



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



# KOYUNLARDA, CMAH GENİNİN NEU5GC SİALİK ASİDİYLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Sedef ERKUNT ALAK

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir  
2022

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KOYUNLARDA, CMAH GENİNİN NEU5GC SİYALİK  
ASİDİYLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sedef ERKUNT ALAK

Danışman: Prof. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Doktora Programı

İzmir  
2022



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Koyunlarda, CMAH Geninin Neu5Gc Sialik Asidiyle İlişkisinin Araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08/ 04/2022

Sedef ERKUNT ALAK

**ÖZET****KOYUNLARDA, CMAH GENİNİN NEU5GC SİYALİK ASİDİYLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ERKUNT ALAK, Sedef

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Nisan 2022, 76 sayfa

Et, sağlıklı bir insan büyümesi ve gelişimi için gerekli olan, besin içeriği bakımından zengin bir gıda kaynağıdır. Günümüzde et tüketimi kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi hastalıklarla ilişkilendirilse de, et insan evriminde önemli bir role sahiptir. Dünya nüfusu arttıkça et ve et ürünlerine olan talep de giderek artmaktadır. Sağlıklı ve dengeli beslenmenin önemli bir unsuru olan kırmızı et ve et ürünleri tüketimi nüfusun hızla arttığı Türkiye'de büyük önem taşımaktadır.

Dünya Kanser Araştırmaları Vakfı'nın yayınladığı raporda kırmızı et, tüm popülasyonlarda karsinomların insidansı ve ilerlemesi ile ilişkili ilk 10 faktör arasında yer almaktadır. İnsan dışı bir sialik asit olan N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc) molekülü ile dolaşımdaki anti-Neu5Gc antikorlarının etkileşimi sonucunda oluşan inflamasyonun kanser ve et tüketimi arasındaki mekanizma olabileceği önerilmiştir. Bu nedenle kanser riskini azaltmak için Neu5Gc'nin daha az bulunduğu diyetlerin önemli olduğu bildirilmiştir.

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan, et ve süt ürünleri tüketilen Kıvırcık ve Karacabey Merinos koyun ırklarında, Neu5Gc sentezinde görev alan *CMAH* mRNA dizisi analiz edilerek sialik asit sentezini etkileyen olası polimorfizmlerin saptanması ve hayvan ıslahı açısından Neu5Gc içeriğiyle ilişkili olabilecek bir biyobelirteç bulunması amaçlanmıştır.

Koyun CMAH mRNA dizilerinde toplamda 11 tek nükleotid polimorfizmi bulunmuştur. Polimorfizm pozisyonlarının 5'i amino asit değişime sebep olurken 6'sı eş anlamlı tek nükleotid polimorfizmi olarak belirlenmiştir. Polimorfizm frekans sonuçları KD ve MD'de G27A pozisyonunda görülen AA genotipinin (sırasıyla 0.07 ve 0.09), KD ve MD'de G55T pozisyonunda görülen GG genotipinin (sırasıyla 0.04 ve 0.05) ve KD ve MD'de A294G'de görülen AA genotipinin (sırasıyla 0.04 ve 0.05) Neu5Gc sialik asit miktarıyla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Ek olarak, koyun CMAH geninde alternatif ekleme varyantları olduğu ortaya konmuş ve bu varyantların Neu5Gc sialik oranını etkileyebileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, Kıvırcık ve Karacabey Merinos koyun ırklarında ilk kez CMAH mRNA dizisi sekanslanmış ve eksonlardaki polimorfizimler belirlenmiştir. Neu5Gc sialik asit miktarıyla ilişkili olabilecek genotipler ilk kez bu çalışmada aday gösterilmiş ve koyun CMAH geninin farklı mRNA varyantları olduğundan ilk defa bahsedilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Kanser, kırmızı et, CMAH, Neu5Gc, polimorfizm

**ABSTRACT****RESEARCH OF RELATIONSHIP BETWEEN CMAH GENE AND  
NEU5GC SIALIC ACID IN SHEEP**

ERKUNT ALAK, Sedef

PhD in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Cemal ÜN

April 2022, 76 pages

Meat is a food source rich in nutrients that are essential for healthy human growth and development. Despite the fact that meat eating is now linked to disease including cancer, cardiovascular disease and diabetes, meat has played a crucial role in human evolution. As the world's population grows, the demand for meat and animal products which are essential for human health and nourishment is also increasing. In Turkey, where the population is continuously growing, it is critical to consume red meat and meat products in order to maintain a healthy and balanced diet.

Red meat is one of the top ten factors linked to the occurrence and progression of carcinomas in all populations, according to a report issued by the World Cancer Research Foundation. Inflammation caused by the interaction of the N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) molecule, a non-human sialic acid, with circulating anti-Neu5Gc antibodies has been proposed as a possible link between cancer and meat eating. As a result, it has been suggested that diets low in Neu5Gc are beneficial in lowering cancer risk.

In the light of this information, the aim of this study was to analyze the CMAH mRNA sequence involved in Neu5Gc synthesis in Kırırcık and Karacabey Merino sheep breeds reared in Turkey, to detect possible polymorphisms affecting sialic acid synthesis and to find a biomarker that may be related to Neu5Gc content in terms of animal breeding.

A total of 11 single-nucleotide polymorphisms were found in sheep CMAH mRNA sequences. While 5 of the polymorphism positions cause amino acid changes, 6 of them are determined as synonymous single nucleotide polymorphisms. The polymorphism frequency results suggested that the AA genotype at position G27A in KD and MD (0.07 and 0.09, respectively), the GG genotype at position G55T in KD and MD (0.04 and 0.05, respectively), and the AA genotype at A294G in KD and MD (0.04 and 0.05, respectively) may be related to the amount of Neu5Gc sialic acid. In addition, alternative splicing variants have been demonstrated in the sheep CMAH gene, and it is thought that these variants also may affect the amount of Neu5Gc sialic acid.

In conclusion, CMAH mRNA sequence was sequenced for the first time in K1vircik and Karacabey Merino sheep breeds and polymorphisms in exons were determined. Genotypes that may be related to the amount of Neu5Gc sialic acid were nominated for the first time in this study and it was mentioned for the first time that there are different mRNA variants of the sheep CMAH gene.

**Keywords:** Cancer, red meat, CMAH, Neu5Gc, polymorphism

## ÖNSÖZ

Kanser, Türkiye ve dünyada her yıl bir çok insanın ölümüne neden olan ciddi bir hastalıktır. Kanser riskini azaltmak için sağlıklı beslenmenin önemli olduğu bildirilmiş ve hayvansal ürünlerin daha az tüketilmesi önerilmiştir. Kırmızı et ve kanser ilişkisinin Neu5Gc sialik asit kaynaklı olabileceğine dair yapılan çalışmalar, bu tez çalışması fikrinin ortaya çıkmasını sağlamıştır.

Hayvan yetiştiriciliğinde et kalitesi ve hayvansal ürün verimliliği başta olmak üzere bir çok özelliğin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, bugüne kadar bir çok özellikle ilgili genotip-fenotip korelasyonu sağlanmıştır. Kanser riskini azaltmak amacıyla Neu5Gc sialik asidini az üreten hayvanların genotiplerinin tespit edilmesinin, hayvan ıslahı açısından önemli bir biyobelirteç olacağı düşünülmüş ve tez çalışması bu çerçevede gerçekleştirilmiştir. Bu alanda daha önce yapılan çalışmalar, çiftlik hayvanlarının vücudunda çeşitli dokularda bulunan Neu5Gc miktarının tayinini gerçekleştirmiş ancak Neu5Gc miktarı az olan hayvanların genotiplerinin belirlenmesi ve hayvan ıslahında kullanılması düşüncesi fikri bu çalışmada ortaya konmuştur.

Çalışmadaki en büyük motivasyon kaynağım, insan sağlığı açısından oldukça önemli olan et kalitesi çalışmalarına dair bir veri ortaya koyabilecek olma düşüncesiydi. Tez çalışmalarım süresince elde ettiğim bilimsel bilgilerin ve laboratuvar tecrübesinin, gelecekteki çalışmalarımda yol gösterici olacağından eminim. Tez çalışmasının sonuçlarının, gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalara temel olacağı ve hayvan ıslahı açısından önemli bir veri oluşturacağı düşüncesindeyim.

İZMİR

08/04/2022

Sedef ERKUNT ALAK

**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK.....	(ii)
KABUL ONAY SAYFASI.....	(iii)
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	(iv)
ÖZET.....	(v)
ABSTRACT.....	(vii)
ÖNSÖZ .....	(ix)
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	(x)
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	(xiii)
TABLolar DİZİNİ.....	(xiv)
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	(xv)
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 İnsan Evriminde Et Tüketiminin Önemi.....	2
2.2 Dünyada Et Tüketimi.....	5
2.2.1 Türkiye’de Et Tüketimi.....	7

**İÇİNDEKİLER (devam)**

2.2.2 Türkiye’de Hayvan Yetiştiriciliği.....	8
2.3 Et Tüketimi ve Çevresel Sorunlar.....	9
2.4 Kırmızı Et ile İlişkilendirilen Hastalıklar.....	11
2.5 Kırmızı Et ve Kansere İlişkisi.....	13
2.6 Sialik Asitler.....	14
2.7 CMAH Geni ve Enzimi.....	18
2.8 Çalışmanın Amacı.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1 Koyun Kan Örneklerinin Alınması.....	22
3.2 Kan Örneklerinden RNA İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi.....	23
3.3 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	23
3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	24
3.5 Agaroz Jel Elektroforezi ve Sekanslama.....	27
3.6 Polimorfizmlerin ve Alel/Genotip Frekanslarının Belirlenmesi.....	27
3.7 Amino Asit Değişiminin Protein Fonksiyonuna Etkisi.....	28
3.8 Kodon Kullanım Oranı ve mRNA İkincil Yapısının Belirlenmesi.....	28
3.9 Protein İkincil Yapı Analizi.....	28

**İÇİNDEKİLER (devam)**

4. BULGULAR.....	29
4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	29
4.2 Polimorfizmlerin Belirlenmesi.....	29
4.3 Polimorfizm Frekansları.....	34
4.4 Amino Asit Değişiminin Protein Fonksiyonuna Etkisi.....	35
4.5 Alternatif Ekleme.....	36
4.6 Kodon Kullanım Oranları.....	41
4.7 mRNA İkincil Yapıları.....	42
4.8 Proteinlerin Sekonder Yapıları.....	44
5. TARTIŞMA.....	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	52
TEŞEKKÜR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	71

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İnsan beslenmesinin evrimi.....	4
2.2. Sialik asitlerin yapıları ve yaygın görülen türleri.....	15
2.3. Şempanze ve insanda CMAH enzim aktivitesi.....	19
3.1. Kıvırcık ve Karacabey Merinos ırkı, dişi ve erkek koyunlar.....	21
3.2. Referans mRNA Dizisi Kullanılarak Tasarlanan Primer Çiftleri.....	25
4.1. MEGA 11 kullanılarak analiz edilen CMAH mRNA sekansları.....	29
4.2. Koyun CMAH eksonlarındaki nükleotit polimorfizmleri ve amino asit değişimlerini.....	30
4.3. Varyantların mRNA ikincil yapıları.....	43
4.4. MEGA 11 kullanılarak analiz edilen CMAH mRNA sekansları.....	30

## TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) 2021 Yılı Ülke Bazında Kişi Başı Et Tüketim Miktarı.....	7
2.2. Hayvansal gıdalardaki Neu5Gc miktarı ve toplam sialik asitlere yüzde oranı.....	14
3.1. Revers transkriptaz reaksiyon koşulları.....	24
3.2. Polimorfizm profilleri ve PZR ürün büyüklüğü.....	25
3.3. Referans CMAH mRNA ekson ve sekansları.....	26
4.1. CMAH mRNA dizilerinde saptanan polimorfizmler.....	31
4.2. Polimorfizm pozisyonlarındaki genotip frekansı.....	34
4.3. Polimorfizm pozisyonlarındaki alel frekansı.....	35
4.4. Yanlış anlamlı mutasyonların protein fonksiyonuna etkisi.....	36
4.5. Alternatif ekleme sonucu oluşan farklı varyantların nükleotit sekansı.....	37
4.6. Alternatif ekleme sonucu oluşan farklı varyantların amino asit sekansı...	40
4.7. Varyantların kodon kullanım oranları.....	41
4.8. Proteinlerin sekonder yapı oranları.....	35

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
bç	Baz çifti
µl	Mikro litre
µM	Mikromolar
ml	Mililitre
g	Yerçekimi Kuvveti
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CMAH	Sitidin monofosfo-N-asetilnöraminik asit hidroksilaz
Neu5Gc	N-glikolilnöraminik asit
Neu5Ac	N-asetilnöraminik asit
Myö	Milyon Yıl önce
Byö	Bin Yıl önce
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
IPCC	Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli
SGE	Sera Gazı Emisyonu

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

YDD	Yaşam Döngüsü Değerlendirmesi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
T2D	Tip 2 Diyabet
KVH	Kardiyovasküler Hastalıklar
KD	Kıvırcık Dişi
KE	Kıvırcık Erkek
MD	Karacabey Merinos Dişi
ME	Karacabey Merinos Erkek
NCBI	National Center for Biotechnology Information

## 1. GİRİŞ

Et insan evriminde rol oynayan, insan gelişimi açısından önemli bir besin kaynağıdır. Zengin besin içeriğine sahip olmakla birlikte, fazla miktarda et tüketimi kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanserle ilişkilendirilmektedir. Kırmızı et tüketimi ve kanser ilişkisine yönelik çalışmalarda, kırmızı et tüketimiyle insan vücuduna alınan N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc) sialik asidinin kanser dokularda yüksek miktarda bulunduğu gösterilmiştir. CMAH geninin kodladığı CMAH enzimi tarafından N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac) sialik asidinin hidrosilasyonu ile oluşan Neu5Gc sialik asidi, insanlarda CMAH geninin delesyona uğrayıp susmuş olması nedeniyle üretilmemektedir. Beslenme yoluyla alınan ve kanser mekanizmasıyla ilişkilendirilen Neu5Gc sialik asidinin daha az bulunduğu veya bulunmadığı besin kaynaklarını tüketmek kanser riskini azaltacak olması nedeniyle oldukça önemlidir.

Bu bilgiler ışığında, çalışmada Türkiye’de et ve süt tüketimi yapılan Kıvırcık ve Karacabey Merinos ırkı koyunların kan örneklerinden elde edilen *CMAH* mRNA eksonları sekanslanarak, Neu5Gc sialik asit miktarıyla ilişkili olabilecek genotiplerin saptanması ve hayvan yetiştiriciliğinde kullanılabilecek bir biyobelirteç belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmayla, koyun CMAH geni mRNA dizisi ilk kez sekanslanmıştır. Elde edilen sonuçlar, her iki ırk için de Neu5Gc sialik asit miktarıyla ilişkili olabilecek genotipler olduğunu göstermektedir. Çalışmanın, koyun ıslah çalışmalarında kullanılabilecek düşük Neu5Gc miktarıyla ilişkili aday biyobelirteçlerin belirlenmesinde bir ilk olması, bu alanda yapılacak gelecek çalışmalarda temel oluşturacağını düşündürmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 İnsan Evriminde Et Tüketiminin Önemi

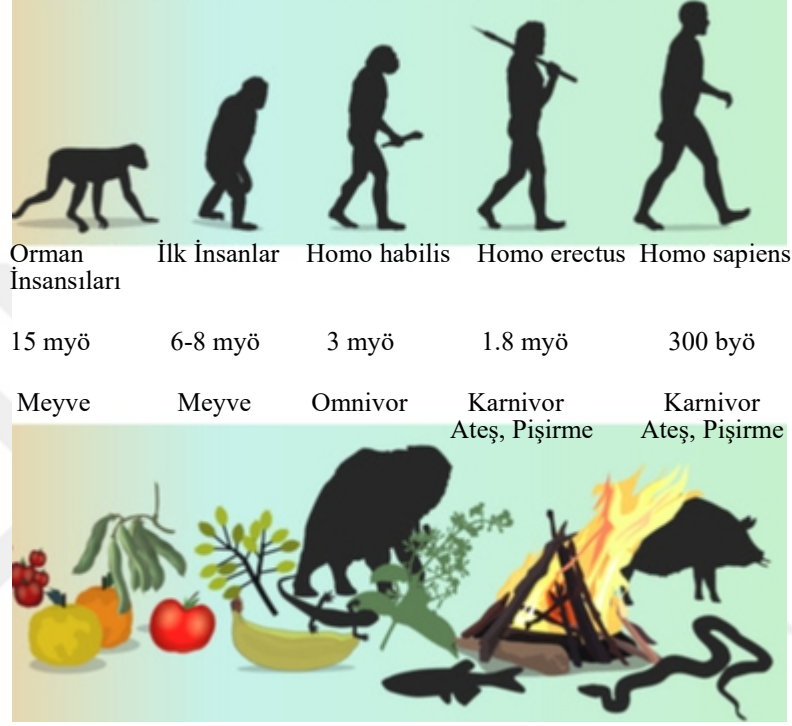
Et, sağlıklı bir insan büyümesi ve gelişimi için gerekli olan, besin içeriği bakımından zengin bir gıda kaynağıdır (Higgs, 2000). Günümüzde et tüketimi diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi bir dizi hastalıkla ilişkilendirilse de, et sadece uygun büyüme, gelişme ve sağlığın korunmasında değil, aynı zamanda insan evriminde de önemli bir role sahiptir. Et tüketiminin vücut büyüklüğü, kafa-diş ve bağırsak morfolojik değişiklikleri, insanın dik duruşu, ve belki en önemlisi, beyin ve entelektüel gelişim üzerine etkisi olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Pereira ve Vicente, 2013).

İlk hominin türlerinin beslenmesi temel olarak bazı hayvansal gıdalarla takviye edilmiş bitkilere (meyveler, tohumlar, çimenler ve yumrular) dayanmaktaydı. Paleontolojik ve arkeolojik araştırmaların sonuçları, daha büyük miktarlarda hayvan proteinlerinin beslenmeye dahil edilmesinin en erken *Homo* ile başladığı teorisini desteklemiştir, *Homo habilis*'in eti çöpçülükten ve daha küçük bir kısmını avlanarak elde ettiği, *Homo erectus*'un ise hayvansal proteinler elde etmek için avlanmayı baskın yöntem olarak kullandığı ve bunun insan evriminde büyük bir adaptif değişim olduğu bildirilmiştir (Leonard vd., 2007) (Şekil 2.1).

Et tüketimi ve avlanma, insanlarda vücut boyutunun artmasına neden olmuştur. Erkeklerin ortalama vücut kütlesi *H. habilis*'de 37 kg iken, *H. erectus*'da 66 kg'a çıkmış, kadınların vücut kütlesi ise *H. erectus*'da, *H. habilis*'e göre %53 artarak, 32 kg'dan 56 kg'a çıkmıştır. Boy erkeklerde 131 cm'den 180 cm'ye (%33), kadınlarda 100 cm'den 160 cm'ye (%37) kadar artış göstermiştir (McHenry ve Coffing, 2000).

İnsanları diğer maymunlardan ayıran bipedalizm, yaklaşık dört milyon yıl önce Afrika'da yaşayan, bilinen en eski *Australopithecus* türünde ortaya çıkmıştır (Leonard, 2002). Bazı araştırmalara göre *A. afarensis*'te "postural" bipedalizm bulunmuş ancak lokomotor bipedalizm 1.9 ile 1.5 milyon yıl önce *H. ergaster*'in ortaya çıkışına kadar görülmemiştir. Afrika'daki iklim değişiklikleri nedeniyle

yiyecek kaynaklarının düzensiz bir şekilde dağıldığı daha açık habitatların insanları yiyecek bulmak için hareket etmeye zorladığı ve *H. ergaster*'deki bipedalizmin bu şekilde ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu durum nedeniyle bipedalizm, insan beslenme evrimindeki ilk stratejilerden biri olarak kabul edilmektedir (Wang ve Crompton, 2004).



**Şekil 2.1.** İnsan beslenmesinin evrimi (Andrews ve Johnson, 2020).

my: milyon yıl önce, byö: bin yıl önce

Etin beslenmede yaygınlaşmasıyla birlikte sindirim sisteminde de değişiklikler gerçekleşmiştir. Australopithecine'lerin evrimi sırasında, azı dişlerinin toplam yüzey alanı *A. afarensis*'te 460 mm<sup>2</sup>'den *A. boisei*'de 756 mm<sup>2</sup>'ye yükselmiş olsa da, Homo cinsinden erken türlerde azı dişlerinin yüzey alanında azalma kaydedilmiştir. Postkaninlerin diş yüzey alanı ise *H. habilis*'te 478 mm<sup>2</sup>'den erken *H. erectus*'da 377 mm<sup>2</sup>'ye düşmüştür. Beslenme evriminin etkisiyle ortaya çıkan azı dişlerinin boyutundaki azalma ve ön dişlerin güçlenmesi, et parçalama ve çiğnemeyi sağlamış, bağırsak morfolojisindeki değişiklikler yüksek kaliteli diyetin etkisini göstermiştir (Speth, 1989).

Genel olarak, büyük primatlar, bitki liflerinden fermentasyon işlemiyle elde edilen uçucu yağ asitleri biçiminde ek enerjinin çıkarılması için gerekli olan genişlemiş bir kolona sahiptirler. Diğer taraftan, insanlarda küçük bir kolon ve genişlemiş ince bağırsak bulunmaktadır. Bağırsak morfolojisindeki bu farklılıklar, insan beslenmesinde kolay sindirilen hayvan proteinlerine adaptasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (Mann, 2007).

Artan vücut boyutuyla birlikte beyin boyutu da artış göstermiştir. Beyin en eski Australopithec'inlerde  $400 \text{ cm}^3$  iken modern insanlarda  $1300-1400 \text{ cm}^3$ 'e yükselmiş ancak beyin boyutundaki eşit değişiklikler evrim sırasında düzenli dönemlerde tespit edilememiştir. Evrim sırasında vücut kütlesine kıyasla diğer primatlardan daha büyük bir beyne sahip olan *H. erectus*'ta en yüksek ensefalizasyon seviyesi bulunmuştur. *H. erectus* beyin boyutu, *H. habilis* beyin boyutundan yaklaşık  $200-300 \text{ cm}^3$  daha büyük olacak şekilde  $800$  ila  $900 \text{ cm}^3$ 'e ulaşmıştır (Leonard vd., 2007).

Karmaşık yiyecek arama davranışı ve araçların kullanımı için daha büyük beyinlere ihtiyaç olduğu bilinmektedir (Leroy ve Praet, 2015). *A. garhi*'nin ilk taş alet kullanıcısı olduğuna ve *A. africanus*'un Oldowan aletleri yaptığının bazı belirtiler bulunmuştur ancak *H. erectus*'un taş aletler kullandığına dair şüphe yoktur (Plummer, 2004). Oldowan endüstri araçlarının geliştirilmesi, başarılı avlanma ve karkasların daha kolay işlenmesini, et, kemik iliği ve beyinlere erişimin artmasını sağlamıştır. Dil gelişiminde bir dönüm noktası olan pandomim ve seslendirmeye yol açan avcılık (Leroy ve Praet, 2015) ve arkeolojik bulgular ile ortaya çıkan et paylaşımındaki işbirliği, sosyogenezin ilk adımlarından kabul edilmiştir. Bunun yanı sıra sanatın kökenlerinin avlanma ritüelleri ile bağlantılı olduğu ve yaban öküzü gibi av olarak avlanan hayvanların, Üst Paleolitik'te hayvan sanatının bilinen ilk nesnelere olduğu bildirilmiştir. Avlanma ve hayvan kurban etme ritüelleri daha sonra, farklı dinler, mit ve halk masallarının kültürel iskelesine güçlü bir şekilde yerleştirilmiştir (Baltic ve Boskovic, 2015; Leroy ve Praet, 2015).

## 2.2 Dünyada Et Tüketimi

Et, insan evriminde çok önemli bir rol oynamış, besin zenginliği nedeniyle sağlıklı ve dengeli beslenmenin önemli bir bileşenidir (Pereira ve Vicente, 2013). Avrupa mevzuatında et terimi, sığır, domuz, koyun ve keçi gibi evcil toynaklıların ve kümes hayvanları, lagomorflar ve av hayvanlarının karkasından çıkarılan yenilebilir kısımları ifade etmektedir. (European Commission, 2004). Özellikle biyolojik değeri yüksek proteinlerin yanı sıra demir, selenyum, çinko ve B12 vitamini gibi mikro besinler açısından oldukça zengin bir besin kaynağıdır. (Biesalski, 2005)

Et tüketimi, yaşam standartları, diyet, hayvancılık ve tüketici fiyatlarının yanı sıra makroekonomik belirsizlik ve gayri safi yurt içi hasıladaki şoklarla ilişkilidir. Diğer ürünlerle karşılaştırıldığında et, yüksek üretim maliyetleri ve yüksek çıktı fiyatları ile karakterize edilmektedir. Et talebi, daha yüksek gelirler ve kentleşme nedeniyle, diyetlerde hayvansal kaynaklardan elde edilen proteinlerin artmasını destekleyen gıda tüketimi değişikliklerine doğru bir kayma ile ilişkilidir. Küresel et endüstrisi milyarlarca insan için gıda ve geçim kaynağı sağlarken, gezegen için önemli çevresel sorunlar ve canlılar için de sağlık sorunları oluşturmaktadır (OECD,2021).

Çoğu ülkede et tüketimi 1960'lı yıllardan bu yana, özellikle de 1980'li yıllardan günümüze kadar artış göstermiştir. Bazı araştırmacılar 1960 – 2010 yılları arasında et ürünleri arzında %204'lük bir artış olduğunu öne sürerken (Basu, 2015), yeni bir araştırmada 1992-2016 yılları arasında et tüketiminde %500'e varan artışlar bildirmiştir (Katare vd, 2020). Bu durum, beslenme alışkanlıklarının son yüzyılda önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir. Avrupa'da da beslenme alışkanlıklarının yıllar içinde önemli ölçüde değiştiği görülmektedir. Yakın Avrupa kıtasındaki et tüketim alışkanlıklarındaki eğilimleri gösteren bir çalışmada, 1960'larda protein mevcudiyeti öncelikle buğday gibi bitki türevli ürünlerden gelirken, günümüzde protein mevcudiyetinin %58'e kadarının hayvansal türevli ürünlerden geldiği bildirilmektedir. Sonuç olarak, şu anda et ürünleri, toplam kalori tüketiminin %30'unu oluşturan ana protein kaynağını (28 g protein/kişi/gün) oluşturmaktadır (Bonnet vd., 2020).

Piyasalarda bulunan farklı et türleri arasında tüketimde en fazla artış kanatlı ve domuz etlerinde görülmektedir (Basu, 2015; Milford vd., 2019). Bir yandan domuz eti tüketimi ağırlıklı olarak Güneydoğu Asya'da, kanatlı eti tüketimi ise başta Kuzey Amerika olmak üzere tüm dünya bölgelerinde artış göstermiştir (Basu, 2015). Salter'e (2018) göre, 2014-2016 döneminde dünya genelinde kişi başına toplam et tüketimi 34,1 kg/yıl olup, yaklaşık %60'ı kırmızı et (koyun ve sığır) olmuştur. Bu gerçek, kırmızı et üretiminin, özellikle de sığır etinin, geniş getiren hayvanların enterik fermantasyonundan kaynaklanan yüksek miktarda CO2 emisyonu üretmesi nedeniyle çevresel anlamda dikkat çekicidir (Farchi vd., 2017).

Et tüketimi ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. En çok et tüketen ülkeler (yılıda kişi/kilogram), 124 kilogram ile Amerika Birleşik Devletleri, 122 kilogram ile Avustralya, 109 kilogram ile Arjantin, 101 kilogram ile Yeni Zelanda ve 100 kilogram ile İspanya'dır. Yüksek et tüketiminin görüldüğü ülkelerin aksine Afrika ülkelerinde yılda kişi başına 20 kilodan az et tüketilmektedir (The World Counts, 2022). Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü'nün (OECD) ülke bazında kişi başı et tüketim miktarıyla ilgili yayınladığı rapora göre, 2021 yılında en çok sığır eti tüketilen ülkeler Arjantin, ABD, Brezilya ve İsrail iken, en çok koyun eti tüketilen ülkeler Kazakistan, Avustralya, Norveç ve Suudi Arabistan'dır (OECD, 2021) (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) 2021 Yılı Ülke Bazında Kişi Başı Et Tüketim Miktarı

Ülke	Sığır Eti (kg/kişi)	Koyun Eti (kg/kişi)
Arjantin	36.9	1.0
Avustralya	19.2	5.9
Brezilya	24.6	0.5
Kanada	17.4	1.0
Şili	20.5	0.5
Çin	4.1	3.4
Kolombiya	8.7	0.1
Mısır	7.8	1.1

<b>Etilyopya</b>	2.5	0.5
<b>Hindistan</b>	0.5	0.5
<b>Endonezya</b>	2.2	0.4
<b>İran</b>	5.9	4.2
<b>İsrail</b>	23.3	1.5
<b>Japonya</b>	7.7	0.2
<b>Kazakistan</b>	19.9	8.3
<b>Güney Kore</b>	11.9	0.3
<b>Malezya</b>	5.5	1.1
<b>Meksika</b>	9.0	0.5
<b>Yeni Zelanda</b>	11.7	3.4
<b>Nijerya</b>	1.3	1.7
<b>Norveç</b>	12.9	4.4
<b>Pakistan</b>	6.5	2.0
<b>Paraguay</b>	12.1	0.5
<b>Peru</b>	4.2	1.0
<b>Filipinler</b>	3.2	0.5
<b>Rusya</b>	10.0	1.3
<b>Suudi Arabistan</b>	3.9	4.4
<b>Güney Afrika</b>	11.7	2.6
<b>İsviçre</b>	13.0	1.1
<b>Tayland</b>	1.2	0.0
<b>Türkiye</b>	9.8	4.2
<b>Ukrayna</b>	4.7	0.3
<b>Birleşik Krallık</b>	11.4	3.9
<b>Amerika Birleşik Devletleri</b>	26.1	0.4
<b>Vietnam</b>	8.4	0.2
<b>OECD - Toplam</b>	14.4	1.3

### 2.2.1 Türkiye’de Et Tüketimi

Dünya nüfusu arttıkça et ve et ürünlerine olan talep de giderek artmaktadır. Sağlıklı ve dengeli beslenmenin önemli bir unsuru olan kırmızı et ve et ürünleri tüketimi nüfusun hızla arttığı Türkiye’de büyük önem taşımaktadır. Ülkelerin gelişmişlik düzeylerini belirlemede kullanılan temel kriterlerden biri kişi başına

düşen et ve hayvansal protein tüketimidir (Özen, 2019). Türkiye’de tüketilen sığır eti ve koyun eti miktarları kişi başı 9.4 kg ve 4.2 kg olarak bildirilmiştir. Bu veriler sığır eti tüketimi açısından Türkiye’nin OECD ülkeleri ortalamasının altında olduğunu, koyun eti tüketimi açısından ise ortalamanın üstünde olduğunu göstermektedir (OECD, 2021) (Tablo 2.1).

## 2.2.2 Türkiye’de Hayvan Yetiştiriciliği

2017 yılında Türkiye’de toplam tarımsal üretimde hayvansal üretimin ortalama %58 olduğu bildirilmiştir (Özen, 2019). Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK) 2021 yılı verilerine göre, Türkiye’de bulunan sığır sayısı 17,8 milyon baş, koyun sayısı 45,2 milyon baş ve keçi sayısı ise 12,3 milyon baştır (TUİK, 2022a). Yine TUİK verilerine göre 2019 yılında 1.076 ton sığır eti, 109 ton koyun eti, 16.5 ton keçi eti ve 2021 yılında 2,245 ton tavuk eti ve 51.3 ton hindi eti üretilmiştir (TUİK, 2020; TUİK, 2022b).

Türkiye’de sığır yetiştiriciliği ağırlıklı olarak Holstein-Friesian (HF), Jersey (JR), Brown-Swiss (BS) ve bunların melezleri gibi egzotik ırklar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yerli Türk sığır ırklarının oranı yaklaşık %12 olarak bildirilmektedir (TUİK, 2020). Yerli Türk sığır ırklarının süt ve et verimlerinin düşük olması nedeniyle çiftçiler tarafından egzotik ırklar tercih edilmekte, bu da yerli Türk sığır ırklarının popülasyon büyüklüğünün önemli ölçüde azalmasına neden olmaktadır (Demir vd., 2021). Bugün Türkiye, Güney Anadolu Kırmızısı, Güney Anadolu Sarısı, Anadolu Siyahı, Doğu Anadolu Kırmızısı, Zavot ve Türk Gri Bozkırı olmak üzere toplam altı farklı yerli sığır ırkına sahiptir (TAGEM, 2009). Yerli sığır ırkları, et ve süt verimliliği bakımından egzotik ırklarla rekabet edemese de sıcaklık değişimlerine ve yetiştirilen bölgelerdeki yerel hastalıklara karşı direnç gibi belirgin özelliklere sahiptirler (Demir ve Balcıoğlu, 2019).

Türkiye’de koyun yetiştiriciliği, doğal otlak, anız ve nadas meraları kullanılarak sürdürülmektedir. Genellikle geleneksel olarak küçük aile tipi işletmeler tarafından yürütülmekte ve kırsal nüfusun beslenmesinde, gelirinde ve kültüründe büyük önem taşımaktadır. Türkiye’de koyun popülasyonunun %97’si yüzlerce yıllık doğal seçilimin sonucu olan düşük verimli yerli ırklar olup,

sadece %3'ü Merinos tipi koyunlardır (Ekiz vd., 2009). Akkaraman, Morkaraman, İvesi, Sakız, İmroz, Dağlıç, Kıvırcık ve Karacabey Merinos Türkiye'de yetiştirilen koyun ırkları arasındadır (Aksoy vd., 2019).

### 2.3 Et Tüketimi ve Çevresel Sorunlar

Et, protein, demir ve vitamin içeriği nedeniyle insan beslenmesi için önemli bir besin kaynağı anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, bu protein kaynağının büyük bir çevresel etkiye sahip olduğu açıktır (Salter, 2018). Toplam sera gazı emisyonlarının % 23'e kadarı, küresel ısınmaya en büyük katkıda bulunanlar arasında yer alan tarım, ormancılık ve diğer arazi kullanımlarından kaynaklanmaktadır (IPCC, 2019). Ayrıca, tarımsal aşırı kullanım, daha büyük çiftlik ve tarla boyutları ve daha fazla pestisit ve gübre kullanımı, doğal biyoçeşitlilik ve habitat kaybına da neden olmaktadır (Geiger vd., 2010). Tarım uygulamaları arasında, hayvancılık endüstrisi de küresel iklim değişikliğine önemli bir katkıda bulunmakta ve %12 ile %18 arasında sera gazı emisyonuna neden olmaktadır (Gomez-Zavaglia vd., 2020; Allen ve Hof, 2019).

Hayvan bazlı gıdaların bitki bazlı gıdalara kıyasla birim enerji başına daha fazla emisyon ürettiği bilinmektedir. Et türleri içinde, geviş getiren hayvan üretimi genellikle geviş getirmeyen memeli üretiminden daha fazla emisyonla yol açarken, kümes hayvanı üretimi, memeli üretiminden daha az emisyonla yol açmaktadır (Godfray vd., 2018). Bunun yanı sıra, hayvancılık üretiminin sadece sera gazı emisyonları (SGE) üzerinde değil, aynı zamanda su ayak izi, su kirliliği ve su kıtlığı üzerinde de olumsuz bir etkisi olduğu bilinmektedir (Farchi vd., 2017). Farklı bitki ve et bazlı ürünlerden 1 kg protein üretmenin çevresel maliyetlerini araştırdığı bir çalışmada, sığır etinden 1 kg protein üretiminin barbunyadan elde edilen aynı miktarda proteine göre 18 kat daha fazla toprak, 10 kat daha fazla su, 9 kat daha fazla yakıt, 12 kat daha fazla gübre ve 10 kat daha fazla pestisit gerektirdiği gösterilmiştir (Sabaté vd., 2015).

Endüstriyel et üretiminin iklim değişikliğine büyük katkıda bulunması nedeniyle (Allen ve Hof, 2019), et tüketiminin çevresel etkilerinin ölçülmesi ve dikkate alınması için yaşam döngüsü değerlendirmesi (YDD) yaklaşımı

kullanılmaktadır. Yaşam döngüsü değerlendirmesine göre asitlenme, toprak ve su kullanımı ve ötrofikasyon gibi iklim değişikliğiyle ilişkili çevresel etkiler değerlendirilerek, çevre dostu beslenme alışkanlıklarıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmektedir (González vd., 2020).

Danimarka'da dört diyet senaryosunun (standart, karnivor, vejetaryen ve vegan) karbon ayak izini tahmin etmek için YDD kullanılarak gerçekleştirilen bir araştırmada, karnivor diyetin daha fazla CO<sub>2</sub> yaydığı (1.83 ton CO<sub>2</sub> eşdeğeri/kişi/yıl), bu nedenle bu tür diyetlerin en yüksek çevresel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, vejetaryen veya vegan diyetlerin daha düşük emisyonlara neden olduğu bildirilmiştir (sırasıyla 0,89 ve 1,37 ton CO<sub>2</sub> eşdeğeri/kişi/yıl) (Bruno vd., 2019).

Bu sonuçlar, farklı beslenme modellerinden elde edilen karbon ayak izinin değerlendirildiği bir Kanada araştırmasındaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Çiftlik üretiminden, yemek pişirme veya depolama gibi ev süreçlerine kadar uzanan faaliyetler de dikkate alındığında, domuz eti içermeyen ancak sığır eti içeren diyet alışkanlıkları ile omnivor diyetin en yüksek karbon ayak izine neden olduğu gösterilmiştir (sırasıyla 3160 kg CO<sub>2</sub> eşdeğeri ve 2282 kg CO<sub>2</sub> eşdeğeri). Sığır eti dahil olmayan, ancak diğer etleri içeren diyetlerin, domuz eti içermeyen diyetten %60 daha düşük bir karbon ayak izine sahip olduğu, ek olarak, vejetaryen ve vegan diyetlerin en düşük karbon ayak izine sahip olduğu bildirilmiştir (sırasıyla 1015 ve 55 kg CO<sub>2</sub> eşdeğeri) (Veeramani vd., 2017). Genel olarak, yapılan çalışmalardaki sonuçların birçoğu, et ve süt ürünlerinin, çeşitli tarımsal ve zooteknik faaliyetlerin dahil edilmesinden kaynaklanan daha yüksek çevresel etkiye sahip gıda maddeleri olduğunu doğrulamaktadır (Notarnicola vd., 2017).

Endüstriyel et üretim sistemi, kendini sürdürmek için çok büyük miktarda toprağa ihtiyaç duymaktadır. Sığırları otlatmak ve milyarlarca çiftlik hayvanını besleyecek kadar mahsul yetiştirmek için her yıl ormanlar kesilmekte ve yakılmaktadır. Ormansızlaştırma çalışmaları, salınan karbondioksit miktarını arttırmakta ve küresel ısınmaya katkı sağlamaktadır (Ripple vd., 2014). Ayrıca Amazon yağmur ormanlarının et üretimi için tahrip edilmesi, ormanda yaşayan yerli halk ve hayvanlar açısından da olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Hayvansal

besin üretimi için kullanılan zirai ilaçlar bir çok hayvan türüne de zarar vermekte ve yok olmalarına sebep olmaktadır. Bunların yanı sıra ormanların tahrip edilmesiyle vahşi hayvanların yaşam alanlarının yok edilmesi, vahşi hayvanların insanlara daha yakın temasına ve bu nedenle çeşitli zoonoz hastalıkların artışına neden olacağı düşünülmektedir (Ferrante and Fearnside, 2020).

Bu nedenler göz önünde bulundurulduğunda, sadece gezegen sağlığı için değil, aynı zamanda insan sağlığı için de mevcut yaşam tarzı ve tüketim alışkanlıklarının değiştirilmesi gerektiğine dair öneriler bulunmaktadır (González vd., 2020).

## **2.4 Kırmızı Et ile İlişkilendirilen Hastalıklar**

Yüksek biyolojik değere sahip proteinler ve bazı temel mikro besinler sağlayan et, insan sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ancak günümüzde sanayileşmiş dünyada kırmızı et (sığır, domuz ve koyun dahil olmak üzere memeli kökenli etler) ve işlenmiş etlerin (tuzlama, kürlenme, fermantasyon, tütsüleme veya lezzeti artırmak veya korumayı iyileştirmek için diğer işlemlerle dönüştürülmüş etler) tüketimin artması önemli sağlık problemlerine yol açmaktadır (Godfray vd., 2018; GBD, 2019). Dünya Sağlık Örgütü'nün kanser ajansı olan Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), işlenmiş eti insanlar için kanserojen ve kırmızı eti ise insanlar için muhtemelen kanserojen olarak sınıflandırmıştır (WHO, 2015).

Uzun vadeli ileriye dönük kohort çalışmalarından elde edilen önemli kanıtlar, kırmızı ve işlenmiş et tüketiminin fazla olduğu diyetlerin artan tip 2 diyabet (T2D), kardiyovasküler hastalık (KVH), kanser (özellikle kolorektal kanser) ve tüm nedenlere bağlı ölüm riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Abete vd., 2014; Mozaffarian , 2016). Benzer şekilde, beslenme üzerindeki kısa süreli müdahale denemelerinden elde edilen kanıtlar, kırmızı ve işlenmiş etlerin bitki bazlı protein kaynakları (baklagiller ve kabuklu yemişler dahil), kümes hayvanları ve deniz ürünleri ile değiştirilmesinin kronik hastalık ve erken doğum riskini azaltma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Song vd., 2016; Guasch-Ferré vd., 2019).

Et ve kilo ilgili sekiz çalışmayı içeren bir analiz çalışmasında, et tüketiminin kilo alımı, vücut kitle indeksi ve bel çevresi ile pozitif bir ilişkisi olduğu ortaya konmuştur. (Fogelholm vd., 2012). Diğer bir meta-analiz çalışmasında, günlük 50 gram işlenmiş et tüketiminin diyabet riskini %51 oranında, 100 gram işlenmemiş et tüketiminin ise %19 oranında arttırdığı bildirilmiştir. Bu meta-analiz çalışmasındaki üç kohort çalışmasının 4 yıl boyunca et tüketimindeki değişiklikler değerlendirildiğinde, diyabet insidansı ile kırmızı et tüketimindeki artış arasında önemli bir ilişki bulunmuştur. Günlük et tüketimi artmamış ve et tüketimi 42 gram veya daha fazla artmış gruplar karşılaştırıldığında, et tüketiminin artmasının 4 yıllık süreçte diyabet riskini %48 oranında arttırdığı gösterilmiştir. (Pan vd., 2013). Bunlara ek olarak, etin önemli bir demir kaynağı olması ve fazla kırmızı et tüketimiyle artan serum ferritin oranının tip 2 diyabet riski ile pozitif bir ilişkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Basuli vd., 2014).

Yapılan çeşitli araştırmalar, daha uzun süre vejetaryen beslenen bireylerin kan basıncı, açlık plazma şekeri ve toplam kolesterol gibi kardiyovasküler risk faktörlerinin daha düşük seviyelerde olduğunu ve ayrıca KVH ve ölüm risklerinin daha düşük olduğunu göstermiştir (McEvoy vd., 2012). Ayrıca, vejeteryanların, özellikle veganların, et yiyenlere göre daha düşük hipertansiyon prevalansına ve daha düşük sistolik ve diyastolik kan basıncına sahip olduğu bildirilmiştir (Appleby vd., 2002).

ABD’de “Sağlık Profesyonellerini Takip Çalışması” ve “Hemşirelerin Sağlık Çalışması” ile kardiyovasküler hastalıklardan ölüm riski ile et tüketimi arasındaki ilişki incelenmiş ve hem kadınlarda hem de erkeklerde, işlenmemiş kırmızı et ve işlenmiş kırmızı et tüketiminin artmasıyla birlikte, işlenmemiş et için %18, işlenmiş et için %21 oranında kardiyovasküler mortalitede bir artış gözlemlenmiştir. Erkekler ve kadınlar karşılaştırıldığında, işlenmemiş et tüketimi benzer bir risk artışı gösterirken, işlenmiş et ile risk artışının kadınlarda erkeklere göre nispeten daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Pan vd., 2012).

## 2.5 Kırmızı Et ve Kanser İlişkisi

Dünya Kanser Araştırmaları Vakfı'nın yayınladığı raporda kırmızı et, tüm popülasyonlarda karsinomların insidansı ve ilerlemesi ile ilişkili ilk 10 faktör arasında yer almaktadır (Wiseman, 2008). Karsinom riskinin artması, onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki moleküler değişiklikler tarafından yönlendirilen adenomların, karsinoma ilerleyebildiği kolon epiteli gibi dokularda yüksek oranda görülmektedir (Fearon, 2011). 2011 yılında gerçekleştirilen 2 meta-analiz çalışmasında, kolorektal kanser riskinin günlük 100 gram işlenmemiş kırmızı et tüketimiyle yaklaşık %17, 50 gram işlenmiş kırmızı et tüketimiyle ise yaklaşık %18 arttığı gösterilmiştir (Alexander vd., 2011; Chan vd., 2011).

Et tüketimi ve kanser arasındaki bağlantı için olası birçok mekanizma bulunmaktadır. Bunlar, yüksek yağ alımıyla karsinogenezin teşvik edilmesini, pişirme sırasında kanserojen heterosiklik aminlerin (HCA'lar) ve/veya polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH'ler) üretilmesini, kanserojen N-nitroso bileşiklerinin (NOC'ler) oluşumunu ve heme demir tarafından serbest radikal oluşumuyla karsinogenezin teşvik edilmesini içerir (Cross vd., 2010).

Bunlara ek olarak 2015 yılında Samraj vd., insan dışı bir sialik asit olan N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc) molekülü ile dolaşımdaki anti-Neu5Gc antikollarının etkileşimi (Hedlund vd., 2008; Padler-Karavani vd., 2011; Samraj vd., 2014) sonucunda oluşan inflamasyonun kanser ve et tüketimi arasındaki mekanizma olabileceğini önermişlerdir (Samraj vd., 2015). İnsanlar Neu5Gc'yi genetik olarak üretememesine rağmen, bu molekül insan epitel ve endotel yüzeylerinde ve malign dokularda yüksek miktarlarda saptanabilmektedir (Varki, 2010). Neu5Gc biyosentezi gerçekleştirilmeyen organizmaların, molekülü alabilmesinin tek kaynağı diyetdir. (Banda vd., 2012). Gerçekleştirilen bir gıda araştırmasında, kırmızı ette belirgin bir Neu5Gc varlığı olduğu gösterilmiştir (Tangvoranuntakul vd., 2003). Kırmızı et tüketimi, Neu5Gc'nin dokulara metabolik olarak dahil edilmesini (Hedlund vd., 2007) ve bu glikanın, dolaşımdaki anti-Neu5Gc antikolları (yani, kseno-otoantikolar) ile reaksiyona girebilen bir kseno-otoantijenin ilk örneği olmasını sağlamaktadır (Padler-

Karavani vd., 2008). Ortaya çıkan antijen-antikor etkileşiminin, farelerde karsinogeneze katkıda bulunan kronik inflamasyon veya “ksenosiyalit” oluşturduğu gösterilmiştir (Samraj vd., 2015).

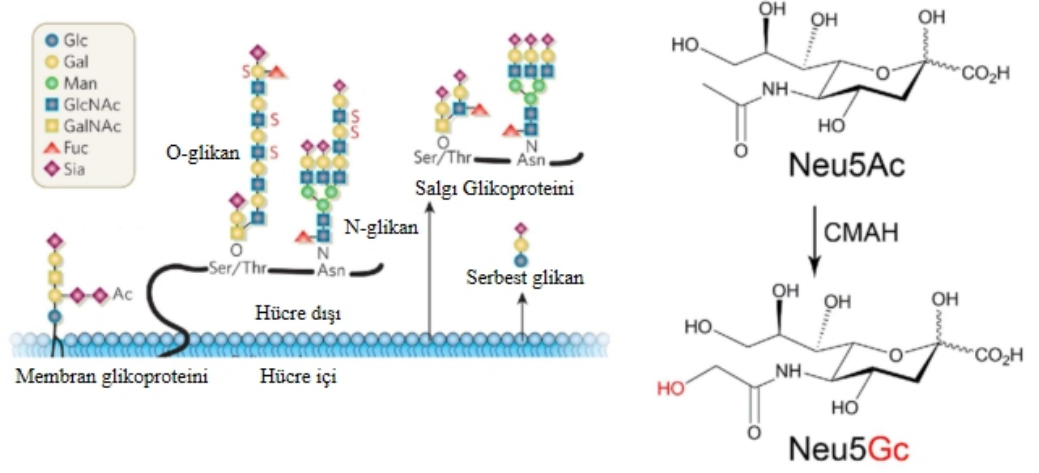
Kırmızı etten bulunan N-glikolilnöraminik aside (Neu5Gc) karşı antikorların, CMAH -/- farelerde kanseri alevlendirdiği ve insanlarda kolektoral kanser başta olmak üzere kanseri tetiklediği önerilse de diyetin bu antikorları nasıl etkilediği 2020 yılında yapılan bir çalışma ile ortaya konmuştur. Çalışmada, yüksek Neu5Gc içeren diyetin, cinsiyet ve yaşın, anti-Neu5Gc IgG immün yanıtlarının özgülüğünü, seviyelerini ve repertuarlarını etkilediği ancak antijen-antikor bağlanma afinitesinde bir farklılık oluşturmadığı gösterilmiştir. Erkeklerde kırmızı et tüketimine bağlı olarak kadınlara oranla daha fazla serum anti-Neu5Gc IgG seviyeleri tespit edilmiştir. Kırmızı et ve süt ürünlerinden alınan Neu5Gc ile anti-Neu5Gc IgG serum repertuarı ve seviyesi arasında bağlantı bulunmuştur. Bu nedenle kanser riskini azaltmak için Neu5Gc'nin daha az bulunduğu diyetlerin önemli olduğu bildirilmiştir (Bashir vd., 2020).

## 2.6 Sialik Asitler

1935 yılında, Ernst Klenk, Niemann-Pick hastalığı olan bir hastanın beyin dokusunda gangliosidleri keşfetti ve 1941'de “nöraminik asit” adını verdiği asitle hidrolize edilmiş bir karbonhidrat bileşeni tanımladı (Klenk, 1941; Lundblad, 2015) Bu arada 1936'da Gunnar Blix, bağımsız olarak, sığır submaksiller müsinin fraksiyonlanmasıyla birleştirilen asit hidrolizinin, bilinmeyen bir şekerin kristallerinin oluşumuyla sonuçlandığını bildirdi ve 1952 yılında bu yapıları sialik asit adını verdi (Blix, vd., 1952). Nihayetinde, Blix ve Klenk'in aynı şeker ailesini tanımladıkları doğrulandı ve bu moleküller 1957'de Blix, Klenk ve Gottschalk tarafından sialik asitler olarak tanımlandı (Blix vd., 1957).

Sialik asitler, üyeleri nöraminik asit ve 2-keto-3-deoksi-nülozonik asit içeren, dokuz karbonlu bir omurgaya sahip bir  $\alpha$ -keto aldonik asit ailesidir (Colley vd., 2014; Li ve Chen, 2012). Bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunurlar (Chen ve Varki, 2010). Sialik asitlerin 50'den fazla farklı tipi tanımlanmış olup, en yaygın bulunanlar N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac) ve

N-glikolilnöraminik asittir (Neu5Gc) (Şekil 2.2) (Chen ve Varki, 2010; Garcia-Garcia vd., 2013).



Şekil 2.2. Sialik asitlerin yapıları ve yaygın görülen türleri (Samraj vd, 2014).

Sialik asitler genellikle, glikolipidlerin ve glikoproteinlerin glikan zincirlerinin indirgenmemiş ucunda bulunan ve ligand reseptörü olarak, döllenme sırasında hücre-hücre interaksiyonunda, immünolojik, nörolojik ve farklılaşma gibi olaylarda rol oynayan yapılardır (Sato ve Kitajima, 2013). Hayvan sialik asitleri, sinir uyarıları ve sinapslar yoluyla beyinde büyük miktarda bilgi ileten beyin gangliozitlerinin önemli bileşenleridir. Hafızaya ve entelektüel gelişime yardımcı olmakta ve yenidoğan karaciğer fonksiyonunda görev almaktadırlar (Tao vd., 2010; Traving ve Schauer, 1998). Ayrıca spesifik sialik asit polipeptitleri kombinasyonları, patojenik bakteriler, toksinler ve virüs partikülleri ile rekabet ederek bağırsak yolundaki bağırsak mukoza hücrelerine girmelerini önleyebilmektedirler (Gnoth vd., 2000). Ek olarak, sialik asitler hücre yüzeyindeki anahtar tanımlama ve antijen bölgelerini etkin bir şekilde engelleyerek, glikokonjugatların konakçı bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve parçalanmasını engelleyebilmektedirler (Dal, 2018). Karbonhidrat-protein etkileşimleri yoluyla, sialik asitler hücre tanımı ve iletişim, viral enfeksiyonlar, immünoloji, tümör büyümesi ve metastazı, hücre sinyalizasyonu ve nörobiyoloji gibi birçok patolojik ve fizyolojik süreçte önemli rol oynamaktadırlar (Schauer ve Kamerlin, 2018).

Memelilerde sialik asitler, heksozamin biyosentez yolağı (HBP) aracılığıyla, fruktoz-6-fosfatın glutamin fruktoz-6-fosfat amidotransferaz (GFAT) tarafından, glukozamin-6-fosfata dönüştürülmesiyle üretilmektedir. GFAT toplam glikozun yalnızca %1-5'ini kullanmasına rağmen, bu yolun düzensizliğı diyabet, Alzheimer, kardiyovasküler hastalık ve bazı kanserler gibi birçok metabolik hastalıkta rol oynamaktadır (Bond ve Hanover, 2013) Sialik asit biyosentezinin son adımlarında, omurgalıların (Neu5Ac ve Kdn) birincil sialik asitleri, ManNAc-6-P (Neu5Ac) veya Man-6-P'nin (Kdn) fosfoenolpiruvat (PEP) ile yoğunlaştırılmasıyla oluşturulur. Neu5Ac daha sonra 50'den fazla farklı sialik asit formu oluşturmak için C-5'te veya C-4, C-7, C-8 ve C-9'da modifiye edilebilmektedir (Angata vd., 1999). Döterostomlardaki glikan biyosentezi ile ilgili olarak, sialik asitler, aktivasyon için bir monofosfat nükleotid donörüne (CMP) ihtiyaç duymaları bakımından benzersizdir ve CMP-konjuge formlarına aktive edilmek için çekirdeğe seyahat etmeleri gerekmektedir (Freeze vd., 2009). Sitosolik CMP-konjuge Neu5Gc, Neu5Ac'den Neu5Gc'yi biyosentezleyebildiğı bilinen tek enzim olan CMAH tarafından CMP-Neu5Ac'nin hidroksilasyonu ile üretilmektedir (Varki vd., 2009).

Neu5Gc yüksek omurgasızlar ve insan olmayan memeliler elde edilebilen ve 20'den fazla türevi olan bir sialik asittir. Deuterostomların çoğunda hücre yüzeyi proteinleri üzerindedir ve sitokrom b5/b5 redüktaz, demir, oksijen ve NADH dahil olmak üzere çeşitli ortak faktörler gerektiren karmaşık bir mekanizmayla CMP-N-asetilnöraminik asit hidroksilaz tarafından sentezlenir (Peri vd., 2018).

İnsanların diğer memelilere kıyasla kolayca tespit edilebilir Neu5Gc seviyelerine sahip olmadığı uzun süredir bilinmesine rağmen, insanların Neu5Gc'yi sentezleme yetersizliğinin nedeni hemen çözülememiştir çünkü bu sialik asidin küçük miktarları, özellikle tümörler ve fetal dokular üzerinde antikolar kullanılarak rapor edilmiştir (Okerblom ve Varki, 2017). 1982'de Roland Schauer, dokularda Neu5Gc'nin varlığına ilişkin raporlara rağmen, Neu5Gc üretiminin insanlarda eksik olduğunu, muhtemelen antijenik olduğunu ve hayvan serumu infüzyonları alan insan hastalarda “serum hastalığı” da dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlara potansiyel olarak katkıda bulunduğunu

kaydetti (Merrick vd., 1978; Okerblom ve Varki, 2017).1998 yılında, iki grup bağımsız olarak, insanların işlevsel bir CMAH enziminden yoksun olduğunu ve bu nedenle endojen Neu5Gc üretimine sahip olmadıklarını keşfetti (Muchmore vd., 1998; Irie vd., 1998).

Daha sonra insanlarda Neu5Gc'nin diyet kaynaklarından dahil edildiği ve bazı epitelyal ve endotelyal hücre yüzeylerinde sunulduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Neu5Gc'nin kümes hayvanları ve deniz canlılarında bulunmazken kırmızı et, süt ürünleri ve havyarda yoğun miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Samraj vd., 2015) (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2.** Hayvansal gıdalardaki Neu5Gc miktarı ve toplam sialik asitlere yüzde oranı (Samraj vd., 2015).

<b>Besin</b>	<b>Neu5Gc Miktarı (µg/g)</b>	<b>Neu5Gc (%)</b>
Tereyağı	0	0
Süt	2	12
İnek Peyniri	10-22	2-4
Keçi Peyniri	43	44
Koyun Eti	14	13
Sığır Eti	25-231	32-53
Domuz Eti	7-40	9-22
Yumurta	0	0
Hindi	0	0
Tavuk	0	0
Balık	0	0
Kabuklu Deniz Ürünleri	0	0
Havyar	445-530	13-29
Sebze	0	0
Meyve	0	0

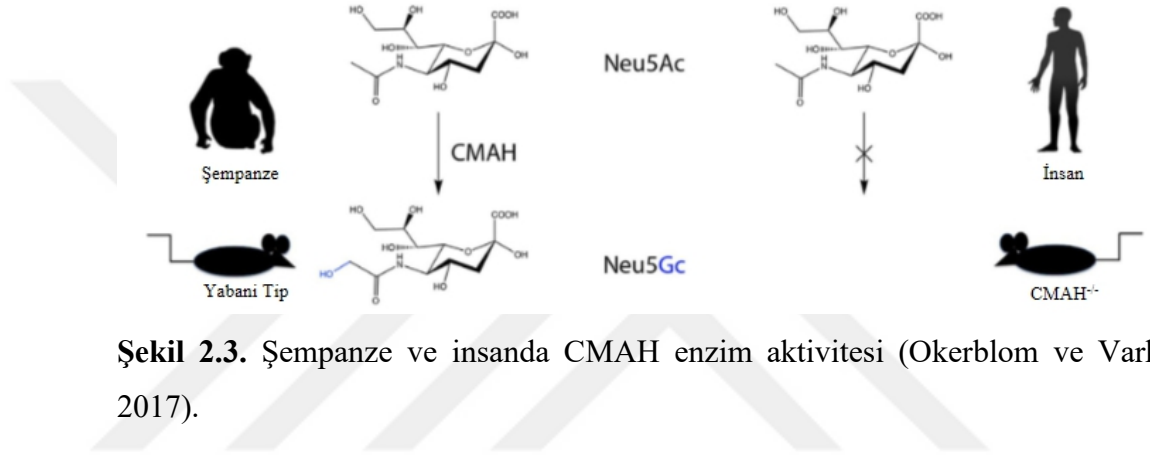
## 2.7 CMAH Geni ve Enzimi

Sitidin monofosfo-N-asetilnöraminik asit hidroksilaz (CMAH) enzimi, CMAH geni tarafından kodlanan ve Neu5Ac'nin hidroksilasyonu ile Neu5Gc'nin sentezini katalize eden bir enzimdir (Schauer vd., 1968; Schoop vd., 1969). Bu enzim birçok kordalıda ve derisidikenlilerde bulunmuştur (Varki, 2009; Bergfeld vd., 2012). Döterostom olmayanlarda, iki yeşil algde ve birkaç prokaryotta homolog CMAH dizileri tespit edilmiştir ve filogenetik analizler yeşil alglerden döterostomlara yatay bir gen transferi olayı düşündürmektedir (Simakov vd., 2015).

İnsanlar da dahil olmak üzere bazı döterostomlar, CMAH geninin inaktivasyonuna veya kaybına uğramış ve bu nedenle Neu5Gc'yi sentezleme yeteneğini kaybetmiştir. İnsan CMAH genindeki 478 bç'lik genomik DNA delesyonunun, 92 bç'lik bir CMAH eksonunu kapsadığı ve bu delesyonun CMAH'ın enzimatik aktivitesi için gerekli olan Rieske demir-kükürt bağlama bölgesini kodlayan dizileri ortadan kaldıran bir Alu-Alu füzyonundan kaynaklandığı gösterilmiştir (Hayakawa vd., 2001). Bu eksonun delesyonu, bir çerçeve kayması mutasyonu ile sonuçlandığından insan proteini işlevsiz hale gelmiştir. Bu nedenle, insan dokuları, sadece hayvansal gıdalardan elde edildiğinden daha düşük Neu5Gc seviyelerine sahiptir (Diaz vd., 2009). Bu inaktivasyonun 2.5-3 milyon yıl önce gerçekleştiği tahmin edilmektedir (Chou vd., 2002).

*CMAH*'ın işlevsiz hale gelmesinin insan biyolojisini birçok şekilde etkilemiş olduğu düşünülmektedir (Okerblom ve Varki, 2017). Birincisi, insanları *Plasmodium reichenowi* (şempanzeler ve gorillerde sıtmadan sorumlu), *E. coli* K99, bulaşıcı gastroenteritis koronavirüsü ve simian virüsü 40 gibi enfeksiyon için Neu5Gc'ye bağlanmayı gerektiren patojenlerden kurtarmış olabileceğidir (Peri vd., 2018). İkincisi, *CMAH* psödogenininin, cinsel seçilim yoluyla sabitlenmeye yönlendirilmiş olabileceğidir. Hominin popülasyonunda fonksiyonel bir CMAH geninin varlığının polimorfik olduğu zamanlarda, Neu5Gc-negatif dişilerin üreme yolundaki anti-Neu5Gc antikorlarının Neu5Gc içeren sperm veya fetal dokuları hedeflemiş ve böylece üreme uyumluluğunu azaltmış olabileceği

düşünülmektedir (Ghaderi vd., 2011). Üçüncüsü, Neu5Gc'nin kaybının insan sialik asit biyolojisinde ve onu kontrol eden genlerde bir dizi değişikliğe neden olmuş olmasıdır. Sialik asit biyolojisine dahil olduğu bilinen yaklaşık 60 genden en az 10'u, Neu5Gc kaybıyla bağlantılı olan insana özgü değişikliklere uğramıştır (Varki ve Varki 2007; Varki, 2009). Dördüncüsü, CMAH  $-/-$  farelerin fenotipleri, Neu5Gc kaybının bir dizi insana özgü hastalığa katkıda bulunmuş olabileceğini düşündürmektedir (Hedlund vd., 2007).



**Şekil 2.3.** Şempanze ve insanda CMAH enzim aktivitesi (Okerblom ve Varki, 2017).

*CMAH*'ın insanlarda etkisiz olması, Neu5Gc'nin insanlarda yabancı bir antijen haline gelmesine neden olmuştur.. Hayvansal gıdalardan elde edilen Neu5Gc (ağırlıklı olarak kırmızı et ve süt ürünleri) (Samraj vd., 2015), insan dokularının glikoproteinlerine dahil olmakta (Tangvoranuntakul vd., 2003) ve burada kronik inflamasyon, romatizma ve kanser ile sonuçlanabilecek bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkardığı düşünülmektedir (Varki ve Varki 2007). Kırmızı et tüketimi ve kanser arasındaki bu mekanizmayı, Neu5Gc'nin genellikle insan tümörlerinde ve iltihaplanma bölgelerinde yoğunlaşması (Tangvoranuntakul vd., 2003; Diaz vd., 2009) ve CMAH $-/-$  farelerin, biyolojik olarak kullanılabilir Neu5Gc ile beslendiklerinde sistemik inflamasyon ve yüksek kanser sıklığı geliştirmesi desteklemektedir (Samraj ve ark. 2015).

İnsanlara ek olarak, *CMAH*'ın diğer hayvan soylarında bağımsız olarak etkisiz hale geldiği bildirilmiştir. Yeni Dünya maymunlarında, CMAH geninde

4-13 eksonlarının ters çevrilmesi ve 4-8 ve 10-13 eksonlarının kaybı nedeniyle gen yaklaşık 30 milyon yıl önce etkisiz hale gelmiştir. Bu durum *P. falciparum* gibi belirli insan patojenlerine neden duyarlı olduklarını açıklamaktadır (Springer vd., 2014). Tavuk ve zebra ispinozunun genomlarıyla gerçekleştirilen dizi analiz çalışmalarında herhangi bir *CMAH* homoloğu saptanamamıştır (Schauer vd., 2009). Kuşlarda ve sürüngenlerde yapılan çalışmalarda ise, Neu5Gc'nin nadir olduğu gösterilmiştir ve bunun diyet kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. (Ito vd., 2000; Schauer vd., 2009). Yanı sıra, kedilerde A, B ve AB kan grupları, belirli eritrosit glikolipidlerinde Neu5Gc'nin varlığı veya yokluğu ile belirlenmekte ve yapılan *CMAH* karakterizasyon çalışmalarında gende bulunan polimorfizmlerin kan grubunun belirlenmesinde etkili olduğu bildirilmektedir (Omi vd., 2016; Can vd., 2020).

Koyun, sığır ve keçi gibi çiftlik hayvanlarında aktif olduğu bilinen *CMAH* enzimi bulunmaktadır (Peri vd., 2018). Koyunlarda *CMAH* geni 20. kromozomda bulunan ve 15 eksondan oluşan bir gendir. 587 amino asit içeren *CMAH* enzimini kodlamaktadır (Ensembl, *Ovis aries*) ve bu enzim Neu5Ac'den Neu5Gc'nin sentezlenmesini sağlamaktadır. İnsanların diyetle aldıkları Neu5Gc'nin temel kaynaklarından birini koyun eti ve koyundan elde edilen süt ürünlerinin tüketimi oluşturmaktadır (Samraj vd., 2015).

## 2.8 Çalışmanın Amacı

İnsanlarda *CMAH* geninin pseudogene dönüşmüş olması ve aktif bir enzim kodlayamaması nedeniyle insanlar Neu5Gc sialik asidini sentezleyememekte ve beslenme yoluyla alabilmektedirler. Kırmızı et ve süt ürünlerinde bulunan ve bunların tüketilmesiyle vücuda alınan Neu5Gc sialik asidinin, insan tümör dokularında yoğun olarak tespit edilmesiyle kırmızı et ve kanser arasındaki ilişki mekanizması araştırılmış ve fazla miktarda et tüketimiyle vücuda alınan yoğun miktardaki Neu5Gc'nin, anti-Neu5Gc ile inflamasyonu sonucu kanseri tetiklediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, kanser riskini azaltmak amacıyla diyet değişikliği yapılması ve Neu5Gc içeriği yüksek besinlerden uzak durulması önerilmektedir.

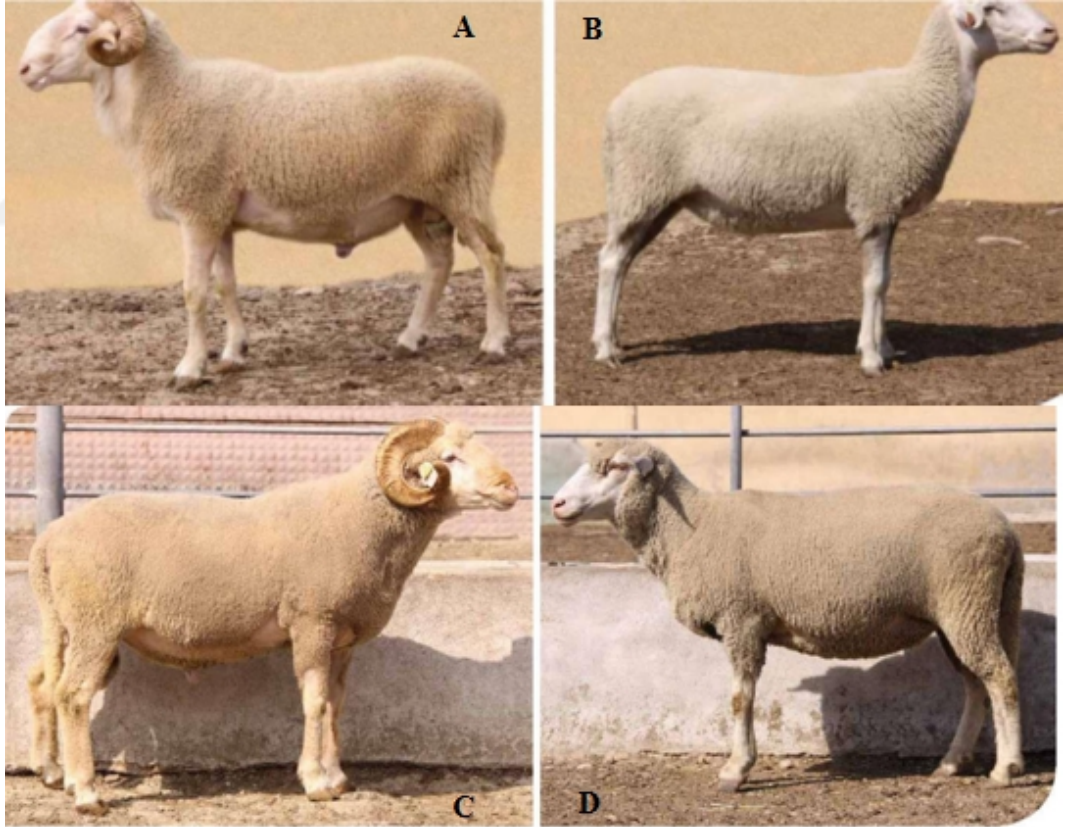
Buradan yola çıkarak, bu çalışmada Türkiye’de besin olarak tüketilen iki farklı koyun ırkından elde edilen örneklerle, *CMAH* mRNA karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi, enzim fonksiyonunu ve Neu5Gc üretimini potansiyel olarak etkileyen olası polimorfizm/mutasyonların saptanması ve hayvan ıslahı açısından düşük Neu5Gc içeriğiyle ilgili bir biyobelirteç bulunması amaçlanmıştır.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Koyun Kan Örneklerinin Alınması

Çalışmada kullanılacak koyun kan örneklerinin alınabilmesi amacıyla Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne proje sunumu gerçekleştirilmiş ve alınan onay sonrasında Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna başvuru yapılmıştır. Etik kurulun 2016-096 sayılı onayı çerçevesinde 27 Kıvırcık dişi (KD), 17 Kıvırcık erkek (KE), 22 Karacabey Merinos dişi (MD) ve 22 Karacabey Merinos erkek (ME) koyundan (Şekil 3.1) toplamda 88 adet koyundan kan örneği alınmıştır. Kan örnekleri juguler venden, ortalama 3 ml olacak şekilde EDTA'lı tüpler içerisine alınmış ve laboratuvara taşınmıştır.



**Şekil 3.1.** Kıvırcık ve Karacabey Merinos ırkı, dişi ve erkek koyunlar (TC Tarım ve Orman Bakanlığı, Yerli Koyun Irkları) A: Kıvırcık erkek, B: Kıvırcık Dişi, C: Karacabey Merinos erkek, D: Karacabey Merinos dişi

### 3.2 Kan Örneklerinden RNA İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi

Kan örneklerinden total RNA izolasyonu Quick-RNA™ Whole Blood (Zymo Research, ABD) kiti kullanılarak üretici firma protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. 1.5 ml'lik santrifüj tüp içerisine 200 µl kan örneği ve üzerine 200 µl DNA/RNA Shield (2X) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra karışıma 8 µl Proteinase K eklenip, karıştırılmış ve 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, karışıma eşit hacimde izopropanol (Sigma Aldrich, ABD) eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Karışım kite ait filtreli tüplere aktarılıp, filtreli tüp bir kolektör tüp içine yerleştirilerek 10,000×g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Sonrasında karışıma 200 µl RNA Recovery Buffer eklenmiş ve santrifüj 10,000×g'de 30 saniye santrifüj sonrası filtreli tüp atılmıştır. Karışıma 200 µl etanol (Sigma Aldrich, ABD) eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra karışım kite ait yeni bir filtreli tüpe aktarılıp, filtreli tüp bir kolektör tüp içine yerleştirilerek 10,000×g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

DNase I muamelesi için filtreli tüpe 00 µl RNA Wash Buffer yıkama tamponu eklenip 10,000×g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Farklı bir 1.5 ml'lik santrifüj tüp içerisine 5 µl DNase I ve 35 µl DNA Digestion Buffer karıştırılarak filtreli tüpe eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında filtreli tüpe 400 µl RNA Prep Buffer yıkama tamponu eklenmiş ve 10,000×g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra 700 µl RNA Wash Buffer yıkama tamponu eklenerek 10,000×g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 400 µl RNA Wash Buffer yıkama tamponu eklenerek 10,000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve kolektör tüp atılıp, filtreli tüp 1.5 ml'lik bir santrifüj tüpüne alınmıştır. Son olarak filtreye 15 µl DNase/RNase-Free Water eklenerek 10,000×g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir ve filtreli tüp atılarak elde edilen RNA örnekleri kullanılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

### 3.3 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Total RNA örneklerinden cDNA sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti kullanılarak üretici firma protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. 20 µl'lik revers transkripsiyon

reaksiyonu için öncelikle 2X RT master mix hazırlanmıştır. Bu amaçla, 0.2 ml'lik santrifüj tüpü içerisine 2 µl 10X RT Buffer, 0.8 µl 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10X RT Random Primers, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase ve 4.2 µl Nuclease-free water eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra karışım üzerine 10 µl total RNA örneği eklenmiş, pipetle karıştırılmış ve 3,000xg'de 5 saniye santrifüj yapılmıştır. Tüpler daha sonra termal döngü cihazına (MiniAmp™ Plus PCR Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, ABD) yerleştirilerek reaksiyon belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1). Daha sonra elde edilen cDNA örnekleri kullanılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır.

**Tablo 3.1.** Revers transkriptaz reaksiyon koşulları

Ayarlar	Aşama 1	Aşama 2	Aşama 3	Aşama 4
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	Sabit

### 3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Koyunlardaki CMAH geninin mRNA dizisini analiz etmek için mRNA dizisine spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.2) (Şekil 3.2). Referans mRNA sekansı ve primer sentezi için National Center for Biotechnology Information (NCBI) ve Ensembl veritabanı kullanılmıştır. 1764 bp uzunluğundaki referans varyant (NCBI-PREDICTED: *Ovis aries* cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (LOC101106806), transcript variant X4, mRNA NCBI Reference Sequence: XM\_042236951.1, Ensembl- cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase Transcript ENSOART00020014684.1) sekansına uygun, benzer büyüklüklerde ürün elde edilecek şekilde üç primer çifti tasarlanmıştır (Tablo 3.3).

**Tablo3.2.** Primer çiftleri ve PZR ürün büyüklükleri

Primer	Ürün Büyüklüğü (bp)
İleri CMAH 1: GATTTCTGCCTTGGGGGAGT Geri CMAH 1: AGGTGGTCTGAGTGCATGTG	693
İleri CMAH 2: GAGGATGGTGTTTGACCCTT Geri CMAH 2: CCTACCCAGATCAAGAGTGG	766
İleri CMAH 3: CCCGAATTTATTGCCCTTT Geri CMAH 3: ATTGCTGATGTCAGTAAGGCA	803

PREDICTED: *Ovis aries* cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (LOC101106806), transcript variant X4, mRNA NCBI Reference Sequence: XM\_042236951.1

TTGGCCGTTGGTGGCGTTTCCCTCAGCAACTGCATGTCCTGCTTCAGTTTCTTCTG|  
GTGGTTTCCCGCTTCCTTTCCGAGCTGTTTGGCCCCTTTCTACCTGGACTGGAACA  
AA **GATTTCTGCCTTGGGGGAGT** GAATGAGACACAGAAGCTGAAGTGACAACATGC  
TATTCTTCTGAAA TCCGAGGGAGAGGCAACAGCAGACT**ATGGGCAGCATCGAA**  
CAAAACAGCTGAGCTCCTCTTGTGTCCTCCTCCCGCTGAAGTTGCCAATCAAGG  
AAGGAATCAATTTTGTTCGAAATAAGAGCACTGGCAAAGATTACATCTGTATAA  
GAGTAAGAGCCTCCTGCGAGCATGCAAGAATA TGTGCAAGCACCAAGGAGGCCT  
GTTCATAAAAAGATATCGAGGATTTAGATGGAAGGTCTGTTAGATGCACAAAAACA  
CAACTGGAAGTTGGATGTGAGCACCATGAAGTACATCAACCTCCAGGCAGCTTC  
TGTC AAGA TGA ACTAGTTGTGGAAGAGAGTGAAGAAAATGAAC TTTTGTCTTAG  
AGCTGAA TCCTCCTAACCCCTGGGATTCAGAGCCCAAGTCTCCTGAAAGATTTGGC  
TTTTGGGGAAGTGCAGATAACATACCTTACTCATGCCTGCATGGACCTCAAGCTG  
GGGACAA **GAGGATGGTGTTTGACCCTT**GGTAAACGGGTCTGCTTTTGGCCGAG  
GATGGTGGTTACTGCATGAGCCTCCATCTGATTGGCTGGAGAGGCTGTGCCAAGC  
GGACCTCATTTACATCAGT **CACATGCACTCAGACCACCT**GAGTTACCCACACATG  
AAGAAGCTTGCTGGGAGAAGACCAGATATCCCATTTATGTTGGAAAAACAGAA  
AGACCTGTATTTTGGAAATCTGAA TCAGAGTGGTGCCAGTTGACTAATA TCAA TG  
TAGTGCCATTTGGAATA TGGCAGCAGGTAGACGAAAA TCTCCGATTCA TGATCCT  
AATGGATGCGTTCATCCTGAAA TGGACACTTGCA TTATCGTGGAA TACAAAGGT  
CATAAAA TACTCAATACAGTGGATTGCACCAGACCCAA TGGAGGAAGGCTGCCT  
ATGAAGGTGA TTTAA TGATGAGTGA TTTTGTGCTGGAGGAGCATCAGGCTTTCCGA  
TGACTTTCAGTGGTGAAAGTTTACTGAGGAATGGAAAGCCAGTTCA TTTAAAC  
AGAAAGGAAGAACTCCTGAAC TACAAGGCTCGGCTGGTGAAGGACCTACAAC **C**  
**CCGAATTATTGCCCTTT**GCTGGGATTTTGTGGAA TCCACCCATCAGACAAGT  
ACATTAAGGAAAAACAACATCAAAAAATGACCCAGATGAAC TCAACAA TCTTATCA  
AGAAAAA TTTGATGTGTTAACA TGGACACCGGACCTGGAG **CCACTCTTGATCT**  
**GGGTAGG**ATGCTAAAGGATCCAACAGACAGCAAAGGCATCATTGACCCTCCGGA  
GGGACTAAAAA TTTACAAGGATTCCTGGGACTTTGGACCATATTTGAAAATCTTG  
AATGCTGTGTAGGAGATGAAATA TTTGCGCCACCCATCCTGGATAAAA GAATACT  
TCACTTGGGCTGGATTTAAGGATTATAACCTGGTGGTCAGGATGATTGAGACAGA  
TGAGGACTCAGCCCTTTCCCTGGAGGATA TGACTATTGGTTGACTTCTAGATT  
TATCCTTTCCAAAAGAAA GACCAAGCCGGGAACATCCA TATGAGGAAA TCCGGA  
GCCGGTTGACGT CATCAGACACGTGGTGAAGAATGGCCTGCTCTGGGACGACCT  
GTATA TAGGATTCAAAACCCGGCTCCAGCGGGATCCTGACATATACCATCATCTG  
TTTTGGAACCATTTCAAATAAAA CTCCCTAACACCCGCCAACCTGGAAGTCAT  
TCCTAATA TACTGTGGGGAGAGAGGACCTGAGATCTCCAGGGATAC **TAA**GCTG  
CATGAAAAA TCAAGTATTCACTGATGCTGTATCTTGAACATGAAGCTTATACCA  
AAGAGACTA TGTA **TGCCTTACTGACATCAGCAAT**GGATAATCAAATGTTGTGTTT  
GTGAAATG TTCACATA TCTTATGTTGTGGATCACTACATAGCCAGAGTATTGAT  
ATTTAATTA TTTCTGTCCATAATTTCTGTAAAAGAACCCATGAATGCCATAGGAA  
CAAA TTTCTATGAAAAACAAGACAACAGGGGATGTAAATCCAAGTACAG

**Şekil 3.2.** Referans mRNA Dizisi Kullanılarak Tasarlanan Primer Çiftleri

Pembe: CMAH 1 primer çifti, Sarı: CMAH 2 primer çifti, Mavi: CMAH 3 primer çifti

88 koyun cDNA örneği her primer çifti ile polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak amplifiye edilmiştir. PZR için her tüp 2,5 µl 10xTaq Buffer, 1,25 µl dNTP karışımı (her birinden 0.2 mM), 1 µl iler ve 1 µl geri primer (10 µM), 3.5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl cDNA, 0.5 µl Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve 14,25 µl ultra saf su içerecek ve 25 µl son hacim olacak şekilde hazırlanmıştır. PZR, 95°C'de 1 dk başlangıç denatürasyonu sonrası, 35 döngü 95°C'de 1 dk denatürasyon, 61°C'de (primer 1), 58°C'de (primer 2), 56°C'de (primer 3), 45 sn bağlanma ve 72°C'de 45 sn elongasyon ve son olarak 72°C'de 7 dk son uzama basamağı koşullarında termal döngü cihazına (MiniAmp™ Plus PCR Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, ABD) gerçekleştirilmiştir.

**Tablo3.3.** Referans CMAH mRNA ekson ve sekansları (Ensembl, Ovis aries)

Ekson	Sekans
1	ATGGGCAG
2	CATCGAACAAACAGCTGAGCTCCTCTTGTGTCTCTCCCCGCTGAAGTTGC CAATCTCAAGGAAGGAATCAATTTTGTTCGAAATAAGAGCACTGGCAAAG ATTACATCTTGATAAGAGTAAGAGCCTCCTGCGAGCATGCAAGAATATGT GCAAGCACCAAGGAGGCCTGTTCATAAAAGATATCGAGGATTTAGATGGA AG
3	GTCTGTTAGATGCACAAAACACAACCTGGAAGTTGGATGTGAGCACCATGA AGTACATCAACCCTCCAGGCAGCTTCTGTCAAGATGAACTAG
4	TTGTGGAAGAGAGTGAAGAAAATGAACTTTTGCTTCTAGAGCTGAATCCTC CTAACCCCTGGGATTCAGAGCCCAGATCTCCTGAAGATTTGGCTTTTGGGG AAGTGCAG
5	ATAACATACCTTACTCATGCCTGCATGGACCTCAAGCTGGGGGACAAGAG GATGGTGTGTTGACCCTTGTTAACGGGTCCTGCTTTTGCCGAGGATGGTG GTTACTGCATGAGCCTCCATCTGATTGGCTGGAGAGGCTGTGCCAAGCGG ACCTCATTTACATCAGTCACATGCACTCAGACCACCTGAG
6	TTACCCCACTGAAGAAGCTTGCTGGGAGAAGACCAGATATCCCCATTT ATGTTGGAAAAACAGAAAGACCTGTATTTTGGAACTGAATCAGAGTGGT GTCCAGTTGACTAATATCAATGTAGTGCCATTTGGAATATGGCAGCAG
7	GTAGACGAAAATCTCCGATTCATGATCCTAATGGATGGCGTTCATCCTGAA ATGGACACTTGCAATTATCGTGGAATACAAAG
8	GTCATAAAATACTCAATACAGTGGATTGCACCAGACCCAATGGAGGAAGG CTGCCTATGAAGGTTGATTTAATGATGAGTGATTTTGTGGAGGAGCATCA GGCTTTCCGATGACTTTCAGTGGTGGAAAGTTTACTG
9	AGGAATGGAAAGCCAGTTCATTAACAGAAAGGAAGAACTCCTGAA CTACAAGGCTCGGCTGGTGAAGGACCTACAACCCCGAATTTATTGCCCTT TGCTGGGTATTTTGTGGAATCCACCCATCAGACAA
10	GTACATTAAGGAAACAAACATCAAAAATGACCCAGATGAACTCAACAATC TTATCAAGAAAAATTCTGATGTGTTAACATGGACACCGCGACCTGGAGCC ACTCTTGATCTGGGTAGGATGCTAAAGGATCCAACAGACAG
11	CAAAGGCATCATTGACCCTCCGGAGGGGACTAAAATTTACAAGGATTCCT GGGACTTTGGACCATATTTGAAAATCTTGAATGCTGCTGTAGGAGATGAA ATATTTCCGCCACCCATCCTGGATAAAAGAATACTTCACTTGGGCTGGATTT AAGGATTATAACCTGGTGGTCAGG
12	ATGATTGAGACAGATGAGGACTTCAGCCCTTTTCTGGAGGATATGACTAT TTGGTTGACTTTCTAGATTTATCCTTTCCAAAAGAAAGACCAAGCCGGGAA

	CATCCATATGAGGAA
13	ATTCGGAGCCGGGTTGACGTCATCAGACACGTGGTGAAGAATGGCCTGCT CTGGGACGACCTGTATATAGGATTCCAAACCCGGCTCCAGCGGGATCCTG ACATATAACCATCATCT
14	GTTTTGGAACCATTTTCAAATAAAACTCCCCCTAACACCGCCCAACTGGAA GTCCTTCCTAATATACTGTGGGGAGAGAGGACCTGAGATCTCCCAG
15	GGATACTAA

### 3.5 AgaroZ Jel Elektroforezi ve Sekanslama

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında amplifiye edilen ürünlerin görüntülenmesi amacıyla ürünler %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. AgaroZ jel hazırlamak için, 1gr agaroz (Thermo Fisher Scientific, ABD), 100 ml 1xTAE çözeltisi içinde ısıtılarak çözdürülmüş ve 1 µl Etidyum Bromide Solution (10 mg/ml) (Pan Reac AppliChem) nükleik asit boyası eklenmiştir. Ürünler, DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher Scientific, ABD) yükleme boyası ile protokole uygun olarak karıştırılmış ve jele yüklenmiştir. Ürün büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla moleküler ağırlık işaretleyici olarak 3 µl GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Jel, 1 saat boyunca 100 V'de (The Mini-Sub Cell GT Cell, Bio-Rad, ABD) yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülenmiştir. Hedeflenen gen bölgesindeki ürün büyüklükleri moleküler ağırlık işaretleyicideki bant büyüklükleri ile kontrol edilmiştir. Beklenen ürün büyüklüklerinin gözleendiği örnekler sekans işlemi için hazırlanmıştır. PZR örnekleri saflaştırma işleminden sonra ABI Prism 3100 cihazıyla sekanslanmıştır.

### 3.6 Polimorfizmlerin ve Alel/Genotip Frekanslarının Belirlenmesi

PZR örnekleri sekanslandıktan sonra, sekanslar MEGA11 (Tamura vd., 2021) programı kullanılarak dizilmiş ve cDNA dizilerindeki polimorfizmler belirlenmiştir. Polimorfizmlerin amino asit sekansında değişikliğe sebep olup olmadığının araştırılması amacıyla nükleotit sekansları MEGA 11 programı kullanılarak amino asit sekansına çevrilmiş ve analiz edilmiştir. Genotip frekansı (Genotip sayısı / Popülasyondaki toplam birey sayısı) ve alel frekansı (Alel kopya sayısı / Popülasyondaki toplam birey sayısı) Microsoft Office Sürüm 365'in Microsoft Office Excel programı (<https://www.office.com/>) kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.7 Amino Asit Değişiminin Protein Fonksiyonuna Etkisi

Amino asit değişimine sebep olan polimorfizmlerin protein fonksiyonundaki zararlı/nötral etkilerinin belirlenmesi amacıyla PredictSNP (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>) (Bendl vd., 2014) ve SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) (Dakal vd, 2017) programları kullanılmıştır.

### 3.8 Kodon Kullanım Oranı ve mRNA İkincil Yapısının Belirlenmesi

Polimorfizmler tespit edildikten sonra her bir varyant için kodon kullanım oranları Sequence Manipulation Suite: Codon Usage ([https://www.bioinformatics.org/sms2/codon\\_usage.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html)) aracıyla belirlenmiştir (Stothard, 2000). Varyantların mRNA ikincil yapılarının belirlenmesi amacıyla UnAFold web sunucusu altında çalışan RNA folding form (<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>) kullanılmıştır (Zuker, 2003).

### 3.9 Protein İkincil Yapı Analizi

Protein 2 boyutlu yapı analizini gerçekleştirmek amacıyla elde edilen amino asit sekansları kullanılarak GOR IV Secondary Structure Prediction Method (Garnier vd., 1996) aracıyla her varyantın protein ikincil yapı analizi gerçekleştirilmiştir.

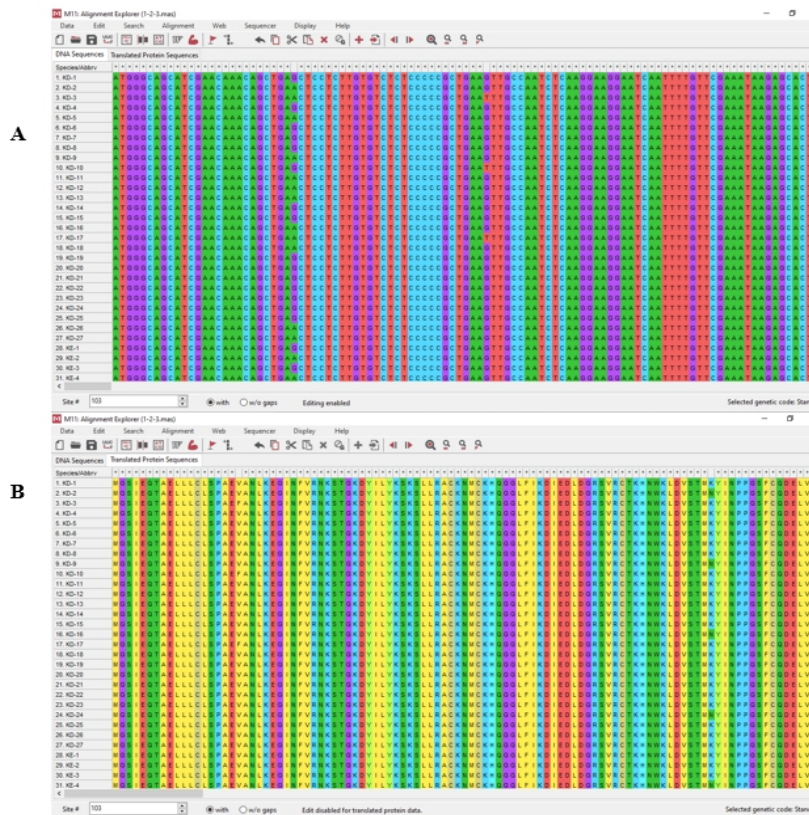
## 4. BULGULAR

### 4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

27 Kıvrırcık dişi (KD), 17 Kıvrırcık erkek (KE), 22 Karacabey Merinos dişi (MD) ve 22 Karacabey Merinos erkek (ME) koyunun cDNA örnekleri ile gerçekleştirilen PZR analizinde 88 örnek her primer çifti için amplifiye edilmiş ve agaroz jel elektroforezinde PZR ürün büyüklüğü teyit edilmiştir.

### 4.2 Polimorfizmlerin Belirlenmesi

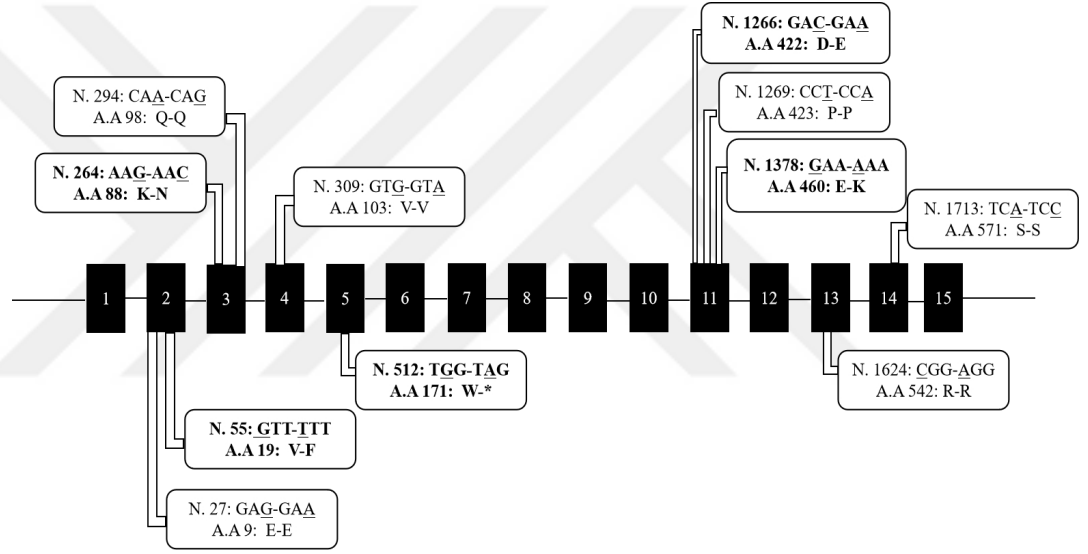
Koyun CMAH mRNA sekansları, MEGA 11 programında ırk ve cinsiyet özelliklerine göre dizilmiştir (Şekil 4.1). Toplamda 11 nükleotid pozisyonunda polimorfizmler saptanmıştır. Daha sonra nükleotid dizilerinin amino asit karşılıkları program üzerinden analiz edilerek polimorfizmlerin amino asit değişimine neden olan polimorfizmler belirlenmiştir.



Şekil 4.1. MEGA 11 kullanılarak analiz edilen CMAH mRNA sekansları

A: MEGA 11 Koyun Nükleotit Sekansı, B: MEGA 11 Koyun Amino Asit Sekansları

G27A, G55T, G264C, A294G, G309A, G512A, C1266A, A1269T, G1378A, C1624A ve A1713C polimorfizmlerinden 5 tanesinin (G55T, G264C, G512A, C1266A ve G1378A) amino asit değişikliğine neden olduğu, geriye kalan 6 pozisyonun amino asit değişimine neden olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.1). G55T polimorfizmi valin-fenilalanin değişimine, G264C polimorfizminin lizin-asparajin değişimine, G512A polimorfizminin triptofan-durdurma kodonu değişimine, C1266A polimorfizminin aspartik asit-glütamik asit değişimine ve G1378A polimorfizminin glütamik asit-lizin değişimine neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Koyun CMAH eksonlarındaki nükleotit polimorfizmleri ve amino asit değişimleri

1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15: Eksonlar, N: Nükleotit, A.A: Amino asit, Kalın: Amino asit değişimine neden olan varyasyonlar, E: Glütamik asit, V: Valin, F: Fenilalanin, K: Lizin, N: Asparajin, Q: Glütamin, W: Triptofan, \*: Durdurma kodonu, D: Aspartik asit, R: Arjinin, P: Prolin

**Tablo 4.1.** CMAH mRNA dizilerinde saptanan polimorfizmler

Sayı	İrk ve Cinsiyet	Polimorfizmler										
		G27A	G55T* <sup>1</sup>	G264C* <sup>2</sup>	A294G	G309A	G512A* <sup>3</sup>	C1266A* <sup>4</sup>	T1269A	G1378A* <sup>5</sup>	C1624A	A1713C
1	KD-1	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
2	KD-2	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	CC
3	KD-3	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TT	GA	CA	CC
4	KD-4	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
5	KD-5	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GG	CA	AC
6	KD-6	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	CC
7	KD-7	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
8	KD-8	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GG	CA	AC
9	KD-9	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TT	GA	CA	AC
10	KD-10	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
11	KD-11	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TT	GG	CA	AC
12	KD-12	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TT	GG	CA	CC
13	KD-13	AA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
14	KD-14	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
15	KD-15	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
16	KD-16	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
17	KD-17	AA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
18	KD-18	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GG	CA	AC
19	KD-19	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
20	KD-20	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	CC
21	KD-21	GG	GG	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
22	KD-22	GG	GG	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
23	KD-23	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
24	KD-24	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GG	CA	CC
25	KD-25	GG	GT	GC	AA	GA	GA	CA	TA	GA	CA	CC
26	KD-26	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TT	GG	CA	CC

27	KD-27	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GG	CA	AC
28	KE-1	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GG	CA	AC
29	KE-2	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
30	KE-3	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
31	KE-4	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GG	CA	CC
32	KE-5	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
33	KE-6	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GG	CA	AC
34	KE-7	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
35	KE-8	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
36	KE-9	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
37	KE-10	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
38	KE-11	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GG	CA	CC
39	KE-12	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
40	KE-13	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	CC
41	KE-14	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	CC
42	KE-15	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
43	KE-16	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
44	KE-17	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	CC
45	MD-1	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
46	MD-2	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
47	MD-3	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	CC
48	MD-4	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
49	MD-5	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	CC
50	MD-6	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
51	MD-7	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
52	MD-8	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
53	MD-9	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	CC
54	MD-10	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GG	CA	AC
55	MD-11	GA	GG	GC	AA	GA	GA	CA	TT	GG	CA	AC
56	MD-12	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	CC
57	MD-13	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TT	GA	CA	CC
58	MD-14	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GG	CC	AC
59	MD-15	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC

60	MD-16	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GG	CA	CC
61	MD-17	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	CC
62	MD-18	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	CC
63	MD-19	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
64	MD-20	AA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
65	MD-21	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
66	MD-22	AA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GG	CA	AC
67	ME-1	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
68	ME-2	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
69	ME-3	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GG	CA	AC
70	ME-4	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
71	ME-5	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
72	ME-6	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
73	ME-7	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
74	ME-8	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TA	GA	CA	AC
75	ME-9	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TT	GA	CC	CC
76	ME-10	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
77	ME-11	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
78	ME-12	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
79	ME-13	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
80	ME-14	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
81	ME-15	GG	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
82	ME-16	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	CC
83	ME-17	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
84	ME-18	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
85	ME-19	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC
86	ME-20	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CC	TT	GA	CA	AC
87	ME-21	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TT	GA	CA	AC
88	ME-22	GA	GT	GC	AG	GA	GA	CA	TA	GA	CA	AC

\* Amino asit değişimine neden olan varyasyon <sup>1</sup>: Valin - Fenilalanin amino asit değişimine neden olan nükleotit pozisyonu, <sup>2</sup>: Lizin - Asparajın amino asit değişimine neden olan nükleotit pozisyonu, <sup>3</sup>: Triptofan - Durdurma kodonu amino asit değişimine neden olan nükleotit pozisyonu, <sup>4</sup>: Aspartik asit - Glütamik asit amino asit değişimine neden olan nükleotit pozisyonu, <sup>5</sup>: Glütamik asit - Lizin amino asit değişimine neden olan nükleotit pozisyonu

### 4.3 Polimorfizm Frekansları

Polimorfizm belirlenen 11 pozisyonun ırk ve cinsiyete göre frekansları belirlenmiştir. G27A pozisyonu için homozigot GG genotip frekansı en yüksek Kıvırcık dişi (KD) (0.45) ve Karacabey Merinos dişi (MD) (0.31) hayvanlarda görülürken heterozigot GA genotip frekansı Kıvırcık erkek (KE) (0.82) ve Karacabey Merinos erkek (ME) (0.95) hayvanlarda görülmüştür. Homozigot AA genotipi sadece KD ve MD hayvanlarda görülmüş olup frekansları sırasıyla 0.07 ve 0.09 olarak belirlenmiştir. G55T polimorfizmi incelendiğinde KE ve ME hayvanlarda sadece GT genotipi görülürken KD ve MD hayvanlarda düşük frekanslarda GG genotipi de belirlenmiştir. Benzer şekilde A294G polimorfizminde KE ve ME’de sadece heterozigot AG genotipi görülürken, KD ve MD’de AA genotipi de görülmüştür. G264C, G309A ve G512A genotiplerinde bütün hayvanların heterozigot genotipe sahip olduğu görülmüştür. C1266A polimorfizm pozisyonunda KD ve ME hayvanlarda CA heterozigot genotip frekansı yüksek iken MD ve KE hayvanlarda CC genotip frekansı oldukça yüksektir. T1269A, G1378A, C1624A ve A1713C pozisyonlarında heterozigot genotip frekansları homozigot frekanslardan daha yüksek bulunmuş, C1624A pozisyonunda CC homozigot genotipi düşük frekansta bile olsa sadece ME hayvanlarda görülmüştür (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Polimorfizm pozisyonlarındaki genotip frekansı

<b>Polimorfizmler</b>											
<b>İrk ve Cinsiyet</b>	<b>G27A (f)</b>	<b>G55T (f)</b>	<b>G264C (f)</b>	<b>A294G (f)</b>	<b>G309A (f)</b>	<b>G512A (f)</b>	<b>C1266A (f)</b>	<b>T1269A (f)</b>	<b>G1378A (f)</b>	<b>C1624A (f)</b>	<b>A1713C (f)</b>
<b>KD</b>	GG (0.45) GA (0.48) AA (0.07)	GG (0.04) GT (0.96)	GC (1)	AA (0.04) AG (0.96)	GA (1)	GA (1)	CC (0.22) CA (0.78)	TT (0.33) TA (0.67)	GG - (0.3) GA (0.7)	CA (1)	CC (0.22) AC (0.78)
<b>KE</b>	GG (0.18) GA (0.82)	GT (1)	GC (1)	AG (1)	GA (1)	GA (1)	CC (0.94) CA (0.06)	TT (0.41) TA (0.59)	GG (0.24) GA (0.76)	CA (1)	CC (0.3) AC (0.7)
<b>MD</b>	GG (0.31) GA (0.6) AA (0.09)	GG (0.05) GT (0.95)	GC (1)	AA (0.05) AG (0.95)	GA (1)	GA (1)	CC (0.82) CA (0.18)	TT (0.45) TA (0.55)	GG (0.23) GA (0.77)	CA (1)	CC (0.32) AC (0.68)
<b>ME</b>	GG (0.05) GA (0.95)	GT (1)	GC (1)	AG (1)	GA (1)	GA (1)	CC - (0.18) CA (0.82)	TT (0.23) TA (0.77)	GG (0.05) GA (0.95)	CA - (0.95) CC (0.05)	CC (0.09) AC (0.91)

(f): Frekans

Polimorfizm pozisyonundaki alel frekans sonuçları, G27A pozisyonunda Kıvrıcık ırkı için G alel frekansının Karacabey Merinos ırkı için ise A alel frekansının yüksek olduğunu göstermektedir. G55T ve A294G pozisyonlarında, G alel frekansının her iki ırktaki dişi koyunlarda eşit olduğu bulunmuştur. Her iki ırkta da, C1266A pozisyonunda C aleli, T1269A pozisyonunda T aleli, G1378A pozisyonunda G aleli ve A1713C pozisyonunda C aleli daha yüksek frekans göstermiştir (Tablo4.3).

**Tablo4.3.** Polimorfizm pozisyonlarındaki alel frekansı

<b>Polimorfizmler</b>											
<b>İrk ve Cinsiyet</b>	<b>G27A (f)</b>	<b>G55T (f)</b>	<b>G264C (f)</b>	<b>A294G (f)</b>	<b>G309A (f)</b>	<b>G512A (f)</b>	<b>C1266A (f)</b>	<b>T1269A (f)</b>	<b>G1378A (f)</b>	<b>C1624A (f)</b>	<b>A1713C (f)</b>
<b>KD</b>	G (0.69) A (0.31)	G (0.52) T (0.48)	G (0.5) C (0.5)	A (0.48) G (0.52)	G (0.5) A (0.5)	G (0.5) A (0.5)	C (0.61) A (0.39)	T (0.66) A (0.34)	G (0.65) A (0.35)	C (0.5) A (0.5)	C (0.61) A (0.39)
<b>KE</b>	G (0.59) A (0.41)	G (0.5) T (0.5)	G (0.5) C (0.5)	A (0.5) G (0.5)	G (0.5) A (0.5)	G (0.5) A (0.5)	C (0.97) A (0.03)	T (0.70) A (0.30)	G (0.62) A (0.38)	C (0.5) A (0.5)	C (0.65) A (0.35)
<b>MD</b>	G (0.61) A (0.39)	G (0.52) T (0.48)	G (0.5) C (0.5)	A (0.48) G (0.52)	G (0.5) A (0.5)	G (0.5) A (0.5)	C (0.91) A (0.09)	T (0.72) A (0.28)	G (0.61) A (0.39)	C (0.5) A (0.5)	C (0.66) A (0.34)
<b>ME</b>	G (0.48) A (0.52)	G (0.48) T (0.5)	G (0.5) C (0.5)	A (0.5) G (0.5)	G (0.5) A (0.5)	G (0.5) A (0.5)	C (0.59) A (0.41)	T (0.71) A (0.39)	G (0.52) A (0.48)	C (0.52) A (0.48)	C (0.54) A (0.46)

(f): Frekans

#### 4.4 Amino Asit Değişiminin Protein Fonksiyonundaki Etkisi

Yanlış anlamlı mutasyonların protein fonksiyonuna etkisinin araştırılması sonucunda, kullanılan her iki programda da V17F ve K88N amino asit değişimlerinin protein fonksiyonunda olumsuz etkiye sebep olduğu, D422E ve E460K amino asit değişimlerinin ise nötral etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** Yanlış anlamlı mutasyonların protein fonksiyonuna etkisi

<b>Mutasyon</b>	<b>Predict-SNP</b>	<b>SIFT</b>
V17F	Zararlı	Zararlı
K88N	Zararlı	Zararlı
D422E	Nötral	Nötral
E460K	Nötral	Nötral

#### 4.5 Alternatif Ekleme (Alternative splicing)

Sekans örneklerinin MEGA11 programında analiz edilmesiyle, referans varyantla aynı uzunlukta olan bir varyantın (Varyant 2) yanı sıra ekson atlanması nedeniyle alternatif ekleme görölen 2 varyant daha tespit edilmiştir. Varyantlardan birinde ekson 9 atlanması (Varyant 3), diğer varyantta ise ekson 6 ve ekson 9 atlanması (Varyant 4) görölmüştür (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Alternatif ekleme sonucu oluşan farklı varyantların nükleotit sekansı

Varyantlar	Nükleotit Sekansı
Varyant 1 (Referans)	ATGGGCAGCATCGAACAAACAGCTGAGCTCCTCTTGTGTCTCTCCCCGCTGAAGTTGCCAATCTCAAGGAAGGAATCAATTTTGTTCGAA ATAAGAGCACTGGCAAAGATTACATCTTGTATAAGAGTAAGAGCCTCCTGCGAGCATGCAAGAATATGTGCAAGCACCAAGGAGGCCTGT TCATAAAAGATATCGAGGATTTAGATGGAAGGTCTGTTAGATGCACAAAACACAACCTGGAAGTTGGATGTGAGCACCATGAAGTACATCA ACCCTCCAGGCAGCTTCTGTCAAGATGAACTAGTTGTGGAAGAGAGTGAAGAAAATGAACTTTTGCTTCTAGAGCTGAATCCTCCTAACCC CTGGGATTCAGAGCCCAGATCTCCTGAAGATTTGGCTTTTGGGGAAGTGCAGATAACATACCTTACTCATGCCTGCATGGACCTCAAGCTG GGGGACAAGAGGATGGTGTGTTGACCCTTGGTTAACGGGTCTGCTTTTGCCCGAGGATGGTGGTTACTGCATGAGCCTCCATCTGATTGGCT GGAGAGGCTGTGCCAAGCGGACCTCATTTACATCAGTCACATGCACTCAGACCACCTGAGTTACCCACACTGAAGAAGCTTGCTGGGAGA AGACCAGATATCCCCATTTATGTTGGAAAAACAGAAAGACCTGTATTTTGGAAATCTGAATCAGAGTGGTGTCCAGTTGACTAATATCAATG TAGTGCCATTTGGAATATGGCAGCAGGTAGACGAAAATCTCCGATTCATGATCCTAATGGATGGCGTTCATCCTGAAATGGACACTTGCAT TATCGTGGAAATACAAAGGTCATAAAATACTCAATACAGTGGATTGCACCAGACCCAATGGAGGAAGGCTGCCTATGAAGGTTGATTTAATG ATGAGTGATTTTGTGCTGGAGGAGCATCAGGCTTCCGATGACTTTCAGTGGTGGAAAGTTTACTGAGGAATGGAAAGCCCAGTTCATTA CAGAAAGGAAGAACTCCTGAACTACAAGGCTCGGCTGGTGAAGGACCTACAACCCCGAATTTATTGCCCTTTGCTGGGTATTTTGTGGA ATCCCACCCATCAGACAAGTACATTAAGGAAACAAACATCAAAAATGACCCAGATGAACTCAACAATCTTATCAAGAAAAATTCTGATGT GTTAACATGGACACCGCGACCTGGAGCCACTCTTGATCTGGGTAGGATGCTAAAGGATCCAACAGACAGCAAAGGCATCATTGACCCTCCG GAGGGGACTAAAAATTTACAAGGATTCCTGGGACTTTGGACCATATTTGAAAATCTTGAATGCTGCTGTAGGAGATGAAATATTTGCCACC CATCCTGGATAAAAAGAATACTTCACTTGGGCTGGATTTAAGGATTATAACCTGGTGGTCAGGATGATTGAGACAGATGAGGACTTCAGCCC TTTTCTGGAGGATATGACTATTTGGTTGACTTTCTAGATTTATCCTTTCCAAAAGAAAGACCAAGCCGGAACATCCATATGAGGAAATTC GGAGCCGGGTTGACGTCATCAGACACGTGGTGAAGAATGGCCTGCTCTGGGACGACCTGTATATAGGATTCCAACCCGCTCCAGCGGG ATCCTGACATATAACCATCATCTGTTTTGGAACCATTTCAAATAAAACTCCCCCTAACACCGCCCAACTGGAAGTCCTTCTAATATACTGT GGGGAGAGAGGACCTGAGATCTCCAGGGATACTAA
Varyant 2	ATGGGCAGCATCGAACAAACAGCTGAACTCCTCTTGTGTCTCTCCCCGCTGAATTTGCCAATCTCAAGGAAGGAATCAATTTTGTTCGAAA TAAGAGCACTGGCAAAGATTACATCTTGTATAAGAGTAAGAGCCTCCTGCGAGCATGCAAGAATATGTGCAAGCACCAAGGAGGCCTGTT CATAAAAGATATCGAGGATTTAGATGGAAGGTCTGTTAGATGCACAAAACACAACCTGGAAGTTGGATGTGAGCACCATGAAGTACATCAA CCCTCCAGGCAGCTTCTGTCAGGATGAACTAGTTGTAGAAGAGAGTGAAGAAAATGAACTTTTGCTTCTAGAGCTGAATCCTCCTAACCCC TGGGATTCAGAGCCCAGATCTCCTGAAGATTTGGCTTTTGGGGAAGTGCAGATAACATACCTTACTCATGCCTGCATGGACCTCAAGCTGG GGGACAAGAGGATGGTGTGTTGACCCTTGGTTAACGGGTCTGCTTTTGCCCGAGGATGGTGGTTACTGCATGAGCCTCCATCTGATTGGCTG GAGAGGCTGTGCCAAGCGGACCTCATTTACATCAGTCACATGCACTCAGACCACCTGAGTTACCCACACTGAAGAAGCTTGCTGGGAGAA GACCAGATATCCCCATTTATGTTGGAAAAACAGAAAGACCTGTATTTTGGAAATCTGAATCAGAGTGGTGTCCAGTTGACTAATATCAATGT AGTGCCATTTGGAATATGGCAGCAGGTAGACGAAAATCTCCGATTCATGATCCTAATGGATGGCGTTCATCCTGAAATGGACACTTGCATT ATCGTGGAAATACAAAGGTCATAAAATACTCAATACAGTGGATTGCACCAGACCCAATGGAGGAAGGCTGCCTATGAAGGTTGATTTAATG

	<p>ATGAGTGATTTTGGCTGGAGGAGCATCAGGCTTTCCGATGACTTTCAGTGGTGGAAAGTTTACTGAGGAATGGAAAGCCCAGTTCATTA AAA  CAGAAAGGAAGAAACTCCTGAAC TACAAGGCTCGGCTGGTGAAGGACCTACAACCCCGAATTTATTGCCCTTTGCTGGGTATTTTGTGGA  ATCCCAACCATCAGACAAGTACATTAAGGAAACAAACATCAAAAATGACCCAGATGAACTCAACAATCTTATCAAGAAAAATTCTGATGT  GTAAACATGGACACCGCGACCTGGAGCCACTCTTGATCTGGGTAGGATGCTAAAGGATCCAACAGACAGCAAAGGCATCATTGAACCACC  GGAGGGGACTAAAATTTACAAGGATTCTGGGACTTTGGACCATATTTGAAAATCTTGAATGCTGCTGTAGGAGATGAAATATTTGCCAC  CCATCCTGGATAAAAAATACTTCACTTGGGCTGGATTTAAGGATTATAACCTGGTGGTCAGGATGATTGAGACAGATGAGGACTTCAGCC  CTTTTCTGGAGGATATGACTATTTGGTTGACTTTCTAGATTTATCCTTTCCAAAAGAAAGACCAAGCCGGGAACATCCATATGAGGAAATT  CGGAGCCGGTTGACGTCATCAGACACGTGGTGAAGAATGGCCTGCTCTGGGACGACCTGTATATAGGATTCCAAACCAGGCTCCAGCGG  GATCCTGACATATAACCATCATCTGTTTTGGAACCATTTTCAAATAAAACTCCCCCTAACACCGCCCAACTGGAAGTCCTTCTAATACTG  TGGGGAGAGAGGACCTGAGATCTCCAGGGATACTAA</p>
Varyant 3	<p>ATGGGCAGCATCGAACAACAGCTGAGCTCCTCTGTGTCTCTCCCCGCTGAAGTTGCCAATCTCAAGGAAGGAATCAATTTTGTTCGAA  ATAAGAGCACTGGCAAAGATTACATCTTGTATAAGAGTAAGAGCCTCCTGCGAGCATGCAAGAATATGTGCAAGCACCAAGGAGGCCTGT  TCATAAAAGATATCGAGGATTTAGATGGAAGGTCTGTTAGATGCACAAAACACAACCTGGAAGTTGGATGTGAGCACCATGAAGTACATCA  ACCCTCCAGGCAGCTTCTGTCAAGATGAACTAGTTGTGGAAGAGAGTGAAGAAAATGAACTTTTGCTTCTAGAGCTGAATCCTCCTAACCC  CTGGGATTCAGAGCCAGATCTCCTGAAGATTTGGCTTTTGGGGAAGTGCAGATAACATACCTTACTCATGCCTGCATGGACCTCAAGCTG  GGGGACAAGAGGATGGTGTTTGACCCTTGGTTAACGGGTCTGCTTTTGCCCGAGGATGGTGGTTACTGCATGAGCCTCCATCTGATTGGCT  GGAGAGGCTGTGCCAAGCGGACCTCATTTACATCAGTCACATGCACTCAGACCACCTGAGGTAGACGAAAATCTCCGATTCATGATCCTAA  TGGATGGCGTTCATCCTGAAATGGACACTTGCATTATCGTGGAATACAAAGGTCATAAAATACTCAATACAGTGGATTGCACCAGACCCAA  TGGAGGAAGGCTGCCTATGAAGGTTGATTTAATGATGAGTGATTTTGGCTGGAGGAGCATCAGGCTTTCCGATGACTTTCAGTGGTGGAAAG  TTTACTGAGGAATGGAAAGCCCAGTTTCAATTAACAGAAAAGGAAGAAACTCCTGAACTACAAGGCTCGGCTGGTGAAGGACCTACAACCC  CGAATTTATTGCCCTTTGCTGGGTATTTTGTGGAATCCCACCCATCAGACAAGTACATTAAGGAAACAAACATCAAAAATGACCCAGATG  AACTCAACAATCTTATCAAGAAAAATTCTGATGTGTTAACATGGACACCGCGACCTGGAGCCACTCTTGATCTGGGTAGGATGCTAAAGGA  TCCAACAGACAGCAAAGGCATCATTGACCCTCCGGAGGGGACTAAAATTTACAAGGATTCCTGGGACTTTGGACCATATTTGAAAATCTTG  AATGCTGCTGTAGGAGATGAAATATTTGCCACCCATCCTGGATAAAAGAATACTTCACTTGGGCTGGATTTAAGGATTATAACCTGGTGG  TCAGGATGATTGAGACAGATGAGGACTTCAGCCCTTTCTGGAGGATATGACTATTTGGTTGACTTTCTAGATTTATCCTTTCCAAAAGAA  AGACCAAGCCGGGAACATCCATATGAGGAAATTCGGAGCCGGGTTGACGTCATCAGACACGTTGGTGAAGAATGGCCTGCTCTGGGACGAC  CTGTATATAGGATTCCAAACCCGGCTCCAGCGGGATCCTGACATATAACCATCATCTGTTTTGGAACCATTTTCAAATAAAACTCCCCCTAAC  ACCGCCCAACTGGAAGTCCTTCTAATAATACTGTGGGGAGAGAGGACCTGAGATCTCCAGGGATACTAA</p>
Varyant 4	<p>ATGGGCAGCATCGAACAACAGCTGAGCTCCTCTGTGTCTCTCCCCGCTGAAGTTGCCAATCTCAAGGAAGGAATCAATTTTGTTCGAA  ATAAGAGCACTGGCAAAGATTACATCTTGTATAAGAGTAAGAGCCTCCTGCGAGCATGCAAGAATATGTGCAAGCACCAAGGAGGCCTGT  TCATAAAAGATATCGAGGATTTAGATGGAAGGTCTGTTAGATGCACAAAACACAACCTGGAAGTTGGATGTGAGCACCATGAAGTACATCA  ACCCTCCAGGCAGCTTCTGTCAAGATGAACTAGTTGTGGAAGAGAGTGAAGAAAATGAACTTTTGCTTCTAGAGCTGAATCCTCCTAACCC  CTGGGATTCAGAGCCAGATCTCCTGAAGATTTGGCTTTTGGGGAAGTGCAGATAACATACCTTACTCATGCCTGCATGGACCTCAAGCTG  GGGGACAAGAGGATGGTGTTTGACCCTTGGTTAACGGGTCTGCTTTTGCCCGAGGATAGTGGTTACTGCATGAGCCTCCATCTGATTGGCT</p>

GGAGAGGCTGTGCCAAGCGGACCTCATTTACATCAGTCACATGCACTCAGACCACCTGAGGTAGACGAAAATCTCCGATTCATGATCCTAA  
TGGATGGCGTTCATCCTGAAATGGACACTTGCATTATCGTGGAATACAAAGGTCATAAAATACTCAATACAGTGGATTGCACCAGACCCAA  
TGGAGGAAGGCTGCCTATGAAGGTTGATTTAATGATGAGTGATTTTGCTGGAGGAGCATCAGGCTTCCGATGACTTTCAGTGGTGGAAAG  
TTTACTGGTACATTAAGGAAACAAACATCAAAAATGACCCAGATGAACTCAACAATCTTATCAAGAAAAATTCTGATGTGTTAACATGGAC  
ACCGCGACCTGGAGCCACTCTTGATCTGGGTAGGATGCTAAAGGATCCAACAGACAGCAAAGGCATCATTGACCCTCCGGAGGGGACTAA  
AATTTACAAGGATTCCTGGGACTTTGGACCATATTTGAAAATCTTGAATGCTGCTGTAGGAGATGAAATATTTCCGCCACCCATCCTGGATAA  
AAGAATACTTCACTTGGGCTGGATTTAAGGATTATAACCTGGTGGTCAGGATGATTGAGACAGATGAGGACTTCAGCCCTTTTCCTGGAGG  
ATATGACTATTTGGTTGACTTTCTAGATTTATCCTTTCCAAAAGAAAGACCAAGCCGGGAACATCCATATGAGGAAATTCGGAGCCGGGTT  
GACGTCATCAGACACGTGGTGAAGAATGGCCTGCTCTGGGACGACCTGTATATAGGATTCCAAACCCGGCTCCAGCGGGATCCTGACATAT  
ACCATCATCTGTTTTGGAACATTTTCAAATAAAACTCCCCCTAACACCGCCAACTGGAAGTCCTTCCTAATATACTGTGGGGAGAGAGGA  
CCTGAGATCTCCAGGATACTAA

Farklı varyantların nükleotit sekanslarından elde edilen amino asit sekanslarında Varyant 3 ve 4'te alternatif ekleme sonucu erken durdurma kodonu olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 4.6.** Alternatif ekleme sonucu oluşan farklı varyantların amino asit sekansı

Varyantlar	Amino Asit Sekansı
Varyant 1 (Referans)	MGSIEQTAELLCLSPAEVANLKEGINFVRNKSTGKDYILYKSKSLLRACKNM CKHQGGLFIKDIEDLDGRSVRCKHNWKLDVSTMKYINPPGSFCQDELVVEES EENELLLLLELNPPNPWDSEPRSPEDLAFGEVQITYLTHACMDLKLGDKRMVFD PWLTPAFARGWWLLHEPPSDWLERLCQADLIYISHMHSDHLSYPTLKKLAG RRPDIPIYVGKTERPVFWNLNQSGLVQLTNINVVVPGIWWQVDENLRFMILMDG VHPMDTCIIVEYKGHKILNTVDCTRPNGGRLPMKVDLMMSDFAGGASGFPM TFSGGKFTEEWKAQFIKTERKLLNYKARLVKDLQPRIYCPFAGYFVESHPSD KYIKETNIKNDPDELNNLIKNSDVLWTWPRPGATLDLGRMLKDPDTSKGIIDP PEGTKIYKDSWDFGPYLKILNAAVGDEIFRHPSWIKEYFTWAGFKDYNLVVR MIETDEDFSPFPGGYDYLVDLFLDLSFKERPSREHPYEEIRSVDVIRHVVKNG LLWDDLYIGFQTRLQRDPDIYHHLFWNHQIKLPLTPPNWKSFLIYCGERGPEI SQGY*
Varyant 2	MGSIEQTAELLCLSPAEFANLKEGINFVRNKSTGKDYILYKSKSLLRACKNM CKHQGGLFIKDIEDLDGRSVRCKHNWKLDVSTMNYINPPGSFCQDELVVEES EENELLLLLELNPPNPWDSEPRSPEDLAFGEVQITYLTHACMDLKLGDKRMVFD PWLTPAFARGWWLLHEPPSDWLERLCQADLIYISHMHSDHLSYPTLKKLAG RRPDIPIYVGKTERPVFWNLNQSGLVQLTNINVVVPGIWWQVDENLRFMILMDG VHPMDTCIIVEYKGHKILNTVDCTRPNGGRLPMKVDLMMSDFAGGASGFPM TFSGGKFTEEWKAQFIKTERKLLNYKARLVKDLQPRIYCPFAGYFVESHPSD KYIKETNIKNDPDELNNLIKNSDVLWTWPRPGATLDLGRMLKDPDTSKGIIEP PEGTKIYKDSWDFGPYLKILNAAVGDEIFRHPSWIKKYFTWAGFKDYNLVVR MIETDEDFSPFPGGYDYLVDLFLDLSFKERPSREHPYEEIRSVDVIRHVVKNG LLWDDLYIGFQTRLQRDPDIYHHLFWNHQIKLPLTPPNWKSFLIYCGERGPEI SQGY*
Varyant 3	MGSIEQTAELLCLSPAEVANLKEGINFVRNKSTGKDYILYKSKSLLRACKNM CKHQGGLFIKDIEDLDGRSVRCKHNWKLDVSTMKYINPPGSFCQDELVVEES EENELLLLLELNPPNPWDSEPRSPEDLAFGEVQITYLTHACMDLKLGDKRMVFD PWLTPAFARGWWLLHEPPSDWLERLCQADLIYISHMHSDHLR*TKISDS*S* WMAFILKWTLALSWNKVIKYSIQWIAPDPMEEGCL*RLI***VILLEEHAQFR *LSVVESSLRNGKPSLQKGRNS*TTRLGW*RTYNPEFIAPLLGILWNPHTQT STLRKQTSKMTQMNSTILSRKILMC*HGHRDLEPLLIWVGC*RIQQTAKASLTL RRGLKFTRIPGTLDDHI*KS*MLL*EMKYFATHPG*KNTSLGLDLRIITWWSG*LR QMRTSALFLEDMTIWLTF*IYPFQKKDQAGNIHMRKFGAGLTSSDTW*RMAC SGTTCI*DSKPGSSGILTYTICFGTIFK*NSP*HRPTGSPS*YTVGREDLRSRPT
Varyant 4	MGSIEQTAELLCLSPAEVANLKEGINFVRNKSTGKDYILYKSKSLLRACKNM CKHQGGLFIKDIEDLDGRSVRCKHNWKLDVSTMKYINPPGSFCQDELVVEES EENELLLLLELNPPNPWDSEPRSPEDLAFGEVQITYLTHACMDLKLGDKRMVFD PWLTPAFARG*WLLHEPPSDWLERLCQADLIYISHMHSDHLR*TKISDS*S*W MAFILKWTLALSWNKVIKYSIQWIAPDPMEEGCL*RLI***VILLEEHAQFR*L SVVESLLVH*GNKHQK*PR*TQOSYQEF*CVNMDTATWSHS*SG*DAKGSN RQQRHH*PSGGD*NLQGFGLWTIFENLECCRR*NISPPILDKRILHLGWI*GL *PGGQDD*DR*GLQPFWSRI*LFG*LSRFILSKRKTGPGTSI*GNSEPG*RHQTRG EWPALGRPVYRIPNPAPAGS*HIPSSVLEPFSNKTPNTAQLEVLPNILWGERT *DLPGIL

\* Durdurma kodonu

#### 4.6 Kodon Kullanım Oranları

Polimorfizmlerin farklı varyantlardaki kodon kullanım oranına etkisini belirlemek amacıyla kodon kullanım oranları analiz edilmiştir. Referans varyant (Varyant 1) ile Varyant 2 karşılaştırıldığında, Asparajin, Aspartik asit, Glütamik asit, Glütamin, Lizin, Fenilalanin, Prolin ve Valin amino asitlerinin kodon kullanımlarında farklılıklar belirlenmiştir. Referans varyant ve Varyant 2'den farklı olarak Varyant 3 ve Varyant 4'te ekson atlanması sonucu oluşan alternatif ekleme, çok sayıda durdurma kodonu kullanımına neden olmuştur (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7.** Varyantların kodon kullanım oranları

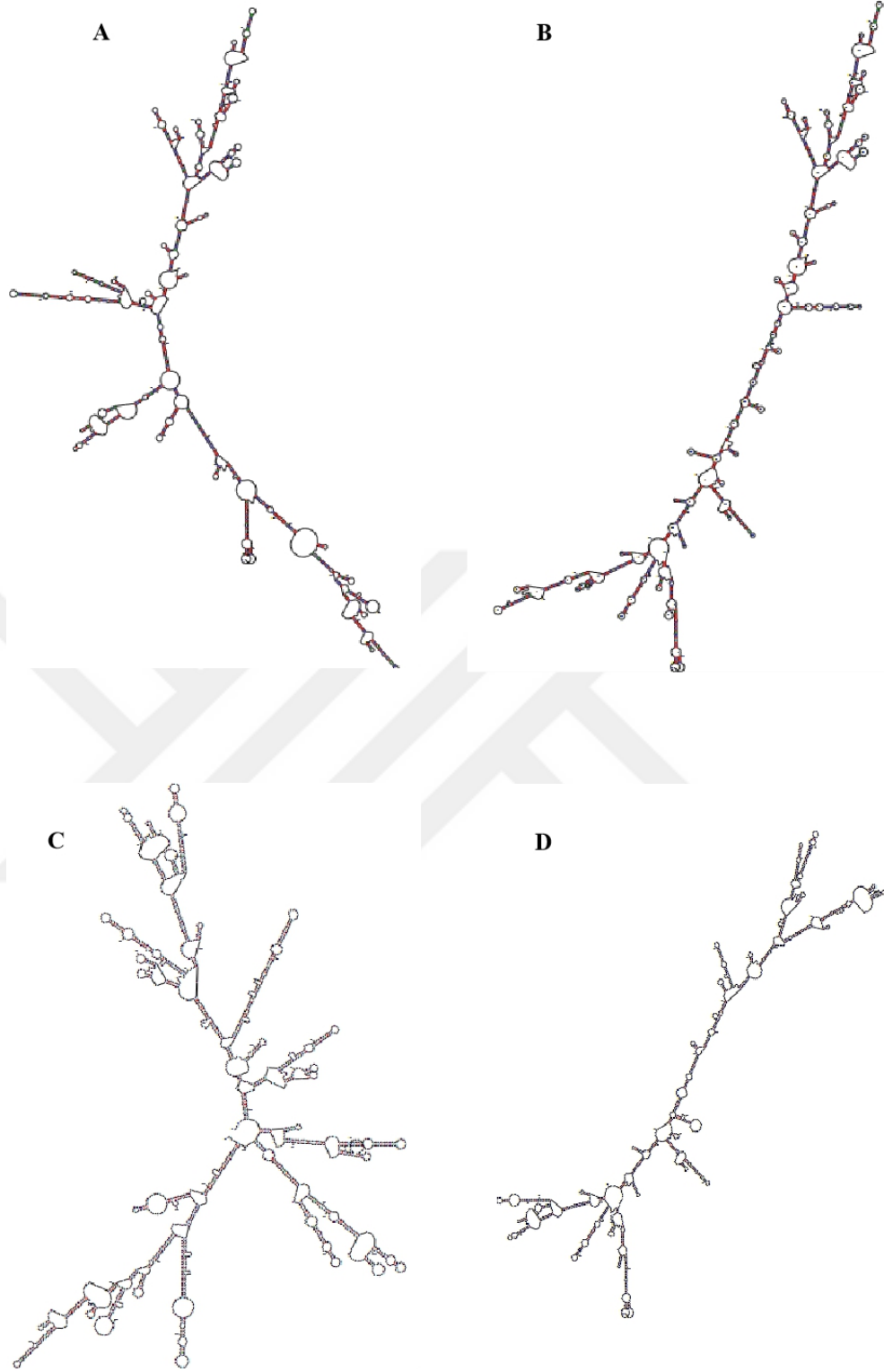
	Varyant 1	Varyant 2	Varyant 3	Varyant 4
Amino asit ve Kodon	Sayı	Sayı	Sayı	Sayı
(A) GCG	1	1	2	4
GCA	2	2	5	3
GCT	11	11	5	8
GCC	5	5	9	4
(C) TGT	3	3	5	4
TGC	8	8	8	8
(D) GAT	24	24	14	15
CAT	20	18	11	9
(E) GAT	14	13	14	12
GAA	24	25	13	19
(F) TTT	19	20	7	9
TTC	9	9	10	6
(G) GGG	6	6	9	5
GGA	20	20	14	16
GGT	5	5	2	6
GGC	8	8	7	6
(H) CAT	8	8	8	9
CAC	8	8	7	7
(I) ATA	10	10	6	11
ATT	10	10	13	7
ATC	16	16	15	10
(K) AAG	25	24	15	13
AAA	17	18	18	13
(L) TTG	9	9	15	9
TTA	6	6	9	7
CTG	18	18	20	16
CTA	8	8	4	5
CTT	6	6	7	12
CTC	14	14	10	8
(M) ATG	15	15	17	9
(N) AAT	18	18	10	13
AAC	9	11	18	8
(P) CCG	4	4	-	3
CCA	12	13	6	10
CCT	16	15	12	12
CCC	10	10	9	8
(Q) CAG	8	9	8	7
CAA	7	6	8	11
(R) AGG	7	7	16	10
AGA	9	9	8	9
CGG	6	6	1	-
CGA	6	6	4	5
CGT	-	-	-	2

	CGC	1	1	2	-
	AGT	7	7	7	4
	AGC	9	9	6	6
(S)	TCG	-	-	1	3
	TCA	4	4	15	7
	TCT	4	4	6	8
	TCC	7	7	8	9
	ACG	1	1	5	2
(T)	ACA	13	13	13	7
	ACT	9	9	11	4
	ACC	3	3	10	7
	GTG	13	12	8	7
(V)	GTA	4	5	1	2
	GTT	9	8	4	6
	GTC	3	3	1	2
(W)	TGG	16	16	17	15
(Y)	TAT	10	10	5	3
	TAC	13	13	6	5
*	TGA	-	-	11	19
	TAG	-	-	4	3
	TAA	1	1	8	6

A: Alanin, R: Arjinin, N: Arparajin, D: Aspartik asit, C: Sistein, E: Glütamik asit,  
 Q: Glütamin, G: Glisin, H: Histidin, I: İzölösün, L: Lösün, K: Lizin, M: Metiyonin,  
 F: Fenilalanin, P: Prolin, S: Serin, T: Treonin, W: Triptofan, Y: Tirozin, V: Valin,  
 \*: Durdurma Kodonu

#### 4.7 mRNA İkincil Yapıları

Referans varyant ve bu çalışmada tespit edilen 3 varyantın mRNA ikincil yapı analizi, polimorfizm ve alternatif eklenme görülen varyantlarda mRNA katlanmasının referans varyanttan farklı olduğunu ortaya koymuştur. Referans varyantla aynı uzunlukta olan Varyant 2, referans varyantla benzerlik gösterse de kodon farklılığına neden olan polimorfizmler nedeniyle zincir ve sap sayısında farklılıklar görülmüştür. Varyant 3'te referans varyanta oranla daha fazla zincir ve sap görülürken, Varyant 4'te daha az görülmüştür (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Varyantların mRNA ikincil yapıları

A: Varyant 1 (Referans), B: Varyant 2, C:Varyant 3, D: Varyant 4

#### 4.8 Proteinlerin Sekonder Yapıları

Varyantların amino asit sekanslarıyla gerçekleştirilen protein sekonder yapı analizinde, referans varyant (Varyant 1) ile Varyant 2 arasında alfa helix miktarında bir farklılık görülmemiş, beta yaprakçık miktarının ise Varyant 2’de daha az olduğu belirlenmiştir. Varyant 3 ve 4’te, referans varyanta oranla alfa heliks miktarı azalmış, beta yaprakçık miktarı ise Varyant 3’te artış gösterirken, Varyant 4’te azalmıştır (Tablo 4.8)

**Tablo 4.8.** Proteinlerin sekonder yapı oranları

Sekonder Yapı	Varyantlar			
	Varyant 1	Varyant 2	Varyant 3	Varyant 4
Alfa Heliks	%21.64	%21.64	%20.79	%20
Beta Yaprakçık	%25.55	%25.38	%25.74	%25.29
Rastgele Sarımlar	%52.81	%52.98	%53.47	%54.71

## 5. TARTIŞMA

Kanser, 2020 yılında yaklaşık 10 milyon insanın hayatını kaybetmesine neden olan küresel olarak önde gelen bir ölüm nedenidir (WHO, 2022). Dünya Kanser Araştırma Fonu çalışmalarına göre 2020 yılında 18.1 milyon yeni vaka teşhis edildiği, küresel olarak daha yüksek bir akciğer ve meme kanseri insidansı olduğu (sırasıyla %12,2 ve %12,5 insidansı), ardından yüksek bir kolorektal kanser (%10,7), prostat kanseri (%7,8), mide kanseri (%6) ve karaciğer kanseri (%5,0) insidansı görüldüğü bildirilmiştir (WCRF, 2022).

Beslenme ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için yapılan bir çok çalışma bulunmaktadır. Düzenli meyve, sebze tüketimine ve bunun sonucunda selenyum, folik asit, vitaminler açısından zengin besinlerin alınmasına dayalı diyet modelleri, kanserin başlangıcında koruyucu bir rol oynamakta ve böylece meme kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanseri riskini %60-70 oranında ve akciğer kanseri riskini de %40-50 oranında azaltmaktadır (Donaldson, 2004). Lif bakımından zengin ürünlerin yüksek miktarda tüketilmesi ve orta düzeyde süt ve süt ürünleri alınmasının farklı kanser türlerinin (örneğin kolorektal kanser, akciğer kanseri, mide kanseri, meme kanseri) görülme sıklığını azalttığı bilinmektedir (Torres vd., 2017; Fliss-Isakov vd., 2018). Tersine, hayvansal katı ve sıvı yağlar bakımından zengin ve genellikle yüksek sıcaklıklarda pişirilen et ve hayvansal ürünler, özellikle kolorektal kanser, mide kanseri ve prostat kanseri için kanser insidansını arttırmaktadır (Aune vd., 2015; Lăcătuşu vd., 2019).

Kırmızı et ve süt ürünleri tüketiminin kanser mekanizmasındaki rolüyle ilgili çalışmalar, beslenme yoluyla alınan Neu5Gc sialik asidinin önemini ortaya koymaktadır. İnsanlar, CMP-Neu5Ac hidroksilaz (CMAH) enziminde gerçekleşen mutasyon nedeniyle Neu5Gc sialik asidini sentezleyememekte ve beslenme yoluyla ya da çeşitli tıbbi durumların tedavisinde kullanılan bazı onaylanmış biyoterapötikler aracılığıyla vücuda almaktadırlar. İnsan vücudu Neu5Gc'yi "yabancı" olarak tanımlamakta ve diyet yoluyla kırmızı et ve süt ürünlerinden alınan Neu5Gc'ye karşı anti-Neu5Gc antikoru üretmektedir (Anjum vd., 2020). Neu5Gc sialik asidinin, anti-Neu5Gc antikoru ile etkileşiminin sonucu oluşan inflamasyonun kanserle ilişkilendirilmesi ve kanser dokularında yoğun miktarda

Neu5Gc bulunması (Samraj vd., 2014; Samraj vd., 2015; Bashir vd., 2020 ), bu sialik asidi daha az miktarda sentezleyen hayvan tüketiminin insan sağlığı açısından önemli olabileceğini düşündürmüştür. 2021 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, koyun, keçi, sığır ve domuz gibi dünyada yüksek miktarda tüketilen çiftlik hayvanlarının farklı dokularında Neu5Gc miktar tayini yapılmıştır. Bağırsak, karaciğer, akciğer, kalp, böbrek ve kas dokularındaki Neu5Gc miktarı domuz ve sığırlarda, keçi ve koyunlara göre daha yüksek çıkmıştır. Koyunlarda, bahsedilen organlara ek olarak dilde ve et olarak tüketilen birçok vücut bölgesinde Neu5Gc saptanmıştır (Jahan vd., 2021). Türkiye’de koyun etinin yanı sıra, karaciğer, dil ve bağırsak gibi organlarının da tüketiliyor olması, Neu5Gc sialik asidini az üreten hayvanların ıslahta kullanılmasının önemini vurgulamaktadır. Bu amaçla, bu çalışmada Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan, et ve süt ürünleri tüketilen Kıvrıkcık ve Karacabey Merinos koyun ırklarında, Neu5Gc sentezinde görev alan *CMAH* mRNA dizisi analiz edilerek sialik asit sentezini etkileyen olası polimorfizmlerin saptanması ve hayvan ıslahı açısından Neu5Gc içeriğiyle ilişkili olabilecek bir biyobelirteç bulunması amaçlanmıştır.

*CMAH* enziminin katalize ettiği Neu5Ac’nin Neu5Gc’ye dönüşümü, kedilerde kan grubunu belirleyen önemli bir faktördür. Eritrositlerde bulunan sialik asit tipleri kedilerde farklı kan gruplarının oluşmasına neden olmaktadır (Bighignoli vd., 2007). *CMAH* geninin moleküler karakterizasyonu sonucu bulunan polimorfizmlerin, kedilerde kan gruplarının belirlenmesinde önemli bir biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir. Anlamlı ve eş anlamlı tek nükleotid polimorfizmlerinin, farklı kedi ırklarında Neu5Ac ve Neu5Gc miktarıyla ilişkisi ortaya konmuştur (Bighignoli vd., 2007; Omi vd., 2016; Kehl vd., 2018; Can vd., 2021). Kedilerde gerçekleştirilen çalışmalarda, farklı kan gruplarındaki kedilerde özgün polimorfizmler saptanarak sialik asit ilişkisi belirlenmiştir. Örneğin, T268A polimorfizminin B kan grubu kedilerde yüksek frekansta görüldüğü ve bu nedenle biyobelirteç olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Omi vd., 2016)

Koyunlarda *CMAH* moleküler karakterizasyonu ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiş ve üç farklı primer çifti kullanılarak sekanslanan *CMAH* mRNA dizilerinde toplamda 11 tek nükleotid polimorfizmi bulunmuştur. Polimorfizm pozisyonlarının 5’i amino asit değişime sebep olurken 6’sı eş anlamlı tek

nükleotid polimorfizmi olarak belirlenmiştir. Kedi CMAH genindeki özgün polimorfizmlerin sialik asit ile ilişkilendirilmesinden yola çıkarak, bu çalışmadaki polimorfizm frekans sonuçları KD ve MD'de G27A pozisyonunda görülen AA genotipinin (sırasıyla 0.07 ve 0.09), KD ve MD'de G55T pozisyonunda görülen GG genotipinin (sırasıyla 0.04 ve 0.05) ve KD ve MD'de A294G'de görülen AA genotipinin (sırasıyla 0.04 ve 0.05) Neu5Gc sialik asit miktarıyla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, her iki ırkta ve cinsiyette G1378A pozisyonunda GG genotip frekansının GA genotip frekansına göre düşük olması ve yine A1713C pozisyonunda CC genotip frekansının AC genotip frekansına göre düşük olması, bu pozisyonlardaki homozigot genotip frekanslarının da Neu5Gc miktarıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Türkiye, 45,2 milyon baş koyun nüfusu ile dünyanın en büyük koyun yetiştiren ülkeleri arasında yer almaktadır. Koyun, Türkiye ekonomisinde ve halkının beslenmesinde önemli bir yere sahiptir (Esen vd., 2020). Koyun yetiştiriciliğinde et, süt verimi ve kalitesi önemli bir rol oynamaktadır. Erkek ve dişi koyunların karkas ve et kalitesi özellikleri, cinsiyete dayalı üretimin planlanmasında ve ürün için bir pazarlama stratejisinin geliştirilmesinde önemli hususlardır (Birkiye vd., 2019). Neu5Gc miktarıyla ilişkilendirilen genotiplerin ilk üçünün her iki ırkta da dişilerde görülmesi, et kalitesinde cinsiyetin rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar, Kıvırcık ve Karacabey Merinos ırklarının et kalitesinin benzer olduğunu ve cinsiyetin her iki ırk için de et verim ve kalitesinde etkisi olmadığını göstermektedir (Koyuncu, 2008; Ekiz vd., 2009; Birkiye vd., 2019). Bu durum, çalışmada biyobelirteç olarak kullanılabilmesi düşülen genotiplerin et kalitesini olumsuz etkilemeyeceğini, aksine Neu5Gc miktarı düşük koyun yetiştiriciliğinin et kalitesini arttıracığını göstermektedir.

Yanlış anlamlı mutasyon, proteinde amino asit değişimine sebep olan tek nükleotit değişimidir. Bu amino asit değişikliği hiçbir etkiye sebep olmayabileceği gibi, proteinin fonksiyonunu değiştirebilmekte veya proteini işlevsiz hale getirebilmektedir (Iqbal vd., 2020). Bu çalışmada bulunan ve amino asit değişimine sebep olan tek nükleotid polimorfizmlerinin protein fonksiyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizde V19F ve K88N amino asit

değişimlerinin protein fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyebileceği gösterilmiştir. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda, farklı genlerdeki yanlış anlamlı mutasyonların koyunlarda kuzu doğum oranıyla, sıcaklık stresiyle ve süt özellikleriyle ilişkisi gösterilmiştir. Örneğin, HSPA8 genindeki T177P amino asit değişiminin, İvesi ırkı koyunlarda sıcaklık stresine karşı düşük toleransla ilişkilendiği (Al-Thuwaini vd., 2020), GDF9 genindeki V371M amino asit değişiminin ise Norveç koyunlarında kuzulama oranını arttırdığı bildirilmiştir (Våge vd., 2013). Yapılan başka bir çalışmada ise, koyunlarda TLR4 genindeki N570K amino asit değişiminin süt miktarı, protein yüzdesi ve yağ yüzdesi gibi süt özelliklerini arttırdığı ortaya konmuştur (Sallam, 2021). Buradan yola çıkarak, bu çalışmada protein fonksiyonunu olumsuz etkileyebileceği belirlenmiş iki yanlış anlamlı mutasyonun, CMAH protein işlevi ile doğrudan bağlantılı olarak Neu5Gc miktarını etkileyebileceği ve Neu5Gc miktarı düşük bireylerin seçiminde biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür. Daha önceki çalışmalarda belirlenen yanlış anlamlı mutasyon ve fenotip ilişkisine benzer olarak, V19F ve K88N yanlış anlamlı mutasyonlarının, koyunlarda et ve süt kalitesi açısından belirleyici olabileceği düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen çalışmada alternatif ekleme sonucu oluşan 3 varyant bulunmuştur. Alternatif ekleme, değişken şekilde eklenmiş mRNA'lar üretmek için bir haberci RNA öncüsü (pre-mRNA) içindeki farklı ek yeri kombinasyonlarının seçilmesi işlemidir. Bu çoklu mRNA'lar, dizilimleri ve aktiviteleri bakımından farklılık gösteren ve yine de tek bir genden ortaya çıkan proteinleri kodlayabilmektedir (Greenberg and Soreq, 2013). Çalışmada bulunan 3 farklı varyanttan biri (Varyant 2) referans varyant (Varyant 1) ile aynı nükleotid uzunluğunda bulunurken, Varyant 3 ve 4 ekson atlanması nedeniyle daha kısa uzunlukta ve erken stop kodonların olduğu varyantlar olarak tespit edilmiştir. NCBI veritabanında gen haritalaması sonucu tahmin edilen koyun CMAH genindeki farklı büyüklükteki varyantların (488 aa, 490 aa e 548 aa uzunluğunda) varlığı, çalışmada farklı varyantların bulunmasını desteklemektedir (NCBI, *Ovis aries* CMAH Transcripts). Yanı sıra, yine NCBI veritabanında gen haritalamasıyla tahmin edilen varyantlardan birinin 121 amino asitten oluşan inaktif bir varyant (XP\_027814438.1) olması, çalışmada bulunan Varyant 3 ve 4'ün inaktif varyantlar olduğunu desteklemektedir (NCBI, *Ovis aries* inactive CMAH). Koyun,

keçi, domuz ve sığır gibi çiftlik hayvanlarından CMAH geni karakterizasyonu bir tek domuzlarda gerçekleştirilmiş ve 577 amino asit uzunluğunda bir protein kodladığı bildirilmiştir. (Butler vd., 2016; Fischer vd, 2020). Domuz ve koyun Neu5Gc miktarı karşılaştırıldığında, domuzlarda koyunlara göre bir çok dokuda daha fazla Neu5Gc sialik asidi bulunmasının (Jahan vd., 2021) sebebinin, koyunlarda farklı varyant ekspresyonlarının fonksiyonel protein miktarını ve buradan yola çıkarak Neu5Gc miktarını azaltması olabileceği düşünülmüştür.

mRNA molekülleri, hem mRNA'nın stabilitesini hem de translasyonun hızını ve aslına uygunluğunu etkileyebilen, geniş ölçüde değişen stabiliteye sahip ikincil yapı elemanları (saplar ve halkalar) oluştururlar (Faure vd., 2016). Kodon kullanım eğiliminin, mRNA ikincil yapısında değişikliklere sebep olduğu, bu nedenle translasyon uzama hızını etkilediği ve translasyon verimliliği ile doğruluğunu düzenlediği bilinmektedir. Eş anlamlı mutasyonların daha önce sessiz olduğu düşünülse de, çok sayıda kanıt kodon kullanımının gen ekspresyon seviyelerini ve protein yapılarını belirlemede önemli roller oynayabileceğini göstermiştir (Bali ve Bebok, 2015; Liu vd., 2021). Çalışmada, üç farklı primer çifti kullanılarak sekanslanan CMAH mRNA dizilerinde toplamda 11 tek nükleotit polimorfizmi bulunmuştur. Polimorfizmlerden 5 tanesinin amino asit değişimine sebep olduğu, 6 tanesinin ise eş anlamlı mutasyona neden olduğu belirlenmiştir. Polimorfizmlerin mRNA katlanmasına olan etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen analizde, referans varyantın mRNA katlanması ile çalışmada tespit edilen polimorfizmleri içeren varyantlar arasında belirgin bir katlanma farkı görülmüştür. Bu durum, polimorfizmlerin translasyonu etkilediği tezinden yola çıkarak, farklı miktarda protein oluşabileceğini ve Neu5Gc sialik asit miktarını etkileyebileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle, çalışmada bulunan ve Neu5Gc miktarıyla ilişkili olabileceği düşünülen polimorfizmleri içeren Varyant 2'nin hem mRNA katlanmasındaki farklılıklar, hem kodon kullanım oranı farklılıkları hem de protein fonksiyonuna etki eden polimorfizmleri içermesi nedeniyle hayvan ıslahı için önemli olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada gerçekleştirilen protein ikincil yapı analizinde referans varyant ile Varyant 2 arasında alfa heliks oranında bir farklılık bulunmazken, beta yaprakçık yüzdesinde az bir düşüş gözlemlenmiştir (sırasıyla %25.55 ve %25.38) .

Beta yaprakçıklar, omurgalarındaki hidrojen bağlarının daha kuvvetli olması nedeniyle alfa heliks yapılarına göre daha kararlıdır (Henzler Wildman vd., 2002). Varyant 2'deki beta yaprakçık yüzdesindeki düşüş, proteinin referans varyant proteinine göre daha az kararlı olabileceğini ve bu durumun Neu5Gc miktarının azalmasına sebep olabileceğini düşündürmüştür.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan, et ve süt ürünleri tüketilen Kıvırcık ve Karacabey Merinos koyun ırklarında ilk kez CMAH mRNA dizisi sekanslanmış ve eksonlardaki polimorfizimler belirlenmiştir. Neu5Gc sialik asit miktarıyla ilişkili olabilecek genotipler ilk kez bu çalışmada aday gösterilmiş ve koyun CMAH geninin farklı mRNA varyantları olduğundan ilk defa bahsedilmiştir. Neu5Gc miktarı düşük bireylerin genotipik olarak seçilmesinin hayvan ıslah çalışmalarında et kalitesini artırmak için önemli bir parametre olacağı ve insan sağlığı açısından Neu5Gc sialik asit miktarı düşük koyun et ve süt ürünlerinin tüketilmesinin oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır.

Bu veriler ışığında gelecekte yapılacak çalışmalarda, aday genotiplerin Neu5Gc miktarıyla ilişkisinin belirlenmesi ve genotip-fenotip korelasyonunun sağlanması amacıyla Neu5Gc miktar tayini yapılması, Türkiye’deki farklı koyun ırklarında ve sığır, keçi gibi çiftlik hayvanlarında da benzer analizlerin gerçekleştirilerek düşük Neu5Gc miktarı olan ırkların belirlenmesi ve alternatif ekleme varyantlarının detaylı analizi için koyun CMAH mRNA’sının bütün eksonları içerecek tek bir amplifikasyonla analiz edilmesi önerilmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abete, I., Romaguera, D., Vieira, A.R., Lopez de Munain, A. and Norat, T.,** 2014, Association between total, processed, red and white meat consumption and all-cause, CVD and IHD mortality: a meta-analysis of cohort studies, *The British journal of nutrition*, 112(5):762–775.
- Aksoy, Y., Çiçek, Ü., Şen, U., Şirin, E., Uğurlu, M., Önenç, A., Kuran, M. and Ulutaş, Z.,** 2019, Meat production characteristics of Turkish native breeds: II. meat quality, fatty acid, and cholesterol profile of lambs, *Archives animal breeding*, 62(1):41–48.
- Alexander, D.D., Weed, D.L., Cushing, C.A. and Lowe, K.A.,** 2011., Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer, *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 20(4):293–307.
- Allen A.M. and Hof A.R.,** 2019, Paying the price for the meat we eat, *Environmental Science and Policy*, 97:90–94.
- Al-Thuwaini, T.M., Al-Shuhaib, M.B.S. and Hussein, Z.M.,** 2020, A novel T177P missense variant in the HSPA8 gene associated with the low tolerance of Awassi sheep to heat stress, *Tropical Animal Health and Production*, 52:2405–2416
- Andrews, P. and Johnson, R.J.,** 2020, Evolutionary basis for the human diet: consequences for human health, *Journal of internal medicine*, 287(3):226-237.
- Angata, T., Nakata, D., Matsuda, T., Kitajima, K. and Troy, F.A.,** 1999, Biosynthesis of KDN (2-Keto-3-deoxy-d-glycero-d-galacto-nononic acid): identification and characterization of A kdn-9-phosphate synthetase activity FROM trout testis, *Journal of Biological Chemistry*, 274(33):22949-22956.
- Anjum, C., Chia, Y.C., Kour, A.K., Adalsteinsson, O., Papacharalampous, M., Zocchi, M.L., and Pan, S.Y.,** 2020, Understanding the presence of xeno-derived Neu5Gc in the human body, and its significance: a review, *Journal of Stem Cell Research & Therapeutics*, 6(2):72-77.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Appleby, P.N., Davey, G.K. and Key, T.J.**, 2002, Hypertension and blood pressure among meat eaters, fish eaters, vegetarians and vegans in EPIC-Oxford. *Public Health Nutrition*, 5:645–654.
- Aune, D., Navarro Rosenblatt, D.A., Chan, D.S., Vieira, A.R., Vieira, R., Greenwood, D.C. and Norat, T.**, 2015, Dairy products, calcium, and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, *The American journal of clinical nutrition*, 101(1):87-117.
- Bali, V. and Bebok, Z.**, 2015, Decoding mechanisms by which silent codon changes influence protein biogenesis and function, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 64:58-74.
- Baltic, M.Z. and Boskovic, M.**, 2015, When man met meat: meat in human nutrition from ancient times till today, *Procedia Food Science*, 5:6-9.
- Banda, K., Gregg, C.J., Chow, R., Varki, N.M. and Varki, A.**, 2012, Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: mechanisms underlying gastrointestinal incorporation of the non-human sialic acid xeno-autoantigen N-glycolylneuraminic acid, *The Journal of biological chemistry*, 287(34):28852–28864.
- Bashir, S., Fezeu, L.K., Leviatan Ben-Arye, S., Yehuda, S., Reuven, E.M., Szabo de Edelenyi, F., Fella-Hebia, I., Le Tourneau, T., Imbert-Marcille, B.M., Drouet, E.B., Touvier, M., Roussel, J.C., Yu, H., Chen, X., Herberg, S., Cozzi, E., Soullillou, J.P., Galan, P. and Padler-Karavani, V.**, 2020, Association between Neu5Gc carbohydrate and serum antibodies against it provides the molecular link to cancer: French NutriNet-Santé study, *BMC medicine*, 18(1):262.
- Basu, S.**, 2015, The transitional dynamics of caloric ecosystems: Changes in the food supply around the world, *Critical Public Health*, 25(3):248-264.
- Basuli, D., Stevens, R.G., Torti, F.M. and Torti, S.V.**, 2014, Epidemiological associations between iron and cardiovascular disease and diabetes, *Frontiers in Pharmacology*, 5:117.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bendl, J., Stourac, J., Salanda, O., Pavelka, A., Wieben, E.D., Zendulka, J., Brezovsky, J. and Damborsky, J.,** 2014, PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations, *PLoS computational biology*, 10(1):e1003440.
- Bergfeld, A.K., Pearce, O.M., Diaz, S.L., Pham, T. and Varki, A.,** 2012, Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: elucidating the intracellular fate of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid, *The Journal of biological chemistry*, 287(34):28865–28881.
- Biesalski, H.K.,** 2005, Meat as a component of a healthy diet—are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?, *Meat Science*, 70(3):509–524.
- Bighignoli, B., Niini, T., Grahn, R.A., Pedersen, N.C., Millon, L.V., Polli, M., Longeri, M. and Lyons, L.A.,** 2007, Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) mutations associated with the domestic cat AB blood group. *BMC genetics*, 8:27.
- Birkiye, M., Atalay, H., Ozturk, N., Ekiz, B., Akin, P.D., and Yilmaz, A.,** 2019, Carcass and meat quality of Karacabey Merino and Kivircik lambs under an intensive finishing system, *South African Journal of Animal Science*, 49(5):790-798.
- Blix, F.G., Gottschalk, A. and Klenk, E.,** 1957, Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids, *Nature*, 179(4569):1088-1088.
- Blix, G., Svennerholm, L. and Werner, I.,** 1952, The isolation of chondrosamine from gangliosides and from submaxillary mucin, *Acta Chemica Scandinavica*, 6:358-362.
- Bond, M.R. and Hanover, J.A.,** 2013, O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease, *Annual review of nutrition*, 33:205-229.
- Bonnet, B., Bouamra-Mechemache, Z., Réquillart, V. and Treich, N.,** 2020, Viewpoint: Regulating meat consumption to improve health, the environment and animal welfare, *Food Policy*, 97:101847.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bruno M., Thomsen M., Pulselli F.M., Patrizi N., Marini M. and Caro D.,** 2019, The carbon footprint of Danish diets, *Climatic Change*, 156(4):489–507.
- Butler, J.R., Martens, G.R., Estrada, J L., Reyes, L.M., Ladowski, J.M., Galli, C., Perota, A., Cunningham, C.M., Tector, M. and Joseph Tector, A.,** 2016, Silencing porcine genes significantly reduces human-anti-pig cytotoxicity profiles: an alternative to direct complement regulation, *Transgenic research*, 25(5):751–759.
- Can, H., Erkunt Alak, S., Köseoğlu, A.E., Şahar, U., Bostanbaş, B., Baydarlı, S., Döşkaya, M. and Ün, C.,** 2021, Molecular characterization of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) gene and frequency of blood types in stray cats of İzmir, Turkey, *BMC genomics*, 22(1):282.
- Chan, D.S., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E. and Norat, T.,** 2011, Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies, *PloS one*, 6(6):e20456.
- Chen, X. and Varki, A.,** 2010, Advances in the biology and chemistry of sialic acids, *ACS Chemical Biology*, 5:163–176.
- Chou, H.H., Hayakawa, T., Diaz, S., Krings, M., Indriati, E., Leakey, M., Paabo, S., Satta, Y., Takahata, N. and Varki, A.,** 2002, Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18):11736–11741.
- Colley, K.J., Kitajima, K. and Sato, C.,** 2014, Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49:498–532.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Cross, A.J., Ferrucci, L.M., Risch, A., Graubard, B.I., Ward, M.H., Park, Y., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A. and Sinha, R.,** 2010, A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association, *Cancer research*, 70(6):2406–2414.
- Dakal, T.C., Kala, D., Dhiman, G., Yadav, V., Krokhotin, A. and Dokholyan, N.V.,** 2017, Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in IL8 gene, *Scientific reports*, 7(1):1-18.
- Dal, N.E.,** 2018, Sialic acid and its role in immune regulation, *Turkish Journal of Immunology*. 6, 75–83.
- Demir, E. and Balcioğlu, M.S.,** 2019, Genetic diversity and population structure of four cattle breeds raised in Turkey using microsatellite markers, *Czech Journal of Animal Science*, 64(10):411-419.
- Demir, E., Karşlı, T. and Balcioğlu, M.S** 2021, A comprehensive review on genetic diversity and phylogenetic relationships among native Turkish cattle breeds based on microsatellite markers, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 45(1):1-10.
- Diaz, S L., Padler-Karavani, V., Ghaderi, D., Hurtado-Ziola, N., Yu, H., Chen, X., Brinkman-Van der Linden, E.C., Varki, A. and Varki, N.M.,** 2009, Sensitive and specific detection of the non-human sialic Acid N-glycolylneuraminic acid in human tissues and biotherapeutic products, *PLoS one*, 4(1):e4241.
- Donaldson, M.S.,** 2004, Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet, *Nutrition Journal*, 3:19
- Ekiz, B., Yilmaz, A., Ozcan, M., Kaptan, C., Hanoglu, H., Erdogan, I. and Yalcintan, H.,** 2009, Carcass measurements and meat quality of Turkish Merino, Ramlic, Kivircik, Chios and Imroz lambs raised under an intensive production system, *Meat science*, 82(1):64-70.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ensembl**, Ovis aries Transcript ENSOART00020014684.1, [https://www.ensembl.org/Ovis\\_aries\\_rambouillet/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSOARG00020009577;t=20:35291773-35339297;t=ENSOART00020014684](https://www.ensembl.org/Ovis_aries_rambouillet/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSOARG00020009577;t=20:35291773-35339297;t=ENSOART00020014684), (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).
- Esen, V.K., Esen, S., Karadağ, O., Önenç, A. and Elmaci, C.**, 2020, Slaughter and carcass characteristics of Kıvırcık, Karacabey Merino, Ramlıç, German Black-Head Mutton× Kıvırcık and Hampshire Down× Merino crossbreed lambs reared under intensive conditions, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 44(6):1155-1163.
- European Commission (EC)**, 2004, Regulation No:835/2004, *Official Journal of European Union*, L139/55.
- Farchi, S., De Sario, M., Lapucci, E., Davoli, M. and Michelozzi, P.**, 2017, Meat consumption reduction in Italian regions: health co-benefits and decreases in GHG emissions, *PloS one*, 12(8).
- Faure, G., Ogurtsov, A.Y., Shabalina, S.A. and Koonin, E.V.**, 2016, Role of mRNA structure in the control of protein folding, *Nucleic acids research*, 44(22):10898–10911.
- Fearon, E.R.**, 2011, Molecular genetics of colorectal cancer, *Annual Review of Pathology*, 6:479–507.
- Ferrante, L. and Fearnside, P.M.**, 2020, The Amazon's road to deforestation, *Science*, 369(6504):634.
- Fischer, K., Rieblinger, B., Hein, R., Sfriso, R., Zuber, J., Fischer, A., Klinger, B., Liang, W., Flisikowski, K., Kurome, M., Zakhartchenko, V., Kessler, B., Wolf, E., Rieben, R., Schwinzer, R., Kind, A. and Schnieke, A.**, 2020, Viable pigs after simultaneous inactivation of porcine MHC class I and three xenoreactive antigen genes GGTA1, CMAH and B4GALNT2, *Xenotransplantation*, 27(1):e12560.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Fliss-Isakov, N., Kariv, R., Webb, M., Ivancovsky, D., Margalit, D. and Zelber-Sagi, S.**, 2018, Mediterranean Dietary Components Are Inversely Associated with Advanced Colorectal Polyps: A Case-Control Study, *World Journal of Gastroenterology*, 24:2617–2627.
- Fogelholm, M., Anderssen, S., Gunnarsdottir, I. and Lahti-Koski, M.**, 2012, Dietary macronutrients and food consumption as determinants of long-term weight change in adult populations: A systematic literature review, *Food and Nutrition Research*, 56:19103.
- Freeze, H.H., Elbein, A.D. and Varki, A.**, 2009, Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 163-173.
- Garcia-Garcia, M.I., Hernandez-Garcia, S., Martinez, A.B., Zapata-Perez, R. and Garcia-Carmona, F.**, 2013, Synthesis of 2-keto-3-deoxy-D-glycero-galactononulosonic acid (KDN) by N-acetyl-D-neuraminic acid aldolase protein aggregates, *The FEBS Journal*, 280:108.
- Garnier, J., Gibrat, J.F. and Robson, B.**, 1996, GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in enzymology*, 266, 540–553.
- GBD 2017 Diet Collaborators**, 2019, Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017, *Lancet*, 393(10184):1958–1972.
- Geiger F., Bengtsson J., Berendse F., Weisser W.W., Emmerson M., Morales M.B. and Inchausti P.**, 2010, Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland, *Basic and Applied Ecolog*, 11(2):97–105.
- Ghaderi, D., Springer, S.A., Ma, F., Cohen, M., Secrest, P., Taylor, R.E., Varki, A. and Gagneux, P.**, 2011, Sexual selection by female immunity against paternal antigens can fix loss of function alleles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43):17743–17748.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Gnoth, M.J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. and Rudloff, S.,** 2000, Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro, *Journal of Nutrition*, 130:3014–3020.
- Godfray, H.C.J., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J.W., Key, T.J., Lorimer, J., Pierrehumbert, R. T., Scarborough, P., Springmann, M. and Jebb, S.A.,** 2018, Meat consumption, health, and the environment, *Science*, 361(6399)
- Gomez-Zavaglia A., Mejuto J.C. and Simal-Gandara J.,** 2020, Mitigation of emerging implications of climate change on food production systems, *Food Research International*, 134.
- González, N., Marquès, M., Nadal, M. and Domingo, J.L.,** 2020, Meat consumption: Which are the current global risks? A review of recent (2010-2020) evidences, *Food research international*, 137:109341.
- Greenberg, D.S. and Soreq, H.,** 2013, Alternative Splicing, Brenner's Encyclopedia of Genetics, Academic Press, 98-97.
- Gromiha, M.M.,** 2010, Protein bioinformatics: from sequence to function, Academic press.
- Guasch-Ferré, M., Satija, A., Blondin, S.A., Janiszewski, M., Emlen, E., O'Connor, L.E., Campbell, W.W., Hu, F.B., Willett, W.C. and Stampfer, M.J.,** 2019, Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials of Red Meat Consumption in Comparison With Various Comparison Diets on Cardiovascular Risk Factors, *Circulation*, 139(15):1828–1845.
- Hayakawa, T., Satta, Y., Gagneux, P., Varki, A. and Takahata, N.,** 2001, Alu-mediated inactivation of the human CMP- N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20):11399–11404.
- Hedlund, M., Padler-Karavani, V., Varki, N.M. and Varki, A.,** 2008, Evidence for a human-specific mechanism for diet and antibody-mediated inflammation in carcinoma progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48):18936–18941.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Hedlund, M., Tangvoranuntakul, P., Takematsu, H., Long, J.M., Housley, G.D., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Wynshaw-Boris, A., Ryan, A.F., Gallo, R.L., Varki, N. and Varki, A., 2007,** N-glycolylneuraminic acid deficiency in mice: implications for human biology and evolution, *Molecular and cellular biology*, 27(12):4340–4346.
- Henzler Wildman, K.A., Lee, D.K. and Ramamoorthy, A., 2002,** Determination of alpha-helix and beta-sheet stability in the solid state: a solid-state NMR investigation of poly(L-alanine), *Biopolymers*, 64(5):246–254.
- Higgs, J.D., 2000,** The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality, *Trends in Food Science & Technology*, 11(3):85–95.
- Iqbal, S., Pérez-Palma, E., Jespersen, J.B., May, P., Hoksza, D., Heyne, H.O., Ahmed, S. S., Rifat, Z. T., Rahman, M. S., Lage, K., Palotie, A., Cottrell, J. R., Wagner, F. F., Daly, M. J., Campbell, A. J. and Lal, D., 2020.,** Comprehensive characterization of amino acid positions in protein structures reveals molecular effect of missense variants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(45):28201–28211.
- IPCC, 2019,** Climate change and land: An IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems, *Research Handbook on Climate Change and Agricultural Law*, 423-449.
- Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Suzuki, A., 1998,** The Molecular Basis for the Absence of N-Glycolylneuraminic Acid in Humans, *Journal of Biological Chemistry*, 273(25):15866-15871.
- Ito, T., Suzuki, Y., Suzuki, T., Takada, A., Horimoto, T., Wells, K., Kida, H., Otsuki, K., Kiso, M., Ishida, H. and Kawaoka, Y., 2000,** Recognition of N-glycolylneuraminic acid linked to galactose by the alpha2,3 linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks, *Journal of virology*, 74(19):9300–9305.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Jahan, M., Thomson, P.C., Wynn, P.C. and Wang, B.**, 2021, The non-human glycan, N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc), is not expressed in all organs and skeletal muscles of nine animal species, *Food chemistry*, 343:128439.
- Katare, B., Wang, H.H., Lawing, J., Hao, N., Park, T. and Wetzstein, M.**, 2020, Toward Optimal Meat Consumption, *American Journal of Agricultural Economics*, 102(2):662-680.
- Kehl, A., Heimberger, K., Langbein-Detsch, I., Boehmer, S., Raj, K., Mueller, E., and Giger, U.**, 2018, Molecular characterization of blood type A, B, and C (AB) in domestic cats and a CMAH genotyping scheme, *PloS one*, 13(9): e0204287.
- Klenk, E.**, 1941, Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipoids, *Biological Chemistry*, 268:50-58.
- Koyuncu, M.**, 2008, Growth performance and carcass quality of fattening lambs of Kivircik and Karacabey Merino breeds, *Bone*, 22:23-3.
- Lăcătușu, C.M., Grigorescu, E.D., Floria, M., Onofriescu, A. and Mihai, B.M.**, 2019, The mediterranean diet: From an environment-driven food culture to an emerging medical prescription. *International journal of environmental research and public health*, 16(6), 942.
- Leonard, W.R.**, 2002, Dietary change was a driving force in human evolution, *Scientific American*, 287:106-16.
- Leonard, W.R., Snodgrass J.J. and Robertson, M.L.**, 2007, Effects of brain evolution on human nutrition and metabolism, *Annual Review of Nutrition*, 27:311-27.
- Leroy, F. and Praet, I.**, 2015, Meat traditions. The co-evolution of humans and meat, *Appetite*, 90:200-11.12.
- Li, Y. and Chen, X.**, 2012, Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94:887–905.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, Y., Yang, Q. and Zhao, F.**, 2021, Synonymous but Not Silent: The Codon Usage Code for Gene Expression and Protein Folding, *Annual review of biochemistry*, 90:375–401.
- Lundblad, A.**, 2015, Gunnar Blix and his discovery of sialic acids. Fascinating molecules in glycobiology, *Upsala journal of medical sciences*, 120(2):104–112.
- Mann, N.**, 2007, Meat in the human diet: An anthropological perspective, *Nutrition and Dietetics*, 64:4.
- McEvoy, C.T., Temple, N. and Woodside, J.V.**, 2012, Vegetarian diets, low-meat diets and health: A review, *Public Health Nutrition*, 15:2287–2294.
- McHenry, H.M. and Coffing, K.**, 2000, Australopithecus to Homo: transformations in body and mind, *Annual Review of Anthropology*, 29:125–46
- Merrick, J.M., Zadarlik, K. and Milgrom, F.**, 1978, Characterization of the Hanganutziu-Deicher (serum-sickness) antigen as gangliosides containing N-glycolylneuraminic acid, *International Archives of Allergy and Immunology*, 57(5):477-480.
- Milford, A.B., Le Mouël, C., Bodirsky, B.L. and Rolinski, S.**, 2019, Drivers of meat consumption, *Appetite*, 141:104313.
- Mozaffarian, D.**, 2016, Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review, *Circulation*, 133:187–225
- Muchmore, E.A., Diaz, S. and Varki, A.**, 1998, A structural difference between the cell surfaces of humans and the great apes, *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 107(2):187-198.
- NCBI**, LOC101106806—cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (Ovis aries) Transcripts, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/tables/genes/?table\\_type=transcripts&key=a3ee2d3306fa629106b26f445494daa8](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/tables/genes/?table_type=transcripts&key=a3ee2d3306fa629106b26f445494daa8) (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- NCBI, inactive cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-like Ovis aries, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP\\_027814438.1?report=genpept](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_027814438.1?report=genpept), (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).
- Notarnicola B., Tassielli G., Renzulli P.A., Castellani V. and Sala S.**, 2017, Environmental impacts of food consumption in Europe, *Journal of Cleaner Production*, 140:753–765.
- OECD.**, 2021, Meat consumption (indicator), <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>, (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).
- Okerblom, J. and Varki, A.**, 2017, Biochemical, cellular, physiological and pathological consequences of human loss of N-glycolylneuraminic acid, *Chembiochem*. 18:1155–1171.
- Omi, T., Nakazawa, S., Udagawa, C., Tada, N., Ochiai, K., Chong, Y. H., Kato, Y., Mitsui, H., Gin, A., Oda, H., Azakami, D., Tamura, K., Sako, T., Inagaki, T., Sakamoto, A., Tsutsui, T., Bonkobara, M., Tsuchida, S., and Ikemoto, S.**, 2016, Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System, *PloS one*, 11(10):e0165000.
- Özen, D.**, 2019, Modeling and Forecasting Meat Consumption per Capita in Turkey, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* , 16 (2):122-129.
- Padler-Karavani, V., Hurtado-Ziola, N., Pu, M., Yu, H., Huang, S., Muthana, S., Chokhawala, H.A., Cao, H., Secrest, P., Friedmann-Morvinski, D., Singer, O., Ghaderi, D., Verma, I. M., Liu, Y.T., Messer, K., Chen, X., Varki, A. and Schwab, R.**, 2011, Human xeno-autoantibodies against a non-human sialic acid serve as novel serum biomarkers and immunotherapeutics in cancer, *Cancer research*, 71(9):3352–3363.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Padler-Karavani, V., Yu, H., Cao, H., Chokhawala, H., Karp, F., Varki, N., Chen, X. and Varki, A.** 2008, Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease, *Glycobiology*, 18(10):818–830.
- Pan, A., Sun, Q., Bernstein, A.M., Manson, J.E., Willett, W.C. and Hu, F.B.,** 2013, Changes in red meat consumption and subsequent risk of type 2 diabetes mellitus: three cohorts of US men and women, *JAMA internal medicine*, 173(14):1328–1335.
- Pan, A., Sun, Q., Bernstein, A.M., Schulze, M.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Willett, W.C. and Hu, F.B.,** 2012, Red meat consumption and mortality: results from 2 prospective cohort studies, *Archives of internal medicine*, 172(7):555–563.
- Pereira, P.M. and Vicente, A.F.,** 2013, Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet, *Meat Science*, 93(3):586-92.
- Peri, S., Kulkarni, A., Feyertag, F., Berninsone, P.M., and Alvarez-Ponce, D.,** 2018, Phylogenetic Distribution of CMP-Neu5Ac Hydroxylase (CMAH), the Enzyme Synthetizing the Proinflammatory Human Xenoantigen Neu5Gc, *Genome biology and evolution*, 10(1), 207–219.
- Plummer, T.,** 2004, Flaked stones and old bones: biological and cultural evolution at the dawn of technology, *American Journal of Physical Anthropology*, 125:118-64.
- Ripple, W.J., Smith, P., Haberl, H., Montzka, S.A., McAlpine, C. and Boucher, D.H.,** 2014, Ruminants, climate change and climate policy, *Nature climate change*, 4(1):2-5.
- Sabaté J., Sranacharoenpong K., Harwatt H., Wien M. and Soret S.,** 2015, The environmental cost of protein food choices, *Public Health Nutrition*, 18(11):2067–2073.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sallam, A.M.**, 2021, A missense mutation in the coding region of the toll-like receptor 4 gene affects milk traits in Barki sheep, *Animal bioscience*, 34(4):489–498.
- Salter, A.M.**, 2018 The effects of meat consumption on global health, *Scientific and Technical Review*, 37(1):45-53.
- Samraj, A.N., Läubli, H., Varki, N. and Varki, A.**, 2014, Involvement of a non-human sialic Acid in human cancer, *Frontiers in oncology*, 4:33.
- Samraj, A.N., Pearce, O.M., Läubli, H., Crittenden, A.N., Bergfeld, A.K., Banda, K., Gregg, C.J., Bingman, A.E., Secrest, P., Diaz, S L., Varki, N.M. and Varki, A.**, 2015, A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(2):542–547.
- Sato, C. and Kitajima, K.**, 2013, Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease, *Journal of Biochemistry*, 154:115–136.
- Schauer, R. and Kamerlin, J.P.**, 2018, Exploration of the sialic acid world., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Elsevier press, 1–148.
- Schauer, R., Schoop, H. J. and Faillard, H.**, 1968, On biosynthesis of the glycolyl groups of N-glycolylneuraminic acid. Oxidative conversion of N-acetyl groups to glycolyl groups, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 349(5):645–652.
- Schauer, R., Srinivasan, G.V., Coddeville, B., Zanetta, J.P. and Guérardel, Y.**, 2009, Low incidence of N-glycolylneuraminic acid in birds and reptiles and its absence in the platypus, *Carbohydrate research*, 344(12):1494–1500.
- Schoop, H.J., Schauer, R. and Faillard, H.**, 1969, On the biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid. Oxidative formation of N-glycolylneuraminic acid from N-acetylneuraminic acid, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 350:155–162.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Simakov, O., Kawashima, T., Marlétaz, F., Jenkins, J., Koyanagi, R., Mitros, T., Hisata, K., Bredeson, J., Shoguchi, E., Gyoja, F., Yue, J.X., Chen, Y.C., Freeman, R.M., Jr, Sasaki, A., Hikosaka-Katayama, T., Sato, A., Fujie, M., Baughman, K.W., Levine, J., Gonzalez, P. and Gerhart, J.,** 2015, Hemichordate genomes and deuterostome origins, *Nature*, 527(7579):459–465.
- Song, M., Fung, T.T., Hu, F.B., Willett, W.C., Longo, V.D., Chan, A.T. and Giovannucci, E.L.,** 2016, Association of Animal and Plant Protein Intake With All-Cause and Cause-Specific Mortality, *JAMA internal medicine*, 176(10):1453–1463.
- Speth, J.D.,** 1989, Early hominid hunting and scavenging: The role of meat as an energy source, *Journal of Human Evolution*, 18:329–43.
- Springer, S.A., Diaz, S.L. and Gagneux, P.,** 2014. Parallel evolution of a self-signal: humans and new world monkeys independently lost the cell surface sugar Neu5Gc, *Immunogenetics*, 66(11):671–674
- Stothard, P.,** 2000, The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences, *Biotechniques*, 28:1102-1104.
- TAGEM,** 2009, Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları Tanıtım Kataloğu, <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/Katalog%20T%C3%BCrk%C3%A7e.pdf> (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S.,** 2021, MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11, *Molecular biology and evolution*, 38(7):3022-3027.
- Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., and Muchmore, E.,** 2003, Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21):12045–12050.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tao, F., Zhang, Y.N., Ma, C.Q. and Xu, P.**, 2010, Biotechnological production and applications of N-acetyl-d-neuraminic acid: current state and perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87:1281–1289.
- TC Tarım ve Orman Bakanlığı**, Küçükbaş Hayvancılık, Koyun Yetiştiriciliği, Yerli koyun ırkları, <https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Belgeler/Hayvanc%C4%B1%C4%B1k/K%C3%BC%C3%A7%C3%BCkba%C5%9F%20Hayvanc%C4%B1%C4%B1k/Koyun%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi/2020%20YILI/Yerli+Koyun+Irkleri.pdf> (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).
- The World Counts**, 2022, Consumption-Food and beverages-Tons of meat eaten, <https://www.theworldcounts.com/challenges/consumption/foods-and-beverages/world-consumption-of-meat/story>, (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).
- Torres Stone, R.A., Waring, M.E., Cutrona, S.L., Kiefe, C.I., Allison, J. and Doubeni, C.A.**, 2017, The Association of Dietary Quality with Colorectal Cancer among Normal Weight, Overweight and Obese Men and Women: A Prospective Longitudinal Study in the USA, *BMJ Open*, 7:e015619.
- Traving, C. and Schauer, R.**, 1998, Structure, function and metabolism of sialic acids, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54, 1330–1349.
- TUİK**, 2020, Kırmızı Et Üretim İstatistikleri, <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kirmizi-Et-Uretim-Istatistikleri-IV.-Ceyrek:-Ekim---Aralik,-2019-33680#:~:text=T%C3%9C%C4%B0K%20Kurumsal&text=Toplam%20k%C4%B1rm%C4%B1z%C4%B1%20et%20%C3%BCretimi%20bir,469%20ton%20olarak%20tahmin%20edildi>. (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).
- TUİK**, 2022a, Hayvansal Üretim İstatistikleri, <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Aralik-2021-45593> (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).
- TUİK**, 2022b, Kümes Hayvancılığı Üretimi, <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kumes-Hayvanciligi-Uretim-Aralik-2021-45689> (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Våge, D.I., Husdal, M., Kent, M.P., Klemetsdal, G. and Boman, I.A.**, 2013, A missense mutation in growth differentiation factor 9 (GDF9) is strongly associated with litter size in sheep, *BMC genetics*, 14,:1.
- Varki, A.**, 2009, Multiple changes in sialic acid biology during human evolution, *Glycoconjugate Journal*, 26(3):231–245.
- Varki, A.**, 2010, Colloquium paper: Uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2):8939–8946.
- Varki, N.M. and Varki, A.**, 2007, Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 87(9):851–857.
- Varki, N.M., Strobert, E., Dick Jr., E.J., Benirschke, K. and Varki, A.**, 2011, Biomedical differences between human and nonhuman hominids: potential roles for uniquely human aspects of sialic acid biology. *Annual Review of Pathology*, 6:365–393.
- Veeramani A., Dias G.M. and Kirkpatrick S.I.**, 2017, Carbon footprint of dietary patterns in Ontario, Canada: A case study based on actual food consumption, *Journal of Cleaner Production*, 162:1398–1406.
- Wang, W.J. and Crompton, R.H.**, 2004, The role of load-carrying in the evolution of modern body proportions, *Journal of Anatomy*, 204:417–30.
- WCRF**, 2022, Worldwide Cancer Data, <https://www.wcrf.org/dietandcancer/worldwide-cancer-data/>, (Erişim Tarihi: 10 Şubat 2022).
- WHO**, 2015, IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat, [https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/pr240\\_E.pdf](https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/pr240_E.pdf) (Erişim Tarihi: 26 Şubat 2022).
- WHO**, 2022, Cancer, [www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer), (Erişim Tarihi: 10 Şubat 2022).

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Wiseman, M.**, 2008., The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective, *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(3):253–256.

**Zuker, M.**, 2003, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Research*, 31 (13):3406-15.



## TEŞEKKÜR

Doktora sürecinde bilime ve yaşama dair eşsiz paylaşımlarda bulunduğum, felsefesiyle bilimsel yolculuğuma ışık tutan, danışman hocam Prof. Dr. Cemal ÜN'e,

Berber çalışıp birlikte üretmekten çok mutlu olduğum, bu süreçteki birikimime çok büyük katkıları olan arkadaşım ve hocam Doç. Dr. Hüseyin CAN'a,

Tezin örneklerinin alınması ve projenin tamamlanmasında büyük katkısı olan Doç. Dr. Yalçın YAMAN'a

Tez çalışmalarım için laboratuvar imkanlarını sunan Doç. Dr. Mert Döşkaya'ya ve tezi tamamlama sürecinde manevi desteğini her zaman hissettiğim Ege Üniversitesi Aşı Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı ekibine,

Tez çalışmasının maddi desteğini sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP;17-FEN-020),

Bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan, bu ünvanı almamı hasretle bekleyen ancak maalesef şu an aramızda olmayan anneannem İlkay BOLCAN'a, koşulsuz sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim ve minnettar olduğum annem Pembe ERKUNT ve babam Şükrü ERKUNT'a, başarılarımla her zaman gurur duyan ve her koşulda yanımda olan ağabeyim Çağın ERKUNT'a, varlığıyla hayatımı anlamlandıran ve bu süreçte en büyük motivasyon kaynağım olan yeğenim Ezra ERKUNT'a,

Sürecin her aşamasında beni motive eden, desteğini her zaman hissettiğim eşim, yol arkadaşım Özgür ALAK'a,

Ve bu uzun yolculuğu tamamlamayı başarabildiğim için kendime çok teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

### Yayın Listesi

#### SCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Karakavuk, M., Can, H., Karakavuk, T., Gül, A., **Erkunt Alak, S.**, Gül, C., Ün, C., Gürüz, A. Y., Döşkaya, M., & Döşkaya, A. D. (2022). Rapid detection of *Toxoplasma gondii* DNA in cat feces using colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays targeting RE and B1 genes. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 81, 101745. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101745>
2. Can, H., Aksoy Gökmen, A., Döşkaya, M., **Erkunt Alak, S.**, Değirmenci Döşkaya, A., Karakavuk, M., Köseoğlu, A. E., Karakavuk, T., Gül, C., Güvendi, M., Gül, A., Gürüz, A. Y., Kaya, S., Mercier, A., & Ün, C. (2022). Development of a new serotyping ELISA for *Toxoplasma gondii* type II, type III and Africa 1 lineages using in silico peptide discovery methods, well categorized feline and human outbreak serum samples. *BMC infectious diseases*, 22(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07088-w>
3. Köseoğlu, A. E., Can, H., Güvendi, M., **Erkunt Alak, S.**, Kandemir, Ç., Taşkın, T., Demir, S., Akgül, G., Değirmenci Döşkaya, A., Karakavuk, M., Döşkaya, M., Gürüz, A. Y., & Ün, C. (2021). Molecular investigation of bacterial and protozoal pathogens in ticks collected from different hosts in Turkey. *Parasites & vectors*, 14(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04779-2>
4. Karakavuk, M., Can, H., Döşkaya, M., Karakavuk, T., **Erkunt-Alak, S.**, Köseoğlu, A. E., Gül, A., Ün, C., Gürüz, Y., & Değirmenci-Döşkaya, A. (2021). Cryptosporidiosis outbreak on a dairy farm: Detection of *Cryptosporidium parvum* as a causative agent in the water source. *Polish journal of veterinary sciences*, 24(3), 323–333. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2021.137669>

5. Karabey, M., Can, H., Öner, T. Ö., Döşkaya, M., **Erkunt Alak, S.**, Döşkaya, A. D., Karakavuk, M., Köseoğlu, A. E., Ün, C., Gürüz, A. Y., Alacacioğlu, A., Pektaş, B., Gül, A., Kaya, S., & Gökmen, A. A. (2021). Cryptosporidium spp. during chemotherapy: a cross-sectional study of 94 patients with malignant solid tumor. *Annals of Saudi medicine*, 41(5), 293–298. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2021.293>
6. Karakavuk, M., Can, H., Gül, A., Döşkaya, A. D., **Erkunt Alak, S.**, Ün, C., Gürüz, A. Y., & Döşkaya, M. (2021). GRA8 DNA vaccine formulations protect against chronic toxoplasmosis. *Microbial pathogenesis*, 158, 105016. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105016>
7. Can, H., Köseoğlu, A. E., **Erkunt Alak, S.**, Güvendi, M., Ün, C., Karakavuk, M., Değirmenci Döşkaya, A., Aykur, M., Aksoy Gökmen, A., Gürüz, A. Y., & Döşkaya, M. (2021). Molecular prevalence and subtyping of Blastocystis sp. isolates in stray cats of İzmir, Turkey: First report of "ST4 allele 42" in cats. *Polish journal of veterinary sciences*, 24(2), 217–223. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2021.137656>
8. Can, H., **Erkunt Alak, S.**, Köseoğlu, A. E., Şahar, U., Bostanbaş, B., Baydarlı, S., Döşkaya, M., & Ün, C. (2021). Molecular characterization of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) gene and frequency of blood types in stray cats of İzmir, Turkey. *BMC genomics*, 22(1), 282. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07588-0>
9. Can, H., Köseoğlu, A.E., **Erkunt Alak, S.** Güvendi, M., Döşkaya, M., Karakavuk, M., Gürüz, A.Y., Ün, C. (2020). In silico discovery of antigenic proteins and epitopes of SARS-CoV-2 for the development of a vaccine or a diagnostic approach for COVID-19. *Sci Rep* 10, 22387 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79645-9>
10. Can, H., **Erkunt Alak, S.**, Köseoğlu, A. E., Döşkaya, M., & Ün, C. (2020). Do Toxoplasma gondii apicoplast proteins have antigenic potential? An in silico

study. *Computational biology and chemistry*, 84, 107158.  
<https://doi.org/10.1016/j.combiolchem.2019.107158>

11. **Erkunt Alak, S.**, Köseoğlu, A. E., Kandemir, Ç., Taşkın, T., Demir, S., Döşkaya, M., Ün, C., & Can, H. (2020). High frequency of knockdown resistance mutations in the para gene of cat flea (*Ctenocephalides felis*) samples collected from goats. *Parasitology research*, 119(7), 2067–2073.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06714-3>

12. Demir, S., **Erkunt Alak, S.**, Köseoğlu, A. E., Ün, C., Nalçacı, M., & Can, H. (2020). Molecular investigation of *Rickettsia* spp. and *Francisella tularensis* in ticks from three provinces of Turkey. *Experimental & applied acarology*, 81(2), 239–253. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00498-y>

13. Alsayed, O., Erkunt Alak, S., & Ün, C. (2019). Analysis of prion protein coding gene polymorphisms in Palestinian native sheep breeds. *Ankara Univ Vet Fak Derg.*

### **Diğer Dergilerde Yayınlanan Makaleler**

1. Karakavuk M., Can H., Karakavuk T., Gül C., **Erkunt Alak S.**, Gül A., Değirmenci Döşkaya A., Ün C., Gürüz A. Y., Döşkaya M. (2021). *Toxoplasma gondii* 529 baz çifti büyüklüğünde tekrar bölgesine (RE) özgü hızlı döngü aracılı izotermal amplifikasyon testinin geliştirilmesi ve analitik hassasiyetinin belirlenmesi. *Ege Tıp Dergisi*. 60(3): 269-273.

2. Karakavuk, M., Selim, N., Yeşilsiraz, B., Atlı, E., Özdemir, H., Alan, N., Yalçın, M., Özkurt, O., Aras, M., Çelik, T., Can, Ş., Değirmenci Döşkaya, A., Köseoğlu, A., **Erkunt Alak, S.**, Karakavuk, T , Ün, C., Gürüz, A., Döşkaya, M., Can, H. (2021). Prevalence of Gastrointestinal Parasites in Stray Cats of İzmir. *Animal Health Production and Hygiene*, 10(1),6-11.  
<https://dergipark.org.tr/en/pub/aduveterinary/issue/62765/889378>

## Projeler

1. 'Toxoplasma gondiinin her üç dönemine etkili DNA ve rekombinant protein aşı stratejisinin geliştirilmesi' Araştırmacı, Ege Üniversitesi BAP, Proje No: TOA-2021-22890
2. 'COVID-19'a Karşı Hızlı DNA Aşısı Geliştirilmesi' COVID-19 Türkiye Platformu, TÜBİTAK 1004, STAR Bursiyeri, Proje No: 18AG020
3. "Kedi Örneklerinde Toxoplasma gondii Hızlı LAMP Testinin geliştirilmesi ve Hassasiyetinin Belirlenmesi" Araştırmacı, Ege Üniversitesi BAP, Proje No: TGA-2020-22182
4. 'Türkiyeden toplanmış kenelerde Theileria spp Babesia spp Hepatozoon canis Anaplasma spp Borreliella burgdorferi ve Bartonella sp varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile araştırılması' Araştırmacı, Ege Üniversitesi BAP, Proje No: TGA-2020-21040.
5. 'Kedilerde Kan Gruplarını Belirleyen Sitidin Monofosfat-N-Asetilnöraminik Asit Hidroksilaz (CMAH) Geninin Moleküler Karakterizasyonu ve Neu5Ac-Neu5Gc Molekülleri ile İlişkisinin Analizi' Bursiyer, TÜBİTAK 1002, Proje No: 218Z105
6. 'Keçilerde Enfestasyona Sebep Olan Pirelerin Moleküler Yöntemler İle Tayini Vektörlüklerinin ve İnsektisit Direnci ile İlişkili Mutasyonlarının Araştırılması' Araştırmacı, Ege Üniversitesi BAP, Proje No: TGA-2019-20233
7. 'Koyunlarda, CMAH Geninin Neu5Gc Sialik Asidiyle İlişkisinin Araştırılması' Doktora Projesi, Ege Üniversitesi BAP / Proje No: 17-FEN-20
8. 'Alzheimer hastalarında ABCA7 geninin 44-base pair deletion (rs142076058) frekansını araştırılması.' Araştırmacı, Ege Üniversitesi BAP, Proje No: 17-FEN-046

**Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster ve Sözlü Bildiri**

### Sözlü

1. **Erkunt Alak, S.**, ‘Genomdan Başlayan Antijen Keşfi: Revers Vaksinoloji’ 22. Uluslararası Parazitoloji Kongresi, 2021/Aydın
2. **Erkunt-Alak, S.**, Köseoğlu, A.E., Kandemir, Ç., Taşkın, T., Demir, S., Döşkaya, M., Ün, C., Can, H., ‘Investigation of Pyrethroid Resistance Prevalence in Flea Samples Collected From Goat, Izmir, Turkey.’ 4th National - 1st International Sheep and Goat Health and Management Congress 2019/Kuzey Kıbrıs
3. **Erkunt, S.**, Yaman, Y., Ün, C., ‘Breeding Farm Animals for Prion Diseases Resistance as Preventive Medicine.’ 10th International Animal Science Conference 2018/Antalya
4. **Erkunt S.**, Altındış, N., Koseoglu, A.E., Ün, C., ‘Use of miRNA in struggling of Varroa parasite.’ 10th International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics, METU 2017/Kuzey Kıbrıs

### Poster

1. Döşkaya, M., Güll, A., **Erkunt Alak, S.**, Can, H., Karakavuk, M., Köseoğlu, A.E., Karakavuk, T., Gül, C., Ün, C., Gürüz, A.Y., Yılmaz H., Karasulu E., Tekin, Ş., Değirmenci Döşkaya, A., ‘Administration of Four Different COVID-19 pcDNA 3.1 DNA Vaccine Prototypes Using Intradermal Electroporation and Assessment of Their Immunogenicity in BALB/c mouse’ ISV Annual Virtual Congress, 2021
2. Döşkaya, M., Can, H., Korukluoğlu, G., Altaş, A.B., Pullukçu, H., Kenanoğlu, O.B., Karakavuk, M., **Erkunt Alak, S.**, Güll, A., Değirmenci Döşkaya, A., Karakavuk, T., Gül, C., Çiçek, C., Taşbakan, M.S., Çinkooğlu, A., Ün, C., Gürüz, A.D., Avcı, M., Karasulu E., Tekin, Ş., Işıkgöz Taşbakan, M., ‘Importance of IFN-λ1 levels in COVID-19 patients and implications on vaccine efficacy against SARS-CoV-2’ ISV Annual Virtual Congress, 2021

3. Can, H., **Erkunt-Alak, S.**, Köseoğlu, A.E., Kandemir, Ç., Taşkın, T., Demir, S., Döşkaya, M., Ün, C., 'Investigation of Rickettsia spp. in Flea Samples Collected From Goat, Izmir, Turkey.' 4th National - 1st International Sheep and Goat Health and Management Congress 2019/Kuzey Kıbrıs
4. Can, H., **Erkunt-Alak, S.**, Köseoğlu, A.E., Döşkaya, M., Ün, C., 'An In Silico Detection For Antigenic Potential Of Toxoplasma Gondii Apicoplast Proteins.' The 12th International Symposium On Health Informatics And Bioinformatics 2019/İzmir
5. Köseoğlu, A.E., Can, H., **Erkunt-Alak, S.**, Demir, S., Ün, C., 'Investigation Of Polymorphisms On Ompb Gene Of Rickettsia Aeschlimannii Strains Isolated From Tick Samples In Turkey And Their Effects On Ompb Protein.' The 12th International Symposium On Health Informatics And Bioinformatics 2019/İzmir
6. Alsayed, O., **Erkunt-Alak, S.**, Ün, C., Detection of Scrapie Related PRNP Polymorphisms in Palestinian Sheep Breeds Assaf and Awassi. 10th International Animal Science Conference 2018/Antalya