

**FARKLI YAŞLARDAKİ GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI
(*Oncorhynchus mykiss*)’NDA MYOSTATİN GENİNİN
KANTİTATİF ANALİZİ**

Özlem ANGİŞ

**Yüksek lisans Tezi
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN
2007**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI YAŞLARDAKİ GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI
(*Oncorhynchus mykiss*)’NDA MYOSTATİN GENİNİN KANTİTATİF
ANALİZİ

Özlem ANGİŞ

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2007

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI YAŞLARDAKİ GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI (*Oncorhynchus mykiss*)’NDA MYOSTATİN GENİNİN KANTİTATİF ANALİZİ

Özlem ANGİŞ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN

Gelişme ve farklılaşma faktörü-8 (GDF-8) olarak da bilinen myostatin (MSTN), son zamanlarda keşfedilmiş olup balıkta kas gelişimini engelleyen bir gendir. Bu araştırmada 8, 18 ve 36 aylık gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)’nda myostatin geninin ekspresyonuna bakılmıştır. Balıkların dokularından totalRNA izole edilerek cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve PCR yapılmıştır. Araştırma sonucunda 8 ve 18 aylık gökkuşağı alabalıklarında myostatin geninin eksprese olmadığı, 36 aylık gökkuşağı alabalığında ise myostatin geninin eksprese olduğu bulunmuştur.

2007, 41 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Oncorhynchus mykiss*, Myostatin, PCR, GDF-8

ABSTRACT

Master Thesis

MYOSTATIN GENE QUANTITATIVE ANALYSIS IN THE DIFFERENT AGE OF RAINBOW TROUTS (*Oncorhynchus mykiss*)

Özlem ANGIŞ

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

GDF-8 (Growth Differentiation Factor-8) is known myostatin that a recently discovered gene that inhibits muscle growth in fish. In this research; myostatin gene expression was investigated in the 8, 18 and 36 months old rainbow trouts. By isolating totalRNA in fish tissue cDNA was composed and done PCR. According to the results of study, while myostatin gene was not expressed in the 8 and 18 months old rainbow trouts, this gene was expressed in the 36 months old rainbow trout.

2007, 41 pages

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, Myostatin, PCR, GDF-8

TEŞEKKÜR

Çalışmanın araştırma konusunun belirlenip planlanması ve yürütülmesinde bana yol gösterip her türlü desteği sağlayan danışmanım, çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Orhan ERDOĞAN'a,

Bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Telat YANIK başta olmak üzere Ziraat Fakültesi Su Ürünleri bölümü elemanlarına, balık materyali temininden dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. E. Mahmut KOCAMAN'a, arkadaşlarıma,

Çalışmalarım sırasında bana maddi ve manevi destek olan ailemin tüm bireylerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özlem ANGIŞ

Ağustos 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
3.MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Primer materyali.....	17
3.1.2. Balık materyali.....	17
3.1.3. Analizlerde kullanılan alet ve cihazlar	18
3.1.4. Analizlerde kullanılan kimyasallar	18
3.1.5. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	19
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Primer dizaynı	19
3.2.2. Total RNA izolasyonu	20
3.2.2.a. Total RNA izolasyon prosedürü.....	20
3.2.2.b. Spektrofotometrik ölçümlerin yapılması.....	21
3.2.2.c. Total RNA 'ların elektroforezde yürütülmesi.....	22
3.2.3. cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması.....	22
3.2.3.a. cDNA Kütüphanesinin Prosedürü.....	22
3.2.4. PCR'ın Yapılması.....	24
3.2.4.a. PCR için Gerekli Olan Kimyasallar.....	24
3.2.4.b. MSTN için gradientli PCR protokolü	24
3.2.4.c. Aktin için PCR Protokolü.....	25
3.2.5. PCR Ürünlerinin Elektroforezde Yürütülmesi.....	25
3.2.5.a. Jelin Hazırlanması.....	26
3.2.5.b. Örneklerin Yürütülmesi.....	26

3.2.6. Jellerin görüntülenmesi	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	27
4.1. Total RNA'nın spektrofotometrik ölçümlerinin analizi.....	27
4.2. Total RNA'nın elektroforez görüntüsü	27
4.3. cDNA'nın spektrofotometrik ölçümlerinin analizi	28
4.4. Myostatin PCR elektroforez görüntüsü.....	29
4.7. Aktinin PCR elektroforez görüntüsü.....	33
4.8. Yaşlara göre myostatinin ekspresyon grafiği	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	35
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.2.	Total RNA'nın elektroforez görüntüsü	28
Şekil 4.4.	8 aylık gökkuşağı alabalığının myostatinin PCR elektroforez jel görüntüsü	30
Şekil 4.5.	18 aylık gökkuşağı alabalığının myostatinin PCR elektroforez jel görüntüsü	31
Şekil 4.6.	36 aylık gökkuşağı alabalığının myostatinin PCR elektroforez jel görüntüsü	32
Şekil 4.7.	Sırasıyla 8, 18 ve 36 aylık gökkuşağı alabalıklarında aktinin PCR elektroforez jel görüntüsü	33
Şekil 4.8.	MSTN'nin yaşlara göre kantitatif mRNA seviyeleri.....	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.	8, 18 ve 36 aylık balıkların totalRNA absorbans ölçüm sonuçları...	27
Çizelge 4.3.	8, 18 ve 36 aylık balıkların cDNA absorbans ölçüm sonuçları	29

1. GİRİŞ

Yeryüzünde iki milyonun üzerinde canlı türü yaşamaktadır. Bu canlı türlerinin birbirine benzer ve farklı özellikleri bulunur. Hatta bir türün tüm bireylerinde de benzer ve farklı özellikler bulunabilmektedir. Bu durumun temelinde bireylerin kalıtsal maddesi olan genler rol oynar (Anonim 2006a). Gen bir proteine karşılık gelen DNA dizisidir (Anonim 2006b). Kalıtımın işlevsel birimi olan genler DNA molekülü üzerindeki nükleotid dizileridir (Anonim 2006a). Diğer bir ifade ile canlıların her türlü özelliklerini belirleyen ve hücre çekirdeğindeki kromozomlarda bulunan kalıtım maddesinin en küçük birimidir (Anonim 2006c).

Genleri ve onların fonksiyonlarını ya da bozukluklarını inceleyen bilim dalına genetik denir (Anonim 2006a). Genetik bilimi özellikle son yıllarda insan genom projesinin de tamamlanmasıyla birlikte giderek daha popüler olmaya başlamıştır (Attar *et al.* 2001). Bugün, genetik bilimi sayesinde birçok hastalığın erken teşhisi mümkün olabilmekte, bunun yanında tedavi metotlarının gelişiminde oldukça faydalı olmaktadır (Anonim 2007a). Genetik biliminde son yıllarda yapılan çalışmalarla canlılar için son derece önemli olan yeni genler bulunmuştur. Bu genlerden birisi de GDF-8 olarak da bilinen myostatin (MSTN) genidir.

Myostatin geni, 1997 yılında myostatin geninden yoksun olan mutant farelerinin bir ırkını üreten McPherron ve Se Jin Lee tarafından bulunmuştur. Bu mutant fareler normal fareden yaklaşık olarak iki kat daha güçlüdür. Gelişme ve farklılaşmayı spesifik bir şekilde düzenleyen, aynı zamanda gelişme ve farklılaşma faktörü (GDF-8) olarak da bilinen, fare ve sığırdaki double kaslanmayla (kas hipertrofisi) ilgili iskelet kas proteini olan myostatin, TGF- β (transforming growth factor- β) ailesinin bir üyesidir (McPherron *et al.* 1997). Lee, 2001’de çeşitli myostatini engelleyici maddelerin üretimini artıran mutasyonları ilave ederek büyük kas kütlesi ve bozulmamış myostatin geniyle fareler meydana getirmiştir. Bu çalışma, “güçlü fareler” takma adına önderlik etmiştir. Türler arasında çok az farklılık gösteren myostatin geninin zinciri insanlarda, farelerde, zebra balığında ve diğer hayvanlarda belirlenmiştir (Anonim 2007b).

Myostatin, 15 kilodaltonluk (kDA) molekül ağırlığına sahip, 376 aminoasitli bir propeptid olarak başlıca iskelet kasında sentezlenmekte olup, işlenmiş ve olgun proteindir. Myostatin, TGF- β (Transforming Growth Factor- β) üst familyası proteinlerinin bir üyesi olduğundan dolayı (Anonim 2007b) TGF- β ailesinin tüm karakteristik özelliklerine sahiptir (McPherron *et al.* 1997). Yani yapısal bir şekilde, myostatin sistein düğümlü oldukça iyi olarak korunmuş örneklerle (numune) sahip etkin karboksi terminal bir bölge ve işlenmiş işaretli bölge gibi TGF- β ailesine ait özellikleri içerir (McPherron *et al.* 1997).

TGF- β üst familyası, GF'lerin (Growth Factor) büyük bir bölümünü oluşturan alt tiplerdir (Anonim 2004).

TGF- β üst familyasının üyeleri, hücrelerin çeşitli tiplerinin farklılaşmasını da düzenler (Kawabata and Miyazono 1999). Myostatin geninin de üye olduğu TGF- β (Transforming Growth Factor), birçok farklı hücre tipinin büyümesini engelleyerek, hücrelerin büyüme ve çoğalmasını düzenler (Anonim 2007c).

Transforming Growth Factor (TGF- β) üst familyası, yapısal olarak ilgili polipeptid büyüme faktörlerinin sayısının büyük bir kısmını kapsar (Luo 2000). TGF- β 'lar, böceklerden memelilere, türlerin birçok çeşidinde (Luo 2000), hücre çoğalması, farklılaşma, apoptis, göç, tahrik etme ve bağışıklık yanıtlarını kapsayan hücrel aktiviteğin geniş bir şekilde değişikliğini ve düzenlenmesini ayarlar (Massague 1990; Lyons and Moses 1990; Roberts and Sporn 1990; Yingling *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1997).

Şimdiye kadar, TGF- β üst familyasının 30'dan fazla üyesi bulunmuştur. TGF- β 'lar, çeşitli alt familyalarda gruplandırılırlar: 1) TGF- β (TGF- β 1-5); 2) Activin/inhibin (activin A, AB ve B, inhibin A ve B); 3) Kemik morfogenetik proteinler (Bone morphogenetic proteins) (BMP'ler) (BMP1-8); 4) Büyüme ve farklılaşma faktörleri (Growth and differentiation factors) (GDF'ler) ve 5) Xenopus Zaevis Vg-1 ve Vgr-1 (Alevizopoulos and Mermod 1997; Massague 1990; Massague 1998).

TGF- β ailesi, omurgalı hayvanlarda farklı proteinleri kodlayan en az beş genden meydana gelir (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, TGF- β 5) (Luo 2000).

TGF- β ' ların ortak bir özelliği, hareketsiz karmaşık bir formda hücreler tarafından salgılanmış olmalarıdır. Sonuç olarak, TGF- β ' ların gizli kompleksleri bozuluncaya kadar, biyolojik faaliyetleri az veya yoktur. Tam mekanizma, tamamen anlaşılmayan bu gizli kompleksleri aktif hale getirmeyi kapsar, ama özel enzimleri içerebilir. Bu daha fazla, kompleks bir sistem içeren büyüme faktörlerinin etkileşiminin nasıl olduğunu örneklemektedir (Luo 2000).

TGF- β ' ların başka bir ortak özelliği, onların biyolojik faaliyetinin çoğunlukla, diğer büyüme faktörlerinin varlığında sergilendiğidir. Bu yüzden, TGF- β ' nın biyoaktivitesinin, diğer büyüme faktörlerinin varlığına ve hedef hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olduğu için kompleks olduğu görülmektedir (Luo 2000).

TGF- β familyasının da alt tipi olduğu büyüme faktörü terimi (Growth Factor), hücrel çoğalma ve hücrel farklılaşma uyarısını yapabilen ve doğal olarak meydana gelen bir proteinden bahseder. Büyüme faktörleri, çeşitli hücrel işlemleri düzenlemek için önemlidir (Anonim 2007d).

Büyüme hormonu (GH), ön hipofiz bezinin somato tropik veya asidofilik hücreleri tarafından sentezlenir (Niall *et al.* 1971). Büyüme faktörleri (GF) tipik olarak, hücreler tarafından sentezlenir ve aynı hücrenin (Autocrine) veya başka bir yakın hücrenin (Paracrine) hücrel fonksiyonunu etkiler. Bu moleküller; hücre farklılığı, gelişimi, hareketliliği, gen ekspresyonu ve doku veya organ olarak bir grup hücrenin fonksiyonlarının nasıl olduğunun belirleyicisidirler (Anonim 2004).

Büyüme faktörleri (GF), çok düşük konsantrasyonlarda normal olarak etkilidir ve hedef hücrelerinde büyüme faktörlerinin uygun alıcıları için yüksek yakınlık vardır. GF' in her tipi için, hücre zarı veya çekirdekte özel bir alıcı vardır (Anonim 2004). Büyüme

faktörleri tipik olarak, hücrelerin arasında moleküllere işaret edici olarak görev yapar (Anonim 2007d).

Bir GF, birbirini etkileyen hücre tipine bağlı olarak farklı biyolojik etkilere sahip olabilir. Insulin growth factor (IGF-I) gibi bazı GF'ler, belli özelliklere sahiptir ve hücrelerin birçok sınıfını etkiler. Diğerleri, sadece bir hücre tipinde hareket eder ve spesifik bir yanıt ortaya çıkarır (Anonim 2004).

Birçok büyüme faktörü, hücresel fonksiyonları engeller veya gelişmesine yardımcı olur. Ayrıca multifaktoral olabilir. Diğer bir deyişle, iki ya da daha fazla madde, spesifik hücresel bir yanıtı teşvik etmeyi gerektirebilir. Proliferasyon (çoğalma), hücrelerin çoğunun gelişimi ve büyümesi tek bir GF'den daha ziyade spesifik GF'ler kombinasyonunu gerektirir (Anonim 2004). Büyüme faktör ailelerinin içerisinde; TGF-beta (transforming growth factor-beta), BMP (bone morphogenic protein), neurotrophins (NGF, BDNF ve NT3), fibroblast growth factor (FGF) ve bunun gibi düzineler vardır (Anonim 2007d).

TGF- β ile ilişkili yapılarla kurulmuş olan TGF- β 'nın çeşitli alt tipleri vardır. Alt tiplerden biri gelişme ve farklılaşma faktörü (GDF) olarak isimlendirilir ve özellikle gelişme ve farklılaşmayı düzenler. Myostatin olarak da isimlendirilen GDF-8, fare ve sığırdaki double kaslanmayla ilgili iskelet kas proteinidir (Anonim 2004, Kocamis and Killefer 2002). Bu gen son zamanlarda gizli düzenleyici faktörlerden transforming growth faktör- β ailesinin bir üyesi olduğu tespit edilmiştir (Kocamis and Killefer 2002). Myostatin; memelilerde iskelet kas sisteminde büyük bir genetik saptama olarak gösterilmiştir (Rescan *et al.* 2001). Memelilerde myostatin mRNA hemen hemen sadece iskelet kasında bulunmuş olmasına rağmen, daha düşük konsantrasyonlarda adipoz dokuda (Anonim 2004; Gonzalez-Cadavid *et al.* 1998; McPherron *et al.* 1997), meme bezinde (Ji *et al.* 1998) ve kalp kasında (Sharma *et al.* 1999) bulunmuştur. Myostatin gen delesyonu kas kütlelerine ek olarak yağ doku kütlelerine de etki etmiştir (Dominique and G'érard 2006). Myostatin myosatellite hücreleri direk olarak etkilediği için kas hücre hiperplasia ve hipertrofisinin her ikisinin sonucunda kas büyümesi artmıştır

(Thomas *et al.* 2000; Rios *et al.* 2001, 2002; Langley *et al.* 2002, 2004; McCroskery *et al.* 2003). Ayrıca, myostatin gen mutasyonu, insan, fare ve sığırdaki kas hücre hiperplasia ve hipertrofinin her ikisinin sonucunda iskelet kas kütlesinde dramatik ve yaygın bir artışa sebep olmuştur (McPherron *et al.* 1997; Schuelke *et al.* 2004).

MSTN geni zebra balığı (*Danio rerio*) (Xu *et al.* 2003; Amali *et al.* 2004; Biga *et al.* 2005), atlantik salmon (*Salmo salar*) (Ostbye *et al.* 2001), gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (Rescan *et al.* 2001), dere alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) (Roberts and Goetz 2001), çizgili levrek (*Morone saxatilis*) (Rodgers and Weber 2001), tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Rodgers *et al.* 2001), çipura (*Sparus aurata*) (Maccatrozzo *et al.* 2001a,b), kanal kedi balığı (*Ictalurus punctatus*) (Kocabas *et al.* 2002), levrek balığı (*Dicentrarchus labrax*) (Terova *et al.* 2006) gibi çeşitli balık türlerini ve insan (Gonzalez-Cadavid *et al.* 1998), fare (McPherron and Lee 1997), sığır (McPherron and Lee 1997) ve tavuk (McPherron and Lee 1997; Kocamis *et al.* 1999) gibi omurgalıların geniş bir çeşidinden klonlanmış ve tanımlanmıştır (Ko *et al.* 2006).

Yukarıda da bahsedildiği gibi myostatin homologları birçok balık türünden izole edilmiştir (Kocabas *et al.* 2002; Maccatrozzo *et al.* 2001a; McPherron and Lee 1997; Ostbye *et al.* 2001; Rescan *et al.* 2001). Balıkta mevcut türler arasında farklar olmasına rağmen, MSTN mRNA diğer doku veya organlarda da bulunmuştur (beyin, göz, bağırsak, solungaç filamentleri, gonad, böbrek) (Rodgers *et al.* 2001; Roberts and Goetz 2001; Maccatrozzo *et al.* 2001a; Maccatrozzo *et al.* 2001b).

Alabalık türlerinde, muhtemelen salmonid geninin son bölümünde var olan iki MSTN gen (Tmyostatin 1 ve Tmyostatin 2) bulunmuştur. Karşılaştırmalı reverse-transcriptase'a bağlı polimeraz zincir reaksiyon testi; Tmyostatin 2 mRNA ekspresyonu kas ve beyinde sınırlı iken, Tmyostatin 1 mRNA alabalık dokularında eksprese olduğunu göstermiştir. Erişkin hayvanların myotomal kasında, Tmyostatin 1 mRNA birikimi, liflerin yavaş ve hızlı kasılmasıyla benzerdir. Tmyostatin 1 mRNA konsantrasyonu cinsel olgunlaşmayla ilgili kasın tahrip olmasıyla değişmemektedir. Buna karşın, Tmyostatin 2 mRNA liflerin yavaş kasılmasında birikir ve Tmyostatin 2

mRNA konsantrasyonu olgunlaşan hayvanların tahrip olan kaslarında çarpıcı biçimde düşmüştür (Rescan *et al.* 2001).

Dünyada ve Türkiye’de yetiştiriciliği en yaygın olan balık türü gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’dır. Dünyanın birçok bölgesine yayılan bu türün yetiştiricilikte tercih edilmesinin nedenleri; yüksek adaptasyon ve yemden yararlanma yeteneği, suni yöntemlerle yumurta alımının kolaylığı, kuluçka sürelerinin kısalığı ve hastalıklara karşı dayanıklı olmasıdır (Canyurt 1978, 1983; Emre ve Kürüm 1998).

Gökkuşağı alabalığı (*Salmo gairdnerii* R.)’nın asıl vatanı Kuzey Amerika olup, 1880 yılında Avrupa’ya getirilmiştir. Erginlerinde ortalama boy uzunluğu 35 cm’dir. Yüzgeç formülü; D 4/10, A 3/10, P 1/12, V 1/8 şeklindedir. Yan çizgi üzerinde 135–150 arasında pul bulunmaktadır. Sırt kısmı yeşilden kahverengiye kadar değişmektedir. Karın altı ise gümüşü renkten sarıya kadar değişir. İki tarafta yan çizgiler boyunca uzanan ve gökkuşağını andıran bir renkler şeridi uzanmaktadır. Bu sebeple adını buradan almıştır. Ağız yapısı diğer alabalık türlerine göre biraz daha büyüktür. Yumurtlama zamanı genellikle erkeklerin alt çeneleri uzamakta ve çengelimsi bir durum arz etmektedir. Yumurtlama zamanı Kasım ayı başlarından Mayıs ayına kadar devam etmektedir. Her dişi balık kg canlı ağırlığa 1800–2000 adet yumurta vermektedir (Pfeffer 1979; Sterba ve Habil 1967). Gökkuşağı alabalığı ile kaynak alabalığı hemen hemen aynı yıllarda yaklaşık 120 yıl önce Kuzey Amerika’dan Avrupa’ya getirilmelerine karşın kültür koşullarına uygun niteliklerinden dolayı gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği hızlı bir artış göstermiş ve günümüzde bir endüstri haline gelmiştir (Steffens 1981).

Gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*), 1988 yılına kadar *Salmo gairdnerii* R. olarak adlandırılmışlardır, bu tarihten sonra Amerikan Balıkçılık Derneği alabalıkları; Atlantik Salmonları, Atlantik Alabalıkları, Pasifik Salmonları ve Pasifik Alabalıkları olarak ayırdıktan sonra; Atlantik Alabalıkları ve Salmonlarına *Oncorhynchus*, gökkuşağı alabalıklarına da *mykiss* adını vermiştir (Smith ve Stearly 1989).

Myostatin, kas gelişiminin negatif bir düzenleyicisidir. Farenin iskelet kas kütlesinde önemli bir artışa sahip olması, myostatinin yıkıma uğratıldığını gösteren önemli bir delildir. Bu buluş çift kaslanma fenotipine sahip olan Belçika mavis (Belgian Blue) ve Piedmontaise sığırlarının her ikisinde myostatin geninin doğal mutasyona uğradığını destekler (Grobet *et al.* 1997; Sonstegard *et al.* 1997; Grobet *et al.* 1998). Kas hipertrofisi (ferdi kas liflerinin büyüklüğündeki artış) olarak da bilinen çift kaslanma 19. yüzyılın başlarında farkına varılan bir fenotiptir ve hiperplasiadan (ferdi kas liflerinin sayısında artış) dolayı kas kütlesinde genelleşmiş artış, görünür bir şekilde karakterize edilmiştir. Çift kaslanma Belçika Mavis (Belgian Blue), Piedmontese ve Austuriana de los Valles sığır türlerinde mevcuttur. Çift kaslı olmayan hayvanlarla karşılaştırıldığında bu hayvanlar daha yüksek doğum ağırlığına, daha düşük yağ ve kemik yüzdelere sahip olduğu görülmektedir (Arthur 1995). Lee 1997 yılında, güçlü Belgian Blue (Belçika Mavis) ve Piedmontese sığır türlerinin eksik bir myostatin genine sahip olduğunu bulmuştur; bu türler yetiştiricilik süresinde üretilmektedir (Kambadur *et al.* 1997; McPherron and Lee 1997).

Kas gelişimini ve farklılaşmasını engelleyici etki olarak çaba sarf eden myostatinin de içinde olduğu moleküler mekanizmayı anlamada ki son bulgular, ergin hayvanlarda kas kütlesindeki artışları göstermiş olan deneysel yaklaşımlara sebep olmuştur. Bu deneyler, myostatinin sinyalizasyon yolunun ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis=Motor Nöron Hastalığı), kas distrofisi (kasın gelişmemesi) ve oldukça yaşlılarda sarkopenik zayıflık gibi kas kaybettiren hastalıkların tedavisinde güçlü bir iyileştirici müdahale noktası olabileceğini göstermiştir (Walsh and Celeste 2005). HIV virüsü bulaşmış olup, bağışıklık sistemi zayıflamış ve kronik kas kaybından acı çeken insanların kas dokusundaki myostatin ekspresyon seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir. Johns Hopkins üniversitesi tıp fakültesi profesörlerinden Se-Jin Lee kastaki myostatin geninin engellenmesi ile insanlarda görülen kanser, aids ve kas distrofisi gibi önemli hastalıkların tedavilerinin olabileceğini ümit etmektedir. Myostatin gen ekspresyonunun engellenmesi ile kas dokusunda gelişme ve irileşme görülmekte, aynı zamanda yağ dokusunda gerileme gözlenmektedir (Anonim 1997; Gonzales-Cadavid *et al.* 1998).

Bu çalışmayla ülkemizde yetiştiriciliği yaygın olarak yapılan gökkuşaağı alabalığının myostatin geninin hangi yaşıta eksprese olduğu bulunarak ortaya konulmuştur. Bu bilgiler ışığında balıklarda az yağlı ve çok kaslı bireyler elde etmek amacıyla myostatin geninin hangi yaşıta engellenmesi gerektiği yönündeki çalışmalara önemli bir kaynak oluşturması hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Gonzalez-Cadavid *et al.* (1998), myostatin ekspresyonunun insanlardaki yağsız kütleyle aralarında ters bir ilişki olduğunu ve myostatin gen ekspresyon artışının AIDS sendromuyla insanda ağırlık kaybıyla ilişkili olduğunu hipotezlerle araştırmışlardır. Bu yüzden insan myostatin genini ve cDNA klonunu iskelet kasında, sağlıklı serumda ve HIV bulaşmış insanlarda ekspresyonunu araştırmışlardır. Myostatin gen; 2 intron ve 3 ekzon bölge içeren 375 aminoasitli bir protein olarak kodlanmıştır. Myostatin 26 kDa'lık olgun glukoprotein olarak insan iskelet kas sisteminde benzersiz bir şekilde eksprese olmuştur ve plazma içinde gizlenmiştir. Myostatin immunoreaktivitesi insan iskelet kasında tip 1 ve 2 liflerin her ikisinde algılanabilmiştir. Myostatin immunoreaktivite proteinin kas içi ve serum konsantrasyonları sağlıklı insanlarla karşılaştırıldığında ağırlık kaybeden HIV bulaşmış insanlarda artmıştır ve yağsız kütle içeriğiyle ters yönde ilişkilidir. Bu veriler; myostatinin ergin insanda iskelet kas gelişimini zayıflatıcı ve HIV bulaşmış insanda kas kaybına katkıda bulunduğunu hipotezlerle desteklemiştir.

Gökkuşığı alabalığıyla yapılan bir çalışmada, iki ayrı myostatin geninin var olduğu ve çeşitli dokularda farklı şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu iki alabalık myostatin geninin kassız dokularda ve kasta farklı bir ekspresyon örneği sergilemiş olduğu ve cinsel olgunlaşmaya eşlik eden kasın tahrip olduğu sürece düzenli olmadığı gösterilmiştir (Rescan *et al.* 2001).

Maccatrozzo *et al.* (2001a), çipurada (*Sparus aurata*) yapmış oldukları çalışmada MSTN geninin zincir ve ekspresyon analizini rapor etmişlerdir. Diğer omurgalıların myostatinleriyle %60-%74 protein benzerliği gösteren, açık okunabilen 385 aminoasitli kodlanmış yapıda 2189 bp'lik bir kopya izole edilmiştir. Tamamlanmış iki intron zinciri de determine edilmiştir. İntron-ekzon sınırları; memeli MSTN genleri ile karşılaştırıldığı zaman korunmuştur, oysaki intron büyüklüğü daha küçüktür. Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile total RNA, MSTN ekspresyonu olan iskelet

kasında ve diğer dokularda farklı gelişme evrelerinde izole edilmiştir. MSTN ekspresyon profilinde memelilerden farklı olarak gözlenmiştir.

Maccatrozzo *et al.* (2001b), yaptıkları çalışmada kemikli balıkta protein benzeri kodlanmış yeni bir morfojenetik kemik proteinin (sbMSTN-b) tam cDNA zincirinin izolasyon ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Kodlanmış protein, çipura (*Sparus aurata*) MSTN'sinin aminoasit seviyesiyle %68 benzerdir ve homologlar *Umbrina cirrosa* ve *Tetraodon nigroviridis*'de de bulunmuştur. Filogenetik analizler, kemikli balık türlerinin muhtemelen çoğunda MSTN-b geninin mevcut olabileceğini göstermiştir. Farklı dokular ve dönemlerde yapılan RT-PCR; son larval dönemlerden başlayarak, MSTN-b'nin neredeyse yalnızca merkezi sinir sisteminde eksprese olduğunu göstermiştir. Kantitatif analizler metamorfozla ilgili beyinde sbMSTN-b ekspresyonunda bir artış olduğunu göstermiştir, aynı zamanda sinir sisteminde de farklılaşmanın olduğunu göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada, beyaz levrek (*Morone chrysops*) ve tilapianın (*Oreochromis mossambicus*) iskelet kasından MSTN cDNA klonlarının izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Her iki balık türünün nükleik asit ve amino asit zincirleri önceden tanımlanmış memeli ve kuşlara ait ortolog genlere (ortak atadan gelen organizmaların aynı işlevi gören genleri için kullanılır) benzerdir. Farelerin aksine, tilapiada MSTN ekspresyonu iskelet kasında sınırlanmamıştır ve birçok dokuda gözlenmiştir. Ayrıca, gelişen tilapia larvasında MSTN ekspresyon zamanlaması myogenesisle çakışır. Bu sonuçlar, tilapia ve muhtemelen diğer balıklarda MSTN geninin biyolojik hareketlerinin kas lifi büyümesinin baskılanmasını sınırlamayabileceğini buna ek olarak farklı hücre tiplerini ve organ sistemlerini etkileyebileceğini akla getirmektedir (Rodgers *et al.* 2001).

Nükleotid seviyesinin uygun bölgelerinin %92'si tanımlanmış olan dere alabalığında (*Brook trout*) yapılan bir çalışmada, iki myostatin izoformu izole edilmiştir. Bir izoform beyinden ve kastan, ikinci izoform yumurta dokudan izole edilmiştir. Ergin dere alabalığının iskelet kas dokusunda myostatinlerin mevcut olduğu gösterilmiştir. Ayrıca,

kırmızı ve beyaz kas tiplerinde de farklı şekilde eksprese olduğu bildirilmiştir. Myostatin geninin yalnızca iskelet kasında sınırlı olmadığı, beyin ve yumurtalık gibi diğer dokularda da mevcut olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler, dokuya özel bir biçimde eksprese olan birçok myostatin izoformlarının olduğunu ortaya koymuştur (Roberts and Goetz 2001).

Norveç'te yapılan bir çalışmada, Atlantik salmonunun (*Salmo salar*) çeşitli dokularında iki myostatin geninin ekspresyonu rapor edilmiştir. Salmon myostatin izoform I ve salmon myostatin izoform II genlerinin %93 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir. Memelilerde myostatin sınırlı dokularda eksprese olurken, salmon myostatin I ve II'nin mRNA'ları dil, göz, beyin, bağırsak, solungaçlar ve beyaz kası da içeren birçok dokuda eksprese olduğu gözlenmiştir. Buna ilaveten, izoform I mRNA kalp, dalak, kırmızı iskelet kası ve yumurtalığa ait dokuda da bulunmuştur (Ostbye *et al.* 2001).

Yapılan bir çalışmada; farklı türlerin kas gelişiminde myostatin ilgisi gözden geçirilmiştir. Hedeflenmiş yıkıma sahip olan fare myostatin geni kas kütlesinde normal büyüklüğünün 3 katı kadar bir artış göstermiştir. Ek olarak; myostatin mutasyonu gözle görülebilir bir şekilde karakterize edilmiş sığır yavrularının çift kaslarını birbirine bağlamıştır, kas kütlesindeki artışı genelleştirmiştir. Bu yüzden ferdi organ veya dokuların gelişimini belirgin bir şekilde kontrol eden myostatinin kasta uzun süre aranan inhibitörlerden biri olduğu belirlenmiştir (Kocamis and Killefer 2002).

Kocabas *et al.* (2002), kanal kedi balığında (*Ictalurus punctatus*) MSTN geninin farklı ekspresyonunu ve moleküler karakterizasyonunu incelemişlerdir. Genomik DNA ve cDNA'sı kodlanmış kanal kedi balığının myostatini klonlanmış ve zinciri belirlenmiştir. Genomik zincirler ve cDNA karşılaştırılmış; sırasıyla 180 ve 323 bp'lik 5' UTR (untranslated bölge) ve 3' UTR bölgeleriyle 1673 bp uzunluğunda myostatin cDNA ortaya çıkarılmıştır. Kanal kedi balığının MSTN'sinin aminoasit zincirlerinin diğer organizmalarla iyi bir şekilde korunmuş olduğu sonucuna varılmıştır. Myostatin bölge, tek nükleotidli polimorfik bölgeler ve çeşitli mikrosatellitler var olduğu için kanal kedi balığında çok iyi derecede polimorfiktir. MSTN geni çeşitli dokularda ve gelişim

aşamalarının farklı seviyelerinde eksprese olmuştur. Başlangıçta ki önerilere ek olarak MSTN'nin muhtemel rollere ve kompleks bir düzene sahip olduğu önerilmiştir.

Xu *et al.* (2003), embriyo, larva ve ergin zebra balıklarında myostatin geninin yapısı, ekspresyonu ve fonksiyonunu analiz etmişlerdir. Zebra balığı embriyolarının ilk döneminde myostatin mRNA az eksprese olmuştur. Yüzen larvada, juvenil ve ergin zebra balıklarının iskelet kaslarında ise myostatin ekspresyonu önemli derecede artmıştır.

Ergin ve gelişen dere alabalıklarında yapılan bir çalışmada, MSTN proteini ve RNA transkript seviyeleri araştırılmıştır. Dere alabalığı embriyolarının gelişiminde, ov (ovarian) ve b/m (brain/muscle) MSTN RNA'lar ve MSTN immunoreaktif protein (MIP) döllenmeden sonra 45 günde önemli derecede yükselmiştir. Ergin dere alabalığında, b/m MSTN biçimi yılın belli zamanına veya cinsiyete bakılmaksızın beyaz kasa karşı kırmızı kasta daha yüksek seviyede eksprese olmuştur. Yıl boyunca balık örneğinin MSTN kopyalarında birkaç değişiklik gözlenirken, 14 kDa MIP işlemiyle özel bir doku çeşidinde yumurtlamada önemli derecede artış tespit edilmiştir. Erkek ve dişiler arasında farklılıklar gözlenmiştir. b/m ve ov genlerinde destekleyici zincir analiziyle birlikte bu veriler balıkta büyüme ve kasta gelişme MSTN'nin rol oynadığını desteklemektedir. Ayrıca real-time RT-PCR test edildiğinden beri dere alabalığının iki myostatin formunun ekspresyon miktarını ölçmek mümkün olmuştur. Her hangi bir balıkta myostatin için özel real-time testlerinin ilk raporu olmuştur (Roberts and Goetz 2003).

Yapılan bir çalışmada yabani tip coho salmonda (*Oncorhynchus kisutch*) ve overexpressing GH (büyüme hormonu fazla eksprese olmuş) coho salmonda MSTN ve büyüme hormonu (GH) arasındaki ilişki araştırılmıştır, MSTN transkript ve protein ekspresyonu yabani tip coho salmonda ve overexpressing GH coho salmonda ölçülmüştür. Kantitatif real-time RT-PCR ve western analizleri; ergin coho salmon dokuları ve gelişen embriyolarda MSTN immunoreaktif protein (MIP) seviyeleri ve iki salmonid MSTN genlerinin (1 ve 2) RNA ekspresyonunu ölçmek için kullanılmıştır.

Transgenik ve kontrol coho salmon embriyolar, MSTN1 ve MSTN2 RNA ekspresyonu ilk olarak gözlenme zamanında incelenmiştir ve 42 kDa'lık bir MIP haçeriden (yumurtadan çıkma) önce zaten saptanmıştır. Transgenik salmonda MSTN1 transkript ekspresyonu; yabani tip ergin coho salmon kas ve beyin dokusundan farklı değildir. Bununla birlikte, MSTN2 transkript ekspresyonu; aynı büyüklükte yabani tip salmone karşı transgenik balığın kırmızı kasında daha çok ve beyaz kasında daha azdır. Northern analizleri; MSTN2 transkript ekspresyonunun, transgenik balığa uygun yaştaki yabani tipin beyaz kasında daha az olduğunu göstermiştir. Ek olarak; farklı protein işlemlerine tanıklık eden ve kontrollere karşı ergin transgenik balıktan alınan kasta bioaktif MIP varsayılandan daha azdır. Daha hızlı gelişen balıkta MSTN ekspresyonunun düşüşü MSTN'nin balıkta ve memelilerde kas gelişiminin negatif bir düzenleyicisi gibi davrandığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın sonuçları; MSTN aracılığıyla GH'nin anabolik etkilerinin aracılık etmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Roberts *et al.* 2004).

Biga *et al.* (2004), gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme hormonunun kas myostatin 1 ve 2'yi farklı şekilde düzenlemesini ve kortizol sirkülasyonunun artışı araştırılmışlardır. Salmonidler ayrı genlerden kopyalanan 2 myostatin üretirler. Şaşırtıcı bir şekilde, kantitatif analizler gökkuşağı alabalığında iki myostatin gen için farklı düzenleyici mekanizmalar göstermiştir. Kontroller karşılaştırıldığında MSTN2 mRNA seviyeleri %74 düşerken MSTN1 mRNA seviyeleri rbGH'la (recombinant bovine growth hormone) muameleyi takiben %26 yükselmiştir. Ek olarak, kortizol sirkülasyon seviyeleri, kontroller karşılaştırıldığında rbGH'la muameleyi takiben %71 yükselmiştir. Muamele edilmiş balıklar ve kontrol balıklarında kortizol seviyeleri sonraki günlerle karşılaştırıldığında 0'ıncı günde %245 yükselmiştir. Muamele edilmiş balığın kortizol seviyesi 0,5'inci günde kontrol balığından %207 daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır ve muameleyi takiben 7'inci günde en az %50 daha yüksekte kalmıştır. Bu değişim örneğiyle MSTN1 mRNA seviyeleri pozitif bir şekilde ilişkilidir. Ayrıca, GH (growth hormone) , myostatin ve kortizol arasında ilk kez direk bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, iki myostatin geninin farklı şekilde düzenlendiğini ve gökkuşağı alabalığı kasında farklı fonksiyonlara sahip olabileceğini göstermektedir.

Kim *et al.* (2004), yaptıkları çalışmada, bir midye türü olan *Argopecten irradians*'ın 382 aminoasitli myostatin benzeri bir proteinin (sMSTN) cDNA'sını klonlamışlardır. sMSTN zinciri memeli MSTN'sine oldukça benzerdir. Kantitatif RT-PCR yöntemi sMSTN geninin adduktor kasında baskın olarak eksprese olduğunu, diğer dokularda sınırlı eksprese olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, MSTN'nin memelilerde olduğu gibi, omurgasız hayvanların kas büyüme ve gelişiminde de büyük bir rol oynayabileceğini göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) 30 günlük bir periyotta günde 18 saat için 0,8 ve 1,6 vücut uzunluğunda araştırma yapılmıştır. Araştırma dinlenmiş kontrol tanklarındaki balıkların hızlı kas liflerinde %24–30 bir artışla sonuçlanmıştır. Araştırmaya neden olan kas lif hipertrofisinin düzenlenmesinde rol oynadığı farz edilen gelişme ve transkripsiyon faktörlerinin konsantrasyonları ölçülmüştür. Araştırma çalışması çekirdekte protein fosfataz (calcineurin) lokalizasyonunda küçük bir artışla sonuçlanmıştır. Araştırma, myostatin ve protein fosfatazın araştırmaya neden olan kas lif hipertrofisinin düzenlenmesinde çok büyük bir rol oynamadığıyla sonuçlanmıştır (Martin and Johnston 2005).

Acosta *et al.* (2005), yaptıkları çalışmada, zebra balığında myostatin fonksiyonunu engellemek için çift zincirli RNA (dsRNA) kabiliyetini incelemişlerdir. Mikroenjeksiyon dsRNA vasıtasıyla tilapia myostatin protein kodonunun 268 aminoasitli ucunun aktif C-terminal alanına biyolojik bir şekilde uyduğunu ve muamele edilmiş balığın vücut kütlelerinin artışı ortaya çıkarmışlardır. Zebra balığının ilk gelişim evresinde dsRNA enjeksiyonu hiperplasia ve hipertrofiyi ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, gen fonksiyonunun engellenmesi dsRNA miktarına güçlü bir şekilde bağlı olduğu görülmüştür.

Amerika'da yapılan bir çalışmada, kanal kedi balığının (*Ictalurus punctatus*) 28 gün boyunca soğuğa veya sınırlı beslenmeye maruz bırakılması ile büyüme, vücut kompozisyonuna etkisi, metabolizma ve kas gelişimiyle ilişkili genlerin ekspresyonu araştırılmıştır. 1. günde soğukla muamele edilmiş ve yiyecek eksikliği olan balığın

MSTN mRNA çokluğu kontrole göre daha düşüktür. Soğukla muamele edilmiş balık, kontrolle veya yiyecek eksikliği olan balıkla karşılaştırılmış MSTN ve HSP-70 mRNA 14 ve 28. günlerde soğukla muamele edilmiş balıkta yüksek bulunmuştur. Yani uzun süre düşük su sıcaklığına maruz kalmış balığın kas dokusunda MSTN mRNA çokluğu artmıştır (Weber and Bosworth 2005).

Farede yapılan bir çalışmada, güçlü bir myostatin aktivin tip II B reseptörün (ACVR2B) çözülebilir bir formu tanımlanmıştır. Yabani tip farelere enjekte edildiği zaman kas kütlelerinde dramatik artışlara (2 haftada %60'a kadar) sebep olabilmektedir. Üstelik çözülebilir reseptörün etkisinin zayıflatıldığı da gösterilmiştir. Sonuç olarak, kas gelişimini düzenlemede kullanılan aktivin tip II reseptörlerin (ACVR2 ve ACVR2B) her ikisi *in vivo* şartlarda kalıtsal olarak kanıtlanmıştır (Lee *et al.* 2005).

Hamrick *et al.* (2006), yapmış oldukları çalışmada, egzersizle kemik kuvvetinde artışların normal olarak gözlenmesine ilaveten kas kütlelerinde de artışlar olduğu hipotezini test etmişlerdir. Kas kütlelerinde artış gösteren myostatini eksik farelerle, yabani tip farelere beraber egzersiz yaptırılmıştır. Sonuçlar, egzersiz ile kemik kuvvetinde ki artışların, myostatini eksik farelerde yabani tip farelerden daha büyük olduğunu göstermiştir.

Ko *et al.* (2006), PCR yöntemiyle turuncu benekli balıkta (*Epinephelus coioides*) memelilerde olmayan myostatinin moleküler klonlanması ve karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Turuncu benekli balığın myostatin geni; 3 ekzonla birlikte 2 intron içermiştir. Myostatin geninden tam bir cDNA klonu da izole edilmiştir. Bu cDNA; yumuşakça, kemikli balık, kuş ve memeli türlerinin MSTN'leri ile %25 ile %96 homoloji göstermiştir. Turuncu benekli balık myostatininde yapılan filogenetik analizler; diğer bilinen MSTN'lerle bu MSTN arasında ilişki olduğunu saptamıştır. Farklı dokulardan reverse transkriptaz RT-PCR analiziyle total RNA ekstraksiyon sonuçları MSTN geninin yalnızca iskelet kasında değil diğer dokularda da eksprese olduğunu göstermiştir. MSTN mRNA farklı embriyonik gelişim ve larval dönemlerde de saptanmıştır. Turuncu benekli balıkta MSTN geninin spesifik doku ekspresyonu

memelilerden farklı olduğu için, balık da kas gelişimini düzenleyen fonksiyonlara ek fonksiyonlara da sahip olduğunun söylenebileceğini bildirmişlerdir.

Garikipati *et al.* (2006), gökkuşağı alabalığıyla (*Oncorhynchus mykiss*) yapmış oldukları çalışmada; gökkuşağı alabalığının myostatin-1a ve myostatin-1b genlerinin tanımlanması, karakterizasyonu ve kantitatif ekspresyon analizini araştırmışlardır. Gökkuşağı alabalığının embriyonik, larval ve ergin doku ekspresyon profillerinin kantitatif değerlendirilmesine ek olarak, iki myostatin geni olan rtMSTN-1a ve rtMSTN-1b'nin intron ve ekzon bölgelerini ve zincir analizlerini bulmuşlardır. MSTN-1a için 490, 368 ve 1600 bp'lik üç ekzon ve MSTN-1b için 486, 386 ve 1419 bp 'lik üç ekzon bölgesi benzer bir biçimde düzenlenmiştir. Ayrıca, farklı ergin dokularında ve embriyonik ya da larval gelişimin çeşitli aşamalarında oluşturulan detaylı RNA panelleri kullanılarak, her bir genin ekspresyonunun kantitatif değerlendirilmesinin de yapıldığını rapor etmişlerdir.

Levrekle (*Dicentrarchus labrax*) yapılan bir çalışmada, iskelet kas gelişiminin büyük genetik belirleyicisi olarak gösterilen myostatin geninin ve fibroblast büyüme faktörü-6 (FGF-6)'nın cDNA zincirlerinin izolasyonu ilk kez bulunmuştur. Ayrıca, real-time RT-PCR'la ölçülerek, farklı beslenme rejimlerine yanıt olarak levrek iskelet kasında FGF-6 ve myostatin ekspresyon profilinde rapor edilmiştir. Hayvanların beslenme durumunu FGF-6 mRNA seviyesi önemli derecede etkilemezken myostatin ekspresyon seviyesini önemli derecede etkilemektedir. Aç bırakılan balıkta myostatin seviyesi artarken, tekrar beslemeye alınmasıyla düşmüştür (Terova *et al.* 2006).

Ye *et al.* (2007), yapmış oldukları çalışmada, bir çeşit levrek olan (*Lateolabrax japonicus*)'dan myostatin geninin ekspresyon analizini ve moleküler klonlanmasını incelemişlerdir. 4873 bp'lik genomik zincir, 3 ekzon, 2 intron ve 5' ve 3' zincirlerini tanımlanmışlardır. Ekspresyon analizi, MSTN'nin gözde, beyinde ve kasta oldukça yüksek seviyede, bağırsakta orta seviyede, solungaç, dalak, karaciğer ve kalpte düşük seviyede eksprese olduğunu göstermiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Primer materyali

Myostatinin ve aktinin Forward ve Reverse primerleri internet ortamında dizayn edildikten sonra siparişleri verilmiştir (Rescan *et al.* 2001; Ojima *et al.* 2005). Belirlenen genlerin gen numaraları; myostatin: AF273035 ve aktin: AB196465'dir. Siparişi verilen Forward ve Reverse primerler aşağıda verilmiştir.

MSTN Forward primer: 5'- AATGCATCTGACGCAGGTTCTG - 3'

MSTN Reverse primer: 5'- TACCGTGAGCGGGTAGCGGCAA - 3'

Aktin Forward primer: 5'- TGGGGCAGTATGGCTTGTATG - 3'

Aktin Reverse primer: 5'- CTCTGGCACCCCTAATCACCTCT - 3'

3.1.2. Balık materyali

Araştırmanın balık materyalini oluşturan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü Alabalık Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir.

2,5 lt./sn.'lik su miktarıyla akan 10x2x1,3 m. ebadında beton havuzdan 1 m³'e 10 kg. balık hesabıyla 250 kg/m³ stoklanmış gökkuşağı alabalıklarından alınan yaşları 8, 18 ve 36 aylık olan balıkların canlılıklarını kaybettikten sonra sırt kısmından doku örneği alınmıştır.

3.1.3. Analizlerde kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır:

PCR	: Eppendorf
Etüv	: Memmert
Etüv	: Nuve EN400
Otoklav	: Alp
Sirkülasyonlu su banyosu	: Hake
Derin dondurucu (-20)	: Uğur
Derin dondurucu (-80)	: Ilshin
Spektrofotometre	: Aquamate
Kar makinesi	: Scotsman AF80
Soğutmalı Makro Santrifüj	: Heal Force
Mikro Santrifüj	: Labret
Hassas Terazî	: Scaltec
Elektroforez	: ThermoEC/EC135-90
Mikrodalgafırın	: Vestel
Vorteks	: Yellowline

3.1.4. Analizlerde kullanılan kimyasallar

Total RNA izolasyonu için; Trizol, kloroform, izopropilalkol, etanol ve DEPC su kullanılmıştır. cDNA sentezi için; adaptör primer (AP), PCR buffer, MgCl₂, dNTP mix, DTT, SuperScript™ II RT, RNaseH kullanılmıştır. PCR için; saf su, PCR buffer, MgCl₂, dNTP, Primer F, Primer R, cDNA (8, 18 ve 36 aylık) ve taq kullanılmıştır. totalRNA'nın elektroforez jeli için; MOPS, agaroz, ddH₂O, formamid ve etidyum

bromür kullanılmıştır. PCR'ın elektroforez jeli için; TBE buffer, agaroz, etidyum bromür kullanılmıştır.

3.1.5. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Kimyasal analizlerde kullanılan çözeltilerin hazırlanış şekli aşağıdaki gibidir:

1. 1XMOPS çözeltisi: 2ml 20xMOPS, 38ml distile suda çözündürüldü.
2. DEPC'li su çözeltisi: 1lt saf suya 1 ml sıvı depekt kondu ve içine bar atılarak manyetik karıştırıcıda uzun süre karıştırılarak hazırlandı.
3. 1XTBE buffer: 20ml 10xTBE buffer, 230ml distile suda çözündürüldü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Primer dizaynı

Gökkuşığı alabalığında 2 myostatin geni (MSTN1 ve MSTN2) belirlenmiştir. MSTN1 tüm vücutta eksprese olurken, MSTN2 beyin ve kasta sınırlanmıştır (Rescan *et al.* 2001). Bu çalışmada MSTN1 geni kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle myostatin1 genine spesifik Forward ve Reverse primerler dizayn edilmiştir. Bunun için internette NCBI'ın gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) MSTN1 (gen numarası: AF273035) ve MSTN2 (gen numarası: AF273036) genlerinin FASTA hali bulunmuştur. MSTN1 ve MSTN2 genlerinin homolojisini bulmak için önce BioEdit programına bu genler yapıştırılmıştır. Daha sonra buradaki genler kopyalanarak CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) programına yapıştırılıp genlerin homolojileri belirlenmiştir. Homolojisi az olan yerlerden Forward ve Reverse primerlerin dizaynı yapılmıştır. Primerler dizayn edilirken; primerlerin 18-22 bazdan oluşmasına, bir bazın üçten fazla tekrarının olmamasına ve A ya da T ile başlayıp G ya

da C ile bitmesine dikkat edilmiştir. Forward primer aynen alınmış Reverse primer ise belirlenen zincirin komplementlerinin tersi şeklinde alınmıştır. Forward ve Reverse primerlerin MSTN1 genine spesifik olup olmadığını belirlemek için NCBI'nin BLAST'lama (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sayfasına primerler yapıştırılmıştır. Primerlerin spesifiklikleri belirlendikten sonra bağlanma sıcaklıkları (tm sıcaklığı) (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>) belirlenmiştir. Aynı işlem aktin primerlerini belirlemek içinde yapılmıştır. MSTN'nin belirlenen tm sıcaklığı: 61°C, aktinin belirlenen tm sıcaklığı: 52,5°C'dir.

3.2.2. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için 8, 18 ve 36 aylık balıkların sırt kısmından steril şartlarda doku alınmıştır. Alınan dokulardan Trizol Reagent ile total RNA izolasyonu yapılmıştır (Biga *et al.* 2004; Chomczynski 1993; Chomczynski and Sacchi, 1987).

3.2.2.a. Total RNA izolasyon prosedürü

1. Her 4 ml Trizol başına 400-750 mg doku örneği kullanılmış ve örnek Trizol içinde homojenize edilmiştir (Örnek Trizolün %10'undan fazla olmamalıdır).
2. Homojenizasyonun ardından 4°C'de 10 dk 11000 devirde santrifüj edilip supernatant alınmıştır.
3. 800 µl kloroform eklenerek tüplerin ağızları güvenli bir şekilde kapatılıp, 15 sn süreyle elle çok güçlü bir şekilde çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra örnekler 4°C' de 15 dk 11000 rpm de santrifüjlenerek supernatant alınmıştır.

5. Örneklere 2 ml izopropilalkol katılmış ve oda sıcaklığında 5-10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
6. Örnekler 11000 rpm' de 4°C' de 15 dk santrifüj edilip üs faz tamamen uzaklaştırılmıştır.
7. Altta kalan kısma 4 ml %70 etanol ilave edilerek hafifçe vortekslenmiş ve 8000 rpm'de 4°C' de 5 dk santrifüj edilmiştir.
8. Etenol uzaklaştırılarak tüpler kurutma kağıdına ters çevrilip kurutulmuştur.
9. Örneğe 40 µl DEPC su ilave edilerek -80°C' de stoklanmıştır

3.2.2.b. Spektrofotometrik ölçümlerin yapılması

Balıklardan Total RNA'lar izole edildikten sonra konsantrasyon eşitlemesi yapmak için spektrofotometrede her yaş için ayrı ayrı absorbans ölçümü yapılmıştır. Bunun için; saf sudan geçirilmiş spektrofotometre küvetine 999 µl saf su (kör) konur, spektrofotometre cihazına yerleştirilir ve kör okunur. Kör okunduktan sonra küvetin içine 1 µl örnek (total RNA) konur tekrar cihaza yerleştirilir ve örneğin 260 nm absorbansı okunur. Tek zincirli DNA ve RNA için 40 µg/ml, çift zincirli DNA için 50 µg/ml olan 1 cm'lik kısımda 1 OD'nin bulunduğu 260 nm absorbans okunur. Saf RNA solüsyonunun OD260/OD280 değeri 2,0'dir. Eğer 2,0'den düşük çıkarsa totalRNA izole edilememiş demektir. Ölçümden sonra distilasyon faktörü hesaplanır. Distilasyon faktör hesaplama formülü $OD_{260} \times 40 \mu g/ml \times \text{Sulandırma faktörü} = \text{RNA } (\mu g/ml)$ şeklindedir. Total RNA'lardan oluşturulan cDNA'larda da konsantrasyon eşitlemesi yapmak için spektrofotometrede her yaş için ayrı ayrı absorbans ölçümü yapılmıştır. cDNA'nın spektrofotometrede ölçüm işlemi totalRNA ile aynıdır. Saf DNA solüsyonunun OD260/OD280 değeri 1,8'dir. Eğer 1,8'den yüksek çıkarsa kirlilik var demektir. cDNA'nın distilasyon faktör hesaplama formülü $OD_{260} \times 50 \mu g/ml \times \text{Sulandırma faktörü} = \text{DNA } (\mu g/ml)$ şeklindedir (Temizkan ve Arda 2004).

3.2.2.c. Total RNA'ların elektroforezde yürütülmesi

I. Örneklerin hazırlanması

1µl RNA'ya 3,5 µl distile su, 0,5 µl 20xMOPS, 5 µl formamid ilave edilerek 65°C'de 15 dak. inkübe edilir (Temizkan ve Arda 2004).

II. Jelin hazırlanması

1,88 ml 20xMOPS, 0,3 gr. Agaroz ve 28,5 ml ddH₂O kaynatılır. 6,68 µl formamid ve 5,5 µl etidyum bromür ilave edilir. Hazırlanan jel elektroforez küvetine boşaltılıp kuyuların oluşması için tarak takılır. Elektroforez tankına 1xMOPS solüsyonu konur (Temizkan ve Arda 2004).

III. Örneklerin yürütülmesi

2 µl boyama tamponuyla 6–8 µl örnek parafin üzerinde pipetaj yapılarak jelin kuyularına yüklenir. Elektroforezde yaklaşık 30 dak. yürütülmüştür (Temizkan ve Arda 2004).

3.2.3. cDNA kütüphanesinin oluşturulması

Elde edilen totalRNA'lardan RACE cDNA amplifikasyon kiti yardımıyla 8, 18 ve 36 aylık balıkların cDNA kütüphaneleri oluşturulmuştur (Rescan *et al.* 2001).

3.2.3.a. cDNA kütüphanesinin prosedürü

1. Bütün kimyasallar kullanılmadan önce hafifçe santrifüjlenmiştir.

2. 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine hazırlanmış olan totalRNA'lerden yoğunluğa bağlı olarak 7–10 µl konularak ve DEPC'li su ilave edilerek son hacim 11 µl'ye tamamlanmıştır.
3. 10 µM'lık adaptör primerden (AP) her tüp için 1 µl ilave edilerek, hafifçe santrifüjlenmiştir.
4. 70°C'de 10 dk etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyondan sonra 1 dk buzda bekletilip, kısaca santrifüjlenmiştir.
6. Tüplere 10X PCR buffer'dan 2 µl, 25 mM'lık MgCl₂'den 2 µl, 10 mM'lık dNTP mix'den 1 µl ve 0,1 M'lık DTT'den 2 µl ilave edilip ve hafifçe santrifüjlenmiştir.
7. Tüpler 42°C'de 5 dk su banyosunda bekletilmiştir.
8. Çıkarıldıktan sonra 1 µl SuperScript™ II RT ilave edilerek, su banyosunda 42°C'de 50 dk bekletilmiştir.
9. Çıkardıktan sonra kısaca santrifüjlenip, 70°C'de 15 dk etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
10. Çıkarılıp buz üzerine konulup, soğuyunca santrifüjlenerek, 1 µl RNaseH ilave edilmiştir. Kısaca santrifüjlenmiştir.
11. 37°C'de 20 dk etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra -20°C'de stoklanmıştır.

3.2.4. PCR'ın yapılması

cDNA kütüphanesi oluşturulduktan sonra MSTN'nin seçilen 859 bp uzunluğundaki bölgesini amplifiye etmek için 8, 18 ve 36 aylık balıklara ayrı ayrı PCR yapılmıştır. Aktinin seçilen 165 bp uzunluğundaki bölgesini amplifiye etmek için de 8, 18 ve 36 aylık balıklara PCR yapılmıştır (Temizkan ve Arda 2004).

3.2.4.a. PCR için gerekli olan kimyasallar

Tek tüp içerisine konulacak olan kimyasallar şunlardır. Eğer birden fazla tüp hazırlanacaksa tek tüp içine mix yapılarak diğer tüplere eşit olarak bölünebilir (Temizkan ve Arda 2004).

Saf su	:	6 µl
10 x PCR buffer	:	2 µl
MgCl	:	1,5 µl
dNTP	:	1 µl
Primer F	:	1 µl
Primer R	:	1 µl
cDNA	:	2 µl (8, 18 ve 36 aylık)
Taq	:	0,5 µl

3.2.4.b. MSTN için PCR protokolü

1- T= 80°C	1dak. (taq hariç)	
2- T= 94°C	3dak.	
3- T= 94°C	45 sn.	} 40 Döngü
4- T= 61°C	45sn.	
5- T= 72°C	45sn.	
6- 3'üncü basamağa dön	40	
7- T= 72°C	5 dak.	

8- 4°C’de tut

Yukarıdaki sekiz tane madde sırasıyla PCR’a girildikten sonra 40 döngü PCR yapılmıştır. Gradientli PCR için; 0,2 ml’lik PCR tüplerinden 5 tüp hazırlanmıştır. 20, 25, 30, 35, 40’ıncı döngülerin her birinde bir tüp PCR’dan çıkarılmıştır. Bu PCR 8, 18 ve 36 aylık balıkların hepsine uygulanmıştır.

PCR protokolünde 94°C’ de 3 dak. ve 94°C 45 sn.’ de DNA zincirindeki hidrojen bağları kopar. 61°C’ de primer yapışır. 72°C’ de amplifikasyon yenilenir. 94°C ile 72°C arasında 35 döngü yapılmıştır. Böylece birkaç saat içerisinde milyonlarca amplifikasyon ürünü elde edilmiş olur (Temizkan ve Arda 2004).

3.2.4.c. Aktin için PCR protokolü

1- T= 95°C	3 dak.	} 35 Döngü
2- T= 95°C	20 sn.	
3- T= 52,5°C	20sn.	
4- T= 72°C	45sn.	
5- 2’inci basamağa dön	35	
6- T= 72°C	5 dak.	
7- 4°C’de tut		

Aktin için yapılan PCR’da: 0,5 ml’lik PCR tüplerinden her yaş için 1 tüp olmak üzere toplam 3 tüp kullanılmıştır. Aktin için yapılan PCR 8, 18 ve 36 aylık balıkların hepsine uygulanmıştır (Temizkan ve Arda 2004).

3.2.5. PCR ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi

Elde edilen PCR ürünleri elektroforezde yürütülmüştür.

3.2.5.a. Jelin hazırlanması

MSTN ve aktin için ayrı ayrı %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için önce 0,3 gr. agar tartılır. 30 ml 1xTBE bufferla karıştırılarak kaynatılır. 5,5 µl etidyum bromür katılır. Hazırlanan jel elektroforez küvetine boşaltılıp kuyuların oluşması için tarak takılır. Elektroforez tankına 1xTBE solüsyonu konur (Temizkan ve Arda 2004).

3.2.5.b. Örneklerin yürütülmesi

Jelin ilk kuyusuna 4 µl marker (belirteç) yüklenmiştir. 2 µl boyama tamponuyla 6–8 µl örnek parafin üzerinde pipetaj yapılarak jelin kuyularına yüklenir. Elektroforezde aktin ve MSTN ayrı ayrı jellere yüklenerek yaklaşık 20 dak. yürütülmüştür (Temizkan ve Arda 2004).

3.2.6. Jellerin görüntülenmesi

Elektroforezde yürütüldükten sonra MSTN ve aktinin PCR ürünlerinin jel görüntüleri UV görüntüleme sistemiyle çekilmiştir. 8, 18 ve 36 aylık balıkların myostatinlerinin yoğunluğu internet ortamında ImageJ 1,37c programından ölçülerek grafik çizilmiştir (Temizkan ve Arda 2004).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Total RNA'nın Spektrofotometrik Ölçümlerinin Analizi

Araştırmada hammadde olarak kullanılan gökkuşağı alabalıklarının sırt kısmından alınan dokulardan elde edilen total RNA'larda konsantrasyon eşitlemesi yapmak için spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

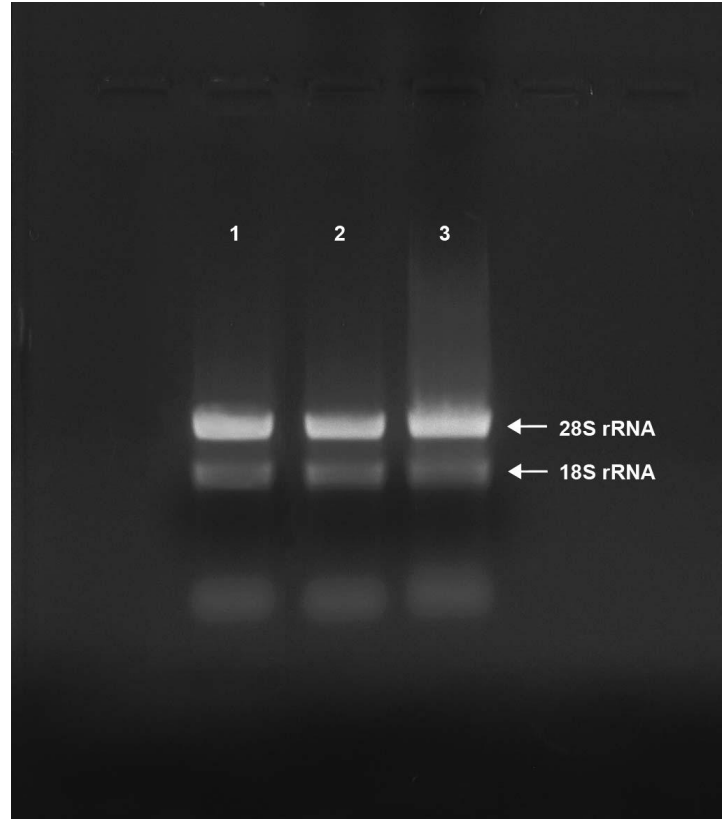
Çizelge 4.1. 8, 18 ve 36 aylık balıkların totalRNA absorbans ölçüm sonuçları

Absorbans (nm)	Yaşlar		
	8 Ay	18 Ay	36 Ay
260	0,4233	0,1404	0,053
280	0,2071	0,068	0,0256
$\frac{1}{2}$ (260/280)	2,044	2,065	2,070

8, 18 ve 36 aylık gökkuşağı alabalıklarında $\frac{1}{2}$ absorbans değerinin 2 çıkması total RNA'nın var olduğunu göstermiştir. Distilasyon faktör hesaplama formülü ile sulandırma faktörleri hesaplanarak total RNA'ların konsantrasyon eşitlemesi yapılmıştır.

4.2. Total RNA'nın Elektroforez Görüntüsü

Araştırmada kullanılan gökkuşağı alabalıklarında elde edilen total RNA'nın elektroforez jel görüntüsü Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Total RNA'nın elektroforez görüntüsü

Şekil 4.2'de sırasıyla (1; 8 aylık, 2; 18 aylık, 3; 36 aylık) balıkların total RNA görüntüleri görülmektedir. Total RNA olması gerektiği gibi üç balıkta da 18S ve 28S RNA olarak çift bant şeklinde çıkmıştır.

4.3. cDNA' nın Spektrofotometrik Ölçümlerinin Analizi

Konsantrasyon eşitlemesi yapmak için spektrofotometrede ölçümü yapılan cDNA' nın yaşlara göre absorbans değerleri Çizelge 4.3'de sunulmuştur.

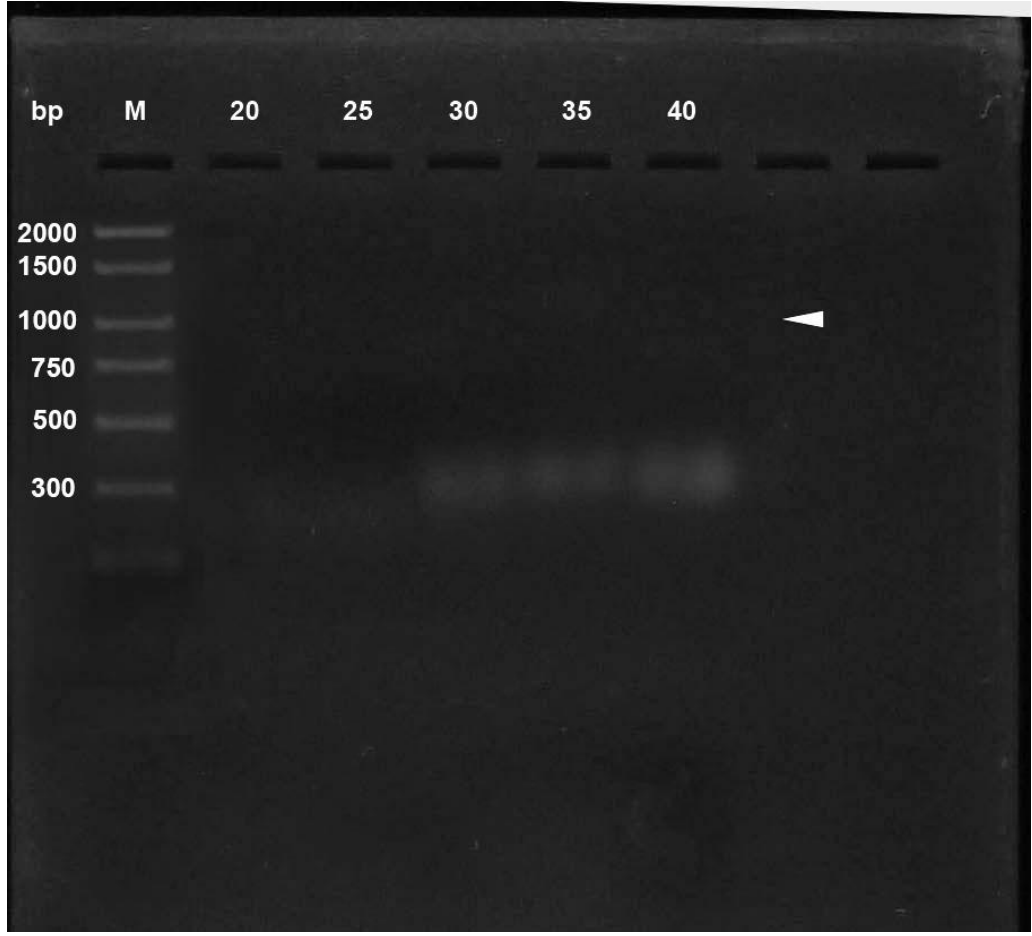
Çizelge 4.3. 8, 18 ve 36 aylık balıkların cDNA absorbans ölçüm sonuçları

Absorbans (nm)	Yaşlar		
	8 Ay	18 Ay	36 Ay
260	0,1147	0,1212	0,034
280	0,0624	0,1181	0,0213
$\frac{1}{2}$ (260/280)	1,842	1,122	1,60

Total RNA’da olduğu gibi distilasyon faktör hesaplama formülü kullanılarak konsantrasyon eşitlemesi yapılmıştır.

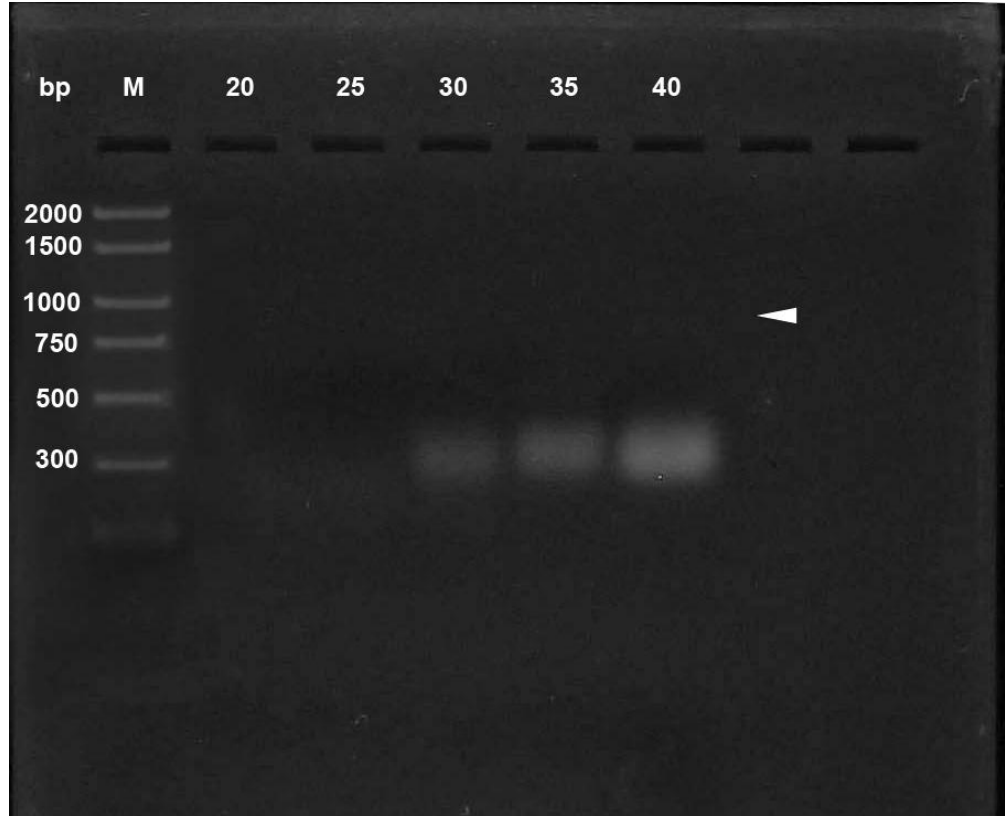
4.4. Myostatinin PCR Elektroforez Görüntüsü

Gökkuşığı alabalıklarındaki myostatin geninin izolasyonunu görmek için yapılan PCR’ın elektroforez jel görüntüleri görüntüleme sisteminde ultraviyole ışınları ile incelenmiş ve Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da verilmiştir.



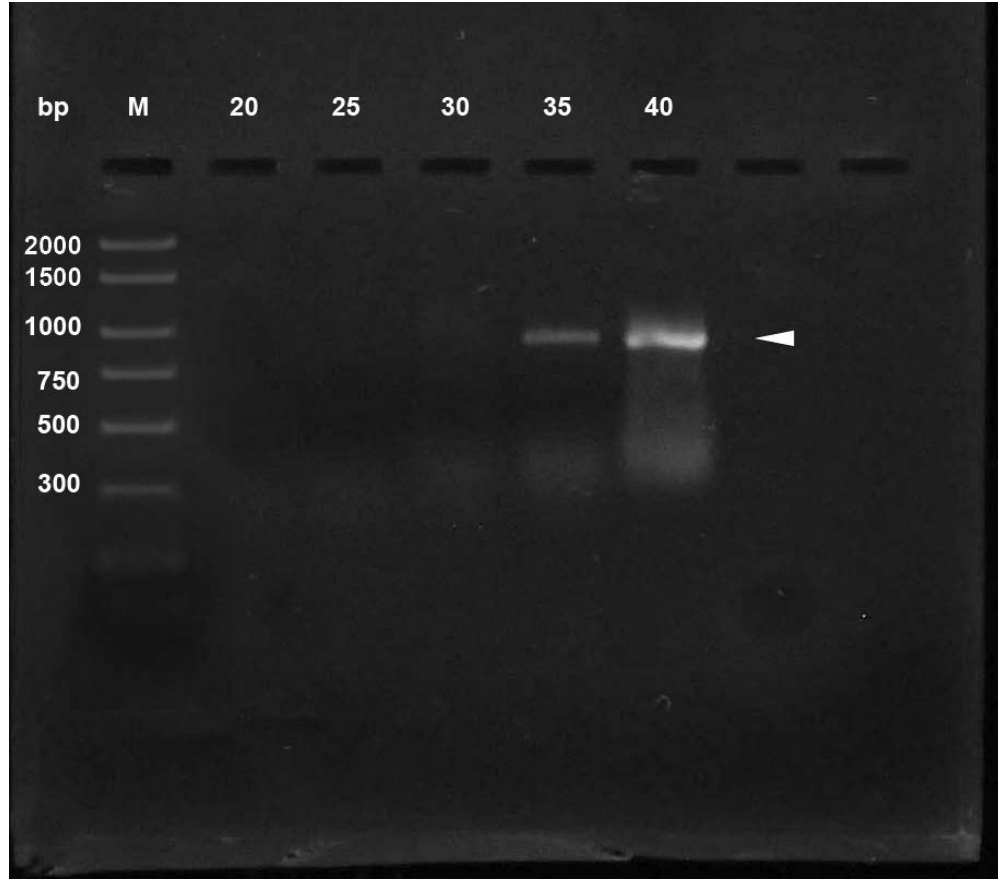
Şekil 4.4. 8 aylık gökkuşağı alabalığın myostatinin PCR elektroforez jel görüntüsü

8 aylık gökkuşağı alabalığın jel görüntüsünde işaretli bölgede 859 bp (750–1000) büyüklüğündeki bant görülmediği için bu balıkta myostatin geninin eksprese olmadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.5. 18 aylık gökkuşağı alabalığının myostatinin PCR elektroforez jel görüntüsü

8 aylık gökkuşağı alabalığında olduğu gibi 18 aylık balıkta da işaretli bölgede 859 bp (750–1000) büyüklüğündeki bant görülmediği için myostatin geni eksprese olmamıştır.

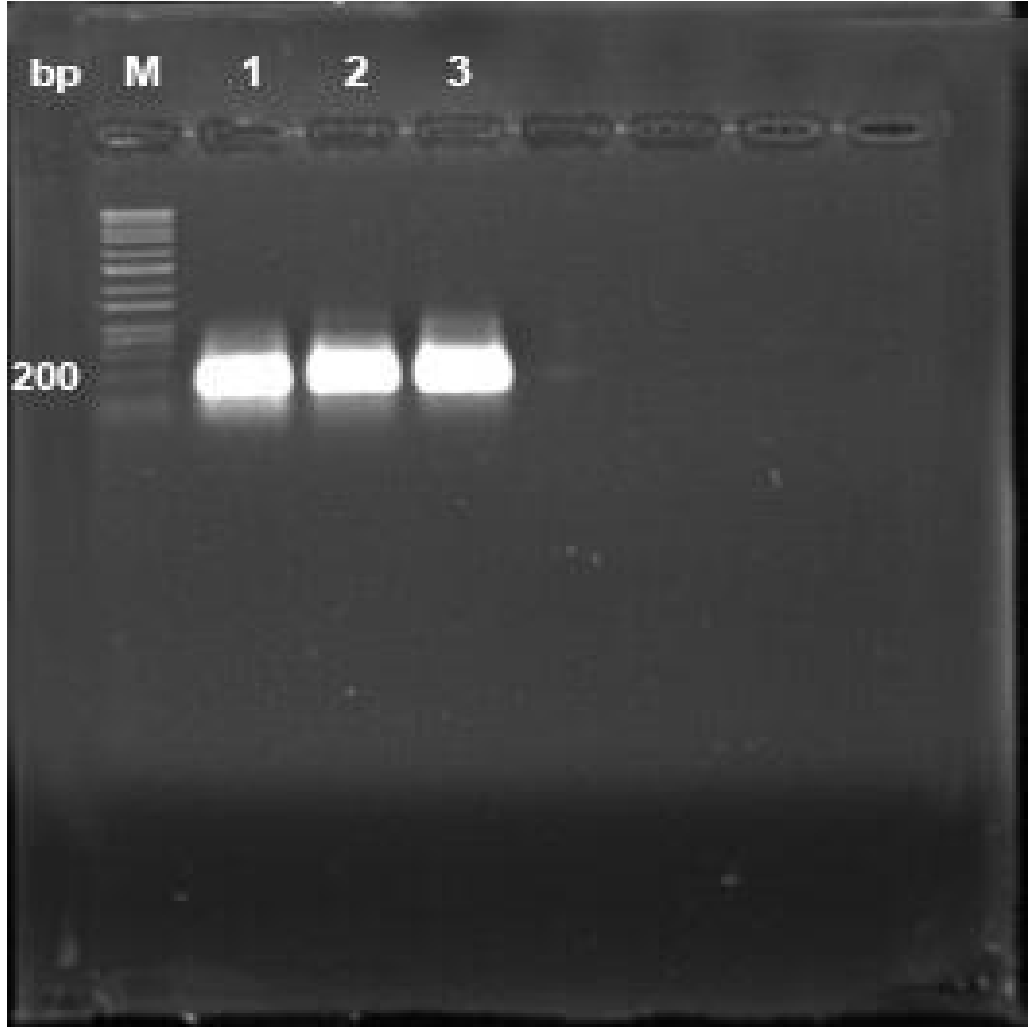


Şekil 4.6. 36 aylık gökkuşuğu alabalığının myostatinin PCR elektroforez jel görüntüsü

36 aylık gökkuşuğu alabalığında işaretli bölgede 859 bp (750–1000) büyüklüğünde bant görülmektedir. Bu da bu balıkta myostatin geninin eksprese olduğunu göstermektedir.

4.7. Aktinin PCR Elektroforez Görüntüsü

Kontrol olarak kullanılan aktinin PCR ürününün elektroforez jel görüntüsü Şekil 4,7’de verilmiştir.

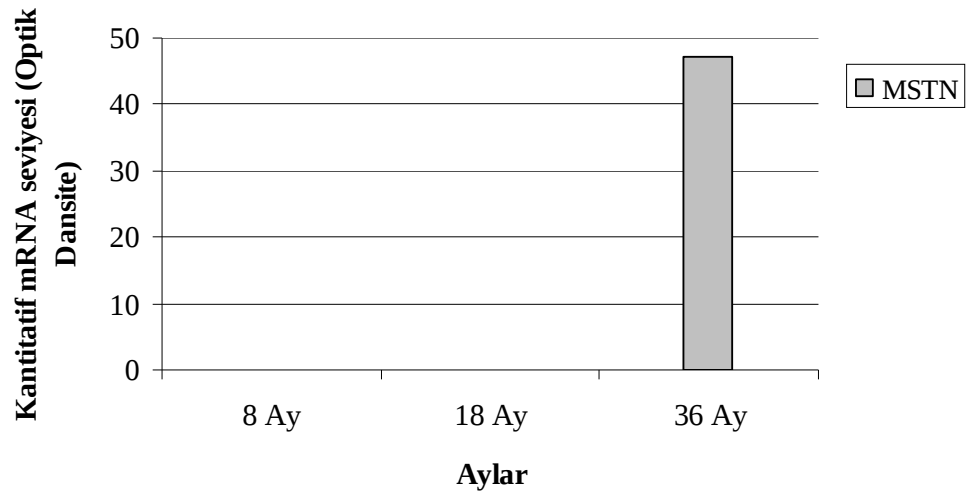


Şekil 4.7. Sırasıyla 8, 18 ve 36 aylık gökkuşığı alabalıklarında aktinin PCR elektroforez jel görüntüsü

Şekil 4,7’den de anlaşılacağı gibi 165 bp (100–200) büyüklüğündeki bant istenen bölgede çıkmıştır.

4.8. Yaşlara Göre Myostatinin Ekspresyon Grafiği

8, 18 ve 36 aylık gökkuşağı alabalıklarının myostatinlerinin aylara göre kantitatif mRNA seviyeleri Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. MSTN’nin yaşlara göre kantitatif mRNA seviyeleri.

Şekil 4,8’den de anlaşılacağı gibi yalnızca 36 aylık balıkta myostatin eksprese olmuştur. Yani bu yaşa kadar gökkuşağı alabalıklarında kas yönünden büyüme ve gelişme devam etmiştir ancak myostatin kaslanmayı engellediği için 36 aylık balıkta kaslanma durmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Analize alınan 8, 18 ve 36 aylık gökkuşağı alabalıklarında myostatin geninin kantitatif ekspresyonu araştırılmıştır. Myostatin geninin 8 ve 18 aylık balıklarda eksprese olmadığı, 36 aylık balıkta ise oldukça yüksek bir oranda eksprese olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan da kas yönünden büyüme ve gelişmenin 8, 18 aylık balıklarda devam ettiği, 36 aylık balıkta ise durduğu anlaşılmaktadır. Bundan dolayı kas yönünden büyümenin durduğu 36 aylık yaştan sonra balıkta yağ yönünden gelişme olabilmektedir.

Çalışma bulguları Roberts and Goetz (2001), Rescan *et al.* (2001), Kocabas *et al.* (2002), Biga *et al.* (2004), Terova *et al.* (2006), Rodgers *et al.* (2001), Xu *et al.* (2003) ve Weber and Bosworth (2005) ile uyum göstermiştir. Şöyle ki: Roberts and Goetz (2001), 15, 17 ve 24 aylık erkek ve dişi dere alabalıklarında myostatin geninin iki izoformunu tespit etmişlerdir. Rescan *et al.* (2001), 190-1500 gr erkek ve 160-1330 gr dişi gökkuşağı alabalıklarında bu ağırlıklarda iki myostatin geninin varlığını tespit etmişlerdir. Kocabas *et al.* (2002), 1, 2, 3, 4, 5 ve 7 yaşlı kanal kedi balıklarından alınan 12 farklı dokuda farklı düzeylerde myostatin seviyesini bulmuşlardır. Biga *et al.* (2004), 550 ± 10 gr'lık erkek ve dişi gökkuşağı alabalıklarında MSTN 1 ve 2'nin farklı seviyelerde eksprese olduğunu bulmuşlardır. Terova *et al.* (2006), 110 ± 4,47 gr'lık üç levrek balığında myostatin genini tespit etmişlerdir. Rodgers *et al.* (2001), beyaz levrek ve tilapia larvalarında myostatin gen ekspresyonun olduğunu tespit etmişlerdir. Xu *et al.* (2003), larval, juvenil ve ergin zebra balıklarında myostatin genini bulmuşlardır. Weber and Bosworth (2005), 119 ± 8 gr ağırlığındaki kanal kedi balığında myostatin genini tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak;

- Literatürler esas alınarak gökkuşağı alabalığında yapılan bu çalışmanın moleküler biyoloji açısından önemli bir adım olduğu, yani myostatin geniyle ilgili yapılan çalışmaların önemli bir halkasını oluşturduğu sonucuna varılmıştır.
- Yine bu çalışmanın moleküler biyoloji dalında bu konuda yapılacak olan diğer çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

- Bu araştırma yapılacak diğer çalışmalara örnek teşkil etmesi yanında, ülkemizde özellikle de bölgemizde moleküler biyoloji dalında yapılan ilk çalışmalardan biri olması açısından da önem kazanmaktadır.
- Elde edilen primer seleksiyon uygulamalarında bir biyo markır olarak kullanılabilir.
- Myostatin geni engellenmiş bireylerin diğer bireylere göre et verimi daha yüksek olacağından yetiştiricilik açısından tavsiye edilebilir olduğu kanısına varılmıştır.
- Balıklarda myostatin gen ekspresyonunun engellenmesi ile yağ oranı düşüp, kas oranı artacağından besin değeri oldukça yüksek olan, daha kaliteli ürünlerin elde edilebileceği söylenebilir.
- İnsan kasında myostatin gen ekspresyonunun durdurulmasıyla; kanser, AIDS, ALS (Motor Nöron Hastalığı) ve yaşlılarda görülen sarkopenik zayıflık gibi kas kaybettiren hastalıkların tedavisinin olabileceği ümit edilmektedir.
- Bu konuda yapılan çalışmalar esas alınarak sıcaklık ve besleme şartlarının myostatin gen ekspresyonunu etkilediği sonucuna varılmıştır.

Tüm bu getirilerden dolayı bu çalışma; moleküler biyoloji, yetiştiricilik ve insan gıdası açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Acosta, J., Carpio, Y., Borrot I., González, O. and Estrada, M.P. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. Elsevier B.V., 324–331.
- Alevizopoulos, A., and Mermod, N. 1997. Transforming growth factor- β : The breaking open of a black box. BioEssays., 19(7), 581–591.
- Amali, A.A., Lin, C. J., Chen, Y.H., Wang, W.L., Gong, H.Y., Lee, C.Y., Ko, Y.L., Lu, J.K., Her, G.M., Chen, T.T. and Wu, J.L. 2004. Upregulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin–1. Dev. Dyn., 229, 847–856.
- Anonim, 1997. <http://www.exn.ca/Stories/1997/05/01/01.asp>. Genetics turn pesky rodent into "Supermice" By Gloria Chang.
- Anonim, 2004. <http://www.thinkmuscle.com/ARTICLES/volk/myostatin.htm>. Think muscle. The Myostatin Gene by Elzi Volk.
- Anonim 2006a. <http://www.genbilim.com/content/view/1611/32/> Gen bilim. Türkiye bilim sitesi. Kalıtım (Genetik).
- Anonim, 2006b. <http://www.realage.com.tr/RealAge.Web/Library> RealAge Ansiklopedisi.
- Anonim, 2006c. <http://missbiyolog.blogspot.com/2006/10/gen-nedir>.
- Anonim, 2007a. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Genetik> Genetik Vikipedi Özgür Ansiklopedi.
- Anonim, 2007b. <http://en.wikipedia.org/wiki/Myostatin> Myostatin From Wikipedia, the free encyclopedia.
- Anonim, 2007c. http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/. Charts Signaling Pathway of TGF- β .
- Anonim, 2007d. http://en.wikipedia.org/wiki/Growth_factor. Growth factor From Wikipedia, the free encyclopedia.
- Arthur, P.F. 1995. Double muscling in cattle: a review. Aust. J. Agric. Res., 46, 1493–515.
- Attar, E., Özsait, B., Bulgurcuoğlu, S. and Serdaroğlu, H. 2001. Türk fertilite dergisi. Günümüzde Reprodüktif Teknoloji ve Genetik. Cilt 9, Sayı:1.
- Biga, P.R., Cain, K.D., Hardy, R.W., Schelling, G.T., Overturf, K., Roberts, S.B., Goetz, F.W., and Ott, T.L. 2004. Growth hormone differentially regulates muscle myostatin1 and 2 and increases circulating cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and Comparative Endocrinology., 138, 32–41.
- Biga, P.R., Roberts, S.B., Iliev, D.B., McCauley, L.A., Moon, J.S., Collodi, P. and Goetz, F.W. 2005. The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol., 141, 218–230.
- Canyurt, M.A., 1978. Alabalık Üretimi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Derneği Yayını, 6, Bornova, 66 s.
- Canyurt, M.A., 1983. Alabalık Yetiştiriciliği. Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı, 2 (2): 37-42.

- Carlson, C.J., Booth, F.W., Gordon, S.E., 1999. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am. J. Physiol.*, 277, 601–606.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single-step method of total RNA isolation by a single extraction with an acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156–159.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from cell and tissue samples. *Biotechniques.*, 15, 536–537.
- Dominique, J.E. and G´erard, C. 2006. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects, *Experimental Cell Research.*, 2–39.
- Emre, Y., Kürüm, V., 1998. Havuz ve Kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliği Teknikleri. Ankara, 231 s.
- Garikipati, D.K., Gahr, S.A. and Rodgers, B.D. 2006. Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes. *Journal of Endocrinology.*, 190, 879–888.
- Gonzalez-Cadavid, N.F., Taylor, W.E., Yarasheski, K., Sinha, H.I., Ma, K., Ezzat, S., Shen, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., Nair, G., Arver, S. and Bhasin, S. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 14938–14943.
- Grobet, L., Martin, L. J. R., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R. and Georges, M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the doubled-muscling phenotype in cattle. *Nature Genet.*, 17, 71–74.
- Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Riquet, J., Pirottin, D., Michaux, C., Menissier, F., Zanotti, M., Dunner, S. and Georges, M. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the yostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mammal.Genome.*, 9, 210–213.
- Hamrick, M.V., Samaddar, T., Pennington, C. and McCormick, J. 2006. Increased muscle mass with myostatin deficiency improves gains in bone strength with exercise. *J. Bone Miner Res.*, 21(3), 477–83.
- Ji, S.Q., Losinski, R.L., Cornelius, S.G., Frank, G.R., Willis, G.M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F.S. and Spurlock, M.E. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.*, 4, 1256–1273.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. and Bass, J. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.*, 7 (9), 910–6.
- Kawabata, M. and Miyazono, K. 1999. Signal transduction of the TGF- β superfamily by Smad proteins. *J. Biochem.*, 125(1), 9–16.
- Kim, H.W., Mykles, D.L., Goetz, F.W. and Roberts, S.B. 2004. Characterization of a myostatin-like gene from the bay scallop (*Argopecten irradians*). *Elsevier B.V.*, 174–179.
- Ko, C.F., Chiou, T.T., Chen, T.T., Wu, J.L., Chen, J.C. and Lu, J.K. 2006. Molecular Cloning of Myostatin Gene and Characterization of Tissue-Specific and

- Developmental Stage-Specific Expression of the Gene in Orange Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*). *Marine Biotechnology*, 1–14.
- Kocabas, A.M., Kucuktas, H., Dunham, R.A. and Liu, Z. 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1575, 99–107.
- Kocamis, H., Kirkpatrick-Keller, D.C., Richter, J. and Killefer, J. 1999. The ontogeny of myostatin, follistatin and activin-B mRNA expression during chicken embryonic development. *Growth Dev. Aging.*, 63, 143–150.
- Kocamis, H. and Killefer, J., 2002. Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. *Domestic Animal Endocrinology.*, 23, 447–454.
- Lalani, R., Bhasin, S., Byhower, F., Tarnuzzer, R., Grant, M., Shen, R., Asa, S., Ezzat, S. and Gonzalez-Cadavid, N.F., 2000. Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J. Endocrinol.*, 167, 417–428.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S. and Kambadur, R. 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. *Journal of Biological Chemistry.*, 51, 49831–49840.
- Langley, B., Thomas, M., McFarlane, C., Gilmour, S., Sharma, M. and Kambadur, R. 2004. Myostatin inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation through an Rb-independent pathway. *Oncogene.*, 23, 524–534.
- Lee, S.J. and McPherron, A.C., 1999. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9, 604–607.
- Lee, S.J., Reed, L.A., Davies, M.V., Girgenrath, S., Goad, M.E.P., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Barker, C., Ehrmantraut, G., Holmstrom, J., Trowell, B., Jiang, M.S., Sebald, S.M., Matzuk, M., Li, E., Liang, L.F., Quattlebaum, E., Stotish, R.L. and Wolfman, N.M. 2005. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci.*, 102(50), 18117–18122.
- Luo, S. 2000. Transforming growth factor-beta on human normal and malignant trophoblast cells: role in cell growth and hormonogenesis. *National Library of Canada.*, 1–103.
- Lyons, R.M. and Moses, H.L. 1990. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur. J. Biochem.*, 187(3), 467–73.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F. and Patarnello, T., 2001a. Characterization of the Myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Mar. Biotechnol.*, 3, 224–230.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Cardazzo, B., Rizzo, G. and Patarnello, T. 2001b. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *Elsevier Science B.V.*, 36–40.
- Martin, C.I., Johnston, I.A. 2005. The role of myostatin and the calcineurin-signalling pathway in regulating muscle mass in response to exercise training in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Journal of Experimental Biology.*, 208, 2083–2090.
- Massague, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6, 597–641.
- Massague, J. 1998. TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 753–791.

- McPherron, A. C. and Lee, S. J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94 (23), 12457–61.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.*, 387, 83-90.
- McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M. and Kambadur, R. 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *Journal of Cell Biology.*, 162, 1135–1147.
- Niall, H.D., Hogan, M.L., Sauer, R., Rosenblum, I.Y., Greenwood, F.C. 1971. Sequence of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68, 866-869.
- Ojima, N., Yamashita, M. and Watabe, S. 2005. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 329, 51-57.
- Ostbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T. and Andersen, O. 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.*, 268, 5249–5257.
- Pfeffer, E., 1979. Die Vorlesung von Fischernährung. Institut für Tierernährung, Göttingen Universität, GDR.
- Rescan, P.Y., Jutel, I. and Ralliere, C. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology.*, 204, 3523-3529.
- Rios, R., Carneiro, I., Arce, V.M. and Devesa, J. 2001. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 280, 561–566.
- Rios, R., Carneiro, I., Arce, V.M. and Devesa, J. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology – Cell Physiology.*, 282, C993–C999.
- Roberts, A.B., Sporn, M.B., 1990. The transforming growth factor-beta. In: Sporn MB, Roberts AB (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology : Peptide Growth Factors and their Receptors*. Springer, Heidelberg., 4-19.
- Roberts, S.B. and Goetz, F.W., 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Lett.*, 491, 212–216.
- Roberts, S.B. and Goetz, F.W., 2003. Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout. *Molecular and Cellular Endocrinology.*, 210, 9–20.
- Roberts, S.B., McCauley, L.A.R., Devlin, R.H. and Goetz, F.W. 2004. Transgenic salmon overexpressing growth hormone exhibit decreased myostatin transcript and protein expression. *The Journal of Experimental Biology.*, 207, 3741-3748.
- Rodgers, B.D. and Weber, G.M., 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 129, 597–603.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V. and Levine, M.A. 2001. Isolation and Characterization of Myostatin Complementary Deoxyribonucleic Acid Clones from Two Commercially Important Fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops* *Endocrinology.*, 142, 1412-1418.

- Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hubner, C., Riebel, T., Komen, W., Braun, T., Tobin, J.F. and Lee, S.J. 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med.*, 350, 2682–2688.
- Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P.J. and Bass, J.J. 1999. Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell Physiol.*, 180, 1-9.
- Smith, G.R., Stearly, R.F., 1989. The Classification and Scientific Names of Rainbow Trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Aquaculture*, 78: 153-161.
- Sonstegard, T.S., Lopez-Corrales, N.L., Kappes, S.M., Beattie, C.W. and Smith, T.P. 1997. Comparative mapping of human Chromosome 2 identifies segments of conserved syntenic near the bovine mh locus. *Mamm. Genome.*, 8, 751–755.
- Steffens, W., 1981. *Moderne Fischwirtschaft*. Verlag J. Neumann-Neudamm. Neulsungen. Berlin. Basel. Wien., 375.
- Sterba, G., Hail, N.R., 1967. *Freshwater Fishes of the World*. Studio Vista Hd., London.
- Temizkan, G. ve Arda, N. 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, Yayın No: 2. S. 67-68, 72, 90, 93, 118.
- Terova, G., Bernardini, G., Bineli, G., Gornati, R. and Saroglia, M. 2006. cDNA encoding sequences for myostatin and FGF6 in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) and the effect of fasting and refeeding on their abundance levels. *Domest Anim Endocrinol.*, 30, 304–319.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J. and Kambadur, R. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry.*, 275, 40235–40243.
- Walsh, F.S., Celeste, A.J. 2005. Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem. Soc. Trans.*, 33, 1513–1517.
- Weber, T.E. and Bosworth, B.G. 2005. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. *Aquaculture.*, 246, 483–492.
- Wehling, M., Cai, B., Tidball, J.G., 2000. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *Faseb J.*, 14, 103–110.
- Xu C, Wu G, Zohar Y, Du S.J. 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.*, 206, 4067–4079.
- Ye, H.Q., Chen, S.L., Sha, Z.X. and Liu, Y. 2007. Molecular Cloning and Expression Analysis of the Myostatin Gene in Sea Perch (*Lateolabrax japonicus*). *Marine Biotechnology*. 10.1007/s10126-006-6093-6.
- Yingling, J.M., Wang, X.F. and Bassing, C.H. 1995. Signaling by the transforming growth factor-beta receptors. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1242, 115–36.
- Zhang, F., Endo, S., Cleary, L.J., Eskin, A. and Byrne, J.H. 1997. Role of transforming growth factor-beta in long-term synaptic facilitation in *Aplysia*. *Science.*, 275(5304), 1318–20.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Balıkesir'in Gönen ilçesinde doğdu. İlkokul İstanbul, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2000 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Hayvansal Üretim Su Ürünleri Bölümü'nden 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı ve halen öğrenimine devam etmektedir.