

Eskişehir Bölgesi Özel Çiftliklerinde Yetiştirilen Arap Atlarında SCID Mutant Geni
Varlığının Araştırılması

Mustafa Doğan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2019

Investigation of SCID Mutant Allele in Arabian Horses Reared in Some Private Farms of
Eskişehir Region

Mustafa Doğan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Agricultural Biotechnology

May 2019

Eskişehir Bölgesi Özel Çiftliklerinde Yetiştirilen Arap Atlarında SCID Mutant Geni
Varlığının Araştırılması

Mustafa Doğan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Kaya

Bu tez, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu (Proje No:2018-2033) tarafından desteklenmiştir.

Mayıs 2019

ONAY

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mustafa DOĞAN'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırlandığı 'Eskişehir Bölgesi Özel Çiftliklerinde Yetiştirilen Arap Atlarında SCID Mutant Geni Varlığının Araştırılması' başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammet KAYA

İkinci Danışman: --

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ece TURHAN

Üye: Doç. Dr. Özden ÇOBANOĞLU

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhammet KAYA

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu 'nun tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Muhammet KAYA danışmanlığında hazırlamış olduğum 'Eskişehir Bölgesi Özel Çiftliklerinde Yetiştirilen Arap Atlarında SCID Mutant Geni Varlığının Araştırılması' başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu: tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığıma: tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğime; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 17/05/2019

Mustafa DOĞAN

İmza

ÖZET

Eskişehir Çifteler ve Mahmudiye’de Osmanlı Devleti döneminde başlatılan safkan Arap atı yetiştiriciliğine günümüzde kamu (Anadolu Tarım İşletmesi Müdürlüğü) ve özel çiftlikler aracılığıyla devam edilmektedir. Bu yörede safkan Arap atı numuneleri yetiştirilmiş, yetiştirilen materyal ile Türk Arap atı yetiştiriciliğine ve yarış sahalarına büyük oranda katkıda bulunulmuştur.

Arap atlarında çeşitli kalıtsal hastalıkların var olduğu bilinmektedir ve bu kalıtsal kusurlara sebep olan mutasyonların moleküler tanı yöntemleri üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. SCID taylarda yapılan çalışma sonucunda, 9’uncu kromozomun kısa kolunda (ECA9p12) olan DNA-bağımlı protein kinazın katalitik alt ünitesi geninde (DNA-PKcs) meydana gelen 9480 kodonu ile başlayan 5 bazlık bir delesyonun hastalığa sebep olduğu belirlenmiştir. SCID otozomal resesif kalıtım modeline sahiptir ve doğan tayların bağışıklık sistemleri oldukça zayıftır.

Yapılan bu tez çalışması ile Eskişehir ve çevresindeki özel çiftliklerde yetiştirilen farklı dokuz özel işletmeden alınan toplam 115 baş Arap atı materyalinde SCID (Şiddetli Kombine İmmun Yetmezlik) mutant geni varlığı DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak incelenmiş ve araştırılan atların SCID mutant alleline sahip olmadıkları tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arap atı, DNA dizi analizi, Kalıtsal kusur, SCID.

SUMMARY

Eskişehir Çifteler and Mahmudiye started in the Ottoman Empire period of thoroughbred Arabian horse breeding is now in public (Anadolu Tarım İşletmesi Müdürlüğü) institutions and private farms. In this region, thoroughbred Arabian horse specimens were cultivated, and with the material it produced, it contributed greatly to Turkish Arabian horse breeding and racing fields.

It is known that there are several hereditary diseases in Arabian horses and studies on the molecular diagnostic methods of mutations that cause these hereditary defects are being carried out. A study of Severe Combined Immuno Deficiency (SCID) trials has shown that a 5-base deletion starting with codon 9480 occurring in the catalytic subunit gene of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) in the short arm of 9th chromosome (ECA9p12). SCID has an autosomal recessive inheritance pattern and the immune system of the born foals is very weak.

The aim of this study was to detect the SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) mutant allele in a total of 115 head Turkish Arabian horse material raised from nine different private farms in Eskişehir, by using DNA sequence analysis method. It was determined that the investigated horses did not carry the SCID mutant allele.

Keywords: Arabian horses, DNA sequence analysis, Heritability disorders, SCID.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışma konusunu seçmemde bana destek veren çalışmam boyunca bilgi, öneri, deneyim ve görüşlerini her zaman benimle paylaşan ve bana her konuda yardımcı olan yüksek lisans tez programının yürütülmesi esnasında çalışmalarımı izleyip yön veren değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Muhammet KAYA'ya ve yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda yardım eden, destekleyen ve imkanlarından faydalandığım Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü öğretim üye ve elemanlarına Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ece TURHAN şahsında en kalbi duygularıyla teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan kan örneklerinin alındığı Eskişehir Mahmudiye'de yerleşik çiftlik sahiplerinden Yenel Kaya, Beşir Kaya, Bayram Gözübüyük ve Ramazan Çoban'a şükranlarımı sunarım

Beni yetiştiren ve bugüne getiren, bu çalışmamda ve yaşamım boyunca maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen aileme ve kız kardeşim Zehra Nur'a, ayrıca bana güven veren bende özel bir yeri olan arkadaşım Muhammet İSKENDER'e teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Bu tez, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu (Proje No:2018-2033) tarafından desteklenmiştir.

Mustafa DOĞAN

İmza

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET | vi |
| SUMMARY | vii |
| TEŞEKKÜR | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xiii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI | 4 |
| 2.1 Arap Atı ve Irkın Özellikleri | 8 |
| 2.2 Kalıtsal Kusurlar | 9 |
| 2.3 Şiddetli Kombine İmmun Yetmezlik (SCID)..... | 10 |
| 2.4 DNA Dizi Analizi (Sekanslama) | 16 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 18 |
| 3.1 Materyal | 18 |
| 3.1.1 Hayvan Materyali | 18 |
| 3.1.2 Araç ve Gereçler | 18 |
| 3.2 Yöntem..... | 19 |
| 3.2.1 Kan Örneklerinin Alınması ve Genomik DNA İzolasyonu | 19 |
| 3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) | 22 |
| 3.2.3 DNA Dizi Analizi (Sekanslama) | 26 |
| 3.2.4 Genotiplerin Belirlenmesi ve Gen Frekanslarının Hesaplanması | 27 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 28 |
| 4.1 Genomik DNA İzolasyonu..... | 28 |
| 4.1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) | 30 |
| 4.1.2 PCR Ürünlerinin Dizi Analizi | 31 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 34 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ | 35 |
| EK AÇIKLAMALAR | 43 |
| Ek Açıklama-A: Atlarda Görülen Bazı Kalıtsal Hastalıklar..... | 44 |
| Ek Açıklama-B: Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereç Listesi. | 46 |
| Ek Açıklama-C: SCID Analiz Sonuçları. | 47 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1. FAO'nun verilerine göre dünyadaki at popülasyonunun kıtalara göre dağılımı | 5 |
| 2.2. SCID karakterli otozomal resesif kalıtım modeli. | 13 |
| 3.1. Thermofisher scientific thermal cyclers 96 örneklik PCR cihazı..... | 23 |
| 3.2. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmiş hali. | 25 |
| 3.3. PCR ürünlerinin yatay elektroforez cihazında jelde yürütülmesi. | 26 |
| 4.1. Bazı örneklerden saflaştırılan DNA'ların jel kontrolü..... | 28 |
| 4.2. PCR ile DNA amplifikasyonunun sonuçları..... | 30 |
| 4.3. Birkaç örneğe ait dizi analizinin CodonCode programı ile sıralaması (align) | 32 |
| 7.1.a. SCID Analiz Sonuçları. | 47 |
| 7.1.b. SCID Analiz Sonuçları..... | 48 |
| 7.1.c. SCID Analiz Sonuçları..... | 49 |
| 7.1.d SCID Analiz Sonuçları..... | 50 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Cizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1. FAO'nun verilerine göre Türkiye'deki at sayısı. | 1 |
| 2.2. TİGEM işletmelerindeki Türk Arap atı sayısı. | 7 |
| 2.3. Beş baz çifti delesyonunu gösteren DNA-PKcs geninin kısmi dizisi. | 11 |
| 2.4. Bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda tayların SCID frekansları. | 15 |
| 3.1. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları. | 22 |
| 3.2. Kullanılan primer çifti. | 22 |
| 3.3. PCR programı. | 23 |
| 4.1. Elde edilen gDNA örneklerinin miktar ve kaliteleri. | 29 |
| 7.1. Atlarda görülen bazı kalıtsal hastalıklar ve hastalık genlerinin tanımlanması. | 44 |
| 7. 2. Araştırmada kullanılan araç ve gereç listesi. | 46 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C

Açıklama

Santigrat derece

Kısaltmalar

A

Adenin

bç (bp)

Baz çifti

bd

Bidestile su

C

Sitozin

DNA

Deoksiribonükleikasit

DNA-PKcs

DNA-bağımlı protein kinazın katalitik alt ünitesi

dNTP

Deoksiribonükleotidtrifosfat

dATP

DeoksiadenozinTrifosfat

dTTP

DeoksitimidinTrifosfat

dGTP

DeoksiguanozinTrifosfat

dCTP

DeoksisistidinTrifosfat

ddATP

DideoksiadenozinTrifosfat

ddTTP

DideoksitimidinTrifosfat

ddGTP

DideoksiguanozinTrifosfat

ddCTP

DideoksisistidinTrifosfat

d

Döngü

EDTA

Ethylendiamintetraaceticacid

G

Guanin

g

Gram

Ig

İmmunoglobulin

IgA

İmmunoglobulin A

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u> |
|---------------------------|---|
| IgG | İmmunoglobulin G |
| IgM | İmmunoglobulin M |
| IL | İnterlökin |
| Kb | Kilobaz |
| L | Litre |
| MgCl ₂ | Magnezyum klorür |
| M | Molar |
| mM | Mikromolar |
| mg | Miligram |
| mL | Mililitre |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| NaCl | Sodyum Klorür |
| ng | Nanogram |
| NK | Negatif Kontrol |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RAG | Rekombinaz Aktive edici Gen |
| Rpm | Rotation per minute - Dakikada döngü sayısı |
| RNAaz | Ribonükleaz |
| s | Saniye |
| T | Timin |
| Taq | Termus Aquaticus |
| Tm | Melting Temperature-Erime Sıcaklığı |
| TE | Tris-EDTA |
| UV | Ultra Violet |
| V | Volt |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türk kültürü ve tarihinde at yetiştiriciliği çok önemlidir, Arap atları dünyadaki at yetiştiriciliğinin gelişmesine ve melezleme ile yeni ırkların oluşturulmasında önemli bir yere sahiptir. Bu durum Arap atlarının yetiştirilmesi konusunda titizlikle durulmasına ve Cumhuriyetin kurulmasından sonra da ülke ihtiyaçları doğrultusunda yetiştirme ve ıslah faaliyetlerine oldukça fazla önem verilmesine neden olmuştur.

Türkiye at yetiştiriciliğinde dünyanın önde gelen ülkelerinden biri konumundadır. Türkiye’de başta yerli tipler olmak üzere çeşitli ırktan atlar yetiştirilmektedir. Bu atların büyük bir bölümü tarım ve binek hayvanı olarak bir kısmı ise başta İngiliz ve Arap atları olmak üzere yarış atları olarak kullanılmaktadır.

Türkiye, Rusya, Amerika ve Katar’daki Arap atlarının yarış performansları karşılaştırıldığında, Türk Arap atları dünya piyasasında iyi yere sahiptir (TJK, 1997). Eskişehir ili, Türkiye yarış atı yetiştiriciliğinde önemli yerlerden biridir. Yarış sahalarında koşan ve başarılı olan birçok atın soy kütüğü incelendiğinde Eskişehir’deki işletmelerin isimleri ön plana çıkmaktadır. Eskişehir ili Mahmudiye ilçesinde ağırlıklı olmak üzere ilimizde toplam 73 adet özel harada safkan at yetiştiriciliği yapılmaktadır. Yetiştirici elinde 2014 itibari ile 1060 adet safkan kısarak ve aygır bulunmaktadır. Muhtelif yaşlardaki taylarda bu rakama dahil edildiğinde yaklaşık 1600 civarında safkan at Eskişehir’de bulunmaktadır (Anonim, 2014).

Üzerinde durulan birçok kalıtsal kusur o özelliğin meydana gelmesini sağlayan resesif gen bakımından homozigot genotiplerde ortaya çıkmakta ve popülasyonda bu şekilde fark edilebilmektedir. Heterozigot genotipte olan bireylerin fenotiplerinde çoğunlukla herhangi bir değişiklik meydana gelmemektedir. Bunun sonucunda genetik kusurun meydana gelmesine neden olan resesif etkili gen belirli oranlarda gelecek generasyonlara aktarılmaktadır. Böylece genetik kusurun oluşmasından sorumlu olan genin popülasyondaki varlığı ve buna bağlı olarak da frekansı generasyonlar boyunca artabilmektedir. Resesif etkili bir gen tarafından belirlenen genetik bir kusur bakımından

heterozigot genotipte olan bireylerin tespit edilmesi ve bu gene sahip olan hayvanların populyasyondan uzaklaştırılması çok daha önemlidir. Moleküler analiz yöntemleri kalıtsal hastalıkların teşhisinde hızlı ve kesin sonuçlar vermesi nedeniyle son derece önemlidir. Kalıtsal kusurların moleküler teknikler kullanılarak gen düzeyinde teşhisine önem verilmesi ile kalıtsal hastalıklar ucuz ve pratik olarak teşhis edilirken ekonomik kayıplar da azaltılabilir. Damızlık olarak seçilen hayvanların damızlık olarak kullanılmasından önce o ırkta en sık görülen kalıtsal hastalıklar yönünden taranması ve taşıyıcı olup olmadıklarının belirlenmesi gerekmektedir. Arap atlarında farklı kalıtsal hastalıklar görülmektedir. Bazı kalıtsal kusurların mutasyonları moleküler düzeyde tanımlanmış ve kalıtım modelleri belirlenmiştir. Arap atlarında Şiddetli Kombine İmmün Yetmezlik (Several Combined Immune Deficiency- SCID), Lavanta Renkli Tay Sendromu (LFS), Serebellar Abiotrofi (Cerebellar Abiotrophy- CA) ve Tay İmmün Yetmezlik Sendromu (Foal Immunodeficiency Syndrome- FIS) gibi kalıtsal hastalıklar belirlenmiştir (OMIA, 2019).

Arap atlarında görülen kalıtsal kusurlardan biri de SCID kalıtsal hastalığıdır. SCID, Arap tayı ölümlerinin nedenlerinden biri olup antimikrobiyal tedaviye yanıt vermemektedir. SCID'in atlardaki genetik temeli; atların 9'uncu kromozomun kısa kolunda (ECA9p12), DNA-bağımlı protein kinazın katalitik alt ünitesi geninde (DNA-PKcs) 9480 kodonu ile başlayan 5 baz (TCTCA) çiftlik bir delesyondur. Bu mutasyon, bir çerçeve kayması (frameshift) mutasyonuna ve proteinin erken sonlanmasına neden olur ve fosfatidilinositol 3 kinazı (PI3 kinase) içeren 967 amino asidin silinmesi ile sonuçlanır (Brooks vd., 2018).

Mutant SCID genotipli olan hayvanların kemik iliklerinde, lenf düğümlerinde ve dalakta T ve B lenfositleri tükenmesini göstermektedir. Genellikle hücrel ve humoral bağışıklık yetersizliği ile ilişkili kısa süreli spesifik olmayan ikincil enfeksiyonlardan sonra kaybolur. İlk SCID olguları 5-8 aylık Arap taylarının enfeksiyonlara karşı sınırlı direnç göstermesi ile bildirilmektedir. Çalışmalar, SCID'li taylarda görülen bağışıklık yetersizliğinin, lymphopenia, hipogammaglobulinemi, lymphoid organlarda germinal merkezlerin oluşmamasından kaynaklandığını göstermektedir (Perryman vd., 1978).

Yurtdışında yapılan çalışmalarda otozomal resesif SCID genetik bozukluğunun sadece Arap atı ve melezlerinde görüldüğü bildirilmiştir (Piro vd., 2008). Gelişmiş ülkelerde (Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya, Kanada, İngiltere, vb.) oldukça kısa sürede güvenilir sonuçlar sağlayan rutin DNA testleri profesyonel at yetiştiriciliğinde kalıtsal hastalıkların tanımlanması için kullanılmaktadır. Testler sonucunda, kalıtsal hastalık taşıyıcısı atlar yetiştiricilik programından çıkartılarak veya kontrollü melezleme yapılarak bu genetik kusurların yeni nesillere taşınmaması sağlanır (Bowling ve Ruvinsky, 2000; Zavrtañık vd., 2005). Türkiye’de atların kalıtsal kusurlarının belirlenmesi için sadece bir çalışma vardır (Çınar Kul vd., 2014). Kalıtsal kusurlardan ari popülasyonlar oluşturmak ve devam ettirmek için haraların tümünde bulunan atlar genetik kusurlar bakımından moleküler analize tabi tutulmalıdır.

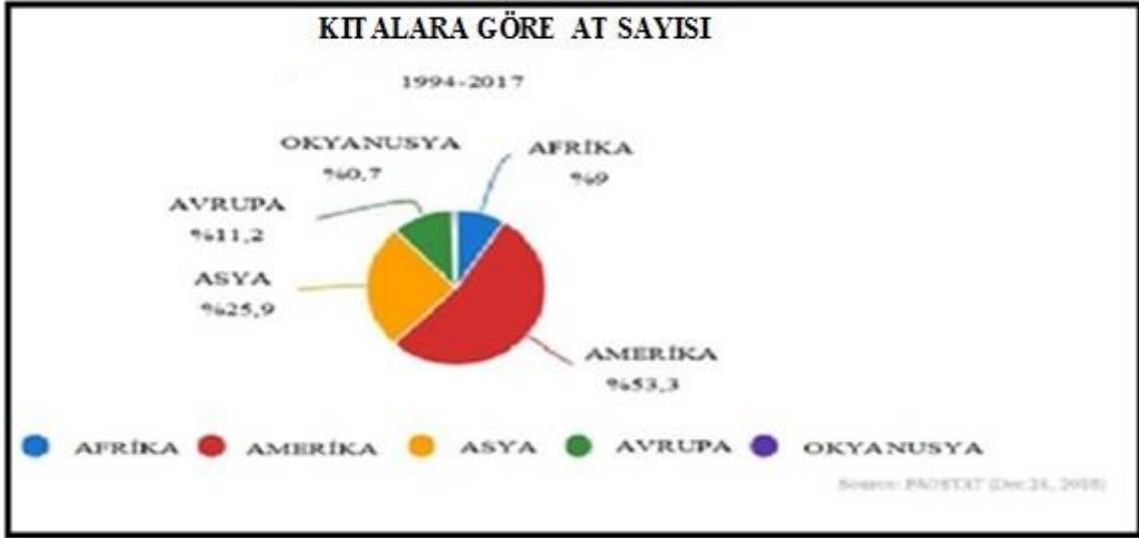
Yapılan bu çalışma ülkemiz at yetiştiriciliği konusunda önemli bir yere sahip olan Eskişehir Mahmudiye ilçesinde özel işletmelerde yetiştirilen Arap atlarında yürütülmüş olup DNA dizi analizi (sekanslama) yöntemi ile SCID mutant geni varlığı araştırılarak bu konudaki eksikliğin giderilmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Atlar trinominal adlandırmada Linnaeus (1758) tarafından *Equus ferus caballus* olarak tanımlanmıştır. Taksonomik sınıflandırmaya göre atın zoooljik sistemdeki yeri ise Őu Őekildedir (Bailey ve Brooks, 2013);

| | | | |
|-----------|------------------------------|-----------|----------------------------------|
| Alem | : Hayvanlar; Animalia | Alt Takım | : Tektırnaklılar; Perissodactyla |
| Őube | : Omurgalılar; Vertebrata | Familya | : Atgiller; Equidae |
| Sınıf | : Memeliler; Mammalia | Cins | : Equus |
| Alt Sınıf | : Plesantalılar; Placentelia | Tür | : At; Equus caballus |
| Takım | : Tırnaklılar; Ungulata | | |

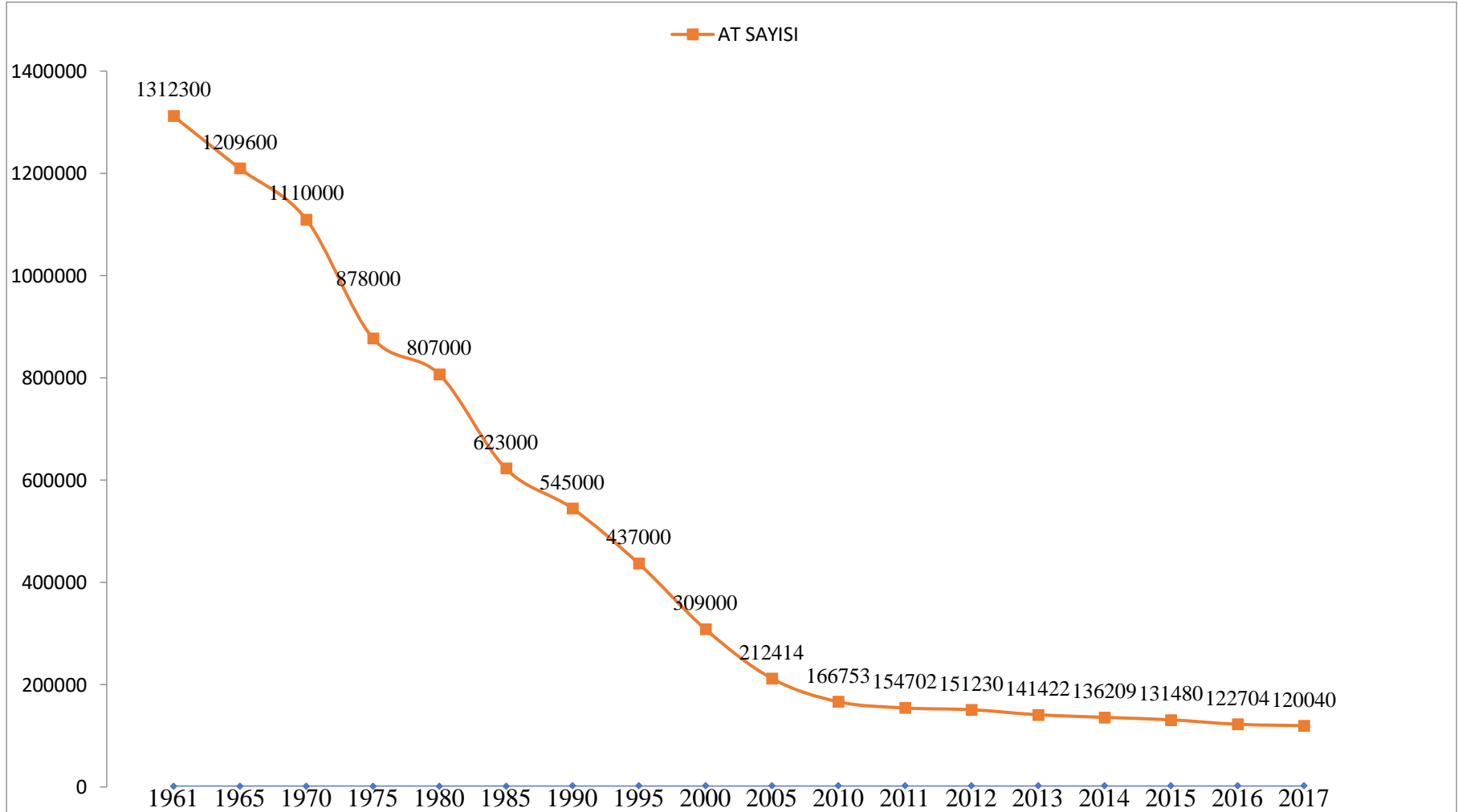
FAO'nun istatistiki veri araŐtırmalarına göre dünyadaki at sayısı 1994 yılında 75.404.935 baş iken 2017 yılında 60.566.601 baŐtır. Şekil 2.1'de FAO'nun verilerine göre dünyadaki at populasyonunun kıtalara göre dağılımı yer almaktadır. Yine 2017 FAO sonuŐlarına göre dünya at varlığının yarısından fazlası 32.176.802 baş atın ABD'de olduğu bildirilmektedir.



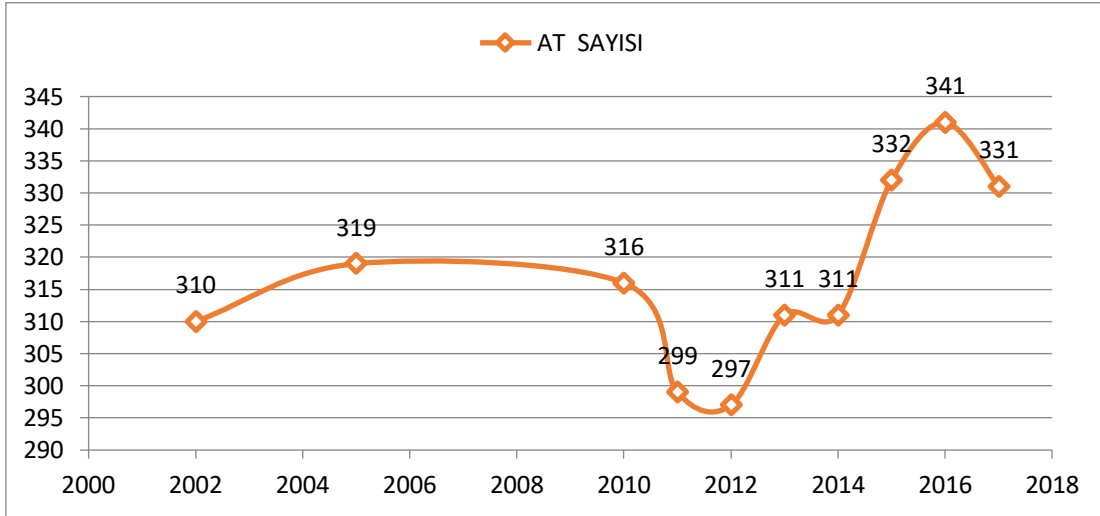
Şekil 2.1. FAO'nun verilerine göre dünyadaki at popülasyonunun kıtalara göre dağılımı (2017).

Türkiye’de at sayısı ise savaşlar nedeniyle damızlıkların büyük bölümünün elden çıkması, ekonomik zorluklar, yetiştiricilikteki yetersizlikler gibi nedenlerle giderek azalmış ve 1930’lu yıllarda 490 binlere kadar düşmüştür. Haraların ve aygır depolarının faaliyetleri ile at sayısı artarak 1928’de 490 bin, 1940’da 898 bin, 1950’de 1.140 bin ve 1960’da 1.312 bin’e ulaşmıştır. Zamanla tarımın makineleşmeye başlaması, ordunun motorize olması, ülke şartları ve ihtiyaçlarının değişmesi ile ata olan ihtiyacın azalması sonucu at sayısı azalmış ve 2011 yılında 154 bin’ e düşmüştür (Yarkın, 1962; Anonim 2014 a). 2017’de ise 120 bin seviyelerine gerilemiştir (Çizelge 2.1) (FAO). Çizelge 2.2’de ise Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM) bünyesinde kayıtlı bulunan bazı yıllara ait Türkiye’deki at sayısı miktarları yer almaktadır.

Çizelge 2.1. FAO'nun verilerine göre Türkiye'deki at sayısı.



Çizelge 2.2. TİGEM işletmelerindeki Türk Arap atı sayısı.



Ülke koşulları ve gereksinimindeki değişimle birlikte, ziraa, ulaşım ve askeri amaçla yapılan faaliyetler, çekim ve binek atları olarak yetiştirilirken yarış ve spor atları yetiştiriciliğine doğru bir yönelim olmuştur. Nitekim bu dönemde çeşitli fuarlar ve at yarışları düzenlemek gibi teşvik edici önlemler alınmıştır (Arpacık, 2010).

Türk at ırkları, Türkiye'dekiler ve Türkiye dışındakiler olarak ayrıldığında toplam 37 tane at ırkı vardır. Bunlardan birisi de Türk Arap atlarıdır (Güleç 2005). Dünya Arap Atı Organizasyonu (WAHO) tarafından onaylanan tanımlamaya göre her ülke sahip olduğu Arap atının başına kendi ülke adını koyarak isimlendirmektedir. Bu sebeple bu ırk Türkiye'de "Türkiye Arap Atı" olarak bilinir (Anonim, 2019 a).

At yarışlarının önem kazanması ile Arap ve İngiliz atı yetiştiriciliğinde gelişme olmuştur. Türkiye, Arap atını yarış atı olarak kullanan ülkelerin başında gelmektedir. Yakın zamana kadar hara adı ile faaliyet gösteren daha sonra Tarım İşletmesi'ne dönüştürülen 7 harada (Karacabey, Çifteler, Sultansuyu, Konya, Karaköy, Çukurova ve Altındere) at yetiştiriciliği yapılırken günümüzde bunlardan devlete ait yalnızca Karacabey (Bursa), Anadolu (Eskişehir) ve Sultansuyu (Malatya) İşletmeleri'nde, özelde ise ağırlıklı olarak Eskişehir, Urfa, Mardin, Adana ve Bursa'da olmak üzere birçok harada Arap atı yetiştiriciliği yapılmaktadır. İngiliz atı yetiştiriciliği ise tamamen özel yetiştiriciler tarafından yapılmaktadır (Yaşar, 1996; Arpacık, 2010; Hacan, 2011).

2.1 Arap Atı ve Irkın Özellikleri

Arap atı, yarış becerisinin yanı sıra çekim gücü ve binek yeteneği olan kombine yönlü bir ırktır (Aksüyek ve Arpacık, 1990). Dünyada bilinen en eski saf ırk olup MÖ. 2000 yıllarından beri Arap yarımadası ve çevresinde yetiştirilmektedir (Arpacık, 2010).

At ırkları arasında Arap atı, kendine has güzellik, vücut yapısındaki tenasüp ve ahengin yanında, kalıtsal gücü (özelliklerini döllerine aktarma gücü-prepotensi) yüksek ve sağlam bir karaktere sahip olması, sürat ve değişik tabiat şartlarına dayanıklılığı ile at yetiştiriciliğinde yeni ırkların geliştirilmesi ve yetiştirilmesinde kullanılmaktadır (Çelebi, 1990; Hacan, 2011). Nitekim, İngiliz, Quarter ve Morgan atları gibi ünlü ırklara yüksek irsi yapısı ile örnek oluşturmuştur. (Özbeyaz ve Akçapınar, 2006; Hacan, 2011).

Arap atı sahip olduğu harmoni ve tenasüp ile vücut bölümlerinin yapısı bakımından safkan Arap atı özelliklerini iyi bir şekilde taşımaktadır. Arap atında; güzel gösterişli küçük, kuru ve zarif bir baş; gözler iri, bakışlar canlıdır. Kulaklar; küçük, sivri dik ve hareketlidir. Alın geniştir. Dudaklar, diğer ırklara göre oldukça incedir. Burun delikleri geniştir. Ağız küçük ve sivridir. Boyun; normal uzunlukta ve inceliktedir. Baş ve cidago ile bağlantısı kuvvetlidir. Yele ince, yumuşak ve gürdür. Cidago, genelde kısa ve az belirgindir. Normal gelişimini tamamlamış Arap atlarında cidago yüksekliği 145-155 cm arasındadır. İslah çalışmalarıyla birlikte, Türkiye’de haralarda yetiştirilen Arap atlarında cidago yüksekliği 5-8 cm daha arttığından cidago yüksekliği 160 cm’i bulmaktadır (Arpacık, 1996).

Beden; derin, geniş ve yandan bakıldığında kare veya dikey dörtgen şeklindedir. Omuzlar; yeteri kadar uzun ve fazla eğimli değildir. Göğüs, derin, uzun ve geniş; karın, yuvarlak; böğürler kapalı; sırt-bel düz, kısa ve sağlam; sağrı kısa, düz veya az eğimli; kuyruk bağlantısı yukarıdan ve kılları incedir. (Yarkın, 1962).

Bacaklar ince, sağlam ve kuru, kemikler sağlam, eklemler geniş, tendonlar belirgin, tırnaklar küçük ve sağlamdır. Deri ince, vücudu örten kıllar ince ve yumuşaktır. Kaslar, tendonlar ve damarlar deri altında kendini belli eder. Yürüyüş hafif ve esnektir. Adi yürüyüşte adımlar geniş değildir. Normal yürüyüşte adımlar kısa olup rahvan yürüyüşe

benzerdir. Tırıs yürüyüş ve dörtnal koşmalarında adımlar alçaktandır. Arap atında en çok görülen donlar; doru, al ve kır donlardır. Yağız don nadir görülür (Arpacık, 2010; Özbeyaz ve Akçapınar, 2006).

Arap atı normal büyüme ile gelişimini üç yaşında tamamlar. İlk tohumlamaya ise dört yaşında başlanır. Gebelik süresi çeşitli faktörlere bağlı olarak 334-342 gün arasında olup, taylarda doğum ağırlığı 44-47 kg, ergin canlı ağırlık 350-450 kg'dır. Taylarda yaşama gücü yüksek olup %94-95 civarındadır (Özbeyaz ve Akçapınar, 2006; Arpacık, 2010).

Atlar 31 çift otozom ve bir çift cinsiyet kromozomu olmak üzere toplam 64 kromozoma sahiptir. Atların genomunun sekans analizi 2007 yılında tamamlanarak 2.7 milyon bç içerdiği tespit edilmiştir. Genom büyüklüğü ile at genomu, köpek genomundan daha büyük fakat insan veya sığır genomundan daha küçüktür. At ve insan kromozomlarının karşılaştırılması sonucunda bu türler arasında kuvvetli korunmuş synteny bölgeler belirlenerek 17 at kromozomunun (%53) tek bir insan kromozomundan materyal içerdiği tespit edilmiştir (köpek içinde %29'dur). Memelilere benzer olarak atlarda 20.322 (ENSEMBL build 52.2b) protein kodlayan gen olduğu tahmin edilmektedir (Wade vd., 2009).

2.2 Kalıtsal Kusurlar

Ebeveynlerden yavruya ve sonraki kuşaklara aktarılabilen, genetik materyal olan DNA'da meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan hastalıklar kalıtsal kusurlar veya kalıtsal hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Kalıtsal kusurlar, aktarılan genlerde kendiliğinden ya da çevresel etkiler nedeniyle meydana gelen mutasyonlar sonucu genetik kodları değiştirerek protein yapısının değişmesi ya da protein sentezinin durmasına neden olmaktadır. Hayvancılıkta genetik bozukluklar, yetiştiriciler için en önemli konulardan biridir. Bu bozuklukların anormal anatomi veya azaltılmış üretim gibi hayvanlar üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle, yetiştiriciler ve yetiştirici dernekleri kusurların popülasyon üzerindeki etkisini kontrol etmesi gerekir. Günümüzde atlarda 235'ten fazla kalıtsal kusur olduğu bildirilmekle beraber bunların 46 tanesinin genetik bozukluk ve özelliği saptanarak,

kusurların DNA seviyesinde mutasyonları tanımlanmış olup Ek Açıklama-A'da verilmiştir (OMIA, 2019)

Kalıtsal bir hastalığın moleküler mekanizmasını bilmek, hastalığın sürüden uzaklaştırılması ve o kalıtsal hastalık yönünden ari sürülere sahip olmak için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle erkek ve dişi damızlık adaylarının ırka özgü kalıtsal hastalıklar yönünden taranarak taşıyıcı olanların yetiştirmeden çıkarılması gereklidir. Moleküler genetik alanındaki gelişmeler sonucunda, damızlık seçim aşamasında genetik temeli bilinen bir kalıtsal hastalık taşıyıcısı bireyler doğumdan hemen sonra ya da embriyonik aşamada yüksek bir doğrulukta belirlenebilmektedir. Atlarda görülen kalıtsal hastalıklara mutasyonun neden olduğu durumlarda mutant allele sahip taşıyıcı hayvanlar moleküler teknikler kullanılarak kolayca belirlenebilmekte ve sonuçta heterozigot taşıyıcı hayvanlar sürüden uzaklaştırılmaktadır.

2.3 Şiddetli Kombine İmmun Yetmezlik (Severe Combined Immune Deficiency-SCID)

SCID'i ilk kez Avustralya'da yapılan bir çalışma (McGuire ve Poppie, 1973) ile rapor etmişlerdir. Perryman'ın (1978) yaptığı araştırmasında SCID'den etkilenen tayların gelişimlerinde T ve B hücre lenfositlerinin eksikliğinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Dr. Perryman, bir tayın SCID'den ölüp ölmediğini belirlemek için üç kriter oluşturmuştur. Bu kriterler; kan serumunda IgM'nin yokluğu veya eksikliği, T ve B hücre lenfositlerinin kandaki düşüklüğü; ve timus bezinin az gelişmiş olmasıdır. Poppie ve McGuire (1977) yaptıkları test melezlemeleri yoluyla kalıtımını göstermiştir (Lund, 2007).

SCID ile ilgili ilk makale 1973'te yayınlanmış (McGuire ve Poppie, 1973), 1980'de SCID genetik kusurunun kalıtım biçimi ve Arap atlarında görüldüğü belirlenmiş (Perryman ve Torbeck, 1980), 1997 yılında SCID'e sebep olan mutasyon tespit edilmiş (Shin vd., 1997 a) ve SCID mutant alleli belirleyen genetik testler (Shin vd., 1997 b) geliştirilerek çeşitli firmalar tarafından ticari kitler (Animal Genetics; Laboklin Laboratory; The UC Davis Veterinary Genetics Laboratory) üretilmiştir.

SCID, insanlarda, farelerde, atlarda ve köpeklerde görülen öldürücü bir otozomal resesif kalıtsal hastalık olup, etkilenen bireyler antijene spesifik bağışıklık (yeterli antijen-spesifik bağışıklık) tepkileri üretememektedir. Farelerde, atlarda, köpeklerde ve otozomal resesif formları olan bazı bireylerde ciddi kombine immün yetmezlik kusurlu V(D)J rekombinasyonu ile açıklanmakla birlikte B ve T lenfosit gelişiminin bir sonucu olduğu araştırmalar sonucunda gösterilmiştir (Lewis, 1994). SCID'li taylar, V(D)J rekombinasyonu için gerekli olan ve çift zincirli DNA kopmalarında tamir için (Wiler vd., 1995) DNA'ya bağımlı protein kinaz enziminde 967 amino asit delesyonu sonucu eksik proteine sahiptir. DNA-PK'nin katalitik alt birimindeki bu delesyon, DNA-PK'nin inaktif olmasına neden olur (Shin vd., 1997 a).

SCID kusurunun moleküler temeli; SCID'den sorumlu genetik kusur, DNA-protein kinazın (DNA-PK) katalitik alt-birimini (DNA-PKcs) kodlayan gende meydana gelen beş beş'lik bir delesyon olarak tanımlanmıştır (Shin vd., 1997a). DNA-PKcs alt ünitesindeki beş beş'lik delesyon; transkriptin 3155 kodonunda bir çerçeve kayması mutasyonuna ve C terminal ucundan tüm fosfatidilinositol 3 kinaz domeinini içeren (tüm PI3 kinaz alanı dahil) 967 amino asidin silinmesine neden olarak kararsız bir mutant protein ile sonuçlanır. Bunun sonucunda enzim işlevsiz hale gelmektedir (Wiler vd., 1995) (Çizelge 2.3). SCID'den sorumlu mutasyona uğramış DNA-PKcs geni, atların 9. kromozomu, ECA9p12 üzerinde bulunduğu floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile gösterilmiştir (Bailey vd., 1997). SCID mutasyonu otozomal resesif kalıtım modeli göstermektedir (Tarr, 2012).

Çizelge 2.3. Beş baz çifti delesyonunu gösteren DNA-PKcs geninin kısmi dizisi.

(Shin vd., 1997a)

| | |
|-------------------|--|
| Normal Gen | AATTTATCATCTCAAATTCCCCTTAA |
| SCID Geni | AATTTATCA..... AATTCCCCTTAA..... |

Tüm dokularda bulunan DNA-PK, lenfosit gelişimi sırasında önemli bir rol oynar. DNA-PK enzimi genellikle DNA'nın çift zincir kırıkları onarımının gerekli olduğu erken lenfoid farklılaşma sırasında VDJ (Değişken, Çeşitlilik ve Birleştirme) rekombinasyonu

mekanizmalarında rol oynar. Olgun T ve B lenfositlerinin lenfoid öncüllerden farklılaşması, T hücre reseptörlerini kodlayan genlerin yeniden düzenlenmesini ve ekspresyonunu gerektirir. Bu nedenle VDJ proteinlerini kodlayan gen bölgeleri, başarılı bir transkripsiyon ve translasyon için yeniden düzenlenmeli ve bir araya getirilmelidir. VDJ rekombinasyon reaksiyonları, yabancı antijenlerin tanınmasında gerekli olan farklı antijen-spesifik T-hücre reseptörlerinin ve B lenfosit immünoglobulin moleküllerini üretir. DNA-PK enzimi yokluğu VDJ rekombinasyonun uyarılmamasına yol açtığından, SCID kusurlu atlarda B ve T lenfositlerin gelişimi durur. Bu nedenle oluşan mutasyon ciddi bir bağışıklık yetmezliğine sebep olmaktadır (Lund, 2007; Tarr, 2012).

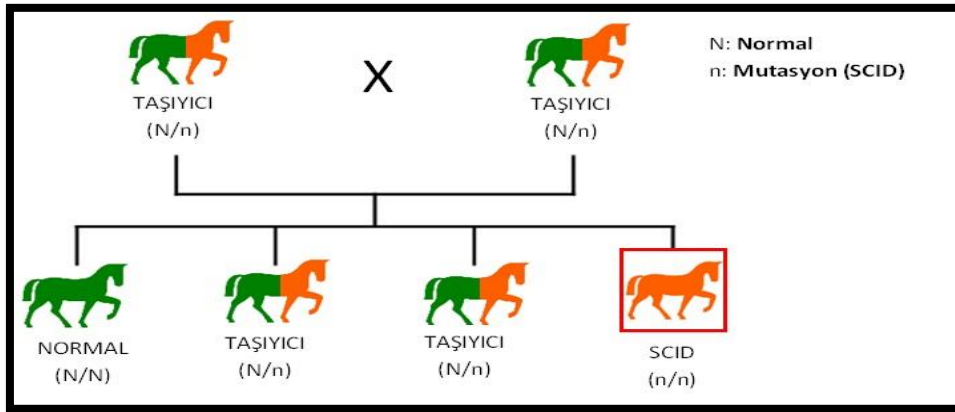
DNA-PK üç alt üniteden oluşur. 70 ve 80 kd moleküler büyüklükteki iki alt ünite DNA bağlayan heterodimerik kompleks Ku'yu oluşturur. DNA-PK'nin üçüncü alt birimi olan DNA-PKcs daha sonra Ku kompleksine katılarak DNA-PK'nın fonksiyonel bir kinaz olmasını sağlar. Atlarda VDJ reaksiyonu ve yeniden düzenleme olayları sırasında sinyal dizisi oluşumu için DNA-PK enzimi gereklidir. SCID mutasyonu, DNA-PKcs proteininin C-terminalinden gelen 967 amino asit kaybıyla kesilmesine ve işlevsel olarak aktif olmayan bir ürüne yol açmasına neden olur. VDJ rekombinasyonunun oluşmaması sonucunda lenfosit öncüllerinin ortadan kaldırılması ve fonksiyonel T ve B lenfosit sayısında şiddetli yetersizliğe neden olur. Sonuç olarak, etkilenen taylar ikincil fırsatçı bulaşıcı ajanlara son derece duyarlı hale gelir (Tarr, 2012).

DNA-PK normal olarak kromozomal stabiliteyi muhafaza etmedeki en önemli rolüyle tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir. DNA-PK aktivitesi eksik olan hücrelerin iyon radyasyona aşırı duyarlı olduğu ve SCID mutasyonu bakımından heterozigot olan atların sarkoidlere karşı duyarlılığının artmış olduğu bildirilmiştir (Tarr, 2014).

SCID için genetik testler geliştirilene kadar tanı, 14 - 30 günlük yaştan sonra şiddetli bir lenfopati (<1000 lenfosit / μ l), serumda IgM yokluğuna dayanarak, maternal IgM'nin tespit edilememesi ve dalak veya timusun hipoplazisi, uygun belirtiler ile konurdu. SCID'li taylarda hem B hem de T hücreleri olgunlaşamaz ve doğan tayların ortalama beş aylık bir ömürleri vardır (Lunn vd., 1995). Maternal antikolar azaldığında hastalık ve ölüm genellikle genç taylarda ortaya çıksa da, seçici IgM eksikliği olan bazı taylar klinik

bulgular ortaya çıkmadan önce iki ila beş yıl yaşayabilir. Bununla birlikte, bu tayların IgM seviyelerinde normalin en az iki ila üç kat sapmalar gösterirken oysa IgG, IgA ve B hücre seviyeleri normal seyretmektedir (Weldon vd., 1992).

Bir hastalık ya da özelliğin kalıtım biçimi, genotipin fenotipe yansıma biçimidir. Hastalığın oluşması için aynı lokusta yer alan bir gen çiftinin her ikisinde de oluşan mutant alleller otozomal resesif özellik göstermektedir. Baskın bir kalıtım biçimine sahip hastalıklar veya özellikler için hem baskın homozigot hem heterozigot durumda aynı fenotip görülür. Genomda her bir özelliğin iki kopyası bulunur. Bir hayvan, bu kopyaların birini babadan, diğerini de anneden alır. Bu nedenle otozomal resesif kalıtsal hastalıklarda etkilenen hayvanın babası ve annesi resesif alleli taşımaktadır, fakat sağlıklı olabilirler. En çok görülen kalıtsal hastalıklar otozomal resesif (çekinik) geçişlidir. Otozomal resesif karakterdeki bir hastalığa sahip “hasta” bir bireyin hücrelerinde genin iki mutant kopyası (alleli) bulunur. Genellikle sadece genin bir mutant kopyasını içeren (heterozigot) ebeveyn (dişi-erkek), hasta değildir ve taşıyıcıdır. Heterozigot bireylerin melezlenmesi sonucu oluşacak 4 yavrudan biri hasta (homozigot çekinik), ikisi taşıyıcı (heterozigot), hiç mutant kopya içermeyen biri de sağlıklı-normal (homozigot baskın) olur. Diğer bir deyişle hasta olma riski $\frac{1}{4}$ 'tür (Perryman, 2000) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. SCID karakterli otozomal resesif kalıtım modeli (Perryman, 2000).

Sağlıklı popülasyonlarda taşıyıcı hayvanlar mutant allelin frekansını artırdığından melezlenmelerine dikkat edilmelidir. Taşıyıcı atlar, kusurlu gen için heterozigot

olduğunda, problemin fenotipik belirtilerine sahip değildir. Bu, ölümcül genin popülasyonda yayılmasını kontrol etmeyi oldukça zorlaştırmaktadır. Bu nedenle taşıyıcılar ile taşıyıcıların veya hatta etkilenen hayvanların üremesi önlenmeli veya melezlenmeleri kontrollü yapılmalıdır. Modern yetiştiricilikte üstün verimli erkek damızlıklardan suni tohumlama ile çok sayıda yavru elde edilebilmesi, damızlık adaylarının bilinen ve verimi olumsuz yönde etkileyen kalıtsal bozukluklar yönünden homozigot negatif olduklarının belirlenmesi zorunluluğunu doğurmuştur. Çünkü kalıtsal bozukluklara neden olan genler çoğunlukla çekinik otozomal kalıtım şekli gösterdikleri için fenotipik olarak bir bozukluk göstermeyen heterozigot bireyler sayesinde popülasyonda varlıklarını sürdürürler. Bu nedenle mutant genleri taşıyan bireyler belirlenerek sürüden ayıklanmalıdırlar. At yetiştiriciliğinde iki heterozigot atın asla birbirleriyle çiftleştirilmemesi gerektiği bildirilmektedir. Heterozigot olduğu belirlenen bir at üzerinden belirli bir kan hattını korumak ilgi çekiciyse, sadece homozigot normal olduğu belirlenen bir atla çiftleştirilmelidir. Bu çiftleşmeden doğan yavrular test edilmeli ve sadece homozigot normal olduğu tespit edildiğinde üremede kullanılmasına izin verilmelidir (Perryman, 2000). Jones, (1997) sadece aygırların SCID için test edilmesinin gerekmediğini, ancak kısrakların damızlık için kullanılmadan önce test edilmesinin gerektiğini ifade etmiştir.

SCID kusurunu belirlemek için ABD'de 1977'de 19 farklı eyaletten 257 tay üzerine bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışma, klinik gözlemlere ve normal taylara etkilenen oranın hesaplanmasına dayanmaktadır. Taşıyıcıların sıklığı yüzde 25 olarak tahmin edilmiştir (Poppie ve McGuier, 1977). Ancak, Bernoco ve Bailey (1998) tarafından yapılan genetik testin ardından, ABD'de 250 Arap atının rastgele örneklenmesi ile SCID taşıyıcıların frekansı yüzde 8,4 olarak bildirilmiştir. Taşıyıcı atların pedigrileri araştırıldıktan sonra, bu hastalığın Polonya'dan ithal edilen popüler bir aygırla popülasyonlar arasında dağıtıldığı gösterilmiştir. Geçmişte, taşıyıcıları tespit etmenin tek yolu, etkilenen tayların doğumu ve ebeveyn test sonuçlarının araştırılması olmuştur. Arap atlarında SCID taşıyıcılarının saptanması için ARMS PCR'lerine dayanan ilk genetik test Bernoco ve Bailey (1998) tarafından tanıtılmıştır. Bu nedenle, Bernoco ve Bailey (1998) tarafından genetik test yapılmadan önce, taşıyıcı sıklığı yüzde 8 ila 25 arasında tahmin edilmiştir.

SCID'den etkilenen tay sayısı popülasyondan popülasyona farklılık göstermektedir. 1970'lerden 1997'ye kadar, araştırma çalışmalarından elde edilen SCID taşıyıcı tahminleri,

SCID tarafından etkilenen tay tahminleriyle yüzde 8 ila 28 arasında değişmiştir (Perryman ve Torbeck, 1980). SCID mutant alleli bakımından hasta taylar Avustralya, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere'de tanımlanmıştır (McGuire ve Poppie, 1973; Clark ve ark., 1978; Studdert, 1978; Whitwell, 1978). McGuire ve Poppie (1973) Arap taylarının yüzde 2,3'ünün bu kusurdan öldüğünü tespit etmişlerdir. McChesney (1973) yaptığı çalışmada tayların yüzde 2.7'sinin yine bu kusurdan dolayı öldüğünü tespit etmiştir. Moleküler yöntemler kullanan araştırmacılar Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Arap atları arasındaki SCID allelinin taşıyıcı frekansının %8.4 olarak tahmin etmişler ve bu frekansa dayanarak, Arap taylarının %0.18'inin homozigot olduğunu bildirmişlerdir (Bernoco ve Bailey, 1998). Polonya'da yapılan bir başka çalışmada ise SCID kusurundan dolayı herhangi bir ölüm ile sonuçlanan bulguya rastlanılmamıştır. Avustralya ve İngiltere'de yapılan diğer araştırmalarda da, ABD'deki gibi benzer olaylar tespit edilmiştir. Çizelge 2.4'de genetik testin tanımlanmasından bu yana farklı ülkelerde SCID ile ilgili çalışmaların sonuçları gösterilmektedir.

Çizelge 2.4. Bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda tayların SCID frekansları.

| ÜLKELER | TEST EDİLEN AT SAYISI | TAŞIYICI YÜZDESİ | REFERANSLAR |
|---------------------|-----------------------------|------------------|---|
| ABD | Genetik Test Öncesi; 250 | 25.7; 8.4 | Poppi ve McGuire (1977) Bernoco ve Bailey (1998) |
| Avustralya | Genetik Test Öncesi | 30 | Studdert (1978) |
| İngiltere | 106 | 2.89 | Swinburne vd., (1999) |
| Polonya | 271; 448 | Yok 0.19 | Terry vd., (1999); Bugno-Poniewierska (2019) |
| Brezilya | 205 | 1.5 | Teixeira ve vd., (2001) |
| Slovenya | 128 | Yok | Zavrtanik vd., (2005) |
| Romanya | 60 | Yok | Georgescu vd., (2006) |
| Fas | 377 | 5.6 | Pirovd., (2008) |
| İran | 244 | Yok 1.6 | Seyedabadi vd., (2011) Arbani vd., (2015) |
| Hırvatistan | 100 | 5 | Efendic vd., (2018) |
| Mısır | 103 | 10.3 Yok | Aleman vd., (2018) AbouEl Ela vd., 2018 |
| Suriye | 250 | Yok | Khanshour vd., (2013) |
| Ukrayna | 16 | Yok | Kurylenko vd., (2013) |
| Güney Afrika | 800 | 6.4 | Tarr vd., (2014) |
| | 699 | 3.4 | |
| Türkiye | 239 | Yok | Çınar Kul vd., (2014) |

2.4 DNA Dizi Analizi (Sekanslama)

Moleküler genetik yöntemleri genetik kusur bakımından heterozigot (taşıyıcı)ların belirlenmesi özellikle fenotipik olarak normal bireylerden ayırt edilemeyen mutant alleli taşıyan heterozigot bireylerin sürüden uzaklaştırılmasında kullanılan önemli bir araçtır. Bir gen bölgesinde meydana gelen polimorfizm bazı genetik ve metabolik düzensizliklerin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına ve genetik olarak kontrolüne yardım edebilmekte ve fenotipik olarak normal bireylerden ayırt edilemeyen heterozigot taşıyıcı hayvanların belirlenmesine olanak tanımaktadır (Mitra vd., 1999).

DNA dizi analizleri ya da sekanslama, DNA'nın birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Günümüzde bu yöntem biyoteknoloji, adli tıp ve klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. DNA dizi analizi ilk olarak 1970'li yıllarda iki farklı araştırmacı tarafından farklı yöntemlerle geliştirilmiştir. Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilen yöntem, DNA'nın kimyasal modifikasyonu ve enzimatik olarak bazların kesilmesi esasına dayanmaktadır. Sanger ve Coulson tarafından geliştirilen yöntem ise zincir sonlandırma yöntemiyle ilerleyen bir metot geliştirmişlerdir. Zincir sonlandırma yönteminin otomasyona uygun olması ve tehlikeli kimyasallar içermemesi nedeniyle geliştirilerek kullanılan Sanger dizileme yöntemi bütün dünyada tercih edilen model olmuştur.

Sanger dizileme yönteminin temelinde DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozittrifosfat) yanı sıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozittrifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanmaktadır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurmakta ve daha sonra elde edilen farklı uzunluktaki DNA parçaları elektroforezle ayrıştırılarak baz tespiti yapılabilmektedir.

Sanger dizileme tekniği DNA polimeraz reaksiyonunun zincir sonlandırıcı 3' OH grubuna sahip olmayan dideoksinükleotidlerin (ddNTP) eklenmesiyle sonlandırılması işlemidir. Bu yöntemde DNA sentezi bir ucundan radyoizotop ile işaretlenmiş primerler kullanılarak başlatılmaktadır. Her bir sentez için 4 ayrı baz içeren (A,C,G,T) ddNTP'lerle, her bir baz için 4 farklı reaksiyon gerçekleştirilmektedir. DNA sentezi ilerlerken bir

ddNTP'nin ipliğe bağlanmasıyla reaksiyon durmaktadır. Sonuçta her bir reaksiyonda reaksiyonu durduran ddNTP ile sonlanan, bir dizi farklı büyüklükte işaretli DNA parçacığı oluşur. Oluşan bu parçacıklar jel elektroforezi kullanılarak birbirinden ayrılmakta ve X ışını kullanılarak otoradyografiyle görüntülenmektedir. Günümüzde dizi analizleri radyoaktif parçalar yerine floresan boyalarla işaretlenmiş nükleotitler kullanılarak otomatik sistemler tarafından görüntülenmektedir (Sanger, 1977).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarında yürütülmüştür. Bu çalışma, alınan kan örneklerinden genomik DNA molekülünün izole edilmesi, SCID lokusunun PCR ile çoğaltılması ve PCR ürünlerinin dizi analizi yapılarak mutasyonların belirlenmesi aşamalarını içermektedir.

3.1 Materyal

3.1.1 Hayvan Materyali

Yürütülen araştırmada, hayvan materyali olarak Eskişehir-Mahmudiye ilçesi ve çevresindeki 9 farklı özel çiftliklerde yetiştirilen Arap atları popülasyonundan 115 baş Arap atından alınan kan örnekleri çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.2 Araç ve Gereçler

Araştırmanın yürütülmesinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Moleküler Genetik Laboratuvarında mevcut bulunan ve Ek Açıklama-B'de detayları açıklanan araç ve gereçler kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Kan Örneklerinin Alınması ve Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunun yapılması amacıyla kan örnekleri atların boyun toplar damarından (vena jugularis), vakumlu kan alma tüpleri ve kanül kullanılarak alınmıştır. Her hayvandan yaklaşık 5 ml kan alınmıştır. Alınan kan örnekleri soğuk zincir içinde, kısa sürede Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Genetik Laboratuvarına getirilerek DNA izolasyon işlemine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA molekülünün izolasyonunda Miller ve ark. (1988) tarafından bildirilen DNA izolasyon protokolü laboratuvar ortamında optimize edilerek aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. -20 °C'de muhafaza edilen kan örnekleri çözülene kadar oda sıcaklığında (23-25°C) bekletilmiştir.
2. Her bir kan örneğinden 500 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüp içine konulmuştur.
3. Örneklerin üzerine 1.000 µl Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi (0,32 M Sukroz, 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂) ilave edilmiş ve kısa bir süre vorteksle iyice karıştırarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Bekletme süresinin sonunda örnekler 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
5. Ependorf tüplerin üst kısmında toplanan sıvı kısım (süpernatant) dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan peletlerin (hücre kısmı) rengi gözlenerek peletlerin rengi beyaz olana kadar Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi ile tekrar (en fazla 3 defa) muamele edilmiştir.
6. Beyaza döndüğüne karar verilen peletlerin üzerine 1.000 µl Fizyolojik Tampon Çözeltisi (75 mM NaCl, 25 mM EDTA) eklenmiş ve elle birkaç defa alt üst olacak şekilde kısa bir süre karıştırılmıştır.

7. Örnekler 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda üstte toplanan sıvı kısım dikkatli bir şekilde tekrar uzaklaştırılmıştır.
8. Peletlerin üzerine 500 µl Lisis TE (10 mM Tris, 1mM EDTA) Tampon Çözeltisi (500 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 20 mM EDTA) eklenmiş ve peletlerin iyice çözünmesi sağlanmıştır.
9. Çözülen peletlerin üzerine 100 µl SDS (%10 luk) solusyonu ve 5 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek hafifçe karıştırılmış ve 65 °C'de 1.5 saat (37 °C'de 12 saat) su banyosunda tutulmuştur. İnkübasyon süresince her 15 dakikada bir hafifçe karıştırılmıştır.
10. İnkübasyondan çıkarılan örneklerin üzerine 200 µl 6 M NaCl çözeltisi eklenmiş ve 15 dk vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonunda üstte kalan ve DNA moleküllerini içeren sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine konulmuştur.
12. Örnekler 14.000 rpm'de 5 dk tekrar santrifüj edilerek tuzun tamamen uzaklaştırılması sağlanmış yine üstte kalan sıvı kısım, tuz kısmına dokunmadan yeni bir ependorf tüp içine konulmuştur.
13. Örnekler üzerine örnek hacminin iki katı hacimde (yaklaşık 1000 µl) %99.9'luk (-20 °C'de muhafaza edilen) soğuk etanol ilave edilmiştir.
14. Etanol ilave edildikten sonra ependorf tüpü DNA iplikçikleri kümeleşinceye kadar alt üst edilerek karıştırılmıştır.
15. Kümeleşen DNA iplikçiklerinin tüpün dibine çökmesi için tüp 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
16. Santrifüj sonunda etil alkol uzaklaştırılarak tüpün dibine çökmüş olan DNA peletlerinin üzerine 1.000 µl %70'lik etil alkol ilave edilerek 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
17. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde yer alan alkol uzaklaştırılmıştır.

18. Tüp içindeki alkolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak amacıyla örnekler, çeker ocak içinde kurumaya bırakılmıştır.
19. Tamamen kuruyan örnekler üzerine 100 µl deiyonize bdH₂O ilave edilerek DNA peletlerinin çözülmesi için bir gece buzdolabında +4 °C’de bekletilmiştir.
20. Örneklerden izole edilen genomik DNA moleküllerinin tek parça olup olmadıklarının (kırılıp kırılmadıklarının) kontrolleri %2’lik agaroz jellerde yapılmıştır.
21. Genomik DNA izolasyonunun miktar ve saflık kontrollerinin yapılmasında NanoDrop Spektrofotometre (ND 1000)’den yararlanılmış ve elde edilen veriler bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) başlamadan önce izolasyonu yapılan DNA’ların miktarlarının spektrofotometre ile ölçülmeleri önemlidir. Genomik DNA miktarının spektrofotometre ile ölçülmesi, DNA solusyonunun 260/280 nm’deki okuma değerine göre OD miktarının hesaplanmasına dayanmaktadır. Sambrook ve ark. (1989)’nın bildirdiğine göre; DNA ve RNA örneklerinin saflık dereceleri spektrofotometredeki 260 nm ve 280 nm değerlerinin oranlanması ile (OD₂₆₀/OD₂₈₀) belirlenmektedir. 260 nm dalga boyunda yapılan okuma, örnekteki nükleik asit konsantrasyonunun hesaplanmasını sağlamaktadır. Örnekte okunan 1 OD absorbans değeri yaklaşık olarak 50 µg/ml çift sarmallı DNA ve 40 µg/ml RNA’nın varlığına işaret etmektedir. Spektrofotometre küvetinde bulunan sıvının 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri birbirine oranlandığında bulunacak OD₂₆₀/OD₂₈₀ (DNA/protein) oranının 1.8–2.00 değerleri arasında olması arzulanır. Bu oranın 1.8’den düşük olması ortamda protein ya da fenol artıklarının, yüksek olması ise DNA dışındaki nükleik asitlerin varlığına işaret etmektedir. Dolayısıyla bu maddelerin ortamdaki varlığı PCR uygulamasının verimini düşürmektedir. Çalışmada 100 µl steril TE (10:1) tampon çözeltisinde çözülen DNA’ların konsantrasyonları 260 ve 280 nm dalga boylarında (OD₂₆₀/OD₂₈₀) spektrofotometre ile okunmuş ve konsantrasyonları steril saf su ile 50 ng/µl olacak şekilde eşitlenmiştir.

3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu laboratuvar ortamında gerçekleşen bir çeşit invitro klonlama olup her PCR işlemi, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşmaktadır. Bir PCR döngüsü sırasıyla, deoksiribonükleik asidin (DNA) iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (Denaturation), sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (Annealing) ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması (Extension) aşamalarından meydana gelir. Bu aşamaların her biri farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (sırasıyla 94°C - 94°C; 55°C-72°C; 72°C). PCR tekniği, tek ve çift sarmallı DNA ya da RNA için kullanılabilir. Yapılan araştırmada, SCID gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla Çizelge 3.1'de verilmiş olan PCR karışımı ve Çizelge 3.2'de verilen primerden yararlanılarak Çizelge 3.3'de verilen PCR döngüsü kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları.

| 1X'lik PCR Reaksiyon Karışımı | | Miktar (µl) |
|-------------------------------|---------|-------------|
| 10x PCR Tamponu | | 5 |
| 2,5 mM MgCl ₂ | | 5 |
| dNTPs (2 mM her birinden) | | 5 |
| Primerler | Forward | 1 |
| | Revers | 1 |
| bd H ₂ O | | 29.75 |
| Taq Polimeraz Enzimi | | 0.25 |

Çizelge 3.2. Kullanılan primer çifti (Tarr, 2012).

| | |
|------|---|
| SCID | F: 5'-AAGTTGGTCTTGTCATTGAGC-3' R: 5' -TTTGTGATGATGTCATCCCAG-3' |
|------|---|

Çalışmada, her bir örnek için toplam 50 µl olacak şekilde, 3 µl DNA + 47 µl PCR karışımı 0.5'lik PCR tüplerinde yapılmıştır. PCR uygulamaları Thermofisher Scientific Thermal Cycler marka cihazda (Şekil 3.1) yürütülmüştür. Cihazın kapak sıcaklığı 105°C olacak şekilde PCR programı ayarlanmıştır. Bu uygulamanın amacı PCR sırasında reaksiyon karışımının tüplerden buharlaşmasını engellemektir. Örnek DNA'ları PCR'da çoğaltıldıktan sonra genetik kusurun meydana geldiği gen bölgesinin çoğaltılıp çoğaltılmadığının kontrolü için %2'lik agaroz jeller kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünlerinin kontrolünden sonra hizmet alımı yoluyla yapılacak olan DNA dizi analizi işlemine geçilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR programı.

| | | |
|---------------|----------|-----------------|
| 94 °C → 5 dk | | Ön Denaturasyon |
| 94 °C → 1 dk | 35 Döngü | Denaturasyon |
| 55 °C → 1 dk | | Annealing |
| 72 °C → 1 dk | | Extension |
| 72 °C → 10 dk | | Son Extension |



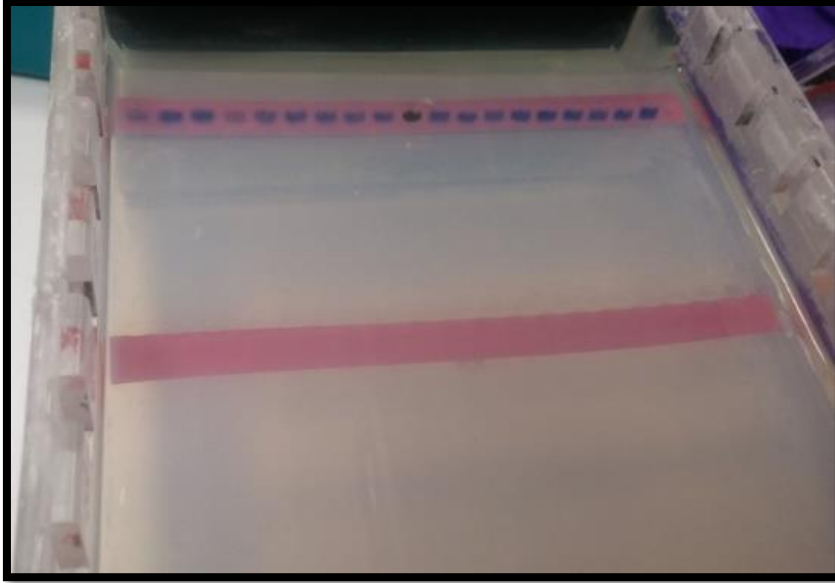
Şekil 3.1. Thermofisher scientific thermal cycler 96 örneklik PCR cihazı.

Örneklerin elektroforez işlemi için elektroforez çözeltisi olarak Çizelge 3.2’de içeriği verilen 1X Elektroforez /Jel Tampon Çözeltisi (100 ml = 90 ml saf su + 10 ml 10X TBE, Tris Borik Asit 0.5 M EDTA (ph 8.0) deiyonize bd H₂O) kullanılmıştır. Elektroforez çözeltisi önce 10X Elektroforez /Jel Stok Tampon Çözeltisi olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok solüsyonu deiyonize su ile 10 katı kadar sulandırılarak (1X TBE Elektroforez /Jel Tampon Çözeltisi = 90 ml saf su + 10 ml 10X TBE) hem jelin hazırlanmasında hem de elektroforez tampon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Jelin hazırlanması için 200 ml, tanka konulacak elektrolit çözeltisi olarak da 1500 ml 1X TBE Elektroforez / Jel Tampon Çözeltisi kullanılmıştır.

PCR işlemlerinin tamamlanmasından sonra, çoğaltılan PCR ürünlerinin kontrolü ve elektroforetik ayrımı için %2’lik agaroz jel (Sigma Agarose Basica LE) kullanılmıştır. Jel hazırlanırken 4,0 gr agaroz tartılıp 500 ml’lik erlenmayere konmuş ve üzerine 200 ml 1X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra yüksek sıcaklıkta 250–300°C’de bir mikrodalga fırın içinde 3–4 dk kaynatılarak eritilmiştir. Kaynama esnasında yaklaşık 15–20 s’de bir çözelti sallamak suretiyle şeffaf bir görünüm kazanıncaya kadar karıştırılmıştır. Jel kaynatıldıktan sonra üzerine 10 µl Safeview çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanan jel 8 x 20 x 0,8 cm ebatlarında olan ve üzerinde 20 kuyucuklu tarak bulunan jel tablasına, tarakların bulunduğu bölgelerde hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek dökülerek oda sıcaklığında jelin polimerleşmesi sağlanmıştır. Polimerleşme tam olarak gerçekleştiği anlaşıldıktan sonra taraklar dikkatli şekilde çıkarılmıştır. Hazırlanan jel 1X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi ile dolu olan yatay elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel tanka yerleştirildikten sonra üzerini tamamen kaplayacak şekilde kadar 1X TBE Elektroforez / Jel Tampon Çözeltisi ilave edilmiştir.

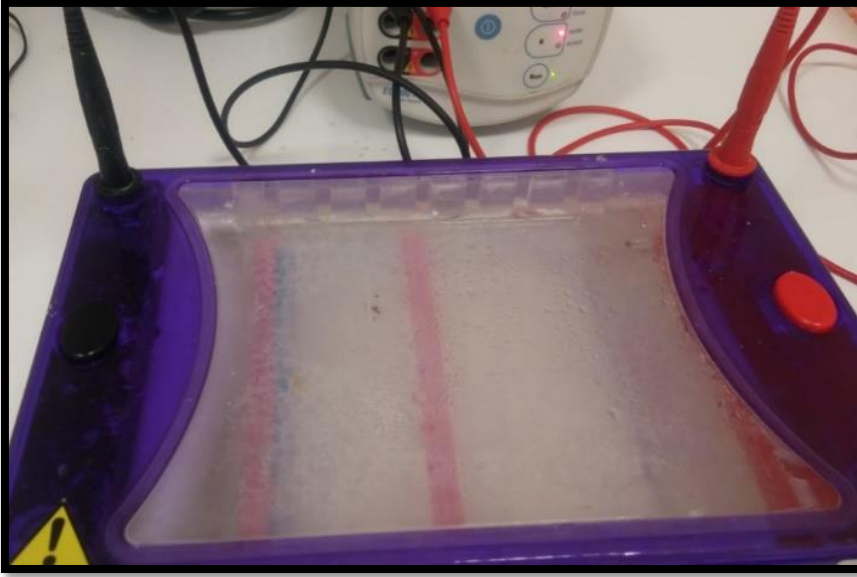
PCR cihazı ile çoğaltılan DNA örneklerinin jelde yürütülebilmesi, takibi ve elektroforez çözeltisi ile karışmasının önlenmesi amacıyla yükleme çözeltisi hazırlanmıştır. PCR ürünlerinden 10 µl alınarak parafilm üzerine konulmuş ve üzerine 2 µl DNA Yükleme Tampon Çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Örneklerin jele yüklenmesinden önce PCR ürünlerinin tüplerin kenarlarına yapışmış olma ihtimalini azaltmak için bu karışım 3-5 s mikrosantrifüjde 4.000-4.600 rpm’de santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu karışım kuyulara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir (Şekil. 3.2).

DNA bantlarının jelde molekül büyüklüklerine göre yürüdükleri bant aralığını (baz çifti) tespit edebilmek için standart olarak DNA Marker (100 bp Ladder, Fermentas® GeneRuler SMO241) standart DNA markeri (DNA Ladder) kullanılmıştır.



Şekil 3.2. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmiş hali.

Jel kuyucuklarına yüklenen PCR ürünleri elektrik akımı olan ortamda birbirlerinden ayırmak için yatay elektroforez cihazında 120 V'da 45 dk süreyle kontrol edilerek agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil.3.3). Agaroz jellerdeki kuyucuklara örneklere ait amplifiye PCR ürünleri (10 µl amplikon + 2 µl DNA loading 6X dye 10 x 100 ml = Bromfenol mavisi 250 mg, Tris 150 mM / 33 ml (ph 7.6), Gliserol 60 ml, bd H₂O 7 ml) ve en son kuyucuğa ise 100 bp'lik DNA marker yüklenmiştir. İşlemler sonunda jel tanktan alınarak UV transmilatörde görüntüleme yapılmıştır.



Şekil 3.3. PCR ürünlerinin yatay elektroforez cihazında jelde yürütülmesi.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin görüntülenebilmesi için jel elektroforezden çıkarılmıştır. Elektroforez işleminden sonra jellerin Jel Görüntüleme Analiz Sisteminde (Kodak Gel Logic 200) fotoğrafları çekilerek elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm örneklerin PCR ürünleri agaroz jelde kontrol edilmiştir.

3.2.3 DNA Dizi Analizi (Sekanslama)

Yapılan PCR işleminin tüm örneklerde 174 bp büyüklükteki band tespit edildikten sonra DNA dizileme (sekanslama) işlemi özel bir firmada hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR örneklerinin temizliği ve DNA sekanslama uygulamaları hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Bu işlemler yürütülürken PCR ürünü temizleme PCR clean-up (Macherey-Nagel, Almanya) adlı kit ve DNA dizi analiz BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit adlı ticari kitle ABI 3500 cihazında yapılmıştır.

3.2.4 Genotiplerin Belirlenmesi ve Gen Frekanslarının Hesaplanması

Araştırmada elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi yapılarak SCID lokusundaki delesyon araştırılmıştır. Yapılan PCR sonucunda hayvanların çoğaltılan DNA bölgesindeki mutasyon dizi analizi yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonucunda hayvanların genotipleri belirlenmiştir. Dizi analizi sonucunda elde edilen sekans verilerini analiz etmek için MEGA X ve CodonCode bilgisayar programları kullanılmıştır.

Atların SCID bakımından genotiplerin frekansı ve standart hataların hesaplanmasında gen sayma (counting the number of genes) yönteminden yararlanılmıştır (Nei 1987). Çünkü muhtemel olan tüm genotipler belirlenmiş olup, aşağıda verilen formül kullanılarak yapılmıştır.

$$P_i = \frac{(2f_1 + f_2)}{2N}$$

$$S_{P_i} = \sqrt{\frac{P_i(1 - P_i)}{2N}}$$

P_i : i'inci allelin frekansı

f_1 : i'inci allel bakımından homozigot genotipli bireylerin sayısı

f_2 : i'inci allel bakımından heterozigot genotipli bireylerin sayısı

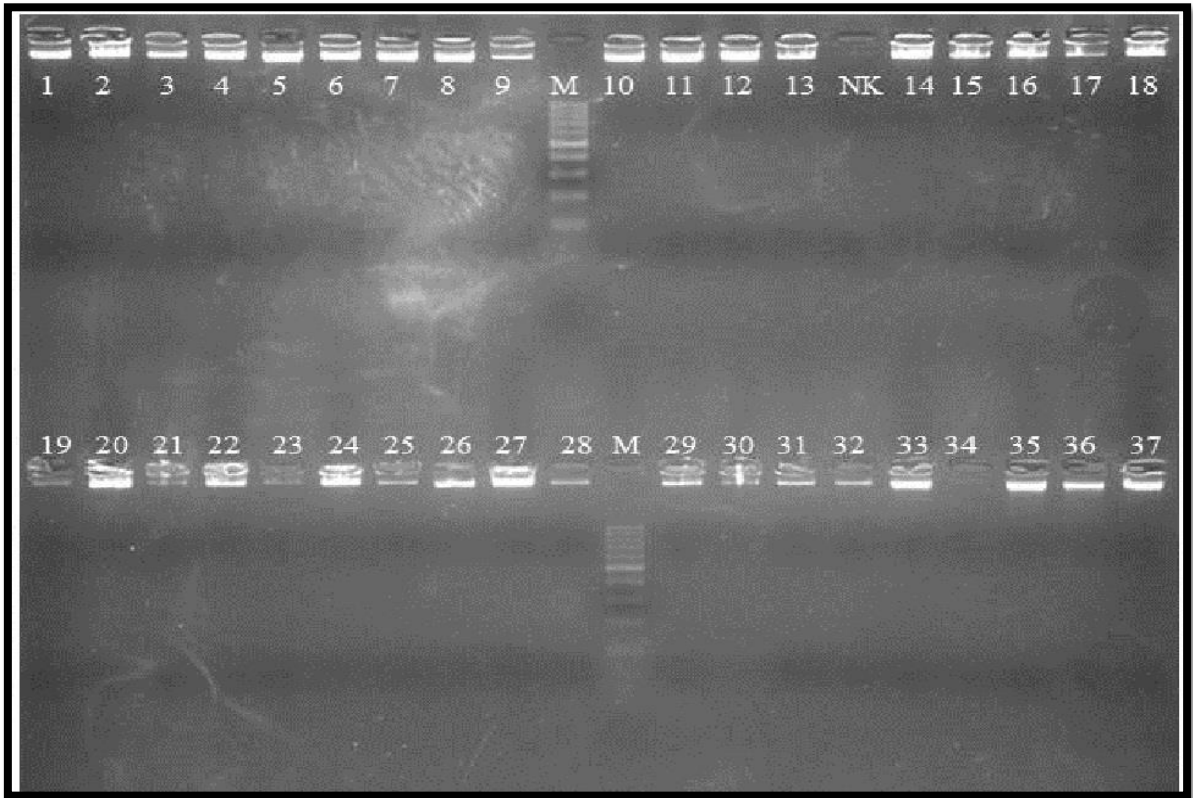
N : i'inci lokus bakımından toplam birey sayısı

S_p : i'inci allel frekansının standart hatası

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Genomik DNA İzolasyonu

Eskişehir’de özel işletmelerde yetiştirilen 115 Arap atı örneğinden kan örneği alınarak g(genomik)DNA salting-out yöntemi ile elde edilmiştir. Saflaştırılan gDNA’ların miktar ve saflık kontrolleri spektrofotometride 260/280 nm dalga boyunda kontrol edilmiş ve elde edilen miktar ve kaliteleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA örnekleri agaroz jelde kontrol edilmiştir. Bazı örneklerin jel görüntüsü Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Bazı örneklerden saflaştırılan DNA’ların jel kontrolü

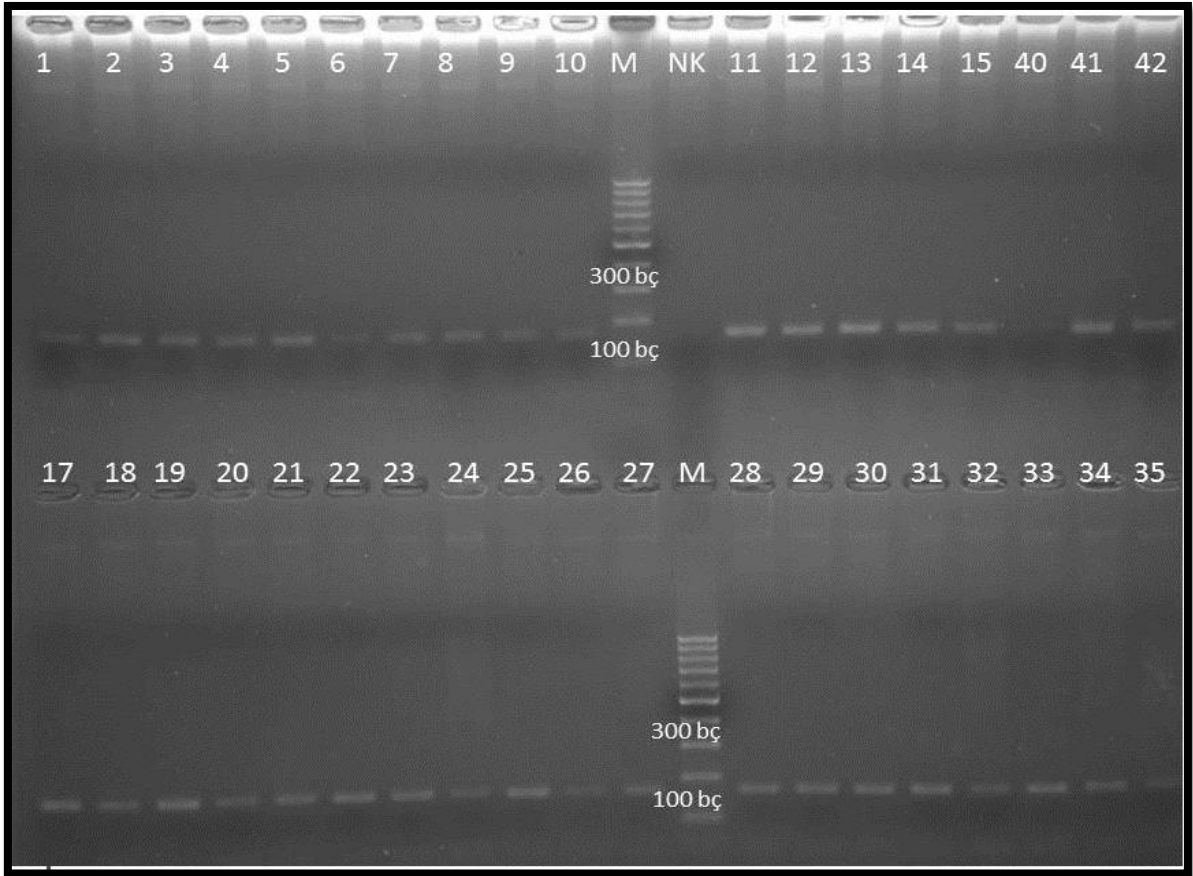
(NK: Negatif Kontrol, M:100 bp Ladder, Fermantas® GeneRuler SMO241)

Çizelge 4.1. Elde edilen gDNA örneklerinin miktar ve kaliteleri.

| Kod | ng/ul | 260/280 | 260/230 | Kod | ng/ul | 260/280 | 260/230 |
|-----|-------|---------|---------|-----|-------|---------|---------|
| 1 | 196,3 | 1,72 | 1,22 | 59 | 35,3 | 1,86 | 1,62 |
| 2 | 161,5 | 1,7 | 1,12 | 60 | 91,7 | 1,61 | 0,94 |
| 3 | 172,0 | 1,78 | 1,63 | 61 | 73,8 | 1,77 | 1,26 |
| 4 | 250,6 | 1,81 | 2,07 | 62 | 216,2 | 1,78 | 1,41 |
| 6 | 203,9 | 1,73 | 1,28 | 63 | 108,6 | 1,72 | 1,22 |
| 7 | 101,4 | 1,78 | 1,27 | 64 | 452,4 | 1,61 | 1,02 |
| 8 | 138,1 | 1,77 | 1,5 | 65 | 261,1 | 1,69 | 1,02 |
| 10 | 111,6 | 1,84 | 1,65 | 66 | 176,8 | 1,68 | 1,03 |
| 11 | 186,9 | 1,75 | 1,15 | 67 | 463,9 | 1,79 | 1,54 |
| 12 | 128,5 | 1,81 | 1,81 | 68 | 119,4 | 1,65 | 0,9 |
| 13 | 216,9 | 1,81 | 1,57 | 69 | 135,6 | 1,55 | 0,91 |
| 14 | 119,2 | 1,8 | 1,43 | 70 | 332,4 | 1,83 | 1,81 |
| 15 | 154,0 | 1,71 | 1,08 | 71 | 39,3 | 1,21 | 0,37 |
| 16 | 169,0 | 1,79 | 1,33 | 72 | 29,0 | 6,95 | 1,01 |
| 17 | 155,1 | 1,62 | 0,89 | 73 | 231,6 | 1,72 | 1,05 |
| 18 | 215,2 | 1,78 | 1,53 | 74 | 383,1 | 1,53 | 0,97 |
| 19 | 263,4 | 1,64 | 0,86 | 75 | 78,1 | 1,58 | 0,89 |
| 20 | 30,8 | 1,59 | 0,64 | 77 | 181,2 | 1,7 | 0,91 |
| 21 | 76,6 | 1,72 | 1,06 | 78 | 131,6 | 1,6 | 0,69 |
| 22 | 47,6 | 1,62 | 0,79 | 79 | 121,8 | 1,71 | 0,97 |
| 23 | 296,6 | 1,83 | 1,68 | 80 | 387,2 | 1,71 | 1,06 |
| 24 | 94,4 | 1,83 | 1,49 | 81 | 63,9 | 1,68 | 0,87 |
| 25 | 16,7 | 1,26 | 0,32 | 82 | 23,7 | 1,81 | 1,25 |
| 26 | 2,2 | 0,61 | 0,22 | 83 | 257,4 | 1,82 | 1,31 |
| 27 | 158,8 | 1,56 | 0,73 | 84 | 146,4 | 1,53 | 0,54 |
| 28 | 168,5 | 1,49 | 0,71 | 85 | 348,5 | 1,75 | 1,06 |
| 29 | 134,8 | 1,56 | 0,7 | 86 | 337,0 | 1,76 | 1,1 |
| 30 | 244,6 | 1,68 | 0,92 | 87 | 271,7 | 1,78 | 1,2 |
| 31 | 137,0 | 1,66 | 0,76 | 88 | 124,6 | 1,77 | 1,28 |
| 32 | 192,6 | 1,44 | 0,77 | 89 | 195,5 | 1,74 | 0,96 |
| 33 | 654,8 | 1,71 | 0,87 | 90 | 180,6 | 1,69 | 0,83 |
| 34 | 122,8 | 1,71 | 1,01 | 91 | 234,0 | 1,75 | 1,03 |
| 35 | 55,5 | 1,46 | 0,6 | 92 | 231,6 | 1,78 | 1,14 |
| 36 | 148,6 | 1,8 | 1,23 | 93 | 439,7 | 1,66 | 0,92 |
| 37 | 145,7 | 1,6 | 0,74 | 94 | 419,7 | 1,78 | 1,15 |
| 38 | 179,4 | 1,53 | 0,77 | 95 | 95,7 | 1,6 | 0,63 |
| 39 | 248,0 | 1,72 | 1,17 | 96 | 215,9 | 1,7 | 0,85 |
| 40 | 190,1 | 1,72 | 1 | 97 | 399,7 | 1,77 | 1,14 |
| 41 | 95,9 | 1,63 | 0,62 | 98 | 393,6 | 1,76 | 1,15 |
| 42 | 266,6 | 1,55 | 0,75 | 99 | 528,4 | 1,84 | 1,84 |
| 43 | 237,2 | 1,6 | 0,79 | 100 | 307,9 | 1,85 | 1,56 |
| 44 | 249,9 | 1,81 | 1,51 | 101 | 392,0 | 1,85 | 1,65 |
| 45 | 203,0 | 1,71 | 1,15 | 102 | 403,8 | 1,8 | 1,29 |
| 46 | 156,8 | 1,84 | 1,61 | 103 | 289,8 | 1,83 | 1,4 |
| 47 | 158,7 | 1,78 | 1,39 | 104 | 454,1 | 1,78 | 1,19 |
| 48 | 392,5 | 1,78 | 1,52 | 105 | 514,2 | 1,84 | 1,73 |
| 49 | 66,8 | 1,76 | 1,27 | 106 | 189,7 | 1,75 | 1,1 |
| 50 | 164,8 | 1,71 | 1,18 | 107 | 401,7 | 1,85 | 1,65 |
| 51 | 144,5 | 1,81 | 1,57 | 108 | 483,5 | 1,82 | 1,48 |
| 52 | 132,9 | 1,8 | 1,34 | 109 | 299,4 | 1,87 | 1,72 |
| 53 | 68,9 | 1,65 | 0,96 | 110 | 293,3 | 1,85 | 1,61 |
| 54 | 173,2 | 1,73 | 1,15 | 111 | 105,2 | 1,87 | 1,76 |
| 55 | 69,1 | 1,73 | 1,04 | 112 | 196,4 | 1,86 | 1,46 |
| 56 | 123,0 | 1,78 | 1,32 | 113 | 181,7 | 1,8 | 1,09 |
| 57 | 120,6 | 1,73 | 1,2 | 114 | 298,1 | 1,84 | 1,54 |
| 58 | 146,1 | 1,77 | 1,44 | 115 | 223,1 | 1,77 | 1,14 |

4.1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

SCID mutant allelini tespit etmek için DNA-PKcs geninde oluşan beş nükleotitik delesyon dizilerini kapsayan primerler kullanılmıştır. Bu primerleri kullanarak yapılan PCR işlemi sonucunda normal atlarda 174 bç, SCID kusurlu atlarda 169 bç ve taşıyıcı atlarda 169 ve 174 bç band büyüklüğüne sahip PCR ürünleri beklenilmektedir (Tarr, 2012). Çalışma örneği olan at DNA'ları kullanılarak yapılan PCR uygulaması sonucunda agaroz jelde yapılacak 169 ile 174 bç büyüklükleri ayırt etmek mümkün olmadığı ve oluşan PCR ürünlerinin dizilerinin kontrolü için DNA dizi analizi yapılmıştır. Yaklaşık 174 bç büyüklüğündeki PCR ürünleri elde edilerek %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 4.2). Tüm örneklerdeki 174 bç PCR ürünü agaroz jelde tespit edildikten sonra DNA dizi analizi için ilgili firmaya gönderilmiştir.



Şekil 4.2. PCR ile DNA amplifikasyonunun sonuçları
(NK: Negatif Kontrol, M:100 bp Ladder, Fermantas® GeneRuler SMO241).

Arap atı popülasyonlarında SCID genetik kusurunu araştırmak için yapılan genetik çalışmalarda DNA-PKcs geninde oluşan beş nkleotitik delesyonu tespit etmek için mutasyonu kapsayan 521 b (Bugno-Poniewierska vd., 2019), 259 b (Seyedabadi vd., 2011), 235 ve 230 b (Georgescu vd., 2006), 179 ve 166 b (Teixeira vd., 2001), 174 b (Tarr, 2012), 169 ve 166 b (Bernoco ve Bailey, 1998; Emelyanova vd., 2008; Arbani vd., 2015), 163 ve 158 b (Swinburne vd., 1999; Emelyanova vd., 2008; AbouEl Ela vd., 2018), 162-157 b (Piro vd., 2008) ve 135 ve 130 b (Zavrtanik vd., 2005; Kurylenko vd., 2013) büyüklükte PCR ürünü veren primerler kullanılmıştır.

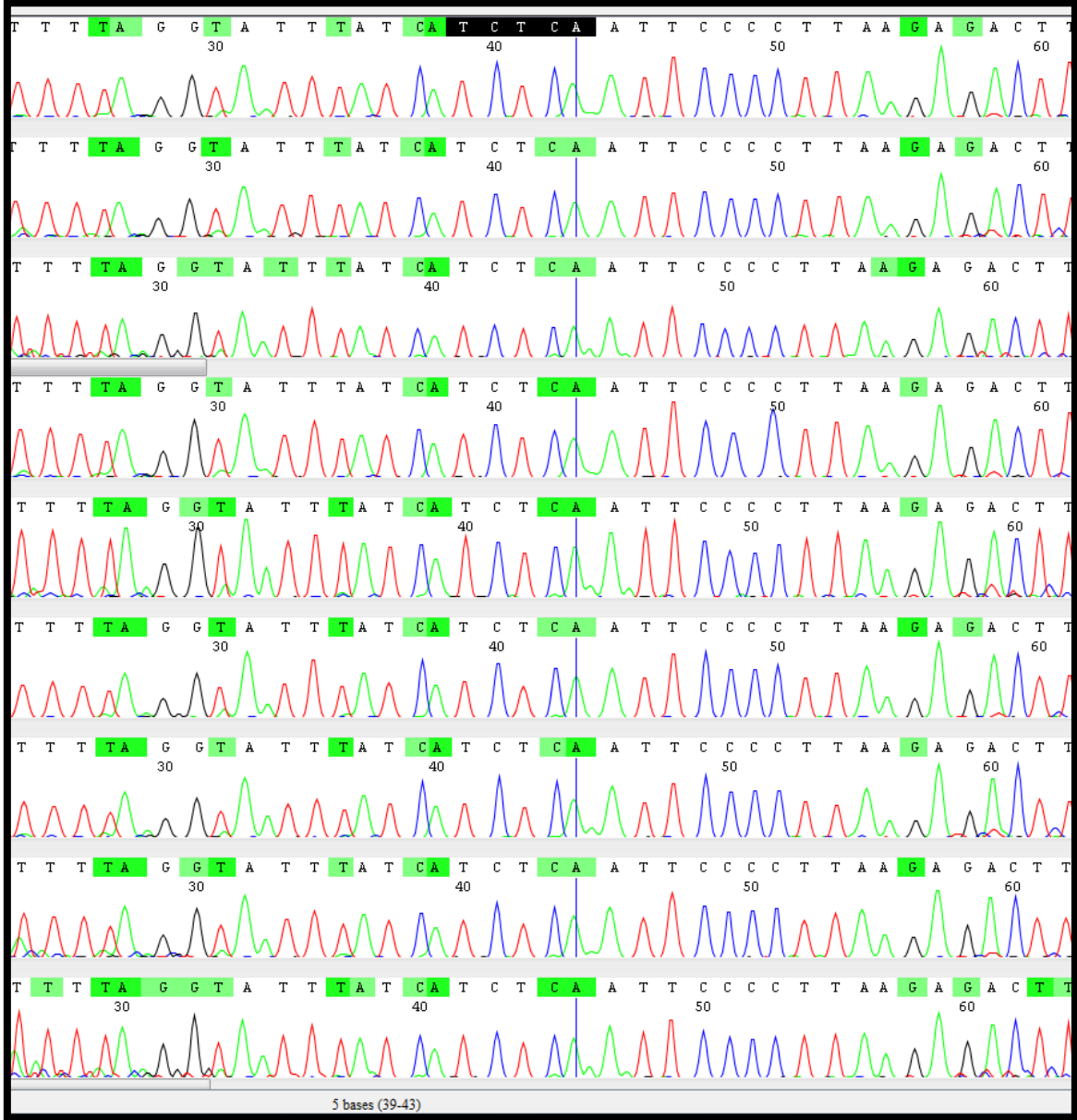
Normal ve mutasyona uğramış allelleri tespit etmek için, çoğaltılan ilgili DNA bölge PCR rnlerinin %10'luk poliakrilamid jelde (Teixeira vd., 2001) %8'lik poliakrilamid jelde (Seyedabadi vd., 2011; Kurylenko vd., 2013), %6'lik poliakrilamid jelde (Bernoco ve Bailey, 1998; Emelyanova vd., 2008) veya %4'lk agaroz jelde (Zavrtanik vd., 2005) ya da capillar (Swinburne vd., 1999; Georgescu vd., 2006; Piro vd., 2008; ınar Kul vd., 2014) elektroforezi yapılarak genotipler belirlenmiştir. Taşıyıcı olan rnekler DNA dizi analizi yöntemiyle de kontrol edilerek doğrulanmıştır (Arbani vd., 2015). Yürütülen çalışmalarda bazı araştırmacılar (AbouEl Ela vd., 2018; Bugno-Poniewierska vd., 2019) gibi tüm örnekler dizi analizi yapılarak genotipi belirlenmiştir.

4.1.2 PCR rnlerinin Dizi Analizi

Dizi analizi için PCR rneklerinin temizliği ve DNA dizi belirleme işlemleri hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. 174 b byklğindeki PCR rnlerinin DNA dizi analizi yapılması için öncelikle PCR karışımında bulunan dNTP ve primer artıkları ile istenmeyen moleküller PCR clean-up kiti kullanılarak temizlenmiştir. Örneklerin ift yönlü DNA dizi analizi BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit adlı ticari kit prosedürüne uygun olarak ABI 3500 cihazında yapılmıştır.

DNA dizi analizi işlemi sonucunda 115 baş Türk Arap atı dizi analizi sonuçları MEGA X (Kumar vd., 2018) ve CodonCode (CodonCode Corporation) bilgisayar programları kullanılarak yapılmıştır. Dizi analizi sonucuna göre PCR ampliconlarından 102 b ile 339 b arasında değişen uzunlukta DNA dizi parçaları elde edilmiştir. Dokuz

Arap atı için elde edilen dizi analizi sonuçlarının CodonCodetrace görüntüsü Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm Arap atı örneklerinde SCID kusuruna yol açan delesyonun olmadığını gösteren örneklerin dizi sıralamaları (align) Ek Açıklama-C’de Şekil 7.1.a, b, c ve d olarak verilmiştir.



Şekil 4.3. Birkaç örneğe ait dizi analizinin CodonCode programı ile sıralaması (align) (İşaretli yer delesyon olan bölgeyi belirtir).

Yapılan tez çalışması sonucunda, Eskişehir ve bölgesinden dokuz farklı popülasyonda yetiştirilen toplam 115 baş Türk Arap atlarında moleküler genetik tekniklerden biri olan DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak SCID mutant alleli araştırılarak incelenen tüm Arap atların SCID mutant alleli taşımadıkları tespit edilmiştir.

Türk Arap atlarında SCID genetik kusurunun araştırıldığı ilk çalışmada ise; Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'nün Anadolu (70), Karacabey (70) ve Sultansuyu işletmelerinde yetiştirilen damızlık toplam 239 baş Arap atları test edilmiş ve örneklerde hastalığa neden olan mutant allel tespit edilmemiştir (Çınar Kul vd., 2014). Yürütülen çalışmada Eskişehir yöresi özel işletmelerinde yetiştirilen Arap atları kullanılırken Çınar Kul vd., (2014) yaptığı araştırmada kamuda yetiştirilen Arap atları test edilerek aynı sonuçlar bulunmuştur. Türk arap atlarında SCID mutant allelin olmadığı belirlenmiştir. Benzer çalışmalar yapılarak Polonya (271) (Terry vd., 1999), Romanya (60) (Georgescu vd., 2006), Slovenya (128) (Zavrtanik vd., 2005), Letonya (57) (Emelyanova vd., 2008), İran (120) (Seyedabadi vd., 2011), Suriye (250) (Khanshour vd., 2013)); Ukrayna (16) (Kurylenko vd., 2013) ve Mısır (10) (103) (Aleman vd., 2018; AbouEl Ela vd., 2018) popülasyonlarında SCID mutant allele rastlanılmamıştır. Farklı ülke Arap atı popülasyonlarında yapılan genetik çalışmalarda SCID taşıyıcı atların prevalansı ABD %8.4 (21/250) (Bernoco ve Bailey, 1998), İngiltere %2.89 (3/106) (Swinburne vd., 1999), Brezilya %1.5 (3/205) (Teixeira vd., 2001), Güney Afrika %6.4 (2004 yılı) ve %3.4 (2009 yılı), Fas %5.6 (21/377) (Piro vd., 2008), İran %1.6 (4/244) (Arbani vd., 2015) ve Polonya %0.19 (Bugno-Poniewierska vd., 2019) olarak tespit edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Eskişehir bölgesi özel çiftliklerinde yetiştirilen Arap atlarında SCID mutant geni varlığının araştırılması DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada, SCID analizi için izole edilen DNA örnekleri PCR'da çoğaltılarak DNA dizi analizleri tamamlanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, Eskişehir bölgesi özel çiftliklerinde yetiştirilen Arap atlarında SCID mutant allele ve taşıyıcısına rastlanılmamıştır. Yapılan tez çalışması ile Eskişehir bölgesi özel işletmelerinde ve Çınar Kul vd., araştırması ise TİGEM Bursa, Malatya ve Eskişehir işletmelerinde yetiştirilen Türk Arap atı popülasyonlarında SCID genetik kusurunun bulunmadığı ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar Türk Arap atlarının yetiştirme değerini arttırmaktadır. Bununla birlikte, tüm Türk Arap atlarının genetik kusurlar bakımından araştırılıp incelenmesi gerekmektedir. Özellikle ithal edilen at ve spermaların bilinen genetik kusurlar bakımından araştırıldıktan sonra yetiştiricilikte kullanılması SCID bakımından ari olan Türk Arap atı popülasyonunun korunması için önemlidir.

Genetik kusura neden olan mutasyon(lar)ın saptanması ve genetik test taramalarıyla hayvan popülasyonlarında kontrollü melezleme yapılarak etkilenen hayvanların doğumu önlenabilir. Taşıyıcı atlar istenen ve değerli özelliklere sahip ise ve ıslah programında maliyet etkin değilse taşıyıcı olmayanlarla mezlenerek yetiştirilebilir. ABD örneğinde olduğu gibi genetik testlerin uygulanmasıyla 1970'lerde %20'lerde olan SCID mutant allelin frekansı 1998'de %8 civarına çekilebilmiştir. Aynı durum Güney Afrika'da görülmüş aynı popülasyonlarda 2004 yılında %6.4 olan prevalans 2009 yılında %3.4'e gerilemiştir. Bunun tersi durumlarda İran ve Polonya'da tespit edilmiştir. 1999'da Polonya ve 2011 İran'da yapılan analizlerde SCID mutant allele rastlanılmazken, 2017 yılında Polonya ve 2015 İran'da yapılan çalışmalarda SCID taşıyıcı atların frekansı sırasıyla %0.19 ve %1.6 olmuştur. Bundan dolayı SCID mutant allelinden ari olan Türk Arap atları genetik testler yoluyla bu özelliğinin korunması ve ülkedeki tüm Arap atlarının test edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akyüz, B., Arslan, K. 2009, Sığır Yetiştiriciliğini Tehdit Eden Kalıtsal Hastalıklar, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 6 ,1, s.43-51.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., vd., 2007, Molecular Biology of The Cell, Garland Science, p.1227-1242.
- Aleman, M., Finno, C., J., Weich, K., Penedo, M., C., 2018, Investigation of known genetic mutations of Arabian horses in Egyptian Arabian foals with Juvenile Idiopathic Epilepsy, Journal of Veterinary Internal Medicine, 32,1, p.465-468.
- Animal Genetics, 2019, http://www.animalgenetics.us/equine/genetic_disease/Index.asp, erişim tarihi: 29.04.2019.
- Anonim, 2014, Turk Haygen Projesi, <http://www.http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>], erişim tarihi: 01.10.2014.
- Anonim, 2014, Eskişehir İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü 2014 Faaliyet Raporu, s.31.
- Anonim, 2019 a, Arabian Horse Definition, <http://www.waho.org> erişim tarihi:04.09.2019.
- Anonim, 2019 b, <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/lifescience/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-workflow.html>, erişim tarihi: 02.07.2019.
- Arbani, R. S., Tarang, A., Potki, P., Baniyaghoub, S., Seighalani, R., vd., 2015, Genetic Monitoring for Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID) Carriers in Arabian Horses of Iran, Journal of Agricultural Science and Technology, 17, p.615,622.
- Arpacık, R., 1996, At yetiştiriciliği, Şahin Matbaası, s.76,78.
- Arpacık, R., 2010, At Yetiştiriciliği, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Yayın no: 417, s.47-52.
- Aytekin, İ., 2006, Güney Karaman Koyun Irkında Genetik Polimorfizmin RAPD-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, 79 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bailey, E., Reid, R., Skow, L., Mathiason, K., Lear, T., vd., 1997, Linkage of The Gene for Equine Combined Immunodeficiency Disease to Microsatellite Markers HTG8 and HTG4: Syteny and FISH mapping to ECA9, *Animal Genetic*, 28,4 p. 268-273.
- Bailey, E., Brooks S., A., 2013, *Horse Genetics*, 2nd Edition, CABI Boston, MA, USA, p.166.
- Bowling, A., T., Ruvinsky, A., 2000, *The genetics of the horse*, CABI, U.K, p.146.
- Bernoco, D., Bailey, E., 1998, Frequency of The SCID Gene Among Arabian Horses in The USA, *Animal Genetics*, 29,1, p.41-42.
- Beşter, D., 1947, *At Bilgisi*, Ankara Halkevi Yayını, Yayın no:44, s.64-65.
- Blunt, T., Gell, D., Fox, M., Taccioli, G., Lehmann, A., vd., 1996, Identification of A Nonsense Mutation in The Carboxyl-Terminal Region of DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Kinase Activity is Linked to V(D)J Recombination and DNA Repair Defects Associated with Murine Scid Mutation, *Cell*, 8), p.813-823.
- Bugno-Poniewierska, M., Stefaniuk Szmukier, M., Piestrzynska-Kajtoch, A., Fornal, A., Ropka-Molik, K., 2017, Preliminary results of genetic monitoring of the occurrence of three genetic diseases (CA, SCID, LFS) in Arabian horses from Poland, In 36th International Society for Animal Genetics Conference.
- Bugno-Poniewierska, M., Wnuk, M., Witar, W., 2017, The fluorescence in situ study of highlyrepeated DNA sequences in domestic horse (*Equus caballus*) and domestic donkey (*Equus asinus*) - Advantages and limits of usefulness in phylogenetic analyses, *Journal Animerican Food Scientist* 18,4, p.723-732.
- Bugno-Poniewierska, M., Stefaniuk Szmukier, M., Piestrzynska-Kajtoch, A., Fornal, A., Ropka- Molik, K., 2019, Genetic screening for cerebellar abiotrophy, severe combined immunodeficiency and lavender foal syndrome in Arabian horses in Poland.*The Veterinary Journal* 248, p.71,73.
- Clark, E., Turner, AS., Boysen, BG., Rouse, BT., 1978, Listeriosis in An Arabian Foal with Combined Immuno Deficiency, *Journal ofAmerican Veterinary Medical Associan*, 172, 3, p.363-366.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

CodonCode Corporation, 2019, www.codoncode.com, erişim tarihi: 5.2.2019

Çelebi, M., 1990, Türkiye’de Arap Atlarının Yetiştirilmesi, 21st Asian Racing Conference, 1-8 July, İSTANBUL.

Çınar, K., B., Korkmaz, A., O., Ertugrul, O., Durmaz, M., 2014, Investigation of Severed Combines Immunodeficiency (SCID) Disease of Arabian Horses Raised at the State Farms in Turkey, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 61,1, p.59-63.

Efendić, M., Maćešić, N., Samardžija, M., Vojta, A., Korabi, N., vd., 2018, Determination of sublethal mutation causing lavender foal syndrome in Arabian horses from Croatia, Journal of Equine Veterinary Science, 61, p.72-75.

Ela, N., A., Khalid, A., Ahmed, H., A., Brooks, S., A., 2018, Molecular Detection of Severe Combined Immunodeficiency Disorder in Arabian Horses in Egypt, Journal of Equine Veterinary Science, 68, p. 55,58.

Emelyanova, V., Ivanova, E., Khrabrova, L., Gavrilicheva, I., 2008, severe combined immunodeficiency in horses, Latvian Journal of Agronomy/Agronomija Vestis, p.10.

FAO, 2017, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EK>, erişim tarihi: 04.02.2019.

Georgescu, S., E., Condac, E., Dinischiotu, A., Costache, M., 2006, Molecular Basis and iagnostication of SCID in Arabian Horses, Romanian Biotechnological Letters, 11,5, p.2875-2876.

Güleç, E., 2005, Türk İngiliz Atı (Elde basım), Anadolu At Irklarını Yaşatma ve Gelistirme Derneği Yayınları.

Hacan, O., Akcapinar, H., 2011, Some Phenotypic and Genetic Parameters of Pure Bred Turkish Arabian Horses Raised in Different Stud Farms I, Body Measurements and Heritabilities, Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 51,2, p.55-70.

Innis, M. A., Gelfand, D., H., 1990, PCR protocols A guide to methods and applications, Academic Press, p.3-12.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jones, W., 1997, Severe Combined Immuno Deficiency New A Solution, Journal of Equine Veterinary Science, 17, p.630-632.
- Khanshour, A., Conant, E., Juras, R., Cothran, E., R., 2013, Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Arabian horse populations, Journal of Heredity, 104,3, p.386-398.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, Molecular Biology and Evolution 35,6, p.1547-1549.
- Куриленко, Ю., Ф., Костенко, С., О., Дубін, О., В., Жежер, М., І., 2013, ПЛР-діагностика важкого комбінованого імунodefіциту (SCID) у коней, Біологія тварин, 15,3, р. 49,53.
- Laboklin Laboratory, 2019, <http://www.laboklin.co.uk/laboklin/index.jsp>, erişim tarihi: 29.04.2019
- Lewis, S., M., 1994, The Mechanism of V(D)J Joining: Lessons From Molecular, Immunological, and Comparative Analyses, Advances in Immunology, 56, p.27–150.
- Linnaeus, C., 1758, Systema Naturae, İSVEÇ, p.73.
- Lund, L., 2007, Equine Severe Combined İmmunodeficiency, SLU, Department of Animal Breeding and Genetics, Uppsala.
- Lunn, D., McClure, J., Schobert, C., Holmes, M., 1995, Abnormal Patterns of Equine Leucocyte Differentiation Antigen Expression in Severe Combined Immunodeficiency Foals Suggests The Phenotype of Normal Equine Natural Killer Cells, Immunology, 84,3, p.495-499.
- Maxam, A., M., Gilbert, W., 1977, A New Method for Sequencing DNA, Proceeding of the National Academy of Sciences, 74,2, p.560-564.
- Meek, K., Kienker, L., Dallas, C., Wang, W., Dark, M., vd., 2001, SCID in Jack Russell Terriers: A New Animal Model of DNA-PKcs Deficiency, The Journal of The Immunology, 167,4, p.2142–2150.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McChesney, T., C., England, J., J., Rich, L., J., 1973, Adenoviral infections in foals, Journal American Veterinary Medical Association, 162, p.545,549.
- McGuire, T., Poppie, M., 1973, Hypogammaglobulinemia and Thymic Hypoplasia in Horses: A Primary Combined Immunodeficiency Disorders, Infection and Immunity, 8,2, p.272-277.
- Miller, S., A., Dykes, D., D., Polesky, H., F., 1988, A Simple Salting Out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells, Nucleic Acids Research, 16,3, p.1215.
- Mitra, A., Yadav, B., Nazir, A., Balakrishnan, C., 1999, Molecular Markers and Their Applications in Livestock Improvement, Current Science, 77,8, p.1045-1053.
- Mullis, K., 1990, The Unusual Origin of The Polymerase Chain Reaction, Scientific American, 262,4, p.56-65.
- Nahla, A., AbouEl Ela, K., El-Nesr, H., Ahmed, S., B., 2018, Molecular detection of severe combined immunodeficiency disorder in Arabian horses in Egypt, Journal of Equine Veterinary Science, 68, p.55-58.
- OMIA, 2019,
https://omia.org/results/?search_type=advanced&gb_species_id=9796&single_locus=, erişim tarihi: 01.12. 2019.
- Özbeyaz, C., Akçapınar, H., 2006, At Yetiştiriciliği Ders Notları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı.
- Perryman, L., E., McGuire, T., C., Crawford, T., B., 1978, Maintenance of foals with combined immunodeficiency: causes and control of secondary infections, American Journal of Veterinary Research, 39,6, p. 1043,1047.
- Perryman, L., Torbeck, L., 1980, Combined Immunodeficiency of Arabian Horses:Confirmation of Autosomal Recessive Mode of Inheritance, Journal of the American Veterinary Medical Association 176,11, p.1250-1251.
- Perryman, L., E., 2000, Primary Immuno Deficiencies of Horses, The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice, 16,1, p.105-116.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Piro, M., Benjouad, A., Tligui, N., S., Allali, K., E., Kohen, M., E., 2008, vd., Frequency of the Severe Combined Immunodeficiency Disease Gene among Horses in Morocco, *Equine Veterinary Journal*, 40,6, p.590-591.
- Poppie, M., McGuire, T., 1977, Combined Immuno Deficiency in Foals of Arabian Breeding Evaluation of Mode of Inheritance and Estimation of Prevalence of Affected Foals and Carrier Mares and Stallion, 170,1, p.31-33.
- Sambrook, J., Fritsch, E., F., Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, p.1546.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A., R., 1977, DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74,12, p.5463-5467.
- Seyedabadi, H., R., Banabazi, M., H., Afraz, F., Asadzadeh, N., Javanmard, A., vd., 2011, Molecular Investigation on DNA-PKcs Gene and Identification of SCID Carriers Among Iranian Arabian Horses Using A Test Based on PCR, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, p.865-867.
- Shin, E., K., Perryman, L., Meek, K., 1997 a, A Kinase-Negative Mutation of DNA-PK(CS) in Equine SCID Results in Defective Coding and Signal Joint Formation, *The Journal of Immunology*, 158,8, p.3565-3569.
- Shin, E., Perryman, L., Meek, K., 1997 b, Evaluation of A Test for Identification of Arabian Horses Heterozygous for The Severe Combined Immunodeficiency Trait, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211,10, p.1268–1270.
- Smith, L., Sanders, J., Z., Kaiser, R., J., Hughes, P., Dodd, ., C., vd., 1986, Fluorescence Detection in Automated DNA Sequence Analysis, *Nature*, 321,6071, p.674-679.
- Studdert, M., 1978, Primary Severe Combined Immunodeficiency Disease of Arabian Foals, *Australian Veterinary Journal*, 54,9, p.411-417.
- Swinburne, J., Lockhart, L., Scott, M., Binns, M., M., 1999, Estimation of The Prevalence of Severe Combined Immunodeficiency Disease in UK Arab Horses as Determined by A DNA-Based. Test, *Veterinary Record*, 145, p.22-23.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Şahin, E., 2005, Antalya Yöresi Kıl Keçilerinde Genetik Polimorfizmin RAPD-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, GAP, 4, s.21-23.
- Tarr, C., J., 2012, The prevalence of severe combined immunodeficiency, lavender foal syndrome and cerebellar abiotrophy in Arabian horses in South Africa, Doctoral dissertation, University of Pretoria, 56. p.
- Tarr, C., J., Thompson, P., N., Guthrie, A., J., Harper, C., K., 2014, The carrier prevalence of severe combined immunodeficiency, lavender foal syndrome and cerebellar abiotrophy in Arabian horses in South Africa, Equine Veterinary Journal, 46, p.512-514.
- Teixeira, C., S., Oliveira, D., A., Kuabara, M., Y., 2001, Prevalência da imunodeficiência severa combinada em cavalos da raça Arabe em plantéis de Minas Gerais e São Paulo, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 53, p.380-384.
- Terry, R., R., Cholewinski, G., Cothran, E., G., 1999, Absence of the severe combined immunodeficiency disease gene among Arabian horses in Poland, Journal of Applied Genetics, 1,4), p.39,41.
- TJK, 1997, Türk Arap atı soykütüğü (Turkish Arabian Horse Stud book), Veliefendi Hipodromu Bakırköy, 1st edition.
- The UC Davis Veterinary Genetics Laboratory, 2019, <https://www.vgl.ucdavis.edu/services/horse.php>, erişim tarihi: 29.04.2019.
- Wade, C., M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., vd., 2009, Domestic Horse Genome Sequenced, Science, 326,5954, p.865,867.
- Weldon, A., Zhang, C., Antczak, D., Rebhun, W., 1992, Selective IgM deficiency and abnormal B-cell response in a foal, Journal of the American Veterinary Medical Association, 2019, p.1396-1398.
- Whitwell, K., E., 1978, Combined Immuno Deficiency in Arab foals, Veterinary Record, 103, p.568.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wiler, R., Leber, R., Moore, B., B., VanDyk, L., F., Perryman, L., E., 1995, Equine severe Combined Immunodeficiency: A Defect in V(D)J Recombination and DNA-Dependent Protein Kinase Activity, Proceedings of the National Academy of Sciences, 92,25, p.11485-11489.
- Yarkın, I., 1962, Atçılık, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Yayınevi, No: 40, s. 41-116.
- Yaşar, A., 1996, Osmanlı Döneminde ve Cumhuriyet Tarihinde Haralar, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 130 s. (yayınlanmamış).
- Zavrtanik, J., Mesarič, M., Majdič, G., 2005, Genetic monitoring for Severe Combined Immuno Deficiency Carriers in Horses in Slovenia, Slovenian Veterinary Research, 42, p.37-41.

EK AÇIKLAMALAR**Sayfa**

| | |
|---|----|
| Ek Açıklama-A: Atlarda Görülen Bazı Kalıtsal Hastalıklar..... | 44 |
| Ek Açıklama-B: Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereç Listesi..... | 46 |
| Ek Açıklama-C: SCID Analiz Sonuçları..... | 47 |

Ek Açıklama-A: Atlarda Görülen Bazı Kalıtsal Hastalıklar.

Çizelge 7.1. Atlarda görülen bazı kalıtsal hastalıklar ve hastalık genlerinin tanımlanması (OMIA).

| HASTALIĞIN ADI | GENİN ADI | GENİN TANIMLANMASI |
|--|-----------|---|
| Andro gen insensitivit ysyndrome (AIS) | AR | Andro gen receptor |
| Atlanto occipital fusion | HOXD3 | Homeobox D3 |
| Brindle 1 | MBTPS2 | Membrane bound transcription factor peptidase, site 2 |
| Cerebellar abiotrophy | MUTYH | MutY DNA glycosylase |
| Coat colour, agouti | ASIP | Agouti signaling protein |
| Coat colour, albinism, oculocutaneous type VI | SLC24A5 | Solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 5 |
| Coat colour, champagne | SLC36A1 | Solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 1 |
| Coat colour, cream dilution | SLC45A2 | Solute carrier family 45, member 2 |
| Coat colour, dominant White | KIT | v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog |
| Coat colour, dun | TBX3 | T-box 3 |
| Coat colour, grey/gray | STX17 | syntaxin 17 |
| Coat colour, extension | MC1R | melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor) |
| Coat colour, Leopard Complex Spotting | TRPM1 | Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1 |
| Coat colour, silver | PMEL | premelanosome protein |
| Coat colour, White spotting | MITF | microphthalmia-associated transcription factor |
| Coat colour, White spotting, PAX3-related | PAX3 | Paired box 3 |
| Congenital liver fibrosis (CLF) | PKHD1 | Polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive) |
| Curly coat | KRT25 | keratin 25, type I |
| Dwarfism, ACAN-related | ACAN | Aggrecan |
| Dwarfism, Friesian | B4GALT7 | Xylosylprotein beta 1,4-galactosyl transferase, polypeptide 7 |
| Ehlers-Danlos syndrome | PPIB | Peptidyl prolyl isomerase B (cyclophilin B) |
| Ehlers-Danlos Syndrome, type VI | PLOD1 | Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 |
| Epidermolysis bullosa, junctionalis, LAMA3-related | LAMA3 | laminin, alpha 3 |
| Epidermolysis bullosa, junctionalis, LAMC2-related | LAMC2 | laminin, gamma 2 |
| Foal immunodeficiency syndrome in the Fells and Dales Pony | SLC5A3 | Solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter), member 3 |
| Glycogen storage disease IV | GBE1 | glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1 |
| Hoof Wall separation syndrome | SERPINB11 | Serpin peptidase inhibitor, clade B |

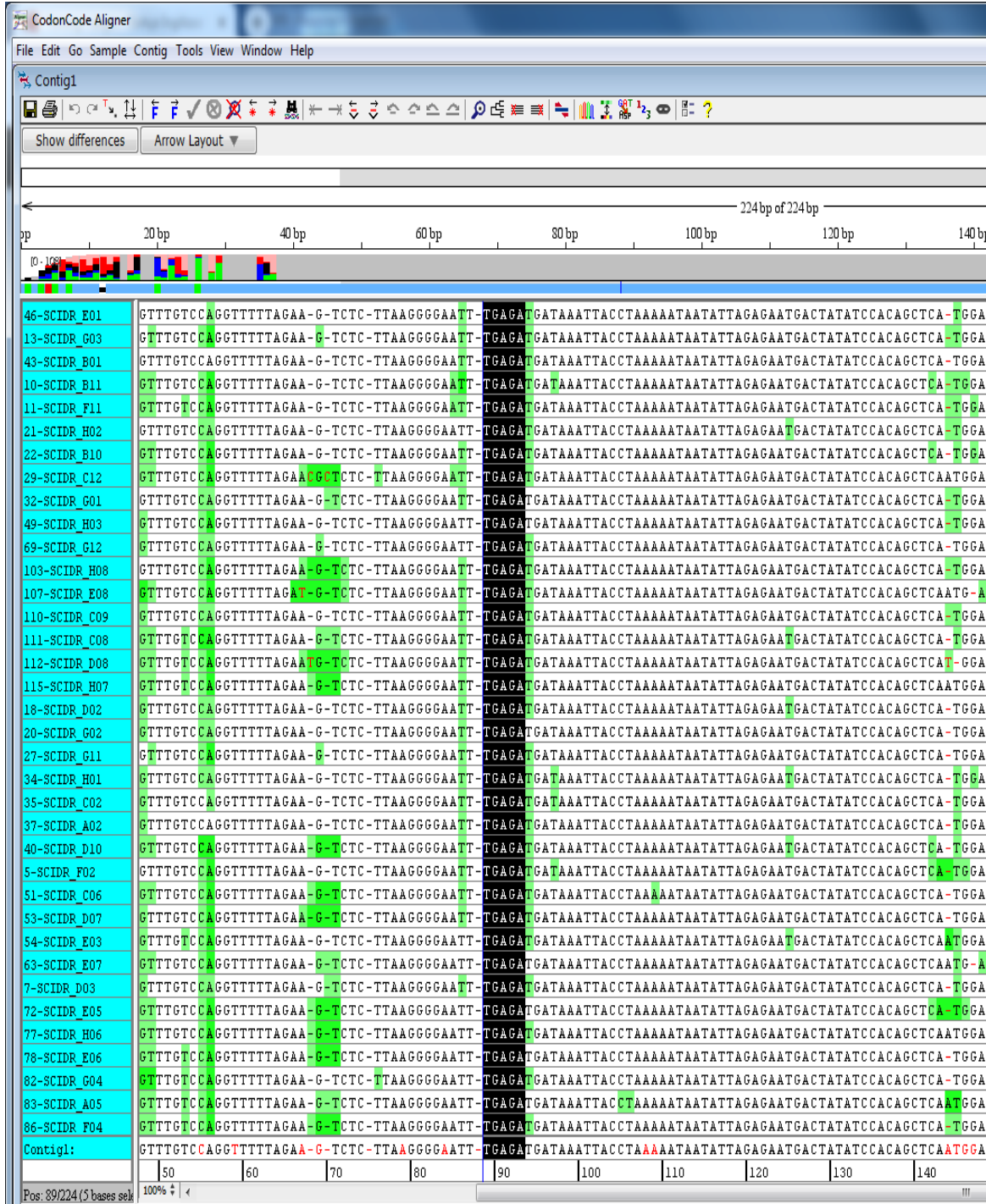
| Çizelge 7.1. Atlarda görülen bazı kalıtsal hastalıklar ve hastalık genlerinin tanımlanması (OMIA) (devam). | | |
|--|----------|--|
| Hydrocephalus | B3GALNT2 | beta-1,3-N-acetyl galactos aminyl transferase 2 |
| Incontinentia pigmenti | IKBKG | inhibitor of kapa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma |
| Lavender foal syndrome | MYO5A | myosin VA |
| Malignanthy perthermia | RYR1 | Ryanodine receptor 1 (skeletal) |
| Megacolon | EDNRB | Endothelin receptor type B |
| Multiple ocular defects | PMEL | premelanosome protein |
| Myotonia | CLCN1 | Chloride channel, voltage-sensitive 1 |
| Naked foal syndrome | ST14 | suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma) |
| Night blindness, congenital stationary | TRPM1 | Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1 |
| Ocular squamous cell carcinoma | DDB2 | damage-specific DNA binding protein 2 |
| Ovotesticular DSD (Disorder of Sexual Development) | SRY | Sex determining region Y |
| Periodicparalysis II | SCN4A | Sodium channel, voltage gated, type IV alphasubunit |
| Polysaccharide storage myopathy/Exertional rhabdomyolysis | GYS1 | Glycogensynthase 1 (muscle) |
| Severe combined immunodeficiency disease, | PRKDC | Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide |
| Skeletalatavism | SHOX | Short stature homeobox |
| Skeletalatavism | ITGA2B | İntegrin alpha 2b |

Ek Açıklama-B: Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereç Listesi.

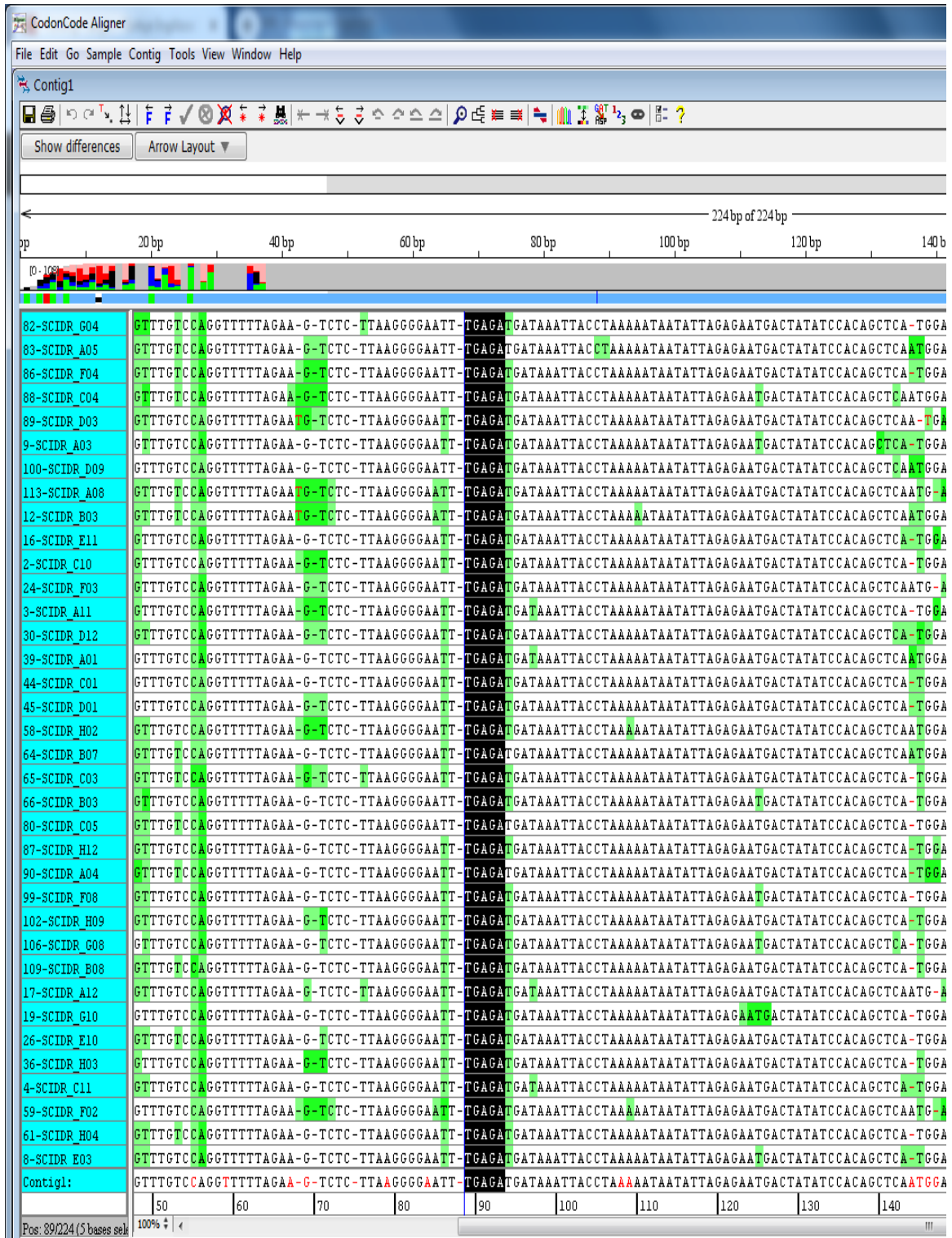
Çizelge 7. 2. Araştırmada kullanılan araç ve gereç listesi.

| Adı /Modeli | Çalışmada Kullanım Amacı |
|--|---|
| Saf Su Cihazı/ Ultra Saf Su Cihazı | DNA İzolasyonu ve PCR Reaksiyonları İçin Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması |
| pH metre /HI 2211 | Tampon Çözeltilerin Hazırlanması İçin Gerekli ph'nın Ayarlanması |
| Çalkalayıcı Sıcak Su Banyosu/Thermomixer Comfort | DNA İzolasyonu |
| Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı/MS-300 HS | Tampon Çözeltilerin Hazırlanması |
| Çalkalayıcı (Vortex)/ Fisher Scientific FB1502 | Tampon Çözeltilerin Hazırlanması ve DNA İzolasyonu |
| Santrifüj/ Thermofisher Scientific 14.600 rpm | DNA İzolasyonu ve PCR Aşamalarında Örneklerin Kısa Süreli Santrifüj Edilerek Çöktürülmesi |
| Hassas Terazı/ Radwag AS220/C/2 | Tampon Çözeltilerin Hazırlanmasında Sarf Malzemelerin Tartılması |
| Jel Elektroforez Takımları / Cleaver Scientific Max. 250 mA Jel Elektroforez Takımları / Owl Separations Systems 7303 A2 Class II | DNA İzolasyonu ve PCR Ürünlerinin Tespiti |
| Güç Kaynakları / Thermofisher Scientific EC300XL | Elektroforez Sistemlerinin Elektrik Ortamlarının Sağlanması |
| Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi | DNA İzolasyonu, PCR Ürünlerinin Ön Denemelerinin Jelde Görüntülenmesi ve Bilgisayar Ortamına Aktarılması |
| Termal Yazıcı /Sony Dijital Graphic printer Up | DNA İzolasyonu ile PCR Ürünlerinin Arşivlenmesi İçin Baskı Yapılması |
| Mikro Dalga Fırını / Arçelik MD 5653 | Agaroz Jellerin Hazırlanması |
| Derin Dondurucu -20 °C Derin Donduruculu Buzdolabı/ +4 °C | Örnek ve Çeşitli Sarf Malzemelerinin Muhafazası |
| Çeker Ocak /Hedlab Class II | DNA tüplerinden etil alkolün uzaklaştırmak için tamamen kurutmaya bırakılması Çeşitli Tampon Çözeltilerin Hazırlanması |

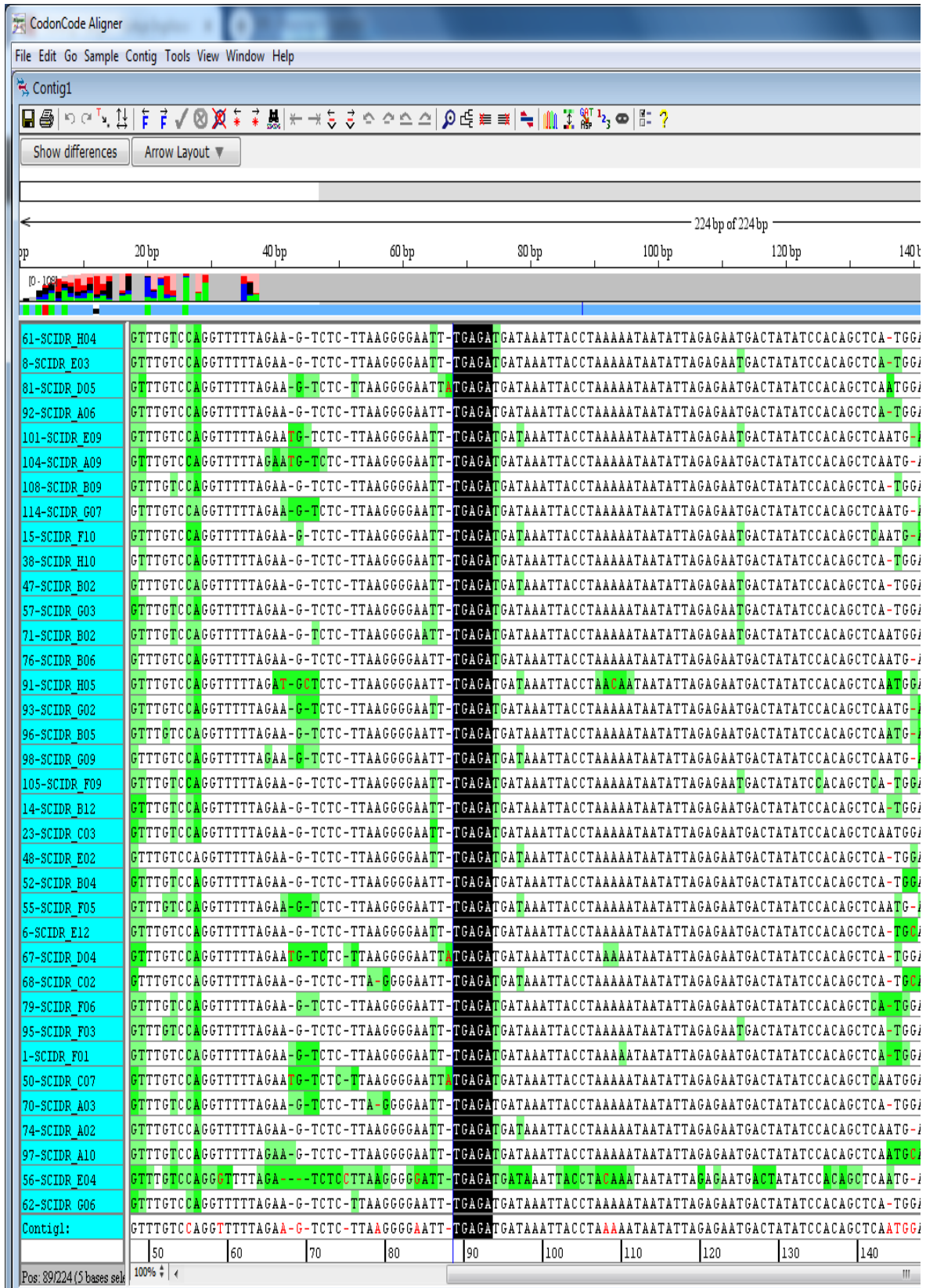
Ek Açıklama-C: SCID Analiz Sonuçları.



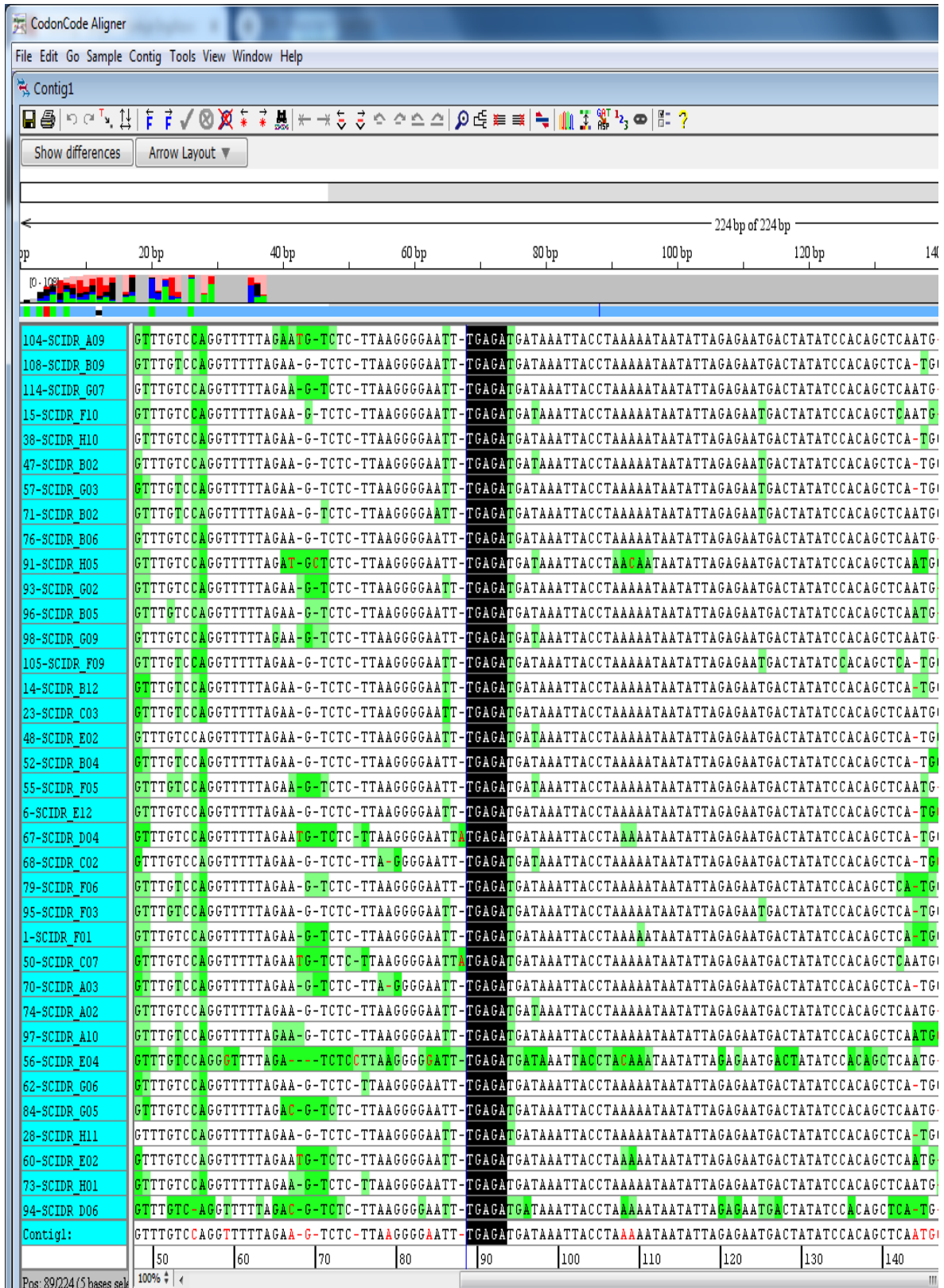
Şekil 7.1.a. SCID Analiz Sonuçları.



Şekil 7.1.b. SCID Analiz Sonuçları.



Şekil 7.1.c. SCID Analiz Sonuçları.



Şekil 7.1.d. SCID Analiz Sonuçları.