coutinho, L.L, Packer, I.U. ve Regitano, L.C.A. (2003). Candidate genes for growth traits inbeef cattle crosses Bos taurus x Bos indicus. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120:51-56.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. ve Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution,* 24, 1596-1599.

Tellam, R.L., Cockett, N.E., Vuacolo, T. ve Bidwell, C.A. (2012). Genes contributing to genetic variation of muscling in sheep. *Frontiers in Genetics,* 3 (164), 1-14.

Temizkan, G. ve Arda, N. (2004). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul, *Nobel Tıp Kitapevleri,* 54-117.

Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C.C.S., Lin,G., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K.W., ve Narayana, S.W.L. (2003). A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain vı of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *Journal of Molecular Biology*, 328, 131-146.

Tompa, P., Mucsi, Z., Orosz, G. ve Friedrich, P. (2002). Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 9022-6.

Tuncel E. ve Bayındır, G. (1983). Türkiye'de keçilerin genetik ıslahı. *Avrupa Zootekni Federasyonu Sempozyumu*, Ankara.

Uerpmann, H.P. (1987). The ancient distribution of ungulate mammals in the Middle East. Dr Ludwig Reichert Verlag, Wiesbaden.

Wang, G., Mahalingan, R. ve Knap, H.T. (1998). (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, Glycine max (L.) Merr. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 1086-1096.

Wang, K.K. ve Yuen, P.W. (1997). Development and therapeutic potential of calpain inhibitors. *Advances in Pharmacology*, 37, 117-152.

Wang, X., Maltecca, C., Tal-Stein, R., Lipkin, E. ve Khatib, H. (2008). Association of bovine fibroblast growth factor 2 (FGF2) gene with milk fat and productive life: an example of the ability of the candidate pathway strategy to identify quantitative trait genes. *Journal of Dairy Science,* 91, 2475-2480.

Warner, R., Greenwood, P., Pethick, D. ve Ferguson, D. (2010). Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Science,* 86 (1), 171-183.

Webb, E.C., Casey, N..H ve Simela, L. (2005) Goat meat quality. *Small Ruminat Research,* 60, 153-166.

Weikard, R., Kühn, C., Boyle, T., Freyer, G. ve Schwerin, M. (2005). The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiological Genomics*, 21, 1-13.

Weller, J.I. (2009). Quantitative trait loci analysis in animals. Modular Texts, Cambridge, USA.

White, B.A. (1993) PCR Protocols: Current methods and applications for DNA amplification, Totowa, New Jersey, *Humana Press*.

White, S.N., Casas, E., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., ve ark. (2005). A newsingle nucleotide polymorphismin CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of Bos indicus, Bos Taurus, and crossbred descent. *Journal of Animal Science*, 83, 2001-2008.

Wu, X.L., MacNeil, M.D., De S. ve Xiao, Q.J. (2005). Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection. *Genetica*, 125, 103-113.

Yalçın, B.C. (1990). Koyun Keçi Hastalıkları ve Yetistiriciligi Kitabı. *TÜM VET Hayvancılık Hizmetleri Yayınları,* 2 (456), Teknografik Matbaası, İstanbul.

Yaralı, E., Atay, O., Gökdal, Ö. ve Kayaardı, S. (2010). Keçi Karkas ve Et Kalitesi. Bildiriler Kitab Editör Doç. Dr. Cengiz ATAOLU Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi iraat Fakültesi Zootekni Bölümü Çanakkale. 2426 Haziran 2010. *Ulusal Keçicilik Kongresi.*2010.

Yeh, F., Yang, R.C. ve Boyle, T. (2000). Popgene (v.1.32) Microsoft Windows-based freeware for Population Genetic Analysis. Retrieved from http://www.ualberta.ca/~fyeh/ Pop32.exe.

Yıldırım, A., (2005). Molecular marker facilitated pyramiding of resistance genes for fungal diseases of wheat. *Workshop on Genomics and Marker Assisted Selection (MAS) in Plant Breeding*, 3-7 Ekim 2005 (Sunulu Bildiri), İzmir.

Yıldız, N. ve Esen, F. (1998). Koyun ve keçi yetiştiriciliği. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Teksiri, No:35.

Yıldız, N., Aygen, S., Ozcelik, M. (2008). Elazığ koşullarında yetiştirilen Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ineklerde sut, dol verimi ve beden olculeri. II. Sut verim ozellikleri, beden olculeri, beden ağırlığı, buzağı doğum ağırlığı ve yaşama gucu. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22, 261-266.

Yilmaz, O., Cemal I., Karaca, O., Ata, N. (2014a). Association of Calpastatin (CAST) Gene Polymorphism with Weaning Weight and Ultrasonic Measurements of Loin

Eye Muscle in Kıvırcık Lambs. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine Kafkas University*, 20, 5, 675-680.

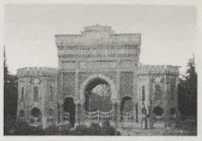
Yilmaz, O., Sezenler, T., Ata, N., Yaman, Y., Cemal, I., Karaca, O. (2014b). Polymorphism of the ovine calpastatin gene in some Turkish sheep breeds. *Turkish Journal Veterinary and Animal Sciences*, 38, 354-357.

Zeder, M.A. ve Hesse, B. (2000). The initial domestication of goats (capra hircus) in the Zagros Mountain 10000 years ago. *Science*, 287, 2254-2257.

Zhou, H., Hickford, J.G. ve Gong, H. (2007). Polymorphism of the ovine calpastatin gene. *Molecular and Cellular Probes*, 21, 242-244.

ETİK KURUL KARARI

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2015/ 54 **01.12.2015**

Sayın Doç. Dr. Feraye ESEN GÜRSEL
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

İlgi: 01.12.2015 tarihli dilekçeniz.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Biyokimya Uzmanı Burhanettin Bahadır KÜÇÜK'e ait "**Türkiye'de bulunan Kilis, Tiftik ve Kıl ırkı keçilerin Kalpain ve Kalpastatin Genlerindeki Mutasyonların İncelenmesi**" başlıklı doktora projenizde, sorumluluğunu Prof.Dr. Ahmet MENGİ'nin üstlendiği Kurulumuzca 07.11.2007 tarih 47 Sayılı kararı ile onaylanmış olan **"Türkiyedeki bazı yerli keçi ırklarının mitokondrial DNA'larının D-loop HVR1 bölgelerinin dizin analizi ile kökenlerinin belirlenmesi"** başlıklı projeden alınan kanlardan izole edilen DNA'ların kullanılması, yukarıda bildirilen onay karar tarihi ve sayısı geçerli olmak üzere uygun bulunmuştur.

Gereği için bilgileriniz rica olunur.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu oda
Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TÜRKİYE'DE BULUNAN KİLİS,TİFTİK VE KIL IRKI KEÇİLERİN KALPAİN VE KALPASTATİN GENLERİNDEKİ MUTASYONLARIN İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%19	%13	%6	%10
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%6
2	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
3	trakyazoder.org İnternet Kaynağı	%1
4	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
5	vetdergi.kafkas.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
6	www.aydindkkyb.org.tr İnternet Kaynağı	%1
7	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	%1
8	zoofed.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Burhanettin Bahadır	**Soyadı**	Küçük
Doğ.Yeri	Rize	**Doğ.Tar.**	09.07.1983
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	59296500602
Email	kucukbaha53@hotmail.com	**Tel**	05340154157

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD	2020
Yük.Lis.	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD	2011
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya ABD	2007
Lise	Rize Anadolu Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Medikal Bilgi Uzmanı	AbbVie Tıbbi İlaç	2015-Halen
2.	Laborant	Centro Laboratuvarları	2012-2013
3.	Laborant	Haşimoğlu Laboratuvarı	2008-2008

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	İyi	İyi		

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Word	İyi
Excel	İyi
Power Point	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap, yürüyüş.