

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
SONUÇ RAPORU**

Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'nde (TİGEM) Yetiştirilen Siyah Alaca Sığırlarda Kalıtsal Kolestrol Eksikliği (CD) Hastalığının Araştırılması

Prof. Dr. Ceyhan Özbeyaz

Doktora Öğrencisi Melike ÖZCAN

18L0239012

18.07.2018 - 18.07.2019

27.08.2019

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara - 2019



**I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri**

**Türkçe Adı** : Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'nde (TİGEM) Yetiştirilen Siyah Alaca Sığırlarda Kalıtsal Kolestrol Eksikliği (CD) Hastalığının Araştırılması

**İngilizce Adı** : Investigation of Hereditary Cholestrol Deficiency (CD) in Holstein Cattle Raised at the State Farm in Turkey

**Özetleri** :  
Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'nde (TİGEM) Yetiştirilen Siyah Alaca Sığırlarda Kalıtsal Kolestrol Eksikliği (CD) Hastalığının Araştırılması

Özet: Türkiye'de uluslararası hayvan ve sperma hareketleri yoğun olduğu için enfeksiyöz ve kalıtsal hastalıklardan da çok etkilenmektedir. TİGEM, damızlık üretimi ve dağıtımını yapan bir kamu kuruluşudur. Bu çalışmada TİGEM'de yetiştirilen Holştayn sığırlarda Kolesterol Eksikliği (CD) adı verilen hastalığa neden olan mutant allelin varlığı ve dağılımının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak Çukurova, Ceylanpınar, Koçaş, Polatlı, Türkgeldi ve Sultansuyu Tarım İşletmelerinde (TİM) yetiştirilen 466 baş Holştayn ırkı sığırdan örnekler toplanmıştır. Genotiplendirmede Real-Time PCR yöntemi kullanılmıştır. Çukurova işletmesinde 3, Ceylanpınar'da 3 ve Koçaş'ta 1 olmak üzere toplam 7 sığırın heterozigot yani taşıyıcı olduğu tespit edilmiştir. İşletmelere göre mutant allel frekansı % 0,00-1,97 arasında değişmektedir. Mutant allelin genel frekansı ise % 0,75 olarak hesaplanmıştır. APOB mutant alleli düşük frekansta da olsa Türkiye'de ilk kez bu çalışmayla tespit edilmiş bulunmaktadır. Bu nedenle diğer sürülerde de taramalar yapılarak kontrol programlarının geliştirilmesi gerekli bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sığır, Holştayn, Mutasyon, APOB, Kolestrol Eksikliği,

Investigation of Hereditary Cholestrol Deficiency (CD) in Holstein Cattle Raised at the State Farm in Turkey

Abstract: Turkey is exposed to international animal and semen movements. For this reason, Turkey is very affected by diseases and also by hereditary disorders. TİGEM is a state farm that produces and distributes breeding cattle. This study aimed to investigate the presence and distribution of mutant alleles causing cholesterol deficiency (CD) disorder in Holstein cattle reared in TİGEM. For this purpose, samples were collected from 466 Holstein cattle reared in Cukurova, Ceylanpınar, Kocas, Polatli, Turkgeldi and, Sultansuyu state farms. Real-Time PCR method was used for genotyping. A total of 7 cattle, 3 in Cukurova, 3 in Ceylanpınar and 1 in Kocas, were found to be heterozygous. According to farms, the mutant allele frequency varies between 0,00-1,97%. The overall frequency of the allele was 0,75%. APOB mutant allele was found low frequencies and detected for the first time in Turkey with this research. Therefore, it is necessary to develop control programs by screening in other Holstein populations.

Keywords: Cattle, Holstein, Mutation, APOB, Cholestrol Deficiency

## II. Amaç ve Kapsam

Entansif üretimde, sağlıklı sürüler elde etmek, yüksek verimli ineklere sahip olmak, her yıl her inekten bir buzağı elde etmek, bu buzağuları iyi bir şekilde büyütmek ve bu işlemlerde süreklilik sağlamak en büyük hedeflerdendir. Buzağı hastalıkları ve ölümleri yetiştiricilerin önemli problemlerinden olup işletmenin maddi zararları arasında ilk sırada gelen kayıplardandır. Hastalıklar genetik kaynaklı da olabilir. Genetik kaynaklı kusurlara “kalıtsal hastalıklar” adı verilmektedir. Kalıtsal hastalıklar, genlere bağlı olarak kalıtsal olarak nesilden nesile aktarılan yapı bozuklukları, anomaliler, sendromlar şeklinde ortaya çıkan kusurlardır. Yetiştiricilikte, bu hastalıklar bir taraftan hayvanların ekonomik değerlerini, verimlerini ve damızlık kıymetlerini azaltırlar, bir taraftan da ölümlere yol açarlar. Bu yüzden buzağının genetik özgeçmişinin bilinmesi yetiştirme stratejileri açısından çok önemli bulunmaktadır.

Kalıtsal hastalıkların önemi ve kalıtımı bilim adamlarının artan bir şekilde ilgisini çekmiştir. Buna rağmen bazı kalıtsal hastalıkların kalıtımı bugün bile tam olarak açıklanamamaktadır. Yetiştiricilikte kongenital malformasyonlar kolaylıkla görülür, ancak bu malformasyonları ebeveynlerinin fenotipinde görmek mümkün değildir. Büyük çiftlik hayvanlarının geç büyümeleri, genelde tek doğum yapmalarından dolayı çok zaman ve paraya ihtiyaç duyulması nedeniyle bu tip malformasyonların kalıtımı iyi anlaşılabilmiş değildir. Bu sürülerde düşük performanslı anomalili hayvanlar ayıklanır ve genelde başka bir işleme tabi tutulmazlar. Ancak günümüzde kayıtların ciddi bir şekilde tutulması neticesinde kalıtsal hastalıklar daha çok ortaya çıkarılabilmektedir.

Sığır yetiştiriciliğinde suni tohumlamanın çok yoğun kullanılması, kalıtsal hastalıklar konusunda daha dikkatli olunmasını gerektirmektedir. Kalıtsal hastalıklar genelde resesif karakterdedir ve akrabalı yetiştirmelerde daha sık ortaya çıkmaktadır. Kendisi herhangi bir hastalık belirtisi göstermeyen ancak herhangi bir kalıtsal hastalığı taşıyan bir boğa damızlıkta kullanıldığı süreçte hastalıklı geni yaymaya devam eder. Hastalık yapan genin frekansı arttıkça yapılacak birleştirmelerde homozigot olma ihtimali de artmaktadır. Bu nedenle kalıtsal hastalıkların belirlenmesi ve sürüden uzaklaştırılması yetiştiricilikte büyük önem arz etmektedir.

Sığır yetiştiriciliğinde verimleri arttırmak ve bazı önemli özellikleri iyileştirmek için seleksiyon yapılmaktadır. Bu seleksiyon yöntemlerinden en yaygın kullanılanları “Projene Test Yöntemi” ile “Genomik Seleksiyon Yöntemi” dir. Bu testlerden geçen ve performans bakımından sıralamaya giren bir boğa sadece bir ülkede veya kıtada değil tüm dünyada suni tohumlamada yaygın olarak kullanılır. Eğer bu boğalarda herhangi bir kalıtsal hastalık var ise verimleri arttırmak isteyen yetiştiriciler istemeden hastalığın da yayılmasına sebep olurlar. Daha önce görülmeyen birçok enfeksiyöz ve kalıtsal hastalık ithalat yoluyla Türkiye’ye giriş yapmıştır. Kontrolsüz sperma girişleri ile kalıtsal hastalıkları taşıyan boğa spermaları da Türkiye’de hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Konuyla ilgili olarak yapılan kayıtlara dayalı bir çalışmada (İnal ve Çam, 2016), 2015 yılında Türkiye’ye sperması ithal edilen 273 Holştayn boğanın % 29’unun en az bir kalıtsal kusuru taşıdığı ve hastalıklara göre 104-193 boğa hakkında da bilgi edinilemediği belirtilmektedir. Özellikle tanınmış boğalar taşıyıcı olduklarında yayılma hızı daha da artmaktadır. Örneğin, 1989 yılında ilk kez tanımlanan ve BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) isimli kalıtsal hastalık nokta mutasyonu sonucu oluşmuş olup 1952 doğumlu tanınmış bir boğadan (Osborndale Ivranshoe) temel almıştır (Özbeyaz, 1997). Gen teknolojisi geliştikçe yeni kalıtsal hastalıklar ve bozukluklar ortaya çıkarılmaktadır. Bunlardan bir tanesi 2015 yılında Alman araştırmacılar tarafından Holştayn’larda tespit edilen “Kolesterol Eksikliği-Cholestrol Deficiency (CD)” adı verilen kalıtsal bir bozukluktur (Kipp ve ark., 2015).

Kolesterol Eksikliği (CD), ölümle sonlanan otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. Hastalıktan etkilenmiş buzağılarda hipokolesterolemi ve hipolipidemi görülür. Hastalık ilk defa 2015 yılında Almanya’da Holştayn popülasyonu için 45,000 SNP ile yapılan rutin GWAS ( Genome Wide Association Study) analizi sayesinde ilgili genin BTA 11. kromozom üzerinde olduğu ortaya konulmuştur. Hastalıkla ilişkili gen, 1991 doğumlu Mauglin Storm isimli Kanada orijinli meşhur bir boğaya dayandırılmıştır (Kipp ve ark., 2015). CD, Holştayn sığırlarda 11. Kromozomda bulunan APOB (Apolipoprotein B) geninin 5. ekzonunun kodlama dizisinde bir insersiyon ile sonuçlanan

mutasyona bağılı ortaya çıkmaktadır. Yabancı allele sahip bireyler hastalıktan aridir (homozigot normal), bir yabancı bir mutant allele sahip bireyler taşıyıcıdır (heterozigot taşıyıcı) her iki allel de mutant (homozigot hasta) olan bireyler ise hastadırlar. İki taşıyıcının birleştirilmesinden % 25 oranında hasta (CD) buzağular doğarken, taşıyıcı ile normal bireyler birleştirildiğinde % 50 taşıyıcı buzağular elde edilir. Yani doğan buzağulardan hiç birisinin hasta olma ihtimali bulunmamaktadır (Doormal ve Beavers, 2016). Bu kalıtsal kusurun otozomal resesif kalıtım gösterdiği bildirilmekle birlikte 2019 yılında yayınlanan bir makalede (Hafliger ve ark., 2019), heterozigotlardan bazılarının klinik belirti gösterdiklerini ve tam penetrans gösteren homozigotlara göre heterozigotlarda genin penetransının azaldığını belirtmişlerdir. Dolayısıyla hastalığın heterozigotlarda tam olmayan penetranslı eksik dominant kalıtım gösteren metabolik bir bozukluk olduğu sonucuna varmışlardır.

Kolesterol Eksikliğinde, APOB genindeki mutasyon sonucu lipit metabolizması bozulmaktadır. Apolipoprotein B şilomikronlar ve LDL'ler (Low-density lipoprotein) için esansiyel bir apolipoproteindir. Apolipoprotein B geninde oluşan mutasyon homozigot olduğunda insanlarda görülen otozomal resesif bir hastalık olan hipobetalipoproteinem -1 (FHBL1) gibi fonksiyon kaybı olur (Menzi ve ark., 2016) ve APOB yokluğunda bağırsaklarda diyet ile alınan yağın ve yağda eriyen vitaminlerin emilimi olmaz. Bu durum bağırsaklarda şilomikron oluşumunu engelleyerek kolesterol metabolizmasını zayıflatır ve dolaşımda ve karaciğerdeki kolesterol seviyesinin azalmasına yol açar.

CD, ilk bulunduğu haplotip düzeyinde ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle hasta ve taşıyıcıların sınıflandırılmasında bazı sıkıntılar olmuştur. Haplotipler pedigri bilgileriyle birleştirilerek teşhis edilmeye çalışılmıştır. O; taşıyıcı olmayanlar, 1; taşıyıcılar, 2; homozigotlar, 3; şüpheli taşıyıcılar, 4; şüpheli homozigotlar olarak kodlanmıştır (VanRaden ve Null, 2015). Haplotip sınıflandırmasına göre Almanya'da 234 sığır homozigot olarak bulunmuş, bunların %80'ini bir yıl içerisinde ölmüştür. Holştayn popülasyonunda hastalıkla ilişkili haplotip frekansı % 8.7 (3400 Holştayn) olarak tespit edilmiştir (Kipp ve ark., 2015).

Kanada'da yetiştirilen Holştaynlarda CD bakımından taşıyıcı frekansı 2002'de % 2 iken yıllar ilerledikçe artış göstermiş ve 2012 yılında % 17 ile en yüksek değere ulaşmıştır. Sonraki yıllarda tedrici düşüş sürecine girmiş ve 2016 yılında % 6 olarak tahmin edilmiştir (Doormal ve Beavers, 2015).

Almanya'da 2012-2015 yıllarında doğan Holştayn boğalarda taşıyıcıların frekansı % 12,7 olarak bildirilmiş (Schütz ve ark., 2016) ve bu oranın daha önce Almanya'da bildirilen % 8,7 değerinden oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir. Kaminski ve Rusc (2016) tarafından Polonya'da yapılan bir çalışmada pedigrisinde M. Storm bulunan 27 boğanın 9'unun taşıyıcı olduğu tespit edilmiştir. Polonya'da analizi yapılan 27 boğanın % 33,3'ünün taşıyıcı olduğu ortaya çıkmaktadır ki bu oran çok yüksek bir değerdir. Kontrol edilmediği takdirde Polonya sığır yetiştiricilerinin çok önemli problemlerle karşılaşması söz konusu olabilecektir. İngiltere'de Holştayn sığırlarda taşıyıcı veya şüpheli taşıyıcı oranının % 4,4-6,0 arasında olabileceği ve yapılan hesaplamalarda CD için vaka başına USA Holştaynlara göre 297 Sterlin kaybın olduğu tahmin edilmiştir (Anonim, 2017). CD'nin göz ardı edilmemesi gerektiği, popüler taşıyıcı boğaların kullanımıyla hastalığın hızla yayılmasının söz konusu olacağı ifade edilmiştir. Almanya'da 2015 yılında her yıl CD bakımından 3400 homozigot mutant buzağı doğduğu ve ekonomik kaybın ise 1,3 milyon Avro olduğu tahmin edilmiştir (Kipp ve ark., 2015).

Hasta hayvanlarda (homozigot mutant) kronik ishal ve gelişme geriliği bulunmakta olup genellikle 3 hafta ile 6 aylık yaş arasında ölüm görülmektedir. Homozigot buzağularda klinik belirtiler üç haftalık yaştan itibaren görülmeye başlamaktadır. Önceleri hasta buzağuların iştahları normal ve sindirim sistemi normal aktivitesindedir. Dışkıları sarı ile yeşil arasında değişmektedir, dışkı normal kokudadır. Yapılan laboratuvar tetkiklerinde viral, bakteriyel ve coccidial etkenler tespit edilmemekte ve semptomatik tedaviye herhangi bir olumlu cevap alınmamaktadır. Homozigot mutant allele sahip tek yumurta ikizi buzağular farklı çiftliklerde büyütülmüşler ancak aynı belirtileri göstermişlerdir (Kipp ve ark., 2015; Menzi ve ark., 2016). Etkilenen hayvanlarda büyüme çok geri

kalmıştır. Mock ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada homozigot hastaların gebe bir düve hariç tutulursa, normal ağırlıklarından % 25-52 kadar daha düşük ağırlığa sahip oldukları, kolesterol seviyelerinin de normale (1-3 mmol/L) göre çok düşük (0,09 -0,24 mmol/L) olduğu bildirilmiştir. Otopside makroskopik olarak tüm hayvanların aşırı zayıf olduğu, ince bağırsakların açık sarı ile küf yeşili ve kısmen köpüklü yağlı içerikle dolu olduğu tespit edilmiştir. İnce bağırsakların distal 2/3'ü ciddi ödemli ve beyazımsı renktedir (Mock ve ark., 2016). Karaciğer portakal renginde, ileal ve sekal mukozalar konjestedir. Histopatolojik olarak kolanjioller, kanalikül ve hepatositlerin içerisinde safra birikimiyle birlikte karaciğerde belirgin koleltaz mevcuttur. Pnömoni benzeri lezyonun saptanması kabaca bakteriyel kaynaklı sekonder bir süpuratif bronkopnömoniyi doğrulamıştır. Koleltaz ve enterit varlığı kolesterol emilimini ve metabolizmasını etkilemesi bakımından ilginç bulunmuştur (Kipp ve ark., 2016).

Kipp ve ark. (2015), taşıyıcıların kolesterol seviyesinin (1,65 mmol/L), normal olanlardan (2,30 mmol/L) düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Kipp ve ark. (2016) yaptıkları başka bir çalışmada 250 hayvanın genotiplendirmesini yaparak kolesterol seviyelerini ölçmüşlerdir. Kolesterol seviyesini normal, taşıyıcı ve hastalarda sırasıyla 1,82; 1,25 ve 0,4 mmol/L olarak bulmuşlar ve aralarında bulunan yüksek farklılık nedeniyle hastalığın kalıtımının kodominant olabileceğini düşünmüşlerdir. Çünkü taşıyıcıların kolesterol seviyesi normal-hasta arasında seyretmektedir. Bu durumda mutant allelin, kolesterol sentezini heterozigot olduğunda da etkilediği anlaşılmaktadır. Kolesterol miktarının düşük olmasının hayvan vücudunda nasıl bir etkisinin olduğu veya olacağı hakkında henüz yeterli bir bilgi yoktur. Bununla beraber Hafliger ve ark.,(2019), heterozigotlardan bazılarının klinik belirti gösterdiklerini ve tam penetrans gösteren homozigotlara göre heterozigotlarda genin penetransının azaldığını belirterek hastalığın eksik dominant kalıtım gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Saleem ve ark. (2016), Holştaynlarda görülen kolesterol yetmezliğinin tespit edilmesinde, dolaşımdaki LDL-C seviyesinin fenotipik bir gösterge olup olamayacağına yönelik yaptıkları çalışmada, CD taşıyıcıları ile kontrol grubunun kolesterol ve LDL-C seviyeleri arasında çok önemli farklılıklar tespit etmişlerdir. Buradan hareketle LDL-C'nin, CD için biyomarker olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir. Kolesterol yetmezliğine sebep olan mutasyonun lipit metabolizmasının etkilediği ve kolesterolle beraber fosfolipitler, TAG ve lipoprotein seviyelerinde de azalma olduğu bildirilmiştir (Gross ve ark., 2016).

Hastalığın tedavisi yoktur, insanlarda görülen hipobetalipoproteinemi hastalığında yüksek doz E vitamini verilerek, gıdalarla alınan yağ kısıtlanarak ishal sıklığı azaltılabilmekte ve nörolojik belirtilerin ortaya çıkması geciktirilebilmektedir. Kolesterol eksikliği ciddi bir hastalıktır, ancak üstesinden gelinemeyecek bir hastalık ta değildir. CD hastalığı ölen hayvanların yanında gereksiz tedavi masraflarına, işgücü ve zaman kaybına neden olarak işletmeleri çok yönlü zarara uğratmaktadır. Kontrol programları uygulanmadığı takdirde tüm ülkeler için önemli kayıplara sebep olabilirler. Bu nedenle bir ülkede kontrol programları yapılmadan önce APOB genindeki mutasyon frekansının belirlenmesi gerekir. Yani öncelikli olarak taşıyıcıların belirlenmesi, kullanılmış ve kullanılmakta olan suni tohumlama boğalarının etiketlenmesi çok önemlidir. Bundan sonra projeni test programlarındaki taşıyıcı boğaların eliminasyonu sağlanarak hastalığın yaygınlaşması önlenir. Hastalık yayıldıysa sadece boğalar üzerine yoğunlaşmakla mutant genin dağılımı önlenemez. Bu durumda dişiler vasıtasıyla mutant allel popülasyonda yayılmaya devam eder. Öte yandan bugün bazı işletmeler hala kendi boğalarını kullanmaktadırlar. Bu boğaların taşıyıcı olması durumunda sürekli olarak genin sürüde dağılması söz konusu olmaktadır ve böylelikle hasta hayvanların doğma ihtimali de yükselmektedir.

İslah programlarında genetik ilerleme, çok uzun yıllar harcanan emeklerle sağlanmaktadır. Genetik ilerlemenin önemli bir kısmı boğalardan gelmektedir. Bu nedenle genetik potansiyeli yüksek olan ve sonradan taşıyıcı olduğu belirlenen bir boğanın hemen kullanımından vazgeçilmesi kolay olmamaktadır. Bunun için kontrollü birleştirilmeler yapılarak mutant allelin aktarılmadığı ancak boğanın üstün genlerinin aktarıldığı bireylerin tespit edilerek suni tohumlamada kullanımı yoluna

gidilebilir. Hastalık Holştayn sığırlarda bulunmuş ve saf ırk yetiştiriciliğinde sadece Holştayn sığırlarda devam edeceği söylenebilir. Ancak saf ırk yetiştiriciliğine dikkat edilmeyen ülkelerde, melezlemeler yoluyla diğer ırklara veya populasyonlara mutant allelin aktarılması ve böylelikle bu sürülerde de hastalığın yayılması ve görülmesi mümkün olabilir. Türkiye’de de kontrolsüz çiftleştirmelerin yapıldığı bilinmektedir. Bunlardan elde edilen melezlerin hangi ırklar arasında yapıldığı bile bilinmemektedir. Nitekim istatistiklerde kültür ırkı melezlerinin oranının % 40-45 kadar olduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla hastalık sadece Holştayn sığırlara mahsus olmakla beraber taşıyıcı boğaların diğer ırklarda kullanılması durumunda hastalığın veya mutant genin de aktarılması mümkündür. Bu yüzden Türkiye’de yapılan melezlemelerde genin diğer ırklara veya mezlere aktarılmış olma ihtimali de bulunmaktadır (Özbeyaz, 1997).

CD hastalığı orijinini genetik kapasitesi üstün ve tanınmış bir boğadan aldığı bilindiğinden Türkiye’nin de kontrol programlarını uygulamaya geçirerek hastalığın yayılmasının önüne geçmesi gerekmektedir. Bu programların hayata geçirilebilmesi yetiştiricilik şartlarında özellikle ülkenin damızlık deposu olarak bilinen kurumlarında hastalığın durumunun bilinmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Mutant allelin Türkiye’de varlığı, dağılımı, frekansı ve kaynaklarını ortaya çıkaracak araştırmaların yapılması önemli bulunmaktadır. Sığır sürülerinde kayıplara neden olan BLAD, DUMPs, Citrullinemia gibi kalıtsal hastalıklarda taşıyıcıların tespit edilebilmesi sayesinde bu hastalıklar önemli sorun olmaktan çıkmıştır. Kalıtsal bozuklukların en önemli dezavantajı, mutasyonun verimler yönünden çok üstün olan boğalarda meydana geldiğinde ortaya çıkmaktadır. Hastalık tanımlanmadığı için de hastalığın tüm Holştayn sürülerinde hızla yayılması söz konusu olmaktadır. Türkiye’de Holştayn yetiştiriciliği özellikle son yıllarda çok yaygınlaşmıştır. CD hastalığının veya mutant genin yaygınlığı hakkında henüz yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Hastalığın durumu hakkında elde edilebilecek bilgilerin ıslah kuruluşlarıyla paylaşılmasıyla CD hastalığına karşı tedbirlerin alınması söz konusu olabilecektir.

TİGEM Türkiye’nin tohum ve damızlık hayvan yetiştiriciliğinde önemli kamu kuruluşlarından. TİGEM’de Holştayn (Siyah Alaca) ırkından toplam 12.000 baş sığır yetiştirilmektedir. 2012 yılına kadar Holştayn’ların tohumlanmasında ithal sperma kullanılmıştır. TİGEM, 2012 yılından sonra ise Sultansuyu TİM’de üretim istasyonu kurarak kendi spermasını üretmektedir ve bu yıldan beri ithal sperma yerine kendi spermasını kullanmaktadır. Üretimde kullanılan boğalar, en iyi boğa spermalarıyla tohumlanan en iyi ineklerden elde edilen yavrulardan oluşmuştur. Bu durumda CD hastalığının taşınma ihtimalinin yüksek olduğu düşünülmektedir. TİGEM’in önemli ve güvenilir damızlık merkezi olması ve damızlıklarını yetiştiricilere de dağıtması nedeniyle yeni ortaya çıkarılan CD hastalığı bakımından da durumunun tespit edilmesi önemli bulunmaktadır.

Bu araştırmada TİGEM’de yetiştirilen Holştayn sığırlarda “Kolesterol Eksikliği (CD)” adı verilen otozomal kalıtsal hastalığa neden olan mutant allelin dağılımının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, TİGEM’e bağlı olan Çukurova, Ceylanpınar, Koçaş, Polatlı, Türkgeldi ve Sultansuyu Tarım İşletmelerinde(TİM) yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlarda mutant allel varlığının ortaya konması hedeflenmiştir.

### **III. Materyal ve Yöntem**

Bu bölüm III Materyal ve Yöntem ismiyle "Ek Dosya" şeklinde verilmiştir.

### **IV. Analiz ve Bulgular**

Bu bölüm IV Analiz ve Bulgular ismiyle "Ek Dosya" şeklinde verilmiştir.

## V. Sonuç ve Öneriler

Yapılan çalışmada kalıtsal bir hastalık olan Kolesterol Eksikliğini meydana getiren ABOP genindeki mutasyon Türkiye’de ilk kez tespit edilmiştir. Örneklemelerin yapıldığı Tarım İşletmelerindeki 466 sığırdan 7’sinin mutant alleli taşıdığı DNA testleriyle ortaya konmuştur. Tarım İşletmelerinde mutant genin frekansı % 0,75 olarak bulunmuştur. Mutant allelin nasıl taşındığına ilişkin pedigrî analizlerinden herhangi bir sonuca ulaşılamamıştır. TİGEM uzun yıllar boyunca ithal sperma kullanmıştır ve muhtemelen de gen taşıyıcı bir boğa aracılığıyla mutant gen transfer edilmiş olabilir. Bu çalışmayla CD hastalığının Türkiye Holştayn popülasyonunda varlığı saptanmış bulunmaktadır.

Sadece TİGEM sürülerinde çalışmalarını yoğunlaştırmakla kalmayıp Türkiye’deki tüm sürülerde mutant allel dağılımını ortaya konup eradikasyon programları başlatılmalıdır.

Damızlık Birlikleri ve kamu konu hakkında bilgilendirilmeli boğa seçiminde kalıtsal hastalıklara dikkat edilmesi sağlanmalıdır. İthal edilen canlı hayvan ve spermalarda da hastalık açısından kontroller yapılmalıdır.

Yapılan yeni bazı çalışmalarda heterozigot bireylerin bazılarında da klinik belirtilerin görülmüş olması, hastalığın etkisinin yüksek olabileceğini göstermektedir. O nedenle taşıyıcıları zararsız olarak görmek doğru değildir. Mutant geninin frekansının azaltılması yanı sıra genin tamamen eradike edilmesi yoluna gidilmesi gerekmektedir.

Taşıyıcı olarak belirlenen bireylerde kolesterol ve trigliserid miktarları belirlenmeli ve bunların takipleri yapılarak klinik belirti gösterip göstermedikleri değerlendirilmelidir.

## VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Araştırma sonuçlarının uluslararası bilimsel dergilerde yayınlattılması ve sempozyum-kongrelerde sunulması düşünülmektedir. Tarım ve Orman Bakanlığının ilgili bölümleri ve TİGEM’e konu hakkında bilgilendirilecektir. Diğer sürülerde de mutant allel dağılımı üzerine çalışmaların yapılması teşvik edilecektir. Kamu ve sığırcılıkla ilgili damızlık kuruluşlarıyla görüşmeler yapılarak eradikasyon programlarının yapılması hakkında sunumlar yapılabilecektir.

Sürülerden bir hastalığın eradike edilebilmesi için hastalıklar bakımından ineklerin ve boğaların tanımlanmış olması gerekir. Bu nedenle sığırların tanımlanması ve tüm sürülerdeki hastalığın durumu hakkında yeni çalışmalar yapılması düşünülmektedir. Bu çalışma öncü bir araştırma olup diğer araştırmaların yapılmasını teşvik edecektir. Bununla beraber hastalıkla mücadele için ön değerlendirmeler de yapılmış olacaktır.

## VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

Proje ile altyapı desteği olmamıştır. Projeden temin edilen sarf malzemeleri tez projesinin analizlerinde kullanılmıştır.

## VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

Altyapı desteği alınmamıştır/sağlanmamıştır.



## IX. Kaynaklar

- Ceylan B, Mazlum A, Ceylan Ş (2007): Ailesel hipobetalipoproteinemi. Göztepe Tıp Dergisi. 21(1): 36-37.
- Doormal BV, Beavers L (2015a). Discovering genetic anomalies from genotyping. Erişim Adresi: [https://www.cdn.ca]. Erişim Tarihi: 5/5/2016.
- Doormal BV, Beavers L (2015b): HCD: Haplotype associated with Cholesterol Deficiency. Erişim Adresi: [https://www.cdn.ca]. Erişim Tarihi: 5/5/2016.
- Doormal BV, Beavers L (2016): Mananing resessives & haplotypes. Erişim Adresi: [https://www.cdn.ca]. Erişim Tarihi: 8/7/2016.
- Gross JJ, Schwinn AC, Schmitz-Hsu F, Menzi F, Drogemüller C, Albrecht C, Bruckmaier RM (2016): Cholesterol deficiency-associated APOB mutation impacts lipid metabolism in Holstein calves. J. Anim.Sci. 94: 1761-1766.
- Hafliger IM, Hofstetter S, Mock T, Stettler MH, Meylan M, Mehinagic K, Stokar-Regenscheit N, Drögemüller C (2019): APOB-associated cholesterol deficiency in Holstein cattle is not a simple recessive disease. Animal Genetics. 50:372-375. doi: 10.1111/age.12801
- Heinrichs AJ, Losinger WC (1998): Growth of Holstein dairy heifers in the United States. J. Anim.Sci., 76: 1254-1260.
- Keunh L, Olson T (2016): Genetic disease in cattle. Erişim Adresi: [dairygenetics.ansci.cornell.edu/research/genetics-diseases/]. Erişim tarihi: 8/7/2016.
- Kipp S, Segelke D, Schierenbeck S, Reinhardt F, Reents R, Wurmser C, Pausch H, Fries R, Thaller G, Tetens J, Pott J, Piechotta M, Grünberg W (2015): A new holstein haplotype affecting calf survival. Proceedings of the 2015 Interbull Meeting, July 09-12, 2015, Orlando, FL. Interbull Bull. 49: 49-53.
- Kipp S, Segelke D, Schierenbeck S, Reinhardt F, Reents R, Würmser C, Pausch H, Fries R, Thaller G, Tetens J, Pott J, Haas D, Raddatz BB, Hewicker- Trautwein M, Proios I, Schmicke M, Grünberg W (2016): Identification of a haplotype associated with cholesterol deficiency and juvenile mortality in Holstein cattle. J. Dairy. Sci. 99: 1-17.
- Menzi F, Besüchet-Schmütz N, Fragniere M, Hofstetter S, Jagannathan V, Mock T, Raemy A, Studer E, Mehinagic K, Regenscheit N, Meylan M, Schmitz-Hsu F, Drogemüller (2016): A transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle. Anim. Genet. doi: 10.1111/age. 12410, 47: 253-257.
- Mock T, Mehinagic K, Menzi F, Studer E, Oevermann A, Stoffel MH, Drogemüller C, Meylan M, Regenscheit N (2016): Clinicopathological phenotype of autosomal recessive cholesterol deficiency in Holstein cattle. Journal of Veterinary Internal Medicine. doi: 10. 111/jvim. 13976.
- Saleem S, Heuer C, Sun C, Kendall D, Moreno J, Vishwanath (2016): The role of low-density lipoprotein levels as a phenotypic marker for Holstein cholesterol deficiency in dairy cattle. J. Dairy Sci. 99: 5545-5550.
- Schutz E, Wehrhahn C, Wanjek M, Bortfeldt R, Wemheuer WE, Beck, J, Brenig B (2016): The Holstein Friesian lethal haplotype 5 (HH5) results from a complete deletion of TBF1M and cholesterol deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) insertion into the coding region of APOB. Plos One 11(4): e0154602.
- Olesen I, Groen AF, Gjerde B (2000): Definition of animal breeding goals for sustainable production systems. J. Anim.Sci. 78: 3, 570-582.
- Özkaya H, Aydemir G, Akcan AB, Kul M, Aydınöz S, Süleymanoğlu S (2011): Ailesel heterozigot hipobetalipoproteinemili bir olgu. ACU Sağlık Bil. Derg. 2: 110-112.
- VanRaden P, Null D (2015): Hostein haplotype for cholesterol deficiency (HCD). Erişim: [https://www.cdc.us/reference/changes/HCD\_inheritance.pdf]. Erişim Tarihi: 5/5/2016.

## X. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları:

Bu kısımdaki tablo "X Ekler a Mali Bilanço ve Açıklamaları" başlıklı dosya ile ekte verilmiştir.

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar:

Proje kapsamında alınmış herhangi bir makine ve teçhizat bulunmamaktadır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar :

Rapor içinde verilenlerin dışında ayrıntı bulunmamaktadır.

d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz):**

Proje tez projesi olduğu ve sonuçlara henüz ulaşıldığı için herhangi bir yerde sunulmamış ve teknik rapora dönüştürülmemiştir.

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz):**

Projenin sonuçlanmasından sonra doktora tezi hazırlanacaktır.

### III. Materyal ve Yöntem

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmanın hayvan materyalini TİGEM'in bazı işletmelerinde yetiştirilen 12 aylıktan büyük Holştayn sığırlar oluşturmuştur. İşletmelere göre toplanan örnek sayıları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Sultansuyu TİM'den alınan 25 örnek, boğalara ait sperma örnekleridir. Diğer işletmelerdeki örnekler ise Holştayn ineklere aittir. Holştayn sığırdan kan örnekleri hayvanların *V. jugularis*'lerinden EDTA'lı vakumlu tüplere alınmış ve soğuk zincirde laboratuvara getirilmiştir. Örnekler DNA izolasyon aşamasına kadar -20°C'de saklanmıştır.

**Çizelge 3.1. Örnekleri alınan Holştayn sığırların işletmelere göre dağılımı**

İşletme Adı (TİM)	Sayı (n)
Çukurova (Adana)	79
Ceylanpınar (Urfa)	76
Koçaş (Aksaray)	96
Polatlı (Ankara)	108
Türkgeldi (Tekirdağ)	82
Sultansuyu (Malatya)	25
<b>Toplam</b>	<b>466</b>

##### 3.1.2. Araştırmada kullanılan kimyasallar ve kitler

DNA izolasyon kiti olarak "Zymo Research/D3025 Quick-gDNA™ Blood MiniPrep" kullanılarak genomik DNA izole edilmiştir. DNA örnekleri agaroz jelde bütünlükleri açısından kontrol edilmiş ve miktarları spektrofotometre cihazı (Thermo Multiscan GO) kullanılarak ölçülmüştür. Miktarı ve kalitesi kontrol edilmiş DNA örnekleri 30-50 ng/μl olacak şekilde sulandırılmış ve -20 °C'de saklanmıştır.



Primer olarak “Primer 200 nM (60baz) Primer/P200HPLC” APOB.e3.WT.F\_5'-CTGCAAAGCCACCTAGCCTA -3' ; APOB.e3.WT.R\_5'- GCCTCTTCTGTTTCTGGGGG -3' ; APOB.e3.Ins.R\_5'- TCACGAGTGGAATGCCTCAC -3' primerler kullanılmıştır.

Green Master Mix olarak “Bioline/BIO-92020, SensiFAST SYBR HI-ROX Kit” kullanılmıştır.

### 3.1.3. Araştırmada kullanılan laboratuvar alet ve ekipmanları:

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan alet ve ekipmanlar aşağıda sırayla verilmiştir:

Distile Su Cihazı (Nüve), Ultra Saf Su Cihazı (Milipore, MiliQ Synthesis), Mikrodalga Fırın (Arçelik), pH Metre (WTW inoLab), Çalkalayıcı Sıcak Su Banyosu (GFL), Çalkalayıcı (Vortex) (IKA ve Dragon), Manyetik Karıştırıcı (IKA), Soğutmalı Mikro Santrifüj (Thermo), Dijital Hassas Terazı (0.001 Duyarlı, 320 g; Sartorius), Nanodrop Spektrofotometre (Thermo), Qubit (Floresan Spektrofotometre; İnvitrogen), Buz makinesi (Uğur), Pipet Takımı, DNA Dizileme Cihazı (ABI 3500), Gradient Thermal Cycler (PCR; Eppendorf Ep Gradient-S ve ABI Veriti), Agaroz Jel Elektforez Takımları (Thermo), Güç Kaynağı (Thermo), Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi (Vilber Lourmat), Derin Dondurucu ve Buzdolabı (-25, +4 °C), İnkübatör (+55 °C; Nüve), Ultra Derin Dondurucu ve Buzdolabı (-80 °C; Panasonic), Real-Time PCR (ABI StepOne Plus).

## 3.2. Yöntem

Genotiplerin ortaya çıkartılması için kullanılan yöntemler sırasıyla aşağıda verilmiştir:

### 3.2.1. DNA İzolasyonu

Kan ve spermden DNA izolasyon aşamaları aşağıda açıklanmıştır.

1a. 100 µl Kan

400 µl Lizis solüsyonu

1.5 ml mikrosantrifüj tüpünde karıştırılmış ve 15 sn vortekslenmiştir.

2a. 15 dakika oda sıcaklığında arada sırada vorteksleyerek bekletilmiştir.

1b. 20 µl Proteinaz-K (20mg/ml)

100 µl Sperm

20 µl DTT



400 µl Lizis solüsyonu

1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne karıştırılmış ve 15 sn vortekslenmiştir.

2b. 60 dakika 56 °C’de arada sırada vorteksleyerek bekletilmiştir.

3. Kapaktaki damları uzaklaştırmak için kısa süreli santrifüj edilmiştir.

4. Solüsyon Zymo-Spin IIC Column spin kolona aktarılmıştır ve 10000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır.

5. Üzerine 200 µl DNA Pre-Wash Buffer eklenmiş ve 10000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

6. Üzerine 500 µl g-DNA Wash Buffer eklenmiş ve 10000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Toplama tüpü içerisindeki sıvı dökülmüş ve spin kolon 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

7. Spin column yeni bir 1,5 ml lik tüpe aktarılmış, üzerine 100 µl TE buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 10000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

### 3.2.2. Real-Time PCR

Real-Time PCR’da Schütz ve ark.(2016) tarafından önerilen APOB.e3.WT.F\_5’-CTGCAAAGCCACCTAGCCTA -3’ ; APOB.e3.WT.R\_5’- GCCTCTTCTGTTTCTGGGGG -3’ ve APOB.e3.Ins.R\_5’- TCACGAGTGGAATGCCTCAC -3’ primerler (Şekil 3.1) kullanılmıştır. Her PCR reaksiyonu için, 50 ng/µL DNA, 1x SYBR Green Master Mix (Bioline, SensiMix SYBR Hi-ROX), her primerden 0,2 µM eklenmiş ve ultra distile su ile 25 µL’ye tamamlanmıştır. Real-time PCR cihazı (ThermoFisher StepOne Plus Real-Time PCR) başlangıç denatürasyon 95°C’de 10 dk, takiben 35 döngü 95°C’de 15 sn, 57°C’de 20 sn, ve 72°C’de 30 sn olacak şekilde her döngünün sonunda ölçüm yapılmıştır. Sonra 65-95 °C arasında yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (HRM, high resolution melting curve) analizi yapılmıştır. HRM analiz sonucuna göre mutant ve normal alleller belirlenmiştir.

### 3.2.3. LongRange PCR Protokolü

Real-Time PCR analizinde heterozigot ve homozigot yapıdaki örnekleri doğrulamak amacı ile LongRange PCR yapılmıştır. Bu amaçla Schütz ve ark. (2016) tarafından önerilen APOB.e3.WT.F\_5’- CTGCAAAGCCACCTAGCCTA -3’; APOB.e3.WT.R\_5’- GCCTCTTCTGTTTCTGGGGG -3’ primerleri kullanılmıştır. PCR karışımı 1xPCR buffer, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,3 pmol ileri primer, 0,3 pmol geri primer, 1 U Platinum Taq polimeraz (Invitrogen, 10966034) ve 20 ng/µL DNA olacak şekilde 20 µL hazırlanmıştır. PCR





cihazı (ThermoFisher, Veriti) sırasıyla 95°C’ de 2 dk bir döngü, 94°C’ de 45 sn, 57°C’ de 30 sn ve 72°C’de 1 dk 35 döngü ve son aşamada 72°C’de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır.

**APOB.e3.WT.F**  
CTGCAAAGCCACCTAGCGCTATGGCTCACGGTAGAGAAAGGGACCTGGGTGACCATMCTCTCTCTGCACGAGGTAGGA  
**APOB.e3.Ins.R**  
CCTCAAAGCTGGCTGTTCCCTGAAAGTGGGGGAGCCGGTGAGGCCTCAGGAGTCCGCCCGGATATTCTCGAGCATTTTC  
GGAGGCTCGGCATACGCCAAAGGCGG GATCGAGCCTCAGGAGTCCGCCCGGATATTCTCGAGCATTTTC  
CCCAAAAAACCAGAGTCTGCCTACTTTATTGCTTTGTGCTCTCACCTCTGACTTTACTGGGGCTGTCC  
CTACCACCGTCTCTCTCTCTGTGTCAAAGAGTTAACTTACAGCTCCAATTAATAAAGTTCTGGGCAAT  
TAGGAGTGTAAATCAAACCCCTCTGATGGCTCTCTAACTCGCCTGACAAAGTTTACCCGGACTCCTGC  
AGCTATGCATACGATTGTTACAGTCTCCAGCCTCGAGAGGCATGGGAAGCTTAAGATATTCAAATAGC  
TTAGAGCCTCTCAGAGAGTTAAAACTGTCAGAAATAAAGTAGTAAAGGATTCATTGATGAGTCAATGCTT  
GTTGCCAAGTTTTCACATCCCTGAATTGTATCCTTGAATATGTATCAATTAATAGTGGGTATGTAGAAAA  
ATAAGTAGTGGCCTTGGTGTAGTAACCTTAGACCCCTAAGGTAATAAATTCCTTCTTTGTTGTAACCCAT  
TACACATCCGCCCTATAGGAATGCAATTTATCTTTGAAAGATGGTCCAAACCTTGAAATAATTACTCTTA  
GAGAAAGTAAGTCTTTGTTGATAAGTCTTGTCAAGAGTCATAAAATGTTAGTAGGCCTTCTGGCCAGAAG  
ATGATGTAATCACCTAAACCATTGATACGATACATTGACAGGAAAGAAACCTTGGTTTTGATAAGAAT  
CAAAGACTGCTGACTTTGCATCCCTATTATCCTCTATGTGTAACCTAGGGTATAAAAAGCCCTGTTAAAA  
ATAAAGCTACGGGCCCTTGCCTACCAACCGCTTGGTCTCCCATGTCATTCTTTAACTTCCAGCTGAGTCTC  
CATCTGGAGCGCGGAAACCCACCGCTTACTAATCATGCCTGGGCTTCTAAGACCCACTCGAGAAGGTG  
TCTAGGGTGAGACACCTTCCGCTATTGAGAGGGCCGCTGGGCTTCTAAGACCCACTCGAGAAGGTG  
TCTTGAAGTTTTATTGGTCTCCCGCTAAACCAAGCTACTCAGCTTCTTTCTCCACTGAAATTTCTACTG  
AGCTATCCTCATTCTATTGTTCTCTATATCTCTAATTAGCATATAAATAGTCGCCGAGCGGCTCTCCCTTC  
GAATACCCTGATCAGCCGGGCTGTGCTCCTCGGCGCAAGCAAGTTCTACTTTACCCAGAGAAAGAAAGCCCTA  
AACACATCCTCAACATCAAGAGGGGCATCATCTGCGCCTCCTGCTTCCCCCAGAAACAGAAAGAGGCTAAGCAAT  
**APOB.e3.WT.R**

Insertion bölgesi

Şekil 3.1. ABOP genindeki insersiyon ve primerlerin bağlanma bölgesi

### 3.2.4. DNA Dizileme Analizi

DNA dizi analizi öncesi çoğaltılan PCR ürünlerini temizlemek için 4 µl PCR ürünü ile 0,5 µl Exonuclease-1 (ThermoFisher, EN0581) ve 1,0 µl FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher, EF0652) eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım 37°C’de 15 dk, 85°C’de 15 dk olacak şekilde PCR cihazında bekletilmiştir. Daha sonra dizileme (sekans) PCR için örnek başına 12 µl 1x Sequencing buffer, 1 µl BigDye solüsyonu, 5 µl (1 pmol) F/R primer ve 2 µl temizlenmiş PCR ürünü eklenmiştir. PCR cihazı 96 °C’de 2 dk 1 döngü, 96 °C’de 10 sn, 54°C’de 20 sn ve 60 °C’de 4 dk 30 döngü olacak şekilde programlanmıştır.



Sekans PCR sonucunda elde edilen ürünleri Etanol-EDTA-Sodyum asetat yöntemine göre temizlenmiştir. Bu amaçla her bir örneğe 1 µl EDTA (pH 8.0), 1 µl 3M sodyum asetat (NaOAc, pH 5,07) ve 50 µl Etanol (% 98) eklenmiştir. Pleyt alüminyum sealing ile kaplanarak 4-5 kez alt-üst edilmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra 30 dk +4 °C' de 4000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstündeki sealing çıkarılmış ve bir peçete üzerine ters çevirerek 1 dk boyunca +4 °C' de 700 rpm' de santrifüj edilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerine % 70' lik etanolden 70 µl eklenerek üstü pleyt sealing ile kapatılmış ve +4 °C' de 10 dk 4000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstündeki sealing çıkartılmış ve bir peçete üzerine ters çevirerek 1 dk boyunca +4 °C' de 700 rpm' de santrifüj edilmiştir. Daha sonra pleyt oda sıcaklığında karanlık bir yerde 60 dk bekletilmiştir. Her bir örneğin üzerine 15 µl Hi-Di Formamide ekledikten sonra pleyt sealing ile kaplanmış ve kuvvetli bir şekilde vortekslenerek 1300 rpm' de kısa bir süre santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından sealing çıkarılmış ve pleyt septa ile kapatıldıktan sonra DNA dizi analizi cihazına (ThermoFisher, ABI 3500 Genetic Analyzer) yüklenmiştir. Yapılan DNA dizi analizi sonucunda elde edilen diziler Sequencher Version 5.4.6 (Gene Codes Co.) paket programı ile düzenlenmiştir.

### **3.2.5. PCR Analizi**

PCR analizinde Schütz ve ark.(2016) tarafından önerilen ve Real-Time PCR'daki primerler kullanılmıştır. Her PCR reaksiyonu için, 50 ng/µL DNA, 5xPhusion HF Buffer (Thermo,F530L), her primerden 0,2 µM, 1 U Phusion Taq Polimeraz eklenmiş ve ultra distile su ile 25 µL'ye tamamlanmıştır. Primerlerin  $T_m$  derecesini belirlemek amacıyla yapılan gradient PCR analizinde PCR cihazı, başlangıç denatürasyon 98°C'de 1 dk, takiben 40 döngü 98°C'de 5 sn, 54-64°C'de 20 sn, ve 72°C'de 20 sn, son aşama 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır.  $T_m$  derecesi 64°C olarak belirlenmiş ve tüm örneklerin PCR'ı bu  $T_m$  derecesinde yapılmıştır. PCR sonrası mutant ve normal alleller %2'lik agaroz elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

### **3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi**

Agaroz jeli hazırlamak için, 1 g agaroz ile 50 ml TAE (Tris-Asetat-EDTA) solüsyonu karıştırılmış ve mikrodalga fırında 2 dk ısıtılmıştır. Hazırlanan % 2'lik agaroz jelin içerisine 1 µl RedSafe (INtRON, 21141) boya solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra jel tepsinine yavaşça



dökülmüştür. Hazırlanan jel, polimerleşmesi için 30 dk oda sıcaklığında, 30 dk +4°C derecede bekletilmiştir. Polimerleşmeden sonra agaroz jel, içerisinde 1xTAE solüsyonu bulunan yürütme tankına yerleştirilmiştir. Jelin üstünü kaplayacak şekilde tank 1xTAE solüsyonu ile doldurulmuştur. Her kuyucuğa 8,5 µl yükleme solüsyonu (1X Loading Dye) ve 2,5 µl PCR ürünü olan karışım konulmuştur. Yükleme işleminin ardından jele 30 dk 7 cm/V uygulanmıştır. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel tanktan çıkarılmış ve jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. PCR ürününün büyüklüklerini belirlemek amacıyla DNA ladder (ThermoFisher, SM0323) kullanılmıştır.

### 3.3. İstatistik analizler

Gen frekansları gen sayma yöntemiyle tespit edilmiştir. Homozigot (AA) fert sayısının iki katı ile heterozigot fert sayısının toplamı, toplam fert sayısının iki katına bölünmesiyle A geninin; aynı işlem B geni için de tekrarlanarak B geninin frekansı bulunmuştur.

$$\text{Gen Frekansı} = (\text{Homozigot Fert Sayısı} \times 2) + \text{Heterozigot Fert Sayısı} / \text{Toplam Fert Sayısı} \times 2$$

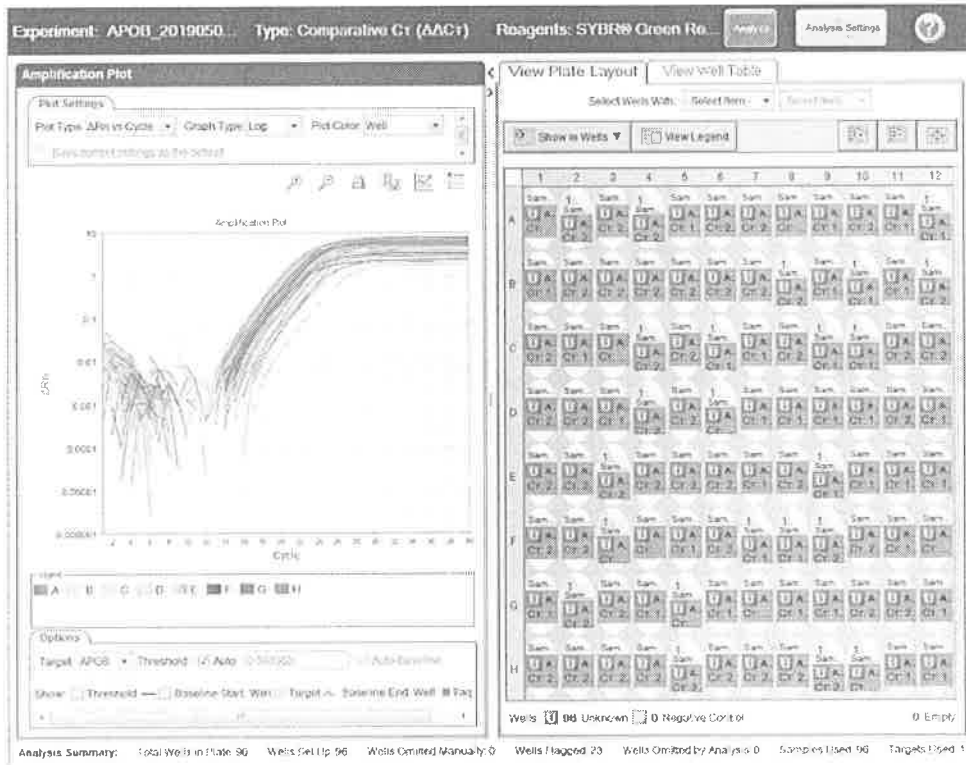
Genotip frekansları arasındaki farklılıklar ki-kare testiyle analiz edilmiştir.



## IV. Analiz ve Bulgular

### 4.1. Real-Time PCR

Yapılan Real-time PCR analizi sonucunda örneklere ait çoğalma (amplifikasyon) grafiği Şekil 4.1’de verilmiştir. Real-time PCR analizi sonunda yapılan HRM analizi sonucunda bazı örneklerde 85,8°C’de pik, bazı örneklerde ise 85,7 ile 92,6°C’de iki pik verdiği görülmüştür (Şekil 4.2). Tek veren örnekler (solda) mutant alleli taşımayan (homozigot), iki pik veren örnekler (sağda) ise mutant alleli taşıyan (heterozigot) olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. Örneklere ait Real-Time PCR amplifikasyon grafiği.





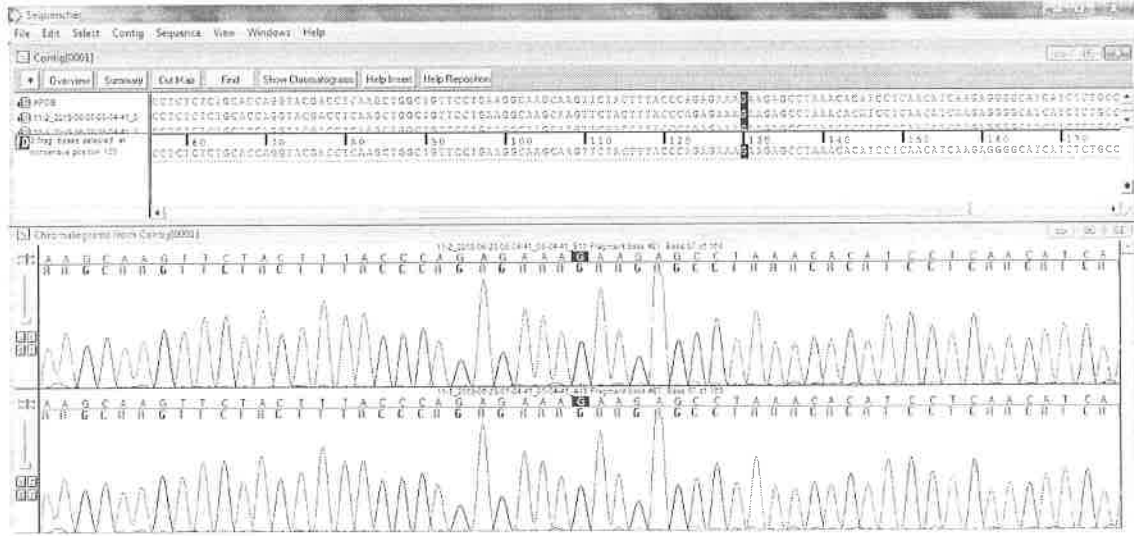


Şekil 4.2. Örneklere ait HRM (High Resolution Melting curve) analiz sonucu

#### 4.2. Dizi Analizi

Real-Time PCR'da heterozigot ve homozigot olarak değerlendirilen örnekleri doğrulamak amacıyla APOB.e3.WT.F ve APOB.e3.WT.R kullanılarak (LongRange PCR) DNA dizileme analizi yapılmıştır (Şekil 4.3). Yapılan dizileme analizi sonucunda homozigot ve heterozigot yapıdaki örneklerde farklılık gözlenmemiş ve tamamında 206 bp (base pair) uzunluğunda DNA dizileri elde edilmiştir (Şekil 4.4). DNA dizileme analizinde Şekil 3.1'deki 1287 bp uzunluğundaki mutant allele ait insersiyon bölgesindeki bazlar bulunamamıştır. Agaroz jelde PCR ürünlerinin 206 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiş ve insersiyon bölgesindeki bazların olduğu bant görüntülenememiştir (Şekil 4.5). Yani homozigot ve heterozigot bireyler birbirinden ayırt edilememiştir.





Şekil 4.3. Örneklere ait DNA dizileme analiz görüntüsü

CTGCAAAGCCACCTAGCCTATGGCTCACGGTAGAGAAGGGACCCTCGGTG  
 ACCATCCTCTCTCTGCACCAGGTACGACCTCAAGCTGGCTGTTCTGAAG  
 GCAAGCAAGTTCTACTTTACCCAGAGAAAGAAGAGCCTAAACACATCCTC  
 AACATCAAGAGGGGCATCATCTCTGCCCTCCTGCTTCCCCCAGAAACAGA  
 AGAGGC

Şekil 4.4. DNA dizileme analiz sonucu elde edilen 206 bp uzunluğundaki dizi

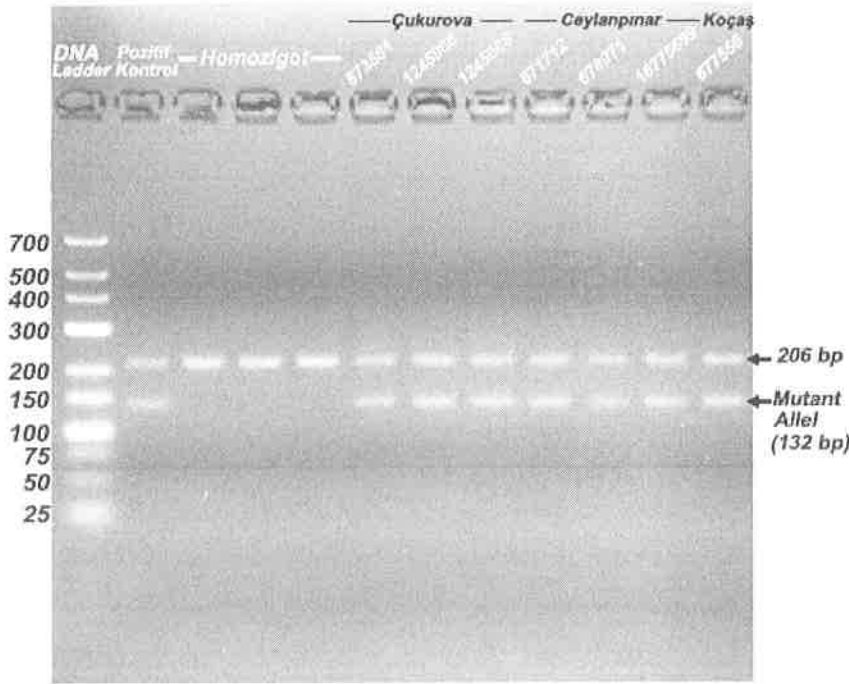


Şekil 4.5. Homozigot ve heterozigot olduğu değerlendirilen genotiplerin LongRange PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri



### 4.3. PCR

Menzi ve ark.(2016), APOB geninin 5 eksonundaki insersiyonu göstermek amacıyla yaptıkları LongRange PCR analizinde mutant allel taşıyıcısı hayvanlarda, kullanılan Taq polimerazının, daha kısa olan yabancı (wild type) alleli (249 bp) tercih ettiğini ve bu nedenle 1548 bp uzunluğundaki mutant allele ait PCR ürününü çoğaltamadıklarını bildirmişlerdir. Bu analizden hareketle taşıyıcıların tespit edilebilmesi için insersiyon bölgesinden bir primer kullanılarak PCR yapılmasını önermişlerdir. Bu nedenle Menzi ve ark.'nın (2016) önerisi dikkate alınarak, Real-Time PCR'da kullanılan APOB.e3.WT.F, APOB.e3.WT.R ve APOB.e3.Ins.R ile tüm örneklerin tekrar Phusion Taq polimeraz kullanılarak PCR'ı yapılmış ve %2'lik agaroz jelde koşturularak görüntülenmişlerdir. Yapılan analizde heterozigot yapıdaki örneklerin 206 ve 132 bp uzunluğunda iki banta sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.6). Böylelikle Real-Time PCR uygulamasında heterozigot yapıda tespit edilen örneklerin ekseriyetinin homozigot oldukları tespit edilmiştir. Bu durumun Real-Time PCR'daki primerlerin kullanılan  $T_m$  derecesinden etkilendikleri ve kullanılan master miks içeriğindeki  $MgCl_2$  konsantrasyonunun değişmesine bağlı olarak Taq polimerazın affinitesinin de farklı olmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir.



Şekil 4.6. Phusion Taq polimeraz ile yapılan PCR analizinde homozigot ve heterozigotların agaroz jel görünümü ve baz büyüklükleri



#### 4.4. Genotip ve Allel frekansları

Agaroz jel eleforezinde gözlenen heterozigot ve homozigot genotiplere ait Dağılımlar ile beklenen genotip frekansları ve khi-kare analizleri Çizelge 4.1'de, allel frekansları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Analizi yapılan 25'i boğa olmak üzere toplam 466 örnekten 459'u yabancı allel bakımından homozigot olarak bulunmuştur. Mutant allel bakımından taşıyıcı olarak 7 inek heterozigot olarak tespit edilmiştir. Sultansuyu TİM'den örnekleri alınan 25 boğanın tamamı yabancı allel bakımından homozigot bulunmuştur. Yani boğaların kalıtsal olarak hastalığı oluşturan mutant alleli taşımadıkları görülmüştür.

Çukurova TİM'de 3, Ceylanpınar TİM'de 3 ve Koçaş TİM'de 1 olmak üzere 7 ineğin taşıyıcı oldukları tespit edilmiştir. İşletmelerde ve toplamda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılığın önemli olmadığı yapılan  $\chi^2$  analizi ile ortaya konmuştur. Populasyonun incelenen alleller bakımından dengede olduğu anlaşılmaktadır.

Mutant allel frekansı işletmelere göre % 0,00-1,97 arasında değişmektedir. Tüm işletmeler birlikte değerlendirildiğinde mutant gen frekansı % 0,75 olarak hesaplanmıştır. Mutant genin frekansı oldukça düşük düzeydedir. Bu durum hastalıkla mücadelede bir avantaj sayılabilir.

**Çizelge 4.1.** İşletmelere göre APOB alleli bakımından genotiplerin dağılımı (N=Sayı)

İşletme Adı (TİM)	AA		AB		BB		X <sup>2</sup>	
	Gözlenen	Beklenen	Gözlenen	Beklenen	N	N		
	N	%	N	%	N	%		
Çukurova (Adana)	76	96,21	76,04	3,79	3	2,92	-	Ö.D.
Ceylanpınar (Urfa)	73	96,06	73,03	3,94	3	2,93	-	Ö.D.
Koçaş (Aksaray)	95	98,96	95,00	1,04	1	0,99	-	Ö.D.
Polatlı (Ankara)	10	100,00	108,00	0,00	-	-	-	Ö.D.
Türkgeldi (Tekirdağ)	82	100,00	82,00	0,00	-	-	-	Ö.D.
Sultansuyu (Malatya)	25	100,00	25,00	0,00	-	-	-	Ö.D.
<b>TOPLAM</b>	<b>459</b>	<b>98,50</b>	<b>459,03</b>	<b>1,50</b>	<b>7</b>	<b>6,94</b>	<b>-</b>	<b>Ö.D.</b>

A: Yabancı allel; B: Mutant allel; Ö.D.: Önemli Değil (P>0,05)





**Çizelge 4.2.** İşletmelere göre APOB genine ait allel frekansları

<b>İşletme Adı (TİM)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
Çukurova (Adana)	98,11	1,89
Ceylanpınar (Urfa)	98,03	1,97
Koçaş (Aksaray)	99,48	0,52
Polatlı (Ankara)	100,00	0,00
Türkgeldi (Tekirdağ)	100,00	0,00
Sultansuyu (Malatya)	100,00	0,00
<b>Genel</b>	<b>99,25</b>	<b>0,75</b>

A: Yabancıl allel; B: Mutant allel



a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

Bütçe Yılı	Bütçe Açıklama Kodu	Detaylar										
		Önceki Yıllan Devir	Başlangıç Ödeneği	Eklenen Aktarma	Düşülen Aktarma	Eklenen Ödenek	Düşülen Ödenek	Net Ödenek	Harcanan	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalan
201	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	0,00	22.317,40	4.682,60	0,00	0,00	0,00	27.000,00	0,00	0,00	0,00	27.000,00
	03.3 YOLLUKLAR	0,00	4.682,60	0,00	4.682,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<b>Toplam</b>	<b>0,00</b>	<b>27.000,00</b>	<b>4.682,60</b>	<b>4.682,60</b>	<b>0,00</b>	<b>27.000,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>27.000,00</b>
201	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	27.000,00	0,00	0,00	0,00	0,00	27.000,00	24.000,00	0,00	0,00	0,00	3.000,00
	<b>Toplam</b>	<b>27.000,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>27.000,00</b>	<b>24.000,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>3.000,00</b>

