



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AKKARAMAN KOYUN IRKINDA SÜT VERİMİYLE İLİŞKİLİ BAZI MİKRORNA'LARIN İNCELENMESİ

Esra DUMAN

GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. Özge ÖZMEN

ANKARA
2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKKARAMAN KOYUN IRKINDA SÜT VERİMİYLE
İLİŞKİLİ BAZI MİKRORNA'LARIN İNCELENMESİ

Esra DUMAN

GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. Özge ÖZMEN

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
18L0239007 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
2019

ETİK BEYAN

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “.Akkaraman Koyun Irkında Süt Verimiyle İlişkili Bazı miRNA'ların İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Esra DUMAN

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilimdalı'nda Esra DUMAN tarafından hazırlanan AKKARAMAN KOYUN IRKINDA SÜT VERİMİYLE İLİŞKİLİ BAZI MİKRORNA'LARIN İNCELENMESİ adlı tez çalışması jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/ OY ÇOKLUĞU ile KABUL/RED edilmiştir.

TEZ SAVUNMA TARİHİ

JÜRİ BAŞKANI

RAPORTÖR

ÜYE

ÜYE

ÜYE

Tez hakkında alınan jüri kararı , Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Tarafından Onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Akkaraman Koyun Irkı	3
1.2. Meme Anatomisi	4
1.3. Meme Dokusunun Gelişimi ve Süt Sentezi	5
1.4. miRNA Biyogenezi	14
1.5. miRNA'lar ve Süt	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Süt Örneklerinin Toplanması	23
2.2. Süt Örneklerinin Analizi	24
2.3. Somatik Hücre Sayımı	25
2.4. Lactoscan Cihazı ile Süt Kompozisyonunun Belirlenmesi	26
2.5. miRNA Profillemesi	26
2.5.1. RNA Ekstraksiyonu	26
2.5.2. RNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi	28
2.5.3. cDNA Sentezi	28
2.5.4.Referans Gen Seçimi	29
2.5.5. Eş-Zamanlı PZR	29
2.6. İstatistiksel Analiz	33
2.7. Biyoinformatik Analizler	34
2.7.1. Farklı eksprese edilen miRNA'ların hedef gen tahmini	34
2.7.2. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi (Gene Ontology Enrichment Analyses)	36
2.7.3. Hedef genlere ait Protein-Protein İnteraksiyon (PPI) Ağı	36
3. BULGULAR	37
3.1. Gruplarının Özelliklerinin Belirlenmesi	37
3.2. California Mastitis Testi (CMT) ve Somatik Hücre Sayımı (SHS) sonuçları	40
3.3. Lactoscan Sonuçları	41
3.4. Süt Örneklerinden RNA İzolasyonu Sonuçları	42
3.5. Real-Time PZR sonuçları	42
3.6. Biyoinformatik analiz Sonuçları	47
3.6.1. Farklı eksprese edilen miRNA'ların hedef gen tahmini	48
3.6.2. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi (Gene Ontology Enrichment Analysis)	49

4. TARTIŞMA	64
4.1. <i>oar-miR-16b</i>	64
4.2. <i>oar-miR-27a</i>	69
4.3. <i>oar-miR-148-3p</i>	72
4.4. <i>oar-miR-181a</i>	74
4.5. <i>oar-miR-221</i>	75
4.6. <i>oar-miR-152</i>	75
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
ÖZET	79
SUMMARY	80
KAYNAKLAR	81
EKLER	89
Ek-1. Etik Kurul Raporu	89
Ek-2. Şubat ayına ait lactoscan analizi sonuçları	90
Ek-3. Haziran ayına ait lactoscan sonuçları	91
Ek-4. Elde edilen RNA'ların Nanodrop Sonuçları	92
Ek-5. RT-PZR Reaksiyonu Sonucu Örneklerin Ct değerleri	93
Ek-6. CMT (-) sonuç veren koyunların SHS sonuçları	94
Ek-7. <i>oar-miR-485'e</i> ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme grafikleri.	95
ÖZGEÇMİŞ	96

ÖNSÖZ

Türkiye’de koyun yetiştiriciliği önemli bir ekonomik faaliyettir. Akkaraman koyun ırkı ülkemizde yetiştiriciliği yapılan sayıca en fazla popülasyona sahip koyun ırkıdır. Meme dokusu gelişimi süt üretimini etkileyen birincil faktördür. Tamamen farklılaşmış salgı hücrelerine, iyi kan akımı ve dengeli bir bağ dokuya sahip iyi gelişmiş bir meme dokusu yüksek üretim kapasitesine sahip olacaktır. Metabolik yollarla ilişkili olan genler süt verimi ve kompozisyonu gibi ekonomik öneme sahip verimleri direkt olarak etkilemektedir. mikroRNA’lar (miRNA) ise yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda ve tek iplikli RNA molekülleridir ve gen ifadesinde düzenleyici rol oynarlar. Koyun türünde süt verimi ve kompozisyonu ile miRNA’ların ilişkisini inceleyen çalışma sayısı oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada süttten elde edilen dokuz adet miRNA’nın süt verimi yüksek ve düşük olmak üzere iki grup olarak incelenen Akkaraman-Şavak koyununda süt verimi için bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı incelenmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda; koyun türünde ilk kez *oar-miR-16b* ile süt verimi arasında, *oar-miR-27a* ile de süt proteini ve laktoz arasında negatif korelasyon olduğu ortaya konulmuştur.

Bana inanıp güvenerek bu yola adım atmamda etkili olan, doktora sürecimin başından sonuna kadar her aşamasında desteğini esirgemeyen benimle birlikte gece gündüz emek veren, bana güvenip, cesaret verip bu günlere gelmemi sağlayan, danışmanım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Özge ÖZMEN’e sonsuz teşekkür ederim. Tezimde ve doktora sürecimde emeği geçen, saha aşamasında çok büyük destekleri olan Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Selim KUL’a teşekkürü borç bilirim. Projenin yürütülmesine mali destek sağlayan Ankara Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne teşekkür ederim. Çalışma süresince bana kapılarını açan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı’na, Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL’a, Araş. Gör. M. Yenal

AKKURT'a ve ismini yazamadığım sevgili Ankara Veteriner Genetik Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez sürecinde bana olan destekleri, inançları ve sabırları için kızım Defne Ela'ya ve eşim Yakup DUMAN'a, bu günlere gelmemi sağlayan aileme teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Δ	Delta
ABCG2	ATP2'ye bağlanan kaset süperailesi G üyesi 2 geni
ACSL1	Açıl-KoA Sentaz Uzun Zincir Ailesi Üyesi 1
Ago	Argonat
AKT	Protein Kinaz B
Areg	Amphiregulin
BMAL1	Brain and Muscle ARNT-Like 1
C/ERB α	Thyroid hormone reseptör alfha
CCND1	Cyclin D1 Geni
CDK6	Cyclin Dependent Kinase 6
cDNA	Komplementer DNA
Ck1 ϵ	Kazein Kinaz 1 izoform epsilon
CMT	Kalifornya mastitis testi
Cry1	Cyrptochrome 1 Geni
Cry2A	Cyrptochrome 2 A
Ct	Treshold Siklusu
DGAT1	Diaçil Gliserol O-Açıltransferaz
DGRC8	DiGeorge sendrom kritik gölge geni 8
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT1	DNA metil transferaz
EGF	Epitelyal Büyüme Faktörü
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ESR	Östrojen Reseptör
EV	Hücre dışı vezikül

Exp5	Exportin 5
FABP3	Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 3
FASN	Yağ asidi sentaz
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FoxO	Forkhead box O
GH	Growth Hormone
GHR	Büyüme Hormonu Reseptör geni
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
GLUT1	Glikoz Transporter 1
GMEC	Keçi Meme Epitel Hücresi
GTP	Guanozin Tri Fosfat
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HGF	Hepatosit Growth Faktör
HK2	Hekzokinaz 2
IDH1	İzositrat Dehidrogenaz
IGF1	İnsulin Growth Faktör 1
IGF1R	İnsülin Growth Faktör 1 Reseptör
INSIG1	İnsülin İndüklü Gen 1
IRS2	İnsülin Reseptör Substrat 2
LNA	Kilitli Nükleik Asit
lncRNA	Long Non-coding RNA
LSO	Keten Tohumu Yağı
MID	Middle Domain
μl	mikrolitre
miRNA	mikro RNA
mRNA	mesajcı RNA
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
OPN	Opsin reseptör geni
PAZ	Piwi-Argounate-Zwille
Per1	Periyot 1 geni
Per2	Periyot 2 Geni
p-ERK	Phospho- extracellular signal regulated kinase

PI3K-AKT	Phosphoinositide 3-kinase –Protein Kinaz
PIWI	P-element induced Wimpy Testes
PLIN2	perilipin 2
PPARA	Peroksizom Proliferator Active Reseptor Alfa)
PPARGC1A	Peroksizom proliferator-aktive reseptor gamma koaktivator 1-alfa
PPARG γ	Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gama
pre-miRNA	Prekürsör mikro RNA
pri-miRNA	Primer miRNA
PRKAA1	Protein Kinase AMP-Activated Catalytic Subunit Alpha 1
PRL	Prolaktin
PRLR	Protein Reseptörü Benzeri Reseptör
PT	Pars Tuberalis
PTSG2	Prostaglandin endoperoxide synthase 2
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ReV-erba (NR1D1)	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
RISC	RNA indüklü susturucu kompleks
RLC	RISC yükleme kompleksi
RNA Pol II	RNA polimeraz II
RNA Pol III	RNA Polimeraz III
RNA	Ribo nükleik asit
rpm	Revolutions per Minute
SCD	Açıl koA desatüraz
SCN	Suprakiazmatik Nükleus
SFO	Aspir Yağı
SHS	Somatik Hücre Sayısı
siRNA	Small Interfering RNA
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A
TAG	Triaçil Gliserol

tRNA	Taşıyıcı RNA
UCP3	Uncoupling protein 3
UTR	Çevirisi yapılmayan bölge



ŞEKİLLER

Şekil 1.1	Akkaraman-Şavak koyunu	4
Şekil 1.2	Koyunlarda memenin sekretuar bölümlerinin anatomisi	5
Şekil 1.3	Meme gelişimi ve süt sekresyonunun başlamasında görevli hormonlar	8
Şekil 1.4	Meme alveolü ve alveoler epitel hücrelerden süt salgısı yolları	10
Şekil 1.5	Apokrin ve Merokrin Salgılama	11
Şekil 1.6	miRNA biyogenezi	18
Şekil 1.7	Ago proteini domainleri	20
Şekil 2.1	Hayvanları sağılması ve süt örneklerinin toplanması	24
Şekil 2.2	CMT pozitif sonuçta oluşan jelleşme	25
Şekil 2.3	Sütün Fraksiyonları	27
Şekil 2.4	LNA'nın 2' oksijen ve 4' karbon atomlarında bulunan metilen köprüsü yapısı	31
Şekil 2.5	Normalizasyonda kullanılan <i>oar-miR-103</i> 'e ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme grafikleri	33
Şekil 3.1	Süt verimi ölçümü	39
Şekil 3.2	<i>oar-miR-16b</i> , <i>oar-miR-23</i> , <i>oar-miR-27</i> , <i>oar-miR-181</i> , <i>oar-miR-374</i> , <i>oar-miR-152</i> ve <i>oar-miR-221</i> 'e ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme grafikleri	43
Şekil 3.3	Süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasında miRNA ifade seviyeleri karşılaştırması	45
Şekil 3.4	Yüksek ve düşük süt verimli gruplardaki bireylere ait miRNA ifade seviyeleri ısı haritası	46
Şekil 3.5	<i>miR-16</i> 'ya ait miRSystem, TargetScan (<i>Bos taurus</i> ve <i>Homo sapiens</i>) ve Tarbase çevrimiçi veri tabanları tarafından ortak belirlenen genlere ait Venn diagramı	48
Şekil 3.6	<i>miR-27a</i> 'ya ait miRSystem, TargetScan (<i>Bos taurus</i> ve <i>Homo sapiens</i>) ve Tarbase çevrimiçi veri tabanları tarafından ortak belirlenen genlere ait Venn diagramı	49

Şekil 3.7	<i>miR-16b</i> 'ye ait belirlenen 490 adet hedef genin PPI ağı	50
Şekil 3.8	<i>miR-27a</i> 'ye ait belirlenen 490 adet hedef genin PPI ağı	51
Şekil 3.9	<i>miR-16b</i> için belirlenen hub genler. A) 20 adet gen içeren birinci modüle ait PPI ağı. B) 60 adet gen içeren ikinci modüle ait PPI ağı	52
Şekil 3.10	<i>miR-27a</i> için belirlenen hub genler. A) 10 adet gen içeren birinci modüle ait PPI ağı. B) 18 adet gen içeren ikinci modüle ait PPI ağı	52
Şekil 3.11	<i>mir16b</i> -Modül 1 de bulunan 20 adet gene ait Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hücresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucu	60
Şekil 3.12	<i>mir16b</i> -Modül 1 de bulunan 20 adet gene ait hedef miRNA tahmin ve Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hücresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucuna ait grafik	60
Şekil 3.13	<i>mir16b</i> -Modül 2 de bulunan 60 adet gene ait Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hücresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucu	61
Şekil 3.14	<i>mir16b</i> -Modül 2 de bulunan 60 adet gene ait hedef miRNA tahmin ve Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hücresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucuna ait grafik	61
Şekil 3.15	<i>mir-27a</i> -Modül 1 de bulunan 10 adet gene ait Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hücresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucu	62
Şekil 3.16	<i>mir-27a</i> -Modül 2 de bulunan 18 adet gene ait Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hücresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucu	63
Şekil 3.17	<i>mir-27a</i> -Modül 2 de bulunan 18 adet gene ait ait hedef miRNA tahmini ve KEGG yolak analizine ait tahminleme grafiği	63

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1	İnek, koyun ve keçi türlerine ait yaklaşık süt kompozisyonu değerleri	13
Çizelge 1.2	İnek, koyun ve keçi türlerine ait yaklaşık vitamin ve mineral içerikleri	14
Çizelge 2.1	cDNA sentez miksi	29
Çizelge 2.2	Çalışmada analiz edilen miRNA'lar ve miRbase erişim numaraları	30
Çizelge 2.3	Eş Zamanlı PZR Reaksiyon Miksi	32
Çizelge 2.4	Çalışılan miRNA'ların homoloji gösteren baz dizileri ve miRBase erişim numaraları	35
Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan koyunlara ait Şubat ayı süt verimleri	38
Çizelge 3.2	Süt verimi yüksek ve süt verimi düşük grubun şubat ayına ait süt verimlerinin karşılaştırılması	39
Çizelge 3.3	SHS ve Gruplar arasında anlamlı farklılık karşılaştırılmasıSHS ve Gruplar arasında anlamlı farklılık karşılaştırması	41
Çizelge 3.4	Şubat-Haziran ayları süt kompozisyonundaki anlamlı farklılıklar	42
Çizelge 3.5	Süt verimi yüksek ve süt verimi düşük gruplara ait miRNA'ların kat değişim değerleri (Fold change)	45
Çizelge 3.6	miRNA'ların gruplar arası anlamlılık düzeyleri	46
Çizelge 3.7	Süt Kompozisyonu açısından süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar	47
Çizelge 3.8	Yüksek süt verimli grupta oar-miR-27a ile protein ve laktoz, oar-miR-16b ile süt verimi korelasyonu	47
Çizelge 3.9	<i>miR-16b</i> ve <i>miR-27a</i> için belirlenen “hub” genlerin listesi	53
Çizelge 3.10	<i>miR-16b</i> modül 1'e ait 20 adet genin KEGG yolak analiz sonucu	56
Çizelge 3.11	<i>miR-16b</i> modül 2'ye ait 60 adet genin KEGG yolak analiz sonucu	57

Çizelge 3.12	<i>miR-27a</i> modül 1'e ait 10 adet genin KEGG yolak analiz sonucu	58
Çizelge 3.13	<i>miR-27a</i> modül 2'e ait 18 adet genin KEGG yolak analiz sonucu	59



1. GİRİŞ

Zengin mineral içeriği, yüksek protein oranı ve fonksiyonel biyoaktif peptidler açısından iyi bir biyolojik kaynak olması nedeniyle uluslararası pazarda koyun sütüne olan talep giderek artmaktadır. Dünya’da koyun varlığı 1 202 milyon baş olup bu sayının 246 milyonluk kısmını (yaklaşık yüzde yirmi bir) sağılan koyunlar oluşturmaktadır. Dünyada toplam koyun sütü üretimi 10,42 milyon ton iken Türkiye yıllık 1 101 013 ton koyun sütü üretimi ile Dünya’da Çin’den sonra ikinci sırada yer alır (Mohapatra ve ark., 2019). Koyun sütü yüksek yağ ve protein oranına sahip olması nedeniyle önemli bir besin kaynağıdır. Türkiye’de koyun yetiştiriciliği önemli bir ekonomik faaliyettir. Türkiye 2018 yılı Haziran sayımlarına göre, 35 194 972 baş koyun varlığına sahiptir (TUİK, 2018). Akkaraman Türkiye'nin yerli bir ırkıdır. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesi ile Akdeniz ve Karadeniz’in iç kısımlarında yetiştirilir. Kangal varyetesi Sivas bölgesi ve Malatya çevresinde Karakaş varyetesi Diyarbakır’da yetiştirilir. Elazığ bölgesinde ise Şavak adı verilen varyetesi bulunmaktadır (Özmen ve ark., 2020). Akkaraman ırkı koyun popülasyonu varlığı ülkemizde birinci sırada (%45) bulunmaktadır. Türkiye’de yetiştirilen yerli koyun ırkları genelde düşük kombine verimli olup yetiştiriciler bunların birçok veriminden yararlanmaktadır. Akkaraman koyun ırkı elverişsiz çevre şartlarına ve hastalıklara karşı dayanıklı bir ırktır. Yeterli olmayan bakım ve besleme koşullarına dayanıklıdır, değişken iklim koşullarında yaşama gücü yüksektir. Kuyruğu yağlı ırklar grubunda olması nedeniyle beslemede yetersiz koşullar olduğunda dahi yaşama gücü yüksektir. Uysal yapısı nedeniyle idare ve sevki kolaydır. Fakir mera şartlarında beslenme ve aldığı besini verime çevirme yeteneği iyidir (Akçapınar, 2000).

Süt, lökosit hücreleri ve epitel hücrelerin oluşturduğu somatik hücreleri içerir. Sütün içinde bulunan somatik hücrelerin sayısı ile sütün kalitesi ve meme dokusunun sağlık durumu (inflamasyon, mastitis gibi) hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Meme bezindeki gen ifadesi ise sütte bulunan bu somatik hücrelerden elde edilebilen total RNA tayini ile mümkündür (Sarıkaya, 2006). Süt, meme dokusu sağlığı, süt kalitesi ve verimi, mastitis gibi meme dokusu ve süt verimini etkileyen bazı

hastalıklara direnç konularının moleküler düzeyde incelenmesinde invaziv işlemler gerekmeksizin elde edilebilen önemli bir kaynaktır (Özkan ve ark., 2016).

Laktasyon; beslenme, besinlerin absorpsiyonu ve transportu, kan glikoz seviyesi, meme dokusu, karaciğer ve yağ dokudaki hücre aktivitesi, salgı hücrelerindeki protein ve yağ sentezi, yağ asidi ve karbonhidrat yapımındaki metabolik ve düzenleyici yollar, genetik ve epigenetik mekanizmalar gibi birçok faktörün etkileşimi ve denetimi ile gerçekleşen dinamik bir süreçtir (Strucken ve ark., 2015).

Laktasyon süresi koyunlarda ırklara göre farklılık göstermektedir. Yerli ırk koyunlarda 3-5 ay, etçi koyun ırklarında 3-4 ay ve sütçü koyun ırklarında ise 7-8 ay kadardır. Laktasyonun başlangıcında süt verimi düşüktür, zamanla artar ve yine süresi ırklara göre değişken olmakla birlikte pik yaparak laktasyonun sonlarına doğru tekrar azalır. Laktasyon piki kuyruğu yağlı olan ırklarda laktasyonun ortalama 60.-70. günlerinde olurken, süt verimi yüksek sütçü ırklarda daha erkendir ve ortalama 30.-40. günlere denk gelir (Akçapınar ve ark., 1982).

Meme dokusu gelişimi süt üretimini etkileyen birincil faktördür. Tamamen farklılaşmış salgı hücrelerine, iyi kan akımı ve dengeli bir bağ dokuya sahip iyi gelişmiş bir meme dokusu yüksek üretim kapasitesine sahip olacaktır. Metabolik yollarla ilişkili olan genler süt verimi ve kompozisyonu gibi ekonomik öneme sahip verimleri direkt olarak etkilemektedir (Strucken ve ark., 2015). *DGAT1* (Diacylglycerol O-acyltransferase 1), *ABCG2* (ATP-binding cassette sub-family G member 2), *OPN* (Opsin receptor), *GHR* (Growth hormone receptor), *FASN* (Fatty acid synthase) ve *SCD* (Acyl-CoA desaturase) genleri; genom boyu ilişkilendirme çalışmaları, fonksiyonel genomik ve karşılaştırmalı genomik analizler sonucunda süt yağ verimini etkileyen aday genler veya genetik belirteçler olarak belirtilmiştir (Shen ve ark., 2016). Ancak bu genlerin; mikroRNA'lar (miRNA) gibi farklı genetik mekanizmalar ile ifadeleri kontrol edilmektedir.

miRNA'lar yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda ve tek iplikli RNA molekülleridir, gen ifadesinde düzenleyici rol oynar. miRNA'lar DNA'dan

transkripsiyonu yapılan ancak proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar yani kodlanmayan RNA'lardandır. İlk defa Lee ve ark. (1993), tarafından *C.elegans*'ta keşfedilmişlerdir. miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmen bağlanarak, bağlandıkları mRNA'ların protein üretimini baskırlar ya da hedef mRNA'ları degrade ederek gen ifadesini durdururlar (Guttman ve ark., 2009). 1993 yılında ilk miRNA *lin-4* keşfinden bu yana, insan, fare, çiftlik hayvanları ve bitkilerde binlerce miRNA'nın belirlenmesine ve miRNA veritabanlarında depolanmasına yol açmıştır. Çiftlik hayvanlarında yapılan çalışmalar birçok miRNA'nın doku ve tür spesifik olduğunu ve bu miRNA'ların belirlenmesinin biyolojik süreçlerde önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (Liu ve ark., 2009).

1.1. Akkaraman Koyun Irkı

Akkaraman koyun ırkının yayılma alanı iç-batı Anadolu şehirlerinden Kütahya ve Eskişehir'den başlar Sivas gibi İç Anadolu şehirlerine kadar uzanır. Türkiye yerli koyun ırkları arasında en yüksek popülasyona sahip koyun ırkıdır (Kaymakçı ve ark., 2001). Akkaraman koyun ırkının Kangal, Karakaş ve Şavak olmak üzere üç varyetesi bulunur. Kangal tipi Sivas başta olmak üzere İç Anadolu bölgesinde yaygın bulunur ve yetiştiricilik amacı et verimidir, Karakaş tipi ise Diyarbakır başta olmak üzere Doğu Anadolu illerinde yaygındır ve süt verimi amaçlı yetiştirilir. Bu iki varyetenin dışında bir de Elazığ yöresinde Şavak-Akkaraman olarak bilinen Akkaraman varyetesi bulunur. Sütünden üretilen Şavak tulum peyniri bu varyetenin önemini arttırmaktadır (Özmen ve ark., 2020).

Akkaraman koyun ırkı, yerli ırk koyunlarımız arasında iri yapılı olarak adlandırılır ve kuyruğu yağlıdır. Kuyruğun üzerinde bulunan 'S' şeklindeki kıvrım Akkaraman ırkına özgü bir ırk özelliğidir. Kulak yapısı uzun ve sarkıktır. Sağlam ve uzun bacak yapısına sahiptir. Koyunlarda boynuz bulunmaz. Vücudu örten yapağının rengi beyazdır, gözlerin etrafında ve ayakların üzerinde değişken oranda siyah lekeler bulunabilir (Şekil 1.1) (TAGEM, 2009).



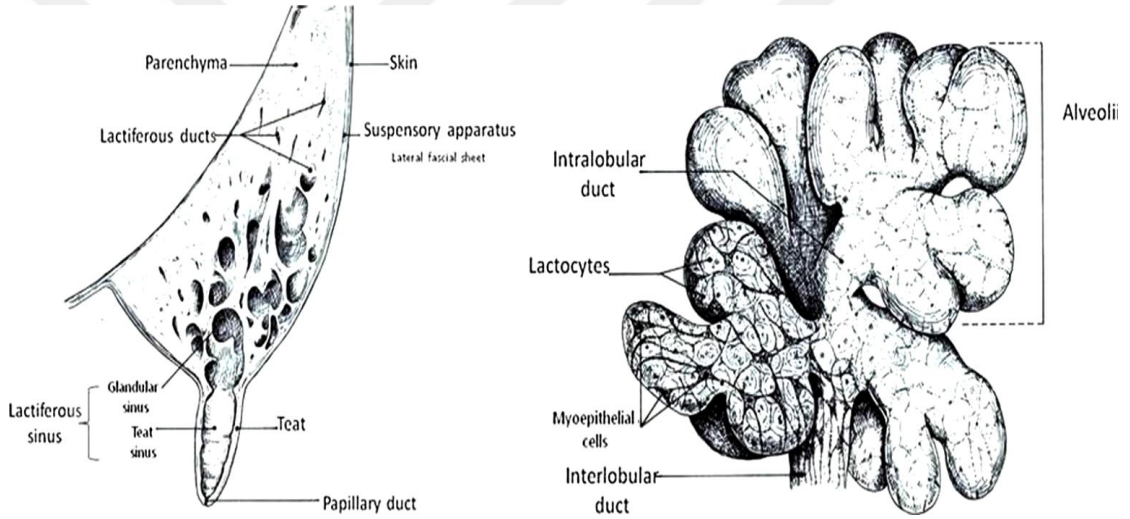
Şekil 1.1. Akkaraman-Şavak Koyunu (Özmen ve ark., 2020).

Süt veriminin ön planda olduğu ve sütçü sürülerin kullanıldığı yetiştiricilik alanlarında damızlık hayvanların seçiminde seçilecek hayvanın süt verimi özelliklerinin önemi artar. Süt veriminin kriter olarak değerlendirilebilmesi için sütün miktarını ve bileşimini etkileyen faktörlerin bilinmesinin yanında bu faktörler üzerine etkili genetik farklılıklara neden olan mekanizmalara ilişkin bilgilerin de elde edilmesi gerekir. Koyun varlığımızın yaklaşık %47'si ile en büyük paya sahip olan Akkaraman koyun ırkı ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda laktasyon süresi, laktasyon süt verimi ve günlük ortalama süt verimleri sırasıyla 155.9 gün, 84,71 ml ve 529,6 ml olarak bildirilmektedir (Karaca, 2002).

1.2. Meme Anatomisi

Küçük ruminantlarda (koyun ve keçi) meme inguinal bölgede, ventral çizginin her iki tarafında iki ayrı meme dokusu şeklinde bulunur. Meme bezleri fibroelastik konnektif doku (apparatus suspensorius mammarum) ile çevrilidir ve birbirinden bu yapı ile ayrılarak bağ doku duvarına (Ligamentum suspensorium uber) bağlanır. Bu ligament ile iki meme dokusu arasında meme oluğu (sulcus intermammarius) oluşur ve aynı zamanda abdominal duvara sıkıca bağlanırlar. Her bir meme, yarısı büyük bir

sarnıçla (sinus lactiferus) tipik tubulo-alveoler yapıya sahiptir ve glandüler sarnıç (sinus lactiferus pars glandularis), meme başı sarnıcı (sinus lactiferus pars papillaris) olmak üzere iki anatomik yapıya ayrılmış durumdadır. Sinus lactiferusun pars glandularisi ve pars papillaris biribirinden düz kas hücrelerinden oluşan fiberler ile ayrılır ve bu yapı sütün drenajı için önemlidir. Aynı zamanda bu yapı makineli sağıım sırasında meme bezini iki yarıya ayırarak sütün tekrar yukarı tırmanmasını önler. Meme bezi sisteminin boyutu ve şekli ırka göre ve koyunun süt verim kabiliyetine göre değişir. Yüksek süt verimli olanlarda daha gelişmiş ve daha lobüler bir yapı gösterir. Düz kas hücrelerinden oluşan bir başka sfinkter ductus papillaris'te bulunur, memenin distal kısmında tek bir delik ile dışarı açılır (Şekil 1.2) (Pourlis, 2019).



Şekil 1.2 Koyunlarda memenin sekretuar bölümlerinin anatomisi (Pourlis, 2019).

1.3 Meme Dokusunun Gelişimi ve Süt Sentezi

Meme bezi embriyonik, pubertal ve reproduktif olmak üzere üç ana basamakta gelişir (Marcias ve Hinck, 2012). Embriyonik dönemde epitelyal ve çevreleyici kompartmanlar olmak üzere iki hücresel kompartman bulunur. Bu dokular embriyonik olarak ektoderm ve mezodermden köken alırlar. Fonksiyonel meme dokusu oluşturmak üzere hücre farklılaşması fetal gelişimin çok erken evrelerinde başlar. İlk fark edilebilir yapı ektodermden köken alan tek katlı kübik epitelyum

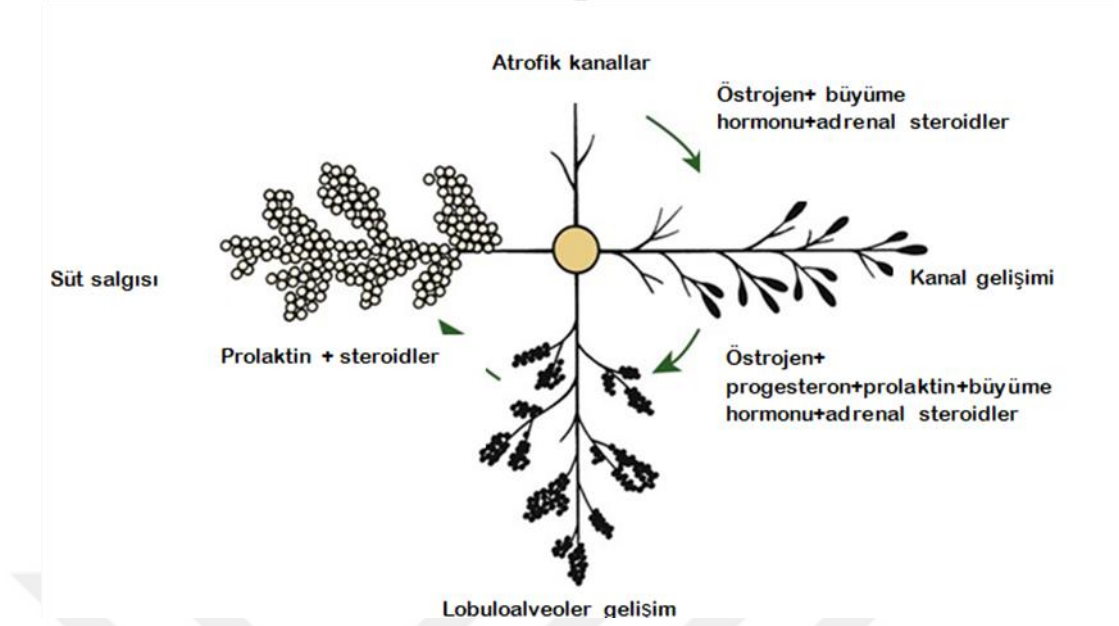
tabakasıdır. Bu tabaka daha sonra bazal mezenkim dokusunu şekillendirir. Ekdodermiden yükselen bu alan inguinal bölgede orta çizginin iki tarafında da şekillenir ve “meme bandı” olarak adlandırılır (Tuner, 1952).

Meme çizgisi (süt çizgisi) ya da kabartısı epitel hücre sıkılaşması olarak ortaya çıkmaya başlar. Meme çizgisinin küre şeklinde lokalize epitel hücre kümeleri şeklinde farklılaşması üç aşamada gerçekleşir. İlki meme tacı olarak adlandırılan deri germinal epitelyumundan meme çizgisi boyunca belirli lokalize bölgelerde proliferasyon şekillenmesidir. Bu yapı hızlı şekilde meme kabartısına dönüşür. Meme kabartısında daha sonra meme küresini oluşturur ve alttaki mezenkimal yapıya penetre olur. Bu kabartı meme tomurcuğu olarak adlandırılır ve ortalama gebeliğin 36-46. günlerine denk gelir. Meme tomurcuğu tüm meme bezlerinin şekillendiği yapıdır ve sayısı hayvan türlerine özgü olarak değişmektedir (Jenkinson ve ark, 2013). Ruminantlarda bir (koyun ve keçi) veya iki (inek) çift olarak inguinal bölgeye yerleşir ve meme ucu sayısını belirler. Koyunlarda bir çift meme tomurcuğundan 2 adet meme başı şekillenir (Turner, 1952).

Doğum sonrası dönemde meme bezi sadece rudimenter duktal sistemden oluşurken henüz süt üretim kabiliyeti yoktur. Endokrin hormonların etkisi altında meme bezi pubertaya kadar tüm vücutla birlikte allometrik bir büyüme aşamasına girer. Terminal Son Tomurcukları (TEB, Terminal End But) lobut şeklinde gelişen duktusların ucunda bulunan ve yağ yastığına penetre yapılardır. Primer duktal yapılar TEB’in dallanmaya uğramasıyla oluşur ve çevre bağ doku tarafından düzenlenirler. TEB’deki örtücü hücreler daha sonra myoepitel hücrelere farklılaşarak çift sıralı tubuler duktal yapıyı oluştururlar. Sekonder dallar gebelik hormonlarının etkisiyle primer duktuslardan filizlenerek ağaç benzeri bir yapı şekillendirirler. Siklik ovaryan stimülasyon altında kısa üçüncü dallar şekillenirken süt salgısı yapabilen tüm alveoler yapı ancak gebelik hormonlarının başlamasıyla oluşur. Gebelik ve laktasyon eşliğinde meme ağacında büyük değişiklikler oluşur. Meme dokusunun laktasyona hazır olması için bir dizi değişim geçirmesi gereklidir. Bu değişiklikler primer olarak progesteron ve *PRL* (Prolaktin) hormonlarının etkisi altında şekillenen

meme bezi maturasyonu ve alveologenezdir. Gebeliğin sebep olduğu ilk değişim sekonder ve tersiyer duktal dallanmalardaki büyük artıştır (Jenkinson ve ark., 2013).

Hormonlar puberta, gebelik ve laktasyon dönemlerinde meme bezi gelişimi, süt salgısı ve süt kompozisyonunu düzenlerler (Şekil 1.3). Lokal hücre büyümesini pubertal dönemde östrojen yönetir. Östrojen, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (*IGF1*) ile birlikte hareket ederek ductal morfogenezi düzenler. Hücre içi östrojen reseptörlerinin iki formu vardır; *ESR1* (Östrojen Reseptör 1) ve *ESR2* (Östrojen Reseptör 2). *ESR1* duktal morfogenezi düzenleyen ana reseptördür ve gen ifadesi susturulmuş farelerde yapılan deneylerde fenotipte gözlemlenen gelişimsel defektler ile ispatlanmıştır, *ESR1* ve *IGF1* geni susturulan farelerde rudimenter ductal sistem gelişmemiştir. Büyüme faktörleri ise duktal dallanma yapısını belirler. Epitelyal Büyüme Faktörü (*EGF*) ve Fibroblast Büyüme Faktörü (*FGF*) üyeleri Tirozin Kinaz reseptörleri üzerinden meme dokusu duktal morfogenezi etkiler. Progesteronun alveologenez üzerine de kritik etkileri vardır (Marcias ve Hinc, 2012). İnsülin, insülin benzeri büyüme faktörü, tiroid hormonu, paratiroid hormonu, oksitosin, plasental laktojen ve glikokortikoidler, ruminantlar ve rodentlerde süt protein ifadesini etkileyen hormonlardır. İnsülin'in STAT5A (Signal transducer and activator of transcription 5A) aktivasyonu üzerine çok güçlü pozitif etkisinin olduğu bildirilmektedir (Bionaz ve ark., 2012).



Şekil 1.3. Meme gelişimi ve süt salgısının başlamasında görevli hormonlar (Austin ve Short, 1958'den Türkçeleştirilmiştir).

Yavrular süten kesildikten sonra involusyon fazına giren meme dokusu gerileyerek alveoler yapının çoğunu kaybeder. Her gebelik tekrar lobulo-alveoler farklılaşmayı başlatır. Bu morfolojik değişimler birçok kez hücre farklılaşması, çoğalması ve dokuların yeniden şekillenmesi döngüsü gerektirir. Tüm bu döngüler embriyonik gelişim ve metastatik yapılarda da benzer olduğundan meme dokusu bu alanlardaki çalışmalar için de iyi bir model oluşturur (Galio ve ark., 2013).

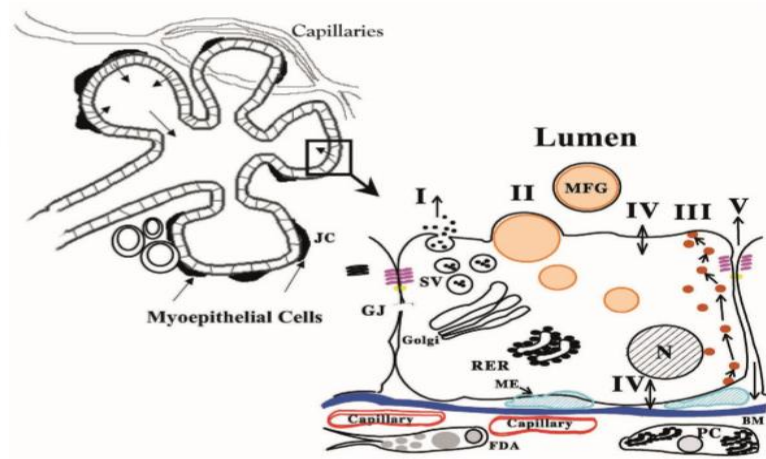
Meme bezinin üretkenliği; beslenme, genetik ve epigenetik faktörlerin etkisi altındadır. Meme bezinin gelişimi ile süten sentez ve salgılanması ise laktasyon süreci ile ilişkilidir. Dinamik bir süreç olan laktasyon, her evresinde; bakım, besleme, sağlık ve moleküler mekanizmalar gibi faktörlerin etkisi altındadır (Do ve ark., 2017b).

Bu açıdan laktasyon ve kuru dönem arasında gerek morfolojik gerekse moleküler düzeyde bir takım farklılıklar görülmektedir (Li ve ark., 2012). Moleküler

düzeyde görülen farklılıklar; genetik ve epigenetik değişimler sonucu oluşmaktadır (Do ve ark., 2017b).

Laktogenez süt salgısının başlaması olarak tanımlanabilir (Cowie ve ark., 2011). Linzell ve Peaker (1971)'a göre bu fizyolojik süreç iki aşamaya ayrılabilir. İlk aşama gebelik sırasında meme bezinin az miktarda kazein ve laktoz gibi özgün süt bileşenlerini yeterince salgılamak üzere farklılaşmasından oluşur. İkinci aşama doğumla bağlantılı olarak bol miktarda süt salgısının olduğu dönem olarak tanımlanabilir (Lerias, 2014).

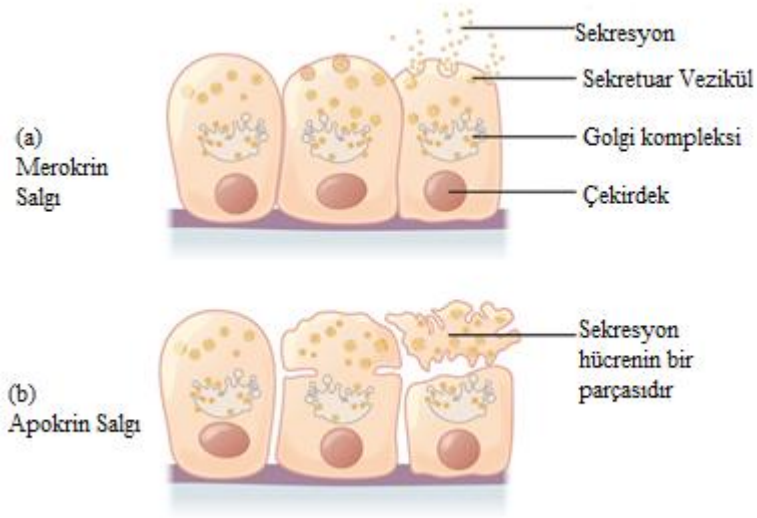
Alveoler epitel hücreler tarafından salgılanan süt, lümene geçerek alveoler ve duktal epitel hücreleri çevreleyen myoepitel hücrelerin kasılmasıyla kanallar boyunca iletilir. Alveoller iyi gelişmiş vasküler yapıya ve hücre dışı matriks, fibroblastlar ve adipositleri de içeren stromal bir yapıya sahiptir. Süt bileşenlerinin sütün sıvı fazıyla buluşmasında beş yolak işlev görür. Birinci yolak; süt proteini, laktoz, kalsiyum ve diğer bileşenlerin eksostoz yolu ile sütün sıvı fazına ulaşmasıdır. İkinci yolak apikal membrana hareket ederek membrana bağlı süt yağ globülü olarak yağ damlacıkları şeklinde süt yağı salgısıdır. Üçüncü yolak immunoglobülinler gibi proteinlerin hücreler arası boşluğa veziküler transsitozudur. Bir diğer yolak ise iyonlar, su ve glukozun apikal ve bazal membrandan hücreye direkt transportla geçişidir. Son olarak plazma bileşenlerinin ve lökositlerin hücreler arası yol ile geçmesidir ki bu yolak sadece gebelik, involusyon ve mastitis gibi inflamatuvar durumlarda açıktır (Şekil 1.4) (McManaman ve Neville, 2003).



Şekil 1.4. Meme alveolü ve alveoler epitel hücrelerden süt salgısı yolları (Kısaltmalar: SV, sekretuar vezikül RER, düz endoplasmik retikulum; BM, bazal membran N, nukleus; PC, plazma hücresi ; FDA, fat depleted adiposit; GJ, gap junction; ME, myoepithelial hücre (McManaman ve Neville, 2003).

Koyunlarda meme bezinin süt üretim kabiliyeti süt salgılayan hücrelerin sayısı ve aktivite düzeyine bağlıdır. Laktasyon periyodu sırasında hücre sayılarında değişimler meydana gelir. Erken ve orta laktasyon döneminde alveollerin sayısında, şeklinde ve farklılaşmasında artış şekillenirken, epitelyum hücrelerde kolumnar yapı ve sekretuar veziküller artar. Süt üretiminde laktasyon pik dönemi sonrası düşüş, süt salgılayan hücrelerin sayıca büyük oranda azalmasıyla oluşur. Bu azalma ya apoptozis ile ya da sütün ejeksiyonu sırasında yıpranma sonucu oluşur (Pourlis, 2019).

Koyun, keçi ve sığır türlerinin süt salgısında önemli bir farklılıkta sütün bezlerden salgılanma şeklidir. Vücutta bulunan tüm bezler salgılarını üç şekilde yaparlar; apokrin, merokrin veya holokrin salgılama. Apokrin sistemle salgı yapan bezler hücre zarının ve stoplazmanın da bir kısmını kaybederlerken, merokrin salgıda böyle bir durum yoktur (Şekil 1.5a ve b). Keçi, koyun ve insanlarda süt bezleri apokrin salgı yaparken ineklerde merokrin salgı türü görülür. Bu nedenle koyun ve keçilerde SHS (Somatik Hücre Sayısı) ineklerden daha yüksektir (Caldwell, 2014).



Şekil 1.5. Apokrin ve Merokrin Salgılama a. Apokrin b. Merokrin salgılama (Anonim, 2019).

Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır. Mevsime bağımlı olarak gerçekleşen bu reproduksiyon döngüsü Melatonin hormonunun kontrolü altında gerçekleşir. Melatonin seviyesindeki mevsimsel değişimler biyolojik saate bağlıdır ve hayvanın mevsimsel üretkenliğinde anahtar sinyallerdir. Koyunlarda mevsimsellik, mevsim ve gün uzunluğu ile bağlantılı olarak endojen ritim şeklinde reproduktif döngüyü şekillendirir ve bu döngü genetik olarak kodlanır. Hipofiz bezindeki suprakiazmatik nükleus (SCN) ve Pars Tuberalis (PT) *Bmal1* (Brain and muscle ARNTL like 1), *Clock*, *PER1* (Periyot 1), *PER2* (Periyot 2), *CRY1* (Cryptochrome 1), *CRY2A* (Cryptochrome 2A), *ReV- ERBa* (Nücleer receptor subfamiliy 1, grup d, member 1) ve *CK1ε* (*Kazein kinaz izoform epsilon*) gibi sirkadyan ritim genleri tarafından düzenlenir. 24 saatin üzerinde Melatonin profilindeki değişim bu genlerin ifadesini değiştirerek PT ve SCN2'deki biyolojik saat genlerine ait mRNA'ların seviyesini değiştirir. Koyunlarda Melatonin ve Prolaktin profillerindeki değişim birbiriyle bağlantılı bulunmuştur. Prolaktin salgısının Melatonin tarafından düzenlenmesi iki mekanizma ile gerçekleşir. Sirkadyan ritim mekanizmasında Melatonin, *PRL* ifadesini doğrudan etkileyebilir. Bu seçenek laktotropik hücrelerde hormonun depolanmasına sebep olur. Aksi durumda da Prolaktin salgısı doğrudan Melatonin tarafından inhibe edilebilir. Prolaktin sentezi anterior hipofizdeki laktotropik hücrelerde meydana gelir.

Prolaktinin ana görevi mamogenez, laktogenez, galaktopoez ve involusyon gibi süreçlerin kontrolüdür. Ayrıca bu hormon süt proteinlerinin (β -kazein, α -laktalbumin, laktoz) biyosentezinde önemli rol oynar. Koyunlarda Prolaktin seviyesindeki değişim de mevsimseldir. Prolaktin seviyesi ilkbaharda düşer, yazın karanlık siklusun yarısında pik yaparken, sonbaharda fotoperiyodun ilk yarısında sabitlenir. Gün ışığı saatlerindeki mevsimsel değişim ilkbahar ve yaz aylarında kısa Melatonin sinyaline sebep olur (Günde dört-sekiz saat) böylece Prolaktin salgısında inhibisyona sebep olmazken sonbahar ve kış aylarında uzun süren Melatonin impulsu (10 saatten fazla) Prolaktin konsantrasyonunda düşüşe sebep olur. Melatonin aynı zamanda Prolaktin salgısını dopamin aracılığıyla da inhibe eder. Günlerin uzadığı dönemde laktasyona başlayan dişilerde süt veriminin günlerin kısaldığı dönemde laktasyona başlayanlara göre %50 daha fazla olduğu belirtilmiştir. Kısalan fotoperiyoda karşı oluşan Melatonin seviyesindeki artış, Prolaktin seviyesinde düşüşe ve süt veriminde azalmaya sebep olmaktadır (Molik ve Zieba-Przybylska, 2017).

Laktogenez, mammogenez, galaktopoez ve involusyon gibi süreçler birçok faktörün varlığını gerektirirken bu faktörler birbiriyle güçlü şekilde bağlantılıdır. Melatonin ve Prolaktin dışında önemli etkisi olan bir başka hormon ise somatotropik sistem hormonlarından GH (Growth hormone) ve IGF-1 (İnsülin Growth Faktör 1)'dir. Büyüme hormonu, Prolaktin'e benzer şekilde hipofiz bezinin anterior kısmında üretilir ve protein, yağ asidi sentezinde etkilidir. Kan glikoz seviyesinin düşürülmesi ve Prolaktin salgısından da kısmen sorumludur. Laktasyonun başında GH seviyesi yükselir. GH'deki artış laktasyon da GHRH ve endojen opioidler tarafından kontrol edilir. Laktasyonun başlaması ve sürdürülmesinde önemli olan bir diğer hormon grubu ise tiroid hormonlarıdır (Gherelin ve Orexin). Hayvanlardaki üretim kapasitesi (Süt verimi, büyüme ve gelişme, yapağı verimi) büyük oranda tiroid hormonlarının uygun fonksiyonuna bağlıdır. Mevsimsel üreme siklusu gösteren hayvanlarda T3 ve T4 hormonları reproduktif aktivitenin sonlandırılmasında sorumludur. Normal tiroid fonksiyonu gösteren bir koyunda tiroksin reproduktif periyodu kısaltır ve anöstrus dönemine geçişi hızlandırır. Koyunlarda laktasyon süresince tiroid hormonu seviyeleri farklılık gösterir. Sürecin başında seviyeleri düşüktür, zamanla tiroksin konsantrasyonu artar. Tiroid hormonlarından özellikle Tri-

iodotironin'in *PRL* geni üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu ve bu etkinin de *PRL* üzerinden süt verimine yansıdığı gösterilmiştir. Ayrıca koyunlarda troid hormonları salgısının gün uzunluğu ile korele olduğu deneysel olarak ispatlanmıştır (Molik ve ark., 2009).

Süt, fiziksel özellikleri ve kompozisyonu türler arasında farklılıklar gösteren meme dokusu salgısıdır. Yağ, protein, laktoz, mineraller, enzimler, hücreler, hormonlar, immunglobulinler ve vitaminleri içeren karmaşık bir su-yağ emülsiyonudur ve her türün süt salgısı türe hatta ırka özgü olarak değişkenlik gösterir ve özgündür (Ha ve ark., 2015). Çizelge 1.1 ve Çizelge 1.2'de inek, keçi ve koyun türüne ait yaklaşık süt kompozisyonları ve vitamin mineral içerikleri verilmiştir.

Çizelge 1.1 İnek, koyun ve keçi türlerine ait yaklaşık süt kompozisyonu değerleri (Balthazar ve ark., 2017).

Parametre	İnek Sütü	Keçi Sütü	Koyun sütü
Nem (g/100g)	87.9±0.5	87.6±0.7	82.9±1.4
Yağ (g/100g)	3.3±0.2	3.8±0.1	5.9±0.3
Kül (g/100g)	0.7±0.0	0.8±0.1	0.9±0.1
Laktoz (g/100g)	4.7±0.4	4.1±0.4	4.8±0.4
Protein (g/100g)	3.4±0.1	3.7±0.1	5.5±1.1
Kazein (g/100g)	3.0±0.1	2.4±0.1	4.7±0.5
α -S1 kazein (%) ^b	39.7	5.6	6.7
α -S2 kazein (%) ^b	10.3	19.7	22.8
β -S1 kazein (%) ^b	32.7	54.8	61.6
K-kazein (%) ^b	11.6	20.4	8.9

Çizelge 1.2 İnek, koyun ve keçi türlerine ait yaklaşık vitamin ve mineral içerikleri (Balthazar ve ark., 2017).

Paramerte	İnek	Keçi	Koyun
Mineraller			
Kalsiyum (mg/100g)	112.0±14.5	130±4.0	197.5±2.5
Demir (mg/100g)	0.1±0.1	0.06±0.0	0.1±0.0
Magnezyum (mg/100g)	11.0±0.5	14.5±1.5	19.5±3.0
Fosfor (mg/100g)	91.0±5.5	109±12.0	141.0±1.7
Potasyum (mg/100g)	145.0±11.5	185±4.5	138.0±2.0
Sodyum (mg/100g)	42.0±6.5	39.5±1.5	39.0±7.0
Çinko (mg/100g)	0.4±0.0	0.43±0.1	0.6±0.1
Bakır (mg/100g)	Eser	0.04±0.0	0.1±0.00
Selenyum (µg /100g)	1.8±1.3	1.66±0.4	1.7±1.0
Manganez (µg /100g)	6.0±0.0	8.0	7.15±1.8
Vitaminler			
Retinol (µg /100g)	35.0±0.8	0.04±0.1	64±19.5
Karotenoidler (µg /100g)	16.0±8.0	Eser	Eser
Vitamin A (µgRE /100g)	37.0±8.0	54.2±0.0	64.6±5.5
Vitamin E (mg/100g)	0.08±0.01	0.04±0.0	0.11±0.01
Tiamin (mg/100g)	0.04±0.01	0.59±0.00	0.07±0.01
Riboflavin (mg/100g)	0.2±0.01	0.17±0.0	0.3±0.02
Niasin (mg/100g)	0.13±0.05	0.23±0.0	0.41±0.05
Pantoteik Asit (mg/100g)	0.43±0.12	0.31±0.0	0.43±0.02
Vitamin B ₆ (mg/100g)	0.64±0.01	0.48±0.0	0.07±0.01
Folat (µg /100g)	8.5±1.5	1.0±0.0	6.0±0.06
Biyotin (µg /100g)	2.0±0.5	1.75±0.3	2.5±0.0
Vitamin B ₁₂ (µg /100g)	0.5±0.3	0.65±0.0	0.66±0.05
Vitamin C (mg/100g)	1.0±0.5	1.29±0.0	4.6±0.04
Vitamin D	0.2±0.1	0.15±0.1	0.2±0.0

1.4 mikroRNA (miRNA) Biyogenezi

1993'te keşfedilmelerinden beri (Lee ve ark. 1993) mikroRNA'lar (miRNA) insan, hayvan ve bitkilerde gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenleyicileri olarak önem kazanmışlardır. Bir miRNA hedefine bağlanıp hem mRNA'nın proteine çevrimini engelleyerek hem de degradasyonunu sağlayarak etki gösterebilir. miRNA ailesi çeşitli memeli türlerinin hücre, doku ve vücut sıvılarında izole edilen çok

küçük, yaklaşık 18-22 nükleotid uzunluğunda, kodlanmayan RNA'lardan oluşur (Alsaweed, 2015).

Memeli hücrelerinde yapılan birçok fonksiyonel çalışma göstermiştir ki miRNA'lar protein sentezinin %50'sinden fazlasını düzenlemektedirler. Farklı miRNA'ların birçok rolü deneysel olarak incelenmiş, memeliler ve bitkilerde çok geniş bir alanda biyolojik süreçleri düzenledikleri keşfedilmiştir. Normal biyolojik süreçleri kontrol etmelerine ek olarak miRNA'ların kanser, otoimmün hastalıklar, gastrointestinal hastalıklar, reproduktif sistem hastalıkları gibi birçok patoloji ile de ilişkili oldukları yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır (Alsaweed, 2015).

Memelilerde miRNA genlerinin büyük çoğunluğu gen duplikasyonu nedeniyle birden fazla izoforma (paralog) sahiptir. Örneğin insan genomunda let-7 genine ait 12 adet gen bölgesi bulunur. Paraloglar genellikle miRNA'ların 5' ucunda 2.-7. nükleotid pozisyonunda özdeş sekanslara sahiptir ve bu altı nükleotidlik bölge (Çekirdek bölge, seed region) hedef mRNA ile baz eşleşmesi açısından oldukça önemlidir. Birçok miRNA geninin transkripsiyonuna RNA Pol II aracılık ederken, Alu tekrarı içeren küçük bir grup miRNA Pol III tarafından da transkribe olabilmektedir. Bir dizi Pol II ilişkili transkripsiyon faktörü miRNA gen ifadesini kontrol eder. Bu Pol II bağımlı transkripsiyon miRNA genlerinin özel durumlarda ve hücre türlerinde sıkı bir şekilde kontrol edilmesine imkan sağlar (Kim ve ark., 2009).

miRNA'lar çekirdek sekanslarındaki benzerlik baz alınarak miRNA ailelerine gruplandırılırlar. Olgun (matür) miRNA'lar hücre çekirdeğinde başlayıp stoplazmada sonlanan bir seri biyokimyasal olay sonucunda şekillenirler. Bu biyokimyasal olaylar stoplazma ve çekirdek süreci olarak değerlendirildiğinde iki basamaktan oluşur (Alsaweed ve ark., 2015; Do ve ark., 2017c; Kim ve ark., 2009).

Çekirdek Süreci: miRNA olgunlaşmasının ilk aşaması saç tokası yapısından çatallanmayla pre-miRNA şekillenmesidir. Bu reaksiyon nükleer RNase III tip proteini olan Drosha tarafından gerçekleştirilir. Drosha bir ko-faktöre ihtiyaç duyar bu ko-fakör Di George Sendrom Kritik Bölge Geni 8 (DGRC8) proteindir. DGRC8

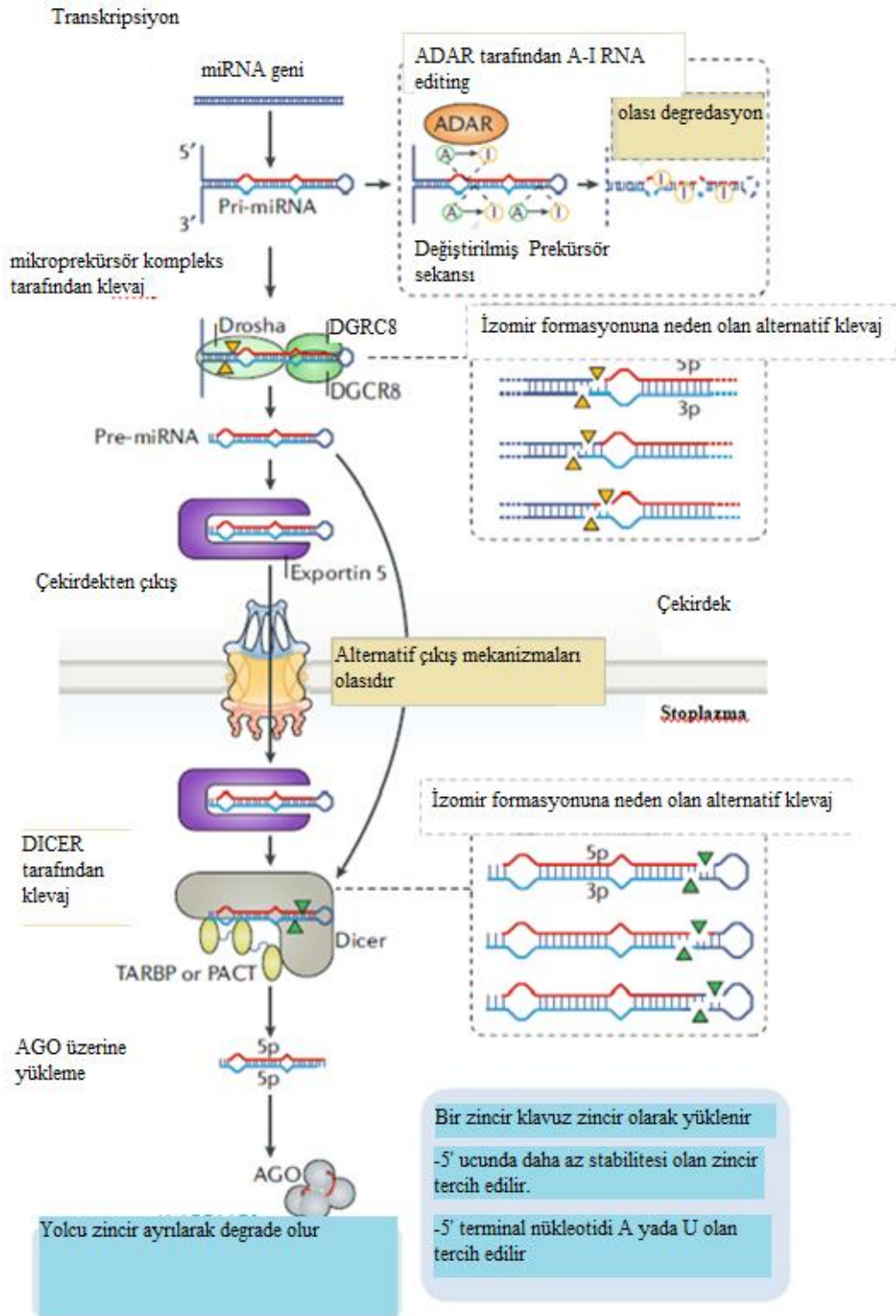
ile birlikte Drocha ‘mikrorekürsör kompleks’ olarak bilinen geniş bir kompleks şekillendirir (Do ve ark., 2017c; Kim ve ark., 2009). miRNA genlerinin çoğu RNA polimeraz II (RNA Pol II) tarafından kökilmek (Stem-loop) içeren pri-miRNA (pirimer miRNA)’ya transkribe olurlar. Bu pri-miRNA yüzlerce nükleotidden onlarca kilobaza değişen boyutta olabilir. miRNA’lar temel olarak RNA Pol II tarafından transkribe edilirken intronlardan veya uzun kodlanmayan RNA (lncRNA)’lardan da köken alabilirler (Gebert ve Macrae, 2019). Alu-tekrarlı elementlerin içinde kalan miRNA’lar istisnai olarak RNA pol III tarafından transkribe olabilirler. mRNA’lar gibi RNA Pol II tarafından transkribe olan miRNA’lar 5’ şapka yapısına ve poly-A kuyruğuna sahiptirler. Pri-miRNA’lar çekirdekte mikrorekürsör olarak adlandırılan multiprotein kompleksi tarafından işlenir, bu kompleksin ana bileşeni RNase III enzimi Drocha ve DGRC8/Pasha’dır. Bu kompleks pri-miRNA’nın kök ilmeğini çift zincir/tek zincir RNA birleşme yerinin uzaklığını ölçerek açar ve yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda saç tokası yapısında prekürsör-miRNA (pre-miRNA)’yı oluşturur 3’ ucunda bulunan 2 nükleotidlik baz çıkıntısı RNase III aracılı bölünmeye (cleavage) özgü bir yapıdır ve pre-miRNA’yı çekirdekten stoplazmaya taşıyan Exportin-5 (*EXP5*) tarafından tanınır (Bushati ve Cohen, 2007). *EXP5* nükleer transport reseptör ailesinin bir üyesidir, tRNA’ların transpotunda minör export faktör olarak bilinmesine rağmen *EXP5*’in majör yüklerinin miRNA’lar olduğu keşfedilmiştir. *EXP5* taşıyacağı moleküle bağlanır ve GTP-bağımlı olarak çalışır. Taşıdığı molekülü GTP hidrolizinden sonra sitoplazmaya serbest bırakır (Kim ve ark., 2009).

Sitoplazma süreci: Dicer tarafından pre-miRNA’ların çift zincirli miRNA dublekslerine dönüşümü stoplazmik süreçte gerçekleşir. Oluşan çift zincirli miRNA dubleksi ATP-bağımlı *RLC* (RISC-loading complex) kompleksine dahil olur. Daha sonra miRNA zincirlerinden biri (yolcu zincir) *RLC*’den ayrılırken diğer zincir (klavuz zincir) olgun *RISC* kompleksini oluşturmak üzere *RLC*’de kalır ve hedef mRNA’nın yakalanmasında kalıp görevi görürler (Sato ve ark., 2010). Olgun miRNA’nın bir zinciri Drocha tarafından belirlenirken diğer ucu Dicer tarafından şekillendirilir. Dicer ökaryotların hemen hepsinde bulunan yüksek derecede korunmuş bir proteindir. Bazı organizmalar birden fazla Dicer homologuna sahiptir

ve bu homologlar farklı işlevlere sahiptir. Örneğin *Drosophila melanogaster*'de Dicer1 miRNA biyogenezi için gerekli iken Dicer2 siRNA (small interfering RNA) üretiminde fonksiyoneldir (Kim ve ark., 2009).

Dicer bölünmesini takiben yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki RNA dubleksleri Ago proteinine yüklenerek RISC kompleksini meydana getirir. Yaklaşık 22 nükleotidlik RNA dubleksinin bir zinciri (klavuz zincir) Ago üzerinde kalırken diğer zincir (yolcu zincir) degrade olur. siRNA dubleksleri üzerinde yapılan çalışmalar göstermektedir ki dubleksin iki ucundaki termodinamik denge hangi zincirin seçileceğini belirler. 5' ucunda daha istikrarsız baz dizisine sahip olan zincir tipik olarak varlığını sürdürür (Şekil 1.6). miRNA prekürsörlerinde yapılan termodinamik denge profillemesi çalışmaları hepsi olmasa da çoğu miRNA'nın bu kurala uyduğunu göstermektedir (Kim ve ark., 2009).

miRNA biyogenezinin düzenlenmesinde ise gelişimsel ve/veya dokuya özgü sinyalizasyon ile miRNA biyogenezi kontrol altında tutulur. miRNA seviyesinin hassas kontrolü normal hücre fonksiyonlarının sürdürülmesi açısından kritiktir ve miRNA'ların disregülasyonu çoğunlukla hastalıklar ve kanser oluşumu ile ilişkilidir (Gebert ve Macrae, 2019).



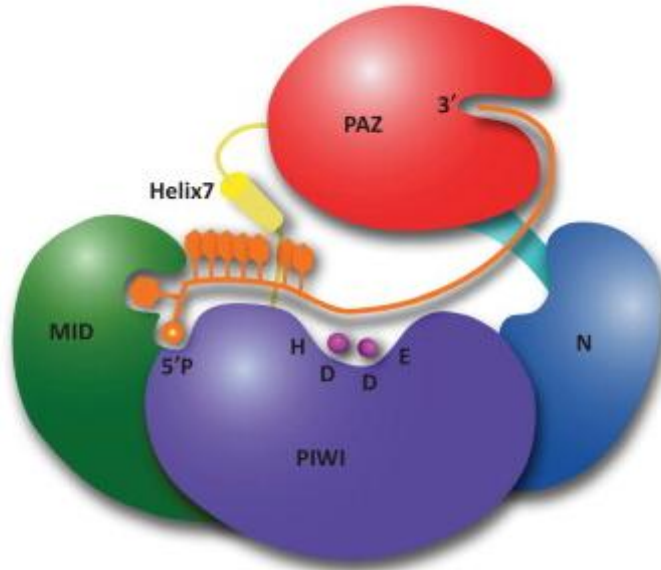
Şekil 1.6. miRNA Biyogenezisi (Gebert ve Macrae, 2019'dan Türkçeleştirilmiştir).

miRNA kontrolünde transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel kontrol mekanizmaları mevcuttur. Transkripsiyonel kontrol miRNA biyogenezinin ana düzenlenme noktasıdır. Birçok Pol II bağlantılı transkripsiyon faktörü miRNA genlerinin transkripsiyonel kontrolünde yer alır. Posttranskripsiyonel kontrolde Drocha süreci önemli düzenleme noktasıdır. miRNA haberleşme ağında geribildirim (feedback) mekanizmaları, biyogenezi transkripsiyon sonrası kontrol altında tutar. Biyogenez faktörleri, miRNA'ların kendisi ve hedefleri içeren birçok aşamasında geribildirim döngüsü ile kontrol edilir. miRNA biyogenezinin kontrolünde genellikle iki tip geribildirim döngüsü işlev görür; Tek negatif geribildirim ve çift negatif geribildirim. Tek negatif geribildirim genellikle iki bileşenin de denetimli veya sabit ifadesi ile sonuçlanırken, çift negatif geri bildirim karşılıklı özel ifade ile sonuçlanır. Drocha ve Dicer'in seviyeleri tek negatif geribildirim ile kontrol edilir. Drocha, *DGCR8* ile birlikte düzenleyici bir çember oluşturur. *DGRC8*'i mRNA'sını keserek baskımlarken, *DGRC8* *Drocha*'nın protein stabilizasyonu ile ifadesini artırır. Çift negatif geribildirim ise genellikle özgün miRNA'ların hücrel farklılaşma sırasında genetik ifade değişimlerini kontrol etmek üzerine etkili olur (Kim ve ark., 2009).

miRNA'ların büyük bir çoğunluğu türler arasında korunmuştur. Bu özellikleri miRNA'ları karşılaştırmalı genomik çalışmaları için merak konusu haline getirmiştir (Barozai, 2012). Dolfin ve ark. (2018), beş farklı hayvan türünde ve beş dokuda ifade edilen miRNA'ların korunmuşluk oranını belirlemek ve karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada miRNA'ların çok büyük oranının yüksek derecede korunmuş olduğunu bularak bu tezi destekleyici sonuçlar elde etmişlerdir.

Memelilerde miRNA'lar vücut sıvılarında degradasyona karşı özel moleküller tarafından mükemmel şekilde korunurlar. *Argonat* (Ago) miRNA ilişkili proteinler miRNA'lara ilk koruyucu tabakayı oluştururlar. Bu proteinler RISC (RNA induced silencing complex) kompleksinin bir parçasıdır. Ago proteini amino N-terminal domaini, Piwi-Argnat-Zwille (PAZ) domaini, Middle domain (MID) ve P-element induced wimpy testes (PIWI) damaini olmak üzere 4 domainden oluşur (Şekil 2.7) (Gebert ve Macrae, 2019). Bu kompleks özellikle mRNA translasyonunun baskılanmasında miRNA'lar tarafından rehberlik edilen Ago-2 proteinini içerir. Bu

protein bu nedenle miRNA'lar ile yakın ilişkilidir ve miRNA'ların fonksiyonelliğini sağlar. Ago-2'nin miRNA'ları degradasyona karşı koruduğu ilk olarak RNase korunma deneyleri ile ispat edilmiştir. Daha sonra bu yakın koruma, miRNA'ların kanda altı aydan fazla stabil kalmasının sadece Ago2-miRNA-nükleoprotein kompleksi tarafından sağlandığının ispatlanmasıyla kesinleştirilmiştir. İkinci koruyucu tabaka ise miRNA'ların HDL (High Density Lipoprotein) ve süt yağ globülleri gibi yağdan zengin hücre dışı veziküller tarafından kapsüle alınmasıdır. İlginç şekilde bu çift koruma sadece miRNA'ların yaşamasını sağlamamakla birlikte aynı zamanda tanısal ve prognostik belirteç olarak kullanılmalarını ve hücreden hücreye haberleşme aracı olarak biyolojik fonksiyonlarının da uzun ömürlü olmasını sağlar (Benmoussa ve Provost, 2019).



Şekil 1.7. Ago proteini domainleri (Khun ve Tor, 2013). Klavuz zincirin 5'fosfat yapısı MID ve PIWI domainlerinin arasına sıkıca bağlanır ve 5' nükleotidi MID domaini'nin özgül loop yapısı tarafından işaretlenir, hedef RNA'yı fark etmek üzere hazırlanır. Çekirdek sekansının bazıları dar aralık (narrow groove) tarafından işaretlenir, hedef RNA'yı fark etmek üzere hazırlanır. Helix 7 yapısı 6. ve 7. bazlar arasında bir kıvrım oluşumunu indükleyerek yalancı klavuz-hedef eşleşmelerinden korunmada bir dolgu görevi görür. Argonatin aktif bölgesi katalitik tetralardan oluşur (H,D,D ve E) ve Mg^{+} iyonlarına bağlı çalışır.

1.5 miRNA'lar ve Süt

Süt birçok memeli tarafından salgılanan sadece miktar olarak değil aynı zamanda yeni doğanların gelişimi ve sağlığı için hem kısa dönemde hem de ilerleyen dönemlerinde etkili tek besin maddesidir. Maternal süt, yeni doğanların beslenme ihtiyacını karşılayan zengin bir besin maddesi olmakla birlikte aynı zamanda antimikrobiyal moleküller gibi biyoaktif bileşenleri, büyüme faktörlerini, kazein ve yağ fragmentleri, bağışıklık hücreleri, antikorları ve katalitik aktif antikorları evrim tarafından şekillendirilmiş fonksiyonel bir besindir. Yeni doğan barsak duvarına entegre olarak lokalize mikrokimerizm (Kimerizm, aynı bedende birbirinden tamamen farklı iki genomun bulunması durumu) ile yeni doğan için uygun bağışıklık gelişimini sağlayan maternal hücreler içerir (Moles ve ark., 2018).

Diğer biyolojik sıvılarda olduğu gibi sütteki miRNA'ların çeşitli türlerde keşfi (Melnik ve ark., 2016; Melnik ve Schmitz, 2017) süt miRNA'larının prognostik, tanısal ve fonksiyonel açıdan araştırılmalarının önünü açmıştır. Özellikle sütün hacmine oranla yüksek miktarda miRNA içermesi araştırmacıların süt miRNA'larına olan ilgisini arttırmıştır.

Sütteki miRNA'ların kaynağı ilk başta tartışmalara neden olmuştur. İnsan serum ve sütündeki miRNA'ların karşılaştırılması sütte bulunan miRNA'ların büyük çoğunluğunun kan dolaşımından geçmediğini ortaya koymuştur (Alsaweed ve ark., 2015). Birçok miRNA'nın sütte serbest olmasına karşın son çalışmalar büyük çoğunluğunun küçük hücre dışı veziküller (ekstraselüler veziküller, EV, ekzosomlar) ile kapsüle edildiğini göstermektedir (Benmoussa ve ark., 2019; Harweijnen ve ark., 2016).

Ekstraselüler veziküllerin proteomik analizleri (Benmoussa ve Provost 2019; Chen ve ark., 2017) en çok ifade edilen proteinlerin meme dokusu hücrelerinden köken aldığını ancak bağışıklık hücreleriyle ilişkili birçok proteinin süt ekstraselüler veziküllerine özgü olduğunu ortaya koymuştur (Benmoussa ve Provost, 2019; Harweijnen ve ark., 2016; Reinhard ve ark., 2012).

Sütün miRNA içeriği ve meme dokusunun hücre profili RNA sekanslama metoduyla karşılaştırıldığında (Hou ve ark., 2017; Li ve ark., 2012; Schen ve ark., 2016) sütte en çok bulunan miRNA'ların aynı zamanda meme dokusunda da en çok ifade edilen miRNA'lar olduğunu ve laktasyonda yüksek önemi olduğunu doğrulayarak bu miRNA'ların epitel kökenli olduğu ispatlanmıştır (Chen ve ark., 2017; Do ve ark., 2017a; Do ve ark., 2017b; Muroya ve ark., 2016).

Bu çalışmanın amacı süttten elde edilen dokuz adet miRNA'nın süt verimi yüksek olan bireylerde bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını incelemesidir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın yürüttüğü, Elazığ ili halk elinde küçükbaş hayvan ıslah ülkesel projesi kapsamında (Proje adı: Şavak Akkaraman-3, Proje Kodu: 23SAV2012-3), aynı bakım ve beslenme koşullarına sahip kayıtlı koyunlar kullanılmıştır. Bu projeye ait çalışma izni Ek-1'de sunulmuştur.

Projede deney ve kontrol grubu olmak üzere iki grup oluşturulmuştur; deney grubunu (n:20) laktasyon süt verimi yüksek hayvan popülasyonu oluştururken kontrol grubunu (n:20) süt verimi laktasyon ortalamasının altında olan hayvanlar oluşturmaktadır. Deneyde toplam 40 adet sağlıklı 4 yaşında, Akkaraman ırkı koyundan süt örneği alınmıştır. Süt kompozisyonu, Somatik hücre sayımı ve RNA izolasyonu için aynı hayvana ait alınan süt örneği üç ayrı falcon tüpte toplanmıştır.

Hayvanların sağlıklı olduğunu doğrulamak için Brucella ve mastitis açısından sağlıklı hayvanlar seçilmiştir. Kayıt altında olan bu koyunların Brucella aşılamaı düzenli olarak yapılmaktadır. Subklinik mastitisin tanısı için seçilen 80 adet 4 yaşında koyundan sabah sağımından önce somatik hücre sayımı (SHS) testi yapılmak amacıyla iki meme lobundan süt örneği alınmış ve California Mastitis testi (CMT) uygulanmıştır. Subklinik mastitisin koyunlarda görülme sıklığı %70 olduğu literatürlerde belirtilmektedir, bu nedenle toplam seçilen 80 adet koyundan süt örneği alınarak subklinik mastitis tanısı koyulan hayvanlar proje dışı bırakılmıştır.

2.1 Süt Örneklerinin Toplanması

Süt örnekleri sabah sağımında buz üzerine yerleştirilmiş DNase ve RNase free tüpler içerisine alınmıştır (100 ml). Süt örnekleri soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmıştır (Şekil 2.1).

Süt örneklerinin alındığı sabah sağımında, hayvanların elle sağım yöntemi ile, 1000 ml'lik mezür kullanılarak süt verimleri de ölçülerek kaydedilmiştir.



Şekil 2.1. Hayvanların sağılması ve süt örneklerinin toplanması.

2.2 Süt Örneklerinin Analizi

Örnek alınan meme dokusunun sağlıklı olduğunu doğrulamak için California Mastitis testi ile somatik hücre sayımı yapılmıştır.

Meme yangısı olarak tanımlanan mastitisin tanısı için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; memelerin ve sütün klinik muayenesi, kimyasal yöntemler, fiziksel muayene ve inceleme, hücresel ve bakteriyolojik incelemeler olarak gruplandırılabilir. Bununla birlikte subklinik mastitislerde tanı koymak zordur çünkü meme dokusunda ve sütte fiziksel olarak dışarıdan gözlemlenebilir bir değişiklik oluşmaz ve ancak belirli tanı metodları ile tespit edilebilir (Yağcı ve Kaymaz, 2006).

CMT sütün içerisinde bulunan somatik hücreleri belirler ve sahada uygulanması oldukça pratik bir yöntemdir. Sütte bulunan somatik hücrelerin miktarında ve sütün pH değerinde oluşan değişimleri baz alarak sonuç veren bir testtir. CMT testi:

negatif, şüpheli, +1, +2, ve +3 olarak değerlendirilen 5 skalada test sonucu vermektedir (Rişvanlı ve Kalkan, 2002).

California Mastitis Test, Schlam ve Noorlander (1957)'ın tarif ettiği şekilde uygulanmıştır (şekil 2.2).



şekil 2.2. CMT pozitif sonuçta oluşan jelleşme

2.3 Somatik Hücre Sayımı

Alınan süt örnekleri soğuk zincirde taşınarak, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'na somatik hücre sayımı yapılmak üzere ulaştırılmıştır. Somatik hücre sayımı DeLeval marka somatik hücre sayım cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Sahada CMT testi negatif olan koyunlardan, sabah sağımı sırasında alınan 80 adet süt rneği laboratuara getirilerek somatik hücre sayıları kit kullanılarak analiz edilmiştir. Somatik Hücre Sayısı (SHS) sonuçları Ek-6'da sunulmuştur.

2.4 Lactoscan Cihazı ile Süt Kompozisyonunun Belirlenmesi

Süt kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla Şubat ayında ayrıca alınan süt örnekleri soğuk zincirde taşınarak, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı'na ulaştırılmış ve yine aynı anabilim dalı laboratuvarında bulunan ultrasonik çalışma prensibine sahip lactoscan cihazı (MilkAnalyser Master Classic LM2, CHADHA salespvt. ltd.dairy equipment engineers) ile süt kompozisyonu incelenmiştir.

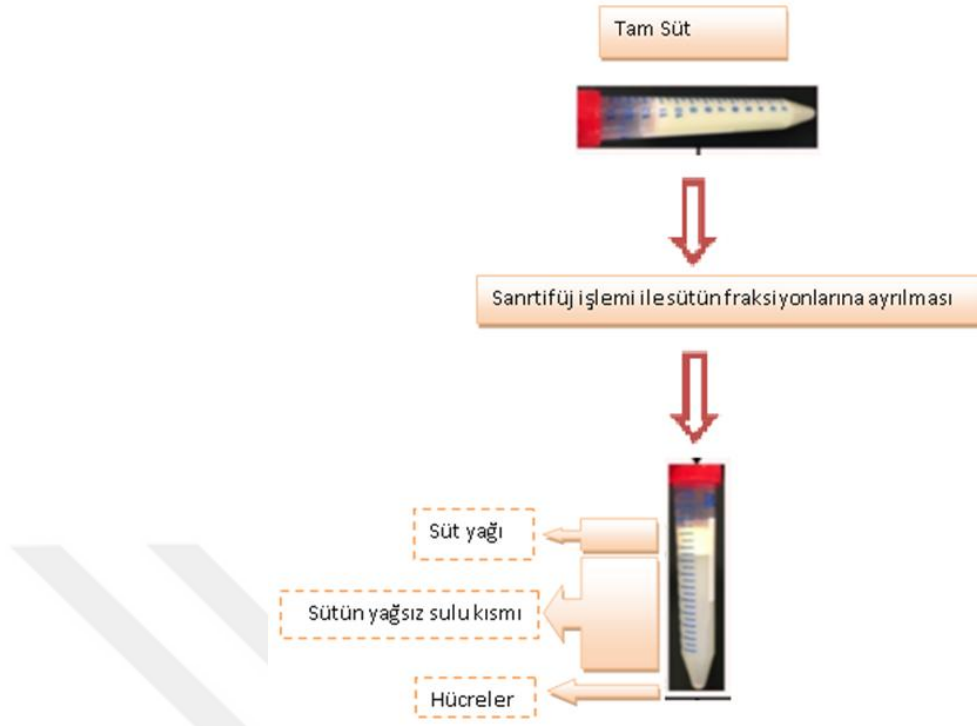
Yağ, protein, laktoz, dansite, yağsız kuru madde, su ve iletkenlik parametreleri analiz edilmiştir. Şubat ve Haziran ayına ait lactoscan sonuçları Ek 2 ve Ek 3'te sunulmuştur.

2.5 miRNA Profillemesi

2.5.1 RNA Ekstraksiyonu

RNA izolasyonunun yapılması için koyunlardan Şubat ayında toplanan süt örnekleri soğuk zincirde hemen Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı'na ulaştırılmış ve yine aynı anabilim dalının moleküler genetik laboratuvarında miRNA izolasyonu yapılmıştır.

Sütten miRNA ekstraksiyonu için miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, ABD, Kat. No: 217204) kullanılmıştır. Örnekler önce 1800 g de 15 dakika santrifüj edilerek Şekil 2.3'deki gibi fazlara ayrılmıştır, RNA izolasyonu için orta fazı kullanılmıştır.



Şekil 2.3. Sütün Fraksiyonları.

miRNA izolasyonu için uygulanan kit protokolü şu şekildedir;

- Orta fazdan 200 μ l alınarak vortekslendi ve oda ısında 3 dakika bekletildi.
- 60 μ l RPL buffer eklenerek pipetaj ile karışması sağlandı.
- 3,5 μ l Spike in eklenerek vortekslendi.
- 20 μ l RPP buffer eklendi, 20 saniye vortekslenerek 3 dakika oda ısında bekletildi. Bu aşamada faz ayrımı oluştu.
- 1200 g de 3 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni tüpe aktarılarak 200 μ l isopropol eklendi ve vortekslendi. Pipete edilerek kolona aktarıldı.
- 15 saniye 8.000 rpm de santrifüj edilerek kolon yeni tüpe yerleştirildi ve 700 μ l RWT buffer eklendi.
- 8000 rpm de 15saniye santrifüj edildi. Kolon yeni koleksiyon tüpüne alınarak 500 μ l RPE buffer eklendi.
- 8.000 rpm de 15 saniye santrifüj edildi.

- 500µl %80 lik etanol eklenerek kolon 2 mililitrelik santrifüj tüplerine aktarıldı. Kolonun kapağı açık kalacak şekilde tam hızda 5 dakika santrifüj edilerek izolasyon işlemi tamamlandı. Yeni 2 mililitrelik santrifüj tüplerine alınarak 20 µl RNase dan ari su eklendi ve 1 dakika inkubasyon sonrası 1 dakika tam hızda santrifüj edildikten sonra kullanılana kadar -80’de muhafaza edildi.

2.5.2 RNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

Çalışma sonucu elde edilen total RNA kalite ve kantitesi Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarında bulunan Thermo NanoDrop Nd2000 spektrofotometri ile A260 / A280 nm dalga boylarında ölçülerek değerlendirilmiştir. Ölçümlerde her bir örnek için 2 µl RNA kullanılmıştır. A260/A280 nm dalga boyu oranının 2.0 ve üstü olması durumunda RNA saf olarak değerlendirilmiştir. 40 adet örnekten elde edilen RNA’ların nanodrop sonuçları Ek 4’te belirtildiği gibidir.

Örnekler daha sonra kuru buz içeren straforlara aktararak, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalına ulaştırılmış ve hemen -80°C de depolanmıştır.

2.5.3 cDNA Sentezi

Çalışmada mircury LNA RT kit (Qiagen, ABD, Katalog No:339340) kullanılarak reverse transkripsiyon (RT) işlemi ile komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA miRNA’ya göre çok daha stabil ve dayanıklıdır bu nedenle elde edilen miRNA örneklerinin hepsi cDNA’ya çevrilerek deney sürecinde miRNA örneklerinin degradasyonu sonucu oluşabilecek olumsuzluklar önlenmiştir.

İzole edilen miRNA örnekleri -80°C’den çıkarıldıktan sonra 4°C’de bir miktar (10-15 dk.) bekletirerek çözdürülmüştür.

cDNA sentezi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında BioRad C100 ısı döngüsü cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Cihazın ısı döngüsü 42°C’de 60 dk, 95°C’de 5 dk, 4°C’de ∞ şeklindedir. Sentez bileşenleri Çizelge 2.1’de belirtildiği gibidir.

Çizelge 2.1. cDNA sentez bileşenleri.

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
5x mirCURY buffer	2 µl
10x mirCURY enzim	1 µl
RNase free su	5 µl
Kalıp RNA	2 µl
Toplam	10 µl

2.5.4 Referans Gen Seçimi

Chen ve ark. (2010), sığırlarda yaptıkları çalışmada süte özgü miRNA’ları belirlemişler ve en çok eksprese olan miRNA’yı, *bta-miR-103* olarak bulmuşlardır. Do ve ark., (2017a) laktasyonda miRNA sinyal yollarını araştırdıkları çalışmalarında *miR-103*’ü normalizasyon için kullandıklarını belirtmişlerdir. Literatür bilgisine dayanarak mevcut araştırmada referans miRNA olarak *oar-miR-103* seçilmiştir.

2.5.5 Eş-Zamanlı PZR Analizi

Eş Zamanlı (Real Time) PZR’da oluşan ürünün miktarı ile orantılı olarak artan florasan boyanın ve probaların verdiği ışımaya ve sinyaller tespit edilerek reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarı izlenebilmektedir. PZR çoğaltımını monitorize eden ve

görünebilir hale getiren floresanla işaretlenmiş problemler ve boyalar kullanılarak, ürün miktarı ile doğru orantılı olarak artan floresanın ölçümüne dayalı bir yöntemidir.

Çalışmada analiz edilen miRNA'ların sipariş edilen dizileri ve mirBase erişim numaraları Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

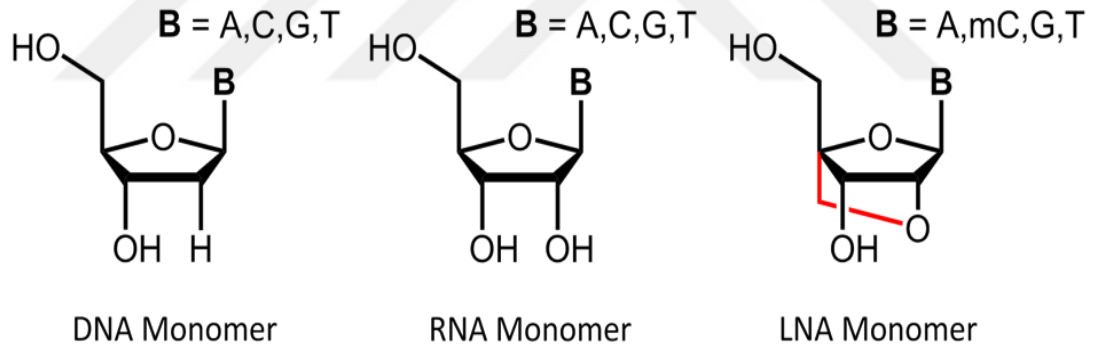
Çizelge 2.2. Çalışmada analiz edilen miRNA'lar ve miRbase erişim numaraları.

miRNA	Dizi	mirBase erişim numarası
<i>oar-mir-485-3p</i>	5'GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	MI0016950
<i>oar-mir-374b</i>	5'AUAUAAUACAACCUGCUAAGU	MI0025284
<i>oar-miR-27a</i>	5'UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	MI0025275
<i>oar-miR-221</i>	5'AGCUACAUUGUCUGCGGGUUU	MI0025269
<i>oar-miR-23a</i>	5'AUCACAUUGCCAGGGAUUUCCA	MI0025270
<i>oar-miR-181a</i>	5'AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	MI0014973
<i>oar-miR-152</i>	5'UCAGUGCAUGACAGAACUUGG	MI0025256
<i>oar-miR-16b</i>	5'UAGCAGCACGUAAAUUUUGG	MI0025257
<i>oar-miR-103</i>	5'AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUG	MI0025248

Eş Zamanlı PZR reaksiyonları için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalında bulunan CFX 96 Real-Time PCR (Biorad, ABD) cihazı ile syber green temelli miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, ABD, Kat. No: 339346) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler kilitli nükleik asit primerlerlerdir. Kilitli Nükleik Asitler (LNA) 2'O ve 4'C atomlarında metilen köprüsü içeren nükleik asit analoglarıdır (Şekil 2.4). Bu köprü-kilit sistemi 3' endo konformasyonda ribofuranoz halkasının esnekliğini sınırlandırarak yapıyı bisiklik formasyona kilitler. Bu durum assay performansını, bağlanma özgüllüğünü artırır.

miRNA'ların küçük boyutları ve çok çeşitli GC içeriği (%5-95) geleneksel yöntemler kullanarak analiz etmeyi zorlaştırmaktadır. miRNA analiz için DNA veya RNA bazlı teknolojilerin kullanılması yüksek belirsizlik ve düşük dayanıklılığı ortaya çıkarabilir. Çünkü oligonükleotid/miRNA dubleksinin erime sıcaklığı (T_m), dizilerin GC içeriğine bağlı olarak büyük ölçüde değişecektir. Bu durum birçok

miRNA hedefinin aynı deneysel koşullar altında analiz edildiği uygulamalarda sorun yaratmaktadır. miRNA analizindeki bu güçlükler, LNA ile zenginleştirilmiş oligonükleotitler kullanılarak aşılabilmektedir. LNA içeriği basitçe değiştirilerek belirli erime sıcaklıkları olan oligonükleotidler, miRNA'nın GC içeriğine bakılmaksızın tasarlanabilmektedir. miRNA'larla çalışılmanın bir diğer zorluğu diziler arasındaki yüksek dereceli benzerliktir (homolojidir). Bazı miRNA ailesi üyeleri tek bir nükleotid vasıtasıyla bile değişiklik gösterebilir. LNA, yakın ilişkili miRNA dizilerinin oldukça güçlü ayırımına izin vererek primerlerin ayırım gücünü artırarak ve primer özgüllüğünü ve hassasiyetini belirgin şekilde artırmaktadır. LNA da riboz halkası, 2'-O ve 4'-C atomları arasında bir metilen köprüsü ile bağlanır ve böylece riboz halkası bağlama için ideal biçimde "kilit" yapı oluşturur. Bir RNA oligonükleotidi LNA içine eklendiğinde, tamamlayıcı bir nükleotid ipliği ile eşleşmeyi daha hızlı yapar ve ortaya çıkan dupleksin stabilitesini artırır.



Şekil 2.4. LNA'nın 2' oksijen ve 4' karbon atomlarında bulunan metilen köprüsü yapısı.

Araştırmada kurulan eş zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri Çizelge 2.3'deki gibidir.

Çizelge 2.3. Eş Zamanlı PZR Reaksiyon İçin kullanılan Reaksiyon Bileşenleri.

Reaksiyon bileşeni	Miktar
2x Syber Green	5 µl
Primer	1 µl
cDNA Kalıp	3 µl (1/60 dilüsyonlu)
RNase free su	1 µl
Toplam	10 µl

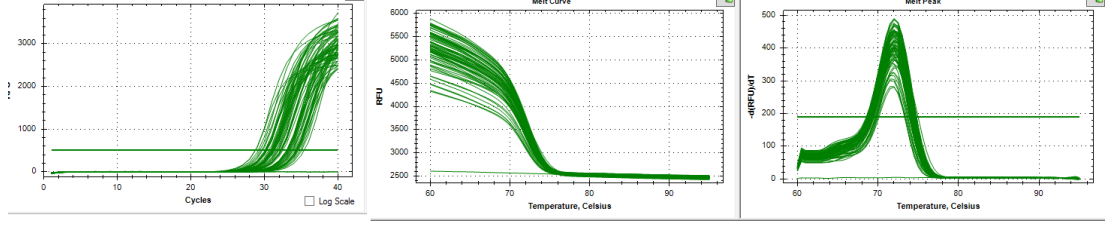
qPZR döngüsü 95°C’de 10 dakika (enzim aktivasyonu), 95°C’de 10 saniye (denatürasyon) 60°C’de 10 saniye (bağlanma) ve 40 döngü şeklinde kurulmuştur. 55°C-90°C sıcaklık değerleri arasında 0,1°C’lik hassasiyette erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Hesaplamalar Livak ve Schmitgen (2001)’e göre gerçekleştirilmiştir ve Normalizasyon *oar-miR-103*’e göre yapılmıştır. Her örnek ve analiz edilen her miRNA için iki teknik replika uygulanmıştır.

Gen ifadeleri belirlenirken her miRNA için elde edilen C_t (cycle threshold/eşik değer) değeri elde edilmiştir. C_t değeri Floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği noktadır. ΔC_t değeri; ilgili genin C_t değerinden normalizasyon için seçilen genin C_t değerinin çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Çalışmada normalizasyon için *oar-miR-103*’e ait C_t değerleri kullanılmıştır. Formülü aşağıdaki gibidir;

$$\Delta C_t_{(test)} = C_t_{(hedef,test)} - C_t_{(referans,test)}$$

$$C_t_{(kontrol)} = C_t_{(hedef,kontrol)} - C_t_{(referans,kontrol)}$$

Daha sonra test geninin ΔC_t değeri, kontrol grubunun (süt verimi düşük) ΔC_t değerine göre $\Delta \Delta C_t = \Delta C_{T(test)} - \Delta C_{T(kontrol)}$ formülü uygulanarak normalize edilmiştir. Son olarak $2^{\Delta \Delta C_t}$ formülü ile süt verimi yüksek ve düşük gruplara ait $2^{\Delta \Delta C_t}$ değerleri oranlanmıştır. *oar-miR-103*’e ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme grafikleri Şekil 2.5’de verilmiştir.



Şekil 2.5. Normalizasyonda kullanılan *oar-miR-103*'e ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme grafikleri

2.6 İstatistiksel Analiz

Süt verimi, Lactoscan sonuçları ve miRNA ekspresyonları incelendikten sonra gruplar arası istatistiksel analizler SPSS paket programı (PASW statistics 18) kullanılarak yapılmıştır.

Değerlerin normal dağılıma uygunluklarının analizi Shapiro-Wilk test ile analiz edilmiştir. Değerlerin normal dağılım gösterdiğini belirledikten sonra parametrik analiz yöntemleri kullanılıp istatistiksel farkın anlamlılık düzeyinin değerlendirilmesinde $P \leq 0,05$ sınır değeri kullanılmıştır.

Normal dağılıma uygun olmayan niceliksel ölçümlerin gruplar arasındaki dağılımının incelenmesinde Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren ikili gruplarda niceliksel değerlerin incelenmesinde Bağımsız Örneklem T testi kullanılmıştır.

Sayısal değişkenler arasındaki ilişkiyi saptamak için ise normal dağılıma uygun gruplarda Pearson korelasyon testi uygulanırken, normal dağılım göstermeyen gruplarda Spierman testi uygulanarak aralarındaki ilişki incelenmiştir.

2.7. Biyoinformatik analizler

2.7.1 Farklı eksprese edilen miRNA'ların hedef gen tahmini

Çalışılan miRNA'ların türler arasında korunmuş olup olmadığı çekirdek dizisinin (seed region) homolojik yapısı NCBI internet sitesinde bulunan BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) veri tabanında kontrol edilmiştir (Çizelge 2.4). Elde edilen sonuçlara göre analiz edilen miRNA'ların yüksek düzeyde korunmuş olduğu belirlendikten sonra insana (*Homo sapiens*) ve ruminant olması nedeniyle de *Bos taurus*'a ait hedef gen tahminleme veri tabanları kullanılmıştır. Çünkü koyuna ait/özgün hedef gen tahminleme veri tabanı bulunmamaktadır.

Çizelge 2.4. Çalışılan miRNA'ların homoloji gösteren baz dizileri ve miRBase erişim numaraları.

miR-148a		Sekans	MiRBase erişim numarası
<i>Ovis aries</i>	<i>oar-miR-148a</i>	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	MIMAT0030033
<i>Homo sapiens</i>	<i>hsa-miR-148a-3p</i>	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	MIMAT0000243
<i>Bos taurus</i>	<i>bta-miR-148a</i>	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	MIMAT0003522
miR-181a			
<i>Ovis aries</i>	<i>oar-miR-181a</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	MIMAT0014973
<i>Homo sapiens</i>	<i>hsa-miR-181a-5p</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	MIMAT0000256
<i>Bos taurus</i>	<i>bta-miR-181a</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	MIMAT0003543
miR-16b			
<i>Ovis aries</i>	<i>oar-miR-16b</i>	UAGCAGCACGUAAAUAUUGG	MIMAT0030036
<i>Homo sapiens</i>	<i>hsa-miR-16-5p</i>	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	MIMAT0000069
<i>Bos taurus</i>	<i>bta-miR-16b</i>	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGC	MIMAT0003525
miR-23a			
<i>Ovis aries</i>	<i>oar-miR-23a</i>	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCCA	MIMAT0030048
<i>Homo sapiens</i>	<i>hsa-miR-23a-3p</i>	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	MIMAT0000078
<i>Bos taurus</i>	<i>bta-miR-23a</i>	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCCA	MIMAT0003827
miR-374b			
<i>Ovis aries</i>	<i>oar-miR-374b</i>	AUAUAAUACAACCUGCUAAGU	MIMAT0030063
<i>Homo sapiens</i>	<i>hsa-miR-374b-5p</i>	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG	MIMAT0004955
<i>Bos taurus</i>	<i>bta-miR-374b</i>	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG	MIMAT0009302
mir-27a			
<i>Ovis aries</i>	<i>oar-mir-27a</i>	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC	MIMAT0030053
<i>Homo sapiens</i>	<i>hsa-miR-27a-3p</i>	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC	MIMAT0000084
<i>Bos taurus</i>	<i>bta-miR-27a-3p</i>	UUCACAGUGGCUAAGUUCCG	MIMAT0003532
miR-221			
<i>Ovis aries</i>	<i>oar-miR-221</i>	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUU	MIMAT0030047
<i>Homo sapiens</i>	<i>hsa-miR-221-3p</i>	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	MIMAT0000278
<i>Bos taurus</i>	<i>bta-miR-221</i>	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUU	MIMAT0003529
miR-152			
<i>Ovis aries</i>	<i>oar-miR-152</i>	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG	MIMAT0030035
<i>Homo sapiens</i>	<i>hsa-miR-152-3p</i>	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG	MIMAT0000438
<i>Bos taurus</i>	<i>bta-miR-152</i>	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG	MIMAT0009238
miR-103			
<i>Ovis aries</i>	<i>oar-miR-103</i>	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUG	MIMAT0030027
<i>Homo sapiens</i>	<i>hsa-miR-103a-3p</i>	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	MIMAT0000101
<i>Bos taurus</i>	<i>bta-miR-103</i>	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	MIMAT0003521

miRNA'lara ait hedef genlerin belirlenmesinde miRSystem, TargetScan ve insan da validasyonu yapılmış hedef genleri içeren Tarbase veri tabanları kullanılmıştır. TargetScan'de *Bos taurus* (Venn diagramından TargetScan_Cow olarak gösterilmektedir.) ve *Homo Sapiens* (Venn diagramından TargetScan_Human olarak gösterilmektedir.) için ayrı ayrı türlere göre arama yapılmıştır. Bu veri tabanlarından miRSystem yedi miRNA hedef gen tahmin programını birleştiren bir veritabanıdır, DIANA, miRanda, miRBridge, PicTar, PITA, rna22, ve TargetScan hedef gen tahmin programlarına ait ortak veriyi kullanmaktadır.

Her iki miRNA için de elde edilen hedef genlerin güvenilirliğini artırmak için, her dört veri tabanında da ortak hedef genler Venn diyagramı kullanılarak belirlenmiştir.

2.7.2. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi (Gene Ontology Enrichment Analysis)

miRNA'lar için belirlenen dört veri tabanında da ortak bulunan hedef gen, yolak analizlerinin ve Gen Ontoloji (GO) analizlerinin yapılması için DAVID 6.8 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) çevrimiçi veri tabanı kullanılarak analiz edilmiştir. Yolak analiz sonuçları, *Ovis aries* seçilerek KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanında koyun türüne göre özgü olarak elde edilmiştir. Gen Ontoloji (GO) analizleri ise Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) çevrimiçi veri tabanına göre Biyolojik Fonksiyon, Hücresel Komponent ve Moleküler Fonksiyon olmak üzere üç farklı bölümde analiz edilmiştir.

2.7.3. Hedef genlere ait Protein-Protein İnteraksiyon (PPI) Ağı

Bu amaçla çevrim için STRING veri tabanı (<http://string-db.org/>) kullanılmıştır. Elde edilen ağ, en az bir başka liste üyesiyle fiziksel etkileşimler oluşturan protein alt kümesini içermiştir. STRING veri tabanında elde edilmiş olan genlere ait PPI ağları sonra, Cytoscape paket programı kullanılarak bu miRNA'lara ait "hub" genler saptanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Gruplarının Özelliklerinin Belirlenmesi

Araştırmada, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığınca yürütülen, Elazığ ili halk elinde küçükbaş hayvan ıslah ülkesel projesinde (Proje adı: Şavak Akkaraman-3, Proje Kodu: 23SAV2012-3) kayıtlı koyunlar kullanılmıştır. Koyunlara ait süt verimi yüksek ve düşük iki grup oluşturulmuştur. Bu koyunlar düzenli olarak aşılama yapıları ve kayıtları tutulan hayvanlardır. Bir önceki yıla ait sürünün laktasyon süt verimi ortalaması 72 litredir. Bu kayıtlardan yararlanılarak sürünün bir önceki yıla ait laktasyon verim ortalamasının altında kalan hayvanlar süt verimi düşük gruba, laktasyon süt verim ortalamasının üzerinde kalan hayvanlar ise süt verimi yüksek gruba dâhil edilmiştir.

Laktasyon pik dönemine denk gelen miRNA izolasyonu için süt örneği toplanırken, hayvanların süt verimlerinde el ile sağım yöntemiyle sağılan hayvanlardan sabah sağımı sırasında 1000 mililitrelik mezür kullanılarak Şekil 3.1'deki gibi ölçülmüştür. Lactoscan analizinde, laktasyon başında (Şubat) ve sonunda (Haziran) süt kompozisyonundaki farklılığı ortaya koymak için Haziran ayında koç katımı öncesi süt kompozisyonu analizleri tekrar gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.1'deki gibidir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan koyunlara ait Şubat ayı süt verimleri.

Süt verimi yüksek grup		Süt verimi düşük grup	
Örnek no	Süt verimi (ml)	Örnek no	Süt verimi (ml)
7	1250	2	250
17	650	3	450
21	800	14	400
25	700	16	250
27	1150	26	300
29	1500	30	300
34	550	31	300
35	800	36	250
37	900	40	250
38	800	45	400
41	900	46	300
43	600	49	300
44	1200	54	300
47	600	55	400
51	700	56	400
52	800	62	450
66	750	63	250
71	750	64	300
74	900	67	300
77	1150	72	350



Şekil 3.1. Süt verimi ölçümü.

Araştırmada miRNA analizinin yapılacağı, laktasyon pik dönemine denk gelen Şubat ayında süt verimleri ölçülmüştür. İki gruba ait hayvanların süt verimleri arasında ise Çizelge 3.2’de belirtildiği şekilde anlamlı bir fark bulunmuştur ($P \leq 0,01$).

Çizelge 3.2. Süt verimi yüksek ve süt verimi düşük grubun şubat ayına ait süt verimlerinin karşılaştırılması.

	Süt Verimi Yüksek		Süt Verimi Düşük		
	M	SD	M	SD	t-test
Süt Verimi	872,5	252,604	325,00	67,8620	0,000**

(** $P \leq 0,01$); M: Mean (ortalama) SD: Standart Sapma

3.2. California Mastitis Testi (CMT) ve Somatik Hücre Sayımı (SHS) sonuçları

Hayvanların sağlıklı olduğunu doğrulamak için Brucella ve Mastitis açısından sağlıklı hayvanlar seçilmiştir.

Subklinik mastitisin tanısı için seçilen 80 adet, 4 yaşında, Akkaraman ırkı koyundan sabah sağımından önce SHS testi yapılmak üzere iki meme lobundan süt örneği alınarak CMT testi uygulanmıştır. 80 koyuna uygulanan CMT sonucu 17 adet CMT pozitif, 63 adet CMT negatif sonuç elde edilmiştir. CMT (+) sonuç veren hayvanlar örnekleme dışında bırakılmıştır.

Somatik hücre sayısı, çiğ sütün kalitesini belirlemede ve meme sağlığının yaygın olarak kullanılan önemli bir ölçüttür. Sütte bulunan somatik hücreleri oluşturan hücreler; plazma hücreleri, çekirdeksiz kırmızı kan hücreleri ile lökositler, epitel hücreler ve epitel hücre döküntüleridir. SHS; hayvanın yaşı ve laktasyon sayısı, laktasyonun dönemi, stres varlığı, mevsimsel değişkenler ve beslenme durumu gibi birçok etkene bağlı olarak değişir. Ancak bu etkenlerin yanında sütteki somatik hücre sayısındaki artışa sebep olan en önemli neden mastitistir. Mastitis nedeniyle sütte SHS'nın artması ile süt verimindeki azalma arasında doğrusal bir ilişki olduğu bildirilmektedir (Önal ve Özder, 2007; Patır ve ark., 2010).

Somatik hücre sayısı sütün kalitesinin ve hijyenik özelliklerinin incelenmesinde bir belirteçtir. Sütteki SHS'nın 1×10^5 adet/ml veya altında olması memenin sağlıklı olarak nitelendirilmesine yardımcı olurken bu değerin üstündeki durumlar ise mastitisin varlığına işaret etmektedir (Heeschen ve Reichmuth 1995; Shearer ve ark., 1992).

Kalan 63 CMT (-) hayvanlardan alınan süt örneklerinden elde edilen SHS sonuçlarına göre 1×10^5 adet/ml üzerinde SHS sonucu veren hayvanlar örnekleme dışı bırakılmıştır.

CMT (-) ve $SHS < 1 \times 10^5$ adet/ml şartlarını sağlayan hayvanlar arasından verim ortalamalarına bakılarak 20 adet süt verimi düşük, 20 adet süt verimi yüksek koyun seçilerek çalışma grupları oluşturulmuştur.

SHS ile süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasında istatistikî olarak fark bulunmamıştır (Çizelge 3.3). Bu sonuç grupları oluşturan bireylerin hepsinin 1×10^5 adet/ml değerinin altında seçilmiş olması nedeniyle iki grup arasında meme sağlığı açısından fark olmadığının, her iki gruptaki bireylerinde meme dokusu sağlıklı hayvanlardan oluştuğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir.

SHS ve CMT sonuçlarına ait bulgular EK-6 'da sunulmuştur.

Çizelge 3.3. SHS ve Gruplar arasında anlamlı farklılık karşılaştırılması.

	Yüksek		Düşük		t-test
	M	SD	M	SD	
Somatik Hücre Sayısı	61,3	47,1	58,2	41,7383	0,83

M: Ortalama SD: standart sapma

3.3. Lactoscan Sonuçları

Gruplardaki bireylere ait süt kompozisyonları Master Classic LM2 (Milkotester, Bulgaria) cihazı ile Şubat (Laktasyon piki) ve Haziran (Laktasyon sonu) aylarında olmak üzere iki kez analiz edilmiştir.

Ölçülen parametreler yağ, yağsız kuru madde, yoğunluk, protein, tuz, laktoz, donma noktası ve iletkenliktir. Şubat ve Haziran ayları Lactoscan analizi sonuçlarında elde edilen bulgular Ek 2 ve Ek 3'te listelenmiştir.

Laktasyon pik dönemi (Şubat) ve Laktasyonun son dönemine (Haziran) ait lactoscan analizi sonuçları Eşleştirilmiş Örneklem Testi (Paired Samples T) Test ile karşılaştırıldığında protein, yağ ve laktoz oranları arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir (Çizelge 3.4). Bu sonuçlar laktasyon boyunca süt veriminin ve süt kompozisyonun değişkenlik gösterdiğini ve dinamik bir süreç olduğunu doğrulamaktadır.

Çizelge 3.4. Şubat-Haziran ayları süt kompozisyonundaki anlamlı farklılıklar.

	Şubat(M±SD)	Haziran (M±SD)	P
Protein	3,92±0,13	4,01±0,16	0,01**
Laktoz	5,94±0,21	6,05±0,23	0,03*
Yağ	6,05±1,68	10,24±1,15	0,00**

(*P≤ 0,05 , **P ≤0,01); M: Ortalama SD: Standart Sapma

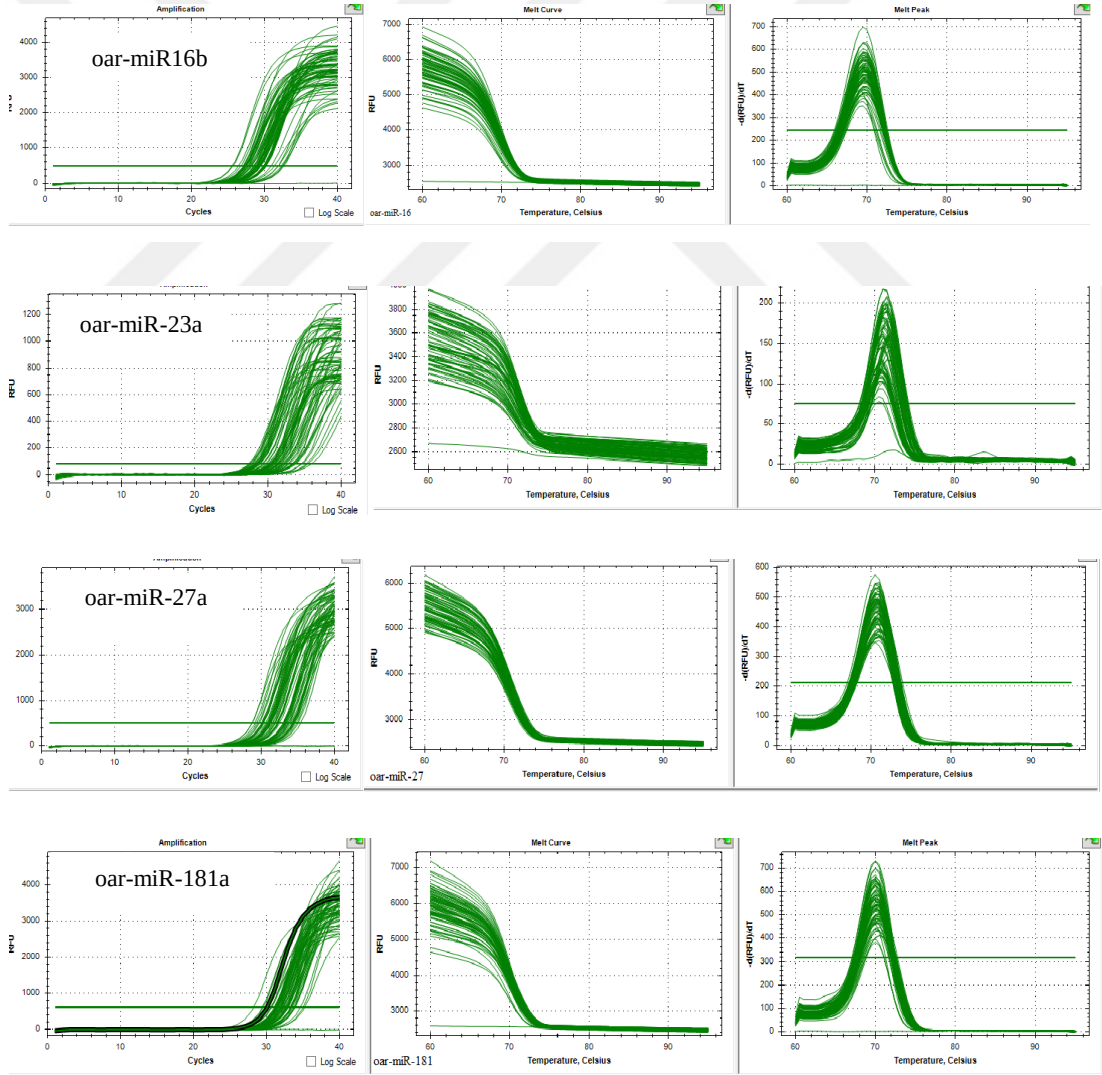
3.4. Süt Örneklerinden RNA İzolasyonu Sonuçları

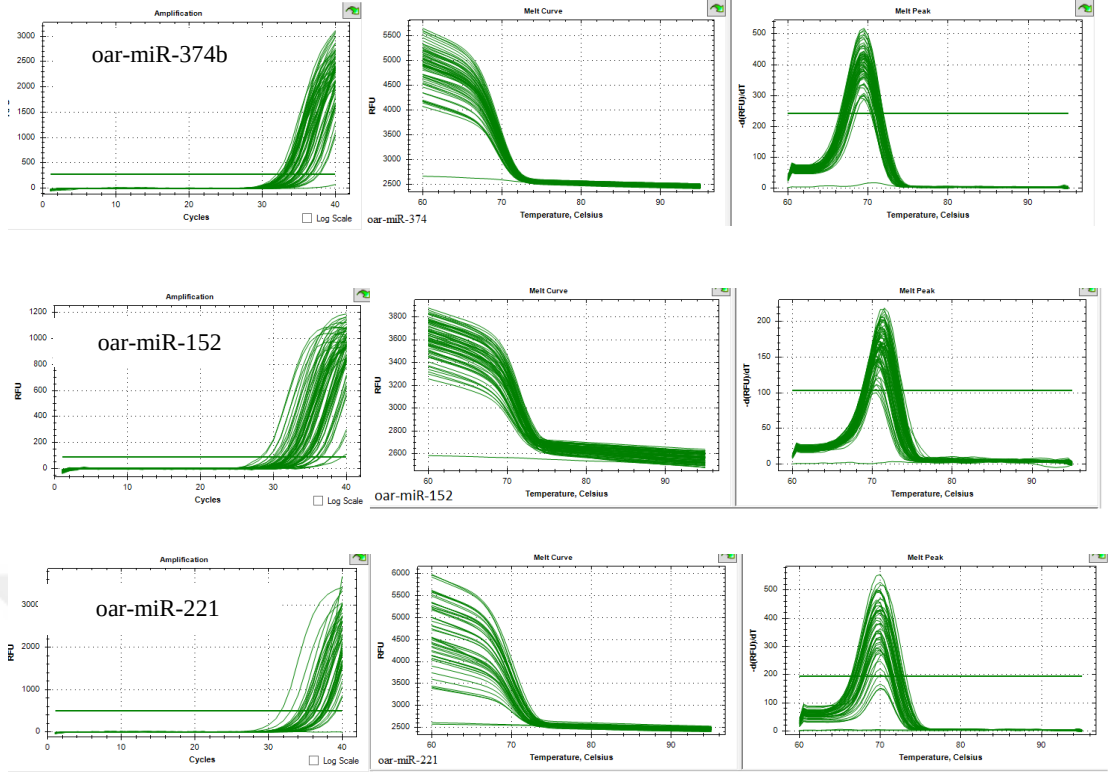
miRNeasy Serum/Plasma Kit kullanılarak RNA izolasyonu kit protokolüne göre gerçekleştirmiştir. Elde edilen RNA'ların miktarın ve kalitesini belirlemek amacıyla Nanodrop (Thermo, NanoDrop ND-2000C) ölçümleri gerçekleştirilerek elde edilen miRNA'ların saflığı doğrulanmıştır. 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbans oranı DNA ve RNA'nın saflık derecesini ölçmek için kullanılmaktadır. Elde edilen nükleik asitin saf olarak elde edilmiş olduğunun göstergesi olan 260/280 oranı DNA için yaklaşık 1.8, RNA için yaklaşık 2.0 değerinde olmalıdır. RNA izolasyonu sonrası Nanodrop ölçümünden elde edilen sonuçlar Ek 4'de özetlenmiştir.

3.5. Real-Time PZR sonuçları

Real-Time PZR (qPZR) deneyleri sonucu elde edilen ortalama Ct değerleri Ek 5 'te listelenmiştir. Bu değerler relatif kantitasyonda kullanılmış olup, bütün reaksiyonlar iki teknik replika olacak şekilde uygulanmıştır ve hesaplamada elde

edilen iki değerin ortalaması alınmıştır. Ct değeri belirtilmemiş örneklerde amplifikasyon olmamıştır. Çalışmaya dahil olan *oar-miR-485* iki kez reaksiyon kurulmasına rağmen çalışmamıştır (Ek 7). Bu primerlerin çalışmama sebebinin *oar-miR-485*'e ait baz dizilimindeki özellikle çekirdek (seed region) bölgesindeki nükleotit farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle ileride tasarlanacak çalışmalarda bu miRNA'ya ait dizi analizinin yapılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Oluşan bu amplifikasyon sorunu nedeniyle *oar-miR-485* çalışmadan çıkarılmıştır. *oar-miR-16b*, *oar-miR-23a*, *oar-miR-27a*, *oar-miR-181a*, *oar-miR-374b*, *oar-miR-152* ve *oar-miR-221*'e ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme grafikleri Şekil 3.2.'de görüldüğü gibidir.





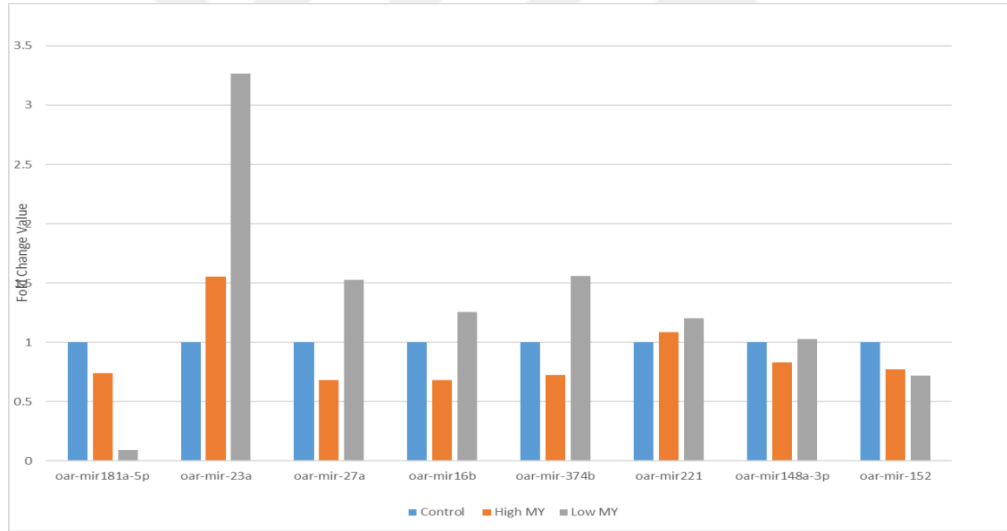
Şekil 3.2. *oar-miR-16b*, *oar-miR-23a*, *oar-miR-27a*, *oar-miR-181a*, *oar-miR-374b*, *oar-miR-152* ve *oar-miR-221* 'e ait amplifikasyon, erime eğrisi ve yükseltgenme grafikleri.

qPZR deneylerinde istatistiksel değerlendirmeler ΔC_t değerleri ile yapıp anlamlı fark gözlenmesi durumunda ekspresyon Livak ve Schmittgen (2001)'in tasarladığı metoda göre $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile analiz edilen miRNA'lara ait kat değişimleri hesaplanmıştır.

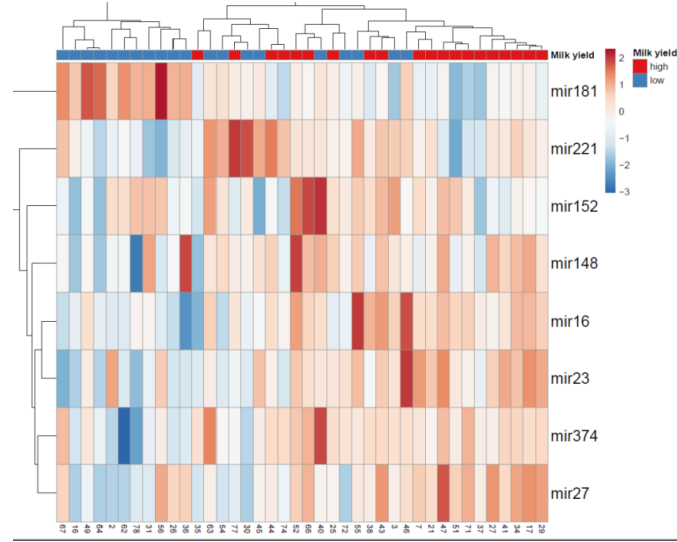
$2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri Çizelge 3.5, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de özetlenmiştir. Örneklerin ΔC_t değerleri hesaplanırken normalizasyonlar *oar-mir-103* 'e göre yapılmıştır.

Çizelge 3.5 Süt verimi yüksek ve süt verimi düşük gruplara ait miRNA'ların kat değişim değerleri (Fold change).

	Kontrol	Yüksek Süt Verimi	Düşük Süt Verimi
<i>oar-mir181a-5p</i>	1	0.74	0.09
<i>oar-mir-23a</i>	1	1.55	3.26
<i>oar-mir-27a</i>	1	0.68	1.53
<i>oar-mir16b</i>	1	0.68	1.26
<i>oar-mir-374b</i>	1	0.73	1.56
<i>oar-mir221</i>	1	1.08	1.20
<i>oar-mir148a-3p</i>	1	0.83	1.03
<i>oar-mir-152</i>	1	0.77	0.72



Şeki 3.3. Süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri (P değeri <0.05).



Şekil 3.4. Yüksek ve düşük süt verimli gruptaki bireylere ait miRNA ekspresyon seviyelerine ait ısı haritası (heat map).

Süt verimi, Lactoscan sonuçları ve miRNA ekspresyonları incelendikten sonra gruplar arası istatistiksel analizler SPSS paket programı (PASW statistics 18) kullanılarak yapılmıştır.

Gruplar arasında ekspresyon seviyesinde anlamlı farklılık gösteren miRNA'lar *oar-miR-181a*, *oar-miR-23a*, *oar-miR-27a*, *oar-miR-16b* ve *oar-miR-374* olarak bulunmuştur. Bu miRNA'ların gruplar arasında anlamlılık düzeylerini belirlemede Student T testi kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.6' da özetlenmiştir.

Çizelge 3.6. miRNA'ların gruplar arası anlamlılık düzeyleri.

miRNA	Süt Verimi Yüksek Grup		Süt Verimi Düşük Grup		t-test
	M	SD	M	SD	
<i>oar-miR-181a</i>	-1,02	1,35	-1,76	1,34	0,00**
<i>oar-miR-23a</i>	-2,72	1,27	-3,79	1,82	0,03*
<i>oar-miR-27a</i>	-0,61	0,89	-1,74	0,9	0,00**
<i>oar-miR-16b</i>	-1,31	0,90	-2,20	1,31	0,02*
<i>oar-miR-374</i>	1,54	0,52	0,35	1,71	0,00**

(*P≤0,05 **P≤0,01) M: Ortalama SD: Standart Sapma

Gruplar arasında süt kompozisyonu açısından istatistiksel bir fark olup olmadığını belirlemek için Şubat ayına ait lactoscan sonuçları Student T Testi ile

analiz edilmiştir. Süt yağı dışındaki süt kompozisyonu ile ilişkili tüm parametlerde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Süt kompozisyonu açısından süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar.

	Yüksek		Düşük		t-test
	M	SD	M	SD	
Yağsız Kuru Madde	10,85	0,39	11,19	0,38	0,01**
Protein	3,87	0,13	3,97	0,12	0,01*
Laktoz	5,86	0,20	6,02	0,19	0,01*
Yağ	6,62	1,38	5,96	1,19	0,13

(*P≤0,05 , **P≤0,01); M: Ortalama Değer SD: Standart Sapma

Süt verimi, süt kompozisyonu ve miRNA ifadeleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla gruplar arasında anlamlı fark gösteren miRNA'lar için korelasyon analizi yapılmıştır. Spearman Korelasyon Testi sonucunda, yüksek süt verimli grupta *oar-miR-27a* ile protein ve laktoz arasında; *oar-miR-16b* ile süt verimi arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Düşük süt verimli grupta incelenen parametreler arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Sonuçlar ve testin anlamlılık düzeyi Çizelge 3.8'deki gibidir.

Çizelge 3.8. Yüksek süt verimli grupta *oar-miR-27a* ile protein ve laktoz, *oar-miR-16b* ile süt verimi korelasyonu.

miRNA	Korele olduğu parametre	N	Korelasyon anlamlılık düzeyi	P
<i>oar-miR-27a</i>	Protein	19	-0,46*	0,04
<i>oar-miR-27a</i>	Laktoz	19	-0,46*	0,04
<i>oar-miR-16b</i>	Süt Verimi	19	-0,45*	0,04

(*P≤0,05, **P≤0,01)

3.6. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

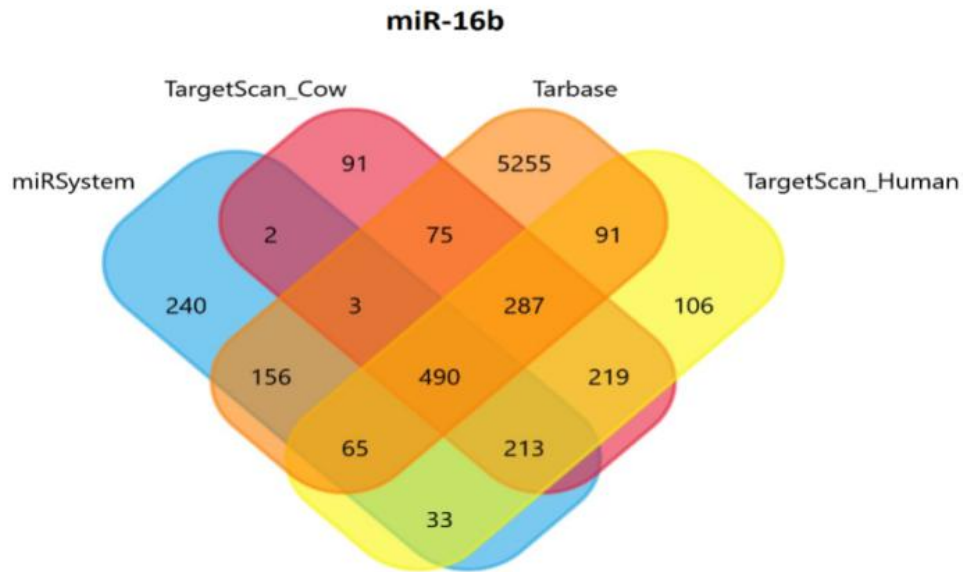
Bulgular kısmında açıklandığı üzere *oar-miR-16b* ile süt verimi arasında negatif korelasyon; *oar-miR-27a* ile de süt protein ve laktozu arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Bu nedenle biyoinformatik analizler *oar-miR-16b* ile *oar-miR-27a*'ya uygulanmıştır. Çalışmada ekspresyon seviyelerinde farklılık bulunan *oar-miR-181a*, *oar-miR-23a* ve *oar-miR-374b*'ye ait analizler gösterilmemiştir.

3.6.1. Farklı eksprese edilen miRNA'lara ait hedef gen tahmini

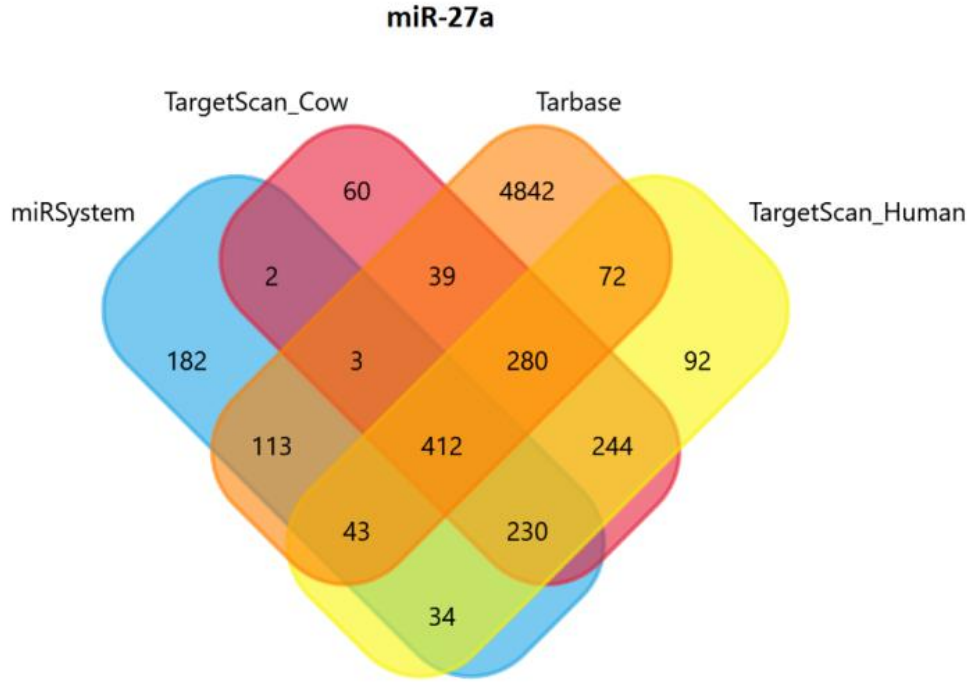
oar-miR-16b ile *oar-miR-27a*'ya ait hedef genlerin belirlenmesinde materyal ve metod bölümünde belirtilen veri tabanları kullanılmıştır. TargetScan'de *Bos taurus* (Venn diagramından TargetScan_Cow olarak gösterilmektedir.) ve *Homo Sapiens* (Venn diagramından TargetScan_Human olarak gösterilmektedir.) için ayrı ayrı türlere göre arama yapılmıştır.

oar-miR-16b için Venn diyagramında her dört veri tabanındaki ortak genler gösterilmiştir (Şekil 3.5). Buna göre *hsa-miR-16b-5p* için miRSystem veri tabanında 1087 gen, *bta-miR-16b* için TargetScan veri tabanında 1352 hedef gen, *hsa-miR-16b-5p* için TargetScan veri tabanında 1472 gen ve *hsa-miR-16b-5p* için Tarbase veri tabanında insanda validasyonu yapılmış 6334 hedef gen belirlenmiştir. Şekil 3.5'de görüldüğü üzere bu hedef genlerden 490 tanesinin her dört veri tabanında da ortak olduğu saptanmıştır.

oar-miR-27a için ise 412 adet hedef genin her dört veri tabanında da ortak olduğu saptanmıştır (Şekil 3.6).



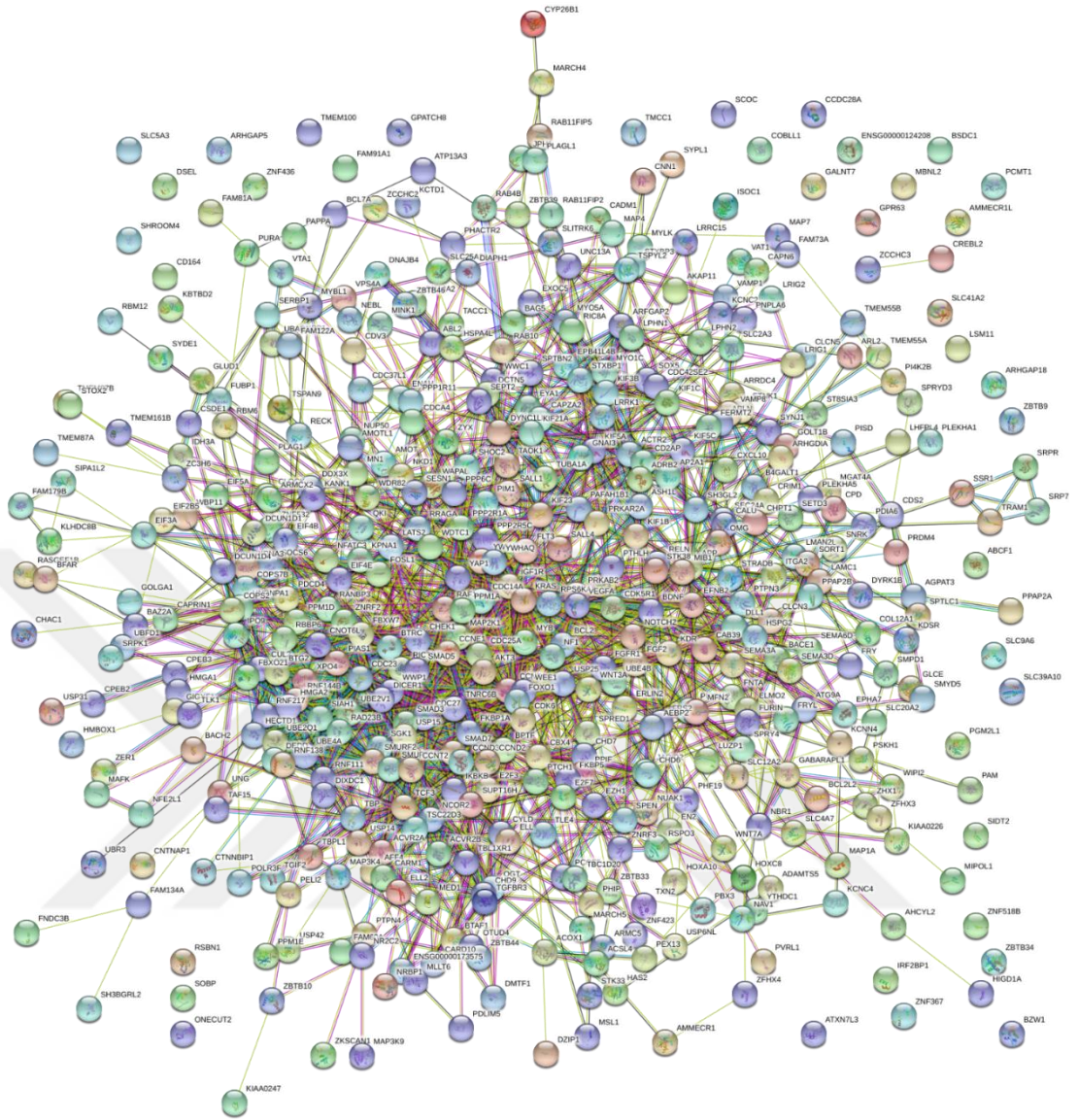
Şekil 3.5. *miR-16b*'ye ait miRSystem, TargetScan (*Bos taurus* ve *Homo sapiens*) ve Tarbase online veri tabanları tarafından ortak belirlenen genlere ait Venn diagramı.



Şekil 3.6. *miR-27a*'ya ait miRSystem, TargetScan (*Bos taurus* ve *Homo sapiens*) ve Tarbase online veri tabanları tarafından ortak belirlenen genlere ait Venn diagramı.

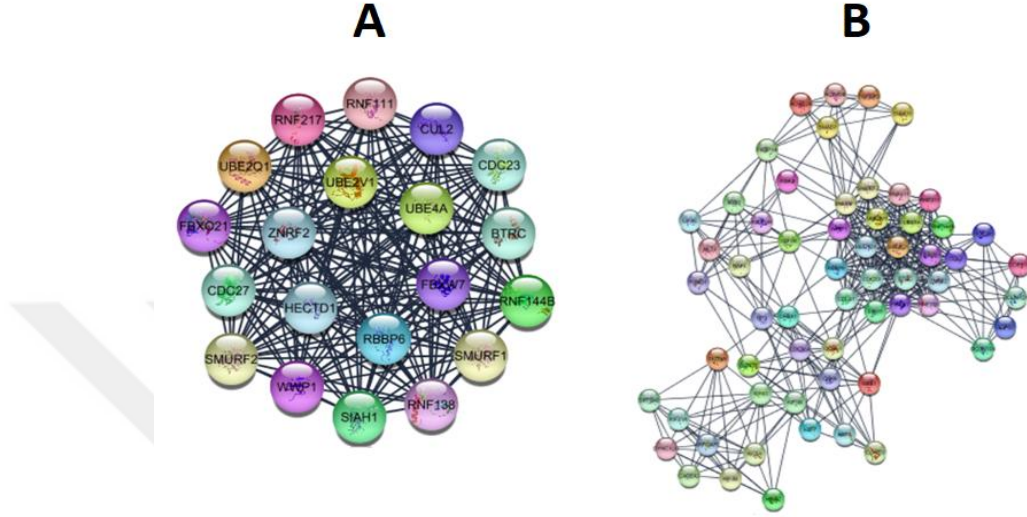
3.6.2. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi (Gene Ontology Enrichment Analysis) ve Hedef genlere ait Protein-Protein İnteraksiyon (PPI) Ağı sonuçları

STRING veri tabanı (<http://string-db.org/>) kullanılmıyarak oluşturulan *miR-16b* için belirlenen 490 adet ve *miR-27a* için belirlenen 412 adet hedef gene ait oluşturulan PPI ağı sırasıyla Şekil 3.7'de ve 3.8'de gösterilmiştir. STRING veri tabanında elde edilmiş olan *miR-16b* ve *miR-27a* için belirlenen sırasıyla 490 ve 412 gene ait PPI ağları sonra, Cytoscape paket programı kullanılarak bu mirRNA'lara ait "hub" genler saptanmıştır. Buna göre *miR-16b* ve *miR-27a* için iki temel "hub" gen ağı belirlemiştir.

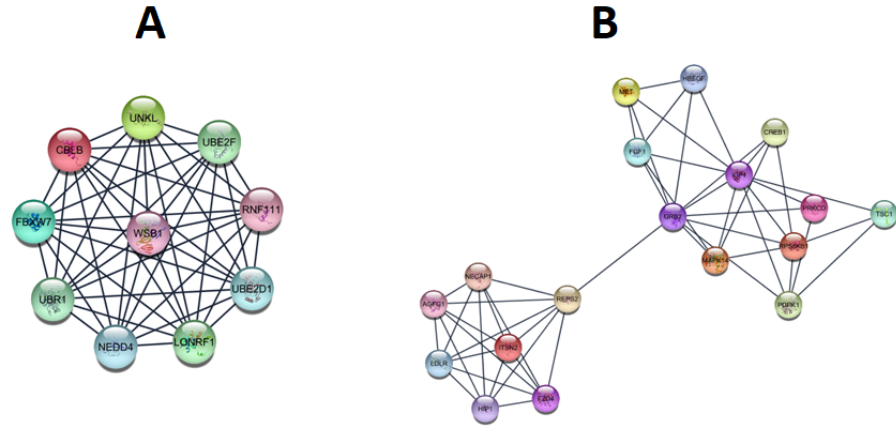


Şekil 3.7. *miR-16b*'ye ait belirlenen 490 adet hedef genin PPI ağı.

16b ve miR-27a için belirlenen sırasıyla 80 ve 28 adet gen daha sonra açıklandığı üzere DAVID veri tabanı kullanılarak, KEGG ile yolak analizi ve GO analizlerine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.9. miR-16b için belirlenen hub genler. A) 20 adet gen içeren birinci modüle ait PPI ağı. B) 60 adet gen içeren ikinci modüle ait PPI ağı.



Şekil 3.10. miR-27a için belirlenen hub genler. A) 10 adet gen içeren birinci modüle ait PPI ağı. B) 18 adet gen içeren ikinci modüle ait PPI ağı.

Çizelge 3.9. *miR-16b* ve *miR-27a* için belirlenen “hub” genlerin listesi.

miR-16b		miR-27a		miR-16		miR-27a	
Modül 1'e ait belirlenen 20 adet gen		Modül 1'e ait belirlenen 10 adet gen		Modül 2'ye ait belirlenen 60 adet gen		Modül 2'ye ait belirlenen 18 adet gen	
CDC23		LONRF1		KIF23	DCUN1D4	RICTOR	TSC1
HECTD1		NEDD4		DCTN5	SMAD7	E2F7	HIP1
RNF144B		CBLB		KIF1B	CDC25A	EIF4E	PRKCD
ZNRF2		RNF111		NF1	SMAD5	RNF138	ITSN2
RNF111		UNKL		KIF1C	FBXW7	CCND2	CREB1
UBE2V1		FBXW7		COPS2	SMURF1	RBBP6	REPS2
CUL2		UBE2D1		RNF217	BTRC	CCND3	RPS6KB1
FBXO21		WSB1		TGFBR3	KIF21A	E2F3	NECAP1
RNF217		UBR1		CDK6	SMURF2	IGF1R	LDLR
UBE4A		UBE2F		COPS7B	CDC27	HECTD1	GRB2
WWP1				DYNC1LI2	CHEK1	ZNRF2	AGFG1
FBXW7				UBE2Q1	KIF3B	CAPZA2	PDPK1
SMURF1				SOC6	CDC23	FKBP1A	MAPK14
BTRC				SIAH1	RAF1	WEE1	FGF1
UBE2Q1				SPTBN2	UBE2V1	IKBKB	IGF1
SMURF2				FOXO1	FBXO21	ACVR2A	HBEGF
RNF138				RNF111	CCNE1	ACVR2B	
SIAH1				AKT3	UBE4A	ARFGAP2	
RBBP6				CUL2	WWP1	SGK1	
CDC27				DCUN1D1	KIF5A	RNF144B	

miR-16b Modül 1'e ait 20 adet genin KEGG yolak analiz sonucuna göre (Çizelge 3.10) 20 adet hedef genin Ubiquitin aracılı proteolizis, Oosit maturasyonu, Endositozis, TGF-beta sinyal yolağı, Hücre döngüsü ve Wnt yolaklarında fonksiyonel olduğu bulunurken; *miR-16b* modül 2'e ait 60 adet genin KEGG yolak analiz sonucu ise (Çizelge 3.11) 60 adet hedef genin Ubiquitin aracılı proteolizis, Hücre döngüsü, PI3K-Akt sinyal yolağı, p53 sinyal yolağı, FoxO sinyal yolağı, TGF-beta sinyal yolağı, mTOR sinyal yolağı ve Progesteron aracılı oosit maturasyonu yolaklarında fonksiyonel olduğu bulunmuştur.

miR-27a Modül 1'e ait 10 adet gene ait KEGG yolak analiz sonucu ise (Çizelge 3.12) bu hedef genlerin Ubiquitin aracılı proteolizis ve Endositozis yolaklarında fonksiyonel olduğunu, Modül 2'ye ait 18 adet genin ise (Çizelge 3.13) PI3K-Akt sinyal yolağı, mTOR sinyal yolağı, Endokrin Direnci, AMPK sinyal yolağı, GnRH sinyal yolağı, Östrojen sinyal yolağı, İnsülin direnci, FoxO sinyal yolaklarında fonksiyonel olduğu bulunmuştur.

Gen Ontoloji (GO) Analiz sonuçlarına göre ise; *miR-16b* Modül 1'e ait 20 adet genin; Biyolojik Fonksiyon (BP) olarak başlıca protein ubikuitinasyonunda görev aldığı; Moleküler Fonksiyon (MF); ubikuitin protein ligaz aktivitesi, ligaz aktivitesi, protein bağlanma, çinko-iyon bağlanma; Hücresel Komponent (CC) olarak da en fazla gen sayısına göre sitozol, sitoplazma, nükleus da yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 3.11, Şekil 3.12).

miR-16b Modül 2'e ait 60 adet genin; Biyolojik Fonksiyon (BP); protein poliubikuitinasyonu ve protein ubikuitinasyonu, hücre bölünmesi, mikrotübül temelli hareket ve mitotik hücrelerin G1/S geçiş aşamasında fonksiyonel olduğu; Moleküler Fonksiyon (MF) da ise 60 adet genin 53 tanesi protein bağlanmasında fonksiyonel bulunurken, Hücresel Komponent (CC) olarak da sitozol, sitoplazma ve nükleus'da yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 3.13, Şekil 3.14).

miR-27a Modül 1'e ait 10 adet genin, Biyolojik Fonksiyon; Biyolojik Fonksiyon (BP) ; protein poliubikuitinasyonu ve protein ubikuitinasyonu; Moleküler

Fonksiyon (MP) bakımından ubikuitin protein transferaz aktivitesi ve protein bağlanmasında fonksiyonel bulunurken; tahminlenen *miR-27a* Modül 1'e ait 10 adet genin Hücresel Komponent (CC) olarak sitozol ve sitoplazma da yer aldığı saptanmıştır. (Şekil 3.15)

miR-27a Modül 2'ye ait 18 adet genin ise, Biyolojik Fonksiyon (BP) olarak protein stabilizasyonu ve sinyal iletiminde görevli olduğu; Moleküler Fonksiyon (MP) bakımından protein bağlanmasında fonksiyonel bulunurken; tahminlenen *miR-27a* Modül 2'ye ait 18 adet genin 10 tanesi Hücresel Komponent (CC) olarak plazma membranında fonksiyonel bulunmuştur (Şekil 3.16, Şekil 3.17)



Çizelge 3.10. *miR-16b* Modül 1'e ait 20 adet genin KEGG yolak analiz sonucu.

Term	Database	ID	Input number	Background number	P-Value	Corrected P-Value
Ubiquitin mediated proteolysis	KEGG PATHWAY	oas04120	11	143	2.99E-09	4.48E-08
Hedgehog signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04340	3	49	8.48E+05	6.36E+06
Oocyte meiosis	KEGG PATHWAY	oas04114	3	113	9.43E+06	0.000472
Endocytosis	KEGG PATHWAY	oas04144	3	282	0.001308	0.004904
TGF-beta signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04350	2	84	0.001996	0.005946
Progesterone-mediated oocyte maturation	KEGG PATHWAY	oas04914	2	92	0.002378	0.005946
Cell cycle	KEGG PATHWAY	oas04110	2	130	0.004623	0.009906
Wnt signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04310	2	141	0.005401	0.010127
HTLV-I infection	KEGG PATHWAY	oas05166	2	285	0.020436	0.03406
Circadian rhythm	KEGG PATHWAY	oas04710	1	32	0.025247	0.037871
Renal cell carcinoma	KEGG PATHWAY	oas05211	1	65	0.04989	0.068032
p53 signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04115	1	76	0.057972	0.072465
HIF-1 signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04066	1	102	0.076817	0.088635
Hippo signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04390	1	155	0.114132	0.122285
Pathways in cancer	KEGG PATHWAY	oas05200	1	397	0.267086	0.267086

Çizelge 3.11. *miR-16b* modül 2'ye ait 60 adet genin KEGG yolak analiz sonucu.

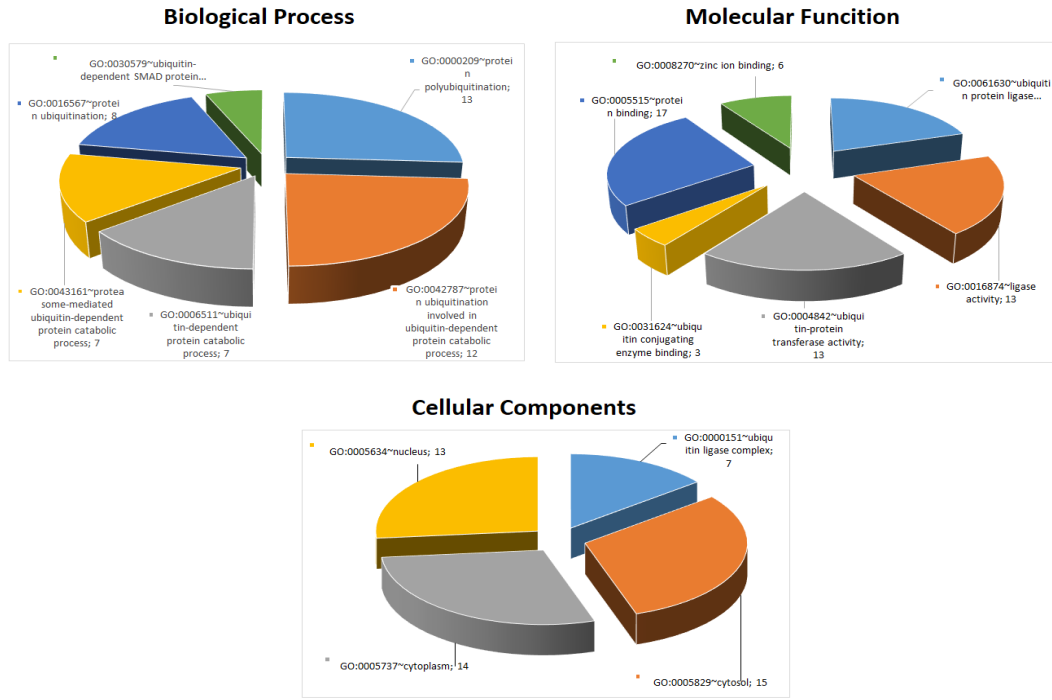
Database	#Term	ID	Input number	Background number	P-Value	Corrected P- Value
KEGG_PATHWAY	Ubiquitin mediated proteolysis	oas04120	11	143	8.77E-03	9.91E-01
KEGG_PATHWAY	Cell cycle	oas04110	10	130	1.28E-01	7.25E+00
KEGG_PATHWAY	Prostate cancer	oas05215	7	85	2.37E+02	8.94E+03
KEGG_PATHWAY	PI3K-Akt signaling pathway	oas04151	10	358	1.64E+03	4.62E+03
KEGG_PATHWAY	MicroRNAs in cancer	oas05206	8	196	3.02E+03	6.83E+04
KEGG_PATHWAY	p53 signaling pathway	oas04115	6	76	4.47E+03	7.54E+04

Çizelge 3.12. *miR-27a* modül 1'e ait 10 adet genin KEGG yolak analiz sonucu.

Database	TERM	ID	Input number	Background number	P-Value	Corrected P-Value
KEGG_PATHWAY	FoxO signaling pathway	oas04068	7	134	4.67E+03	7.54E+04
KEGG_PATHWAY	TGF-beta signaling pathway	oas04350	6	84	7.84E+03	1.11E+04
KEGG_PATHWAY	mTOR signaling pathway	oas04150	7	152	1.07E+04	1.34E+05
KEGG_PATHWAY	Progesterone-mediated oocyte maturation	oas04914	6	92	1.31E+03	1.47E+05
	Endocytosis	oas04144	2	282	0.005651	0.031078
KEGG_PATHWAY	Ubiquitin mediated proteolysis	oas04120	5	143	1.84E+02	2.02E+03

Çizelge 3.13. *miR-27a* modül 2'e ait 18 adet genin KEGG yolak analiz sonucu.

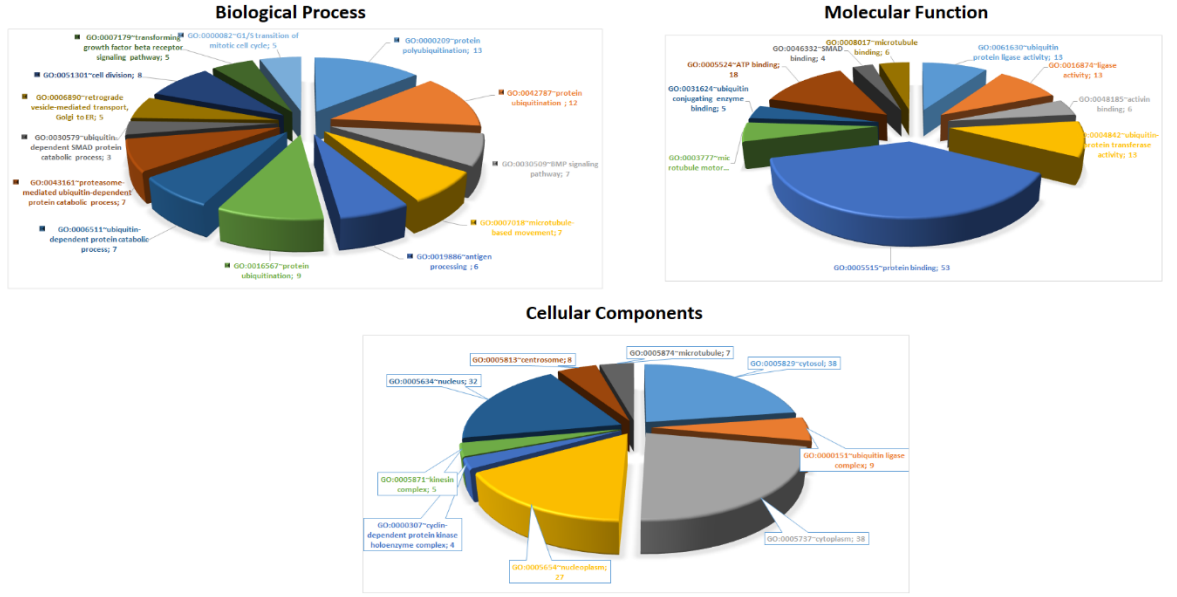
#Term	Database	ID	Input number	Background number	P-Value	Corrected P-Value
Proteoglycans in cancer	KEGG PATHWAY	oas05205	8	210	1.38E-01	1.62E+01
PI3K-Akt signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04151	8	358	8.70E+00	5.09E+02
mTOR signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04150	6	152	1.13E+02	4.39E+03
Endocrine resistance	KEGG PATHWAY	oas01522	5	97	9.21E+02	2.70E+04
AMPK signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04152	5	125	3.13E+03	7.32E+04
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	KEGG PATHWAY	oas01521	4	82	4.14E+04	7.95E+05
Prostate cancer	KEGG PATHWAY	oas05215	4	85	4.75E+04	7.95E+05
GnRH signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04912	4	90	5.92E+04	8.66E+05
Longevity regulating pathway	KEGG PATHWAY	oas04211	4	97	7.91E+04	9.46E+05
Estrogen signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04915	4	99	8.55E+03	9.46E+05
Choline metabolism in cancer	KEGG PATHWAY	oas05231	4	100	8.89E+04	9.46E+05
Insulin resistance	KEGG PATHWAY	oas04931	4	113	1.43E+05	1.39E+06
Neurotrophin signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04722	4	123	1.98E+04	1.78E+06
FoxO signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04068	4	134	2.75E+05	2.21E+06
Hepatitis C	KEGG PATHWAY	oas05160	4	135	2.83E+05	2.21E+06
Insulin signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04910	4	139	3.17E+04	2.32E+06
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	KEGG PATHWAY	oas04550	4	142	3.45E+05	2.37E+06
Pathways in cancer	KEGG PATHWAY	oas05200	5	397	8.26E+05	5.37E+06
Rap1 signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04015	4	211	1.59E+06	9.38E+05
Focal adhesion	KEGG PATHWAY	oas04510	4	212	1.62E+06	9.38E+05
Fc epsilon RI signaling pathway	KEGG PATHWAY	oas04664	3	66	1.68E+05	9.38E+05



Şekil 3.11. *miR-16b* Modül 1 de bulunan 20 adet gene ait Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hüresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucu.



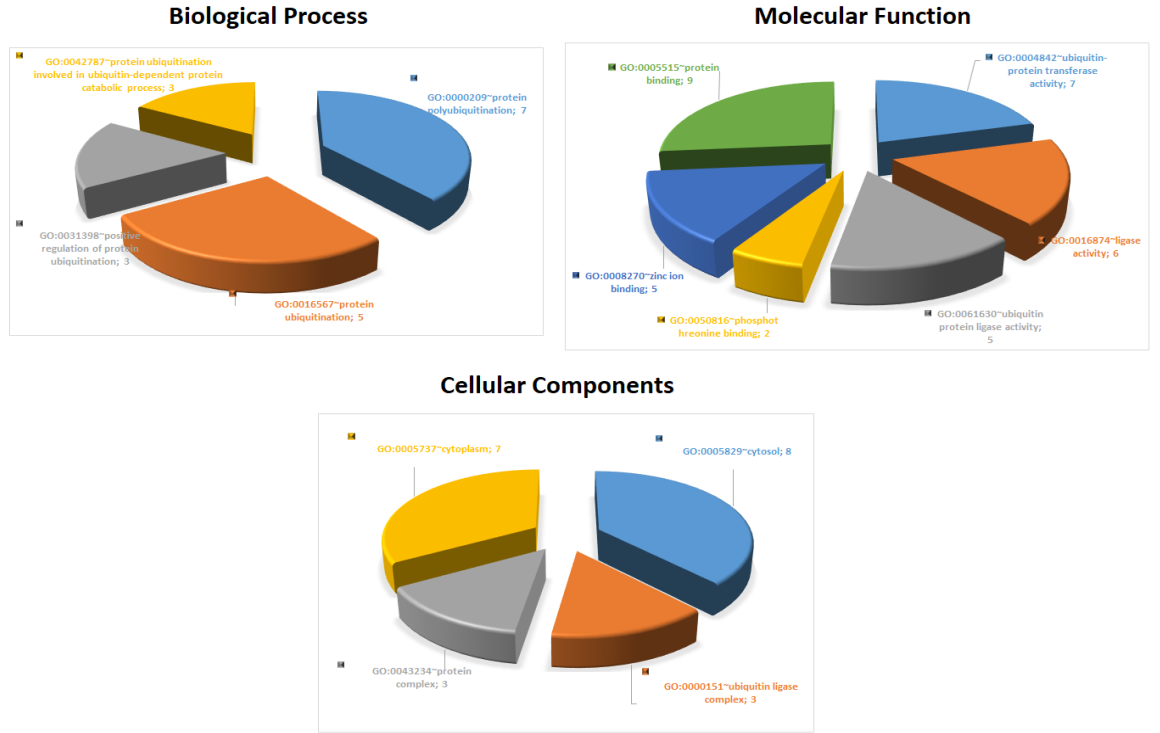
Şekil 3.12. *miR-16b*-Modül 1 de bulunan 20 adet gene ait hedef miRNA tahmin ve Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hüresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucuna ait grafik.



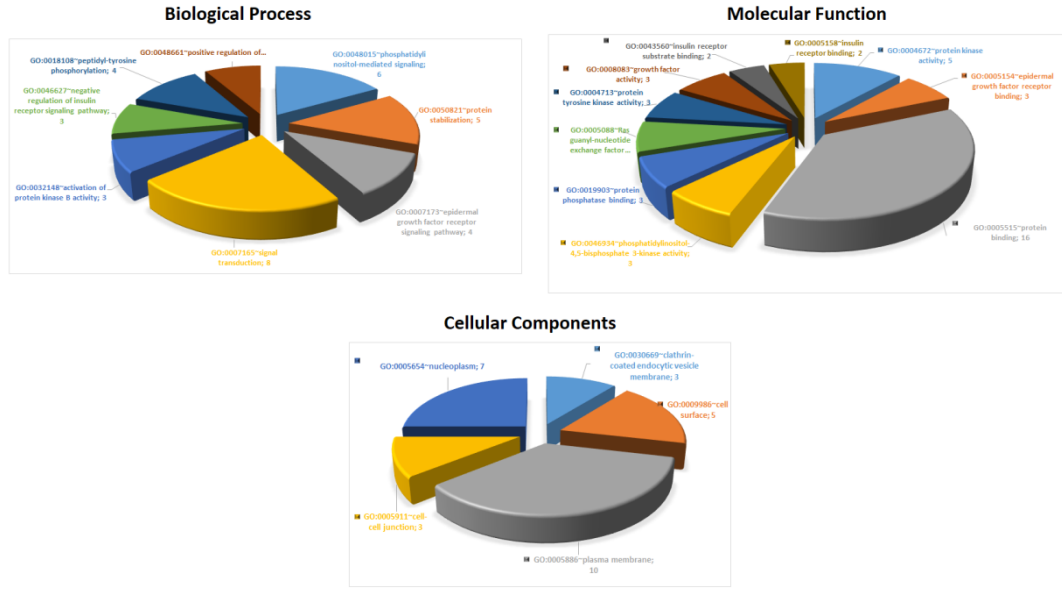
Şekil 3.13. *miR-16b* Modül 2 de bulunan 60 adet gene ait Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hücresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucu.



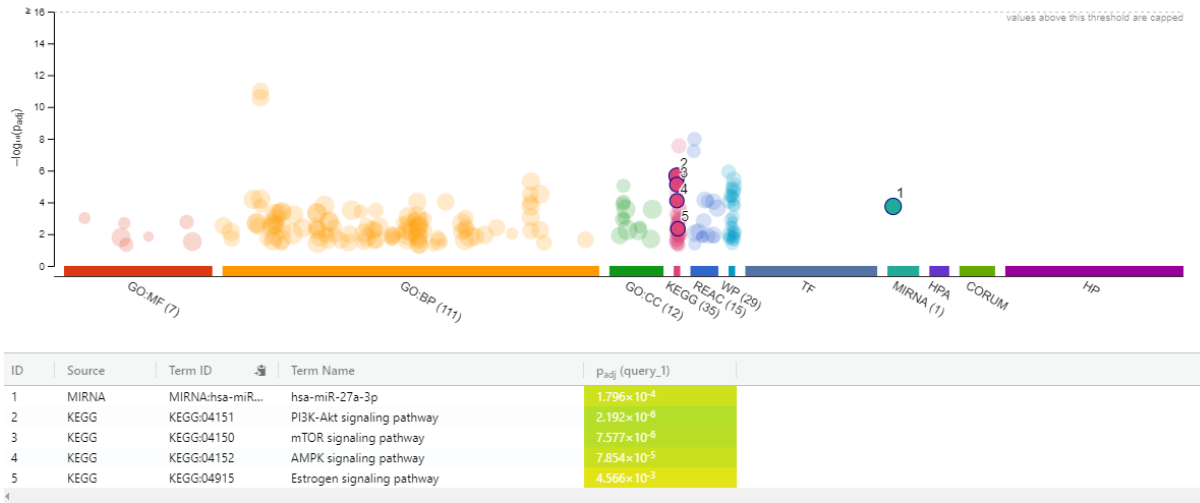
Şekil 3.14. *miR-16b* Modül 2 de bulunan 60 adet gene ait hedef miRNA tahmin ve Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hücresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucuna ait grafik.



Şekil 3.15. *miR-27a* Modül 1 de bulunan 10 adet gene ait Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hücresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucu.



Şekil 3.16. *miR-27a* Modül 2 de bulunan 18 adet gene ait Biyolojik Fonksiyon, Moleküler fonksiyon, Hüresel Komponent GO zenginleştirme analiz sonucu.



Şekil 3.17. *miR-27a* Modül 2 de bulunan 18 adet gene ait ait hedef miRNA tahmini ve KEGG yolak analizine ait tahminleme grafiği.

4. TARTIŞMA

Evcil çiftlik hayvanlarında miRNA çalışmaları temel olarak ekonomik önemi olan verimlerden özellikle süt, et, yumurta, döl verimi, embriyo yaşama gücü ve hastalıklara direnç gibi konular üzerine yoğunlaşmıştır. Bunlara ilave olarak miRNA'lar aynı zamanda çiftlik hayvanlarında görülen belirli hastalıkların tanılmal test ve biyobelirteci olarak ta kullanılmakta ve araştırılmaktadır (Fatima, 2019). 2019 miRBase kayıtlarına göre sığırlarda 1085, koyunlarda 153, keçilerde 267 adet miRNA tanımlanmıştır (miRBase, 2019). Bu rakamlardan da anlaşılmaktadır ki koyun türünde yapılan miRNA çalışmalarının sayısı oldukça azdır. Daha çok sığır türüne yönelinmiştir.

Koyun türünde tespit edilen miRNA sayısı ve hedef gen etki mekanizmasına yönelik çalışmalar oldukça sınırlı olmakla birlikte genellikle kas gelişimi ve döl verimi konularına yoğunlaşmıştır (Dinçel ve ark., 2018).

Bu çalışmanın hipotezi Akkaraman koyun ırkında laktasyonun pik döneminde, sütten izole edilen *oar-miR-181a*, *oar-miR-148a*, *oar-miR-16b*, *oar-miR-485-3p*, *oar-miR-374b*, *oar-miR-27a*, *oar-miR-23a*, *oar-miR-221* ve *oar-miR-152*' nin süt verimi ve süt kompozisyonu ile olası ilişkisini araştırmaktır.

4.1. *oar-miR-16b*

miR-16, *miR-15* süper ailesi içerisinde bulunan 8 miRNA'dan birisidir. *miR-16*'nın süt verimi ve süt kompozisyonu üzerine etkisini araştıran çalışmalar son derece sınırlıdır.

miR-16 ile süt verimi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar sığır türünde yapılmış olup koyun türünde henüz uluslararası literatürde yayınlanmış bir çalışma mevcut değildir. Sığır türünde yapılan ilk çalışma ise Ammah ve ark. (2018)'nın çalışmasıdır. Rasyonlarına LSO (linseed oil, keten tohumu yağı) ve SFO (Safflower

oil, aspir yağı) ilave ettikleri iki grup laktasyondaki Holştayn ırkı ineklerden elde ettikleri meme dokusu ve kan örneklerinde kan triaçil gliserit ve esterleşmemiş yağ asitleri üzerine etkili olan ve süt verimi, sütün yağ, süt, protein ve laktoz oranına etkili miRNA'ları araştırdıkları çalışmalarında hub (diğer miRNA'lar ile en çok ilişkili) miRNA'ları *miR-30d*, *miR-484* ve *miR-16* olarak rapor etmişlerdir. İlgili çalışmada birbiriyle ilişkili veya koordine olabilecek miRNA'lardan oluşan 3 modül oluşturulmuş; süt proteini ile süt verimi üçüncü modülle, süt proteini, süt verimi ve süt laktoz oranı birinci modülle, süt yağ oranı ise ikinci modülle ilişkili bulunmuştur. Bu modülleri oluşturan miRNA'lar içerisinde ikinci modülde *bta-miR-374* ve *bta-miR-23*, üçüncü modülde ise *bta-miR-16a* ve *bta-miR-16b* bulunmaktadır. Çalışmada rasyonlarına SFO (Saturated Fatty Acid, Doymuş Yağ Asidi) katılan grupta özellikle *bta-miR-16*'nın farklı ifade seviyesi dikkat çekerken, SFO ile *bta-miR-16* arasında korelasyon olduğu rapor edilmiştir.

Mevcut çalışmada *oar-miR-16b* ifade seviyesi süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasında anlamlı derecede farklı bulunurken ($P \leq 0.05$), süt verimi yüksek grupta *oar-miR-16b* ile süt verimi arasında negatif korelasyon varlığı istatistiki olarak ortaya koyulmuştur. *oar-miR-16b* ve süt verimi arasındaki negatif korelasyon sonucu Ammah ve ark. (2018), çalışmasında üçüncü modüldeki süt verimi ve *miR-16* ilişkisini destekler niteliktedir.

Yine sığır türünde yapılan ikinci çalışma da Chen ve ark. (2019), farklı laktasyon dönemlerindeki (erken, pik, orta ve geç laktasyon) ineklerde miRNA ifade profilini inceleyerek *bta-miR-16*'nın ifadesinin bu dört dönemde de farklı olduğunu belirttikleri çalışmalarında *bta-miR-16* ile süt yağı arasında negatif bir ilişki olduğunu *miR-16* ifadesinin susturulduğunda TAG seviyesinin arttığını belirtmektedir. Mevcut araştırma tek laktasyon dönemini (pik laktasyon) kapsamakta olup süt yağı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

miR-16 ile ilgili araştırmalar daha çok hücre döngüsü üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu Amaçla Chu ve ark. (2018), *miR-15* süper ailesi (*miR15a*, *miR15b*, *miR16*, *miR195*, *miR322*, *miR424*, *miR457* ve

miR497) miRNA'larından *miR15b* ile meme epitelyum hücrelerinde hücre gelişimi üzerine etkili faktörleri inceledikleri çalışmalarında *miR-15b*'nin meme epitel hücrelerindeki lipid metabolizması arasında negatif korelasyon bulmuşlardır. *miR-15b*'nin *ERK*, *p-Erk*, *HGF*, *GHR*, *IGF1a*, *Areg*, *p-AKT* ve *STAT3* gibi hücresel büyüme faktörlerini etkilediği rapor edilmiştir. Araştırmamızda *miR-16*'ya ait yolak analizinde PI3K-AKT yolağının iki miRNA arasında ortak olduğu görülmektedir. PI3K/AKT/mTOR sinyal kaskadı hücre büyümesi, çoğalması ve hayatta kalma gibi hücresel düzenleyici mekanizmalar üzerinde önemli rol oynar ve bu sinyalizasyondaki bozukluklar sayısız literatürde kanser türleri ile ilişkilendirilmiştir.

miR15a/16-1 ve *miR-15b/16-2* kümeleri (cluster) memeli türleri arasında yüksek oranda korunmuştur ve bu iki miRNA kümesi hücre döngüsü ve apoptozu siklin D3 (*CCND3*) siklin E1 (*CCNE1*), *CDK6* ve apoptotik gen olan *Bcl-2* üzerinden düzenlediği bildirilmektedir (Yue ve Tigyi, 2010). Fosfoinozitol-3 kinaz (*PI3K*) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir. Laktasyon süreci boyunca meme dokusu hücreleri laktasyon aşamasına bağlı olarak sürekli değişkenlik gösterirler. Temel hücresel süreçlerin (çoğalma, farklılaşma, yaşam gücü ve hücre ölümü) sürekli değişken döngü halinde laktasyonun aşamasına ve üretim kapasitesine, genetik faktörlerin etkisi altında değiştiği dikkate alındığında laktasyonda ve meme dokusunda ifade edilen miRNA'ların temel hücresel süreçlerle ve bu süreçler üzerine etkili yollarda işlevsel olması beklenen bir bulgudur. Bu hücresel süreçler aynı zamanda süt üretimi ve meme dokusunun sağlık durumu hakkında önemli bilgiler elde edilmesini sağlar.

miR-16b Modül 2'ye ait 60 adet genin; Biyolojik Fonksiyon (BP); protein poliubikuitinasyonu ve protein ubikuitinasyonu, hücre bölünmesi, mikrotübül temelli hareket ve mitotik hücrelerin G1/S geçiş aşamasında fonksiyonel olduğu; Moleküler Fonksiyon (MF) da ise 60 adet genin 53 tanesi protein bağlanmasında fonksiyonel bulunurken, Hücresel Komponent (CC) olarak da sitozol, sitoplazma ve nükleus'da yer aldığı sonuçlar kısmında belirtilmiştir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak Liu ve ark. (2008), *miR-16* ailesinin birçok transkripti baskılayarak hücre döngüsü sürecini negatif olarak düzenlediğini ifade ettikleri çalışmalarında *CCND1*'in *CDK6* ve

CDK4 ile birlikte hücrenin; S fazına girişini önleyerek G0/G1'de kalmasını sağladığını ve *miR-16*'nın CCND1 ifadesini baskılayarak hücrel büyüme ve hücre döngüsünü negatif düzenlediğini rapor etmişlerdir. *miR-16* Modül 1 ve 2 ye ait genlerin KEGG yolak analizi sonuçları içerisinde her iki modülde de hücre döngüsü sinyal yolağının bulunması ve GO analizinde biyolojik fonksiyonunda hücre döngüsünün bulunması bu sonuçları destekler niteliktedir. Yine *miR-16* Modül 1'de bulunan HIPPO sinyal yolağı, *miR-27*'ye ait Modül 1 ve 2'deki mTOR sinyal yolağı ile birlikte organ boyutları üzerinde; hücre büyümesi, çoğalması, epitelial gelişme ve homeostaz üzerine düzenleyici rollerinden dolayı anahtar yolaklardır (Sandhu ve ark., 2016).

Chu ve ark. (2018), *miR-16*'nın üyesi olduğu *miR-15* ailesindeki miRNA'ların meme epitel hücrelerindeki lipid metabolizmasına etkilerini araştırdıkları çalışmalarında *miR-15b*'yi lipid metabolizması ile negatif korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir. *miR-15b*'nin ifadesinin hücrel gelişim ile ilgili büyüme faktörleri üzerinde etkilerini inceleyerek *ERK*, *p-ERK*, *PI3K*, *HGF*, *GHR*, *IGF1R*, *Areg*, *AKT*, *p-AKT* ve *STAT3* üzerine etkili olduğunu, laktasyonda *miR-15*'in ifadesinin azaldığını ifade ederek bu ailenin hücre döngüsü üzerinde negatif etkisini destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir (Chu ve ark., 2018). PI3K-AKT sinyal yolağı Modül 2'ye ait genlerin yolak analizinde ortak bulunmuştur. PI3K-AKT/mTOR ve JAK-STAT sinyal yolakları meme bezi gelişimi ve süt proteini sentezi için primer yolaklardır (Jiao ve ark., 2019).

Mamogenez olarak adlandırılan meme bezi gelişiminde puberta döneminde ki allometrik büyüme sonrası ilk gebeliği takiben oluşan hücrel büyüme, çoğalma, salgı üretme ve gerileme döngülerinin laktasyon döngüsüne ve periyoduna göre döngüsel dalgalanmalar şeklinde sürekli tekrarından oluşması, tüm bu dinamik hücrel süreçlerin hücre döngüsü, çoğalması ve apoptozunun sürekli döngüsel olarak birbirini izlemesini gerektirir. Bu döngüler üzerinde ve meme bezi gelişiminde etkili olduğu belirtilen genlerden birisi de *IGF1* genidir (Knight, 2010). *IGF1* mevcut çalışmada *miR-16* Modül 2'de belirtilen genlerden birisidir. Son olarak Yukarıda tartışılan *miR-16* ile ilgili; mevcut çalışmada diğer literatürlerle ortak olan yolaklar

ve *IGF1* geninin hücre döngüsünde etkili olması *oar-miR-16b*'nin süt verimini ve meme bezi gelişimini hücre döngüsü genleri ve yolakları üzerinden etkileyebileceği hipotezini desteklemektedir. Elde edilen ve yorumlanan bu bulgular koyun türünde bir ilktir.

Meme dokusu, gebeliğin sonundan laktasyona geçiş sırasında dramatik fizyolojik adaptasyonlara maruz kalan dinamik bir organdır. Büyüme farklılaşma ve gerileme döngüsünü reproduksiyon durumuna göre birçok kez yineleyen bir doku olması nedeniyle hücre döngüsü, farklılaşması ve gelişimi ile ilgili yolaklar laktasyonun dönemine göre ve reproduktif döneme göre sürekli dinamik haldedir. Süt verimi ve meme dokusu gelişimi üzerine de belirleyici etkileri olan metabolik yolaklarla ilgili genler birçok miRNA'nın hedef genidir.

Yayımlanan literatürlere ve yaptığımız biyoinformatik analizlere göre *oar-miR-16b*'nin bu yolaklardan bir çoğunda etkili olduğu, özellikle hücre döngüsü ile ilgili yolaklarda negatif düzenleyici etkisinin belirlenmesi mevcut araştırmada elde ettiğimiz Akkaraman-Şavak koyun ırkında süt verimi ile negatif korelasyon göstermesini açıklayabilir düzeydedir. Çünkü laktasyon dönemi sürekli üretkenliğin olduğu ve hızlı hücre döngüsü, gelişimi, farklılaşmasının gerekli olduğu bir dönemdir.

Hipofiz bezindeki suprakiazmatik nükleus (SCN) ve Pars Tuberalis (PT) *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2A*, *Rev- erba* ve *Cklε* gibi sirkadyan ritim genleri tarafından düzenlenmesi koyunlarda mevsimsel üretkenlik periyodunun başlangıcı ve devamlılığı için önemlidir (Molik ve Zieba-Przybylska, 2017). Yine *oar-miR-16b*'nin modül 1 KEGG analizindeki yolaklar arasında sirkadyan ritim bulunması koyunlarda laktasyonun ve laktasyon verimliliğinin belirlenmesindeki fizyolojik farklılıkları ve bu dönemin mevsimsel poliöstrus göstermeyen diğer hayvanlardan farklılık arz ettiğini dolayısıyla elde edilen sonuçların koyun türüne özgü olabileceği sonucunu desteklemektedir.

4.2. *oar-miR-27a*

miR-27a ve süt verimi ve süt kompozisyonu ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda keçi, sığır ve domuzlarda yapılan araştırmalar dışında koyunlarda bu miRNA'nın süttten eldesi, süt verimi ve süt kompozisyonu parametreleri ile ilişkisini araştıran bir çalışmanın uluslararası literatürde henüz olmadığını görmekteyiz.

miR-27a'nın sığır türünde ifadesi, süt verimi ve süt kompozisyonuna etkisini belirten çalışmalara baktığımızda; Do ve ark. (2017a), farklı laktasyon dönemlerindeki ineklerden yaptıkları örneklemelerde, modüller oluşturarak yaptıkları miRNA ifade ve korelasyon incelemelerinde içinde *bta-miR-27*'nin de bulunduğu modüller ile süt laktozu arasında korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuç mevcut araştırmada bulunan *oar-miR-27* ile laktoz ve protein arasındaki korelasyonu destekler nitelikte bir sonuçtur. Yine sığır türünde *miR-27* ile süt yağı ve yağ metabolizması üzerine ilişkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, hücre kültüründe *miR-27*'nin aşırı ifadesinin adiposit formasyonunu miyojenik farklılaşmayı etkilemeden inhibe ettiğini ve *miR-27* ifadesinin adipogenezin iki ana düzenleyicisi olarak kabul edilen *PPAR γ* ve *C/EBP α* (Tiroid hormone reseptör alfa)'yı bloke ettiği belirtilmiştir. *miR-27* süt yağı ilişkisini araştıran bir başka çalışmada inek meme dokusunda *bta-miR-27*'nin aşırı ifadesinin yağ damla formasyonunu ve TAG seviyesini düşürdüğü, *PPAR γ* , *C/EBP α* , *PLIN2* (Peripilin 2) ve *FABP3* (Fatty Acid Binding Protein 3)'ün ifadesini inhibe ettiği, *bta-miR-27a* ifadesindeki azalmanın ise *PLIN2* dışında belirtilen diğer üç genin mRNA ifadesini arttırdığı belirtilmiştir.

miR-27 ile süt yağı arasındaki ilişkiyi araştıran bir başka çalışma ise keçi meme dokusunda yapılmıştır. Chen ve ark. (2015), erken laktasyon ve kuru dönemde keçi meme dokusunda süt yağı ile ilişkili olabilecek miRNA'ları incelediklerinde *chu-miR-27a*, *chu-miR-200a* ve *chu-miR-200c*'nin süt yağ metabolizmasında etkisini belirtmişlerdir. Bu çalışmaların ışığında *oar-miR-27a* ile süt yağı regülasyonu arasında sığır ve keçi türünde bir ilişki olduğu açıktır ancak yaptığımız analizler sonucu koyunlarda *oar-miR-27a* süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasında anlamlı

derecede farklı ifade edilirken, süt yağı ile herhangi bir ilişkisi saptanmamış, sütün protein ve laktoz oranı ile negatif korelasyonu istatistiki olarak ortaya koyulmuştur.

miR-27 ayrıca sığır ve keçi türlerinde yapılan iki çalışma sonucu Prolaktin hormonu ile ilişkilendirilmiştir. Li ve ark. (2012), inek meme dokusunda farklı laktasyon dönemlerindeki miRNA profilini ve hedef genlerini araştırdıkları çalışmalarında *bta-miR-27*, *bta-miR-374b* ve *bta miR-23*'ünde içinde olduğu 5 adet miRNA için *PRLR* (Prolactin receptor like receptor)'nin olası hedef gen olduğunu ve belirtilen 5 miRNA'nın Prolaktin hormonu ile birlikte meme bezi gelişiminde rol oynayabileceğini önermektedir, Prolaktin ile *miR-27* arasında ilişki olduğunu belirten bir başka çalışmada keçilerde yapılmış ve *chu-miR-27b*, *chu-miR-23a*, *chu-miR-103* ve *chu-miR-200a* üzerine Prolaktinin doz bağımlı etkisi olduğu, Prolaktin seviyesindeki artışın bu miRNA'ların da ifade seviyesini arttırdığı rapor edilmiştir (Lin ve ark., 2013b).

Prolaktin süt verimi ve özellikle süt proteini üzerine etkili olduğu en iyi bilinen hormonlardan birisidir, mevcut araştırmada *oar-miR-27a* ile süt proteini ve laktozu arasında negatif korelasyon bulunmuş olsa da Prolaktin ile ilgili herhangi bir yolak ile ilişkisi tespit edilememiştir. Ayrıca bulunan korelasyonun negatif olmasının koyunlarda laktasyonun başlangıcında gerekli olan hormonlardan östrojen ve Prolaktin seviyesinin mevsime, gün ışığı uzunluğuna ve Melatonin seviyesine bağlı olmasıyla ineklerde ve hücre kültüründe yapılan çalışma sonuçlarından ayrılmasına neden olabileceğini veya *oar-miR-27a* ifade profilinin koyun türünde diğer türlerden farklılık gösteriyor olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü koyun türünde reproduktif aktivite mevsimseldir. Reprodüktif aktivitenin başlaması ve bitmesinde gün ışığı seviyesine bağımlı değişkenlik gösteren Melatonin hormonunun etkisi diğer türlerde ortak olan bazı hormonal ve hücresel sinyalizasyonlardan farklılık göstermesinin nedenlerinden biri olabilir.

Sütte bulunan miR-27'nin immunité ile ilişkili olabileceğini belirten domuz ve sığır türünde yapılan iki araştırmada, süttten izole edilen ekzosomal *ssc-miR 27*'nin domuzlarda *PPAR γ* ile ilişkili olduğu ve immunitéyle ilişkisi olduğu belirtilirken (Gu ve ark., 2012), bir başka çalışmada inek kolostrumunda normal süttten daha yüksek oranda tanımlanan ve immunitéyle ilişkili olabileceği belirtilen miRNA'lar arasında *bta-miR-27*'de gösterilmektedir (Izumi ve ark., 2012).

miR-27a Modül 1'e ait 10 adet genin, Biyolojik Fonksiyon (BP); protein poliubikuitinasyonu ve protein ubikuitinasyonu; Moleküler Fonksiyon (MP) bakımından ubikuitin protein transferaz aktivitesi ve protein bağlanmasında fonksiyonel bulunurken; tahminlenen *miR-27a* Modül 1'e ait 10 adet genin Hücresel Komponent (CC) olarak sitozol ve sitoplazma da yer aldığı bulgular kısmında belirtilmiştir, *miR-27a* Modül 2'ye ait 18 adet genin ise, Biyolojik Fonksiyon (BP) olarak protein stabilizasyonu ve sinyal iletiminde görevli olduğu; Moleküler Fonksiyon (MP) bakımından protein bağlanmasında fonksiyonel bulunurken; tahminlenen *miR-27a* Modül 2'ye ait 18 adet genin 10 tanesi Hücresel Komponent (CC) olarak plazma membranında fonksiyonel bulunması *oar-miR-27a* ile süt protein ve laktoz arasındaki korelasyonu destekler niteliktedir.

Birçok çalışmada *miR-27*'nin hücre çoğalması ve apoptozda görevli olduğu rapor edilmiştir. *miR-27*'nin *EGFR* ile ilişkisi tümör baskılayıcı olarak rapor edilirken, *miR-27a*'nın G1/S ilerlemesini arttırarak proliferasyonu arttırdığı belirtilmiştir (Li ve ark., 2019). Osorio ve ark. (2016), protein sentezinde mTOR-İnsülin sinyal yolağının görevli olduğunu, İnsülinin mTOR sinyal yolağı aktivitesini indükleyerek *STAT5*'i aktive ettiğini ve bu yolla süt protein sentezini kontrol ettiğini belirtmiştir bu sonuçlar moleküler fonksiyon analizinde, *miR-27* modül 2 yolak analizinde mTOR, insülin sinyal yolağı bulunmasının ve dolayısıyla *miR-27* hedef genlerinin protein bağlanmasında fonksiyonel bulunması, *miR-27* ile protein ve laktoz arasındaki ilişkiyi desteklemektedir.

4.3. *oar-miR-148-3p*

miR-148 farklı hayvan türlerinde meme dokusunda ve sütte en çok ifade edilen miRNA'lar içinde ilk 10 da rapor edilmiş ve sütün kalite göstergesi için aday biyobelirteçlerden birisi olarak gösterilmiştir (Alsaweed ve ark., 2018; Chen ve ark., 2010; Chen ve ark., 2017; Do ve ark., 2017b; Fatima ve ark., 2019; Li ve ark., 2016; Melnik ve ark., 2016). Çalışmaya *oar-miR-148-3p* nin dahil edilme amacı bu miRNA'nın koyun türünde de en çok ifade edilen ve süt kalite göstergesi olabilecek miRNA'lar arasında olup olmadığını araştırmaktır.

İnsan, sığır, domuz ve panda sütündeki hücre dışı veziküllerde (eksozom) en çok bulunan ilk yirmi miRNA'nın türler arasında korunmuşluğu karşılaştırıldığında *miR-148a* ve *let-7* ailesinin tüm türlerde ortak olduğu, bu korunmuşluğun sadece sekans homolojisi değil aynı zamanda farklı türlerde ortak oluşunun süt hücre dışı veziküllerinde bu miRNA'ların evrimsel olarak yeni doğarlarda hücre düzenlenmesinin fonksiyonu için seçilmiş olabileceğini belirtmişlerdir (Herwijnen ve ark., 2018).

Chen ve ark. (2010), çiğ süt ve diğer süt ürünlerinde (pastörize süt, bebek mamaları) yaptıkları araştırmada 7 adet süte özgü miRNA'yı süt kalite kontrolünde biyobelirteç olarak aday göstermişlerdir. Bu miRNA'lar *miR-26a*, *miR-26b*, *miR-200c*, *miR-21*, *miR30-d*, *miR-99a* ve *miR-148* olarak belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca kolostrum ve süt miRNA profilleri de karşılaştırılmış ve 15 miRNA'nın süte özgü, 32 miRNA'nın da kolostruma özgü olduğu belirtilmiştir.

miRNA ifade paternleri laktasyonun dönemine göre de farklılık göstermektedir. Do ve ark. (2017a), Holştayn ırkı ineklerde yaptıkları çalışmada laktasyonu 3 basamakta incelemişler ve bu basamaklar arasındaki miRNA ifade profillerini karşılaştırarak üç laktasyon aşamasında da (laktasyon, galaktopoez ve involusyon) en çok ifade edilen miRNA'lardan birinin *miR-148* olduğunu doğrulamışlardır. Aynı çalışmada, farklı laktasyon aşamalarında dört küme, sekiz modül oluşturarak miRNA ifadelerini gruplandırarak karşılaştırdıklarında *miR-148*'i

en çok ifade olan ilk üç miRNA içerisinde bulmuşlardır. Erken laktasyon ve kuru periyottaki keçi meme dokusu miRNA profillemekarşılaştırmasının yapıldığı çalışmada erken laktasyondaki meme dokusunda 12 adet en yüksek ifadeye sahip gen belirlenerek, bu genlerin yağ transportu ve yağ metabolizması ile yakın ilişkili olduğu belirtilmiştir. Fonksiyonel analizler sonucu *PPARGC1A* (peroksizom proliferatör aktive reseptör gamma koaktivaör1 alfa) ve *PPARA* (peroksizom proliferatör aktive reseptör gamma)'nın birlikte çalıştığını ve bu genlerin *miR148a* ve *miR-17-5p* için doğrudan hedef olduğunu belirtmişler ve bu iki miRNA'yı laktasyondaki meme dokusunda yüksek ifade edildiğini rapor ederek bu hipotezi doğrulamak amaçlı Keçi Meme Epitel Hücrelerinden (GMEC) hücre kültürü çalışması yapılmıştır. *miR-148a* aşırı ifadesinde *PPARGC1A*'nın baskılandığı, *miR-148*'in inhibisyonunda ise ifadesinin arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca *miR-148*'in *PPARGC1A* geninin 3' UTR bölgesinde bir bağlanma bölgesine sahip olması bu tezi güçlendirmiştir (Chen ve ark., 2017). Keçi türünde yapılan bir başka araştırmada keçilerde kolostrum ve laktasyon aşamalarındaki miRNA'ların karşılaştırılmasında hem pik laktasyon döneminde hemde kolostrumda *miR-148a-3p* en çok ifade edilen miRNA'lar arasında bulunarak, bu miRNA'ların keçi süt performansında önemli etkileri olabileceği düşünülmüştür (Hou ve ark., 2017).

Gu ve ark. (2012), domuz sütünde bulunan eksosomal miRNA'ları karşılaştırdıkları çalışmada *miR-148*'i inek ve keçi çalışmalarında olduğu gibi en çok ifade edilen miRNA'lar arasında göstermişlerdir.

Bu bilgiler ışığında birçok türde *miR-148*'in süt ve meme dokusunda en çok ifade edilen miRNA olduğu ve çiğ süt kalitesinin belirlenmesinde güçlü bir biyobelirteç adayı olduğu açıktır. Birçok çiftlik hayvanında süt ve meme dokusunda ve laktasyonun farklı aşamalarında en çok ifade edilen miRNA'lar arasında gösterilen *miR-148*'in koyunlarda süt veya meme dokusundaki ifadesi hakkında uluslararası literatürde henüz bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışma *oar-miR-148a*'nın koyun sütünden izolasyonu ve ekspresyonunun incelemesi açısından bir ilk niteliğindedir.

Ancak çalışma sonucunda süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasında *oar-miR-148a* ifadesi açısından anlamlı bir fark veya herhangi bir korelasyon bulunmamıştır. Koyun sütünde bu miRNA'nın ifade profilinin diğer türlerden farklı olabileceği düşünülmektedir. Ancak daha kesin yorumların yapılabilmesi için *oar-miR-148a*'nın farklı laktasyon dönemlerinde de incelenmesi daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesini sağlayacağından bu miRNA'nın ileri çalışmalarda farklı laktasyon dönemlerinde incelenmesi planlanmaktadır.

4.4. *oar-miR-181a*

miR-181 çeşitli literatürlerde keçi ve sığır türlerinde süt yağı ile ilişkilendirilmiş ve farklı ifade seviyesine sahip olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2016; Li ve ark., 2012; Lian ve ark., 2016). Çalışmaya *oar-miR-181a*'nın dâhil edilme amacı yine koyun türünde süttten izolasyonu ile süt yağı ilişkisinin araştırılmamış olmasıdır. *miR-181* ailesi *miR-181a*, *miR-181b* ve *miR-181c* ve *miR-181d* olmak üzere dört üyeden oluşur.

miR-181a, *IDH1* (İzositrat Dehidrojenaz 1) üzerinde yağ sentezini de içeren genlerin ifadesini azaltır ve beta oksidasyon genlerinin ekspresyonunu arttırarak lipid akümüleyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir. Saanen ırkı keçilerden oluşan elit sürüden seçilen hayvanlarda yapılan *miR-181b* ve süt yağı ilişkisi araştırması sonucunda *chi-miR-181b* meme dokusu hücre kültüründe inhibe edildiğinde *IRS2* (İnsülin Reseptör Substrat 2) geni mRNA'sının ifadesinin arttığını, *chi-miR-181b*'nin aşırı ifadesi durumunda ise azaldığını, ayrıca *chi-miR-181b* ifadesinin süt yağı damla akümüleyonunu ve Triaçil Gliserol (TAG) seviyesini de düşürdüğü sonucu elde edilerek *miR-181* ailesinin süt yağı üzerine etkisi doğrulanmıştır (Chen ve ark., 2016). Laktasyon dönemlerine göre sığırlarda meme dokusunda miRNA ifade seviyeleri karşılaştırıldığında 12 miRNA'nın laktasyonda kuru döneme göre ifadesinin azaldığı bulunmuştur. *bta-miR-181*'in bu miRNA'lar arasında olması düşük ifadesinin yağ akümüleyonunu, TAG seviyesini ve süt yağı üzerine negatif etkisinden kaynaklandığı hipotezini destekler niteliktedir (Gigli ve ark., 2013; Wang ve ark., 2012;). Lian ve ark. (2016), sığırlarda *bta-miR-181*'in *ACSL1* (Acil koA

Sentaz long chain family member 1) genini direkt hedef olarak süt yağı (TAG) biyosentezini düzenlediğini ortaya koymuşlar ve diğer *miR-181* ve süt yağı ilişkisini kapsayan çalışmaları destekler nitelikte sonuçlar elde etmişlerdir. Li ve ark. (2012) bu çalışmaların aksine sığırlarda kuru dönem ve laktasyon dönemini karşılaştırdıklarında kuru dönemde *bta-miR-181* ifadesini düşük bulmuşlar ve Hekzokinaz 2 (*HK2*) geninin 3' UTR bölgesinin *bta-miR-181* ile eşleşmesine rağmen hücre kültüründe *miR-181* transfeksiyonunda *HK2* geni ifadesinde bir farklılık gözlemlememişlerdir.

Mevcut çalışmada *oar-miR-181a*'nın ifade seviyesini süt verimi düşük ve yüksek gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulmasına rağmen ($P \leq 0,001$) *oar-miR-181a* ifadesi herhangi bir süt kompozisyonu parametresi veya süt verimi ile korele bulunmamıştır. Özellikle süt yağı üzerine düzenleyici olarak literatürlere giren *miR-181*'in ifade seviyesinde gruplar arası anlamlı fark bulunmasına rağmen süt yağı ile korelasyon göstermemesinin iki olası sebebi olabileceği düşünülmüştür. Birincisi oluşturulan iki grup arasında süt yağı açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu durumda *oar-miR-181a*'nın istatistiki olarak süt yağıyla korelasyonunu ortaya koymamızı güçleştirmesi, ikincisi ise keçi ve sığırlarda yapılan çalışmaların aksine koyunlarda bu miRNA'nın henüz süt yağı ilişkisinin çalışılmamış olması ve ilk kez mevcut çalışmada koyun türünde çalışılması nedeniyle bu miRNA'nın ifadesinin ve olası süt yağı ilişkisinin koyunlarda farklı olabileceğidir. Bu soruların cevaplanabilmesi laktasyonun her üç döneminde (laktasyon başı, ortası ve sonu) yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Zira laktasyon dinamik bir süreçtir ve mevcut çalışma sadece laktasyon piki dönemini kapsamaktadır. Bu nedenle *oar-miR-181a*'nın laktasyonun orta ve son dönemlerinde ki etkisi de örnek sayısı artırılarak araştırılmalıdır.

4.5. *oar-miR-221*

Chu ve ark. (2018), deneysel olarak farelerde ve hücre kültüründe *miR-221* ile süt yağı arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, *miR-221*'in ifade seviyesinin arttırıldığı hücrelerde lipid damlalarının azaldığını, *miR-221* inhibitörü verilen

hücrelerde ise arttığını tespit ederek süt yağı metabolizması üzerine etkili bazı genlerin *miR-221* üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar ayrıca fare meme dokusunda farklı laktasyon aşamalarında *miR-221*'in ifade profilini de çıkartarak, gebelikle birlikte *mmu-miR-221* seviyesinin düşmeye başladığını ve laktasyona kadar bu düşüşün devam ettiğini, laktasyonun başlangıcında ise en düşük seviyeye ulaştığını, laktasyon sonrası involusyon aşamasında ise artmaya başladığını rapor etmişlerdir. *mmu-miR-221*'in ergin ama doğum yapmamış farelerde en yüksek ifade seviyesine sahip olduğu belirtilmiştir.

Mevcut çalışmada *oar-miR-221* için süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasında ifade açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. *miR-221*'in süt verimi ve kompozisyonu ile olan ilişkisini araştıran çalışma sayısı oldukça azdır. Bu konunun açığa kavuşturulması için *oar-miR-221*'in farklı laktasyon dönemlerindeki koyunlarda ifade profilinin karşılaştırılması gerekmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar *miR-221* süt kompozisyonuna etkisinden ziyade meme dokusu üzerine etkisi olduğunu önermektedir. Jiao ve ark. (2019) sığır meme dokusunda yaptıkları çalışmada *bta-miR-221*'in sığır meme dokusunda hücrel çoğalmayı düzenlediğini ve bu düzenleme işlevini *STAT5A* (Signal Transducer and activator of transcription 5A) ve *IRS1* genleri üzerinden yaptığını bildirmişlerdir. Do ve ark. (2017b), laktasyon aşamasına göre laktasyon ve involusyon olarak iki gruba ayırdığı ineklerde yaptığı miRNA profili çalışmasında *bta-miR-221*'in laktasyon ve involusyon grupları arasında ifade açısından en çok fark bulunan miRNA olarak bulmuşlardır. Li ve ark. (2012), inek meme dokusunda laktasyon ve kuru dönemde ifade edilen miRNA profillerini karşılaştırdıklarında *bta-miR-374*'ünde içlerinde bulunduğu dokuz miRNA'nın sadece laktasyonda, *bta-miR-23b-3p*'nin de içinde bulunduğu altı miRNA'yı sadece kuru dönemde farklı ifade edildiğini belirleyerek *bta-miR-23b*'nin meme kanal sisteminin gelişiminde etkili olabileceğini, *bta-miR-23* ve *bta-miR-374*'ün olası hedef geninin *PRLR* olabileceğini belirtmişlerdir.

miR-23 ve *miR-374* Ammah ve ark. (2018), çalışmasında da süt proteini, süt verimi ve süt laktozu ile korele bulunan birinci modülde birlikte yer almakta ve her

iki miRNA'nın da laktasyon aşamasında farklı ifade seviyesine sahip olduğu belirtilmektedir. İki farklı çalışmada da *miR-23* ve *miR-374*'ün birlikte farklı ifade edilmesi bu iki miRNA'nın sinerjik hareket edebilme ihtimalini akla getirir de yaptığımız analizlerde her iki miRNA'da gruplar arasında anlamlı ifade farkı göstermesine rağmen, süt verimi veya herhangi bir süt kompozisyonu ile de ilişkili bulunmamıştır.

4.6. *oar-miR-152*

miR-152, *miR-148/152* ailesinin üç üyesinden biridir. Ailenin diğer üyeleri *miR-148a* ve *miR-148b*'dir.

Shen ve ark. (2016), süt yağı metabolizmasında ve sentezinde etkili miRNA seviyelerini incelemek için süt yağ oranları arasında belirgin fark olan iki Holştayn ırkı inekten meme dokusunda çalışarak 292 bilinen, 116 yeni (novel) miRNA tanımlamışlar; *miR-33*, *miR-152* ve *miR-224*'ün süt yağı ile ilişkisini ve olası hedef genlerini belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda *miR-152*'nin yağ metabolizmasında önemli olan *PRKAA1* (Protein Kinase AMP-Activated Catalytic Subunit alpha1), *PTSG2* (Prostaglandine endoperoxide synthase) ve *UCP3* (uncoupling protein 3) genleri üzerinde etkili olduğunu ayrıca *miR-152*'nin süt yağı üzerine etkili olduğunu bildirerek Wang ve ark. (2014), çalışmasını destekler nitelikte sonuçları literatüre kazandırmışlardır.

Wang ve ark. (2014), süt kalitesine göre (yağ, verim, protein) gruplandıkları Holştayn ırkı ineklerde *miR-152*'nin süt kalitesi ve verimi üzerine etkisini incelemişler ve süt kalitesi yüksek olan grupta β -kazein, trigliserit ve laktoz salgısını arttırdığını belirterek *miR-152*'nin *DNMT1* (DNA metil transferaz) geninin 3'UTR bölgesinde bağlanma alanına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek süt kalitesine sahip grupta, *miR-152* ifadesi yüksek bulunurken *DNMT1* ifadesinin azalmış olduğu bulunmuştur. Bu araştırmada *oar-miR-152*'nin ifade seviyesi süt verimi yüksek ve düşük gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Koyunlarda süt verimi üzerine etkili miRNA sayısı, fonksiyonu, hedef gen ve etki mekanizmasına yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Koyun türünde *oar-miR-16b* ile süt verimi ilişkisi, *oar-miR-27a* ile süt proteini ve laktoz ilişkisi ilk kez tespit edilmiştir. Mevcut araştırmada *oar-miR-16b*'nin koyun türünün süt örneğinde ifade seviyesini inceleyen ve süt verimi ile ilişkilendiren uluslararası literatürde ilk çalışma olması, *oar-miR-27a*'nın yine koyun türünde uluslararası literatürde süttten elde edilerek süt proteini ve laktozu ile ilişkilendirildiği ilk çalışma olması bu sonuçların önemini arttırmakla birlikte, *oar-miR-16b*'nin koyunlarda süt verimi ile ilgili, *oar-miR-27a*'nın da süt proteini ve laktoz ile ilgili biyobelirteç olabilme potansiyeli hakkında yapılabilecek diğer çalışmaların önünü açmaktadır. Bu iki miRNA koyunlarda süt verimi, meme dokusu gelişimi, süt proteini ve laktoz oranı ile ilişkileri hem korele oldukları parametreler hem de ilişkili bulundukları yollar açısından yapılacak daha ileri çalışmaların önünü açacak nitelikte ve araştırmaya değer oldukları sonucuna varılmıştır.

Çalışmada analiz edilen, gruplar arasında anlamlı fark göstermesine rağmen süt verimi ve süt kompozisyonu ile ilişkisi belirlenmeyen *oar-miR-146-3p*, *oar-miR-181a* ve *oar-miR-221*'in farklı laktasyon dönemlerinde ifade ve korelasyonlarının araştırılması süt verimi ve süt kompozisyonu ile olası ilişkilerini belirlemede etkili olabileceği, çalışılan miRNA'ların Akkaraman koyun ırkının farklı varyetelerinde ve farklı koyun ırklarında da çalışılarak sonuçların karşılaştırılmasının yine bu miRNA'ların potansiyellerini ve etkilerini ortaya koymada daha aydınlatıcı olabileceği öneriler arasındadır.

ÖZET

Akkaraman Koyun Irkında Süt Verimiyle İlişkili Bazı mikroRNA'ların İncelenmesi

Araştırmanın amacı Akkaraman koyun ırkında süttten elde edilen dokuz adet miRNA'nın süt verimi ve süt kompozisyonu ile ilişkisini araştırmaktır. Bu amaçla Akkaraman ırkı, süt verimi yüksek (n=20) ve süt verimi düşük (n=20) iki grup koyundan süt örneği alınarak süt verimi ölçümü, süt kompozisyonu analizi ve seçilen miRNA'ların ifade seviyeleri incelenmiştir. İncelenen miRNA'lar *oar-mir-485-3p*, *oar-mir-374b*, *oar-miR-27a*, *oar-miR-221*, *oar-miR-23a*, *oar-miR-181a*, *oar-miR-152*, *oar-miR-16b* 'dir. Normalizasyon için *oar-miR-103* kullanılarak bu miRNA'ların gruplar arası ifade farklılıkları ve süt verimi ile süt kompozisyonu ile ilişkileri araştırılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda yüksek süt verimli grupta *oar-miR-27a* ile protein ve laktoz arasında; *oar-miR-16b* ile süt verimi arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Bulunan sonuçlar koyun türünde literatürde bir ilktir. Bu iki miRNA koyunlarda süt verimi, meme dokusu gelişimi, süt protein ve laktoz oranı ile ilişkileri hem korele oldukları parametreler hemde ilişkili bulundukları yolaklar açısından yapılacak daha ileri çalışmaların önünü açacak nitelikte sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: laktasyon, mikroRNA, qRT-PCR, süt verimi.

SUMMARY

Investigation of Some miRNAs Associated With Milk Yield in White Karaman Sheep Breed

Aim of this study is investigating nine milk microRNAs related with milk yield, milk composition and their biomarker potential on milk yield with high milk yield sheep. Milk samples collected from two groups with high milk (n=20) yield and low milk yield (n= 20), milk yield, milk composition and nine selected miRNAs expression levels compared with two groups. Investigated miRNAs are *oar-mir-485-3p*, *oar-mir-374b*, *oar-miR-27a*, *oar-miR-221*, *oar-miR-23a*, *oar-miR-181a*, *oar-miR-152*, *oar-miR-16b*. We investigated their association with milk yield and milk composition and with *oar-miR-103* for normalization.

We found negative correlation between *oar-miR-27* protein and lactose; *oar-miR-16* and milk yield on high milk yield group. These results are first reports on sheep species. These two miRNAs and their association with milk yield, mammary gland development, milk protein and lactose and their associated pathways would lead up further studies.

Keywords: microRNA, milk yield, lactation, qRT-PCR.

KAYNAKLAR

- AKÇAPINAR H (2000). *Koyun Yetiştiriciliği*. Ankara.
- AKÇAPINAR H, KADAK R, ODABAŞIOĞLU F (1982). Morkaraman ve Kangal Akkaraman Koyunlarının Döl verimi ve Süt Verimi Üzerinde Karşılaştırmalı Araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Dergisi*. **29**:3-4.
- AKERS RM (2017). A 100-Year Review: Mammary development and lactation. *J. Dairy Sci.* **100**: 10332-10352. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12983>
- ALSAWEED M, HARTMANN PE, GEDDES DT, KAKULAS F (2015). MicroRNAs in Breastmilk and the Lactating Breast: Potential Immunoprotectors and Development Regulators for the Infant and the Mother. *Int. J. Res. Public Health* **12**: 13981-14020. Doi: 10.3390/ijerph121113981.
- AMMAH AA, DO DN, BISSONNETTE N, GEVRY N, IBEGHA-AWEMU EM (2018). Co-Expression Network Analysis Identifies miRNA-mRNA Network Potentially Regulating Milk Traits and Blood Metabolites. *Int. J. Mol. Sci.*, **19** : 2500. Doi:10.3390/ijms19092500
- ANONİM (2019) WIKIWAND. Erişim adresi: <https://www.wikiwand.com/>. Kurulum yılı 2013, Erişim tarihi 26.10.2019.
- ARRANZ J A, GUTIERREZ-GİL B (2012). Detection of QTL Underlying Milk Traits in Sheep: An Update. *INTECH. Chapter* 5:97-126.
- AUSTIN CR, SHORT RV (1984). Hormonal Control of Reproduction. Ed 2 ,Vol 3 Cambridge University Press, UK.
- BALTHAZAR CF, PRIMENTEL TC, FERRAO LL, ALMEDA CN, SANTILLO M, ALBENZIO M, MOLLAKHALILI N, MORTAZAVIAN AM, NASCIMENTO JS, SILVA MC, FREITAS MQ, SANT'ANA AS, GRONATO D, CRUZ AG (2017). Sheep milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Comprehensive Reviews in Food Science And Safety* **16**: 247-262.
- BAROZAI MYK (2012). The novel 172 sheep (Ovis Aries) microRNAs and their targets. *Mol Biol Rep* **39**: 6259-6266
- BENMOUSSA A, PROVOST P (2019). Milk MicroRNAs in Health and Disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **18**:703-722. Doi: 10.1111/1541-4337.12474
- BIONAZ M, HURLEY W, LOOR J (2012). Milk Protein Synthesis in Lactating Mammary Gland: Insights from Transcriptomics Analyses. *INTECH* , Chapter 11. Doi: 10.5772/46054.
- BIONAZ M, LOOR J (2008). Gene networks driving bovine milk fat synthesis during lactation cycle. *BMC Genomics* **9**:366 doi: 10.1186/1471-2164-9-366

- BLAST, ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- BUSHATI N, CHOEN SM (2007). microRNA Functions. *Annu. Re. Cell. Dev. Biol* **23**:175-205. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406.
- CALDWELL G. (2014) The Small-Scale Dairy: The Complete Guide to Milk Production for the Home and Market . Chelsea Green Publishing, Pp: 61
- CHEN X, GAO C, LI H, HUANG L, SUN Q, DONG Y, TIAN C, GAO S, DONG H, GUAN D, HU X, ZHAO S, LI L, LIN Z, YAN Q, ZHANG J, ZEN K, ZHANG CY (2010) .Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Research* **20** (10):1128-1137
- CHEN Z, CHU S, WANG X, SUN Y, XU T, MAO Y, LOOR JJ, YANG Z (2019). MiR-16a Regulates Milk Fat Metabolism by targetting LArge Tumor Suppressor Kinase 1 (LATS1) in bovine Mammary Epithelial Cells. *J. Agric. Food Chem.* **67**: 11167-11178
- CHEN Z, LUO J, MA L, WANG H, CAO WT, XU HF, ZHU JJ, SUN YT, LI, YAO DW, GOU D (2015). Mir-130b-Regulation of PPAR γ Coactivator-1 α Supresses Fat Metabolism in Goat Mammary Epithelial Cells. *Plos One* **10(11)**:e0142809. doi:10.1371/journalphone.01420809
- CHEN Z, LUO J, SUN S, CAO D, SHI H, LOOR JJ (2017). miR-148a and miR-17-5p synergistically regulate milk TAG synthesis via PPARGC1A and PPARA in goat mammary epithelial cells. *RNA Biology* **14(3)**:326-338. doi:10.1080/15476286.2016.1276149
- CHEN Z, SHI HP, SUN S, XU HF, CAO DY, LUO J (2016) . MicrRNA-181b supresses TAG via target IRS2 and regulating multiple genes in the Hippo pathway. *Exp. Cell. Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.004>
- CHU M, ZHAO Y, YU S, HAO Y, ZHANG P, FENG Y, ZHANG H, MA D, LIU J, CHENG M, LI L, SHEN W, CAO H, LI Q, MIN L (2018). MicroRNA-221 may be involved in lipid metabolism in mammary epithelial cells. *Int. J. Biochem. And Cell Biol.* **97**:118-127. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.02.014>
- COWIE AT, FORSYTH KA, HART IC (2011). Hormonal Control of Lactation. Springer-Veriag, BERLIN.
- ÇINAR D, DURSUN HG (2016). miRNA biyogenezi ve kanser patogenezindeki fonksiyonu. *Sakarya Tıp Dergisi* **6(2)**: 64-71.
- DAVID Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009;4(1):44-57.
- DİNÇEL D, ARDIÇLI S, ŞAMLI H, BALCI F (2018). Sığır, keçi, ve koyunlarda MikroRNA'ların (miRNA) meme bezi gelişimi ve süt üretimine etkisi. *Anadolu Çev. Ve Hayv. Dergisi* **3(3)**: 124-130.
- DO DN, DUDEMAINE PL, LI R, IBEAGHA-AWEMU EM (2017b). Co-Expression Network and Pathway Analyses Reveal Important Modules of miRNAs Regulating Milk Yield and Component Traits. *Int. J. Mol. Sci* **18**:1560. doi: 10.3390/ijms18071560

- DO DN, IBEAGHA-AWEMU M (2017c). Non-coding RNA roles in ruminant mammary gland development and lactation. *INTECH*. Chapter 5:55-80.
- DO DN, RAN L, DUDEMAINE PL, IBEAGHA-AWEMU EM (2017a). MicroRNA roles in signalling during lactation: an insight from differential expression, timecourse and pathway analyses of deep sequence data. *Scientific Reports* **7**:44605 doi: 10.1038/srep44605
- DOLFIN LP, MOXON S, HAERTY W, PALMA FD (2018). The evolutionary Dynamics of microRNAs in domestic mammals. *Scientific Reports* **8**:17050. doi: 10.1038/s41598-018-34243-8
- FATÌMA A, MORRIS DG (2013). MicroRNAs in domestic livestock. *Physiol Genomics* **45**: 685-696. doi: 10.1152/physiolgenomics.00009.2013.
- FLORIS I, BILLARD H, BOQUEN CY, GAUVARD EJ, SIMON L, LEGRAND A, BOSCHER C, ROZE JC, JIMENEZ FB, KAEFFER B (2015). MiRNA analysis by Quantitative PCR in Preterm Human Breast Milk Reveals Daily Fluctuations of hsa-miR-16-5p. *PLoS One* **10**(10): e0140488. doi: 10.1371/journal.pone.0140488
- GALÌO L, DROINEAU S, YEBOAH P, BOUDIAF H, BOUET S, TRUCHET S, DEVINOY E (2013). MicroRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: spatial and temporal expression of miR-21, miR-205 and miR-200. *Physiol Genomics* **45**: 151-161. doi: 10.1152/physiolgenomics.00091.2012.
- GEBERT LFR, MACRAE IJ (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Molecular Cell Biology* **20**:21-37.
- GENE ONTOLOGY (2000) Ashburner. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* May;25(1):25-9.
- GIGLI I, MAIZON DO (2013). microRNAs and the mammary gland: A new understanding of gene expression. *Genetics and Molecular Biology* **36**(4): 463-474.
- GO Gene Ontology Consortium(2004) The Gene Ontology (GO) database and informatics resource *Nucleic Acids Research*, (32) Database issue :258-261
- GOEDEKE L, ROTLLAN N, DUQUE AC, ARANDA JF, RAMIREZ CM, ARALDI E, LIN CS, ANDERSON NN, WAGSCHAL A, CABO R, HORTON JD, LASUNCTION MA, NAAR A M, SUAREZ Y, HERNANDO CH (2015). microRNA-148 regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels. *Nature Medicine* doi: 10.1038/nm.3949
- GOLAN-GERSTL R, SHIFF YE, MOHAYOFF V, SCHECTER D, LESHKOWITZ D, REIF S (2017). Characterization and biological function of milk –derived miRNAs. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**(10): 9-20. Doi: 10.1002/mnfr.201700009
- GU Y, LI M, WANG T, LIANG Y, WANG X, ZHOU Q, CHEN LEI, LANG Q, HE Z, CHEN X, GONG J, GAO X, LI X (2012). Lactation Related MicroRNA Expression Profiles of Porcine Breast Milk Exosomes. *Plos One* **7**(8): e43691. Doi: 10.1371/journal.pone.0043691

- GUTTMAN M, AMÍT I, GARBER M, FRENCH C, LÍN MF, FELDSER D, HUARTE M, ZUK O, CAREY BW, CASSADY JP (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**: 223–227.
- HA M, SEBHERWAL M, DUNCAN E, STEVENS S, STOCKWELL P, MCCONELL M, BEKHIT AE, CORNE A (2015). In depth characterization of sheep (ovis aries) milk whey proteome and comparison with cow (Bos Taurus). *Plos One* **10(10)**: e0139774 doi: 10.1371/journal.pone.0139774.
- HEESCHEN W, REICHMUTH J (1995). Mastitis: The disease under aspects of milk quality and hygiene. *Kieler Milchwirtschaftliche forschungsberichte*. **46(3)**: 221-237.
- HERWEJINEN MJC, DRIEDONKS TAP, SNOEK BL, KROON AMT, KLEINJAN M, JORRITSMA R, PIETERSE CMJ, HOEN ENMN, WAUBEN MHM (2018). Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. *Frontiers in Nutrition* **5**:81 doi: 10.3389/fnut.2018.00081
- HOU J, AN X, SONG Y, CAO B, YANG H, ZHANG Z, SHEN W, LI Y (2017). Detection and comparison of microRNAs in the caprine mammary gland tissues of colostrum and common milk stages. *BMC Genetics* **18**:38 doi: 10.1186/s12863-017-0498-2.
- IOANNIDIS J, MOLANO ES, PSIFIDI A, DONADEU FX, BANOS G (2018). Association of plasma microRNA expression with age, genetic background and functional traits in dairy cattle. *Scientific Reports* **8**:12955. doi: 10.1038/s41598-018-31099-w
- IVEY KN, SRIVASTAVA D (2016). MicroRNAs as Regulators of differentiation and cell Fate Decisions. *Cell Stem Cell* **7**:36-41. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.012.
- IZUMI H, KOSAKA N, SHIMIZU T, SLEKINE K, OCHIYA T, TAKOSE M (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J. Dairy Sci.* **95**: 4831-4841.
- JENKINSON CMC (2003) The Pattern and Regulation of Mammary Gland Development During Fetal Life in the Sheep. Doktora tezi. Institute of Food , Nutrition and Human Health, Massey Üniversitesi , Yeni Zellanda.
- JIAO BL, ZHANG XL, WANG SH, WANG LX, LUO ZX, ZHAO HB, KHATIP H, WANG X (2019). MicroRNA-221 regulates proliferation of bovine mammary gland epithelial cells by targeting the STAT5A and IRS1 genes. *J. Dairy Sci.* **12(1)**: 426-435 . doi: 10.3168/jds.2018-15108.
- KARACA O, AKYÜZ N, ANDIÇ S, ALTIN T (2003). Karakaş koyunlarının süt verim özellikleri. *Turk J Vet Anim Sci.* **27**:589-594.
- KAYMAKÇI M, ÜN OC, BİLGİN G, TAŞKIN T (2001). Basic Characteristics of Some Turkish Indigenous Sheep Breeds. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **4(7)**: 916-919.
- KEGG KANEHISA M, GOTO S.(2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**: 27-30.

- KÌM VN, HAN J, SIOMI MC (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Molecular Cell Biology* **10**:126-139.
- KNIGHT CH (2010). The importance of cell division in udder development and lactation. *Livestock Prod. Sci.* **66**(2): 169-176.
- KUHN CD, TOR LJ (2013). Eukaryotic Argonautes come into focus. *Trends in Biochemical Sciences* **38**(5): 263-271.
- LERIAS JR, CASTELLANO LEH, TRUJILLO AS, CASTRO N, POURLIS A, ALMEIDA AM (2014). The mammary gland in small ruminants: major morphological and functional events underlying milk production- a review. *Journal of dairy research.* **81**(3):304-318. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029914000235>
- LIAN S, GUO XM, NAN XM, MA L, LOOR JJ, BU DP (2016). MicroRNA Bta-miR-181a regulates the biosynthesis of bovine milk fat by targetting ACSL1. *J. Dairy Sci* **99**: 3916-3924 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10484>.
- LINZELL HL, PEAKER M (1971) Mechanism of milk secretion. *Physiol, Rev.* **51**: 564-597.
- LÌ R, DUDEMAÏNE PL, ZHAO W, LEI C, IBEAGHA-ABEMU EM (2016) Comparative Analysis of the miRNome of Bovine Milk Fat, Whey and Cells. *Plos One* **11**(4):e0154129. doi: 10.1371/journal.pone.0154129
- LÌ Z, LÌU H, JÌN X, LO L, LÌU J (2012). Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC Genomics* **13**: 731
- LÌN Q, GAO Z, ALARCON RM, YE J, YUN Z (2009). A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS journal* **276**: 2348-2358. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06967.x.
- LÌN X, LUO J, ZHANG L, WANG W, SHÌ H, ZHU J (2013b). miR-27 suppresses triglyceride accumulation and effects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. *Gene* **521**: 15-23
- LÌN X, LUO J, ZHANG L, ZHU J (2013a). MicroRNAs synergistically Regulate milk fat synthesis in Mammary Gland Epithelial Cells of Dairy Goats. *Gene Expression* **16**:1-13 doi:10.3727/105221613X13776146743262.
- LÌU HC, HÌCKS JA, TRAKOOLJUL N, ZHAO SH (2009). Current knowledge of microRNA characterization in agricultural animals. *Animal Genetics* **41**: 225-231. doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01995.x
- LÌU Q, FU H, SUN H, ZHANG H, TÌE Y, SHU J, XÌNG R, SUN Z, ZHENG X (2008) miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Research* **36**(16): 5391-5404
- LÌVAK KJ, SCHMÌTTGEN TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C (T)) method. *Methods* **25**(4) 402-408.

- MARCIAS H, HINCK L (2012). Mammary gland development. *WIREs Dev Biol* **1**:533-557.doi:10.1002/wdev.35.
- MCDUGUALL S, MURDOUGH P, PANKEY W, DELANEY C, BARLOW J, DAN S (2001). Relationsheeps among somatic cell count, California MASTitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research* **40**:245-254.
- MCMANAMAN JL, NEVILLE MC (2003). Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**: 629–641. doi:10.1016/S0169-409X(03)00033-4
- MOHAPATRA A, SHINDE AK, SINGH R (2019). Sheeo milk: A pertinent functional food. *Small Ruminant Research* **181**:6-11.
- MELNİK BC, KAKULAS F, GEDDAS DT, HARTMANN PE, JHON SM, BASTOS PC, CORDIAN L, SCHİMTZ G (2016). Milk MiRNAs: simple nutrients or systemic functional regulators. *Nutrition & Metabolism* **14**:42 doi: 10.1186/s12986-016-0101-2.
- MELNİK BC, SCHMİTS G (2017). DNA methyltransferase 1- targetting miRNA-148a of diary milk: a potential bioactive modifier of human epigenome. *Functional Foods in Health and disease* **7(9)**: 671-687.
- MOLES JP, TUAİLLAN E, KANKASA C, BODIN AS, NAGOT N, MARCHANT A, MCDERMID JM, PERRE DV (2018). Breastmilk cell trafficking induces microchmerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatr. Allergy immunol.* **29(2)**: 133-143. Doi: 10.1111/pai.12841.
- MOLIK E, MİSZTAL T, RMANOWICZ K, ZİEBA D, WIERZCHOS E (2009). Changes in growth hormone and prolactin secretion in ewes used form ilk under diffrent photoperiodic conditions. *Bulltein of Veterinary institue in Pulawy* **53**: 389-393.
- MOLIK E, ZİEBA-PRZYBYLSKA D (2017). Current topics in lactation içinde ; Role of Melatonin and the biologycal clock in regulating lactation in seasonal sheep. Chapter **3**. *Intech*. <http://dx.doi.org/10.5772/66208>.
- MUROYA S, HAGİ T, KİMURA A, ASO H, MATSUZAKİ M, NOMURA M (2016) Lactogenic hormones alter cellular and extracellular microRNA expression in bovine mammary epithelial cell culture. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **7**: 8
- OSORIO JS, LOHAKARE J, BIONAZ M (2016). Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Phsiol. Genomics* **48**: 231-256.
- ÖNAL AR., ÖZDER M (2007) Trakya’da özel bir süt işleme tesisi tarafından değerlendirilen çiğ sütlerin somatik hücre sayısı ve bazı bileşenlerinin tespiti. *Tekirdağ Zir Fak Derg*, **(4)2**, 195-199.
- ÖZKAN H, ERASLAN ŞAKAR A, YAKAN A (2016). Keçi Süt Somatik Hücrelerinden RNA İzolasyonu: problemler ve Çözüm Önerileri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, **5(2)**:160-162.
- ÖZMEN Ö, KUL S, GÖK T (2020) Determination of genetic diversity of the Akkaraman sheep breed from Turkey. *Small Ruminant research* **182**:37-45

- PATIR B, CAN ÖP, GÜRSER M (2010). Farklı illerden toplanan çiğ inek sütlerinde somatik hücre sayısı. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Derg.* **24(2)**: 87-91.
- POURLIS A (2019). Ovine mammary morphology and associations with milk production, milk ability and animal selection. *Small Ruminant Research*. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.10010>
- REINHARDT TA, LİPPOLIS JD, NONNECKE BJ, SACCO RE (2012). Bovine milk exosome proteome. *J. Proteom.* **75**: 1486–1492.
- RIŞVANLI A, KALKAN C (2002). Sütçü ineklerde yaş ve ırkın subklinik mastitisli memelerin sütlerindeki somatik hücre sayısı ile mikrobiyolojik izolasyon oranlarına etkisi. *YYÜ Vet. Fak. Derg.* **13(1-2)**: 84-87.
- SANDHU GK, MILEVSKI MJG, WILSON W, SHEWAN AM, BROWN MA (2016) Non-coding RNAa in Mammary Gland Development and Disease. *Non-coding RNA and the Reproductive System*. WILHELM D, BERNARD P. Springer Dordrecht Heidelberg ,New York, London.
- SARIKAYA H (2006) Somatic cell populations in milk: Importance in mammary gland physiology and behaviour during technological processing. Doktora Tezi. Technical University, Munich
- SATO F, TSUCHIYA S, MELTZER SJ, SHİMİZU K (2011). MicroRNAs and Epigenetics. *FEBS journal* **278**: 1598-1609. doi:10.1111/j.1742-4658-2011.08089.x.
- SCHLAM OW, NOORLANDER DO. (1957). "Experiments and observations leading to development of the California mastitis test". *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **130** (5): 199–204.
- SHEARER JK, BACHMAN KC, BOOSİNGER J (1992). The production of quality milk. *Dairy Prod Guide*. Florida Cooperative Extension Service.
- SHEN B, ZHANG L, LIAN C, LU C, ZHANG Y, PAN Q, YANG R, ZHAO Z (2016). Deep Sequencing and Screening of Differentially Expresses microRNAs Related to Milk Fat Metabolism in Bovine Primary Mammary Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci* **17**:200 doi: 10.3390/ijms17020200.
- STRİNG. JENSEN LJ, KUHN M, STARK M, CHAFFRON S, CREEVEY C, MULLER J, DOERKS T, JULİEN P, ROTH A, SIMANOVIC M, BORK P, MERING C (2009) STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids res.* **37(Database issue)**: 412-416.
- STRUCKEN EM, LAURENSEN YCSM, BROCKMANN GA (2015). Go with the flow-biology and genetics of the lactation cycle. *Front. Genet.* **6**:118. Doi: 10.3389/fgene.2015.00118.
- TAGEM (2009) Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları Tanıtım Katoloğu, Ankara.
- TUIK. Türkiye İstatistik kurumu (2019) www.tuik.gov.tr .Erişim tarihi: 19.09.2019

- TANG KQ, WANG YN, ZAN LS, YANG WC (2017). miR-27a controls triacylglycerol synthesis in bovine mammary epithelial cells by targetting peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Dairy Sci.* **100**:4102-4112. Doi: 10.3168/jds.2016-12264.
- TURNER CW (1952) The anatomy of the udder of sheep. In: the mammary gland. Ed. TURNER CW, LUCAS B, Columbia, Missouri. 315-335.
- WANG J, BIAN Y, WANG Z, LI D, WANG C, LI Q, GAO X (2014). MicroRNA-152 Regulates DNA Methyltransferase 1 and Is Involved in the Development and Lactation of Mammary Glands in Dairy Cows. *Plos One* **9**(7) : e101358. Doi: 10.1371/journal.pone.0101358.
- WANG X, ZHANG L, JIN J, XIA A, WANG C, CUI Y, QU B, LI Q, SHENG C (2018). Comparative transcriptome analysis to investigate potential role of miRNAs in milk protein/fat quality. *Scientific Reports* **8**: 6250. Doi: 10.1038/s41598-018-24727-y.
- WANG M, MOISA S, KHAN M, WANG J, BU D, LOOR J (2012) MikroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation. *Journal of Dairy Science* **95** (11): 6529-6535.
- YAĞCI İP, KAYMAZ M (2006). Koyunlarda klinik, mikrobiyolojik ve biyokimyasal metodlar ile subklinik mastitlerin saptanması. *Ankara üniv. Vet. Fak. Derg* **53**:31-35.
- YANG Y, FANG X, YANG R, YU H, JIANG P, SUN B, ZHAO Z (2018). Mir-152 Regulates Apoptosis and Triglyceride Production in MECs via Targetting ACAA2 and HSD17B12 Genes. *Scientific Reports* **8**:417. Doi: 10.1038/s41598-017-18804-x.
- YUE J, TIGYI G (2010) Conservation of miR-15a/16-1 and miR-15b/16-2 clusters. *Mamm Genome* **21**(1-2): 88-94. doi:10.1007/s00335-009-9240-3.

EKLER

Ek-1 Etik kurul yazısı.

	T.C. GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü	
Sayı : 87799839-325.04.02-E.2506382		10.10.2017
Konu : Çalışma İzinleri		
ELAZIĞ VALİLİĞİNE (Elazığ İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü)		
İlgi : 05.10.2017 tarihli ve 55592074-325.04.02-E.2471471 sayılı yazınız.		
İlgide kayıtlı yazınızda belirttiğiniz, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalında görevli Yrd. Doç. Dr. Özge ÖZMEN'in yürütücüsü olduğu "Akkaraman koyun ırkında süt verimiyle ilişkili bazı miRNA'ların belirlenmesi" isimli projesinin, 13.12.2011 tarih ve 28141 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanarak yürürlüğe giren "Deneyisel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik" kapsamında olan bir proje olmadığı değerlendirilmiştir.		
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.		
 e-imzalıdır Doç. Dr. Veli GÜLYAZ Bakan a. Genel Müdür Yardımcısı V.		
Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.		
Eskişehir Yolu 9. Km. Lodumlu Mevkii 06800 Çankaya/ Ankara		Bilgi için: Dr. Yasin ŞEN Veteriner Hekim

Ek-2 Şubat ayına ait lactoscan analizi sonuçları.

No	Sıcaklık	Yağ	YKM	Yoğunluk	Protein	Laktoz	Tuz	Su	Donma N.	İletkenlik
7	18,2	7	10,62	34,6	3,8	5,7	0,8	0	-0,749	4,6
17	14,7	8,6	10,47	33	3,7	5,7	0,8	0	-0,751	4,6
21	17	7,1	10,87	35,5	3,9	5,9	0,8	0	-0,77	4,7
25	15,6	6,3	11,18	37,1	4	6	0,8	0	-0,788	4,7
27	14,3	8,9	9,96	31,1	3,6	5,4	0,7	0	-0,712	4,6
29	19,1	7,2	10,85	35,3	3,9	5,9	0,8	0	-0,769	4,6
34	14,4	5	11,3	38,3	4	6,1	0,9	0	-0,785	5
35	18,5	5,4	10,95	36,7	3,9	5,9	0,8	0	-0,762	5
37	18,8	5,3	10,74	36,1	3,8	5,8	0,8	0	-0,745	4,6
38	17,8	5,6	10,74	35,9	3,8	5,8	0,7	0	-0,747	4,7
41	16,5	7	11,31	37,1	4	6,1	0,9	0	-0,805	4,8
43	16,4	7,5	11,18	36,3	4	6	0,8	0	-0,799	4,2
44	18,1	7	10,98	35,9	3,9	5,9	0,8	0	-0,778	4,1
46	15,5	5,8	10,28	34,1	3,7	5,6	0,8	0	-0,712	4,8
51	16,1	8,8	11,11	35,3	4	6	0,8	0	-0,805	4,6
52	18	12,8	10,32	30	3,7	5,6	0,7	0	-0,777	4,1
66	20	6,6	10,93	36	3,9	5,9	0,8	0	-0,77	4,3
71	16,7	7,8	10,65	34,2	3,8	5,8	0,8	0	-0,758	4,8
74	18,6	3,9	10,94	37,6	3,9	5,9	0,8	0	-0,74	4,3
77	17,1	5,1	11,63	39,4	4,1	6,3	0,9	0	-0,813	4,9
2	16,6	5,4	10,72	36	3,8	5,8	0,8	0	-0,734	4,5
3	15,2	6,2	11,18	37,1	4	6	0,8	0	-0,778	4,3
14	17,5	6,2	11,11	36,9	4	6	0,8	0	-0,781	4,6
16	12,9	5,9	11,73	39,3	4,2	6,3	0,9	0	-0,829	4,7
26	14,8	4,7	11,52	38,2	4	6,1	0,9	0	-0,776	4,4
30	15	6,8	11,44	37,7	4,1	6,2	0,9	0	-0,815	4,7
31	16,5	5,7	11,05	36,9	3,9	6	0,8	0	-0,772	4,6
36	11,8	6,8	11,45	37,7	4,1	6,2	0,9	0	-0,815	4,6
40	14,8	5,5	10,71	35,8	3,8	5,8	0,8	0	-0,743	4,3
45	17,3	5,7	11,8	37,1	4	6	0,8	0	-0,775	4,6
49	17,5	4,9	11,59	39,4	4,1	6,3	0,9	0	-0,808	4,2
54	18,5	8,4	11,11	35,5	4	6	0,8	0	-0,801	4,6
55	17,7	6,1	10,61	35,1	3,8	5,7	0,8	0	-0,74	4,8
56	18	3,8	11,21	38,7	4	6,1	0,9	0	-0,768	5,1
62	20	5,6	11,57	38,9	4,1	6,3	0,9	0	-0,812	4,1
64	15,5	8,8	10,57	33,3	3,8	5,7	0,8	0	-0,761	4,9
67	16,1	5,3	10,91	36,7	3,9	5,9	0,8	0	-0,75	4,2
72	16,2	5,6	11,25	37,8	4	6,1	0,9	0	-0,787	4
17	14,7	8,6	10,47	33	3,7	5,7	0,8	0	-0,751	4,6
21	17	7,1	10,87	35,5	3,9	5,9	0,8	0	-0,77	4,7

Ek-3 Haziran ayına ait lactoscan sonuçları

örnek no	sıcaklık	yağ	ykm	Yoğunluk	Protein	Laktoz	Tuz	Su	Donma Nok	İletkenlik
7	13,8	9,8	10,64	33,0	3,8	5,8	0,8	0	0,776	4,8
17	18,4	10,4	11,5	34,5	4	6	0,8	0	0,824	4,7
21	18,3	9,9	11,27	35,2	4	6,1	0,8	0	0,829	4,3
25	10,8	11	10,82	32,9	3,9	5,8	0,8	0	0,802	4,8
27	21,3	9,7	11,73	37	4,2	6,3	0,9	0	0,867	4,7
29	18,6	11	10,8	32,8	3,9	5,8	0,8	0	0,8	4,7
34	21,5	9,9	10,73	33,2	3,8	5,8	0,8	0	0,785	4,8
35	16,4	9,8	10,71	33,3	3,8	5,8	0,8	0	0,781	4,5
37	21,5	9,6	10,72	33,4	3,8	5,8	0,8	0	0,781	4,4
38	27,2	10,7	11,94	37,1	4,3	6,5	0,9	0	0,821	4,7
41	21,2	9,4	11,2	35,2	4	6,1	0,8	0	0,815	4,6
43	22,9	10,8	11,4	35,2	4,1	6,2	0,8	0	0,85	4,6
44	23	9,9	11,11	34,6	4	6	0,8	0	0,816	4,8
47	10,8	9,7	11,5	36,2	4,1	6,2	0,9	0	0,847	4,4
51	20,3	11,7	11,91	36,5	4,3	6,4	0,9	0	0,904	4,5
52	21,2	9,2	11,22	35,4	4	6,1	0,8	0	0,819	4,9
66	20	11,8	11,42	35,1	4,1	6,2	0,8	0	0,854	4,5
71	10	10,8	10,66	32,4	3,8	5,8	0,8	0	0,786	4,8
74	16	10	11	33,8	3,9	5,9	0,8	0	0,813	5,5
77	11,7	11,2	11	34,3	4,1	6,1	0,8	0	0,847	4,3
3	32,3	12,2	11,42	34,4	4,1	6,2	0,8	0	0,867	4,8
55	20,2	10,8	10,84	33,1	3,9	5,9	0,8	0	0,802	4,5
56	16,5	13,4	11,44	33,7	4,1	6,2	0,8	0	0,881	4,4
62	18	9,4	11,29	35,6	4	6,1	0,8	0	0,826	4,8
63	16,1	10,3	11,92	37,3	4,3	6,4	0,9	0	0,889	4,6
64	15,2	7,6	10,96	35,5	3,9	5,9	0,8	0	0,782	5,2
67	Meme kuru örnek alınamadı									
72	17	8,5	11,38	36,1	4,1	6,2	0,9	0	0,825	4,8
78	22,9	11,3	11,59	35,5	4,2	6,3	0,9	0	0,871	4,8
2	17	10,8	11,35	35,7	4,2	6,1	0,8	0	0,874	4,6
16	20	9,8	11,02	34,3	3,9	6	0,8	0	0,807	4,6
26	20,2	10,6	10,63	32,4	3,8	5,7	0,8	0	0,783	4,6
30	14,5	11,6	11,43	34,8	4,1	6,2	0,8	0	0,86	4,5
31	17,3	9,4	9,3	34,9	3,9	6,1	0,8	0	0,834	4,7
36	23,5	11,4	11,8	36,2	4,2	6,4	0,9	0	0,891	4,5
40	18	10	8,9	36,1	4,3	5,8	0,8	0	0,826	4,6
45	18,7	8,5	10,8	34,6	3,9	5,5	0,8	0	0,783	4,5
46	16,9	8,7	10,01	37,4	3,8	6,2	0,9	0	0,847	4,3
49	22,5	8,9	11,2	35,9	4,1	6,3	0,8	0	0,877	4,6
54	24,5	11	10,9	38	4,4	6,6	0,9	0	0,921	4,2

Ek-4 Elde edilen RNA'ların nanodrop sonuçları.

Örnek NO	Nükleik asit konsantrasyonu	Birim	260/280	Örnek Tipi
2	101	ng/μl	2,98	RNA
64	25,8	ng/μl	2,26	RNA
7	96	ng/μl	2,84	RNA
41	50,5	ng/μl	2,38	RNA
27	49,7	ng/μl	2,26	RNA
46	73,6	ng/μl	2,51	RNA
34	14,9	ng/μl	2,19	RNA
29	39,3	ng/μl	2,92	RNA
21	27,1	ng/μl	2,32	RNA
25	48,7	ng/μl	2,39	RNA
17	41,9	ng/μl	2,06	RNA
52	80,3	ng/μl	2,31	RNA
66	46,2	ng/μl	2,27	RNA
71	29,7	ng/μl	2,42	RNA
74	41,8	ng/μl	2,04	RNA
77	18,3	ng/μl	2,27	RNA
37	13,7	ng/μl	2,1	RNA
35	95,6	ng/μl	2,38	RNA
43	30,6	ng/μl	2	RNA
44	71,2	ng/μl	3,11	RNA
46	18,8	ng/μl	2,29	RNA
54	36,4	ng/μl	2,51	RNA
40	38,8	ng/μl	2,31	RNA
45	89,4	ng/μl	2,55	RNA
62	36,3	ng/μl	2,41	RNA
3	46	ng/μl	2,36	RNA
26	14,4	ng/μl	2,79	RNA
16	28,3	ng/μl	2,86	RNA
47	38,7	ng/μl	2,28	RNA
51	38,1	ng/μl	2,02	RNA
55	29,9	ng/μl	2,33	RNA
56	22,6	ng/μl	2,3	RNA
36	30,7	ng/μl	2,68	RNA
31	17	ng/μl	2,24	RNA
30	68,1	ng/μl	2,32	RNA
63	46,5	ng/μl	2,31	RNA
78	29,2	ng/μl	2,26	RNA
72	56,4	ng/μl	2,3	RNA
67	78,7	ng/μl	2,64	RNA
2	49,2	ng/μl	2,67	RNA
38	10,5	ng/μl	2,22	RNA

Ek-5 RT-PZR reaksiyonu sonucu örneklerin ct değerleri.

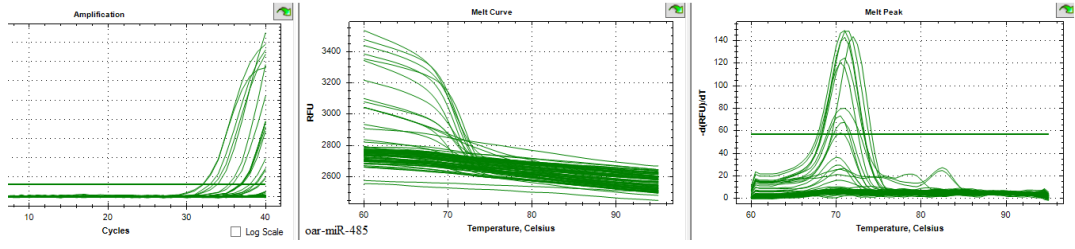
ÖRNEK	miR-148	miR-221	miR-16	miR-181	miR-27	miR-152	miR-23	miR-374
H1	29,5	37,68	33,6	33,9	34,44	35,20	33,64	36,05
H2	29,0	36,28	32,1	32,9	33,05	32,15	31,72	34,29
H3	27,4	36,09	31,0	31,2	31,53	31,87	30,22	32,91
H4	27,2	34,19	28,6	31,6	29,91	31,55	28,39	32,90
H5	29,5	36,79	31,4	33,3	33,56	32,40	31,15	34,22
H6	30,1	37,52	33,6	33,5	34,63	33,77	33,06	36,21
H7	27,3	35,58	30,6	31,4	31,30	30,79	29,38	33,00
H8	27,3	35,52	29,5	32,0	31,07	31,73	28,73	35,00
H9	32,6	39,16	0,0	34,8	19,43	35,79	33,91	36,22
H10	29,4	37,85	34,1	33,0	33,49	34,98	30,81	34,63
H11	28,7	36,18	31,3	32,5	32,26	31,43	31,37	34,73
H12	29,0	37,52	32,7	32,9	33,23	33,93	30,89	33,03
H13	27,3	37,38	30,2	30,0	30,24	30,59	28,04	33,67
H14	27,8	32,80	30,8	31,5	32,37	32,39	30,59	18,91
H15	30,1	34,48	34,4	31,6	34,93	36,16	32,30	35,14
H16	30,2	36,79	32,8	33,6	32,70	34,96	31,17	36,26
H17	30,0	37,52	33,0	33,8	33,83	36,29	31,34	37,09
H18	30,0	35,58	33,8	31,7	34,72	34,62	31,30	32,55
H19	25,6	35,52	28,9	28,2	29,07	28,91	25,82	32,45
H20	0,0	39,16	30,6	32,7	30,03	30,68	28,01	33,42
L1	29,4	36,38	31,6	32,1	31,66	34,81	33,12	33,81
L2	27,8	36,84	38,2	31,2	31,09	33,69	29,55	34,14
L3	28,8	37,89	32,3	31,0	32,06	32,34	29,12	33,69
L4	29,4	35,29	31,0	31,4	33,89	33,39	29,26	31,22
L5	27,5	39,05	29,7	30,8	29,38	32,13	27,38	35,30
L6	31,7	35,13	33,3	33,1	33,13	36,17	31,00	34,97
L7	32,4	37,09	30,7	32,6	34,92	34,64	30,31	36,55
L8	29,1	36,43	31,6	32,7	31,56	35,37	29,92	33,59
L9	28,3	37,87	30,4	31,7	31,36	29,73	30,76	33,21
L10	27,0	36,07	32,2	32,1	30,99	31,04	31,87	36,10
L11	30,0	37,01	33,6	32,0	33,09	34,14	31,72	33,27
L12	28,6	37,80	29,3	29,8	30,22	32,79	27,93	33,36
L13	28,2	37,49	33,0	32,7	31,21	32,93	30,44	31,22
L14	31,4	36,38	34,2	35,7	37,02	37,80	34,94	35,30
L15	29,4	36,84	31,6		31,66	34,81	29,55	34,97
L16	27,8	37,89	38,2		31,09	33,69	29,12	36,55
L17	28,8	35,29	32,3		32,06	32,34	29,26	33,59
L18	29,4	39,05	31,0		33,89	33,39	27,93	33,21
L19	27,5	35,13	29,7		29,38	32,13	29,55	36,10
L20	28,3	37,09	33,3		33,13	36,17	29,12	33,27

H: Yüksek Süt Verimi; L: Düşük Süt Verimini ifade etmektedir.

Ek-6 CMT (-) sonuç veren koyunların SHS sonuçları.

Örnek No	SHSx1000	Örnek No	SHSx1000
1	70	36	74
2	98	37	27
3	63	38	103
4	96	40	117
5	47	41	80
6	11	43	73
7	24	44	40
8	69	45	78
9	40	46	18
10	Ölçmedi*	47	73
11	217	49	10
13	30	51	32
14	31	52	140
15	1042	53	359
16	32	54	41
17	96	55	59
18	80	56	50
19	143	60	181
21	21	62	52
22	60	63	42
23	92	64	188
24	392	66	7
25	32	67	75
26	5	69	438
27	122	79	520
29	24	71	16
30	22	72	61
31	49	74	13
32	29	75	28
34	30	76	163
35	110	77	19
1	70		

Ek-7 Örneklemeden çıkarılan *oar-miR-485* 'e ait amplikasyon ve erime eğrileri.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Esra
Soyadı : DUMAN
Doğum yeri ve tarihi : Eskişehir-1986
Uyruğu : TC
Medeni Durumu : Evli
İletişim Adresi ve Telefonu : Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Artova Meslek Yüksek Okulu
0 530 114 68 18

II- Eğitimi

İlköğretim: 2005-Fatih Sultan Mehmet İlköğretim Okulu
Ortaöğretim: 2009-H.Ahmet Kanatlı Anadolu Lisesi
Lisans: 2010-Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doktora: 2015(yatay geçiş)-2019 Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens.
Genetik AD

III- Mesleki Deneyimi

2012-2014 Fırat Üniversitesi- Araştırma Görevlisi
2017-- Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi-Öğretim Görevlisi

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Görev aldığı projeler

1. Elazığ Bölgesinde Yetiştirilen Akkaraman Koyunlarının Morfolojik ve Genetik Yapısı, DİĞER, Araştırmacı, 2012
2. Artova MYO Laborant ve Veteriner Sağlık Programı Uygulama Laboratuvarı Kurulması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma

projesi, Yürütücü: KAYA EMRAH, Araştırmacı: DUMAN ESRA, Araştırmacı: DURSUN ADEM, , 01/08/2018 (Devam Ediyor) (ULUSAL).

3. Akkaraman Koyun Irkında Süt Verimiyle İlişkili Bazı miRNA'ların İncelenmesi., Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü:ÖZMEN ÖZGE, Araştırmacı:DUMAN ESRA, 2018.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. ŞENEL ARAS, TÜREL ÖMER OSMAN, DUMAN ESRA, ÖZMEN ÖZGE (2019). Heat Stress and Heat Shock Protein Genes Mediated Cellular Responds in Ovis aries. 1st International Erciyes Agriculture, Animal and Food Sciences Conference (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:5024988).
2. DUMAN ESRA, ÖZMEN ÖZGE, KUL SELİM (2019). The Expression Level Of Oar-Mir-148a, Oar-Mir-16b And Oar-Mir-181a In Sheep Milk During Lactation. 3. International Conference on Agriculture, Food, Veterinary and Pharmacy Sciences (ICAFOP 2019) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5024880).
3. ÇILDIR ÖZGE ŞEBNEM, DUMAN ESRA, ÖZMEN ÖZGE, KUL SELİM (2017). Dna Barkod Metodunun Koyunda Tür Ayırımı İçin Kullanımı. 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 104-104. (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4219132).

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. ŞENEL A, DUMAN E, TÜREL ÖO (2019) Değişen İklim Koşullarına Karşı Çiftlik Hayvanlarında Genetik Adaptasyon Mekanizmaları. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 11(1):1-23.