

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAYSERİ BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN HOLŞTAYN
SIĞIRLARINDA KOMPLEKS VERTEBRAL
MALFORMASYON HASTALIĞI GENİNİN ALLEL
FREKANSININ BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Gevher Nesibe KULAKLI**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Bilal AKYÜZ**

**Veteriner Zootečni Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSY-10-2908 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2011
KAYSERİ**

KAYSERİ BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN HOLŞTAYN SIĞIRLARINDA KOMPLEKS VERTEBRAL MALFORMASYON HASTALIĞI GENİNİN ALLEL FREKANSININ BELİRLENMESİ

ÖZET

Bu çalışmanın amacı Kayseri ve civarında yetiştirilen ve sütçü ırklar içerisinde Türkiye’de en yüksek popülasyona sahip olan Holştayn sığır ırkına ait ineklerde, kompleks vertebral malformasyon (CVM) hastalığına neden olan mutant allelinin bulunup bulunmadığının araştırılmasıdır. Ayrıca bu çalışmada kullanılan moleküler genetik testin, Türkiye’deki damızlık olarak seçilmek istenen Holştayn ırkına ait damızlık adaylarının CVM yönünden taranmalarında kullanmak, veteriner hekimler ve yetiştiricilerin bu kalıtsal hastalıktan haberdar olmalarını sağlamaktır.

Kompleks vertebral malformasyon, Holştayn sığır ırkında görülen otozomal ve çekinik kalıtım şekli gösteren, öldürücü kalıtsal bir hastalıktır. Bu kalıtsal hastalık ilk olarak 1999 yılında Danimarka’da yetiştirilen Holştayn’larda belirlenmiştir. Hastalık, homozigot hasta buzağılarda kompleks anomaliler, bacak eklemlerinde ve sırt omurlarında kemik deformasyonları ile karakterizedir. Ayrıca homozigot yavrularda embriyonal ölümler, abort ve ölü doğumlara da sebep olmaktadır. Çalışmanın materyalini, Kayseri ve civarında halk elinde yetiştirilen 150 baş Holştayn ırkı dişi sığır oluşturmuştur. İncelenen hayvanlardan alınan kan örnekleri DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Alınan kanlardan DNA izolasyonu fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada CVM allelinin varlığı veya yokluğu, polimeraz zincir reaksiyonu-restiriksiyon parçacık büyüklü polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi kullanılarak araştırılmaya çalışılmıştır.

Elde edilen DNA’lar uygun primerler kullanılarak PCR’de çoğaltılmıştır. PCR ürünleri *EcoT22* endonükleaz enzim ile kesilmiştir. Kesilen PCR ürünleri % 2’lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Bu çalışmada incelenen 150 baş Holştayn ırkı sığırdaki CVM taşıyıcı bireylere rastlanmamıştır.

Anahtar kelimeler: CVM, Holştayn, PCR, RFLP

**DETERMINATION OF THE FREQUENCY OF THE ALLELE IN THE GENE
CAUSING THE COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION IN THE
HOLSTEIN COWS IN THE KAYSERI REGION**

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the mutant allele causing the complex vertebral malformation (CVM) in Holstein which is the largest population among the milked breed in the Kayseri region. In addition, this test can be adapted to screen the Holstein cows in terms of the CVM disorder for breeding purpose, and veterinarians and breeders can be informed about this hereditary disease.

The CVM is a hereditary lethal disease with an autosomal and recessive heredity in the Holstein cows. This hereditary disease was first determined in the Holstein cows in 1999 in Denmark. This disease is characterized with complex anomalies, bone deformations in the joints of extremities and vertebrae in calves with homozygous. Moreover, fetal deaths, abortions and stillbirths are seen in calves with homozygous. Client-owned animals used in this study were consisted of 150 female Holstein cows in the Kayseri region. Isolation of DNA with phenolchloroform extraction method was performed from blood samples taken from animals. In this study, the method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was applied to determine the mutant allele causing the CVM.

The numbers of DNA obtained have been increased with the PCR. The products of PCR have been divided into small pieces by *EcoT22* endonuclease enzyme. Small pieces of PCR products were treated with electrophoresis in the 2% agarose gel. In the study none of the cows were determined with the CVM disorder.

Key words: CVM, Holstein, PCR, RFLP

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET	III
İÇİNDEKİLER	V
TABLO ve RESİM LİSTESİ.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. SIĞIR LÖKOSİT BAĞLANMA YETMEZLİĞİ (BOVINE LEUKOCYTE ADHESION DEFICIENCY, BLAD).....	8
2.2. ÜRİDİN MONOFOSFAT SENTETAZ EKSİKLİĞİ (DEFICIENCY OF URIDINE MONOPHOSPHATE SYNTHASE, DUMPS)	9
2.3. MİYOKLONUS.....	9
2.4. SİTRÜLİN BİRİKİMİ (CİTRULLİNAEMİA).....	10
2.5. SİFEROSİTOZİS	11
2.6. KALITSAL ÇİNKO EKSİKLİĞİ HASTALIĞI (HEREDITARY ZINC DEFICIENCY, HZD, A46)	11
2.7. SIĞIR KLAUDİN-16 (CL-16) EKSİKLİĞİ SENDROMU.....	12
2.8. FAKTÖR XI EKSİKLİĞİ (FXI).....	12
2.9. MİYOFOSFORİLAZ EKSİKLİĞİ (GLİKOJEN DEPO HASTALIĞI TİP V).....	12
2.10. BATTEN HASTALIĞI (SİNİRSEL KEROİD LİPOFUSİNOZ, NCLs)	13
2.11. ALFA MANNOSİDOZİS	13
2.12. KASSEL HİPERTROFİ (MUSCULAR HYPERTROPHY).....	14
2.13. ŞEDİAK-HİGAŞİ (CHEDIAK-HIGASHI) SENDROMU.....	14
2.14. AKÇAĞAĞAÇ ŞURUBU İDRAR HASTALIĞI (MAPLE SYRUP URINE DISEASE, MSUD).....	15
2.15. SPİNAL MUSCULAR ATROFİ (SMA).....	15
2.16. TİBİAL HEMİMELİA (DOĞUŞTAN TİBİA YOKLUĞU).....	15
2.17. SİNDAKTİLİ (SYNDACTYLY)	16
2.18. KONJENİTAL ERİTROPOETİK PORFİRİYA (CONGENITAL ERYTHROPOIETIC PORPHYRIA).....	16
2.19. KALITSAL GUATR	16
2.20. KOMPLEKS VERTEBRAL MALFORMASYON (CVM)	16
2.20.1. Homozigot CVM'li Bireylerde Klinik Görünüm.....	17
2.20.2. CVM'nin İlk Kez Belirlenmesi ve Yayılışı.....	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
3.1. HAYVAN MATERYALİ.....	20
3.2. KAN ALMA	20
3.3. DNA İZOLASYONU	21

3.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanış Formülleri;	22
3.4. KULLANILAN PRİMERLER ve POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)	22
3.5. ELEKTROFOREZ.....	23
3.5.1. Jel'in Hazırlanması.....	24
3.5.2. Jel'in Dökülmesi	24
3.5.3. Kuyulara Örneklerin Yüklenmesi	24
3.6. BANTLARIN GÖZLENMESİ VE FOTOĞRAF ÇEKİLMESİ.....	25
3.7. <i>ECOT22</i> ENDOKNÜKLEAZ ENZİMİ İLE PCR ÜRÜNLERİNİN KESİLMESİ.....	25
4. BULGULAR.....	27
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	30
6. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	47

TABLO ve RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1.	Diğer ülkelerdeki Holştayn boğalar arasında CVM taşıyıcılarının sayıları ve görülme sıklığı	18
Resim 4.1.	1,2, 4-8: PCR ürünleri, 3: 100 bç'lik DNA merdiveni.....	28
Resim 4.2.	1: 100 bç'lik DNA merdiveni, 2-10: 233 bç'lik homozigot normal bireylere ait <i>EcoT22</i> enzim kesim ürünleri	29

KISALTMALAR

°C	: Sıcaklık.
µl	: Mikro litre.
A	: Adenin nükleotid.
A46	: Kalıtsal çinko eksikliği hastalığı.
ABD	: Amerika birleşik devletleri.
AS-PCR	: Allel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu.
ASS	: Arjininosüksinat sentetaz enzimi.
Bç	: Baz çifti.
BLAD	: Sığır lökosit bağlanma yetmezliği.
C	: Sitozin.
CGG	: Arjinin aminoasit.
CL-16	: Klaudin-16.
CVM	: Kompleks vertebral malformasyon.
dH₂O	: Distile su.
dk	: Dakika.
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit.
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat.
DUMPS	: Üridin monofosfat sentetaz yetmezliği.
ER	: Endoplazmik retikulum.
FXI	: Faktör XI eksikliği.
g	: Gram.
G	: Guanin.
GABA	: Gamma aminobütirik asit engelleyici nörotransmitter
HCl	: Hidroklorik asit.
HZD	: Kalıtsal çinko yetmezliği.
kb	: Kilo baz
kg	: Kilogram.
M	: Molar
mg	: Miligram

MgCl₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mili litre.
mM	: Milimolar
MSUD	: Akçaağaç şurubu idrar hastalığı.
NaCl	: Sodyum klor.
NCLs	: Sinirsel keroid lipofuksinoz.
nMol	: Nanomol
NSTs	: Nükleotid şeker taşıyıcıları.
PCLN-1	: Paracellin-1.
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restiriksiyon parçacık büyüklük polimorfizmi.
SDS	: Sodyum dodesil sülfat.
SMA	: Spinal muscular atrofi.
SSCP	: Single- stranded conformation polymorphism.
T	: Timin
TBE	: Tris-borat-EDTA.
TE	: Tris-EDTA
TGG	: Triptofan aminoasit.
TNE	: Tris-NaCl-EDTA
UDP-N	: Asetil glukozamin transporter proteini.
UMPS	: Üridin monofosfat sentetaz.
UV	: Ultra viyole.
V180F	: Fenilalaninin.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yetiştirme programlarında kullanılması planlanan damızlık adaylarının ait oldukları ırklarda yaygın olarak görülen kalıtsal hastalıklar yönünden kontrol edilmesi gereklidir. Bu uygulama, damızlık adaylarından beklenen düzeyde verim elde edilmesi ile kalıtsal hastalıkların sebep olabileceği yavru kayıplarının ve verim kayıplarının önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Kalıtsal hastalıklar; bir kuşaktan diğer kuşağa aktarılan genlerde, kendiliğinden ya da çevresel etkiler nedeniyle ortaya çıkan mutasyonlar sonucu şekillenmektedir. Kalıtsal hastalıklardan kaynaklanan zararlı etkilerin önlenmesi amacıyla, kalıtsal hastalığa neden olan ve mutant allel olarak adlandırılan mutasyona uğramış genin alternatif formlarının tamamen sürüden eradike edilmesi gereklidir. Bu zararlı etkiler ancak fenotipik olarak normal görünüme sahip kalıtsal hastalık yönünden taşıyıcı bireylerin kesin ve doğru olarak belirlenerek sürüden uzaklaştırılması ile sağlanabilir. Bu durum özellikle entansif sığır yetiştiriciliğinde, suni tohumlama yöntemiyle üstün verimli bir veya birkaç boğa ile yetiştiriciliği yapılan ırkın tüm dünyadaki dişi damızlıklarının tohumlanmasında yaygın olarak kullanılması ve embriyo naklinin giderek daha da yaygınlaştırılmasıyla çok daha önemli hale gelmiştir. Çünkü kalıtsal hastalıklar, kalıtsal bozukluklar yönünden genetik yapısı hakkında herhangi bir bilgiye sahip olunmayan damızlıklar yardımıyla popülasyonda varlığını ve

yayılmasını sürdürürler. Yetiştiriciliği yapılan ırklarda en çok görülen kalıtsal hastalıklar yönünden homozigot normal oldukları kesin olarak bilinmeyen damızlıklar, geneotiplerinde bulunması muhtemel mutant allelleri, bu kalıtsal hastalıktan etkilenmiş yavruları doğana kadar popülasyona yaymaya devam ederler. Günümüz süt sığırı yetiştiriciliğinde en yaygın olarak kullanılan Holştayn sığır ırkında görülen ve Holştayn yetiştiriciliğinde önemli verim kayıplarına neden olan sığır lökosit bağlanma yetmezliği (BLAD) ve üridin monofosfat sentetaz yetmezliği (DUMPS) gibi kalıtsal bozukluklar, tüm dünyaya suni tohumlamada yaygın olarak kullanılan bir boğadan yayılmıştır (1, 2). Bu nedenle ekonomik verimlilik açısından öncelikle, Türkiye’de yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan ve yüksek kazanç beklenen sığır ırklarının damızlık ve damızlık adaylarında, verimi olumsuz etkileyen kalıtsal hastalıklara sebep olan mutant allellerin varlığı araştırılmalıdır. Diğer taraftan, Türkiye’de yetiştirilen ve Türkiye’nin sığır türü için genetik zenginliğini oluşturan yerli sığır ırklarına ait damızlıkların da kalıtsal hastalıklar yönünden genetik yapılarının belirlenmesi, Türkiye’deki farklı sığır ırklarının oluşturduğu toplam sığır popülasyonu açısından daha faydalı olacaktır. Çünkü ırka özgü olduğu düşünülen birçok kalıtsal hastalık için yerli gen kaynaklarının yeterince incelenmesi gerekmektedir.

Türkiye’de, hayvancılığın önemli bir bölümünü oluşturan sığır yetiştiriciliğinde kullanılan damızlık ve damızlık adaylarında kalıtsal hastalıklar ve bunlara neden olan mutant allellerin varlığının aranmasına yeteri kadar önem verilmemektedir. Yapılan bu ihmal sığır yetiştiricilerinin ekonomik açıdan zarara uğramasına sebep olmaktadır. Her ne kadar 2000’li yılların sonuna doğru kalıtsal hastalıklar ve bunlara sebep olan alleller yönünden popülasyonun taranması yönünde çalışmalar yapılmaya başlanmış olsa da Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa ülkelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olan kalıtsal kusurlar hakkında Türkiye’de yeterince veri bulunmamaktadır. Bunun için Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan ırklara ait damızlıkların, damızlık olarak kullanılmaya başlanmasından önce bu ırklarda görülen kalıtsal hastalıklar yönünden taranmaları gerekmektedir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, Türkiye’de yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan Holştayn sığır ırkına ait dişi damızlıklarda, kompleks vertabral malformasyon (CVM) hastalığına neden olan mutant allelinin bulunup bulunmadığının polimeraz zincir reaksiyonu-restiriksiyon parçacık büyüklük polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi

kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, kalıtsal hastalıklar konusunda Veteriner Hekimler ile sığır yetiştiricilerinde farkındalık oluşturmak ve damızlık seçiminde seçim kriteri olarak, damızlık adaylarında CVM taramalarının rutin olarak yapılması bu yüksek lisans tezinin sonunda elde edilmesi hedeflenen amaçlar arasındadır.

2. GENEL BİLGİLER

Son elli yılda, sığır yetiştiriciliğinde yapılan genetik iyileştirme çalışmaları sayesinde süt ve et üretiminde büyük ilerlemeler elde edilmiştir (3). Tüm dünyada süt endüstrisinde kullanılan ineklerin yaklaşık %70'i suni tohumlama yöntemi ile tohumlanmaktadır (4). Suni tohumlama uygulaması süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılan Holştayn ırkının süt verimini artırmıştır (4). Bu yöntem hayvan başına verimi artırırken, aynı zamanda yetiştiriciliği yapılan ırklarda, ırk içi genetik benzerliğin de artmasına neden olmuştur (4). Irk içinde artan genetik benzerlik, bireylerin yaşama gücünü ve döl verimini düşüren kalıtsal hastalıkların hızla popülasyon içinde yayılmasına da sebep olmuştur (5). Bunun sonucu olarak kalıtsal hastalıklar çok kısa sürede ülkeleri hatta kıtaları aşarak tüm dünyaya yayılmıştır (5). İnsanlarda görülen kalıtsal hastalıklardan farklı olarak sığırlarda görülen kalıtsal hastalıkların büyük çoğunluğu çekinik kalıtım şekli göstermektedir (6). Sığır yetiştiriciliğinde kalıtsal hastalıklar saf yetiştirme nedeniyle ırka özgüdür (6). İnsanlarda çoğunlukla belirli resesif kalıtsal bozukluklar belirli ırklarda görülür (6). Orak hücreli aneminin çoğunlukla zencilerde, kistik fibrozisin ise çoğunlukla Kafkasya kökenlilerde görülmesi bu duruma iyi bir örnektir (6). Ayrıca insanlardaki bazı kalıtsal kusurlar, coğrafik engeller veya dini kurallardan dolayı çoğunlukla belirli etnik veya sosyal gruplarda görülmektedir (6). Benzeri durum aynı ırktan hayvanların birbirleri ile

çiftleştirilmesinin önerildiği modern entansif sığır yetiştiriciliği için de geçerlidir (7). Örnek olarak Holştayn ırkında görülen kalıtsal bir hastalık entansif yetiştiricilik yapılan ülkelerde sadece Holştayn'larda görülür (7). Ancak entansif yetiştiricilikte kullanılan erkek damızlık sayısı dişi bireyler göre çok az olduğu için bir bireyde ortaya çıkan mutant allel çok kısa sürede o ırkın tüm dünyadaki popülasyonlarına yayılabilir (7). Çünkü sığır yetiştiriciliğinde sıkı bir inbreeding yetiştiricilik uygulanmaktadır (7). Aslında sığır yetiştiriciliğinde birkaç elit boğanın yaygın kullanımı mutant resesif iki allelin bir hayvanın genotipinde bir araya gelme şansını artırmaktadır (7). Ekonomik açıdan bir sürünün tüm bireylerinin kalıtsal hastalıklar yönünden taranması zordur. Ancak, özellikle suni tohumlama ve embriyo nakli amacıyla kullanılan damızlık adaylarının ırka özgü kalıtsal hastalıkları taşıyıp, taşımadıklarının kesin olarak belirlenmesi kalıtsal hastalıklar kontrol altına alınmasına yardımcı olabilir (8).

Gen, protein üretimi için kodlanmış ve bir kuşaktan sonraki kuşağa aktarılan bilgileri içeren kalıtsal birimler olarak tanımlanabilir (9). Kalıtsal hastalıklar, canlılardaki kalıtım materyalinde meydana gelen ve ebeveynlerden yavruya aktarılan bozukluklar sonucu canlının sağlığını, verimini olumsuz etkileyerek ya da embriyonik ölüme neden olarak fertilitiyi düşüren hastalıklar olarak tanımlanabilir (10). Kalıtsal hastalıklar, aktarılan genlerde kendiliğinden ortaya çıkan ya da çevresel etkilerin sebep olduğu mutasyonların etkisiyle canlıya ait kalıtım materyalini değiştirerek, bozuk protein sentezine ya da protein sentezinin tamamen durmasına neden olan mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (9). Veteriner hekimlikte, kalıtsal bir hastalığa neden olan bozuk genin moleküler düzeyde belirlenmesi, kalıtsal hastalık yönünden ari sürülere sahip olmak ve hastalığın sürüden eradikasyonunu sağlamak için büyük önem taşımaktadır (10). Moleküler genetik alanındaki gelişmeler, genetik temeli bilinen kalıtsal bir hastalık yönünden bireylerin genetik yapılarının damızlık seçimi sırasında, doğumdan hemen sonra ya da embriyonik aşamada belirlenebilmesine olanak sağlayabilmektedir (10, 11). Sığır yetiştiriciliğinde, damızlık olarak kullanılması düşünülen damızlık adaylarının, bu ırklarda yaygın görülen kalıtsal hastalıklar yönünden genetik yapılarının belirlenmesi önemlidir. Aksi takdirde kalıtsal hastalıklara sebep olan mutant allelin oluşturulacak sürüye bulaşacaktır ve bu durum sürüde hasta ya da ölü yavruların doğmasına neden olarak yapılan yetiştiriciliğin karlılığını düşürecektir (1).

Tüm dünyaya damızlık hayvan ve sperma satan ülkelerde damızlık seçimlerinde çok sayıda gen ve çevrenin etkilediği süt verimi, tip özellikleri, erkek yavrularının günlük canlı ağırlık artışı, karkas bileşenleri, döl verimi, uzun ömürlülük ve hastalıklara karşı direnç yapılan ıslah programlarında aranan özelliklerdir (3). Suni tohumlama yönteminin et ve süt sığırları yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılması, bu özellikler bakımından en iyi erkek hayvanların belirlenerek damızlık olarak seçilip kullanılmasına olanak sağlamıştır (3). Süt sığırları yetiştiriciliğinde uygulanan bu genetik iyileştirme programlarının yardımıyla entansif yetiştiricilik yapılan ülkelerdeki sağmal hayvanlarda, laktasyon başına ortama süt veriminde önemli ilerlemeler elde edilmiştir (3). Uygulanan ıslah programları ve seleksiyon çalışmalarının bu avantajlarının yanında damızlık bir bireyde ortaya çıkan ve bireyde döl tutma problemlerine ya da yavru kaybına neden olan mutant allelerin frekansının hızla popülasyon içinde yayılmasına da neden olabilmektedir (3). Az sayıdaki erkek damızlığın tüm dünyada yaygın olarak kullanıldığı suni tohumlama yöntemi; ırk içindeki genetik ilerleme hızını artırmış ancak aynı zamanda da ırk içindeki genetik havuzun daralmasına sebep olmuştur (11). Suni tohumlama tekniğinin yoğun olarak kullanılması, sığır yetiştiriciliğinde tek bir damızlık boğanın yılda 100.000 inek tohumlayabilmesine olanak vermektedir (1). Bunun sonucu olarak, verim yönünden üstün bir boğanın, sahip olduğu verimle ilgili genleri çok sayıda yavruya kısa sürede nakletmesinin yanında, boğanın sahip olduğu olası mutant genlerinde çok kısa sürede tüm dünya popülasyonuna yayılmasına sebep olmaktadır. Bundan dolayı, damızlık bir erkeğin kalıtsal bozukluklara neden olan resesif alleller yönünden taşıyıcı olmaması gerekmektedir. Entansif yetiştiricilikte, istenmeyen bir özelliğin ortaya çıkmasına neden olan allelin yavrulara geçmesini önlemek için, damızlık erkeğin genotipinin belirleneceği bir sisteme gerek duyulmaktadır. Yıgınsal üretimin yapılmasının zorunlu olduğu et ve süt üretimi amacıyla yetiştirilen yüksek verimli elit sığır ırklarının damızlıklarının ırka özgü kalıtsal hastalıklar yönünden kontrol edilmeleri zorunludur.

Zararlı resesif genlerin belirlenmesi ve popülasyondan uzaklaştırılması, hayvan ıslahı ve hayvan yetiştiriciliğinde önemli bir yer tutmaktadır. Hayvan yetiştiriciliğinde temel amacın yüksek verimli hayvanların yetiştirilmesinin olduğu düşünüldüğünde, yetiştirme ve seleksiyon programlarının planlanması aşamasında, verimi olumsuz yönde etkileme potansiyeline sahip kalıtsal hastalıklar göz ardı edilmemelidir. Gelişmiş ülkelerin hemen hepsinde kullanılan damızlık hayvanlar, enfeksiyöz hastalıklar haricinde kalıtsal

hastalıklar yönünden de taranmaktadır. Örnek olarak, sığırlardaki kalıtsal hastalıklar için Danimarka'da 1989 yılından beri yürürlükte olan bir gözetim sistemi oluşturulmuştur (12). Hatta Holştayn ırkında kırmızı- beyaz alacalık gibi verime etkisi olmayan ancak yetiştiriciler tarafından istenmeyen özelliklere sahip bireyler bile belirlenerek popülasyonlardan çıkarılmaktadır (7). Sığır yetiştiriciliğinde kalıtsal hastalıkların sebep olabileceği verim kaybı riski ancak suni tohumlama amacıyla sığır yetiştirilen işletmelere girecek boğa adaylarının, kullanımı kolay özel DNA temeli testler ile incelenerek taşıyıcıların ayıklanması ile en aza indirilebilir (7). Genetik hastalıkların kontrolündeki en önemli sıkıntılardan biri kalıtsal hastalığa sebep olan resesif allelin varlığının belirlenmesine kadar geçen sürede bu allelin frekansının popülasyon içinde zaten yüksek bir frekansa ulaşmış olmasıdır (7). Aslında, genel olarak bir kalıtsal hastalığın açığa çıkması, mutasyonun ilk olarak ortaya çıktığı dişi ve erkek ataların çiftleşerek popülasyona bu mutant alleli yaymalarından çok sonra ortaya çıkar (7). Bu arada mutant allel zaten sığır popülasyonlarına yayılmış olur (7). Bu duruma en güzel örnek, taşıyıcılarının teşhisinin yapılabildiği 1990 yılına kadar tüm dünyadaki Holştaynlara yayılan ve mutant allelin ilk olarak 1952 doğumlu bir boğada ortaya çıktığı BLAD'ı verebiliriz (7). Bu nedenle mümkün olduğu kadar erken bir sürede, mutasyona uğramış iki allelin homozigot olduğu genotip ile fizyolojik bir anormalliğin, biyokimyasal bir bozukluğun veya bir enzim yetmezliğinin görüldüğü fenotipin ilişkilendirilmesi gereklidir (7). Bir anormalliğin gerçekten genetik kaynaklı olduğunu araştırmacılara düşündürecek üç durum vardır (7). Bunlardan birincisi, bu anomali akrabalık ilişkisi olan hayvanlarda daha çok gözlenmektedir (7). İkincisi, yılın tüm sezonlarında ve farklı coğrafik bölgelerde yetiştirilen hayvanlarda görülmektedir ve üçüncü olarak da İnbreding düzeyinin artması durumunda anormal yavruların frekansının artmasıdır (7). Bu da bireyin iyi tutulan pedigree kayıtlarının incelenmesi ile belirlenebilir.

Evcil hayvanlardaki kalıtsal hastalıkların birçoğu insanlarda belirlenen kalıtsal hastalıkların benzeridir. Bu nedenle hayvanlarda görülen kalıtsal hastalıkların sebeplerinin belirlenmesinde ve taşıyıcı bireylerin teşhisinde insanlarda görülen kalıtsal hastalıkların tanı yöntemlerinden yararlanılmaktadır (13). Son elli yılda yaygın yetiştiriciliği yapılan sığır ırklarında 300 civarında kalıtsal bozukluk bildirilmiştir (12, 13). Bunlardan tüm dünyada yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan ırklarda en yaygın görülen ve genetik temeli bilinen kalıtsal hastalıklar şunlardır;

2.1. SIĞIR LÖKOSİT BAĞLANMA YETMEZLİĞİ (BOVINE LEUKOCYTE ADHESION DEFICIENCY, BLAD)

Sığır lökosit bağlanma yetmezliği (BLAD), Holştayn sığır ırkında görülen ve hasta buzağuların doğumdan sonraki bir yıl içerisinde tekrarlayan mukozal enfeksiyonlar sonucunda ölmesi ile karakterize, otozomal resesif kalıtsal bir hastalıktır (8, 14). Bozukluk, ilk olarak 1990 yılında ABD’de belirlenmiş ve sığır granülopati sendromu olarak adlandırılmıştır (15). Yangı durumunda lökositlerin damar duvarını geçerek yangı bölgesine ulaşmaları; hücre zarlarında bulunan α ve β olarak adlandırılan iki alt üniteden oluşan, lökointegrin reseptörleri sayesinde olur (4). Hastalık, damarlarda endotel-lökosit bağlanmasını sağlayan CD11\CD18 kompleksinin alt ünitesi olan ve lökosit hücre zarındaki CD18 glikoproteinini kodlayan genin 383 pozisyonundaki guanin organik bazının, adenin ile yer değiştirmesine neden olan bir nokta mutasyonu sonucu oluşmaktadır (8). Meydana gelen bu değişiklik CD18 geni tarafından kodlanan CD18 glikoproteininin 128. amino asidi olan aspartik asidin $\rightarrow$ glisine dönüşmesine neden olur (4, 16, 17). Bu amino asit değişikliği, yavruda oluşan yangı durumunda lökositlerin damar endotel hücrelerine bağlanarak damar duvarından geçişlerini sağlayan β_2 integrin molekülünün sentezinin bozulmasına neden olmaktadır (18, 19). Lökointegrin kompleksinde oluşacak bir bozukluk, lökositlerin damar dışına çıkamayarak lezyonlu dokuya ulaşmalarını engeller (20). Hasta buzağuların sindirim kanalında, ağız mukozasında geniş ve yaygın ülser, diş etlerinde diş eti iltihabı ve erken diş kaybı, şiddetli ve iyileşmeyen bir ishal, solunum sistemlerinde bronşit ve pnömoni görülür (1, 8). Uygulanan tedavi sonrasında klinik belirtiler ortadan kalksa bile, tedavi bitimini takiben kısa sürede klinik görünümü tekrarlar (2). Hasta buzağılarda aralıklarla yapılan kan sayımında çoğunluğunu nötrofil lökositlerin oluşturduğu devamlı bir lökosit artışı görülür (1, 21). Sağlıklı bir sığırın 1 mm³ kanında 8.000 adet lökosit sayılırken, hasta buzağılarda bu sayı 100 000’den fazladır (1, 21). Hasta buzağılarda büyüme geriliği ve aşırı zayıflık görülür (1). Hasta buzağuların vücut ağırlıkları yaşlılarının ancak %50-60’ı kadardır (1). Hasta hayvanlarda doğumdan sonraki ilk bir yıl içerisinde tekrarlayan mukozal enfeksiyonlar sonucu ölüm görülmektedir (1, 8, 21).

2.2. ÜRIDİN MONOFOSFAT SENTETAZ EKSİKLİĞİ (DEFICIENCY OF URIDINE MONOPHOSPHATE SYNTHASE, DUMPS)

Holştayn sığır ırkında görülen üridin monofosfat sentetaz eksikliği (DUMPS), homozigot durumda embriyonun gebeliğin yaklaşık 40. gününde ölümü ile karakterize olan otozomal resesif kalıtım şekli gösteren kalıtsal bir hastalıktır (10, 22). Hücrelerde, üridin monofosfat sentetaz enzimi (UMPS) orotik asit tarafından pirimidin nükleotidin esansiyel bileşeni olan üridin monofosfata dönüştürülmektedir (23). Hasta hayvanlarda, UMPS enzimini sentezleyen genin 405. kodonunda meydana gelen bir nokta mutasyonu, UMPS geninde erken bir stop kodonunun oluşmasına neden olarak fonksiyonel yönden bozuk bir protein sentezletir (24, 25). Bu durumda orotik asit, üridin monofosfata çevrilememektedir (22, 26, 27). Genetik yapılarında DUMPS genini taşıyan taşıyıcı hayvanlar ile normal hayvanlar arasında doğum ağırlıkları, büyüme ve beden ölçüleri bakımından istatistiksel olarak taşıyıcı-normal ayırımını yaptıracak kadar önemli farklılıklar bulunmadığı bildirilmiştir (28). Taşıyıcı hayvanlarda büyüme ve gelişmenin normal olduğu, taşıyıcı dişilerin laktasyon dönemlerinde süt ve idrarlarındaki orotik asit miktarının daha fazla olduğu bildirilmiştir (28). Taşıyıcı hayvanların dokularındaki UMPS aktivitesi, sağlıklı bireylerdekinin yarısı kadar olmasına rağmen, fenotipik olarak normal görünmektedir (29). Taşıyıcı bireylerin pedigrileri incelendiğinde Kuzey Amerika’da 1988-1992 yıllarında en fazla taşıyıcı yavruya sahip boğanın Happy-Herd Beautician adlı boğa olduğu, ikinci sırada ise Needle-Lane Jon-Red adlı boğanın olduğu belirlenmiştir (27). Bu kalıtsal hastalığa neden olan mutant allele ABD, Almanya, Kanada, Macaristan ve Hindistan’ da yetiştirilen Holştayn’ larda da rastlandığı bildirilmiştir (27).

2.3. MİYOKLONUS

Miyoklonus, Avustralya’da yetiştirilen Hereford ve Hereford melezlerinde görülen, otozomal çekinik özellik gösteren kalıtsal bir hastalıktır (30). Miyoklonus homozigot buzağların iskelet kaslarında istemsiz olarak aniden başlayan kasılmalarla karakterize olan merkezi sinir sistemi hastalığıdır (31). Hastalık beyin sapı ve omuriliğin en önemli inhibitör nörotransmitteri olan glisin amino asidinin bağlandığı glisin reseptörünün (Glyr) α_1 alt ünitesinin ikinci ekzonunda bulunan 156. nükleotidinde bir sitozin-adenin değişmesine (156 C→A) neden olan nokta mutasyonu sonucu ortaya çıkar (31). Meydana gelen bu mutasyon sonucunda Glyr geninde prematür bir “stop” kodunu oluşur (32). Bu

da glisin amino asitini tanıyan reseptörün oluşmasını engeller (32). Hasta buzağılarda görsel, işitsel ve dokunma ile uyarıldıklarında ani ve şiddetli kas kasılmaları ve titreme görülür (25). Hasta embriyolarda, intra uterin dönemde kontrolsüz kas tetanilerinin görüldüğü ve bu kontrolsüz kasılmaların bazen de embriyonik dönemde kemik kırılmalarına sebep olabildiği bildirilmiştir (25). Histo-patolojik incelemelerde, hasta buzağıkların merkezi sinir hücrelerinde hastalığın tanınmasını kolaylaştıracak patolojik bir bulguya rastlanılmaz (31, 32).

2.4. SİTRÜLİN BİRİKİMİ (CİTRULLİNAEMİA)

Holştayn sığır ırkında görülen sitrülün birikimi, üre döngüsünün bozulmasına neden olan otozomal çekinik bir kalıtsal hastalıktır (10, 33). Hastalık, üre döngüsün sırasında ortaya çıkan sitrulinin, arginosüksinata çevrilmesini sağlayan arjinosüksinat sentetaz (ASS) enzim enzimini kodlayan genin 59. ekzonunda meydana gelen bir nokta mutasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (25). Sağlıklı sığırlarda ASS 412 amino asit içeren protein molekülünden oluşmaktadır (25). Bu kalıtsal hastalığın ASS enzimini kodlayan genin 5. ekzonunda gözlenen C86T transisyon mutasyonunun sığırlarda sitrülün birikimine neden olduğu belirlenmiştir (33). Meydana gelen bu mutasyon sonucu, amonyağın üreye çevrilmesi aşamasında, amonyaktan daha toksik bir ürün olan sitrülünün, arginosüksinata çevrilemeyerek vücutta birikmesine neden olmaktadır (34). Hasta buzağıkların kanlarında, serebrospinal sıvılarında, göz sıvılarında ve beyin dokularında sitrülün konsantrasyonu yüksektir (24). Devamlı kötüleşen nörolojik bulgular görülür ve hasta buzağıklar doğumu takiben bir hafta içinde ölürlür (10). Bu kalıtsal bozukluktan etkilenmiş buzağıklar normal görünüşlü olarak doğarlar (10). Doğumdan sonraki ikinci günde buzağılarda depresyon, dil çıkarma ve az beslenme gibi belirtiler görünür (10). Üçüncü günde, bu buzağıkların amaçsız hareket ile önlerindeki herhangi bir engele veya duvara başlarını dayayarak durdukları görülür (10). Etkilenmiş buzağılarda bulgular 3-5 gün arasında hızla kötüleşir ve buzağılarda körlük gelişir, hasta buzağıklar kollapsa girerek 12 saat içinde ölürlür (10). Hastalık, Avustralya'ya yüksek süt yağı oranına sahip olduğu için bu ülkede yaygın olarak kullanılmış olan ABD kökenli Linmack Kriss King isimli boğaya ait spermalar ile bulaşmıştır (6). Avustralya'da 1980'li yıllarda suni tohumlamada kullanılan tüm boğalarının %75' inin bu boğa ile akraba olduğu ve bu boğaların %13'ünün ise citrullinemia taşıyıcısı oldukları bildirilmiştir (6). Daha sonra

bu kalıtsal hastalığın ABD, Kanada, İngiltere, Almanya, Yeni Zelanda ve Hindistan'da da yetiştirilen Holştaynlarda görüldüğü bildirilmiştir (24).

2.5. SİFEROSİTOZİS

Bu hastalık Japon yerli Siyah (Wagyu) sığırlarında, hasta buzağılarda yaygın hemolitik anemi ve büyüme geriliği ile kendini gösteren ve dominat kalıtım şekli gösteren kalıtsal bir hastalıktır (35). Hasta buzağılarda alyuvarlar osmotik olarak kırılğan hücre zarına sahiptirler (25). Hastalık alyuvar hücrelerinde anyon taşıyıcısı olarak görev yapan AE1 glikoproteininde meydana gelen mutasyon sonucu ortaya çıkar (25). Bu kalıtsal hastalık insanlardaki aynı genin 646. kodonuna denk gelen yerde meydana gelen bir mutasyon sonucu oluşur (25). Mutasyon arjinin amino asidini kodlayan CGA kodonunu stop kodonu olan TGA' ya dönüştürür (25). Meydana gelen bu mutasyon, AE1 glikoprotein eksikliğine, AE1 eksikliği ise çok sayıda kararsız kırmızı kan hücre membranı üretimine ve bunun sonucunda da anemi ve büyüme geriliğine neden olmaktadır (25, 35).

2.6. KALITSAL ÇİNKO EKSİKLİĞİ HASTALIĞI (HEREDITARY ZINC DEFICIENCY, HZD, A46)

Kalıtsal çinko yetmezliği (HZD) ilk olarak 1951 yılında İskoçya'da yetiştirilen Holştayn'larda bildirilmiştir (36). Hastalık, 1970'li yıllarda Danimarka, Hollanda, Almanya ve İtalya'da, 1980'li yıllarda ise İrlanda, İngiltere ve Fransa'da bildirilmiştir (36-38). Adema hastalığı ve A46 gibi birkaç ismi olan kalıtsal çinko eksikliği hastalığı artık HZD olarak isimlendirilmektedir (36). Hastalık otozomal resesif bir kalıtım şekli göstermektedir (37, 38). Hastalık çinkonun bağırsaklardan emilmesinde görev alan çinko emilim protein ailesine ait bir proteinin anormal fonksiyonu sonucu oluşur (36). Hastalığa *SLC39A4* geninde meydana tek bir nükleotid yer değişimi neden olur (36). Hastalık, normal serum çinko düzeyi ile doğan hasta hayvanlarda, doğumu takip eden bir hafta boyunca çinkonun bağırsaklarda yetersiz emilimine bağlı olarak serum çinko seviyesinde devamlı bir azalma görülür (36). Serum çinko seviyesinde ki bu azalma sonucu hasta hayvanlarda devamlı ishal, paraketozis, deri lezyonları, timusda körelme ve kıl dökülmesi görülür (25, 37-39). Deri lezyonları çoğunlukla ağız, göz, kulak dipleri, eklemler, toraksın alt kısımları, abdomen ve bacaklarda görülür (36). Ayrıca hasta hayvanlarda stomatitis, yemede azalma ve büyüme geriliği görülür (39). Yüksek dozda çinko verildiğinde hasta hayvanların düzeldiği görülür (39).

2.7. SIĞIR KLAUDİN-16 (CL-16) EKSİKLİĞİ SENDROMU

Klaudin-16/paracellin-1 (CL-16/PCLN-1) eksikliği sendromu, Japon Yerli Siyah (Wagyu) sığır ırkında görülen otozomal çekinik kalıtsal bir hastalıktır (40). Hastalık büyüme geriliği, tırnaklarda aşırı büyüme, ciddi böbrek bozuklukları, kanda üre, nitrojen ve kreatinin düzeyleri ile idrarda protein düzeyinde düzensizlikle kendini göstererek, kronik böbrek yetmezliği gibi klinik semptomlar gösterir (40). Hasta buzağuların böbreklerinin histolojik incelemesinde böbrek paranşim dokusunun fibröz doku ile yer değiştiği, böbrek medulla ve korteksinin mononükleer hücre invazyonu ve normal tubul ve glomerulus sayısında azalma görülür (41). Hastalık Japon Siyah sığırlarında renal tubuler displazi olarak da bilinir (40). Hastalık, CL-16 geninin ilk dört ekzon bölgesini içeren 37 kilo bazlık bölgenin delesyonu sonucu meydana gelmektedir (42). Hastalık et kalitesi yönünden iyi ailelerin özellikle tosunlarında görüldüğü için yetiştiriciler açısından önemli ekonomik kayıba neden olmaktadır (40).

2.8. FAKTÖR XI EKSİKLİĞİ (FXI)

Faktör XI eksikliği, sığırlardan önce insan ve köpeklerde belirlenmiştir (43). Faktör XI eksikliği Holştayn ve Japon siyah sığır ırklarında görülmüştür (44). Hastalığın faktör XI geninin 12 numaralı ekzonuna 76 baz eklenmesine neden olan bir mutasyon sonucu meydana geldiği belirlenmiştir (5, 43). Hastalık Hemofili C olarak da bilinmektedir (25). Faktör XI eksikliğine neden olan mutant allel yönünden homozigot ve heterozigot buzağuların, homozigot normal buzağılara oranla daha düşük doğum ağırlığı ve yaşama gücü gösterdiği bildirilmiştir (45). Ayrıca bu mutant allel yönünden homozigot ve heterozigotların, homozigot normallere göre enfeksiyöz hastalıklara yakalanma olasılıklarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (45). Hasta hayvanlarda döl tutmama, anemi, metritis, mastitis, pnömoni ve uzayan kanamalar görülebilir (46).

2.9. MİYOFOSFORİLİZ EKSİKLİĞİ (GLİKOJEN DEPO HASTALIĞI TİP V)

Etçi bir sığır ırkı olan Şarole ırkına özgü kalıtsal bir hastalık olan miyofosforilaz eksikliği, dokularda patolojik olarak glikojen birikmesi ile karakterize, otozomal resesif bir kalıtım şekli göstermektedir (10, 47). Hastalığa miyofosforilaz geninin 489. kodonun 12. ekzonunda meydana gelen bir nokta mutasyonu neden olmaktadır (25). Bu mutasyon, genin 489. kodonunun kodladığı arjinin amino asitinin (CGG), triptofan amino asidine (TGG) dönüşmesine neden olmaktadır (48). Bu mutasyon sonucunda miyofosforilaz geninde daha önce bulunmayan bir StyI restriksiyon enzim tanıma

bölgesi oluşmakta ve bu değişim polimeraz zincir reaksiyonu restriksiyon parçacık büyüklük polimorfizmi (PCR-RFLP) yardımıyla belirlenebilmektedir (48). Sığırlarda glikojen depo hastalığı tip V, ilk olarak Kuzey Amerika'da yetiştirilen Şarole ırkı sığırlarda bildirilmiştir (48). Şarole sığırlarında glikojen depo hastalığı tip V'in klinik belirtileri genellikle birkaç haftalık veya birkaç aylık buzağılarda eksersize bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (48). Kas glikojen fosforilaz veya miyofosforilaz yetmezliği olarak da adlandırılan hastalık birkaç aylığa kadar olan buzağılarda görülmektedir (48). Hastalık homozigot hasta buzağılarda egzersiz intoleransı, kas ağrısı, tekrarlayan miyoglobini, kahve renkli idrar ve plazma kreatin kinaz seviyesinde artış ile kendini göstermektedir (10, 49). Benzer kalıtsal hastalık insanlarda McArdle' s hastalığı olarak adlandırılmakta ve hastalık kaslarda glikojenin glikoz-1-fosfat'a çevrilmesini sağlayan miyofosforilaz enziminin eksikliğine neden olmaktadır (48, 49).

2.10. BATTEN HASTALIĞI (SİNİRSEL KEROİD LİPOFUSİNOZ, NCLs)

Hastalık insanlarda, köpeklerde, Siyam kedilerinde, South Hampshire koyunları ve Avustralya Devon sığır ırkında görülen bir resesif lizozomal depolama hastalığıdır (50, 51). Vücut hücrelerinde intrasellüler boşlukta florosan lipopigment birikimi görülür (51). Lipopigment parçacıkları pankreas, karaciğer, böbrek ve beyin dokusundan izole edilir (50). Batten hastalığı, beyin dokusunda atrofi ve vücut sinir hücrelerinde floresan madde birikimi ve retinal atrofi ile teşhis edilir (50-53).

2.11. ALFA MANNOSİDOZİS

Angus, Galloway, Murray ve Brangus ırkı sığırlarda görülen, otozomal resesif kalıtım şekli gösteren kalıtsal bir hastalıktır (54). Hastalık Avustralya, İskoçya ve Kuzey Amerika'da bildirilmiştir (55). Hastalık, lizozomal alfa-mannosidoz geninde meydana gelen bir nokta mutasyonu sonucunda alfa-mannosidoz enziminin yetmezliğine sebep olan otozomal resesif lizozomal depo hastalığıdır (55). Hastalık, Angus, Murray ve Brangus ırklarında ilgili genin 961 numaralı nükleotidinde oluşan nokta mutasyonu sonucu, Galloway ırkı sığırlarda ise genin 662. numaralı nükleotidinde meydana gelen nokta mutasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (55-57). Hastalığın moleküler mekanizması ırklara göre farklılık göstermektedir (55). Meydana gelen mutasyon Angus, Murray ve Brangus ırklarında ilgili genin 961 numaralı timin nükleotidinin sitozine dönüşmesiyle lösin eksikliğine, Galloway ırkı sığırlarda ise genin 662 numaralı guaninin nükleotidinin adenin nükleotidine dönüşmesiyle histamin eksikliğine neden olmaktadır (56, 57).

Galloway ve Angus ırkı ile Angus ırkı türevleri olan Murray ve Brangus ırklarının İskoçya kökenli olduğu ve meydana gelen nokta mutasyonlarının İskoçya’da ortaya çıkıp, dünyanın diğer bölgelerine yayıldığı bildirilmiştir (25). Yeni Zelanda’da 1974 yılında kontrol programı öncesinde her yıl yaklaşık olarak 3000 Angus buzağının bu kalıtsal hastalıktan etkilenmiş olabileceği bildirilmiştir (25). Tollersrud ve arkadaşları tarafından (1997) sığır geninin 16 kb ağırlığında ve 24 ekzon uzunluğunda olduğu rapor edilmiştir (25). Hasta Angus buzağlarının büyük çoğunluğu canlı doğar, ancak bu buzağlarda başta titreme, ataksi ve sinirlilik gibi ve giderek şiddetlenen klinik semptomlar sonucunda felç ile bunu takiben ölüm şekillenir (25). Hasta Galloway buzağlarında ise semptomlar Angus’lardan daha şiddetlidir ve hasta buzağların çoğunda abort veya erken doğum görülür (55).

2.12. KASSEL HİPERTROFİ (MUSCULAR HYPERTROPHY)

Kas hipertrofi hastalığı, etçi sığır ırklarından Piedmontes ve Belçika Mavisi ırkı sığırlarda görülen ve otozomal çekinik kalıtım şekli gösteren kalıtsal bir hastalıktır (58). İskelet kaslarında görülen hipertrofinin ilk olarak bildirilmesi 1807 yılına kadar uzanır (58). Birçok sığır ırkında görülen ve “çift kashlık” olarak da isimlendirilen kas hipertrofisi başlangıçta değerli etlerin fazlalığından dolayı istenen bir özelliktir (58). Bozukluk sığır miyostatin geninde meydana gelen 11 bç’lik bir delesyon sonucu ortaya çıkmaktadır (59) Homozigot hayvanlarda, yaklaşık %20 oranında kas artışı ancak iskelet kasları dışında diğer tüm organların büyüklüğünde azalma görülmektedir (25, 60). Bu duruma neden olan gen yönünden homozigot olan hayvanların dişilerinde süt veriminde ve fertilitede düşüklük, homozigot erkeklerde ise solunum sistemi hastalıkları oranında artışa bağlı olarak üretici için ekonomik kayba neden olmaktadır (61).

2.13. ŞEDİAK-HİGAŞİ (CHEDIAK-HIGASHI) SENDROMU

Şediak-Higaşi sendromu, Japon Siyah sığırı, Hereford ve Brangus ırkı sığırlarda görülen, otozomal çekinik kalıtım şekli gösteren kalıtsal bir hastalıktır (62-64). Hastalık sığırlar dışında insanlarda, minklerde, kedilerde, farelerde ve tilkilerde de görülmektedir (64). Lizozomal bir bozukluk olan Şediak-Higaşi sendromu sığır karyotipinin 28. kromozomu üzerinde bulunan ve lizozomal taşımayı düzenleyen ve lizozomal sindirim ile ilgili LYST geninde meydana gelen bir mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (25, 65). Hasta hayvanlarda klinik olarak kısmi albinizm, enfeksiyona yatkınlık, pıhtı oluşumundaki bozukluk sonucu ortaya çıkan kanamalar görülmektedir (64, 65).

2.14. AKÇAAĞAÇ ŞURUBU İDRAR HASTALIĞI (MAPLE SYRUP URINE DISEASE, MSUD)

Hastalık ilk olarak 1980'li yıllarda Avustralya'da yetiştirilen Poll Hereford ırkı sığırlarda gözlenmiştir (6). Daha sonra Sorthorn ırkında da bu kalıtsal hastalığın görüldüğü bildirilmiştir (6). Hastalık sinirsel semptomlarla karakterize otozomal çekinik bir hastalıktır (66, 67). Hastalık ismini, hasta hayvanların idrarlarının akçaağaç şurubu kokusunda olmasından almaktadır (68). Hastalık, α -keto asitlerin metabolize edilmesinden sorumlu genin E1- α alt ünitesinin altı numaralı kodonunda bir sitozin bazının timin bazı ile yer değişmesiyle, arjinin kodonunun erken bir stop kodonuna dönüşmesine neden olan bir nokta mutasyon sonucu oluşur (32). Meydana gelen bu değişim, α -keto-asit dehidrojenaz enzim eksikliğine neden olmaktadır (33). Hastalık merkezi sinir sistemini etkileyerek; depresyona, bunu takiben komaya yol açarak hasta hayvanlarda 48-72 saat içinde ölüm ile sonuçlanır (25).

2.15. SPİNAL MUSCULAR ATROFİ (SMA)

Spinal muscular atrofi, İsviçre Esmeri sığır ırkında görülen otozomal çekinik bir kalıtsal hastalıktır (69). Hastalığa sebep olan gen sığır karyotipini 24. kromozomunun distal parçasındadır (7). Hastalık ABD ve Avrupa'daki İsviçre Esmerlerinde görülmektedir. Ancak Holştayn'larda görüldüğü bildirilmiştir (7). Hastalık, hasta hayvanlarda motorik fonksiyon kaybı, titreme, duruş bozukluğu gibi semptomlarla karakterizedir (69-71). Semptomlar doğumu takiben ilk 6 hafta içerisinde görülmeye başlar ve bunu takip eden birkaç hafta içerisinde de ölüm şekillenmektedir (25, 72). Hasta buzağılarda defekasyon, ürinasyon, iştah ve emme refleksi vardır (7). Çoğunlukla hasta buzağılar doğumu takiben ayağa kalkamazlar (7). Görülen semptomlar çoğunlukla beyaz kas hastalığının semptomlarına benzerdir (7). Hasta buzağılarda ölüm, semptomların ortaya çıkmasını takip eden 2-4 hafta içinde solunum kaslarındaki felçten kaynaklanmaktadır (36). Histopatolojik incelemede kas liflerinde atrofi, omurilikte aksonal dejenerasyon ve motor nöron kaybı görülür (36).

2.16. TİBİAL HEMİMELİA (DOĞUŞTAN TİBİA YOKLUĞU)

Tibial hemimelia, Galloway sığır ırkında görülen, otozomal, çekinik kalıtım şekli gösteren kalıtsal bir hastalıktır (73, 74). Sorthorn ırkı buzağılarda da benzer semptomlar görülmüştür (73) Hastalık tibia yokluğu, abodominal fıtık ve kranial kemiklerde defektlerle kendini gösteren multiple kongenital anomali sendromudur (25). Bu

sendromla doğan buzağların her iki tibialarında kısılma, malformasyon veya tibia kemiklerinin tamamen yokluğu görülür (25). Bu defektlerle doğan buzağlar ayağa kalkamaz ve doğumu takip eden kısa bir süre sonra buzağlar ölürlü (25).

2.17. SİNDAKTİLİ (SYNDACTYLY)

Sindaktili yeni doğan buzağlarda, fetal dönemde bir veya daha çok ayaktaki III. ve IV parmak kemiklerinin kaynaşması veya kısmen veya tamamen ayrılmaması ile karakterize kalıtsal bir bozukluktur (7, 25). Katır ayaklılık olarak da adlandırılan sindaktili birçok ülkede yetiştirilen Holşyan'larda dahil birçok ırkta bildirilmiştir (25). Bozukluk inkomplet penetrans gösteren monogenik resesif kalıtım gösterir ve sindaktili lokusu sığır karyotipini 15. kromozomunda lokalize olmuştur (75).

2.18. KONJENİTAL ERİTROPOETİK PORFİRİYA (CONGENITAL ERYTHROPOIETIC PORPHYRIA)

Sığırlarda görülen konjenital eritropoetik porfiriya, hemoglobinin yapımında kullanılan hem biyosentezindeki enzim yetmeliği sonucu oluşur (7). Sığırlarda bu kalıtsal bozukluğun moleküler temeli henüz belirlenmemiştir (25). Klinik olarak ışığa duyarlılık, yeni doğan buzağların kemiklerinde ve dişlerinde kahverengi renklilik, kronik hemolitik anemi ve büyüme geriliği görülür (25). Ayrıca hasta buzağlar güneşe çıktıklarında, derinin pigmentsiz alanlarında dermal nekroz, ve subepidermal su dolu keseciklerin oluştuğu görülür (7).

2.19. KALITSAL GUATR

Boynun önünde şişmeye sebep olan tiroit bezinin kalıtsal olarak büyümesi Afrikander sığır ırkında görülür (76). Otozomal resesif kalıtım yolu izleyen bu hastalık sığırlar dışında keçi ve insanlarda da bildirilmiştir (25, 76). Afrikander sığır ırkında kalıtsal guatr, tyrogobulin geninini 9. ekzonunda meydana gelen anlamsız bir mutasyon sonucu gelişir (25). Hasta hayvanlarda tyroglobulin seviyesinde azalma görülür (76).

2.20. KOMPLEKS VERTEBRAL MALFORMASYON (CVM)

Kompleks vertabral malformasyon (CVM), Holştayn sığırlarında görülen otozomal çekinik kalıtım şekli gösteren, öldürücü kalıtsal bir hastalıktır (77-81). Bu kalıtsal hastalık, sığır karyotipinin üçüncü kromozomunda bulunan UDP-N-asetilglukozamin tranporter proteinini kodlayan *SLC35A3* genin 559. nükleotid pozisyonunda bir guanin nükleotidinin timin nükleotid ile yer değişimine neden olan nokta mutasyonu sonucu

oluşmaktadır (78, 80, 82, 83). Bu mutasyon sonucunda *SLC35A3* proteininin 180. pozisyonunda bulunan valin amino asiti fenilalanine (V180F) dönüşür (23, 83, 84). *SLC35A3* geni altı ekzondan oluşmuştur (85). *SLC35A3*'den oluşan çözücü taşıyıcı enzim ailesi sitosol lümeninde endoplazmik retikulum (ER) ve golgi aygıtına nükleotid-şekerleri taşır (86, 87). Taşıma işleminde luminal toplanmayı sürdüren bir mekanizma bulunmaktadır (87). Hücre zarının geçirgen olmamasından dolayı nükleotid-şekerler sitozolde sentezlenir ve kullanılmadan önce aktif olarak taşınmak zorundadır (86). ER ve golgi aygıtında şeker zincirleri glikotransferaz enzimi kullanılarak glikoprotein, glikolipid ve uzun zincirli karbonhidrat moleküllerine sentezlenmektedir (86). Bu nedenle *SLC35A3*'den oluşan çözücü taşıyıcı enzim ailesi nükleotid-şeker taşıyıcıları (NSTs) olarak hastalık gelişiminde temel rol oynamaktadır (86).

2.20.1. Homozigot CVM'li Bireylerde Klinik Görünüm

Kompleks vertabral malformasyon, homozigot buzağılarda kompleks anomaliler, anterior ve posterior bacak eklem yerlerinde eklem sertliği ve sırt omurlarında birden çok deformasyonlarla karakterizedir (88). Kompleks vertabral malformasyon, embriyo ölümlerine, abortlara ve ölü doğumlara sebep olmaktadır (77, 80, 83). Bu kalıtsal hastalıkta çoğunlukla, kongenital büyüme yetersizliği, omurganın boyun ve sırt omurlarında kısalık, metakarpofalangeal ve metatarsfalangeal eklemlerinde yapışmalar, simetrik eklem sertliği, kafatasından kuyruk sokumuna kadar uzanan omurga dizisinin boyun ve sırt omurlarında birden fazla omurun anatomik olarak tam olmayışı, omurga kemerinin lateral eğriliği, omurga kemiklerinde yapışma ve ölü doğum ile karakterizedir (89, 90). Bu klinik belirtilerden en önemlisi ve embriyo için ölümcül olanı omurga kısalığıdır (12). Hastalıktan etkilenmiş embriyoların %50'sinde kalp anomalisi görülmüştür (85). Mutant allel yönünden homozigot fötusların yarısında çoğunlukla gebeliğin. 100 ila 260. günlerinde fötal ölüm şekillenmektedir (88). Bazı vakalarda 260. günde fötal ölümlerin şekillenmediği de bildirilmiştir (91). Bu hastalıktan etkilenen buzağılar nadirde olsa canlı doğabilmektedir (91). Ancak doğan yavruların yaşama şansları olmadığı ve şiddetli iskelet anomalileri gösterdikleri için insani sebeplerden dolayı bunlara ötanazi uygulanmaktadır (91). Bu kalıtsal hastalık yönünden heterozigot bireylerde her hangi bir klinik belirti görülmemektedir (83).

2.20.2. CVM'nin İlk Kez Belirlenmesi ve Yayılışı

Hastalık ilk olarak 1999 yılında Agerholm ve arkadaşlar tarafından Danimarka'da yetiştirilen Holştaynlar'da belirlenmiştir (78, 79, 85, 89). Daha sonra İngiltere, Çek Cumhuriyeti, Polonya ve Hollanda gibi Avrupa ülkelerinde CVM'li Holştayn buzağularının görüldüğü bildirilmiştir (81, 88, 90). Avrupa dışında ABD ve Japonya' daki Holştayn popülasyonunda CVM'ye neden olan mutant allelin varlığı bildirilmiştir (88, 90). Bu kalıtsal hastalık ilk olarak Danimarka'da belirlenmesine rağmen şu anda dünyada Holştayn yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede CVM'ye neden olan mutant allelin varlığı bildirilmiştir (92-95). Danimarka' da 1999 yılında suni tohumlamada kullanılan boğaların %31'nin, Japonya' da 2001 yılında taranan 40 boğanın %32,5' nin, ABD' de 2006 yılında incelenen 11868 hayvanın %17,76'sının, Almanya'da 2003 yılında incelenen 957 hayvanın %13,20'sinin ve İsveç'de 2004 yılında incelenen 228 hayvanın %23'inin CVM taşıyıcısı oldukları belirlenmiştir (83).

Tablo 2.1. Diğer ülkelerdeki Holştayn boğalar arasında CVM taşıyıcılarının sayıları ve görülme sıklığı.

Ülke	Test edilen boğa sayısı	CVM taşıyıcı boğa sayısı ve yüzdesi	Referans
Amerika	11868	2108 % 17.76	Holstein Association USA (2006)
Almanya	957	126 % 13.20	Konersmann et al. (2003)
İsviçre	228	53 % 23.00	Berglund et al. (2004)
Japonya	40	13 % 32.50	Nagahata et al. (2002)
Danimarka	-	- % 31.00	Thomsen et al. (2006)

Hasta yavruların pedigrileri incelendiğinde hepsinin 1974 yılında ABD'de doğan ve üstün verim özellikleri nedeniyle tüm dünyada suni tohumlama istasyonlarında yaygın olarak kullanılan Carlin-M Ivanhoe Bell isimli boğa ile akraba oldukları belirlenmiştir (23, 79, 83, 91, 93). Bell dünyanın her yerinde üstün sütçülük özellikleri nedeniyle süt sığırcılığında yaygın olarak kullanılmıştır ve onun kızlarının süt verimi bundan etkilenmiştir (90). Bu boğanın pedigrisi incelendiğinde, CVM dışında yine Holştayn'larda önemli verim kayıplarına sebep olan BLAD kalıtsal hastalığına neden olan mutant allelide taşıdıkları belirlenmiştir (1, 2, 81, 85, 96).

Kompleks vertabral malformasyon bozukluğu yönünden taşıyıcı ve normal bireylerin fenotipik olarak birbirlerinden ayrılması mümkün değildir. Homozigot durumda yavru kayıplarına neden olabilen CVM gibi resesif bozukluklardan sorumlu mutant allellerin popülasyona yayılmasını kontrol etmek, ancak klinik olarak normal görünen taşıyıcı bireylerin doğru olarak belirlenmesine imkân veren moleküler genetik yöntemlerle mümkündür.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. HAYVAN MATERYALİ

Araştırmanın materyalini Kayseri civarında halk elinde yetiştirilen 150 baş Holştayn ırkı inek oluşturmuştur. Çalışmada kullanılmak üzere DNA izole edilmek için gerekli kan örnekleri Kayseri'nin Bünyan ve Develi ilçelerinde süt sığır yetiştiriciliği yapan işletmelerde yetiştirilen damızlık dişi hayvanlardan alınmıştır.

3.2. KAN ALMA

Hayvanlara ait kan örnekleri, 10 ml'lik EDTA'lı vakumlu tüplere, steril ve tek kullanımlık iğneler ile Vena Jugularis'den steril olarak alınmıştır. Alınan kan örneklerinde hemoliz oluşumunu ve pıhtılaşmaları önlemek için kanların alındığı EDTA'lı tüpler arada alt üst edilerek karıştırılmıştır. Her hayvandan birer tüp kan alınarak soğuk zincirde laboratuara getirilmiştir. Laboratuarda kanlar ilk olarak 3000 devirde 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, steril ve tek kullanımlık cam pastör pipetleri kullanılarak kan tüpün orta kısmında toplanmış olan lökosit tabakası alınarak 1,5 ml'lik steril tüplere konulmuştur. Daha sonra içinde lökosit bulunan bu tüpler -20°C de DNA izolasyonuna kadar saklanmıştır.

3.3. DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu için fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak, -20°C de dondurularak saklanmış lökosit bulunan tüpler eritilmiştir. Eritilmiş lökosit bulunan tüplerden, steril 1,5 ml'lik ependorf tüplerine otomatik pipet yardımıyla 100µl lökosit konulmuştur. Ependorf tüpüne konulan lökosit üzerine 300µl 1 X TNE solüsyonu, 30µl Tris-HCl (pH 8), 5µl proteinaz K (10mg/ml) ve 10µl %20'lik SDS solüsyonu eklenerek karışım vorteksle iyice karıştırılmıştır. Daha sonrada karışım 50°C'lik etüvde bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün etüvden çıkarılan örnekler üzerine 445µl fenol eklenerek 10 dk. hafifçe sallanarak karıştırıldıktan sonra, karışım 3000 devirde 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üsteki sıvı kısım otomatik pipet yardımıyla yeni bir steril ependorf tüpüne konulmuş ve üzerine 445µl fenol-kloroform karışımından eklenmiştir. Karışım tekrar 10 dk. alt üst edilerek karıştırılmış ve sürenin sonunda tüpler 3000 devirde 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda yine üsteki sıvı kısım dikkatlice, alttaki kısmı karışmayacak şekilde alınarak başka bir steril etiketli ependorf tüpüne konulmuştur. Alınan bu sıvının üzerine 445µl kloroform-izoamil alkol ilave edilerek tekrar 10 dk. alt üst edilip karıştırılmıştır. Sonra, 3000 devirde 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda yine üsteki sıvı kısım otomatik pipet yardımıyla dikkatlice alttaki kısmı karışmayacak şekilde alınarak başka bir steril etiketli ependorf tüpüne konulmuştur. Alınan sıvı kısmın üzerine -20°C de saklanan %100'lük saf etil alkol'den 890 µl eklenmiştir. Etil alkol eklendikten sonra ependorf tüpleri DNA iplikçikleri kümeleşinceye kadar 4-5 kez hafifçe aşağı yukarı hareket ettirilmiştir. Kümeleşen DNA iplikçiklerinin tüplerin diplerine çökmesi için tüpler 10000 devirde 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstteki alkol uzaklaştırılarak tüplerin dibine çökmüş olan DNA peletlerinin üzerine %70'lik etil alkol'den 890 µl eklenmiştir. Tekrar 10000 devirde 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda yine tüpün üstündeki alkol dökülerek uzaklaştırılmıştır. Tüplerin içindeki alkolün tamamen uzaklaşması için tüpler etüvde kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kuruyan ve içinde DNA bulunan tüplerin üzerine 100µl TE buffer (10mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) konulmuştur. Tüplerin içerisindeki DNA peletinin çözülmesi için bir gece buzdolabında bekletilmiştir. Ertesi gün DNA izolasyon işleminin başarılı olup olmadığının kontrolü için örneklerden 2µl alınarak %0,5'lik agaroz jelde 15 dk. elektroforez yapılmıştır. Elektroforez sonunda, eğer DNA izolasyonu başarılı olmuş ise Kodak Gel Logic 200 Imaging System® ile örneklerin yüklenmiş olduğu kuyucuklarda jelde floresan parıldaama gözlenmiştir.

Daha sonra DNA elde edilen örnekler polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılmak için +4°C de saklanmıştır.

3.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanış Formülleri;

1 X TNE (Toplam 30ml)

1,5 ml Tris-HCl pH 8

3 ml 1 M NaCl

300 µl 0,5 M EDTA pH 8

25,2 ml bidistile su

Tris-HCl pH 8 (1L)

12,1 g Tris

800 ml distile su

HCl ile pH ayarlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanır.

3.4. KULLANILAN PRİMERLER ve POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Mutant CVM allelini belirlemek için yapılmış olan polimeraz zincir reaksiyonunda primer olarak Kepenek tarafından bildirilen (96) CVMF1: 5'-CACAATTTGTAGGTCTCACTGCA-3'; CVMR1: 5'-CGATGAAAAAGGAACCAAAAAGGG-3', olacak şekilde bir primer seti kullanılmıştır. Primerler liofilize olarak satın alınmıştır. Bu primerler kullanılarak yapılan PCR sonunda 233 bp uzunluğunda tek bir PCR ürünü elde edilmiştir. PCR işlemi toplam hacmi 25,4 µl olacak şekilde 10'ar tüplük PCR karışımı; 14,3 µl dH₂O, 5,4 µl MgCl₂ 2 µl 10 x PCR buffer, 2 µl dNTP, her primerden 0,4 µl (20 nmol), 0,8 µl genomik DNA, 0,1 µl Taq polimeraz enzimi (5 U/ µl) hazırlanan karışımla yapılmıştır. Hazırlanan bu karışımdan her bir örnek için 25,4 µl alınarak daha önce etiketlenerek buz üzerine yerleştirilen diğer 0,2 ml'lik ependorf tüplerine dağıtılmıştır. Hazırlanan PCR stok karışımı 0,2 ml'lik ependorf tüplerine dağıtıldıktan sonra incelenecek örneklerle ait genomik DNA'dan 2,6 µl ilave edilerek her örnek için toplam 28 µl'lik PCR karışımı hazırlanmıştır. Her bir örnek için hazırlanan PCR karışımları otomatik pipetle ayrı ayrı 2-3 kez pipete edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra ependorf tüplerinin kenarlarına

yapışmış olan kısmı dibe çöktürmek için kısa bir santrifüj yapılmıştır. Kayseri ve civarında yetiştirilen Holştayn'larda CVM allelinin varlığının aranması için yapılan PCR işleminde 150 baş damızlık dışı Holştayn incelenmiştir.

Çalışma kolaylığı nedeniyle PCR işlemi her seferinde 20 örnekle yapılmıştır. Buz üzerinde hazırlanan PCR karışımı, 94 °C'ye kadar ısıtılan ısı düzenleme aletine yerleştirilmiştir. Kapak kapatıldıktan sonra PCR işlemi başlatılmıştır.

Holştaynlarda CVM mutant allellerinin PCR ile belirlenmesi işleminde, hazırlanan ve 0,2 ml'lik ependorflara dağıtılan PCR karışımları önce 95 °C de 10 dk. tutulmuştur. Bu süre sonunda her bir döngüsü;

95 °C 30 saniye

56 °C 1 dakika

72 °C 30 saniye,

olacak şekilde üç farklı ısı derecesinde tutulacak şekilde 30 döngü yapılmıştır. Son döngüden sonra örnekler, 72 °C de 10 dk. tutularak PCR işlemi tamamlanmıştır. Isı düzenleme aletinden çıkarılan PCR ürünleri kısa bir süre santrifüj yapılmıştır. Daha sonra, doğrudan elektroforez uygulanarak PCR'nin başarılı olup olmadığı kontrol edilmiştir. PCR'nin başarılı olduğu PCR ürünleri restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesme işleminde kullanılmak üzere 4 °C de saklanmıştır.

3.5. ELEKTROFOREZ

Elektroforez işleminde tampon çözeltisi olarak Tris-Borat-EDTA (TBE) kullanılmıştır. Kullanılan elektroforez çözeltisi önce 5 X yoğunlukta stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok solüsyonu elektroforez tankında ve jel hazırlamada 1 X oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Elektroforez çözeltisi stok olarak 5 X hazırlanırken; 54 g Tris base; 27,5 g Borik asit; 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 1 litre distile suda çözdürülmüş ve hazırlanan karışım koyu renkli şişelerde oda ısısında saklanmıştır. Kullanılacağı zaman alınan bir ölçek stok solüsyonu, distile su ile beş katı sulandırılarak kullanma solüsyonu hazırlanmıştır. Bu kullanma solüsyonu hem jelin hazırlanmasında hem de elektrolit çözeltisi olarak kullanılmıştır. Jelin hazırlanması için 35 ml, elektrolit çözeltisi olarak da 300 ml 1 X TBE kullanma çözeltisi kullanılmıştır. Elektroforez tankında bulunan elektrolit solüsyonu, elektroforez işlemi sırasında

elektrolit çözeltisinde köpürme ve bantların görüntü kalitesinde düşme olduğunda 7-8 elektroforez denemesinden sonra çözelti değiştirilmiştir.

3.5.1. Jel'in Hazırlanması

Çalışmada, jel PRONA® Basica le agaroz kullanılmıştır. Jel, PCR işleminde %2 RFLP ürünlerinin gözlenmesinde ise %4'lük yoğunlukta hazırlanmıştır. Bu amaçla PCR için 0,7 g agaroz, RFLP için 1,4 g agaroz tartılarak 250 ml'lik erlenmayere konulmuştur. Tartılan agarozun üzerine 35 ml 1 X TBE çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan karışımın homojen bir jel olması için karışım mikro dalga fırında tamamen saydamlaşınca kadar ısıtılmıştır. Daha sonra şeffaflaşan jel üzerine 0,5 µl/ml oranında ethidium bromide katılmıştır. Ethidium bromide'in jel içine homojen dağılmasını sağlamak amacıyla karışım hafifçe karıştırılmış ve erlenmayer el yakmayacak kadar soğutulmuştur.

3.5.2. Jel'in Dökülmesi

Çalışmada, elektrotları arasındaki uzaklık 10 cm olan Owl® marka elektroforez tankı kullanılmıştır. Jel, boyutları 9 x 8 x 0,5 cm olan ve ultra-viyole ışık geçiren jel teknesine dökülmüştür. Örneklere ait DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonunda elde edilmesi hedeflenen 233 bp'lik tek bandın varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan ilk elektroforez sonunda 233 bp'lik bandın görüldüğü PCR ürünleri belirlenerek *EcoT22* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Jel tekneye, hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldükten sonra jel tarağı jele yerleştirilmiş ve jelin katılaşması beklenmiştir. Eğer jelde hava kabarcığı kalmışsa, kullanılmamış steril bir pipet ucuyla bu hava kabarcığı jelin taraktan en uzak tarafına doğru çekilerek örneklerin yükleneceği kuyulardan uzaklaştırılmıştır. Tekneye dökülen jelin şeffaf olan görünümünün opak görünüme dönüşmesiyle jelin katılaştığı anlaşılmıştır. Tarak, katılaşan jeli yırtmadan dikkatlice çıkarılmış ve jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel tanka yerleştirildikten sonra tanka, jelin üstünü tamamen örtecek kadar elektrolit çözeltisi eklenmiştir.

3.5.3. Kuyulara Örneklerin Yüklmesi

PCR sonunda elde edilen ürünler kuyulara yüklenirken önce 1 cm eninde, 3,5 cm uzunluğunda parafilm kesilmiş ve parafilm üzerine kuyulara yüklenecek örnek sayısı kadar yükleme çözeltisi (loading buffer), her örnek için 0,5 şer µl olacak şekilde otomatik pipetle konulmuştur. Parafilm üzerine konan 0,5 µl yükleme çözeltisinin

üzerine örneklere ait PCR ürünlerinden 3,5 µl eklenerek otomatik pipetle karıştırılarak kuyulara yüklenmiştir. En son kuyuya da PCR ürünlerinden elde edilecek bantların belirlenmesi için 100 bç'lik (MBI Fermentas® SMO241) standart DNA merdiveni (DNA Ladder) yüklenerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. Elektroforez, 35 dakika 80 volt elektrik gerilimi uygulanarak yapılmıştır. Jelde ki örneklerin ilerleyişleri izlenerek sürenin sonunda elektroforez bitirilmiş ve tanktaki jel, teknesi ile birlikte tanktan çıkarılarak ultra-viyole (UV) ışık veren jel görüntülenme sehpasında incelenmiştir.

3.6. BANTLARIN GÖZLENMESİ VE FOTOĞRAF ÇEKİLMESİ

Ethidium bromide ile boyanan DNA molekülü UV ışıkta, floresan yansıma göstermiştir ve bu yansımanın görülmesiyle PCR sonunda aranan bantların varlığı kanıtlanmıştır. Elektroforez sonunda jel teknesi, üzerindeki jel ile birlikte tanktan alınarak jel görüntülenme sehpasına konulmuştur. Sehpanın UV ışığı açılarak, önce aranan 233 bç uzunluğundaki tek bant jelde görülmüş ve sonra bantların bulunduğu jelin fotoğrafı çekilmiştir. Fotoğraf çekimi Kodak Gel Logic200 Imagine görüntüleme sistemi ile yapılmıştır. PCR örneklerinin elektroforezi sonunda PCR'ın başarılı olduğu örneklerden 233 bç'lik tek bant elde edilmiştir. Bu tek bantın elde edildiği örneklere ait PCR ürünleri daha sonra *EcoT22* endonükleaz enzim ile kesilerek, örneklerin CVM durumlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.7. *ECOT22* ENDONÜKLEAZ ENZİMİ İLE PCR ÜRÜNLERİNİN KESİLMESİ

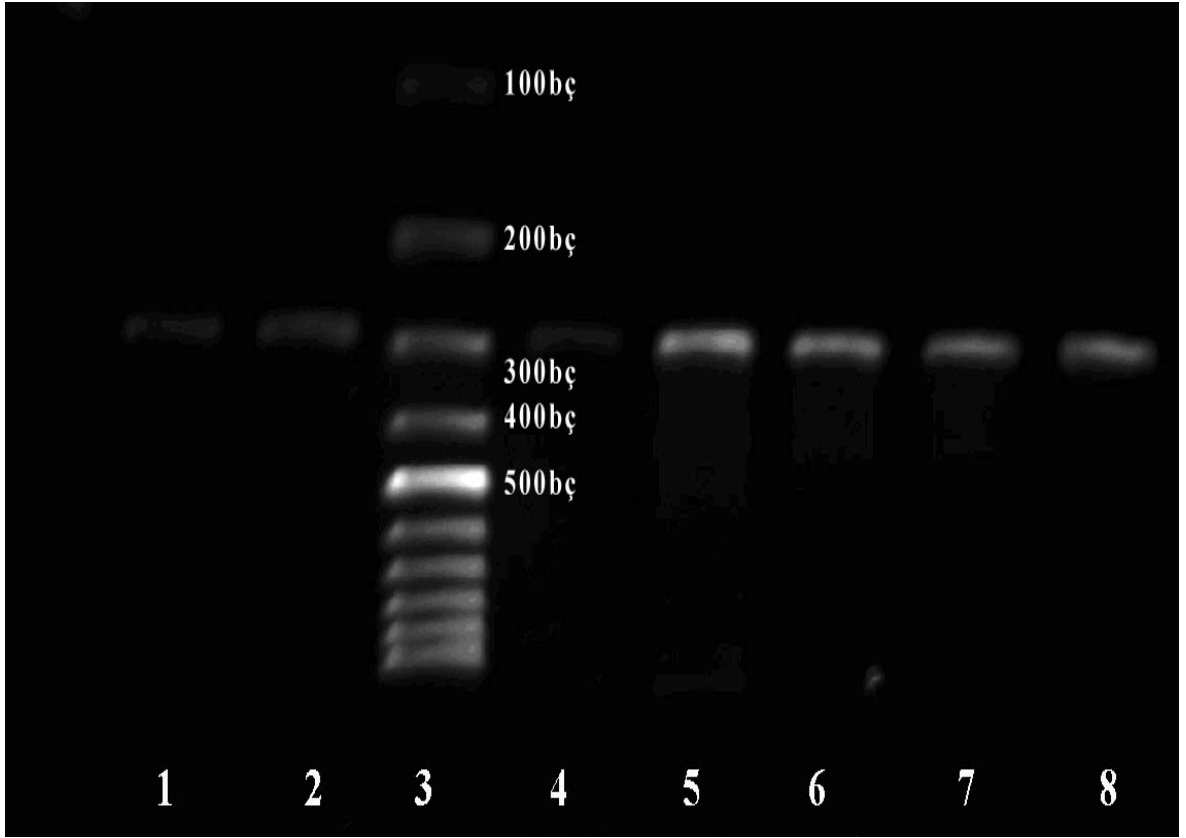
PCR sonunda 233 bç'lik bantların elde edildiği örneklere ait PCR ürünleri *EcoT22* restriksiyon endonükleaz enzim ile kesilmiştir. Kesim işlemi örnek başına 9 µl dH₂O, 1,5 µl enzim tampon solüsyonu ve 0,5 µl *EcoT22* endonükleaz enzimi konarak hazırlanan karışım üzerine 5 µl PCR 233 bç'lik bant veren PCR ürünü eklenerek yapılmıştır. Restriksiyon enzimi ile kesme işlemi de her seferinde 20 örnek işlenecek şekilde bir buz üzerinde yapılmıştır. Bu amaçla etiketlenmiş olan 0,2 ml'lik ependorf tüpleri buz üzerine yerleştirilmiştir. Her bir örnek için gerekli olan restriksiyon karışımı buz üzerindeki ependorfların birinde hazırlanıp diğer etiketli ependorflara 20'şer µl dağıtılmıştır.

Etüve yerleştirilen örnekler +37 °C'de bir gece bekletilmiş ve sürenin sonunda restriksiyon enzimini inaktive etmek amacıyla karışım etüvde +65 °C'de 20 dakika tutularak kesim işlemi sonlandırılmıştır.

İşleminin sonunda örneklerde tekrar yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan jelde elektroforez yapılmıştır. Bu son elektroforezde, homozigot normal bireylerde 233 bç'lik tek bant, homozigot hasta bireylerde 233, 212 bç'lik iki bant, taşıyıcılarda ise 233, 212 ve 21 bç'lik üç bantın görülmesi amaçlanmıştır. Elektroforez sonunda jelin fotoğrafı çekilerek sonuçlar kayıt edilmiştir.

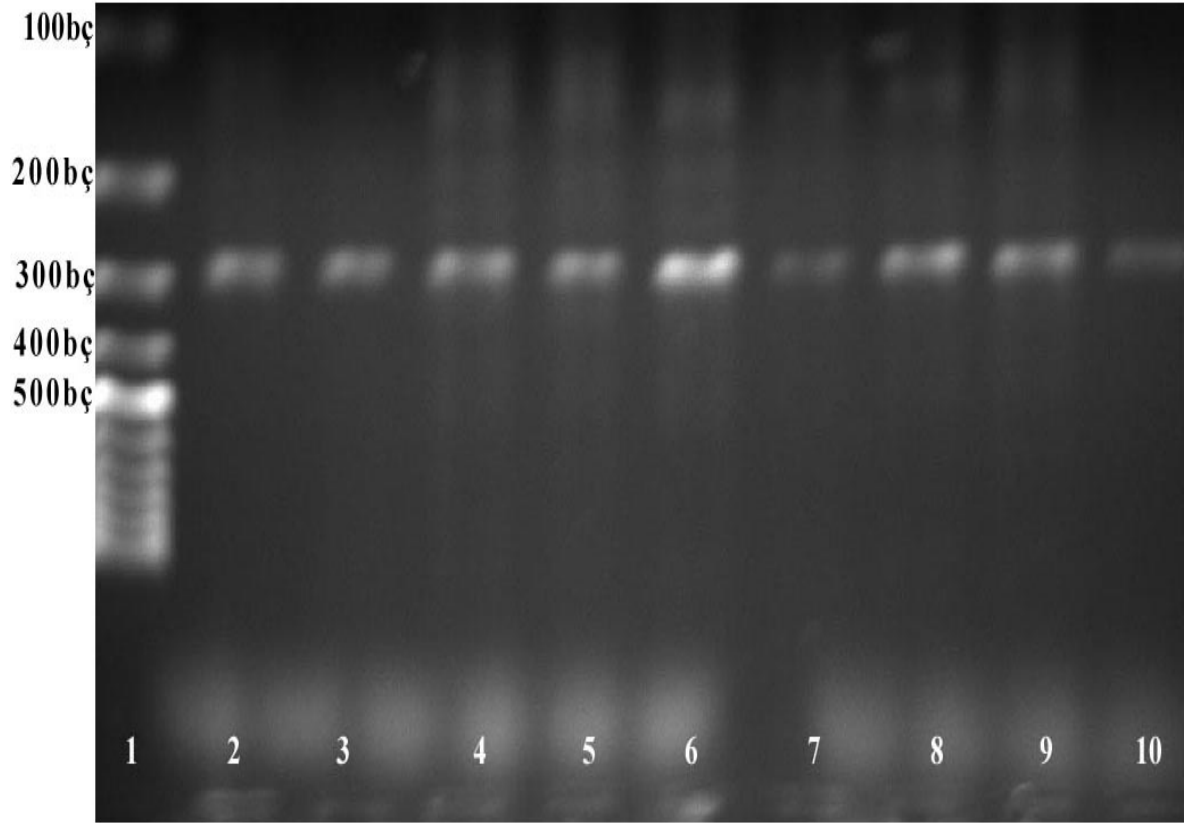
4. BULGULAR

Çalışmada incelenen 150 baş damızlık dişi Holştayn örneklere ait DNA'lar, incelenen bireylerden alınan kan örneklerinde fenol-kloroform yöntemi ile başarı bir şekilde izole edilmiştir. DNA izolasyonunun başarısı önce %0,5'lik agaroz jelde elektroforezinde DNA'nın olup olmadığının kontrolü yapılmıştır. Yapılan 15 dakika elektroforez sonunda jeldeki etidyum bromid ile birleşen DNA'ların floresan parıldama vermesi ile DNA izolasyonunun başarısı doğrulanmıştır. İncelenecek örneklere ait kan numunelerinden izolasyonu yapılan DNA'lar kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır. Yapılan PCR sonunda elde edilen ürünlerin % 2'lik agaroz jel elektroforezlerinde 233 bp'lik tek bandın görülmesi ile PCR'nin başarısı doğrulanmıştır. Elde edilen 233 bp'lik bantlar elektroforez sonunda, jelin ultraviyole ışık veren jel görüntüleme sehpası üzerine konulduğunda çıplak gözle kolaylıkla saptanmıştır. Daha sonra 233 bp'lik PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezlerinin fotoğrafları çekilmiştir. PCR sonunda elde edilen ürünlerinin büyüklüğü 233 bp uzunluğundadır. Bu büyüklükteki PCR ürünleri en iyi görüntüyü %2'lik agaroz jelde verdiği için PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Yapılan elektroforez sonucunda kullanılan örneklere ait 233 bp'lik bantlar Resim 1'de görülmektedir.



Resim 4.1. 1,2, 4-8: PCR ürünleri, 3: 100 bç'lik DNA merdiveni

Elde edilen PCR 233 bç'lik ürünlerinin *EcoT22* restriksiyon endonükleaz ile kesilmesi sonunda incelenen bireylere ait PCR ürünlerinin hiç birinin bu enzim ile kesilmediği ve taşıyıcı bireylerde görülmesi beklenen 233, 212 ve 21 bç'lik üç bant görülmemiştir. Tüm bireylerde homozigot normal bireylerde görülen 233 bç'lik tek bant görülmüştür (Resim 2). Bu sonuçla incelenen tüm bireylerin homozigot normal olduğu belirlenmiştir.



Resim 4.2. 1: 100 bç'lik DNA merdiveni, 2-10: 233 bç'lik homozigot normal bireylere ait *EcoT22* enzim kesim ürünleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir süt sğrclığı işletmesinde karlılık, işletmede bulunan damızlık hayvanların 305 gün sağılması ve her bir hayvandan yılda bir yavru alınması ile sağlanabilir. Bu nedenle işletmede karlılığı engelleyecek enfeksiyonlar, metabolik hastalıklar, beslenme hastalıkları ve kalıtsal hastalıklar damızlık olarak seğilecek hayvanlarda seğimden önce belirlenerek erken müdahale ile nlenmeleri önemlidir. Özellikle kalıtsal hastalıklar yönünden damızlık adaylarının genetik durumları, bu bireyler henüz yavru iken hatta embriyonal aşamada belirlenmesi damızlık seçiminde zaman kaybının önüne geçilmesinde yardımcı olabilir. Türkiye’de verim kayıplarına neden olan sebepler arasında yetiştiriciler ve veteriner hekimler tarafından en az bilinenler kalıtsal bozukluklardır. Gelişmiş ülkelerde erkek damızlık adayları, kendi ırklarında en yaygın görülen kalıtsal hastalıklar gz önünde tutularak taranıp, damızlık kataloglarına bu kalıtsal bozukluklar yönünden genetik yapıları kaydedilir. Ancak Türkiye’de kalıtsal bozukluklar hakkında sadece konu ile ilgili çalışmaları olan araştırmacılar bilgi sahibidir. Türkiye’de enfeksiyonlar ve beslenme bozuklukları ile karşılaştırılınca kalıtsal bozuklukların sebep oldukları verim kayıpları göz ardı edilmektedir. Bir gende meydana gelen mutasyon yavrunun ölümüne veya dl tutma problemlerine neden olarak dl verimini düşürebilir. Bazı durumlarda veteriner hekim müdahalesi ile mutasyondan

etkilenmiş yavrular bir yıla kadar yaşayabilirler ancak bu yavrular için yapılacak sağlık harcamaları işletme için ekonomik kayba neden olur. Genel olarak çiftlik hayvanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olan kalıtsal bozukluklar resesif otozomal kalıtım yolu izlerler. Bu nedenle bir mutasyon yönünden taşıyıcı bireylerin; hasta yavruların doğmalarına neden olabileceği göz önüne alınarak taşıyıcıların belirlenerek yetiştirme programlarından çıkartılmaları gereklidir (26).

Modern süt sığırı yetiştiriciliğinde yüksek genetik değere sahip az sayıdaki seçkin boğadan elde edilen spermaların uluslar arası ticareti üzerine kurulmuş ıslah programları tüm dünyada artış göstermektedir. Suni tohumlama ve multiple ovulasyon ile elde edilen ovumların in vitro veya in vivo fertilizasyon yöntemleri sonucu elde edilen embriyoların transferleri gibi gelişmiş üreme teknolojilerinin yaygın kullanılması sonucu tek bir boğa tüm dünyada doğan binlerce buzağının babası olabilmektedir. Süt sığırı yetiştiriciliğinde uygulanan genetik iyileştirme programlarının yardımıyla entansif yetiştiriciliğin yapıldığı ülkelerdeki sağmal sığır popülasyonlarında laktasyon başına ortalama süt veriminde önemli ölçüde iyileştirme elde edilmiştir. Yapılan genetik iyileştirme ve seleksiyon çalışmalarının bu avantajlarının yanında, damızlık bir bireyde ortaya çıkarak döl tutma problemlerine yada yavru kayıplarına sebep olarak mutant allellerin frekansının popülasyon içinde hızla artmasına da neden olabilmektedir. Bazen kızlarının verimlerinin üst düzeyde olmasından dolayı ıslah çalışmalarında spermaları suni tohumlamada yaygın olarak kullanılan boğaların, mutasyona uğramış alleli yönünden taşıyıcısı olmaları olasıdır. Kalıtsal kusurlar yönünden taşıyıcı olan boğalar fenotipik olarak normal olmalarına rağmen, kalıtsal kusurların yayılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır.

Holştayn yetiştiriciliğinde sığır lökosit bağlanma yetmezliği (BLAD) ve üridin monofosfat senteaz yetmezliği (DUMPS) gibi kalıtsal hastalıkların canlı yavru elde edilmesini önlediği 1990'lı yılların başında fark edilmiştir (29). Bu kalıtsal bozuklukların belirlenmesinden sonra yine Holştayn ırkında Sitrulinemia ve Faktör XI yetmezliği gibi kalıtsal bozuklukların bulunduğu belirlenmiştir (29). Hayvancılıkta ilerlemiş Avrupa ülkelerinde ve ABD'de hayvansal üretimi olumsuz yönde etkileyen bu kalıtsal bozuklukları taşıyan bireylerin belirlenerek sürüden ayıklanmasına yönelik çalışmalar 1980'li yılların sonundan beri yapılmaktadır. Ancak sığır yetiştiriciliğinde önemli kayıplara neden olan CVM, BLAD ve DUMPS gibi kalıtsal bozuklukların bir

çoğu resesif kalıtım yolu izlemeleri nedeniyle, eldeki sürüde bu kalıtsal hastalıklar yönünden taşıyıcıların en etkili yöntemle belirlenerek sürüden uzaklaştırılmaları önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu da son yıllarda geliştirilen ve DNA elde edilmesi için bir damla kan, dışkı veya kıl kökü kullanılarak yapılan moleküler genetik metotların veteriner hekimlikte kullanılmaya başlanması ile kolaylaşmıştır (6).

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde, yetiştiriciliği yapılan türlerde ve ırklarda görülen genetik bozuklukların yaygınlığı önemli ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Sığır yetiştiriciliğinde, kalıtsal hastalıklar yetiştiriciliğin karlılığını düşüren önemli konulardan biridir. Yetiştirmede kullanılan hayvanlarda görülecek anormal anatomik yapılar veya düşük verime neden olacak kalıtsal hastalıkların negatif etkileri nedeniyle, yetiştiriciler ve yetiştirici birlikleri tarafından bir ülkedeki mevcut damızlık popülasyonunda bu tür verim kayıplarına neden olan genlerin etkilerinin kontrol altında tutmaları gerekir. Örnek olarak, bir kalıtsal hastalık olduğu 1980'li yılların sonunda belirlenen BLAD'ın ABD ekonomisine yıllık kaybının beş milyar dolar olduğu bildirilmiştir (1). Bu nedenle kalıtsal hastalıkların sebep oldukları verim ve ekonomik kayıpların en aza indirilmesi için taşıyıcıların kesin ve doğru olarak kısa sürede belirlemeye imkân veren yöntemlerin geliştirilmesi gereklidir. Moleküler genetik analizler alanında yapılan ilerlemeler doğumda veya yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkabilecek anomalilere neden olan mutasyonların belirlenmesine yardım edebilmektedir. Bu sayede kalıtsal kusurların popülasyon içerisinde hızla yayılmasına neden olan taşıyıcı damızlıkların kesin olarak belirlenerek hasta yavru doğması engellenebilir. Moleküler genetik yöntemler kalıtsal bozuklukların belirlenmesinde çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde bozukluğa neden olan lokusun belirlenmesini sağlayarak kalıtsal kusurların azaltılması ve mutant allellerin popülasyondan uzaklaştırılmasına yardım edebilir. Süt sığırcılığında en yaygın kullanılan Holştayn ırkı sığırlarda BLAD kalıtsal bozukluğun moleküler temeli ilk kez Kehrli ve arkadaşları tarafından 1992 yılında belirlenmiştir (1). Yine 1992 yılında Shuster ve arkadaşları bu kalıtsal hastalık yönünden taşıyıcı bireylerin belirlenmesini sağlayan bir restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism-RFLP) yöntemi geliştirmiştir (1). Yine Avrupa ve ABD'de yetiştirilen Holşyanlarda 1990'lı yıllarda önemli kayıplara neden olan DUMPS için Schwenger ve arkadaşları ilk olarak 1994 yılında DNA örnekleri kullanarak Holştayn sığırlarının DUMPS yönünden genotiplerinin belirlenmesine olanak sağlayan bir RFLP metodu geliştirmiştir (29).

Kalıtsal kusura neden olan genlerin tarandığı, normal ve taşıyıcı bireylerin belirlendiği durumlarda mevcut damızlıklar arasındaki çiftleştirmeler planlanabilir veya taşıyıcılar yetiştirmeden çıkarılabilir. Kalıtsal bozuklukların çoğunun Mendel Kalıtım yolu izleyen bir veya iki lokustan kaynaklandığı bildirilmektedir (97). Sığırlarda Mendel kalıtım şekli gösteren yaklaşık 300 kalıtsal bozukluğun çok azının genetik nedeni belirlenmiştir (97). Birçoğunun kalıtım şekli bilinmesine rağmen bu kalıtsal bozukluğa neden olan mutant allel henüz belirlenememiştir (3).

Holştayn ırkı sığırlarda görülen kompleks vertabral malformasyon (CVM) kalıtsal bozukluğu ilk olarak 1999 yılında Agerholm ve arkadaşları tarafından Danimarka'da yetiştirilen Holştaynlar'da belirlenmiştir (12, 78, 79, 85, 89). Bu kalıtsal hastalık Danimarka'da belirlenmesinden sonra, Amerika Birleşik Devletlerinde (98), İngiltere'de (99), Hollanda'da (100) ve Japonya'da (92) bildirilmiştir. Golgi aygıtına anormal nükleotid-şeker taşınmasına neden olan *SLC35A3* geninin 559. nükleotid pozisyonunda G→T değişimine neden olan bir nokta mutasyonu sonucu oluşmaktadır (90). Bu kalıtsal bozukluğa neden olan mutant allel kızlarının yüksek süt verim performansından dolayı tüm dünyada yaygın olarak kullanılan Osborndale Ivanhoe isimli boğada belirlenmiştir (90). Yüksek süt verimi nedeniyle gerek bu boğanın gerekse bu boğanın oğullarının suni tohumlamada yaygın olarak kullanılmaları sonucu CVM'ye neden olan mutant allel tüm dünyaya yayılmıştır (90). Bu boğanın CVM taşıyıcılığı belirlenene kadar yüksek veriminden dolayı hastalık taşıyıcısı olduğu ispatlanmadan önce, spermelerinin dünyada yaygın olarak kullanılması CVM hastalığının tüm dünyaya yayılmasında etkili olmuştur (85). Schütz ve ark. (2008) tarafından Almanya'da 1995 den 2007 yılları arasında yetiştirilen 25753 baş inek CVM ve BLAD yönünden incelenmiş ve incelenen hayvanların 2489 başının CVM taşıyıcısı olduğunu belirlemiştir (85).

Çalışmada kullanılan örneklerle ait DNA'lar fenol-kloroform yöntemi ile kolay ve kısa sürede izole edilmiştir. Çalışmada DNA izolasyonu için 100 µl lökosit kullanılmıştır. Bu durum DNA izolasyonunda çıkabilecek olası sorunlar karşısında geriye dönülerek tekrar DNA izolasyonuna olanak vermektedir. Ayrıca bu yöntem ile DNA izolasyonunda az miktarda sarf malzemesi kullanılmaktadır. Bu da kullanılan DNA izolasyonunun üstünlüğü olarak görülmüştür. Fenol-kloroform yöntemi ile yapılan DNA izolasyonu ticari DNA izolasyon kitleri ile karşılaştırıldığında daha ucuzdur.

Ancak, bu çalışmada kullanılan DNA izolasyon yöntemi dört aşamada yapılmakta ve her aşamada 1,5 ml'lik yeni, etiketli steril plastik tüplerin kullanılmasını gerektirmektedir. Etiketli yeni steril plastik tüplerin hazırlanması zaman ve işçilik gerektirmektedir. Bu durum yöntemin tek olumsuz yönü olarak görülmesine karşılık; yöntemin kolay uygulanabilirliği, ucuzluğu ve kısa sürede tamamlanması avantajlı yönleri olarak görülmüştür.

Birçok kalıtsal hastalığın kalıtım şeklinin resesif kalıtım yolu izlediği artık bilinmektedir (79). Holştayn'larda CVM resesif kalıtım şekli gösterdiğinden bu kalıtsal bozukluğun yayılmasında heterozigot damızlıkların rolü çok önemlidir. Heterozigot bireyler herhangi bir klinik belirti göstermeden yaşamlarını popülasyon içinde normal olarak sürdürürler. Heterozigot bireyin mutant alleli bir sonraki jenerasyona geçirme olasılıkları % 50'dir. Bu nedenle taşıyıcı bireylerin belirlenerek damızlık sürülerden uzaklaştırılması CVM'ye neden olan mutant allelin popülasyondan eradikasyonu için gereklidir. Holştayn yetiştiriciliğinde CVM'ye neden olan mutant allele sahip inek ve boğalar yetiştirme programlarından çıkartılırsa, yine Holştayn'larda görülen sığır lökosit bağlanma yetmezliğinin (BLAD) Holştayn popülasyonlarında başarılı bir şekilde eradike edilmesindeki gibi CVM'ye sebep olan mutant allel de Holştayn popülasyonlarından uzaklaştırılabilir. Ancak BLAD ve CVM'ye sebep olan mutant genler Holştayn sığırlarında yüksek süt verimi gibi süt sığırcılığı için istenen özellikleri belirleyen genlerle bağlı bulunmaktadır (79). Bu nedenle bu kalıtsal bozukluklara neden olan genleri taşıyan taşıyıcıların damızlıktan çıkarılması popülasyondan mutant genin eradike edilmesini sağlamakla birlikte verim artışı gibi aranan özellikleri determine eder ve bu genlerinde sürüden uzaklaştırılmasına neden olabilir. Dolayısıyla, kalıtsal hastalığa neden olan genlerin kontrolünde bu genlerin tamamen ortadan kaldırılması bir seçenek olabilir. Bu amaçla, özellikle sığır yetiştiriciliğinde verim kayıplarına neden olan kalıtsal hastalıkların kontrol altında tutulabilmesi için kalıtsal hastalığa sebep olan mutant gen yönünden mevcut damızlıklarda, özellikle dişi damızlıklarda geniş tarama yapılması gereklidir. Bu nedenle erkek damızlıkların CVM yönünden genetik durumlarının belirlenmesi ve taşıyıcıların damızlıktan çıkarılması, dişi damızlıklarında CVM durumları belirlenerek olası taşıyıcı/taşıyıcı çiftleştirilmesi engellenerek hasta yavru doğması önlenmelidir.

Uygun primerlerle elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi olarak tanımlanan polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) mutasyonların saptanması için güvenilir bir yöntemdir (79). Holştaynlarda CVM taşıyıcılarının belirlenmesi amacıyla değişik yöntemler geliştirilmiştir. Kalıtsal bozukluk olarak CVM'nin ilk olarak belirlenmesinden 2001 yılına kadar farklı RFLP metotları mutant alleli taşıyan bireylerin belirlenmesinde kullanılmıştır (85). Kanae ve ark. (2005) alternatif bir PCR-RFLP yöntemi geliştirilmişlerdir (79).

Japonya'da Ghanema ve ark. (2007) CVM tanısı için geliştirdikleri bir allel spesifik-PCR (AS-PCR) testi ile yabani tip ve CVM allelleri ayırt etmeyi başarmışlardır (79). Bu yöntem ile incelenen 200 hayvandan 26'sının (%13,0) CVM taşıyıcısı olduklarını belirlemişlerdir (79). Ruoeæ ve ark. (2007) özellikle büyük hayvan popülasyonlarında CVM'nin tanısının daha kolay yapılabilmesi amacıyla bilinen nokta mutasyonlarının tanısında kullanılabilecek bir single-stranded conformation polymorphism (SSCP) yöntemi geliştirmişlerdir (83). Rezaee ve ark. (2009) İran'da yetiştirilen Holştayn ırkı 144 baş damızlık boğanın CVM durumlarının PCR-SSCP yöntemini ile araştırmışlar ve incelenen hayvanlar arasında taşıyıcılara rastlamamışlardır (23). Chu ve ark. (2008) Çin'de PCR-SSCP yöntemini kullanarak CVM hastalığının tanısı amacıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışmada 68 risk grubu boğada 10 (%14,7), 602 risk grubu inekte 282 (%46,84) CVM taşıyıcı hayvan tespit etmişlerdir (88).

Türkiye'de yetiştirilen Holştaynlarda CVM allelinin belirlenmesine yönelik ilk çalışma 2007 yılında Kepenek tarafından 21 baş damızlık Holştayn boğa kullanılarak yapılmıştır (80). Bu çalışmada incelenen hayvanlarda taşıyıcılara rastlanılmamıştır (96). Kepenek tarafından yapılan bu çalışmada incelenen örnek sayısının azlığı nedeniyle elde edilen verilerin Türkiye Holştayn popülasyonunun CVM durumu hakkında bir bilgi vermek için yeterli olmadığı düşünülmüştür. Meydan ve ark. (2010) 2007-2009 yılları arasında Ankara ve Şanlıurfa'daki mezbahalardan topladıkları 350 baş Holştayn örnekten 12'sinin CVM taşıyıcısı olduğunu ve incelenen örnekler içerisinde taşıyıcıların oranının % 3.4 olduğunu bildirmişlerdir (97). Bu oranın daha önce CVM taşıyıcılarının bulunduğu bildirilen Danimarka (% 31.0) (90), Polonya (% 24.8) (83), Japonya (% 32.5) (92), İsveç (% 23.0) (78), ve Almanya (% 13.2) (97) gibi ülkelerdeki ile karşılaştırıldığında çok düşük olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada ise Kayseri ilinde yetiştirilen dişi 150 baş Holştayn incelenmiş ve taşıyıcı bireylere rastlanılmamıştır. Fakat Türkiye’de Holştayn popülasyonunun oluşmasında gerek damızlık hayvan gerekse sperma ithal edilen ülkelerde bu kalıtsal bozukluğa neden olan mutant allele rastlanılmıştır (81, 85, 90). Bu neden ile Türkiye Holştayn popülasyonunun CVM durumunun kesin olarak belirlenebilmesi için daha çok ve farklı şehirlerdeki Holştayn’lardan örneklerin incelenmesi gereklidir. Çünkü CVM taşıyıcılarının belirlendiği ülkelerde, çok sayıda birey veya CVM klinik görünümünün gösteren yavrulara sahip hayvanlar incelenmiştir (23, 85). Bu sayede Holştayn popülasyonlarında CVM’ye neden olan mutant alelin allel frekansı hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

Bu kalıtsal hastalığın ilk olarak belirlendiği 2000’li yılların başından bu yana, mevcut Holştayn popülasyonlarında CVM hastalığına sebep olan mutant alelin varlığını belirleyen ülkeler CVM taşıyıcı sıklığını azaltmak için damızlıklarda tarama programları hazırlamışlardır. Buna rağmen Polonya (98) ve Japonya’da (92) 2007 ve 2008 yıllarında yapılan taramalarda CVM allel frekansının hala yüksek olduğu görülmüştür.

Türkiye’de yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlarda BLAD, CVM ve DUMPS gibi kalıtsal hastalıklara ait klinik vakaların gerçek sayısı bilinmemektedir. Fakat bu hastalıklar yönünden taşıyıcılarının bulunması demek dikkatli bakıldığında bu kalıtsal hastalıklar yönünde homozigot bireylerin görülebileceği anlamına gelmektedir.

Bu çalışma Türkiye’deki Holştayn popülasyonunda CVM’ye sebep olan mutant alelin varlığının araştırılması ve ileride Türkiye’deki damızlıkların CVM yönünden taranabilmesi için rutin kullanımda uygulanabilir bir yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonunda incelenen bireyler arasında taşıyıcı bireylere rastlanılamamasının sebebinin örnek sayısının azlığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Ancak çalışmada kullanılan yöntemin ileride damızlıkların CVM alleli yönünden incelenmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Akyüz B, Ertuğrul O. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Turkish native and Holstein cattle. *Acta Vet Hung* 2006; 54: 173-178.
2. Jánosa Á, Baranyai B, Dohy J. Comparison of milk production of the progeny of BLAD-carrier and healthy Holstein bulls in Hungary. *Acta Vet Hung* 1999; 47(3): 283-289.
3. Distl O. The use of molecular genetics in eliminating of inherited anomalies in cattle. *Arch Tierz Dummerstorf* 2005; 48(3): 209-218.
4. Kehril MK, Ackermann MR, Schuster DE, et al. Animal model of human disease, bovine leukocyte adhesion deficiency, β_2 integrin deficiency in young Holstein cattle. *Cornell Vet* 1992; 82: 103-109.
5. Mukhopadhyaya PN, Jha M, Muraleedharan P, et al. Simulation of normal, carrier and affected controls for large-scale genotyping of cattle for factor XI deficiency. *Genet Mol Res* 2006; 5 (2): 323-332.
6. Healy PJ. Testing for undesirable traits in cattle: an Australian perspective. *J Anim Sci* 1996; 74: 917-922.

7. Gentile A, Testoni S. Inherited disorder of cattle: a selected review. *Slov Vet Res* 2006; 43(1): 17-29.
8. Ackermann MR, Kehril ME, Morfitt DC. Ventral dermatitis and vasculitis in a calf with bovine leukocyte adhesion deficiency. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 413-415.
9. Başaran N. Tıbbi Genetik. (Altıncı Baskı), Bilim Teknik Yayınevi, İstanbul 1996; ss 49.
10. Citek J, Rehout V, Hajkova J, Pavkova J. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Vet Med Czech* 2006; 51(6): 333-339.
11. Akyüz B, Ertuğrul O. Türkiyede Holştıyan ve yerli sığırlarda üridin monofosfat senteaz eksikliğinin (DUMPS) belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2008; 55: 57-60.
12. Agerholm S, Bendixen C, Andersen O, Arnbjerg J. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13: 283-289.
13. Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, et al. A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomics* 2000; 68: 229-236.
14. Batt CA, Wagner P, Wiedmann M, Luo J, Gilbert R. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency by nonisotopic ligase chain reaction. *Anim Genet* 1994; 25: 95-98.
15. Kehrlı M, Shuster DE, Ackerman MR. Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle. *Cornell Vet* 1992; 82: 103-9.
16. Craznik U, Grzybowski G, Kaminski S, Prusak B, Zabolewicz T. Effectiveness of a program aimed at the elimination of BLAD-carrier bulls from Polish Holstein-Fresien cattle. *Vet Rec* 2007; 43: 56-70.
17. Nagahata H, Kehril ME, Murata H, et al. Neutrophil function and pathologic findings in Holstein calves with leukocyte adhesion deficiency. *Am J Vet Res* 1994; 55: 40-48.
18. Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, et al. The leukocyte integrins. *Adv Immunol* 1989; 46: 149-182.

19. Schuster DE, Kehril ME, Ackermann MR, Gilbert RO. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 9225-9229.
20. Akyüz B, Ertuğrul O. Holştayn sığırlarında sığır lökosit bağlanma noksanlığı (SLBN) ve tanı yöntemleri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2006; 3(1): 57-60.
21. Olchoway TWJ, Bochsler PN, Welborn MG. Clinopathological findings in a Holstein calf with peripheral leukosytosis and leukocyte adhesion deficiency. *Can Vet J* 1994; 35: 242-243.
22. Schwenger W, Schöber S, Simon D. DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. *Genomics* 1993; 16: 241-244.
23. Rezaee AR, Nassiry MR, Sadeghi B, et al. Implication of complex vertebral malformation and deficiency of uridine monophosphate synthase on molecular-based testing in the Iranian Holstein bulls population. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2009; 8 (22): 6077-6081.
24. Patel RK, Singh KM, Soni KJ, Chauhan B, Sambasiva RKRS. Lack of carriers of citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. *J Appl Genet* 2006; 47(3): 239-242.
25. Nicholas FW. Genetics of morphological traits and inherited disorders. In: Fries R, Ruvinsky A. (eds), *The genetics of cattle*, CABI Publishing, Wallingford UK 1999; pp 55-76.
26. Ghanem ME, Nakao T, Nishibori M. Deficiency of uridine monophosphate synthases (DUMPS) and X-chromosome deletion in fetal mummification in cattle. *Anim Reprod Sci* 2006; 91: 45-54.
27. Kaminski S, Grzybowski G, Prusak B, Rusc A. No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle. *J Apply Genet* 2005; 46(4): 395-397.
28. Akyüz B, Ertuğrul O. Türkiye’de Holştayn ve yerli sığırlarda üridin monofosfat senteaz eksikliğinin (DUMPS) belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2008; 55: 57-60.

29. Akyüz B, Kul BÇ. Türkiye’de Holştayn ırkı ineklerde üridin monofosfat sentez eksikliğinin (DUMPS) belirlenmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2009; 56: 231-232.
30. Gundlach AL. Disorder of the inhibitory glycine receptor inherited myoclonus in Poll Hereford calves. FASEB J 1990; 4: 2761-2767.
31. Pierce KD, Handford CA, Morris R, et al. A nonsense mutation in the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor associated with bovine myoclonus. Mol Cell Neurosci 2001; 17: 354-363.
32. Healy PJ, Dennis JA, Windsor PA, Pierce KD, Schofield PR. Genotyping cattle for inherited congenital myoclonus and maple syrup urine disease. Aust Vet J 2002; 80(11): 695-697.
33. Dennis JA, Healy PJ, Beaudet AL, O’Brien WE. Molecular definition of bovine argininosuccinate synthase deficiency. Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 7947-7951.
34. Harper PA, Healy PJ, Dennis JA, Obrine JJ, Rayward DH. Citrullinaemia as a cause of death in neonatal Friesian calves. Aust Vet J 1986; 63: 378.
35. Inaba M, Yawata A, Koshino I, et al. Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. J Clin Invest. 1996; 97(8): 1804-1817.
36. Agerholm JS. Inherited disorders in Danish cattle. APMIS Suppl 2007; 122 (115): 1-76.
37. Andresen E, Basse A, Brummerstedt E. Lethal trait A 46 in cattle. Additional genetic investigations. Nord Vet Med 1974; 26: 275-278.
38. Andresen E, Flagstad T, Basse A. Evidence of lethal trait A 46 in Black Pied Danish cattle of Friesian descent. Nord Vet Med 1970; 22: 473-485.
39. Machen M, Montgomery T, Holland R, et al. Bovine hereditary zinc deficiency: lethal trait A46. J Vet Diagn Invest 1996; 8: 219-27.
40. Okada K, Ishikawa N, Fujimori K, et al. Abnormal development of nephrons in claudin -16- defective Japanese Black cattle. J.Vet.Med.Sci. 2005; 67(2): 171-178.

41. Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Asahina S, et al. Homozygosity mapping of the locus responsible for renal tubular dysplasia of cattle on bovine Chromosome 1. *Mammalian Genome* 2000; 11: 316-319.
42. Hirano T, Hirotsune S, Sasaki S, et al. A new deletion mutation in bovine claudin-16 (CL-16) deficiency and diagnosis. *Animal Genetics* 2002; 33: 118-122.
43. Brush PJ, Anderson PH, Gunning RF. The identification of factor XI deficiency in Holstein-Friesian cattle in Britain. *Vet Rec* 1987; 121: 14-17.
44. Ohba Y, Takasu M, Nishii N, et al. Pedigree analysis of factor XI deficiency in Japanese black cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 2008; 70(3): 297-299.
45. Marron BM, Robinson JL, Gentry PA, Beever JE. Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstaysn cattle. *Anim Genet* 2004; 35(6): 454-456.
46. Gurgul A, Rubioe D, Słota E. Identification of carriers of the mutation causing coagulation factor XI deficiency in Polish Holstein-Friesian cattle. *J Appl Genet* 2009; 50(2): 149-152.
47. Citek J, Rehout V, Vecerek L, Hajkova J. Genotyping glycogen storage disease type II and type V in cattle reared in the Czech Republic. *J Vet Med* 2007; 54: 257-259.
48. Jhonstone AD, McSporran KD, Kenny JE, et al. Myophosphorylase deficiency (glycogen storage disease Type V) in a herd of Charlolais cattle in New Zealand: Conformation by PCR-RFLP testing. *N Z Vet J* 2004; 52(6): 404-408.
49. Soethout EC, Verkaar ELC, Jansen GH, Müller KE, Lenstra JA. A direct Styl polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) test for the myophosphorylase mutation in cattle. *J Vet Med* 2002; 49: 289-290.
50. Houweling PJ, Cavanagh JAL, Palmer DN, et al. Neuronal ceroid lipofuscinosis in Devon cattle is caused by a single base duplication (c.662dupG) in the bovine *CLN5* gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1762: 890-897.
51. Martinus RD, Harper PA, Jolly RD, et al. Bovine ceroid-lipofuscinosis (Batten' s disease): the major component stored is the DCCD-reactive proteolipid, subunit C, of mitochondrial ATP synthase. *Vet Res Commun* 1991; 15(2): 85-94.

52. Harper PAW, Walder KH, Healy PJ. Neurovisceral ceroid-lipofuscinosis in blind Devon cattle. *Acta Neuropathol (Berl)* 1988; 75: 632-636.
53. Jolly RD, Gibson AJ, Healy PJ, Slack PM, Birtles MJ. Bovine ceroid lipofuscinosis: pathology of blindness. *N Z Vet J* 1992; 40: 107-111.
54. Hocking JD, Jolly RD, Batt RD. Deficiency of α -mannosidase in Angus cattle: an inherited lysosomal storage disease. *Biochem J* 1972; 128: 69-78.
55. Berg T, Healy PJ, Tollersrud OK, Nilssen O. Molecular heterogeneity for bovine α -mannosidosis: PCR based assays for detection of breed-specific mutations. *Res Vet Sci* 1997; 63: 279-282.
56. Berg T, Tollersrud OK, Walkley SU, Siegel DA, Nilssen O. Purification of feline lysosomal α -mannosidase, determination of its cDNA sequence and identification of a mutation causing α -mannosidosis in Persian cats. *Biochem J* 1997; 328: 863–870.
57. Tollersrud OK, Berg T, Healy PJ, et al. Purification of bovine lysosomal α -mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause α -mannosidosis. *Eur J Biochem*, 1997; 46: 410-419.
58. Hanset R, Michaux C. On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. *Genet Sel Evol* 1985; 17: 359-368.
59. Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, et al. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mammalian Genome* 1998; 9: 210-213.
60. Rollins WC, Tanaka M, Nott CFG, Thiessen RB. On the mode of inheritance of double muscled conformation in bovine. *Hilgardia Oakland* 1972; 1: 433-456.
61. Charlier C, Coppieters W, Farnir F, et al. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2 *Mammalian Genome* 1995; 6: 788-792.
62. Ayers J, Leipod HW, Padgett GA. Lesion in Brangus cattle with Chediak-Higashi syndrome. *Vet Pathol* 1988; 25: 432-436.
63. Padget GA, Reiquam CW, Gorham JR, Henson JB, O'mary CC. Comparative studies of the Chediak-Higashi syndrome. *Am J Pathol* 1967; 51: 553-571.

64. Shiraishi M, Ogawa H, Ikeda M, Kawashima S, Ito K. Platelet dysfunction in Chediak-Higashi syndrome-affected cattle. *J Vet Med Sci* 2002; 64(9): 751-760.
65. Kunieda T, Ide H, Nakagiri M, Yoneda K, Konfortov B. Localization of the locus responsible for Chediak-Higashi syndrome in cattle to bovine chromosome 28. *Anim Genet* 1999; 86: 591-594.
66. Dennis JA, Healy PJ. Definition of the mutation responsible for maple syrup urine disease in Poll Shorthorns and genotyping Poll Shorthorns and Poll Herefords for maple syrup urine disease alleles. *Res Vet Sci* 1999; 67(1): 1-6.
67. Zhang B, Healy PJ, Zhao Y, Crabb DW, Harris R. Premature translation termination of the pre-E1 α subunit of the branched chain α -ketoacid dehydrogenase as a cause of maple syrup urine disease in polled Hereford calves. *J Biol Chem* 1990; 265(5): 2425-2427.
68. Yeaman S. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes recent advances. *Biochem J* 1989; 257: 625-632.
69. El-Hamidi M, Leipold HW, Vestweber JG, Saperstein G. Spinal muscular atrophy on Brown Swiss calves. *J Vet Med* 1989; 36: 731-738.
70. Smitt PAE, de Jong JMB. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis and the spinal muscular atrophies. *J Neurolog Sci* 1989; 91: 231-258.
71. Troyer D, Cash WC, Vestweber J, Hiraga T, Leipold HW. Review of spinal muscular atrophy (SMA) in Brown Swiss cattle. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 303-306.
72. Joerg H, Muntwyler J, Glowatzki-Mullis ML, et al. Bovine spinal muscular atrophy: *AFG3L2* is not a positional candidate gene. *J Anim Breed Genet* 2005; 122: 103-107.
73. Laponten JM, Lachance S, Steffen DL. Tibial hemimelia meningocele and abdominal hernia in Shorthorn cattle. *Vet Pathol* 2000; 37: 508-511.
74. Ojo SA, Guffy MM, Saperstein G, Leipold HW. Tibial hemimelia in Galloway calves. *J Am Vet Med Assoc* 1974; 165(6): 548-550.

75. Drögemüller C, Leeb T, Harlizius B, et al. Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (*LRP4*). BMC Genetics 2007; 8(5): 1-12.
76. Ricketts MH, Pohl V, de Martynofft G, et al. Defective splicing of thyroglobulin gene transcripts in the congenital goitre of the Afrikaner cattle. The EMBO Journal 1985; 4(3): 731-737.
77. Agerholm JS, Andersen O, Almskou MB, et al. Evaluation of the inheritance of the complex vertebral malformation syndrome by breeding studies. Acta Vet Scand. 2004; 45: 133-137.
78. Berglund B, Persson A, Stålhammar H. Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle. Acta Vet Scand. 2004; 45: 161-165.
79. Ghanem ME, Akita M, Suzuki T, et al. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. Animal Reproduction Science 2008; 103: 348-354.
80. Ghanem ME, Suzuki T, Akita M, et al. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. Can Vet J 2009; 50: 389-392.
81. Nagahata H, Nishiyama T, Kanae Y, et al. A retrospective survey of the prevalence of complex vertebral malformation carriers in 9 Holstein dairy herds in Hokkaido, Japan. J. Vet Med Sci 2009; 71(6): 793-795.
82. Logar B, Kavar T, Meglič V. Detection of recessive mutations (CVM, BLAD and red factor) in Holstein bulls in Slovenia. Journal of Central European Agriculture 2008; 9: 101-106.
83. Ruoeæ A, Kaminski S. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls. J Appl Genet 2007; 48(3): 247-252.
84. Rezaee AR, Nassiry MR, Valizadeh R, et al. Study of complex vertebral malformation disorder in Iranian Holstein bulls. World Journal of Zoology 2008; 3 (2): 36-39.

85. Schütz E, Scharfenstein M, Brenig B. Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based testing on disease frequency in the Holstein population. *J Dairy Sci* 2008; 91: 4854-4859.
86. Thomsen B, Kraemer Andersen PK, Veng L, et al. Molecular cloning and mutational analysis of the porcine nucleotide-sugar transporter *SLC35A3*, 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Brasil, Belo Horizonte 13-18 August 2006.
87. Andersen PK, Veng L, Juul-Madsen HR, et al. Gene expression profiling, chromosome assignment and mutational analysis of the porcine golgi-resident UDP-N-Acetylglucosamine transporter *SLC35A3*. *Molecular Membrane Biology* 2007; 24(5-6): 519-530.
88. Chu Q, Sun D, Yu Y, et al. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 228-230.
89. Kanaei Y, Endoh D, Nagahata H, et al. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 258-262.
90. Hirano T, Hirotsume S, Thomsen B, et al. A missense mutation in the bovine *SLC35A3* gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter causes complex vertebral malformation. *Genome Res* 2006; 16: 97-105.
91. Agerholm JS, Bendixen C, Arnbjerg J, et al. Morphological variation of “complex vertebral malformation” in Holstein calves. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 548-553.
92. Nagahata H, Oota H, Nitani A, et al. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. *J Vet Med Sci* 2002; 64(12): 1107-1112.
93. VanRaden PM, Miller RH. Effects of nonadditive genetic interactions, inbreeding, and recessive defects on embryo and fetal loss by seventy days. *J Dairy Sci* 2006; 89: 2716-2721.
94. Nielsen US, Aamanda GP, Andersen O, et al. Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. *Livestock Production Science* 2003; 79: 233-238.

95. Kanae Y, Endoh D, Nagahata H, Hayashi M. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17:258-262.
96. Kepenek EŞ. Polymorphism of Prolactin (PRL), Diacylglycerol acyltransferase (DGAT-1) and bovine solute carrier family 35 member 3 (*SLC35A3*) genes in native cattle breeds and its implication for Turkish cattle breeding, Ph. D. Thesis, University of Middle East Technique, Department of Biological Sciences, Ankara 2007; pp 4-17.
97. Meydan H, Yildiz MA, Agerholm JS. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2010; 52: 56.
98. Duncan RBJ, Carrig CB, Agerholm JS, Bendixen C. Complex vertebral malformation in a Holstein calf: Report of a case in the USA. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13: 333-336.
99. Revell S. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. *Vet Rec* 2001; 149: 659-660.
100. Wouda W, Visser IJ, Borst GH, et al. Developmental anomalies in aborted and stillborn calves in The Netherlands. *Vet Rec* 2000; 147: 612.

ÖZGEÇMİŞ

Gevher Nesibe KULAKLI. 1985 yılında K.Maraş’da doğdu. 1991-1999 yılları arasında Yüzüncü Yıl İlköğretim Okulu, Yıldırım Beyazıt İlköğretim Okulu ve Mimar Sinan İlköğretim Okulu’nda ilk ve orta dereceli öğrenimini tamamladı. 1999 yılında Çukurova Elektrik Anadolu Lisesi’ni kazandı ve lise öğrenimini burada tamamladı. 2003 yılında lise öğrenimi sonrası Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı. 2008 yılında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden dönem ikincisi olarak mezun oldu. 2008 yılı güz döneminde Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Zootečni Bölümünde Yüksek Lisans Programı’na girdi ve halen devam etmektedir.

İletişim Bilgileri

Adres : İstiklal Mah. 15.Sok. Villakent Sitesi No: 51/ K.Maraş
Telefon : 0 344 215 94 81- 0344 236 53 90
Fax : 0 344 236 53 93
Cep : 0 538 785 85 80
E-mail : nesibekulakli@gmail.com

**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 09/09/2009

Toplantı Sayısı: 09

Karar No: 09/54

Etik kurul toplantısı

09/09/2009

tarikhinde Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik

Kurul Başkanlığı'nda

Prof. Dr. Zübeyde GÜNDÜZ

başkanlığında gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Harun Ülger	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç.Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yard.Doç.Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun Tez	Doç.Dr.	Fen Edebiyat Fakültesi	
M. Betül Ayycan	Yrd. Doç.Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör	Tıp Fakültesi Biyoistatistik	
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		
Halil Tekiner	Eczacı		

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doc.Dr. Bilal Akyüz'ün "Kayseri ve Civarında Yetiştirilen Holştayn Sığırlarında Kompleks Vertebral Malformasyon Hastalığına Neden Olan SLC35A3 Genin Allel Frekansının Belirlenmesi" adlı araştırması incelenerek, çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

Tarih : 09/09/2009

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Zübeyde GÜNDÜZ

Etik Kurul Başkanı İmzası

